

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

KIKIRDAK İYİLEŞMESİNDE AMNİYON SIVISI İLE
YÜKSEK MOLEKÜL AĞIRLIKLİ HİYALURONİK
ASİTİN KARŞILAŞTIRILMASI

Uzmanlık Tezi

Dr. Mehmet Emre BAKİ

Trabzon - 2008

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

KIKIRDAK İYİLEŞMESİNDE AMNİYON SIVISI İLE
YÜKSEK MOLEKÜL AĞIRLIKLİ HİYALURONİK
ASİTİN KARŞILAŞTIRILMASI

Uzmanlık Tezi

Dr. Mehmet Emre BAKİ

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Servet KERİMOĞLU

Trabzon - 2008

GİRİŞ VE AMAÇ

Osteoartrit; en sık görülen eklem hastalığı olup, ilerleyici kıkırdak hasarı ile seyreder. Günümüzde osteoartrit için kesin bir tedavi yöntemi bulunamamıştır. Temel patoloji olan ilerleyici kıkırdak hasarını azaltmak için çalışmalar devam etmektedir.

Çalışmaların büyük çoğunluğu deneysel osteoartrit modeli oluşturulmuş hayvanlar üzerinde yapılmıştır. Çeşitli deney hayvanlarında değişik metodlar uygulandığında ne kadar sürede ve ne seviyede kıkırdak hasarı olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (1).

Tedavide, osteoartrit oluşumunu önleyecek, durduracak etkenler henüz yeterli seviyeye ulaşmamıştır. Uygulamada temini kolay; tedavide etkin materyallere gereksinim vardır.

Hiyaluronik asitin kıkırdak iyileşmesi ve osteoartrit ilerleme hızı üzerine olan olumlu etkileri bilinmekte olup, günümüzde osteoartrit tedavisinde yaygın şekilde kullanılmaktadır (2,3).

İnsan amniyon sıvısının içeriğindeki hiyaluronik asit, HASA (Hiyaluronik asit uyarıcı aktivatör), kondroitinsülfat, dermatan sülfat gibi mukopolisakkaritler ve FGF (Fibroblast büyüme faktörü), EGF (Epidermal büyüme faktörü), IGF-I (İnsülin benzeri büyüme faktörü 1), IGF-2 (İnsülin benzeri büyüme faktörü 2) gibi büyüme faktörleri vasıtasıyla yara, tendon, sinir ve kemik doku iyileşmesi üzerine olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir (4,5,6,7,8). Bu nedenle; insan amniyon sıvısının osteoartritteki kıkırdak hasarının önlenmesinde ve kıkırdak iyileşmesinde hiyaluronik asite alternatif bir tedavi seçeneği olabileceği düşünülerek deneysel çalışma planlandı.

Bu çalışmada; ratlar üzerinde oluşturulan deneysel osteoartrit modelinde, amniyon sıvısı ile yüksek molekül ağırlıklı hiyaluronik asitin osteoartrit ilerleme hızına ve kıkırdak iyileşmesine olan etkilerinin karşılaştırılması amaçlandı.

Çalışmada önce konu ile yakın ilgisi olan kıkırdak yapısı, osteoartrit patofizyolojisi, hiyaluronik asit ve amniyon sıvısına ait genel bilgilere kısaca değinildi. Daha sonra üzerinde çalışılan materyal ve uygulanan yöntemler açıklandı, bulgular sıralandı ve tartışmadan sonra elde edilen sonuçlar verildi. Metinde geçen tıpla ilgili kelimeler Türkçe okunduğu gibi, özel isimler ise olduğu gibi yazıldı.

GENEL BİLGİLER

A) Eklem Kıkırdağı:

Eklem kıkırdağı birkaç milimetrelik kalınlığına rağmen olağanüstü mekanik özelliklere ve dayanıklılığa sahiptir. Eşsiz yapısı ve bileşimi ile eklemlere düşük sürtünmeli, yüksek kayganlıkta, şok emici ve yıllar boyunca tekrarlayan yüklere dayanıklı bir yüzey sunar (9).

Göreceli olarak düşük metabolik aktivitesine ve üzerindeki ağır fiziksel etkilere rağmen fonksiyonlarını insan ömrü boyunca sürdürebilir (9).

Kıkırdak Çeşitleri:

Ara maddedeki kollajen liflerin özelliklerine göre 3 tip kıkırdak dokusu vardır (10).

- 1- Hiyalin kıkırdak; en sık görülen tiptir, matriksinde tip 2 kollajen fazladır.
- 2- Elastik kıkırdak; matriksinde tip 2 kollajene ek olarak bol miktarda elastik lif vardır. Daha esnek ve bükülebilir özelliktedir.
- 3- Fibröz kıkırdak; vücudun büyük zorlanmalar ile karşı karşıya kaldığı yerler ile ağırlık taşıyan bölgelerde bulunur. Ağ şeklinde örülmüş tip1 kollajen lifleri içerir.

Eklem kıkırdağı çoğunlukla özelleşmiş hiyalin kıkırdak yapısındadır (9,11). Mikroskobik olarak ana bileşeni matrikstir. Bu madde eklem kıkırdağının yapısındaki tek hücre tipi olan kondrositleri çevreler. Matriksin yapısında su, kollajen, proteoglikanlar, glikoproteinler ve çeşitli proteinler bulunur (9).

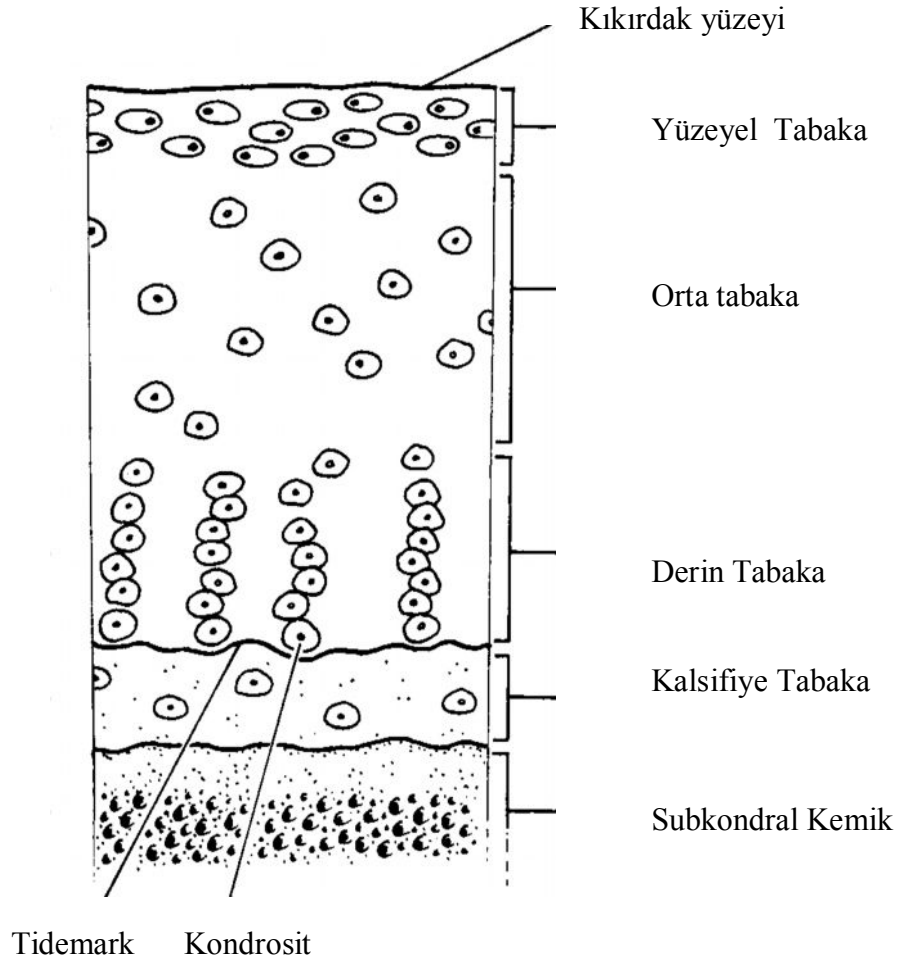
Kıkırdak doku hacminin %95'ini matriks, %5'ini ise kondrositler oluşturur (11). Kondrositlerin asıl görevi; eşsiz yapıdaki matriksin sentezinin, idamesinin ve yapımı ile yıkımı arasındaki dengenin sağlanmasıdır (11,12).

Eklem kıkırdağı kan damarlarından, lenfatiklerden ve sinir dokusundan yoksundur (9,11,13). Bu nedenle kendisi için gerekli olan besin maddelerini ve oksijeni difüzyon ile sinoviyal sıvıdan sağlar (10).

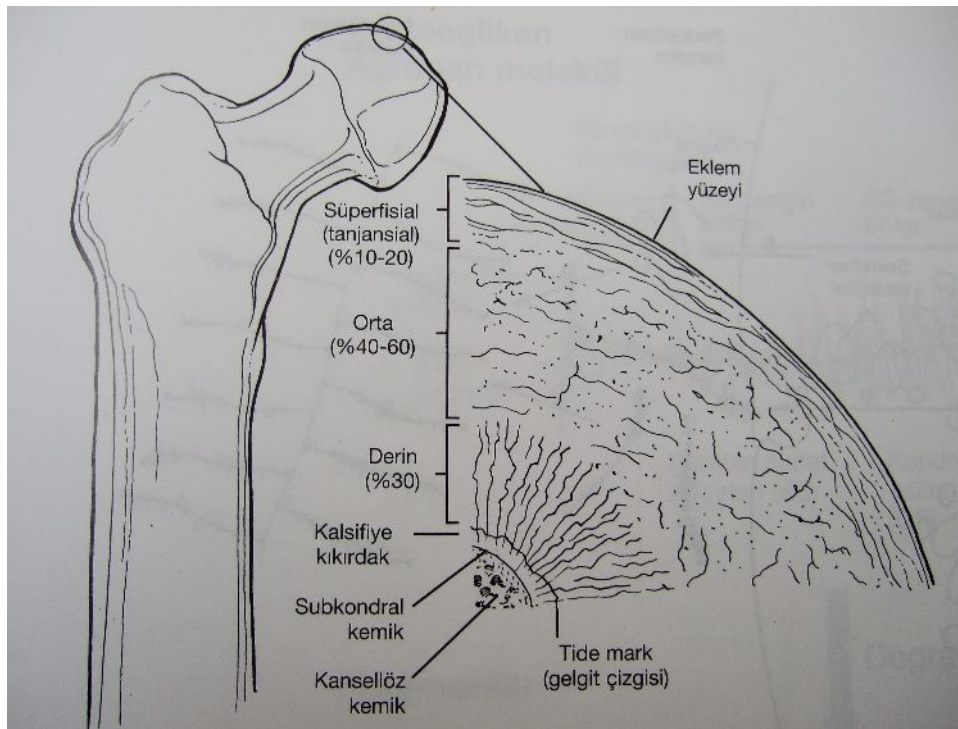
Eklem kıkırdağı yapı ve içerik olarak birbirinden farklı dört tabakadan oluşur (9,11,12). (Şekil 1) (12).

- 1- Yüzeysel tabaka
- 2- Orta (Geçiş tabakası) tabaka
- 3- Derin tabaka
- 4- Kalsifiye tabaka

Bütün bu tabakalarda; kollajen liflerin şekli, boyutu, dizilimi, kondrositlerin şekilleri, matriksin proteoglikan ve su içerikleri değişiklik gösterir (9). (Şekil 2) (14).



Şekil 1: Eklem kıkırdağının farklı tabakalarındaki hücre düzeni.



Şekil 2: Eklem kıkırdağının farklı tabakalarındaki kollajen liflerin yerleşimi.

1-Yüzeysel Tabaka

Bu tabaka hacim olarak en küçük kıkırdak tabakasıdır (11). En üst kısmında 3 mikron kalınlığında hücre içermeyen lamina splendens adı verilen bir bölüm vardır (12). Bir ila üç kondrosit tabakasından oluşur. Yüzeysel tabakada kollajen lifler yüzeye paralel olarak uzanırlar, kondrositler yapı olarak yassılaştırmışlardır ve yüzeye paralel olarak dizilirler (9,15). Bu nedenle yüzeysel tabaka kompresyon kuvvetlerinden çok, horizontal makaslama kuvvetlerinin karşılanmasında görev alır (15).

Buradaki kondrositler en bilineni lubrisin olan bazı kayganlaştırıcı proteinler üretip, eklem aralığına salgılayarak, kıkırdaktaki sürtünmeyi ve aşınmayı azaltırlar (13,15).

Yüzeysel tabaka matriksi; proteoglikan oranı en düşük, su oranı ise en yüksek matrikstir (9,12).

2-Orta Tabaka

Hacim olarak kıkırdağın en büyük tabakasıdır. Daha geniş ve düzensiz şekilde yerleşmiş kollajen liflerin yanında buradaki hücreler yuvarlak yapıdadır. Elektron mikroskopik görüntülerde bu bölgelerdeki kondrositlerin daha büyük endoplazmik retikuluma, Golgi cismine ve mitrokondrilere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu özellik metabolik olarak daha aktif hücre yapısı ile uyumludur (9,11). Bu tabakadaki hücreler baskı altında hacimlerini %40 oranında azaltabilirken, kollajen lifler de kompresyon kuvvetlerinin geliş yönüne göre uyum gösterebilirler. Bu yapı çarpma kuvvetlerinin hızlarının azaltılmasında ve ortaya çıkan enerjinin emilmesinde bir yastık görevi görerek; kıkırdağın dayanıklılığına katkı sağlar (15).

3-Derin Tabaka

Bu bölgedeki kollajen lifleri diğer tabakalardakine göre daha geniştir ve lifler eklem yüzeyine dik şekilde yerleşmişlerdir. Proteoglikan yoğunluğu en yüksek, su yoğunluğu en az olan bölgedir. Hücreler yuvarlak yapıdadır, yüzeye dik şekilde ikişerli ve dörderli kolonlar oluşturacak şekilde yerleşmişlerdir. Hücrelerin oluşturduğu bu yapıya kondron adı verilir (9,11,12,15). Kondronlar ve kollajen lifler yüzeye dik olarak yerleştiğinden; bu tabakanın vertikal kompresyon kuvvetlerinin karşılanmasındaki önemi büyüktür (15).

4-Kalsifiye Tabaka

Subkondral kemiğin hemen üzerindeki tabakadır. Derin tabakadan tidemark denilen su içeriği fazla bazofilik bir kısım ile ayrılır. Bu sert bölge alttaki kemikten gelen besleyici damarların geçişini engeller. Bu tabakada hücreler daha küçüktür ve sadece birkaç organel içerirler (9,12,15). Alttaki kemik doku ile biyomekanik bağlantıyı sağlamak esas görevidir (15).

Kondrositler:

Eklem kıkırdağındaki tek hücre tipidirler. Bütün kondrositler kendi ürettikleri matriks tarafından çevrilmişlerdir (9). Hücreler matriks içinde kendilerine ait boşluklarda bulunurlar. Hücre ve yerleştiği bu boşluğa laküna adı verilir. Hücreleri çeviren matriks ana matriksten tip 4 kollajenden oluşan bir ağ ile keskin bir şekilde ayrılır (15).

Kondrositler mezenşimal hücre kökenlidirler. Temel görevleri matriksin sentezini, şekillenmesini ve yapım yıkım dengesini ayarlamaktır (12). İskelet büyümesi tamamlandıktan sonra nadiren bölünürler, metabolik olarak aktiftirler ve çevresel uyarılara, büyüme faktörlerine, interlökinlere, değişik farmakolojik maddelere yanıt verebilirler. Mekanik yüklere, hidrostatik ve osmotik basınç değişikliklerine karşı duyarlıdır (9).

Kıkırdak dokusunun damarlanması olmadığından, hücreler gerekli besin maddelerini difüzyon ile sağlarlar. Matriks içinde bulunmaları ve hücre-hücre temasının çok az olması difüzyon için elverişli bir ortam sunar (9).

Kondrositlerin enerji kaynağının tespiti ile ilgili çalışmalarda; bu hücrelerin uygun şartlar altında aerobik ve heksoz monofosfat şant yollarını kullanabildikleri fakat enerjinin çoğunun anaerobik yol ile meydana geldiği gösterilmiştir (16).

Matriks:

Matriksin miktar olarak en büyük bileşeni sudur. Kollajen ve proteoglikanlar iki ana yük taşıyan moleküldür. Bunların dışında glikoproteinler, değişik proteinler, fosfolipidlerde matriksin yapısında bulunur (9).

Su: Su miktarı kıkırdağın farklı tabakalarında değişik seviyelerdedir. Matriksteki su inorganik sodyum, potasyum ve kalsiyum tuzları içerir. Böylece proteoglikanlardaki (-) yüklü sülfat grupları ile etkileşime girerek eklem kıkırdağına çok önemli biyomekanik özellikler kazandırır (9).

Kollajen: Matriksin ana yapısal molekülleridir. Kondrositler tarafından birçok kollajen tipi sentez edilir (9). Eklem kıkırdağında %95 oranında tip 2 kollajen bulunurken %5 oranında ise tip 6,9,10,11 kollajen bulunur (12,15).

Tüm kollajen lifleri birbirine çapraz kovalan bağlarla bağlı 3 adet polipeptid zincirinden oluşan; üçlü heliks yapısındadır. Elektron mikroskopik görüntülerde birbirlerini çaprazlayan liflerin daha çok tip 2,9,11 kollajen lifleri olduğu ortaya konmuştur. Bu yapı kıkırdağa ekstra bir gerginlik ve üzerine binen yüklere karşı dayanma gücü vermiştir (9,12).

Kollajen lifleri ayrıca; oluşturdukları ağ yapısı ile büyük proteoglikan moleküllerini aralarında hapsederek kıkırdağın şok emici özelliğinin ortaya çıkmasında önemli rol oynarlar (9).

Proteoglikanlar: Kondrositler tarafından sentez edilip matrikse salınırlar. Proteoglikanlar çekirdek proteinlere kovalan olarak bağlanmış kondroitin 4 sülfat, kondroitin 6 sülfat ve keratan sülfat zincirlerinden oluşur. Bu zincirlerde birçok (-) yüklü sülfat ve karboksilaz bulunduğundan matriksteki suyu ve içindeki (+) yüklü Na, K ve Ca iyonlarını çekerler, (-) yüklü kondroitin sülfat ve keratan sülfat zincirleri ise birbirlerini iter (9,12).

Böylece proteoglikanların kollajen ağı içinde hapsolmesi sağlanmış olur ki buda kıkırdağın üstün biyomekanik özelliklerinin ortaya çıkmasında büyük rol oynar (9).

Proteoglikanlar eklem kıkırdağında kollajene bağlı veya kollajen ağları arasında hapsolmüş şekilde bulunabildikleri gibi, bağlayıcı bir protein vasıtasıyla hiyaluronik asite bağlanmış yüzlerce kondroitin ve keratan sülfattan oluşmuş proteoglikan agregatı şeklinde de bulunabilirler (9).

Bu ana bileşenlerin dışında eklem kıkırdağında farklı görevleri olan ve henüz görevi anlaşılamamış birçok değişik madde bulunur.

Bir glikoprotein olan fibronektin yapışmada görev alırken, kondrokalsin kalsiyum bağlanmasında, BMP'ler (Kemik morfogenez protein) ise büyüme faktörü olarak görev alırlar (15).

Matrikste birçok proteaz ve hiyaluronidaz bulunur. Bunlardan lizozim kıkırdağa giren mikroorganizmalara karşı görev alırken, matriksin yapımı ile yıkımı arasındaki dengeyi sağlayan MMP'lerin (Matriks metalloproteaz) en bilinenleri MMP-3, MMP-8, MMP-9 ve MMP-13' tür (15).

B) Osteoartrit Patofizyolojisi:

Osteoartrit, kıkırdağ dokunun uzun yıllar boyunca devam eden yıkımı ile karakterize bir hastalıktır. Normal kıkırdağ dokuda matriks sentezi ve yıkımı arasında hassas bir denge mevcuttur. Bu denge yaşla ve artan kompresyon kuvvetlerinin etkisiyle bozulmaya başlar. Dengenin bozulmasında kondrosit ve sinoviya kaynaklı birçok maddenin rolü vardır (17).

Su, kollajen lifler ve proteoglikanlar matriksin en önemli bileşenleridir. Matriksteki, proteoglikan konsantrasyonunda azalma ve proteoglikan içeriğinde bozulma; osteoartritteki ilk patofizyolojik değişikliklerdendir. Bu değişiklikleri;

matriksin su yoğunluğundaki artma ve sinoviyal sıvıdaki hiyaluronik asit miktarındaki azalma takip eder (17).

Osteoartritte kıkırdak doku üzerine binen yüklerin etkisi ile kondrosit ve sinoviya kaynaklı IL-1 (İnterlökin-1) ve TNF- α (Tümör nekroz faktör- α) sentezinde ve bu sitokinlerin reseptör sayılarında artış olur. IL-1 ve TNF- α hem kendilerinin hem de IL-6 (İnterlökin-6), IL-8 (İnterlökin-8), PGE2 (Prostaglandin E2) gibi kıkırdak hasarını arttırıcı etkileri olan diğer sitokinlerin sentezini uyarır. Eklem sıvısında PGE2 ve LTB4 (Lökotrien B4) konsantrasyonlarında yükselme olur. Tüm bu sitokinlerin etkisiyle MMP-3 (Stromelisin), MMP-2, MMP-9 (Jelatinazlar), MMP-1, MMP-8, MMP-13 (Kollajenazlar) gibi enzimlerin sentezinde ve salınımında artış olur. MMP'ler kendi sentezlerini arttırırken, inhibitörleri olan TIMP-1'in (Metalloproteaz doku inhibitörü) sentezini ise azaltırlar (17).

Osteoartritte IL-1 ve TNF- α vasıtasıyla sentezinde artış olan bir diğer madde de NO'dur (Nitrikoksit). Nitrikoksit de; matrikste kollajen ve proteoglikan sentezini azaltarak, MMP sentezini arttırarak ve özellikle yüzeysel kıkırdak tabakasındaki kondrosit apoptozisini uyararak kıkırdak yıkımındaki bu kısır döngüye yardım eder (17).

Kondrositler bu yıkıma cevap verebilmek için proteoglikan sentezini arttırırlar ancak bu artış yıkımı karşılamada yeterli olmaz. Proteoglikan sentezindeki artış özellikle orta ve derin tabakalarda olduğundan; hasardan ilk etkilenen ve proteoglikan kaybı fazla olan tabaka yüzeysel tabakadır (17).

C) Hiyaluronik asit:

Hiyaluronik asit; glukronik asit ve N-asetil glukozamin içeren disakkarit birimlerinin herhangi bir dallanma olmaksızın tekrarlanmasıyla oluşan; bakterilerden, hayvanlara ve insanlara kadar uzanan birçok canlının yapısında bulunan bir glikozaminoglikandır (18).

HA; sinovial sıvı, vitröz sıvı ve göbek kordonundaki ana glikozaminoglikandır (19). Kıkırdak dokusunda kondroitin sülfat ve keratan sülfat ile beraber yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Embriyolojik dokularda yüksek miktarlarda bulunur. Morfogenez esnasındaki hücre göçünde ve embriyolojik dokuların olgunlaşmasında önemli rol oynar (18).

Nötral formu olan hiyaluronat matriksin organizasyonu, yara iyileşmesi, anjiogenez ve tümör metaztazlarında rol alır (19).

HA sinoviyal sıvının viskozitesini sağlayan esas maddedir. Büyük moleküller oluşturarak hem viskoziteyi artırır, hem de yağlanma ve kayganlığı arttırarak kıkırdağın şok emici özelliğine katkı sağlar (17,19).

HA; eklem kıkırdağının yüzeyini kaplamasının yanında, kollajen lifleri ve proteoglikanlarla birlikte matriksin de yapısında bulunur. Böylece hem kıkırdak yüzeyini korurken hem de matriksteki proteoglikanların sinoviyal sıvıya kaçışını engelleyerek; matriksin içeriğinin ve yapısının korunmasında rol alır. İnflamatuvar hücrelerin eklem aralığına girmesinin engellenmesinde de görev alır (17). Karaciğerde metabolize olur (18).

D) Amniyon sıvısı:

Amniyon sıvısı kısmen amniyon hücreleri tarafından oluşturulan fakat esas olarak anne kanından gelen berrak bir sıvıdır. Miktarı 10. haftada ortalama 30 ml, 20. haftada 350 ml, 37. haftada 900 ml olacak şekilde gebeliğin yaşıyla birlikte artar (20).

Amniyon sıvısı içinde barındırdığı canlıyı dıştan gelen darbelere karşı korur, embriyonun amniyon zarına yapışmasını önler ve fetusun hareket etmesine olanak sağlar (20).

Amniyon sıvısındaki su her üç saatte bir değişir. Bu amniyon boşluğu ile maternal kan dolaşımı arasındaki madde alışverişinin ne denli fazla olduğunun göstergesidir. Sıvı miktarının normalden fazla veya az olması fetal anomalilere işaret edebilir (20).

Bu sıvının içeriğinde; mezenşimal hücreler ve kondrositler üzerinde uyarıcı etkileri olan FGF, EGF, IGF-I ve IGF-II gibi birçok büyüme faktörü vardır. Ayrıca içeriğinde hiyaluronik asit, kondroitin sülfat, keratan sülfat ve HASA bulundurur (4,5).

MATERYAL VE METOD

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma ve Uygulama Merkezinde, 15.10.2007 - 07.01.2008 tarihleri arasında yapıldı. Çalışmada ortalama ağırlıkları 275gr (250-300gr) olan, 20 haftalık, 28 adet Sprague Dawley cinsi dişi ratın sağ dizleri kullanıldı.

Ratlar; 20-24°C oda sıcaklıkları ve 14-10 saatlik ışık-karanlık döngüleri sağlandıktan sonra, tek tek olacak şekilde kafeslere yerleştirildi. Kafeslerinde günlük 10 gr rat yemi ve suları hazır olacak şekilde bakımları sağlandı. Bir haftalık takipten sonra ratlar; cerrahi kontrol, serum fizyolojik (SF), amniyon sıvısı (AS) ve hiyaluronik asit (HA) olmak üzere rasgele dört gruba ayrıldı.

Anestezi: Ameliyat öncesi ratlar 4 saat süreyle aç bırakıldı. Anestezi sağlamak için 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar®; Pfizer, İstanbul, Türkiye) ve 10 mg/kg xylazin hidroklorür (Rompun®; Bayer, Leverkusen, Almanya) intraperitoneal olarak kullanıldı. Gerektiğinde anesteziyi uzatmak için 15 mg/kg ketamin hidroklorür intraperitoneal olarak uygulandı.

Cerrahi: Anesteziden sonra ratlar sırtüstü yatılarak sağ dizleri traş edildi (Resim 1). Cerrahi kesiden önce dizler %10 Povidon iyot (Batticon; Adeka, Samsun, Türkiye) ile boyandı (Resim 2).



Resim 1: Sağ diz traş edildi.



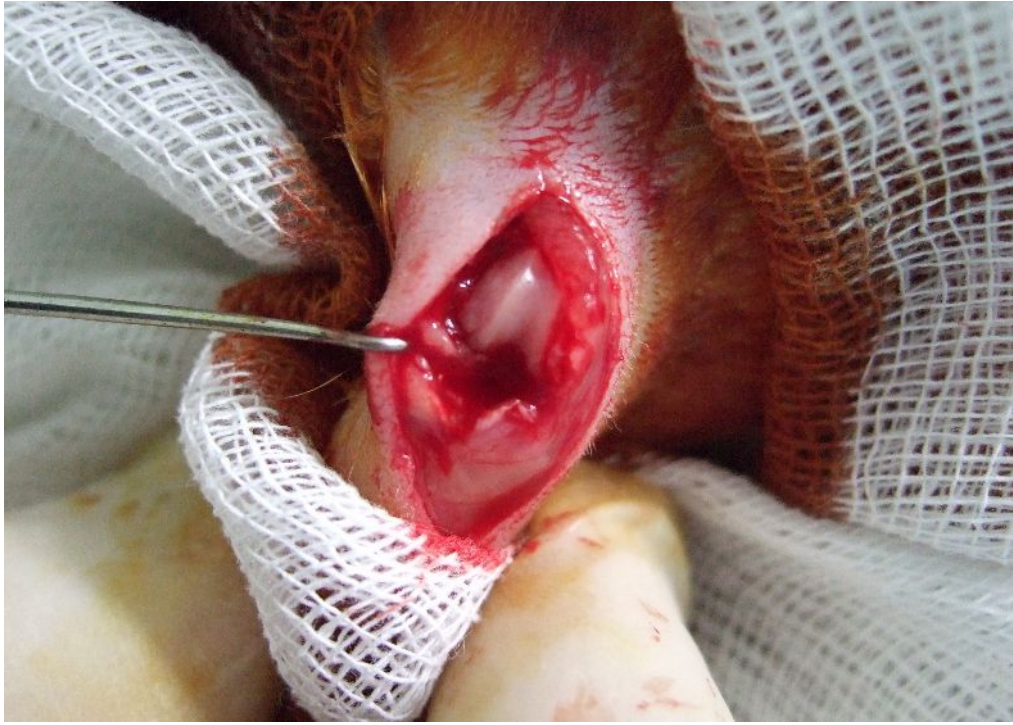
Resim 2: Sağ diz Povidon iyot ile boyandı.

Daha sonra medial parapatellar kesi ile cilt-cilt altı geçildi (Resim 3). Eklem açıldıktan sonra, patella laterale doğru kaydırıldı (Resim 4). Medial kollateral bağ kesilerek eklem aralığının açılması sağlandı. Buraya kadar olan işlemler tüm gruplardaki ratlara uygulandı. Kontrol grubundaki ratlara bu aşamadan sonra herhangi bir işlem yapılmayarak 4.0 vikril ile cilt altı ve cilt kapatıldı. Bu gruba 6. hafta sonuna kadar herhangi bir işlem uygulanmadı.

SF, AS ve HA gruplarına ise medial kollateral bağ kesilmesini takiben medial menisektomi uygulandı (Resim 5). Daha sonra 4.0 vikril ile cilt altı ve cilt kapatıldı (Resim 6,7). Yara yerlerine % 10'luk Povidon iyot ile pansuman yapıldı.



Resim 3: Medial parapatellar kesi.



Resim 4: Eklem açılarak patella laterale kaydırıldı.



Resim 5: Medial menisküs kesilerek çıkarıldı.



Resim 6: Eklem kapsülü kapatıldı.



Resim 7: Cilt kapatıldı.

Cerrahi sonrası ratlar her kafeste bir rat olacak şekilde kafeslerine yerleştirildi. Ratların serbest hareket etmelerine izin verildi. Kafesler düzenli olarak üç günde bir temizlendi. Hiçbir grupta, cerrahi öncesi ve sonrasında antibiyotik kullanılmadı.

3 haftalık bekleme süresinin ardından ratlara tekrar anestezi uygulandıktan sonra SF grubundaki ratların sağ dizlerine 0,1 ml serum fizyolojik, AS grubundaki ratların sağ dizlerine 0,1 ml insan amniyon sıvısı, HA grubundaki ratların sağ dizlerine ise 0,1 ml; 15 mg/ml konsantrasyonunda sodyum hiyaluronat (Orthovisc®; Biomeks, Ankara, Türkiye) eklem içi injeksiyon yoluyla uygulandı.

AS grubunda kullanılan amniyon sıvısı Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğinde amniyosentez yapılan 20 haftalık bir gebeden onayı alınarak temin edildi. Daha sonra 4300 devirde 15 dakika santrifüj edilerek hücrelerinden ayrıldı ve -20 °C de muhafaza edildi. Kullanılmadan önce oda sıcaklığında yaklaşık 15 dakika bekletilerek çözünmesi sağlandı.

Bu eklem içi injeksiyonlar; 4. ve 5. haftaların sonlarında da, aynı şekil ve dozlarda bu üç gruba uygulandı. 3. eklem içi injeksiyondan sonra bir hafta beklenilerek 6. hafta sonunda kontrol, SF, AS ve HA grubundaki ratlar servikal dislokasyon yoluyla öldürüldü.

Ratların sağ dizleri eklem altına ve üstünde birer santimetrelük bölüm bırakılacak şekilde alındı. Kaslardan ve yumuşak dokulardan ayrıldıktan sonra %10 formol solüsyonunda 2 gün bekletilerek fikse edildi. Daha sonra %10'luk formik asitte 1 hafta bekletilerek dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyon sıvısı iki günde bir değiştirildi. Örnekler etanolle dehidrate edildikten sonra xylolle temizlendi. Sagittal düzlemde tam ortadan kesilerek medial kısımları parafin bloklara gömüldü. Mikrotom vasıtasıyla 5 µm lik seri kesitler alınarak tibial eklem yüzeyinin yük taşıyan kısmına ulaşıldı. Uygun kesitler safranin-O boyası ile boyandıktan sonra KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji bölümünde ışık mikroskobu (Olympus BX-51) altında Mankin sınıflaması (Tablo 1) esas alınarak değerlendirildi.

Tablo 1: Mankin Sınıflaması (21).

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

İstatistik değerlendirme: Sonuçlar alındıktan sonra gruplar arasındaki karşılaştırma Kruskal Wallis varyans analizi (Post hoc olarak Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi) kullanılarak yapıldı. Bilgisayar programı olarak SPSS 13.0 kullanıldı.

BULGULAR

Klinik bulgular:

Ratlarda ameliyattan sonra 1-2 gün süre ile hafif topallama gözlemlendi. Bu süreden sonra ratlar, sağ alt ekstremitelerini normal bir şekilde kullanmaya başladılar. Ratlarda anesteziye bağlı bir komplikasyon izlenmedi. Gerek ameliyat sonrası, gerek eklem içi enjeksiyonlar sonrası ratların sağ dizlerinde infeksiyonu düşündürecek bir bulguya rastlanmadı. Çalışma süresince hiçbir rat ölmedi.

Deney sonunda ratların sağ diz eklemleri alındığında hiçbir eklemden kontraktür ve patella dislokasyonu gözlenmedi.

Histolojik bulgular:

Ratların sağ dizlerinin tibial eklem yüzeyleri; hasarın kıkırdak tabakalarını etkileme derecesi, kondrositlerin durumu, matriksin safranin-O ile boyanma miktarı ve tidemarkın yapısı göz önüne alınarak mikroskopik olarak incelendi.

Gruplardaki tüm ratların tibial eklem kıkırdaklarının almış olduğu histolojik skorlar tablo-2'de ayrıntılı şekilde verilmiştir. Grupların toplam Mankin skorları ve bu skorların ortalamaları ise tablo-3'de verilmiştir.

Kontrol grubuna bakıldığında; eklem yüzeylerinin genellikle düzgün olduğu, sadece 2 eklem yüzeyinde hafif yüzeysel fibrilasyonların olduğu görüldü. Kıkırdağın farklı tabakalarındaki hücrelerin şekil, sayı ve dizilimlerinin normal olduğu izlendi. Hiçbir kıkırdak dokudaki matriksin safranin-O boyasını tutmasında, herhangi bir kaybın olmadığı gözlemlendi (Resim 9,10).

SF grubunda; 2 eklemden yüzeysel fibrilasyonların ve pannus yapısının olduğu görülürken, 5 eklemden ise tibia kıkırdağında yaygın yüzeysel düzensizliklerin olduğu, fibrilasyon ve yarıkların orta tabakanın alt kısımlarına kadar uzandığı görüldü (Resim 11). Özellikle hasarın olduğu bölgelerdeki kıkırdak tabakalarında, hiposelülarite veya kondrositlerdeki kümelenmenin tabloya hakim olduğu görüldü.

SF grubuna, matriksin safranin-O boyasını tutma derecesi açısından bakıldığında; 4 kıkırdak dokuda boyanmanın orta derecede azaldığı, 3 kıkırdak dokuda ise boyanmadaki azalmanın ileri dereceye ulaştığı görüldü (Resim 12).

Bu gruptaki 4 tibia kıkırdağında, tidemarkın bütünlüğünün damarlarca bozulduğu görüldü.

AS grubundaki tüm eklem yüzeylerinde yüzeysel fibrilasyon görülürken, 5 tanesinde fibrilasyona ek olarak pannus da görülmüştür.

Bu grupta, hasar bölgelerinde yüzeysel tabakadaki hücrelerde kayıplar görülürken; orta tabakadaki kondrositlerde kümelenme sık görülen bir durum olarak karşımıza çıktı. Sadece 2 kıkırdak dokuda orta tabakadaki kondrositlerde hiperselülarite gözlemlendi.

Matriks değerlendirildiğinde ise 5 kıkırdak dokuda safranin-O ile boyanmada orta derecede azalmanın olduğu görülürken; 2 tanesinde ise boyanmadaki azalmanın hafif derecede olduğu görüldü. (Resim 14)

AS grubundaki kıkırdak dokuların tidemarklarına bakıldığında; 3 tanesinin yapısının damarlar tarafından bozulduğu görüldü.

HA grubu değerlendirildiğinde; genel olarak eklem yüzeylerinde yüzeysel fibrilasyonun ön planda olduğu, 4 dokuda pannusun da tabloya eklendiği tespit edildi.

Kondrositlerin durumuna bakıldığında ise kümelenmenin sık görüldüğü, yalnızca 2 kıkırdak dokuda hiperselülaritenin tabloya hakim olduğu görüldü.

Matriksin safranin-O boyasını tutma miktarı genelde hafif derecede azalırken; 3 dokuda ise bu azalma miktarı orta dereceye ulaştı (Resim 16).

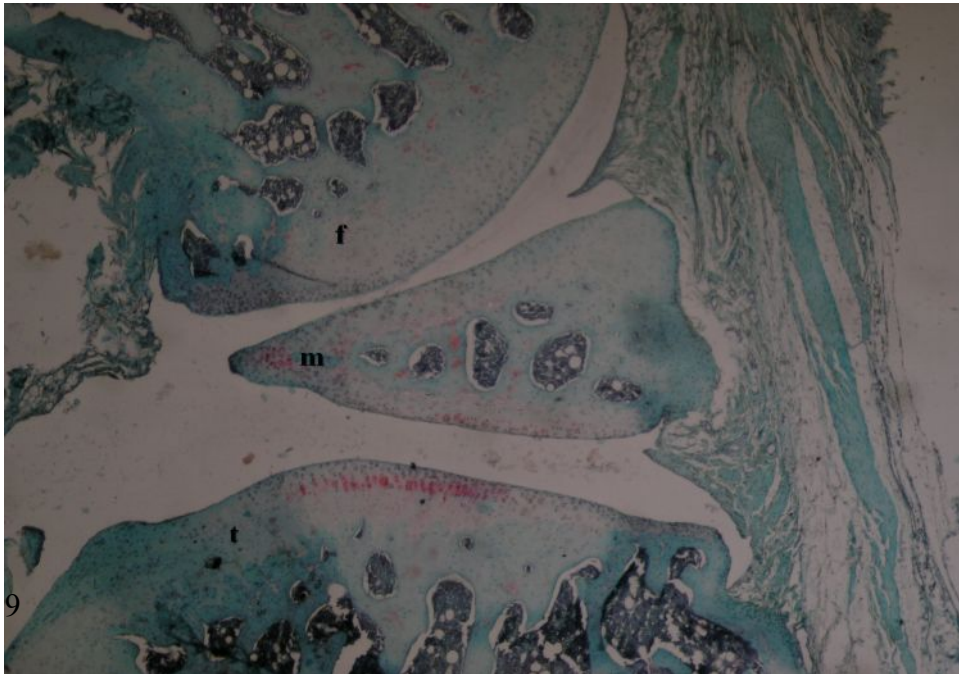
Son olarak bu gruptaki kıkırdak dokuların tidemarkları değerlendirildiğinde sadece 2 dokuda, tidemarkın yapısının damarlar tarafından bozulduğu gözlemlendi.

Tablo 2: Tibial eklem kırıkdağlarının ayrıntılı Mankin skorları.

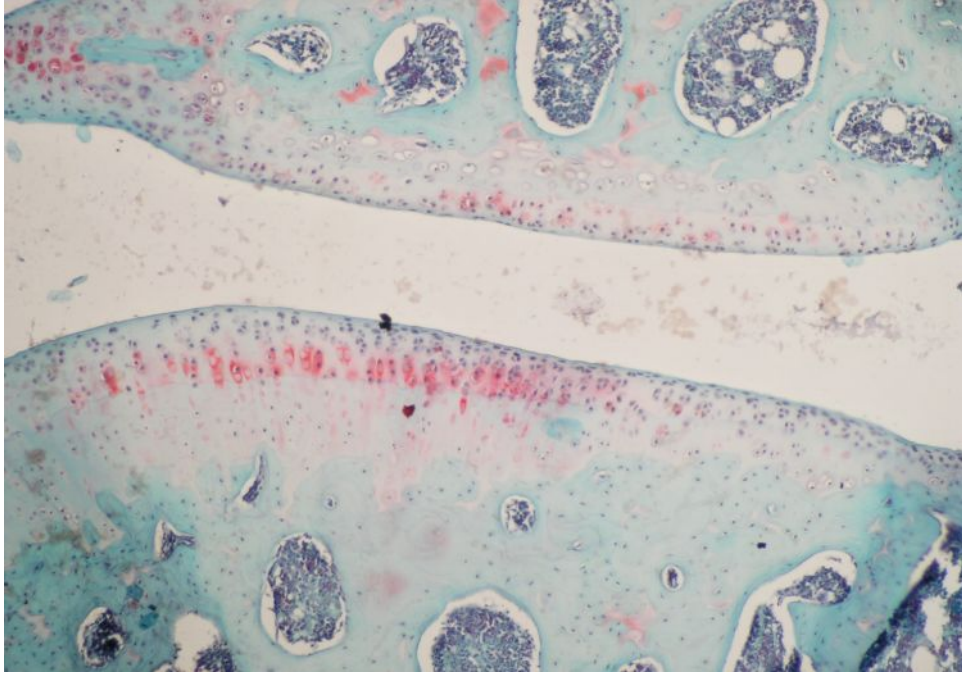
Ratlar	Yapı	Hücreler	Safranin-0	Tidemark
K ₁	0	0	0	0
K ₂	1	0	0	0
K ₃	0	0	0	0
K ₄	0	0	0	0
K ₅	0	0	0	0
K ₆	1	0	0	0
K ₇	0	0	0	0
SF ₁	3	2	2	1
SF ₂	3	2	2	1
SF ₃	3	3	3	0
SF ₄	2	3	3	1
SF ₅	3	3	2	0
SF ₆	2	2	3	0
SF ₇	3	2	2	1
AS ₁	2	1	2	0
AS ₂	2	2	2	0
AS ₃	1	2	2	1
AS ₄	1	2	2	0
AS ₅	2	2	1	1
AS ₆	2	1	2	0
AS ₇	2	2	1	1
HA ₁	2	1	1	1
HA ₂	1	2	1	0
HA ₃	1	2	2	0
HA ₄	2	2	1	0
HA ₅	2	1	2	0
HA ₆	2	2	1	1
HA ₇	1	2	2	0

Tablo 3: Grupların toplam ve ortalama Mankin skorları

Ratlar	Kontrol	SF	AS	HA
1	0	8	5	5
2	1	8	6	4
3	0	9	6	5
4	0	9	5	5
5	0	8	6	5
6	1	7	5	6
7	0	8	6	5
Toplam	2	57	39	35
Ortalama	0,28	8,14	5,57	5,00

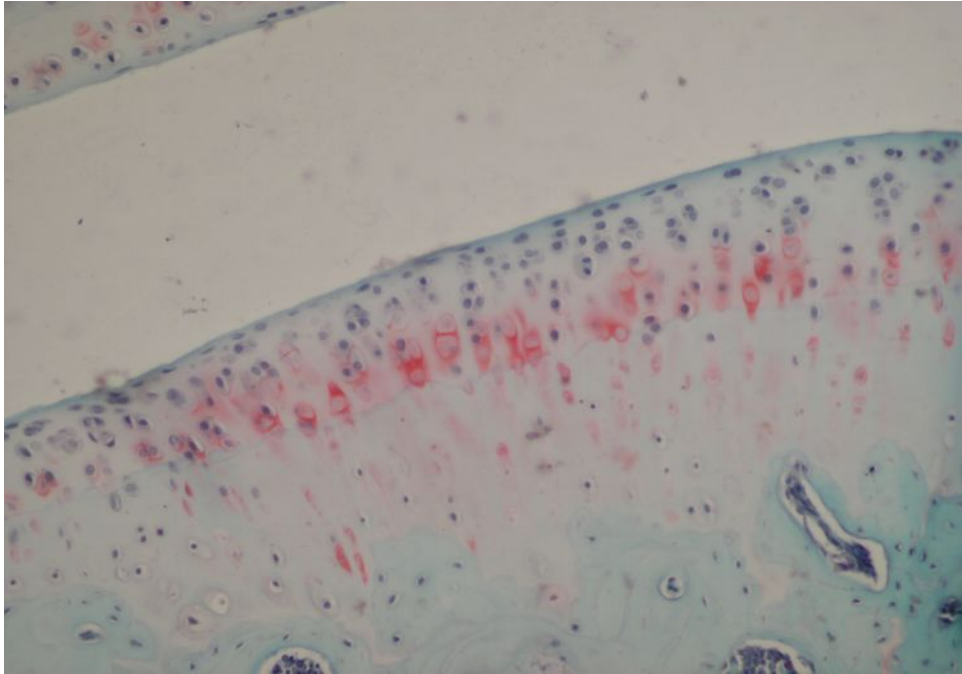


Resim 8: Kontrol grubu
f) femur, m) medial menisküs, t)tibia (Safranin-O x4).



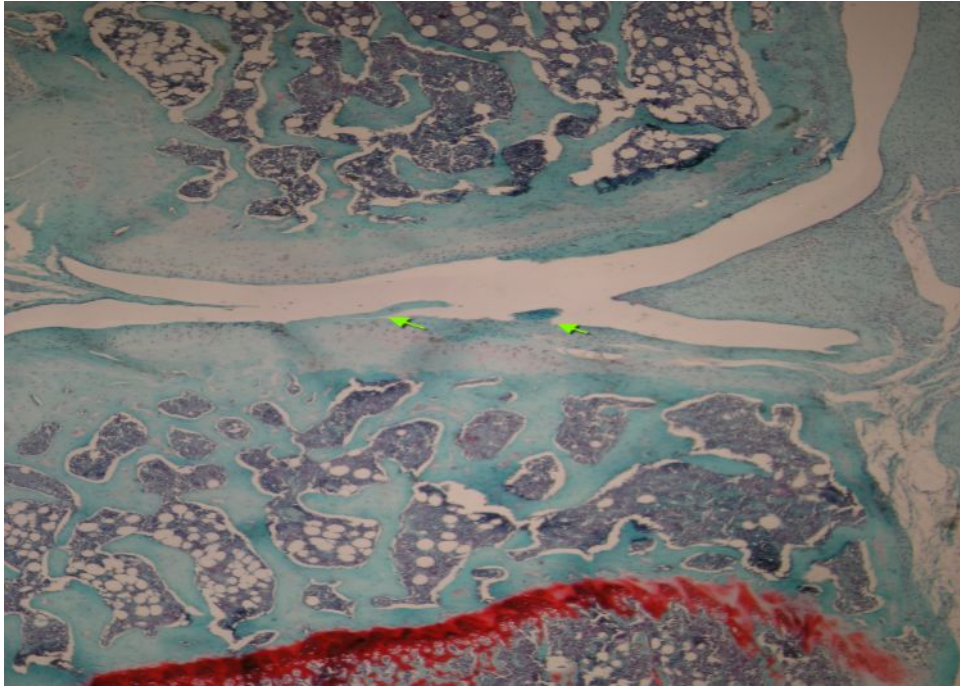
Resim 9: Kontrol grubu

Tibial eklem yüzeyinin düzgün olduğu, safranin-O ile boyanmanın tam olduğu görülmüştür (Safranin-O x10).



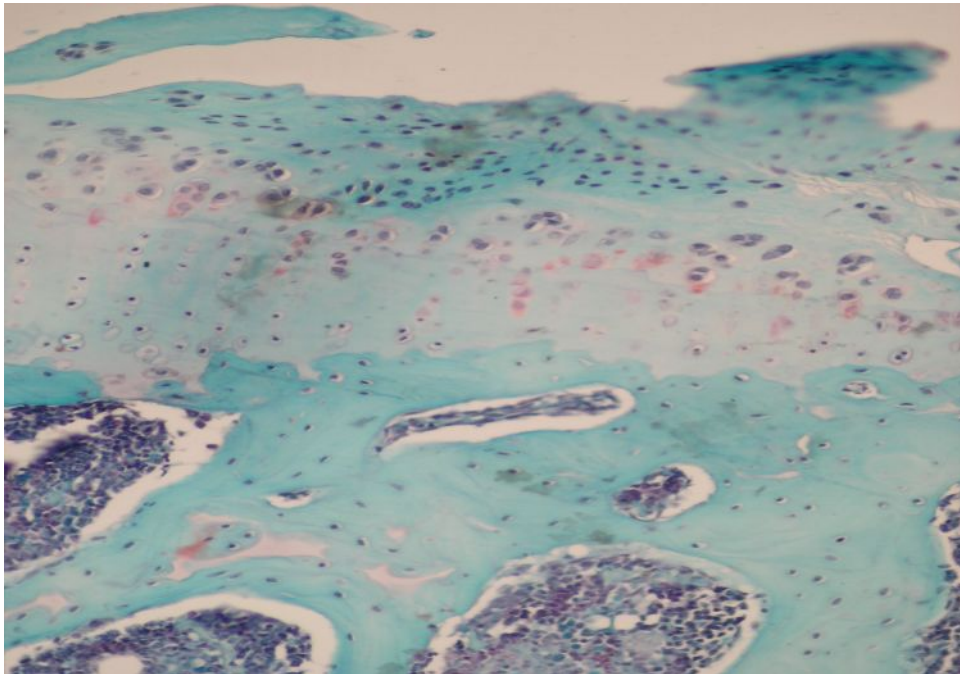
Resim 10: Kontrol grubu

Hücrelerin şekil, sayı ve dizilimlerinin normal olduğu görülmüştür (Safranin-O x40).



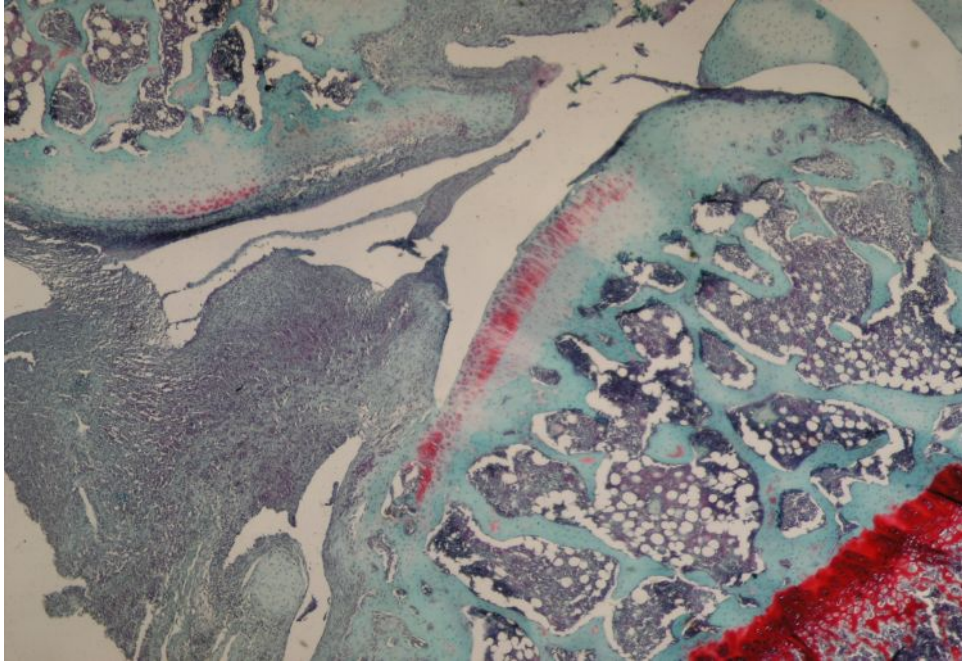
Resim 11: SF grubu

Tibial eklem yüzeyinde bozulmalar olduğu, oluşan yarıkların orta tabakaya kadar uzandığı görülmüştür (yeşil oklar) (Safranin-O x4).

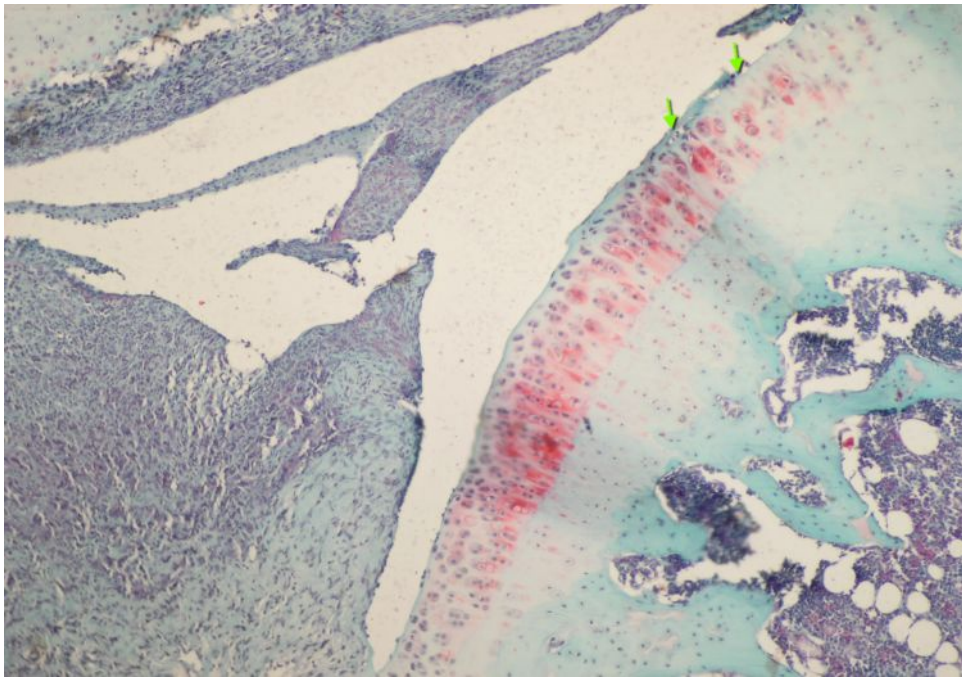


Resim 12: SF grubu

Hasarlı bölgelerde safranin-O ile boyanmada ileri derecede azalma olduğu görülmüştür (Safranin-O x40).

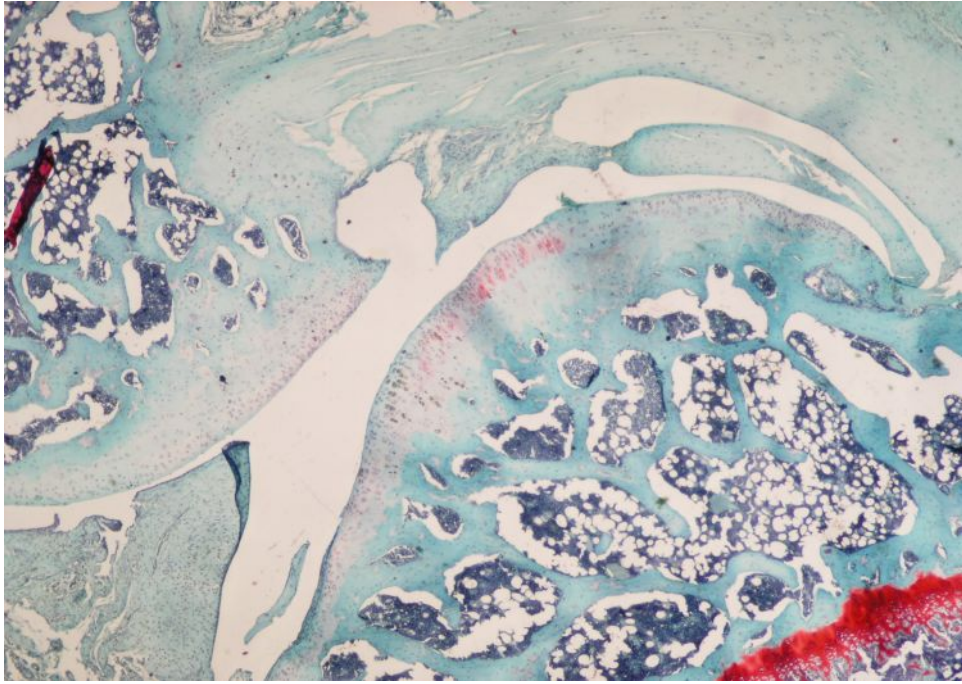


Resim 13: AS grubu (Safranin-O x4)

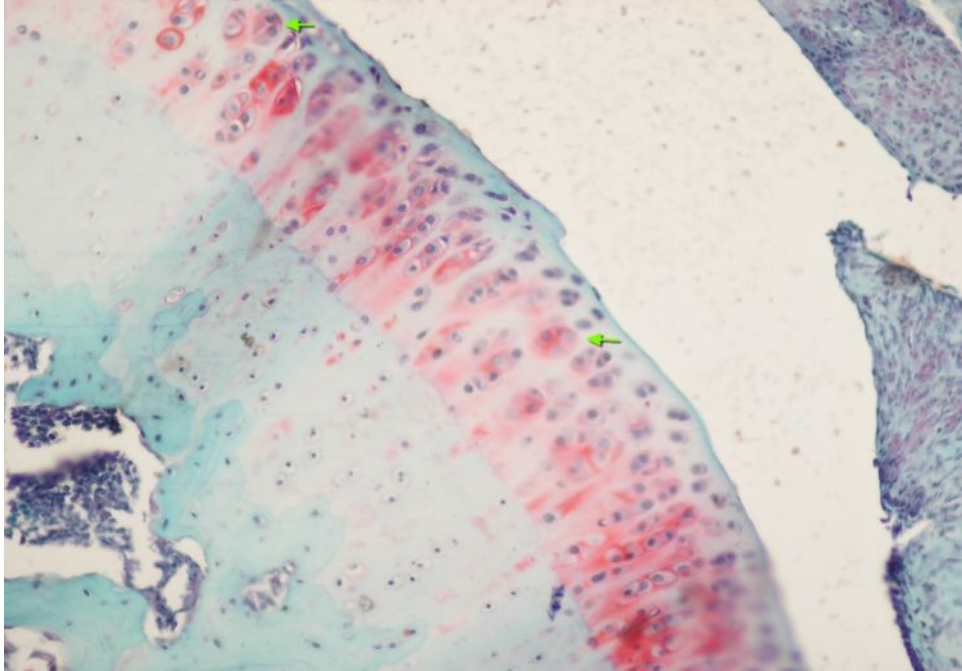


Resim 14: AS grubu

Kıkırdak yüzeyinde düzensizlik ve fissürler (yeşil oklar)
Hasarlı kısımda safranin-O ile boyanmada orta derecede
azalma görülmüştür (Safranin-O x10).



Resim 15: HA grubu (Safranin-O x4).



Resim 16: HA grubu

Kıkırdak yüzeyinde hafif bozulmalar, yüzeyel tabakada hücre kaybı ve safranin-O ile boyanmada azalma görülmüştür.

Orta tabakadaki hücrelerde kümelenme (yeşil oklar) (Safranin-O x40).

Değerlendirilme sonucunda; SF, AS ve HA gruplarının almış olduğu Mankin skorları, cerrahi kontrol grubu ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında; bu üç grup ile kontrol grubu arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($P<0,008$). Benzer şekilde AS ve HA grupları SF grubu ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında; bu iki grubun da almış olduğu histolojik skorların, SF grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu ortaya çıktı ($P<0,008$).

AS ve HA grupları karşılaştırıldığında ise HA grubunun Mankin histolojik skorları rakamsal olarak daha düşük olmasına rağmen; bu iki grup arasında istatistiksel olarak fark bulunamadı ($P>0,008$).

TARTIŞMA

Osteoartrit, diğler adıyla dejeneratif eklem hastalığı 65 yaş üstü popülasyonun %80-90'ını etkileyen; patogenezinde kondrosit ölümü, matrikste proteoglikan kaybı ve kırıkirdakta yapım ile yıkım arasındaki dengenin bozulmasının ön planda olduğu; ilerleyici kırıkirdak hasarı, subkondral kemik değışiklikleri, osteofit oluşumu ve düşük derecede sinovit ile karakterize en sık görülen eklem hastalığıdır (22,23,24).

Bu kadar sık görüldüğünden ve geniş kitleleri etkilediğinden dolayı tedavisi önem kazanmıştır. Günümüze kadar kırıkirdak hasarının iyileştirilmesi ve ilerleme hızının azaltılması amaçlanılarak birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar çoğunlukla deneysel olarak kırıkirdak hasarı oluşturulmuş hayvanlar üzerinde yapılmıştır (1).

Çalışmamızda ratların seçilme nedeni, ratların dizlerinin medial kısımlarının daha fazla yüke maruz kalması ve medial menisektomi sonrası morfolojik olarak insandakine benzer bir kırıkirdak hasarı ortaya çıkmasıdır (1,22).

Ortaya çıkan bu kırıkirdak hasarı insana kıyasla çok daha kısa bir sürede oluşmaktadır. Bunun nedenlerinden biri de menisektomi sonrası ratların eklemlerini sakınmadan hemen harekete başlamasıdır (1).

Çalışmamızda ratlara medial menisektomi uygulandıktan sonra, hareket etmelerine izin verilerek 3 hafta beklenilmiş daha sonra tedaviye başlanılmıştır. Değerlendirme ise 6. haftanın sonunda yapılmıştır. Çünkü menisektomi sonrası deneysel çalışmalar için yeterli kırıkirdak hasarının oluşabilmesi için en az 3 hafta beklenmesi gerektiği ve 3 ila 6 hafta arasında tibia kırıkirdağında ilerleyici hasarın ortaya çıktığı bir çok çalışmada bildirilmiştir (1,22,25).

6. hafta sonunda SF grubu değerlendirildiğinde; eklem kırıkirdağında fibrilasyonların ve yarıkların oluştuğu, bu yarıkların orta tabakanın alt kısımlarına kadar uzandığı görülmüştür. Ayrıca hasar gören bölgelerde safranin-O ile boyanmada ileri

dereceye varan kayıpların olduğu ve kondrosit sayısında azalma olduğu tespit edilmiştir.

Literatüre bakıldığında; medial menisektomi modelinde, ilk etapta kıkırdağın yüzeysel tabakasında değişikliklerin başladığı; bu değişikliklerin proteoglikan kaybı, fibrilasyon, aşınma ve kondrosit sayısında düşme ile karakterize olduğu gösterilmiştir (23). Bunun yanında Wancket ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; medial menisektomi modelinde, 6.hafta sonunda hasarın tüm kıkırdak kalınlığının %50'sine ulaştığı bildirilmiştir (22). Bu modelde ortaya çıkan kıkırdak hasarı ile ilgili bilgiler çalışmamızdaki SF grubunda, 6. hafta sonunda ortaya çıkan kıkırdak hasarı derecesi ile uyum göstermektedir.

Çalışmamıza, hücreler arası matrikstekki proteoglikan miktarının bir göstergesi olan safranin-O ile boyanma yönünden baktığımızda; AS ve HA gruplarında boyanmadaki azalmanın hafif-orta derecede olduğu görülürken, SF grubunda ise bu azalmanın orta-ileri derecede olduğu görülmüştür. Benzer şekilde; invitro yapılan bazı deneysel çalışmalarda HA uygulanmasının hücreler arası matrikste kondroitin sülfat ve keratan sülfat sentezini arttırdığı gösterilmiştir (19). Tavşan kondrosit kültürlerine HA uygulanmasından sonra kondroitin sülfat sentezinin arttığı, yine tavşan ve at kondrosit kültürlerinde HA'nın proteoglikan sentezini arttırdığı gösterilmiştir (26,27,28).

Çalışmamızda SF grubunda hasarlı kıkırdak bölgelerinde hiposelülarite, sık görülen bir bulgu iken; AS ve HA gruplarında ise kondrositlerde hiperselülarite veya kümelenme tabloya hakim olan bulgulardır.

Jansen ve arkadaşları; tavşan medial femoral kondilleri üzerinde oluşturdukları 4 mm'lik kısmi kıkırdak hasarına eklem içi tek doz 5 mg/ml konsantrasyonunda yüksek molekül ağırlıklı HA uygulamışlar. Başka bir gruba ise serum fizyolojik uygulamışlar. Erken dönemde yapılan histolojik ve biyokimyasal incelemelerde HA uygulanan kıkırdaklarda hasar çevresinde apoptozis'e bağlı kondrosit ölümlerinin daha az olduğu ve bu bölgedeki kondrositlerin metabolik olarak daha aktif oldukları gösterilmiştir (29).

Ayrıca HA'nın mezenkimal hücreler üzerinde farklılaşmayı uyarıcı etkisinin yanında, yüksek konsantrasyonlarda doku tamirini hızlandırıcı etkisi de mevcuttur (30).

Yoshimi ve arkadaşları tavşan dizlerinde ACL kesilmesi sonucu oluşturdukları osteoartrit modelinde 12 hafta süre ile gruplara haftada bir kez eklem içi 0,1 ml HA ve 0,1 ml serum fizyolojik uygulamışlar. Histolojik inceleme sonucunda HA uygulanan gruptaki medial femoral kondillerin Mankin skorlarının anlamlı derecede düşük olduğu görülmüş. Ayrıca sinovialardan alınan örneklerde de HA uygulanan grupta sinovit skorunun daha düşük olduğunu rapor etmişler (2).

HA'nın inflamatuvar hücreler üzerine de etkileri vardır. Bu konuyla ilgili yapılan deneysel çalışmalarda HA'nın yüksek konsantrasyonlarda lenfosit hareketliliğini azalttığı, benzer şekilde özellikle yüksek molekül ağırlıklı HA'nın doza bağımlı olarak makrofaj fagositozunu inhibe ettiği gösterilmiştir (31,32,33). HA nötrofil adhezyonunda doza ve molekül ağırlığına bağlı olarak engeller ve nötrofillerin neden olduğu kıkırdak hasarını azaltır (34,35).

Çalışmamızda, diz eklemlerinin sinoviyal dokuları ve inflamatuvar hücreler değerlendirilmediğinden dolayı; bu noktada literatür ile bir karşılaştırma yapılamamıştır.

Özellikle son yıllarda MMP'lerin kıkırdak matriksin yıkımında önemli rol oynadıkları ve osteoartrit gelişiminde katkılarının olduğu ortaya çıkmıştır. IL-1, IL-17 (İnterlökin-17), IL-18 (İnterlökin-18) ve TNF- α gibi bazı proinflamatuvar sitokinlerin MMP'lerin sentezini arttırarak, MMP inhibitörlerinin ise sentezini azaltarak matriks yıkımına neden oldukları gösterilmiştir (36).

Janutz ve arkadaşları ratlara medial menisektomi uygulayarak oluşturdukları osteoartrit modelinde MMP inhibitörünün etkilerini araştırmışlardır. Gruplardan birine 3 hafta boyunca oral olarak MMP inhibitörü verilmiş, diğer gruba ise herhangi bir tedavi verilmemiştir. 3 hafta sonunda yapılan histolojik incelemede inhibitör verilen grubun femur ve tibia kıkırdaklarındaki hasarın anlamlı derecede düşük olduğu ve bu grupta osteofit oluşumunun daha az olduğu görülmüştür (25).

Tip 2 ve 3 osteoartritli hastaların dizlerinden alınan kıkırdak ve sinovial dokulardan ayrı ayrı oluşturulan doku kültürlerine molekül ağırlıkları yönünden farklı üç HA solusyonu uygulanarak yapılan bir çalışmada dokulardaki MMP-2, MMP-9 ve MMP'leri katalize ederek etkilerini arttıran u-PA (Ürokinaz) konsantrasyonları incelenmiş. Sonuç olarak molekül ağırlığı 6000 kDa ile en yüksek olan HA'nın

MMP-2, MMP-9 ve u-PA konsantrasyonlarını daha fazla düşürdüğü ortaya konmuştur (37).

Çalışmamızda kullanılan Orthovisc® ve amniyon sıvısı, içeriklerindeki hyaluronik asitin molekül ağırlığına göre karşılaştırıldığında; Orthovisc'de bulunan HA'nın molekül ağırlığı $1,0-2,9 \times 10^6$ iken, gebeliğin ortalarında AS'de bulunan HA'nın molekül ağırlığı ortalama $3,3 \times 10^6$ dir (38). İçeriğinde bulundurduğu HA'nın molekül ağırlığının göreceli olarak düşük olması; MMP-2, MMP-9 ve u-PA konsantrasyonlarının düşürülmesi açısından AS için bir dezavantaj gibi görülmekte; AS içeriğinde HA dışında, birçok ekstraselüler makromolekül, birçok büyüme faktörü ve uygulandığı dokudaki HA miktarını endojen olarak arttıran HASA bulundurmaktadır.

Araşidonik asit türevlerinden prostaglandin ve lökotrienlerin inflamatuvar yanıtta rol alarak kıkırdak yıkımını arttırdıkları ve bu maddelerin miktarlarının osteoartritte arttığı bilinmektedir (39). HA'nın araşidonik asit salınımını azalttığı ve PGE2 yapımını azalttığı gösterilmiştir (40,41).

Jean ve arkadaşları ratlarda oluşturdukları deneysel osteoartrit modelin üzerinde yaptıkları çalışmada bir COX-2 (Siklooksijenaz-2) inhibitörü olan Parekoksib'in eklem içi olarak uygulandığında kıkırdak hasarı gelişimini yavaşlattığını göstermişlerdir (42).

Bizim çalışmamızda da HA ve AS uygulanan gruptaki kıkırdak skorları SF grubundaki skora göre anlamlı derecede düşük çıkmıştır. Literatürde HA'nın kıkırdak dokusu üzerine olan olumlu etkileri göz önüne alındığında; çalışmamız bu yönden literatürle uyum göstermektedir.

Benzer şekilde deneysel osteoartrit oluşturularak ratlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada HA ile güçlü antiinflamatuvar etkisi olan metil prednizolon eklem içi uygulanarak karşılaştırılmıştır. Eklem içi enjeksiyonlar haftada bir kez olacak şekilde üç hafta yapılmış, son enjeksiyondan iki hafta sonra ratlar öldürülerek diz eklemleri incelenmiştir. HA uygulanan gruptaki tibia kıkırdaklarının Mankin Skorları anlamlı derecede daha düşük çıkmıştır (43).

İnsan amniyon sıvısı içeriğinde birçok büyüme faktörü (FGF, EGF, IGF-I, IGF-II), mukopolisakkarit, (Kondroitin 4 sülfat, Kondroitin 6 sülfat, Dermatan sülfat) HA, HASA ve ekstraselüler makromolekül (Fibronektin, Laminin) bulundurmaktadır (5,8).

Bu maddelerden birçoğu kırık dokusunun yapısında bulunurken; büyüme faktörlerinin kırık hücreleri üzerinde uyarıcı etkisinin olduğu gösterilmiştir (44,45,46). HASA'nın endojen HA üretimini arttırarak yara iyileşmesini uyardığı bilinmektedir (47,48). Bu nedenle AS uygulandığı bölgedeki HA miktarını hem ekzojen hem de endojen olarak arttırıcı etki gösterir.

Çalışmamızda, 20 haftalık bir gebeden amniyosentez yoluyla aldığımız AS'yi kullanma nedenimiz; Dahl ve arkadaşlarının AS üzerinde yaptıkları bir dizi çalışmadır. Bu çalışmalarda, AS'nin içeriğinde yüksek molekül ağırlıklı HA ve HASA bulunduğu ortaya koyulmuştur. HA miktarının gebeliğin ilerleyen haftalarında artış göstererek, 16-20 haftalar arasında 20 mikrogram/ml ile en yüksek değerine ulaştığı bildirilmiştir. 20. haftadan sonra HA miktarının kademeli olarak düştüğü ve gebeliğin son dönemlerinde miktarının 1 mikrogram/ml olduğu gösterilmiştir (38,49).

Özgenel ve arkadaşları tavşan fleksör tendonları üzerinde yaptıkları deneysel çalışmada AS'nin tendon iyileşmesini hızlandırdığını ve iyileşme sırasında meydana gelen yapışıklıkları azalttığını ortaya koymuşlardır (6).

Yine Özgenel ve arkadaşlarının yaptıkları bir başka çalışmada ise tavşanların kulaklarından alınan perikondrial greftler, kendi paravertebral kasları arasında tespit edilmiş ve bu bölgeye AS uygulanmış. Sekiz hafta sonunda greftler çıkarılarak histolojik olarak incelenmiş. AS uygulanan greftlerdeki kırık tabakanın kalınlığının ve yoğunluğunun kontrol grubuna göre daha fazla olduğu gösterilmiş (5).

AS'nin sinir tamiri sonrası iyileşmede de tamir bölgesindeki akson sayısını arttırarak etkili olduğu ortaya koyulmuştur (7).

AS'nin değişik dokulardaki olumlu etkilerini ortaya koyan yazarlar bu sonuçların; AS'nin içeriğindeki büyüme faktörlerine, HA'ya ve uygulandığı dokudaki endojen HA yapımını arttıran HASA'ya bağlı olduğunu bildirmişlerdir (5,6,7).

AS'nin içeriğinde bulunan büyüme faktörlerinden bFGF'nin (FGF-2) rat dizlerine eklem içi uygulandığında kırık dokusunda genişlemeye, büyümeye ve farklılaşmaya neden olduğu, yine ratlar da oluşturulan kırık modelinde ise kallus içindeki kırık doku büyümesine olumlu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (50). Medial menisektomi sonrası üç hafta beklenilerek oluşturulan bir osteoartrit modelinde; FGF-18'in üç hafta, haftada bir kez eklem içi uygulanmasının hasarlı bölgede yeni kırık doku

oluşumunu arttırdığı ve kırıkdağın histolojik skorunu anlamlı derecede düzelttiği ortaya koyulmuştur (24).

Karaçal ve arkadaşları tavşan kraniumlarında oluşturdukları kemik defektlerine AS uygulayarak AS'nin kemikleşme üzerindeki etkisini araştırmışlar. Altı hafta sonunda histolojik ve bilgisayarlı tomografi çekilerek yapılan radyolojik incelemelerde AS uygulanan gruptaki kemik defektlerinde kemikleşmenin anlamlı derecede daha fazla olduğu gösterilmiştir (4).

Gebeliğin 16-20. haftaları arasında AS'deki HA miktarı gebeliğin son dönemlerindeki HA miktarının 5 katı civarındadır (38). Bu iki dönemdeki farklı AS'lerin kırık iyileşmesine olan etkilerini karşılaştırabilmek için, Kerimoğlu ve arkadaşları ratlar üzerinde deneysel tibia kırığı oluşturmuşlar ve intramedüller tespitten sonra kırık bölgesine AS uygulamışlar. Bir gruba 18. gebelik haftasında alınan AS, bir gruba gebeliğin son döneminde alınan AS uygulanırken bir grup ise cerrahi kontrol grubu olarak belirlenmiş. 3. ve 5. haftaların sonlarında kırık hatları histolojik, radyolojik ve sintigrafik olarak incelenmiş. 18. gebelik haftasında alınan AS uygulanan grubun 3 ve 5. hafta sonlarındaki histolojik ve radyolojik kırık iyileşme skorları daha yüksek bulunmuş. 3. hafta sonundaki sintigrafik değerlendirmede ise bu gruptaki kırık hatlarında metabolik aktivitenin daha fazla olduğu ortaya konmuş (8).

Burada bahsedilen literatür bilgilerinin ışığında hücreler arası matriks bileşenlerinin, büyüme faktörlerinin ve hyaluronik asitin mezenşimal dokuların iyileşme basamaklarında olumlu etkilerin olduğu görülmüştür. Bundan dolayı; AS'nin içeriğinde bulundurduğu büyüme faktörleri, HA, HASA ve birçok hücreler arası matriks bileşeni vasıtasıyla, osteoartritteki kırıkdağ hasarı üzerine koruyucu ve tedavi edici etkisinin olabileceği kanısına varılmıştır. Oluşturduğumuz deneysel osteoartrit modelinde AS'nin etkisinin ne seviyede olduğunu görebilmek için de onu kırıkdağ dokusu üzerindeki olumlu etkileri birçok çalışmada kanıtlanan ve tedavi seçeneği olarak da kullanılan HA ile karşılaştırdık.

Karşılaştırma sonucunda; 6. hafta sonundaki Mankin skorlarına göre, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı. Çalışmamızda kullanılan HA preparatının içeriğindeki HA konsantrasyonu ve HA'nın molekül ağırlığı; 20. haftadaki AS'deki HA'nın konsantrasyonundan ve molekül ağırlığından daha fazladır. Buna

rağmen iki grubun histolojik skorlarının benzer bulunma nedeninin; AS'nin içeriğinde bulunan değişik büyüme faktörlerine ve diğer hücreler arası matriks bileşenlerine bağlı olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle AS'nin osteoartrit tedavisinde güncel tedavi yaklaşımlarından biri olan; kırkırdak koruyucu ajanlara alternatif bir yöntem olabileceği kanısına varılmıştır.

Bununla birlikte ileriki çalışmaların planlanması açısından; AS'nin kırkırdak doku üzerindeki bu olumlu etkilerine, içeriğindeki değişik moleküllerin hangi düzeyde katkı yaptıkları ve bu katkıların mekanizmalarının nasıl olduğu sorularının aydınlatılmasının gerekli olduğu kanaatine varılmıştır.

SONUÇLAR

Bu çalışmamızda şu sonuç ve yargılara varılmıştır:

- 1- Ratlara uygulanan medial menisektomi sonrası, zamanla ilerleyici kıkırdak hasarı ortaya çıktığı görülmüştür.
- 2- Meydana gelen kıkırdak hasarı insanlara göre çok daha kısa bir sürede oluşmaktadır.
- 3- Ameliyat edilen dizlerde instabilite, patella çıkığı ve infeksiyon gibi komplikasyonlar görülmemiştir.
- 4- HA ve AS grubundaki kıkırdak dokuların Mankin skorları SF grubuna göre anlamlı derecede daha düşük çıkmıştır.
- 5- HA grubunun Mankin skoru AS grubuna göre rakamsal olarak daha düşük çıkmasına rağmen, aralarındaki bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür.
- 6- İnsan amniyon sıvısının, kıkırdak dokusu üzerindeki olumlu etkisinin mekanizmalarının aydınlatılması gerektiği ve ileriki çalışmaların bu eksende planlanmasının uygun olacağı saptanmıştır.
- 7- Yüksek molekül ağırlıklı hiyaluronik asit ve insan amniyon sıvısının kıkırdak hasarının ilerlemesini yavaşlattığı ve kıkırdak iyileşmesi üzerine olumlu etkilerinin olduğu kanaatine varılmıştır.

ÖZET

Kıkırdak iyileşmesinde amniyon sıvısı ile yüksek molekül ağırlıklı hiyaluronik asitin karşılaştırılması.

Bu deneysel çalışmada 28 adet Sprague Dawley tipi dişi ratın sağ dizleri kullanıldı. Ratlar kontrol, SF, AS ve HA olmak üzere 4 gruba ayrıldı.

Deneysel osteoartrit modeli oluşturmak için; kontrol grubu dışındaki gruplardaki ratlara medial menisektomi uygulandı. Kontrol grubundaki ratlara ise artrotomi sonrası başka bir işlem uygulanmadı.

Yeterli kıkırdak hasarını sağlamak için; ratların hareket etmelerine izin verilerek 3 hafta beklenildi. 3. haftanın sonunda SF grubundaki ratların sağ dizlerine 0,1ml serum fizyolojik, AS grubundakilere 0,1ml amniyon sıvısı, HA grubundakilere ise 0,1ml 15mg/ml konsantrasyonunda yüksek molekül ağırlıklı hiyaluronik asit eklem içi injeksiyon yoluyla uygulandı. Bu eklem içi injeksiyonlar aynı şekil ve dozlarda olmak üzere; 4. ve 5. haftaların sonlarında da tekrarlandı.

6.hafta sonunda tüm ratlar servikal dislokasyon uygulanarak öldürüldü. Sağ diz eklemleri alınarak, fiksasyon ve dekalsifikasyon uygulandı. Uygun kesitler Safranin-O boyası ile boyandıktan sonra, ışık mikroskobu altında Mankin skorlama sistemi kullanılarak değerlendirildi.

Gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırma Kruskal Wallis varyans analizi (Post- hoc olarak Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi) kullanılarak yapıldı. Sonuç olarak AS ve SF grupları arasında anlamlı fark olduğu görüldü ($P<0,008$). Benzer şekilde HA ve SF grupları arasında da anlamlı fark olduğu tespit edildi ($P<0,008$). AS ve HA grupları karşılaştırıldığında ise aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($P>0,008$).

SUMMARY

The comparison of amniotic fluid and high molecular weight hyaluronic acid on cartilage healing.

In this experimental study we utilize the right knees of 28 Sprague Dawley type female rats. The rats were divided into 4 groups named as control, SF, AS and HA.

In order to obtain an experimental osteoarthritis model; we perform medial meniscectomy to the rats except control group. We did not apply another process after arthrotomy to the rats belong to control group.

To supply an adequate cartilage injury; we allow rats to move in a period of 3 weeks. After this period we practise 0,1ml saline solution to the right knees of the rats in SF group, 0,1ml amniotic fluid to the AS group and 0,1ml high molecular weight hyaluronic acid with a concentration of 15mg/ml to the HA group through intraarticular injection. This intraarticular injections were repeated as the same dose and form, at the end of week 4 and 5.

At the end of week 6; all rats were euthanized by cervical dislocation. The right knee joints were taken, then fixation and decalcification was applied. The appropriate cross-sections were stained with Safranin-O, then examined under light microscope by using Mankin scoring system.

Comparisons among groups were performed by using Kruskal Wallis analysis of variance (Mann Whitney U test with Bonferroni correction as post-hoc test). Consequently there was a statistically significant difference between AS and SF groups ($P < 0,008$). Alike that a significant difference was seen among HA and SF groups ($P < 0,008$). When we compared AS and HA groups; the difference did not have a statistical meaningfulness ($P > 0,008$).

İÇİNDEKİLER

1- GİRİŞ VE AMAÇ	1
2- GENEL BİLGİLER	3
3- MATERYAL VE METOD	11
4- BULGULAR	18
5- TARTIŞMA	27
6- SONUÇLAR	34
7- ÖZET	35
8- İNGİLİZCE ÖZET (SUMMARY)	36
9- KAYNAKLAR	37

KAYNAKLAR

1. Bendele AM: Animal models of osteoarthritis. *J Musculoskel Neuron Interact*, 1(4): 363-376, 2001.
2. Yoshimi T, Takanori K, Obara T, Yamaguchi T, Sakakibara Y, Itoh H, Iwata H, Miura T: Effects of high-molecular-weight sodium hyaluronate on experimental osteoarthrosis induced by the resection of rabbit anterior cruciate ligament. *Clin Orthop Relat Res*, 298: 296-304, 1994.
3. Jean YH, Wen ZH, Chang YC, Lee HS, Hsieh SP, Wu CT, Yeh CC, Wong CS: Hyaluronic acid attenuates osteoarthritis development in the anterior cruciate ligament transected knee: Association with excitatory amino acid release in the joint dialysate. *J Orthop Res*, 24(5): 1052-1061, 2006.
4. Karaçal N, Koşucu P, Çobanoğlu Ü, Kutlu N: Effect of human amniotic fluid on bone healing. *J Surg Res*, 129: 283-287, 2005.
5. Özgenel GY, Gülaydan F, Özcan M: Effects of human amniotic fluid on cartilage regeneration from free perichondrial grafts in rabbits. *Br J Plast Surg*, 57: 423-428, 2004.
6. Özgenel GY, Şamli B, Özcan M: Effects of human amniotic fluid on peritendinous adhesion formation and tendon healing after flexor tendon surgery in rabbits. *J Hand Surg*, 26: 332-339, 2001.
7. Ayan İ, Esenkaya İ, Karakaplan M, Germen B, Milcan A, Zorludemir S, Özcan C: Sığan siyatik sinir iyileşmesinde insan plasenta süspansiyonunun etkisi. *Acta Orthop Traumatol Turc*, 41(2): 140-146, 2007.
8. Kerimoğlu S, Livaoğlu M, Sönmez B, Yuluğ E, Aynacı O, Topbaş M, Yarar S: Effects of human amniotic fluid on fracture healing in rat tibia. *J Surg Res*, Basım aşamasında, 2008.

9. Williams III RJ: Cartilage Repair Strategies. Humana Press Inc, Totowa, New Jersey, 2007, pp. 1-12.
10. Jungueira LC, Carneiro J, Kelley RO: Basic Histology. Eighth ed., Beta A.Ş, İstanbul, 1998, s. 124-131.
11. Weinstein SL and Buckwalter JA: Turek's Orthopaedics principles and their application. Sixth ed., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2005, pp. 26-31.
12. Tyyni A and Karlsson J: Biological treatment of joint cartilage damage. Scand J Med Sci Sports, 10(5): 249-265, 2000.
13. Wakitani S, Kawaguchi A, Tokuhara Y, Takaoka K: Present status of and future direction for articular cartilage repair. J Bone Miner Metab, 26: 115-122, 2008.
14. Miller MD: Miller'in Ortopedi Kitabı (çev. H Yetkin, M Yazıcı) Akademi Doktorlar Yayınevi, Ankara, 2006, s. 47
15. Mollenhauer JA: Perspectives on articular cartilage biology and osteoarthritis. Injury, 39S1: 5-12, 2008.
16. Treadwell BV and Mankin HJ: The synthetic processes of articular cartilage. Clin Orthop, 213: 50-61, 1986.
17. Moreland LW: Intraarticular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action. Arthritis Res Ther, 5: 54-67, 2003.
18. Murray RK, Granger DK, Mayes PA, Rodwell VW: Harper's Illustrated Biochemistry. Twenty sixth ed., Lange Medical Publications/McGraw-Hill, 2003, pp. 542-555.
19. Karaaslan Y: Klinik romatoloji. Hekimler Yayın Birliği, Ankara, 1996, s. 13-16.
20. Sadler TW: Langman's Medikal Embriyoloji (çev. C Başaklar) Palme yayıncılık, Ankara, 1993, s. 102-103.

21. Ostergaard K, Andersen CB, Petersen J, Bendtzen K, Salter DM: Validity of histopathological grading of articular cartilage from osteoarthritic knee joints. *Ann Rheum Dis*, 58: 208-213, 1999.
22. Wancket LM, Baragi V, Bove S, Kilgore K, Korytko PJ, Guzman RE: Anatomical localization of cartilage degradation markers in a surgically induced rat osteoarthritis model. *Toxicologic Pathology*, 33: 484-489, 2005.
23. Hayami T, Pickarski M, Zhuo Y, Wesolowski GA, Rodan GA, Duong LT: Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. *Bone*, 38: 234-243, 2006.
24. Moore EE, Bendele AM, Thompson DL, Littau A, Waggle KS, Reardon B, Ellsworth JL: Fibroblast growth factor-18 stimulates chondrogenesis and cartilage repair in a rat model of injury-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 13: 623-631, 2005.
25. Janusz MJ, Bendele AM, Brown KK, Taiwo YO, Hsieh L, Heitmeyer SA: Induction of osteoarthritis in the rat by surgical tear of the meniscus: Inhibition of joint damage by a matrix metalloproteinase inhibitor. *Osteoarthritis and Cartilage*, 10: 785-791, 2002.
26. Kawasaki K, Ochi M, Uchio Y, Adachi N, Matsusaki M: Hyaluronic acid enhances proliferation and chondroitin sulfate synthesis in cultured chondrocytes embedded in collagen gels. *J Cell Physiol*, 179: 142-148, 1999.
27. Frean SP, Abraham LA, Lees P: In vitro stimulation of equine articular cartilage proteoglycan synthesis by hyaluronan and carprofen. *Res Vet Sci*, 67: 183-190, 1999.
28. Kikuchi T, Yamada H, Shimmei M: Effect of high molecular weight hyaluronan on cartilage degeneration in a rabbit model of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 4: 99-110, 1996.

29. Jansen EJP, Emans PJ, Douw CM, Guldemond NA, Van Rhijn LW, Bulstra SK, Kuijer R: One intra-articular injection of hyaluronan prevents cell death and improves cell metabolism in a model of injured articular cartilage in the rabbit. *J Orthop Res*, 26(5): 624-630, 2008.
30. Sasaki T and Watanabe C: Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronic acid. *Bone*, 16: 9-15, 1995.
31. Balazs EA and Darzynkiewicz Z: The effect of hyaluronic acid on fibroblasts, mononuclear phagocytes and lymphocytes. *Biology and Fibroblasts*, 66: 237-252, 1973.
32. Balazs EA, Briller S, Denlinger JL: Na-hyaluronate molecular size variations in equine and human arthritic synovial fluids and the effect on phagocytic cells. *Semin Arthritis Rheum*, 11: 141-143, 1981.
33. Forrester JV and Balazs EA: Inhibition of phagocytosis by high molecular weight hyaluronate. *Immunology*, 40: 435-446, 1980.
34. Tobetto K, Nakai K, Akatsuka M, Yasui T, Ando T, Hirano S: Inhibitory effects of hyaluronan on neutrophil-mediated cartilage degradation. *Connect Tissue Res*, 29: 181-190, 1993.
35. Forrester JV and Lackie JM: Effect of hyaluronic acid on neutrophil adhesion. *J Cell Sci*, 50: 329-344, 1981.
36. Sandell LJ and Aigner T: Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res*, 3(2): 107-113, 2001.
37. Hsieh YS, Yang SF, Lue KH, Chu SC, Lu KH: Effects of different molecular weight hyaluronan products on the expression of urokinase plasminogen activator and inhibitor and gelatinases during the early stage of osteoarthritis. *J Orthop Res*, 26(4): 475-484, 2008.

38. Dahl LB, Dahl IMS, Borresen AL: the molecular weight of sodium hyaluronate in amniotic fluid. *Biochem Med Metab Biol*, 35(2): 219-226, 1986.
39. Amin AR, Dave M, Attur M, Abramson SB: COX-2, NO and cartilage damage repair. *Curr Rheumatol Rep*, 2: 447-453, 2000.
40. Tobetto K, Yasui T, Ando T, Hayaishi M, Motohashi N, Shinogi M, Mori I: Inhibitory effects of hyaluronan on arachidonic acid release from labeled human synovial fibroblasts. *Jpn J Pharmacol*, 60: 79-84, 1992.
41. Yasui T, Akatsuka M, Tobetto K, Hayaishi M, Ando T: The effect of hyaluronan on interleukin-1 alpha-induced prostaglandin E2 production in human osteoarthritic synovial cells. *Agents Actions*, 37: 155-156, 1992.
42. Jean YH, Wen ZH, Chang YC, Hsieh SP, Tang CC, Wang YH, Wong CS: Intra-articular injection of the cyclooxygenase-2 inhibitor parecoxib attenuates osteoarthritis progression in anterior cruciate ligament transected knee in rats: role of excitatory amino acids. *Osteoarthritis and Cartilage*, 15: 638-645, 2007.
43. Çoğalgil Ş, Karsan O, Cerrahoğlu L, Uğur M, Süleyman H, Gündoğdu C, Erdoğan F: Ratlarda oluşturulan deneysel artrit modelinde intraartiküler hyaluronik asit ve metil prednizolon asetatin kıkırdak üzerine etkileri. *Romatizma*, 17(2): 112-117.
44. Hofmann GE, Abramowics JS: Epidermal growth factor (EGF) concentrations in amniotic fluid and maternal urine during pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 69(3): 217-221, 1990.
45. Merimee TJ, Grant M, Tyson JE: Insulin-like growth factors in amniotic fluid. *J Clin Endocrinol Metab*, 59(4): 752-755, 1984.
46. Hill DJ, Tevaarwerk GJM, Arany E, Kilkenny D, Gregory M, Langford KS, Miell J: Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) is present in maternal and cord serum, and in the mother is associated with a binding protein immunologically related to the FGF receptor-1. *J Clin Endocrinol Metab*, 80(6): 1822-1831, 1995.

47. Longaker MT, Chiu ES, Harrison MR, Crombleholme TM, Langer JC, Duncan BW, Adzick NS, Verrier ED, Stern R: Studies in fetal wound healing IV. Hyaluronic acid-stimulating activity distinguishes fetal wound fluid from adult wound fluid. *Ann Surg*, 210(5): 667-672, 1989.
48. Longaker MT, Adzick NS, Hall JL, Stair SE, Crombleholme TM, Duncan BW, Bradley SM, Harrison MR, Stern R: Studies in fetal wound healing VII. Fetal wound healing may be modulated by hyaluronic acid stimulating activity in amniotic fluid. *J Pediatr Surg*, 25(4): 430-433, 1990.
49. Dahl L, Hopwood JJ, Laurent UBG, Lijia K, Tengblad A: The concentration of hyaluronate in amniotic fluid. *Biochem Med*, 30(3): 280-283, 1983.
50. Shida J, Jingushi S, Izumi T, Ikenoue T, Iwamoto Y: Basic fibroblast growth factor regulates expression of growth factors in rat epiphyseal chondrocytes. *J Orthop Res*, 19: 259-264, 2001.