

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
CERRAHİ ANABİLİM DALI

**TAVŞANLARDA DENEYSEL OSTEOARTRİT
MODELİNDE SIĞIR AMNİYOTİK SIVISI VE
HİYALURONİK ASİDİN EKLEM İÇİ
ENJEKSİYONLARININ KIKIRDAK DOKU ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

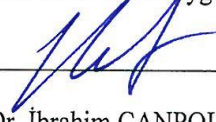
DOKTORA TEZİ
Murat TANRISEVER
2015

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

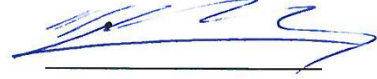


Prof. Dr. İbrahim CANPOLAT

Cerrahi Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sait BULUT



Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Sait BULUT

Prof. Dr. İbrahim CANPOLAT

Prof. Dr. Zeki OĞURTAN

Prof. Dr. Servet KILIÇ

Doç. Dr. Mustafa İSSİ



TEŞEKKÜR

Bu tez, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından “Hızlı Destek Programı, 1002” kapsamında 1130979 proje numarasıyla desteklenmiş olup, 12 aylık bir süre içinde tamamlanmıştır. Projenin zamanında ve başarıyla tamamlanması TÜBİTAK’ın verdiği mali destek ve proje sürecinde birçok konuda çözümleyici ve süreçleri hızlandırıcı politikası sayesinde gerçekleşmiştir. Bu nedenle proje ekibi olarak öncelikle TÜBİTAK’a,

Doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Sait BULUT ‘a ve bu süreçte yardımlarını gördüğüm Anabilim Dalı Başkanım Prof. Dr. İbrahim CANPOLAT ve tezin tüm aşamalarında katkıda bulunan Doç. Dr. Enis KARABULUT’a, Doç. Dr. Mustafa İSSİ’ye, Cerrahi Anabilim Dalı tüm öğretim üyelerine ve asistan arkadaşlara,

Tezimin patolojik çalışmalarında destek veren Prof. Dr. Hatice ERÖKSÜZ ve Arş. Gör. Burak KARABULUT’a, istatistiksel değerlendirmelerdeki katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Murad GÜRSES’e çok teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan ve tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen kardeşime, hayatımın her aşamasında sabırla ve sevgiyle yanımda olan sevgili annem ve babama, tabiki hayatıma girdiği ilk günden beri gösterdiği destek ve ilgiden dolayı biricik eşime ve yaşam kaynağım canım oğlum Mert’ime ...

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar LİSTESİ	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
KISALTMALAR LİSTESİ	xiv
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. Diz Eklemının Anatomisi	6
3.1.1. Kemik Yapı.....	7
3.1.1.1. Femur	7
3.1.1.2. Tibia	7
3.1.1.3. Patella.....	8
3.1.2. Kaslar	9
3.1.2.1. Ekstansör Kaslar.....	9
3.1.2.1.1. M. Kuadriseps Femoris	9
3.1.2.1.1.1. M. Rektus Femoris.....	10
3.1.2.1.1.2. M. Vastus Lateralis	10
3.1.2.1.1.3. M. Vastus Medialis	10
3.1.2.1.1.4. M. Vastus İntermedius	11

3.1.2.2. Fleksör Kaslar	11
3.1.2.2.1. Hamstring Grubu Kaslar	11
3.1.2.2.2. M. Popliteus.....	12
3.1.2.2.3. M. Gastroknemius	12
3.1.2.2.4. M. Plantaris	12
3.1.2.3. Rotasyon Yaptıran Kaslar	12
3.1.2.3.1. İçe Rotasyon Yaptıran Kaslar.....	12
3.1.2.3.2. Dışa Rotasyon Yaptıran Kaslar	13
3.1.3. Menisküsler.....	14
3.1.4. Çapraz Bağlar	15
3.1.4.1. Ön Çapraz Bağ (ÖÇB)	15
3.1.4.1.1. Ön Çapraz Bağın Görevleri.....	15
3.1.4.2. Arka Çapraz Bağ (AÇB)	16
3.1.4.2.1. Arka Çapraz Bağın Görevleri.....	16
3.1.5. Eklem Dış Bağları.....	16
3.1.5.1. Ligamentum Patella	16
3.1.5.2. Ligamentum Collaterale Laterale.....	16
3.1.5.3. Ligamentum Collaterale Mediale.....	17
3.1.6. Bursalar	17
3.1.7. Eklem Kapsülü.....	18
3.1.8. Sinovyal Zar.....	19
3.1.9. Sinovyal Sıvı.....	19
3.1.10. Kıkırdak Doku	20
3.1.10.1. Kıkırdak Tipleri.....	20

3.1.10.1.1. Hiyalin Kıkırdak	20
3.1.10.1.2. Elastik Kıkırdak	21
3.1.10.1.3. Fibröz Kıkırdak	21
3.1.10.2. Eklem Kıkırdağı	22
3.1.10.2.1. Yüzeysel Tabaka	23
3.1.10.2.2. Orta Tabaka	24
3.1.10.2.3. Derin Tabaka	24
3.1.10.2.4. Kalsifiye Tabaka.....	24
3.1.10.3. Kondrositler	25
3.1.10.4. Matriks	25
3.2. Diz Eklemi Biyomekaniği	26
3.3. Eklem Lubrikasyonu	27
3.3.1. Sıvı Film (İnce Tabaka) Lubrikasyonu	27
3.3.2. Sınırlayıcı Lubrikasyon.....	28
3.4. Artrit	28
3.4.1. Osteoartrit.....	29
3.4.1.1. Etiyoloji.....	30
3.4.1.2. Patogenez	31
3.4.1.3. Klinik Bulgular	33
3.4.1.4. Teşhis	33
3.4.1.4.1. Radyografiye Alternatif Görüntüleme Teknikleri	34
3.4.1.4.1.1. Bilgisayarlı Tomografi (BT) ve Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG).....	34
3.4.1.4.1.2. Ultrasonografik Muayene	34

3.4.1.4.1.3. Sintigrafi	35
3.4.1.5. Tedavi.....	35
3.4.1.5.1. Medikal Tedavi.....	35
3.4.1.5.1.1. Analjezikler.....	35
3.4.1.5.1.2. Diğer Medikal Tedavi Seçenekleri	36
3.4.1.5.2. Medikal Olmayan Tedavi Yöntemleri.....	36
3.4.1.5.2.1. Egzersiz.....	36
3.4.1.5.2.2. Kilo Kontrolü.....	36
3.4.1.5.2.3. Yem Katkı Maddeleri	37
3.4.1.5.2.4. Düşük Seviyeli Lazer Uygulaması	37
3.4.1.5.2.5. Akupunktur	38
3.4.1.5.2.6. Cerrahi Yöntemler	38
3.4.1.6. Osteoartritisde İntraartiküler Enjeksiyon Kullanımı.....	38
3.4.1.6.1. Kortikosteroidler	39
3.4.1.6.2. Hiyaluronik Asit	39
3.4.1.6.3. Trombositten Zengin Plazma	41
3.4.1.6.4. Otolog Serum Kullanımı	42
3.4.1.6.5. Mezenkimal Kök Hücre	42
3.4.1.6.6. Amniyotik Sıvı	43
3.4.1.7. Diğer Tedavi Seçenekleri.....	43
3.5. Deneysel Osteoartritis Hayvan Modelleri	44
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	46
4.1. Cerrahi Yöntem	46
4.1.1. Anestezi	46

4.1.2. Operatif Yöntem	46
4.2. Kullanılan Eklem İçi Sıvılar	51
4.3. Histopatolojik ve İmmunohistokimyasal Yöntem.....	53
4.3.1. Hematoksilen-Eosin Boyama Yöntemi	54
4.3.2. Safranin–O Boyama Yöntemi.....	54
4.3.3. İmmunohistokimyasal Boyamalar	55
4.4. Radyolojik Değerlendirme	56
4.5. Histopatolojik ve İmmunohistokimyasal Değerlendirme.....	58
4.6. İstatistiksel Yöntem	59
5. BULGULAR	60
5.1. Klinik Bulgular	60
5.2. Radyolojik Bulgular	60
5.2.1. Otuzuncu Güne Ait Radyolojik Bulgular	60
5.2.2. Doksanıncı Güne Ait Radyolojik Bulgular.....	61
5.2.3. Yüzyirminci Güne Ait Radyolojik Bulgular.....	61
5.3. Makroskobik Bulgular	70
5.4. Histopatolojik Bulgular	73
5.4.1. Femur Eklem Yüzeyine Ait Histopatolojik Bulgular	73
5.4.2. Tibia Eklem Yüzeyine Ait Histopatolojik Bulgular	79
5.5. İmmunohistokimyasal Bulgular	81
5.5.1. Kaspaz – 3 Boyaması.....	81
5.5.2. Kaspaz – 8 Boyaması.....	84
5.5.3. MMP – 13 Boyaması	86
5.6. İstatistiksel Sonuçlar.....	91

5.6.1. Radyolojik Bulguların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi.....	91
6.5.2. Mankin Skorlarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	911
5.6.3. İmmunohistokimyasal Boyamanın İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi.....	922
6. TARTIŞMA	955
7. KAYNAKLAR	101
8. ÖZGEÇMİŞ.....	111

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. Kellgren- Lawrence skorlaması	57
Tablo 2. Mankin skorlaması	58
Tablo 3. Sığır amniyotik sıvısı grubu radyoloji sonuçları.....	66
Tablo 4. Hiyaluronik asit grubu radyoloji sonuçları	68
Tablo 5. Kontrol grubu radyoloji sonuçları.....	69
Tablo 6. Grupların toplam radyoloji skorları	70
Tablo 7. Femoral eklem kırıkdağlarının ayrıntılı Mankin skorları	78
Tablo 8. Grupların femoral eklem kırıkdağı toplam ve ortalama Mankin skorları	79
Tablo 9. Tibial eklem kırıkdağlarının ayrıntılı Mankin skorları	80
Tablo 10. Grupların tibial eklem kırıkdağı toplam ve ortalama Mankin skorları	81
Tablo 11. SAS grubu Kaspaz-3, Kaspaz-8, MMP-13 immunohistokimyasal boyanma yüzdesi ve şiddeti.....	88
Tablo 12. HA grubu Kaspaz-3, Kaspaz-8, MMP-13 immunohistokimyasal boyanma yüzdesi ve şiddeti.....	89
Tablo 13. KONT grubu Kaspaz-3, Kaspaz-8, MMP-13 immunohistokimyasal boyanma yüzdesi ve şiddeti.....	90
Tablo 14. Radyoloji sonuçları istatistiksel değerlendirmesi	911
Tablo 15. Femur veTibia eklem kırıkdağına ait Mankin skorları istatistiksel değerlendirme si	Hata! Yer işareti tanımlanmamış. 2
Tablo 16. Kaspaz-3 boyanma yüzdesi istatistiksel değerlendirme si	933
Tablo 17. Kaspaz-8 boyanma yüzdesi istatistiksel değerlendirme si	933
Tablo 18. MMP-13 boyanma yüzdesi istatistiksel değerlendirme si	944

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Tavşan diz eklemının önden şematize edilmiş görünümü	9
Şekil 2. Tavşan diz eklemi çevresinde bulunan kasların görünümü	13
Şekil 3. Tavşan diz eklemının ligament ve tendolarının önden görünümü	17
Şekil 4. Eklem kıkırdağının histolojik yapısı.....	23
Şekil 5. Sağ diz traş edilip Povidon iyot ile steril hale getirildikten sonraki görüntüsü.....	47
Şekil 6. Deri ve deri altı bağ dokunun kesildikten sonraki görüntüsü.....	48
Şekil 7. Lateral parapatellar kesi ile patellanın mediale kaydırıldıktan sonraki görüntüsü.....	48
Şekil 8. Ön çapraz bağın kesilme anı görüntüsü.....	49
Şekil 9. Kesilmiş olan ön çapraz bağın görüntüsü.....	49
Şekil 10. Eklem kapsülünün dikişlerle kapatıldıktan sonraki görüntüsü.....	50
Şekil 11. Derinin dikişlerle kapatıldıktan sonraki görüntüsü	50
Şekil 12. Serbest dolaşım kafeslerinin görüntüsü	51
Şekil 13. Enjektör içerisinde kullanıma hazır sığır amniyotik sıvısının görüntüsü	52
Şekil 14. Kullanıma hazır cam enjektörde hiyaluronik asitin görüntüsü.....	52
Şekil 15. Kullanılan dijital röntgen cihazı	57
Şekil 16. SAS grubu 5 nolu deneğe ait radyografiler	64
Şekil 17. HA grubu 6 nolu deneğe ait radyografiler.....	652
Şekil 18. Kontrol grubu 1 nolu deneğe ait radyografiler	66
Şekil 19. SAS grubu 7 nolu bireyin 120. gün postero-anterior radyografisi	62

Şekil 20. HA grubu 7 nolu bireyin 120. gün postero- anterior radyografisi.....	62
Şekil 21. KONT grubu 5 nolu bireyin 120. gün postero- anterior radyografisi ...	63
Şekil 22. SAS grubuna ait diz ekleminin makroskopik görünümü.....	71
Şekil 23. HA grubuna ait diz ekleminin makroskopik görünümü	72
Şekil 24. KONT grubuna ait diz ekleminde makroskopik olarak genel bir disorganizasyon.....	72
Şekil 25. SAS grubuna ait femur eklem kıkırdağında yüzeysel düzensizlikler ve tidemark bütünlüğünde bozulma (H.E. x10).....	74
Şekil 26. HA grubuna ait femur eklem kıkırdağında orta tabakaya kadar inen yarıklar, fibrilasyon ve matriks kaybı (H.E. x4)	75
Şekil 27. Kontrol grubu femur eklem kıkırdağında genel disorganizasyon ve geniş bir alanda nekroz (H.E. x4)	75
Şekil 28. SAS grubuna ait femur eklem kıkırdağında yüzeysel düzensizlikler (Safranin-O x10)	76
Şekil 29. HA grubunda yüzeysel femur eklem kıkırdağında bölgesel inceleme (Safranin-O x10)	76
Şekil 30. KONT grubuna ait femur eklem kıkırdağında kalsifiye tabakaya kadar inen derin yarıklar, genel disorganizasyon, negatif boyanma ve tidemark bütünlüğünde bozukluk (Safranin-O x10)	77
Şekil 31. SAS Grubuna ait femur eklem kıkırdağının tüm katmanlarında pozitif sitoplazmik boyanmalar (IHC kaspaz-3 x20).....	82
Şekil 32. HA Grubuna ait femur eklem kıkırdağında orta tabaka kondrositlerde yoğunlaşan pozitif sitoplazmik boyanmalar (IHC kaspaz-3 x20).....	83

Şekil 33. KONT Grubuna ait femur eklem kıkırdağında tüm katmanlarda yoğun sitoplazmik pozitif boyanmalar (IHC kaspaz-3 x20).....	83
Şekil 34. SAS Grubuna ait tibia eklem kıkırdağında tüm katmanlarda orta derecede sitoplazmik boyanmalar (IHC kaspaz-8 x20)	84
Şekil 35. HA Grubuna ait tibia eklem kıkırdağında tüm katmanlarda pozitif sitoplazmik boyanmalar (IHC kaspaz-8 x20).....	85
Şekil 36. KONT Grubuna ait tibia eklem kıkırdağında tüm katmanlarda ileri derecede kuvvetli pozitif sitoplazmik boyanmalar (IHC kaspaz-8 x20)	85
Şekil 37. SAS Grubuna ait femur eklem kıkırdağında sınırlı bölgede pozitif, genel olarak ta negatif boyanma (IHC MMP13 x10).	86
Şekil 38. HA Grubuna ait femur eklem kıkırdağında pozitif sitoplazmik boyanma (IHC MMP-13 x40).....	87
Şekil 39. KONT Grubuna ait tibia eklem kıkırdağında yaygın pozitif sitoplazmik boyanmalar (IHC MMP-13 x20).....	87

KISALTMALAR LİSTESİ

AÇB	: Arka çapraz bağ
CS	: Kondrotin sülfat
DAB	: Diaminebenzidin
ECM	: Ekstrasellüler matriks
HA	: Hiyaluronik asit grubu
HASA	: Hiyaluronik asit aktive edici ajan
HRP	: Horseradish peroksidaz
IGFs	: İnsülin benzeri büyüme faktörleri
IHC	: İmmunohistokimyasal
IL	: İnterlökin
KONT	: Kontrol grubu
KS	: Keratan sülfat
M	: Musculus
MMP	: Matriksmetalloproteinaz
n	: Birey sayısı
NSAİ	: Non–sterodial antiinflamatuvar ilaç
OA	: Osteoartritis
ÖÇB	: Ön çapraz bağ
PBS	: Fosfat tampon çözeltisi
SAS	: Sığır amniyotik sıvısı grubu
TIMP	: Doku metalloproteinaz inhibitörleri
TNF	: Tümör nekroz faktörü

1. ÖZET

Bu deneysel çalışmada tavşanların genu eklemlerinde oluşturulan osteoartritis (OA) modelinde sığır amniyotik sıvısının kıkırdak doku üzerinde oluşturacağı etkilerin araştırılması ve hiyaluronik asit ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada 21 adet tavşan kullanılmış olup, sağ dizlerinin ön çapraz bağları OA oluşturmak amacıyla kesildi. Tavşanlar 4 hafta sonra rastgele 3 eşit gruba ayrıldı. Birinci grup tavşanlara birer hafta ara ile 3 kez eklem içi 0.5mL sığır amniyotik sıvısı (SAS), ikinci grup tavşanlara birer hafta ara ile 3 kez eklem içi 0.5 mL hiyaluronik asit (HA) enjekte edildi. Üçüncü grup tavşanlar ise kontrol grubu (KONT) olarak ayrıldı ve herhangi bir uygulama yapılmadı. Tüm deneklerin operasyona alınmadan önce ve operasyonu takiben 30, 90 ve 120. günlerde sağ genu eklemlerinin postero-anterior ve medio-lateral pozisyonda radyografileri alındı. Alınan radyografilerin radyolojik değerlendirilmesi Kellgren- Lawrence skorlaması kullanılarak yapıldı. SAS ve HA gruplarında daha çok 2 ve 3. evre bulgular görülürken, KONT grubunda 3 ve 4. evreler görüldü. En son uygulanan eklem içi enjeksiyondan 12 hafta sonra bütün tavşanlar kas içi yüksek doz anestezi madde uygulanarak ötenazi edildi. Femur ve tibia eklem yüzleri Mankin skorlaması kullanılarak ayrı ayrı histopatolojik olarak değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda femur eklem kıkırdağı SAS grubu ortalaması 4.85; HA grubu ortalaması 5.00; KONT grubu ortalaması 11.71 olarak hesaplandı. Tibial eklem yüzünün SAS grubu ortalaması 5.00; HA grubu ortalaması 5.14; KONT grubu ortalaması 9.57 olarak tespit edildi. Bu

değerlendirmelere ek olarak grupların hem femoral hem de tibial eklem yüzleri kaspaz-3, kaspaz-8 ve MMP-13 kullanılarak immunohistokimyasal olarak değerlendirildi. SAS ve HA grubunda zayıf-orta şiddette ve %30-40 boyanma gözlenirken, KONT grubunda şiddetli ve %60-70 oranında boyanma görüldü. OA'nın ileri derecede olduğunun bir göstergesi olan apoptozis (programlı hücre ölümü) yüzdesinin, kontrol grubunda diğer gruplara göre yüksek olduğu tespit edildi. Alınan sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde Mann-Whitney U Testi kullanıldı. Tüm istatistiksel sonuçlarda SAS ve HA grupları arasında anlamlı bir fark bulunmazken KONT grubu ile aralarında ileri derecede önemli fark bulundu ($P < 0.01$).

Sonuç olarak, büyüme faktörlerinden zengin inert bir sıvı olan SAS'm, tavşan deneysel OA modelinde kıkırdak dokudaki dejeneratif değişikliklere karşı koruyucu etkisinin olması nedeniyle kıkırdak koruyucu tedavi ajanlarına alternatif olabileceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Deneysel osteoartritis, sığır amniyotik sıvısı, hiyaluronik asit, kıkırdak koruyucu etki, histopatoloji

2. ABSTRACT

COMPARISON OF THE EFFECTS OF INTRA-ARTICULAR INJECTIONS OF BOVINE AMNIOTIC FLUID AND HYALURONIC ACID ON CARTILAGE TISSUE IN AN EXPERIMENTAL OSTEOARTHRITIC RABBIT MODEL

In this experimental study, effects of bovine amniotic fluid and hyaluronic acid were compared on an osteoarthritic model induced in the rabbit stifle joints.

The study was performed on 21 rabbits undergoing anterior cruciate ligament transaction for establishing osteoarthritis. Four weeks later, the rabbits were divided into 3 equal groups of 7 animals, each. The first group rabbits received intra articular injection of 0.5 mL bovine amniotic fluid (BAF) three times at one week interval. The second group rabbits received intra articular injection of 0.5 mL hyaluronic acid (HA) three times at one week interval. The third group rabbits served as a control with no application. Radiographs were taken postero-anteriorly and medio-laterally of the right stifle joint immediately before and after the operation at 30th, 90th and 120th days. Radiological evaluations of radiographs were assessed by using of Kellgren and Lawrence osteoarthritic scores. Radiologic evaluation revealed that while control group had scores of grade 3 and 4, scores of grade 2 and 3 were obtained for the BAF and HA groups. All rabbits in three groups were sacrificed twelve weeks after the last intra articular injection. Articular surfaces of the femur and tibia were evaluated by using Mankin scoring system for histopathological cartilage examination. The mean scores of 4.85, 5.00 and 11.71 were obtained for the BAF, HA and control groups on the evaluation of femoral articular cartilage, respectively. It was 5.00,

5.14 and 9,57 for the BAF, HA and control groups, on the evaluation of tibial articular cartilage, respectively. In addition to these evaluations, both femoral and tibial articular surfaces were evaluated utilizing immunohistochemical examination by using Caspase-3, Caspase-8 and MMP-13. While staining percentage was found to be 60- 70% with severe staining in the control group, in the BAF and HA groups it was 30- 40% with middle staining. The amount of apoptosis of the control group was found to be higher than those of other groups which is the indicative of high levels of osteoarthritis. The results were statistically evaluated using the Mann-Whitney U test. All statistical results showed that there were highly significant differences between the control group and other groups. On the other hand there was no significant difference between the BAF and HA groups ($P < 0.01$).

It was concluded that the use of BAF, which is an inert fluid, rich in growth factors had protective effects against cartilage degenerative changes in an experimental rabbit model and it may be therefore an alternative agent to be used in cartilage protective therapy.

Keywords: Experimental osteoarthritis, bovine amniotic fluid, hyaluronic acid, chondroprotective effects, histopathology

3. GİRİŞ

Osteoarthritis (OA) eklem kıkırdağının fibrilasyonu ile başlayan, ilerleyici ve düzensiz kıkırdak kaybı, osteofit oluşumu, subkondral skleroz, periartriküler yapılarda ve sinovyal membranda bir dizi anormalliklerle karakterize dejeneratif eklem hastalığıdır (1,2).

Günümüzde OA için kesin bir tedavi yöntemi bulunamamıştır. Hastalığın temel patolojisi olan ilerleyici kıkırdak hasarını azaltmak için çalışmalar devam etmektedir. Çalışmaların büyük çoğunluğu deneysel OA modeli oluşturulmuş hayvanlar üzerinde yapılmıştır. Çeşitli deney hayvanlarında değişik metodlar uygulanarak hangi sürede ve ne seviyede kıkırdak hasarı olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur(3). Tedavide, OA oluşumunu önleyecek, durduracak etkenler henüz yeterli seviyeye ulaşmamıştır. Uygulamada temini kolay, tedavide etkin materyallere gereksinim vardır.

Hyaluronik asidin kıkırdak iyileşmesi ve OA ilerleyişini yavaşlatıcı etkileri bilinmekte ve günümüzde OA tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (4,5).

Ayrıca yapılan birkaç çalışmada insan amniyotik sıvısı, OA'daki kıkırdak hasarının önlenmesinde ve kıkırdak iyileşmesinde hyaluronik aside alternatif olarak kullanılmıştır (6-8).

Bu çalışmada, üzerinde birçok araştırma yapılmış olan insan amniyotik sıvısından yola çıkılarak erişimi çok daha kolay, ekonomik ve ayrıca veteriner hekimliğin erişim ve kullanım sahasına uygun olan sığır amniyotik sıvısının

OA'da kıkırdak doku üzerindeki etkinliğinin ortaya konması ve yaygın olarak kullanılan hiyaluronik asit ile etkilerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

3.1. Diz Eklemının Anatomisi

Diz eklemi (articulatio genus); femur, tibia ve patellanın katılımıyla şakillenmiş olup menteşe niteliğinde, diartrodial (tam oynar) bir eklemdir. Bu eklem iki eklemi kapsamaktadır. Femur ile tibia arasındaki articulatio femorotibialis ve femur ile patella arasındaki articulatio femoropatellaristir (9-11).

-Articulatio femorotibialis: Femurun distal ucu ile tibiannın proximal ucu arasındaki eklemdir. Eklem çıkıntısını femurun condylus lateralis ve condylus medialis, eklem çukurluğunu ise tibiannın nispeten iç bükey olan condylus lateralis ve condylus medialis oluşturur. Femurun transvers yöndeki bir eksen etrafında fleksiyon ve ekstensiyon hareketlerini yapar. Ayrıca fleksiyon hareketi esnasında bir miktar rotasyon hareketi de yapabilir (9, 15).

-Articulatio femoropatellaris: Femur ile patella arasında bulunan eklemdir. Eklemın oluşumuna katılan kemik sayısına göre yalın (simplex), fonksiyon itibariyle de delabens (kızak) bir eklemdir. Eklem kapsülü bu bölgede geniştir ve femurun kondilleri ile patellanın sınırlarını sarar. Eklem boşluğu özellikle at ve sığırlarda articulatio femorotibialisin eklem kapsülünün şekillendirdiği medial ve lateral keselerle iştirak halinde bulunur (9).

3.1.1. Kemik Yapı

Diz ekleminin konveks olan yüzeyi femurun kondilleri, konkav olan yüzeyi ise tibiyanın proximal ucu tarafından oluşturulur (Şekil 1). Ayrıca ekleme ön taraftan patella da dahil olmaktadır(9,12).

3.1.1.1. Femur

Distal ucu condylus lateralis ve condylus medialis adı verilen iki kısımdan oluşmuştur. Ön tarafta ise trochlea ossis femoris bulunmaktadır. İki kondil fossa intercondylaris denilen derin bir çukur ile ayrılmıştır. İki kondil arasında enine uzanan çizgiye linea intercondylaris adı verilir. Trochlea ossis femoris lateral ve medialde yer alan birer labium ile bu labiumları birbirinden ayıran bir oluktan ibarettir. Patella bu oluşun üzerinde kayma hareketini gerçekleştirir (12,13).

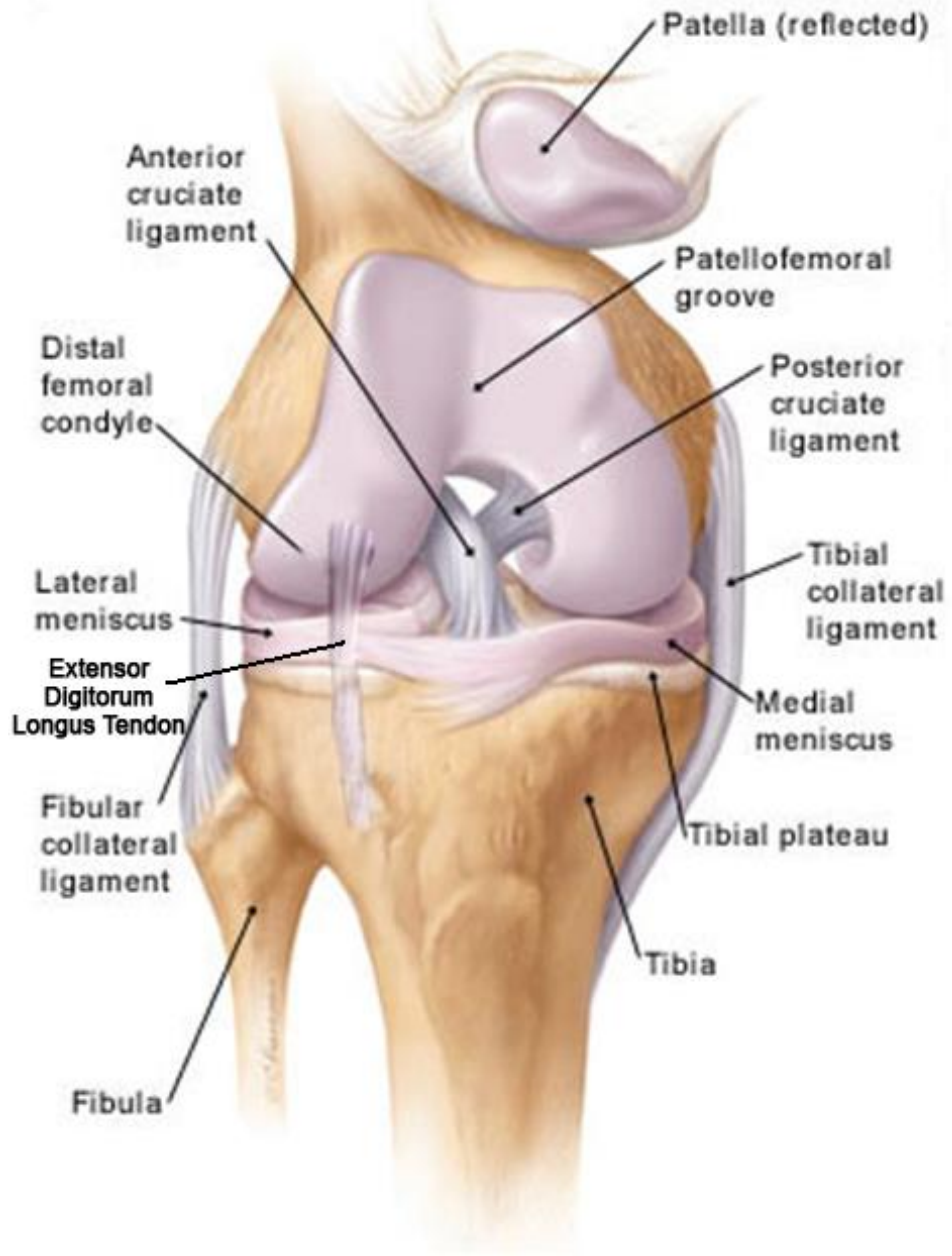
3.1.1.2. Tibia

Tibia vücudun femurdan sonra en uzun ikinci kemiğidir. Ekleme katılan üst ucu condylus medialis ve condylus lateralis adında iki büyük oluşumdan meydana gelir. Bu iki condylus ön ve dış tarafında yer alan sulcus extensorius, arkada yer alan insicura poplitea vasıtasıyla birbirinden ayrılmışlardır. Her iki kondilin üst yüzünde femurun kondilleri ile eklem yapan birer eklem yüzü yani facies articularis proximalis bulunur. Bu iki eklem yüzü orta kesimlerden itibaren merkeze doğru giderek yükselen bir tümseklik, bu tümseklerin uçları da birer çıkıntı oluşturur. Bu çıkıntılara tuberculum intercondylare mediale ve tuberculum intercondylare laterale adı verilir. Bu iki çıkıntı birlikte eminentia intercondylaris oluşturur. Tibial plato da denilen bu eklem yüzlerini birbirinden ayıran eminentia

intercondylaris, femurun fossa intercondylarisine girer. Eminentia intercondylarisin önündeki anterior interkondiler fossada önden arkaya doğru medial menisküs ön boynuzu, ön çapraz bağ ve lateral menisküs ön boynuzu bulunur. Posterior interkondiler fossada ise önden arkaya medial menisküs arka boynuzu, lateral menisküs arka boynuzu ve arka çapraz bağ bulunur (12,13).

3.1.1.3. Patella

Patella (diz kapağı kemiği), trochlea ossis femorisin önünde yer alan ve ona bir eklemlle bağlanan bir kemiktir. Musculus quadriceps femorisin kirişine gömülmüş, vücudun en büyük susam (sesamoid) kemiğidir. Patellanın facies articularis ve facies cranialis olmak üzere iki yüzü vardır. Trochlea ossis femorise bakan yüzüne facies articularis öne bakan dışbükey ve pürüzlü olan yüzeyine ise facies cranialis denir (9).



Şekil 1.Tavşan diz eklemi nin önden şematize edilmiş görünümü(14)

3.1.2.Kaslar

3.1.2.1. Ekstansör Kaslar

3.1.2.1.1. M. Kuadriseps Femoris

Uyluğun ön ve yan yüzünü örten geniş, aynı zamanda kalın bir kastır (Şekil 2). Diz eklemi nin en kuvvetli ekstansör kası olan M. kuadriseps femoris;

M. vastus lateralis, M. vastus medialis, M. vastus intermedius ve M. rectus femoris kasları tarafından meydana getirilen uyluğun dört başlı kasıdır (9).

3.1.2.1.1.1. M. Rektus Femoris

Femurun ön tarafında, M. vastus lateralis ile M.vastus medialis arasında yer alır. Uzun ve iğ şeklinde bir kاستır. Area lateralis m. recti femoris ve area medialis m. recti femoristen iki baş şeklinde başlar. M. kuadriseps femorisin diğer porsiyonlarının tendoları ile birleşir. Geniş ve kalın bir kiriş vasıtası ile patellada, hatta ligamentum patella intermedium vasıtası ile de sulcus tuberositas tibia ve crista tibiada sonlanır (9, 15).

3.1.2.1.1.2. M. Vastus Lateralis

Femurun dış yan yüzeyinde yer alır. M. kuadriseps femorisin en büyük porsiyonudur. Femurun üst kesiminin ön ve dış yanından başlar. M. kuadriseps femorisin diğer porsiyonları ile birlikte patellaya ve crista tibiaya bağlanır (9).

3.1.2.1.1.3. M. Vastus Medialis

Femurun iç yanında yer alır. Femurun üst kesiminin iç yanından başlar. M. kuadriseps femorisin diğer kısımları ile birlikte patellada ve crista tibiada sonlanır (9).

3.1.2.1.1.4. M. Vastus İntermedius

M. vastus lateralis ve M. vastus medialisin arasında, M. rectus femorisin derinliğinde bulunur. Femur gövdesinin ön ve dış yanından başlar. M. kuadriseps femorisin diğer porsiyonları ile birlikte patellada ve crista tibiada sonlanır (9, 15).

3.1.2.2. Fleksör Kaslar

3.1.2.2.1. Hamstring Grubu Kaslar

Uyluğun arka tarafında bulunan kaslardır. M.semitendinosus, M. semimembranosus ve biceps femoris kaslarına “hamstring grubu kaslar” adı verilir (Şekil 2). M.semitendinosus, M. sartorius ve M. gracilis kasları pes anserinus (kaz ayağı) oluşturarak, tibianın condylus medialisine yapışırlar. Bu kaslardan biceps femorisin kısa başı dışında tümünün innervasyonu N. tibialis tarafından sağlanır. M.biceps femorisin kısa başı ise N. peroneus communis tarafından innerve edilir (12,13,15).

Hamstring grubu kaslar iki ayrı eklem üzerinden geçtiklerinden kalça eklemi aracılığı ile uyluğa ekstensiyon ve diz eklemi aracılığı ile bacağına fleksiyon hareketi yaptırırlar. Dize olan etkileri kalça eklemine pozisyonuna bağlıdır(12, 15).

Kalça fleksiyonda iken kasların başlangıç ve bitiş noktaları arasındaki uzaklık giderek artar. Kas uzadıkça gerileceğinden kalça fleksiyonda iken diz fleksörü olarak etkisi artar (12,15).

3.1.2.2.2. M. Popliteus

Tibianın arkasında ve derinde yer alan bir kastır. Femurun dış kondilinin yanından başlar. Tibianın arka yüzündeki linea m. popliteide sonlanır. Articulatio femorotibialisin fleksörüdür ve N. tibialis tarafından innerve edilir (9).

3.1.2.2.3. M. Gastroknemius

Bacağın arka tarafında yer alan kalın bir kastır. Medial ve lateral başları femoral kondillerin arka yüzünden çıkar soleus kasını da içine alarak, aşağıda aşıl tendonunu oluşturup kalkaneusa yapışır ve diz eklemine fleksiyon yaptırır (9,12).

3.1.2.2.4. M. Plantaris

Femur kondilinin üst dış kısmından köken alıp, ince bir tendon halinde gastroknemius kasının içteki başı altında ilerler (12).

3.1.2.3. Rotasyon Yaptıran Kaslar

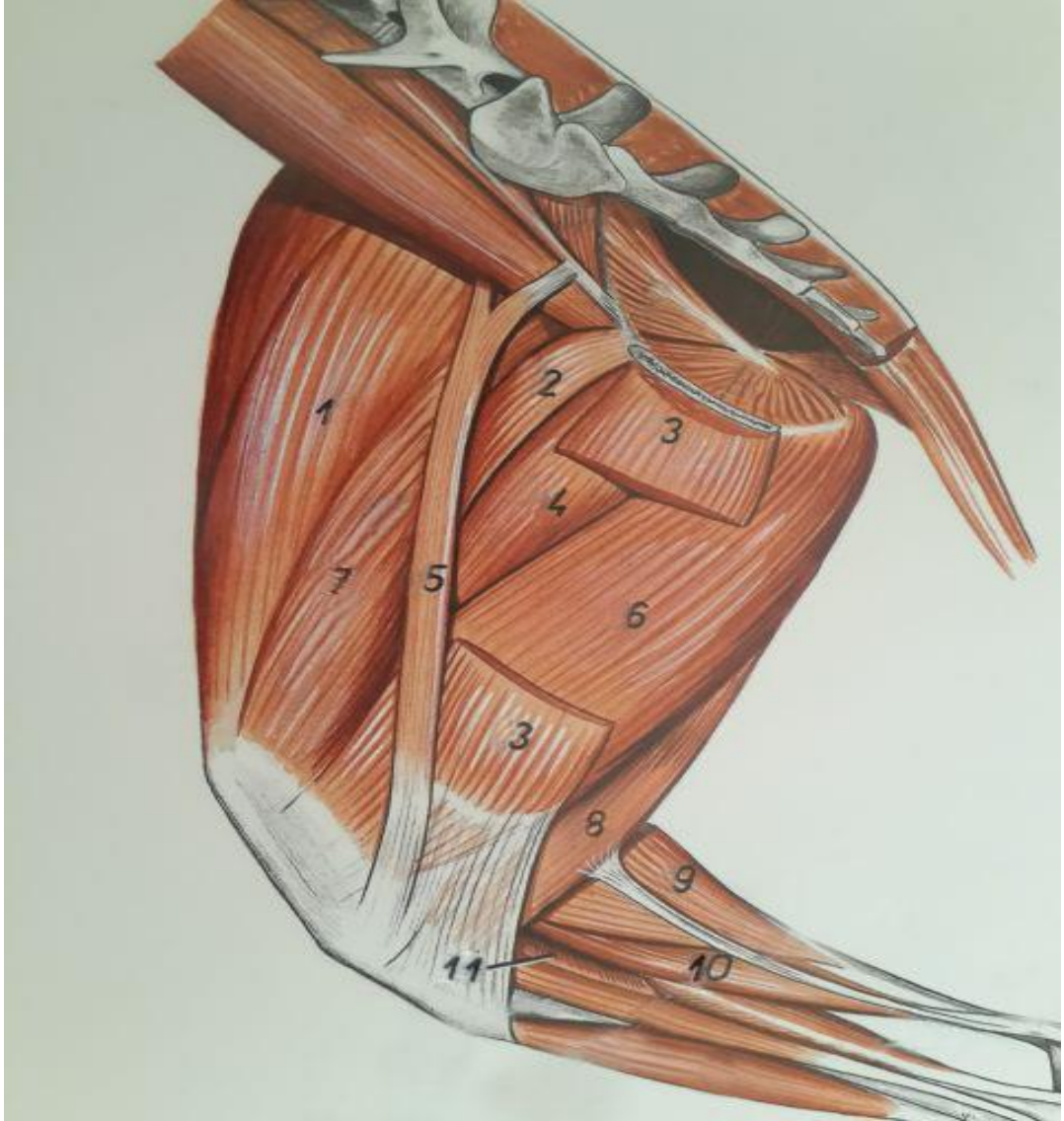
Diz eklemi, rotasyon hareketini fleksiyon ve ekstensiyona kıyasla çok daha küçük bir eklem hareket açıklığında gerçekleştirir. Bu hareket sırasında menisküsler, femurun condyluslarıyla birlikte tibianın üst eklem yüzü boyunca hareket eder (12,13,15).

3.1.2.3.1. İçe Rotasyon Yaptıran Kaslar

Diz eklemine içe rotasyonunu sağlayan kaslar; M. popliteus, M. semitendinosus, M. semimembranosus, M. sartorius ve M. gracilistir (12).

3.1.2.3.2. Dışa Rotasyon Yaptıran Kaslar

Diz ekleminde dışa rotasyonu gerçekleştiren kaslar; M. biceps femoris ve tensor fascia lata'dır. Dış rotasyon esnasında çapraz bağlar gevşediğinden dolayı diz ekleminde dış rotasyon hareketi iç rotasyona göre daha fazla olmaktadır (12,15).



Şekil 2. Tavşan diz eklemi çevresinde bulunan kasların görünümü(16)

1, m. rectus femoris; 2, m. pectineus; 3, m. gracilis; 4, m. adductor; 5, m. sartorius; 6, m. semimembranosus; 7, m. vastus medialis 8, m. semitendinosus; 9, m.gastrocnemius, 10, m. flexor digitorum superficialis; 11, m. popliteus.

3.1.3. Menisküsler

Menisküsler,femur ve tibia arasındaki kondiller arasındaki uyumu sağlayan ve eklem yüzeyini derinleştiren fibrokartilajinöz yapıda ve yarımay şeklindeki yapılardır. Tibial platonun üçte ikilik eklem yüzünü örtecek şekilde ve merkeze doğru incelerek seyrederek. Medial ve lateral olmak üzere iki adet menisküs bulunur. Karşılaşılan basınca direnç gösterecek biçimde yoğun, sıkı örgü şeklinde kollajen liflere sahip elastik yapılardır. Birbirine dönük iki adet C harfine benzeyen ve kesit yüzeyi üçgene benzeyen bu yapılar, bağlarla interkondiller bölgeye ve eklem kapsülüne sıkı bir şekilde yapışmıştır. Menisküsün periferik kısımları kalın ve konveks bir yapı gösterir, iç tarafa doğru giderek incilir ve iç kısımlar serbesttir. Proksimal kısımları içbükey olup femur kondilleri ile temas halindedir (12, 17-19).

Çoğunlukla avasküler, anöral ve alenfatiktirler ancak kemiğe yapıştıkları yerde damarlanma gösterirler. Bundan dolayı eklem kırıkdağının aksine dejenerasyona uğradıklarında bir miktar kendi kendilerini tamir edebilirler (11,20).

Menisküsler temas yüzleri arasındaki anatomik farklılıkları telafi ederken eklem arasındaki boşluğu doldurarak, hareket genişliğini artırır ve basıncın eşit bir şekilde dağılmasına olanak sağlarlar (12).

Medial menisküs, C şeklinde olup kenarları dış menisküse göre daha kalındır. Tibia ve eklem kapsülüne çok sıkı şekilde bağlanmıştır. Bundan dolayı medial menisküs daha az hareketlidir ve bu yüzden daha çok tahribata uğrar (12).

Lateral menisküs, medial menisküse göre daha dairesel yapıdadır ve eklem yüzünün neredeyse tamamını örter. Lateral menisküs, medial menisküse kıyasla daha hareketlidir ve bundan dolayı daha az yaralanır (17-19).

3.1.4. Çapraz Bağlar

Ön çapraz bağ ve arka çapraz bağ olmak üzere iki adet çapraz bağ bulunur. Bu yapılar, çok iyi organize olmuş kollajen matriksten oluşur. Çapraz bağlar diz eklemının stabilitesinin sağlanmasına ve tibianın femur üzerinde antero-posterioryönde deplasmanının önlenmesine yardım eder (11,21).

3.1.4.1. Ön Çapraz Bağ (ÖÇB)

Tibia eklem yüzeyinde eminentia interkondillarisin ön ve lateralinde yer alan fossadan çıkarak, cranio-medialyönde eklemi çaprazlayıp lateral femoral kondilin medial yüzünde ve posterioründe bulunan fossaya yapışır (Şekil 3). Ön interkondiler fossa, medial menisküs ve ön tibial çıkıntı ile ilişkilidir. Ön çapraz bağ diz ekstensiyon halinde iken eklemın rotasyonunu kısıtlar. Primer görevi tibianın öne deplasmanını engellemektir (12,22,23).

3.1.4.1.1. Ön Çapraz Bağın Görevleri

- Diz eklemi fleksiyon durumundayken, tibianın femur üzerinde öne kaymasını engeller.
- Diz eklemının hiperekstensiyonunu engeller.
- Diz eklemının içe ve dışa rotasyonunu engeller.
- Genu varum ve genu valgus oluşumları sınırlayan ikinci önemli unsurdur (24,25).

3.1.4.2. Arka apraz Bağ (AB)

Tibianın eklem yüzeyinde interkondiler fossadan başlar ve cranio-medial yönde ilerleyip femurda medial kondilin lateral ve posterior yüzüne yapışır. Birçok araştırmacı tarafından, AB'nin B'den iki kat daha fazla kuvvetli olduğu ve diz eklem rotasyonunun merkezi ekseninin yakınına yapışması nedeniyle de dizin statik stabilizatörü olduğu görüşü kabul edilmektedir. Primer fonksiyonu tibianın posterior translasyonunu engellemektir (11,26). Dizin fleksiyonu sırasında oluşan “femoral yuvarlanma hareketi” arka çapraz bağın sayesinde meydana gelmektedir(24).

3.1.4.2.1. Arka apraz Bağın Görevleri

Arka apraz bağ; tibianın femur üzerindeki arka (caudal) ekme hareketini sınırlandırarak, diz eklemine hiperekstensiyona engel olur. Ayrıca arka çapraz bağ, n çapraz bağ ile birlikte diz eklemine ön-arka stabilitesini sağlar ve tibianın ie ve dışa rotasyonunu sınırlandırır (24, 27-29).

3.1.5. Eklem Dış Bağları

3.1.5.1. Ligamentum Patella

Patella ile tibia arasında uzanan bağdır. Hareketin femoral bölgeden tibiaya iletilmesinde dolayısıyla lokomasyonda ayrıca bacağın statiğinde çok önemli rolü vardır (9).

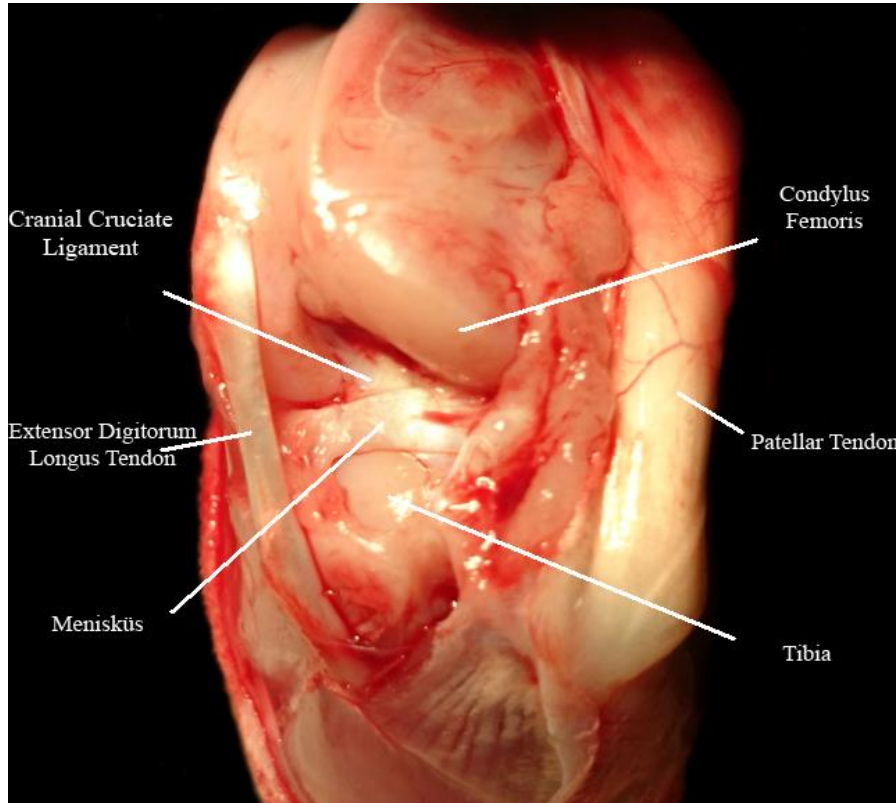
3.1.5.2. Ligamentum Collaterale Laterale

Femurun epicondylus lateralis, tibianın condylus lateralis ile caput fibula arasında uzanan ve M. popliteus'u örten kısa bir bağdır (9,30). Ayrıca bazı hayvan

türlerinde olduğu gibi tavşanlarda, ligamentum collaterale lateralenin biraz cranialinde ve eklemin ön tarafında femurun condylus lateralisten orjin alan extensor digitorum longus tendonu da eklem dışı bağlar arasında yer almaktadır (30).

3.1.5.3. Ligamentum Collaterale Mediale

Femurun epicondylus medialis ile tibianın condylus medialisine tutunur. Uzun ve geniş bir bağıdır. Dikey seyirlidir, aynı zamanda meniscus medialisine de yapışır (9, 15).



Şekil 3. Tavşan diz ekleminin ligament ve tendolarının önden görünümü

3.1.6. Bursalar

Dizi çevreleyen muskulotendinöz yapıların, hareket esnasında aşırı basınç ve sürtünmesini önlemek amacıyla içerisinde sinovyal sıvı bulunan keseciklerdir.

Eklem boşluğuyla ilişkili olan bursalar; suprapatellar bursa, prepatellar bursa, infrapatellar bursa, medial ve lateral gastroknemius başları altındaki bursalar, semimembranosus bursası, pes anserin bursa, iliotibial bant altındaki bursa, dış yan bağ ve eklem kapsülü arasındaki bursa, biceps bursası, iç yan bağın yüzeysel ve derin tabakaları arasındaki bursa, medial gastroknemius bursası ve suprapatellar bursadır (11,12,31,32).

3.1.7. Eklem Kapsülü

Diz ekleminin kapsülü, iyi innerve olan bir yapıdır. Femoral trochleadan proksimal olarak uzanır, suprapatellar pošta sonlanır. Bu geniş hacimli kavite genellikle suprapatellar plika adını alan transvers fibröz band ile kesilir. Suprapatellar plikanın superomedial kısmı, medial patellar plika ile karışır. Distal olarak medial oluğa ve infrapatellar yağ yastığına uzanır. Medial patellar plika, patellanın medial yüzü ile medial femoral kondil arasında sıkıştığında veya koptuğunda yangılanabilir (33,36).

Eklem kapsülü tibiada, popliteal tendonun geçtiği bölge dışında artiküler bölgelere, arkada ise kıkırdak kenarına daha yakın bir yerden yapışır. Ön tarafta kapsül çok incedir. İnfrapatellar yağ yastığı ile sinovyumdan ayrılır. Kapsül patella üzerinde kuadriseps tendonuna derince uzanan ve patellanın üst kutbu üzerinde, büyük suprapatellar bölüm ile ilişkilidir (34-36).

3.1.8. Sinovyal Zar

Diartrodial eklemlerin kıkırdak ve menisküsleri dışındaki tüm eklem yüzeylerini, bazı tendon kılıflarını ve bursaları örten yumuşak ve vasküler bir bağ dokudan oluşur. Sinovyal membran epitel yapıda değildir ve bazal membranı bulunmaz. Sinovyal doku oldukça aralıklı dizilmiş yüzeysel hücre tabakası ve intima olarak bilinen özelleşmiş matriksle bunların altında yer alan damardan ve özelleşmiş fibroblastlardan zengin subintimal dokudan oluşur.

Sinovyal zar birçok yangısal olayın geliştiği önemli bir dokudur. Sinovyal zar dizde kondiller arasında ve çevresindeki eklem boşluğunu kapsar. Patellofemoral eklemi içerecek şekilde patellanın arkasından yukarı doğru uzanır ve kuadriseps femoris tendonu ile femur arasında suprapatellar bursa ile birleşir. Eklem boşluğunun girintili kısımları da sinovyal membran tarafından döşenmiştir (35,38).

3.1.9. Sinovyal Sıvı

Tüm sinovyal eklemlerde bir miktar sinovyal sıvı bulunur. Sıvı, eklem aralığının tüm boşluklarını doldurarak çok önemli olan yağlama görevini yerine getirir. Normal şartlarda sıvı parlak saman sarısı renkte, berrak ve çok kıvamlı bir yapıdadır. İçerdiği hücrelerin önemli kısmı lenfositlerden, diğerleri ise polimorf ve monosit-makrofajlardan oluşmaktadır. Bu sıvı, plazmanın sinovyal dokuyu geçerek, sinovyal aralığa gelen bir filtratı niteliğindedir. Sinovyal dokudan geçerken içine sinovyal hücreler tarafından üretilen hiyaluronik asit de ilave edilir. Küçük molekül ağırlıklı maddeler kolaylıkla plazmadan sinovyal sıvıya geçerken, büyük molekül ağırlıklı maddelerin geçişi daha zordur ve bu geçiş molekülün

ağırlığı ile ters orantılıdır. Bundan dolayı büyük immunglobülinler, makroglobülinler vb. sinovyal sıvıda çok az miktarda bulunur. Bunun yanında glukozun bu sıvıya transferinde özel bir durum vardır. Glukoz, öncelikli olarak transfer edilir. Glukoproteinler ve lipidler de sinovyal sıvıya geçer. Ayrıca lipidler içinde eriyebilen maddelerin sinovyal sıvıya kolayca geçebildiği bilinir. Elektrolitler, oksijen ve karbondioksit de kolaylıkla sinovyal sıvıya geçebilmektedirler (37).

3.1.10. Kıkırdak Doku

Kıkırdak dokudaki genç hücrelere kondroblast, olgun hücrelere ise kondrosit adı verilir. Kondrositler matriks (temel madde) içinde tek tek ya da birkaç adedi bir araya gelerek gruplar halinde bulunurlar. Bağ dokuda olduğu gibi kıkırdak dokuda da dayanıklılığı sağlayan oluşumlar, büyük ölçüde bağ dokusu iplikleridir. Bu ipliklerin tür, miktar ve tertiplenme durumları üç türde kıkırdak dokusunun ortaya çıkmasına neden olur (38).

3.1.10.1. Kıkırdak Tipleri

3.1.10.1.1. Hiyalin Kıkırdak

Organizmada en çok bulunan kıkırdak tipidir. Matriksinde tip 2 kollajen fazladır. Hiyalin kıkırdak çok az bükülebilir fakat basınçlara karşı son derece dayanıklıdır. Kıkırdak ana maddesi bazofil karakterdedir. Bunun hücreleri sınırlandırılan bölümü diğer kısımlara kıyasla daha da bazofiliktir. Bu kısma hücre kapsülü denir. Temel maddenin hücre kapsülünü oluşturan bölgelerinde kollajen

iplikçikler daha ince ve seyrek, şekilsiz temel madde ise daha boldur. Bu durum, bazik boyalarla hücre kapsülünün daha koyu boyanmasına neden olur (38).

Kıkırdak hücreleri fazla su içerirler. Bundan dolayı da preparat hazırlanması sırasında fazla büzülürler; sitoplazmaları dallı budaklı, hatta yıldız şekilli bir hal alır. Hücre yüzeyi ile hücre kapsülü arasında doğal olmayan bir boşluk belirir (38).

3.1.10.1.2. Elastik Kıkırdak

Elastik kıkırdak, basınçlara karşı hiyalin kıkırdak kadar dirençli değildir fakat çok daha fazla bükülebilir. Az miktardaki tip 2 kollajene ek olarak bol miktarda elastik iplikçiklerden oluşur (38).

3.1.10.1.3. Fibröz Kıkırdak

Bu tür kıkırdak, düzensiz sıkı bağ dokusunun kıkırdak dokusuna dönüşmüş şeklindedir. Vücudun büyük zorlamalar ile karşı karşıya kaldığı yerler ile ağırlık taşıyan bölgelerde bulunur. Ağ şeklinde örülmüş tip 1 kollajen iplikçikleri içerirler (8,38,39). Eklem kıkırdağı çoğunlukla özelleşmiş hiyalin kıkırdak yapısındadır. 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 (8,39).

3.1.10.2. Eklem Kıkırdağı

Eklem kıkırdağı birkaç milimetrelik kalınlığına rağmen olağanüstü mekanik özelliklere ve dayanıklılığa sahiptir. Düzgün yüzeyli ve basınçlara karşı dayanıklı, düşük sürtünmeli, yüksek kayganlıkta ve şok emici olmasından ötürü kemiklerin rahat hareket edebilmelerini sağlayan yüzeyler oluşturur (8,38,39).

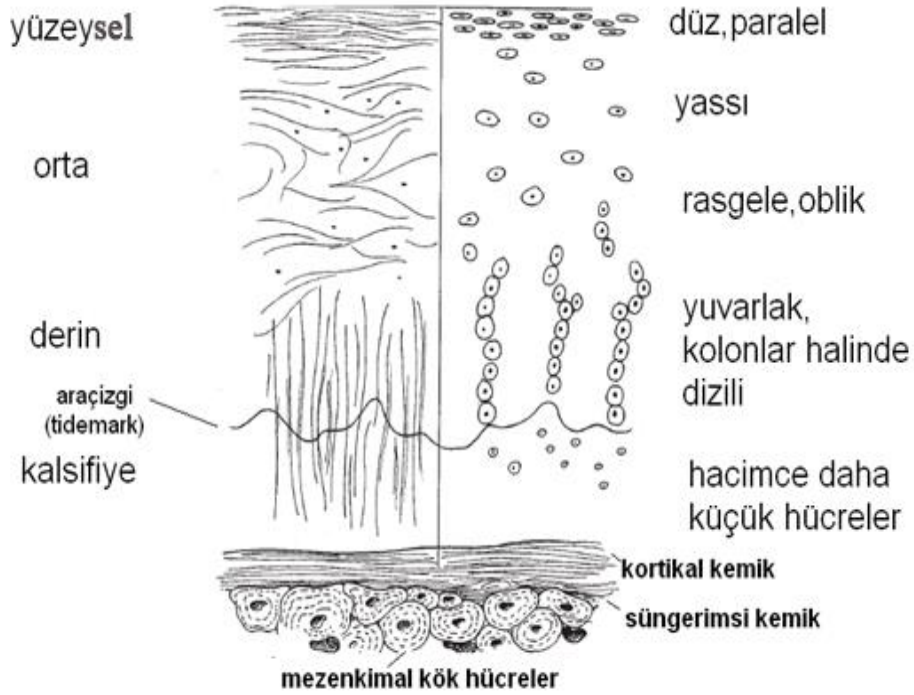
Kıkırdaklarda kan ve lenf damarları ile sinirler bulunmaz, bu nedenle eklem kıkırdaklarında gerekli olan besin maddeleri ve oksijen difüzyon ile sinovyal sıvıdan sağlanır (38).

Eklem kıkırdağı yapı ve içerik bakımından farklı dört tabakadan oluşur (Şekil 4):

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

Bütün bu tabakalarda; kollajen liflerin şekilleri, boyutları, dizilimleri, kondrositlerin şekilleri, matriksin proteoglikan ve su içerikleri değişiklik gösterir (8,39).

Katmanlar Kollajen LiflerKondrosit Görünümü



Şekil 4. Eklem kıkırdağının histolojik yapısı(40)

3.1.10.2.1. Yüzeysel Tabaka

Bu tabaka hacimsel olarak kıkırdağın en küçük tabakasıdır. Yüzeysel tabakada kollajen lifler yüzeye paralel olarak seyrederek, kondrositler yapı olarak yassı hücrelerdir ve yüzeye paralel olarak dizilirler (8,39,41,42). Bu nedenle yüzeysel tabaka kompresyon kuvvetlerinden ziyade, horizontal makaslama kuvvetlerinin karşılanmasında rol oynar (8,41). Burada bulunan kondrositler, bazı kayganlaştırıcı proteinler üretilip, eklem aralığına salgılayarak, kıkırdaktaki sürtünme ve aşınmayı azaltırlar (8,41). Yüzeysel tabaka matriksi; proteoglikan oranı en düşük, su oranı ise en yüksek matrikstir (39,42).

3.1.10.2.2. Orta Tabaka

Bu tabaka ise kıkırdağın hacimsel olarak en büyük tabakasıdır. Daha geniş ve düzensiz biçimde yerleşmiş kollajen liflerin yanı sıra buradaki kondrositler yuvarlak yapıdadır. Elektron mikroskopla alınan görüntülerde bu bölgelerdeki kondrositlerin daha büyük endoplazmik retikulum, golgi cisimciğine ve mitrokondrilere sahip olduğu gösterilmiştir (8,39,41). Bu tabakadaki hücreler baskı altında hacimlerini azaltırken, 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 dayanıklılığını artırır (8,42).

3.1.10.2.3. Derin Tabaka

Bu tabakadaki kollajen lifler diğer tabakalardaki liflere göre daha geniş yapıdadır. Lifler eklem yüzeyine dik olarak yerleşmişlerdir. Proteoglikan yoğunluğu en yüksek, su yoğunluğu ise en az olan katmandır. Hücreler yuvarlak yapıda olup yüzeye dik şekilde ikişerli ve dörderli kolonlar oluşturacak tarzda dizilmişlerdir. Hücrelerin oluşturduğu bu yapıya kondron adı verilir (39,41-43). Kondronlar ve kollajen lifler yüzeye dik olarak yerleştiğinden; bu tabakanın vertikal kompresyon kuvvetlerinin karşılanmasındaki rolü büyüktür (8,42).

3.1.10.2.4. Kalsifiye Tabaka

Subkondral kemiğin hemen üzerinde bulunan tabakadır. Derin tabakadan tidemark adı verilen su içeriği fazla olan bazofilik bir kısımla ayrılır. Bu sert bölge alttaki kemikten gelen besleyici damarların geçişini engeller. Bu tabakada

hücreler daha küçüktür ve sadece birkaç organel içerirler. Bu tabakanın esas görevi alttaki kemik doku ile biyomekanik bağlantıyı sağlamaktır (8,39,42).

3.1.10.3. Kondrositler

Eklem kıkırdağında bulunan tek hücre tipi kondrositlerdir. Bütün kondrositler kendi ürettikleri matriks tarafından çevrilmişlerdir (39). 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 (42).

Kondrositler mezenşimal hücre kökenlidirler. Temel görevleri matriksin sentezini, şekillenmesini ve yapım yıkım dengesini ayarlamaktır (43). 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 duyarlıdırlar (39).

3.1.10.4. Matriks

Matriksin miktar olarak en büyük bileşeni sudur. Kollajen ve proteoglikanlar iki ana yük taşıyan moleküllerdir. Bunların dışında glikoproteinler, değişik proteinler ve fosfolipidlerde matriksin yapısında bulunurlar. Kollajen, matriksin ana yapısal molekülleridir. Kondrositler tarafından birçok kollajen tipi sentez edilir. Kollajen lifleri ayrıca; oluşturdukları ağ yapısı ile büyük proteoglikan moleküllerini aralarında hapsederek kıkırdağın şok emici özelliğinin ortaya çıkmasında önemli rol oynarlar (39).

Ayrıca matrikste birçok proteaz ve hiyaluronidaz bulunur. Bunlardan lizozim kırırdağa 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 (38).

3.2. Diz Eklemi Biyomekaniği

Diz eklemi hareketleri iki yönlüdür. Transversal düzlemde, fleksiyon ve ekstensiyon hareketlerini yaparken; longitudinal düzlemde tibia rotasyonel hareketlerini yapar. Bu rotasyonel hareketler, diz eklemi hareket açısı ve diz eklemi bağlarının maksimum hareket sınırları ile kontrol altında tutulur (30,45).

Diz eklemi normal duruş pozisyonundaki fizyolojik eklem açısı 105° - 160° , fleksiyon hareketinde 65° - 90° , ekstensiyon hareketinde ise 35° - 60° dir (30,45).

Diz eklemi ekstensiyon pozisyonunda, çapraz bağlar gergin olduğu için içe ve dışa rotasyon hareketi gerçekleşmez. Diz eklemine ve tarsal eklemine 90° fleksiyon hareketi yaptırıldığı zaman, tibia 10° - 20° dışa (eksternal) ve 35° - 40° içe (internal) rotasyon yapmaktadır. Tibianın, 20° dışa (eksternal) ve 40° içe (internal) rotasyonu dışında oluşabilecek açılar patolojik olarak değerlendirilir ve diz eklemi instabilitesini tanımlar (25,26,30,45).

Femurun distal eklem yüzeyi, tibianın platosuna göre daha geniştir. Diz eklemine gelen yükün şiddetine göre menisküsler belirgin formlar alırlar ve eklemde oluşan fleksiyon, ekstensiyon ve rotasyon hareketlerine eşlik ederler. Menisküsler diz eklemi ekstensiyon hareketinde kendi anatomik bağlantıları

ölçüsünde kalırlar. Fleksiyonda ise medial menisküs, medial (tibial) kollateral bağa ve eklem kapsülüne sıkı bir bağlantısı olması nedeniyle, lateral menisküse göre daha az yer değiştirir (25,30,45,46).

Femur kondillerinin asimetrik yapısı nedeniyle medial ve lateral kondillerin hareketleri birbirlerinden farklıdır. Lateral kondil medial kondilden daha fazla yuvarlanır. Ekstensiyon ilerledikçe femur lateral kondilinin artiküler yüzeyi biter ve hareket ön çarpaz bağ ile sınırlanır. Bu sırada daha büyük ve daha az eğri olan medial kondil hareketine devam eder. Bu asimetri nedeniyle dizin lateral kompartmanı önce ekstensiyona gelir. Ekstensiyonun sonunda femur mediale döner, tibia dış rotasyon yapar ve lateraldeki bağların gerilmesine yol açar. Buna 'screw-home' (vida-yuva) hareketi denir. Çarpaz bağların yokluğunda bu hareket gözlenmez (12,13,47,48).

3.3. Eklem Lubrikasyonu

Eklemlerin lubrikasyonu büyük bir glikoprotein molekülü olan hyaluronat içeren sinovyal sıvı ile sağlanır. Sinovyal eklemlerin lubrikasyonunda görev alan en az oniki farklı mekanizma olmakla birlikte çoğu iki ana tipte toplanır(11, 44).

3.3.1. Sıvı Film (İnce Tabaka) Lubrikasyonu

Kıkırdak eklem yüzleri bir sinovyal sıvı filmi ile birbirinden ayrılır. Sıvı film lubrikasyonu farklı biçimlerde olabilir.

a)Sıkıştırma lubrikasyonu: Hiperhidrate kıkırdaktan sızan sıvı, kıkırdak yüzleri arasında sıkışarak yüzlerin birbirine temas etmesini engeller.

b) Desteklenmiş lubrikasyon: Kıkırdak yüzeyindeki ondulasyonlarda toplanan sıvı birikintileri sıkıştırılır.

c) Hidrodinamik lubrikasyon: Kalın sinovyal sıvı filmi kıkırdak yüzlerini ayırır. Bu mekanizma, muhtemelen hareketin başlangıcında ve bitişinde rol oynar (44).

3.3.2. Sınırlayıcı Lubrikasyon

Sıvı film lubrikasyonu mekanizması en iyi ağır yük altında işler. Çünkü hafif yük altında pek az sıkıştırma olacağından eklem yüzüne çok az sıvı sızacaktır. Oysaki eklemler genellikle hafif yük altında hareket ederler. Bu durumda ikinci bir yağlanma mekanizması olan sınırlayıcı mekanizma çalışmaya başlar. Özel lubrikan moleküller, muhtemelen hyoluronat, kıkırdak yüzeyine tutunarak yüzlerin birbirine temas etmelerini engeller. Eklem hareketleri sırasında hem büyük, hem düşük yüklenmelerde, hızlı ve yavaş hareketlerde, bu lubrikasyon mekanizmalarından bir kaçını birlikte rol oynar (44).

3.4. Artritis

Artritis kısaca eklem yangısı olarak tanımlanır. Bozukluk eklemi oluşturan dokulardan birini, birkaçını veya hepsini kapsayabilir (49). Sığırcılık işletmelerinde; büyük ekonomik kayıpların nedenlerinin başında topallıkların geldiği, topallıkların önemli bir kısmında eklem hastalıklarından ileri geldiği bildirilmiştir (50-52). Yapılan bir çalışmada 1994–1998 yılları arasında muayeneye getirilen sığırların %61'inde topallığın, eklem hastalıklarından kaynaklandığı bildirilmiştir (52).

Artritler iki ana grupta sınıflandırılır; belirgin eklem kıkırdağı yıkımlanmalarının görüldüğü dejeneratif artritler ve belirgin sinovitisin temel patolojik bulgu olduğu yangısal artritlerdir(56).

A. Yangısal Olmayan Eklem Hastalığı (dejeneratif eklem hastalığı)

1. Osteoartrit; Primer osteoarthritis, Sekonder osteoarthritis
2. Travmatik Artrit
3. Hemofilik Artrit
4. Nöropatik Artrit

B. Yangısal Eklem Hastalığı

1. Enfekte Eklem Hastalığı; Bakteriyel (septik) Artrit, Fungal Artrit, Viral Artrit
 2. Non-enfekte Yangısal Eklem Hastalığı (immün kaynaklı)
 - a. Eroziv Artrit; Romatoid Artrit, Periostal Proliferatif Poliartrit
 - b. Non-erosiv Artrit; Sistemik Lupus Eritematozus, Poliartrit/Polimyozitis, Poliartrit/Meningitis, Irka Bağlı Yangısal Artrit Sendromu
 3. Kristal Etkisine Bağlı Artritler: Gut, Pseudogut, Hidroksiapatit
 4. Diğerleri; İlaç Etkisi, Aşılama Reaksiyonu, Plazmatik/Lenfositik Gonitis
- (53-56)

3.4.1. Osteoartrit

Osteoartrit, (dejeneratif eklem hastalığı, hipertrofik artrit ve osteoartrosis) eklem kıkırdağının fibrilasyonu ile başlayan, ilerleyici ve düzensiz kıkırdak kaybı, osteofit oluşumu, subkondral skleroz, periartriküler yapılarda ve

sinovyal membranda bir dizi anormalliklerle karakterize dejeneratif eklem hastalığıdır (1,2). Tüm evcil hayvanlarda ve laboratuvar hayvanlarında da bu hastalık görülmektedir (57,58). Ayrıca OA, köpeklerde görülen en önemli eklem hastalıklarındandır. Köpeklerde topallıkların yaklaşık %37'sinin OA'dan ileri geldiği bildirilmektedir (59-61).

3.4.1.1. Etiyoloji

Osteoarthritis; primer (idiopatik) ve sekonder olmak üzere ikiye ayrılır (62,63). Birçok olguda OA'nın hangi nedenden oluştuğu tam anlamıyla açıklanamamıştır. Çevre faktörleri, genetik duyarlılık, endokrin ve metabolik durum, hastanın bünyesi ve travmatik yaralar hastalığın nedenleri arasında sayılabilir (64).Uzun süre tekrarlayan eklem fonksiyonları ile eklem kıkırdağı ve subkondral kemiğin yapısal olarak zedelenmesi OA'yı oluşturur (62, 65).

Primer OA; eklem kıkırdağının biyomateryal özelliklerinde (glikozaminoglikanlar) önemli bir defekt olduğu durumları ve OA'nın başlagıcını ifade etmektedir(57).

Sekonder OA; kıkırdak üzerine etki eden anormal stres, enfeksiyon, immün kökenli yangı, osteokondrosis veya kristal artropati gibi hastalıkların sonucu olarak oluşabilmektedir. Ayrıca beslenme hastalıkları, travma ve gelişim bozuklukları ile diğer nedenlere bağlı olarak şekillenir (62,63).

Etiyolojik nedenler arasında yaş, cinsiyet, ırk ve genetik endojen risk faktörleri yer alır. Fazla kilo, eklem aşırı hareket etmesi ve zorlamalar ile anormal eklem şekli eksojen risk faktörleri arasında gösterilir. Yaşın ilerlemesi OA gelişiminde en önemli risk faktörlerindedir. Yaralanma veya kıkırdağın

matriksindeki kaybın, yenileme ve tamir yeteneğine sahip kondrositlerin duyarlılık kaybındaki artıştan olabileceği bildirilmiştir (60,62,66,67). Ayrıca yaşlanan kıkırdak matriksi mikro darbelere karşı daha fazla duyarlı hale gelir ve hücrelerin yenileme ve tamir etme mekanizmaları artan bu hassasiyet karşısında yetersiz kalır. Bunlara ek olarak hafif bir kondroplazi oluşumuna ve OA'nın erken başlangıcına yol açan genetik nedenlerin hastalığın oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir (62,68).

3.4.1.2. Patogenez

Normal bir eklemden kıkırdak yapımı ve yıkımı arasında dinamik bir denge bulunmaktadır. OA gelişen eklemlerde ise bu denge, yıkım lehine bozulmuştur. OA'nın patogenezinde rol oynayan temel faktör; kıkırdak maddesi olan matriksin bozulmasıdır. Kıkırdaktaki proteoglikan içeriği azalırken, su içeriği artar. Bu değişikliğe yanıt olarak kondrositler tamir olayını gerçekleştirmek için çoğalarak, kaybedilen ara maddeyi yerine koymaya çalışırlar. Ancak uyarılan kondrositler aynı zamanda parçalayıcı enzimleri de salgıladığından açığa çıkan enzimlerle ve sinovyal enzimlerin de işin içine girmesiyle proteoglikanlarda sürekli bir kayıp olur ve matriks yıkımı ilerleyerek devam eder (69-74). Proteoglikan kaybı, kıkırdağın yüzeye yakın bölgesinde lokal şişme ve yumuşama kıkırdak harabiyetindeki ilk bozukluklardır (11). Bu olayları sinovyal sıvıdaki hiyaluronik asit miktarındaki azalma takip eder (8, 76).

OA'lı hastalarda, kaspaz-3 ve kaspaz-8'inde içinde bulunduğu bazı kaspazların (cysteinly aspartate- specific proteinases) miktarlarında da artış gözlemlendiği bildirilmiştir (75).

Ayrıca OA'da kıkırdak doku üzerine binen yüklerin etkisi ile kondrosit ve sinovya 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 (Prostoglandin E2) gibi kıkırdak hasarını arttırıcı etkileri olan diğer sitokinlerin sentezini uyarır. Eklem sıvısında PGE2 (Prostoglandin E2) ve LTB4 (Lökotrien B4) konsantrasyonlarında yükselme olur. Tüm bu sitokinlerin etkisiyle kıkırdak yıkımında rol oynayan MMP-3 (Stromelisin), MMP-2, MMP-9 (Jelatinazlar), MMP-1, MMP-8 ve özellikle MMP-13 (Kollajenazlar) gibi metalloproteinaz enzimlerinin sentezinde ve salınımında artış olur. MMP'ler kendi sentezlerini arttırırken, inhibitörleri olan TIMP-1'in (Metalloproteinaz doku inhibitörü) sentezini ise azaltırlar (75,76).

OA'da IL-1 ve TNF- α vasıtasıyla sentezinde artış olan bir diğer madde de nitrikoksittir. Nitrikoksit de; matrikste kollajen ve proteoglikan sentezini azaltarak, MMP sentezini arttırarak ve özellikle yüzeyel kıkırdak tabakasındaki kondrosit apoptozisini uyararak kıkırdak yıkımındaki bu kısır döngüye yardım etmiş olur (76).

Kondrositler bu yıkım olayına cevap verebilmek için proteoglikan sentezini arttırırlar ancak bu artış yıkımı karşılamaya yeterli gelmez. Proteoglikan sentezindeki artış özellikle orta ve derin tabakalarda olduğundan; yüzeysel tabaka hasardan ilk etkilenen ve proteoglikan kaybı en fazla olan tabakadır (8, 76).

3.4.1.3. Klinik Bulgular

OA mevcut diğer eklem hastalıklarında görülen benzer klinik bulguları gösterir (67). OA'lı eklem fiziksel muayenesinde; palpasyonda ağrı ve zorla yapılan fleksiyon ve ekstensiyon hareketleri sırasında kırıklar meydana gelebilir. Eklem hareket ederken bazen krepitasyon duyulabilir ve eklem hareket aralığında sık sık redüksiyon gerçekleşir (63,67). Nadirde olsa diz eklemi içersine bir osteofit parçasının düşmesi, kırıkdağın tibia ile femur arasındaki aralıkta sıkışması sonucu eklem kilitlenmesine sebep olabilir (77). İlerlemiş olgularda çoğu kez osteofitik çıkıntılardan kaynaklanan dizde düzensiz şişliklerle karşılaşılabilir (44).

3.4.1.4. Teşhis

Beşeri ve veteriner hekimliğinde OA için en önemli sorun hastalığın erken dönemde teşhis edilmemesidir. Radyolojik değişiklikler OA'nın teşhisinde standart olarak göz önünde tutulabilirler (62,68). OA için tanısal bir laboratuvar bulgusu bulunmamaktadır. Eritrosit ve sedimentasyon hızı, rutin kan sayımları, idrar tetkiki ve kan biyokimya testleri normal sonuç verir (24,78).

Rutin olarak dizin antero-posterior ya da postero-anterior radyografileri ile lateral radyografilerini incelemek çoğunlukla yeterli olmaktadır. Radyografilerin değerlendirilmesinde; eklem kenarını çevreleyen sklerotik kemik değişikliklerine, eklem kenarından dışarıya uzanan osteofitik üremelere, eklem aralığının daralmasına, subkondral kemik kistlerine ve kemik uçlarındaki destrüktif değişikliklere bakılmaktadır (44,79,80).

Son yıllarda kıkırdak metabolizması üzerine yapılan çalışmalar kıkırdağın yıkımlanma derecesini, glikozaminoglikan, keratan sülfat (KS), kondrotin sülfat(CS) ve hiyaluronik asit seviyelerindeki değişimleri ortaya koymuştur. OA'lı eklem sıvılarında KS ile CS konsantrasyonunun arttığı ve HA konsantrasyonunun azaldığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bununla birlikte IL-6, TNF konsantrasyonunda artış olduğu ve ayrıca MMP'lerin ve bir kemik parametresi olan osteokalsinin de sinovyal sıvıda arttığı gösterilmiştir (81,82).

3.4.1.4.1. Radyografiye Alternatif Görüntüleme Teknikleri

3.4.1.4.1.1. Bilgisayarlı Tomografi (BT) ve Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG)

BT ve MRG'nin kullanımlarının pahalı ekipmanlar gerektirmesi nedeniyle hayvanlarda eklem hastalıklarının görüntülenmesinde pek tercih edilmemektedir. Teşhis konulmakta zorlanılan bazı olgularda bu tekniklerden yararlanılması önerilmiştir. Eklem mineralize yapılarını değerlendirmek için BT'den yararlanılırken, MRG'den eklem içi ve periartiküler yapılar, ligamentler, tendolar, menisküs ve eklem kıkırdağının değerlendirilmesinde yararlanır (62,83).

3.4.1.4.1.2. Ultrasonografik Muayene

Mineralize yapıların oluşturduğu akustik gölge artefaktlarından dolayı eklem ultrason ile değerlendirilmesi kolay değildir. Eklem içi yumuşak dokuların, tendo ve periartiküler yapıların ve eklemde oluşan şişkinliğin niteliğinin anlaşılmasında kullanılır (62,83).

3.4.1.4.1.3. Sintigrafi

Oluşmuş aktif yangı ve topallıkların yerinin tam olarak tespit edilmesinde kullanılır. Eklem hastalıklarının teşhisinde pek tercih edilmez. Özellikle farklı muayene teknikleri ile teşhis edilemeyen bölgenin belirlenmesinde kullanılır (62,83).

3.4.1.5. Tedavi

OA'nın tedavisinde oluşan kıkırdak hasarını eski haline getirebilecek bir yöntem şu ana kadar bulunamamıştır. Yalnızca kıkırdakta oluşan hasarın ilerleyip genişlemesini önleyen sağaltım yöntemleri vardır (84,85). Tedavide amaç ağrıyı gidermek, eklem hareket genişliğini ve fonksiyonel aktivitesini korumak, sekonder OA'da buna ek olarak mevcut nedeni ortadan kaldırmak olarak özetlenebilir (86-88).

3.4.1.5.1. Medikal Tedavi

3.4.1.5.1.1. Analjezikler

Parasetamol, asetaminofen, asetil salisilik asit analjezi sağlamak için kullanılabilir ilaçlardır. Kodein ve diğer narkotikler nadiren ağrıyı gidermede kullanılmaktadır (89,90). Özellikle sinovitin eşlik ettiği durumlarda non-steroidal anti-inflamatuar (NSAİ) ilaçların pür analjeziklerden daha etkili olduğunu bildiren çalışmalar vardır (78). Ayrıca NSAİ'ler, OA'da en sık kullanılan ilaçlar olup hem akut hem de kronik ağrılarda kısa sürede etki edip uzun süre etkisini gösterdiği de bildirilmiştir (67,91). Sürekli NSAİ kullanımı ağrı kontrolü ve klinik olarak eklem hareketinin daha iyi olmasına yardımcı olur.

NSAİ sürekli kullanımı ile nitrik oksit baskılanır ve bu nedenle eklem kıkırdağının yıkımlanması engellenir (81). Caprofen ve meloxicam en sık kullanılan NSAİ grubunda yer alır (67).

3.4.1.5.1.2. Diğer Medikal Tedavi Seçenekleri

Polisülfat glikozaminoglikan ve pentosan sülfat diğer medikal tedavi seçeneklerindedir (67). Pentosan polisülfat yarı sentetik glikozaminoglikan olup kıkırdak koruyucu etkisi bulunmaktadır. Pentosan polisülfatın antikoagulan etkisi olmasından dolayı NSAİ ilaçlarla birlikte kullanılması önerilmez (92). Ayrıca sistemik glukokortikoid tedavisi veya ACTH verilmesinin gonartroz tedavisinde yeri yoktur (90).

3.4.1.5.2. Medikal Olmayan Tedavi Yöntemleri

3.4.1.5.2.1. Egzersiz

OA tedavisinde egzersizden beklenen fayda hareket açıklığını, kas gücünü ve dayanıklılığını arttırmaktır (93). OA'lı hastalarda egzersiz, masaj ve hidroterapi ile ağrının azaldığı ve fonksiyonların arttığı görülmüştür (87). Ayrıca OA'lı kedi ve köpeklerde en iyi fizik tedavi yöntemi ise yüzme olarak kabul edilmiştir (87,94).

3.4.1.5.2.2. Kilo Kontrolü

Aşırı kilolu hastaların zayıflatılması özellikle OA'lı kedi ve köpeklerde önemli yöntemlerden biridir. Küçük hayvanlarda obezite çok yaygındır ve bu OA'nın gelişmesi ile ilişkili önemli bir risk faktörüdür (87). Yapılan çalışmalarda

düşük kalorili beslenme ve kilo kaybının tek başına OA'nın klinik belirtilerini azalttığı ve hareketliliği arttırdığı gösterilmiştir (95).

3.4.1.5.2.3. Yem Katkı Maddeleri

Glikozamin ve kondrotin sülfat en çok kullanılan yem katkı maddeleridir. Bunların kullanımlarında bir sakınca olmamasına karşın etkinlikleri daha ileri çalışmalarla ortaya konulmalıdır (96,97). Ayrıca sabunlaşmayan avokado ve soya fasulyesi ürününün de atlar üzerinde yapılan bir çalışmada ağrıyı gidermediği ancak hastalık parametrelerini iyileştirici etkilerinin umut verici olduğu gösterilmiştir (98). Yine bu ürünün kedi ve köpeklerdeki antiartritik etkileri umut verici olmasına karşın dozları, avokado- soya oranları ve klinik verileri ile ilgili eksiklikler vardır (99,100). Bunlara ek olarak omega-3 yağ asiti, Boswellia serrata ağacından elde edilen resin ürünü ve C vitamini de kullanılmaktadır (67,87).

3.4.1.5.2.4. Düşük Seviyeli Lazer Uygulaması

Düşük seviyeli lazer uygulaması kedi ve köpeklerin kronik ağrılarının giderilmesinde tedavinin etkisini arttıracak faydalı bir yöntemdir. Her ne kadar düşük seviyeli lazer uygulamasının etki mekanizması tam olarak açıklanamamış olsa da artritteki ağrıyı ve kas spazmını azalttığı ve etkilenen bölgedeki kan dolaşımını ise düzenlediği görülmüştür (101,102).

3.4.1.5.2.5. Akupunktur

Veteriner pratikte yangı ve kronik ağrının kontrolünde akupunktur sıklıkla kullanılmaktadır (103,104). Akupunkturun etki mekanizması tam olarak açıklanmamış olmasına rağmen, endojen endorfin salınımı sonucu kas spazmlarındaki lokal rahatlık ile birlikte medulla spinalise ağrının aktarılmasındaki düşüş olarak kabul görmüştür (105). Diğer alternatif tedavi yöntemleri arasında homeopati, sıcak buhar, masaj, buz tedavisi ve bitkisel tedavi yöntemleri gibi uygulamalar yer alır (87,106).

3.4.1.5.2.6. Cerrahi Yöntemler

Uygulanan medikal tedavi yöntemlerinin ağrının azaltılmasında yetersiz kaldığı durumlarda cerrahi müdahaleye gereksinim vardır. Kondrosit transplantasyonu (155), diz artroplastisi, artrodez veya gerekirse amputasyon bunların bazılarıdır. Ön çapraz bağın kopuklarında yapılan sağaltımlar ile OA'nın hızlı gelişimini yavaşlatacağı bildirilmiştir (62,63).

3.4.1.6. Osteoartritide İntraartiküler Enjeksiyon Kullanımı

Kedi ve köpeklerde OA'nın tedavisinde eklem içi enjeksiyonlar insan ve atlarla karşılaştırıldığında rutinde daha az kullanılmaktadır. Ayrıca bu konuda kedi ve köpekler üzerinde yapılmış yeterince çalışma bulunmamaktadır (107). Veteriner paratikte eklemle ilgili topallıkların önemli rol oynadığı tür olan atlarda OA'nın eklem içi enjeksiyon ile tadavisi yaygın olarak uygulanmaktadır (108,109).

3.4.1.6.1. Kortikosteroidler

Çok popüler olmasına rağmen OA'lı eklemdaki etki mekanizmaları henüz tam olarak açıklanmamıştır. Ancak etkisini fosfolipaz A aktivasyonunu baskılayarak siklojenaz ve lipoksijenazların üretimini azaltarak gösterdiği bildirilmektedir (63). Eklem içi steroidler; lenfosit, makrofaj ve mast hücreleri gibi yangı hücrelerinin miktarlarını azaltırlar ve bu da fagositozu ve lizozomal enzimler ile yangısal medyatörlerin salınımını engeller (110). Kortikosteroidlerin osteoartrit eklemda bulunan kıkırdak dejenerasyonunda etkili olan sitokin ve enzimlerin baskılanmasında etkili olduğu gösterilmiştir. Kortikosteroidler; lökotrienler, prostaglandinler ve eklem kıkırdağının yıkılmasındaki en önemli iki medyatör olan interlökin-1(IL-1), tümör nekrosis faktör- α (TNF- α)'nın salınımını azalttığı bildirilmiştir (108,110). Kıkırdak koruyucu etkilerini metalloproteinaz aktivitesini baskılayarak gerçekleştirirler (63).

Eklem içi kortikosteroid uygulamasının yan etkileri de bulunmaktadır. Bunların en önemlisi kondrosit metabolizmasının baskıya uğratılarak kıkırdağın yapısında bulunan proteoglikan ve kollajen sentezini azaltmalarıdır (63,67,111).

3.4.1.6.2. Hiyaluronik Asit

Hiyaluronik asit (hyaluronat, hyaluronan), parlak ve saydam olmasından dolayı Yunancada cam anlamına gelen "hyalos" kelimesinden türetilmiş bir kelimedir. HA doğrusal bir düzlemde dizilmiş polisakkaritlerden meydana gelen bir glikozaminoglikandır. Bu polisakkaritler tekrar eden bölümler halinde birbirine bağlanmış olan D-glukuronik asit ve N asetil-D-glukozamin monosakkaritlerinin birbiri ardısına dizilmesiyle oluşur (106,112).

Endojen hiyaluronik asit tip B sinoviosit ve fibroblastlar tarafından sentezlenir ve sinovyal sıvının kayganlaştırıcı özelliğinde ve meydana gelen şokun absorbe edilmesinde önemli rol oynar (85,106,113).

HA sinovyal sıvı ve eklem kıkırdağı dışında gözde vitröz humorda ve göbek kordonunda safhalde bulunur (114).

Hiyaluronik asidin özellikleri OA'lı eklemlerde farklılık gösterir. OA'lı eklemlerdeki sinovyal sıvının viskoelastik özelliği, HA molekül ağırlığı ve konsantrasyonu azalır (115, 116). Eksojen hiyaluronik asit kullanımı sinovyal sıvının viskoelastiklik derecesini arttırarak eklem hareketi sırasında oluşan ağrıyı azaltmaktadır (85,106,117).

Oral yoldan iyi absorbe edilemediği için intraartiküler yoldan uygulanan HA'nın değişik yollarla etki ettiği düşünülmektedir. İleri sürülen mekanizmalar şöyledir:

- a) Eklem sıvısının bozulan viskozitesinin ve kayganlaştırıcı özelliklerinin arttırılması,
- b) Sinovyal membran ve eklem yüzeyinde koruyucu bir bariyer oluşturarak mekanik şokların absorpsiyonuna yardım etmesi,
- c) Kıkırdak esnekliğinin ve hasara dayanıklılığın arttırılması,
- d) Eklem efüzyonunun azaltılması,
- e) Nosiseptörler üzerine direkt etki,
- f) Isı şoku protein 72 (Hsp72) ekspresyonunun arttırılması,
- g) Sinovyal permeabilite üzerine etki ederek serbest oksijen radikalleri ve matriks metalloproteinazları inhibe etmesi (118-123).

Hiyaluronik asit uygulamasının etkilerinin 12 hafta içinde görüldüğü ve bununla birlikte viskosuplementasyonun etkisinin intraartiküler steroid uygulamasından daha geç başladığı ancak daha uzun süreli olduğu bildirilmektedir (112,124). Yapılan in-vitro çalışmalarda anti-inflamatuar, analjezik ve kıkırdak koruyucu etkisinin olduğu ortaya konulmuştur (125-129).

3.4.1.6.3. Trombositten Zengin Plazma

Trombositten zengin plazma (TZP), hastanın kendi kanının santrifüj edilmesiyle hazırlanan büyüme faktörlerinden zengin bir trombosit konsantresidir (62). Büyüme faktörleri, kondrosit hücrelerinin çoğalmasında ve mezenşimal hücrelerin farklılaşmasında, matriks depozisyonunda, proteoglikan sentezinde görev alırlar ve kıkırdak metabolizmasında da anabolik etki gösterirler (111,130).

Kan dolaşımında bulunan trombositlerin α - granüllerinde, vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor (TGF) β 1 ve β 2, basic fibroblast growth factor (β FGF) gibi birçok büyüme faktörü depolanmış durumdadır. Çeşitli uyarılar sonucu trombositler aktive olduğunda bu maddelerin granüllerden salındığı bilinmektedir. Aktif trombositlerden salınan büyüme faktörlerinden TGF- β 1'in matriks sentezi, PDGF'nin anjiyogenez, hücre proliferasyonu, fibroblastlar için mitojen, β FGF2'nin fibroblast ve myoblast proliferasyonu ve anjiyogenez, epithelial growth factor (EGF2)'nin epitelyum hücreleri ve mezenkimal hücrelerin proliferasyonu, insülin like growth factor (IGF-1)'in fibroblast ve myoblast stimülasyonu ve hepatocyte growth factor (HGF2)'nin anjiyogenezde rol aldığı bilinmektedir (62,131).

3.4.1.6.4. Otolog Serum Kullanımı

Otolog serum yeni bir biyolojik terapi yöntemi olup insan ve atta görülen OA olgularında kullanılmaktadır (62).

Kıkırdak yıkımlanmasında, katabolik stitokin interleukin (IL-1) en önemli yangısal medyatördür (132). İnterleukin 1 reseptör antagonisti (IL- 1Ra), IL- 1'in salgılanmasını engeller (132, 133). Otolog serum IL 1Ra'nın endojen salgılanacak kaynağı olup bunun doğal olarak bulunduğu yer ise monositlerdir (134). Genelde otolog serum inkube edilen venöz kandan izole edilir. İçeriğinde endojen antiinflamatuvar sitokinlerden IL-1Ra, IL- 4, IL- 10 ve fibroblast büyüme faktörü- 1, hepatosit büyüme faktörü ve transforming büyüme faktörü bulunmaktadır. Klinik kullanımına rağmen otolog serumun OA'lı eklem üzerindeki etkinliği tam olarak anlaşılamamıştır (135).

3.4.1.6.5. Mezenkimal Kök Hücre

Farklı hücre tiplerine dönüşme yeteneği, kendi kendini yenileme gücü ve canlı kaldıkça yaşamlarını devam ettirebilme özelliğine sahip olan hücrelere kök hücre adı verilmektedir (136,137).

Mezenkimal kök hücre (MKH), erişkin kök hücresi tipidir. Bağ dokunun ana hücreleridir. Birçok dokudan elde edilebilirler. Yağ, kıkırdak, kemik, kas, nöron gibi hücrelere farklılaşabilirler (137). Veteriner hekimlikte MKH kullanılarak yapılan tedaviler atlarda ve köpeklerde tendon ve ligament yaralanmalarında kullanıldıkları gibi kıkırdak ve eklem hasarlarında kullanım sahası bulmaktadırlar (136). MKH köpeklerde kalça OA tedavisinde denenmiş ve çalışmanın sonucunun başarılı olduğu belirtilmiştir (138). Aynı araştırmacının

dirsek eklemi OA tedavisinde ise hasta sahibi değerlendirmelerinde köpeklerin klinik olarak daha iyi olduğu bildirilmiştir (138).

3.4.1.6.6. Amniyotik Sıvı

Amniyotik sıvı kısmen amniyon hücreleri tarafından oluşturulan fakat esas olarak anne kanından gelen bir sıvıdır. Amniyon sıvısı içinde barındırdığı canlıyı dıştan gelen darbelere karşı korur, embriyonun amniyon zarına yapışmasını önler ve fetusun hareket etmesine olanak sağlar (139).

Sığır amniyotik sıvısının içeriğinde; mezenşimal hücreler ve kondrositler üzerinde uyarıcı etkileri olan, insulin benzeri büyüme faktörleri (IGFs), diğer büyüme faktörleri, HA ve HA aktive edici ajan (HASA) gibi makromoleküller bulunmaktadır (140-143). Bununla birlikte kıkırdak yıkımını önleyebilecek doku metalloproteinaz inhibitörlerini (TIMP) de bünyesinde bulundurmaktadır (144). İnsan amniyotik sıvısı daha önce yapılan deneysel çalışmalarda eklem içi kullanılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır (7,8).

3.4.1.7. Diğer Tedavi Seçenekleri

Deneysel olarak orgotein, sikon, magnezyum sülfat, kondroitin sülfat, somatostatin, klorokin, mukopolisakkarit polislfrik asit esteri, laktik asit solüsyonu, thiotepa sitostatika, polinükleotit ve prolotedavi (farmakolojik ve irritan olmayan solüsyon enjeksiyonu) seçenekleri kullanılmış fakat tatmin edici bir sonuç alınamamıştır (62, 109).

3.5. Deneysel Osteoartrit Hayvan Modelleri

Literatürdeki mevcut çalışmalarda 3 farklı deneysel hayvan OA modeli oluşturulmuştur. Bunlar;

1. Genetik olarak manipüle edilmiş spontan veya doğal oluşan model
2. Mekanik model
3. Kimyasal model

Günümüzde en çok kullanılan model kronik travmatik OA modeline benzer mekanik instabilite oluşturan modellerdir. Bu modellerin avantajları; hastalık oluşma oranı, doğru cerrahi teknik uygulandığında %100'dür. Hızlı fakat kontrollü bir OA modeli oluşturması, yapısal elemanların veya özelliği olan mekanik komponentlerin OA gelişimine katkısını ve kimyasal etkileşim olmadan OA tedavisinde yeni ilaç uygulamalarını araştırma imkanı vermesi bu yöntemi avantajlı kılar. Mekanik olarak hayvan OA modellerinde en sık tercih edilen cerrahi uygulamalar şunlardır;

Parsiyel menisektomi; hafif, ilerleyici bir hastalık oluşturmakta tercih edilir (145).Komplet menisektomi; hastalığın hızlı bir şekilde gelişmesini sağlar (146). Ön çapraz bağ kesilmesi; hızlı hastalık progresyonu oluşturur (147). Ön çapraz bağ kesilmesi ve parsiyel menisektomi yöntemi ile hızlı hastalık progresyonu oluşur (149).

Ön çapraz bağ kesilmesi sonrası oluşturulan OA modeli, eklem yüzeyinde yük dağılımı ve eklem hareketinin değişmesinin önemini destekleyen bir modeldir (150).

Bununla birlikte deneysel OA modelinde en çok tercih edilen hayvanlar; tavşan ve ratdır (7,147).

Bu çalışmanın amacı beşeri olarak üzerinde birçok araştırma yapılmış olan insan amniyotik sıvısından da yola çıkılarak erişimi çok daha kolay ve ekonomik olan sığır amniyotik sıvısının OA’da kırık doku üzerindeki etkinliğinin ortaya konması ve yaygın olarak kullanılan hiyaluronik asit ile etkilerinin karşılaştırılması ve sonuç olarak kırık doku koruyucu ilaçlara alternatif yeni bir ajan geliştirilmesidir.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, T.C. Fırat Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleti Etik Kurulu Başkanlığı tarafından 04.04.2013/46 tarih ve sayılı etik kurul onayı ile yapıldı. Denekler Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nden (FÜDAM) temin edildi. Çalışma FÜDAM ve Fırat Üniversitesi Hayvan Hastanesi Küçük Hayvan Kliniği ameliyathanelerinde yapıldı.

Çalışmada ortalama ağırlıkları 2700–3000 g olan 5 aylık, dişi-erkek 21 adet Yeni Zellanda Tavşanı kullanıldı. Tavşanlarda deneysel OA oluşturmak amacıyla ön çapraz bağlarının kesilmesi yöntemi uygulandı.

4.1. Cerrahi Yöntem

4.1.1. Anestezi

Tavşanlara anestezi için kas içine 5 mg/kg xylazine hidroklorür (Rompun®; 23.32mg/mL, Bayer, İstanbul, Türkiye) ve 35 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar®; 50 mg/mL, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) uygulandı.

4.1.2. Operatif Yöntem

Cerrahi işlem Fırat Üniversitesi Hayvan Hastanesi Küçük Hayvan Kliniği ameliyathanelerinde yapıldı. Anesteziden sonra tavşanların sağ dizleri traş edilerek sırtüstü pozisyonda yatırıldı. Cerrahi insizyondan önce dizler %10 Povidon iyot (Batticon; Adeka, Samsun, Türkiye) ile steril edildi (Şekil 5). Daha sonra latero-anterior longitudinal insizyon ile yaklaşıp (Şekil 6), lateral parapatellar artrotomi sonrası (Şekil 7) patella mediale deviye edilip (Şekil 8) ön

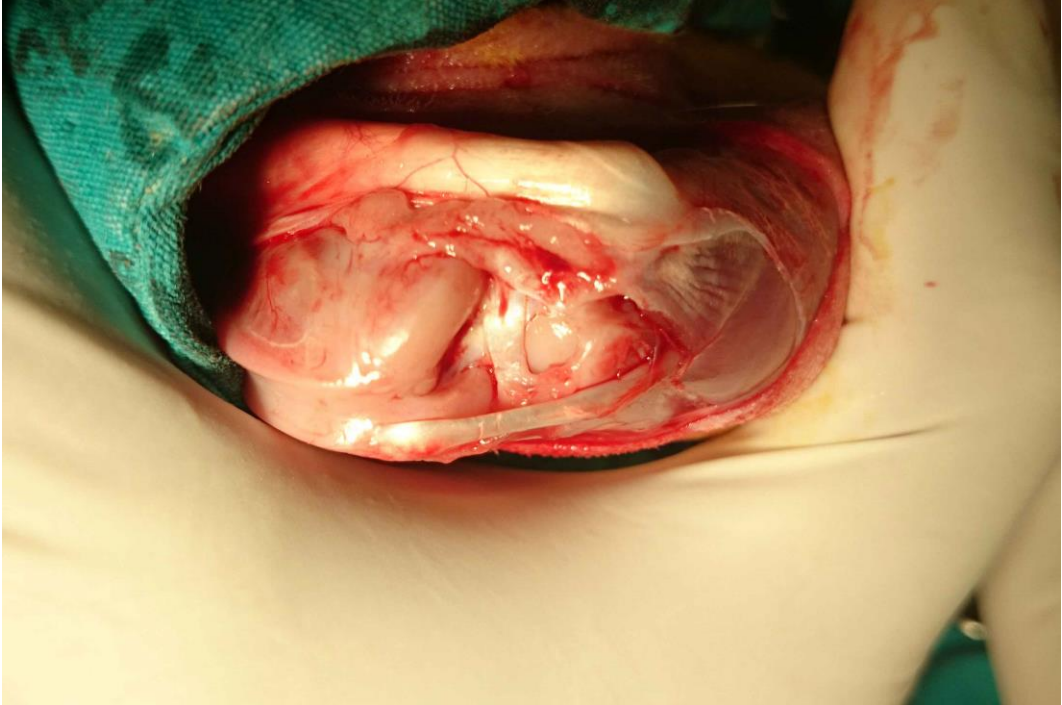
Çapraz bağ kesildi (Şekil 9). Çapraz bağın tam olarak kesilip kesilmediği n ekmece testi ile değerlendirildikten sonra deneklerin patellar tendonu ve derisi polyglactin 2/0 (Vicryl® , Johnson &Johnson Medical, Brussels) dikiŐ materyali kullanılarak ayrı dikişlerle kapatıldı (Şekil 10,11). Yara yerlerine %10'luk Povidon iyot ile pansuman yapıldı.



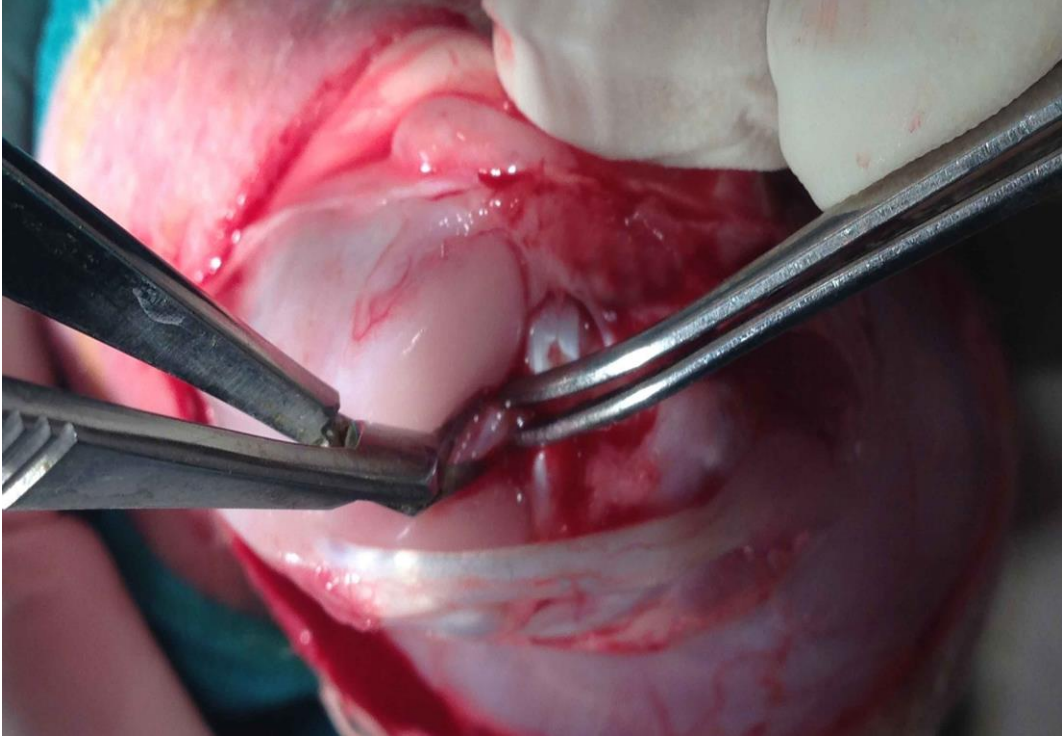
Şekil 5. Sağ diz traş edilip Povidon iyot ile steril hale getirildikten sonraki görüntüsü



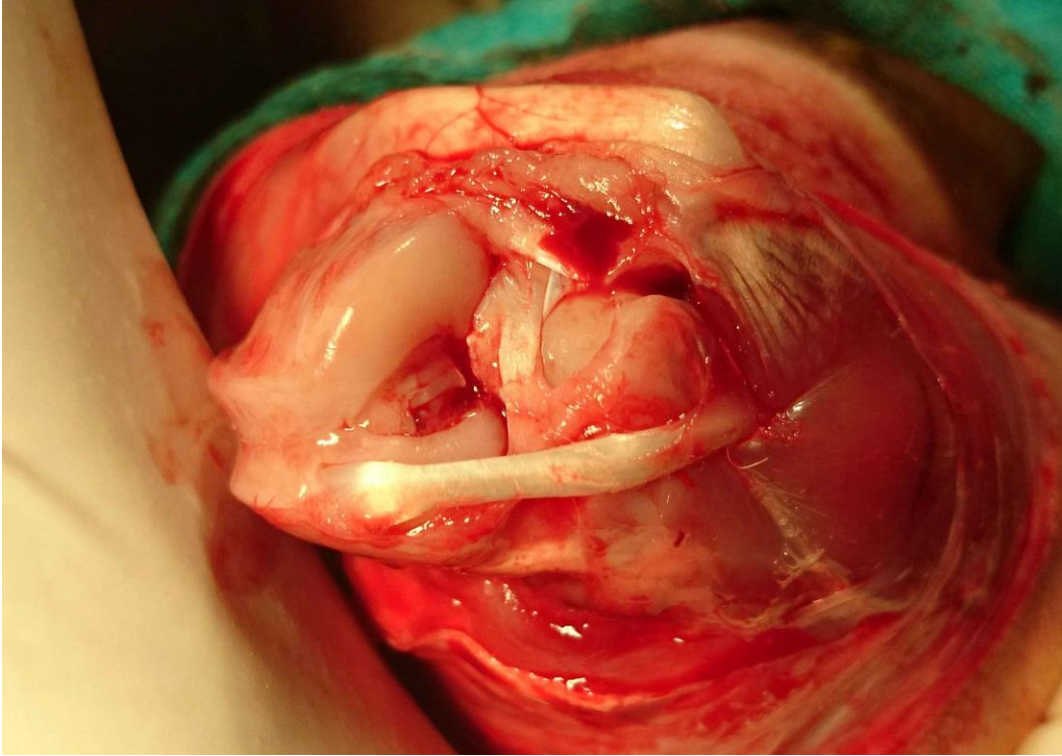
Şekil 6. Deri ve deri altı bağ dokununkesildikten sonraki görüntüsü



Şekil 7. Lateral parapatellar kesi ile patellanın mediale kaydırıldıktan sonraki görüntüsü



Şekil 8. Ön çapraz bağı kesilme anı görüntüsü



Şekil 9. Kesilmiş olan ön çapraz bağı görüntüsü



Şekil 10. Eklem kapsülünün dikişlerle kapatıldıktan sonraki görüntüsü



Şekil 11. Derinin dikişlerle kapatıldıktan sonraki görüntüsü

Deney hayvanları ameliyat sonrası dönemde normal kafes aktivitesine bırakıldı (Şekil 12). Uygulanan cerrahi girişimden 4 hafta sonra tavşanlar rastgele 3 eşit gruba ayrıldı. Birinci grup tavşanlara (n=7) birer hafta ara ile 3 kez eklem içi 0.5 mL sığır amniyotik sıvısı enjekte edildi (SAS). İkinci grup tavşanlara (n=7) birer hafta ara ile 3 kez eklem içi 0.5 mL hiyaluronik asit uygulandı (HA). Üçüncü grup tavşanlar (n=7) kontrol grubu olarak ayrıldı ve herhangi bir uygulama yapılmadı (KONT).



Şekil 12.Serbest dolaşım kafeslerinin görüntüsü

4.2.Kullanılan Eklem İçi Sıvılar

Sığır amniyotik sıvısı, yaklaşık 5-6 aylık sağlıklı gebe bir inekten aseptik koşullar altında postmortem olarak kesimhanede alındı. Soğuk zincir kırılmadan laboratuvara getirilip -20°C 'de muhafaza edildi. Kullanılmadan önce oda sıcaklığında yaklaşık 15 dakika bekletilerek çözünmesi sağlandı (Şekil 13).



Şekil 13.Enjektör içerisinde kullanıma hazır sığır amniyotik sıvısının görüntüsü

Hiyaluronik asit olarak, kullanıma hazır cam enjektörde sodyum hyaluronat (Ostenil®;10 mg/mL, Bio- Gen, Ankara,Türkiye) kullanıldı (Şekil 14).En son uygulanan eklem içi enjeksiyondan 12 hafta sonra bütün tavşanlar kas içi yüksek doz anestezik madde uygulanarak ötenazi edildi.



Şekil 14.Kullanıma hazır cam enjektörde hiyaluronik asitin görüntüsü

4.3. Histopatolojik ve İmmunohistokimyasal Yöntem

Ötenazi edildikten sonra nekropsi salonuna alınan 21 adet tavşanın, operasyon bölgesi olan sağ dizleri, kaslar disseke edilerek açığa çıkarıldı. Daha sonra femur ve tibia, corpus kısımlarından kostatom vasıtasıyla kırılarak eklem dışarıya alındı. Eklem kapsulası ve ligamentler kesilerek femur ve tibianın eklem yüzleri (facies articularis) açığa çıkarıldı. Her iki kemiğinde eklem yüzlerindeki kıkırdağın (cartilago articularis) durumu, deformasyon olup olmaması ve varsa deformasyonun derecesi yönünden makroskobik olarak incelenip mankin skorlamasına göre puanlandı. Makroskobik değerlendirmeleri yapılan kemiklerin, genu eklem yüzlerine yakın olacak şekilde, corpus kısımları kesildi, çevre kas ve ligament dokularından temizlendi ve her hayvandan birer adet, eklem yüzlerini ihtiva eden femoral ve tibial kondil (her denekten bir femoral bir tibial kondil 21x2= toplam 42 doku) kısımları elde edildi. Bu kısımlar, her deneğin ayrı ayrı olmak üzere, tespit olmalarını sağlamak için %10'luk nötral formaldehit solüsyonundan 250 mL ihtiva eden cam kavanozlara konularak numaralandırıldı. Tespit olmaları için 3 gün beklendikten sonra dokular dekalsifiye edilmek üzere 100 mL Biocal-C (Edta/Hydrochloric Acid, Atom Scientific Limited, UK) hazır dekalsifikasyon solüsyonu bulunan numune kaplarına konulup numaralandırıldı. Oda ısısında ve karanlık ortamda bekletilen numunelerde ki yumuşama ve esneklik artışı günlük olarak kontrol edilerek 2 günde 1 kez olmak kaydıyla dekalsifikasyon solüsyonları değiştirildi. İki haftanın sonunda istenilen yumuşamayı ve esnemeyi gösteren dokular, kondillerin uzun eksenini boyunca, yaklaşık 3 mm kalınlığında trimlenerek, birer adet femoral ve tibial, genu eklem kıkırdağını ve altındaki kemik dokusunu gösterebilecek kesit yüzleri elde edildi.

Bu dokular, doku takip kasetlerine (Citotest Embedding Cassette) alındı ve otomatik doku takip cihazında (Leica TP 1020, United Kingdom), otomatik program kullanılarak doku takibi sağlandı. Doku takip cihazından alınan dokular, parafin bloklar elde edilmek üzere doku bloklama cihazına (Leica EG 1150 H, United Kingdom) alındı. Metal bloklar kullanılarak bloklanan dokular soğutulmak üzere soğutma tablasına (Leica EG 1150 C, United Kingdom) alındı. Soğuduktan sonra kalıplardan çıkarılan bloklar, buzdolabında -5°C 'de 2-3 saat kadar bekletildikten sonra buz aküleri üzerinde teker teker alınarak, rotary mikrotom (Leica RM 2125 United Kingdom) vasıtasıyla 5 mikron kalınlığında her parafin bloktan 10 adet (21 deneğin femur ve tibia kondülllerinden 10'ar kesit toplam 420 kesit) seri kesit pozitif şarjlı lama alındı. Bu lamalar metal taşıma sepetlerine dizilerek, 1-2 gün içerisinde kullanılmak üzere arşivlendi. Daha sonra sırasıyla aşağıdaki boyama işlemleri uygulandı.

4.3.1. Hematoksilen-Eosin Boyama Yöntemi

Arşivlenen kesitlerden, her hayvanın femur kondülünden ve tibia kondülünden birer tane olmak üzere ikişer kesit alınarak (21 denek x 2 kesit=42 kesit) parafinin erimesi için 30 dakika 68°C 'deki etüvde (Elektro-Mag M 3025 BP, Türkiye) bekletildikten sonra 2 ayrı ksilol serisinde 5'er dakika bekletilmek suretiyle deparafinize edildi. Daha sonra rutin hematoksilen-eosin boyama protokolü uygulanarak dokular boyandı ve entellan yapıştırıcı vasıtasıyla lamel ile kapatıldı.

4.3.2. Safranin –O Boyama Yöntemi

Arşivlenen kesitlerden, her hayvanın femur ve tibia kondülünden birer tane olmak üzere ikişer kesit alınarak (21 denek x 2 kesit=42 kesit) parafinin erimesi

için 30 dakika 68°C'deki etüvde bekletildikten sonra 2 ayrı ksilol havuzunda 5'er dakika bekletilmek suretiyle deparafinize edildi. Daha sonra rutin Safranin-O boyama protokolü uygulanarak dokular boyandı ve entellan yapıştırıcı vasıtasıyla lamel ile kapatıldı.

4.3.3. İmmunohistokimyasal Boyamalar

İmmunohistokimyasal (IHC) olarak dokular, hücre apoptozisinin indikatörü olan kaspaz-3 ile kaspaz-8, kollajen yıkımının ve osteoartrit göstergesi olan MMP-13 ekspresyonu yönü ile incelendi. IHC boyama protokolü ticari kitin (Invitrogen Superpicture 3rd Gen IHC Detection Kit, USA) protokolü dikkate alınarak uygulandı. Her bir kriter için yine arşivlenen preparatlardan 42'şer adet alınarak metal preparat sepetleri içinde 68°C'lik etüve konularak 1 saat bekletildi. Ardından ksilolde 2x5 dakika bekletilerek deparafinize edildi. Sonrasında alkol serilerinden geçirilen preparatlar distile suda 5 dakika yıkayıp PBS içerisine alındı. Ticari kitin protokolü uygulanarak sırasıyla peroksidaz solüsyonundan ikişer damla damlatılarak 5 dakika bekletildi ve PBS ile yıkandı. Primer antikor olarak kaspaz-3, Ab.4 Rabbit Pab (Neomarkers, kullanıma hazır), kaspaz-8 FLIP antibody, Ab.4 Rabbit Pab (Biorbyt, 1/100-1/200 sulandırma) ve MMP-13, Ab.1 Mouse Mab (Neomarkers, kullanıma hazır) antikorları ile nemli ve karanlık ortamda 1 saat inkübasyona bırakılan preparatlar PBS ile yıkandı. Sonra HRP konjugate ile 10 dakika inkübasyona alındı ve PBS ile yıkandı. Son aşamada preparatlar protokole uygun hazırlanan DAB (diaminebenzidin) ile 5 dakika kontrollü inkübasyona bırakıldı. Sürenin sonunda PBS'e alınan

preparatlara yaklaşık 30–60 saniye mayer hematoksilen ile zıt boyama yapılarak su bazlı yapıştırıcı ile lamel kapatıldı.

Hematoksilen-eosin boyama, Safranin-O boyama ve IHC boyama sonuçları Olympus BX43 görüntüleme ve analiz sistemli (Cellsense Software, USA) ışık mikroskobu kullanılarak değerlendirildi ve fotoğraflandı. Hematoksilen-eosin ve Safranin-O boyamalarından elde edilen verilerin skorlamasında kullanıldı.

4.4. Radyolojik Değerlendirme

Tüm deneklerin operasyona alınmadan önce ve operasyonu takiben 30, 90 ve 120'nci günlerde sağ genu eklemlerinin postero-anterior ve medio-lateral pozisyonda Fırat Üniversitesi Hayvan Hastanesi bünyesinde bulunan dijital röntgen cihazı (Canon CXDI–50G, Japonya) kullanılarak radyografileri alındı (Şekil 15). Alınan radyografilerin radyolojik değerlendirmesi Kellgren– Lawrence skorlaması (Tablo 1) kullanılarak yapıldı (151,152). Bu değerlendirmede eklem kenarını çevreleyen sklerotik kemik değişikliklerine, eklem kenarından dışarı uzanan osteofitik üremelere, eklem aralığının daralmasına, kemik uçlarında destrüktif değişikliklere bakıldı.



Şekil 15.Kullanılan dijital röntgen cihazı

Tablo 1.Kellgren- Lawrence skorlaması (151-152)

Evre	Radyolojik Bulgular
0	Normal
1	Şüpheli: Eklem aralığında şüpheli daralma ve olası osteofit oluşumu
2	Hafif: Kesin osteofit ve eklem aralığında olası daralma
3	Orta: Orta derecede çok sayıda osteofit, eklem aralığında kesin daralma, bir miktar skleroz ve kemik uçlarında olası deformite
4	Şiddetli: Büyük osteofitler, eklem aralığında belirgin daralma, belirgin skleroz ve kemik uçlarında kesin deformite

4.5. Histopatolojik ve İmmunohistokimyasal Değerlendirme

Çalışmanın histopatolojik değerlendirmesinde Mankin skorlaması

(Tablo 2) kullanılırken immunohistokimyasal değerlendirmede kaspaz-3, kaspaz-8 ve MMP-13 kullanılmıştır.

Tablo 2.Mankin Skorlaması (153)

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 disorganizasyon	6
Kondrosit Hücre Sayısı	Normal	0
	Yaygın hiperselülarite	1
	Hücre kümeleri	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

4.6. İstatistiksel Yöntem

Sonuçların istatistiksel analizi “Statistical package for Social Sciences 22” (SPSS 22) programı kullanılarak yapıldı. İlk olarak Kruskal–Wallis analiz yöntemiyle gruplar arası fark olup olmadığı değerlendirildikten sonra farkın hangi gruptan kaynaklandığını ve anlamlı bir fark olup olmadığını belirlemek amacıyla da gruplar arasında Mankin skorları, radyografi puanları ve kaspaz-3, kaspaz-8 ve MMP13 boyanma yüzdesi açısından Mann-Whitney U testi kullanılarak değerlendirildi.

5. BULGULAR

5.1. Klinik Bulgular

Tavşanlarda operasyonu takip eden 3-5 gün boyunca hafif topallık gözlemlendi. Bu süreden sonra tavşanlar, ekstremitelerini normal bir şekilde kullanmaya başladılar. Tavşanlarda anesteziye bağlı herhangi bir komplikasyon izlenmedi. Deney boyunca hiçbir tavşanda ameliyat sonrası yara yeri enfeksiyonu ve septik artrit gelişmedi. Çalışma süresince hiçbir tavşan ölmedi. Osteoartritisin ilerlemesine bağlı olarak kontrol grubunda 90-120. günler arasında tavşanlarda sağ ekstremitelerinde topallık gözlenirken SAS ve HA gruplarında benzer bir semptom izlenmedi. Deney sonunda tavşanların sağ diz eklemleri açığa çıkarılırken hiçbir eklemden kontraktür ve patella dislokasyonu gözlenmedi.

5.2. Radyolojik Bulgular

5.2.1. Otuzuncu Güne Ait Radyolojik Bulgular

SAS grubunda bulunan 4 olguda osteofit ve eklem aralığında hafif daralma (evre 2), 3 olguda ise orta decerede ve çok sayıda osteofit, eklem aralığında daralma, hafif sklerozlar, kemik uçlarında hafif deformiteler (evre 3) gözlemlendi (Şekil 16) (Tablo 3).

HA grubuna ait 4 olguda osteofit ve eklem aralığında hafif daralma (evre 2), 3 olguda ise orta decerede ve çok sayıda osteofit, eklem aralığında daralma, hafif sklerozlar (evre 3) gözlemlendi (Şekil 17) (Tablo 4).

Kontrol grubunda 3 olguda osteofit ve eklem aralığında hafif daralma (evre 2), 4 olguda ise orta decerede çok sayıda osteofit, eklem aralığında daralma, kemik uçlarında hafif deformiteler (evre 3) gözlemlendi (Şekil 18) (Tablo 5).

5.2.2. Doksanıncı Güne Ait Radyolojik Bulgular

SAS grubunda 1 olguda eklem aralığında şüpheli daralma ve osteofit şüphesi (evre 1), 3 olguda osteofit ve eklem aralığında hafif daralma (evre 2), 3 olguda ise orta decerede çok sayıda osteofit, eklem aralığında daralma, kemik uçlarında hafif deformiteler (evre 3) gözlemlendi (Şekil 16) (Tablo 6).

HA grubuna ait 4 olguda osteofit ve eklem aralığında hafif daralma (evre 2), 3 olguda ise orta decerede çok sayıda osteofit, eklem aralığında daralma, kemik uçlarında hafif deformiteler (evre 3) gözlemlendi (Şekil 17).

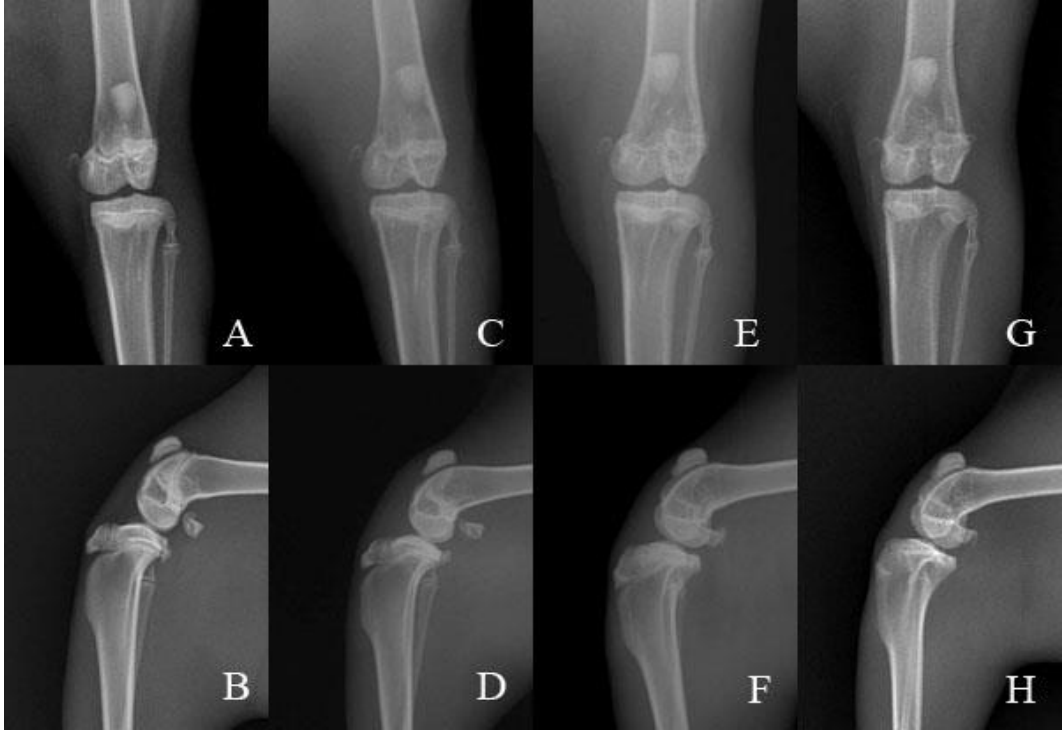
Kontrol grubunda 1 olguda osteofit ve eklem aralığında hafif daralma (evre 2), 2 olguda ise orta decerede çok sayıda osteofit eklem aralığında daralma, hafif sklerozlar, kemik uçlarında hafif deformiteler (evre 3), 4 olguda ise şiddetli büyük osteofitler, eklem aralığında belirgin daralmalar, belirgin skleroz ve kemik uçlarında kesin deformiteler (evre 4) gözlemlendi (Şekil 18).

5.2.3. Yüzyirminci Güne Ait Radyolojik Bulgular

SAS grubunda 1 olguda eklem aralığında şüpheli daralma ve osteofit şüphesi (evre 1), 3 olguda osteofit ve eklem aralığında hafif daralma (evre 2), 3 olguda ise orta decerede çok sayıda osteofit, eklem aralığında daralma, hafif sklerozlar, kemik uçlarında hafif deformiteler (evre 3) gözlemlendi (Şekil 19).

HA grubuna ait 4 olguda osteofit ve eklem aralığında hafif daralma (evre 2), 3 olguda ise orta decerede çok sayıda osteofit, eklem aralığında daralma, hafif sklerozlar, kemik uçlarında hafif deformiteler (evre 3) gözlemlendi (Şekil 20).

Kontrol grubunda 3 olguda ise orta decerede çok sayıda osteofit, eklem aralığında daralma, hafif sklerozlar, kemik uçlarında hafif deformiteler (evre 3), 4 olguda ise şiddetli büyük osteofitler, eklem aralığında belirgin daralmalar, belirgin skleroz ve kemik uçlarında kesin deformiteler (evre 4) gözlemlendi (Şekil 21).



Şekil 16. SAS grubu 5 nolu deneğe ait radyografler
A-B: Pre-operatif C-D: Post-operatif 30. gün, E-F: 90. gün, G-H: 120. gün
posterior- anterior ve medio-lateral görüntüleri



Şekil 17. HA grubu 6 nolu deneğe ait radyografler
A-B: Pre-operatif C-D: Post-operatif 30. gün, E-F: 90. gün, G-H: 120. gün
posterior- anterior ve medio-lateral görüntüleri



Şekil 18. Kontrol grubu 1 nolu deneğe ait radyografiler
A-B: Pre-operatif C-D: Post-operatif 30. gün, E-F: 90. gün, G-H: 120. gün
posterior- anterior ve medio-lateral görüntüleri



Şekil 19.SAS grubu 7 nolu bireyin 120. gün postero-anterior radyografisi, osteofit ve eklem aralığında hafif daralma (Evre 2).



Şekil 20. HA grubu 7 nolu bireyin 120. gün postero- anterior radyografisi, osteofiter üremeler ve eklem aralığında hafif daralma (Evre 2).



Şekil 21. KONT grubu 5 nolu bireyin 120. gün postero- anterior radyografisi, dev osteofitler ve eklem aralığında ileri derecede daralma (Evre 4).

Tablo 3. Sığır Amniyotik Sıvısı grubu radyoloji sonuçları

Denek	Süre	Evre 0	Evre 1	Evre 2	Evre 3	Evre 4
SAS1	30. gün			X		
	90. gün			X		
	120. gün			X		
SAS2	30. gün				X	
	90. gün				X	
	120. gün				X	
SAS3	30. gün			X		
	90. gün			X		
	120. gün			X		
SAS4	30. gün				X	
	90. gün				X	
	120. gün				X	
SAS5	30. gün			X		
	90. gün		X			
	120. gün		X			
SAS6	30. gün				X	
	90. gün				X	
	120. gün				X	
SAS7	30. gün			X		
	90. gün			X		
	120. gün			X		

Tablo 4. Hiyaluronik Asit grubu radyoloji sonuçları

Denek	Süre	Evre 0	Evre 1	Evre 2	Evre 3	Evre 4
HA1	30. gün				X	
	90. gün				X	
	120. gün				X	
HA2	30. gün			X		
	90. gün			X		
	120. gün			X		
HA3	30. gün			X		
	90. gün			X		
	120. gün			X		
HA4	30. gün				X	
	90. gün				X	
	120. gün				X	
HA5	30. gün				X	
	90. gün				X	
	120. gün				X	
HA6	30. gün			X		
	90. gün			X		
	120. gün			X		
HA7	30. gün			X		
	90. gün			X		
	120. gün			X		

Tablo 5. Kontrol grubu radyoloji sonuçları

Denek	Süre	Evre 0	Evre 1	Evre 2	Evre 3	Evre 4
KONT1	30. gün					
	90. gün				X	X
	120. gün					X
KONT2	30. gün					
	90. gün				X	X
	120. gün					X
KONT3	30. gün					
	90. gün			X		
	120. gün			X	X	
KONT4	30. gün					
	90. gün			X	X	
	120. gün				X	
KONT5	30. gün					
	90. gün				X	X
	120. gün					X
KONT6	30. gün					
	90. gün				X	X
	120. gün					X
KONT7	30. gün			X		
	90. gün				X	
	120. gün				X	

Tablo 6.Grupların toplam radyoloji skorları

Grup	Süre	Evre 0	Evre 1	Evre 2	Evre 3	Evre 4
SAS	30. gün	-	-	4	3	-
	90. gün	-	1	3	3	-
	120. gün	-	1	3	3	-
HA	30. gün	-	-	4	3	-
	90. gün	-	-	4	3	-
	120. gün	-	-	4	3	-
KONT	30. gün	-	-	3	4	-
	90. gün	-	-	1	2	4
	120. gün	-	-	-	3	4

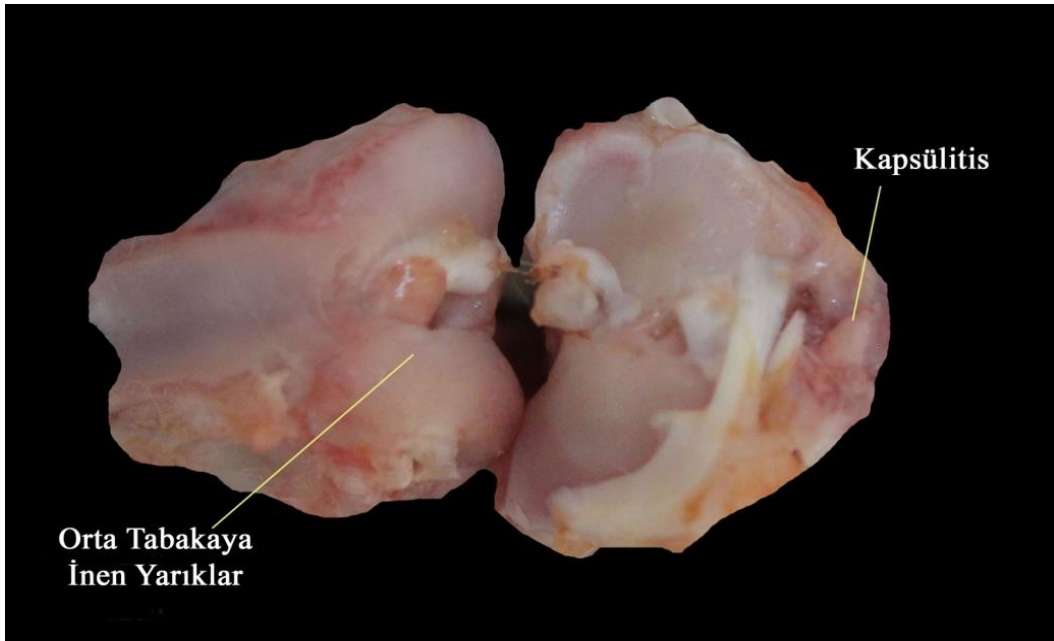
5.3. Makroskobik Bulgular

Mankin skorlamasında makroskobik değerlendirmede Meachim morfolojik evreleme sistemi kullanılarak hint mürekkebine daldırılmış eklem yüzeyi stereomikroskop kullanılarak incelenmektedir. Bu çalışmada makroskobik defektler minimal düzeyde olmadığı için ve ileride yapılacak immun boyamalarda risk oluşturabileceği endişesiyle makroskobik değerlendirmeler lup kullanılarak yapılmıştır.

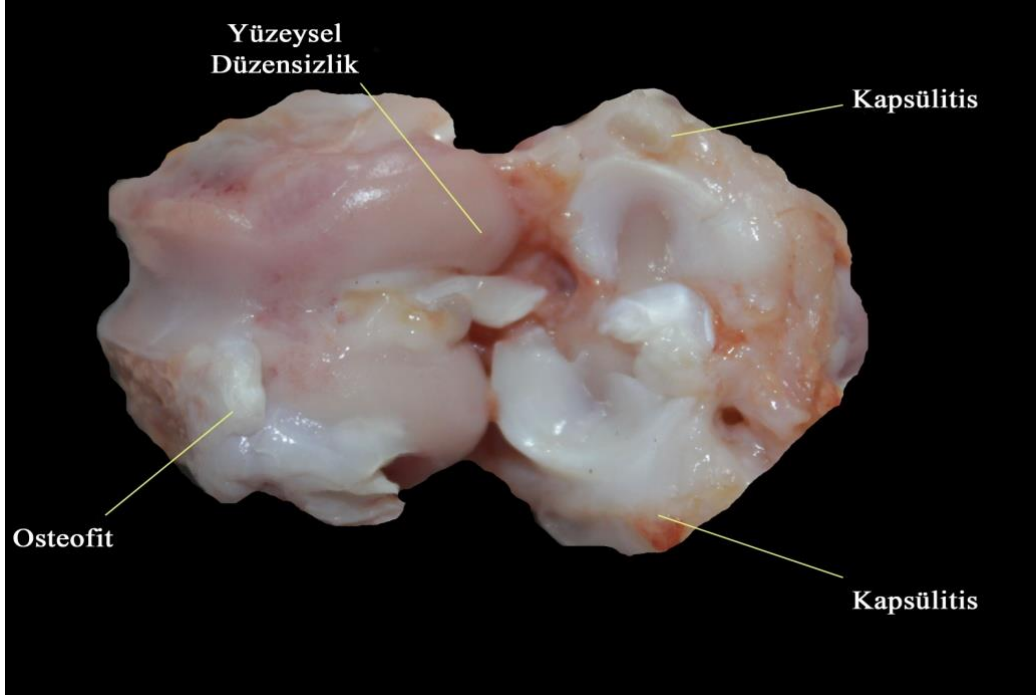
SAS grubuna ait femur kondilleri incelendiğinde 3 olguda yüzeysel düzensizlikler, 2 olguda yüzeysel düzensizlikler ile birlikte pannus oluşumu, 1 olguda orta tabaka derinliklerine doğru ilerleyen yarıklar izlenirken 1 olgunun eklem yüzeyi ise normal olarak değerlendirildi. Aynı gruba ait tibia eklem yüzeyleri incelendiğinde ise 6 olguda yüzeysel düzensizlikler izlenirken 1 olguda yüzeysel düzensizliklere ek olarak pannus oluşumu da gözlemlendi (Şekil 22).

HA grubuna ait femur condylusları incelendiğinde 4 olguda yüzeysel düzensizlikler, 3 olguda yüzeysel düzensizlikler ile birlikte pannus oluşumu izlendi. Aynı gruba ait tibia eklem yüzeyleri incelendiğinde ise 6 olguda yüzeysel düzensizlikler izlenirken 1 olguda yüzeysel düzensizliklere ek olarak pannus oluşumu da gözlemlendi (Şekil 23).

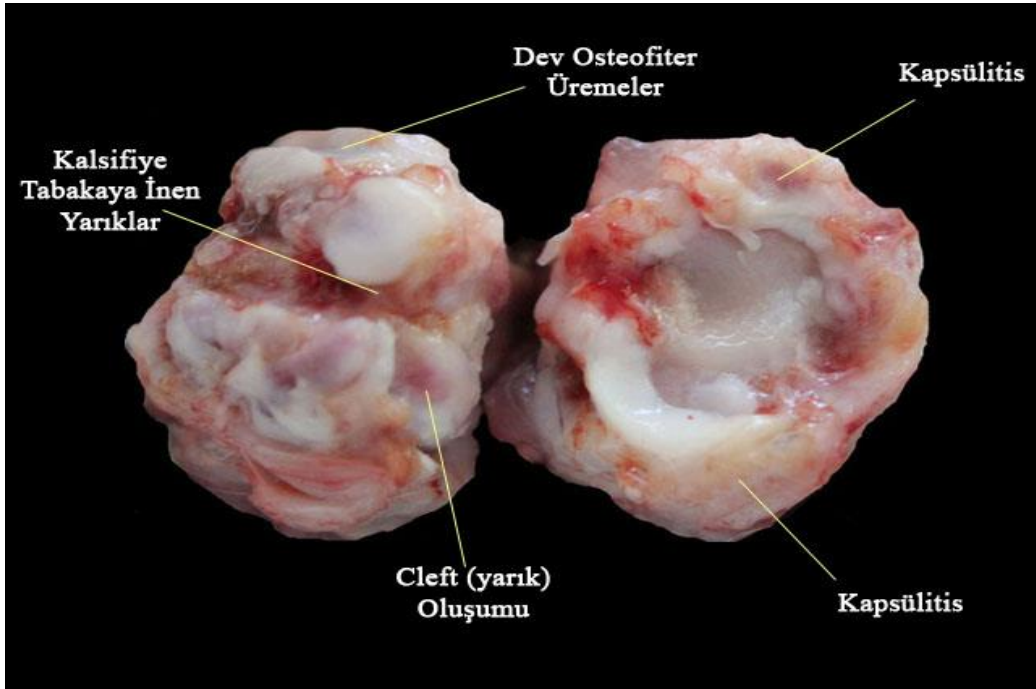
Kontrol grubuna ait femur condylusları incelendiğinde 1 olguda orta tabaka derinliklerine doğru ilerleyen yarıklar, 3 olguda derin tabakaya doğru ilerleyen yarıklar, 1 olguda kalsifiye tabakaya kadar uzanan yarıklar izlenirken 2 olgunun eklem yüzeyinde ise tamamen disorganizasyon görüldü. Aynı gruba ait tibia eklem yüzeyleri incelendiğinde 2 olguda yüzeysel düzensizlikler ve pannus izlenirken 4 olguda orta tabakaya doğru ilerleyen yarıklar ve 1 olguda ise kalsifiye tabakaya inen yarıklar izlendi (Şekil 24).



Şekil 22. SAS grubuna ait diz eklemine makroskopik görünümü



Şekil 23. HA grubuna ait diz ekleminin makroskopik görünümü



Şekil 24.KONT grubuna ait diz ekleminde makroskopik olarak genel bir disorganizasyon

5.4. Histopatolojik Bulgular

Tavşanların sağ dizlerinin femoral ve tibial eklem yüzeyleri; meydana gelen hasarın kıkırdak tabakalarını etkileme derecesi, kondrositlerin durumu, matriksin safranin- O ile boyanma miktarları ve tidemark bütünlüğü yönünden mikroskopik olarak incelendi.

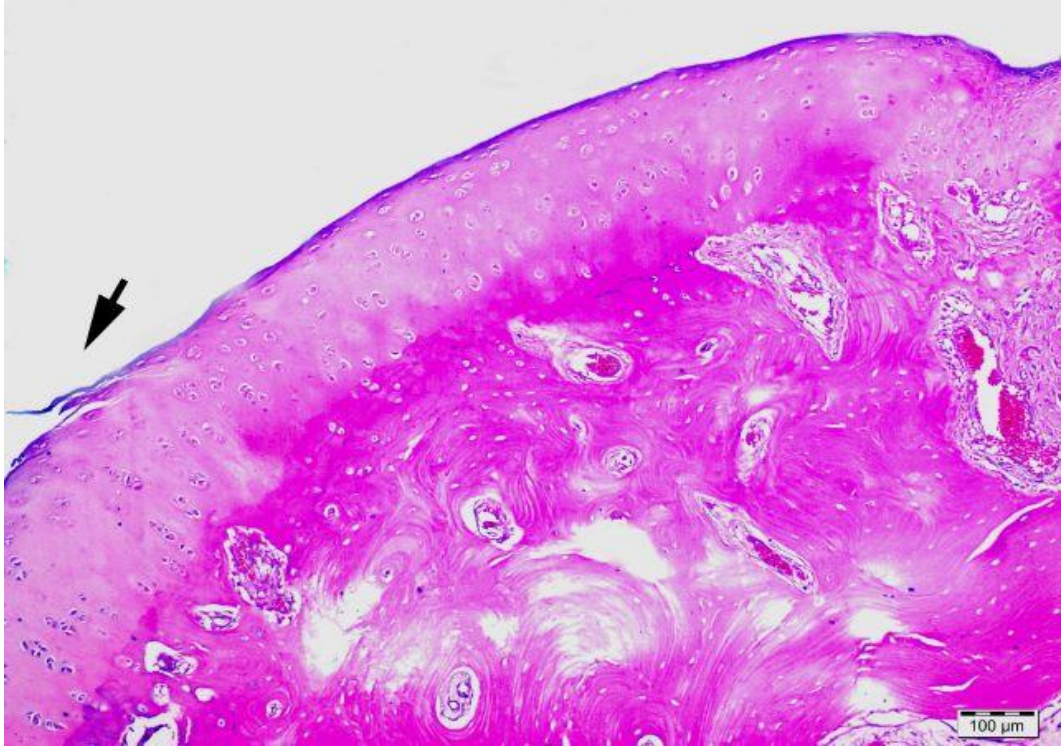
Gruplarda bulunan tüm tavşanların hem femoral hem de tibial eklem kıkırdaklarının almış oldukları histopatolojik değerler Tablo 7 ve Tablo 8’de detaylı bir şekilde verilmiştir. Grupların toplam Mankin skorları ve bu skorların ortalamaları ise Tablo 9 ve Tablo10’da verilmiştir.

5.4.1. Femur Eklem Yüzeyine Ait Histopatolojik Bulgular

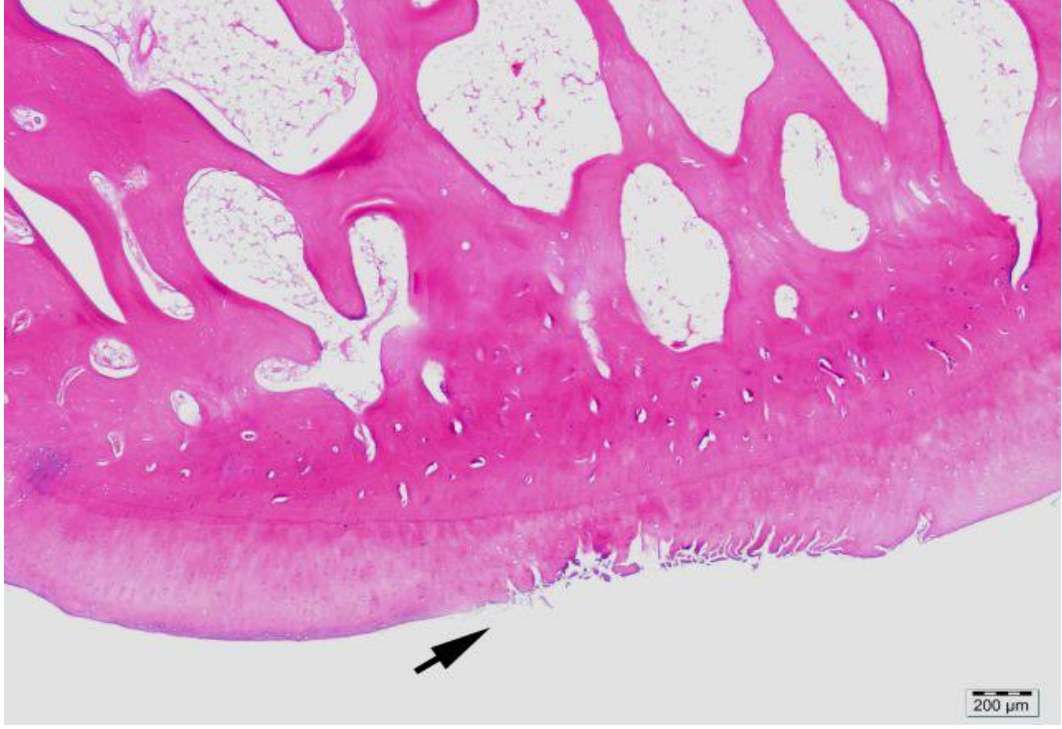
SAS grubunda kondrosit hücre sayısı yönünden 1 olgu normal olarak değerlendirilirken 3 olguda yaygın hiperselülarite ve 3 olguda ise hücre kümeleri izlendi (Şekil 25). Ekstra sellüler matriksin (ECM) Safranin-O ile boyanması yönünden değerlendirilmesinde 2 olguda hafif derecede bir azalma, 4 olguda orta derecede azalma ve 1 olguda ise ileri derecede azalma görüldü (Şekil 28). Bu gruba ait bireylerin 2 tanesinde tidemark bütünlüğünün damarlar tarafından bozulduğu görüldü.

HA grubunda hücre sayısı yönünden 1 olgu normal olarak değerlendirilirken 2 olguda yaygın hiperselülarite 2 olguda ise hücre kümeleri ve 2 olguda hiposelülarite izlendi (Şekil 26). Safranin-O ile boyanma yönünden 3 olguda hafif derecede bir azalma, 3 olguda orta derecede azalma ve 1 olguda ise ileri derecede azalma görüldü (Şekil 29). Bu gruba ait bireylerin sadece 1’inde tidemark bütünlüğünün bozulduğu görüldü.

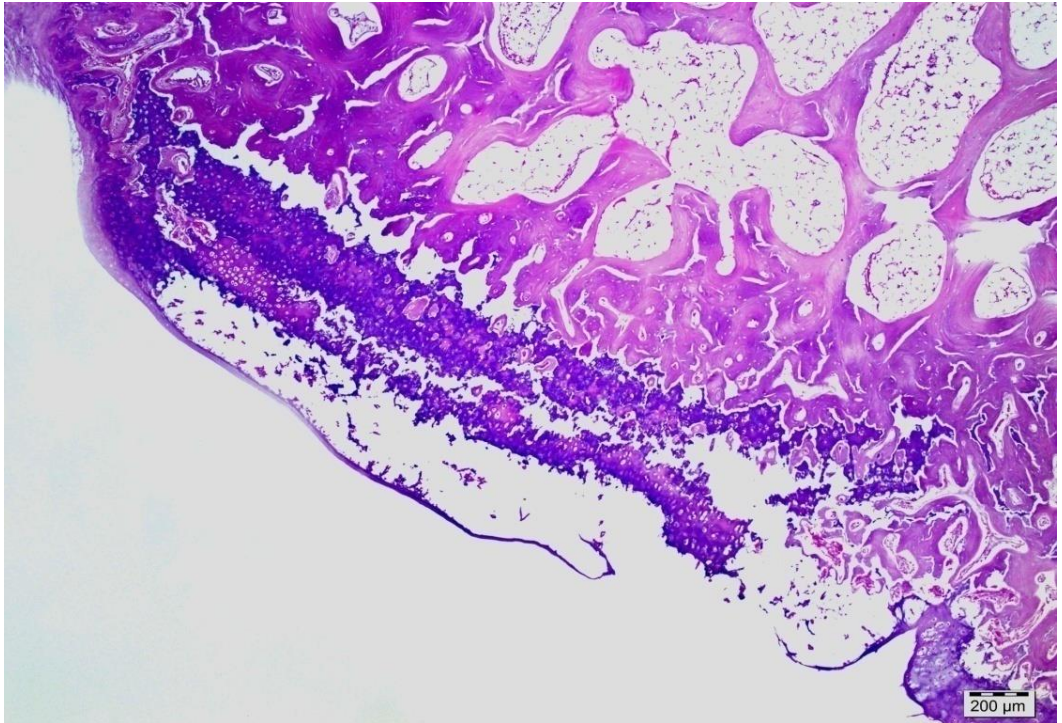
Kontrol grubunda hücre sayısı yönünden 1 olguda hücre kümeleri ve 6 olguda hiposelülarite izlendi (Şekil 27). Matriksin Safranin-O ile boyanması yönünden değerlendirilmesinde 1 olguda orta derecede azalma, 3 olguda ileri derecede azalma ve 3 olguda ise boyanma olmadığı görüldü. Bu gruba ait bireylerin tamamında tidemark bütünlüğünün bozulduğu görüldü (Şekil 30).



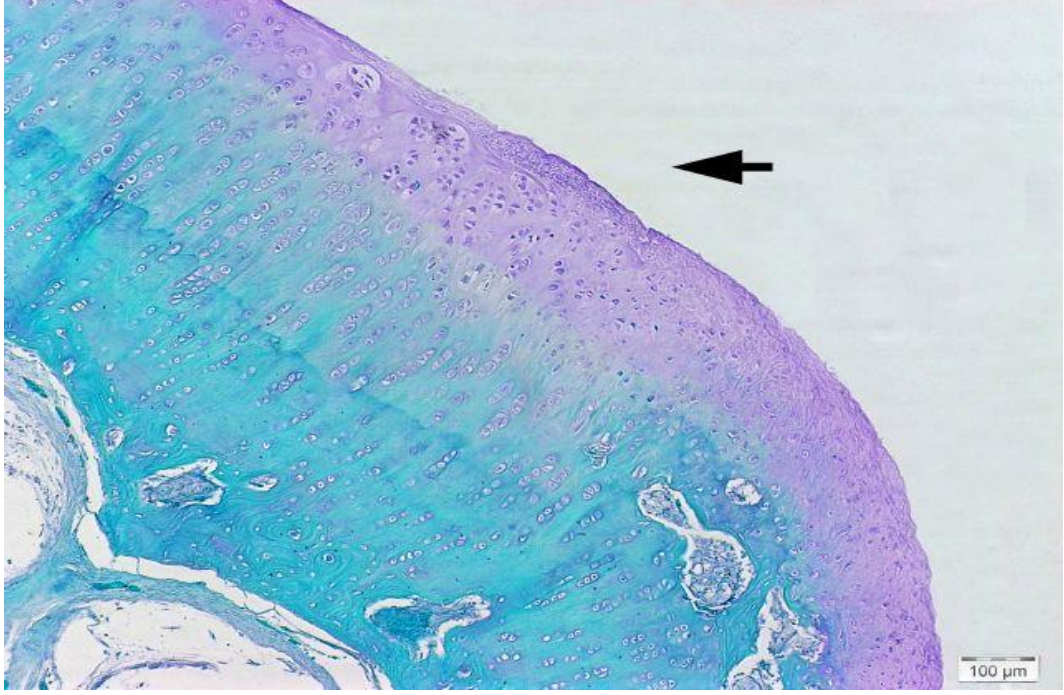
Şekil 25.SAS grubuna ait femur eklem kıkırdağında yüzeysel düzensizlikler ve tidemark bütünlüğünde bozulma (H.E. x10)



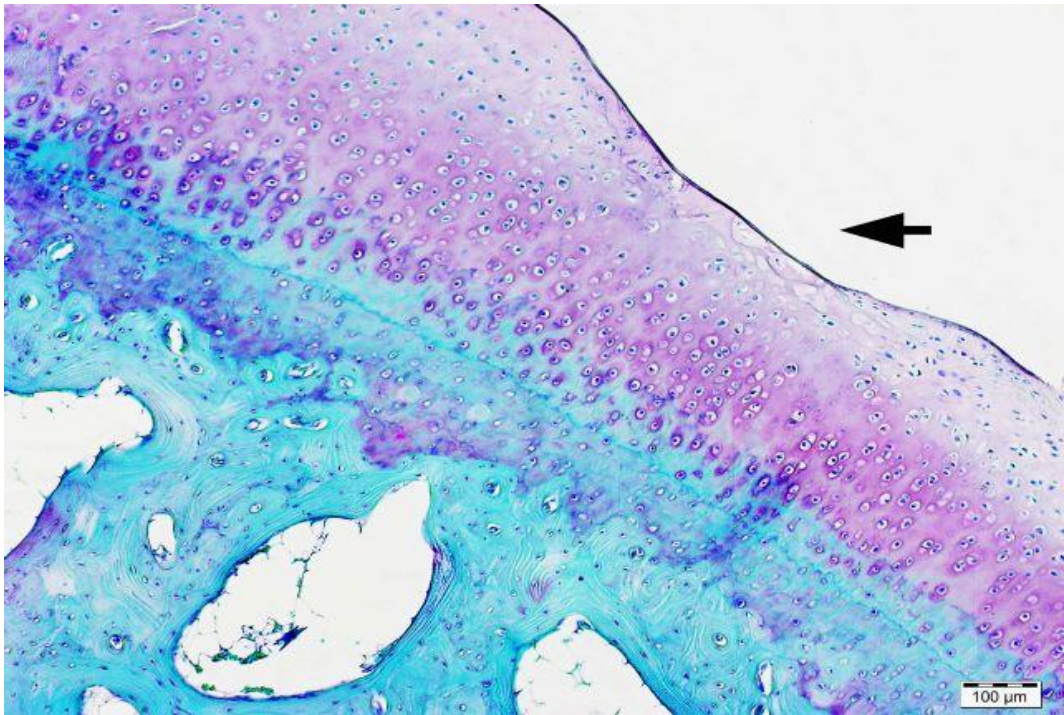
Şekil 26.HA grubuna ait femur eklem kıkırdağında orta tabakaya kadar inen yarıklar, fibrilasyon ve matriks kaybı (H.E. x4)



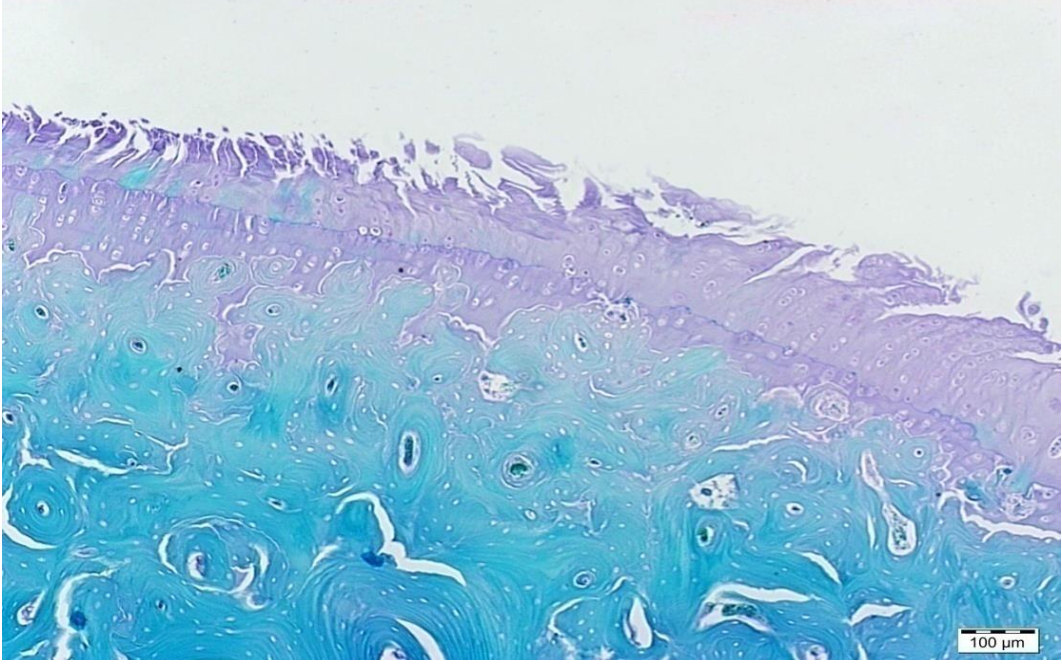
Şekil 27.KONT grubu femur eklem kıkırdağında genel disorganizasyon ve geniş bir alanda nekroz (H.E. x4)



Şekil 28.SAS grubuna ait fermur eklem kıkırdağında yüzeysel düzensizlikler
(Safranin-O x10)



Şekil 29.HA grubunda yüzeysel fermur eklem kıkırdağında bölgesel incelme
(Safranin-O x10)



Şekil 30.KONT grubuna ait fermur eklem kıkırdağında kalsifiye tabakaya kadar inen derin yarıklar, genel disorganizasyon, negatif boyanma ve tidemark bütünlüğünde bozukluk (Safranin-O x10)

Tablo 7.Femoral eklem kıkırdaklarının ayrıntılı Mankin skorları

Tavşanlar	Makroskopik Görünüm	Kondrosit Hücre Sayısı	Safranin-O Boyama	Tidemark Bütünlüğü
SAS₁	1	1	1	0
SAS₂	1	2	2	0
SAS₃	2	1	2	0
SAS₄	2	2	2	1
SAS₅	1	1	2	0
SAS₆	3	2	3	1
SAS₇	0	0	1	0
HA₁	2	3	2	0
HA₂	1	2	1	1
HA₃	1	1	1	0
HA₄	1	2	2	0
HA₅	2	3	3	0
HA₆	1	0	1	0
HA₇	2	1	2	0
KONT₁	6	3	4	1
KONT₂	6	3	4	1
KONT₃	5	3	2	1
KONT₄	4	3	4	1
KONT₅	4	3	3	1
KONT₆	4	3	3	1
KONT₇	3	2	3	1

Tablo 8.Grupların femoral eklem kıkırdağı toplam ve ortalama Mankin skorları

Tavşanlar	SAS	HA	KONT
1	3	7	14
2	5	5	14
3	5	3	11
4	7	5	12
5	4	8	11
6	9	2	11
7	1	5	9
Toplam	34	35	82
Ortalama	4.85	5.00	11.71

5.4.2. Tibia Eklem Yüzeyine Ait Histopatolojik Bulgular

SAS grubunun hücre sayısı incelendiğinde 1 olgu normal olarak değerlendirilirken 1 olguda yaygın hiperselülarite, 5 olguda ise hücre kümeleri izlendi. Safranin-O ile boyanma durumuna bakıldığında 2 olguda hafif derecede, 3 olguda orta derecede ve 2 olguda ise ileri derecede bir düşüş olduğu görüldü. Bu gruba ait bireylerin tidemark bütünlüğünün 2 olguda bozulduğu görüldü.

HA grubunda kondrosit hücre sayısı yönünden 3 olguda yaygın hiperselülarite, 3 olguda hücre kümeleri ve 1 olguda hiperselülarite izlendi. Matriksin safranin-O ile boyasını tutma miktarı yönünden değerlendirilmesinde 3 olguda hafif derecede bir azalma, 3 olguda orta derecede azalma ve 1 olguda ise

ileri derecede azalma görüldü. Bu gruba ait bireylerin 4'ünde tidemark bütünlüğünün damarlar tarafından bozulduğu görüldü.

KONT grubunda hücre sayısı yönünden 4 olguda hücre kümeleri ve 3 olguda hiposelülarite izlendi. Matriksin Safranin-O ile boyanması yönünden değerlendirilmesinde 6 olguda ileri derecede azalma ve 1 olguda ise boyanma olmadığı görüldü. Bu gruba ait bireylerin hepsinde tidemark bütünlüğünün bozulduğu görüldü.

Tablo 9.Tibial eklem kıkırdaklarının ayrıntılı Mankin skorları

Tavşanlar	Makroskobik Görünüm	Kondrosit Hücre Sayısı	Safranin-O Boyama	Tidemark Bütünlüğü
SAS ₁	1	2	2	0
SAS ₂	1	2	3	0
SAS ₃	1	1	1	0
SAS ₄	1	2	2	1
SAS ₅	1	2	2	1
SAS ₆	2	2	3	0
SAS ₇	1	0	1	0
HA ₁	2	2	2	1
HA ₂	1	1	1	1
HA ₃	1	2	2	1
HA ₄	1	3	3	0
HA ₅	1	2	2	1
HA ₆	1	1	1	0
HA ₇	1	1	1	0
KONT ₁	5	3	4	1
KONT ₂	3	3	3	1
KONT ₃	3	2	3	1
KONT ₄	2	2	3	1
KONT ₅	2	3	3	1
KONT ₆	3	2	3	1
KONT ₇	3	2	3	1

Tablo 10.Grupların tibial eklem kıkırdağı toplam ve ortalama Mankin skorları

Tavşanlar	SAS	HA	KONT
1	5	7	13
2	6	4	10
3	3	6	9
4	6	7	8
5	6	6	9
6	7	3	9
7	2	3	9
Toplam	35	36	67
Ortalama	5.00	5.14	9.57

5.5. İmmunohistokimyasal Bulgular

İmmunohistokimyasal değerlendirme kondrositlerin kaspaz-3, kaspaz-8 ve MMP-13 immunohistokimyasal sitoplazmik boyanmasına ve boyanma şiddetine göre yapıldı. Kondrosit sitoplazmasında uygun boyanma pozitif olarak kabul edildi ve her alanda boyanan kondrosit sayısı kıkırdaktaki tüm kondrosit sayısına oranlandı.

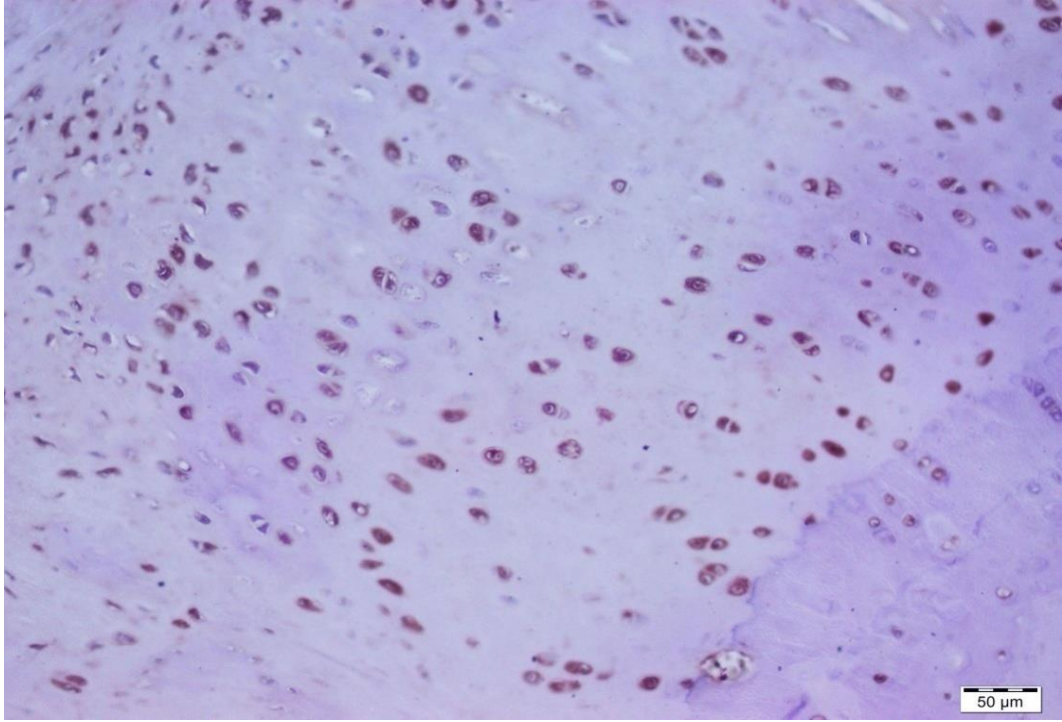
5.5.1. Kaspaz-3 Boyaması

SAS grubunda kaspaz-3 boyanma yüzdesi femur için; 2 olguda %20, 3 olguda %30 ve 2 olguda %50 iken, tibia için; 1 olguda %20, 3 olguda %30, 2

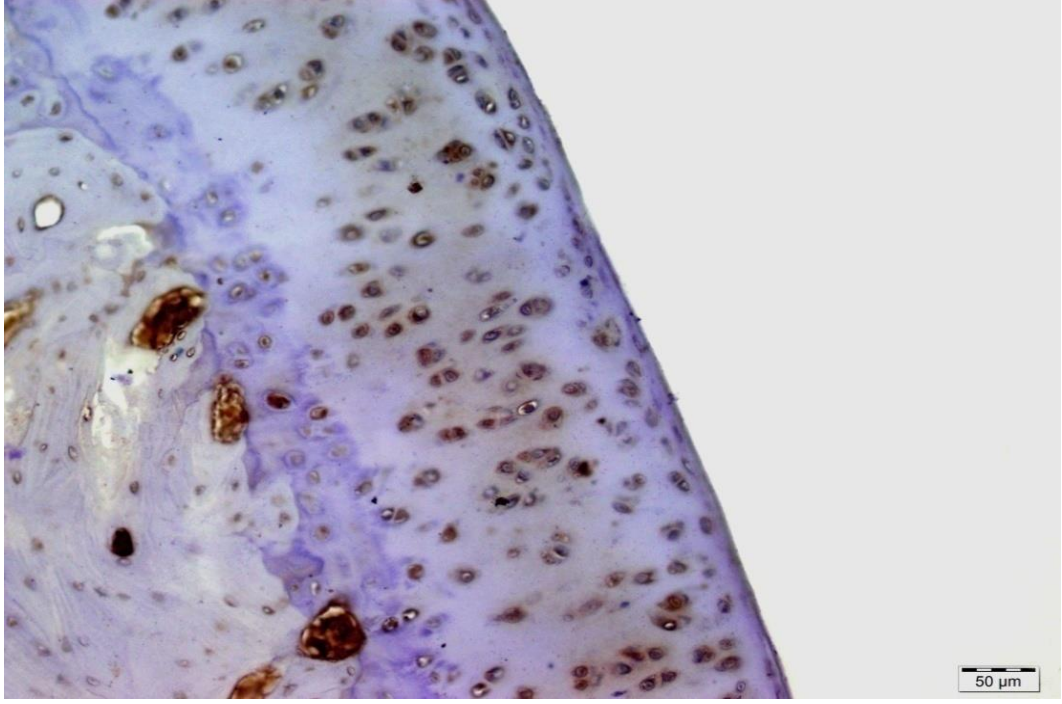
olguda %40 ve 1 olguda %50 olarak ölçüldü. Boyanma şiddeti genel olarak orta derece olarak değerlendirildi (Şekil 31).

HA grubunda femur için; 1 olguda %20, 3 olguda %30, 1 olguda %40 ve 2 olguda %50 iken, tibia için; 1 olguda %20, 3 olguda %30, 2 olguda %40 ve 1 olguda %50 olarak ölçüldü. Orta derecede bir boyanma şiddeti izlendi (Şekil 32).

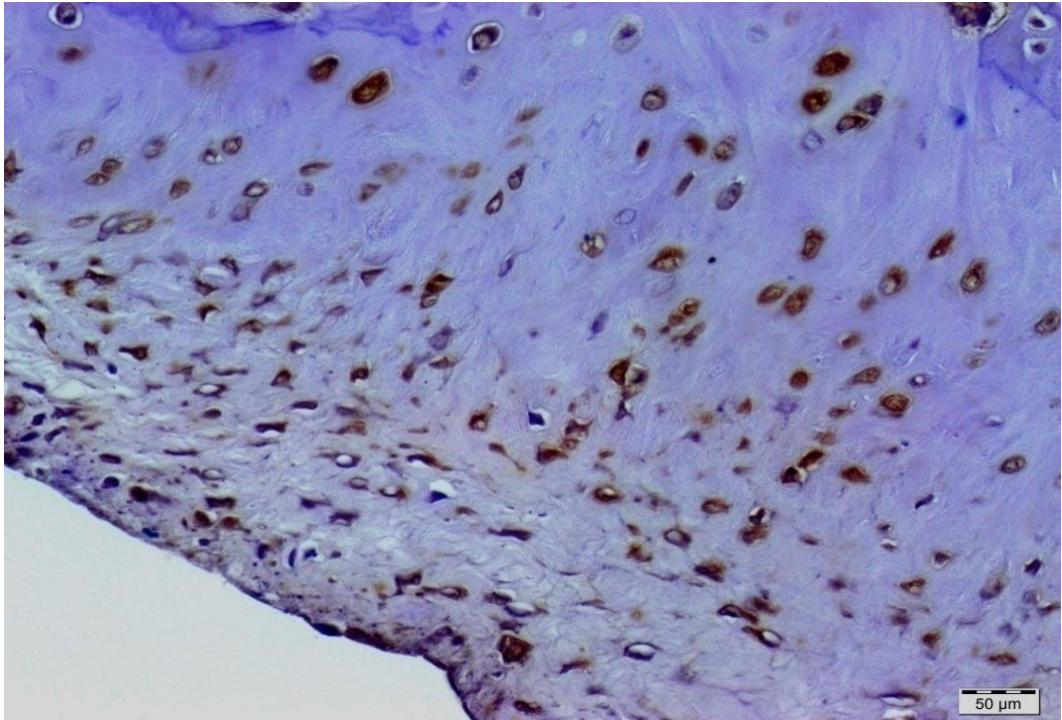
Kontrol grubunda femur için; 3 olguda %60, 2 olguda %70 ve 2 olguda %80 iken, tibia için; 2 olguda %50, 4 olguda %60, ve 1 olguda %70 olarak ölçüldü. Kuvvetli derecede bir boyanma görüldü(Şekil 33) .



Şekil 31.SAS grubuna ait femur eklem kıkırdağının tüm katmanlarında pozitif sitoplazmik boyanmalar (IHC kaspaz-3 x20)



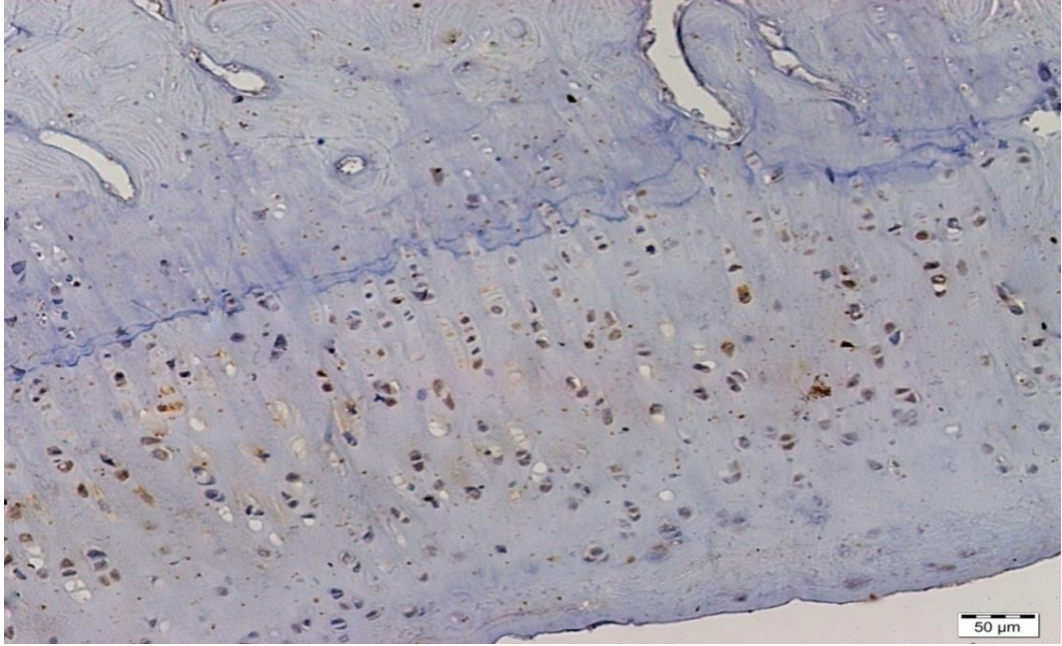
Şekil 32.HA grubuna ait femur eklem kıkırdağında orta tabaka kondrositlerde yoğunlaşan pozitif sitoplazmik boyanmalar (IHC kaspaz-3 x20)



Şekil 33.KONT grubuna ait femur eklem kıkırdağında tüm katmanlarda yoğun sitoplazmik pozitif boyanmalar (IHC kaspaz-3 x20)

5.5.2. Kaspaz-8 boyaması

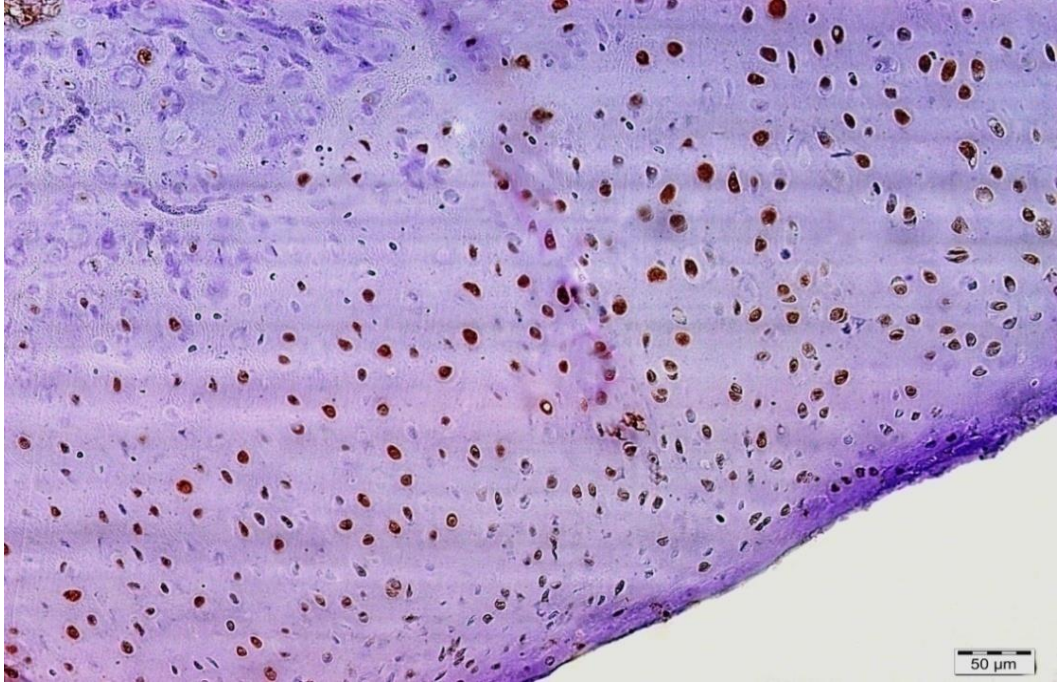
SAS grubunda kaspaz-8 boyanma yüzdesi femur için; 1 olguda %20, 4 olguda %30 ve 2 olguda %40 iken, tibia için; 6 olguda %30 ve 1 olguda %40 olarak ölçüldü. Boyanma şiddeti genel olarak orta şiddette görüldü (Şekil 34).



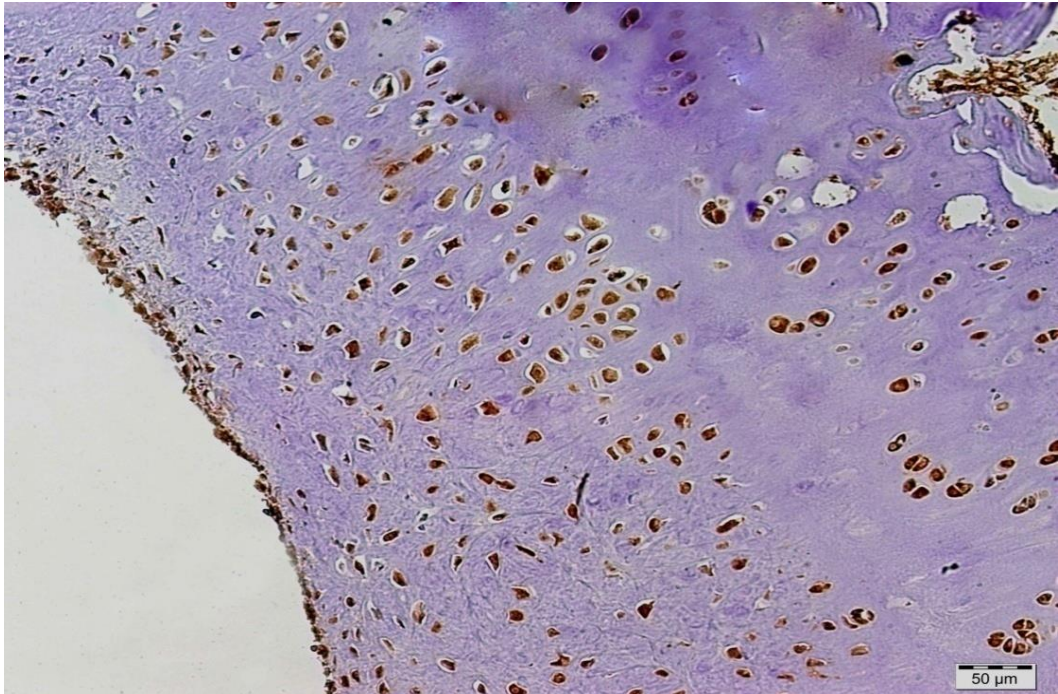
Şekil 34.SAS grubuna ait tibia eklem kıkırdağında tüm katmanlarda orta derecede sitoplazmik boyanmalar (IHC kaspaz-8 x20)

HA grubunda femur için; 1 olguda %20, 4 olguda %30, 2 olguda %40 iken, tibia için; 1 olguda %20, 1 olguda %30 ve 5 olguda %40 olarak ölçüldü. Femur eklem yüzeyleri daha ziyade zayıf boyanırken tibiada orta derecede bir boyanma şiddeti izlendi (Şekil 35).

Kontrol grubunda femur için; 1 olguda %60, 4 olguda %70 ve 2 olguda %80 iken, tibia için; 2 olguda %60, 3 olguda %70 ve 2 olguda %80 olarak ölçüldü. Femur eklem yüzeylerinde genel olarak orta şiddette bir boyanma gözlenirken tibia eklem yüzeyinde kuvvetli derecede bir boyanma görüldü (Şekil 36).



Şekil 35.HA grubuna ait tibia eklem kıkırdağında tüm katmanlarda pozitif sitoplazmik boyanmalar (IHC kaspaz-8 x20)



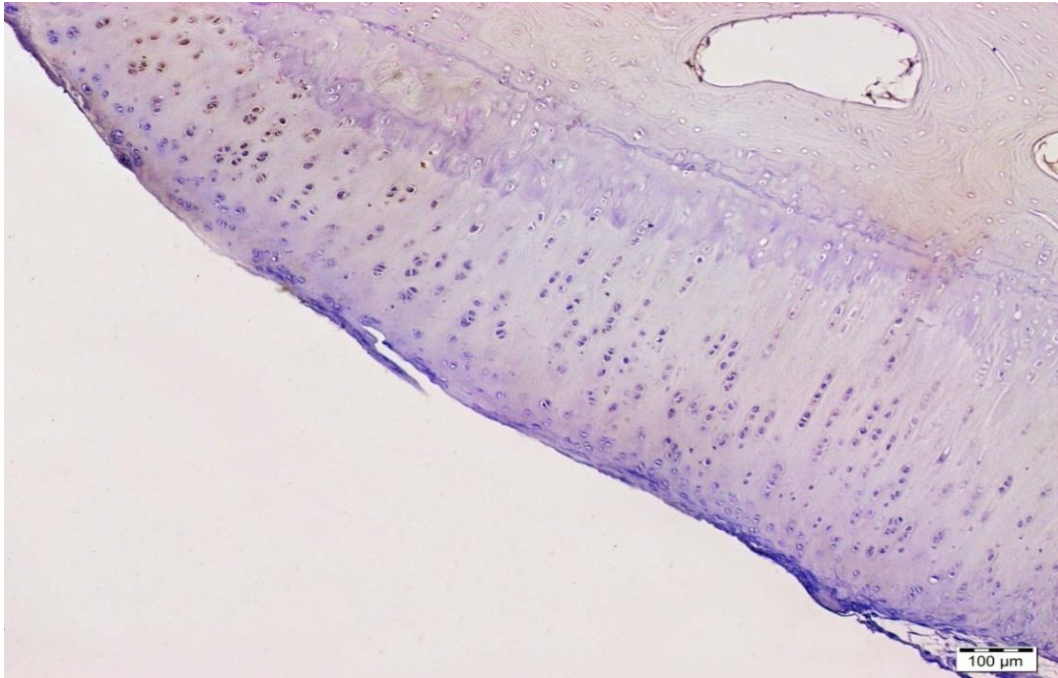
Şekil 36.KONT grubuna ait tibia eklem kıkırdağında tüm katmanlarda ileri derecede kuvvetli pozitif sitoplazmik boyanmalar (IHC kaspaz-8 x20)

5.5.3. MMP-13 boyaması

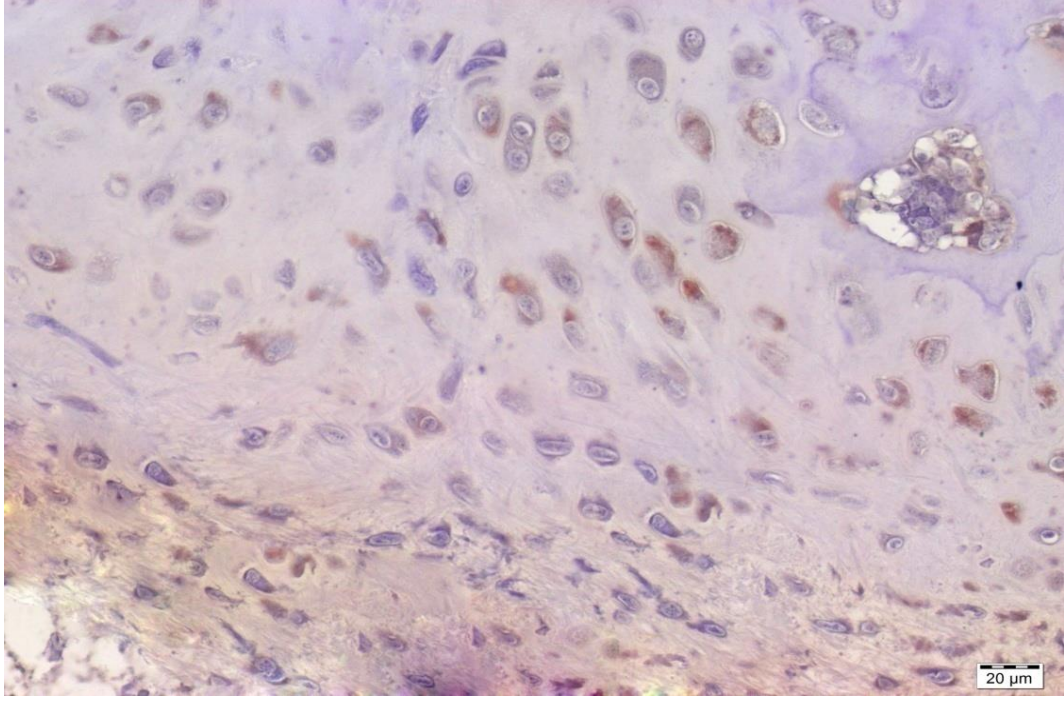
SAS grubunda MMP-13 boyanma yüzdesi femur için; 3 olguda %20, 2 olguda %30 ve 2 olguda %40 iken, tibia için; 3 olguda %20 ve 4 olguda %30 olarak ölçüldü. Femur eklem yüzeylerinde genel olarak orta şiddette bir boyanma gözlenirken tibia eklem yüzeyinde zayıf derecede bir boyanma görüldü (Şekil 37).

HA grubunda femur için; 3 olguda %20, 2 olguda %30, 2 olguda %40 iken, tibia için; 1 olguda %20, 5 olguda %30 ve 1 olguda %40 olarak ölçüldü. Zayıf- orta şiddette bir boyanma izlendi (Şekil 38).

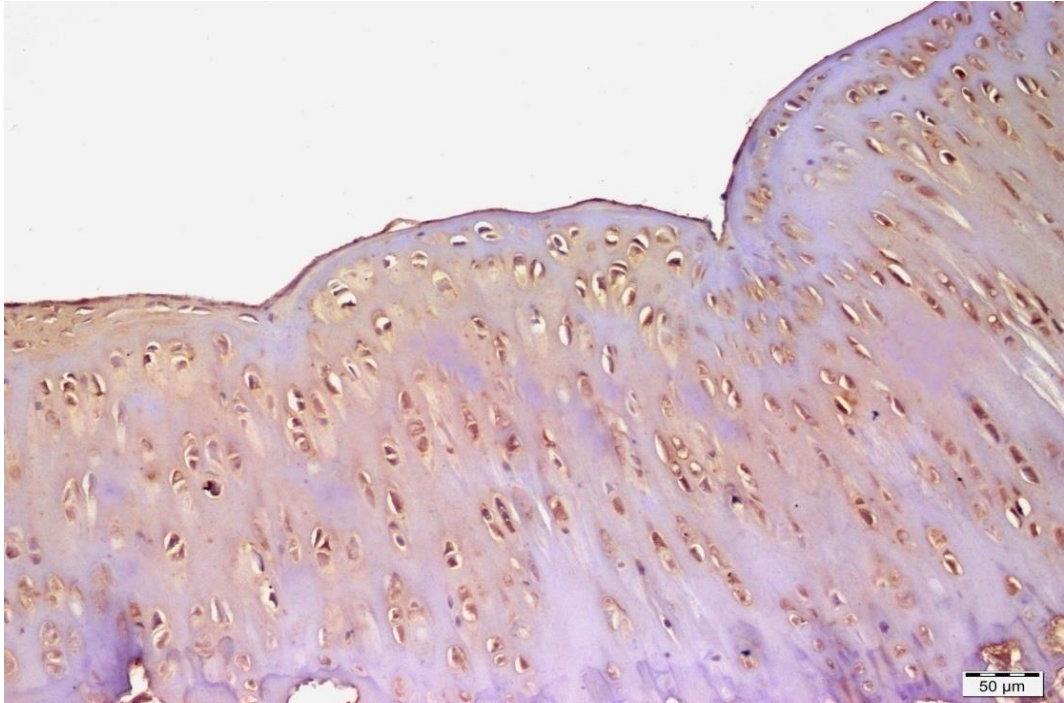
Kontrol grubunda femur için; 2 olguda %60, 4 olguda %70 ve 1 olguda %80 iken, tibia için; 1 olguda %50, 2 olguda %60 ve 4 olguda %70 olarak ölçüldü. Femur eklem yüzeylerinde genel olarak kuvvetli şiddette bir boyanma gözlenirken tibia eklem yüzeyinde orta derecede bir boyanma izlendi (Şekil 39).



Şekil 37.SAS grubuna ait femur eklem kıkırdağında sınırlı bölgede pozitif, genel olarak ta negatif boyanma (IHC MMP13 x10).



Şekil 38.HA grubuna ait femur eklem kıkırdağında pozitif sitoplazmik boyanma(IHC MMP-13 x40)



Şekil 39.KONT grubuna ait tibia eklem kıkırdağında yaygın pozitif sitoplazmik boyanmalar (IHC MMP-13 x20)

Tablo 11. SAS grubu Kaspaz- 3, Kaspaz- 8, MMP- 13 immunohistokimyasal boyanma yüzdesi ve şiddeti

SAS Grubu	Kaspaz- 3		Kaspaz- 8		MMP-13	
	% Boyama	Boyanma Şiddeti	% Boyama	Boyanma Şiddeti	% Boyama	Boyanma Şiddeti
1F (Femur)	20	Orta	20	Orta	20	Zayıf
1T (Tibia)	30	Orta	30	Orta	30	Orta
2F	30	Orta	30	Zayıf	20	Zayıf
2T	40	Kuvvetli	30	Orta	30	Orta
3F	30	Orta	40	Orta	30	Orta
3T	20	Orta	30	Orta	20	Zayıf
4F	50	Orta	30	Zayıf	40	Orta
4T	40	Orta	30	Orta	30	Orta
5F	30	Orta	30	Orta	30	Orta
5T	30	Orta	30	Zayıf	20	Zayıf
6F	50	Orta	40	Orta	40	Orta
6T	50	Orta	40	Zayıf	30	Zayıf
7F	20	Orta	30	Zayıf	20	Orta
7T	30	Orta	30	Zayıf	20	Zayıf

Tablo 12. HA grubu Kaspaz- 3, Kaspaz- 8, MMP- 13 immunohistokimyasal boyanma yüzdesi ve şiddeti

HA Grubu	Kaspaz- 3		Kaspaz- 8		MMP-13	
	% Boyama	Boyanma Şiddeti	% Boyama	% Boyama	Boyanma Şiddeti	% Boyama
1F(Femur)	50	Kuvvetli	40	Orta	20	Zayıf
1T (Tibia)	50	Orta	40	Kuvvetli	40	Orta
2F	40	Orta	30	Zayıf	30	Orta
2T	30	Orta	40	Orta	30	Zayıf
3F	30	Orta	30	Zayıf	20	Orta
3T	40	Orta	40	Orta	30	Zayıf
4F	30	Orta	20	Zayıf	30	Orta
4T	40	Orta	40	Zayıf	30	Orta
5F	50	Kuvvetli	40	Orta	40	Orta
5T	30	Orta	20	Orta	30	Zayıf
6F	20	Orta	30	Orta	20	Orta
6T	30	Orta	40	Zayıf	30	Zayıf
7F	30	Orta	30	Zayıf	40	Orta
7T	20	Orta	30	Zayıf	20	Zayıf

Tablo 13. KONT grubu Kaspaz- 3, Kaspaz- 8, MMP- 13 immunohistokimyasal boyanma yüzdesi ve şiddeti

KONT Grubu	Kaspaz- 3		Kaspaz- 8		MMP-13	
	% Boyama	Boyanma Şiddeti	% Boyama	% Boyama	Boyanma Şiddeti	% Boyama
1F (Femur)	80	Kuvvetli	80	Orta	70	Orta
1T (Tibia)	70	Kuvvetli	80	Kuvvetli	70	Kuvvetli
2F	80	Orta	70	Orta	70	Orta
2T	60	Kuvvetli	70	Kuvvetli	70	Orta
3F	70	Kuvvetli	60	Orta	60	Kuvvetli
3T	50	Orta	60	Kuvvetli	50	Orta
4F	70	Kuvvetli	70	Kuvvetli	70	Kuvvetli
4T	50	Orta	70	Kuvvetli	60	Orta
5F	60	Kuvvetli	70	Orta	60	Kuvvetli
5T	60	Kuvvetli	60	Orta	70	Orta
6F	60	Kuvvetli	80	Orta	80	Kuvvetli
6T	60	Kuvvetli	70	Kuvvetli	60	Kuvvetli
7F	60	Kuvvetli	70	Orta	70	Orta
7T	60	Orta	80	Orta	70	Orta

5.6. İstatistiksel Sonuçlar

5.6.1. Radyolojik Bulguların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Radyoloji skorları arası fark Kruskal Wallis varyans analizi ile değerlendirilmiştir. Kruskal Wallis varyans analizi sonucunda 30. günde gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. 90. günde gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak $P < 0.05$ düzeyinde, 120. günde ise gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak $P < 0.01$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

Daha sonra yapılan Mann-Whitney U testinde ise 90. günde SAS ve HA grupları arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunurken SAS ve KONT grupları ile HA ve KONT grupları arası fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). 120. günde SAS ve HA grupları arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunurken SAS ve KONT grupları ile HA ve KONT grupları arası fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.01$) (Tablo 14).

Tablo 14. Radyoloji sonuçları istatistiksel değerlendirmesi

Süre	SAS	HA	KONT
30. gün	2.4286 ± 0.20203 ^a (2 – 3)	2.4286 ± 0.20203 ^a (2 – 3)	2.5714 ± 0.20203 ^a (2 – 3)
90. gün	2.2857 ± 0.28571 ^a (1 – 3)	2.4286 ± 0.20203 ^a (2 – 3)	3.4286 ± 0.29738 ^b (2 – 4)
120. gün	2.2857 ± 0.28571 ^a (1 – 3)	2.4286 ± 0.20203 ^a (2 – 3)	3.5714 ± 0.20203 ^b (3 – 4)

^{a,b}: Aynı satırda farklı harflerle gösterilen rakamlar istatistiksel olarak birbirinden farklı bulunmuştur.

6.5.2. Mankin Skorlarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Mankin skorlamasında; femur ve tibia için ayrı ayrı çıkan sonuçlar SAS, HA ve KONT grupları arası fark Kruskal Wallis varyans analizi ile değerlendirilmiştir. Kruskal Wallis varyans analizi sonucunda hem femur hem de

tibia için SAS, HA ve KONT grupları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0.01$).

Daha sonra yapılan Mann-Whitney U testinde Femur için SAS ve HA gruplar arası fark istatistiksel olarak önemsiz bulunurken SAS ve KONT grupları ile HA ve KONT gruplar arası fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0.01$). Tibia için ise SAS ve HA gruplar arası fark istatistiksel olarak önemsiz bulunurken SAS ve KONT grupları ile HA ve KONT gruplar arası fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0.01$) (Tablo 15).

Tablo 15.Femur ve Tibia eklem kıkırdağına ait Mankin skorları istatistiksel değerlendirmesi

Kemik	SAS	HA	KONT
Femur	4.8571±0.9863 ^a (1 – 9)	5.0000±0.7868 ^a (2 – 8)	11.7143±0.6801 ^b (9 – 14)
Tibia	5.0000±0.6900 ^a (2 – 7)	5.1429±0.6700 ^a (3 – 7)	11.7143±0.6801 ^b (8 – 13)

^{a,b}: Aynı satırda farklı harflerle gösterilen rakamlar istatistiksel olarak birbirinden farklı bulunmuştur.

5.6.3. İmmunohistokimyasal Boyamanın İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Femur kaspaz-3 boyanma yüzdesiSAS ve HA gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunurken SAS ve KONT grupları ile HA ve KONT grupları arası fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0.01$) (Tablo16).

Tibia kaspaz-3 boyanma yüzdesiSAS ve HA gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunurken SAS ve KONT grupları ile HA ve KONT grupları arası fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0.01$) (Tablo16).

Tablo 16.Kaspaz-3 boyanma yüzdesi istatistiksel değerlendirmesi

	SAS	HA	KONT	Pdeğeri
Femur kaspaz-3 boyanma yüzdesi	32.8571±4.73804 ^a	35.7143±4.28571 ^a	68.5714±3.40068 ^b	0.01
Tibia kaspaz-3 boyanma yüzdesi	34.2857±3.68856 ^a	34.2857±3.68856 ^a	58.5714±2.60820 ^b	0.02

^{a,b}: Aynı satırda farklı harflerle gösterilen rakamlar istatistiksel olarak birbirinden farklı bulunmuştur.

Femur ve tibia kaspaz-8 boyanma yüzdesi SAS ve HA grupları arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunurken SAS ve KONT grupları ile HA ve KONT grupları arası fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P<0.01) (Tablo17).

Tablo 17. Kaspaz-8 boyanma yüzdesi istatistiksel değerlendirmesi

	SAS	HA	KONT	Pdeğeri
Femur kaspaz-8 boyanma yüzdesi	31.4286±2.60820 ^a	31.4286±2.60820 ^a	71.4286±2.60820 ^b	0.01
Tibia kaspaz-8 boyanma yüzdesi	31.4286±1.42857 ^a	35.7143±2.97381 ^a	70.0000±3.08607 ^b	0.01

^{a,b}: Aynı satırda farklı harflerle gösterilen rakamlar istatistiksel olarak birbirinden farklı bulunmuştur.

Femur ve tibia MMP-13 boyanma yüzdesi SAS ve HA grupları arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunurken SAS ve KONT grupları ile HA ve KONT grupları arası fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P<0.01).

Tablo 18. MMP-13 boyanma yüzdesi istatistiksel değerlendirmesi

	SAS	HA	KONT	P değeri
Femur MMP-13 boyanma yüzdesi	28.5714±3.40068 ^a	28.5714±3.40068 ^a	68.5714±2.60820 ^b	0.01
Tibia MMP-13 boyanma yüzdesi	25.7143±2.02031 ^a	30.0000±2.18218 ^a	64.2857±2.97381 ^b	0.01

^{a,b}: Aynı satırda farklı harflerle gösterilen rakamlar istatistiksel olarak birbirinden farklı bulunmuştur.

6. TARTIŞMA

Osteoarthritis tüm evcil hayvanlarda ve laboratuvar hayvanlarında da görülmektedir (57,58). Ayrıca OA, köpeklerde görülen en önemli eklem hastalıklarındandır. Köpeklerde topallıkların yaklaşık %37'sinin OA'dan ileri geldiği bildirilmektedir (57, 59-61).

Tedavide amaç ağrıyı gidermek, eklem hareket genişliğini ve fonksiyonel aktivitesini korumak, sekonder OA'da buna ek olarak mevcut nedeni ortadan kaldırmak olarak özetlenebilir (86-88).

Hiyaluronik asit yapılan birçok çalışmada eklem içi uygulanmış olup kıkırdak koruyucu etkileri ortaya konulmuştur (125-129). Ayrıca insan amniyotik sıvısının eklem içi kullanımının da oluşturulan deneysel OA modellerinde kıkırdak koruyucu etkilerinin olduğu bildirilmiştir (7,8)

Bu çalışmadaOAoluşturulmuş deneklerde, hiyaluronik asit ile daha önce OA'da hiç denenmemiş olan, ekonomik ve erişimi insan amniyotik sıvısına kıyasla daha kolay ve ayrıca veteriner hekimliğin erişim ve kullanım sahasına uygun olan sığır amniyotik sıvısının eklem kıkırdağı üzerindeki etkileri karşılaştırmalı olarak ortaya konulmaya çalışıldı.

OA oluşturmak amacıyla parsiyel menisektomi (145), komplet menisektomi (146), ön çapraz bağ kesilmesi (147), ön çapraz bağ kesilmesi ve parsiyel menisektomi(149) gibi cerrahi yöntemler kullanıldığı bildirilmektedir.

Ön çapraz bağ kesilmesi sonrası oluşturulan OA modeli, OA oluşumunda eklem yüzeyinde yük dağılımı ve eklem hareketinin değişmesinin önemini

destekleyen bir modeldir (150). Bu özelliğinden dolayı bu çalışmada bahsi geçen yöntem tercih edilmiştir.

Deneysel OA modelinde en çok tercih edilen hayvanlar; tavşan ve ratdır (7,80,127,147). Bu çalışmada deney havanı olarak tavşanların seçilme nedeni; vücut ağırlıklarının fazla olmasına bağlı olarak eklem yüzeyine binecek yükün ratlara göre daha fazla olması ve hastalığın erken şekillenmesi ve ayrıca histopatolojik kesit alımında da daha geniş yüzeyler elde edilebilir olmasıdır.

Bilgili ve Orhun(80) yaptıkları bir çalışmada tavşan dizlerinde ön çapraz bağın kesilmesi ve medial menisektomi ile oluşturdukları deneysel OA modelinde eklem dokularında gelişen değişiklikleri radyolojik ve histolojik olarak araştırmışlardır. Sonuç olarak radyolojik değerlendirmede 30. günde yüzeysel dökülmeler, subkondral kemik dokusunda kalınlaşmalar ve osteofitik üremeler olduğunu göstermişlerdir.

Bu çalışmada 30. günde bütün gruplarda, bahsi geçen literatürde(80) olduğu gibi yüzeysel dökülmeler, subkondral kemik dokusunda skleroz ve osteofitik üremeler görülmüştür. Ayrıca çalışmanın 90 ve 120. günlerinde SAS ve HA gruplarında eklemdeki bu lezyonlar ilerlemezken KONT grubunda büyük osteofitler, eklem aralığında daralmalar, subkondral sklerozlar ve kemik uçlarında deformiteler izlenmiştir.

Deneysel OA ile ilgili yapılan histopatolojik çalışmalarda makroskopik dejeneratif değişiklikleri değerlendirmek amacıyla Meachim morfolojik evreleme sistemi kullanılarak hint mürekkebi ile eklem yüzeyi boyandıktan sonra lezyonlar incelenmiştir. Bu çalışmanın uzun süreli olması ve dolayısıyla makroskopik defektlerin minimal düzeyde olmaması nedeniyle ve ayrıca ileride yapılacak

immun boyamalarda risk oluşturabileceği endişesiyle makroskobik değerlendirmeler lup kullanılarak yapılmıştır.

Tunay ve ark.(154) yaptıkları çalışmada tavşanlarda ön çapraz bağın kesilmesinden sonra intraartiküler hiyalüronik asit uygulamasının kıkırdak dokuda şekillenen inflamasyon ve yıkımlanma olaylarını engellediğini göstermişlerdir.

Baki (8) yaptığı çalışmada medial menisektomi uyguladığı ratlarda 3 hafta sonra OA'nın oluşmasını takiben eklem içi 0.1 mL hiyaluronik asit ve diğer gruba 0.1 mL insan amniyotik sıvısını birer hafta arayla 3 kez enjekte etmiş. Altıncı haftanın sonunda mankin skorlamasının sonuçlarına göre hiyaluronik asit ve insan amniyotik sıvısının kıkırdak koruyucu etkileri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı sonucuna varmıştır.

Tirelioğlu ve ark. (7) tavşanlarda ön çapraz bağın kesilmesiyle 4 hafta sonra oluşturdukları OA modelinde eklem içi birer hafta ara ile 3 kez eklem içi 0.5mL insan amniyotik sıvısını kullanmışlar ve en son uygulanan enjeksiyondan 12 hafta sonra femur ve tibia kıkırdaklarındaki hasarın, hiçbir enjeksiyon uygulanmayan kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğunu göstermişlerdir.

Bu çalışmada tavşanların ön çapraz bağları kesildikten 4 hafta sonra birinci gruba birer hafta arayla 3 kez eklem içi sığır amniyotik sıvısı, ikinci gruba yine birer hafta arayla 3 kez hiyaluronik asit uygulanmıştır. Kontrol grubuna ise herhangi bir enjeksiyon uygulanmamıştır. Yapılan Mankin skorlamasına göre hiyaluronik asit uygulanan grup ile sığır amniyotik sıvısı uygulanan grup arasında anlamlı bir fark bulunamamış olmasının yanı sıra her iki grupta kontrol grubuyla karşılaştırıldığında Mankin puanları anlamlı derecede düşük çıkmıştır ($P<0.01$).

Literatürlerde HA'nın kıkırdak doku üzerindeki olumlu etkileri göz önüne alındığında, bu çalışma mevcut literatürlerle (8,154) uyum göstermektedir. Aynı şekilde çalışmada kullanılan sığır amniyotik sıvısı da insan amniyotik sıvısıyla benzer etkiler göstermiştir.

İnsan amniyotik sıvısının kıkırdak doku üzerindeki koruyucu etkilerini ortaya koyan yazarlar, bunun insan amniyotik sıvısı içerisinde bulunan büyüme faktörlerine, HA'ya, uygulandığı dokudaki endojen HA sentezini arttıran HASA'ya ve büyüme faktörlerine bağlı olduğunu bildirmişlerdir (7,8).

Çalışmada kullandığımız sığır amniyotik sıvısının içeriğinde; mezenşimal hücreler ve kondrositler üzerinde uyarıcı etkileri olan, insulin benzeri büyüme faktörleri (IGFs) ve diğer büyüme faktörleri ayrıca HA ve HA aktive edici ajan (HASA) gibi makromoleküller bulunmaktadır (140-143). Bununla birlikte kıkırdak yıkımını önleyebilecek doku metalloproteinaz inhibitörlerini de bünyesinde bulundurmaktadır (144). Sığır amniyotik sıvısının içeriğinin insan amniyotik sıvısının içeriğiyle benzerlik göstermesi nedeniyle bu çalışmada sığır amniyotik sıvısının kullanılmasına karar verilmiştir.

Yapılan çalışmalarda genellikle femoral kondillere ve tibial eklem yüzeylerine yönelik incelemeler yapılmıştır.

Bu çalışmada bahsi geçen bölgelerdeki lezyonlara ek olarak bütün deneklerde femur distalinde bulunan, trochlea ossis femoris adı verilen bölgelerde de ciddi lezyonlar görülmüştür. Bunun nedeninin sulcus intertrochlearis üzerinde kayma hareketi gösteren patellanın kayma hareketi sırasında bölgede yeterli sıvının bulunmamasından dolayı viskosuplementasyonun yeterince sağlanamamış olması ve sürtünmenin fazla olmasından veya minimal invaziv cerrahi

prosedürlerin uygulanmamasından kaynaklanmış olabileceğini düşünmekteyiz. Bu nedenle ileride yapılacak çalışmalarda uygulanacak olan eklem içi sıvı enjeksiyonlarının farklı miktarlardaki etkilerinin ortaya konmasının veya minimal invaziv cerrahi girişimlere önem verilmesinin (artroskopik cerrahi) uygun olacağı kanısındayız.

Xia ve ark. (75) yaptıkları çalışmada ön çapraz bağı kesilmesiyle oluşturulmuş deneysel OA'lı tavşanlarda farklı tedavi sürelerindeki milimetrik dalga boylarında ışın uygulamasının sonuçlarını Mankin skorlaması ve immunohistokimyasal olarak kaspaz-3, kaspaz-8 ve MMP-13 kullanarak değerlendirmişler ve çapraz bağı kesilerek osteoartrit gelişen ve tedavi uygulanmayan model kontrol grupta kaspaz-3, kaspaz-8 ve MMP-13 boyanma yüzdelerinin çapraz bağı kesilmeyen normal kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek çıktığını göstermişlerdir.

Bu çalışmada kullandığımız immunohistokimyasal boyamalarda kaspaz-3, kaspaz-8 ve MMP-13 boyanma yüzdelerinde SAS ve HA grupları arasında OA'nın ilerlememesine bağlı olarak anlamlı bir fark bulunmazken bu iki gruba ileri derecede OA'nın bulunduğu kontrol grubu arasında önemli derecede fark bulunmuştur.

Sonuç olarak; günümüzde hem beşeri hemde veteriner pratikte OA tedavisinde yaygın olarak kullanılmakta olan eklem içi hiyaluronik asit uygulaması yaptığımız bu çalışmada da etkinliğini göstermiştir. Çalışmamızda yapılan radyolojik, histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemelerde ise hiyaluronik asit ve sığır amniyotik sıvısının eklem içi enjeksiyonlarının arasında anlamlı bir fark olmadığı ve sığır amniyotik sıvısının tavşanların diz eklemlerinde

herhangi bir alerjik reaksiyon oluşturmadığı görüldü. Bu sayede çalışmamızın asıl hedefi olan sığır amniyotik sıvısının eklem içi enjeksiyonunun OA tedavisinde kıkırdak koruyucu ilaçlara alternatif olabileceğı kanısına varıldı. Bununla birlikte ileri çalışmaların planlanması ile sığır amniyotik sıvısı veya diğeri amniyotik sıvıların farklı türlerdeki OA tedavisindeki etkilerinin araştırılmasının yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesi açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Freeman MAR. The Pathogenesis of Primary Osteoarthritis: An hypothesis. Modern Trends in Orthopaedics. London: Butterworths, 1972.
2. Sellam J, Herrero-Beaumont G, Berenbaum F. Osteoarthritis: Pathogenesis, clinical aspects and diagnosis. In: Bijlsma JWJ, Burmester GR, P de Silva JA, et al. (Editors). EULAR Compendium on Rheumatic Diseases. Italy: BMJ Publishing Group Ltd 2009: 444-463.
3. Bendele AM. Animal models of osteoarthritis. J Musculoskel Neuron Interact 2001; 1: 363-376.
4. Adams ME, Lussier AJ, Peyron JG. A risk-benefit assessment of injections of hyaluronan and its derivatives in the treatment of osteoarthritis of the knee. Drug Safety 2000; 23: 115-130.
5. Kılıç S, Karadaş E, İstek Ö, Timurkaan N. Comparison of the effectiveness of hyaluronic acid, prednisolone and doxycycline on the progression of the pond-nuki model of osteoarthritis in dogs. FÜ Sağ Bil Derg 2001;15: 387-396.
6. Özgenel GY, Gülaydan F, Özcan M. Effects of human amniotic fluid on cartilage regeneration from free perichondrial grafts in rabbits. Br J Plast Surg 2004; 57: 423-428.
7. Tirelioğlu O, Bilgen MS, Atıcı T, Yalçınkaya U, Bilgen ÖF. Tavşanda deneysel osteoartrit modelinde insan amniotik sıvısının eklem içi uygulamasının kıkırdak doku ve sinovya üzerindeki etkileri. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2007; 33: 121-125.
8. Baki ME. Kıkırdak İyileşmesinde Amniyon Sıvısı ile Yüksek Molekül Ağırlıklı Hiyaluronik Asitin Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, Trabzon: Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2008.
9. Dursun N. Veteriner Anatomi I. Arka Ekstremitte Eklemleri. 8. Baskı, Medisan Yayıncılık, Ankara 2002.
10. Tüzün Ş. Diz Ağrıları. In: Tüzün F, Eryavuz M. (Editors) Hareket Sistemi Hastlıkları. Akarırmak Ü, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul 2002; 279-288.
11. Akkuş Ö. Diz Osteoartritli Hastalarda Vizkosuplementasyon. Uzmanlık Tezi. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi. 2005.
12. Başar B. Diz Osteoartritli Hastalarda Fizik Tedavi Modaliteleri (Tens, Ultrason, Kısa Dalga Diatermi)'nin Fiziksel Fonksiyon Üzerine Olan Etkisi. Uzmanlık Tezi, İstanbul: Sağlık Bakanlığı İstanbul Fizik Tedavi Rehabilitasyon Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2009.
13. Clarke ED, Scott WD, Insall JN. Anatomy. In: Insall JN, Scott WD. (Editor). Surgery of The Knee. 3rd edition, Philadelphia: Churchill Livingstone, 2001: 1: 13-77.
14. Calmbach WL, Hutchens M. Evaluation of patients presenting with knee pain: Part I. History, physical examination, radiographs, and laboratory tests. Am Fam Physician 2003; 68: 907.
15. Çimen A. Anatomi. Bursa;Uludağ Üniversitesi Basımevi, 1994.

16. Popesko P. Evcil Hayvanların Topografik Anatomi Atlası. İstanbul Nobel Tıp Kitap Evleri. 2010.
17. Flo GL. Meniscal injuries. Vet Clin North Am Small Anim Pract 1993; 23: 831.
18. Ege R. Diz anatomisi. In: Ege R. (Editör). Diz sorunları. Ankara: Bizim Büro Basımevi 1998: 27-54.
19. Aydın AT. Diz eklemi anatomisi. In: Tandoğan RN, Alpaslan AM (Editörler). Diz cerrahisi. Ankara. Haberal Eğitim Vakfı. 1999: 5-19.
20. Kaplan-Machlis B, Klostermeyer BS. The cyclooxygenase -2 inhibitors: Safety and effectiveness. Ann Pharmacother 1999; 33: 979-988.
21. Sisk TD. Knee Injuries In: Crenshaw AH. (Editor). Campbells Operativ Orthopaedics. St. Louis: Mosby Year Book 1992: 1487-1732.
22. Tune N. Romatizmal Hastalıklar. 3.Baskı, Ankara: Hacetepe Taş Yayıncılık, 1994.
23. McCarty DJ. Arthritis and Allied Conditions. Philadelphia. Lea and Febiger, 1985.
24. Çaptuğ Ö. Köpeklerde Ön Çapraz Bağ Kopuklarının Sağaltımında Tuberositas Tibiae'yi Öne Taşıma Tekniğinin Klinik ve Radyolojik Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2009.
25. Brinker WO, Piermatte DL, Flo GL, et al. Orthopadie und Frakturbehandlung beim Kleintier. Stuttgart, New York: Schattauer 1993.
26. Köstekci M. Diz osteoartritin tedavisinde viskosuplementasyon rolü, Uzmanlık tezi, Ankara 2002.
27. Aslanbey D. Veteriner Ortopedi ve Travmatoloji Ders Kitabı. Ankara: Medisan Yayınevi, 1994.
28. Arnoczky PS. Patellar Tendon Graft for Cranial Cruciate Ligament Repair. In: BojrabMJ, Ellison GW, Slocum B. (Editors). Current Techniques in Small Animal Surgery: Knee. 4th edition, Baltimore: Williams & Wilkins, 1998; 1199-1202.
29. Bonath KH, Prieur WD. Kleintierkrankheiten Band 3, Orthopadische Chirurgie und Travmatologie Stuttgart: Ulmer 1998.
30. Crum JA, LaPrade RF, Wentorf FA. The anatomy of the posterolateral aspect of the rabbit knee. J. Of Orth. Res, 2003; 21: 723-729.
31. Soames RW. Gray's Anatomy. 38th edition, Churchill: Livingstone 1995; 484-500.
32. Tandoğan RN, Alpaslan M. Diz cerrahisi. Ankara: Haberal Eğitim Vakfı, 1999.
33. Dye SF, Vaupel GL. Functional anatomy of the knee. Bone geometry, static and dynamic restraints, sensory and motor innervation proprioception and neuromuscular control in joint stability. In: Lephard DM, Fu FH (Editors). Human Kinetics. California: San Francisco, 2000; 59-73.
34. Wilson SA, Vigorita VJ, Scott WN. Anatomy of the Knee. St. Louis: Mosby Years Book, 1994.
35. Williams PL, Warwick R. Arthrology Gray's Anatomy. Philadelphia: WB Saunders Co, 1986.

36. Yeşilyurt H. Primer Diz Osteoartritinde Ketoprofen Monoforezi ve Ultrason Tedavilerinin Klinik Etkilerinin Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi Edirne: Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı, 2008.
37. Akoğlu P. Eklernlerin Yapı ve Fonksiyonlan, Klinik Romatoloji. Ankara: Medikomat Basım Yay. San. 1996.
38. Sağlam M, Aştı RN, Özer A. Genel Histoloji. 6. Baskı, Yorum Matbaacılık, Ankara, 2001; 183-188.
39. Williams III RJ. Cartilage Repair Strategies. Humana Press Inc, New Jersey 2007; 1-12.
40. Browne JE, Branch TP. Surgical alternatives for treatment of articular cartilage lesions. J Am Acad Orthop Surg 2000; 8: 180-189.
41. Weinstein SL, Buckwalter JA. Turek's Orthopaedics Principles and Their Application. 6th edition, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2005.
42. Mollenhauer JA. Perspectives on articular cartilage biology and osteoarthritis. Injury 2008; 39: 5-12.
43. Tyyni A, Karlsson J. Biological treatment of joint cartilage damage. Scand J Med Sci Sports 2000; 10: 249-265.
44. Oğuz H. Romatizmal Ağnlar, Atlas kitabevi, Konya, 1992.
45. Yazıcı A. Köpeklerde Ön Çapraz Bağ Kopuklarının, Paatsama ve Modifiye Utrecht Tekniği ile Sagaltımlarının Klinik Sonuçlarının Değerlendirilmesi. Doktora Tezi Ankara: Ankara Üniversitesi Sağlık bilimleri Enstitüsü. 2002.
46. Dupuis J, Harari J. Cruciate ligament and meniscal injuries in dogs. Contin Educ Pract Vet 1993; 2: 215-230.
47. Burstein H, Wright A, Timothy M. Biomechanics. In: Insall JN. (Editor). Surgery of the Knee. 2nd edition, New York: Churchill Livingstone 1993; 43-54.
48. Heck DA, Murray DG. Biomechanics of the knee. In: Everts CM. (Editor). Surgery of the musculoskeletal system. 2nd edition, New York: Churchill Livingstone 1990; 3243-3251.
49. Samsar E, Akın F. Genel Cerrahi. Malatya: Medipres 2003.
50. Merkens HW, Van Dieten JSMM, Kersjes A. Infectious (septic) arthritis of the distal intertarsal and tarsometatarsal joint in cattle. Vet Rec 1984; 114: 212-213.
51. Nesbitt GH, Lewis RE. Lameness in cattle: A survey of 102 cases including history, clinical and radiographic findings, prognosis and treatment. Bovine Pract 1975; 10: 39-49.
52. Sarierler M, Alkan Z. Artritli sığırlarda klinik, radyolojik ve artroskopik bulguların karşılaştırılması. Vet Cer Derg 2002; 8: 41-47.
53. Bennett D. Immune based erosive inflammatory joint disease of the dog. Canine rheumatoid arthritis 1. Clinical radiological and laboratory investigation. J Small Anim Prac 1987; 28: 779-798.
54. Bennett D. Immune based erosive inflammatory joint disease of the dog. Canine rheumatoid arthritis 2. Pathological investigation. J Small Anim Prac 1987; 28: 799-820.

55. Bennett D, Taylor DJ. Bacterial infective arthritis in the dog. *J Small Anim Prac* 1988; 29: 207-230.
56. Arıcan M. Bone and Cartilage Metabolism in Canine Arthropathies, University of Liverpool, 1995; 1-23.
57. Arıcan M, Çalım KN. Köpek artritlerinin oluşumunda enzimlerin rolü ve sağaltımına yeni bir bakış: I. *Vet Bil Derg* 2004; 71-76.
58. Fessler JF. Degenerative joint disease (Osteoarthritis). *The Practice of Large Animal* 1984; 2: 715-763.
59. Bennet D, Tennant B, Lewis DG. A reappraisal of anterior cruciate ligament disease in the dog, *J Smail Anim Prac* 1981; 29: 275-297.
60. Bennet D, May C. Joint diseases of dogs and cats. In: Etlinger SJ, Feldman EC. (Editors). *Textbook of Veterinary Intemal Medicine*. 4th edition, Philedelphia: Saunders WB Company, 1995: 2032-2072.
61. Arıcan M, Yavru N. Köpeklerdeki eklem hastalıklarının teşhisinde kullanılan biyokimyasal, immunolojik ve enzim parametreleri. *Vet Cer Derg* 1997; 3: 54-57.
62. Arıcan M. Köpeklerin dejeneratif eklem hastalıklarında (osteoarthritis) güncel teşhis ve tedavi yöntemleri. *Türkiye Klinikleri Veteriner Bilimleri* 2014; 5: 1-8.
63. Schulz K. Diseases of the Joint. In: Fossum TW. (Editor). *Small Animal Surgery Textbook*. 3rd edition, St. Louis Missouri: Mosby Elsevier 2007.
64. Jouzeau JY, Gillet P, Netter P. Interest of animal models in preclinical screening of anti-osteoarthritic drugs. *Joint Bone Spine* 2000; 67: 565-569.
65. Milli ÜH, Haziöglu R. Kemik, Eklem, Kas, Tendo ve Aponözozlar. *Veteriner Patoloji I*. Ankara: Tamer Matbaacılık 1997.
66. Garvican ER, Vaughan- Thomas A, Innes JF, Cleeg PD. Biomarkers of cartilage turnover. Part 1: Markers of kollagen degradation and synthesis. *Vet J* 2010; 185: 36-42.
67. Innes F. Arthritis. In: Tobias KM, Spencer A, Johnston SA. (Editors). *Veterinary Surgery: Small Animal*. 1st edition, St Louis: Elsevier Saunders 2012; 1078-1111.
68. Tamura T, Shirai T, Kosaka N, Ohmori K, Takafumi N. Pharmacological Studies of diacerein in animal models of inflammation, arthritis and bone resorption. *Euro J Pharmacol* 2002; 448: 81-87.
69. Brandt KD, Mankin HJ. Osteoarthritis and Polycondritis In: Kelly WN, Harris ED, Ruddy S, Sledge CB. *Edit Textbook of Rheumatology 4th Edition*, WB Saundres Company, Philadelphia 1993; 1355-1373.
70. Atay BM. Osteoartrit. In: Beyzaova M. (Editör). *Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon*. Ankara: Güneş Kitabevi, 2000.
71. Mankin HJ, Brandt KD. Biochemistry and Articular Cartilage in osteoarthritis. In; Moskowitz RW, Howel DS, Goldberg VM, Mankin HJ. (Editors). *Osteoarthritis*. USA: W.B. Saunders Company, 1992: 109-154.

72. Mankin HJ, Brandt KD. Osteoarthritis and Polycondritis (pathogenesis of osteoarthritis) In: Kelly WN, Harris ED, Ruddy S, Sledge CB. (Editors) Textbook of Rheumatology. 4th Edition, Philadelphia: WB Saunders Company, 1989: 1469-1479.
73. Altman R, Asch E, Bloch D. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism* 1986; 29: 1039-1049.
74. Aurbery J. Pathology of Osteoarthritis. In: Koopman WJ. (Editor) *Arthritis and Allied Conditions. Textbook of Rheumatology*. 14 th.ed. Philadelphia, 2001; 2167-2194.
75. Xia L, Luo QL, Lin HD, et al. The effect of different treatment time of millimeter wave on chondrocyte apoptosis, caspase- 3, caspase- 8 and MMP- 13 expression in rabbit surgically induced model of knee osteoarthritis. *Rheumatol Int* 2012; 32: 2847-2856.
76. Moreland LW. Intraarticular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: Mechanisms of action. *Arthritis Res Ther* 2003; 5: 54-67.
77. Önel D. Osteoartroz Romatizmal Hastalıklar. 2. baskı, İstanbul: Atlas Ofset Matb, 1987.
78. Karaarslan Y. Osteoartrit, Klinik Romatoloji. Ankara: Medikomat Basım Yay San, 1996.
79. Spector TD, Hart DJ. Radiological evaluation of osteoarthritis. *Rev Prat*. 1996; 1: 15-21.
80. Bilgili H, Orhun S. Tavşan Diz Eklemine Oluşturulan Deneysel Osteoarthritis’de Eklem Dokularında Gelişen Değişikliklerin Radyolojik ve Histolojik Olarak Araştırılması. *Vet Cer Derg*. 2012; 8: 8-12.
81. Arıcan M, Coughlan AR, Clegg PD, Carter SD. Matrix Metalloproteinases 2 and 9 in bovine synovial fluids. *J Vet Med A* 2000; 47: 449-456.
82. Hongbin W, Jingyuan D, Qixin Z. Expression of MMP-1 in cartilage and and synovium of experimentally induced rabbit ACLT traumatic osteoarthritis: Immunohistochemical study. *Rheumatol Int* 2008; 29: 31-36.
83. Barr FJ, Kirberger RM. BSAVA Manual of Canine and Feline Musculoskeletal Imaging. 1st edition, Gloucester: British Small Animal Veterinary Association, 2006.
84. Mobasheri A, Henrotin Y. Identification, validation and qualification of biomarkers for osteoarthritis in humans and companion animals: Mission for the next decade. *Vet J* 2010; 185: 95-97.
85. Kwon DR, Park GY. Intra-articular injections for the treatment of osteoarthritis: focus on the clinical use of several regimens. In: Chen Q. (Editor). *Osteoarthritis Diagnosis, Treatment and Surgery*. Chapter 4. Open Access Book. Shanghai. 2012; 67-100.
86. Atilla B. “Osteoartrit ve Non-inflamatuvar artritler”.<http://www.aile.net/agep/klinik/osteoartrit/osteoartrit.pdf> /05.12.2014
87. Rychel JK. Diagnosis and treatment of osteoarthritis. *Topics in Companion Animal Medicine*. 2010; 25: 20-25.
88. Akinbo S, Owoeye O, Adesegun S. Comparison of the therapeutic efficacy of diclofenac sodium and methyl salicylate phonophoresis in the management of knee osteoarthritis. *Turk J Rheumatol* 2011; 26: 111-119.

89. Zhang W, Jones A, Doherty M. Does paracetamol (acetaminophen) reduce the pain of osteoarthritis? A meta-analysis of randomised controlled studies. *Ann Rheum Dis*. 2004; 63: 901-907.
90. Jordan KM, Arden NK, Doherty M, et al. An evidence based approach to 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* 2003; 62:1145-1155.
91. Lamont A, Mathews A. Opioids, nonsteroidal anti-inflammatories and analgesic adjuvants. In: Tranquilli WJ, Thurmon JC, Grimm KA. (editors). *Lumb Jones Veterinary Anesthesia and Analgesia*. 4th ed. Blackwell Publishing. Ames, Iowa: 2007; 241-272.
92. Plumb DC. *Plumb's Veterinary Drug Handbook*. 7th edition, Pharmavet Inc. Stockhol, Wis. Iwoa: Wiley- Blackwell 2011; 1-1584.
93. Oğuz H. Romatizmal hastalıkların rehabilitasyonu. *Tıbbi Rehab*. 4. Baskı. Oğuz, Nobel Tıp Kitabevleri Konya 1995.
94. Taylor M. Joint Disorders. In: Couto NW. (Editor) *Small Animal Internal Medicine*. 4th Edition. St. Louis: Mosby Elsevier. 2007; 1119-1142.
95. Budsberg SC, Bartges JW. Nutrition and osteoarthritis in dogs: does it Help? *Vet Clin Small Anim* 2006; 36: 1307-1323.
96. Johnston SA, McLaughlin RM, Budsbers SC. Nonsurgical management of osteoarthritis in dogs. *Vet Clin Small Anim* 2008; 38: 1449-1470.
97. Aragon CL, Hofmeister EH, Budsberg SC. Systematic review of clinical trials of treatments for osteoarthritis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2007; 230: 514-521.
98. Kawcak CE, Frisbie DD, McIlwraith CW, et al. Evaluation of avocado and soybean unsaponifiable extracts for treatment of horses with experimentally induced osteoarthritis. *Am J Vet Res* 2007; 68: 598-604.
99. Altinel L, Saritas ZK, Kose KC, et al. Treatment with unsaponifiable extracts of avocado and soybean increases TGF-1 and TGF-2 levels in canine joint fluid. *Tohoku J Exp Med* 2007; 211: 181-186.
100. Boileau C, Martel-Pelletier J, Caron J, et al. Protective effects of total fraction of avocado/soybean unsaponifiables on the structural changes in experimental dog osteoarthritis: inhibition of nitric oxide synthase and matrix metalloproteinase-13. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: 1-9.
101. Millis DL. Physical therapy and rehabilitation in dogs. In: Gaynor JS, Muir WW. (editors): *Handbook of Veterinary Pain Management*. 2nd edition. St Louis, Mosby Elsevier 2009; 507-537.
102. Hegedus B, Viharos L, Gervain M, et al. The effect of low-level laser in knee osteoarthritis: A double-blind, randomized, placebo- controlled trial. *Photomed Laser Surg* 2009; 27: 577-584.

103. Cantwell SL. The Mechanism and Management of Acupuncture for Chronic Pain. Published by Elsevier Inc 2010; 53-57.
104. Tangjitjaroen W, Shmalberg J, Colahan PT, Xie H. Equine acupuncture research: An Update. *Journal of Equine Veterinary Science*. Published by Elsevier Inc. 2009; 29: 698-707.
105. Mathews KA. Neuropathic pain in dogs and cats: if only they could tell us if they hurt. *Vet Clin Small Anim* 2008; 38: 1365-1414.
106. Henrotin Y, Sanchez C, Balligand M. Pharmaceutical and nutraceutical management of canine osteoarthritis: Present and future perspectives. *Vet J* 2005; 170(1): 113-123.
107. Piirainen K. Intra-articular injections in The Management of Canine Osteoarthritis. Licentiate Thesis. University of Helsinki; 2013; 1-63.
108. Caron JP. Intra-articular injections for joint disease in horses. *Veterinary clinics of North America Equine Practice Elsevier*, 2005; 559-573.
109. Edwards SHR. Intra-articular drug delivery: The challenge to extend drug residence time within the joint. *Vet J* 2011; 190: 15-21.
110. Lavelle W, Lavelle DE, Lavelle L. Intra-articular injections. *Anesthesiology Clinics* 2007; 25: 853-862.
111. Kon E, Buda R, Filardo G, et al. Platelet-rich plasma intra-articular knee injections for the treatment of degenerative cartilage lesions and osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2011, 19:528–535
112. Dıraçoğlu D. Osteoartritte intra-artiküler hyalüronik asit tedavisi. *Türk Fiz Tıp Rehab Derg* 2007; 53: 154-159.
113. Bannuru R, Natov S, Obadan E, et al. Therapeutic Trajectory of Hyaluronic acid versus corticosteroids in the treatment of knee osteoarthritis: Systematic review and meta-analysis. *Arthritis Rheumatism (Arthritis Care and Research)* 2009; 61: 1704-1711.
114. Neustadt DH. Intra-Articular injections for osteoarthritis of the knee. *Cleve Clin J Med* 2006; 73: 897-898.
115. Evanich JD, Evanich CJ, Wright MB, Rydlewicz JA. Efficacy of intraarticular hyaluronic acid injections in knee osteoarthritis. *Clin Orthop* 2001; 390: 173-181.
116. Balazs EA, Denlinger JL. Viscosupplementation: A new concept in the treatment of osteoarthritis. *J Rheumatol* 1993; 20: 4-9.
117. Larsen C, Ostergaard J, Larsen W, et al. Intra-articular depot formulation principles: Role in the management of postoperative pain and arthritic disorders. *Journal of pharmaceutical sciences* 2008; 97: 4622- 4654.
118. Pozo MA, Balazs EA, Belmonte C. Reduction of sensory responses to passive movements of inflamed knee joints by hyalan, a hyaluronan derivative. *Exp Brain Res* 1997; 116: 3-9.
119. Takahashi K, Goomer RS, Harwood F, et al. 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; 7: 182-190.
120. Kelly MA, Kurzweil PR, Moskowitz RW. Intra-articular hyaluronans in knee osteoarthritis: rationale and practical considerations. *Am J Orthop* 2004; 33: 15-22.
 121. Dougados M, Nguyen M, Listrat V, Amor B. High molecular weight sodium hyaluronate (hyalectin) in osteoarthritis of the knee: A 1-year placebo-controlled trial. *Osteoarthritis Cartilage* 1993; 1: 97-103.
 122. Asari A, Miyauchi S, Matsuzaka S, et al. Molecular weight-dependent effects of hyaluronate on the arthritic synovium. *Arch Histol Cytol* 1998; 61: 125-135.
 123. Goldberg VM, Buckwalter JA. Hyaluronans in the treatment of osteoarthritis of the knee: Evidence for disease-modifying activity. *Osteoarthritis Cartilage* 2005; 13: 216-224.
 124. Aggarwal A, Sempowski IP. Hyaluronic acid injections for knee osteoarthritis. Systematic review of the literature. *Can Fam Physician* 2004; 50: 249-256.
 125. Gerald NS, Stephen LM, Kenneth DB, Elizabeth AM. Effect of intraarticular hyaluronan injection in experimental canine osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism* 1998; 41: 976-984.
 126. Colen S, van den Bekerom J, Bellemans J, Mulier M. Comparison of intraarticular injections of hyaluronic acid and corticosteroid in the treatment of osteoarthritis of the hip in comparison with intra-articular injections of bupivacaine. Design of prospective, randomized, controlled study with blinding of the patients and outcome assessors. *BMC Musculoskeletal disorders* 2010; 11: 264.
 127. Hulmes DJS, Marsden ME, Strachan RK, et al. Intra-articular hyaluronate in experimental rabbit osteoarthritis can prevent changes in cartilage proteoglycan content. *Osteo Arthritis and Cartilage* 2004; 12: 232-238.
 128. Uğur M, Tuğuş A, Melikoğlu Alkan M, Yıldırım K, Şenel K. Diz dejeneratif osteoartritli hastalarda intraartiküler hiyaluronik asit ile intraartiküler metil prednizolon asetatın etkinliklerinin karşılaştırılması. *The Eurasian Journal of Medicine* 2007;39: 185-188.
 129. Borrás-Verdera A, Calcedo-Bernal V, Ojeda-Levenfeld J, Clavel-Sainz C. Efficacy and safety of a single intra-articular injection of 2% hyaluronic acid plus mannitol injection in knee osteoarthritis over a 6-month period. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol* 2013; 56: 274-280.
 130. Eravcı E, Erdikmen OD. Ortopedide plateletten zengin plazma uygulamaları. *Türkiye Klinikleri Dergisi* 2014; 5: 81-84.
 131. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2004; 91: 4-15.
 132. Baltzer AW, Moser C, Jansen SA, Krauspe R. Autologous conditioned serum (Orthokine) is an effective treatment for knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2009; 17: 152-160.

133. Textor J. Autologous biologic treatment for equine musculoskeletal injuries: Platelet rich plasma and IL- 1 receptor antagonist protein. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2011; 27: 275-298.
134. Fox BA, Stephens MM. Treatment of knee osteoarthritis with Orthokine-derived autologous conditioned serum. *Expert Rev Clin Immunol* 2010; 6: 335-345.
135. Rutgers M, Saris DB, Dhert WJ, Creemers LB. Cytokine profile of autologous conditioned serum for treatment of osteoarthritis, in vitro effects on cartilage metabolism and intra-articular levels after injection. *Arthritis Res Ther.* 2010; 12:114.
136. Özen A, Gül Sancak İ. Mezenkimal kök hücreler ve veteriner hekimlikte kullanımı. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 2014; 61: 79-84.
137. Andrades JA, Claros S, Palomo PJ, et al. Skeletal Regeneration by MesenchymalStem Cells: What Else? *Regenerative Medicine and TissueEngineering - Cells and Biomaterials* 2011; 5: 107-144.
138. Black LL, Gaynor J, Adams C, et al. Effect of intraarticular injection of autologous adipoz-derived mesenchymal stem and regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of the elbow joint in dogs. *Vet Ther* 2008; 9: 192-200.
139. Sadler TW. *Langman's Medikal Embriyoloji.* Ankara, Palme yayıncılık, 1993.
140. Dasari G, Prince I, Hearn MTW. Investigations into the rheological characteristics of bovine amniotic fluid. *J Biochem Biophys Methods* 1995; 30: 217-225.
141. Ravelich SR, Breier BH, Reddy S, et al. Insulin-like growth factor-ı and binding proteins 1, 2, and 3 in bovine nuclear transfer pregnancies. *Biology of Reproduction* 2004; 70: 430-438.
142. Longaker M, Adzick NS, 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* 1990; 25: 430-433.
143. Decker M, Chiu E, Moiin A, et al. A hyaluronic acid stimulating factor from the bovine fetus and from breast cancer patients. *Cancer Res* 1989; 49: 3499-3505.
144. Bunning RAD, Murphy G, Kumar S, Phillips P, Reynolds JJ. Metalloproteinase inhibitors from bovine cartilage and body fluids. *Eur J Biochem* 1984; 139: 75-80.
145. Moskovitz RW, Davis W, Sammarco J, et al. Experimentally induced degenerative joint lesions following partial meniscectomy in the rabbit. *Arthritis & Rheumatism* 1973; 16: 397-405.
146. Smith MM, Little CB, Rodgers K, Ghosh P. Animal models used to evaluate antiosteoarthritis drugs. *Pathol Biol* 1997; 45(4): 313-320.
147. Aktaş E. Deneysel diz osteoartrit modelinde simvastatinin matriksmetalloproteinaz inhibisyonu üzerinden kondroprotektif etkisi. *Uzmanlık Tezi Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.* Ankara 1998.
148. Williams JM, Felton DL, Peterson RG, O'Connor BL. Effects of surgically induced instability on rat knee articular cartilage. *J Anat* 1982; 134: 103-109.

149. Tadashi H, Maureen P, Ya Z, et al. Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. *Bone* 2006; 38: 234–243.
150. Er EM, Herzog W, Leonard TR, Stano A, Nguyen H. In vivo knee joint loading and kinematics before and after ACL transection in an animal model. *J Biomech* 1998; 31: 253-262.
151. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1957; 16: 494-502.
152. Köseoğlu HK, Özdemir BÖ. Osteoartritte radyolojik değerlendirme. *RAED dergisi* 2011; 3: 43-48.
153. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg* 1971; 53:523-7.
154. Tunay S, Bilgili H, Yıldız C, Yanmış İ, Solakoğlu C, Gür E. Deneysel osteoarthritis'in sağaltımında intraartiküler hyaluronik asit kullanımı: Tavşan diz ekleminde radyolojik ve histopatolojik çalışma. *Turk J Vet Anim Sci* 2002; 26: 939-947.
155. Bilgili H, Yıldız C, Kürüm B. ve ark. Repair of osteochondral defects with autologous chondrocyte implantation: Clinical study on the stifle joint of 9 dogs Ankara Üniv Vet Fak Derg 2006, 53: 103-109.

8. ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Elazığ/Baskil’de doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Bartın, Diyarbakır ve Elazığ’da tamamladım. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nde ki eğitimime 2001 yılında başlayıp 2006 yılında mezun oldum. 2006-2007 yıllarında askerlik görevimi icra ettim. 2009 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı’nda Araştırma görevlisi olarak görevime başladım. 2010 yılında aynı anabilim dalında doktora eğitimime başladım. Evli ve bir erkek çocuk babasıyım.