

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

DENEYSEL DİZ OSTEOARTRİT MODELİNDE SİMVASTATİNİN
MATRİKSMETALLOPROTEİNAZ İNHİBİSYONU ÜZERİNDEN
KONDROPROTEKTİF ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ
DR. ERDEM AKTAŞ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ERTUĞRUL ŞENER

ANKARA
ARALIK 2008

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

DENEYSEL DİZ OSTEOARTRİT MODELİNDE SİMVASTATİNİN
MATRİKSMETALLOPROTEİNAZ İNHİBİSYONU ÜZERİNDEN
KONDROPROTEKTİF ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ
DR. ERDEM AKTAŞ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ERTUĞRUL ŞENER

ANKARA
ARALIK 2008

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01-2008/18
proje numarası ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji AD' da araştırma görevlisi olarak çalıştığım süre içinde bilgi ve becerilerimin her geçen gün artmasında ve bu mesleğin inceliklerini öğrenmemde kendi tecrübeleri ve bilgilerini bana aktararak destek olan, etik ve bilimsel açıdan örnek aldığım, tez danışmanım Prof. Dr. Ertuğrul Şener başta olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. Şahap Atik, Prof. Dr. Haluk Yetkin, Prof. Dr. Selçuk Bölükbaşı, Prof Dr. Necdet Altun, Prof. Dr. Erdal Cila, Prof. Dr. Sacit Turanlı, Prof. Dr. Aykın Şimşek, Doç. Dr. Ulunay Kanatlı, Doç. Dr. Alparslan Şenköylü, Doç. Dr. Hamza Özer, Yrd. Doç. Dr. Akif Muhtar Öztürk, Öğr. Gör.Dr. Hakan Selek, Öğr.Gör.Dr. Erdinç Esen'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin oluşumundaki katkılarından dolayı, Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezinden Prof. Dr. Engin Çalgüner, Patoloji Anabilim Dalından Yrd. Doç. Dr. Pınar Uyar Göçün'e teşekkür ederim

Eğitimim süresince her konuda yardım ve desteklerini gördüğüm tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma, poliklinik, klinik ve ameliyathane hemşire, personeli ve sekreterlerine, Uz. Ft. Funda Bülgin Kesici'ye teşekkür ederim.

Bütün yaşamım süresince yetişmemi sağlayan, desteklerini ve sevgilerini esirgemeyen babam Doğan Aktaş, annem Ayten Aktaş, kardeşim Evren Aktaş ve zorlu Ortopedi ve Travmatoloji eğitimim boyunca anlayış ve yardımlarını esirgemeyen eşim Zeynep Aktaş' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
KIKIRDAK YAPISI	3
ÖN ÇAPRAZ BAĞ.....	12
KIKIRDAK HOMEOSTAZİSİ.....	15
EKLEM BİYOMEKANİĞİ.....	16
İNSTABİLİTE VE DEĞİŞEN YÜK DAĞILIMINA KIKIRDAK CEVABI.....	17
OSTEOARTRİT	21
MATRİKSMETALLOPROTEİNAZ	30
MATRİKSMETALLOPROTEİNAZ İNHİBİSYONU.....	35
KOLESTEROL YAPISI VE METABOLİZMASI.....	37
STATİNLER.....	39
DENEYSEL OSTREOARTRİT HAYVAN MODELLERİ.....	44
GEREÇ VE YÖNTEM	46
CERRAHİ YÖNTEM.....	47
HİSTOPATOLOJİK VE İMMÜNHİSTOKİMYASAL YÖNTEM.....	51
BULGULAR.....	57
TARTIŞMA VE SONUÇ	72
ÖZET	78
KAYNAKÇA.....	82

GİRİŞ

Genel populasyonda 55 yaş üzeri insanların %80'inde farklı evrelerde görülen, ilerleyici kıkırdak kaybı ile karakterize, etkilenen eklemlerde kronik ağrı, deformite, foksiyon kaybı, kontraktür ve kas atrofisi ile seyreden ve toplum bireylerinde hayat kalitesinin büyük ölçüde düşmesine ve gün geçtikçe artan tedavi masraflarına neden osteoartrit (OA) etiopatogenezi aydınlandıkça farklı farmakolojik tedavi seçenekleri gündeme gelmiştir.

OA; eklemlerde, çeşitli lokal, sistemik, genetik ve çevresel faktörlere verilen bir cevap olarak düşünülmelidir. Günümüzde travma, dizilim bozukluğu, genetik yatkınlık, yaşam şekli, kas gücü, cinsiyet, sistemik hastalık, hormon ve büyüme faktörlerine yanıt gibi etkenlerin OA gelişiminde etkili olduğu bilinmektedir.^{37,85,67,102} Bu faktörlerden bir veya birkaçının beraber kıkırdak doku üzerindeki yıkıcı etkilerine lokal ve sistemik yeterli onarıcı cevabın verilememesi kendini yenileme yeteneği kısıtlı olan kıkırdak dokuda yapım ve yıkım arasında dengesizlik oluşturarak OA ile sonuçlanır.

Travmatik etmenlerin yol açtığı instabilite ve değişen diz kinematiğinin erken başlangıçlı sekonder OA oluşumuna neden olduğu bilinmektedir ancak yaşlanma ile beraber artan oranda görülen primer OA vakalarının pek çoğunda geçirilmiş major travma ve/veya tekrarlayan mikrotravmaların olduğu araştırmalarda ortaya konmuştur. Manyetik rezonans görüntüleme bazlı çalışmalar, geleneksel olarak sekonder osteoartrit ile ilişkili bulunan menisküs ve bağ lezyonlarının önceden düşünüldüğünün aksine primer osteoartritte yaygın olarak görüldüğünü kanıtlamıştır. Özellikle 30-50 yaş arasında erken başlangıçlı OA'nın büyük çoğunluğundan ön

Çapraz bağ hasarı sorumludur. Oluşan instabilite ve anormal tibiofemoral kinematik, eklem kıkırdadı üzerinde fizyolojik yük dağılımını etkileyerek, cevap olarak osteoartrit oluşumu ile sonuçlanan karışık patofizyolojik mekanizmaları başlatır.^{97,67} Osteoartrit (OA) fizyopatolojisi bugün hala kesin bilinmemekle beraber, sadece dejeneratif bir hastalık olmadığı, hastalığın patogenezinde yapım ve yıkımla beraber ilerleyen enflamatuvar bir süreç olduğu son zamanlarda yapılan deneyselalışmalar ile ispat edilmiştir.^{65,2,108,46,9,25,55}

Hücre kültürü ve deneysel OA hayvan modelleri ve OA gelişen insanlardan alınan subkondral kemik, kıkırdak ve sinovyal membran doku örneklerinde özellikle matriksmetalloproteinaz 1-3-9-13 düzeylerinde kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı artış bulunmuş ve ekstraselüler matriks yıkımının kondrositler tarafından salgılanan MMP'ler vasıtası ile gerçekleştiğine dair güçlü kanıtlar elde edilmiştir.^{73,44,80,25,72}

Bu anlamda OA ilerlemesinin durdurmak için yeni tedavi stratejileri matriksmetalloproteinaz inhibisyonu üzerinde yoğunlaşmış ve hipolipidemik etkilerinin yanında antienflamatuvar ve immunmodülatör özellikleri keşfedilen statin grubu ilaçların kullanımı gündeme gelmiştir.^{12,1,8,94,62,3}

Bualışmada diz napraz bağı kesilmesi sonucu instabilite ve kıkırdakta artan mekanik stresin başlattığı enflamatuvar sürece simvastatin tedavisinin matriksmetalloproteinaz inhibisyonu üzerinden kıkırdak etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

KIKIRDAK YAPISI

Eklemlerin kıkırdığı:

Eklemlerin kıkırdığı, eklemi döşeyen ve hayat boyu sinoviyal eklemlerde düşük sürtünme ve ağrısız hareket sağlayan bir dokudur. Doku; kollajen, nonkollajen protein ve proteoglikan ihtiva eden bir ekstraselüler matriks (ESM) içinde yerleşmiş yüksek oranda özelleşmiş hücreler olan kondrositlerden oluşur. Hiyalen kıkırdak içerisinde sinir, damar ve lenfatik yapıları bulunmaz. Matriks pH'sı 7.4 olan kıkırdak değişen pH değerlerinden olumsuz olarak etkilenir. İnsan vücudunda matriks birleşenlerine göre 4 tip kıkırdak bulunmaktadır.

1. Fibröz kıkırdak
2. Hiyalen kıkırdak
3. Elastik kıkırdak
4. Fibroelastik kıkırdak

Eklemlerin kıkırdığının ana yapısını hiyalen kıkırdak oluşturur ve birtakım özellikler ile eklemi korur. Bunlar;

1. Kortikal kemik ve eklem binalarının aşırı yükü ve kuvvetleri absorbe etmesi
2. Düşük sürtünme katsayısı sağlaması
3. Eklem stabilitesini artırması

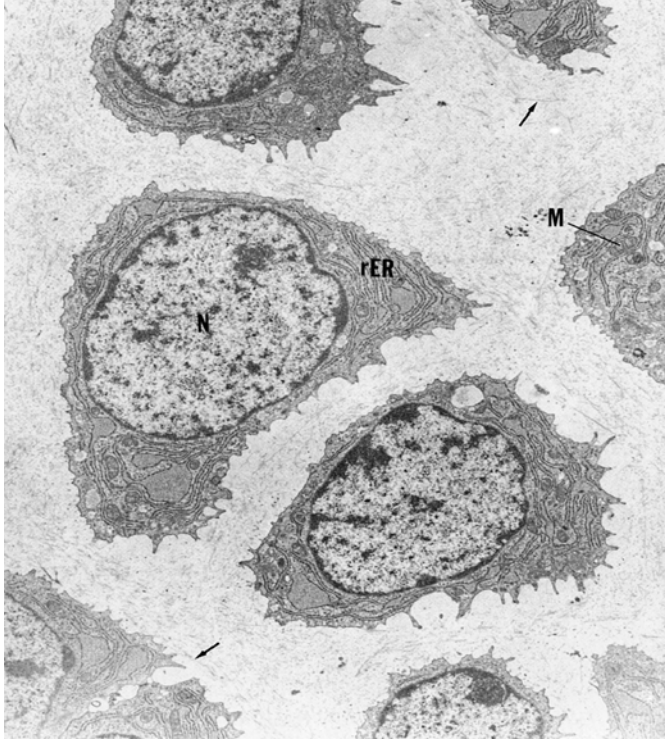
Eklemlerin hiyalen kıkırdığı 4 farklı tabakadan meydana gelir ve altındaki kortikal kemiğe kalsifiye bir kıkırdak katmanı ile sıkı bir şekilde tutunur.

Kıkırdak embriyolojisi:

Gestasyonel 5. haftada mezankimal hücreler blastema oluşturmak için bir araya gelir. Blastema hücreleri kıkırdak matriks üretmeye başlıyarak kondroblast adını alırlar. Üretilen ekstraselüler matriks (ESM) kondroblastları kademeli olarak birbirinden ayırmaya başlar ve bu özelleşmiş matriks tarafından kaplanan hücelere kondrosit denir. Blastemayı çevreleyen mezankimal doku ise perikondrium adı verilen membranı oluşturur.

Kondrosit:

Kondrositler, kıkırdak içinde bulunan ESM birleşenlerini üreten, devamlılığını sağlayan ve remodelize eden izole hücrelerdir (Şekil 1). Kondrositler doku hacminin %1-5'ini oluşturur. Osteositlerin aksine ESM tarafından çevrelenmiş olup hücreler arasında temas bulunmaz. Yüzeyde bulunan kondrositler fibroblastları taklit eder şekilde elonge, orta tabakada yuvarlak, derin tabakalarda radyal, geçiş tabakası altında küçük fonksiyon görmeyen hücreler şeklindedir. Kondrositler makromoleküllerin yıkımı ile oluşan matriks bileşiminde değişimi ve eklem yüzeyinde farklı mekanik gereksinimi algılayarak, uygun miktar ve özellikte makromolekül salgılayarak cevap verirler. Yaşlanma ve tekrarlayan travmalar kondrosit fonksiyonlarını etkiler. Yaşlanma ile beraber bazı proteoglikan tiplerinin üretme kapasitesi, prolifere olma ve anabolik uyarılara cevap verme kapasitesinde azalma olur. Bu değişiklikler hücrenin dokuyu yenileme ve devamlılığını sağlama kabiliyetini azaltarak eklem kıkırdak dejenerasyonu gelişimi ve ilerlemesine yol açabilir.



Şekil 1: Kondrositin elektronmikroskopik görüntüsü

Kondrosit aktivitesini etkileyen faktörler ;

1. Mekanik etkenler

2. Sitokinler ve büyüme faktörleri: IL-1 ve TNF- α gibi sitokinler kondrositler tarafından kıkırdak yıkımına yol açan matriksmetalloproteinaz (MMP) üretimine neden olurken TGF- β (transforming growth factor β), kondrositlerin diferansiyasyonu olarak tip2 kolajen ve proteoglikan üretimine neden olur.

Ekstraselüler matriks :

Eklem kıkırdak matriksi iki komponentten oluşmaktadır. Doku sıvısı ve dokuya şeklini veren, stabilitesini sağlayan yapısal moleküller (kolajen, kolajen

olmayan proteinler ve proteoglikanlar). Doku sıvısı ve makromoleküler yapı arasındaki etkileşim dokuya mekanik olarak katılık ve elastikiyet özelliklerini verir. Eklem kıkırdığının ağırlığının %65-80'ni su oluşturur. Su oranı, yüzeyel tabakada %80 iken derin tabakalarda %65'e kadar düşer.

Suyun bir kısmı jel formundadır ve basınç etkisi ile serbest olarak dokunun içinde ve dışında dolaşabilir. Kıkırdak üzerinde basınç etkisi ile sıvı dokunun dışına çıkıp eklem yüzeyinde dağılarak kayganlaştırıcı olarak görev yapar. Dokunun hacmi, konsantrasyonu ve davranış özellikleri primer olarak yapısal makromoleküller, genel olarak da sıvıyı matriks içinde tutan ve sıvı elektrolit konsantrasyonunu ayarlayan büyük agregre olan makromoleküller ile olan etkileşimine bağlıdır. Bu makromoleküller büyük oranda negatif olarak yüklendiklerinden sodyum gibi pozitif yüklü iyonları çekerek konsantrasyonlarını artırırken, klor gibi negatif yüklü iyonları iterek konsantrasyonlarını azaltırlar.

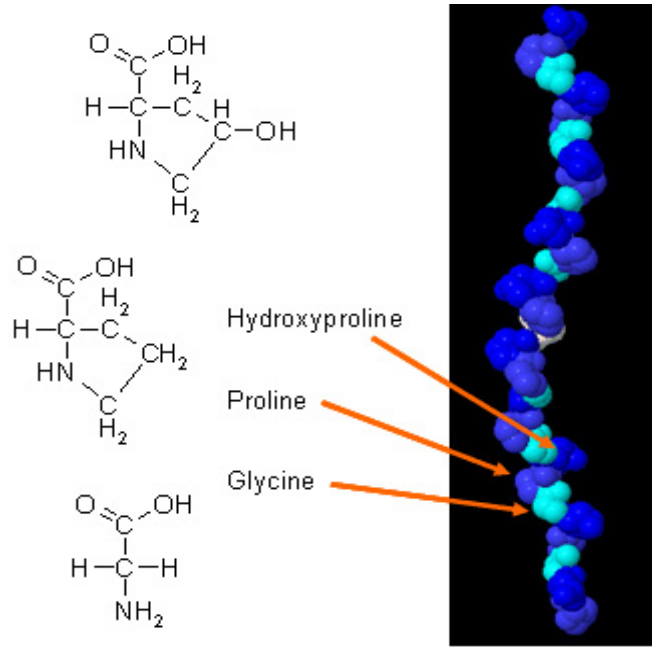
Total inorganik iyon konsantrasyonundaki artış doku osmolaritesinin artışı yönünde etki eder.

Kıkırdığın yapısal makromolekülleri; kollajenler, proteoglikanlar ve kollajen olmayan moleküller dokunun ıslak ağırlığının %20-40 'ını oluşturur.

Kollajen:

3 α zincirinden oluşan fibröz bir proteindir (Şekil 2). Proteoglikan ve kondrositlerin doldurması için ESM mimarisini oluşturur, kıkırdak tensil gücünü sağlar. Eklem kıkırdığı yapısındaki kollajenin %90'ı tip2 ,%10'u tip 9 ve 11 tarafından oluşturulur. Tip2 kollajen, kıkırdığın yüzeyel tabakasında oluşan yüksek orandaki makaslama güçlerine karşı koyabilmek için eklem yüzeyine tanjansiyel olarak yapılanmıştır.

Eklem kıkırdağının orta ve derin tabaklarında ise vertikal tensil güç oluşturabilmek için yön değiştirerek vertikal düzlemde dizilim gösterirler. Kıkırdak yapısının bozulması ile bu dizilim bozularak yüzeysel ve derin tabakalarda düzensiz bir yapı göstererek yük transferinin fizyolojik dağılımı bozulur.



Şekil 2: Kollajenin yapısı

Proteoglikan:

Protein bir kılıfa kovalen bağ ile bağlanmış, uzun zincirli, negatif yüklü glikozaminoglikan (GAG) moleküllerinden meydana gelmiştir (Şekil 3). GAG'lar; aminoşekerleri, sülfatlanmış asetilaminoşekerleri ve uronik asit içeren tekrarlayan dissakarid derivelerinin dallanmayan polimerleridir.

Glikozaminoglikan :

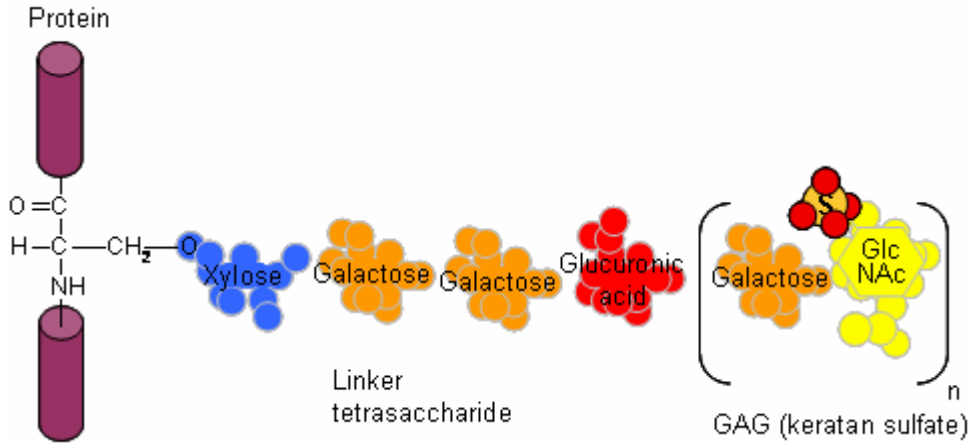
Asidik molekül olmaları nedeniyle sodyum ve dolayısıyla osmotik etki ile su çeker ve kompresif güç sağlarlar.

A. HYALURONAN:

- Sülfatlanmaz
- Hücre membranından oluşturulur
- Proteoglikan yapısına katılmaz

B. DİĞER

1. KERATAN SÜLFAT
2. KONDROİTİN SÜLFAT
3. DERMATAN SÜLFAT
4. HEPARAN SÜLFAT



Şekil 3: Proteoglikan yapısı

ESM'deki Temel Proteoglikanlar: Eklem kıkırdağındaki proteoglikanlar 2 sınıfa ayrılır. Büyük agrege olan proteoglikan monomerleri (**Agreganlar**) ve küçük, nonagregan proteoglikanlar (**Biglycan, Decorin, Fibromodulin**). Agregan prodominant ve en üzerinde en çok çalışılmıştır. GAG molekülleri kondroitin sülfat ve keratan sülfattan meydana gelmiştir. Pek çok aggregan molekülü tek bir hyaluronik asit zincirine bağlanmış olarak bulunur.

Agregan, polianyonik molekülün su çekmesi sayesinde eklem kıkırdağına elastikiyet sağlar ancak eklem kıkırdağının şişmesi kollajen fibrillerinin dizilimi nedeniyle potansiyel hacminin %20 'si ile sınırlı kalır. Eklem kıkırdağı üzerinde basınç olması, agreganın suyu kıkırdaktan serbestleştirip eklem yüzeyine ince bir tabaka halinde yaymasına yol açarak eklem hareketi için minimal sürtünmeye sahip bir yüzey oluştururken kıkırdak yüzeyindek basıncın azalması sıvının beraberinde kondrositler için gerekli besin maddeleri ile beraber kıkırdağa geri çekilmesine neden olur.

Eklem kıkırdağı tabakaları:

Eklem yüzeyinden subkondral kemiğe kadar kondrositler ve matriksteki morfolojik değişim eklem kıkırdağını 4 tabakaya ayırmaktadır.

1.Yüzeyel Tabaka: Tipik olarak 2 tabakadan oluşur. Hücre ihtiva etmeyen, az miktarda poliskkarid içeren düzgün bir fibril tabakası eklem yüzeyini kaplar. Bu kısım lamina splendens olarak tanımlanır. Derinde fibroblastlara benzeyen, yassılaştırmış elipsoid şekilli kondrositler majör aksları eklem yüzeyine paralel olarak yerleşmişlerdir. Diğer kıkırdak tabakalarına oranla daha fazla kollajen konsantrasyonu ve daha az proteoglikan konsantrasyonu olan matriks sentezler. Fibronektin ve su konsantrasyonu yüksektir. Kollajen fibrilleri toksik olabilecek madde girişini ve önemli maddelerin çıkışını kısıtlar. Önemli olarak yüzeyel tabaka, kıkırdağı etkin olarak immün sistemden izole eder.

2.Geçiş Tabakası: Morfoloji ve matriks bileşimi yüzeyel tabaka ve radyal tabaka arasındadır. Yüzeyel tabaka hacminin birkaç katıdır. Yüzeyel tabakaya göre

hücrelerde daha yüksek konsantrasyonda sentetik organel, endoplazmik retikulum ve golgi membranları vardır. Yüzeyel tabakaya göre hücreler sferik şekilde olup çapları daha kalın kollajen fibrilleri ve daha fazla proteoglikan konsantrasyonu ihtiva ederken, daha düşük su konsantrasyonu ve kollajene sahiptir.

3.Orta Tabaka : Radyal veya derin tabaka denir. Orta tabkadaki kondrositler sferik şekilde ve eklem yüzeyine göre kolonlar halinde dik olarak dizilirler. Bu tabakada en geniş çapta kollajen fibrilleri, en yüksek konsantrasyonda proteoglikan ve en düşük konsantrasyonda su bulunur.

Bu tabakanın kollajen fibrilleri hematoksilin eozin boyamada mikroskopik kesitlerde ince bazofilik bir boyanma olarak görülen, kalsifiye ve kalsifiye olmayan kıkırdak arasında bir sınır oluşturan tidemark'a geçerler. Bu bölgede kollajen fibrillerinin yapısı kıkırdağa dik ve eklem hareketi sırasında oluşan makaslama kuvvetlerine karşı koyacak şekilde düzenlenmiştir.

4.Kalsifiye Tabaka: İnce bir kalsifiye kıkırdak tabakası radyal (kalsifiye olmayan) tabaka ile subkondral kemiği ayırır. Radyal tabakaya göre hücreler daha küçük hacimde ve sadece küçük hacimde endoplazmik retikulum ve golgi membranı içerirler. Besin maddelerinin subkondral kemikten bu tabakaya geçtiğine dair kanıt yoktur.

Matriks bölgeleri:

Matriks değişimine göre 3 kompartman vardır. Periselüler kısım, bölgesel kısım, bölgeler arası kısım. Periselüler ve bölgesel kısım kondrosit membranlarını

matriks makromolekülerine bağlayarak ve dokunun yüklenme ve deformasyonu sırasında hücreleri hasardan koruyarak hizmet eder. Eklem yüklenmesi sırasında matriks deforme olurken mekanik sinyallerin kondrositlere iletilmesine yardımcı olurlar. Bölgeler arası matriksin birincil fonksiyonu dokunun mekanik özelliklerini korumaktır.

Subkondral Kemik:

Son zamanlarda osteoartrit (OA) etyopatogenezinde, özellikle OA başlamasında subkondral kemik oldukça önemli bir yer tutmaktadır. İnsan ve hayvan OA modellerinde subkondral kemik kalınlığı ve osteoblastik metabolik aktiveler modifiye edilmiştir. Eklem kıkırdak dejenerasyonunda ilerleme nedenleri arasında, artan kemik yeniden yapılanması (remodeling) ve kemikte katılık artışının olduğu düşünülmektedir.²⁰

OA subkondral kemikte oluşan trabeküler mikrokırıkların iyileşmesi, şok absorbe etme yeteneği olmayan katı bir subondral kemik oluşturabilir. Yapılan otopside çalışmalarında normal hastalara göre OA'li hastaların proksimal femur trabeküler kemik mikrohasarının yaygın olduğu görülmüştür.⁸²

Mekanik Osteoartrit oluşturulan hayvan modellerinde, artan kemik dansitesi ve osteoid hacmi çoğunlukla kıkırdak değişiklikleri kadar şiddetlidir.¹⁷ Artmış subkondral kemik sklerozu, osteoartrit gelişimi için kesin bir belirleyici olmamasının yanında OA gelişiminde ilerleyici bir subkondral sklerozun eşlik ettiği görülmüştür. Pekçok OA havyan modelinde kontrol gruplarına oranla kıkırdak dejenerasyonu gelişimiyle eş zamanlı ve uyumlu olarak yaş bağımlı subkondral kemik kalınlığında

artış görülmüştür. Bu belirgin fark OA'de artmış subkondral kemik aktivitesi ile bağlantılıdır.⁴⁹

Buradan yola çıkarak artmış subkondral kemik aktivitesini gösteren teknesyum işaretli difosfanat alımında artış ile yapılan sintigrafik inceleme, OA hastalarında kırıkta kaybını önceden işaret edebilir. Araştırmalar belirgin subkondral aktivite yokluğunda kırıkta lezyonlarının ilerleme kaydetmediği, kemik yatağında oluşan değişimlerin ise kırıkta değişimlerine öncülük ettiğini kanıtlar niteliktedir.²⁴

Kemik yeniden yapılanması osteoblastlar tarafından mineralize kollajen tip 1 kemik matriksi ve bu matriksin osteoklastlar tarafından yıkılmasını ilgilendiren ve sıkı kontrol edilen bir mekanizmadır. OA hastalarında kemik yeniden yapılanmasını gösteren belirteçlerin artışı görülmüştür.⁸⁶

OA hastaların serumlarında hem kemik oluşumu ve yıkımı ile ilgili markerlarda artış bulunması anormal ve artmış yeniden yapılanma şeklinde açıklanabilir.

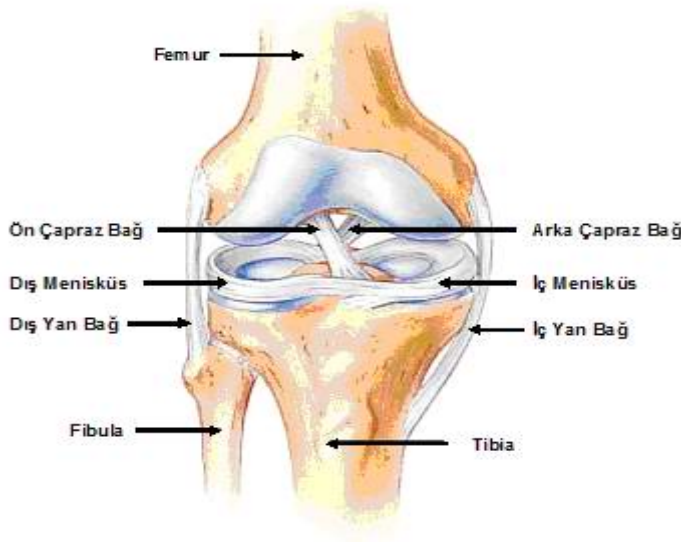
Sinoviyal Sıvı:

İçeriğindeki yüksek miktardaki polimerize hyaluronik asit ile bağlantılı olarak subkondral kemiği koruyup eklemden kayganlığı artıran yüksek viskoziteli aselüler plazma ultrafiltratıdır.

ÖN ÇAPRAZ BAĞ:

ÖÇB femur ve tibia arasında uzanan, sinoviyal bir kılıf olan paratenon tarafından sarılmış intraartiküler bir bağ dokusu bandıdır. ÖÇB proksimalde femur lateral kondili medialine yapışır. İnterkondiler aralık içinde distale, anteriora ve mediale

doğru uzanır ve tibia platosu anterioruna yapışır (Şekil 4). Kalınlığı ortalama 7-12mm, uzunluğu ise ortalama 20-40 mm'dir. Diz 90 ° fleksiyonda ÖÇB eklem içindeki seyri boyunca, aksında vertikal düzlemden anteriora doğru $26\pm6^\circ$ bir eğim izlenirken, bağın lifleri kendi üzerinde 90° spiral bir dış rotasyon gösterirler.^{33,116}



Şekil 4: Diz stabilitesine katkıda bulunan anatomik yapılar

İnsanda ön çapraz bağ fonksiyonu, hasarlanma insidansı:

Ön çapraz bağ, anterior posterior translasyonel ve internal eksternal rotasyonel stabilite sağlayarak tibiofemoral eklem kinematiğinde önemli bir rol oynar. Yürüme sırasında ön çapraz bağı kopuk olan dizlerde; hasarlanmamış karşı diz veya sağlıklı kontrolere kıyasla tibiofemoral harekette belirgin değişiklikler rapor edilmiştir.^{6,45}

Yürümenin stance fazında dizdeki 6 ° serbest hareketi inceleyen bir çalışmada karşı dize oranla ön çapraz bağı kopuk olan dizde tibianın açısal olarak daha fazla internal rotasyon ve posterior translasyon pozisyonunda olduğu raporlanmıştır.⁶

Biplanar floroskopi kullanılan ön çapraz bağı kopuk dizlerde yapılan çalışmalar düşük açılarda internal tibial rotasyona ek olarak medial tibial spine'nin medial femoral kondil tarafından sıkıştırıldığı gösterilmiştir. ⁶³ Oluşan instabilite ve anormal tibiofemoral kinematik eklem kıkırdağı üzerinde fizyolojik yük dağılımı etkileyerek, cevap olarak osteoartrit oluşumu ile sonuçlanan karışık patofizyolojik mekanizmaları başlatır. ^{97,67}

Danimarka'da prospektif olarak yapılan hastane kaynaklı bir çalışmada yıllık insidans 10000 de 30 olarak rapor edilmiştir. Ancak yakın zamanda İsveçte genel popülasyonda 10-64 yaş arası insanlarda neredeyse 3 katı fazla olarak 10000'de 81 olarak gösterilmiştir. Bu hastalar hastanenin acil servisine rotasyonel diz travmasına eşlik eden efüzyon sonucu başvuran ve subakut olarak manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ile tanı konulan hastalar olup, pek çok nedenden hastaneye başvurmayan hastalar düşünüldüğünde sayının çok daha fazla olacağı söylenebilir. Yakın zamanda Amerikan toplumu kaynak alınarak yapılan kohort çalışmada 50-90 yaş arasında ambulator hastalarda tanı yöntemi olarak MRG kullanarak ön çapraz bağ yırtık oranının % 4.8 olduğu rapor edilmiş.

Ön çapraz bağ dizde en sık hasar gören ligaman olmakla beraber izole ön çapraz bağ yırtıkları sık görülmez. Sıklıkla eşlik eden diğer bağ, menisküs, eklem kıkırdağı, subkondral kemik ve kansellöz kemik hasarı vardır. ^{66,14,75}

Tedavi edilmemiş ÖÇB yırtıkları:

Tedavi edilmemiş ön çapraz bağ yırtıkları ve menisküs lezyonlarının uzun dönemde diz osteoartrit gelişimine yol açtıkları yönünde yeterli kanıt bulunmaktadır. MRG bazlı çalışmalarda görülmektedir ki geleneksel olarak sekonder osteoartrit ile

ilişkili bulunan menisküs ve ligaman lezyonlarının önceden düşünüldüğünün aksine primer osteoartritde daha yaygın olarak görüldüğünü kanıtlamıştır. 30-50 yaş arasında ağrı, fonksiyonel kısıtlılık, hayat kalitesinde düşüş ile seyreden erken başlangıçlı osteoartritin büyük çoğunluğundan ön çapraz bağ kopması sorumludur. Ön çapraz bağ hasarı sonrası 10-20 yıl içinde oluşan OA oranları %10 ile %90 arasında değişmektedir. Posttravmatik instabilite sonrası böylesine geniş bir yelpazede OA gelişimi olması hastalığın multifaktöryel (eşlik eden lezyon, genetik yatkınlık, yaşam şekli, cinsiyet, sistemik hastalık...) olduğuna dair kanıtları güçlendirmektedir.^{37,85,67,102}

KIKIRDAK HOMEOSTAZİSİ:

Normal eklemde kıkırdak matriks yıkımı ve sentezi arasında bir denge bulunmaktadır. Bu dengeyi sağlayan çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler ve mekanik faktörler bulunmaktadır. Dengenin bozulması yıkım yönünde ilerleyerek kıkırdağın fonksiyonel ve yapısal bütünlüğüne zarar vermektedir.

Kıkırdağın yapılanma aşamasında kondrositler tarafından üretilen MMP'lar kıkırdak yıkım aşamasının bir parçası olarak görev alırlar. MMP aktivitesi kıkırdak içinde yerleşen doku metalloproteinaz inhibitörleri (TIMP) tarafından engellenir.

MMP ve MMP inhibitörleri arasındaki karmaşık etkileşim ve çeşitli sitokinlerin kondrosit aktivitesini yönlendirmesi eklem kıkırdağının yapısal bütünlüğünü ve fonksiyonlarını etkilemektedir.

EKLEM BİYOMEKANİĞİ:

Eklem kıkırdağı geniş bir yelpazede statik ve dinamik yüklenmeye maruz kalır. Merdiven çıkma gibi normal fizyolojik aktiviteler sırasında *invivo* yüklenme kıkırdakta 15-20MPa dinamik mekanik stres ile sonuçlanır. Bu tepe stres değerleri çok kısa zaman diliminde oluştuğundan ($\leq 1\text{sn}$) %1-3 arasında düşük kıkırdak kompresif gerilmelerine neden olur. Ters olarak diz eklemine 5-30 dakika süresince uygulanan ortalama 3.5 MPa statik fizyolojik stres diz kıkırdağında %35-45 kadar yüksek değerlerde kompresif gerilme ile sonuçlanabilir. Kıkırdağın fizyolojik kompresif, gerilme ve makaslama kuvvetlerine karşı koyabilme yeteneği ekstraselüler matriksinin bileşimine ve yapısal bütünlüğüne bağlıdır.

Ölçümlerde erişkin eklem kıkırdağının kompresif denge katsayısı tahmini 0.5 ile 1 MPa, makaslama katsayısı 0.25 MPa ve germe katsayısı 10 ile 50 MPa arasında değiştiğini göstermektedir. Kollajen fibrilleri germe ve makaslama deformasyon kuvvetlerine etkili olarak direnebilmesine karşın yüksek oranda yüklü glukozaminoglikan içeren agregan molekülleri kompresyona karşı koyar ve sıvı doku içerisine geçer. Agregan molekülünün neden olduğu elektrostatik itme ve osmotik şişme etkileşimleri kıkırdağın kompresif denge katılığına %50 ‘den fazla katkıda bulunur. Çalışmalarda eklem yüklenmesinin kıkırdakta metabolik bir cevap oluşmasına neden olduğu gösterilmiştir. İmmobilizasyon matriks sentezinde ve bileşiminde azalmaya neden olarak dokuda yumuşama ile sonuçlanır. Yüklenmenin çok olduğu kıkırdak bölgelerinde agregan konsantrasyonu kıkırdak yapısını korumak için daha yüksek konsantrasyonda bulunur. Daha şiddetli etkilerde ve yorucu egzersiz yüklenmelerinde kıkırdakta yıkılmalar meydana gelir. Akut veya kronik kompresif aşırı yüklenmeler kıkırdak dejenerasyonuna yol açar. Fizyolojik sınırlarda

statik kompresyon, kıkırdak matriks sentezini geri dönüşümlü olarak inhibe eder. Ters olarak siklik olarak uygulanan intermitant hidrostatik basınç ve kompresif gerilme protein ve agregan sentezini stimüle eder.

Kondrositin mikro çevresindeki mekanik kuvvetler matriks moleküllerinin sentez ve yıkılmasını belirgin olarak etkiler. Yakın veriler kondrositlerin mekanik uyarıları algılama ve cevap vermesinde pek çok ayarlayıcı mekanizmanın bulunduğunu göstermektedir. Değişen basıncın sadece matriks üretme hızını değil, fakat yeni üretilen proteoglikan, kollajen ve diğer moleküllerin kalite ve fonksiyoneliğini değiştirdiğini göstermektedir. Bu bilgiler ışığında spesifik mekanik yüklenme şekilleri kıkırdağın uzun dönem biyomekanik fonksiyonunu geliştirebilir veya olumsuz etkileyebilir. Kıkırdak dokunun uzun dönemdeki fonksiyonel biyomekanik özellikleri, hasarlanmış kıkırdaktaki kondrositler tarafından sentezlenen bireysel matriks moleküllerinin moleküler mekanik özellikleri tarafından belirlenir. Fonksiyonel olarak yetersiz özellikteki matriks makromoleküllerinin biyosentezi, mekanik olarak fonksiyonel bir matriks yapısına katılamayarak postravmatik kıkırdak dejenerasyonu gelişimi nedenlerinden birini oluşturur.

İNSTABİLİTE VE DEĞİŞEN YÜK DAĞILIMINA KIKIRDAK CEVABI:

Yürüyüş sırasında oluşan kronik fizyolojik yüklenmeye kıkırdak kısmi olarak adapte olmuştur. Yürümenin topuk vurma fazında büyük kompresif güçler olduğundan sağlıklı eklemden kalın kıkırdak bölgeleri yüklenmeye bir cevap olarak oluşmuştur. Normal yürümenin topuk vurma fazında tam ekstansiyonda medial

femoral ve tibial temas fazla olduğundan, medial kompartmanda kıkırdak buna cevap olarak daha kalın olarak ölçülmüştür.⁵⁹

Tam tersi olarak spinal kord yaralanması sonucu paralize olan hastalarda yapılan invivo çalışmada kas hareketi veya eksternal mekanik yüklenme olmaması nedeniyle diz ve omuz eklemlerinde kıkırdak kalınlığında azalma saptanmıştır. Kantitatif MRG kullanarak hareketsiz popülasyonda yapılan invivo çalışmalarda sağlıklı kıkırdak kalınlığı ile yüklenme arasında doğrudan bir ilişki bulunmuştur.¹⁰⁹

Diz hareketinin yüzlerce değişik fazında dinamik MRG kullanılarak yapılan çalışmalarda ÖÇB kopuk olan dizlerde sağlıklı karşı dize oranla değişime uğramış tibiofemoral hareket neticesinde eklem yüzeyinde anormal yük dağılımı ve temas paterni olduğu gösterilmiştir.^{11,68}

İnvivo olarak fonksiyonel yüklenmelere kıkırdağın metabolizmasını uygun hale getirerek cevap verdiği gözlemlenmiştir. Laboratuvar ortamında 2 boyutlu tek katmanlı kondrosit kültürlerine uygulanan dinamik hidrostatik basınçta cevap kondrosit proliferasyonu, proteoglikan ve tip 2 kollajen sentezi şeklinde ekstraselüler matriks artışı şeklinde olduğu görülmüştür. Makaslama kuvvetleri şeklinde uygulanan stres ise proteoglikan üretiminde artış ve azalmış matriksmetalloproteinaz ekspresyonu şeklinde kondrosit metabolizmasında değişimi tetiklemiştir. Ancak bu cevap kıkırdağın her bölgesinde sabit değildir.^{91,92}

Histolojik olarak değerlendirildiğinde aynı eklemin farklı lokalizasyonlarında maruz kalınan kompresif ve makaslama kuvvetleri farklı olduğundan kondrosit morfolojisi, kollajen dizilimi ve ekstraselüler matriks yoğunlukları değişkenlik

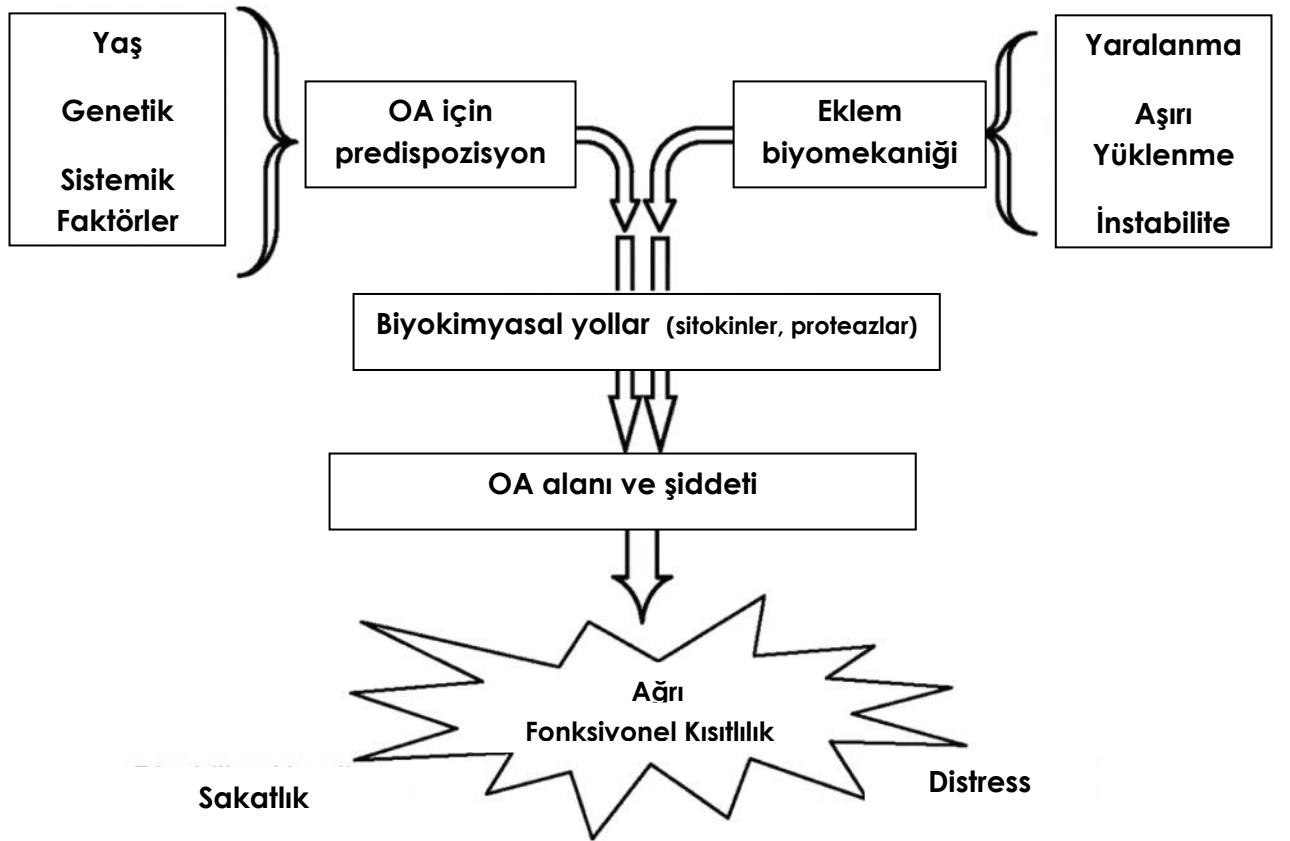
gösterir. Tibial platonun orta bölgelerinde kondrositler daha yassı ve yüzeyel tabakada kollajen dizilimi düzensiz olduğu halde periferinde, meniskusun altında kondrositler daha yuvarlak ve kollajenin yüzeyel tabakada dizilimi tanjansiyel olarak daha organizedir. Daha kalın ve dezorganize olan kıkırdığın santral kısmının su geçirgenliği fazla olup kompresyon güçlerine daha dayanıklı iken periferik kısmının su geçirgenliği daha az olup germe ve makaslama güçlerine daha dayanıklıdır.^{7,19,4}

Her bölgedeki kondrosit ve kollajen kendi maruz kaldığı fizyolojik yüklenmeye adaptasyon olarak germe, kompresyon ve makaslama güçlerine farklı karşı koyma özellikleri geliştirdiğinden eklemde alışagelmışin dışında olabilen hareket ve yüklenmeler kıkırdak yıkım mekanizmasının başlangıcı olabilir. Matriks komponentlerinde yıkım veya yapım, doku yüklenmesinin şiddetine, kondrositlere yakınlığına ve sıvı akımındaki değişikliklere göre yönlendirilir.^{21,104}

Yukarıda bahsedilen özellikler ve yapılan deneyler sonucunda diz eklem yüklenmesinde, yapısal özelliklerinde ve biyolojik aktivitesinde meydana gelen dramatik değişim nedeniyle OA başlangıcı için ÖÇB hasarının potansiyel bir basamak olduğu bilinmelidir.

OA erken evrelerinde yüzeysel takada proteoglikan kaybı ile beraber fibrilasyon ve matriks konsolidasyonunu kapsayan yüzey değişiklikleri görülmektedir.⁵² Yüzeyde fibrilasyon ve matriks konsolidasyonundan sonra eklem yüzünde tanjansiyel kuvvetlerin artmasına yol açan yüzeyel sürtünme artışı olmaktadır. Bu tanjansiyel kuvvet yüzeydeki kollajen yapısında makaslama güçlerini artırarak fibrillerin kırılmasına ve yüzeyde fibrilasyonun artmasına neden olur. Kıkırdak yüzeyinde devam eden tanjansiyel traksiyon ve eşlik eden makaslama

stresi, matriksmetalloproteinaz ve interlökin şeklinde katabolik yolları aktive edebilir. Anormal yüklenmemin devam etmesi kısır döngüye yol açarak kompresif güçlere karşı dayanıklılığı azaltır ve OA ilerleyerek eklemdede dejenerasyon şeklinde kalıcı yapısal değişimler oluşur.^{31,92,43}



Şekil 5: Osteoartrit etiyopatogenezinde etkili faktörler

OSTEOARTRİT:

Epidemiyoloji:

75 yaş üzeri popülasyonda %80 oranında en az bir eklemden osteoartrit varken klinik olarak belirgin osteoartrit %30 oranında görülmektedir. Otopsi ve radyolojik çalışmalar bu oranların epidemiyolojik çalışmalara göre daha yüksek oranlarda olduğunu göstermektedir. Yaşla beraber görülme sıklığında artış olması bize bu hastalığın yaşa bağımlı dejeneratif bir durum olduğunu düşündürmektedir. Ligamentöz laksiye, kas güçsüzlüğü ve propriyoseptörlerin işleyişinin bozulması, kondrositlerin büyüme faktörlerine duyarlılığının ve matriks yapımının azalması nedeniyle artan yaş ile görülme sıklığı artmaktadır. OA gelişimi için diğer risk faktörleri;^{41,48,51,88,99} (Şekil 5)

1. Cinsiyet
2. Obezite
3. Genetik yatkınlık
4. Normalden yüksek kemik mineral dansitesi
5. Travma

Etiyoloji:

Klasik olarak osteoartrit sebeplerine göre 2 ayrı grupta incelenebilir.

1. Primer osteoartrit (idiyopatik)
2. Sekonder osteoartrit (travma, postenfeksiyöz, Romatoid Artrit, hipermobilité sendromu, Diabetes Mellitus, Akromegali, Hemokromatozis, Okronosis, Wilson hastalığı, Gut, kalsiyum kristal depo hastalıkları, nörolojik hastalıklar, Tabes Dorsales)

OSTEOARTRİT PATOFİZYOLOJİSİ:

OA patofizyolojisi bugün hala kesin bilinmemekle beraber, sadece dejeneratif bir hastalık olmadığı, hastalığın patogeneğinde yapım ve yıkım beraber ilerleyen inflamatuvar bir süreç olduğu son zamanlarda yapılan deneysel çalışmalar ile ispat edilmiştir.² Tekrarlayan minör veya majör travmalar başta olmak üzere, kas gücü, subkondral kemik dansitesi, eklem aligmanı gibi çeşitli lokal faktörlerin etkisi zaman içerisinde anormal kıkırdak yüklenmesine cevap oluşmasına neden olarak primer OA'ı tetikleyen mekanizma olabilir.

Yük taşıyan eklemlerde görülen artmış kemik dansitesi, yük altında daha az deforme olarak kıkırdaktaki stresi artıran bir faktördür. Diz ve kalça osteoartrisinde artmış kemik dansitesi dikkat çekmektedir.

Anormal dizilimde OA görülme sıklığını artırmaktadır. (dizde 4 °varus veya valgus açılanması medial ve lateral OA görülme riskini 4 kat artırmaktadır). Erkeklerde daha az görülmekle birlikte kuadriseps güçsüzlüğü kadınlarda OA gelişimine katkıda bulunmaktadır. Asetabular displazi ve slipped femoral kapital epifiz gibi gelişimsel anormallikler sıklıkla kalçanın prematür osteoartritine neden olmaktadır.

OA yaygın formunda ailesel yatkınlık görülmektedir ancak, tip2 prokollajen sentezleyen COL2A1 geninde mutasyona rastlanmamıştır. Osteokondrodisplastik sendromlar gibi ender rastlanan OA subtiplerinde COL2A1 geninde mutasyonlara rastlanmıştır.

Obezite ile OA patogeneğinde arasındaki ilişki; diz üzerinde artan mekanik yük, artan kemik dansitesi ve adipöz dokunun büyüme faktör ve hormon üretimini artırması sonucu olabilmektedir.

OA oluşumunda kondrosit anahtar rol oynamaktadır. Mekanik stres ve IL1 ve TNF- α gibi birtakım sitokinlere yanıt olarak kondrositler tarafından sentezlenen MMP 'lar ESM yıkımına neden olmaktadır. Sitokinler ayrıca eklem katılığı ve ağrıya neden olan prostaglandin salınımını stimüle etmektedir.

Oluşan subkondral kemik sklerozu ve osteofitler kemik elastisitesini azaltarak eklem kıkırdığı üzerinden daha fazla kuvvetin transfer olmasına neden olarak kısır döngüye katkıda bulunmaktadır. Kondrositlerin hasarlı tip 2 kollajeni onarması yetersiz olmaktadır. Oluşan yeni kıkırdak tip1 kollajen ve artmış oranda fibronektin ihtiva etmektedir. Yeni oluşan kıkırdak, sağlıklı kıkırdığın elastikiyet ve düşük sürtünme özelliklerini karşılamakta yetersiz kalmakta; daha ileri yıkım klinik olarak belirgin OA oluşumuna neden olmaktadır

Moleküler seviyede OA, ESM proteinlerinin sentez ve yıkımı arasındaki dengenin bozulması ile karakterizedir. Kondrositler kıkırdak homeostazisin korunmasında önemli bir rol üstlenmiştir. Eklem kıkırdığının hayatiyeti kondrositlerin apoptozise karşı koyma, ESM proteinlerinin biyosentez ve yıkımını regüle etme kapasitesine dayanmaktadır.

Kıkırdak ekstraselüler matriks döngüsü:

Kıkırdak ESM döngüsü, ESM proteinlerini yıkıma uğratmak için inaktif olarak sentez edilen bir grup proenzim olan matriksmetalloproteinazlar tarafından regüle edilir. Matriksmetalloproteinazlar çeşitli hücreler (makrofaj, fibroblast, kondrosit) tarafından salgılanan nötral pH'da çinko bağımlı olarak etki gösteren bir endopeptidaz enzim gurubudur. Özellikle inflamatuvar sitokinlerden IL-1 ve TNF-

α 'nın stimulan etkisi ile hücreden proenzim olarak salgılanarak pek çok biyolojik olayı regüle edebilirler. Günümüzde MMP 'lar substratlarına göre çeşitli gruplara ayrılmışlardır. Temel olarak 3 enzimin ekstraselülmatriks protein döngüsünü regüle ettiği bilinmektedir. Bunlar; kollajen liflerinin yıkımından sorumlu olan **kollajenazlar**, (MMP 1-8-13), proteoglikan ve tip9 kollajenin yıkımından sorumlu **stromelysin** (MMP 3-10-11), ve denatüre kollajeni yıkan **jelatinazdır** (MMP 2-9).

Hücre kültürü ve deneysel OA hayvan modelleri ve OA gelişen insanlardan alınan subkondral kemik, kıkırdak ve sinovyal membran doku örneklerinde özellikle MMP 1-3-9-13 düzeylerinde kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı artış bulunmuş ve ekstraselülmatriks yıkımının kondrositler tarafından salgılanan MMP'lar vasıtası ile gerçekleştiğine dair güçlü kanıtlar elde edilmiştir.⁷³

Normal kıkırdak yapısının korunmasında MMP aktivitesinin regülasyonu kritik bir öneme sahiptir. Her ne kadar invitro olarak insan OA femur başından elde edilen kıkırdak kültüründe belirgin MMP3 ekspresyonu gösterilemese de Stromelysin-1 (MMP-3)'in genel olarak OA ile ilişkili olduğu ortaya çıkmaktadır. Diğer MMP'ler arasında MMP 2'nin (i.e. 72-kDa gelatinase A) kollajen fibronektin ve tip 11 kollajeni, MMP 9 (i.e. 92-kDa gelatinase B) proteoglikanları yıkıma uğratabilmektedir. MMP-2 ve MMP-9 insan eklem kıkırdağında bulunmakla birlikte insan OA kıkırdağında sadece MMP-9 artan miktarlarda bulunmuştur.

OA'de kıkırdak yıkımı ile en çok bağlantılı görülen enzim grubu, ADAMTS adı verilen metalloproteinazların bir subgrubudur. Bu enzim subgrubu, ekstraselüler matrikste hyalektinin proteolitik yıkımından sorumlu olarak gösterilmiştir. ADAMTS

enzim subgrubunun moleküler yapısı yakın zamanda Gao ve ark. tarafından gösterilmiştir.

ADAMTS 1- 4 ve 5 aggregana karşı aktivite göstermişlerdir. ADAMTS 1 ve 4 ayrıca versikan yıkıcı aktivite göstermektedir. ADAMTS 4 olduğu ispat edilen MMP aktivasyonu OA eklemlerde artmış olarak bulunmuştur.¹⁰⁰ Yakın zamanda Malfait ve ark. ADAMTS 4 ve 5'in insan OA kıkırdağında olduğunu göstermişlerdir.⁷⁰

MMP aktivitesi endojen bir enzim grubu olan matriksmetalloproteinaz inhibitörleri (TIMP) tarafından regüle edilmektedir.⁴⁰ İnsanların eklem dokusunda TIMP-1, TIMP-2 ve TIMP-3 bulunmaktadır. TIMP-4 fonksiyonel olarak TIMP-2'ye bağımlıdır.¹⁵

TIMP-1, TIMP-2 and TIMP-3 ekspresyonu tümör nekrosis faktör (TNF) tarafından baskılanmaktadır.⁵⁰

Yakın zamanda Huang ve ark. yaptığı çalışmada TIMP-4 mRNA 14 OA femur başı kıkırdağının 12'sinde, artritik olmayan 9 femur başı kıkırdağının 2'sinde bulunmuştur. İnsan OA kıkırdağında artmış olarak bulunan TIMP-4 seviyeleri, TIMP-4'ün OA kıkırdakta MMP aktivitesini düzenleyerek ekstraselülmatriks döngüsünden sorumlu enzim olabileceğini ortaya koymuştur. Bu yeni bir bilgidir, oysa daha önceki çalışmalarda OA kıkırdağında MMP seviyelerine oranla TIMP'lerde rölatif bir eksikliğin olduğu ve bunun anabolik ve katabolik yol arasındaki dengesizliğe yol açtığı idia ediliyordu. Ancak OA ile ilişkili ve TIMP 4 tarafından regüle edilen MMP' nin hangisi olduğu günümüzde bilinmese de, MMP-2'nin (72-kDa gelatinase) TIMP-4 tarafından belirgin olarak inhibe edildiği Bigg ve ark. tarafından rapor edilmiştir.

OA patogenezinde MMP proenzimlerinin aktivasyonu anahtar bir düzenleyici basamaktır. MMP'ların membran bağımlı bir ezim grubunun (MTMMP1-MTMMP4) kollejenaz 3'ü aktivie ettiği, ancak MT-MMP'lerin OA kıkırdakta proenzim aktivasyonu üzerindeki rolü henüz kanıtlanmamıştır.

OA patogenezinde potansiyel proMMP aktivatörü olarak çeşitli enzim grupları üzerinde çalışılmıştır. Bunlar plazminojen aktivatörü olan plazmin ve katepsin B gibi serin, sistein bağımlı proteazlardır.²² Sinoviyal katepsin B' nin tavşanda parsiyel menisektomi yapılarak oluşturulan deneysel OA modelinde kıkırdak yıkımında kritik bir rol üstlendiği gösterilmiştir.

Büyüme faktörleri ve kıkırdak tamiri:

Kıkırdak ESM sentezi ve tamiri, insulin benzeri büyüme faktörü (IGF 1-2) ve insulin benzeri büyüme faktörü bağlayan proteinler (IGFBP-1) tarafından regüle edilmektedir.

Malemud ve ark. yaptığı invitro çalışmalarda rekombinant TGF- β 'nin insan kondrosit proteoglikan kor protein sentezini stimüle etmesi nedeniyle TGF'ün OA kıkırdak onarımında rol sahibi olabileceği öne sürülmüştür. Ayrıca yük artışına yanıt olarak TGF- β üretimi artmakta ve TGF- β TIMP sentezini artırmaktadır.⁶⁹

Büyüme hormonu diferansiye olmuş kondositlerin IGF-1'e yanıtını azaltarak uzun kemik büyümesini tetikler. Middleton ve ark. normal insan eklem kıkırdağında düşük seviyelerde IGF-1 düzeylerine karşın OA kıkırdağında IGF-1 mRNA ve IGF-1 protein düzeylerinin artmış olduğunu göstermiştir.⁷¹ Artan IGF-1 düzeylerine rağmen OA kıkırdakları IGF-1'e yanıtsız görülmektedir, bunun sebebi OA kondrositleri

tarafından üretilen IGFBP 'lerinin artması sonucu olabilir. Semptomatik OA hastalarında normal hastalara kıyasla serum ve intraeritrosit büyüme hormon seviyeleri ve serum IGF-1 seviyeleri artmış olarak bulunmuştur.³²

Sitokinler ve diğer çözülebilen mediatörler:

IL-1 ve TNF- α gibi sitokinler kıkırdak ESM döngüsünü etkileyerek anahtar rol oynamaktadır. İnsan OA kıkırdağından elde edilen insan kondrositlerinin rekombinant IL-1 veya IL-1 β ile inkübe edilmedikleri zaman MMP3 (stromelysin -1) üretimi yapmadıkları görülmüştür. RhIL-1 veya IL-1 β ile inkübe edildikleri zaman kondrositlerin ürettikleri MMP3 moleküler karakteristiği fibroblast MMP3 ile benzer bulunmuştur.³⁵

IL-1 β TIMP sentezini baskımlarken, sürekli olarak MMP üretimini yukarı regüle edip, plazminojen sentezinin artması ve plazminojen aktivatör inhibitör-1 seviyelerinin azalmasına neden olmaktadır

Aktif IL-1'in OA sinoviyal membranda bulunması kondrositlerin aksine sinoviyal hücrelerin OA kıkırdağında MMP enzim ekspresyonunun yukarı regülasyonundan sorumlu olabileceği sonucunu doğurmaktadır. OA'in inflamatuvar döneminde üretilen IL-6, IL-8 gibi sitokinler düzenleyici moleküller için kofaktör görevi görürken, IL4-10-13 interferon A gibi moleküller inflamasyonu inhibe ederek etki göstermektedir.

46

TNF- α membran bağımlı bir öncü olarak üretilerek TNF alfa konverting enzim (TACE) ile proteolize uğrayak aktif hale gelmektedir. TACE gen ekspresyonu normal insan kıkırdağında bulunmakla birlikte OA kıkırdağında artmış olarak bulunmuştur.⁹

IL-1 ve TNF- α tarafından başlatılan proinflatuar yolda reseptör bağımlı bağlamaya ihtiyaç vardır. Her sitokin spesifik IL-1 ve TNF- α reseptörlerine yüksek afinite ile bağlanır. IL-1'in IL-1 tip 1 resptörüne bağlanması romatoid artrit (RA) tedavisinde kullanılan IL-1 reseptör antagonist tedavisinin veya OA tedavisinde tip 2 IL- β decoy reseptör kullanımının temelini oluşturmaktadır. Ayrıca TNF- α 'nın OA patogenezi ile ilgili olabileceği yolunda artan kanıtlar bulunmaktadır. Bu kanıtlar TNF- α ve reseptörleri tarafından kondrosit ve synoviositlerde oluşturulan sinyal iletimi ve mekanizmalarının öğrenilmesi gerektiğini göstermektedir.

İnsan kondrositlerinde p55 ve p75 TNF- α reseptörlerinin ikisinde bulunmaktadır.¹⁰³ Alaaeddine ve ark. yaptığı çalışmada normal dokulara kıyasla OA eklemlerden elde edilen kondrosit ve sinoviositlerde artmış TNF- α reseptörleri gösterilmiştir.⁵ Ek olarak OA eklemden elde edilen sinoviyum veya sinoviyal kültürleri invitro olarak normal insan kondrositlerine eklendiğinde normal kondrositlerde artmış TNF- α reseptörleri oluşumu ile sonuçlandığı görülmüştür.

Çalışmalarda elde edilen sonuçlar beraber değerlendirildiğinde OA'de TNF- α reseptör seviyesinin artışı ve TNF- α aracılı proinflatuar mekanizmaya katkıda bulunduğu tespit edilmiştir.

Metotreksat alan RA hastalarında TNF- α aktivasyonunu nötralize eden tedavi stratejileri etkili bulunmuştur. RA tedavisinde kullanılan iki ajan olan infliximab ve etanerceptinin OA kıkırdak kültüründe TNF- α 'nın indüklediği nitrik oksit sentezini baskıladığı gösterilmiştir. TGF B1 veya IGF 1 ise TNF- α aracılı MMP sentezini önlemektedir.

IL-6, lösemi inhibitör faktör ve IL-7, ESM sentezi, MMP gen ekspresyonu ve TIMP üretimini stimüle etmeleri ile OA de potansiyel rol oynayabilen diğer

sitokinlerdir. IL-17 özellikle kondrosit kültürlerinde Nitrik Oksit (NO) üretimini artırması nedeniyle ilgi çekiçi bir sitokindir.

NO seviyeleri artritik serum, sinoviyal sıvı ve sinoviyal membranda artmış olarak bulunmuştur. Hayvanlar üzerinde parsiyel menisektomiye takiben oluşturulan deneysel OA modelinde kontrol gruplarına oranla medial menisküs ve tibia eklem kıkırdağında artmış NO seviyeleri bulunmuştur. NO ayrıca eklem kıkırdağı MMP'lerini aktive edebilmektedir. IL-1 β ve IL-17 insan OA kondrositlerinde NO üretimini artırırken IL-1 β insan kondrosit kültüründe IL-6 sentezini artırmaktadır. Fibrile olmuş insan OA kıkırdağında IL-6 RNA düzeyleri artmış olarak bulunmuştur.

Hidrostatik basınç tarafından kondrosit apoptozisinin başlaması:

Yaşlanma sırasında eklem kıkırdağının anormal mekanik yüklenmesi kıkırdak apoptozisinin başlamasını stimüle eden başlıca çevresel faktördür. Mekanik yüklenmenin apoptozisi başlatma ihtimalini araştırmak için OA kıkırdağından elde edilen insan kondrositlerinin normal yürüme siklusu boyunca maruz kaldıkları siklik hidrostatik basınç değerleri ölçülmüştür. Bu çalışmalarda servo pnömatik basınç yüklenme cihazı ile (5 MPa 30dk- 4 saat arası; 1 Hz siklik sinüzoidal dalga formu) invitro olarak hidrostatik basınca maruz kalan insan OA kondrositlerinin apoptozis yönünden tetiklendiği görülmüştür. Başlangıç hücre dansitesinden bağımsız olarak devamlı siklik hidrostatik basınç (5MPa) azalmış kondrosit sağkalımı ile sonuçlanmaktadır. Hidrostatik basınç indüksiyonu ile azalan kondrosit sağkalımı agarose jel üzerinde ethidium bromide ile boyanan internükleozomal DNA fragmanlarının migrasyonu ile gösterilmiştir. 30 dakika basınç altındaki DNA fragmanlarının migrasyon paterni yüklenmeyen kondrositler ile benzer bulunmuştur.

Ancak 2. saat itibariyle 4 saatlik basınç yüklenmesinde DNA fragmanları farklı görülmüştür. DNA fragmanlarının migrasyon paterni TNF- α veya sodyum nitroprusid ile inkübe edilerek indükte edilen insan kondrosit kültüründeki kondrosit DNA fragmantasyonuna benzer apoptotik bir patern göstermiştir.

MATRİKSMETALLOPROTEİNAZLAR:

Matriksmetalloproteinazlar; ESM'in bütün komponentlerini yıkıma uğratabilen bir enzim ailesini kapsamaktadır. MMP'ler, embriyonik gelişme, büyüme, doku yeniden yapılanması ve onarımı gibi pek çok fizyolojik olayda önemli rol oynar. MMP'lerin aktivasyonu ve aşırı ekspresyonu artrit, kardiyovasküler hastalıklar, tümör progresyonu ve akciğer hastalıkları dahil pek çok patolojiye katılır. MMP'ler nötral pH'da pek çok substratı yıkıma uğratan 25'ten fazla salgılanan ve hücre yüzeyinde çinko bağımlı endopeptidazdan oluşan bir multigen ailesinden oluşmaktadır. MMP ailesi en iyi aktive olduklarında ve beraber hareket ettikleri zaman ESM komponentlerini yıkıma uğratma kabiliyetleri ile bilinirler. Ayrıca proteinazları, proteinaz inhibitörlerini, latent büyüme faktörlerini, kemotatik molekülleri, büyüme faktörü bağlama proteinlerini, hücre yüzey reseptörlerini ve hücre-hücre adezyon moleküllerini yıkıma uğratırlar. MMP'lerin hepsi ortak alanlar içerirler, çinko katalitik merkezin ortasında bulunur ve pro-peptid kaybı ile aktive olan proenzim formu olarak üretilirler. Proenzim MMP aktivasyonundaki gecikme prodomainde bulunan korunmuş sistein rezidü ve aktif bölgedeki katalitik çinko arasındaki etkileşim tarafından sağlanır. Sistein değişim hipotezinde açıklandığı gibi Sys-Zn ilişkisinde çözülme ile sonuçlanan prodomainin ardışık proteolizi,

prodomanın ayrılması ve enzimin aktifleşmesine neden olmaktadır. Membran tip MMP'ler (MT-MMPs) gibi bazı MMP'lerin propeptid ve N terminal bölgesi arasında kısa bir peptid yapı bulunmaktadır. Bu, golgide yerleşmiş bir serin proteaz olan furin tarafından tanınır, böylece bu tür MMP' ler aktif formda salgılanır. MMP-8 (kollajenaz-2) ve MMP-9 (jelatinaz B) nötrofil içindeki spesifik granüllerde depolanmış olarak bulunurken, diğer çoğu MMP'ler sitokinlerin stimülasyonu sonucu değişik konnektif doku hücreleri tarafından üretilir. Geleneksel olarak MMP'ler substratlarına göre; stromelysins, kollajenaz, jelatinaz, MT-MMP ve GPI adları ile değişik gruplara ayrılır. Stromelysinslerin geniş bir substrata spesifitesi vardır. Bu enzimlerin nötral substratları proteoglikanlar, fibronektin ve laminindir. MMP-3 (stromelysin-1) normalde yaygın olarak eksprese edilmez ancak büyüme faktörleri ve IL-1 ve TNF- α gibi sitokinler tarafından hızla indüklenir. MMP3 ve MMP10'nun (stromelysin-2) benzer bir substrat spesifitesi vardır ancak bu enzimlerin ekspresyon paternleri çoğunlukla farklıdır.

Artan sayıda ve karmaşıklıkta substrat aralığı nedeniyle MMP'ler günümüzde çoğunlukla domain yapılarına göre gruplandırılmaktadır. MMP'lerin çoğu MMP-1'e (kollajenaz-1) benzemektedir; MMP-2 (jelatinaz-A) ve MMP-9'da fibronektin benzeri yapılar varken, MMP-21 de vitroektin benzeri domain yapısı bulunmaktadır. MMP-17 ve MMP-25'in her ikisinde de sitoplasmik GPI ankor bulunur, MMP-23 C-terminal immunoglobulin benzeri domaine sahiptir fakat ne MMP-7 nede MMP-26'da haemopexin domaini bulunmaktadır. 3 adet memeli kollajenazı bulunmaktadır: MMP-1, MMP-8 ve MMP-13 (kollajenaz -3). Bu enzimler tek bir bölgede kollajen fibrillerini yıkıma uğratırlar. MMP-2 ve MT1-MMP 'de (MMP-14) bu bölgede

yıkım yapabilir. Enzimlerin değişik kollajenlere karşı spesifitesi değişir; MMP-13'ün diğer kollajenazlara göre daha geniş bir substrat spesifitesi vardır ve tip 2 kollajeni yıkıma uğratmayı tercih ederken MMP-1 ve MMP-8 sırasıyla tip 3 ve tip 1 kollajeni tercih eder. MMP-1 ve MMP-13'ün her ikisinde inflamtuar mediatörler tarafında stimüle edildikleri zaman makrofaj, fibroblast ve kondrositler tarafından sentez edilir. MMP-8 hücrenin stimülasyonu sonucu predominant olarak nötrofiller tarafından salınır ancak bu MMP kondrositler tarafından da üretilir ve her 3 kollajende hastalıklı kıkırdakta bulunmaktadır. MMP-13, MMP-1'ye göre çoğunlukla değişik bir şekilde kontrol edilir; bazı türlerde MMP-1'i aşağı regüle eden retinoik asit MMP-13' yukarı regüle ettiği bilinmektedir. MMP-2, MMP'ler içinde en yaygın olanıdır. MMP-9 transforme olmuş ve tümör tarafından oluşturulan hücrelerde yaygın olarak bulunmaktadır. Bu jelatinazlar bazal membranın bozulmasından ve anjiogenesis ile bağlantılıdır. Romatoid sinoviyal eklemlerde, romatoid sinoviyal doku ve hücrelerden elde edilen kültür ortamlarında, romatoid eklemlerin kıkırdak-pannus kesişiminden alınan sinoviyal dokuda, osteoartrit kıkırdakta ve artrit geliştirilen artrit modellerinde değişik MMP'lerin artmış düzeyleri bulunmuştur. Bu proteinazlar eklem dokusunun patolojik yıkımı ve büyüme ve gelişme sırasında oluşan normal konnektif doku matriks döngüsü ile bağlantılıdır. Osteoartritte hem matriks sentez hızı hemde yıkım artmıştır. Bu olayın sonucu olarak bazı bölgelerde fazla matriks oluşumu gözlenirken (osteofit), diğer alanlarda fokal matriks yıkımı görülmektedir.

MMP'lerin kontrolü:

MMP'lerin dikkatle kontrol edilmesi gerekmektedir ve bu sentez ve sekresyon, proenzimlerin aktivasyonu, aktif enzimlerin inhibisyonu, ve MMP'lerin temizlenmesini kapsayan birkaç kritik basamakta gerçekleşmektedir. Buna ilave olarak konnektif doku hücresinin cevabı, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimi ile modifiye edilmektedir. Örnek olarak kırık dokü kùltürlerine fibronektin fragmanlarının eklenmesi aktif proteinaz sentezlenmesini belirgin olarak artırmaktadır.

Sentez ve sekresyon:

IL-1 ve TNF- α gibi bazı sitokinler pek çok hücre tiplerini proinflatuar ve yıkıcı etkileri olan proteinaz sentezi yönünde stimüle ederler. MMP-1 MMP-3 ve diğler MMP'lerin sentez ve salgılanması IL-1 ve TNF- α tarafından stimüle edilir. Artritlik eklemdede spesifik sitokin ve büyüme faktörü üreten çok sayıda değışik hücre tipleri bulunmaktadır.

Matriksmetalloproteinazın kemik üzerine etkisi:

Kemik rezorpsiyonu ve formasyonu iskeletin gelişimi ve kalsiyum homeostazisinin devamlılığının sağlanmasında gereklidir. Kemik döngüsünün uygun olmayan regölasyonu, kemik gücünde kayıp, mikrokırıklar, iskelet sekil bozuklukları veya hiperkalsemi şeklinde patolojik durumlara neden olabilir. Bu hastalıkların arasında osteoporoz, osteolitik metastaz, OA, paget hastalığı veya algodistrofi bulunmaktadır.

MMP-9'un osteoklastlarda yüksek oranda görölmesi, osteoklastik aktivitede önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. MMP-9 yoksun fareler anormal

iskelet büyüme plağı vaskülarizasyon ve ossifikasyon paterni gösterir. Hipertrofik kondrositler normal olarak gelişimini tamamlar ancak apoptozis, vaskülarizasyon ve ossifikasyon gecikmeye uğrar. MMP-9'un osteoklastların rezorpsiyon bölgelerine invaziv aktivitesinde önemli olduğu ortaya çıkmaktadır. MMP-9'dan yoksun olan farelerde osteoklastların işlevlerinde bir gecikme olmakta ancak mineralize matriksin osteoklastik rezorpsiyonunda bir açık ortaya koymamaktadır. MMP-9'un asıl rolü osteoklastlar üzerinde kemotaktik aktiviteyi kullanarak ve invazyonu teşvik ederek VEGF bağı ECM'i serbestleştirmek.

Matriksmetalloproteinazın eklem kıkırdığı üzerine etkisi:

Kıkırdaktaki agreganın yıkımından sorumlu asıl proteinaz aggregenazlardır. Bunlar aggregenaz-1 (ADAMTS-4), aggregenaz-2 (ADAMTS-5) ve yakın zamanda ADAMTS-1 ve ADAMTS -9 olarak adlandırılan ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) ailesinin üyeleridir. Tip 2 kollajen kollejenazlar (MMP 1-8-13) ve MT1-MP tarafından yarılabılır. Fizyolojik ısılarda yarılmış olan kollajen triple helikal yapısı çözülür ve diğer proteinaz saldırılarına açık hale gelmektedir. Jelatinazlar (MMP-2-9) denatüre kollajeni (jelatin) kolayca sindirebilirler ve MMP-2 pro-MMP-13'ü aktive edebilir. RA sinoviyal sıvıda ve dokularda MMP-2 ve MMP-9 protein seviyeleri artmıştır. Bu araştırmalar MMP-2ve MMP-9'un artritde hayati bir rol oynadığını göstermektedir. Ancak antijenin tetiklediği artrit şeklinde geliştirilen hayvan romatoid artrit (RA) modelinde MMP-2 yoksun farelerde vahşi tip farelere kıyasla belirgin olarak şiddeti artmış artrit görülmüştür. Bu bulgu bize MMP-2'nin supresif bir rol oynayabileceğini göstermektedir. MMP-2 yoksun farelerin tersine MMP-9 yoksun farelerde azalmış

miktarda artrit seviyeleri görülmektedir, bu bize MMP-9'un bu modelde artriti artırdığını göstermektedir. MMP-2 ve MMP-9'un her ikisinin yokluğunda vahşi tip farelere oranla artrit de herhangi bir fark görülmemesi MMP-2 yokluğu nedeniyle artmış artrit ve MMP-9 yokluğu nedeniyle azalmış artritin birbirini dengelemesi nedeniyledir. MMP-3'ün geniş bir substrat spesifitesi vardır. Etkili olarak proteoglikanları yıkabilir ve latent kollajenazları aktive edebilme yeteneği vardır. MMP-3 RA veya OA hastalarının eklem kıkırdığı ve sinoviyalarında bulunmaktadır. MMP-3 seviyeleri RA hastalarının sinoviyal sıvılarında artmıştır. MMP-3 genindeki bozulma; antijenle indüklenen artrit, kollajenle indüklenen artrit ve medial kollateral bağ ve medial menisküsün cerrahi olarak kesilerek oluşturulan 3 artrit modelinde incelenmiştir. Çalışmaların hepsinde MMP-3 yoksun fareler ve kontrol grupları arasında inflamasyon veya proteoglikan azalması yönünden belirgin fark bulunmamıştır. Bu erken proteoglikan yıkımının muhtemel sebebi aggregenazlar. Antijenle indüklenen artrit modelinde MMP-3'ün tip2 kollajen yıkımına yol açan mekanizmalarda önemli rol oynadığı ortaya çıkmaktadır.²⁸

MATRİKSMETALLOPROTEİNAZ İNHİBİSYONU :

Hayvanlarda yapılan yoksunluk çalışmaları proteinlerin fonksiyonlarının tanımlanmasında önemli çalışmalar ancak bu çalışmaların insanlarda dikkatli bir şekilde tekrarlanması gerek. Bütününde insan ve fare MMP'leri amino asit seviyesinde %65-80 oranında benzerlik ve benzer katalitik kapasiteye sahip görülmektedir.

MMP inhibitörleri ve artritler :

Kanser araştırmalarının tedavisinde pek çok MMP inhibitörü araştırmalarına kıyasla artritli hastalarda eklem harabiyetini koruyucu özellikleri daha az araştırılmıştır. Buna rağmen sentetik MMP'lerden bazılarının hayvan osteoartrit modellerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Selektif bir kollejenaz inhibitörü olan Torcade (Ro 32-3555) MMP-1-8-13'e karşı düşük nanomolar inhibisyon katsayısı varken, MMP-2-3-9'a karşı ortalama 10 ile 100 kez daha az oranda etkinliği vardır. Kıkırdak kültürlerinde IL-1 β aracılı kollajen salınımını bloke ederler. İn vivo olarak rat granüloma modelinde, P. Acnes ile oluşturulan rat artrit modelinde kıkırdak yıkımını önlemiştir. Aktif inflamasyonun olduğu durumlarda dahi kıkırdak ve kemik üzerindeki koruyucu etkilerinin açık bulguları mevcuttur. MMP1-2-3-9-12 ve 13'e karşı nanomolar sabit bu geniş spektrumlu inhibitör, menisektomi yapılmış tavşan OA modellerinde ve spontan OA yapılan kobay modellerinde kondroprotektif olarak bulunmuş. Sentetik bir MMP inhibitörü olan, MMP2-3-8-9 ve 13'e karşı etkin, MMP-1'e karşı düşük etkinliği olan Tanomastat (BAY12-9566) kobay ve köpek OA modellerinde etkili bulunmuş ve OA tedavisinde önerilmiştir. MMP2-9-13 ve 14'e karşı picomolar aralığında inhibisyon katsayısı olan ve MMP1 ve 17'e karşı düşük seviyede aktivite gösteren sentetik bir MMP inhibitörü olan Prinomastat (AG3340) ve geniş bir spektrumda MMP inhibisyonu yapan bir birleşik olan D2163'ü geliştirmiştir ve Marimastat ile karşılaştırıldığında verilen dozda sistemik yararlanımda 10 kat artış görülmüştür. İlaç uygulaması ile herhangi bir kas iskelet sistemi yan etkisi görülmemiş ve fare modelinde anjiogenesis önlemiştir. Bazı inhibitörler artritli insan çalışmalarında test edilmiştir. BAY 12-956 3 ay boyunca

OA olan 300 hastaya verilmiş ve herhangi bir kas iskelet sistemi yan etkisi rapor edilmemiştir. İlaç, eklem protezi ile daha sonra tedavi edilen hastaların kıkırdaklarında tespit edilmiştir. Bir antibiyotik olan doksisisiklinin zayıf olarak MMP'leri inhibe ettiği bilinmektedir. Bu bileşikler şimdilerde periodontal hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere ruhsat almışlar ve artritde görülen kıkırdak hasarını önleme tevdisine aday gösterilmiştir. Bu inhibitör birleşikler hayvan modellerinde etkin bulunmuş ancak insanda OA ve RA de hasarın önlenmesinde henüz kesin kanıtlar yoktur.

KOLESTEROL YAPISI VE METABOLİZMASI

Kolesterol insandaki en yaygın steroldür. Karaciğer, bağırsak böbrek üstü bezi, testisler, yumurtalıklar ve plasenta başta olmak üzere hemen hemen bütün dokular tarafından sentezlenir. Bütün hücre zarlarının birleşeni olup safra tuzları, steroid hormonları ve D vitaminin öncül maddesidir.

Kolesterol karbonları sırayla numaralanmış olan dört adet bileşik halka ve bu halkanın bir tanesine tutunmuş sekiz üyeli dallanmış hidrokarbon zincirinden oluşmuştur. Kolesterol sentezinde hız kısıtlayıcı basamak HMG-CoA (3-hidroxy-3-methylglutarylcoenzymeA) redüktaz tarafından katalizlenen basamaktır. Farklı metabolik kontrol tiplerinin etkisine maruz kalır. (Şekil-6)²⁶

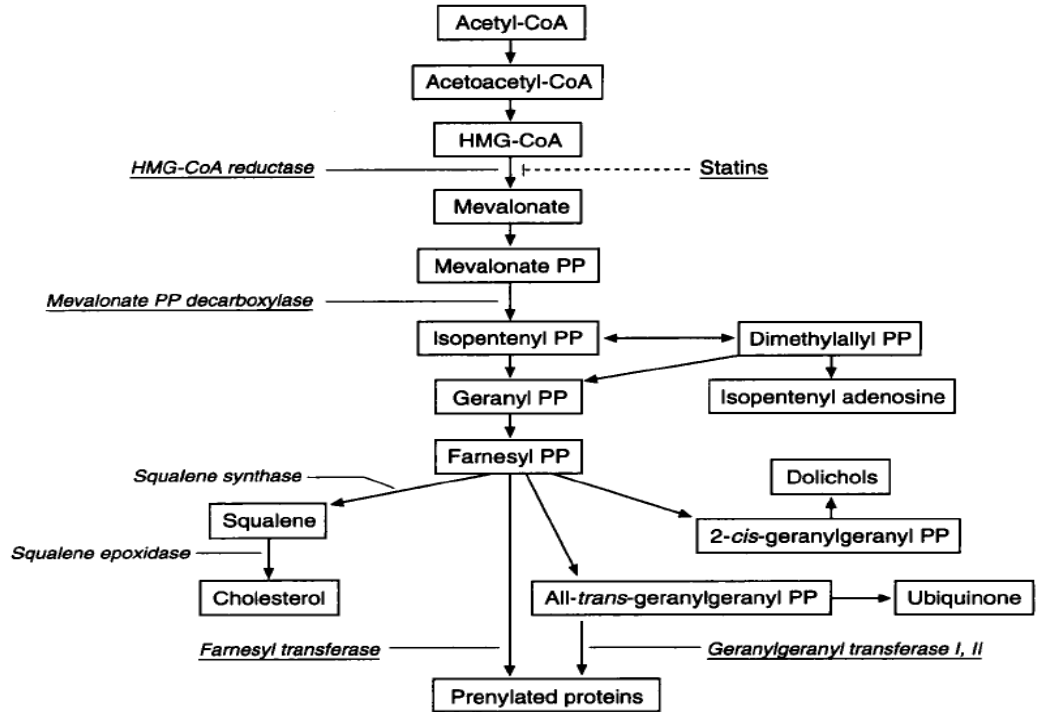
1.Geri beslemeli inhibisyon

2. Hormonal düzenleme

3. Transkripsiyonun sterol aracılı düzenlenme

4. İlaçlar tarafından inhibisyon:

Statin grubu ilaçlardan lovastatin, provastatin, simvastatin ve fluvastatin, HMG-CoA redüktazı inhibe ederek kolesterol sentezindeki ilk basamağı kontrol ederler. HMG-CoA 'dan mevalonik asit oluşumu engellenir.



Şekil-6: Kolesterol sentezi basamakları ve statin grubu ilaçların HMG-CoA basamağında enzim inhibisyonu

STATİNLER:

Fluvastatin dışında tüm statinler mantarlarda bulunan maddelerin kimyasal olarak değişime uğramış şekilleridir. Simvastatin *Aspergillus* *Terreus*'un fermentasyon ürünüdür.

Farmakokinetik özellikleri:

Simvastatin ve lovastatin inaktif yapıda olup hidrolizlenerek aktif hale gelir. Lovastatin ve Simvastatin oral dozları %30-50 arasında emilir. Karaciğerde Simvastatin %80, Fluvastatin ve Lovastatin % 70 oranında tutulur. Tüm statinler biyotransformasyona uğrar ancak yıkım ürünlerinin bir kısmının aktiveteleri devam etmektedir. Dolaşımda düşük konsantrasyonlarda bulunabilirler. Simvastatin %5, Atorvastatin %12, Cerivastatin %60 oranında bulunur. Vücuttan atılımlarının önemli bölümü safra ve bağırsak üzerinden sağlanırken az miktarda böbrekler üzerinden atılır. Pravastatin oldukça hidrofilik, Lovastatin, Atorvastatin ve Cerivastatin hidrofobiktir.²³

Yan etkileri: Statinler genel olarak iyi tolere edilirler. En büyük yan etkileri karaciğer ve kas dokusu üzerinedir.

1.Karaciğer: Karaciğer fonksiyonlarını bozabilirler. Sitokrom p450 inhibitörleri statinlerin diğer metabolizma inhibitörleriyle birlikte alındığında ortaya çıkar. Serum transaminazları ile takip önemlidir.

2.Çizgili kaslar: Miyopati ve rabdomiyolize neden olabilir.

3.Böbrek : rabdomiyoliz sonucu renal yetmezlik oluşabilir

4.Hipotiroidi

Kontrendikasyonları:

Emziren anneler, hamileler ve çocuklarda kullanımı sakıncalıdır.

Statinlerin etkileri:

Statin olarak adlandırılan, 3-hidroxy-3-methylglutarylcoenzyme A (HMG-CoA) redüktaz inhibitörleri, hiperkolesterolemi tedavisinde kullanılan ve relatif olarak plazma kolesterol seviyelerinde büyük azalmalara neden olabilen bir ilaç grubudur.³⁰

Klinik araştırmalarda vasküler aterosklerozun gerilemesini indükte ettikleri ve koroner ater hastalığı olan ve olmayan hastalarda kardiyovasküler mortalite ve morbitideyi azalttıkları gösterilmiştir.^{18,79}

HMG-CoA redüktaz inhibitörlerinin yararlı etkileri genel olarak kolesterol sentezini azaltabilme özelliklerine bağlanmıştır. Ancak enzim reaksiyonunun ürünü olan mevalonat sadece kolesterolün öncüsü değil, aynı zamanda pek çok nonsteroidal isoprenoid bileşkekelerin öncüsü olduğundan, HMG-CoA redüktaz inhibisyonu farklı pleiotropik etkiler ile sonuçlanır. Mevolant yolu; hücre çoğalması, hücre sinyal iletimi, hücre farklılaşması, miyelinizasyon gibi hücresel fonksiyonlar için gerekli olan hayati isoprenoid üretir.

Bu isoprenoidler; taşıyıcı RNA 'nın bazı tiplerinde bulunan isopentil adenozin, glikoprotein sentezi için gerekli olan dolikoller ve elektron transportunda görevli Ubikinon ve hem A 'nın poliisoprenoid yan halkalarını kapsamaktadır.

Endotelial hücre fonksiyonlarına etkisi: Nitrik oksit (NO) endoteldeki aterosklerotik fonksiyonu düzenler. Hiperkolesterolemi, endotel hücrelerinin NO üretim kapasitesini olasılıkla, L-arginin azalmasına bağlı olarak azaltır ve NO yıkımını artırır. HMG-CoA redüktaz inhibitörleri ile endotelial NO sentezinde artış ve endotel fonksiyonlarında belirgin düzelme meydana gelmektedir.^{60,87,112}

İnflamasyona etkisi: Dolaşımdaki monosit ve T-lenfositlerin endotelyuma yapışması ve ardından transendotelial migrasyonu aterosklerotik lezyonların oluşmasında görülen erken bir olaydır. Lokositlerin endotelden geçişi ile bağlantılı moleküller; endotel, monosit ve SMC tarafından üretilen monosit kemotaktik protein 1 (MCP-1), osteopontin, modifiye LDL gibi monositleri ve T hücrelerini artere çeken kemoatraktan moleküllerdir. Makrofajlar ve T lenfositler tarafından salgılanan enflamatuvar sitokinler endotelial fonksiyonlarını, kolajen yıkımını ve trombozisi modifiye edebilmektedir. Kan yağlarını düşüren deneysel modellere aterosklerotik plak içinde inflamatuvar hücrelerin azalması eşlik etmektedir.^{1,8,89}

Statinlerin, monositlerin endotel katmanlarına yapışmaları için gerekli hücre yüzey moleküllerinin (integrin heterodimer CD 11b/CD 18) fonksiyonlarını ve oluşmalarını azaltma imkanına sahip olduğu yönünde kanıtlar elde edilmiştir. Hiperkolesterolemik hastaların statin tedavisi öncesi ve sonrasında elde edilen monositlerde endotele adezyonda ve CD11b yüzey ekspresyonunda azalma görülmüştür.¹¹³

Statinler, MCP-1 tarafından stimule edilen ve edilmeyen monositlerin endotele CD1b bağımlı olarak yapışmalarını önlemektedir.⁸⁴

Kemoatraktan reseptörler GTP bağlayan proteinler ile beraber bulunurlar, lokositlerin endotele integrin bağımlı olarak bağlanmaları G protein tarafından ayarlanan olayları başlatmaktadır. Statinler prenilasyonu engelleyerek heterotrimerik G proteinleri ve küçük GTP azları etkileyerek enflamatuvar cevabı zayıflatırlar. Statinler hiperkolesterolemik ratlarda lipid aracılı stimule olan postkapiller venlerde lökosit birikmesini önlerler.⁵⁸

Bu çalışmalar statinlerin antienflamatuvar etkilerinin kolesterol düşürücü özelliklerinden farklı olduğunu göstermektedir. Statinlerin inflamasyon için gerekli olan nötrofil kemotaksisi ve transendotelyal migrasyonu engellediği gösterilmiştir. Bu etki kolesterol sentez mekanizmasında ara ürün olan mevalonatın eklenmesi ile engellenebilmektedir.³⁶

Statinler farklı olarak antienflamatuvar etkilerini, monosit ve makrofajlar üzerindeki interselüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ekspresyonunda ve lipopolisakkaridin indüklediği IL-6 sekresyonunda azalma yolu ile gösterebilirler.⁵⁷ Pravastatin hariç bütün statinler aort düz kas hücresi çoğalmasını azaltmaktadır. Kültürlerde statinlerin düz kas hücresi apoptozisini artırdığı gösterilmiştir. Preklinik araştırmalar ve invitro çalışmalar apoptozisin damar tıkanmasında düzenleyici olduğunu göstermiştir.^{10,1,8,84}

Aterosklerotik plağın stabilitesine katkısı: Statinler makrofajlardan salınan metalloproteinazların jelatinolitik etkilerini inhibe ederek aterosklerotik plağın yırtılması ve pıhtı oluşumunu engellerler.^{12,39}

Trombosit aktivasyonu üzerine etkisi: Hiperkolesterolemide artmış trombosit aktivasyonu ile beraber hiperkoagülabilité söz konusudur. Statinler trombosit kümeleşmesini, fibrinojen ve tromboksan A2 yapımını azaltmaktadır.^{110,76}

Pıhtılaşma olayına etkisi: Simvastatin ve fluvastatin ekstrinsik pıhtılaşma yolundaki doku faktörünün yapımını ve aktivitesini azaltmaktadır.^{29,107}

Malignensi üzerine etkileri: Birçok malign hücrede artmış HMG-CoA redüktaz aktivitesi vardır. Mevalonat hücre çoğalmasında anahtar bir rol oynamaktadır. Bu yüzden bu enzimin selektif olarak önlenebilmesi önem kazanmaktadır. Statinlerin invivo ve invitro olarak tümör hücre büyümesini önleyebileceği gösterilmiştir.^{13,90}

Kemik üzerine etkileri: Bone morfojenik protein (BMP) kemik yapımını uyaran en önemli otokrin, parakrin büyüme faktörüdür. Hayvan osteoproz modellerinde statinlerin kemik hücrelerinde BMP-2 gen ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir. İnvitro etkilerinde insan MG63 osteoblastik hücrelerinde BMP-2 transkripsiyonunu uyarmakta ve endojen BMP-2 mRNA ve protein ekspresyonunu artırmaktadır.^{27,47}

Simvastatinin osteoblast farklılaşmasını artırdığı, alkalın fosfataz ekspresyonu, mineralizasyonu veya BMP-2 ve osteokalsin ekspresyonuna bakılarak saptanmıştır. Statinler ayrıca bifosfanatlar gibi etki ederek kemik yıkımını önleyebilmektedir. Nitrojen içeren bifosfanatlar, mevalonat yolunda GTP bağlayan proteinleri etkileyerek osteoklast aktivitesini ve osteoblast apoptozisini önlemektedir.¹¹⁵

Proanjiogenik etkileri ile kemik yapımını artırabilirler. Endotelial hücre fonksiyonunu ve dolaşımdaki endotel öncü hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını artırır. Enkondral kemik oluşumu sırasında kalsifikasyon için

damar invazyonu gereklidir. Kemik oluşumunu inflamasyonu engelleyerek etkileyebilirler. ³⁴ Deneysel olarak oluşturulan inflamatuvar artrit modelinde vücut kitle indeksi, histolojik yöntemler ve serum pridinolin seviyeleri ölçümlerinde simvastatinin kemik döngüsünü değiştirerek, periartiküler osteoklast artışı ve bölgeye makrofaj göçünü engelleyerek periartiküler kemik rezorbsiyonunu engellediği görülmüştür. ^{42,95}

DENEYSEL OSTEOARTRİT HAYVAN MODELLERİ:

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

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

Günümüzde en çok faydalanılan model kronik travmatik osteoartrit modelini taklit eden mekanik instabilite yaratan modellerdir. Bu modellerin avantajları; hastalık oluşma oranı doğru cerrahi teknik uygulanması durumunda %100'dür. Hızlı fakat kontrollü bir OA modeli oluşturması, yapısal elemanların veya özelliği olan mekanik komponentlerin OA gelişimine katkısını araştırma imkanı ve kimyasal etkileşim olmadan OA tedavisinde yeni ilaç modalitelerini araştırmak imkanı vermesi diğer avantajlarıdır. Mekanik olarak hayvan OA modellerinde en sık tercih edilen cerrahi uygulamalar :

1. Parsiyel menisektomi: Hafif, progresif bir hastalık oluşturmakta tercih edilir ^{74,53}

2. Komplet menisektomi: Hızlı hastalık progresyonu oluşturur. ⁹³

3. Ön çapraz bağ kesilmesi: Hızlı hastalık progresyonu oluşturur. ^{114,16,3}

4. Ön çapraz bağ kesilmesi ve parsiyel menisektomi: Hızlı hastalık progresyonu oluşturur ⁹⁶

5. Ön çapraz ve arka çapraz bağın beraber kesilmesi: hızlı hastalık progresyonu oluşturur.

6. Varus ve valgus osteotmisi ve kas rezeksiyonları gibi eklem dışı cerrahiler: Yavaş hastalık oluşturan ve teknik olarak güç, daha çok zaman ve ekipman gerektiren modellerdir.

Ön çapraz bağ kesilmesi sonrası oluşturulan OA modeli, OA'in başlangıç komponenti olan eklem yüzeyinde yük dağılımı ve eklem hareketinin değişmesinin önemini destekleyen bir modeldir.³⁸ Ayrıca ÖÇB kesilerek uygulanan modelin uzun dönem sonuçları; kinematik değişim, proteoglikan içeriğinde azalma, matriksmetalloproteinaz aktivitesinde değişim ve kırıkta ilerleyici erozyon olması ile insan ön çapraz hasarı ile benzerlik göstermektedir. Kullanılan hayvan modelleri içinde radyolojik, morfolojik ve biokimyasal değişiklikler açısından insan modelini en iyi taklit eden model ÖÇB kesilerek OA oluşturulan köpek modelidir ancak filogenetik olarak yüksek bir ırk özeliği taşımaları ve OA oluşma sürecinin diğer hayvan modellerine göre uzun olması nedeniyle deneysel modellerde en çok tercih edilen hayvanlar; tavşan, rat, guinea domuzdur.^{98,64,111}

GEREÇ VE YÖNTEM:

Bu çalışma, T.C. Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurulu Başkanlığı tarafından B.30.2.GÜN.0.EU.00.00/113-21239 sayılı etik kurul onayı ile yapılmıştır. Çalışma Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiş olup, denekler hayvan üretim merkezinden temin edilmiştir. Çalışmada ortalama ağırlıkları 250-300 gr olan 27 adet Wistar Albino rat kullanıldı. Çalışmada denekler 3 gruba ayrılarak takip edildi. Grup 1’de 9 adet rat sağ diz ön çapraz bağı 1. gün kesilerek eklemde instabilite ve yük dağılımında bozulma ve altı hafta sonunda diz ekleminde osteoartrit oluşturuldu. Grup 1’de ayrıca 9 diz eklemi kendi içinde femur (F) ve tibia (T) olarak ayrıldı.

Grup 2’de 9 adet rat sağ diz ön çapraz bağı kesilerek diz ekleminde mekanik yöntemle osteoartrit oluşturulmasını takiben postoperatif 1. günden itibaren 6 hafta boyunca gavaj yöntemiyle 20mg/kg/gün Simvastatin (Merck Sharp & Dohme ,Middlesex,U.K) p.o olarak verildi. Grup 2 ‘de 9 diz ayrıca kendi içinde femur (F) ve tibia (T) olarak ayrıldı.

Grup 3’de 9 adet ratın 9 diz eklemi kullanılarak kontrol grubu oluşturuldu. Grup 3’de 9 diz kendi içinde femur (F) ve tibia (T) olarak ayrıldı. Deneklere altı hafta sonunda yüksek doz ketamin ile ötenazi uygulandı, aynı gün femur ve tibia eklem yüzleri korunarak, diz eklemi uygun seviyeden histopatolojik inceleme için kesilerek çıkartıldı.

CERRAHİ YÖNTEM:

Cerrahi işlem Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı Ameliyathanesinde yapıldı. İşlem için 40mg/kg intramusküler ketamin enjeksiyonu ile genel anestezi sağlanmış olup bütün cerrahi işlemler aynı cerrah tarafından steril cerrahi ekipman ile gerçekleştirildi. Anesteziyi takiben grup 1 ve 2 'de her ratın sağ alt ekstremitesi traşlanıp supin pozisyonunda aseptik maddeyle boyanma ve uygun örtünme ile cerrahi işleme hazırlık yapıldı. Diz fleksiyon pozisyonunda orta hat insizyonla girilerek cilt-ciltaltı ve faysa geçildi. Median parapatellar insizyonla girilerek diz eklemine ulaşıldı (Şekil 7a-b-c). Patella laterale devrilerek ön çapraz bağa ulaşılarak mikroskop altında kesildi (Şekil 8a-b). Her 2 grubun patellar tendonu ve cildi polyglactin 4/0 (vicryl®, Johnson & Johnson Medical, Brussels) dikiş materyali ile aralıklı dikiş ile kapatıldı (Şekil 9). Ratların ameliyat edilen ekstremiteleri kullanmaları kısıtlanmadı. Bütün deneklerin cerrahi uygulanan ekstremiteleri kullandıkları görüldü. Postoperatif takiplerinde deneklerde yüzeysel yara yeri problemi, septik artrite rastlanmadı ve perioperatif ve postoperatif hiçbir denek kaybedilmedi.

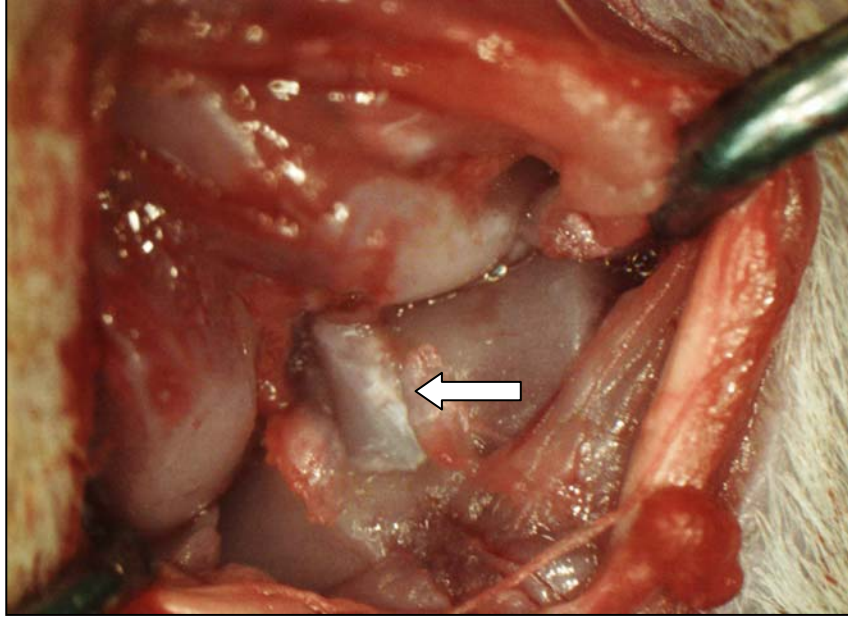
Deneklere altı hafta sonunda yüksek doz ketamin ile ötenazi uygulandı, aynı gün femur ve tibia eklem yüzleri korunarak diz eklemi uygun seviyeden histopatolojik inceleme için kesilerek çıkartıldı.



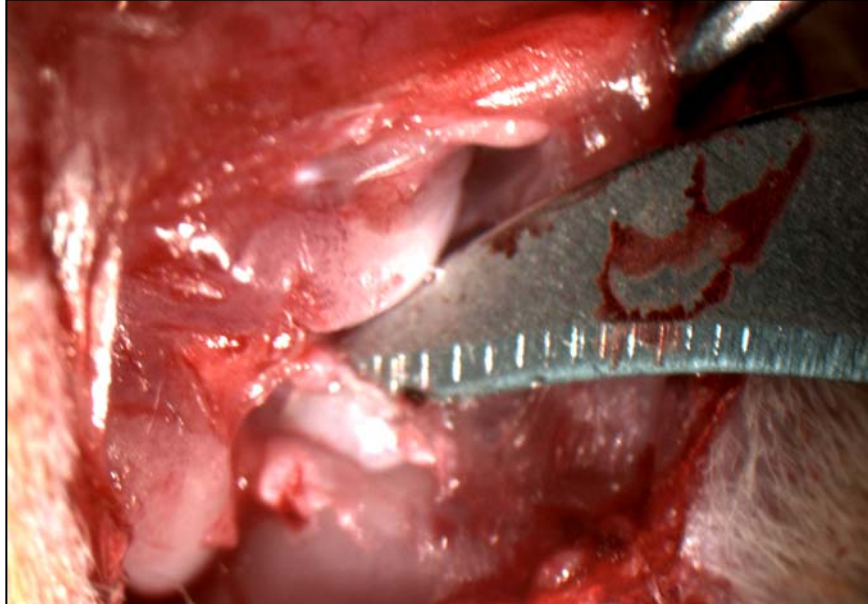
Şekil 7a: Sağ diz eklemi üzerinden longitudinal orta hat insizyon uygulaması



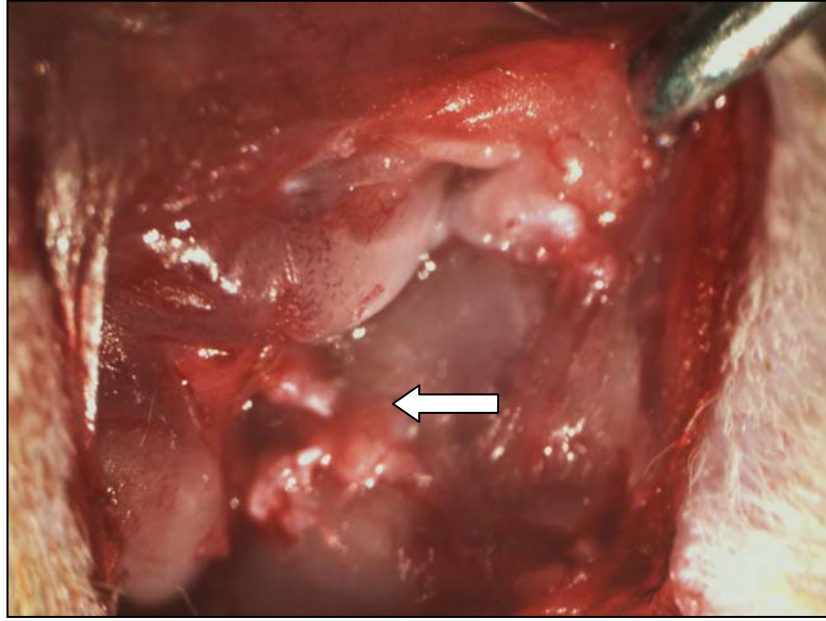
Şekil 7b: Median parapatellar insizyonla diz eklemine ulaşılması



Şekil 7c: Sağlam ön çapraz bağ



Şekil 8a: Ön çapraz bağın kesilmesi



Şekil 8b: Ön çapraz bağı kesilmiş durumda



Şekil 9: Ön çapraz bağ kesilmesini takiben diz ekleminin uygun olarak kapatılması

HİSTOPATOLOJİK VE İMMÜNHİSTOKİMYASAL YÖNTEM:

Cerrahi olarak eksize edilen tibia proksimali ve femur distali %10'luk formaldehit içerisinde 1 hafta fikse edildikten sonra %10'luk formik asit solüsyonu içinde dekalsifikasyon işlemine alındı. %10' luk formik asit solusyonu her 24 saatte bir değiştirilerek kemik materyalin sertliği kontrol edildi. 72. saatte kemik materyaller kesilebilecek sertliğe ulaşmıştı. Tibia örnekleri sagittal düzlemde kesilerek, femur örnekleri ise koronal düzlemde kesilerek kesit yüzleri üzerine yatırıldı ve kasetlendi (Şekil10a-b). Kasetler rutin doku takip işlemine alındıktan sonra materyaller parafin bloklara gömüldü. Her parafin bloktan 3 mikron kalınlığında 3'er adet kesit hazırlandı. Bu kesitlerden bir tanesi hematoksilin eosin, diğeri MMP3 ile boyandı. Tüm kesitler bir uzman patolog tarafından değerlendirildi.

İmmünhistokimyasal boyama için parafin kesitler deparafinize edilerek distile sudan geçirildi. %3'lük Hidrojen Peroksitte 10 dak. bekletilmesini takiben çeşme suyu ile yıkandı. pH 6.0 olan sitrat buffer içinde mikrodalgada yüksek sıcaklıkta 20 dak. bekletildi. Oda sıcaklığında 20 dak. bekletildikten sonra PBS (fosfat buffer saline pH 7.6) ile 5 dak. yıkandı. Protein blok damlatılıp 10 dak. primer antikorda 1 saat oda sıcaklığında bekletildi (MMP-3). PBS ile 5 dak. yıkandıktan sonra biotinylated secondary antibody damlatılıp 20 dak bekletilip tekrar PBS ile 5 dak. yıkandı. Streptavidin/peroxidase kompleks damlatılıp 20 dak. bekletildi, PBS ile 5 dak. yıkandı. DAB (3,3' Diaminobenzidine) kromojen damlatılıp 5 dak. bekletildi, çeşme suyunda yıkandı. Harris Hematoksilin ile 10 saniye zıt boyama yapıldı, alkol ve xylenden geçirildi. Lamlar mounting balzamlı kapatıldı.

Osteoartrit kıkırdığın histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirilmesi:

Her standart kesit tibia ve femur eklem yüzlerinin medial ve lateral kompartmanları esas alınarak yapıldı. Kesitler horizontal düzlemde eklem yüzeylerinin tamamını içermekte ve vertikal düzlemde eklem yüzeyinden subkondral kemiğe kadar uzanmaktadır (Şekil 10a-b) . Histopatolojik değerlendirme bugün en çok kabul gören OARSİ (Osteoarthritis Research Society International) osteoartrit kıkırdak histopatoloji değerlendirme sistemi kullanılarak yapıldı. Bu sistem osteoartrit eklem makroskopi, görüntüleme ve artroskopi bulguları ile korelasyon göstermektedir. Sistemde grade (derece), stage (evre) ve buna bağlı bir puanlama yapılmaktadır. Sistemde 6 derece ve 4 evre (Tablo1) bulunmaktadır. Evre ve dereceye göre puanlama sistemi (Tablo 2) geliştirilmiş olup hastalık ilerlemesini değerlendirmekte kullanılır Derecelendirme, horizontal uzanım bakmadan vertikal düzlemde kıkırdak içinde bulunan en ileri OA bulguları esas alınarak yapılır. Derece; kıkırdaktaki OA gelişim derinliğinin ve osteoartrit biyolojik gelişim şiddetinin bir göstergesidir. Buna göre kıkırdığın daha derin tabakalarında görülen OA bulguları daha ileri bir hastalığı tanımlar. Evre; derecelendirmeden bağımsız eklem tek kompartmanında kıkırdığın horizontal planda hastalık bulguları taşınmasına göre hesaplanır. Puanlama; OA'ın derece ve evresinin beraber değerlendirilmesi ile yapılır, bu nedenle puanlama OA yaygınlığı ve şiddetinin bir göstergesidir. ^{56, 81}

Derece 0: OA ile ilgisi olmayan hiyalen eklem kıkırdığı olup eklem yüzeyi pürüszdür. Matriks ve beraberindeki kondrositler 3 tabakada uygun miktarda ve dizilimde bulunmaktadır. Kondrositlerde proliferatif değişiklikler görülmemektedir.

Derece 1: Kıkırdaktaki OA başlangıç aşamasıdır. Yüzeyel tabakada yüzeyel fibrilasyon olarak adlandırılan hafif abrazyon ile karakterize mikroskopik çatlaklar görülür. Bu tip fibrilasyon biyolojik reaksiyon olmadan doğrudan mekanik olarak oluşur. Aşırı ödem durumunda kıkırdak hipertrofisi şeklinde görülen kıkırdak matriksde fokal veya yaygın ödem. Yüzeyel tabakada dezoryante kondrosit kümeleri şeklinde kondrosit proliferasyonu görülmektedir. Histolojik olarak kıkırdak tabakada diğer kıkırdaklara göre artmış kondrosit sitoplazması kondrosit hipertrofisi olarak yorumlanır. Kondrom içerisinde kondrosit veya kondrosit hücre membranı görülmemesi ve bazofilik boyanmada görülmeyen çekirdek kondrosit ölümü olarak tanımlanır. Kondrosit çekirdeğinde fragmentasyon görülmesi apoptozis olarak yorumlanır. Matriksin katyonik boyanmasında sürekli kayıp yüzeyel hücre tabakasında geniş alanda ölüm anlamına gelirken geri dönüşümlü matriks boyanma kaybı kıkırdak veya sinoviya tarafından salgılanan proteolitik enzimlerin etkileridir.

Derece 2: Kıkırdak yüzeyel tabakada fokal olarak devamlılığın bozulması ile karakterizdir. Makaslama kuvvetlerinden oluşan abrazyon yüzeye paralel olarak yüzeyel matrikste küçük miktarda kayıp oluşturur. Soyulmuş olan fragmanlar sinoviyal sıvıda fibril veya kar tanesi olarak görülür. Bir veya daha fazla matriks çatlağı yüzeyel tabakanın tamamını katedebilir ve derin fibrilasyon olarak bilinir. Kıkırdak üst 1/3 bölümde katyonik boyanan matrikste azalma, fokal olarak perikondral artmış boyanma, kondrom kolonlarında organizasyon bozukluğu, hücrelerde ölüm, proliferasyon ve hipertrofi görülmektedir.

Derece 3: Orta tabakaya kadar uzanan vertikal matriks fissürler ve dallanmış fissürler görülmektedir. Kıkırdak 2/3'üne uzanan (derin tabaka) boyanma azalması, polarize ışık mikroskopunda görülen yeni kollajen formasyonu, hücrelerde ölüm ve rejenerasyon görülmektedir.

Derece 4: Erozyon, kıkırdak matriks kaybı, yüzeyel tabakanın ayrılması, orta tabakada kist oluşumu görülmektedir.

Derece 5: Soyulmuş olan yüzeyde sklerotik kemik veya fibrokartilaj içeren onarım dokusu ve kemik yüzeyde mikrokırık görülmektedir.

Derece 6: Deformasyon, kemik yeniden yapılanması, osteofit oluşumu, fibrokartilaj ve kemik onarımı ile beraber mikrokırık görülmektedir

Evrelendirme: OA derecelendirmesinden bağımsız olarak horizontal düzlemde eklem yüzeyini ilgilendiren OA lezyon varlığının yüzdesine göre yapılır. (Tablo1)

EVRE	EKLEM YÜZEYİ %
Evre 0	OA aktivitesi yok
Evre 1	$\leq 10\%$ OA aktivitesi
Evre2	10-25% OA aktivitesi
Evre 3	25-50% OA aktivitesi
Evre4	$\geq 50\%$ OA aktivitesi

Tablo 1: OARSİ (Osteoarthritis Research Society International) osteoartrit kıkırdak histopatoloji değerlendirme sistemi evrelemesi

Puanlama Sistemi : Derece ve evre puanlarının çarpılması sonucuna göre yapılan güncel ve etkili bir yöntemdir. (derece x evre). Puanlama OA yaygınlığı ve şiddetinin göstergesidir (Tablo2).

	Evre 1	Evre 2	Evre 3	Evre 4
Derece 1	1	2	3	4
Derece 2	2	4	6	8
Derece 3	3	6	9	12
Derece 4	4	8	12	16
Derece 5	5	10	15	20
Derece 6	6	12	18	24

Tablo2: OARSİ sistemi puanlaması

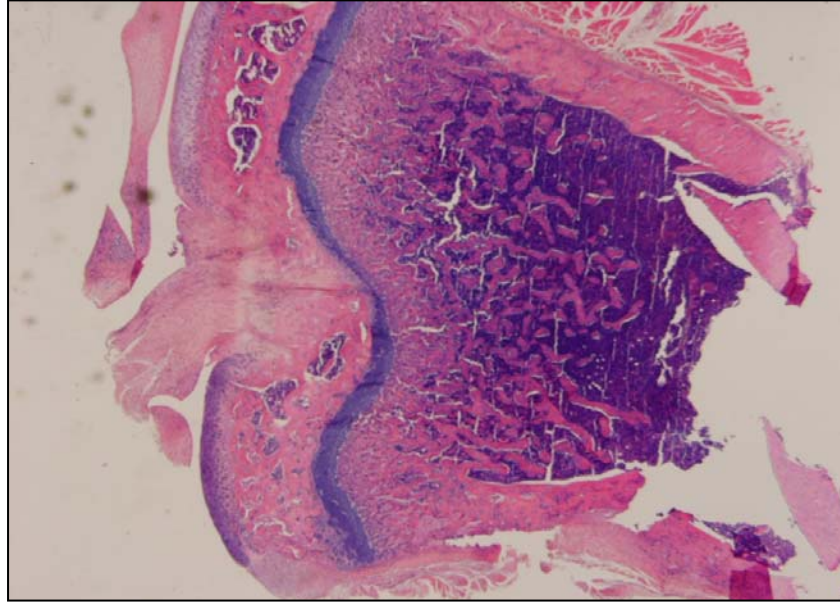
İmmunhistokimyasal değerlendirme ise 40X büyütme altında kondrositlerin MMP3 immunohistokimyasal sitoplazmik boyanmasına ve şiddetine göre yapıldı. Kondrosit sitoplazmasında uygun boyanma pozitif olarak kabul edildi ve her alanda boyanan kondrosit sayısı kırkırdaki tüm kondrosit sayısına oranlandı.

İSTATİSTİKSEL YÖNTEM:

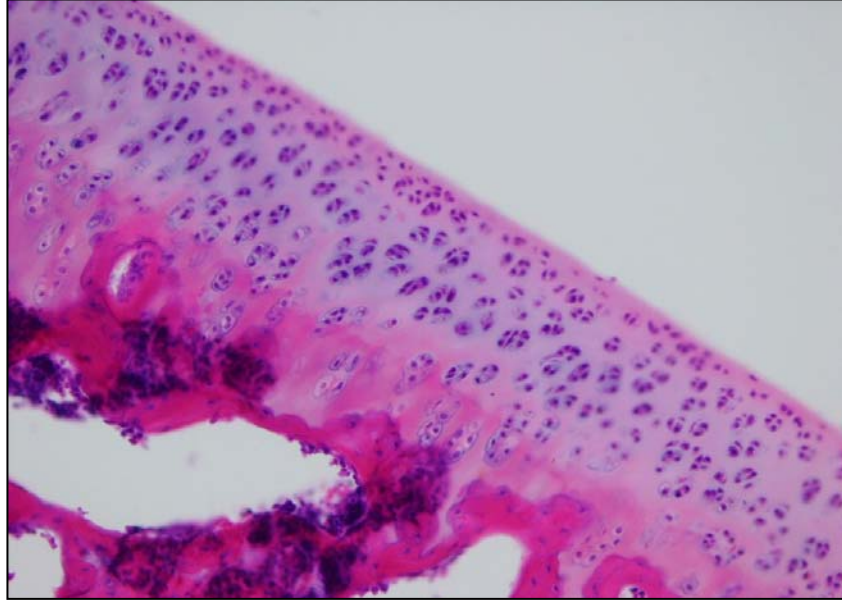
Sonuçların istatistiksel analizi “Statistical package for Social Sciences-11” (SPSS-11) programı kullanılarak yapıldı. Grup1 ve 2, Grup1 ve 3, Grup 2 ve 3 arasında OARS  puanı ve MMP3 boyanma yüzdesi açısından farklar Mann-Whitney U testi kullanılarak değerlendirildi. $p \leq 0.05$ istatistiksel anlamlılık ölçütü olarak kabul edildi.

BULGULAR :

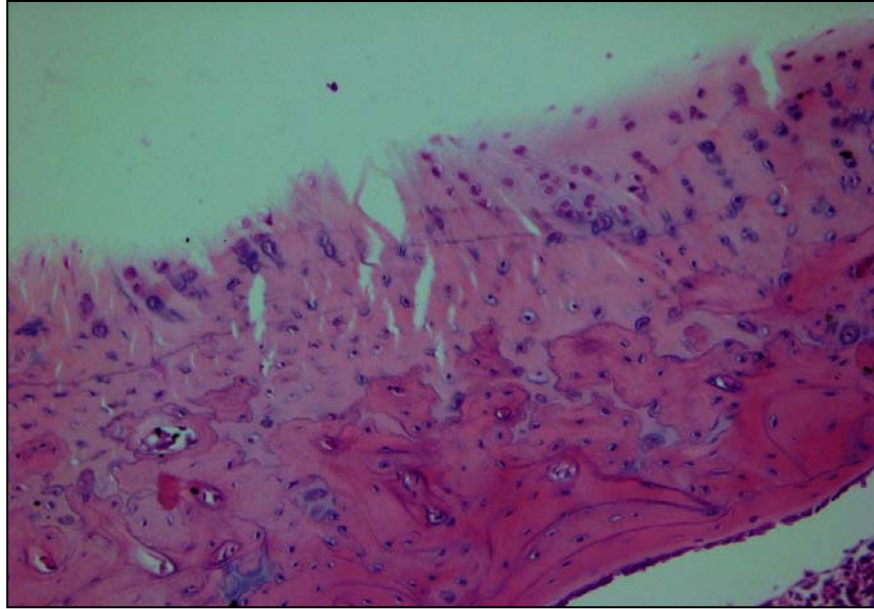
Grup 1 (ÖÇB kopuk) vakalarına ait hematoksilen-eosin ile boyanan kesitlerde (Şekil 12) femur ve tibia eklem kıkırdak yüzeyinde Grup 3'e (kontrol) (Şekil 11) oranla düzensizlik ve orta tabakaya uzanan dallanmış vertikal fissürler, erozyon ve kıkırdak matriks kaybı gözlemlendi. Grup 1'de ayrıca polarize ışık altında kollajen diziliminde bozulma ve fokal olarak kollajen kaybı gözlemlendi (Şekil 13). Grup 2 (ÖÇB kopuk-simvastatin) vakalarına ait kesitlerde femur ve tibia eklem yüzeylerinde oluşan osteoartrit bulgularının sadece yüzeysel zonda fokal fibrilasyon şeklinde olduğu ve kıkırdak matriks ve kollajen kaybının olmadığı gözlemlendi (Şekil 14a-b).



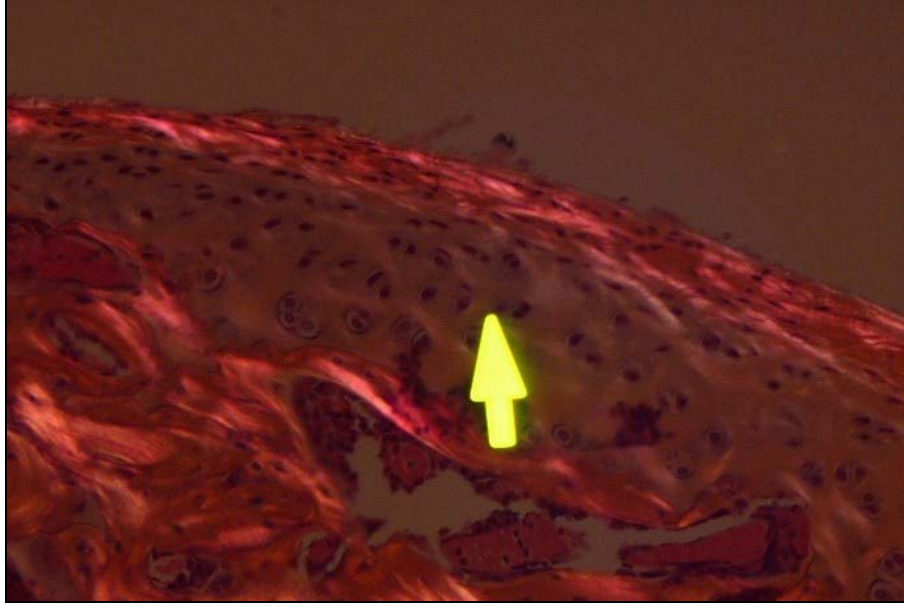
Şekil 10: Femur distalinin, eklem kıkırdığı ve subkondral kemiği içine alan koronal düzlemede kesiti (HEx20)



Şekil 11: Grup 3'e (kontrol) ait normal distal femur eklem kıkırdığı (HEx200).



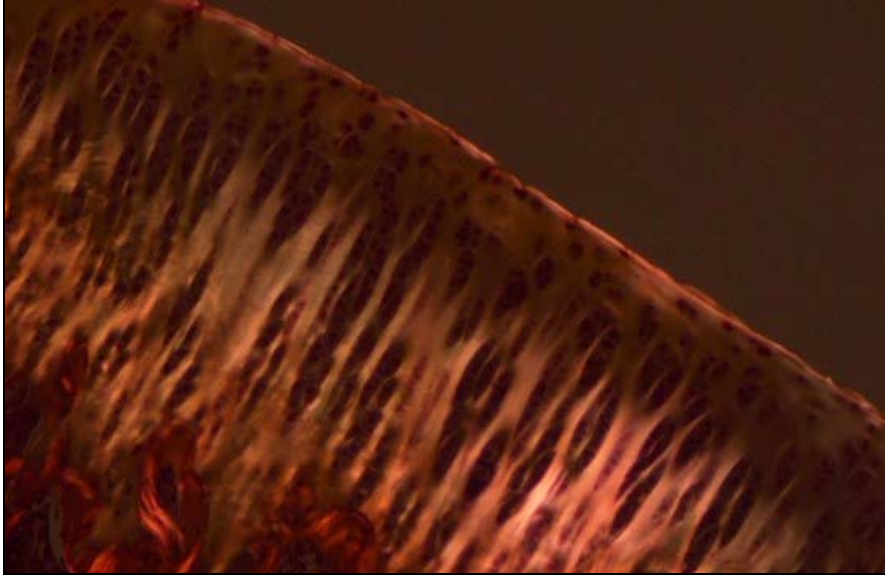
Şekil 12: Grup 1 femur distal eklem kıkırdak yüzeyinde düzensizlik ve orta tabakaya uzanan dallanmış vertikal fissürler, erozyon ve kıkırdak matriks kaybı (HEx200).



Şekil 13: Polarize ışıktaki Grup 1 eklem yüzeyinde kollajen diziliminde bozulma ve fokal kollajen kaybı (HEx200)

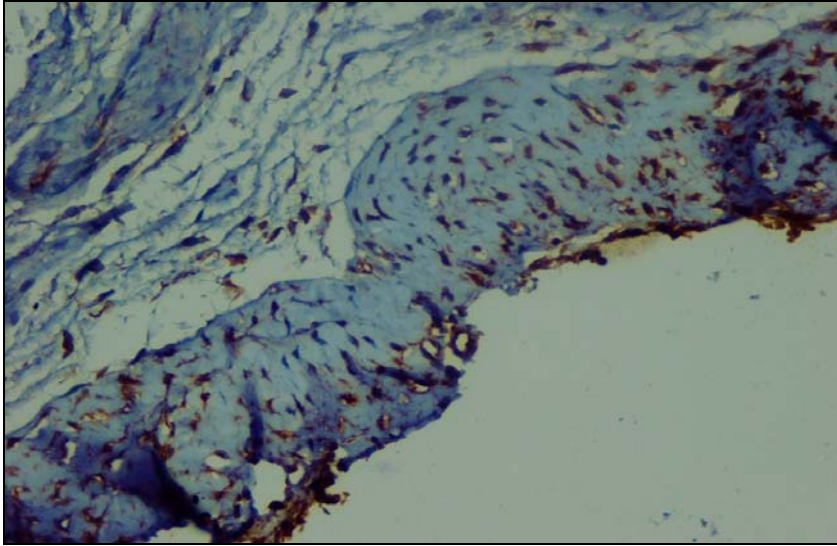


Şekil 14a: Grup 2 femur distal eklem kıkırdağı yüzeyinde sadece fokal fibrilasyon olduğu ve kıkırdak matriks kaybının olmadığı görülmektedir (HEx400)

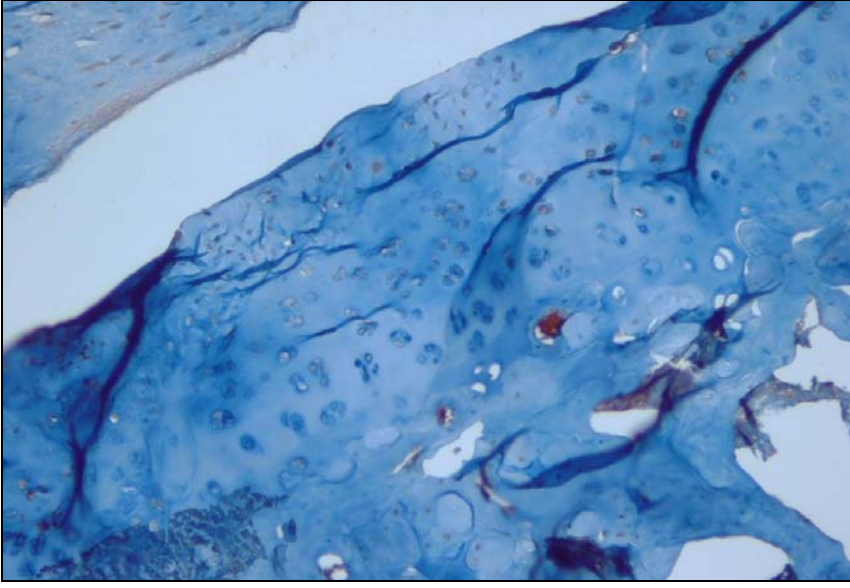


Şekil 14b: Polarize ışıktaki Grup 2 eklem yüzeyinde kollajen diziliminde bozulma ve fokal kollajen kaybı görülmemektedir (HEx200)

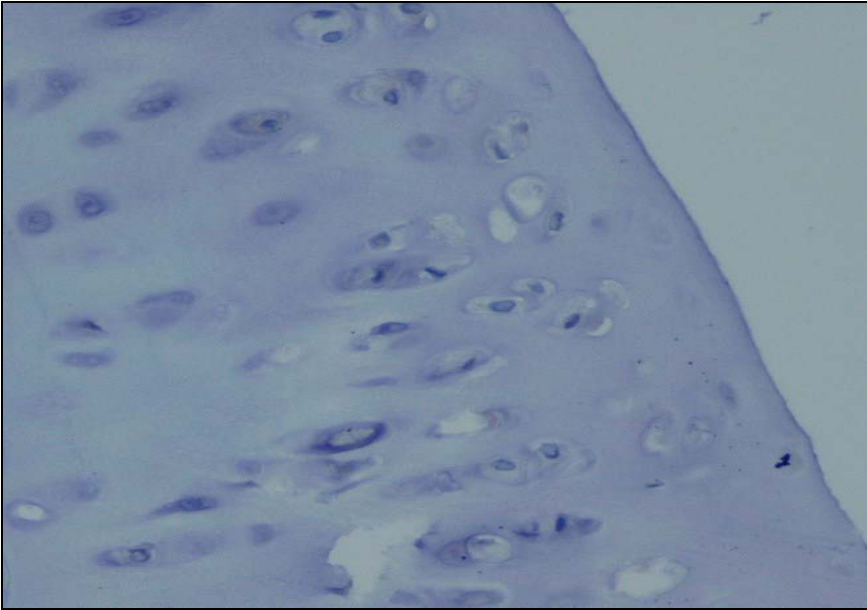
MMP3 immunohistokimyasal boyama yapılan Grup1 (Şekil 15) vakalarından alınan kesitlerde OA evre ve derecesi ile uyumlu olarak kondrositler içinde MMP3 boyanmasının Grup2 (Şekil 16) ve Grup 3'e (Şekil 17) oranla sayısal ve boyanma şiddeti bakımından daha fazla olduğu gözlemlendi.



Şekil 15: Grup 1 distal femur eklem kıkırdak kondrositlerinde kuvvetli boyanma (MMP-3 immünhistokimyasal boyama x 400)



Şekil 16: Grup 2 distal femur eklem kıkırdak kondrositlerinde zayıf boyanma (MMP-3 immünohistokimyasal boyama x 200)



Şekil 17: Grup 3 distal femur eklem kıkırdak kondrositlerinde negatif boyanma (MMP-3 immünohistokimyasal boyama x 400)

Grup1 (ÖÇB kopuk)	Derece	Evre	Puan
1F (femur)	4	4	16
1T (tibia)	4	4	16
2F	3	3	9
2T	3	3	9
3F	3	3	9
3T	3	2	6
4F	3	2	6
4T	4	3	12
5F	3	4	12
5T	2	2	4
6F	4	3	12
6T	4	2	8
7F	3	3	9
7T	4	4	16
8F	3	3	9
8T	2	2	4
9F	2	2	4
9T	2	2	4

Tablo 3 : Grup 1 OARSİ puanlama sistemine göre puan dağılımı

Grup 2 (ÖÇB kopuk Simvastatin)	Derece	Evre	Puan
1F (femur)	1	1	1
1T (tibia)	1	1	1
2F	1	3	3
2T	1	1	1
3F	3	3	9
3T	1	1	1
4F	1	1	1
4T	3	3	9
5F	1	3	3
5T	1	1	1
6F	2	3	6
7F	3	3	9
7T	3	3	9
8F	3	3	9
8T	3	2	6
9F	2	2	4
9T	3	3	9

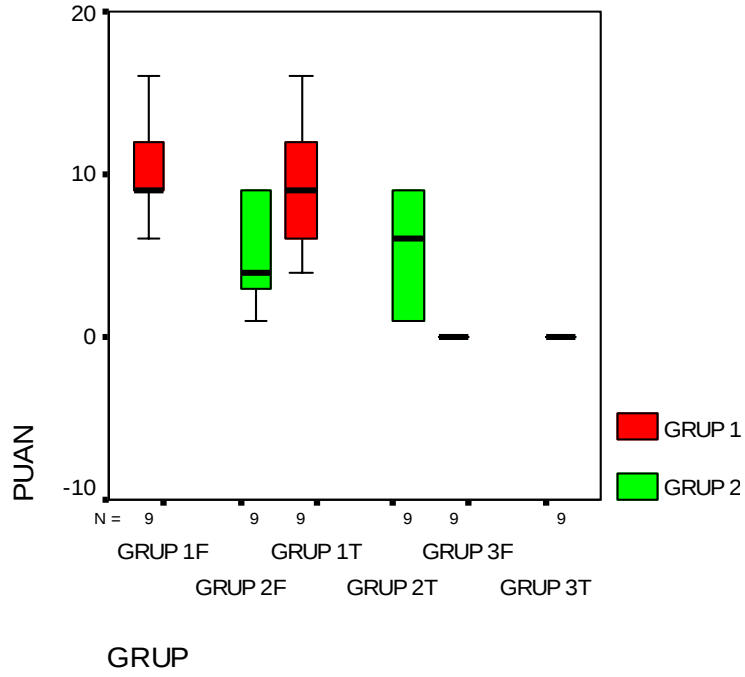
Tablo 4: Grup 2 OARSİ puanlama sistemine göre puan dağılımı

Grup 1 ve 2 ‘de femur ve tibiada saptanan OARSİ puanları Tablo 3 ve 4’de sunulmaktadır. Grup 3 (kontrol) AORSİ puanı 0 olup, grup 1 ve grup 2 ile karşılaştırıldığında fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p: 0.0001). Grup 1 ve Grup 2’de femur OARSİ puanları ortalaması sırasıyla 9.5 ± 3.5 (4-16) ve 5.0 ± 3.4 (1-9) olup fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (P: 0.019). Grup1 ve 2’de tibia OARSİ puanları ortalaması sırasıyla 9.3 ± 4.6 (4-16) ve 5.1 ± 4.0 (1-9) olup fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p:0.103). Grup 1 ve 2’de toplam OARSİ puanları sırasıyla 9.4 ± 3.9 (4-16) ve 5.1 ± 3.6 (1-9) olup, istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p: 0.004). (tablo 5;grafik 1-2)

	GRUP 1	GRUP 2	P değeri
Femur OARSİ puanı	9.5 ± 3.5 (4-16)	5.0 ± 3.4 (1-9) olup	p :0.019
Tibia OARSİ puanı	9.3 ± 4.6 (4-16)	5.1 ± 4.0 (1-9)	p:0.103
Toplam OARSİ puanı	9.4 ± 3.9 (4-16)	5.1 ± 3.6 (1-9)	p: 0.004

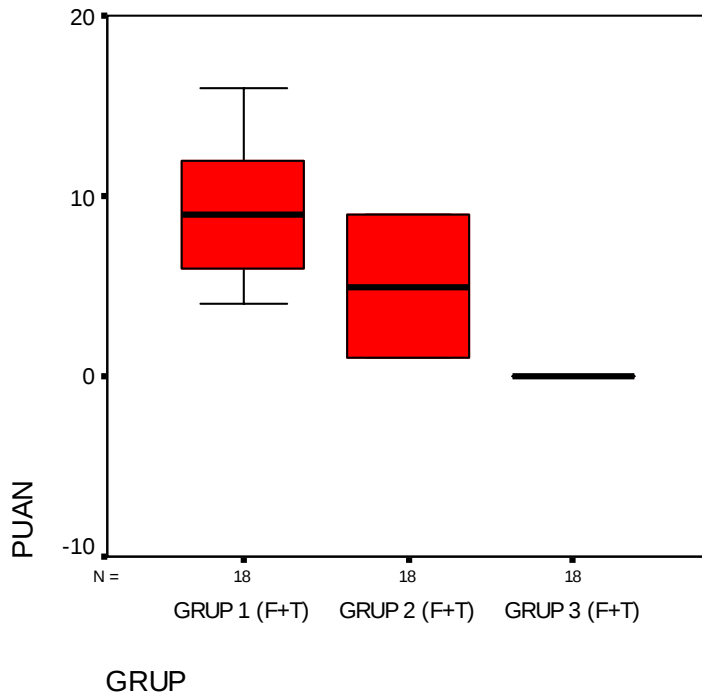
Tablo 5: Grup 1 ve Grup 2’nin OARSİ puanı istatistiksel değeri

GRUPLARA GÖRE OARSİ PUAN DAĞILIMI



Grafik 1: Femur ve tibia OARSİ puanlarının gruplara göre dağılımı

GRUPLARA GÖRE OARSİ PUAN DAĞILIM



Grafik 2: Toplam OARSİ puanlarının gruplara göre dağılımı

Grup 1		
ACL kopuk	% Boyama	Boyanma şiddeti
1F (femur)	%80	kuvvetli
1T (tibia)	%50	kuvvetli
2F	%50	orta
2T	%10	zayıf
3F	%30	Orta
3T	%30	orta
4F	%30	zayıf
4T	%50	orta
5F	%60	orta
5T	%5	zayıf
6F	%20	orta
6T	%40	zayıf
7F	%80	orta
7T	%40	orta
8F	%60	orta
8T	%30	zayıf
9F	%40	orta
9T	%60	orta

Tablo 6: Grup 1 immunohistokimyasal MMP3 boyanma yüzdesi ve şiddeti

Grup2		
ACL kopuk- ilaçlı	% Boyama	Boyanma şiddeti
1F	%50	zayıf
1T	%5	zayıf
2F	%5	zayıf
2T	%30	zayıf
3F	%5	zayıf
3T	%30	zayıf
4F	%5	zayıf
4T	%5	zayıf
5F	%50	orta
5T	%30	orta
6F	%10	zayıf
6T	%5	zayıf
7F	%5	zayıf
7T	%5	zayıf
8F	%5	zayıf
8T	%10	zayıf
9F	%30	zayıf
9T	%5	zayıf

Tablo 7: Grup 2 immunohistokimyasal MMP3 boyanma yüzdesi ve şiddeti

Grup3		
Kontrol	% Boyama	Boyanma şiddeti
1F	%5	zayıf
1T	%5	zayıf
2F	%5	zayıf
2T	%5	zayıf
3F	%5	zayıf
3T	%5	zayıf
4F	%10	kuvvetli
4T	%5	zayıf
5F	%5	zayıf
5T	%10	kuvvetli
6F	%10	zayıf
6T	%5	zayıf
7F	%5	zayıf
7T	%5	zayıf
8F	%10	zayıf
8T	%5	zayıf
9F	%5	zayıf
9T	%5	zayıf

Tablo 8: Grup 3 immunohistokimyasal MMP3 boyanma yüzdesi ve şiddeti

Grup 1, 2 ve 3 ‘de saptanan MMP3 boyanma yüzdeleri ve şiddetleri Tablo 6,7 ve 8’de sunulmaktadır. Bu değerlere göre Grup 1 ve Grup 3 femur MMP3 boyanma yüzdeleri karşılaştırıldığında, sonuçlar sırasıyla 50 ± 21.8 (20-80) ve 5.6 ± 3.9 (0-10) olup, fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p:0.0001). Grup 1 ve Grup 3 tibia MMP3 boyanma yüzdeleri sırasıyla 35 ± 18.4 (5-60) ve 1.6 ± 3.5 (0-10) olup fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p:0.0001). Grup 1 ve Grup 3 toplam MMP3 boyanma yüzdesi sırasıyla 42 ± 21 (5-80) ve 3.6 ± 4.1 (0-10) olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p: 0.001) (Tablo 9; Grafik 3-4)

	GRUP 1	GRUP 3	P değeri
Femur MMP3 boyanma yüzdesi	50 ± 21 (20-80)	5.6 ± 3.9 (0-10)	P:0.0001
Tibia MMP3 boyanma yüzdesi	35 ± 18.4 (5-60)	1.6 ± 3.5 (0-10)	P:0.0001
Toplam MMP3 boyanma yüzdesi	42 ± 21 (5-80)	3.6 ± 4.1 (0-10)	p: 0.001

Tablo 9: Grup 1 ve Grup 3 arası MMP-3 boyanma yüzdesi istatistiksel değerlendirmesi

Grup 2 ve Grup 3 femur MMP3 boyanma yüzdeleri karşılaştırıldığında sonuçlar sırasıyla 15.6 ± 21.9 (0-50) ve 5.6 ± 3.9 (0-10) olup iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (p: 0.927). Grup 2 ve Grup 3 tibia MMP3 boyanma yüzdeleri karşılaştırıldığında sonuç sırasıyla 13.3 ± 18.7 (0-50) ve 1.6 ± 3.5 (0-10) olarak bulunmuş olup iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (p: 0.188). Grup 2 ve Grup 3 MMP3 toplam boyanma yüzdeleri sırasıyla 14.4 ± 19.8 (0-50) ve 3.6 ± 4.1 (0-10) olup istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (p:0.429) (Tablo10;Grafik 3-4)

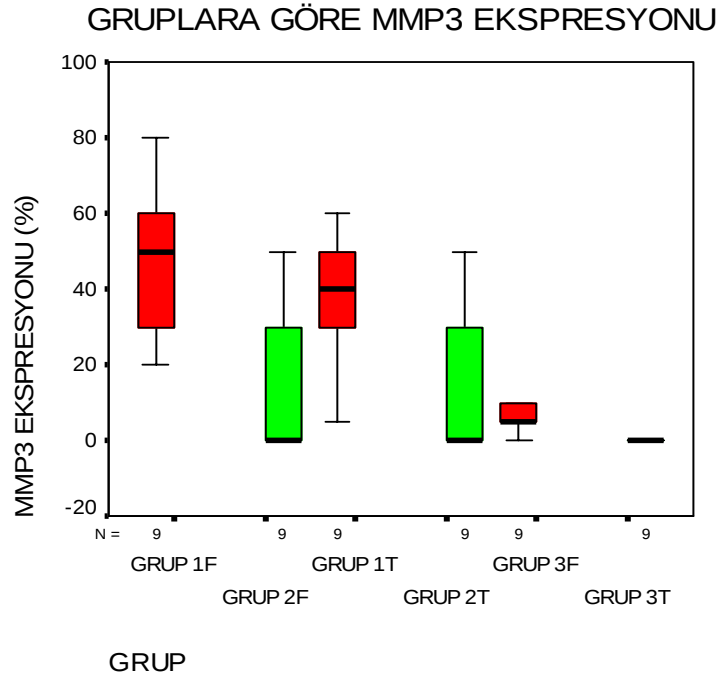
	GRUP 2	GRUP 3	P değeri
Femur MMP3 boyanma yüzdesi	%15.6±21.9 (0-50)	%5.6±3.9(0-10)	p:0.927
Tibia MMP3 boyanma yüzdesi	%13.3±18.7 (0-50)	%1.6±3.5(0-10)	P:0.188
Toplam MMP3 boyanma yüzdesi	%14.4±19.8(0-50)	%3.6 ±4.1(0-10)	p:0.429

Tablo 10: Grup 2 ve Grup 3 arası MMP-3 boyanma yüzdesi istatistiksel değerlendirmesi

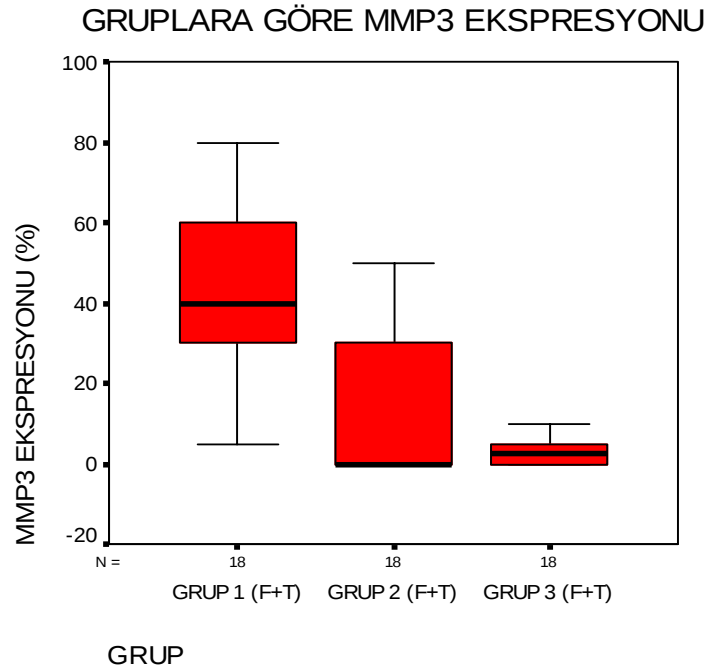
Grup 1 ve Grup 2 femur MMP3 boyanma yüzdeleri karşılaştırıldığında sonuçlar sırasıyla ve %50 ± 21(20-80) ve %15.6 ± 21.9 (0-50) olup fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p:0.008). Grup 1 ve Grup 2 tibia MMP3 boyanma yüzdeleri sırasıyla %35 ± 18.4(5-60) ve %13.3 ± 18.7 (0-50) olup fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p:0.019). Grup 1 ve Grup 2 toplam MMP3 boyanma yüzdeleri sırasıyla %42 ± 21(5-80) ve %14.4 ± 19.8(0-50) olup fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p:0.001). (Tablo 11; Grafik 3-4)

	GRUP 1	GRUP 2	P değeri
Femur MMP3 boyanma yüzdesi	%50±21(20-80)	%15.6±21.9 (0-50)	p:0.008
Tibia MMP3 boyanma yüzdesi	%35±18.4(5-60)	%13.3±18.7 (0-50)	p:0.019
Toplam MMP3 boyanma yüzdesi	%42±21(5-80)	%14.4±19.8(0-50)	p:0.001

Tablo 11: Grup 1 ve Grup 2 arası MMP-3 boyanma yüzdesi istatistiksel değerlendirmesi



Grafik 3: Femur ve tibia MMP-3 boyanma yüzdesinin gruplara göre dağılımı



Grafik 4: Toplam MMP-3 boyanma yüzdesinin gruplara göre dağılımı

TARTIŞMA VE SONUÇ:

Osteoartrit (OA), genel popülasyonda 55 yaş üzeri insanların %80'inde farklı evrelerde görülen, ilerleyici kıkırdak kaybı ile karakterize, etkilenen eklemlerde kronik ağrı, deformite, fonksiyon kaybı, kontraktür ve kas atrofisi ile seyreden, toplum bireylerinde hayat kalitesinin büyük ölçüde düşmesine ve gün geçtikçe artan tedavi masraflarına neden olan kronik bir hastalıktır.

Günümüzde OA tedavisinde konservatif ve cerrahi pek çok yöntem mevcuttur. Kullanılan farmakolojik yöntemler, yaşlanan toplumda yaygın, ilerleyici ve hayat kalitesini olumsuz etkileyen OA'nın ilerlemesini durdurmak yerine çoğunlukla semptomatik tedavi yönünde etki etmektedir. Artroplasti ve osteotomiler gibi cerrahi yöntemlerin ise teknolojik ilerlemeye paralel artan sayıda uygulamalarında, seçilmiş vakalarda ve iyi cerrahi teknikle yapılması durumunda sonuçlarının yüz güldürücü olduğunu bilmekteyiz. Bununla birlikte cerrahi endikasyonu bulunmayan veya cerrahi tedavinin tartışmalı olduğu erken-orta evre primer OA vakalarında üzerinde çalışılması gereken OA progresyonunu yavaşlatabilen hatta geri çevirebilen non-invaziv tedavilerin gündeme gelmesidir.

Manyetik rezonans görüntüleme bazlı çalışmalar, geleneksel olarak sekonder osteoartrit ile ilişkili bulunan menisküs ve ligaman lezyonlarının önceden düşünüldüğünün aksine primer osteoartritte yaygın olarak görüldüğünü kanıtlamıştır. Özellikle 30-50 yaş arasında erken başlangıçlı osteoartritin büyük çoğunluğundan ön çapraz bağ hasarı sorumludur. Oluşan instabilite ve anormal tibiofemoral kinematik, eklem kıkırdağı üzerinde fizyolojik yük dağılımını etkileyerek cevap olarak osteoartrit oluşumu ile sonuçlanan karışık patofizyolojik mekanizmaları

başlatmaktadır.^{97,67} Ön çapraz bağ (ÖÇB) hasarı sonrası 10-20 yıl içinde oluşan OA oranları %10 ile %90 arasında değişmektedir. Posttravmatik instabilite sonrası böylesine geniş bir yelpazede OA gelişimi olması sadece travmaya bağlı değil, hastalığın etiolojisinin multifaktöryel (genetik yatkınlık, yaşam şekli, kas gücü, cinsiyet, sistemik hastalık, hormon ve büyüme faktörlerine yanıt) olduğuna dair kanıtları güçlendirmektedir.^{37,85,67,102}

Devam eden ileri düzeydeki moleküler çalışmalara rağmen osteoartrit fizyopatolojisi bugün hala kesin bilinmemekle beraber, sadece dejeneratif bir hastalık olmadığı, hastalığın patogenezinde yapım ve yıkımla beraber ilerleyen enflamatuvar bir süreç olduğu son zamanlarda yapılan deneysel çalışmalar ile ispat edilmiştir.^{65,2,108,46,9,25,55}

Bu enflamatuvar süreç içerisinde özellikle IL-1, TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinler ve kıkırdak ESM (ekstraselüler matriks) yıkımına yol açan matriksmetalloproteinazlar (MMP) önemli rol oynamaktadır. MMP'ler çeşitli hücreler (makrofaj, fibroblast, kondrosit) tarafından salgılanan nötral pH'da çinko bağımlı olarak etki gösteren bir endopeptidaz enzim grubudur. Özellikle inflamatuvar sitokinlerden IL-1 ve TNF α 'nın matriksmetalloproteinazlar üzerinde stimulan etkisi ile hücreden proenzim olarak salgılanarak pek çok biyolojik olayı regüle edebilirler. Günümüzde MMP'ler substratlarına göre çeşitli gruplara ayrılmışlardır. Bunlar; Kollejenazlar (MMP 1-8-13), Stromelyns (MMP 3-10-11), Jelatinaz (MMP 2-9), membran tipi metalloproteinazlardır (MMP 14-16). Hücre kültürü ve deneysel OA hayvan modelleri ve OA gelişen insanlardan alınan subkondral kemik, kıkırdak ve sinovyal membran doku örneklerinde özellikle MMP 1-3-9-13 düzeylerinde kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı artış

bulunmuş ve ekstraselüler matriks yıkımının kondrositler tarafından salgılanan MMP'ler vasıtası ile gerçekleştiğine dair güçlü kanıtlar elde edilmiştir.^{73,44,80,25,72}

Bu bilgiler ışığında osteoartrit ilerlemesinin durdurmak için yeni tedavi stratejileri matriksmetalloproteinaz inhibisyonu üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu amaçla literatürde pek çok MMP inhibitörü inivivo ve invitro ortamlarda kıkırdak ve farklı dokularda etkileri yönünden araştırılmıştır.^{54,53,61}

Bulunan metalloproteinaz inhibitörleriyle yapılan klinik çalışmaların çoğunda istenilen sonuçlara ulaşamadığı konusunu izah edebilmek için pek çok olası neden ortaya konmuştur. Nedenlerden biri; birleşiklerin emilim sırasında değişime uğrayabilmesi ve MMP'ler için olan spesifitelerinin değişmesidir. Bir başka olasılık aktif MMP'ler ve TIMP'ler arasındaki dengenin yapay bir inhibitör ile değiştirilmesi sonucu daha fazla MMP sentezinin uyarılarak yıkımın teşvik edilmesidir.

Gelecekte başarının anahtarı artritlik hastalıklardaki hasardan sorumlu spesifik MMP'lerin izole edilmesine bağlıdır. Belirli enzimleri hedef alan spesifik inhibitörlerin bulunması sadece istenen dokuyu etkileyerek potansiyel yan etkilerin azalmasını sağlayacaktır.

Statinler; kolesterol sentezinde 3-hidroksi-3-metilgutaril-CoA (HMG-CoA), mevalonik asit konversiyonunu katalizleyen HMG-CoA redüktaz enzimini kompetitif olarak inhibe ederek kolesterol sentezinde düzenleyici etki gösteren ve günümüzde hiperlipidemi tedavisinde başarı ile kullanılan bir ilaç grubudur.

Hipolipidemik etkileri bilinmekle beraber antienflamatuar ve immunmodülatör özellikleri ilk kez koroner arter hastalıklarında arter duvarındaki enflamasyonu inhibe etmeleri ve aterosklerotik plağı stabilize etmeleri ile ortaya konmuştur ve bu

ilaçların kardiyovasküler hastalıkların dışında kullanımı gündeme gelmiştir.^{12,1,8,94,62,3}

Statin grubu ilaçların OA patogenezi üzerindeki etkilerinin temel olarak inflammatuar hücre kemotaksisini ve proteazların salınımını önlemeleri ile olduğu çeşitli araştırmalarda bulunmuştur. Statinlerin inflammatuar yanıtı, temel olarak monosit kemotaksisi ve proinflammatuar sitokinler ve MMP salınımını azalatarak önlediği araştırmalarda gösterilmiştir.¹²

Lazzerini ve ark.⁶¹ tarafından yapılan bir çalışmada simvastatinin invitro olarak IL-1 tarafından stimüle edilen insan kondrosit kültüründe MMP -3 üzerinde inhibitör etkileri gözlemlenmiş ancak bugüne kadar invivo olarak mekanik OA oluşturulan bir hayvan modeli üzerindeki etkileri araştırılmamıştır.

Literatürdeki 3 farklı deneysel hayvan modelinde osteoartrit oluşturulmuştur. Bunlar genetik olarak manipüle edilmiş grubu içeren spontan veya doğal oluşan model, kimyasal model ve mekanik olarak oluşturulan modellerdir. Günümüzde en çok faydalanan model kronik travmatik osteoartrit modelini taklit eden mekanik instabilite yaratan modeldir. Bu modelin avantajları; hastalık oluşma oranı, doğru cerrahi teknik uygulanması durumunda %100, hızlı fakat kontrollü bir OA modeli oluşturması, yapısal elemanların veya özelliği olan mekanik komponentlerin OA gelişimine katkısını araştırma imkanı ve kimyasal etkileşim olmadan OA tedavisinde yeni ilaç modalitelerini araştırmak olanağı vermesidir.

Farklı mekanik yöntemler içerisinde ÖÇB kesilerek OA oluşturulmasını tercih etmemizin nedeni ÖÇB kesilmesi sonrası oluşturulan OA modelin, OA'ın başlangıç komponenti olan eklem yüzeyinde yük dağılımı ve eklem hareketinin değişmesinin önemini destekleyen bir model olmasıdır. Ayrıca ÖÇB kesilerek

uygulanan modelin uzun dönem sonuçları; kinematik değişim, proteoglikan içeriğinde azlama, matriksmetalloproteinaz aktivitesinde değişim ve kıkırdakta ilerleyici erozyon olması ile insan ÖÇB hasarı ile benzerlik göstermektedir.^{114,16,3,96}

Kullanılan hayvan modelleri içinde radyolojik, morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler açısından insan modelini en iyi taklit eden model, ÖÇB kesilerek OA oluşturulan köpek modelidir. Bununla beraber filogenetik olarak yüksek bir ırk özeliği taşımaları, OA oluşma sürecinin diğer hayvan modellerine göre uzun olması, insan MMP protein yapılarına %65-80 gibi yüksek oranında benzerlik göstermesi ve yakın diz anatomisi nedeniyle çalışmamızda ratların kullanılması tercih edilmiştir.³⁸

Mekanik olarak instabilite gelişen kıkırdakta artan stres, eklem içerisine kıkırdak parçalarının dökülmesi, eklemde makrofaj, monosit, kondrosit ve sinoviyositlerin karmaşık etkileşimi sonucu ortama salınan proinflamatuvar sitokinler ve MMP'ler matriks yıkımına neden olan inflamatuvar cevabı oluşturmaktadır. Anormal yüklenmenin devam etmesi zaman içerisinde bir kısır döngü oluşturarak OA'de ilerleyici ve kalıcı kıkırdak hasarına neden olmaktadır.

Çalışmamızda rat ön çapraz bağları kesilerek deneysel olarak oluşturulan OA modelinde, 6 hafta boyunca 20mg/kg/gün p.o Simvastatinin (Merck Sharp & Dohme ,Middlesex,U.K) tedavisinin MMP-3 inhibisyonu yoluyla kıkırdak üzerindeki etkisi histopatolojik ve immunhistokimyasal yöntemler kullanarak araştırılmıştır.

Simvastatin ile tedavi edilen deneklerin (Grup 2) yapılan histopatolojik ve immunhistokimyasal incelemesinde eklem kıkırdağı üzerindeki tedavinin etkisinin kontrol grubuna (Grup 3) benzer olduğu (Tablo 10), ÖÇB kesilerek tedavi almayan grubun aksine (Grup 1) kıkırdak yıkımını yavaşlattığı bulunmuştur (Tablo5,11).

Elde ettiğimiz bulguların statinlerin MMP-3 inhibisyonu yapmaları ve enflamatuar hücre kemotaksisini önlemeleri nedeniyle olduğunu düşünmekteyiz (Şekil 8-10). Statin grubu ilaçların kondrositler, makrofaj ve sinoviyal hücreler tarafından salgılanan MMP-3 üzerindeki inhibitor etki mekanizması kesin bilinmemekle beraber, isoprenoid sentezini engelleyerek membran protein trafiğini etkilemeleri ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Çalışmamızda deneklerde hızlı etki edebilmek amacıyla Simvastatin dozu, insanda hipolipidemik etki için gerekli olan terapötik dozdan (1.5/mg/kg) yüksek olarak kullanılmıştır. Çalışmamızda ratlarda belirgin bir yan etki görülmemekle beraber simvastatinin OA’de doz, kullanım süresi ve yan etki profili gözlenmesi ile ilacın farklı uygulama yollarına göre kıkırdak üzerindeki etkilerinin araştırılması gerekmektedir.

Kardiyak mortalite ve morbiditeyi azaltması yönünde etkinliği kanıtlanmış ve yaygın kullanımı olan Simvastatin tedavisinin dizde instabilite, anormal kıkırdak yüklenmesi sonucu oluşan sekonder OA ve primer OA vakalarının erken evresinde kullanılmasının, OA patogenezi aydınlayabilecek ve hastalık progresyonunu yavaşlatabilecek yeni, etkili tedavi protokollerinin geliştirilmesi yönünden önemli olduğunu düşünmekteyiz.

ÖZET:

Amaç: Bu çalışmada, mekanik olarak oluşturulan rat osteoartrit (OA) modelinde oral Simvastatin tedavisinin matriksmetalloproteinaz-3 (MMP-3) inhibisyonu yaparak diz eklem kıkırdığı üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada ortalama ağırlıkları 250-300 gr olan 27 adet Wistar Albino rat kullanıldı. Çalışmada denekler 3 gruba ayrıldı. Grup 1’de 9 adet rat sağ diz eklemine medial artrotomi ile girilerek ön çapraz bağı kesildi. Dizde instabilite ve kıkırdak yük dağılımının bozulmasını takiben altıncı haftada mekanik yöntemle osteoartrit oluşturuldu. Grup 1’de 9 diz eklemi kendi içinde femur (F) ve tibia (T) olarak ayrıldı.

Grup 2’de 9 adet rat sağ diz ön çapraz bağı kesilerek diz eklemine mekanik olarak osteoartrit oluşturulmasını takiben postoperatif 1. günden itibaren 6 hafta boyunca gavaj yöntemiyle 20mg/kg/gün Simvastatin (Merck Sharp & Dohme ,Middlesex,U.K) oral olarak verildi. Grup 2 ‘de 9 diz eklemi kendi içinde femur (F) ve tibia (T) olarak ayrıldı.

Grup 3’de 9 adet ratın 9 diz eklemi kullanılarak kontrol grubu oluşturuldu. Grup 3’de 9 diz eklemi kendi içinde femur (F) ve tibia (T) olarak ayrıldı. Deneklere altı hafta sonunda yüksek doz ketamin ile ötenazi uygulandı. Aynı gün femur ve tibia eklem yüzleri korunarak, diz eklemi uygun seviyeden kesilerek çıkartıldı ve histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemeye tabi tutuldu. Hematoksilin-eosin ile boyanan kesitlerde OARSI (Osteoarthritis Research Society International) osteoartrit kıkırdak histopatoloji değerlendirme sistemi kullanılarak skorlandı. MMP-3 İmmünohistokimyasal boyanmayı takiben değerlendirme femur ve tibia

eklem kıkırdağında pozitif boyanan kondrosit sayısının diz eklemi toplam kondrosit sayısına oranlanması ile yapıldı. Sonuçların istatistiksel analizi “Statistical package for Social Sciences-11” (SPSS-11) programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki bulguların istatistiksel farkı Mann-Whitney U testi kullanılarak araştırıldı.

Bulgular: OARSI (Osteoarthritis Research Society International) osteoartrit kıkırdak histopatoloji değerlendirme sistemi kullanılarak yapılan değerlendirmede Grup 3’e (kontrol grubu) göre Grup 1 (ÖÇB kesik) ve Grup 2’de (ÖÇB kesik-simvastatin) osteoartrit olduğu gözlemlendi. Grup 2’de ise Grup 1’e göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde osteoartrit evresi, derece ve puanı düşük bulundu. Her 3 grupta yapılan MMP-3 immunohistokimyasal boyama sonucu; Grup 1 MMP-3 boyanma yüzdesi Grup 2 ve 3’e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. Grup 2 ve Grup 3 karşılaştırıldığında ise MMP-3 boyanma yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Sonuç: Dizde instabilite ve yük dağılımının bozulması sonucunda oluşan osteoartritte oral uygulanan Simvastatin tedavisinin MMP-3 inhibisyonu ile kondroprotektif ve hastalık progresyonunu yavaşlatıcı etkiye sahip olduğu saptanmıştır (Mann-Whitney U; $p<0.05$). Osteoartritte kısır döngüyü kırmak amacıyla hastalığın inflamatuvar basamağına müdahale ederek ilerleyici özeliğinin engellenmesi amaçlanarak yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu amaca yönelik olarak tedavide Simvastatinin kullanılması mümkün görülmekle beraber kondroprotektif etkilerinin insanda ispat edilmesi için ileri düzeyde klinik ve histopatolojik prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

ABSTRACT

Objective: To investigate the chondroprotective effect of orally administered simvastatin via the inhibition of matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) enzyme in an experimental model of knee osteoarthritis (OA).

Materials and Methods:

In this study 27 Wistar Albino rats weighing 250-300 gr were used. Animals were divided into 3 Groups. Animals comprising Group 1 and Group 2 underwent an anterior cruciate ligament transection via using a medial arthrotomy to simulate a knee instability altering articular cartilage loading that leads to mechanically induced osteoarthritis (OA). After the surgical procedure each animal in Group 2 was treated with orally administered Simvastatin (Merck Sharp & Dohme, Middlesex, U.K) 20/mg/kg/day for 6 weeks. In Group 3 knees of healthy animals were taken as controls. 9 knee joints in all groups were subsequently divided into femur (F) and tibia (T) subgroups. All animals were housed in different cages according to their groups and were allowed unlimited activity. All animals were sacrificed 6 weeks after the operation by using an intravenous overdose anesthesia and the knee joints were assessed by histopathological and immunohistochemical methods.

Histopathological assessment was made by using the OARSI (Osteoarthritis Research Society International) cartilage OA pathology assessment system based on 6 grades and 4 stages reflecting extent of OA over the joint surface.

Immunohistochemical assessment was made by identifying the percentage of MMP-3 stained chondrocytes in the articular cartilage of femur and tibia respectively.

Results: 9 knees of 9 animals were included in each study group. Histopathological examination showed that Group 1 (ACLT) and Group 2 (ACLT +simvastatin) had statistically significant higher OARSI cartilage OA pathology assesment scores compared with the untreated control knees. However animals in Group 2 treated with simvastatin had statistically lower scores compared to those of Group 1, revealing a decrease in OA progression.

The percentage of matrixmetalloproteinase staining between Group 2 (ACLT+simvastatin) and Group 1 (ACLT) showed statistacally significant difference, whereas there was no difference between Group 2 and Group 3 (control).

Conclusion: Orally administrated Simvastatin had benefical effects on progression of osteoarthritis in an experimental animal model of osteoarthritis achieved by transecting the anterior crutiate ligament. Simvastatin may be used as a disease modifying drug in the inflammatory phase of the disease achieving chondroprotective effect on knee joint cartilage and has a promising role in prevention of osteoarthritis in the future.

KAYNAKÇA

1. Abeles AM, Pillinger MH. Statins as antiinflammatory and immunomodulatory agents: a future in rheumatologic therapy. *Arthritis Rheum.* 2006 Feb;54(2):393-407.
2. Abramson SB. Inflammation in osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl.* 2004;70: 70–76.
3. Akasaki. Y, Matsuda S. Mevastatin reduces cartilage degradation in rabbit experimental osteoarthritis through inhibition of synovial inflammation. *Osteoarthritis and Cartilage* 2008.
4. Akizuki S, Mow VC, Muller F, Pita JC, Howell DS, Manicourt DH. Tensile properties of human knee joint cartilage: I. Influence of ionic conditions, weight bearing, and fibrillation on the tensile modulus. *J Orthop Res.* 1986;4(4):379-92.
5. Alaaeddine N, DiBattista JA, Pelletier JP, Cloutier JM, Kiansa K, Dupuis M, Martel-Pelletier J. Osteoarthritic synovial fibroblasts possess an increased level of tumor necrosis factor-receptor 55 (TNF-R55) that mediates biological activation by TNF-alpha. *J Rheumatol.* 1997 Oct;24(10):1985-94.
6. Andriacchi TP, Dyrby CO. Interactions between kinematics and loading during walking for the normal and ACL deficient knee. *J Biomech.* 2005;38(2):293-8.
7. Appleyard RC, Burkhardt D, Ghosh P, et al. Topographical analysis of the structural, biochemical and dynamic biomechanical properties of cartilage in an ovine model of osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil.* 2003;11(1):65-77.
8. Arnaud C, Braunersreuther V, Mach F. Toward immunomodulatory and anti-inflammatory properties of statins. *Trends Cardiovasc Med.* 2005Aug;15(6):202-6.

9. Attur MG, Dave M, Akamatsu M, Katoh M, Amin AR. Osteoarthritis or osteoarthrosis: the definition of inflammation becomes a semantic issue in the genomic era of molecular medicine. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002 Jan;10(1):1-4.
10. Baetta R, Donetti E, Camparato C, Calore M, Rossi A, Teruzzi C. In vitro and in vivo apoptosis by atorvastatin in stimulated smooth muscle cells. *Pharmacol Res*. 1997;36: 115-21.
11. Barrance PJ, Williams GN, Snyder-Mackler L, Buchanan TS. Altered knee kinematics in ACL-deficient non-copers: a comparison using dynamic MRI. *J Orthop Res*. 2006;24(2):132-40.
12. Bellosta S, Via D, Canavesi M, Pfister P, Fumagalli R, Paoletti R. HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998; 18: 1671-8.
13. Bellosta S, Ferri N, Bernini F, Paoletti R, Corsini A. Non-lipid related effects of statins. *Ann Med*. 2000;32:164-76.
14. Beynon BD, Johnson R, Abate JA, Fleming BC, Nichols CE. Treatment of anterior cruciate ligament injuries, part I. *Am J Sports Med*. 2005;33:1579–1602.
15. Bigg HF, Shi YE, Liu YE, Steffensen B, Overall CM. Specific, high affinity binding of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) to the COOH-terminal hemopexin-like domain of human gelatinase A. TIMP-4 binds progelatinase A and the COOH-terminal domain in a similar manner to TIMP-2. *J Biol Chem*. 1997 Jun 13;272(24):15496-500.

16. Brandt K D, Insights into the natural history of oteoarthritis provided by cruciate-deficient dog. An animal model of osteoarthritis. *Ann New York Acad Sci.*1994;732 199.
17. Brandt KD, Myers SL, Burr D. Osteoarthritic changes in canine articular cartilage, subchondral bone, and synovium fifty-four months after transection of the anterior cruciate ligament. *Arthritis Rheum.* 1991; 34:1560–1570.
18. Brown BG, Zhao XQ, Sacco DE, Albers JJ. Lipid lowering and plaque regression: new insights into prevention of plaque disruption and clinical events in coronary disease. *Circulation.* 1993; 87: 1781-91.
19. Bullough PG, Yawitz PS, Tafra L, Boskey AL. Topographical variations in the morphology and biochemistry of adult canine tibial plateau articular cartilage. *J Orthop Res.* 1985;3(1):1-16.
20. Burr DB, Schaffler MB. The involvement of subchondral mineralized tissues in osteoarthritis: quantitative microscopic evidence. *Microsc Res Tech.* 1997; 37:343–357.
21. Buschmann MD, Kim YJ, Wong M, Frank E, Hunziker EB, Grodzinsky AJ. Stimulation of aggrecan synthesis in cartilage explants by cyclic loading is localized to regions of high interstitial fluid flow. *Arch Biochem Biophys.* 1999;366(1):1-7.
22. Buttle DJ, Handley CJ, Ilic MZ, Saklatvala J, Murata M, Barrett AJ. Inhibition of cartilage proteoglycan release by a specific inactivator of cathepsin B and an inhibitor of matrix metalloproteinases. Evidence for two converging pathways of

- chondrocyte-mediated proteoglycan degradation. *Arthritis Rheum.* 1993 Dec;36(12):1709-17.
23. Camelia S, Anca S. Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med.* 2001;5(4):378-387.
24. Carlson CS, Loeser RF, Purser CB, et al. Osteoarthritis in Cynomolgus macaques. III: effects of age, gender, and subchondral bone thickness on the severity of disease. *J Bone Miner Res.* 1996; 11:1209–1217.
25. Charles J, Malemud-c Najmul Islamd Tariq M, Haqqia. Pathophysiological Mechanisms in Osteoarthritis Lead to Novel Therapeutic Strategies. *Cells Tissues Organs.* 2003;174:34–48
26. Champe PC, R Harvey. *Lippicot's Illustrated Review Biochemistry.* 1994; s205-20
27. Christopher JE, Tim DS. Statins as modulators of bone formation . *Arthritis Res.* 2002; 4:151-153.
28. Clements KM, Price JS, Chambers MG, Visco DM, Poole AR, Mason RM .Gene deletion of either interleukin-1beta, interleukin-1beta-converting enzyme, inducible nitric oxide synthase, or stromelysin 1 accelerates the development of knee osteoarthritis in mice after surgical transection of the medial collateral ligament and partial medial meniscectomy. *Arthritis Rheum.* 2003 Dec;48(12):3452-63.
29. Colli S, Eligini S, Lalli M, Camera M, Paoletti R, Tremoli E. Vastatins inhibit tissue factor in cultured human macrophages: a novel mechanism of protection against atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:265-72.

30. Corsini A, Bellosta S, Baetta R, Fumagalli R, Bernini F. Newinsights into the pharmacodynamics and pharmacokineticproperties of statins. *Pharmacol Ther.* 1999; 84: 413-28.
31. Das P, Schurman DJ, Smith RL. Nitric oxide and G proteins mediate the response of bovine articular chondrocytes to fluid-induced shear. *J Orthop Res.* 1997;15(1):87-93.
32. Denko CW, Boja B, Malemud CJ. Intra-erythrocyte deposition of growth hormone in rheumatic diseases. *Rheumatol Int.* 2003 Jan;23(1):11-4.
33. Dienst M, Burks RT, Greiss PE. Anatomy and biomechanics of the anterior cruciate ligament. *The orthopedic clinics of North America* . 2002;33(4):605-620
34. Dimmler S, Aicher A, Vasa M, Mildner RC, Adler K, Tiemann M, Rutten H, Fichtlscherer S, Martin H, Ziegler AM. HMG-CoA reductase inhibitors increase endothelial progenitor cells via the PI3-kinase /akt pathway . *J. Clin Invest.* 2001; 108: 391-397.
35. Doughty JR, Goldberg RL, Ganu V, Melton RA, Hu SI, Di Pasquale G. A stromelysin assay for the assessment of metalloprotease inhibitors on human aggregated proteoglycan. *Agents Actions.* 1993;39 Spec No:C151-3.
36. Duzendorfer S, Rothbuecher D, Schratzberger P, Reinisch N, Kahler CM, Wiedermann CJ. Mevalonate-dependent inhibition of transendothelial migration and chemotaxis of human peripheral blood neutrophils by pravastatin. *Circ Res.* 1997 Dec;81(6):963-9.

37. Englund M, Hunter DJ, Gale D, et al. Prevalence of anterior cruciate ligament tear and its association with knee osteoarthritis and giving-way among older adults in the community. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006;14(suppl 2):S121.
38. Er EM, Herzog W, Leonard TR, Stano A, Nguyen H. In vivo knee joint loading and kinematics before and after ACL transection in an animal model. *J Biomech*. 1998;31(3):253-62.
39. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation*. 1995;92:657-71.
40. Fearon U, Reece R, Smith J, Emery P, Veale DJ. Synovial cytokine and growth factor regulation of MMPs/TIMPs: implications for erosions and angiogenesis in early rheumatoid and psoriatic arthritis patients. *Ann N Y Acad Sci*. 1999 Jun 30;878:619-21.
41. Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, et al. Osteoarthritis: new insights, part 1: the disease and its risk factors. *Ann Intern Med*. 2000;133:635–646.
42. Funk JL, Chen J, Downey KJ, Clark RA. Bone protective effect of simvastatin in experimental arthritis. *J Rheumatol*. 2008 Jun;35(6):1083-91.
43. Fujisawa T, Hattori T, Takahashi K, Kuboki T, Yamashita A, Takigawa M. Cyclic mechanical stress induces extracellular matrix degradation in cultured chondrocytes via gene expression of matrix metalloproteinases and interleukin-1. *J Biochem*. 1999;125(5):966-75

44. 105. Gao G, Westling J, Thompson VP, Howell PE, Gottschall, J.D. Sandy Activation of the proteolytic activity of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by C-terminal truncation. *J Biol Chem.* 2002; 277: 11034–11041.
45. Georgoulis AD, Papadonikolakis A, Papageorgiou CD, Mitsou A, Stergiou N. Three-dimensional tibiofemoral kinematics of the anterior cruciate ligament-deficient and reconstructed knee during walking. *Am J Sports Med.* 2003;31(1):75-9.
46. Goldring MB. The role of cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis: lessons from animal models. *Connect Tissue Res.* 1999;40(1):1-11. Review.
47. Hong H, Arthur S, Guohua Z, Lingfang S, Daoming Q, Toshihiko N, Peter NK. Simvastatin enhances bone morphogenetic protein receptor type 2 expression. *Biochemical and Biophysical Research.* 2006; 339:59-64.
48. Hootman JM, FitzGerald S, Macera CA, Blair SN. Lower extremity muscle strength and risk of self-reported hip or knee osteoarthritis. *J Phys Act Health.* 2004;1:321–330.
49. Huebner JL, Hanes MA, Beekman B, et al. A comparative analysis of bone and cartilage metabolism in two strains of guinea-pig with varying degrees of naturally occurring osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002; 10:758–767.
50. Hui W, Rowan AD, Cawston T. Modulation of the expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinases by TGF-beta1 and IGF-1 in primary human articular and bovine nasal chondrocytes stimulated with TNF-alpha. *Cytokine.* 2001 Oct 7;16(1):31-5.

51. Hunter DJ, Zhang Y, Niu J, et al. Structural factors associated with malalignment in knee osteoarthritis: the Boston Osteoarthritis Knee Study. *J Rheumatol*. 2005;32:2192–2199.
52. Hyttinen MM, Arokoski JPA, Parkkinen JJ, et al. Age matters: collagen birefringence of superficial articular cartilage is increased in young guinea pigs but decreased in older animals after identical physiological type of joint loading. *Osteoarthr Cartil*. 2001;9(8):694-701.
53. Janusz MJ, Bendele AM, Brown KK, Taiwo YO, Hsieh L, Heitmeyer SA. Induction of osteoarthritis in the rat by surgical tear of the meniscus: inhibition of joint damage by a matrix metalloproteinase inhibitor. *Osteoarthr Cartil*. 2002;10:785–91.
54. Jennifer M.Milner, Tim E Cawston. Matrix Metalloproteinase Knockout Studies and the Potential Use Of Matrix Metalloproteinase Inhibitors in the Rheumatic Diseases. *Current Drug Targets- Inflammation and Allergy*.2005;4:363-375.
55. Johanne Martel-Pelletier PhD. Pathophysiology of osteoarthritis
OsteoArthritis and Cartilage. 2004;12:S31–S33
56. Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006 Jan;14(1):13-29.
57. Kagami S, Kanari H, Suto A, Fujiwara M, Ikeda K, Hirose K, Watanabe N, Iwamoto I, Nakajima H.HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin inhibits proinflammatory cytokine production from murine mast cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008;146 Suppl 1:61-6.

58. Kimura M, Kurose I, Russell J, Granger DN. Effects of fluvastatin on leukocyte-endothelial cell adhesion in hypercholesterolemic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 1521-6.
59. Koo S, Andriacchi TP. A comparison of the influence of global functional loads vs. local contact anatomy on articular cartilage thickness at the knee. *J Biomech.* 2007;40(13):2961-6.
60. 6. Laufs U, Fata VL, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-Co A reductase inhibitors. *Circulation.* 1998;97:1129-1135.
61. Lazzerini PE, Capecchi PL, Nerucci F, Fioravanti A, Chellini F, Piccini M, et al. Simvastatin reduces MMP-3 level in interleukin 1beta stimulated human chondrocyte culture. *Ann Rheum Dis.* 2004 Jul;63(7):867-9.
62. Leung BP, Sattar N, Crilly A, Prach M, McCarey DW, Payne H, et al. A novel anti-inflammatory role for simvastatin in inflammatory arthritis. *J Immunol.* 2003 Feb 1;170(3):1524-30.
63. Li G, Moses JM, Papannagari R, Pathare NP, Defrate LE, Gill TJ. Anterior cruciate ligament deficiency alters the in vivo motion of the tibiofemoral cartilage contact points in both the anteroposterior and mediolateral directions. *J Bone Joint Surg [Am.].* 2006;88(8):1826-34.
64. Liu W, Burton-Wurster N, Glant TT, et al. Spontaneous and experimental osteoarthritis in dog: similarities and differences in proteoglycan levels. *J Orthop Res.* 2003;21(4):730-7.

65. Loeuille D, Chary-Valckenaere I, Champigneulle J, Rat AC, Toussaint F, Pinzano-Watrin A, et al. Macroscopic and microscopic features of synovial membrane inflammation in the osteoarthritic knee: correlating magnetic resonance imaging findings with disease severity. *Arthritis Rheum.* 2005 Nov;52(11):3492-501.
66. Lohmander, Englund PM, Dahl LL, Roos EM. The long-term consequence of anterior cruciate ligament and meniscus injuries: osteoarthritis. *The American Journal of Sports Medicine.* 2007;35:1756-1769.
67. Lohmander LS, Ostenberg A, Englund M, Roos H. High prevalence of knee osteoarthritis, pain, and functional limitations in female soccer players twelve years after anterior cruciate ligament injury. *Arthritis Rheum.* 2004;50:3145–3152.
68. Logan M, Dunstan E, Robinson J, Williams A, Gedroyc W, Freeman M. Tibiofemoral kinematics of the anterior cruciate ligament (ACL)-deficient weightbearing, living knee employing vertical access open "interventional" multiple resonance imaging. *Am J Sports Med.* 2004;32(3):720-6.
69. Malesud CJ, Killeen W, Hering TM, Purchio AF. Enhanced sulfated-proteoglycan core protein synthesis by incubation of rabbit chondrocytes with recombinant transforming growth factor-beta 1. *J Cell Physiol.* 1991 Oct;149(1):152-9.
70. Malfait AM, Liu RQ, Ijiri K, Komiya S, Tortorella MD. Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage. *J Biol Chem.* 2002 Jun 21;277(25):22201-8.

71. Middleton JF, Tyler JA. Upregulation of insulin-like growth factor I gene expression in the lesions of osteoarthritic human articular cartilage *Ann Rheum Dis*. 1992 Apr;51(4):440-7.
72. J. Martel-Pelletier. Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 1997; 371–373.
73. Mohtai M, Smith RL, Schurman DJ, Tsuji Y, Torti FM, Hutchinson NI, Stetler-Stevenson WG, Goldberg GI. Expression of 92-kD type IV collagenase/gelatinase (gelatinase B) in osteoarthritic cartilage and its induction in normal human articular cartilage by interleukin 1. *J Clin Invest*. 1993 Jul;92(1):179-85.
74. Moskovitz, R.W. *Experimental models of osteoarthritis ,Diagnosis and Medical /Surgical Management,2nd ed*. Philadelphia ,1992;213
75. Nielsen AB, Yde J. Epidemiology of acute knee injuries: a prospective hospital investigation. *J Trauma*. 1991;31:1644–1648.
76. Nofer JR, Tepel M, Kehrel B. Low -density lipoproteins inhibit the Na/H antiport in human platelets: a novel mechanism enhancing platelet activity in hipercholesterolemia. *Circulation*. 1997;95:1307-7.
77. Odensten M, Gillquist J.F. Unctional anatomy of the anterior cruciate ligament and a rationale of reconstruction. *The Journal of bone and joint surgery*. 1985;67(2):257-262.
78. Pelletier JP, Mineau F, Faure MP, Martel-Pelletier J. Imbalance between the mechanisms of activation and inhibition of metalloproteases in the early lesions of experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 1990;33(10):1466-76.

79. Pitt B, Waters D, Brown WV, van Boven AJ, Schwartz L, Title LM, et al. Aggressive lipid-lowering therapy compared with angioplasty in stable coronary artery disease. *N Engl J Med*. 1999 Dec 9;341(24):1854-5.
80. Puzas, J.E., J.-M. Landreau, R. Tallents, J. Albright, E.D. Schwarz, R. Landesberg Degradative pathways in tissues of the temporomandibular joint. *Cells Tissues Organs*. 2001;169:248–256.
81. R. J. H. Custers M.D., L. B. Creemers Ph.D., A. J. Verbout M.D., Ph.D., M. H. P. van Rijen B.Sc., W. J. A. Dhert M.D., Ph.D., F.B.S.E. and D. B. F. Saris M.D., Ph.D.

Reliability, reproducibility and variability of the traditional Histologic/Histochemical Grading System vs the new OARSI. *Osteoarthritis Cartilage Histopathology Assessment System OsteoArthritis and Cartilage* 2007;15, 1241-1248.
82. Radin EL, Rose RM. Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clin Orthop*. 1986, 213:34–40.
83. Fazzalari NL, Kuliwaba JS, Forwood MR: Cancellous bone microdamage in the proximal femur: influence of age and osteoarthritis on damage morphology and regional distribution. *Bone* 2002; 31:697–702.
84. Romano M, Diomedede L, Sironi M, Massimiliano L, Sottocorno M, Polentarutti N, et al. Inhibition of monocyte chemotactic protein-1 synthesis by statins. *Lab Invest*. 2000 Jul;80(7):1095-100.
85. Roos EM. Joint injury causes knee osteoarthritis in young adults. *Curr Opin Rheumatol*. 2005;17:195–200.

86. Seibel MJ, Duncan A, Robins SP: Urinary hydroxy-pyridinium crosslinks provide indices of cartilage and bone involvement in arthritic diseases. *J Rheumatol.* 1989;16:964–970.
87. Simionescu M, Stancu C, Costache G, Sima A. Endothelial cell response to hiperlipidemia: activation of dysfunction injury; the protective role of simvastatin. *Vascul Pharmacol.* 2002 May;38(5):275-82.
88. Sharma L, Dunlop DD, Cahue S, Song J, Hayes KW. Quadriceps strength and osteoarthritis progression in malaligned and lax knees. *Ann Intern Med.* 2003;138:613–619.
89. Shiomi M, It0 T, Tsukada T, Yata T, Watanabe Y, Tsujita Y, et al. Reduction of serum cholesterol levels alters lesional composition of atherosclerotic plaques. Effect of pravastatin sodium on atherosclerosis in mature WHHL rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15: 1938-44.
90. Sławińska A, Kandefer-Szerszeń M. The anticancer properties of statins. *Postepy Hig Med Dosw* 2008 Aug 7;62:393-404.
91. Smith RL, Trindade MC, Ikenoue T, et al. Effects of shear stress on articular chondrocyte metabolism. *Biorheology.* 2000;37(1-2):95-107.
92. Smith RL, Donlon BS, Gupta MK, et al. Effects of fluid-induced shear on articular chondrocyte morphology and metabolism in vitro. *J Orthop Res.* 1995;13(6):824-31.

93. Smith M M, Little C B, Rodgers K, Ghosh P. Animal models used to evaluate antiosteoarthritis drugs. *Pathol Biol*. 1997 Apr;45(4):313-20.
94. Sparrow CP, Burton CA, Hernandez M, Mundt S, Hassing H, Patel S, et al. Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering. *ArteriosclerThromb Vasc Biol*. 2001 Jan;21(1):115-21.
95. Staal A, Frith JC, French MH, Swartz J, Güngör T, Harrity TW, Tamasi J, Rogers MJ, Feyen JH. The ability of statins to inhibit bone resorption is directly related to their inhibitory effect on HMG-CoA reductase activity. *J Bone Miner Res*. 2003 Jan;18(1):88-96.
96. Tadashi Hayami, Maureen Pickarski, Ya Zhuo, Gregg A. Wesolowski, Gideon A. Rodan, Le T. Duong. Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. *Bone*. 2006; 38: 234–243.
97. Tashman S, Collon D, Anderson K, Kolowich P, Anderst W. Abnormal rotational knee motion during running after anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med*. 2004;32(4):975-83.
98. Tashman S, Anderst W, Kolowich P, Havstad S, Arnoczky S. Kinematics of the ACL-deficient canine knee during gait: serial changes over two years. *J Orthop Res*. 2004;22(5):931-41.
99. Thorstensson CA, Petersson IF, Jacobsson LT, Boegard TL, Roos EM. Reduced functional performance in the lower extremity predicted radiographic knee osteoarthritis five years later. *Ann Rheum Dis*. 2004;63:402–407.

100. Tortorella MD, Arner EC, Hills R, Gormley J, Fok K, Pegg L, Munie G, Malfait AM. ADAMTS-4 (aggrecanase-1): N-terminal activation mechanisms. *Arch Biochem Biophys*. 2005 Dec 1;444(1):34-44.
101. Vanwanseele B, Eckstein F, Knecht H, Spaepen A, Stussi E. Longitudinal analysis of cartilage atrophy in the knees of patients with spinal cord injury. *Arthritis Rheum*. 2003;48(12):3377-81.
102. Von Porat A, Roos EM, Roos H. High prevalence of osteoarthritis 14 years after an anterior cruciate ligament tear in male soccer players: a study of radiographic and patient-relevant outcomes. *Ann Rheum Dis*. 2004;63:269–273.
103. Westacott CI, Atkins RM, Dieppe PA, Elson CJ. Tumor necrosis factor- α receptor expression on chondrocytes isolated from human articular cartilage *J Rheumatol*. 1994 Sep;21(9):1710-5.
104. Wong M, Wuethrich P, Buschmann MD, Eggli P, Hunziker E. Chondrocyte biosynthesis correlates with local tissue strain in statically compressed adult articular cartilage. *J Orthop Res*. 1997;15(2):189-96.
105. Johanne Martel-Pelletier. Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 1998; 6: 374–376.
106. Janusz MJ, Bendele AM, Brown KK, Taiwo YO, Hsieh L, Heitmeyer SA. Induction of osteoarthritis in the rat by surgical tear of the meniscus: inhibition of joint damage by a matrix metalloproteinase inhibitor. *Osteoarthr Cartil*. 2002;10:785–91.

107. Undas A, Brummel KE, Musial J, Mann KG, Szezeklik A. Simvastatin depresses blood clotting by inhibiting activation of prothrombin. Factor 5, and factor 13 and enhancing factor 5a inactivation. *Circulation*. 2001;103:2885-2890.
108. Van Valburg AA, Wenting MJ, Beekman B, Te Koppele JM, Lafeber FP, Bijlsma JW. Degenerated human articular cartilage at autopsy represents preclinical osteoarthritic cartilage: comparison with clinically defined osteoarthritic cartilage. *J Rheumatol*. 1997 Feb;24(2):358-64.
109. Vanwanseele B, Eckstein F, Knecht H, Spaepen A, Stussi E. Longitudinal analysis of cartilage atrophy in the knees of patients with spinal cord injury. *Arthritis Rheum*. 2003;48(12):3377-81.
110. Vaughan CJ, Gotto AM, Basson CT. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35: 1-10.
111. Vilensky JA, O'Connor BL, Brandt KD, Dunn EA, Rogers PI, DeLong CA. Serial kinematic analysis of the unstable knee after transection of the anterior cruciate ligament: temporal and angular changes in a canine model of osteoarthritis. *J Orthop Res*. 1994;12(2):229-37.
112. Wagner AH, Kohler T, Ruckschloss U, Just I, Hecker M. Improvement of nitric oxide dependent vasodilatation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20:61-9.

113. Weber C, Erl W, Weber KSC, Weber PC. HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and CD11b dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30:1212-7.
114. Williams JM, Felton DL, Peterson RG, O'Connor BL. Effects of surgically induced instability on rat knee articular cartilage. *J. Anat.* 1982 Jan;134(Pt 1):103-9.
115. Wang PS, Solomon DH, Mogun H, Avorn J. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of hip fractures in elderly patients. *JAMA* 2000;283:3211-3216.
116. Zantor T, Peterson W, Fu FH. Anatomy of the Anterior Cruciate Ligament . *Operative techniques in Orthopaedics* . 2005;15(1):20-28.