



**T.C.**  
**ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SEPTİK ARTRİTE BAĞLI KIKIRDAK HASARINA**  
**ALFA-2 MAKROGLOBULİNİN ETKİSİ**

**Dr. Mehmet Fatih AYDEMİR**

**UZMANLIK TEZİ**

**BURSA – 2011**



**T.C.**  
**ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SEPTİK ARTRİTE BAĞLI KIKIRDAK HASARINA**  
**ALFA-2 MAKROGLOBULİNİN ETKİSİ**

**Dr. Mehmet Fatih AYDEMİR**

**UZMANLIK TEZİ**

**Danışman: Doç. Dr. Burak DEMİRAĞ**

**BURSA- 2011**

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Türkçe Özet	ii
İngilizce Özet	iv
Giriş	1
Gereç ve Yöntem	7
Bulgular	12
Tartışma ve Sonuçlar	19
Kaynaklar	33
Teşekkür	38
Özgeçmiş	39

## ÖZET

Septik artrit, özellikle çocuklar olmak üzere tüm yaş gruplarında görülmekte; teşhis ve tedavide gecikme olduğu zaman kıkırdak harabiyetine bağlı eklem hasarı, artroz ve kalıcı deformite sonucu mağduriyet oluşturmakta sosyal ve ekonomik kayıplara sebebiyet vermektedir. Uygun antibiyoterapi ve cerrahi debridmanlara rağmen septik artritte görülen kıkırdak harabiyeti ve buna bağlı sekellerin önüne geçilememektedir. Septik artritte kıkırdak hasarından sorumlu esas mekanizmanın bakteriyi temizlemek için aktive olan immün sistem hücrelerinden üretilen IL-1, TNF- $\alpha$  gibi pro-inflamatuar sitokinlerin aktive ettiği matriks metalloproteinazların (MMP) kıkırdak proteoglikan ve kollajenini parçalaması olduğu anlaşılmıştır.

Bizde hipotez olarak klasik septik artrit tedavisinin yanında endojen ve genel bir MMP inhibitörü olan alfa-2 makroglobulin ( $\alpha$ -2M) kullanarak septik eklemlerde MMP inhibisyonu sağlamayı ve bu sayede MMP'lerin patofizyolojide rolünü kanıtlamayı ve neden oldukları kıkırdak harabiyetini azaltabileceğimizi veya önleyebileceğimizi düşündük.

Bu amaçla tavşan dizlerinde stafilokokkus aureus kullanılarak deneysel septik artrit modeli oluşturuldu. Tavşan dizleri (1) enfekte kontrol, (2)  $\alpha$ -2M kontrol, (3) antibiyotik tedavi grubu, (4) antibiyotik+  $\alpha$ -2M tedavi grubu olarak gruplandırıldı. 7 gün sonra hayvanlar sakrifiye edildi. Gruplardan alınan kıkırdak örnekleri biyokimyasal ve histolojik olarak incelendi.

Biyokimyasal olarak kıkırdakların glikozaminoglikan miktarları ölçülerek gruplar arasında karşılaştırıldı. Antibiyotik+  $\alpha$ -2M tedavisi verilen dizlerde kıkırdak glikozaminoglikan kaybının diğer tüm tedavi gruplarına göre anlamlı ölçüde az olduğu tespit edildi ( $p < 0.0001$ ). Kıkırdak örneklerinde meydana gelen lezyonlar histolojik skorlama sistemi ile değerlendirildi. Antibiyotik+  $\alpha$ -2M tedavi grubunun puanları ile antibiyotik tedavisi verilen grubun puanları karşılaştırıldı. Antibiyotik +  $\alpha$ -2M grubunun puanlarının sadece antibiyotik tedavisi verilen gruba göre daha iyi olduğu ve kıkırdak hasarının anlamlı ölçüde az olduğu görüldü ( $p < 0.008$ ).

Sonuç olarak; klasik septik artrit tedavisine ek olarak kullanılan  $\alpha$ -2M'in genel MMP inhibitör etkisi ile septik artritte oluşacak kırıkdağ hasarı önlenmektedir. Bu durum septik artritte meydana gelen kırıkdağ hasarında MMP'lerin rolünü kanıtlamakta ve bunların bloke edilmesi ile kırıkdağ yapısının koruyabileceğini göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** Septik artrit, matriks metalloproteinaz, alfa-2 makroglobulin

## SUMMARY

### **The Effect of Alpha-2 Macroglobulin on the Cartilage Destruction due to Septic Arthritis**

Including particularly children patients, septic arthritis is seen on all age groups and as a result of late diagnosis and treatment, it leads to joint destruction due to cartilage damage, arthrosis and suffering from permanent deformity which causes to social and economical losses. Despite proper antibiotic treatment and surgical debridement, cartilage destruction and sequellae in parallel with it which are seen on septic arthritis cannot be prevented. It is understood that the essential mechanism which is responsible from cartilage destruction on septic arthritis is that breaking up of cartilage proteoglycan and collagen by the matrix metalloproteases (MMP) activated by proinflammatory cytokines like IL-1 and TNF- $\alpha$  which are produced by immune system cells activated in order to clean the bacteria from the joint.

So as hypothesis, we thought that, together with classical septic arthritis treatment, by utilizing alfa-2 macroglobulin ( $\alpha$ -2M) which is endogenic and general MMP inhibitor, to provide MMP inhibition on the septic joint thus proving the role of MMPs on pathophysiology and reducing or preventing cartilage destruction which they caused.

For that purpose, an experimental septic arthritis model has been formed by utilizing staphylococcus aureus on the rabbit knees. Rabbit knees are classified as (1) infected control, (2)  $\alpha$ -2M control, (3) antibiotic treatment and (4) antibiotic +  $\alpha$ -2M treatment groups. After 7 days animals are sacrificed. Cartilage samples taken from the groups are analyzed biochemically and histologically.

Biochemically glycosaminoglycan amount of the cartilage samples are measured and compared between the groups. Compared to all treatment groups, on the knees treated with antibiotic +  $\alpha$ -2M it is determined that loss

of cartilage glycosaminoglycan was significantly lower ( $p < 0.0001$ ). Lesions occurred on the cartilage samples are evaluated by utilizing histological scoring method. Scores of the antibiotic +  $\alpha$ -2M treatment group and antibiotic treatment group are compared. It is determined that, compared with the score of the group which is treated only with antibiotics, score of the antibiotic +  $\alpha$ -2M treatment group was better and that the cartilage damage was significantly lower ( $p < 0.008$ ).

In conclusion; cartilage damage which is to be occurred on the septic arthritis is prevented by utilizing  $\alpha$ -2M with its general MMP inhibitor effect, as an addition to the classical septic arthritis treatment. This situation proves the role of the MMPs on the cartilage damage occurring on septic arthritis and it demonstrates that by blocking them the cartilage structure can be protected.

**Key words:** Septic arthritis, matrix metalloproteases, alpha-2 macroglobulin

## GİRİŞ

Septik artrit, piyojenik bakteriler başta olmak üzere, çeşitli mikroorganizmaların çoğunlukla bakteriyemi sonucunda meydana getirdikleri eklem enfeksiyonudur (1, 2).

Teşhis ve tedavisinde gecikme olduğu zaman kıkırdak harabiyetine bağlı eklem hasarı, hareket kısıtlılığı, artroz ve kalıcı deformite sonucu mağduriyet oluşturmakta sosyal ve ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. En iyi şartlar altında dahi morbidite oranının yaklaşık %11 olduğu ve bu oranın poliartiküler durumlarda %50'ye kadar yükseldiği bildirilmiştir (3).

Septik artrite tüm yaş gruplarında rastlanılmakla beraber en sık küçük çocuklarda ve ileri yaşlarda görülmektedir (4). Çocuklarda görülen septik artrit vakalarının %70'ine 1 ay ile 5 yaş aralığında rastlanılmaktadır. Bunlarında yarısından fazlasını 2 yaşından küçük çocuklar oluşturmaktadır (1, 2, 5). Hastaların %94'ünde tek eklem tutulumu görülmesine rağmen poliartiküler durumlar septik artrit tanısını ekarte ettirmemelidir (2). Çocuklarda en sık kalça eklemi etkilenirken bunu diz, ayak bileği, dirsek eklemleri takip eder. Erişkinlerde en sık etkilenen eklem ise dizdir (1, 2, 4-6). Erkek cinsiyet, prematürite, düşük doğum ağırlığı, orak hücreli anemi, respiratuvar distres sendrom gibi nedenler çocuklarda risk faktörleri arasında sayılırken, erişkinlerde romatoid artrit, eklem protezleri, intravenöz ilaç bağımlılığı, alkol, diyabet, immün supresif hastalıklar septik artrit riskini arttıran nedenlerdir (4-6).

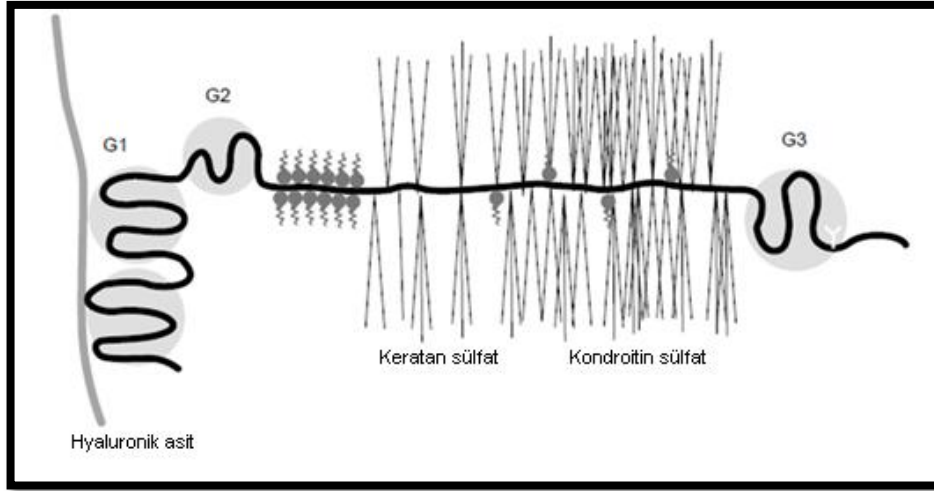
Tüm yaş grupları ve risk faktörleri içerisinde en sık karşılaşılan patojen stafilokokkus aureustur (s. aureus) bunu streptokoklar gibi diğer gram pozitif bakteriler takip eder (1, 4-8). Bu iki patojen organizma vakaların %91'inden sorumludur (3). Hemafilus influenza kaynaklı vakalara geçmişte sık rastlanırken, aşı immünizasyonu sonucu günümüzde önemli ölçüde azalma sağlanmıştır (9). Orak hücre anemisi olan hastalarda salmonella ve genç erişkinlerde neisseria gonore septik artrit nedeni olarak karşılaşılabilen diğer patojenlerdir (1, 4, 5, 8).



Tanıda ideal olan sinovyal sıvıda bakterinin gösterilmesidir. Fakat sinovyal sıvıda bakteri düşük oranda (%30) gösterilebildiğinden tanı büyük çoğunlukla klinik, fizik muayene ve laboratuvar bulgularının sonuçlarına göre konulmaktadır (5). Caird ve ark.'nın (10) yaptıkları çalışmada çocuklarda septik artrit tanısını düşündürecek en önemli bulgunun ateş (>38,5°C oral) olduğu ve bunu C-reaktif protein seviyesindeki yükselme (>2mg/dl), eritrosit sedimentasyon hızındaki artış (>40mm/saat) ve lökositozun (12000/mm<sup>3</sup>) takip ettiğini belirtmişlerdir. Aspirasyon sıvısında gram pozitif bakteri tespit edilmesi, hücre sayısının >50000/mm<sup>3</sup> ve polimorfonükleer lökosit hakimiyetinde olması, yüksek protein ve düşük glukoz içeriği (<%33 serum glukozu) septik artrit için karakteristiktir (2). Aspirasyon materyalinden yapılan kültürler tanıyı doğrulamakta önemli olmakla birlikte %18-48 arasında kültür negatif septik artrit vakaları literatürde bildirilmiştir (11, 12).

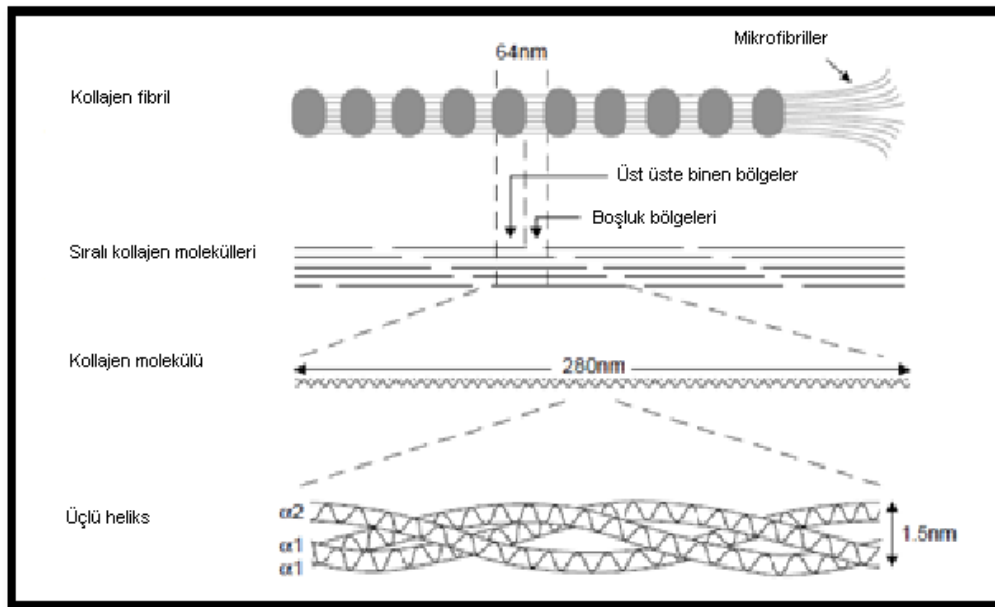
Günümüzde septik artrit tedavisi parenteral antibiyotik tedavisi ve septik eklem artroskopik veya artrotomi ile yapılan debridman ve irrigasyonundan oluşmaktadır (5-8, 13). Uygun antibiyoterapi ve zamanında yapılan cerrahi debridmanlara rağmen septik artritte görülen kıkırdak hasarı ve buna bağlı sekellerin önüne geçilememektedir. Bu durum tedavinin gecikmesine bağlı olacağı gibi tedaviye rağmen oluşabilmektedir (14, 15). Bu nedenle septik artritte kıkırdak hasarının oluşum mekanizmasını aydınlatılabilmek ve bunu önleyebilecek yeni tedavi yöntemleri geliştirebilmek için günümüzde birçok araştırma yapılmaktadır.

Eklem kıkırdağı hiyalin kıkırdak özelliğindedir ve temel olarak kondrositler ile hücre dışı matriksten (HDM) meydana gelir. HDM %60-85 su, %15-20 kollajen, %4-7 proteoglikan ve diğer matriks proteinlerini ihtiva eder (16). Proteoglikanlar agrekan, dekorin, biglikan, fibromodulin ve luminikan olmak üzere 5 çeşittir. Bunlar arasında kıkırdakta en çok bulunan ve yapısal olarak en büyük olanı agrekandır (17, 18). Agrekan 3 adet globüler protein ile keratan sülfat ve heparan sülfat gibi glikozaminoglikanların (GAG) birleşiminden meydana gelir (17-19) (Şekil-1). Proteoglikanlar, GAG'ların su çekme özellikleri sayesinde kıkırdağı kompresif güçlere karşı korumaktadırlar (17, 18, 20).



**Şekil-1:** Agreganın yapısı (19).

Eklem kıkırdağının kuru ağırlığının 2/3'ünü oluşturan kollajen fibrillerinin %80-85'i tip II kollajendir. Geri kalanı tip IX, X ve tip XI kollajenden meydana gelir (21, 22). Kollajen fibrilleri, üç adet  $\alpha$  polipeptit zincirinin sarmal yaparak oluşturduğu "üçlü heliks" yapılarının düzgün olarak sıralanması ile meydana gelir (Şekil-2). Kollajen fibrilleri bu yapısal özellikleri sayesinde güçlü gerilim kuvvetlerine karşı kıkırdağı koruyabilen bir yapı iskeleti oluştururlar (19, 21, 22).



**Şekil-2:** Kollajen fibril yapısı (19).

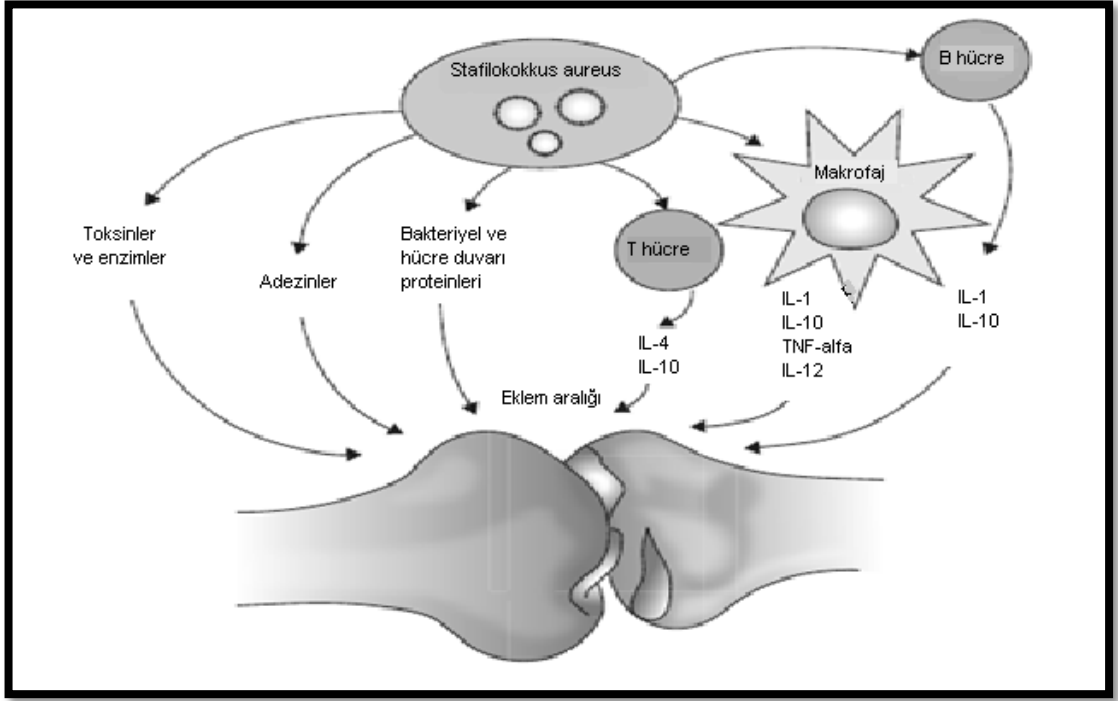
Septik artritte görülen kıkırdak hasarının mekanizması halen üzerinde çalışılan bir konu olmakla birlikte HDM' de bulunan proteoglikanın hızlı yıkımı ile başlamakta bunu kollajen kaybı izlemekte ve sonuçta morfolojik değişiklikler meydana gelmektedir (13, 14, 19). Smith ve ark.'nın (13) tavşan dizlerinde s.aureus kullanarak oluşturdukları deneysel septik artrit modelinde kıkırdaktan GAG kaybının enfeksiyon başlangıcından 8 saat sonra başladığını göstermişlerdir. Bu kaybın 48 saat sonunda %30'a; 5. günde %50'ye ulaştığını belirtmişlerdir. Kollajen kaybının ise 10. günden sonra tespit edilebildiğini, enfeksiyondan 3 hafta sonra %38 kollajen kaybı olduğunu rapor etmişlerdir.

Eklem aralığında çoğalan bakterilerin salgıladığı toksinler, enzimler ve diğer bakteri virulans faktörleri kıkırdak hasarının oluşumun mekanizması üzerinde durulan ilk konular olmuştur (13, 23). Schurman ve ark. (24) oluşturdukları deneysel septik artrit modelinde, eklemden bakteri temizlenip kültür negatif hale getirildikten sonrada kıkırdak harabiyetinin progresif olarak devam etmekte olduğunu göstermişlerdir. Bu durum septik artrit sırasında görülen kıkırdak hasarlanmasının bakteri dışı mekanizmalardan da kaynaklanabileceğini düşündürmüştür.

Enfeksiyonun başlangıcında bakterinin ürettiği kollajenazlar ve diğer proteolitik enzimler kıkırdak harabiyetinin başlamasında önemli olmakla birlikte yapılan deneysel çalışmalar göstermiştir ki özellikle s.aureus gibi virulansı yüksek bakterileri yok etmek için aktive olan konak immün sistemi de bu hasarlanmada önemli paya sahiptir (25).

Bakterinin eklem ulaşması ile patojen mikroorganizmaya karşı konağın immün sistemi harekete geçmekte sinoviyal hücrelerden, kondrositlerden ve makrofajlardan tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ) ve interlökin-1 (IL-1) başta olmak üzere IL-6, IL-10, interferon-alfa (IFN- $\alpha$ ), interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) gibi sitokinler salgılanmaktadır (4, 15, 23, 26). Bu sitokinler kapiller endotelial geçirgenliği artırıp dolaşımdaki lökositlerin eklem migrasyonunu sağlamakta aynı zamanda kondroblastlardan, sinovyal hücrelerden ve lökositlerden kollajenaz, jelatinaz, agrekanaz, elastaz,

stromelizin gibi kıkırdak proteoglikan ve kollajenini parçalayan matriks metalloproteinazların (MMP) üretilmesini uyarmaktadır. Yapılan çalışmalarda TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 gibi stokinlerin MMP üretimi için güçlü bir indükleyici olduğu gösterilmiştir (15, 19, 23, 27-30). Üretilen bu enzimler eklem sterilizasyonunda rol oynamakla birlikte, beraberinde bu enzimlere bağlı kıkırdak hasarı kaçınılmazdır (27, 31-33).



**Şekil-3:** Stafilokokkus aureus septik artrit patogenezi (4).

Osteoartrit ve romatoid artrit gibi aseptik artritlerde MMP'lerin HDM elemanlarını parçalayarak kıkırdak hasarı meydana getirdikleri literatürde yapılan araştırmalar ile kanıtlanmıştır (19, 29). Bu proteolitik enzimlerin kıkırdak yıkıcı etkisini önleyebilmek için son yıllarda bu enzimleri inhibe edecek tedavi ajanları üzerinde çalışılmaktadır. Geliştirilmeye çalışılan farmakolojik ajanların yanında endojen MMP inhibitörleri olan doku metalloproteinaz inhibitörleri (TIMP),  $\alpha$ -1 antitripsin ve  $\alpha$ -2 makroglobulin ( $\alpha$ -2M) gibi moleküllerin kıkırdak yıkımını önleme üzerindeki etkileri son yıllardaki araştırma konusudur (16, 30, 34).

$\alpha$ -2M plazmada bulunan genel MMP inhibitörü olup, büyük çoğunluğu karaciğerde daha az oranda makrofaj ve fibroblastlarda sentez edilen bir glikoproteindir (16, 26, 34, 35). Yüksek moleküler ağırlığından (725 kDa) dolayı dokular arası difüzyon kapasitesi sınırlı olup normal şartlarda eklem aralığında eser miktarda bulunur (36, 37). İnflamasyon durumunda serum konsantrasyonu yükselmekte, artan kapiller endotelial geçirgenlik sayesinde sinovyal geçişi artmaktadır (36). Sinovyal sıvıya geçen  $\alpha$ -2M, MMP'leri "tuzak bölgesi" olarak adlandırılan kısımlarında kovalent bağlarla hapsederek bu enzimleri geri dönüşümsüz olarak etkisiz hale getirmektedir (26, 34, 35).

$\alpha$ -2M'in MMP inhibitör etkisi tedavi ajanı olarak çeşitli deneysel çalışmalarda kullanılmışsa da septik artritte kıkırdak hasarını önleyici etkisini araştırmak için literatürde herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bizde hipotez olarak endojen ve genel bir MMP inhibitörü olan  $\alpha$ -2M'i kullanarak septik eklemde MMP inhibisyonu sağlamayı ve bu sayede MMP'lerin etyolojide bir rolü olup olmadığını kanıtlamayı, eğer varsa bu sayede neden oldukları kıkırdak hasarını azaltabileceğimizi veya önleyebileceğimizi düşündük.

Bu hipotezden yola çıkarak deneysel septik artrit hayvan modelinde MMP'lerin septik artrit patofizyolojisindeki rollerini araştırmak ve klasik septik artrit tedavisinin yanında  $\alpha$ -2M'i kullanımının kıkırdak hasarını önleyip önleyemediğini araştırmayı amaçladık.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 15.12.2009 tarih ve 2009-11/11 karar numarası ile alınan izin sonrası Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı tarafından Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

### Çalışma Planı

Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi'nden 3 - 4 aylık, ağırlıkları 2500 - 3000 gr arasında, dişi 20 adet erişkin Yeni Zelanda tavşanı temin edildi. Hayvanlar 5 ve 15 tavşandan oluşan iki kümeye ayrıldı. Tavşanların dizleri uygulanacak tedavilere göre aşağıdaki gibi gruplandırıldı.

1. **Grup 1 (G1):** Enfekte kontrol grubu; ilk 5 tavşanın sağ dizleri
2. **Grup 2 (G2):**  $\alpha$ -2M kontrol grubu; ilk 5 tavşanın sol dizleri
3. **Grup 3 (G3):** Antibiyotik tedavi grubu; son 15 tavşanın sağ dizleri
4. **Grup 4(G4):** Antibiyotik+ $\alpha$ -2M tedavi grubu; son 15 tavşanın sol dizleri

### Septik Artrit Oluşturulması

Tüm hayvanlara kas içi 60 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar®; Pfizer, USA) uygulanarak anestezi sağlandı. Tavşanların her iki dizi tıraş edilerek %10 povidin iyod solüsyonu ile temizlendi. Deney öncesi Uludağ Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın bakteriyoloji laboratuvarında çoğaltılan seftriaksona hassas s.aureus suşundan yapılan pasajlarla  $10^4$  adet/ml bakteri bulunan süspansiyonlar elde edildi. S.aureus ile yapılan deneysel çalışmalarda septik artrit oluşturmak için kullanılan bakteri dozu

$10^3 - 10^5$  bakteri/ml dir (13-15, 24, 38). Bizde çalışmamızda  $10^4$  bakteri dozunu kullandık. Tüm tavşanların her iki dizine hazırlanan bu bakteri süspansiyonundan 1 ml enjekte edildi. Enjeksiyon sonrası tavşanlar standart yem ile beslenerek kafes aktivitesine bırakıldı.

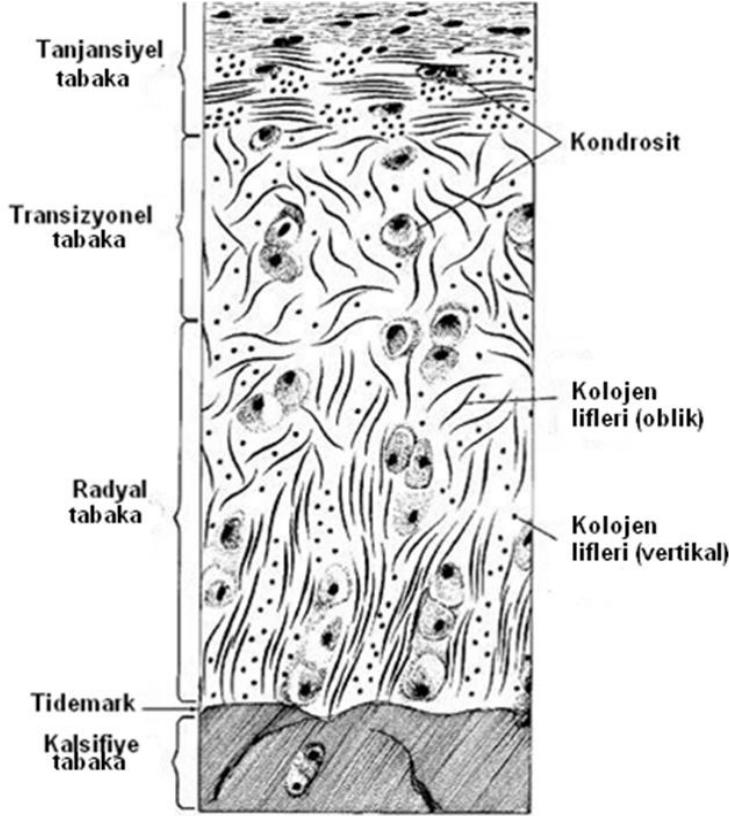
### **Uygulanan Tedaviler**

Enfeksiyonun başlamasından 16 saat sonra diz gruplarının her birine farklı tedaviler uygulandı. G1' e herhangi bir tedavi verilmedi enfekte kontrol grup olarak bırakıldı. G2' ye eklem içi 1mg/ml insan kaynaklı  $\alpha$ -2M (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) (10000 inhibitör ünite/mg) enjekte edildi. G3'e kas içi 40mg/kg seftriakson (İsef, i.m 1 gr flakon, İ.E Ulugay) uygulandı. G4'e kas içi 40mg/kg seftriakson tedavisine ek olarak eklem içi 1mg/ml  $\alpha$ -2M enjekte edildi. Antibiyotik tedavisine başlama zamanına Smith ve ark.'nın (14) tavşanlar üzerinde yaptıkları deneysel septik artrit çalışmaları temel alınarak karar verilmiştir. Antibiyotik tedavisine 7 gün süre ile devam edildi. Eklem içi  $\alpha$ -2M enjeksiyonu 1. ve 2. günler yapıldı.  $\alpha$ -2M tedavi süresi ve dozu Demirağ ve ark.'nın (36, 37) tavşanlarda eklem içi  $\alpha$ -2M uygulamasının ön çapraz bağ iyileşmesi üzerine yaptıkları deneysel çalışmalar baz alınarak uygulanmıştır. Deney hayvanları 7. gün sonunda dekapitasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Artrotomi yapılarak tüm tavşanların diz eklemleri, femur ve tibia eklem yüzeylerini içerecek şekilde çıkartıldı.

### **Histopatolojik Değerlendirme**

Antibiyotik tedavisine eklenen eklem içi  $\alpha$ -2M tedavisinin etkisini araştırmak için G3 ve G4'den alınan 5' er diz histolojik olarak incelendi. Dizlerin femur ve tibia eklem yüzleri çevre yumuşak dokulardan diseke edildikten sonra histopatolojik inceleme için %10'luk formaldehit solüsyonunda üç gün süreyle bekletilerek dokuların fiksasyonu sağlandı. Takiben %10'luk formik asit solüsyonu içinde onbeş gün bekletilerek dekalsifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Örnekler dehidrasyonu takiben parafin

bloklara gömüldü. Rutin takip işlemleri sonrası 4 µm lik kesitler alınarak hematoxilen-eosin ve safranin-O ile boyanıp incelendiler. Kıkırdak dokudaki histolojik ve histokimyasal değişikliklerin değerlendirilmesi için kıkırdak dokusunun 4 tabakasına bakıldı (Şekil-4).



**Şekil-4:** Eklem kıkırdağının histolojik katmanları (39). Yüzeysel (tanjansiyel) tabakada, yassı kondrositler ve eklem yüzeyine paralel yerleşim gösteren kolajen lifleri bulunur. Orta (transizyonel) tabakada, kondrositler daha büyük ve yuvarlak, kolajen lifleri ise rastgele organize olmuşlardır. Derin (radyal) tabakada ise kondrositler geniş, vertikal yerleşimli ve kolajen lifleri ise radyal uzanımlı olarak bulunurlar. En alt tabaka olan kalsifiye tabakada kondrositler mineralize matriks içine gömülmüş ve non-kalsifiye kıkırdaktan tidemark yapısı ile ayrılmıştır.

Eklem kıkırdak dokusu, Mankin ve ark.'nın (38) tanımladığı, Yoshimi ve ark. (40) tarafından modifiye edilen eklem kıkırdak lezyonlarının histolojik ve histokimyasal evreleme sistemi kullanılarak; kıkırdak doku tabakalarındaki histolojik yapısal değişiklikler, hücresel değişiklikler, safranin-O tutulumu, tidemark yapısının bütünlüğü ve pannus oluşumu değerlendirildi ve grupların puanları hesaplandı (Tablo-1).



## **Biyokimyasal Değerlendirme**

Septik artrit oluşturulan tavşan dizlerinde  $\alpha$ -2M tedavisi ile kıkırdak proteoglikan kaybının daha az olup olmadığını tespit edebilmek için biyokimyasal GAG tayini gerçekleştirildi. G1 ve G2' deki 5'er diz ile G3 ve G4' den histopatolojik inceleme için ayrılan dizlerden sonra kalan 10'ar dizin femur pateller oluk ve tibia eklem yüzündeki kıkırdaklar subkondral kemikten sıyrılarak çıkarıldı ve değerlendirme yapılana kadar  $-80^{\circ}\text{C}$  sıvı nitrojende saklandı. Kıkırdak örneklerinin GAG miktarları Richard ve ark.'nın (41) çalışmalarında tarif ettiği şekilde papain-fosfat yağında eritilip dimetilen mavisi ile boyanarak spektrofotometre yardımı ile tayin edildi. Bunun için kıkırdak örnekleri; 300  $\mu\text{g/ml}$  papain (Sigma, St. Louis, Missouri) ile 2 mM N-asetil sistein (Sigma), 2 mM EDTA (Sigma) içeren 50 mM fosfat yağı (pH 6.5) içerisinde  $65^{\circ}\text{C}$  de 1 saat enzimatik reaksiyona tabi tutularak kıkırdak solusyonları haline getirildi. Solüsyonların GAG miktarlarını spektrofotometre ile ölçebilmek için 16 mg 1,9 dimetilen mavisi (DMM) (Sigma) 5 ml etanol, 2 g sodyum format, 2 ml formik asit ile karıştırılıp distile su ile hacmi 1 litreye tamamlanarak bir DMM solusyonu hazırlandı. Her kıkırdak solusyondan standart hacimler (250  $\mu\text{l}$ ) 5 ml'lik tüplerde 2.5 ml DMM ile karıştırılıp spektrofotometrede 535 nm ( $A_{535}$ ) dalga boyunda incelendi. Örneklerin GAG içerikleri kantitatif olarak tayin edildi. Ölçülen GAG miktarları kıkırdak yağ ağırlığına oranlanarak gruplar arasında karşılaştırma yapıldı.

## **İstatiksel Değerlendirme**

Elde edilen histolojik puanlar ve biyokimyasal GAG değerleri Mann – Whitney U testi kullanılarak istatiksel olarak karşılaştırıldı. Karşılaştırılan tedavi grupları arasında  $p < 0.05$  değeri istatiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.

**Tablo-1:** Modifiye Mankin sistemine göre eklem kıkırdak lezyonlarının histolojik ve histokimyasal evrelemesi (40).

<b>I.Yapı</b>		
	Normal	0
	Hafif yüzey düzensizliği	1
	Orta derece yüzey düzensizliği	2
	Ciddi yüzey düzensizliği	3
	Transizyonel tabakada yarık	4
	Radyal tabakada yarık	5
	Kalsifiye tabakada yarık	6
	Transizyonel tabaka kaybı	7
	Radyal tabaka kaybı	8
	Kalsifiye tabaka kaybı	9
	Tam dezorganizasyon	10
<b>II. Hücre</b>		
1.Tanjansiyel tabaka		
	Normal	0
	Şişme	1
	Hücre kaybı	2
2.Transizyonel ve radyal tabaka		
	Normal	0
	Hafif hiperselülerite	1
	Orta derece hiperselülerite	2
	Ciddi hiperselülerite	3
	Hafif klonlaşma	4
	Orta derece klonlaşma	5
	Ciddi klonlaşma	6
	Hafif hiposelülerite	7
	Orta derece hiposelülerite	8
	Ciddi hiposelülerite	9
	Hücre kaybı	10
<b>III. Safranin-O tutulumu</b>		
	Normal	0
	Hafif azalma	1
	Orta derece azalma	2
	Ciddi derecede azalma	3
	Hiç tutulum yok	4
<b>IV. Tidemark</b>		
	İntakt	0
	Çok seviyeli	1
	Belirsiz	2
	Damarlanma	3
<b>V.Pannus oluşumu</b>		
	Yok	0
	Hafif	1
	Orta derece	2
	Belirgin	3

## BULGULAR

### Histopatolojik Sonuçlar

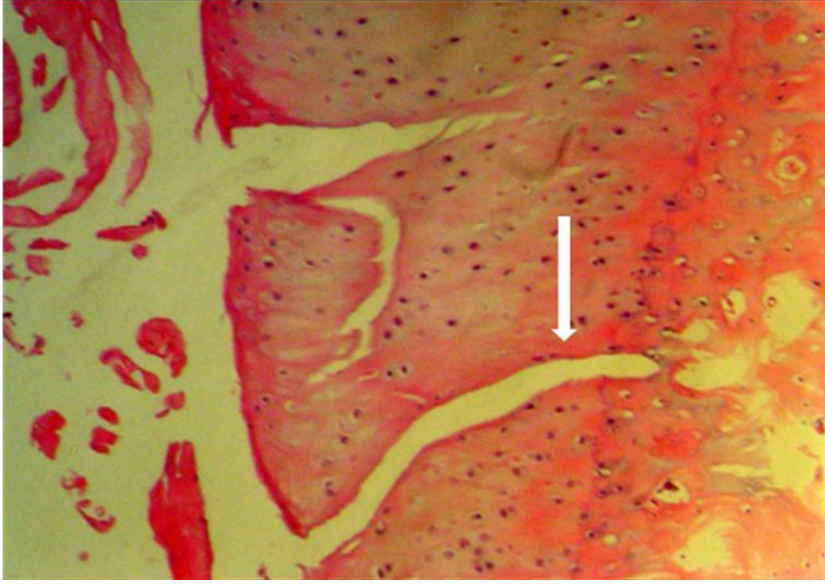
Antibiyotik tedavisine eklenen eklem içi  $\alpha$ -2M tedavisinin etkisini araştırmak için G3 ve G4'den alınan 5'er dizin femur kondil ve tibia eklem yüzündeki kıkırdak lezyonları modifiye Mankin (40) skora sistemi kullanılarak değerlendirildi. Bu skora sistemine göre gruplardaki dizlerin kıkırdak yapıları, hücresel yapıları, proteoglikan kaybını gösteren safranin-O tutulumları, tidemark yapıları ve pannus oluşturmaları değerlendirilip elde ettikleri puanlar gruplar arasında karşılaştırıldı. Bu skora sistemine göre kıkırdak dokusundaki yapısal ve hücresel lezyonlar arttıkça alınan puanda artmaktadır. Yapılan histolojik değerlendirme sonucu antibiyotik tedavisine eklem içi  $\alpha$ -2M tedavisi eklenen grup 4 dizlerde sadece antibiyotik tedavisi verilen grup 3 dizlere göre meydana gelen kıkırdak hasarının yapısal ve hücresel düzeyde belirgin şekilde daha az olduğu görüldü. Grup 3 dizlerin modifiye Mankin skora sisteminden aldıkları puanlar sırası ile 19, 21, 22, 24 ve 29 iken grup 4 dizlerin aldıkları puanlar 4, 5, 7, 9 ve 11 olarak hesaplandı. Her iki grubun aldıkları puanlar Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldığında puanlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.008$ ) (Tablo-2).

**Tablo-2:** Gruplarının modifiye Mankin skora sistemine göre aldıkları puanlar ve istatistiksel karşılaştırması

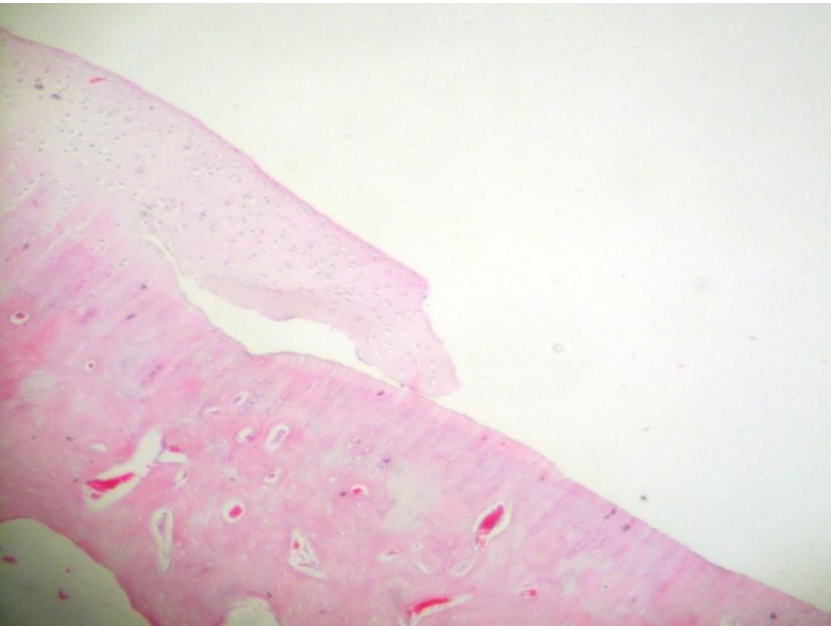
Grup 3 dizler		Grup 4 dizler		p değeri
Ortanca değeri	Min - Max değeri	Ortanca değeri	Min - Max değeri	
22	19 - 29	7	4 - 11	< 0.008

Kıkırdak dokusunun yapısında meydana gelen değişiklikler değerlendirildiğinde grup 3 dizlerde %20 normal kıkırdak yapısı, %20 hafif

yüzey düzensizliği, %10 ciddi yüzey düzensizliği, %40 transizyonel ve radyal tabakada yarık, %10 radyal tabakada kayıp saptanırken; grup 4 dizlerde ise %20 normal kıkırdak yapısı, %70 hafif yüzey düzensizliği, %10 orta yüzey düzensizliği gözlenmiş olup hiçbir tabakada yarık veya tabaka kaybı gibi ciddi lezyonlar görülmemiştir.

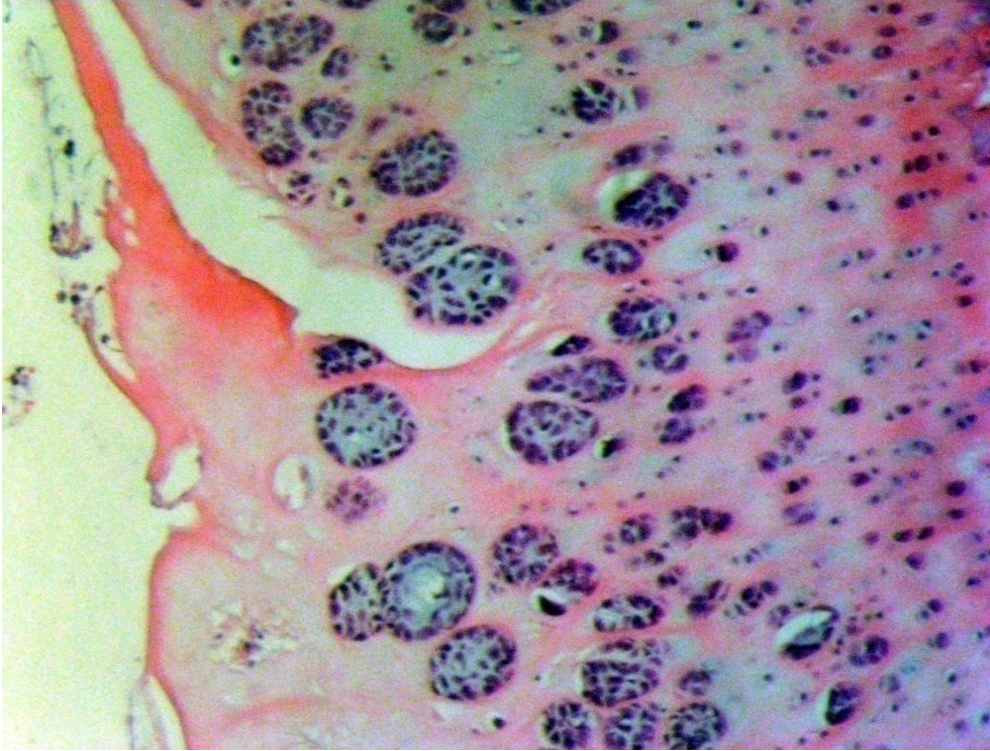


**Şekil-5:** Radyal bölgeye kadar uzanan yarık görülmektedir Beyaz ok işareti yarığı göstermektedir (Grup 3) (HE, X200).

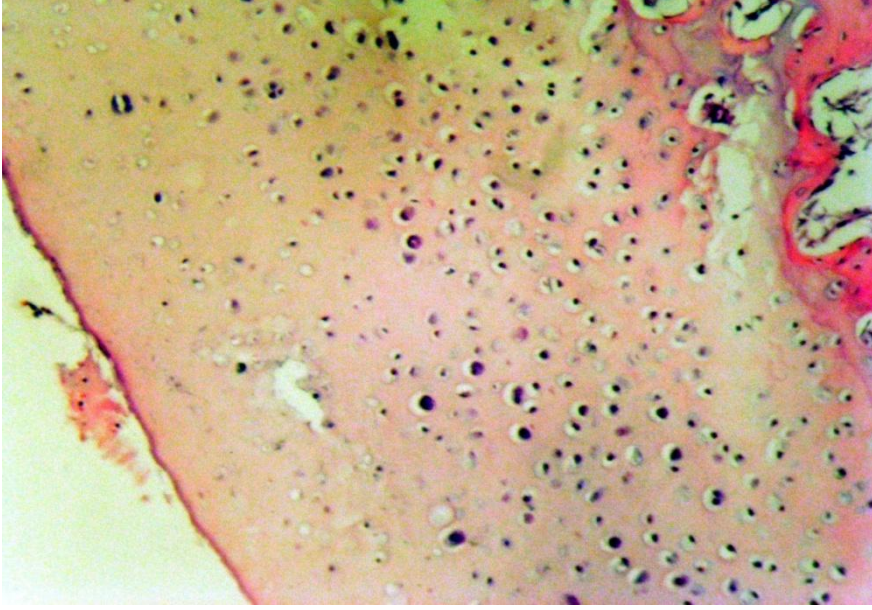


**Şekil-6:** Eklem kıkırdağında radyal tabaka kaybı (Grup 3) (HEX100).

Hücresel düzeyde meydana gelen değişiklikler incelendiğinde grup 3 dizlerde tanjansiyel tabakada %60 hücre kaybı, %40 hücresel şişme transizyonel ve radyal tabakada %60 orta-ciddi hiperselülerite, %10 ciddi klonlaşma, %20 orta hiposelülerite, %10 hücre kaybı tespit edilmiştir. Grup 4 dizlerde ise tanjansiyel tabakada %70 hücresel şişme, %30 normal hücre transizyonel ve radyal tabakada %90 hafif-orta hiperselülerite, %10 normal hücreler tespit edilirken hiçbir tabakada hücre kaybı, klonlaşma ya da hiposelülerite gözlenmemiştir.

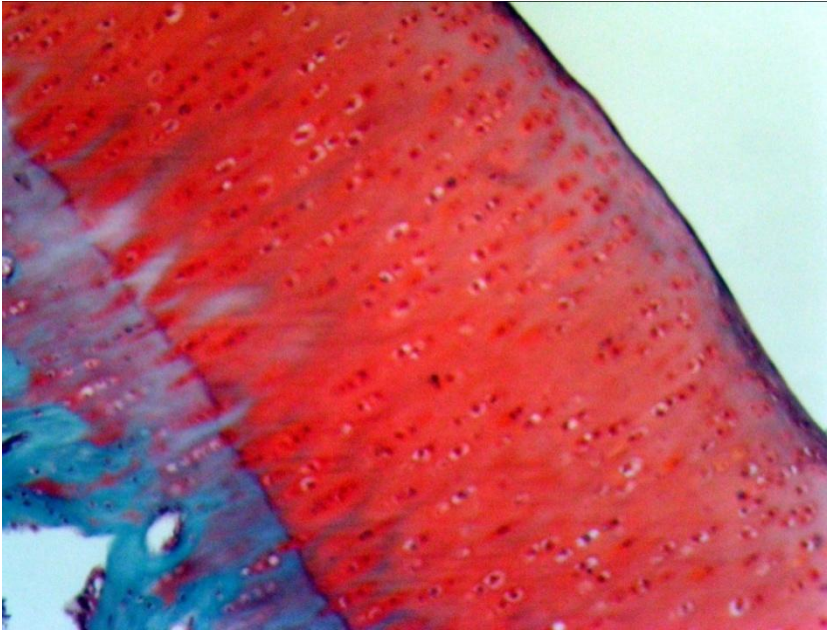


**Şekil-7:** Transizyonel ve radyal tabakada kondrositlerde ciddi klonlaşma görülmektedir (Grup 3) (HE, X200).

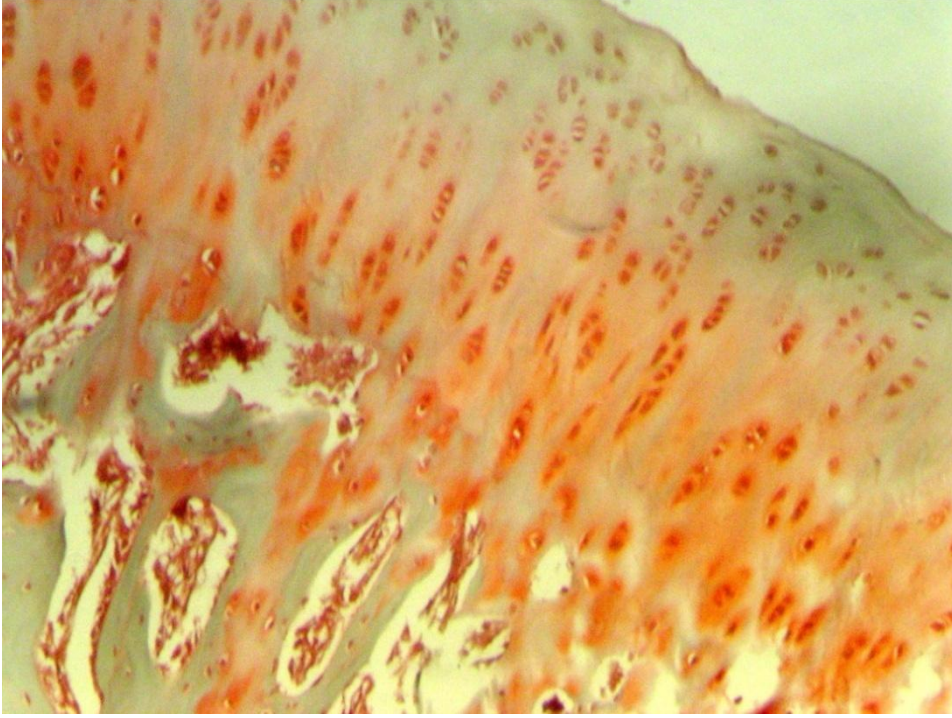


**Şekil-8:** Transizyonel ve radyal tabakada kondrositlerde orta derecede hiposelülarite görülmektedir (Grup 3) (HE, X200).

Kıkırdakların proteoglikan içeriği histokimyasal olarak safranin-O tutulumu ile değerlendirildi. Buna göre grup 3 dizlerde safranin-O tutulumunda %70 orta-ciddi derecede azalma, %30 hafif azalma; grup 4 dizlerde ise sadece %50 hafif azalma, diğer yarısında ise safranin-O tutulumu normal olarak değerlendirildi.



**Şekil-9:** Normal eklem kıkırdağında safranin-O tutulumu (Grup 4) (Safranin-O, X200).



**Şekil-10:** Safranin-O tutulumunda ciddi kayıp görülmektedir (Grup 3) (Safranin-O, X200).

Tidemark yapılarına bakıldığında grup 3 dizlerde %40 belirsiz ve çok seviyeli düzensizlik, %60 intakt yapı saptanırken. Grup 4 dizlerde ise %30 çok seviyeli düzensizlik, %70'inde tidemark yapısının intakt olduğu ve hiçbirinde belirsiz yapı oluşmadığı saptanmıştır.

Grup 3 ve grup 4 dizlerin hiç birinde pannus oluşumu meydana gelmemiştir.

### **Biyokimyasal Sonuçlar**

Tüm gruplardan elde edilen kıkırdak örnekleri papain-fosfat yağında enzimatik olarak eritildikten sonra DMM ile boyanarak GAG içerikleri Richards ve ark.'nın (41) tarif ettiği spektrofotometre yöntemi ile ölçüldü. Elde edilen bu GAG ( $\mu\text{g}$ ) değerleri, kıkırdak ıslak ağırlığına (mg) oranlanarak gruplar arasında istatistiksel karşılaştırma yapıldı.

Proteoglikan içeriği antibiyotik tedavisine ek olarak eklem içi  $\alpha$ -2M tedavisi yapılan grup 4 dizlerde diğer tüm gruplara göre daha yüksek tespit edildi. GAG/kıkırdak ıslak ağırlığı ortanca değerleri grup 4 dizlerde

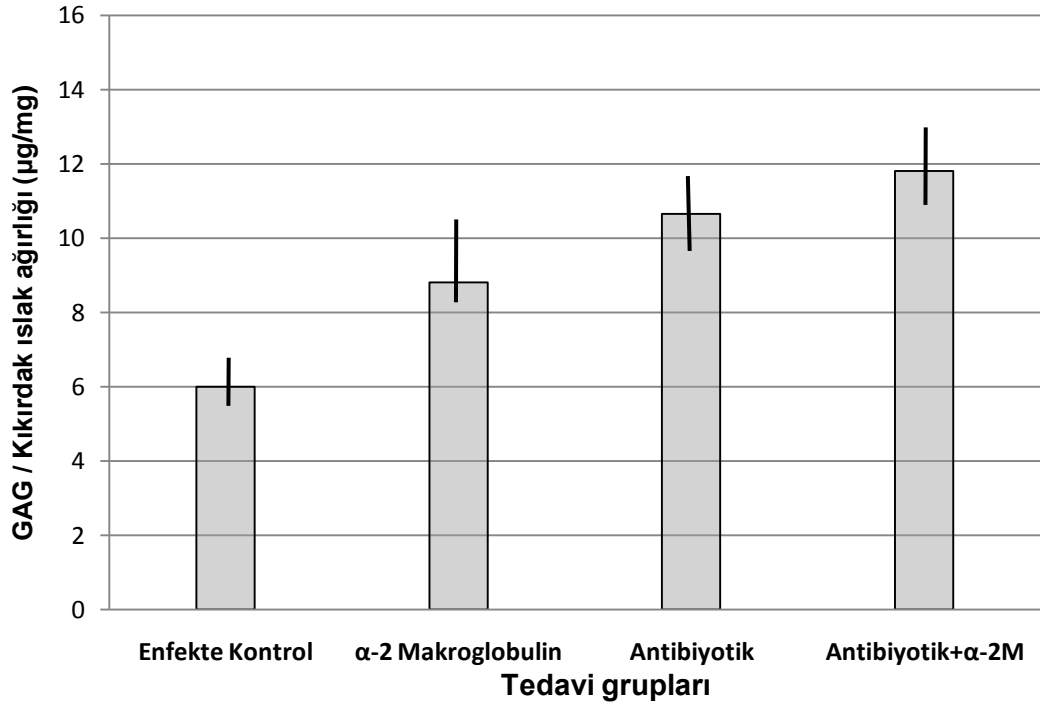
(11,81 µg/mg), grup 3 dizlerde (10,645 µg/mg), grup 2 dizlerde (8,8 µg/mg) ve grup 1 dizlerde ise (6 µg / mg) olarak ölçüldü (Tablo–3). Değerler Man-Whitney U testi ile karşılaştırıldığında Grup 4 dizlerin GAG miktarları diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p<0.0001$ ). Tedavi grupları enfekte kontrol grubu dizler ile karşılaştırıldığında; sadece eklem içi  $\alpha$ -2M tedavisi ile %46, sadece antibiyotik tedavisi ile %77 oranında GAG kaybının önlendiği; antibiyotik tedavisine eklem içi  $\alpha$ -2M eklenmesi ile bu oranın %96' ya çıkarıldığı saptanmıştır. Buna göre tek başına  $\alpha$ -2M tedavisi septik artrit kıkırdak hasarını önlemede yeterli olmazken antibiyotik tedavisi ile beraber kullanıldığında sadece antibiyotik tedavisine göre GAG kaybını önlemede %19' luk bir artış meydana getirdiği saptanmıştır.

Bu sonuçlar bize antibiyotik tedavisine eklem içi  $\alpha$ -2M enjeksiyonu eklenmesi ile septik artritte kıkırdak GAG kaybının önlenebileceğini veya en az düzeye indirilebileceğini kanıtlamıştır.

**Tablo–3:** Tedavi gruplarına göre ölçülen kıkırdak GAG miktarları.

Gruplar	Kıkırdak ıslak ağırlığı (mg)		GAG (µg)		GAG / Islak ağırlık (µg / mg)	
	Ortanca değeri	Min - Max değer	Ortanca değeri	Min - Max değer	Ortanca değeri	Min - Max değer
<b>Enfekte kontrol</b> (n=5)	55	47 - 56	308	300 - 340	6	5,36 - 6,38
<b>Alfa - 2 Makroglobulin</b> (n=5)	55	48 - 58	493	484 - 500	8,8	8,55 - 10,42
<b>Antibiyotik</b> (n=10)	55,5	51 - 58	587	527 - 607	10,645	9,41 - 11,65
<b>Antibiyotik + Alfa-2 Makroglobulin</b> (n=10)	51	50 - 54	594,5	576 - 631	11,81	11,26-12,13





**Şekil-11:** Tedavi gruplarının GAG/kıkırdak ıslak ağırlığı oranlarının karşılaştırması.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, klasik septik artrit tedavisine ek olarak kullanılan  $\alpha$ -2M'in genel MMP inhibitör etkisi ile tedavi süresince oluşacak kırık hasarı önlenmektedir. Bu durum septik artritte meydana gelen kırık hasarında MMP'lerin rolünü kanıtlar ve bunların bloke edilmesi ile tedavide kırık yapısının koruyabileceği sonucunu doğurur. Tek başına antibiyotik tedavisi kırık proteoglikan kaybını ve bunun sonucunda meydana gelen kırık hasarını önlemekte yetersiz kalmaktadır. Çalışmamızda biyokimyasal olarak ölçülen kırık GAG değerleri ile antibiyotik tedavisine eklenen eklem içi  $\alpha$ -2M tedavisinin kırık proteoglikan yüzdesini; sadece antibiyotik tedavisi verilen dizlere göre %19 oranında, enfekte kontrol dizlere göre %96 oranında arttırdığı ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0.0001$ ). Histolojik açıdan kırık örneklerinde meydana gelen lezyonlar modifiye Mankin histolojik skorumla sistemi ile değerlendirildi. Antibiyotik+  $\alpha$ -2M tedavi grubunun puanları ile antibiyotik tedavisi verilen grubun puanları karşılaştırıldığında; antibiyotik+ $\alpha$ -2M grubunun puanlarının sadece antibiyotik tedavisi verilen gruba göre daha iyi olduğu ve kırık hasarının anlamlı ölçüde az olduğu tespit edildi. Bununda istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir ( $p < 0.008$ ).

Bu çalışmanın güçlü tarafları kırık GAG değerlerini kantitatif olarak değerlendirebilmek için literatürdeki diğer septik artrit modelleri ile karşılaştırıldığında kullanılan hayvan sayısı yeterlidir. Tavşan dizlerinin anatomik ve mekanik olarak insan dizine yakın benzerlik göstermesi ve içerdikleri kırık miktarının deneysel çalışma yapabilmek için yeterli olması nedeniyle çalışmamızda tavşan kullanılmıştır. Tüm yaş grupları arasında en sık karşılaşılan patojen olması nedeniyle *S.aureus* ile septik artrit oluşturulmuştur. Tavşanları enfekte etmek için kullanılan *S.aureus* koloni miktarına literatürde yapılmış septik artrit modelleri temel alınarak karar verilmiştir. Bu çalışmada nispeten daha kalitatif bir inceleme olan patolojik değerlendirme için ayrılan hayvan sayısının az olması, insana model teşkil

eden hayvan çalışmalarının insanlardaki sonuçlarının farklı olabileceği bu çalışmanın zayıf yanlarını oluşturmaktadır.

$\alpha$ -2M, tetramer yapısında çinkoya yüksek afinitesi olan bir plasma glikoproteinidir. Bazı TIMP alt tipleride plasmada bulunmasına rağmen  $\alpha$ -2M, plasmadaki genel MMP inhibitörü olarak değerlendirilmektedir (34, 42).  $\alpha$ -2M, MMP'lerin ve ADAM'ların tamamını inhibe edip etkisiz hale getirebilir (42).  $\alpha$ -2M tetramerlerinin her birinde "tuzak bölgeleri" (bait region) bulunmaktadır. Proteazlar bu tuzak bölgelerini tanıyarak  $\alpha$ -2M tetramerlerini ikiye ayırır. Bu sırada  $\alpha$ -2M'de meydana gelen yapısal değişikliklerle proteaz ve  $\alpha$ -2M arasında kovalent bağlar kurulur ve proteaz bir çeşit tuzağa düşürülmüş olur. (16, 26, 34, 35, 42). Oluşan  $\alpha$ -2M - proteaz kompleksi hücre yüzeyinde bulunan LDL-RP (low density lipoprotein receptor related protein) adındaki  $\alpha$ -2M reseptörü ile hücre içine alınır ve endozomlarda parçalanır (43).  $\alpha$ -2M, aynı zamanda IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  gibi pro-inflamatuar sitokinler ile kompleks oluşturarak sitokinlerin toksik etkilerini ve MMP üretmelerini azaltır bu şekilde MMP' ler üzerinde dolaylı bir inhibisyon gerçekleştirmiş olur (26, 42).

$\alpha$ -2M vücutta bulunan endojen bir molekül olması, normalde de inflamasyon sırasında vücudun genel MMP inhibitörü olarak eklem sıvısında konsantrasyonunun artmaya başlaması septik artrit tedavisinde kullanılan diğer farmakolojik ajanlara göre önemli bir üstünlüktür.  $\alpha$ -2M'in tüm MMP'leri inhibe etmesi MMP'lere bağlı kıkırdak yıkımını önlemesi açısından bir avantajdır; ancak bu septik artritte hangi MMP'lerin sorumlu olduğunu anlaşılmasını olanaklı kılmaz.  $\alpha$ -2M'in genel inhibitör etkisi ile normal şartlarda kıkırdak ve kemik gelişimi için gerekli olan MMP-9, -13 gibi MMP'lerinde etkisiz hale gelmesinin, eklem içi ek sorunlara yol açıp açmadığı konusunda literatürde herhangi bir bilgi mevcut değildir.  $\alpha$ -2M yüksek moleküler ağırlığı nedeniyle eklem içi uygulamalarda eklem dışına çıkamaz ve lokal etki gösterir. Bu sayede sadece septik eklem içi MMP inhibisyonu gerçekleştirerek diğer ajanlardan farklı olarak sistemik yan etkilerden korunmuş olacaktır.  $\alpha$ -2M, MMP'leri kompetatif mekanizma ile inhibe ettiğinden etkisinin daha çok görülebilmesi bakımından  $\alpha$ -2M septik artrit

tedavisinde erken evrede, MMP'lerin HDM elemanlarına bağlanmasından önce kullanılmalıdır.

Septik artrit tedavisinde medikal tedavi yanında cerrahi debridmanda büyük çoğunlukla gerekmektedir. Cerrahi debridman başlı başına bir tedavidir. Uygun zamanlamayla ve endikasyonla kıkırdak harabiyetini konservatif tedaviye nazaran daha çok azaltabilir. Çalışmamızı bu tedaviyle kombine etmeden yapmamız bu araştırmanın zayıf tarafıdır ancak çalışmaya kontrolü zor bir faktör daha katılması bu deneyin kontrolünü daha güçleştirecektir.  $\alpha$ -2M septik artrit tedavisinde yer alırsa antibiyotik ve gerekirse yapılacak cerrahi debridman ile zamanlaması ayarlanmalıdır. Acil cerrahi debridman gereken durumlarda cerrahi debridman sonrası yapılması uygun olacaktır. Bu durumda  $\alpha$ -2M tedavisinin cerrahi tedavinin gerekmeyeceği konservatif tedavi durumlarında veya ön çapraz bağ rekonstrüksiyonu sonrası gelişebilecek septik artritte olduğu gibi radikal debridmanın ön çapraz bağın rekonstrükte halini bozacağı durumlarda daha uygun olacağı düşüncesindeyiz.

$\alpha$ -2M inflamasyon sırasında pro-inflamatuar sitokinler ile de kompleks oluşturarak anti-inflamatuar etki göstermektedir. Bu anti-inflamatuar mekanizma ile MMP'ler üzerinde dolaylı bir inhibisyon sağlamakla beraber bu etkinin eklemden bakteri temizlenmesinde olumsuz bir duruma yol açıp açmadığı bilinmemektedir. Literatürde insan üzerinde tedavi ajanı olarak  $\alpha$ -2M kullanılarak yapılan çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle  $\alpha$ -2M'in insanda sistemik veya eklem içi ne şekilde ve hangi sıklıkta ve hangi dozda kullanılabileceğini insan kıkırdak dokusu ve sinovyal sıvılarında  $\alpha$ -2M kullanılarak yapılacak çalışmalar belirleyecektir.

Septik artritte kıkırdak hasarına bağlı gelişen sekelleri önleyebilmek için konak immün yanıtının kontrol altına alınması kritik öneme sahiptir. Eklem hasarı; bakteriyal faktörler ile immün mediatörlerin tetiklediği metalloproteinaz enzimlerinin kıkırdak yıkıcı etkilerinin kombinasyonu sonucu meydana gelmektedir. Bakterinin bir MMP alt tipi olan kollajenaz gibi proteolitik enzimler ile başlattığı direkt kıkırdak hasarını, eklemden bakterileri temizlemek için harekete geçen immün sisteminin meydana getirdiği

hasarlanma takip etmektedir. İmmün yanıt sonucu meydana gelen bu hasarlanma septik artrit sırasındaki kırıkta yıkımından primer sorumlu mekanizma olarak görülmektedir (44). Bu durum eklem aspirasyonu steril hale geldikten sonrada progresif kırıkta harabiyetinin devam ettiğinin gösterilmesi ile açıkça ortaya çıkmıştır (13, 45). İmmün aktivasyon sonucu üretilen pro-inflamatuar IL-1, IL-6 ve TNF- $\alpha$  gibi sitokinler kondrositlerden, sinovyal hücrelerden ve lökositlerden metalloproteinazların üretilmesini uyarmakta ve bu endoproteazların kırıkta proteoglikan ve kollajenini yıkması sonucu kırıkta hasarı meydana gelmektedir. Sacz ve ark.'nın (44) tavşanlarda yaptıkları çalışmada eklem içi rekombinant IL-1 enjeksiyonu yapılan dizlerde akut septik artrit tablosunu taklit eden bulguların oluştuğunu, enjeksiyonu takiben saatler içerisinde effüzyon meydana geldiğini ve yapılan aspirasyonlarda proteoglikan ve diğer kırıkta yıkım ürünlerine rastladıklarını bildirmişlerdir. Cawston ve ark. (46) septik artrit tanısı konulan hastalardan tedavi öncesi yaptıkları aspirasyon örneklerini incelediklerinde sinovyal sıvıda yüksek düzeyde aktif MMP saptarken TIMP veya  $\alpha$ -2M tespit edememişlerdir. Tedaviye başladıktan sonra yaptıkları aspirasyonda ise TIMP ve  $\alpha$ -2M düzeyinin artmış olduğunu göstermişlerdir. Aktif MMP'ler, inhibitör eksikliğinde kırıkta proteoglikan ve kollajenini yıkmakta ve septik artritteki hızlı kırıkta kaybına neden olmaktadır.

Metalloproteinazlar; kalsiyum ve çinko bağımlı çalışabilen, HDM yıkımında ve dokuların yeniden düzenlenmesinde rol oynayan endoproteaz ailesidir (19, 28). Bu aile içerisinde MMP'ler, "disintegrin ve metalloproteinazlar" (ADAM), "trombospondin içeren disintegrin ve metalloproteinazlar" (ADAMTS) alt grupları bulunmaktadır (19, 28-30). Günümüzde yaklaşık 26 farklı MMP tipi tanımlanmıştır (19, 27-30) (Tablo-4). MMP'ler HDM'de denatüre ettikleri ana substratlara göre alt gruplara ayrılmıştır fakat MMP lerin denatürasyon kapasitesi tek bir substratla sınırlı değildir hepsi HDM'nin farklı komponentlerini parçalayabilmektedir (19, 28-30). Kollajenazlar (MMP-1, -8, -13) memeli dokularındaki tüm kollajenleri denatüre edebilmekle beraber, dokuların mekanik direncini sağlayan fibriller kollajen denatürasyonu daha ön plandadır (30). MMP-13 tip II kollajene daha

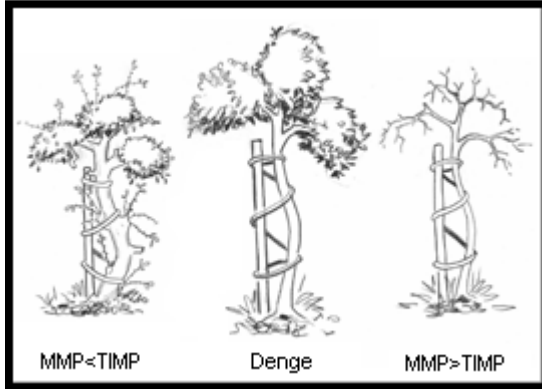
duyarlı iken MMP-1 tip III kollajene, MMP-8 tip I kollajene daha duyarlıdır (19, 47). Geletinazlar (MMP-2, -9) kollajenazların denatüre ettiği kollajeni daha küçük parçalara ayırır (29, 30). Stromelizinler (MMP-3, -10) ve matrilizinler (MMP-7, -26) geniş bir substrat çeşitliliğine sahiptir ve diğer MMP'lerin aktivasyonlarında ve fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (28, 30).

**Tablo-4: MMP ailesi (30).**

Grup	MMP	Kollajenöz substratlar	Non-kollajen HDM substratları	Yapısal olmayan substratlar
<b>Kollajenazlar</b>	MMP-1	kollajen I,II,III,VII,VIII,X,XI, jelatin	proteoglikanlar, fibronektin, entaktin, laminin, tenazkin, vitronektin	$\alpha$ -1-antiproteaz, pro-
Kollajenaz 1	MMP-8	kollajen I, II, III, V, VII, VIII, X	fibronektin, laminin, proteoglikanlar	ADAMTS-1, pro-MMP-8
Kollajenaz 2	MMP-13	kollajen I,II,III,IV,V,VII,IX,X,jelatin	proteoglikanlar, fibronektin, laminin, tenazkin	fibrinojen, proMMP-9 ve -13
Kollajenaz 3				
<b>Jelatinaz</b>	MMP-2	jelatin, kollajen I, II, III, IV, VII, X	laminin, elastin, fibronektin, proteoglikanlar	pro-MMP'ler -9 ve -13, $\alpha$ -1-antiproteaz, IGFBPs, IL-1 $\beta$ , TGF $\beta$
Jelatinaz A	MMP-9	jelatin, kollajen IV, V, VII, X, XI	laminin, elastin, fibronektin, proteoglikanlar	$\alpha$ -1-antiproteaz, CXCL5, IL-1 $\beta$ , TGF $\beta$ , plazminojen
Jelatinaz B				
<b>Stromelizin</b>	MMP-3	kollajen III,IV,V,VII,IX,X,XI,jelatin	laminin, fibronektin, elastin, proteoglikanlar	pro-MMP'ler, pro-TNF $\alpha$ , E-cadherin, L-selektin, fibrinojen
Stromelizin 1	MMP-10	kollajen I, III, IV, V, IX, X, jelatin	lamininler, proteoglikanlar	pro-MMP'ler
Stromelizin 2				
<b>Matrilizin</b>	MMP-7	jelatin, kollajen I ve IV	laminin, elastin, fibronektin, proteoglikanlar, tenazkin	pro-MMP'ler, pro- $\alpha$ -defensin, pro-TNF $\alpha$ , E-cadherin
Matrilizin 1	MMP-26	yukarıdaki gibi	yukarıdaki gibi	yukarıdaki gibi
Matrilizin 2				
<b>Membran tipi (MT) MMP'ler</b>				
MT1-MMP	MMP-14	jelatin, kollajen I, II, III	proteoglikanlar, fibronektin, tenazkin, fibrinojen	Pro-MMP-2 ve -13
MT2-MMP	MMP-15	jelatin, kollajen III		Pro-MMP-2
MT3-MMP	MMP-16		fibronektin	Pro-MMP-2
MT4-MMP	MMP-17			
MT5-MMP	MMP-24	jelatin	fibronektin	Pro-MMP-2
MT6-MMP	MMP-25			
<b>Diğer MMP'ler</b>				
Stromelizin 3	MMP-11		fibronektin	$\alpha$ -1-antiproteaz, serpinler
Metalloelastaz	MMP-12	kollajen, jelatin	elastin, proteoglikanlar	plazminojen
RASI	MMP-19		bazal membran elemanları	
Enamelysin	MMP-20		amelogenin	

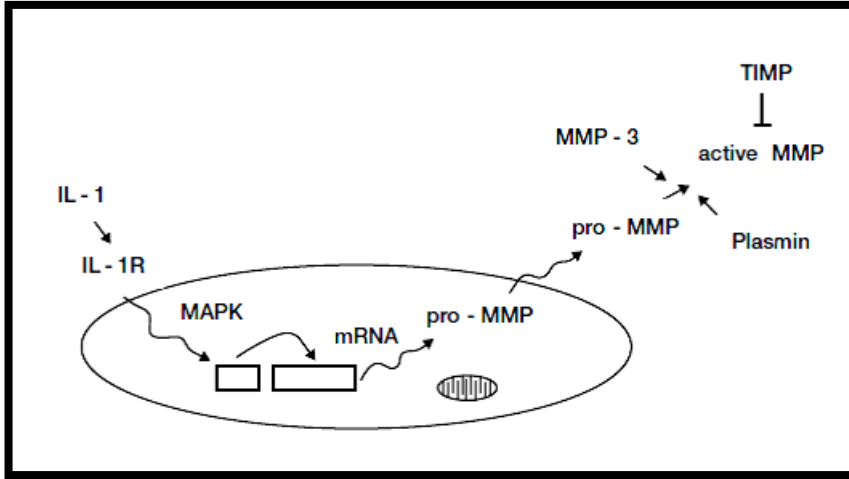
Fizyolojik koşullarda MMP'ler; embriyonik gelişme, angiogenez, yara iyileşmesi, apoptoz gibi bir çok biyolojik süreçte görev alırlar (28). Dokulardaki MMP aktivitesi çok düşük düzeydedir ve regülasyonu MMP'lerin doğal inhibitörleri olan TIMP'ler tarafından sağlanır (19, 28, 30). HDM'nin sentezi ve yıkımı arasında dinamik bir denge mevcuttur. Yıkım sürecinden

büyük ölçüde MMP enzimleri sorumludur ve bu etkileri TIMP'ler tarafından antagonize edilir. MMP'lerin fazla üretilmesi veya TIMP'ler tarafından yetersiz inhibe edilmesi MMP ve TIMP arasındaki dengenin bozulmasına ve HDM'nin aşırı yıkılmasına neden olur. Bunun sonucunda da osteoartrit, romatoid artrit, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, periodontal hastalıklar, akciğer ve karaciğer hastalıkları, nefrit, deri, kornea, gastrik ülserler gibi patolojilerin ortaya çıkmasına yol açar (19, 29). MMP'lerin fazla inhibe edilmesi ise aşırı HDM sentezlenmesine ve fibrozis ile seyreden hastalıkların ortaya çıkmasına neden olur (Şekil-12).



**Şekil-12:** MMP ve TIMP'lerin HDM üzerindeki etkisi (30).

MMP'ler proenzim şeklinde sentezlenip hücreler arası boşluğa sekrete edilirler bazıları ise MMP-9 gibi nötrofil granüllerinde depolanır bir kısımda hücre zarına bağlı şekilde (MT-MMP) bulunur (30). Pro-MMP'ler, plasmin gibi serin proteazlar ve aktif MMP-3 başta olmak üzere bazı MMP'ler tarafından aktifleştirilirler (29, 30, 42, 48). Aktif hale gelen MMP'ler TIMP'ler tarafından inhibe edilmezlerse HDM yıkımı gerçekleşir (Şekil-13).



**Şekil-13:** MMP regülasyonu. **MAPK:** mitojen ile aktive olan protein-kinaz(30).

Bilinen dört TIMP izoformu mevcuttur. Bunlar MMP'ler ile birebir non-kovalent olarak etkileşime girerek proteazı çinko içeren aktif kısmından geri dönüşümsüz şekilde inhibe ederler (42, 48). TIMP-1, -2, ve -4 dokularda ve dolaşımda bulunurken TIMP-3 sadece HDM'de bulunur (29, 30). TIMP'ler sadece aktif haldeki enzimi değil aynı zamanda inaktif formlarında etkisiz hale getirebilmektedirler (29, 48). TIMP'lerin MMP inhibisyonu yanında anjiogenez ve sellüler proliferasyon üzerinde de etkileri mevcuttur (30). TIMP'lere ek olarak  $\alpha$ -1 antitripsin ve  $\alpha$ -2 makroglobulin gibi MMP inhibisyonunda rol oynayan endojen inhibitörlerin olduğu gösterilmiştir (28, 30, 49, 50). Ayrıca hücre membranında bağlı halde bulunan yapısı TIMP' lere benzeyen endojen MMP inhibitörlerinden de bahsedilmektedir (42).

Literatürde septik artritteki kıkırdak hasarında MMP'lerin rolü ve özellikle hangi MMP'lere bağlı olarak meydana geldiğini anlayabilmek için çeşitli deneysel çalışmalar yapılmıştır. Kanangat ve ark. (23) sığır serumunda çoğaltılan s.aureus kültürünü santrifüj ederek hazırladıkları bakteri lizati ile insan dermal ve sinovyal fibroblastlarını sığır serumunda 37°C'de 8 ve 48 saat inkübe etmişler. Daha sonra kültür santrifüj edilip üste biriken süpernatanda hangi MMP'lerin artmış olduğuna iki farklı şekilde bakılmış. 8 saat inoküle edilen süpernatandaki MMP'lere, multi-MMP-mRNA kiti kullanılarak; 48 saat inoküle edilen süpernatandaki MMP'lere MMP protein kiti kullanılarak bakılmış. MMP protein kiti kullanılarak bakılan süpernatanda



MMP-1, -2, -10 ve -13 artışı tespit edilirken, MMP-mRNA kiti kullanılarak bakılan süpernatanda MMP-1, -2, -3, -7, -10 ve -11 artışı tespit edilmiş. MMP-1 ve -3 artışının daha öncede gösterildiğini kendi çalışmaları ile aslında septik artrit artışı gösteren MMP'lerin daha geniş bir bantta olduğunu belirtmişler. Gjertsson ve ark.'nın (27) MMP-7 defisiti bulunan ve normal fareleri kullanarak oluşturdukları septik artrit modelinde defisit bulunmayan farelerdeki anlamlı MMP-7 artışını göstermişlerdir. MMP-7 defisiti bulunan farelerde septik artrit kliniğinin normal farelere göre daha hafif ve kıkırdak hasarının daha az olduğu göstermişler fakat dolaşımdaki bakteri yüklerinin MMP-7 defisiti olmayan normal farelere göre anlamlı olarak arttığı tespit etmişlerdir. MMP'lerin bakterilere verilen immün yanıt sonucu arttığını, dolaşımdaki lökositleri ekleme çekerek bakteri bakteriyemiyede rol oynadıklarını ancak aşırı artan bu enzimlerin kıkırdak hasarlanması meydana getirdiklerini bildirmişlerdir. Wang ve ark. (51) sepsis sırasında MMP-9 seviyesindeki artışı göstermek için insan donörlerden venöz kan örnekleri alıp bunları heparin ile antikoagüle etmişler. Santüfüj yardımı ile kan örneklerinin polimorfonükleer lökositleri ayrılarak *S.aureus* hücre duvarının ana maddesi olan peptidoglikan ile fetal buzağı serumunda 37°C'de kültür edilmiş. 0, 1, 4, 6, 12, 24. saatlerde kültürlerden örnekler alınarak ELISA yöntemi MMP-9 seviyeleri ölçülmüş. 1 saat içerisinde MMP-9 seviyesinde anlamlı bir artışın olduğunu ve 4. saatte bu artışın plato seviyesine ulaştığını göstermişler. Calander ve ark. (31) yaptıkları deneysel çalışmada MMP-9 defisiti olan fareler ile normal farelerde *S.aureus* septik aritri oluşturularak klinik olarak meydana gelen eritem ve şişlik derecesine ve histolojik bulgular açısından sonuçları karşılaştırmışlar. MMP-9 defisiti bulunan farelerin dolaşımda ve eklem aralığında normal farelere göre bakteri yükünün anlamlı derecede artmış olduğunu, normal farelere göre daha ciddi bir septik artrit tablosunun görüldüğünü fakat histolojik olarak kıkırdak harabiyeti açısından her iki grup arasında anlamlı fark bulunmadığını belirtmişlerdir. Bu sonuçlara göre MMP-9 eksikliğinde dolaşımdan ve eklem aralığından bakteri temizlenmesindeki yetersizlik nedeniyle daha ciddi bir septik artrit görüldüğünü eklem harabiyeti açısından ise bu bulgulara dayanarak MMP-

9'un küçük bir rol oynadığının söylenemeyeceğini daha kompleks mekanizmaların olabileceğini belirtmişlerdir. Hironari ve ark. (32) MMP-13'ün tip-II kollajeni tip-I ve tip-III'e göre daha fazla yıktığı için kırıkta hasarlanmasında diğer MMP'lere göre daha ön planda olduğunu düşündüklerini belirtmişlerdir.

$\alpha$ -2M'in MMP'ler üzerindeki genel inhibitör etkisinden yararlanarak literatürde  $\alpha$ -2M'i tedavi ajanı olarak kullanan deneysel çalışmalar yapılmıştır. Bedi ve ark.'nın (52), fareler üzerinde yaptıkları deneyde, cerrahi olarak rotator manşetleri onarılan farelerin, tendon kemik birleşim yerine  $\alpha$ -2M uygulanarak MMP inhibisyonu amaçlanmışlardır. Sonuç olarak kontrol grubu farelere göre  $\alpha$ -2M uygulanan farelerde onarım alanında daha iyi kollajen organizasyonu ve daha büyük bir fibrokartilaj oluşumu gözlemlemişlerdir. Demirağ ve ark.'nın (36, 37)  $\alpha$ -2M'i kullanarak tavşan dizlerinde sinovyal MMP'leri inhibe etmek için yaptıkları iki ayrı deneysel çalışma mevcuttur. İlk çalışmalarında (37) sağ diz ön çapraz bağlarında cerrahi olarak yırtık meydana getirilen tavşanların dizlerine 3 ardışık gün 1ml/gün dozunda koyun kaynaklı  $\alpha$ -2M eklem içi uygulanmış, kontrol grubu tavşanlara ise 1ml serum fizyolojik eklem içi verilmiş. Hayvanlar 10 gün sonra sakrifiye edilmiş ve ön çapraz bağları histolojik olarak incelenmiş. Çalışma grubu tavşanların çapraz bağlarında kontrol grubuna göre hacim kaybı, retraksiyon meydana gelmediğini, kollajen ve fibroblast içeriğini koruduğunu gözlemlemişlerdir. İkinci çalışmalarında (36) bilateral ön çapraz bağ rekonstrüksiyonu yapılan tavşanlardaki greft-tendon iyileşmesi üzerine  $\alpha$ -2M uygulamasının etkisini araştırmışlardır. Tavşanların çalışma dizlerine eklem içi 1 IU/kg  $\alpha$ -2M uygulanmış ve diğer dizleri kontrol grubu olarak bırakılmıştır. Dizler arasında histolojik ve sinovyal MMP-8 (tip-I kollajenaz) düzeyi açısından enzimatik karşılaştırma yapılmıştır. Çalışma grubu dizler enzimatik olarak kontrol grubu dizler ile karşılaştırıldığında MMP-8 düzeyinde anlamlı bir azalma tespit etmişlerdir ( $p < 0.05$ ). Çalışma grubu dizlerin greft-tendon iyileşmesi açısından da kontrol grubu dizlere göre kollajen doku iyileşmesinin daha iyi olduğu gözlenmiştir.

Luan ve ark. (16) kıkırdak HDM glikoproteinlerinin yıkımında ADAMTS-7 ve ADAMTS-12'nin önemini vurgulamışlar ve bunların meydana getireceği kıkırdak yıkımını önleyebilmek için deneysel bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları in vitro çalışmada hazırladıkları kıkırdak kültür ortamını IL-1 ve TNF- $\alpha$  ile inkübe ederek kıkırdak HDM yıkımını uyarılmışlar. 2 gün sonra bu kültürde süpernatant olarak biriken kıkırdak oligomatriks proteinleri (COMP) western blot yöntemi ile ayrıştırılmış. 330 nM Rekombinant ADAMTS-7 ve ADAMTS-12 değişik konsantrasyonlardaki  $\alpha$ -2M ile 2 saat 37°C'de inkübe edilmiş daha sonra bu karışıma 170 nM COMP eklenerek 2 saat daha beklenilmiş ve jel elektroforez yardımı ile ADAMTS'ların  $\alpha$ -2M ile kompleks oluşturup oluşturmadıkları ve COMP'un yıkılıp yıkılmadığına bakmışlar. Sonuçta artan  $\alpha$ -2M konsantrasyonları ile daha güçlü ADAMTS inhibisyonu sağlandığını ve COMP parçalanmasına rastlanılmadığını göstermişlerdir. Tortorella ve ark. (53) kıkırdak proteoglikan parçalanmasında önemli rol oynayan ADAMTS-4 (agrekaz-1) ve ADAMTS-5'in (agrekaz-2)  $\alpha$ -2M kullanılarak inhibe edilebileceğini göstermek için benzer bir deneyi drozofila (meyve sineği) kaynaklı ADAMTS-4 ile ADAMTS-5,  $\alpha$ -2M ve sığır nasal septasından elde edilen agrekanı kullanarak yapmışlardır. 25'er nM ADAMTS-4 ve ADAMTS-5 değişen konsantrasyonlarda  $\alpha$ -2M ile inkübe edilmiş daha sonra bu karışıma 500 nM agrekan eklenilmiş ve 37°C'de 30 dakika bekletilmiş. Western blot yöntemi ile agrekan yıkım ürünlerine ve ADAMTS inhibisyonu sağlanıp sağlanmadığına bakılmış.  $\alpha$ -2M'in 100 nM konsantrasyonunda inhibisyonun etkili olduğu ve 150 nM konsantrasyonda neredeyse tama yakın inhibisyon elde edildiğini belirtmişlerdir. Bu araştırmacılar  $\alpha$ -2M'in kıkırdak hasarlanması ile seyreden patolojilerde tedavi edici bir ajan olarak ileride kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Septik artritte görülen immün yanıtı eklemde bakteri temizlenmesini etkilemeyecek şekilde kontrol altına almak için yapılan müdahaleler eklem kıkırdağına konak kaynaklı hasarın sınırlandırılmasında önemlidir. Literatürde bu ana fikirden yola çıkarak septik artrit tedavisinde antibiyotik tedavisine ek olarak non-steroid antiinflatuar (NSAİ) ve steroid ajanlar başta olmak

üzere kullanılarak yapılmış deneysel çalışmalar mevcuttur. Smith ve ark. (14) tavşan dizlerinde s.aureus kullanarak oluşturdukları septik artrit modelinde inflamasyonu baskı altına alabilmek için antibiyotik tedavisine ek olarak tavşanların içme suyuna NSAİ olarak naproksen sodyum eklemiştir. Bu tavşanlar sadece antibiyotik tedavisi verilen grup ile karşılaştırıldıklarında naproksen sodyum tedavisi eklenen tavşanlarda GAG kaybında %15, kollajen kaybında %30 oranında azalma sağlamışlardır. NSAİ ilaçlara göre steroid ajanlar kullanılarak yapılmış çalışmalar daha çok sayıdadır. Deksametazon, betamezon ve metilprednizolon etkileri araştırılan steroid ajanlardan bazılarıdır. Jafari ve ark. (45) hemofilus influenza ile enfekte ettikleri tavşan dizlerindeki kıkırdak hasarlanması üzerine deksametazonun etkisini araştırmışlardır. Hayvanlara dizleri enfekte edilmeden önce damar yolundan 1mg/kg deksametazon verilmiş ve hayvanlar sakrifiye edilmiştir. Bu hayvanların sinovyal sıvıları incelendiğinde kontrol grubuna göre lökosit konsantrasyonunun, IL-1 ve TNF- $\alpha$  düzeyinin, proteolitik enzimlerin anlamlı ölçüde azaldığını buna bağlı olarak daha az kıkırdak hasarlanması meydana geldiğini göstermişlerdir. Stricker ve ark. (54) s.aureus septik artritinde antibiyotik tedavisine ek olarak betametazonun parenteral ve eklem içi uygulanmasının etkisini tavşan dizlerinde araştırmışlar ve kıkırdak proteoglikan düzeyinin antibiyotik tedavisine ek olarak parenteral betametazon verilen grupta en fazla olduğunu göstermişlerdir. Eklem içi betametazon verilen grupta kıkırdak hasarının sadece antibiyotik tedavisi verilen gruptan farklı olmadığını bununda eklem içi uygulanan steroid dozunun az olmasından ileri gelebileceğini bildirmişlerdir. Wysenbeek ve ark. (55) ise antibiyotik tedavisine ek olarak eklem içi 5 mg metilprednizolon tedavisi verilen septik tavşan dizlerinde sadece antibiyotik tedavisi verilenlere göre kıkırdak hasarının anlamlı olarak daha az olduğunu göstermişlerdir.

NSAİ ve steroid ajanlar dışında septik artrit tedavisinde adenozin reseptör agonisti gibi immün modülatör ilaçlar ve kemik rezorpsiyonunu engellemek için bifosfonatlarda etkisi araştırılan ilaçlar olmuştur. Cohen ve ark. (15) immün bir modülatör olan adenozin-2A reseptör agonisti kullanarak lökositlerden oksijen radikallerinin, sitokinlerin salınımını önlemeyi ve buna

bağlı proteolitik kırıkta hasarını azaltabilmeyi amaçlamışlardır. Oluşturdukları s.aerus septik artrit modelinde antibiyotik tedavisine ek olarak adenozin-2A reseptör agonisti verilen grup sadece antibiyotik verilen dizler ile karşılaştırıldığında kırıkta GAG düzeyinin adenozin verilen grupta daha fazla olduğunu ve bu grupta histolojik olarak kırıkta hasarının daha az olduğunu göstermişlerdir. Margareta ve ark. (56) ise osteoklast aktivitesini düzenleyen bifosfanatları septik artrit tedavisinde denemişlerdir. Farelerde oluşturulan septik artrit modelinde antibiyotik tedavisine zoledronik asit tedavisi eklenmesi ile kemik rezorpsiyonunun azaltıldığını kemik mineral dansitesini ölçerek göstermişler. Araştırmacılar aynı zamanda gruplarda serum IL-6 düzeyine de bakmışlar zoledronik asit eklenmesi ile IL-6 seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak düştüğünü belirtmişlerdir. Bu tedaviye steroid tedavisinin eklenmesi ile hem kemik dansitesinin daha iyi korunabildiğini hemde IL-6 düzeyinin daha da düşürüldüğünü göstermişlerdir.

Oluşturulan bu deneysel septik artrit modellerinden başka kırıkta hasarı üzerinde sitokinlerin ve MMP'lerin etkisinin gösterilmesi ile osteoartrit (OA), romatoid artrit (RA) gibi diğer eklem patolojilerinde de bu mediatörlerin ve proteazların etkisini önleyebilmek için deneysel çalışmalar yapılmış sentetik inhibitörler geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla anti-inflamatuar bir sitokin olan IL-4 ve anti TNF- $\alpha$  tedavi ajanı olarak kullanılmış böylece bu hastaların sinovyal sıvılarındaki inflammatuar sitokin ve MMP düzeylerinde azalma sağlanmıştır (19, 30, 57).

Sitokin baskılayıcı tedaviler dışında sentetik MMP inhibitörleri üzerinde de çalışılmıştır. Marimastat, Hidroksamat (MMP-1, -2, -3, -9, -12, -13), tanomastat (MMP-2, -3, -9, -13), cipemastat (MMP-1, -8, -13) gibi sentetik MMP inhibitörlerinin başta kanser, RA ve OA gibi pek çok hastalıkta kullanılması hedeflenmiştir (19, 30). Bu sentetik MMP inhibitörlerinin insanlar üzerindeki klinik uygulamalarında muskuloskeletal sendrom olarak adlandırılan yaygın artralji, myalji, tendinit gibi bulgular veren yan etkileri ortaya çıkmıştır (19, 30, 32). Görülen muskuloskeletal yan etkilerin bu ilaçların non-selektif MMP inhibisyonu gerçekleştirmesi, uzun süreli kullanılması sonucunda ve doz bağımlı olabileceği bildirilmiştir (19, 29, 30).

Bu yan etkileri nedeniyle günümüzde halen herhangi bir sentetik MMP inhibitörü lisans alamamıştır (32).

MMP'lere bağlı kırıldak hasarını engelleyebilmek için tetrasiklinler, statinler ve bifosfanatlar üzerinde çalışılan diğer tedavi ajanlarıdır. Antibakteriyal bir ilaç olan tetrasiklinlerin aynı zamanda anti-inflamatuar etkilerinin olduğu ve MMP inhibisyonu yapabildiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (19, 30, 58). Literatürde tetrasiklinlerin mikromolar dozlarda bile kollajenaz aktivitesini %50 azalttığı, günde 2 kez 20 mg dozunda kullanılması ile endojen mikroflora bozulmadan yeterli MMP inhibisyonu yapılabileceği bildirilmiştir (19, 30). Periodontit tedavisinde kullanılan doksisisiklin hyclate (Periostat) MMP inhibitörü olarak lisans alabilen tek ilaçtır (19). Bowyer ve ark. (59) farelerde 66 gün subkutan olarak tetrasiklin enjeksiyonu sonrası kırıldak değerlendirmesinde MMP-13 ve -8 aktivitesinde %100, MMP-9 aktivitesinde %65 ve MMP-1 aktivitesinde %24 azalma tespit etmişlerdir. Sonuç olarak tetrasiklinlerin MMP'ler üzerine seçici etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir. Tetrasiklinlerin artrit tedavisinde anti-inflamatuar ilaçlar ile beraber kullanılması ile bu etkilerinin daha da arttırılabileceği bildirilmiştir (19). Doksisisiklin ve tetrasiklinler ile OA ve RA tedavisinde yapılmış çalışmalar bulunmakla beraber septik artrit tedavisinde bu ilaçlarla ilgili yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu ilaçların septik artrit tedavisinde hem antibiyotik hemde MMP inhibitörü olarak kullanılıp kullanılmıyacağı konusunda çalışmalara ihtiyaç vardır. Statinlerin, serum kolesterolünü düşürücü etkilerinin yanında genel antiinflamatuvar ve immünomodulator etkilerinin olabileceği ortaya atılmıştır (60). Statinlerin antiinflamatuvar etki mekanizmaları incelendiğinde, bu ilaçların çeşitli hücre tiplerinde inflamasyon öncesi sinyali sağlayan indüklenebilir nitrik oksit sentetaz enzim salınımını inhibe ettiği ve inflamatuvar sitokinlerden IL-1, IL-6 ve TNF- $\alpha$  üretimini azalttığı veya engellediği bildirilmiştir. Aynı zamanda bu ajanların MMP-3 ve MMP-13 üretilmesini ve aktifleştirilmesini engellediği de çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir (61, 62). Osteoklastik kemik rezorpsiyonunu inhibe eden bifosfonatların anti-inflamatuar etkilerinin olduğu, serum IL-1 seviyesini

azalttıkları ve çinko ile katyon şelasyonu oluşturarak etkili bir MMP inhibisyonu gerçekleştirdikleri bildirilmiştir (30, 56).

Literatürde septik artrit tedavisinde  $\alpha$ -2M veya başka bir MMP inhibitörü kullanılarak yapılan çalışmamız dışında başka bir deneysel çalışma yoktur.

Bu çalışmada, septik artrit patogenezinde rol oynayan inflamatuvar sitokinlerin ve MMP'lerin kırkırdak yıkıcı etkisini önleyebilmek amacıyla; anti-inflamatuvar ve genel MMP inhibitör etkisi birçok çalışmada gösterilmiş olan  $\alpha$ -2M, geliştirilen deneysel septik artrit modelinde eklem içi uygulandı. Kırkırdak dokuda meydana gelen değişiklikler gruplar arasında histopatolojik ve biyokimyasal olarak değerlendirildi.

Sonuç olarak septik artritte kırkırdak harabiyetini engelleyebilmek için medikal olarak sadece antibiyotik tedavisinin yeterli olmadığı, antibiyotik tedavisine eklenen eklem içi  $\alpha$ -2M uygulaması ile MMP'lerin kırkırdak üzerindeki proteolitik aktivitelerinin baskılanması sonucu kırkırdak GAG kaybının önemli ölçüde engellenebileceği ve septik artritte görülen kırkırdak hasarının önüne geçilebileceği gösterilmiştir. Gelecekte septik artritte özellikle hangi MMP'lerin etkili olduğunu kanıtlayacak ve böylelikle daha spesifik bir blokörün kullanılabileceği ileri çalışmalar gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Gutierrez K. Bone and joint infections in children. *Pediatr Clin North Am* 2005;52:779-94.
2. Herring JA. Tachdjian's pediatric orthopaedics. 4th edition. Canada: Saunders Elsevier; 2008. 2109-13.
3. Gupta MN, Sturrock RD, Field M. A prospective 2-year study of 75 patients with adult-onset septic arthritis. *Rheumatology (Oxford)*; 2001; 40: 24–30.
4. Mathews CJ, Weston VC, Jones A, Field M, Coakley G. Bacterial septic arthritis in adults. *Lancet* 2010;375:846-55.
5. Kang SN, Sanghera T, Mangwani J, Paterson JM, Ramachandran M. The management of septic arthritis in children: systematic review of the English language literature. *J Bone Joint Surg Br* 2009;91:1127-33.
6. Mathews CJ, Kingsley G, Field M, et al. Management of septic arthritis: a systematic review. *Ann Rheum Dis* 2007;66:440-5.
7. Mathews CJ, Coakley G. Septic arthritis: current diagnostic and therapeutic algorithm. *Curr Opin Rheumatol* 2008;20:457-62.
8. Shirliff ME., Mader JT. Acute septic arthritis. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:527-44.
9. Ross JJ. Septic arthritis. *Infect Dis Clin Noth Am.* 2005;19:799-817.
10. Caird MS, Flynn JM, Leung YL, Millman JE, D'Italia JG, Dormans JP. Factors distinguishing septic arthritis from transient synovitis of the hip in children. A prospective study. *J Bone Joint Surg Am* 2006;88:1251-7.
11. Chen CE, Ko JY, Li CC, Wang CJ. Acute septic arthritis of the hip in children. *Arch Orthop Trauma Surg* 2001;121:521-6.
12. Lyon RM, Evanich JD. Culture-negative septic arthritis in children. *J Pediatr Orthop* 1999;19:655-9.
13. Smith RL, Schurman DJ, Kajiyama G, Mell M, Gilkerson E. The effect of antibiotics on the destruction of cartilage in experimental infectious arthritis. *J Bone Joint Surg Am* 1987;69:1063-8.
14. Smith RL, Kajiyama G, Schurman DJ. Staphylococcal septic arthritis: antibiotic and nonsteroidal anti-inflammatory drug treatment in a rabbit model. *J Orthop Res* 1997;15:919-26.
15. Cohen SB, Gill SS, Baer GS, Leo BM, Scheld WM, Diduch DR. Reducing joint destruction due to septic arthrosis using an adenosine2A receptor agonist. *J Orthop Res* 2004;22:427-35.
16. Luan Y, Kong L, Howell DR, et al. Inhibition of ADAMTS-7 and ADAMTS-12 degradation of cartilage oligomeric matrix protein by alpha-2-macroglobulin. *Osteoarthritis Cartilage* 2008;16:1413-20.
17. Roughley PJ. The structure and function of cartilage proteoglycans. *Eur Cell Mater* 2006;12:92-101.



18. Knudson CB, Knudson W. Cartilage proteoglycans. *Semin Cell Dev Biol* 2001;12:69-78.
19. Elliott S, Cawston T. The clinical potential of matrix metalloproteinase inhibitors in the rheumatic disorders. *Drugs Aging* 2001;18:87-99.
20. Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J* 1992;6:861-70.
21. Eyre D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res* 2002;4:30-5.
22. Cremer MA, Rosloniec EF, Kang AH. The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. *J Mol Med* 1998;76:275-88.
23. Kanangat S, Postlethwaite A, Hasty K, et al. Induction of multiple matrix metalloproteinases in human dermal and synovial fibroblasts by *Staphylococcus aureus*: implications in the pathogenesis of septic arthritis and other soft tissue infections. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R176.
24. Schurman DJ, Johnson BL Jr, Amstutz HC. Knee joint infections with *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus* species. *J Bone Joint Surg Am* 1975;57:40-9.
25. Krieg AM. A possible cause of joint destruction in septic arthritis. *Arthritis Res* 1999;1:3-4.
26. Mocchegiani E, Costarelli L, Giacconi R, Cipriano C, Muti E, Malavolta M. Zinc-binding proteins (metallothionein and alpha-2 macroglobulin) and immunosenescence. *Exp Gerontol* 2006;41:1094-107.
27. Gjertsson I, Innocenti M, Matrisian LM, Tarkowski A. Metalloproteinase-7 contributes to joint destruction in *Staphylococcus aureus* induced arthritis. *Microb Pathog* 2005;38:97-105.
28. Skiles JW, Gonnella NC, Jeng AY. The design, structure, and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors. *Curr Med Chem* 2001;8:425-74.
29. Milner JM, Cawston TE. Matrix metalloproteinase knockout studies and the potential use of matrix metalloproteinase inhibitors in the rheumatic diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005;4:363-75.
30. Pasternak B, Aspenberg P. Metalloproteinases and their inhibitors- diagnostic and therapeutic opportunities in orthopedics. *Acta Orthop* 2009;80:693-703.
31. Calander AM, Starckx S, Opdenakker G, Bergin P, Quiding-Järbrink M, Tarkowski A. Matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) deficiency leads to increased severity of *Staphylococcus aureus*-triggered septic arthritis. *Microbes Infect* 2006;8:1434-9.
32. Takaishi H, Kimura T, Dalal S, Okada Y, D'Armiento J. Joint diseases and matrix metalloproteinases: a role for MMP-13. *Curr Pharm Biotechnol* 2008;9:47-54.
33. Piroo MH, Mandell BF. Septic arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 1997;23:239-58.

34. Sottrup-Jensen L. Alpha-macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. *J Biol Chem* 1989;264:11539-42.
35. Feinman RD. The proteinase-binding reaction of alpha 2M. *Ann N Y Acad Sci* 199;737:245-66.
36. Demirag B, Sarisozen B, Ozer O, Kaplan T, Ozturk C. Enhancement of tendon-bone healing of anterior cruciate ligament grafts by blockage of matrix metalloproteinases. *J Bone Joint Surg Am* 2005;87:2401-10.
37. Demirag B, Sarisozen B, Durak K, Bilgen OF, Ozturk C. The effect of alpha-2 macroglobulin on the healing of ruptured anterior cruciate ligament in rabbits. *Connect Tissue Res* 2004;45:23-7.
38. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am* 1971;53:523-37.
39. McIlwraith, C.W. *Anatomy and Physiology of Equine Joints*. At: Equine Orthopaedic Center Colorado State University. Home page [online] (2006)  
<http://www.equineortho.colostate.edu/questions/anatomyjoint.htm>
40. Yoshimi T, Kikuchi T, Obara T et al. Effects of high-molecular-weight sodium hyaluronate on experimental osteoarthritis induced by the resection of rabbit anterior cruciate ligament. *Clin Orthop Relat Res* 1994;(298):296-304.
41. Farndale RW, Sayers CA, Barrett AJ. A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures. *Connect Tissue Res* 1982;9:247-8.
42. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002;115(Pt 19):3719-27.
43. Strickland DK, Ashcom JD, Williams S, Burgess WH, Migliorini M, Argraves WS. Sequence identity between the alpha 2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. *J Biol Chem* 1990;265:17401-4.
44. Sáez-Llorens X, Jafari HS, Olsen KD, Nariuchi H, Hansen EJ, McCracken GH Jr. Induction of suppurative arthritis in rabbits by *Haemophilus* endotoxin, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta. *J Infect Dis* 1991;163:1267-72.
45. Jafari HS, Sáez-Llorens X, Paris M et al. Dexamethasone attenuation of cytokine-mediated articular cartilage degradation in experimental lapine *Haemophilus* arthritis. *J Infect Dis* 1993;168:1186-93.
46. Cawston TE, Weaver L, Coughlan RJ, Kyle MV, Hazleman BL. Synovial fluids from infected joints contain active metalloproteinases and no inhibitory activity. *Br J Rheumatol* 1989;28:386-92.
47. Hasty KA, Jeffrey JJ, Hibbs MS, Welgus HG. The collagen substrate specificity of human neutrophil collagenase. *J Biol Chem* 1987;262:10048-52.

48. Hidalgo M, Eckhardt SG. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:178-93.
49. Hidalgo M, Eckhardt SG. Matrix metalloproteinase inhibitors: how can we optimize their development. *Ann Oncol* 2001;12:285-7.
50. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006;69:562-73.
51. Wang YY, Myhre AE, Pettersen SJ, et al. Peptidoglycan of *Staphylococcus aureus* induces enhanced levels of matrix metalloproteinase-9 in human blood originating from neutrophils. *Shock* 2005;24:214-8.
52. Bedi A, Kovacevic D, Hettrich C, et al. The effect of matrix metalloproteinase inhibition on tendon-to-bone healing in a rotator cuff repair model. *J Shoulder Elbow Surg* 2010;19:384-91.
53. Tortorella MD, Arner EC, Hills R et al. Alpha2-macroglobulin is a novel substrate for ADAMTS-4 and ADAMTS-5 and represents an endogenous inhibitor of these enzymes. *J Biol Chem* 2004;279:17554-61.
54. Stricker SJ, Lozman PR, Makowski AL, Gunja-Smith Z. Chondroprotective effect of betamethasone in lapine pyogenic arthritis. *J Pediatr Orthop* 1996;16:231-6.
55. Wysenbeek AJ, Volchek J, Amit M, Robinson D, Boldur I, Nevo Z. Treatment of staphylococcal septic arthritis in rabbits by systemic antibiotics and intra-articular corticosteroids. *Ann Rheum Dis* 1998;57:687-90.
56. Verdrengh M, Carlsten H, Ohlsson C, Tarkowski A. Addition of bisphosphonate to antibiotic and anti-inflammatory treatment reduces bone resorption in experimental *Staphylococcus aureus*-induced arthritis. *J Orthop Res* 2007;25:304-10.
57. Joosten LA, Lubberts E, Helsen MM, et al. Protection against cartilage and bone destruction by systemic interleukin-4 treatment in established murine type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Res* 1999;1:81-91.
58. Shlopov BV, Smith GN Jr, Cole AA, Hasty KA. Differential patterns of response to doxycycline and transforming growth factor beta1 in the down-regulation of collagenases in osteoarthritic and normal human chondrocytes. *Arthritis Rheum* 1999;42:719-27.
59. Bowyer J, Heapy CG, Flannelly JK, Waterton JC, Maciewicz RA. Evaluation of a magnetic resonance biomarker of osteoarthritis disease progression: doxycycline slows tibial cartilage loss in the Dunkin Hartley guinea pig. *Int J Exp Pathol* 2004;85:85-96.
60. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1712-9.
61. Lazzerini PE, Capecchi PL, Nerucci F, et al. Simvastatin reduces MMP-3 level in interleukin 1beta stimulated human chondrocyte culture. *Ann Rheum Dis* 2004;63:867-9.

- 62.** Baragi VM, Becher G, Bendele AM et al. A new class of potent matrix metalloproteinase 13 inhibitors for potential treatment of osteoarthritis: Evidence of histologic and clinical efficacy without musculoskeletal toxicity in rat models. *Arthritis Rheum* 2009;60:2008-18.

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimde emeği olan başta Ortopedi ve Travmatoloji A.D. BaŐkanı Prof.Dr.Gayyur Kurap ve danışman hocam Doç.Dr. Burak Demirağ olmak üzere Prof.Dr. Tufan Kaleli, Prof.Dr. Ufuk Aydınlı, Prof.Dr. Ömer Faruk Bilgen, Prof.Dr. Kemal Durak, Prof.Dr. Bartu Sarısözen, Doç.Dr. M. Sadık Bilgen; tezimi hazırlamamda yardımı bulunan Biyokimya A.D. öğretim üyesi Doç.Dr. Zehra Serdar ve Patoloji A.D. öğretim üyesi Doç.Dr. Ulviye Yalçınkaya ve tüm anabilim dalı çalıŐanlarına; birlikte çalıŐtıđım asistan arkadaşlarıma; maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen başta anne ve babam olmak üzere tüm değerli aileme ve sevgili eŐime teşekkür ederim.

## ÖZGEÇMİŞ

03 Ocak 1978 tarihinde Ankara'da doğdum. İlköğretimi Özel Polatlı Koleji'nde, orta öğretimi Özel Polatlı TED Koleji'nde ve lise eğitimimi Mersin Fen Lisesi'nde tamamladım. 1997 yılında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde tıp eğitimime başladım ve 2003 yılında mezun oldum. 2005 yılında tıpta uzmanlık sınavını kazanarak Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı'nda göreve başladım ve 2011 yılında uzmanlık eğitimimi tamamladım.