



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

**DEJENERATİF OSTEOARTRİTTE POLİFENOL
BİLEŞENLERİN İNTRAATİKÜLER UYGULANMASININ
KIKIRDAK ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİ GROSS
MORFOLOJİK, RADYOLOJİK VE HİSTOLOJİK OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ: TAVŞAN MODELİ**

DR. AHMAD SEEYAR PAMİRY

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Öğr. Üyesi Dr. Mustafa TEKİN

ADANA/2022

TEŞEKKÜR

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı'nda birlikte çalışma ve eğitim fırsatı bulduğum, uzmanlık eğitimim süresince bilgi, beceri, tecrübe, sabır ve hoşgörülerini esirgemeyen, yetişmemde büyük katkılarını gördüğüm değerli hocalarım; Prof. Dr. İsmet TAN, Prof. Dr. Serdar ÖZBARLAS, Prof. Dr. Cenk ÖZKAN, Doç. Dr. Ömer Sunkar BİÇER, Doç. Dr. Mehmet Ali DEVECİ, Dr. Öğr. Üyesi Mustafa TEKİN, Dr. Öğr. Üyesi Melih BAĞIR, Öğr. Gör. Dr. Akif MİRİOĞLU ve Öğr. Gör. Dr. Buğra KUNDAKÇI'ya ve çalışmamızdaki çok değerli katkılarından dolayı Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyoloji Anabilim Dalı'ndan Öğr. Gör. Dr. Sevgül Köse'ye, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı'ndan Öğr. Gör. Dr. Leman SANCAR'a ve Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Salih BEYAZ'a çok teşekkür ederim.

Asistanlık yıllarım boyunca isimlerini buraya yazmakla bitiremeyeceğim, birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk duyduğum tüm hekim arkadaşlarıma, bana her zaman sevgi ve saygı göstermiş, yardımcı olmuş servis ve ameliyathanemizin tüm hemşire, personel ve sekreterlerine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan, bana koşulsuz ve şartsız ellerinden gelebileceğinin çok daha fazlasını sunan, haklarını hiçbir şekilde ödeyemeyeceğim canım anneme ve babama sonsuz saygı ve sevgimle teşekkür ederim.

Son olarak asistanlık hayatımın zorlu süreci boyunca ve bu tezin yazılma süresince bana büyük bir sabır göstermiş, sevgisini ve desteğini her zaman hissettiğim gözlerimin ferî biricik eşim Selda PAMİRY'a ve varlığı ile beni neşelendiren sevgili oğlum Mustafa PAMİRY'a en derin sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Ahmad Seeyar PAMİRY

ADANA-2022

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
TABLO LİSTESİ	IV
ŞEKİL LİSTESİ	V
ÖZET	IX
ABSTRACT	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Eklem kıkırdığı	3
2.1.1. Kıkırdak tipleri	3
2.1.1.1. Elastik kıkırdak	3
2.1.1.2. Fibröz kıkırdak	3
2.1.1.3. Hiyalin kıkırdak	3
2.1.2. Eklem kıkırdak yapısı	4
2.1.2.1. Yüzeyel tabaka	5
2.1.2.2. Orta tabaka	6
2.1.2.3. Derin tabaka	6
2.1.1.4. Kalsifiye tabaka.....	6
2.2. Kondrosit ve özellikleri	6
2.3. Eklem kıkırdığının Ekstrasellüler Matriksi.....	7
2.4. Eklem kıkırdığının Kollajen yapısı	7
2.5. Eklem kıkırdığının proteoglikan yapısı	7
2.6. Osteoartrit.....	8
2.6.1 Osteoartrit etiyopatofizyolojisi	8
2.6.2. Metabolik ve yapısal değişikliği.....	10
2.6.3. OA Risk faktörleri	11
2.6.4. Kellgren Lawrence Sınıflandırma Sistemi	11
2.6.5. Tedavi	12
2.7. Polifenol ve Oleocanthal(OC)	13
2.8. Dejeneratif OA deneysel çalışma hayvan modelleri	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	15
3.1. Çalışma planı ve Deneklerin hazırlanması	15

3.2. Uygulanan cerrahi işlemler ve Teknik.....	16
3.3. Cerrahi Sonrası Takip	16
3.4. Deneklerin Sakrifikasyon ve Materyallerin Hazırlanması	17
3.5. Ölçümlerin değerlendirilmesi	24
3.5.1. Gross morfolojik değerlendirilmesi.....	24
3.5.2. Radyolojik değerlendirilmesi	28
3.5.3. Histolojik Değerlendirilmesi	37
3.6. Çalışma İstatistik Metodu	40
4. BULGULAR	41
4.1. Çalışmanın Gross Morfolojik Sonuçları.....	41
4.2. Çalışmanın MRG Evrelemesi Sonuçları.....	43
4.3. Çalışmanın Histolojik Sonuçları.....	46
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	61
KAYNAKLAR.....	62

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Grupların dağılımı	16
Tablo 2. Morfolojik Modifiye Collin's Skalası ⁷¹	24
Tablo 3. Dipaola ve arkadaşlarının osteokondral lezyon MRG sınıflaması ⁷²	28
Tablo 4. Işık mikroskopik doku takip işlemi	37
Tablo 5. Mankin skorlaması ⁷⁴	39
Tablo 6. Kısa vadeli grupların Gross Morfolojik Sonuçları	42
Tablo 7. Uzun vadeli grupların Gross Morfolojik Sonuçları.....	43
Tablo 8. Gross Morfolojik Sonuçların istatistiksel analiziHata! Yer işareti tanımlanmamış.	
Tablo 9. MRG Evrelemesi İstatistiksel Sonuçları	43
Tablo 10. Çalışmanın Kısa Vadeli Grubu MRG Sonuçları.....	44
Tablo 11. Çalışmanın Uzun Vadeli Grubu MRG Sonuçları	45
Tablo 12. Histolojik değerlerin Mankin Skorlama Sonuçları.....	50
Tablo 13. Mankin skorlama OA şiddeti derecesi Sonuçları.....	51
Tablo 14. Histolojik değerlendirmesinin İstatistiksel Sonuçları	52
Tablo 14. Histolojik OA Şiddeti istatistik analizi	52

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Hiyalin kıkırdak yapısı ^{13,42}	4
Şekil 2. Eklem kıkırdağı tabakaları ^{13,42}	5
Şekil 3. OA patofizyolojisi mekanizması şeması ³²	9
Şekil 4. Kellgren ve Lawrence sınıflaması şeması ⁴⁸	12
Şekil 5. Oleocanthal kimyasal yapısı şeması ⁶⁶	14
Şekil 6. Cerrahi alanın tıraşlanmış hali ok ile gösterilmiş	18
Şekil 7. Supin pozisyonda, cerrahi saha temizliği ve steril örtüsü	19
Şekil 8. Artrotomi sonrası sağlam ÖÇB ok ile gösterilmiştir	19
Şekil 9. Kesilmiş ÖÇB ok ile gösterilmiş	20
Şekil 10. İnsizyon sahasına 0.2 cc Polifenolden zengin sızma zeytinyağı uygulaması.....	20
Şekil 11. Cilt altının primer sütürasyonu	21
Şekil 12. Cildin primer sütürasyonu	21
Şekil 13. İşlem sonrası yara bakımı	23
Şekil 14. Cerrahi sonrası komplikasyonsuz yara yeri iyileşmesi	22
Şekil 15. 6 nolu tavşan rakamının yenilenmesi, kulağın her iki tarafı işaretlenmiştir	22
Şekil 16. İnkübasyonun 5. gününde üremenin olmadığı kültür çalışması	23
Şekil 17. Eski insizyon üzerinden artrotomi insizyonu	25
Şekil 18. Spesmenin yumuşak dokulardan temizleme aşaması.....	25
Şekil 19. Gross morfolojik Evre 1 spesmen örneği.....	26
Şekil 20. Gross morfolojik Evre 2 spesmen örneği.....	26
Şekil 21. Gross morfolojik Evre 3 spesmen örneği.....	27
Şekil 22. Gross morfolojik Evre 4 spesmen örneği her iki femural kondil tama yakın destrükte	27
Şekil 23. Polifenol grubu kısa vadeli cerrahi öncesi sağ diz eklemi A:Sagittal ve B: Koronal MRG görüntüsü	29
Şekil 24. Polifenol grubu kısa vadeli cerrahi sonrası 5. haftada sağ diz eklemi C: Koronal ve D: Sagittal MRG görüntüsü. Kıkırdak devamlılığında belirgin kırılma izlenmemektedir	30
Şekil 25. Polifenol grubu uzun vadeli cerrahi öncesi sağ diz eklemi	31
E: Kronal ve F: sagittal MRG görüntüsü. Normal sınırlarda MRG tetkiki	31
Şekil 26. Polifenol uzun vadeli grubu cerrahi sonrası 10. haftada sağ diz eklem G: Koronal ve H: Sagittal plan MRG görüntüsü. Eklem kıkırdağının bütünlüğü korunmuş yer yer kıkırdak fibrilasyonunu andıran bulgular izlenmektedir. Sagittal planda lateral kondilde normal kıkırdak devamlılığı izlenmektedir	32
Şekil 27. Kontrol grubu kısa vadeli cerrahi öncesi 5. haftada sol diz eklemi İ: koronal ve J: koronal planda normal sınırlarda MRG görüntüsü. Eklem kıkırdağı normal izlenmektedir.	33
Şekil 28. Kontrol grubu kısa vadeli grubu cerrahi sonrası 5. haftada sol diz eklemi	34
K: Koronal ve L: Sagittal planda MRG görüntüsü. Eklem kıkırdağının bütünlüğü belirgin şekilde bozulmuş olup kıkırdak devamlılığında kırılma ve fibrilasyonunu bulgular izlenmektedir	34
Şekil 29. Kontrol grubu uzun vadeli cerrahi öncesi 10. haftada sol diz eklemi.....	35
M: koronal ve N: sagittal planda normal sınırlarda MRG görüntüsü. Eklem kıkırdağı normal izlenmektedir.	35

- Şekil 30. Kontrol grubu uzun vadeli grubu cerrahi sonrası 10. haftada sol diz eklemi**
O: Koronal ve P: Sagittal plan MRG görüntüsü. Eklem kıkırdağının bütünlüğü
belirgin şekilde bozulmuş olup kıkırdak devamlılığında kırılma ve serbest
fragman bulguları izlenmektedir..... 36
- Şekil 31. Osteoartrit oluşturulan ve herhangi bir tedavi uygulanmayan deney kontrol**
grubuna ait (a,b) hematoksilen-eozin (H&E) ile boyanan eklem kıkırdağı
kesitlerinin ışık mikroskopik görüntüsü. (a) Osteoartrite bağlı olarak, eklem
kıkırdağının superfisyal tabakasında bozulma ve sınırlı yüzeyel erozyon (ok),
(b) superfisyal zonda fokal fibrilasyon (*) izlenmektedir. Osteoartrit oluşturulan
ve polifenol tedavisi uygulanan tedavi grubuna ait (c,d) hematoksilen-eozin
(H&E) ile boyanan eklem kıkırdağı kesitlerinin ışık mikroskopik görüntüsü. (c)
Tedavi ile birlikte tidemark zonunda belirginleşme (ok) (d) kondrositlerin
kompanseasyona gösterdikleri direnç klon (izogen grup) formasyonu (ok)
oluşturmalarıdır. 47
- Şekil 32. Alcian blue/PAS ile boyanan eklem kıkırdağı kesitlerinin ışık mikroskopik**
görüntüsü. Alcian mavisi kartilajinöz dokuya özgüdür, koyu pembe periyodik
asit Schiff boyaması ise subkondral kemiği gösterir. Osteoartrit oluşturulan ve
herhangi bir tedavi uygulanmayan deney kontrol grubuna ait (a,b) eklem
kıkırdağında sınırlı alanda mavi ile boyanmış yeni kıkırdak dokusu
izlenmektedir. Bar: 200µm. Osteoartrit oluşturulan ve polifenol tedavisi
uygulanan tedavi grubuna ait (c,d) eklem kıkırdağında, tedaviye bağlı olarak
mavi ile boyanan yeni oluşmuş kıkırdak dokunun artışı görülmektedir. Bar:
200µm. 49
- Şekil 33. Histolojik toplam puan değerlendirilmesinde Polifenol grubu hem kısa vadede**
(5 hafta) hem de uzun vadede kontrol grubuna göre daha düşük puan almıştır.
..... 53

KISALTMALAR LİSTESİ

ACL	: Anterior Cruciate Ligament
ADAMTS	: A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs
ark.	: Arkadaşları
BMP	: Bone Morphogenetic Protein
cm	: Santimetre
COX	: Siklooksijenaz
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
ESM	: Ekstraselüler Matriks
GAG	:Glikozaminoglikan
gr	: Gram
H&E	: Hemtatoxilen ve Eosin
HA	: Hyaluronik Asit
HHGS	: Histological-Histochemical Grading System
HT	: Hidroksi Tirosol
IGF	: İnsülin Büyüme Fakörü
IL	: İnterlökin
İM	: İntramusküler
kg	: Kilogram
MAPKs	: Mitogen-Activated Protein Kinases
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
NF-κB	: Nuclear Factor Kappa B
NO	: Nitrik Oksit
NSAID	: Non-Steroid Anti-Inflammatuar Drug
OA	: Osteoartrit
OACH	: Osteoarthritis Cartilage Histopathology
OC	: Oleocanthol
ÖÇB	: Ön Çapraz Bağ
P	: Poliphenol

Post op	: Ameliyat Sonrası
PRP	: Platelet Rich Plasma
RA	: Romatoid Artrit
SABİDAM	: Sağlık Bilimleri Deneysel ve Araştırma Merkezi
SF	: Serum Fizyolojik
TGF-β	: Transforming Growth Factor Beta
TNF-alpha	: Tumour Necrosis Factor alpha



ÖZET

Dejeneratif Osteoartritte Polifenol Bileşenlerin İntraartiküler Uygulaması ile Sonuçların Gross Morfolojik, Radyolojik ve Histolojik Olarak Değerlendirilmesi: Tavşan Modeli

Amaç: Sızma zeytinyağında bulunan Polifenol bileşenlerinin osteoartrit oluşumunu azaltabileceği ve kondroprotektif özellikte olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada deneysel osteoartrit oluşturulmuş olan tavşanlara intraartiküler uygulamasıyla Polifenolden zengin sızma zeytinyağının osteoartrit tedavisindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda her grupta 8 tavşan olmak üzere toplam 32 Yeni Zelanda beyaz ırkı tavşan kullanıldı. İlk önce rastgele olarak iki ana grup şeklinde 16 tavşanın sağ diz diğer 16 tavşanın ise sol diz MRG'ı çekildi. Tüm tavşanların ön çapraz bağları kesilerek sağ diz MRG'ı çekilen tavşanlara insizyon hattından 0.2 ml Polifenolden zengin sızma zeytinyağı, sol diz MRG'ı çekilen tavşanlara ise 0.2 ml serum fizyolojik uygulandı ve serbest dolaşıma bırakıldı. 5. haftanın sonunda her iki gruptan rastgele 8'er adet tavşan seçilerek kısa vadeli alt grup olarak MRG'ları çekildi daha sonra sakrifiye edildi. 2. haftanın sonunda polifenol uygulanan tavşan grubuna ikinci doz 0.2 ml polifenolden zengin sızma zeytinyağı uygulandı ve kontrol grubunun tavşanlarına ek tedavi verilmedi. 10. haftanın sonunda uzun vadeli grupların MRG'ı çekildi ve sakrifiye edildi. Sakrifikasyonlar sonucu elde edilen spesmenler gross morfolojik, radyolojik ve Mankin sınıflaması kullanılarak histolojik değerlendirilmesi yapıldı.

Bulgular: Oluşturulmuş olan osteoartritte kısa (5 hafta) ve uzun (10 hafta) vadede polifenol uygulanması sonrası ve kontrol grubu sonuçlarının gross morfolojik ($p=0.055/p=0.0041$), radyolojik ($p=0.017/p=0.041$) ve histolojik olarak mankin skorlaması olarak ($p=0.001/ p=0.004$) olarak karşılaştırılması sonucunda anlamlı farklılık saptandı.

Sonuç: Çalışmamızda intraartiküler uygulanan Polifenolden zengin sızma zeytinyağının eklem üzerinde osteoartritin dejeneratif etkisini azalttığı ve kondrosit rejenerasyon özelliği göstererek kondroprotektif etkisi olduğu gözlemlendi.

Anahtar sözcükler: Polifenol, Osteoartrit, İntraartiküler enjeksiyon

ABSTRACT

Gross Morphological, Radiological and Histological Evaluation of Outcomes by Intra-Articular Administration of Polyphenol Components in Degenerative Osteoarthritis: Rabbit Model

Objectives: It is thought that the Polyphenol components in extra-virgin olive oil can reduce the formation of osteoarthritis and have chondroprotective properties. In this study, it was aimed to investigate the effects of extra-virgin olive oil rich in polyphenols in the treatment of osteoarthritis by intra-articular application to rabbits with experimental osteoarthritis.

Material and Methods: In our study, a total of 32 New Zealand white breed rabbits, 8 rabbits in each group, were used. First, MRI of the right knee of 16 rabbits and the left knee of the other 16 rabbits were performed randomly in two main groups. The anterior cruciate ligaments of all rabbits were cut and 0.2ml of extra-virgin olive oil rich in polyphenol was applied to the rabbits who had MRI of the right knee from the incision line and 0.2ml of saline was applied to the rabbits who had MRI of the left knee and left free. At the end of the 5th week, 8 rabbits were randomly selected from both groups, and MRI was taken as a short-term subgroup, and then they were sacrificed. At the end of the 2nd week, a second dose of 0.2 ml of polyphenol-rich olive oil was applied to the polyphenol-treated rabbit group and no additional treatment was given to the rabbits of the control group. At the end of the 10th week, MRI of the long-term groups was taken and sacrificed. Specimens obtained as a result of sacrifices were evaluated gross morphologically, radiologically and histologically using Mankin classification.

Results: After polyphenol application in short (5 weeks) and long (10 weeks) term in established osteoarthritis, and the results of the control group were determined as gross morphological ($p=0.055/p=0.0041$), radiological ($p=0.017/p=0.041$) and histologically using mankin scoring. ($p=0.001/ p=0.004$), a significant difference was found.

Concllusions: In our study; it was observed that extra-virgin olive oil rich in polyphenols applied intraarticularly, reduced the degenerative effect of osteoarthritis on the joint and had a chondroprotective effect by showing chondrocyte regeneration.

Key words: Polyphenol, Osteoarthritis, Intraarticular injection

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Osteoartrit (OA) sık görülen, ilerleyici, kronik inflamatuvar olmayan bir hastalıktır. Osteoartrit sinoviyal eklemleri etkileyen en sık hastalık sebep olarak kabul edilmiştir. 60 yaşın üzerindeki insanlarda oldukça yaygın olarak görülen kas-iskelet sistemi problemlerinden biridir¹. Toplumdaki görülme sıklığı giderek artan osteoartrit özellikle ortalama yaşam süresinin uzaması, obezitenin artması ve sedanter yaşam tarzının yaygınlaşması gibi sebeplerin giderek artmasıyla önemli ölçüde sosyoekonomik kayıplara yol açan bu hastalığın tedavisi daha da önem kazanmaktadır.

Osteoartritli bireylerde temel yakınmanın ağrı ve buna bağlı fonksiyon kısıtlılığı olması nedeniyle tedavinin ilk hedefi ağrının azaltılması ve hareketin yeniden kazandırılmasıdır, böylece yaşam kalitesini iyileştirmek ve gelişebilecek deformitelerin önüne geçmek tedavinin temel amacını oluşturmaktadır.^{2,3} Amerika Birleşik Devletleri'nde semptomatik diz OA'ı 60 yaş ve üzeri erkeklerde %10, kadınlarda ise %13 oranda gözükme¹.

OA en sık diz ve kalça ekleminde görülmektedir⁴.OA'ten etkilenen bireylere öncelikle cerrahi dışı yaklaşılır, bu hastaların ilk tedavisi için Asetaminofen gibi analjezik ilaçlar, lokal ve sistemik antiinflamatuvar ilaçlar; intraartiküler kortikosteroid, glukozamin, kondroitin sülfat takviyesi ve bunlara ek olarak diyet ve kilo verme önerilir.⁵

Bu tedavilerle yetersiz kalınan hastalarda intraartiküler hyaluronik asit (HA), plateletten zengin plazma (PRP) ve kök hücre uygulamalarının yanı sıra bazı vakalarda ise Opioidler belli şartlarda verilebilir. Konservatif tedaviden fayda görmeyen, uygun hastalara cerrahi tedavi uygulanabilir.

Literatüre bakıldığında yapılan son çalışmalardan elde edilen sonuçlar, tüm tedavilerin oral plaseboya oranla daha etkili olduğunu ayrıca intraartiküler plasebunun ise oral plaseboya göre daha etkili olduğunu göstermiştir⁵. Özellikle intraartiküler steroid uygulamalarının başlıca etkisi olan inflamasyon inhibisyonunun etki süresi hastadan hastaya değişmektedir. Yapılan çalışmalarda sık olmamakla birlikte intraartiküler steroid uygulamalarının; hiperglisemi, septik artrit, intraartiküler ve periartiküler kalsifikasyonlar, lokal kutanöz atrofisi, lokal depigmentasyon, avasküler nekroz, akut sinovit, Charcot artropatisi ve tendinopati gibi bazı yan etkileri bildirilmiştir⁶.

HA insan sinoviyum ve iskelet kıkırdak yapısında bulunmaktadır. HA sinoviyal hücreler, kondrositler ve fibroblastlardan salgılanan glikozaminoglikan (GAG) yapısında bir molekül olup Beta-glukuronil ve Beta-asetilglukozaminden oluşmaktadır⁷. Dejeneratif eklem

hastalıklarında HA türevleri yaygın olarak intraartiküler tedavi ajanı olarak kullanılmaktadır. HA ana bileşen olarak eklemlerde bulunmasına rağmen OA’te ağrı kesmedeki rolü henüz net bir şekilde açıklanamamıştır⁸. Literatürde Akdeniz diyeti uygulaması ile insan sağlığı ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Sızma zeytinyağında bulunan polifenol bileşeni olan Oleocanthal (OC) molekülünün; osteoartrit, romatoid artrit (RA)⁹ ve fare OA modelinde oral olarak verilmesiyle OA seyrinin yavaşlattığına dair radyolojik bulgular elde edilmiştir¹⁰. Ancak polifenolden zengin zeytinyağı intraartiküler çalışması bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda mekanik travma ile indüklenen OA tavşan modelinde; polifenolden zengin sızma zeytinyağının intraartiküler yolla verilmesiyle OA seyrinin değerlendirilmesi ve kondroprotektif özelliğinin makroskobik, radyolojik ve histolojik olarak araştırılması amaçlandı.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Eklem kıkırdağı

Eklem kıkırdağı, eklemi oluşturan kemiklerin birbirlerine bakan yüzlerini oluşturan parlak ve sedefi-beyaz yapıya denir. En önemli görevi yük aktarımı ve yüklenme sırasında eklem kayganlığını sağlar. Eklem kıkırdağı ortalama 2 ila 4 mm kalınlığında kansız, sinirsiz bir yapıdır.^{11,12}

2.1.1. Kıkırdak tipleri

Kıkırdak dokusu ekstrasellüler matriks içeriği olan kollajenin dağılımına ve tipine göre temel olarak üçe ayrılır.

2.1.1.1. Elastik kıkırdak

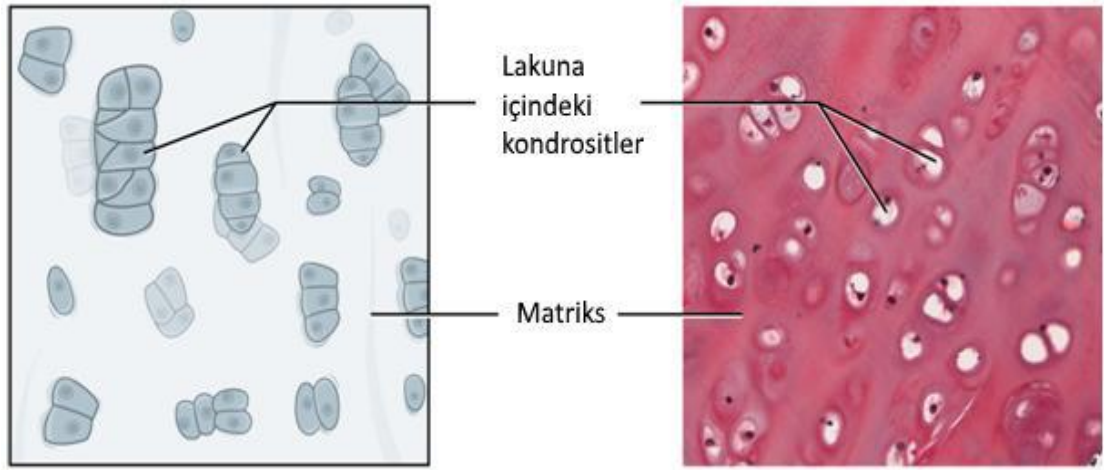
Yapısında tip 2 kollajene ek olarak elastik lifleri içerir. Epiglottis, östaki tüpü ve dış kulakta bulunur. Rengi sarı ve opaktır.¹³

2.1.1.2. Fibröz kıkırdak

Matriks yapısı organize olmuş fibröz doku içermektedir. Ayrıca içeriğindeki tip 1 kollajen ağ şeklindedir. Temporomandibuler eklem, menisküs ve intervertebral disk fibröz kıkırdak yapısındadır.¹³

2.1.1.3. Hiyalin kıkırdak

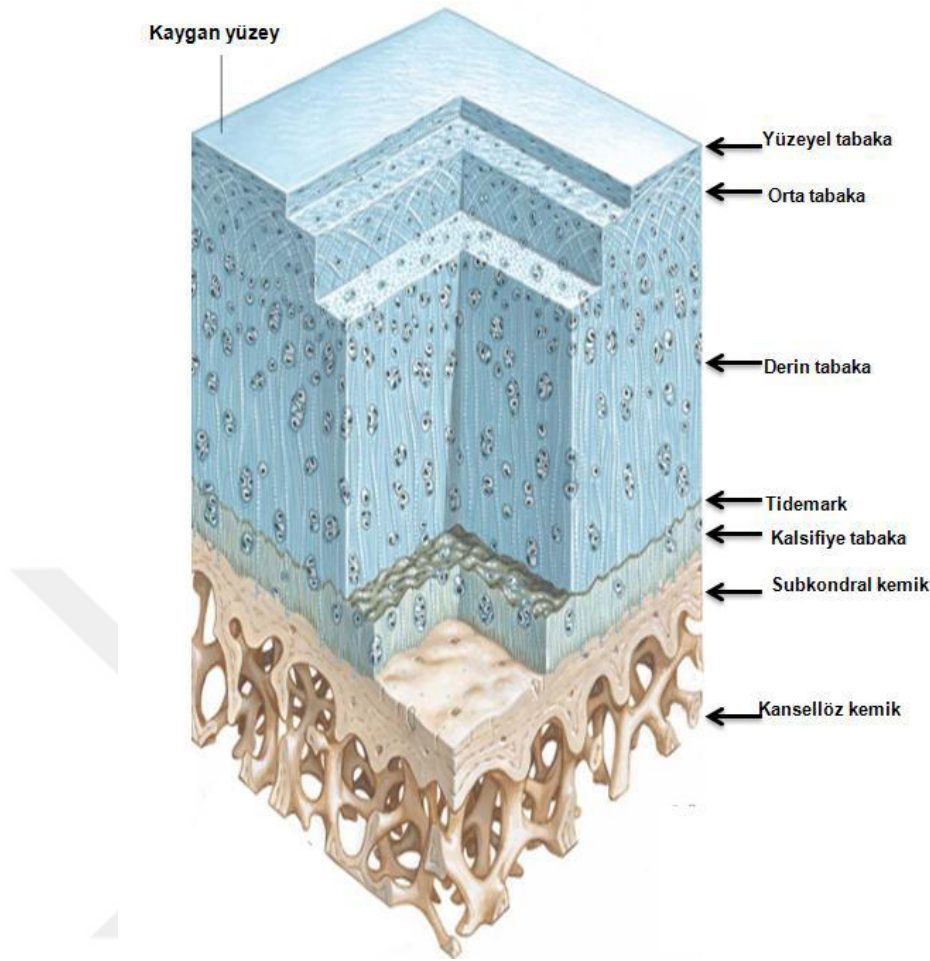
İnsan vücudunda en sık rastlanan kıkırdak dokusudur. Sedef renginde, mavimsi beyaz ve saydam camsı görünümde olup sinoviyal eklemlerin yüzeylerini örter. Fetal dönemdeki geçici iskeletin ana unsurunu oluşturur. Bu kıkırdak iskelet daha sonra endokondral kemikleşme sonucu gerçek kemik dokusuna dönüşür^{13,42}. (Şekil-1)



Şekil 1. Hiyalin kıkırdak yapısı^{13,42}

2.1.2. Eklem kıkırdak yapısı

Kıkırdak, embriyonun mezoderm tabakasından gelişir. Kondrositlerden ve ekstraselüler-matriksten oluşan damarsız bir dokudur. Bölünebilme ve esneklik özelliği vardır. Kıkırdak dokunun içerdiği lifler ve hücreler jel kıvamındaki esas maddenin içine gömülüdür. Kaygan yüzeyi ve düşük sürtünme katsayısı ile kemiklerin birbirleri üzerinde düzgün şekilde kaymasını, yükün aktarılmasını yardımcı olur. Kıkırdak dokusunda kan damarı, sinir ve lenfatik damarlar yoktur. Sinoviyal sıvıdan difüzyon vasıtasıyla besin ve oksijen ihtiyacı karşılanır.¹⁴ Eklem kıkırdağı; eklem yüzeyinden subkondral bölgeye kadar yapısal olarak ayırt edilebilen sırayla yüzeyel, orta, derin ve kalsifiye tabakalardan oluşmaktadır.^{13,42} (Şekil-2)



Şekil 2. Eklem kıkırdağı tabakaları^{13,42}

Eklem kıkırdağına bakıldığında yüzeyel, orta ve derin tabakalardaki hücrelerin ve ekstrasellüler matriksi oluşturan yapıların; yoğunlukları ve dağılımları farklılıklar göstermektedir.¹⁴ Ekstrasellüler matriksin kollajen yapısı gerilme kuvvetlerine, proteoglikan yapısı ise sıkışma kuvvetlerine karşı direnç göstermektedir.¹⁵

2.1.2.1. Yüzeyel tabaka

Eklem sıvısı ile temas halinde olup kıkırdağının yaklaşık olarak %15'lik kısmını oluşturur. Bu tabakada lamina splendens adı verilen bir kısım bulunur. Bu tabakadaki kollajen lifleri eklem yüzeyine paralel olarak dizilmektedir. Kondrositlerden sentezlenen Lubrisin adı verilen protein eklem yüzeyinde maksimum kayganlık sağlar.

Yüksek oranda tip 2 ve tip 9 kollajen ve düşük oranda proteoglikan bulunur. Bu sebeple su oranı en yüksek olan tabakadır. Eklem yüzeyine paralel uzanmış olan kollajen lifleri

sayesinde kıkırdakta makaslama kuvvetlerine ve artmış gerilime karşı direnç sağlar. Ayrıca bu tabakanın bir diğer görevi makromoleküllerin geçişi için filtre görevi görmesi ve kıkırdak dokuyu sinoviyal dokunun immün sistemine karşı korumasıdır.^{16,17}

2.1.2.2. Orta tabaka

Eklem kıkırdağın en kalın tabakası olup kıkırdak hacmin yaklaşık olarak %50'ini oluşturur. Proteoglikan ve kollajen lifler içerir. Kollajen liflerin oblik yerleşimli ve kondrositlerin sferik yapıda olmasıyla kompresif kuvvetlere karşı ilk direnç gösteren kıkırdak tabakasıdır.¹⁷

2.1.2.3. Derin tabaka

Kıkırdak hacminin yaklaşık yüzde 30'unu oluşturur. Bu tabaka eklem yüzeyine dik uzanan en geniş çaplı kollajen liflerini içerir. Proteoglikan oranının yüksek ve su oranının düşük olması önemli bir özelliğidir. Kondrosit ve kollajen liflerin bu dizilimleri sonucu kompresif kuvvetlere en yüksek direnç bu tabakadan sağlanmaktadır.¹⁷

2.1.2.4. Kalsifiye tabaka

Düşük metabolik aktiviteli kalsifiye bir matriks içindeki az sayıda hücreden oluşur. Tip 10 kollajen üreten hipertrofik kondrositler içerir. Bunun sonucunda yapısal bir bütünlük sağlanır ve kıkırdağa etki eden kuvvetlere karşı direnç oluşturur.¹⁷ Kalsifiye tabaka ile derin tabaka Tidemark adı verilen yapı ile ayrılmaktadır.

2.2. Kondrosit ve özellikleri

Mezenkimal kök hücre kaynaklı olup kondroblasta dönüşüp kıkırdak matriksi üretir.¹⁷ Kondrositler kıkırdağın farklı tabakalarında; büyüklük, şekil ve metabolik aktivite olarak farklılık gösterir. Bu hücreler interlökinler, büyüme faktörleri, mekanik yüklenmeler, farmasötik ajanlar, hidrostatik basınç değişiklikleri ve elektriksel uyaranlar gibi uyaranlara biyolojik cevap verme yeteneğine sahiptirler.¹⁸

Matriksle olan bağlantıları nedeniyle sitokinler ve büyüme faktörleri vasıtasıyla katabolik ve anabolik süreçte rol alırlar. Kondrositlerde matriks yapımı ve matriks yıkım özelliği ile bilenen enzimlerin olması kıkırdak dokusunun normal dengesini sağlanabilmektedir.¹²

2.3. Eklem kıkırdağının Ekstrasellüler Matriksi (ESM)

Eklem kıkırdağında lif ve hücreler arası amorf maddenin oluşturduğu yapıya matrix denir. Ekstrasellüler matriksin %85 sudan oluşur. Yaşlandıkça bu oran %70 düşer. ESM'te su ile beraber proteoglikanlar, kollajen ve daha düşük oranda da diğer glikoproteinler, fosfolipidler, nonkollajen proteinler ve lipidler bulunmaktadır.¹⁴

Kollajen lif dizilimi açısından gösterdiği farklılığa göre ekstrasellüler matriks interterritoriyal, periselüler ve territoriyal matriks olmak üzere üç bölgeye ayrılmıştır.¹⁹ Periselüler bölge, nonkollajen protein ve proteoglikandan yapısı ile kondrositlerin yüzeyini halka şeklinde saran bölgedir. Teritoriyal matriks periselüler matriksi çevreler. Kollajen liflerin yoğun bir fibriller ağı yapısı ile doku hasarı oluştuğunda ve yüklenme esnasında kondrositler için mekanik korunma sağlar. İnterterritoriyal matriks en fazla hacme sahip olup mekanik destek sağlamaktır.²⁰

2.4. Eklem kıkırdağının Kollajen yapısı

Ekstrasellüler matriks'in makromolekölüdür. Eklem kıkırdağının kollajen yapısının %90-95'ini tip 2 kollajen oluşturmaktadır. Tip 2 kollajen lifleri üç adet polipeptid zincirden oluşan üçlü heliks yapıdadır. Başlıca prolin ve glisin aminoasit yapısındadır²¹, Kıkırdak dokuya etki eden yüklere karşı direnç ve kıkırdak dokunun gerginliği sağlanmaktadır.^{11,22} Ayrıca çapraz bağlanmış kollajen lifleri arasında bulunan proteoglikanlar matriks stabilizasyonunun yanı sıra şok emilimine katkı sağlar.^{11,22}

2.5. Eklem kıkırdağının proteoglikan yapısı

Proteoglikanlar kondrositler tarafından üretilip matrikse salgılanırlar. Şok emici özelliği vardır. Proteoglikanlar çokça glikozillenmiş olan özel bir glikoprotein sınıfını temsil eder. Bir veya daha fazla kovalent bağla eklenmiş glikozaminoglikan (GAG) zincirli bir çekirdek (Core) proteinden oluşur.²³ GAG keratan sulfat ve kondroitin sulfat olmak üzere iki alt gruptan oluşmuştur. Bu glikozaminoglikan zincirleri; sülfat ve üronik asit gruplarının ortamda bulunmasıyla ilişkili fizyolojik koşullar altında negatif yüklü olan uzun, çizgisel karbonhidrat polimerleridir. Bağlantı proteinleri sayesinde agregan molekülü hyaluronik asid ile bağlanarak proteoglikan agregatını oluşturmaktadır. Bunların yanında matriks yapımı ve yıkımında görevli hyaluronidaz ve matriks metalloproteazları gibi birçok enzimi içermektedir.¹⁵

2.6. Osteoartrit

2.6.1. Osteoartrit etiyopatofizyolojisi

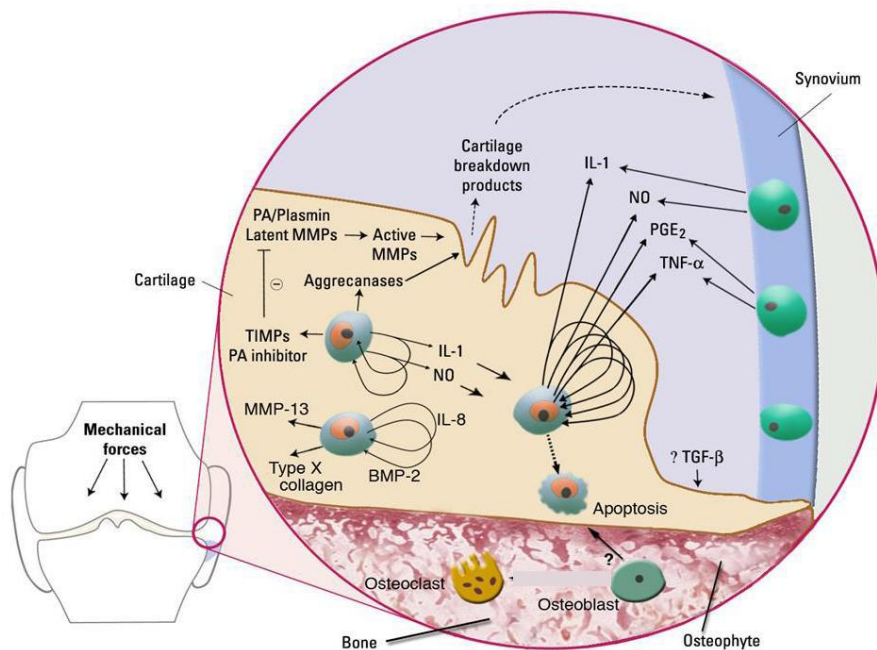
OA eklem kıkırdığının dejenerasyonu ile giden, etiyolojisi tam olarak bilinmeyen metabolik, genetik ve etkileyen diğer nedenlerle birlikte kronik progresif multifaköriyel bir hastalıktır(24). Yapılan çalışmalardan edinilen sonuca göre eklem kıkırdığında eşlik eden yapısal, metabolik ve biyokimyasal değişiklikler izlenmiştir. Normal hiyalin kıkırdak tip 2 kollajen, su ve proteoglikandan oluşan ekstrasellüler matrikse gömülü kondrositlerden oluşur. Kıkırdak aktif dejenerasyon olayı ve dengede oluşan rejenerasyon ile stabil kalır. Dejenerasyon başlangıcında bir yandan kıkırdak ve matriks dejenerasyonuna, diğer yandan gelişmiş biyosentez ile aktif kondrosit replikasyonuna yol açar. Bu durum onarım ve dejenerasyonun dengelendiği, dengelenmiş OA olarak bilinir. Zamanla bu dengenin sekteye uğramasıyla kıkırdak, subkondral kemik, sinoviyal membran, periartiküler kaslar ve bağlar dahil total eklem yapısını etkileyen bir hastalık süreci başlamaktadır. Bunun sonucunda fonksiyon kaybına yol açan inflamasyon, ağrı ve yapısal değişikliğe bağlı deformite oluşur.¹⁶

Normal eklem kıkırdığının travmaya yanıtı suboptimal olması ve kıkırdığın avasküler yapıda olması ve indifferansiye hücre yetersizliği nedeniyle, sadece kıkırdığı ilgilendiren yaralanmalar, kanama ve fibrin pıhtı oluşumunu sağlayamadığından iyi bir iyileşme potansiyeline sahip değildir. Bu yüzden kondrositler sadece sınırlı oranda proliferer olarak yaralanma bölgesinde matriks makromoleküllerinin sentezini artırır, fakat yeni matriks ve hücreler yüzeyi restore edemezler.¹⁷ Lezyonun tidemark tabakasını geçmesi durumunda mezenkimal hücrelerin oluşturduğu fibrin tıkaç devreye girer ve fibröz kıkırdak ile sonuçlanan ekstrensek onarım dönemi oluşur.²²

Literatüre bakıldığında yapılan birçok çalışma IL-1' in proteoglikan sentez inhibisyonu üzerindeki etkisini nitrik oksit (NO) aracılığıyla yaptığını desteklemektedir.²⁴ NO; kollajen sentezinin azaltılması, matriks metaloproteaz (MMP) aktivasyonunun arttırılması, yüzeyel kıkırdak dokusundaki kondrositlerin apoptozisinin tetiklenmesinde etkilidir. Normal kıkırdığa göre osteoartritli kondrositte apoptozis görülme olasılığı daha fazladır.^{25,26}

OA'nın erken safhalarında eklem kıkırdığının yüzeyel tabakası sağlamdır, öncelikle ekstrasellüler matriks moleküler bileşimi ve organizasyonu değişir.²⁷ Dolayısıyla katabolik süreçlerin etkisi sonucu kondrositlerin ölümü ile geri dönüşü olmayan kıkırdak dejenerasyonu başlamaktadır²⁸. OA gelişimi sadece travmaya bağlı olmamakla birlikte, eklem kıkırdığında yaşlanmayla beraber dengede olan yapım ve yıkım süreci, daha çok yıkım lehine değişiklik göstermektedir.

Trombospondin motifleri (ADAMTS), matriks metalloproteinazlar (MPM) ve kolajenazlar gibi proteolitik enzim grubu, ESM’te bulunan proteoglikan ve tip 2 kollajenin yapı bozukluğuna neden olduğu gösterilmiştir. Bazı çalışmalarda Nf-κB sinyalinin inflammatuar yanıtlarda rolü olduğunu ve eklem kıkırdak hücreleri ile sinoviyal hücrelerden salgılanan çeşitli pro-inflammatuar faktörlerin, OA gelişiminde temel rolde olduğu gösterilmiştir³⁰. Yeni yapılan çalışmalar ışığında yedi matriks metalloproteinaz subtipleri tanımlamıştır. Matriks metalloproteinaz-1 (MMP-1), MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-13 ve MMP-14. Bu yedi metalloproteinazdan dördü (MMP-1, MMP-2, MMP-13 ve MMP-14) insan erişkin kıkırdağında bulunmuştur³¹. Kıkırdakta MMP-3, MMP-8 ve MMP-9’un varlığı sadece patolojik durumlara özel olduğu gösterilmiştir³¹. Ayrıca Matriks metalloproteinaz 13 (MMP-13), tip II kollajen, trombospondin motifli matriks metalloproteinaz-4 (ADAMTS-4) ve ADAMTS-5’in OA’ın katabolizmasında merkezi bir rolü olduğu gösterilmiştir.³¹ OA patofizyolojisi mekanizması aşağıdaki şemada özetlenmiştir.³² (Şekil-5).



Şekil 3. OA patofizyolojisi mekanizması şeması³²

2.6.2. Metabolik ve yapısal değişikliği

Dejeneratif osteoartrit oluşum sürecinde meydana gelen eklem kıkırdak hasarı, kondrositlerin rejenerasyon yetersizliği ve kıkırdak hasarının oto onarım mekanizmasında oluşan aksaklıklar sonucu bir takım metabolik ve yapısal değişiklikler oluşmaktadır. OA'ın erken evresinde esas olarak proteoglikan doku içeriği değişmektedir. Eklem kıkırdağının yüzeysel tabakasındaki fibrilasyonu, kollajen liflerin dizilim ve yapısında bozulma, kondrositlerin çoğalması ve migrasyon yetersizliği sonucu kıkırdak kaybı süreci ortaya çıkmaktadır. Erken evreden ileri düzeye doğru kollajen lif dizilimi boyunca bozulma meydana gelmektedir. Devamında kıkırdakta oluşan derin fissürler ve kondrosit çevresindeki matriks proteoglikanlarda bozulma süreci ortaya çıkmaktadır³². Hasarlanan bölgede kondrositlerin çoğalmasıyla hiyalin ve fibröz kıkırdak salgılanması ile fokal oto onarım süreci meydana gelmektedir. Ancak hiyalin dizilimdeki bozukluklar ve fonksiyonu bozulmuş kondrositlerin varlığı sonucu yeni kemik oluşumu, subkondral kemikte kistik değişiklikler ve eklem sınırlarında osteofit oluşumu ortaya çıkmaktadır²⁹.

Subkondral kist oluşumu daha çok kıkırdağın üzerini örten veya zayıf olan eklem bölgesinde oluşma eğilimindedir. OA süreci sadece eklem kıkırdağı ile sınırlı kalmamakla birlikte sinoviyal dokuda kalınlaşma, eklem kapsülüne lenfositlerin ve makrofajların infiltrasyonu ile oluşan yapısal değişikliklere bağlı olarak ilerleyen yıllarda eklemde deformiteye yol açmaktadır^{29,32}.

OA çeşitli etkenlerin ortak bir kliniğe yol açması nedeniyle heterojen bir durumdur.

Dejeneratif osteoartritte sadece eklem kıkırdağı değil, subkondral kemik, bağlar, kaslar, menisküs, sinovyum, eklem kapsülü ve eklem sıvısı dâhil olmak üzere tüm eklem yapıları etkilenmektedir. OA gelişim sürecinde etkili bazı anabolik ve katabolik sitokinlerin birbirine etkileşimi ve ilişkileri bilinmektedir. TGF (doku büyüme faktörü beta-1, 2 & 3) gibi anabolik faktörler³³, kondrosit proliferasyonunda, matriks sentezinde, IL-1'in baskılamasında ve Proteinaz inhibitörlerini uyarmada etkilidir.

Fibroblast ve trombosit kaynaklı büyüme faktörleri ayrıca kondrositlerin ve MMP üretiminin farklılaşmasına ve çoğalmasına yardımcı olur. İnsülin büyüme faktörü-1 (IGF-1) glikozaminoglikan (GAG) ve kollajen sentezini artırır. Kemik morfojenik proteinler (BMP) matriks sentezini artırır. Eklem kıkırdak hasarı sürecinde İnterlökin-I ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF α) doğal kollajen yapısını bozan patolojik MMP'leri artırır³⁴.

2.6.3. OA Risk faktörleri

Osteoartrit dünyada en sık görülen, nedeni tam bilinmeyen kronik progresif eklem hastalığıdır. Eklem kıkırdığının bozulmuş yapılanması nedeni ile eklem ağrısına ve mobilizasyon kısıtlamasına yol açmaktadır. Çeşitli travmatik, biyomekanik, inflamatuvar ve genetik faktörlerin etkisiyle, yapım ve yıkım süreçlerinin bozulması sonucu ortaya çıkan dejeneratif bir hastalıktır. Diz eklemi osteoartritte en sık tutulan eklemdir.³⁵

OA’te yaş, cinsiyet, obezite, mesleki faktörler, spor aktiviteleri, eklemden daha önce meydana gelen hasarlar, duyu bozukluğu, genetik faktörler, kalsiyum kristal metabolizmasında bozukluk, hipermobilité, sigara ve alkol kullanımı, diabetes mellitus (DM), hipertansiyon (HT) ve septik artrit gibi risk faktörleri tartışılmaktadır.^{36,37}

Diz osteoartritin risk faktörleri içinde, primer olarak ileri yaş, obezite, metabolik sendromlar, majör eklem yaralanması, kadın cinsiyet, genetik yatkınlık, anormal eklem yüklenmesi ve yeme alışkanlıkları olduğu düşünülmektedir. Obezite ve OA arasında yakın bir bağlantı olduğu görülmüştür.^{37,38}

Alt ekstremité uyumsuzluğu ve displazi gibi nedenler osteoartrit risk faktörleri arasındadır.^{37,39} Eklemi oluşturan yapılarda bozukluk veya travmaya bağlı oluşan ÖÇB rüptürü, menisküs patolojilerine sekonder gelişen eklem kıkırdak hasarları sonradan gelişecek osteoartrit ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.⁴⁰ Meslek ilişkili kronik travmatik irritasyonlar OA için risk faktörü olduğu tahmin edilmektedir.⁴¹ D vitamini eksikliği kıkırdak ve kemik metabolizmasının önemli faktörlerinden biri olması sebebi ile OA için risk faktörü olduğu düşünülmektedir.⁴² OA hastaları genellikle diğer insanlara göre daha az fiziksel aktiviteye sahiptirler.⁴³ Hemofili ve Gut hastalığı gibi artropati yapan sebepler osteoartrit ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.^{44,45} OA risk faktörü bulunan bireylerde erken tanı ve tedavi açısından etkin bir biyobelirteç hala bulunamamıştır.⁴⁶

2.6.3. Kellgren Lawrence Sınıflandırma Sistemi

Osteoartritte en sık kullanılan radyolojik kriterler 1957 yılında Kellgren ve Lawrence tarafından tanımlanan kriterlerdir. Amerikan Romatoloji Koleji tarafından semptomatik diz, kalça ve el osteoartritin sınıflandırılması için kriterler tanımlanmıştır.⁴⁷ Radyolojik olarak ikinci dekatta bireylerin %1’inde osteoartrit bulgusu saptanırken, bu oran yedinci, sekizinci dekatlarda %50-60’lara ulaşır. Yetmişli yaşlarda bireylerin büyük kısmında radyolojik olarak osteoartrit saptanmakla birlikte bu bireylerin yarısından daha azında semptomatik bulgular ortaya çıkmaktadır.

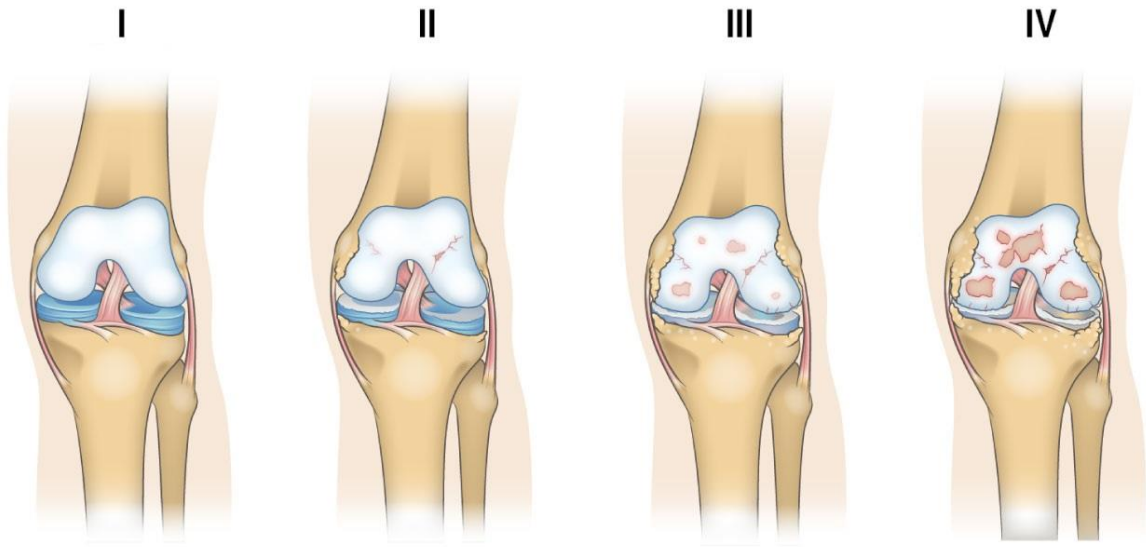
Kellgren Lawrens evrelemesi aşağıdaki gibidir:

Evre 1: Eklem aralığında şüpheli daralma, olası osteofit.

Evre 2: Kesin osteofit, eklem aralığında olası daralma.

Evre 3: Orta derecede çok sayıda osteofit, eklem aralığında belirgin daralma, bir miktar skleroz ve kemik uçlarında olası deformite.

Evre 4: Büyük osteofitler, eklem aralığında belirgin daralma, belirgin skleroz ve kemik uçlarında kesin deformite.



Şekil 4. Kellgren ve Lawrence sınıflaması şeması ⁴⁸

2.6.5. Tedavi

Osteoartritin patogenezi tam olarak bilinmemekle birlikte OA'lı hastaların tedavisi, ağrıların azaltılmasına, hastalığın progresyonun önlenmesine ve günlük yaşam kalitesinin iyileştirilmesine yöneliktir. Tedavide başlıca ilaçlar (parasetamol⁵⁰, steroid olmayan anti inflamatuvar ilaçlara (NSAİİ)⁵¹, topikal anti inflamatuvar⁵², intraartiküler Hyaluronik asit, Steroid ve PRP gibi enjeksiyon çeşitleri^{53,54,55}, Opioidler⁵⁶) olmak üzere, eklem çevresindeki kas grupların güçlendirilmesi⁵⁷, sıcak soğuk uygulaması, aktivite ve çalıştığı iş şartların modifikasyonun yanı sıra sızma zeytinyağı⁵⁸, diyet programı ile kilo verme gibi konservatif tedavileri içermektedir. Konservatif tedavi ile iyileşme sağlanamayan, uygun hastalara artrodez veya artroplasti gibi cerrahi seçenekler önerilebilir.^{59,60} Parasetamol 4000 mg/gün ve üstündeki dozlarda, steroid olmayan ilaç (NSAİİ) ve plaseboya göre etki üstünlüğü gösterilmiştir.⁵⁰

Opioid analjezikler kodein, tramadol, propoksifen standart tedavilere ek olarak ağrı artışı ve alevlenmelerde kullanılabilir.⁵⁶

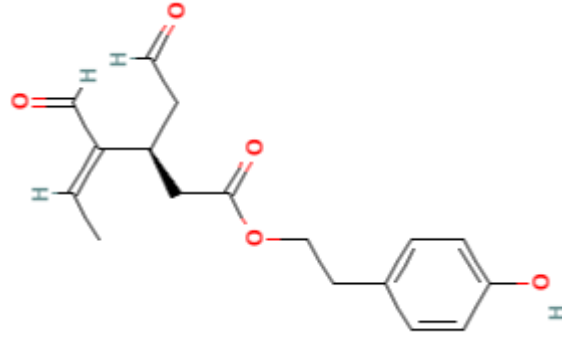
2.7. Polifenol ve Oleocanthal(OC)

Polifenoller doğal organik bileşenlerdir. Doğal bitki polifenollerinin insan vücudu üzerindeki faydalı etkileri, bir dizi bilimsel araştırma projesine yol açmıştır. Biyoaktif polifenoller çeşitli doğal bileşiklerdir. Kaynakları çoğunlukla meyveler (Zeytin), sebzeler, kuruyemişler, tohumlar, ağaç kabuğu ve yapraklardır.

Biyolojik aktivite gösteren polifenollerinin antioksidan, anti inflamatuvar, anti alerjik, anti aterosjenik, anti trombotik, anti mutajenik, analjezi, anti mikrobial ve kondroprotektif etkileri yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Oleocanthal (OC), feniletanoid yapısında olan tirozol esterdir ($C_{17}H_{20}O_5$) ve zeytinyağının acı tadından sorumlu görünmektedir.^{61,65} Esas olarak sızma zeytinyağında bulunan fenolik bir bileşendir. Literatüre bakıldığında yapılan son çalışmalardan elde edilen objektif sonuçlar sızma zeytinyağından elde edilen OC insan primer osteoartritli diz eklemi kıkırdağından izole edilen kondrositlere toksik olmadığı ayrıca kondroprotektif ve anti inflamatuvar özellikleri olduğu gösterilmiştir.^{62,64}

Literatür incelendiğinde Iacono Anna ve ark. tarafından 2011 yılında yaptığı bir deneysel rat modelinde; in-vitro ortamda rat OA'li kondrositlerde hücre canlılığına zarar vermeden lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenmiş OA modelinde OC etkisi altında NO salınımını inhibe ettiği görülmüştür⁶³. Ayrıca bu çalışmada NOS2, COX2 ve mRNA ekspresyonunu önemli derecede azalttığı, OA erken döneminde OC etkisi ile MMP-13 ve ADAMTS-5 mRNA ekspresyonunun azaldığı elde edilmiştir⁶³. Bir başka çalışmada OC oral uygulanması ile sıçan makrofaj (J774) ve sıçan kondrositlerinde (ATDC5) MIP-1 α ve IL-6 inhibisyonu ile anti inflamatuvar etkisi gösterilmiştir.^{63,64}

Bu çalışmada ÖÇB tüptürü ile indüklenen tavşan diz OA modelinde sızma zeytinyağında bulunan Polifenol bileşenlerin intaratiküler uygulaması ile sonuçların gross morfolojik, radyolojik ve histolojik olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.



Şekil 5. Oleocanthal kimyasal yapısı şeması⁶⁶

2.8. Dejeneratif OA deneysel çalışma hayvan modelleri

Literatüre bakıldığında OA ile ilgili çok sayıda deneysel hayvan çalışması mevcuttur. Hayvan anatomisi ve fizyolojisi insan vücut yapısına tam olarak benzememektedir. Deneysel hayvan çalışmalarında OA modeli oluşturmak için ekstremite denervasyonu, eklem içine enzim⁶⁷ (Proteinaz, kollajenaz) enjeksiyonu, eklem immobilizasyonu ve cerrahi olarak instabilite oluşturmak gibi yöntemler kullanılmaktadır. Günümüzde en sık kullanılan yöntem daha çok post travmatik osteoartriti taklit eden cerrahi olarak mekanik instabilite (ÖÇB rüptürü, parsiyel veya total menisektomi) modelidir.^{68,69} Oluşturulan OA modelinden yeterli örnek temini, kolay elde edilebilir ve uygun maliyetli gibi parametreler esas alınarak hayvan modeli seçilmektedir.

Ön çapraz bağ kesilmesi eklem hareketinin ve eklem yüzeyinde yük dağılımının değişmesi ile uzun dönemde proteoglikan içeriğinde azalma, kinematik değişimi, kıkırdakta ilerleyici erozyon olması ve matriks metalloproteinaz aktivitesinde değişiklik ile insandaki ÖÇB hasarı ile benzerlik göstermektedir.⁷⁰ Yapılan çalışmalarda kullanılan hayvan modellerinde biyokimyasal, morfolojik ve radyolojik değişiklikler açısından insandaki osteoartrit modelini en iyi taklit eden model, ÖÇB kesilerek osteoartrit oluşturulmuş olan köpek modelidir.⁶⁹ Ancak filogenetik olarak yüksek ırk özelliği taşımaları ve OA oluşma sürecinin diğer hayvan modellerine göre uzun olması nedeniyle deneysel modellerde en çok tercih edilen hayvanlar tavşan ve domuzdur.⁷⁰

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Deneysel uygulama ve Araştırma Merkezi (SABİDAM) yerel etik kurulunun 15.01.2021 tarihli toplantısında verdiği etik kurul onayı ve Çukurova Üniversitesi Proje Süreçleri Yönetim Sistemi maddi desteğiyle 20.09.2021 ve 30.11.2021 tarihleri arasında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde Bilimsel Araştırma Projeleri kapsamında gerçekleştirildi.

Çalışmamızda tavşanların kullanma sebebi öncelikle uygun maliyetli ve boyutun küçük olmasıdır. Ayrıca insan anatomisine benzerliği ve fizyolojik özelliklerinin benzer olmasıyla hem cerrahinin kolay yapılabilir olması ve hem de vereceğimiz tedavinin insana daha benzer etkileri olması tercih etme nedenlerimizdedir. Yapılan araştırmalara göre insan dizi anatomisine en yakın deney hayvanı köpektir ancak etik kuralları ve maliyetin yüksek olması nedeniyle tavşan tercih edildi.

3.1. Çalışma planı ve deneklerin hazırlanması

Çalışmamıza dahil edilen 32 adet Yeni Zelanda beyaz tavşanının (Cinsiyetten bağımsız) yaş ortalaması 6 ay (5-6.5 ay) ve ortalama ağırlıkları 3000 gr (3-3.5 kg) olarak rastgele seçilip numaralandırılmıştır. SABİDAM barınma kafesinde Tularemi hastalığı şüphesiyle 3 hafta boyunca önlem amaçlı karantinaya alındı. Tavşanlar rastgele olarak iki ana gruba ayrıldı ve 1'den 32'ye kadar rastgele numaralandırıldı. Karantina izlemi sonrası tüm tavşanlar elektronik tartıda tartılarak anestezi dozu ayarlandı. Ketamin hidroklorür %10 (50mg/kg, intraperitoneal Ketamol®, Richter Pharma AG, Wels Avusturya) ve Ksilazin hidroklorür (10 mg/kg, intraperitoneal Xylasin Bio 2%, Bioveta, İntermed Ecza Deposu İthalat, İhracat, Ticaret ve Taahhüt Ltd. Ankara) aynı enjeksiyon içinde kombine olarak her tavşanın kasık bölgesinden uygulanarak intraperitoneal yol ile sedasyon yapıldı. 1'den-16'ya kadar olan tavşanların sağ dizlerine ve 17'den-32'ye kadar olan tavşanların sol dizlerine koronal ve sagittal planlarda T₁ ve T₂ sekanslarda, 14-16 kesitler halinde MRG (3T PHILIPS IMEGMIA) çekildi. Tavşanlar tarafımızca numaralandırılıp bazal değerlendirme veri kaydı için radyoloji bölümüne verildi. Bu şekilde daha sonra da kör radyolojik değerlendirilmesi sağlandı. Sağ diz Polifenol ve sol diz ise Kontrol grubu olarak yazı tura atma işlemi sonrası seçildi.

Denek hayvanları çalışma (Polifenol) ve kontrol grupları makroskobik, radyolojik ve histolojik analiz için kısa ve uzun vadeli olarak iki ana gruba ayrıldı.

Tablo 1. Grupların dağılımı

Gruplar	Kısa vade (5 hafta)	Uzun vade (10 hafta)	Toplam
Polifenol Grubu	8	8	16
Kontrol Grubu	8	8	16

3.2. Uygulanan Cerrahi İşlemler ve Teknik

Tüm tavşanlar cerrahi öncesi elektronik tartı ile tartılarak her deneğe ayrı şekilde anestezi dozu hesaplandı. Ketamin hidroklorür %10 (50mg/kg, intraperitoneal Ketazol®. Richter Pharma AG, Wels Avusturya) ve Ksilazin hidroklorür (10 mg/kg, , intraperitoneal Xylasin Bio 2%, Bioveta, İntermed Ecza Deposu İthalat, İhracat, Ticaret ve Taahhüt Ltd. Ankara) aynı enjeksiyon içinde kombine olarak her tavşanın kasık bölgesinden intraperitoenal yol ile anestezi uygulandı.

Denekler cerrahi alanı tıraş edildikten sonra ameliyathane masasında supin pozisyona alındı ve Povidon iyot (Batticon®, Adeka İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş Samsun) solüsyonu ile cerrahi saha temizliği sonrasında steril şekilde örtüldü (şekil 6,7) 1-16 no'lu tavşanlar sağ dizinden ve 17-32 no'lu tavşanlar ise sol dizinden daha önceden Yoshioka ve ark.⁷⁰ tarafından tanımlanan yöntem ile medial parapatellar mini insizyonla girilerek katlar geçildi. Patella hafif lateralize edilerek eklem tam fleksiyona alındı. ÖÇB görüldü ve 11 numaralı bistüri yardımı ile kesildi (şekil 8). Daha sonra ön çekmece testi ile tibianın öne translasyonu izlendi.

Cilt altı 4-0 Vicryl (Coated VICRYL®, Ethicone) ve cilt 4-0 Ethilon (Prolene®, Ethicone, Johnson&Johnson) sütür ile primer onarıldı (şekil 9, 10). Cerrahi işlemin hemen sonrasında insizyon hattından 1-16 no'lu tavşanlara 0.2 cc yüksek polifenol sızma zeytinyağı (önceden 0.6 ve 0.45 mikron süzgeçten süzölmüş) diz eklemine enjekte edildi. Cerrahi işlemin sonrasında 17-32 no'lu tavşanlara ilk güne mahsus steril 0.2 cc izotonik SF enjekte edilerek steril pansuman sarıldı (şekil 12). Bu çalışmaya başlamadan önce deneyde kullanılan yüksek polifenollü sızma zeytinyağından alınan örnekler ile mantar ve bakteri çalışması yapıldı. İnkübasyonun 5. gününde üreme olmadığı bilgisi alındı (şekil 13).

3.3. Cerrahi Sonrası Takip

Cerrahi sonrası herhangi bir immobilizasyon yöntemi uygulanmadı ve deneklerin barınma kafesinde serbest dolaşmalarına izin verildi(şekil 14). Postop 1. gün vizitinde tüm

deneklerin pansumanlarını çıkardıkları görüldü. 10 haftalık takip süresi boyunca her iki grupta yara yeri komplikasyonuna bağlı denek kaybı ve enfeksiyon izlenmedi(şekil 15). Polifenol grubu postop 1. günden itibaren dört ayak üzerinde hafif aksayarak mobilize oldukları gözlemlendi. Buna karşın kontrol grubun tavşanların bazıları postop 3. gün bazıları ise postop 5. günde 4 ayak üzerinde daha belirgin olarak aksayarak mobilize oldukları gözlemlendi. Polifenol grubun daha erken 4 ekstremité üzerine mobilizasyonunu OC'nin analjezik ve antiinflamatuvar etkisine bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Polifenol grubundan 8 no'lu tavşan anestezi sonrası uyandırılmadı ve 12 no'lu tavşan Otitis İnterna olması üzerine eksitus oldu. Kontrol grubundan 32 ve 28 no'lu tavşanlar ise Coccidiosis (otopsi uygulandı) enfeksiyonu sonucu öldü. Ölen tavşanlar çalışmaya dahil edilmedi. 5 gün boyunca kontrol grubun kalan denek tavşanlarına Coccidiosis enfeksiyonu profilaksisi açısından antibiyoterapi verildi. Deneklerin kulaklarının her iki tarafına yazılan numaraların silinmemesi için haftada iki kez olmak üzere sayılar yeniden yazıldı(şekil 16). Postop 2. haftada uzun vadeli polifenol grubuna ikinci doz olarak 0.2cc polifenolden zengin sızma zeytinyağı intraartiküler yolla uygulandı.

Postop 5. ve 10. haftalarda her gruptan rastgele yedişer denek tavşan seçilip tarafımızca önceden numaralandırılmış şekilde radyoloji bölümüne verildi. Deneklerin numaralarının hangi gruba ait olduğu radyoloji bölümüne iletilmedi. Böylece radyolojik değerlendirilmesinin kör olması sağlandı. Tüm tavşanlar cerrahi öncesi elektronik tartı ile tartılarak her deneye ayrı şekilde anestezi dozu hesaplandı. Ketamin hidroklorür %10 (50mg/kg, intraperitoneal Ketazol®, Richter Pharma AG, Wels Avusturya) ve Ksilazin hidroklorür (10 mg/kg, , intraperitoneal Xylasin Bio 2%, Bioveta, İntermed Ecza Deposu İthalat, İhracat, Ticaret ve Taahhüt Ltd. Ankara) aynı enjeksiyon içinde kombine olarak her tavşanın kasık bölgesinden intraperitoneal yol ile anestezi uygulandı. Sedasyon altında tavşanların sakrifikasyon öncesi kısa ve uzun vadeli olarak polifenol grubun sağ dizlerine ve kontrol grubun ise sol dizlerine koronal ve sagittal planlarda T₁ ve T₂ sekanslarda, 14-16 kesitler halinde MRG (3T PHILIPS IMEGMIA) çekildi.

3.4. Deneklerin Sakrifikasyon ve Materyallerin Hazırlanması

Kısa vadeli grupların 5. haftasında ve uzun vadeli grubun ise 10. haftasında kontrol MRG çekiminden hemen sonraki gün intrakardiyak potasyum uygulaması ile sakrifikasyon işlemi uygulandı. Hiçbir denek tavşanın insizyon bölgesinde komplikasyon ve suture materyali izlenmedi. Eski insizyon skar yerinden yeni insizyon yapıldı. Katlar geçilerek artrotomi işlemi tamamlandı. Patellar tendon tibia yapışma yerinden 15 numaralı bistüri yardımı ile kesildi ve

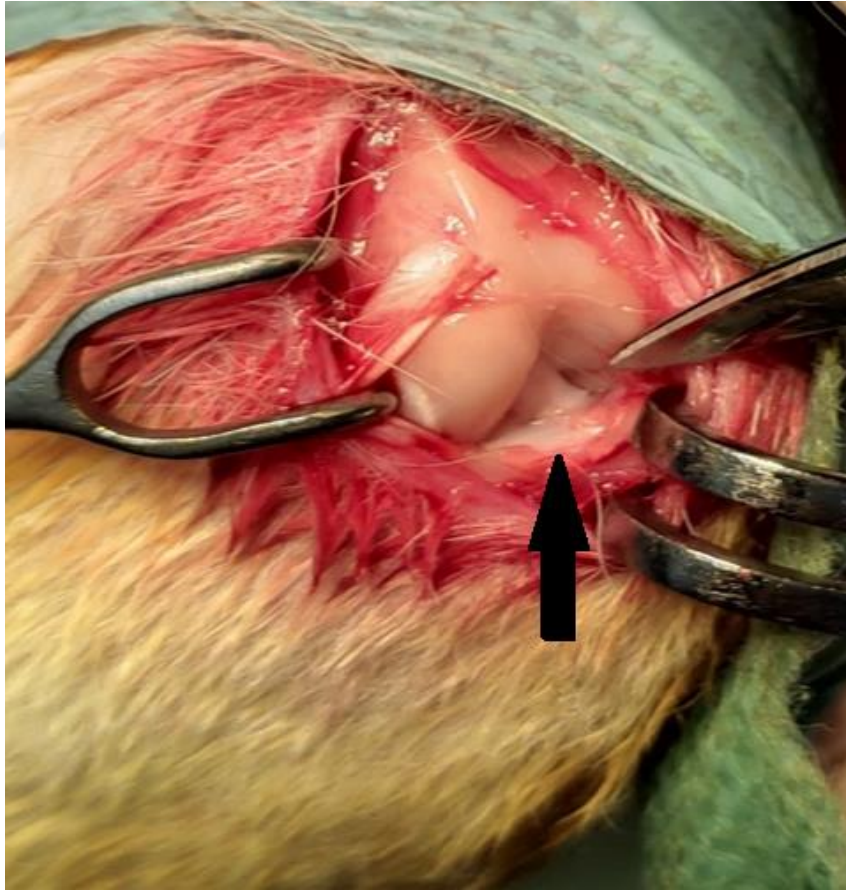
proksimale kaldırarak eklem görünür hale getirildi. Eklem tam fleksiye getirilerek femurun her iki kondil ve patellar fossanın; ÖÇB kesisi sonrası kısa ve uzun vadede OA'in oluşturduğu bulguların, gross morfolojik değişiklikleri kayıt edildi(şekil 17-21). Osteoartrite bağlı gross morfolojik değişiklikleri Yoshioka ve ark.⁷⁰ ve Collins ve ark.⁷¹ tarafından tanımlanan makroskobik eklem kırık hasarı evrelendirme kriterlerine göre değerlendirildi. Femur, distal eklem kırıktaşı korunarak yumuşak dokulardan bistüri yardımı ile temizlendi ve suprakondiler bölgeden testere yardımı ile osteotomize edilerek histolojik değerlendirilmesi için %10'lük formaldehit solüsyonuna konuldu. Her denek tavşanın histolojik örneği tarafımızca ayrı kutularda önceden numaralandırılmış şekilde hangi gruba ait olduğu bilgisi verilmeden histolojiye verildi. Bu şekilde histolojik değerlendirilmesinin kör olması sağlandı.



Şekil 6. Cerrahi alanın tıraşlanmış hali ok ile gösterilmiş



Şekil 7. Supin pozisyonda, cerrahi saha temizliği ve steril örtüsü



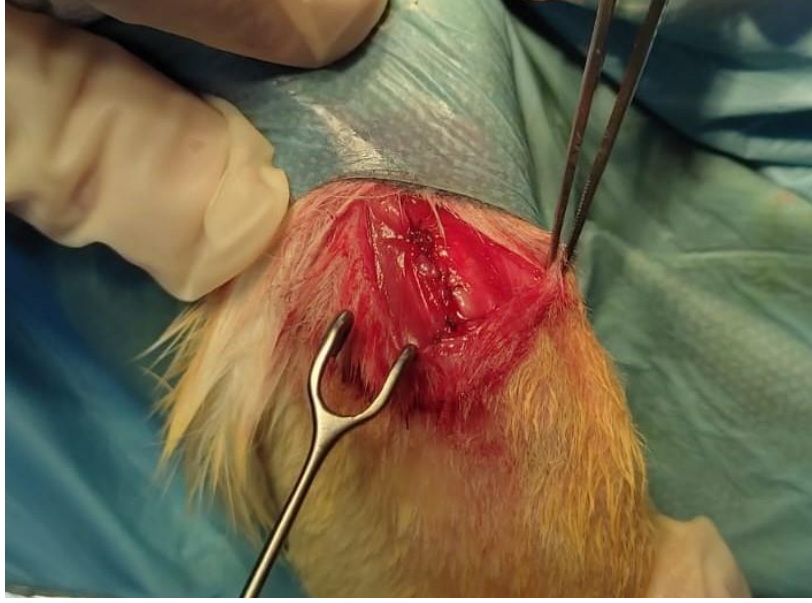
Şekil 8. Artrotomi sonrası sağlam ÖÇB ok ile gösterilmiştir



Şekil 9. Kesilmiş ÖÇB ok ile gösterilmiş



Şekil 10. İnsizyon sahasına 0.2 cc Polifenolden zengin sızma zeytinyağı uygulaması



Şekil 11. Cilt altının primer sütürasyonu



Şekil 12. Cildin primer sütürasyonu



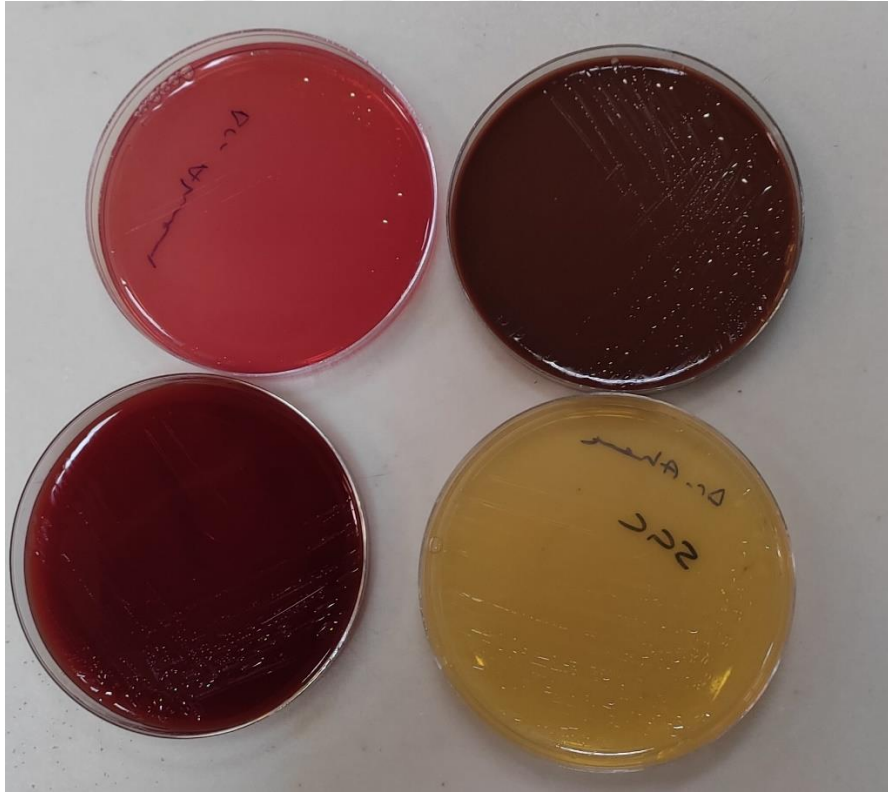
Şekil 13. İşlem sonrası yara bakımı



Şekil 14. Cerrahi sonrası komplikasyonsuz yara yeri iyileşmesi



Şekil 15. 6 nolu tavşan rakamının yenilenmesi, kulağın her iki tarafı işaretlenmiştir



Şekil 16. İnkübasyonun 5. gününde üremenin olmadığı kültür çalışması

3.5. Ölçümlerin değerlendirilmesi

OA'in deney modellerine göre biyomekanik, histopatolojik, makroskopik morfolojik, biyomarker, ağrı ölçümü ve radyolojik gibi farklı değerlendirme ölçüm yöntemleri tanımlanmıştır. Bizim çalışmamızda makroskopik morfolojik, radyolojik ve histolojik değerlendirme yöntemleri ile ölçüm yapıldı.

3.5.1. Gross morfolojik değerlendirilmesi

Çalışma süresi tamamlanan denekler intrakardiyak potasyum uygulaması ile sakrifiye edildi. Sakrifikasyon işlemi sonrası cerrahi alanı tıraşlandı. Patellar tendon tibia yapışma yerinden 15 numaralı bistüri yardımı ile kesildi ve proksimale kaldırarak eklem görünür hale getirildi. Eklem tam fleksiyona getirilerek femurun her iki kondil ve patellar fossanın; ÖÇB kesisi sonrası kısa ve uzun vadede OA'in oluşturduğu bulguların. gross morfolojik değişiklikleri Yoshioka M. ve ark⁷⁰. (1996) ve Collins ve ark.⁷¹ tarafından tanımlanan makroskopik eklem kıkırdak hasarı evrelendirme kriterlerine göre değerlendirildi.

Collin's ve ark. tarafından 1960 yılında insan talus eklem yüzeyinde dejeneratif osteoartrite bağlı oluşan kıkırdak hasarının şiddetini, makroskopik morfolojik değişikliklerini gösteren gross morfolojik modifiye Collin's skalası tanımlanmıştır. Buna göre osteoartrite bağlı oluşan kıkırdak hasarı; Evre 0 normal kıkırdak yüzeyi, Evre 1 eklem yüzeyinde Kartilaj fibrilasyonu, Evre 2 eklem kıkırdağının üst tabakasında ülserasyon, Tidemark intakt. Evre 3 subkondral alanda Erozyon, Eklem yüzeyin < %30 ve Evre 4 ise subkondral alandaki kıkırdak erozyonu eklem yüzeyin > %30 olmasını tanımlar(Tablo 2.).

Tablo 2. Morfolojik Modifiye Collin's Skalası⁷¹

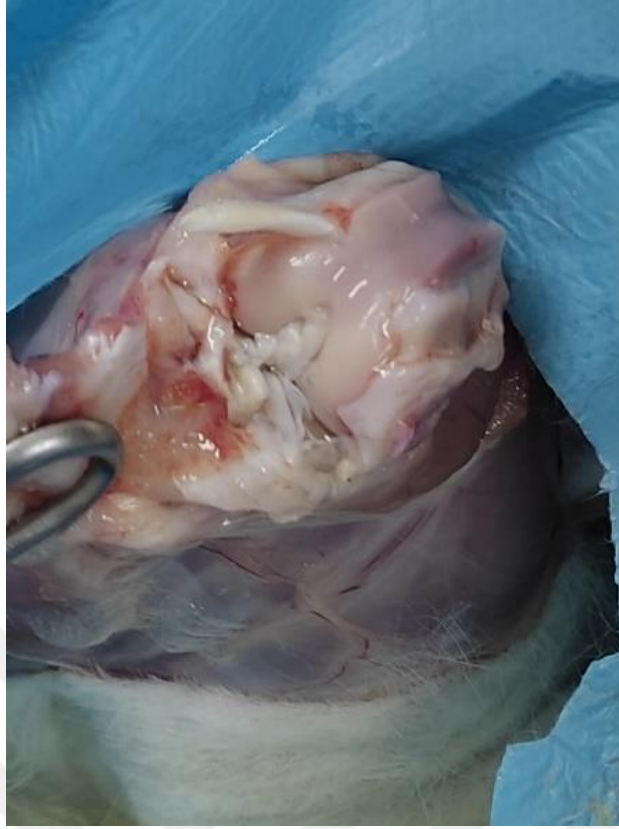
Morfolojik Modifiye Collin's Skalası	
Evre 1	Eklem yüzeyinde Kartilaj fibrilasyonu
Evre 2	Eklem kıkırdağının üst tabakasında ülserasyon, Tidemark intakt
Evre 3	Subkondral alanda Erozyon, Eklem yüzeyin < %30
Evre 4	Subkondral alanda Erozyon, Eklem yüzeyin > %30



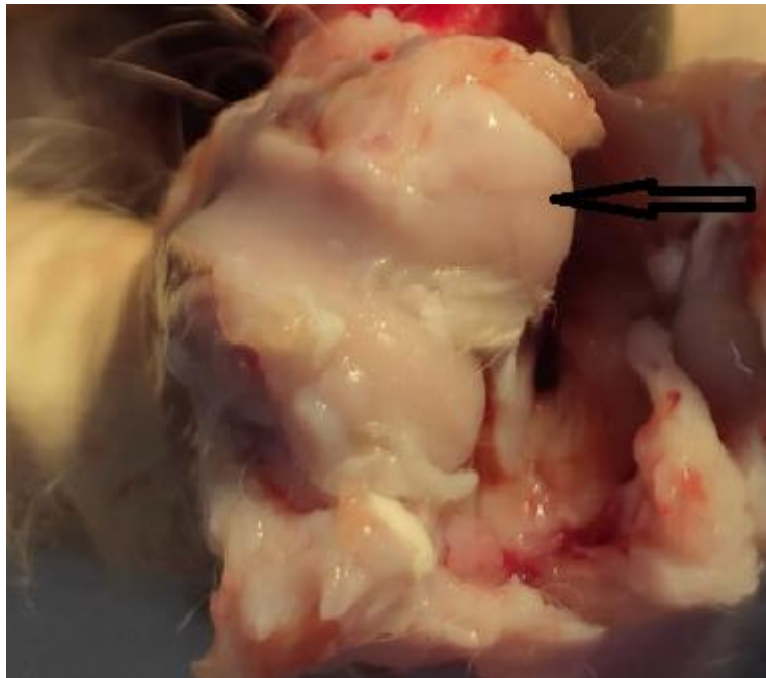
Şekil 13. Eski insizyon üzerinden artrotomi insizyonu



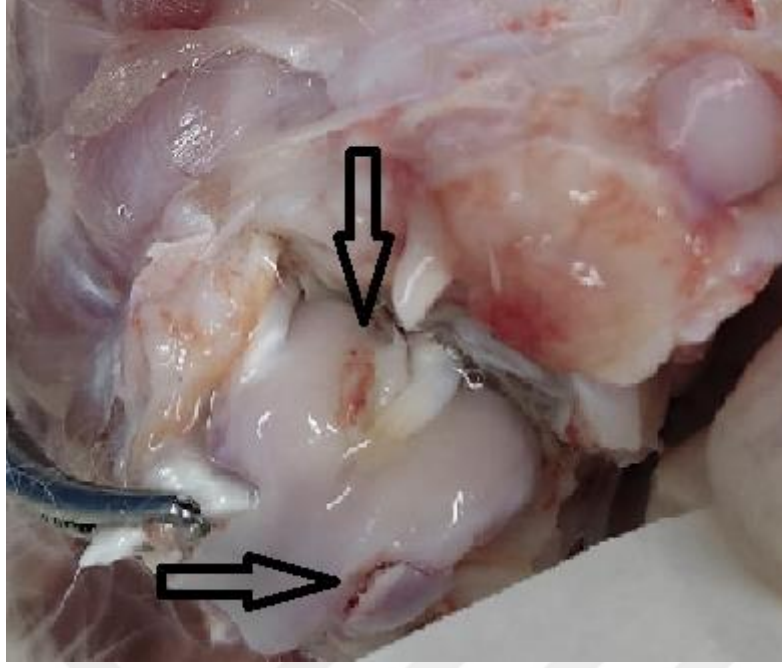
Şekil 14. Spesmenin yumuşak dokulardan temizleme aşaması



Şekil 15. Gross morfolojik Evre 1 spesmen örneği



Şekil 16. Gross morfolojik Evre 2 spesmen örneği



Şekil 17. Gross morfolojik Evre 3 spesmen örneği



Şekil 18. Gross morfolojik Evre 4 spesmen örneği her iki femural kondil tama yakın destrükte

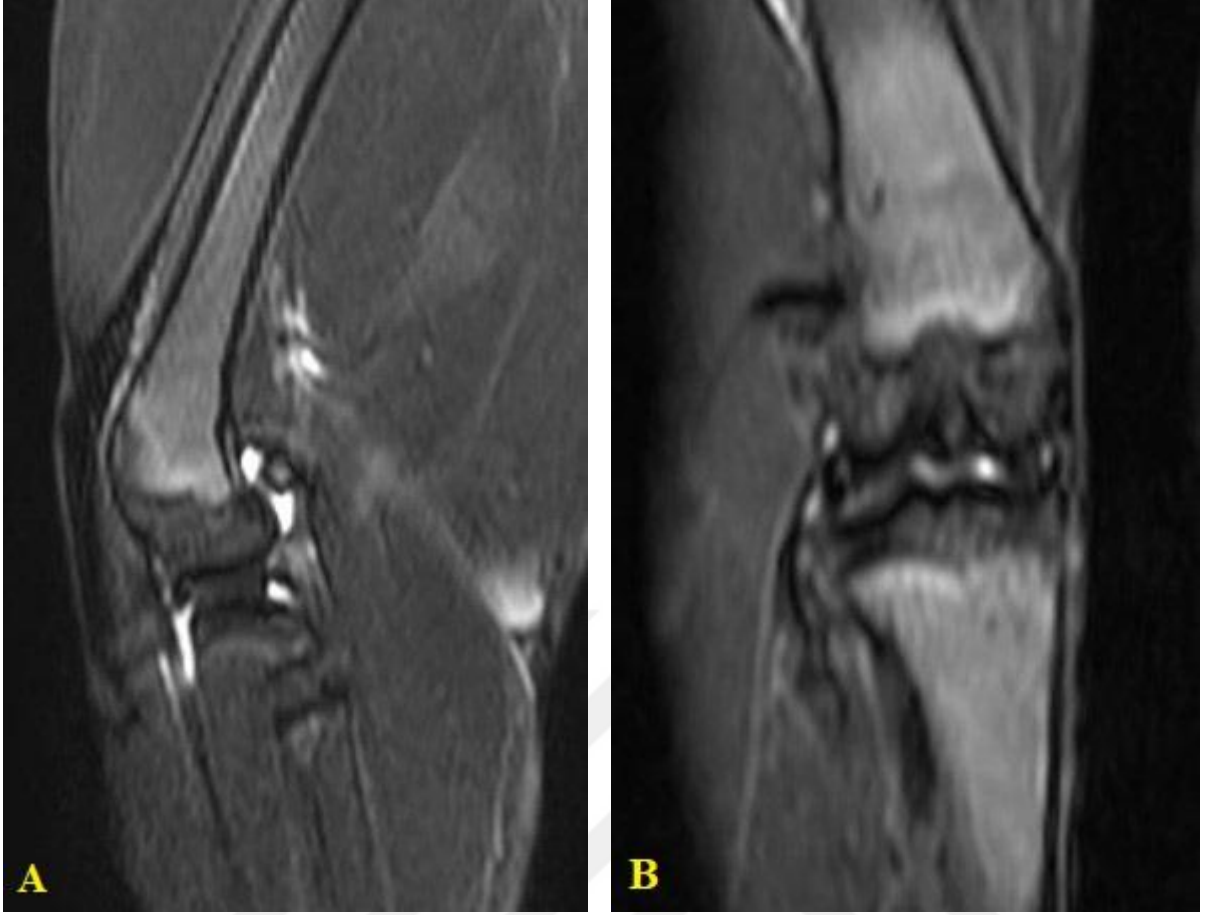
3.5.2. Radyolojik değerlendirilmesi

ÖÇB rüptürü ile tetiklenmiş dejeneratif kıkırdak hasarın tanısı için günümüzde MRG yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda denekler ÖÇB kesi işlemi öncesi; bazal veri elde edilmesi için tüm tavşanlara intraperitoneal yolu ile verilen (Xylasin Bio 2%, 10 mg/kg ve Ketazol %2, 50 mg/kg) sedasyon ile tarafımızca numaralandırılmış biçimde hangi gruba ait olduğu söylenmeden radyolojiye verildi ve diz eklemi MRG (Philips Ingenia 3.0 T, 14-16 mm kesi T₁ ve T₂ sekanslarda, koronal ve sagittal planlarda) çekimi yapıldı. Kısa vadeli grup ameliyat sonrası 5. Hafta ve uzun vadeli grup ise ameliyat sonrası 10. haftada sedasyon altında diz MRG çekimi yapıldı. Tüm denek tavşanlara ait diz eklemi MRG görüntüleri tek uzman radyolog hekim tarafından değerlendirildi. Radyolojik olarak eklem kıkırdağı Dipaola ve arkadaşlarının osteokondral lezyon MRG sınıflaması⁷¹ kriterleri kullanılarak değerlendirildi.

Dipaola ve ark⁷² göre eklem kıkırdak hasarının MRG değerlendirilmesinde Evre 0 normal kıkırdak, Evre 1 kartilaj yüzeyi kalınlaşma ancak kırılma yok. Evre 2 Eklem kartilajda ezilme, Subkondral alanda düşük sinyal değişikliği, Evre 3 eklem kartilajda defekt mevcut. T2’de artmış sinyal değişikliği, Ayrılmamış parça çevresinde ödem sinyal değişikliği ve Evre 4 eklemde serbest parça, Eklem yüzeyinde defekt olmasını tanımlar.

Tablo 3. Dipaola ve arkadaşlarının osteokondral lezyon MRG sınıflaması⁷²

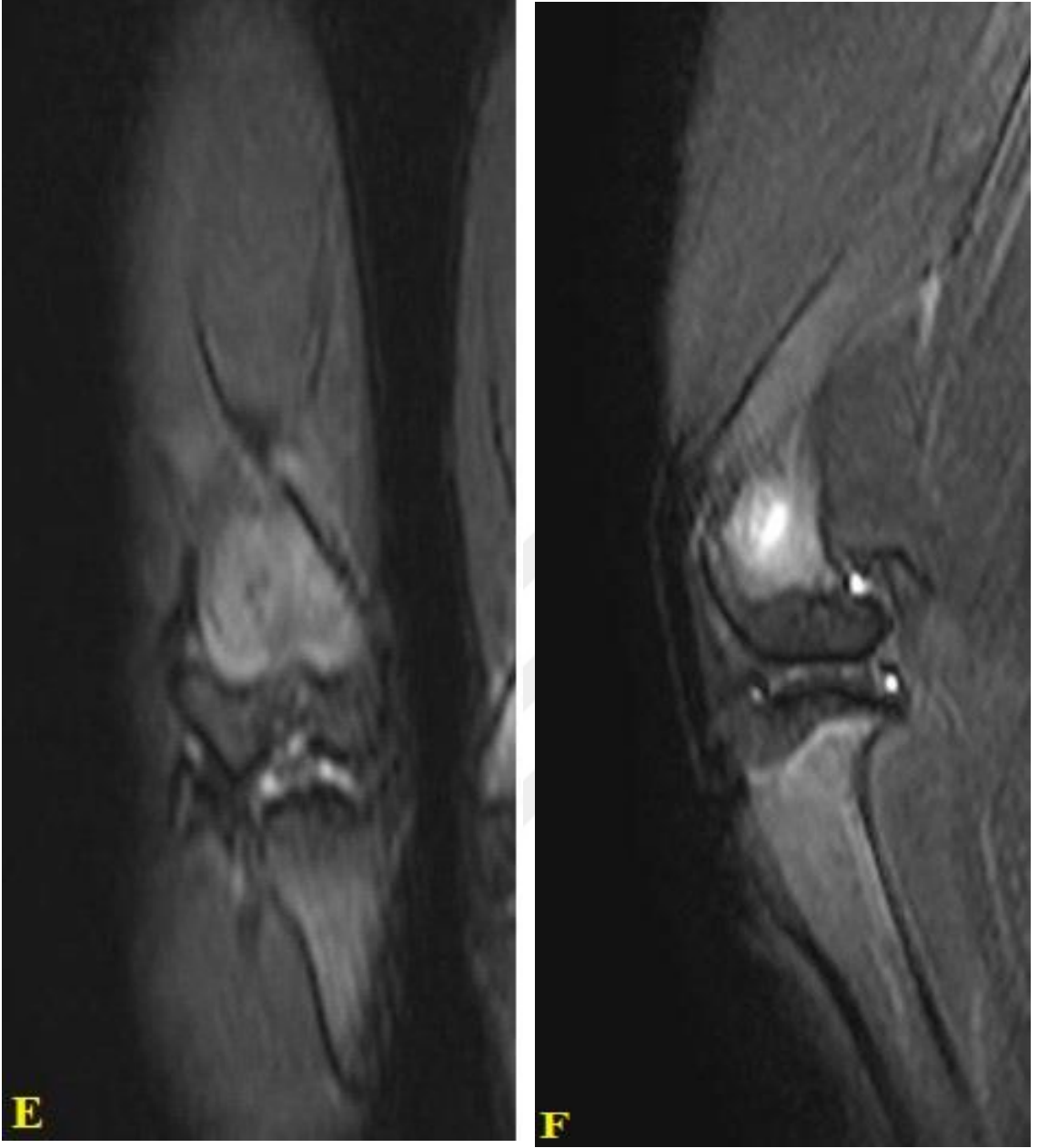
Evre	Dipaola ve arkadaşlarının osteokondral lezyon MRG sınıflaması
Evre 0	Normal kıkırdak
Evre 1	Kartilaj yüzeyi kalınlaşma, Ancak kırılma yok
Evre 2	Eklem kartilajda ezilme, Subkondral alanda düşük sinyal değişikliği
Evre 3	Eklem kartilajda defekt mevcut. T2’de artmış sinyal değişikliği, Ayrılmamış parça çevresinde ödem sinyal değişikliği
Evre 4	Eklemde serbest parça, Eklem yüzeyinde defekt



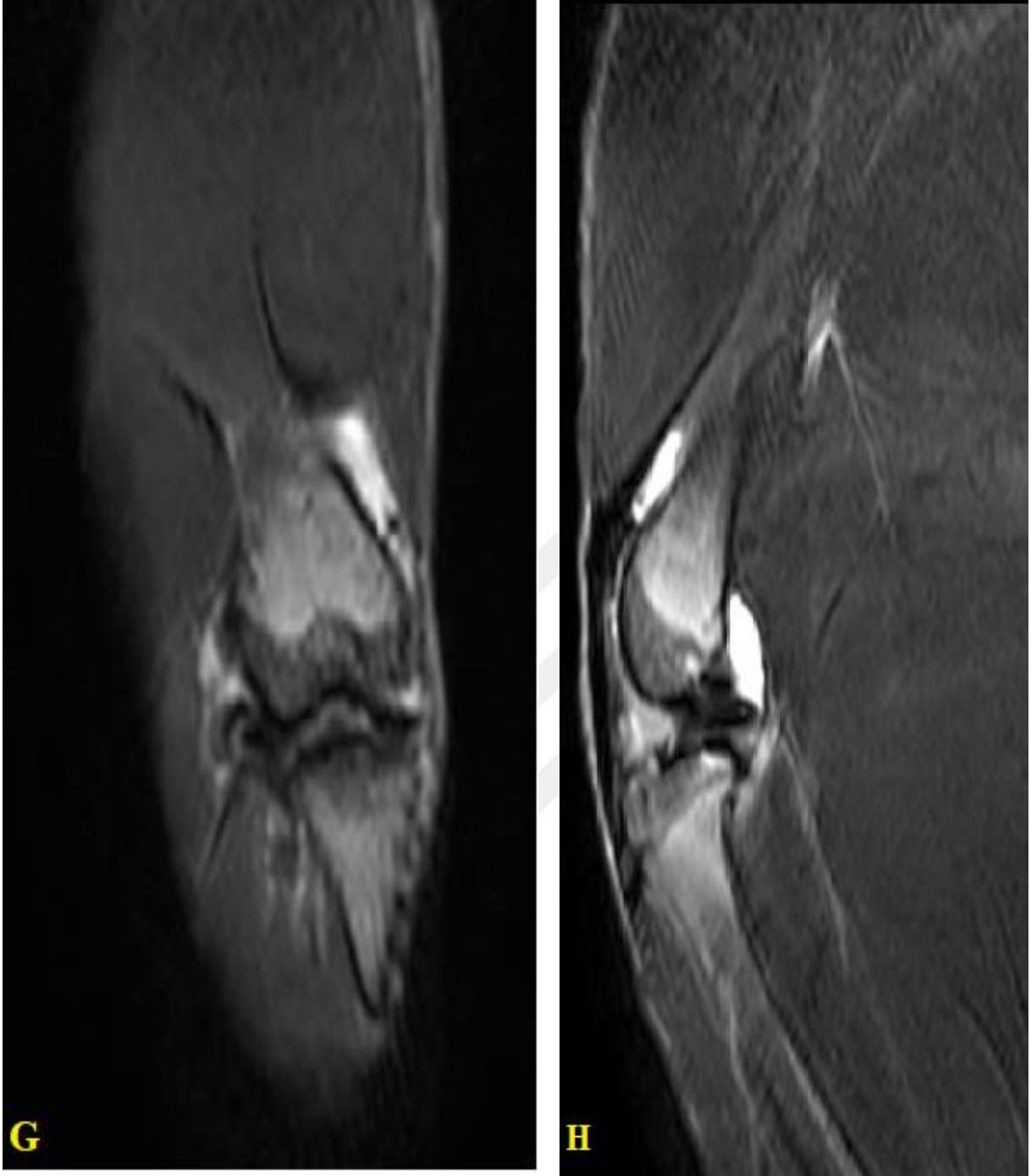
Şekil 19. Polifenol grubu kısa vadeli cerrahi öncesi sağ diz eklemi A:Sagittal ve B: Koronal MRG görüntüsü



Şekil 20. Polifenol grubu kısa vadeli cerrahi sonrası 5. haftada sağ diz eklemi C: Koronal ve D: Sagittal MRG görüntüsü. Kıkırdak devamlılığında belirgin kırılma izlenmemektedir



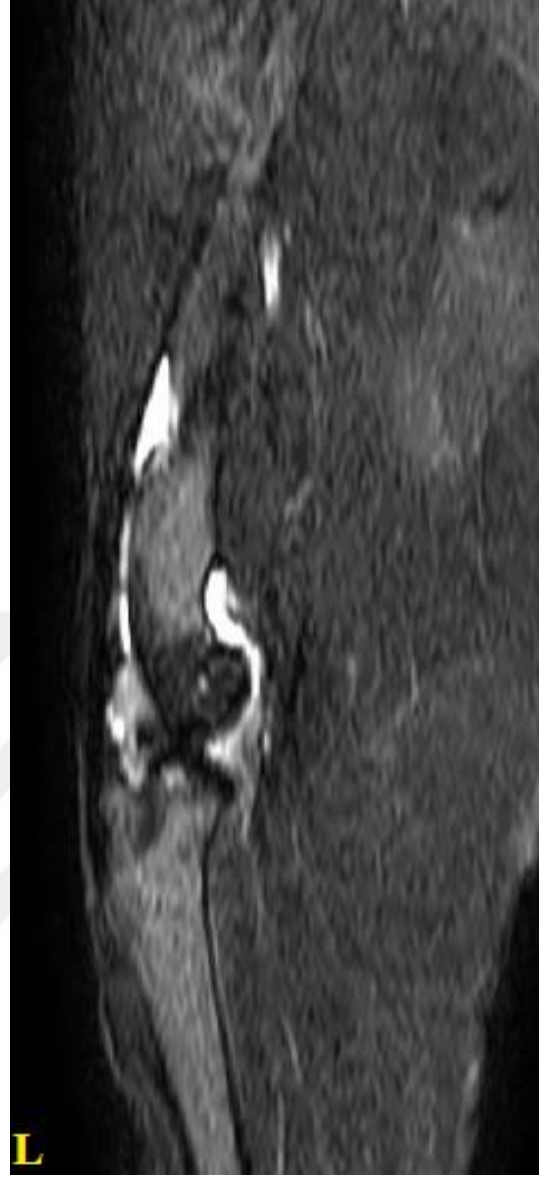
Şekil 21. Polifenol grubu uzun vadeli cerrahi öncesi sağ diz eklemi E: Kronal ve F: sagittal MRG görüntüsü. Normal sınırlarda MRG tetkiki



Şekil 22. Polifenol uzun vadeli grubu cerrahi sonrası 10. haftada sağ diz eklemi G: Koronal ve H: Sagittal plan MRG görüntüsü. Eklem kıkırdağının bütünlüğü korunmuş yer yer kıkırdak fibrilasyonunu andıran bulgular izlenmektedir. Sagittal planda lateral kondilde normal kıkırdak devamlılığı izlenmektedir



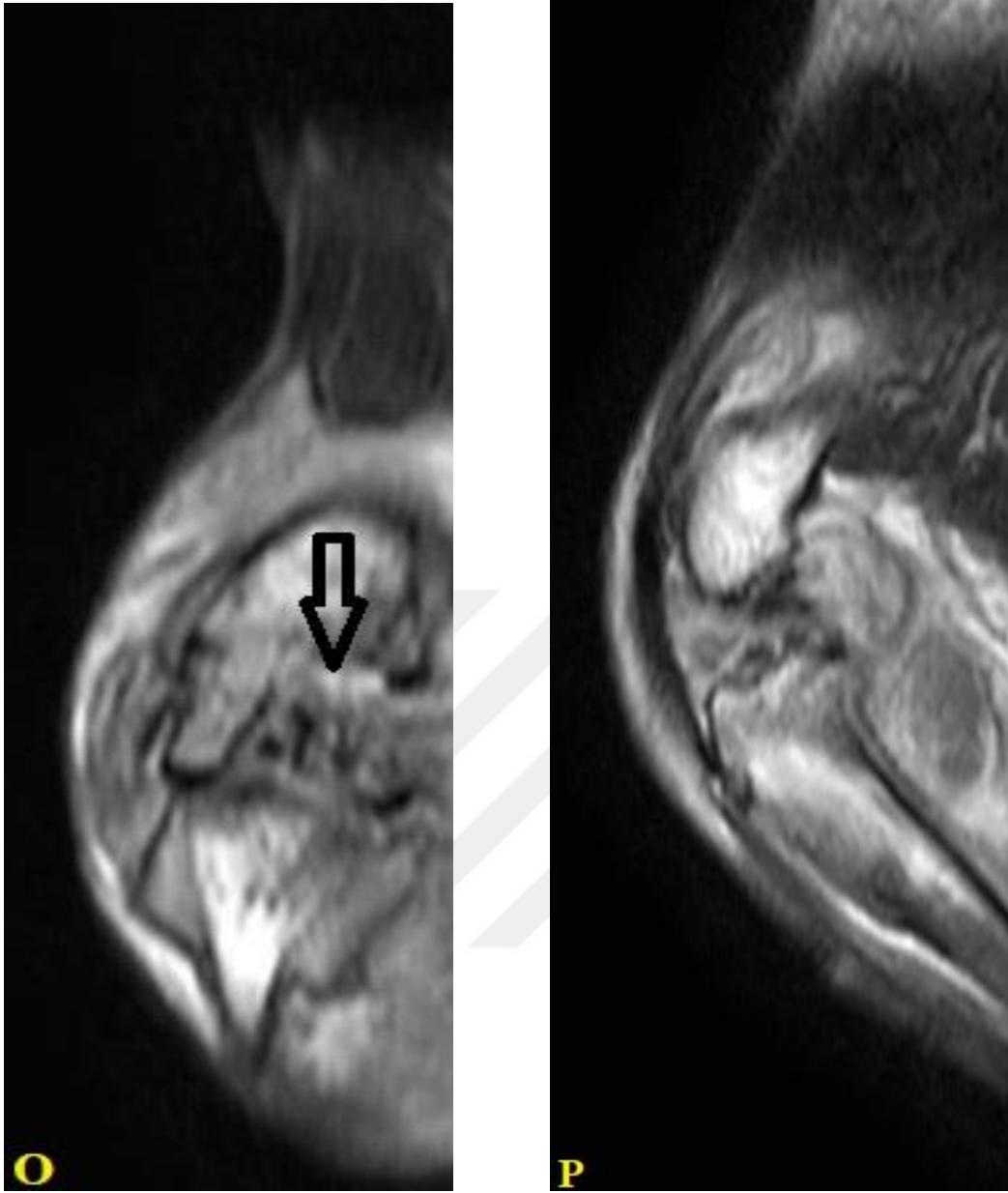
Şekil 23. Kontrol grubu kısa vadeli cerrahi öncesi 5. haftada sol diz eklemi İ: Sagittal ve J: koronal planda normal sınırlarda MRG görüntüsü. Eklem kıkırdağı normal izlenmektedir.



Şekil 24. Kontrol grubu kısa vadeli grubu cerrahi sonrası 5. haftada sol diz eklemi K: Koronal ve L: Sagittal planda MRG görüntüsü. Eklem kıkırdağının bütünlüğü belirgin şekilde bozulmuş olup kıkırdak devamlılığında kırılma ve fibrilasyonunu bulgular izlenmektedir



Şekil 25. Kontrol grubu uzun vadeli cerrahi öncesi 10. haftada sol diz eklemi M: koronal ve N: Sagittal planda normal sınırlarda MRG görüntüsü. Eklem kıkırdağı normal izlenmektedir.



Şekil 26. Kontrol grubu uzun vadeli grubu cerrahi sonrası 10. haftada sol diz eklemi O: Koronal ve P: Sagittal plan MRG görüntüsü. Eklem kıkırdağının bütünlüğü belirgin şekilde bozulmuş olup kıkırdak devamlılığında kırılma ve serbest fragman bulguları izlenmektedir.

3.5.3. Histolojik Değerlendirilmesi

Sakrifikasyon işlemi sonrası elde edilen kısa ve uzun vadeli gruptaki spesmenler tarafımızca numaralandırılmış kutulara %10'lük nötral formol solüsyon içerisine konuldu. Spesmen numaralarının hangi gruplara ait olduğu bilgisi verilmeden Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı laboratuvarına teslim edildi. Spesmenler uzman histolog tarafından makroskopik olarak değerlendirildi ve bloklandı.

Doku parçaları %10'luk tamponlu nötral formaline alınarak bir hafta süreyle tespit edildi. Bir haftanın sonunda akarsuda 8 saat boyunca yıkandı. Daha sonra dokular dekalsifikasyon işlemi için %25'lik Formik asit içerisine alındı. Dekalsifikasyon solüsyonu günlük olarak değiştirildi. Dekalsifikasyon işlemi sonunda, formik asitin giderilmesi amacıyla dokular 8 saat süreyle akarsuda yıkandı. Ardından dokular 0,35 M Sodyum Sülfat içerisine alınarak 3 gün süreyle bekletildi. 3 günün sonunda dokular akarsuda 8 saat boyunca yıkandı. Daha sonra dokulardaki suyu uzaklaştırmak amacıyla derecesi giderek artan etil alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Dekalsifikasyon işleminin ardından dokulara Leica TP 1020 Ototeknikon Cihazı ile Tablo 4'de belirtilen doku takip yöntemi uygulandı.

Tablo 4. Işık mikroskopik doku takip işlemi

Oda sıcaklığında	Formalin	30 dakika
Oda sıcaklığında	%70'lik etil alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	%80'lik etil alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	%90'lik etil alkol	1 saat 30 dakika
Oda sıcaklığında	Saf alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	Saf alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	Saf alkol	1 saat 30 dakika
Oda sıcaklığında	Saf alkol+Ksilol	1 saat
Oda sıcaklığında	Ksilol	1 saat
Oda sıcaklığında	Ksilol	1 saat 30 dakika
60°C'de	Parafin	1 saat
60°C'de	Parafin	1 saat 30 dakika

Blok haline getirilen dokulardan Thermo Scientific Shandon Finesse 325 marka mikrotomla 5 mikron kalınlığında kesitler alındı, deparafinize edildi, hematoksilen–eozin ve Alcian blue-periodic acid schiff (PAS) ile boyanarak kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Olympus BX53 ışıık mikroskobunda incelendi ve fotoğrafları alındı. Hematoksilen-eosin ve Alcian blue/PAS boyamalarından elde edilen veriler Mankin skorlamasında kullanıldı.

Kıkırdak dokudaki histolojik ve histokimyasal değışiklikler, Mankin ve ark¹'nin tanımladığı histopatolojik skorlama sistemine göre: eklem kıkırdak doku tabakalarındaki histolojik yapısal ve hücresel değışiklikler, matriksin Alcian blue/PAS ile boyanma miktarı ve tidemark yapısının bütünlüğü göz önüne alınarak makroskobik olarak değeriendirildi(Tablo 5.).

Mankin histopatolojik skorlama sistemine göre normal eklem kıkırdağı için beklenen puan aralığı 0-1 normal kabul edilmiş olup; hafif, orta, şiddetli osteoartritik değışiklikler için beklenen puan aralıkları ise sırasıyla 2-5, 6-9, 10-14 olarak belirtildi.⁷⁴

Tablo 5. Mankin skorlaması⁷⁴

Kıkırdak yapısı	Puan
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
Alcian blue/PAS ile boyanma	
Normal	0
Hafif derecede düşük	1
Orta derecede düşük	2
İleri derecede düşük	3
Boyanma yok	4
Tidemark Bütünlüğü	
Sağlam	0
Destrüksiyon	1
Toplam puan	14
Normal	0-1
Hafif	2-5
Orta	6-9
Şiddetli	10-14

3.6. Çalışma İstatistik Metodu

Makroskobik görünüm, tidemark bütünlüğü gibi kategorik ölçümler sayı ve yüzde olarak, histoloji toplam puanı ise ortanca ve IQR olarak özetlendi. Kategorik ölçümlerin gruplar arasında karşılaştırılmasında Ki Kare test istatistiği kullanıldı. Histoloji toplam puanının normal dağılım varsayımını sağlayıp sağlamadığı Shapiro Wilk testi ile test edildi. Normal dağılım göstermeyen Histoloji toplam puanını polifenol ve kontrol grupları arasında karşılaştırmada Mann Whitney U testi kullanıldı. Verilerin istatistiksel analizinde IBM SPSS Statistics Versiyon 20.0 paket programı kullanıldı. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0.05 olarak alındı. SPSS referansı: IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.



4. BULGULAR

4.1. Çalışmanın Gross Morfolojik Sonuçları

Sakrifikasyon işlemi sonrası artrotomi yapılan kısa vadeli grubu 5.hafta ve uzun vadeli grubu ise 10. haftada deneklerin tamamı aynı günde gross morfolojik değişiklikleri değerlendirilip verileri kayıt edildi. Gross morfolojik evrelemesinin istatistiksel analizine bakıldığında; Polifenol grubunun hem kısa hem uzun vadede tavşanların tamamı gross morfolojik evrelemesi olarak evre 1 ve evre 2 iken, kontrol grubunun kısa vadede tavşanların % 50'si evre 3 ve evre 4, uzun vadede %57'si evre 3 ve evre 4 olarak tespit edildi (tablo 6.). Gross morfolojik istatistiksel değerlendirilmesinde uzun vadedeki P değeri ($P=0,041$) anlamlı bir değer olarak elde edildi (tablo 6.). Buna karşı gross morfolojik istatistiksel değerlendirilmesinde kısa vadedeki P ($p=0.055$) değeri sınırda anlamlı bir değerdir. Polifenol grubunda hem kısa vadede hem de uzun vadede eklem kıkırdak hasarı ve eklem destrüksyonu yönünden kontrol grubuna göre daha düşük evrede olduğu saptandı.

Tablo 6. Kısa vadeli grupların Gross Morfolojik Sonuçları

Polifenol grubu kısa vade (5 Hafta)		Kontrol grubu kısa vade (5 Hafta)	
Tavşan No	Evre	Tavşan No	Evre
1	1	17	3
3	1	18	4
6	2	20	2
7	1	24	2
9	2	29	4
13	1	31	2
14	2		

Tablo 7. Uzun vadeli grupların Gross Morfolojik Sonuçları

Polifenol grubu uzun vade (10 Hafta)		Kontrol grubu uzun vade (10 Hafta)	
Tavşan No	Evre	Tavşan No	Evre
2	2	21	4
4	1	22	2
5	1	23	3
10	2	25	4
11	1	26	4
12	1	27	2
15	2	30	2
16	2		

Tablo 8. Gross Morfolojik Sonuçların istatistiksel analizi

Gross kıkırdak hasarı	Kısa vadeli			Uzun vadeli		
	Polifenol	Kontrol	P	Polifenol	Kontrol	P
Evre 1	4 (%57)	0 (%00)	0,055	1 (%14)	0 (%00)	0,041
Evre 2	3 (%43)	3 (%50)		4 (%57)	3 (%43)	
Evre 3	0 (%00)	1 (%17)		2 (%29)	1 (%14)	
Evre 4	0 (%00)	2 (%33)		0 (%0)	3 (%43)	

4.2. Çalışmanın MRG Evrelemesi Sonuçları

Sakrifikasyon işlemi öncesi kısa vadeli grubun 5. haftada ve uzun vadeli grubun ise 10. haftada çekilen MRG tetkiklerinin değerlendirilmesine bakıldığında; Polifenol grubunun hem kısa hem uzun vadede tavşanların neredeyse tamamı MRG evrelemesi olarak evre 1 ve evre 2 iken, kontrol grubunun kısa vadede tavşanların % 67 (2/3)'si evre 3 ve evre 4, uzun vadede %43'ü evre 3 ve evre 4'tür (Tablo 9. ve 10.). İstatistiksel değerlendirilmesinde ise Polifenol grubun kısa vadede ve uzun vadede anlamlı olarak saptandı ($p=0.017$ $p=0.014$). Polifenol grubunda hem kısa vadede hem de uzun vadede eklem kıkırdak hasarı, ödem ve radyolojik sinyal değişikliği yönünden kontrol grubuna göre düşük evrede olduğu saptandı (tablo 8 ,9 ve 10.).

Tablo 9. MRG Evrelemesi İstatistiksel Sonuçları

MRG Evrelemesi	Kısa vadeli			Uzun vadeli		
	Polifenol	Kontrol	P	Polifenol	Kontrol	P
Evre 1	6 (%86)	1 (%17)	0,017	4 (%50)	0 (%00)	0,041
Evre 2	1 (%14)	0 (%00)		4 (%50)	4 (%57)	
Evre 3	0 (%0)	3 (%50)		0 (%00)	0 (%00)	
Evre 4	0 (%0)	1 (%16)		0 (%00)	3 (%43)	

Tablo 10. Çalışmanın Kısa Vadeli Grubu MRG Sonuçları

Kısa vadeli grubu Polifenol Tavşan No	Kıkırdak lezyon evresi (MRG)	Radyolojik yorumu
1	Evre 1	Eklemdede effüzyon
3	Evre 1	Eklemdede effüzyon
6	Evre 1	Eklemdede effüzyon
7	Evre 2	Eklemdede effüzyon, Subkondral ödem
9	Evre 1	Eklemdede effüzyon, Kıkırdak sinyal artışı
13	Evre 1	Eklemdede effüzyon
14	Evre 1	Eklemdede effüzyon
Kısa vadeli grubu Kontrol Tavşan No	Kıkırdak lezyon evresi (MRG)	Radyolojik yorumu
17	Evre 3	Artmış effüzyon, Kartilaj defekti, Ayrılmış parça
18	Evre 4	Artmış effüzyon, Kartilaj defekti, Ayrılmış parça
20	Evre 3	Artmış effüzyon, Kartilaj defekti, Ayrılmamış parça
24	Evre 1	Eklemdede effüzyon, Subkondral ödem
29	Evre 2	Eklemdede effüzyon, Subkondral ödem
31	Evre 3	Artmış effüzyon, Kartilaj defekti, Ayrılmamış parça

Tablo 11. Çalışmanın Uzun Vadeli Grubu MRG Sonuçları

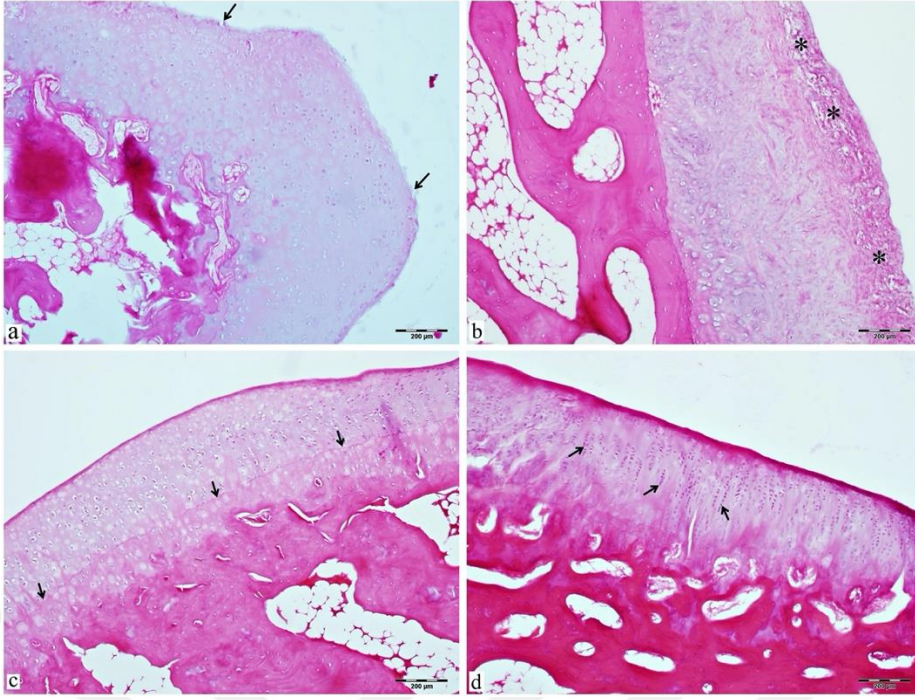
Uzun vadeli grubu Polifenol Tavşan No	Kıkırdak lezyon evresi (MRG)	Radyolojik yorumu
2	Evre 2	Eklemdede effüzyon, Subkondral ödem
4	Evre 3	Artmış effüzyon, Kartilaj defekti, Ayrılmamış parça
5	Evre 2	Eklemdede effüzyon, Subkondral ödem
10	Evre 1	Eklemdede effüzyon, Subkondral ödem
11	Evre 1	Eklemdede effüzyon, Kıkırdak sinyal artısı
12	Evre 1	Eklemdede effüzyon
15	Evre 2	Eklemdede effüzyon, Subkondral ödem
16	Evre 1	Eklemdede effüzyon
Uzun vadeli grubu Kontrol Tavşan No	Kıkırdak lezyon evresi (MRG)	Radyolojik yorumu
21	Evre 2	Eklemdede effüzyon, Subkondral ödem (suboptimal)
22	Evre 2	Artmış effüzyon, Subkondral ödem
23	Evre 4	Artmış effüzyon, Kartilaj defekti, Ayrılmış parça
25	Evre 2	Artmış effüzyon, Subkondral ödem
26	Evre 4	Eklemdede effüzyon, Kartilaj defekti, Ayrılmış parça
27	Evre 2	Eklemdede effüzyon, Subkondral ödem
30	Evre 4	Artmış effüzyon, Kartilaj defekti, Ayrılmamış parça

4.3. Çalışmanın Histolojik Sonuçları

Sakrifikasyon sonrası kısa ve uzun vadeli gruptaki spesmenlerin histolojik değerlendirilmesinde; Osteoartrit modeli oluşturulan ve herhangi bir tedavi uygulanmayan deney kontrol grubuna ait eklem kıkırdağı örneklerinin hematoksil-eosin ile boyanan kesitlerinde, kıkırdak matriksinde kollajen diziliminde düzensizleşme ve superfisyal zonda fokal fibrilasyon gözlemlendi.

Hyalin kıkırdak yapısındaki eklem kıkırdağının transizyonal ve radyal zonunda belirgin herhangi bir hasar görülmezken, superfisyal zonun kondrositlerinde hafif deformasyon ve düzensizlik bulunmaktaydı. Eklem kıkırdağında tidemark zonunda kondrosit organizasyonunun ve matriks düzenleniminin bozulduğu ve bütünlüğü bozulan tidemark zonunun görünürlüğünün azaldığı dikkat çekti. Subkondral kemik, trabeküler kemik uzantıları ve kemik iliği kavileriyle birlikte normal görünümde izlenmekteydi (Şekil 31. 1a ve 1b).

Osteoartrit modeli oluşturulan ve Polifenol tedavisi uygulanan tedavi grubuna ait eklem kıkırdağı örneklerinin hematoksil-eosin ile boyanan kesitlerinde, özellikle hasarlı bölgeye yakın kısımlarda hipersellüler kıkırdak bölgeleri gözlemlendi ve bu durum kondrositlerin kompansasyona direnç göstergesi olarak değerlendirildi. Radyal zonda klon (izogen grup) formasyonu oluşturan kondrositler dikkat çekerken, lakünalar içinde yer alan kondrositlerin proliferasyonu ve ekstrasellüler matriksin düzenli formasyonu ile tidemark zonunda belirginleşme olduğu ve normal zon yapısının sağlandığı gözlemlendi. Superfisyal zonda yeni kıkırdak oluşumu ile birlikte yüzeyel erozyonun azaldığı görüldü (Şekil 31. 1c ve 1d).



Şekil 27. Osteoartrit oluşturulan ve herhangi bir tedavi uygulanmayan deney kontrol grubuna ait (a,b) hematoksilin-eozin (H&E) ile boyanan eklem kıkırdağı kesitlerinin ışık mikroskopik görüntüsü. (a) Osteoartrite bağlı olarak, eklem kıkırdağının superfisyal tabakasında bozulma ve sınırlı yüzeysel erozyon (ok), (b) superfisyal zonda fokal fibrilasyon (*) izlenmektedir. Osteoartrit oluşturulan ve polifenol tedavisi uygulanan tedavi grubuna ait (c,d) hematoksilin-eozin (H&E) ile boyanan eklem kıkırdağı kesitlerinin ışık mikroskopik görüntüsü. (c) Tedavi ile birlikte tidemark zonunda belirginleşme (ok) (d) kondrositlerin kompansasyona gösterdikleri direnç klon (izogen grup) formasyonu (ok) oluşturmalarıdır.

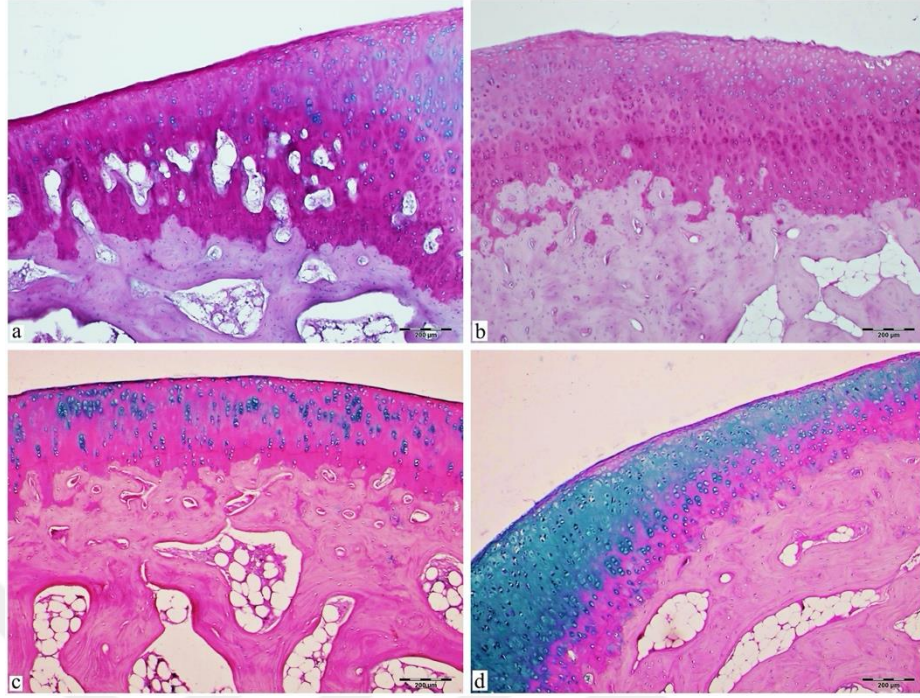
Osteoartrit modeli oluşturulan ve herhangi bir tedavi uygulanmayan kontrol grubuna ait eklem kıkırdığı örneklerinin AB/PAS ile boyanan kesitlerinde, mavi ile boyanma derecesinin oldukça az olduğu izlendi ve osteoartrit ile hasar görmüş eklem kıkırdığında kıkırdak matriksinin azaldığı sonucuna varıldı (Şekil 32. 2a ve 2b).

Osteoartrit sebebiyle oluşan immobilizasyon ile bağlantılı olarak, patolojik yerleşimli kıkırdak bölgelerindeki mavi rengin görünümü, asidik glikozaminoglikanlardan zengin yeni oluşan kıkırdak dokuyu gösterir. Osteoartrit modeli oluşturulan ve Polifenol tedavisi uygulanan tedavi grubuna ait eklem kıkırdığı örneklerinin AB/PAS ile boyanan kesitlerinde ise, deney kontrol grubuna göre eklem kıkırdak matriksinin mavi ile boyanma derecesinin arttığı gözlemlendi. Polifenol tedavisi ile birlikte mavi ile boyanan yeni kıkırdak matriksi ekstrasellüler komponentleriyle birlikte normal görünümde izlendi. Kondrositlerin izogen grup formasyonu gösterdikleri de dikkat çekti (Şekil 32. 2c ve 2d).

Mankin ayrıntılı skorlamasına göre; Polifenol ve kontrol gruplar arasında makroskobik görünüm, kondrosit hücre sayısı, Alcian blue/PAS boyama ve Tidemark bütünlüğü ve Mankin skoru açısından hem kısa vadede ($p=0,005$, $p=0,028$, $p=0,001$, $p=0,005$) hem de uzun vadede ($p=0,002$, $p=0,014$, $p<0,001$, $p=0,200$) istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (Tablo 11., 12.).

Mankin OA şiddeti skorlamasına göre; kısa vadede Polifenol grubunun tamamı normal ve hafif kategorisinde iken, kısa vadeli kontrol grubunun %33'ü orta ve %67'si ise şiddetli bulgular kategorisinde saptandı (tablo 11.). Uzun vadede ise Polifenol grubunun tamamı hafif şiddet kategorisinde iken, kontrol grubunun %14 hafif, %29 orta ve %57'si şiddetli OA bulgular kategorisinde saptandı (tablo 13.).

Polifenol grubunun tümü kısa vadede ve uzun vadede normal ve hafif olarak puanlanırken, kontrol grubunun kısa vadede tamamı, uzun vadede ise neredeyse tamamı orta ve şiddetli olarak puanlanmıştır. Toplam puan olarak değerlendirildiğinde kısa vadede Polifenol grubunun medyan puanı 1 iken kontrol grubunda medyan puanı 11.5 olarak elde edilmiştir. Uzun vadede ise polifenol grubunda medyan puan 2 iken kontrol grubunda ise 10 olarak elde edilmiştir.



Şekil 28. Alcian blue/PAS ile boyanan eklem kıkırdağı kesitlerinin ışık mikroskopik görüntüsü. Alcian mavisi kartilajinöz dokuya özgüdür, koyu pembe periyodik asit Schiff boyaması ise subkondral kemiği gösterir. Osteoartrit oluşturulan ve herhangi bir tedavi uygulanmayan deney kontrol grubuna ait (a,b) eklem kıkırdağında sınırlı alanda mavi ile boyanmış yeni kıkırdak dokusu izlenmektedir. Bar: 200µm. Osteoartrit oluşturulan ve polifenol tedavisi uygulanan tedavi grubuna ait (c,d) eklem kıkırdağında, tedaviye bağlı olarak mavi ile boyanan yeni oluşmuş kıkırdak dokunun artışı görülmektedir. Bar: 200µm.

Tablo 12. Histolojik değerlerin Mankin Skorlama Sonuçları

Denek eklem kıkırdaklarının ayrıntılı Mankin skorları						
Tavşan No		Makroskopik Görünüm	Kondrosit Hücre Sayısı	Alcian blue/PAS Boyama	Tidemark Bütünlüğü	Denek puanı
1	Polifenol grubu Kısa vadeli	0	1	0	0	1
3		0	1	0	0	1
6		1	2	0	0	3
7		1	0	0	0	1
9		1	2	0	0	3
13		0	1	0	0	1
14		2	1	1	0	4
2	Polifenol grubu Uzun vadeli	2	1	1	0	4
4		0	2	0	0	2
5		1	1	0	0	2
10		0	1	0	0	1
11		1	2	0	0	3
12		1	0	0	0	1
15		0	2	0	0	2
16		1	2	0	0	3
17	Kontrol grubu Kısa vadeli	4	3	3	1	11
18		5	0	2	0	7
20		5	3	2	1	12
24		6	3	2	1	14
29		5	3	3	1	12
31		4	2	2	1	9
21	Kontrol grubu Uzun vadeli	5	3	3	0	11
22		4	0	2	0	8
23		5	3	2	0	10
25		6	3	3	0	12
26		4	3	3	1	11
27		5	2	2	0	4
30		3	3	2	1	9

Tablo 13. Mankin skortlama OA şiddeti derecesi Sonuçları

Polifenol grubu kısa vade			Kontrol grubu kısa vade		
Tavşan No	Mankin puanı	OA dereresi	Tavşan No	Mankin puanı	OA dereresi
1	1	Normal	17	11	şiddetli
3	1	Normal	18	7	Orta
6	3	Hafif	20	12	şiddetli
7	1	Normal	24	14	şiddetli
9	3	Hafif	29	12	şiddetli
13	1	Normal	31	9	Orta
14	4	Hafif			
Polifenol grubu uzun vade			Kontrol grubu uzun vade		
Tavşan No	Mankin puanı	OA dereresi	Tavşan No	Mankin puanı	OA dereresi
2	4	Hafif	21	11	şiddetli
4	2	Hafif	22	8	Orta
5	2	Hafif	23	10	şiddetli
10	1	Hafif	25	12	şiddetli
11	3	Hafif	26	11	şiddetli
12	1	Hafif	27	4	Hafif
15	2	Hafif	30	9	Orta
16	3	Hafif			

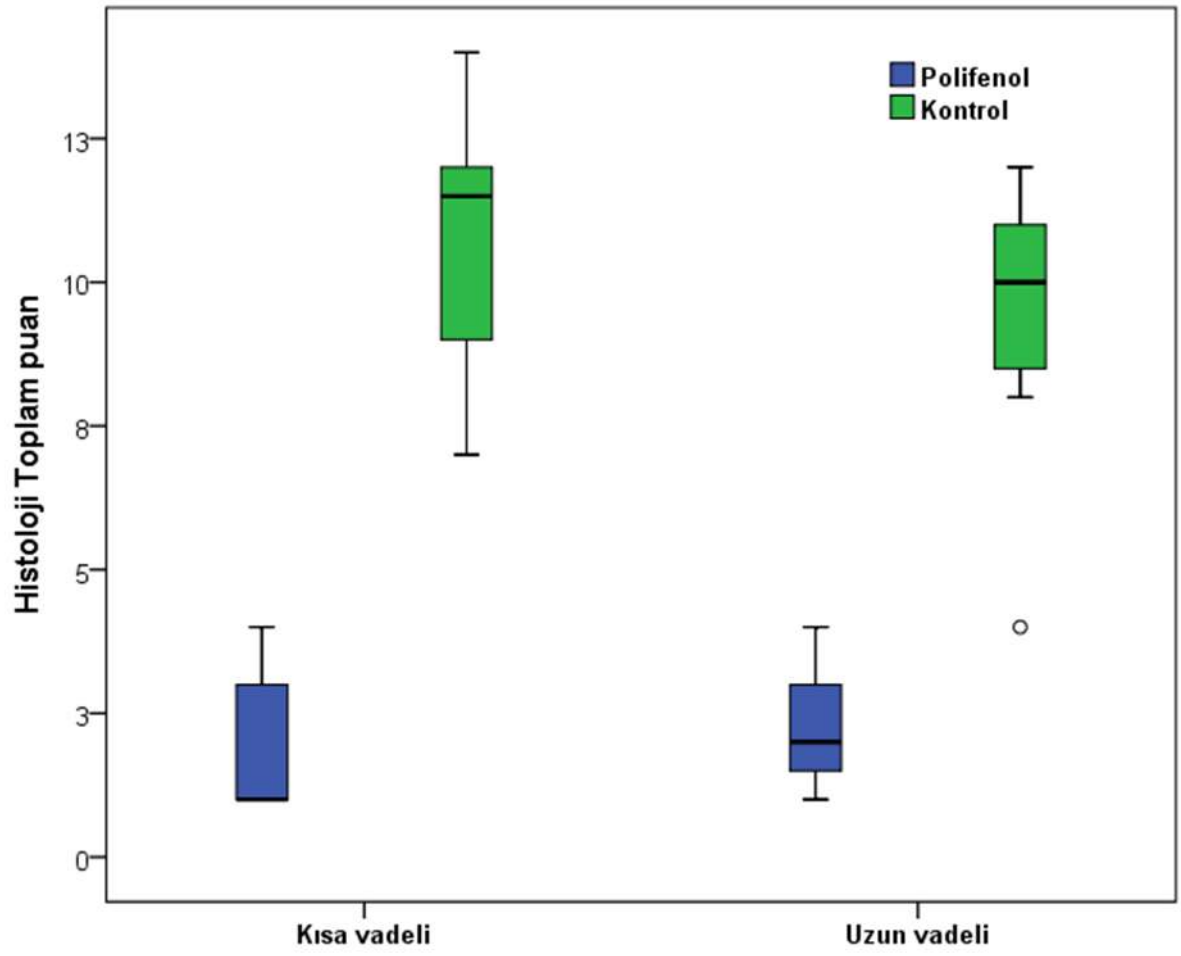
Tablo 14. Histolojik değerlendirmesinin İstatistiksel Sonuçları

Parametreler	Kısa vadeli			Uzun vadeli		
	Polifenol	Kontrol	P	Polifenol	Kontrol	P
Makroskopik Görünüm						
0	3 (%43)	0 (%00)	0,005	3	0	0,002
1	3 (%43)	0 (%00)		4	0	
2	1 (%14)	0 (%00)		1	0	
3	0 (%0)	0 (%00)		0	1	
4	0 (%0)	2 (%33)		0	2	
5	0 (%0)	3 (%50)		0	3	
6	0 (%0)	1 (%17)		0	1	
Kondrosit Hücre Sayısı						
0	1 (%14)	1 (%17)	0,028	1 (%12)	1 (%14)	0,014
1	4 (%57)	0 (%00)		3 (%38)	0 (%00)	
2	2 (%29)	1 (%17)		4 (%50)	1 (%14)	
3	0 (%00)	4 (%67)		0 (%0)	5 (%72)	
Alcian blue/PAS Boyama						
0	1 (%14)	1 (%17)	0,001	1 (%14)	1 (%17)	< 0,001
1	4 (%57)	0 (%00)		4 (%57)	0 (%00)	
2	2 (%29)	1 (%17)		2 (%29)	1 (%17)	
3	0 (%00)	4 (%67)		0 (%0)	4 (%67)	
Tidemark Bütünlüğü						
0	7 (%100)	1 (%17)	0,005	8 (%100)	5 (%71)	0.002
1	0 (%000)	5 (%83)		0 (%000)	2 (%29)	

Tablo 15. Histolojik OA Şiddeti istatistik analizi

	Kısa vadeli			Uzun vadeli		
	Polifenol	Kontrol	P	Polifenol	Kontrol	P
Histoloji puanlama						
Normal	4 (%57)	0 (%00)	0,001	2 (%25)	0 (%00)	0,004
Hafif	3 (%43)	0 (%00)		6 (%75)	1 (%14)	
Orta	0 (%00)	2 (%33)		0 (%00)	2 (%29)	
Şiddetli	0 (%00)	4 (%67)		0 (%00)	4 (%57)	
Histoloji Toplam puan						
Medyan (IQR)	1 (2)	11,5 (3)	0,001	2 (1,5)	10 (3)	<0,001

IQR: 75. Persentil – 25. Persentil



Şekil 29. Histolojik toplam puan değerlendirilmesinde Polifenol grubu hem kısa vadede (5 hafta) hem de uzun vadede kontrol grubuna göre daha düşük puan almıştır.

5. TARTIŞMA

Osteoartrit her toplumda sık görülen, inflamatuvar olmayan özellikle yaşlı hastalarda ağrı ve sakatlığa neden olan progresif bir hastalıktır⁷⁵. Özellikle sinoviyal eklemlerin etkilenmesiyle önemli mobilizasyon sorunlarından biri olarak bilinmektedir. Eklem kıkırdak hasarı, osteofitler, subkondral skleroz ve kistik değişikliği ile beraber sinoviyal membran ve eklem kapsülünün biyokimyasal ve morfolojik değişimleri ile karakterize multifaköriyel etiyojisi olan kronik dejeneratif bir bozukluktur⁷⁶. 25 yaşın üstündeki insanların %15'ini, 65 yaşın üstündeki insanların %50'sini etkileyen ciddi bir sağlık sorunudur⁷⁷. Toplumdaki sıklığı, ortalama yaşama süresinin uzaması, obezite ve sedanter yaşam tarzının yaygınlaşması gibi nedenlerle giderek artmaktadır. Sosyo-ekonomik önemli kayıplara yol açan hastalığın tedavisi bu nedenle önem kazanır⁷⁸.

OA histopatolojik olarak ekstrasellüler matrikte proteoglikan yapısında bozulma, kollajenin ağ yapısında bozulma, kondrosit sayısında azalma sonrası eklem yüzeyinde fissürler, fibrilasyonlar, ülserasyonlar ve tidemarkta damarlanma artışı ile karakterize ve dengenin katabolik yönde bozulması ile oluşan eklem hastalığıdır^{79,80}. Hastalık patogeneğinde etkili olan yapım ve yıkımla beraber ilerleyen inflamatuvar mediyatörlerin hastalık progresyonunda etkili olduğu yapılmış olan deneysel çalışmalarla gösterilmiştir^{81,82}. Bu inflamatuvar süreçlerde özellikle TNF- α , IL-1 gibi proinflamatuvar sitokinler ve kıkırdak ekstrasellüler matriks (ESM) yıkımına yol açan MMP' ler önemli rol oynamaktadır. Kıkırdak dokudaki bu patolojik süreçte kondrositlerden NO salınımı artmakta ve NO bu proinflamatuvar sitokinlerin çoğalmasına sebep olmaktadır. Özellikle bu iki sitokin kendilerinin ve diğer inflamatuvar sitokinlerin sentez ve salınımlarının artmasına ve sonucunda kıkırdak hasarına neden olmaktadır^{83,84}.

Osteoartrit için günümüzde birçok konservatif ve cerrahi tedavi seçenekleri bulunmaktadır. Fizik tedavi, yaşam tarzının düzenlenmesi, eklem içi enjeksiyonlar ve büyük kısmını NSAİD'lerin oluşturduğu ilaç tedavisi konservatif tedaviyi oluşturmaktadır. Erken evrelerde tedavi genellikle semptomları gidermeye yöneliktir, fakat ileri evrelerde eklem hasarı ilerlediğinde fonksiyonu artırmak ve ağrıyı azaltmak için cerrahi tedaviye başvurulmaktadır^{85,86}. Günümüzde tıbbi bitkiler bir çok alanda kullanılmaktadır (Gıda, kozmetik, vs.). Bu bitkilerden üretilen ürünler sıklıkla oral yolla veya topikal olarak kullanılmaktadır.

Zeytinyağı ise ülkemizde daha çok taze veya sızma yağ şeklinde yemeklerde, yara iyileştirici ve ağrı kesici etkisi ile bilenen kantaron bitkisi ile kombine romatizmal ve yanık yaraların iyileşmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bunun sonucunda ülkemizde zeytin bitkisi daha çok oral olarak alınmış olmaktadır. Literatür ışığında sızma zeytinyağının diyet şeklinde uygulamasıyla kondroprotektif özelliğine dair kanıtlar mevcuttur. Çalışmamızda farklı olarak sızma zeytinyağında bulunan polifenol bileşenlerinin kondroprotektif, antiinflamatuvar ve antimikrobiyal özelliklerinden dolayı insanlara faydasını bekleyerek yaptığımız bu çalışmamızda intraartiküler uygulanmıştır.

Bakhaat, Gamal ve ark. tarafından 2014 yılında yapılan bir çalışmada immobilizasyonla tetiklenen OA fare modelinde; zeytinyağı ile düzenlenen diyet ile polifenol bileşenlerinin OA’te bağlı oluşan radyolojik değişikliklerinin azaltıldığı gösterilmiştir. Ayrıca OA’in dinamik süreci sırasında kıkırdak yapısında bozulma ve degradasyonundan sorumlu olan IL-6, TNF-alfa ve IL-1beta gibi inflamatuvar sitokinlerinin azaldığı ispat edilmiştir⁸⁷.

Mohammad Yunus Ansari ve ark. tarafından 2020 yılında yapılan bir çalışmada; deneysel hayvan osteoartrit modelinde polifenol bileşenlerinin potent antioksidan ve antiinflamatuvar etkisi ile radikal oksijen türlerinin (ROS) tetiklediği inflamatuvar sitokinlerinin inhibisyonu ile kondroprotektif özellikte olduğu gösterilmiştir⁸⁸. Maruyama Takuma ve ark. tarafından 2018 yılında yaptıkları çalışmasında; deneysel fare modelinde oral zeytin yaprağı tozu uygulamasıyla Hyaluronan molekülünün inhibisyonu ile eklem kıkırdağındaki hasarın azaldığı sonucuna varılmıştır. Hyaluronan molekülünün sinoviyal hücrelerde metabolize olup OA semptomlarına neden olduğu düşünülmektedir⁸⁹.

Giuseppe Musumeci ve ark. tarafından 2013 yılında yapılan bir deneysel OA rat modelinde; ÖÇB kesisi ile indüklenen akut osteoartritin, sızma zeytinyağı diyet ile histomorfometrik, immünohistokimyasal, western blok ve biyokimyasal analizler sonucu in-vivo olarak lubrisin düzeyinde artış ve interlukin-1 düzeyinde azalma ile zeytinyağı diyetinin kondroprotektif özelliği olduğu sonucuna varılmıştır⁹⁰. Bu çalışmanın histomorfometrik değerlendirmesinde Mankin skorlama sistemi kullanılmış olup kartilaj gösterilmiştir ancak kıkırdak rejenerasyonu ile ilgili bilgi bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda sızma zeytinyağı intraartiküler uygulanmış olup Mankin skorlamasına göre değerlendirilmiştir. Çalışmamızda polifenol uygulanan deneklerimizin morfolojik ve histolojik değerlendirmesinde kontrol grubuna göre hematoksilen-eosin ile boyanan kesitlerinde, özellikle hasarlı bölgeye yakın kısımlarda hipersellüler kıkırdak bölgeleri gözlemlendi ve bu durum kondrositlerin kompensasyona direnç göstergesi olarak değerlendirildi.

Giuseppe Filardo ve ark. tarafından 2020 yılında yapılan bir çalışmada; 11 meta-analizde 34 kontrol randomize çalışma değerlendirilmiş ve gonartroza bağlı semptomları olan hastalara intraartiküler PRP uygulanmıştır. PRP ile kontrol grupları arasında 6. ve 12. ay takiplerinde VAS ve IKDS skorlarında; PRP'nin gonartroza bağlı oluşan ağrı semptomlarının giderilmesinde intraartiküler steroid, HA ve plasebodan daha etkin bir intraartiküler ajan olduğu sonucuna varılmıştır⁹⁶. Mao Hong ve ark. tarafından 2021 yılında yapılan bir benzer çalışmada PRP'nin diz osteoartrit septomatik tedavisinde diğer intraartiküler ajanlar ve plaseboya göre etkin bir yöntem olmakla beraber 1. ve 3. aylar gibi kısa vadede tekrarlayan dozlardaki uygulamasında tek doz PRP arasında anlamlı fark olmadığı gösterilmiştir⁹⁷.

Günümüzde OA'te bağlı oluşan kıkırdak hasarının rejenerasyonu ile ilgili çalışmalar hızla devam ederken, bu meta-analiz çalışmasında PRP'nin kıkırdak restorasyonu ve kondrojenik özelliklerinden bahsedilmemektedir.

Kwon Dong Rak ve ark. tarafından 2012 yılında yapılan bir çalışmada kollajenaz enzimi ile indüklenen OA tavşan modelinde; intraartiküler PRP uygulamasının histolojik ve gross morfolojik ölçüm skorlarının izotonik SF grubuna göre daha düşük olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca PRP'nin kondroprotektif özelliği gösterilmiştir⁹⁸. Çalışmamız sonuçlar bakımından benzer nitelikte olup farklı olarak ÖÇB kesisi zemininde oluşturulan OA tavşan modelinde; intraartiküler polifenolden zengin zeytinyağı uygulamasıyla kontrol grubuna göre histomorfometrik ve gross morfolojik yönünden daha düşük puanla istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermekle beraber radyolojik olarak da sonuçların anlamlı olduğunu gösterdik. Oksidatif stres ve ÖÇB rüptürü gibi bozulmuş eklem kinematiği durumlarında, OA'ı tetikleyen etkenlerin varlığı nedeniyle kondrositler apoptoza uğrayabilmektedir. Dolayısıyla kondrositlerin apoptoz süreci OA'in predispozan faktörlerinden biri olarak düşünülmektedir. Patel Sandeep ve ark. tarafından 2022 yılında yapılan bir domuz modeli deneysel çalışmada; ağırlığa bağlı spontan oluşan OA tedavisinde tekrar dozlarda intraartiküler PRP uygulaması ile kıkırda üzerinde caspaz 3 enzim inhibisyonu ile apoptoz azaltıcı etkisi ve kısmen kondrosit rejenerasyonu ile kondroprotektif olduğu sonucuna varılmıştır⁹⁹.

Luis Diaz-Gallego ve ark. tarafından 2005 yılında yapılan deneysel bir çalışmada; ÖÇB kesisi ile oluşturulan dejeneratif tavşan modelinde; kısa (5 hafta) ve uzun vadeli (10 hafta) olarak intraartiküler HA uygulaması ile eklem kıkırdağında gross morfolojik ve in-vitro kültür ortamında CO₂ ve nitrik oksit (NO) değerlerinin azaldığını dolayısıyla apoptoz önleyici etkisi ile kondrosit ölümünü azaltarak kondroprotektif özellikte olduğu sonucuna varılmıştır¹⁰⁰.

Çalışmada intraartiküler uygulanan HA kondrosit apoptozunu azaltarak dolaylı kondroprotektif özellik göstermekle birlikte kondrosit rejenerasyon etkisi gösterilmemiştir.

Yoshioka M. ve ark. tarafından 1996 ve 1997 yıllarında yaptıkları iki deneysel tavşan çalışmasına göre ÖÇB rüptürü ile tetiklenen akut dejenerasyon süreci 4. haftalarda başlar ve 8-9. haftalarda NO artışı ile şiddetlenir^{70,101}.

Bizim çalışmamızdaki kontrol grubunun sonuçları bu çalışma ile uyumlu sonuç gösterdi. Ancak farklı olarak polifenol grubunun sonucu yapılan tüm ölçümlerde daha düşük dejeneratif puan almıştır. Ryo Furuuch ve ark. tarafından 2018 yılında yaptıkları bir çalışmada Polifenol bileşenlerinin ROS ve NO düzeylerini önemli ölçüde azaltarak hücreleri oksidatif stresten koruyucu nitelikte olduğu sonucuna varılmıştır¹⁰². Bu çalışma bizim çalışmamızı destekler niteliktedir. Çalışmamızda benzer olarak OA indüklenmesinin 10. Haftasında, Polifenol grubunda histolojik olarak eklem kıkırdığı yapısını koruyarak, kıkırdığın normal hemostazına devam etmesiyle, basıya uğran bölgelerde kıkırdak resjenerasyonu ve restorasyonu ile zeytinyağının kondroprotektif özellikte olduğunu gösterdik.

Literatüre bakıldığında HA, PRP, intraartiküler steroid uygulaması ile yapılan çalışmaların çoğunda asıl etkisinin hastanın ağrısının azalması, VAS ve IKDS skorların azalması yönünde sonuçlar elde edilmiştir. Bazı çalışmalar yukarıda belirtilen ajanların intraartiküler uygulamasıyla, oluşturulan OA modellerinde kontrol gruplara göre kondroprotektif özellikte olduğu karşımıza çıkmaktadır^{103,104}.

Bazı çalışmalarda HA ve PRP kombine olarak intraartiküler uygulamasıyla tek başına uygulamalarına oranla daha iyi hasta memnuniyeti sağladığına dair veriler mevcuttur¹⁰². Yüksek molekül ağırlıklı çapraz bağlanmış HA ve ozon gazı emdirilmiş HA deneysel çalışmalarında, tek başına HA uygulamalarına göre daha etkin kondroprotektif olduğu sonucuna varılmıştır^{105,106}. Lee D. Kaplan ve ark. tarafından 2009 yılında yapılan bir deneysel koyun parsiyel kıkırdak lezyonu çalışmasında; erken dönemde akut parsiyel kıkırdak hasarının onarımında uygulanan tekrar dozlarda intraartiküler HA'ın kıkırdak iyileşmesinde etkin bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır¹⁰⁷. Literatüre bakıldığında dejeneratif OA hastalık seyrini değiştiren, kıkırdak restorasyonu ve özellikle kıkırdak rejenerasyonu gibi esas tedavi yöntemler ile ilgili çok az çalışma karşımıza çıkmaktadır.

Çalışmamızın radyolojik değerlendirilmesinde indüklenerek oluşan OA'ye bağlı kıkırdak ülserasyon ve degradasyon bulguları daha çok medial femoral eklem yüzeyinin lateral bölgesinde oluştuğunu gördük. Ancak bazı deneklerin MRG görüntülerinde her iki kondilin etkilendiği görülmesine rağmen gross morfolojik değerlendirilmesinde, deneklerin tamamına

yakınında oluşan hasarın sadece medial femoral kondilin lateral bölgesinde olduğu görüldü ve bu farklılıklar MRG'a bağlı oluşan agumentasyon olarak değerlendirildi.

Histolojik değerlendirme, kas-iskelet sisteminde uzman bir patolog tarafından yapıldı. Tüm preparatlar aynı gün içerisinde ark arkaya değerlendirilerek oluşabilecek hatalı sonuçların önüne geçildi. Çalışmamıza standart Hematoksilen-Eosin'e ek olarak Alcian blue-periodic acid Schiff (AB/PAS) boyaması dahil edildi. AB/PAS ile boyanan eklem kıkırdığı; kartilajınöz dokuya spesifik olarak, kıkırdak matriksinde glikozaminoglikanlara ve glikoproteine bağlanan Alcian blue ile mavi renkte görünürken, subkondral kemik PAS ile koyu pembe renkte ayırt edilmektedir. Böylece skrolama sistemimizin parametrelerinden olan kondrosit ve matriks komponentlerinin değerlendirilmesi sağlanmış oldu. Literatür incelendiğinde kartilaj değerlendirilmesinde en sık Mankin ve Osteoarthritis Research Society International (OARSI) skor sistemleri kullanılmaktadır^{108,109}. Pauli C ve ark. tarafından 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada Mankin ve OARSI skrolama sistemlerinin birbirine olan üstünlüğü karşılaştırılmış¹¹⁰. Ve her iki sistemin birbirine belirgin üstün olmadığı ancak Mankin skrolama sisteminde lezyon derinliğini gösteren parametrenin olması üzerine tüm okuyucuların oy birliği ile daha üstün olduğu sonucuna varılmıştır¹¹¹. Ayrıca eklem kıkırdak hasarının derinliği gross morfolojik değerlendirilmesinde OA ciddiyetinin bir göstergesi olması nedeniyle çalışmamızın histolojik değerlendirilmesinde Mankin skrolama sistemi tercih edildi.

Literatürde OA'ın tüm evrelerini ve dejenerasyon şiddetini gösteren benzer çalışmalardan yola çıkarak kıkırdak dokusunu değerlendiren ortak parametreleri belirledik. Bu parametreler değerlendirildiğinde polifenol grubunda matriks boyanma derecesinin arttığı ve mavi ile boyanan yeni kıkırdak matriksi ekstrasellüler komponentleriyle birlikte normal görünümde izlendi. Özellikle hasarlı bölgeye yakın kısımlarda hipersellüler kıkırdak bölgeleri gözlendi ve bu durum kondrositlerin kompensasyona direnç göstergesi olarak değerlendirildi. Radyal zonda klon (izogen grup) formasyonu oluşturan kondrositler dikkat çekerken, lakünalar içinde yer alan kondrositlerin proliferasyonu ve ekstrasellüler matriksin düzenli formasyonu ile tidemark zonunda belirginleşme olduğu ve normal zon yapısının sağlandığı gözlendi. Superfisyal zonda yeni kıkırdak oluşumu (Mankin) ile birlikte yüzeyel erozyonun azaldığı görüldü.

Sonuç olarak; çalışmamızda polifenolden zengin zeytinyağının intraartiküler uygulaması ile eklem kinematiğin bozulması sonucu oluşan akut dejeneratif osteoartrit tedavisinde olumlu yönde umut verici etkiler tespit ettik. Polifenol bileşenlerinin lokal uygulamasında kıkırdak restorasyonu ve rejenerasyonu yaparak OA tedavisinde etkili bir yöntem olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamız; literatürde sızma zeytinyağının intraartiküler uygulamasıyla akut OA’e bağlı oluşan kıkırdak hasarının iyileşmesi üzerine olan etkisini araştıran ilk çalışma özelliğindedir. Dolayısıyla çalışmamızın, bu özelliği ile literatüre olumlu yönde katkı sağlayacağını ve diğer çalışmalara örnek teşkil edeceğini düşünmekteyiz.



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Polifenolden zengin sızma zeytinyağının osteoartrit tedavisindeki etkilerinin araştırılması amacıyla yaptığımız bu deneysel çalışmada şu sonuçlar elde edildi:

1. Polifenolden zengin sızma zeytinyağının osteoartrit tedavisinde etkili olduğu gözlemlendi.
2. Çalışmamızda; Polifenol grubu kısa vadede ve serum fizyolojik grubu kısa vadede gruplar arasında gross morfolojik, radyolojik ve histolojik değerlendirilmesinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.
3. Çalışmamızda; Polifenol grubu uzun vadede ve serum fizyolojik grubu uzun vadede gruplar arasında gross morfolojik, radyolojik ve histopatolojik değerlendirilmesinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Çalışmamızın zayıf yönleri:

- 1- İstatistiksel değerlendirmeye alınan histolojik materyal sayısının az olması
- 2- Bu çalışmanın denek sayısı az olan bir hayvan deneyi olması ve insanlarda daha büyük sayıda hasta ile klinik çalışmaların yapılması gerekliliği
- 3- Kullandığımız deneysel osteoartrit modelinin spontan osteoartrit modelinden daha çok posttravmatik osteoartrit modeline yakın olması

Bu sonuçlar ışığında, Polifenolden zengin zeytinyağının osteoartrit tedavisinde kullanılabileceği çıkarımına varıldı. Bu konu ile alakalı gelecekte daha farklı parametrelerle daha ileri çalışmalar yapılmalı ve yapılacak olan hayvan deneyleri ve klinik çalışmalarla literatür daha da aydınlatılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. **Zhang, Yuqing, and Joanne M Jordan.** "Epidemiology of osteoarthritis." *Clinics in geriatric medicine* vol. 26,3 (2010): 355-69.
2. **Altman RD, Lozada CJ.** Clinical features of osteoarthritis. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH, editors. *Rheumatology*. 4th ed. Spain: Mosby Elsevier; 2008:1703-10.
3. **Peat G, McCarney R, Croft P.** Knee pain and osteoarthritis in older adults: a review of community burden and current use of primary health care. *Ann Rheum Dis* 2001;60:91-7.
4. **Egloff C, Hugle T, Valderrabano V.** Biomechanics and pathomechanisms of osteoarthritis. *Swiss medical weekly*. 2012;142:w13583.
5. **Cheng OT, Souzdalnitski D, Vrooman B, Cheng J.** Evidence-based knee injections for the management of arthritis. *Pain medicine (Malden, Mass)*. 2012;13(6):740-53.
6. Scanzello CR, Goldring SR. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone*. 2012;51(2):249-57.
7. **Bert JM, Bert TM.** Nonoperative treatment of unicompartmental arthritis: from bracing to injection. *Clinics in sports medicine*. 2014;33(1):1-10. 58
8. **Uthman I, Raynauld JP, Haraoui B.** Intra-articular therapy in osteoarthritis. *Postgraduate medical journal*. 2003;79(934):449-53.
9. **Hekmatpou, Davood et al.** "The Effectiveness of Olive Oil in Controlling Morning Inflammatory Pain of Phalanges and Knees Among Women With Rheumatoid Arthritis: A Randomized Clinical Trial." *Rehabilitation nursing: the official journal of the Association of Rehabilitation Nurses* vol. 45,2 (2020): 106-113.
10. **Szychlińska, Marta Anna et al.** "Physical activity and Mediterranean diet based on olive tree phenolic compounds from two different geographical areas have protective effects on early osteoarthritis, muscle atrophy and hepatic steatosis." *European journal of nutrition* vol. 58,2 (2019): 565-581.
11. **Brinker M. R, O'Connor D.** Eklemler. In: Yetkin H, Yazıcı M (Çeviri editörleri) *Miller' in Ortopedi Kitabı* 4.Baskı. Ankara, Adya; 2006:44-66.
12. **Doral NM, Dönmez G, Atay ÖA ve ark.** Dejeneratif eklem hastalıkları. *TOTBİD dergisi* 2007;6,(1-2):s. 56-65.
13. http://cnx.org/resources/15ceed3a8ec6619905f488499f8b52ad0924def6/412_Types_of_Cartilage-new.jpg. 2022.
14. **Fox S, Bedi A, Rodeo S A.** The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports health* 1.6 (2009): 461-468.
15. **Poole A R, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Lavery S.** Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 391 (2001): 26-33
16. **Bhosale AM, Richardson JB.** Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *British Medical Bulletin*. 2008; 1: 1-19.
17. **Alford WJ, Cole BJ.** Basic Science, Historical perspective, Patient Evolution and Treatment Options.

- Cartilage restoration Part I. The American Journal of Sport Medicine. **2005**; 33(2); 295-306.
18. **Tatari H.** Eklem kırıkdağının yapısı, fizyolojisi ve biyomekaniği: Yaralanma ve onarım. *Acta Orthop Traumatol Turc.* **2007**; 41; 1-5.
 19. **Minaiyan, M., Ghannadi, A. R., Afsharipour, M., & Mahzouni, P.** Effects of extract and essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. on TNBS-induced colitis in rats. *Research in pharmaceutical sciences*, (2011), 6(1), 13.
 20. **Funk, J., J. Frye, J. Oyarzo and B. Timmermann.** Comparative effects of two gingerol-containing *Zingiber officinale* extracts on experimental rheumatoid arthritis. *J. Nat. Prod.* 72: 403–407, **2009**.
 21. **Vishwanathan, A. and R. Basavaraju.** A review on *Vitex negundo* L. — a medicinally important plant. *Eur. J. Biol. Sci.* 3: 30–42, **2010**.
 22. **Tyyni A, Karlsson J.** Biological treatment of joint cartilage damage. *Scand J Med Sci Sports*.**2000**; 10: 249-65.
 23. **John R. Couchman and Csilla A. Pataki.** An Introduction to Proteoglycans and Their Localization. 26 September **2012**.
 24. **Attur, M. et al.** Low-grade inflammation in symptomatic knee osteoarthritis: prognostic value of inflammatory plasma lipids and peripheral blood leukocyte biomarkers. *Arthritis Rheumatol.* 67, 2905–2915 (**2015**).
 25. **Nagase H, Woessner JF.** Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem.* **1999**;274:21491-4
 26. **Aksun AA, Özmen D, Bayındır O.** Metalloproteinases, Their Inhibitors And Related Physiological And Pathological Conditions. *T Klin J Med Sci* **2001**;21:332-42
 27. **Madry H, Luyten FP, Facchini A.** Biological aspects of early osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* **2012** Mar;20(3):407-22.
 28. **Mora JC, Przkora R, Cruz-Almeida Y.** Knee osteoarthritis: pathophysiology and current treatment modalities. *J Pain Res.* **2018**;11:2189-2196. Published 2018 Oct 5.
 29. **Wojdasiewicz P, Poniatowski LA, Szukiewicz D.** The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm.* **2014**;2014:561459.
 30. **Rigoglou S, Papavassiliou AG.** The NF-κB signalling pathway in osteoarthritis. *Int J Biochem Cell Biol.* **2013** Nov;45(11):2580-4.
 31. **Yoshihara Y, Nakamura H, Obata K, et al** Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis *Annals of the Rheumatic Diseases* **2000**;59:455-461.
 32. **Krasnokutsky S, Samuels J, Abramson SB.** Osteoarthritis in 2007. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* **2007**;65(3):222-8.
 33. **Blaney Davidson EN, van der Kraan PM, van den Berg WB.** TGF-beta and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* **2007**;15(6):597-604. 10.1016/j.joca.2007.02.005
 34. **Hongxi LiShujuan XieYunlong Qi Huazhe LiRui ZhangYongyun Lian,** September19,**2018**
 35. **Palmer KT.** Occupational activities and osteoarthritis of the knee. *Br Med Bull.* **2012**;102:147-170.
 36. **Cruz M, Rodrigues AM, Dias S, Sepriano A, Canhão H, Gouveia N, Ramiro S, Branco JC.** Obesity and diabetes are associated with disability in women with hand osteoarthritis. Results from the EpiReumaPt nationwide study. *Acta Reumatol Port.* **2021** Jul-Sep;46(3):208-217.

37. **Anderson, Katharine L., Zulch, Helen, O'Neill, Dan G., Meeson, Richard L., and Collins, Lisa M.,** "Risk Factors for Canine Osteoarthritis and Its Predisposing Arthropathies: A Systematic Review" **2020**, *Frontiers in Veterinary Science* Vol. 7, 2297-1769
38. **SCHELLEVIS, François G., et al.** Comorbidity of chronic diseases in general practice. *Journal of clinical epidemiology*, **1993**, 46.5: 469-473.
39. **Murray KJ, Azari MF.** Leg length discrepancy and osteoarthritis in the knee, hip and lumbar spine. *J Can Chiropr Assoc.* **2015**;59(3):226-237.
40. **Friel, N. A., & Chu, C. R.** The role of ACL injury in the development of posttraumatic knee osteoarthritis. *Clinics in sports medicine*, (**2013**). 32(1), 1–12.
41. **Palmer KT.** Occupational activities and osteoarthritis of the knee. *Br Med Bull.* **2012**;102:147-170.
42. **Amar Kanekar, Manoj Sharma, V. R. Joshi,** "Vitamin D Deficiency—A Clinical Spectrum: Is There a Symptomatic Nonosteomalacic State?", *International Journal of Endocrinology*, vol. 2010, Article ID 521457, 6 pages, **2010**.
43. **Vuori, I. M.** Dose–response of physical activity and low back pain, osteoarthritis, and osteoporosis. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, (**2001**). 33(6, Suppl), S551–S586.
44. **Favazzo, L. J., Hendesi, H., Villani, D. A., Soniwala, S., Dar, Q. A., Schott, E. M., ... & Zuscik, M. J.** The gut microbiome-joint connection: Implications in osteoarthritis. *Current opinion in rheumatology*, (**2020**). 32(1), 92.
45. **Knobe K, Berntorp E.** Haemophilia and joint disease: pathophysiology, evaluation, and management. *J Comorb.* 2011;1:51-59. Published **2011** Dec 27.
46. **De Sousa, E. B., et al.** "Metabolomics as a promising tool for early osteoarthritis diagnosis." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 50 (**2017**).
47. **Kohn, M.D., Sassoon, A.A. & Fernando, N.D.** Classifications in Brief: Kellgren-Lawrence Classification of Osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res* 474, 1886–1893 (**2016**).
48. <https://springloadedtechnology.com/wp-content/uploads/2020/09/Kellgren-Lawrence-Stages-of-Knee-Osteoarthritis.jpg>.
49. **Mao L, Wu W, Wang M, Guo J, Li H, Zhang S, Xu J, Zou J.** Targeted treatment for osteoarthritis: drugs and delivery system. *Drug Deliv.* **2021** Dec;28(1):1861-1876.
50. **Miceli-Richard, C., et al.** "Paracetamol in osteoarthritis of the knee." *Annals of the rheumatic diseases* 63.8 (**2004**): 923-930.
51. **da Costa BR, Pereira TV, Saadat P, et al.** Effectiveness and safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs and opioid treatment for knee and hip osteoarthritis: network meta-analysis. *BMJ.* 2021;375:n2321. Published **2021** Oct 12.
52. **Argoff CE, Gloth FM.** Topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs for management of osteoarthritis in long-term care patients. *Ther Clin Risk Manag.* **2011**;7:393-399.
53. **Bhandari, M., Bannuru, R. R., Babins, E. M., Martel-Pelletier, J., Khan, M., Raynauld, J. P., Frankovich, R., Mcleod, D., Devji, T., Phillips, M., Schemitsch, E. H., & Pelletier, J. P.** (2017). Intra-articular hyaluronic acid in the treatment of knee osteoarthritis: a Canadian evidence-based perspective. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*, 9(9), 231–246.
54. **Arroll B, Goodyear-Smith F.** Corticosteroid injections for osteoarthritis of the knee: meta-analysis. *BMJ.* **2004**;328(7444):869.

55. **Meheux CJ, McCulloch PC, Lintner DM, Varner KE, Harris JD.** Efficacy of Intra-articular Platelet-Rich Plasma Injections in Knee Osteoarthritis: A Systematic Review. *Arthroscopy*. **2016**;32(3):495-505.
56. **Abdel Shaheed C, Awal W, Zhang G, et al.** Efficacy, safety, and dose-dependence of the analgesic effects of opioid therapy for people with osteoarthritis: systematic review and meta-analysis. *Med J Aust*. **2022**;216(6):305-311.
57. **van Baar ME, Dekker J, Oostendorp RAB, et al** Effectiveness of exercise in patients with osteoarthritis of hip or knee: nine months' follow up *Annals of the Rheumatic Diseases* **2001**;60:1123-1130.
58. **de Andrés, M. C. et al. (2020)** 'Osteoarthritis treatment with a novel nutraceutical acetylated ligstroside aglycone, a chemically modified extra-virgin olive oil polyphenol', *Journal of Tissue Engineering*.
59. **H.S. Somayaji, P. Tsaggerides, H.E. Ware, G.S. E. Dowd,** Knee arthrodesis—A review, Volume 15, Issue 4, **2008**, Pages 247-254, ISSN 0968-0160.
60. **Steinhaus ME, Christ AB, Cross MB.** Total Knee Arthroplasty for Knee Osteoarthritis: Support for a Foregone Conclusion?. *HSS J*. **2017**;13(2):207-210.
61. **Ruan JQ, Nie LY, Qian LN, Zhao K.** Efficacy and Safety of Polyphenols for Osteoarthritis Treatment: A Meta-Analysis. *Clin Ther*. **2021**;43(8):e241-e253.e2.
62. **Lucas L, Russell A, Keast R.** Molecular mechanisms of inflammation. Anti-inflammatory benefits of virgin olive oil and the phenolic compound oleocanthal. *Curr Pharm Des*. **2011**;17(8):754-768.
63. **Iacono, Anna et al.** "Effect of oleocanthal and its derivatives on inflammatory response induced by lipopolysaccharide in a murine chondrocyte cell line." *Arthritis an rheumatism* vol. 62,6 (**2010**): 1675-82.
64. **Scotece, Morena et al.** "Further evidence for the anti-inflammatory activity of oleocanthal: inhibition of MIP-1 α and IL-6 in J774 macrophages and in ATDC5 chondrocytes." *Life sciences* vol. 91,23-24 (**2012**): 1229-35.
65. **Montoya T, Sánchez-Hidalgo M, Castejón ML, Rosillo MÁ, González-Benjumea A, Alarcón-de-la-Lastra C.** Dietary Oleocanthal Supplementation Prevents Inflammation and Oxidative Stress in Collagen-Induced Arthritis in Mice. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(5):650. Published **2021** Apr 23.
66. **National Center for Biotechnology Information.** from PubChem Compound Summary for CID11652416, Oleocanthal. Retrieved April 6, **2022**.
67. **Murray, David G.** "Experimentally induced arthritis using intra-articular papain." *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology* 7.3 (**1964**): 211-219.
68. **Moskowitz RW.** *Experimental self-steady-state arthritis* In Moskowitz RW, Howell DS, Goldberg VM, Mankin HJ, Eds. Osteoarthritis." diagnosis and Medical/Surgical Management, 2nd ed. Philadelphia, PA: W.B. Saunders **1992**;213-32.
69. **Brandt, Kenneth D.** "Transection of the anterior cruciate ligament in the dog: a model of osteoarthritis." *Seminars in arthritis and rheumatism*. Vol. 21. No. 3. WB Saunders, **1991**.
70. **Yoshioka, M et al.** "Characterization of a model of osteoarthritis in the rabbit knee." *Osteoarthritis and cartilage* vol. 4,2 (**1996**).
71. **Collins DH, McElligott TF.** Sulphate (35SO₄) uptake by chondrocytes in relation to histological changes in osteoarthritic human articular cartilage. **1960**. Ann Rheum Dis 19: 318–330

72. **Dipaola, J D et al.** "Characterizing osteochondral lesions by magnetic resonance imaging." *Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* vol. 7,1 (1991): 101-4.
73. **Díaz-Gallego L, Prieto JG, Coronel P, Gamazo LE, Gimeno M, Alvarez AI.** Apoptosis and nitric oxide in an experimental model of osteoarthritis in rabbit after hyaluronic acid treatment. *J Orthop Res.* **2005**;23(6):1370-1376.
74. **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.
75. **Song J, Chang RW, Dunlop DD.** Population impact of arthritis on disability in older adults. *Arthritis Rheum.* **2006**;55(2):248-255.
76. **Dicesare PE, Abramson SB.** Pathogenesis of osteoarthritis. In: Harris ED, Budd RC, Genovese MC et al) .Kelley's Textbook of Rheumatology, volume II, 7th edition, Elsevier Saunders. **2005**. pp.1493-1513.
77. **Moore EE, Bendele AM, Thompson DL, Littau A, Waggle KS, Reardon B, Ellsworth JL.** Fibroblast growth factor-18 stimulates chondrogenesis and cartilage repair in a rat model of injury induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.***2005**; 13(7): 623-31.
78. **Vaughn IA, Terry EL, Bartley EJ, Schaefer N, Fillingim RB.** Racial-Ethnic Differences in Osteoarthritis Pain and Disability: A Meta-Analysis. *J Pain.* 2019;20(6):629-644.jpain.**2018**.11.012
79. **Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ.** Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr. Course Lect.* **2005**; 54: 465-80.
80. **Zhou PH, Liu SQ, Peng H.**The effect of hyaluronic acid on IL-1 β -induced chondrocyte apoptosis in a rat model of osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research.* **2008**; 26(12): 1643-48.
81. **Cesare PE, Abramson SB, Samuels J.** Pathogenesis of Osteoarthritis. cartilage, bone, and heritable connective tissue disorders. In: Firestein GS (ed) Kelley's Textbook of Rheumatology 8th edition. Philadelphia, Saunders Elsevier; **2008**.
82. **Bonnet CS, Walsh DA.** Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology* **2005**;44:7–16.
83. **Buckwalter JA, Mankin HJ.** Articular cartilage Part II: Degeneration and Osteoarthrosis, Repair, Regeneration and Transplantation. *JBJS.* **1997**; (79)4: 612-32.
84. **Ma CH, Lv Q, Yu YX, Zhang Y, Kong D, Niu KR, Yi CQ.** Protective effects of tumor necrosis factor alfa blockade by adalimumab on articular cartilage and subchondral bone in a rat model of osteoarthritis. *Braz J Med Biol Res.* **2015**; 48(10); 863-70.
85. **Naito, K., Watari, T., Muta, T., Furuhashi, A., Iwase, H., Igarashi, M., ... & Kaneko, K.** Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) increases the articular cartilage type II collagen in a rat osteoarthritis model. *Journal of Orthopaedic Research,* (2010). 28(3), 361-369.
86. **Yu SP, Hunter DJ.** Managing osteoarthritis. *Aust Prescr.* **2015**;38(4):115-119.
87. **Bakhaat, Gamal & Abulfadle, Khaled.** Protective Effect of Olive Oil against Experimental Osteoarthritis: Key Cytokines and Radiological Changes. *الاجتماعية للعلوم الجوف مجلة.* (2014). 1. 21-26. 10.12816/0011913.
88. **Mohammad Yunus Ansari, Nashrah Ahmad, Tariq M Haqqi,** Oxidative stress and inflammation in osteoarthritis pathogenesis: Role of polyphenols, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Volume 129,**2020**,110452,ISSN 0753-3322,
89. **Maruyama Takuma, Kamihama Haruka, Watanabe Mutsuto, Matsuo Toshiki, Matsuda Kenshiro, Tanaka Akane, Matsuda Hiroshi, Nomura Yoshihiro,** Olive leaf extract prevents cartilage degeneration

in osteoarthritis of STR/ort mice, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Volume 82, Issue 7, 3 July 2018, Pages 1101–1106,

90. **Musumeci, Giuseppe et al.** “Extra-virgin olive oil diet and mild physical activity prevent cartilage degeneration in an osteoarthritis model: an in vivo and in vitro study on lubricin expression.” *The Journal of nutritional biochemistry* vol. 24,12 (2013): 2064-75.
91. **Cetrullo S, Facchini A, , D'Adamo S, Guidotti S, Minguzzi M, Facchini A, et Al** Hydroxytyrosol Prevents Increase of Osteoarthritis Markers in Human Chondrocytes Treated with Hydrogen Peroxide or Growth-Related Oncogene α . (2014) PLoS ONE 9(10): e109724.
92. **Yubo M, Yanyan L, Li L, Tao S, Bo L, Lin C** Clinical efficacy and safety of mesenchymal stem cell transplantation for osteoarthritis treatment: A meta-analysis. PLoS ONE 12(4): e0175449 (2017).
93. **Pittenger MF**, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147
94. **Saw, Khay-Yong et al.** “Articular cartilage regeneration with autologous peripheral blood stem cells versus hyaluronic acid: a randomized controlled trial.” *Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* vol. 29,4 (2013): 684-94.
95. **Koh YG, Choi YJ.** Infrapatellar fat pad-derived mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. *Knee*. 2012; 19(6):902±7.
96. **Filardo G, Previtali D, Napoli F, Candrian C, Zaffagnini S, Grassi A.** PRP Injections for the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *CARTILAGE*. December 2021:364S-375S.
97. **Hong, Mao et al.** “Efficacy and Safety of Intra-Articular Platelet-Rich Plasma in Osteoarthritis Knee: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *BioMed research international* vol. 2021 2191926. 30 Apr. 2021
98. **Kwon, Dong Rak et al.** “The effects of intra-articular platelet-rich plasma injection according to the severity of collagenase-induced knee osteoarthritis in a rabbit model.” *Annals of rehabilitation medicine* vol. 36,4 (2012): 458-65.
99. **Patel, Sandeep et al.** “Chondroprotective effects of multiple PRP injections in osteoarthritis by apoptosis regulation and increased aggrecan synthesis- Immunohistochemistry based Guinea pig study.” *Journal of clinical orthopaedics and trauma* vol. 25 101762. 11 Jan. 2022.
100. **Díaz-Gallego, Luis et al.** “Apoptosis and nitric oxide in an experimental model of osteoarthritis in rabbit after hyaluronic acid treatment.” *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* vol. 23,6 (2005): 1370-6.
101. **Yoshioka, M et al.** “The effects of hyaluronan during the development of osteoarthritis.” *Osteoarthritis and cartilage* vol. 5,4 (1997): 251-60.
102. **Furuuchi R, Shimizu I, Yoshida Y, Hayashi Y, Ikegami R, Suda M, et al.** Boysenberry polyphenol inhibits endothelial dysfunction and improves vascular health. PLoS ONE 13(8): (2018) e0202051.
103. **Palco, Michelangelo et al.** “Platelet-Rich Plasma Combined with Hyaluronic Acid versus Leucocyte and Platelet-Rich Plasma in the Conservative Treatment of Knee Osteoarthritis. A Retrospective Study.” *Medicina (Kaunas, Lithuania)* vol. 57,3 232. 3 Mar. 2021,

104. **Berney, Mark et al.** "Platelet-rich plasma injections for hip osteoarthritis: a review of the evidence." *Irish journal of medical science* vol. 190,3 (2021): 1021-1025. doi:10.1007/s11845-020-02388-z
105. **Najm, Aurélie et al.** "Efficacy of intra-articular corticosteroid injections in knee osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials." *Joint bone spine* vol. 88,4 (2021): 105198. doi:10.1016/j.jbspin.2021.105198
106. **Karasavvidis, Theofilos et al.** "Platelet-Rich Plasma Combined With Hyaluronic Acid Improves Pain and Function Compared With Hyaluronic Acid Alone in Knee Osteoarthritis: A Systematic Review and Meta-analysis." *Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* vol. 37,4 (2021): 1277-1287.e1.
107. **S. Elmorsy, T. Funakoshi, F. Sasazawa, M. Todoh, S. Tadano, N. Iwasaki,** Chondroprotective effects of high-molecular-weight cross-linked hyaluronic acid in a rabbit knee osteoarthritis model, *Osteoarthritis and Cartilage*, Volume 22, Issue 1, **2014**, Pages 121-127, ISSN 1063-4584
108. **Pazzini, Josiane Morais et al.** Skin graft associated with platelet-rich plasma in correcting extensive injuries resulting from the resection of skin cancer chemically induced in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira* [online]. 2021, v. 36, n. 12 [Accessed 17 April 2022] , e361203. Available from: Epub 05 Jan 2022. ISSN 1678-2674..
109. **Kaplan, Lee D et al.** "The effect of early hyaluronic acid delivery on the development of an acute articular cartilage lesion in a sheep model." *The American journal of sports medicine* vol. 37,12 (2009): 2323-7.
110. **Pauli C, Whiteside R, Heras FL, et al.** Comparison of cartilage histopathology assessment systems on human knee joints at all stages of osteoarthritis development. *Osteoarthritis Cartilage*. **2012**;20(6):476-485.
111. **Rutgers, M et al.** "Evaluation of histological scoring systems for tissue-engineered, repaired and osteoarthritic cartilage." *Osteoarthritis and cartilage* vol. 18,1 (2010): 12-23.