

# RATLARDA OLUŞTURULAN DENEYSSEL ARTRİTİN İNTRAARTİKÜLER OLARAK VERİLEN HYALURONİK ASİTLE TEDAVİSİ

## THE TREATMENT WITH INTRA-ARTICULAR ADMINISTRATION OF HYALURONIC ACID ON EXPERIMENTAL ARTHRITIS IN RATS

Orhan KARSAN, Şirzat ÇOĞALGİL, Cemal GÜNDOĞDU, Fazlı ERDOĞAN, Halis SÜLEYMAN

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji (OK), Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon (ŞÇ) Patoloji (CG, FE) ve Farmakoloji (HS) Anabilim Dalı, Erzurum

### Özet

Erken dönem dejeneratif osteoartrit tedavisi için henüz tam bir tedavi protokolü belirlenmemiştir. Bu nedenle intraartiküler olarak verilen Hyaluronik Asit'in (HA) dejeneratif artrit tedavisinde ne derece etkili olduğunu araştırmak amacıyla 40 adet adult albino Wistar erkek ratın sağ arka diz eklemlerinde deneysel artrit oluşturuldu. Deneysel artrit eklem içine 0.2ml %1'lik formalin verilerek elde edildi ve ilaç verilmesinden 1 hafta sonra 10 rat öldürülerek artritin oluşturulduğu histopatolojik olarak ispatlandı. Diğer 30 rat 3 gruba ayrılarak birinci gruba intraartiküler 0.05 ml HA, ikinci gruba 0.05 ml serum fizyolojik verildi. Üçüncü gruba ise herhangi bir tedavi yapılmayarak kontrol grubu oluşturuldu. Haftada bir olmak üzere toplam üç kez uygulanan bu tedavilerin bitiminden 15 gün sonra öldürülen ratlardan alınan örnekler, histopatolojik olarak modifiye Mankin sistemine göre değerlendirildi. Sonuçlar istatistiksel olarak Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. İntraartiküler HA uyguladığımız deneklerde, serum fizyolojik uygulanan gruba ve kontrol grubuna kıyasla kıkırdakta daha fazla bir iyileşme ( $p<0.05$ ), sinovya da ise kısmen bir iyileşme olduğu tesbit edildi. Sonuç olarak; erken dönem dejeneratif osteoartrit tedavisinde HA'in, klinik olarak uygulanabilir ilaç olduğu, ancak halen kullanılan diğer intraartiküler tedaviler ile karşılaştırmalı araştırmalar yapılmasının gerekli olduğu kanısına varıldı.

**Anahtar kelimeler:** *Deneysel artrit, Hyaluronik asit, İntraartiküler tedavi*

### Summary

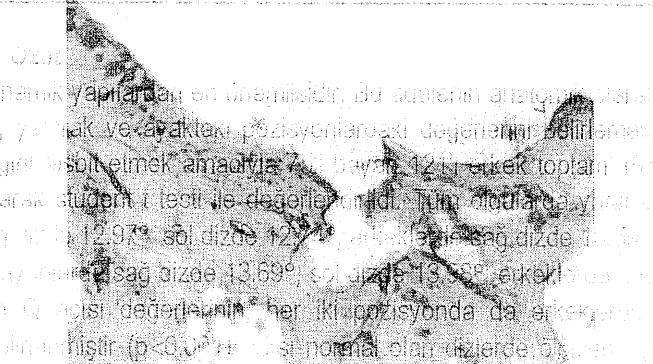
A satisfactory protocol for the treatment of early stage degenerative osteoarthritis hasn't been determined yet. For this reason, in order to investigate how much Hyaluronic Acid (HA) administered intra-articularly is effective in degenerative arthritis treatment, experimental arthritis was formed in the right back knee joint of 40 adult albino Wistar male rats. The experimental arthritis was formed by administering 0.2 ml (%1) formalin into the joint and the formation of arthritis was demonstrated histopathologically by sacrificing 10 rats one week after the administration of formalin. The other 30 rats were divided into three groups and the first group was administered 0.05 ml HA intra-articularly. The second group was administered 0.05 ml serum physiologic intra-articularly. No treatment was applied for the third group and it was accounted as the control group. 15 days after termination of the treatment applied totally 3 times one per week, the samples obtained from the sacrificed rats were assessed according to modified Mankin system histopathologically. The results were compared with Mann-Whitney U test statistically. There were a better improvement in cartilage and a relative improvement in synovia in the group administered HA than those of the control group and serum physiologic group. As a result, it was concluded that HA is a clinically applicable drug in the treatment of early stage degenerative osteoarthritis, but that it is necessary to perform comparative investigations with the other intra-articular treatments still in use.

**Key words:** *Experimental arthritis, Hyaluronic acid, Intra-articular treatment*

**Şekil 1. Ratların Artrit Oluşturulmayan Normal Diz Eklem Kıkırdığı (H&E x 200)****Şekil 2. Deneysel Artrit Oluşturulduktan Bir Hafta Sonra Elde Edilen Kıkırdak Harabiyeti<sup>+</sup> ve Sinovyal İltihabi Hücre İnfiltrasyonu > (H&E x 200) (+ Kıkırdak Değişikliğini, > Sinovyal Doku Değişikliğini göstermektedir)**

Erzurum Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji (OK, GA), Beden Eğitimi ve Spor Yüksek Okulu (PEY) ve Fizyoloji (ŞD) Anabilim Dalları, Erzurum

Quadriceps femoris adalesi diz eklemi ekleme dinamik yapıları en önemlisidir. Bu adalenin anatomiye paralel oluşturduğu dizilimin klinik göstergesi olan Q açısı, ayak ve ayakta pozisyonlardaki değerlerini belirlemek için, pozisyona ve diz aksına göre ne şekilde değiştiği saptanarak araştırılmaktadır. Bu amaçla 40 bayan ve 40 erkek toplam 80 kişide ölçüm yapıldı. Alınan sonuçlar istatistiksel olarak student t testi ile değerlendirildi. Tüm ölçümlerde elde edilen Q açısı değerleri ortalama olarak bayanlarda ayakta 12,97°, sol dizde 12,74°, ayakta ve sol dizde 10,75°; erkeklerde ayakta 13,69°, sol dizde 13,38°, ayakta ve sol dizde 10,38°, sol dizde 10° bulunmuştur. Bayanların Q açısı değerlerinin her iki pozisyonda da erkeklerin Q açısı değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu görülmüştür (p<0,05). Erkeklerin normal olan dizlerde ölçülen Q açısı değeri 10°'den fazla olarak ölçülen değere göre bayanların normal olan dizlerinde de yüksek olduğu görülmüştür.



Quadriceps femoris adalesi diz eklemi ekleme dinamik yapıları en önemlisidir. Bu adalenin anatomiye paralel oluşturduğu dizilimin klinik göstergesi olan Q açısı, ayak ve ayakta pozisyonlardaki değerlerini belirlemek için, pozisyona ve diz aksına göre ne şekilde değiştiği saptanarak araştırılmaktadır. Bu amaçla 40 bayan ve 40 erkek toplam 80 kişide ölçüm yapıldı. Alınan sonuçlar istatistiksel olarak student t testi ile değerlendirildi. Tüm ölçümlerde elde edilen Q açısı değerleri ortalama olarak bayanlarda ayakta 12,97°, sol dizde 12,74°, ayakta ve sol dizde 10,75°; erkeklerde ayakta 13,69°, sol dizde 13,38°, ayakta ve sol dizde 10,38°, sol dizde 10° bulunmuştur. Bayanların Q açısı değerlerinin her iki pozisyonda da erkeklerin Q açısı değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu görülmüştür (p<0,05). Erkeklerin normal olan dizlerde ölçülen Q açısı değeri 10°'den fazla olarak ölçülen değere göre bayanların normal olan dizlerinde de yüksek olduğu görülmüştür.

Quadriceps femoris adalesi diz eklemi ekleme dinamik yapıları en önemlisidir. Bu adalenin anatomiye paralel oluşturduğu dizilimin klinik göstergesi olan Q açısı, ayak ve ayakta pozisyonlardaki değerlerini belirlemek için, pozisyona ve diz aksına göre ne şekilde değiştiği saptanarak araştırılmaktadır. Bu amaçla 40 bayan ve 40 erkek toplam 80 kişide ölçüm yapıldı. Alınan sonuçlar istatistiksel olarak student t testi ile değerlendirildi. Tüm ölçümlerde elde edilen Q açısı değerleri ortalama olarak bayanlarda ayakta 12,97°, sol dizde 12,74°, ayakta ve sol dizde 10,75°; erkeklerde ayakta 13,69°, sol dizde 13,38°, ayakta ve sol dizde 10,38°, sol dizde 10° bulunmuştur. Bayanların Q açısı değerlerinin her iki pozisyonda da erkeklerin Q açısı değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu görülmüştür (p<0,05). Erkeklerin normal olan dizlerde ölçülen Q açısı değeri 10°'den fazla olarak ölçülen değere göre bayanların normal olan dizlerinde de yüksek olduğu görülmüştür.

**Giriş**

Dejeneratif osteoartrit, eklemlerde ağrı, sertlik ve hareket kısıtlılığı ile karakterize yavaş gelişen bir hastalıktır (1). Konservatif tedavi için her geçen gün yeni seçenekler önerilmekle birlikte henüz tam bir tedavi protokolü belirlenmemiştir (1-3). Son zamanlarda kullanılan konservatif tedavi yöntemlerinden birisi de intraartiküler olarak uygulanan Hyaluronik Asit (HA) tedavisidir. HA eklemlerin en etkili yağlayıcısı olmakla birlikte osteoartritteki bozukluğun eklemdeki yağlanmayla ilgili olup olmadığı bilinmemektedir (1). Deneysel ve klinik çalışmalarla osteoartritin tedavisinde HA'nin farmakolojik etkilerinin olduğu gösterilmiştir. HA'ın bir taraftan inflamasyonun bazı fazlarını kontrol eden ilaçlar, diğer taraftan da kondroprotektif ilaçlar gibi etki gösterir (4). Osteoartritte ve romatoid artritte sinovyal sıvıda HA konsantrasyonu azalır (5-7). Romatoid artritte özellikle HA'nin ortalama moleküler ağırlığı azalır (5). Rydell ve Balazs dejeneratif dizlerde intraartiküler HA enjeksiyonunun, tedavi edici etkisinin olduğunu göstermişlerdir (8).

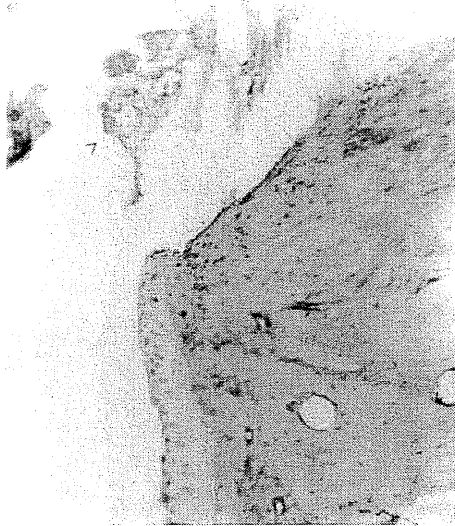
Çalışmamızda ratlarda oluşturulan deneysel artrit modelinde intraartiküler olarak verilen HA'nin tedaviye ne derece katkıda bulunduğunu araştırmayı amaçladık

**Tablo 1. Eklem Kıkırdak Lezyonlarının Değerlendirildiği Histolojik Derecelendirme Sistemi\***

kıkırdak yapısı değişiklikleri	derece
normal	0
hafif yüzeysel düzensizlik	1
orta derecede yüzeysel düzensizlik	2
ağır derecede yüzeysel düzensizlik	3
tranzisyonel zonda yarıklık	4
radial zonda yarıklık	5
kalsifiye zonda yarıklık	6
tranzisyonel zonun kaybı	7
radial zonun kaybı	8
kalsifiye zonun kaybı	9
yapının tam bozulması	10

\* Mankin ve ark (6)'dan modifiye edilmiştir

**Şekil 3.** İntraartiküler Serum Fizyolojik Uygulandıktan Sonra Kıkırdakta Harabiyet ve Sinoviyada Hafif Derecede İltihabi Hücre İnfiltrasyonu Mevcut (H&E X 200) (+ Kıkırdak Değişikliğini, > Sinovyal Doku Değişikliğini göstermektedir).



**Şekil 4.** Hyaluronik Asit Tedavisi Sonucunda Kıkırdakta Proliferatif Aktivite, Sinoviyada Hafif Derecede İltihabi Hücre İnfiltrasyonu (H&E X 200) (+ Kıkırdak Değişikliğini, > Sinovyal Doku Değişikliğini göstermektedir).



### Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada ağırlığı 180-200 gram olan toplam 40 adet adult albino Wistar erkek rat kullanıldı. Deneyde kullanılan bütün ratların sağ arka dizlerine artrit oluşturmak amacıyla, Süleyman H. ve Ark.'nın tanımladığı yöntemle göre intraartiküler olarak (9,10) %1'lik formalinden 0.2 ml verildi. Sol arka dizler kontrol olarak bırakıldı. Deneysel artrit aşamasında formalin verilmesini takiben bir hafta sonra 10 adet rat, intraabdominal pentothal verilerek öldürüldü. Sağ arka dizleri, oluşturulan artrit derecesini saptamak amacıyla, sol arka dizleriyle karşılaştırmak üzere histopatolojik incelemeye alındı. Geri kalan 30 rat deneysel artrit oluşturulmasından bir hafta sonra her birinde 10 rat bulunan 3 gruba ayrıldı. Birinci gruba intraartiküler 0.05 ml (0.1ml/kg) dozunda HA (Sodyum Hyaluronat, "Orthovisc®", 15 mg/ml, Anika Research, INC. Woburn, USA) uygulandı. İkinci gruba intraartiküler 0.05 ml serum fizyolojik verildi. Üçüncü gruba ise herhangi bir tedavi yapılmayıp kontrol grubu oluşturuldu. Bu tedaviler birer hafta aralıklarla toplam üç kez tekrarlandı. Son tedaviden iki hafta sonra ratlar, intraabdominal olarak verilen 250 mg/kg pentothal ile öldürüldüler. Alınan doku örnekleri tamponlanmış % 10'luk formalin içerisinde fikse edildi. Daha sonra %10'luk formik asitte 24 saat bekletilerek dekalsifiye

edildi. Dekalsifikasyon işlemlerinden sonra eklem kıkırdığı ve sinovyal membran içeren 5 mm kalınlığında örnekler alındı. Değişik derecede alkolden geçirilerek dehidrate edilen bu örnekler parafine gömüldü. 5 µm kalınlığında kesitler alınarak Hematoksilin-Eozin ve Matson's trikrom boya ile boyandı. Işık mikroskopunda yapılan incelemelerde elde edilen bulgular Mankin ve Ark.'nın yöntemi (6) modifiye edilerek değerlendirildi (Tablo 1, 2). Buna göre her bir grupta kıkırdak harabiyetinin olup olmaması, kıkırdak hücre proliferasyonu, sinovyal membranda iltihabi hücre infiltrasyonu ve kapiller damar proliferasyonu araştırıldı. Sonuçlar istatistiksel olarak Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı.

### Bulgular

Deneysel artrit oluşturulan 10 rat ilaç verilmesini takiben 1 hafta sonra sakrifiye edilerek patolojik incelenmeye alındı. Artrit oluşturulmayan eklemleriyle karşılaştırıldığında (Şekil 1) ilaç verilen 10 ratda sağ dizde kıkırdakta, modifiye Mankin sistemine göre ortalama 6.7 derecelik harabiyet ve sinoviyada ortalama 8 derecelik doku değişikliği olduğu tesbit edildi (Şekil 2).

**Tablo 2.** Sinovyal Doku Değişikliklerinin Değerlendirildiği Histolojik Derecelendirme Sistemi\*

sinovyal doku değişiklikleri	derece
sinovyal membran hücre hiperplazisi	
normal	0
önemsiz	1
orta	2
şiddetli	3
sinovyal membran hücre hipertofisi	
normal	0
önemsiz	1
orta	2
şiddetli	3
inflatuar hücre infiltrasyonu	
normal	0
önemsiz	1
orta	2
şiddetli	3

\* Mankin ve ark (6). 'dan modifiye edilmiştir

Herhangi bir tedavi verilmeyen grupta kıkırdakta ortalama 6.3 derecelik harabiyet, sinovyada 7.2 derecelik doku değişikliği ve intraartiküler olarak serum fizyolojik verilen grupta 5.9 derecelik kıkırdak harabiyeti, 6.8 derecelik sinovyal değişiklik olduğu bulundu (Şekil 3). HA tedavisi uygulanan grupta ise kıkırdakta ortalama 1.5 derecelik proliferatif aktivitenin bulunduğu iyileşme, sinovyada ise ortalama 4.5 derecelik doku değişikliği olduğu görüldü (Şekil 4) (Tablo 3). HA uygulanan grup ile diğer iki grup arasında kıkırdak lezyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tesbit edildi ( $p < 0.05$ ). Sinovyal değişiklikler açısından bakıldığında ise HA ile diğer gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu ( $p > 0.05$ ).

### Tartışma

Osteoartritte meydana gelen ağırlı semptomların ve azalmış eklem fonksiyonlarının kontrol edilmesinde intraartiküler olarak verilen HA'nın, uzun süreli ve faydalı bir etkisinin olduğu birçok yazar tarafından bildirilmektedir (4,11-13). Ayrıca intraartiküler olarak verilen HA'nın, bu hastalığın rekürrensinde daima mevcut olan sekonder inflamatuvar prosesin kontrolünü de sağlayabildiği iddia edilmektedir (4,12). Yüksek moleküler ağırlıklı HA'nın çeşitli deneysel artiküler kıkırdak injürilerinde etkili olduğu bulunmuştur. Yarış atlarında travmatik artrit ve insanlarda dejeneratif eklem hastalıklarının tedavisinde iyi sonuçlar alındığı bildirilmekte ve bu etkinin, hyaluronik asitin yüzey koruyucu etkisine bağlı olduğu söylenmektedir (14).

Schiavinato ve ark. (5) anterior çapraz bağı kesmek suretiyle köpeklerde oluşturdukları deneysel osteoartrit modelinde intraartiküler sodyum hyaluronat'ın, tedavide faydalı olduğunu gösterdiler. Ghosh ve ark. (15) medial menisektomi yapmak suretiyle erken dönem osteoartrit oluşturdukları koyun dizlerine düşük molekül ağırlıklı, yüksek molekül ağırlıklı HA ve serum fizyolojik vererek karşılaştırdıkları çalışmada, histolojik olarak meydana gelen değişiklikler açısından en iyi sonucun yüksek moleküler ağırlıklı HA'le alındığını saptamışlardır. Klinik olarak, Leardini ve ark. (4) osteoartritle hastalarda intraartiküler olarak HA ve 6-methyl prednisolone asetat vererek yaptıkları karşılaştırmada ağırlı semptomların iyileşmesi, sabah sertliğinde azalma ve eklem hareketlerinde artış bakımından aralarında bir fark olmadığı, uzun dönem takiplerinde özellikle 35. günde hyaluronik asitle elde edilen iyileşmenin devam ettiği ancak 6-methyl prednisolone asetat'la olan iyileşmenin devam etmediğini gördüklerini bildirmektedirler. Bununla beraber HA tedavisi ile beklenen sonucun alınmadığı çalışmalar da vardır. Bunlardan Olsen ve ark. (16) immobilize etmek suretiyle dejenerasyon oluşturdukları tavşan dizlerinde HA'nın dejenerasyonu önlemediğini hatta tamir sürecinin inhibe olduğunu belirlediler (16). Tavşan dizlerinde kıkırdak harabiyeti meydana getirerek intraartiküler HA uygulayan Tosun ve ark. (17)'da HA'nın travmatik kıkırdak defektlerinde etkili olmadığını bildirmektedir. Çalışmamızda, intraartiküler HA uyguladığımız deneklerde, serum fizyolojik uygulanan gruba ve kontrol grubuna kıyasla kıkırdakta daha fazla bir iyileşme, sinovyada ise kısmi bir iyileşme olduğunu gözledik.

Sonuç olarak HA'nın, erken dönem dejeneratif osteoartrit tedavisinde klinik olarak uygulanabilir ilaç olduğu, ancak halen kullanılan diğer intraartiküler tedaviler ile karşılaştırmalı araştırmalar yapılmasının gerekli olduğu kanısına varıldı.

**Tablo 3.** Deneklerden Elde Edilen Kıkırdak ve Sinovyal Doku Bulgularının Modifiye Mankin Derecelendirme Sistemine Göre Dağılımı

deney grupları	lezyonun derecesi	
	kıkırdak	sinovya
deneysel artrit (n=10)	6.7	8
tedavi edilmeyen grup (n=10)	6.3	7.2
serum fiz. ile ted. edilen grup (n=10)	5.9	6.8
HA ile ted. edilen grup (n=10)	1.5	4.5

**Kaynaklar**

1. Moskowitz RV. Clinical and laboratory findings in osteoarthritis. In: McCarty DJ (ed). *Arthritis and Allied Conditions*. Eleventh ed., Philadelphia: Lea-Febiger, 1989: 1605-30
2. Nizolek DJH, White KK. Corticosteroid and hyaluronic acid treatments in equine degenerative joint disease. *Cornell Vet* 1981; 71:355-75
3. Jones AC, Patrick M, Doherty S, Doherty M. Intra-articular hyaluronic acid compared to intra-articular triamcinolone hexacetonide in inflammatory knee osteoarthritis. *Osteoarth Cart* 1995; 3: 269-73
4. Leardini G, Mattara L, Franceschini M, Perbellini A. Intra-articular treatment of knee osteoarthritis. A comparative study between hyaluronic acid and 6-methyl prednisolone acetate. *Clin Exp Rheumatol* 1991; 9:375-81
5. Schiavinato A, Lini E, Guidolin D, et al. Intraarticular sodium hyaluronate injections in the pond-nuki experimental model of osteoarthritis in dogs. *Clin Orthop Rel Res* 1989; 241:286-99
6. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. *Bone Joint Surg* 1971; 53: 523-37
7. Howell DS: Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: McCarty DJ (ed). *Arthritis and Allied Conditions*, Eleventh ed., Philadelphia: Lea-Febiger, 1989: 1595-604
8. Rydell N, Balazs EA. Effect of intra-articular injection of hyaluronic acid on the clinical symptoms of osteoarthritis and on granulation tissue formation. *Clin Orthop* 1971; 80:25-7
9. Süleyman H, Geptiremen A, Göçer F, Sönmez S, Banoğlu NZ, Büyükkuroğlu ME. Antiinflammatory effects of a newly synthesized compound and phenylbutazone in intact and adrenalectomized rats. *New Med* 1997;14:10-2
10. Süleyman H, Geptiremen A, Banoğlu NZ, Sönmez S. Yeni pirazol türevlerinin antiinflatuar etkileri. *Yeni Tıp Der* 1996; 13:294-7
11. Gotoh S, Onaya JI, Abe M, et al. Effect of the molecular weight of hyaluronic acid and its action mechanism on experimental joint pain in rats. *Ann Rheum Dis* 1993; 52: 817-22
12. Auer JA, Fackelman GE, Gingerich DA, Fetter AW. Effect of hyaluronic acid in naturally occurring and experimentally induced osteoarthritis. *Am Vet Res* 1980; 41: 568- 74
13. Corrado M, Peluso GF, Gigliotti S, et al. The effects of intra-articular administration of hyaluronic acid on osteoarthritis of the knee: a clinical study with immunological and biochemical evaluations. *Europ Rheum Inf* 1995; 15: 1-10
14. Wigren A, Wik O, Falk J. Intra-articular injection of high-molecular hyaluronic acid. *Acta Orthop Scand* 1976; 47: 480-5
15. Ghosh P, Read R, Armstrong S, Wilson D, Marshall R, McNair P. The effect of intraarticular administration of hyaluronan in a model of early osteoarthritis in sheep I. Gait analysis and radiological and morphological studies. *Sem Arth Rheum* 1993; 22:18-30
16. Olsen EB, Trier K, Jorgensen B, Brok KE, Ammitzball T. The effect of hyaluronic acid on cartilage in the immobilized rabbit knee. *Acta Orthop Scand* 1991; 62: 323-6
17. Tosun N, Uğraş S, Akpınar F. The effect of intraarticular exogenous hyaluronic acid injection on the healing of traumatic cartilage damage. An experimental study on rabbits. *Turk Bone Joint Surg* 1997;3:96-8

**Yazışma Adresi:**

Yrd.Doç.Dr.Orhan KARSAN  
Atatürk Üniversitesi lojmanları  
42. Blok, Da:23 25240 Erzurum  
Tel. 0 (442) 2352542