



Sıçanlarda papainle oluşturulan osteoartrit Mankin skoru ile zamana bağlı derecelendirilmesi

Quantification of papain-induced rat osteoarthritis in relation to time with the Mankin score

Nergis MURAT,¹ Bahattin KARADAM,² Sermin ÖZKAL,³ Vasfi KARATOSUN,² Sedef GİDENER¹

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, ¹Farmakoloji Anabilim Dalı, ²Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, ³Patoloji Anabilim Dalı

Amaç: Papainle deneysel olarak oluşturulan sıçan osteoartrit modelinde kıkırdak yapısındaki değişiklikler Mankin skora sistemiyle zamana bağlı olarak derecelendirildi.

Çalışma planı: Çalışmada 21 adet erkek Wistar sıçanda osteoartrit oluşturmak için %4'lük papain solüsyonu (10 µl) ve aktivatörü 0.03M sistein (10 µl) sağ diz eklemine 1, 4 ve 7. günlerde enjekte edildi. Kontrol olarak ise aynı miktarda steril serum fizyolojik solüsyonu sol dizlere enjekte edildi. Sıçanlardan rastgele seçimle yedişerli üç grup oluşturuldu. Her bir gruptaki sıçanların yaşamı son enjeksiyondan sırasıyla 1, 2 ve 4 hafta sonra yüksek doz eter anestezisi ile sonlandırıldı ve sağ ve sol diz eklemleri çıkarıldı. Eklem kıkırdığı yapısında oluşan değişikliklerin histolojik derecelendirilmesi modifiye Mankin skoru kullanılarak yapıldı.

Sonuçlar: Kıkırdak yapısı değerlendirildiğinde, her üç grupta da yüzeysel tabakada düzensizlik ve fibrilasyonlar; geçiş ve radial alanlardaki hücre sayılarında azalma ve tabakalanma gözlenirken, pannus oluşmadığı izlendi. Her üç grupta da modifiye Mankin skoru papain uygulanan dizlerde kontrollere göre anlamlı derecede yüksek idi ($p<0.05$). Birinci, ikinci ve dördüncü hafta Mankin skorları papain grubunda sırasıyla 4.3 ± 0.9 , 6.9 ± 1.3 ve 10.4 ± 1.9 ; kontrol dizlerde ise 2.7 ± 0.5 , 4.0 ± 0.8 ve 4.4 ± 1.0 bulundu. Papain enjeksiyonundan sonra bir hafta ve dört hafta beklenen gruplar arasında Mankin skoru anlamlı farklılık gösterdi ($p=0.0471$).

Çıkarımlar: Enjeksiyondan dört hafta sonra elde ettiğimiz bulgular osteoartritin erken evre bulguları ile uyumlu görünmektedir. Bu araştırmanın sonuçları erken evre osteoartrit tedavisine yönelik çalışmalara ışık tutabilir.

Anahtar sözcükler: Kıkırdak, eklem/ilaç etkisi/patoloji; hastalık modeli, hayvan; diz eklemi/patoloji; osteoartrit/kimyasal yolla oluşan; papain; sıçan.

Objectives: The aim of this study was to evaluate structural changes in relation to time with the use of the Mankin scoring system in papain-induced rat osteoarthritis.

Methods: Osteoarthritis was induced in 21 male Wistar rats by injecting an admixture of 4% papain (10 µl) and its activator 0.03 M cysteine (10 µl) into the right knee joints on the first, fourth, and seventh days. The same volume of sterile saline solution was injected into the left knees as controls. The rats were assigned to three groups equal in number and were sacrificed under high-dose ether anesthesia after one, two, and four weeks of the last papain injection, respectively. The study and control knee joints were removed and histologic changes in cartilage structure were assessed and quantified with the modified Mankin scoring system.

Results: Histologically, all papain injected knees exhibited irregularity and fibrillation in the superficial layer, decreased cell count and multilayering in transitional and radial zones, and no pannus formation. The modified Mankin scores were significantly higher compared to the control knees in all the groups ($p<0.05$), being 4.3 ± 0.9 , 6.9 ± 1.3 , and 10.4 ± 1.9 in diseased knees, and 2.7 ± 0.5 , 4.0 ± 0.8 , and 4.4 ± 1.0 in the control knees after after one, two, and four weeks of the last papain injection, respectively. There was a significant difference between the Mankin scores of the rats sacrificed after one and four weeks of the last papain injection ($p=0.0471$).

Conclusion: Findings observed after four weeks of papain injection seem to be consistent with early osteoarthritic changes. Our results may provide insight into therapeutic strategies for early osteoarthritis.

Key words: Cartilage, articular/drug effects/pathology; disease models, animal; knee joint/pathology; osteoarthritis/chemically induced; papain; rats.

Osteoartrit, eklem kıkırdağı ve subkondral kemikte yıkım ve tamir olayları arasındaki normal dengenin bozulması sonucu gelişen, sadece kıkırdak dokunun değil, eklemi oluşturan ve destek sağlayan kemik, sinovya, kapsül, ligaman, kas ve tendonların bütün olarak yer aldığı dinamik bir hastalık sürecidir.^[1,2]

İnsanlarda yapılan çalışmalarda patolojik değişikliklerin standardizasyonu ve derecelendirilmesi için eklem doku örneği almak güçtür.^[3] Hastalığın daha iyi anlaşılması için insanlardakine benzer deneysel osteoartrit modelleri kullanılmaktadır. Eklemi oluşturan dokulardaki yapısal değişiklikleri ve bu değişiklikleri etkileyen risk faktörlerini belirlemede ve tedavi yaklaşımlarının etkinliğini değerlendirmede deneysel modeller yarar sağlamaktadır.^[4]

Osteoartrit çalışmaları için farklı hayvanlarda birçok deneysel model oluşturulmuştur.^[5] Genel olarak hayvanlardaki osteoartrit modelleri travmayla, ameliyatla, enzimatik olarak, eklem instabilitesi ve ekstrasellüler matris dejenerasyonu yaratarak, kondrosit metabolizmasını bozan çeşitli ajanlar ile oluşturulmaktadır. Proteolitik enzimlerden biri olan papain de deneysel osteoartrit modeli oluşturmada kullanılmaktadır. Bu enzimin kollajen integrasyonu üzerine etki etmesi ve kondrosit üzerinde doğrudan etkisinin olmaması ve düşük dozlarda etkisinin geri dönüşümlü olması, diğer kimyasal modellere üstünlüğünü oluşturmaktadır.^[6] Eklem içine papain enjeksiyonunun insan osteoartrite benzer bir model oluşturduğu çeşitli histopatolojik çalışmalarda gösterilmiştir.^[4,7-10] Bu çalışmalarda sonuçlar histopatolojik olarak ortaya konmuş; ancak, karşılaştırmalı çalışmaya olanak verecek bir skorlama ile değerlendirme yapılmamıştır.

Bu çalışmada, papainle deneysel olarak oluşturulan osteoartrit modelinde kıkırdak yapısındaki değişikliklerin bir skorlama ile zamana bağlı evrelendirilmesi amaçlandı.

Gereç ve yöntem

Çalışmada 200-300 gr ağırlığında, 21 adet erkek Wistar cinsi sıçan kullanıldı. Çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanı Etik Kurulu'na değerlendirilip onaylandı. Sıçanlar, tüm deney süresince sabit sıcaklıkta (24 °C) tutulan odalarda barındırıldı, standart bir yemle

beslendi ve su içmeleri kısıtlanmadı. Çalışmanın her evresinde, uygulama aşamasından önce sıçanlara eter anestezisi uygulandı. Osteoartrit oluşması patolojik olarak değerlendirildi.

Deneysel osteoartrit oluşturulması

Osteoartrit, %4'lük papain solüsyonu ve onun aktivatörü 0.03M sisteinle oluşturuldu.^[9] Her iki maddenin stok solüsyonundan 10'ar µl aynı enjektöre çekilip toplam 20 µl sağ diz eklemine enjekte edildi. Sol diz eklemine ise, kontrol amaçlı, aynı hacimde steril distile su enjekte edildi. Enjeksiyonlar 1, 4 ve 7. günlerde yapıldı.^[9] Son enjeksiyondan sonra sıçanlardan rastgele seçimle yedişerli üç grup oluşturuldu. Bu gruplardaki sıçanların yaşamı enjeksiyondan sırasıyla bir, iki ve dört hafta sonra yüksek doz eter anestezisi ile sonlandırıldıktan sonra sağ ve sol diz eklemleri çıkarıldı.

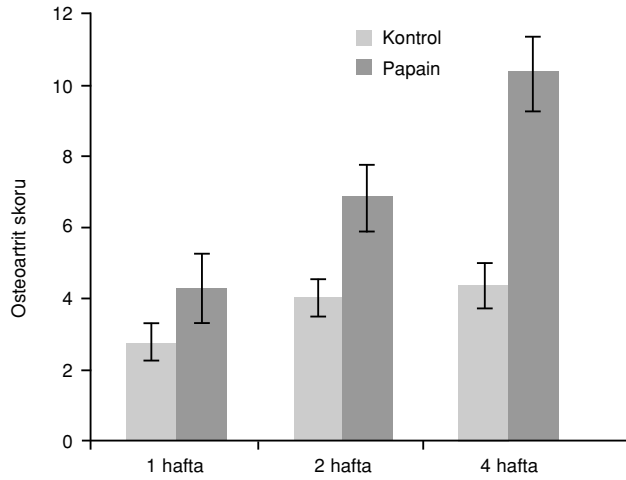
Histopatolojik inceleme

Diz eklem örnekleri %10'luk nötral tamponlu formalin solüsyonu içinde saklanıp, daha sonra %10'luk formik asit solüsyonu içinde dekalsifiye edildi. Parafin bloklamayı takiben örnekler hematoxilen-eozin ve toluidin mavisi ile boyandı. Bu şekilde hazırlanan preparatların histolojik değerlendirmesi ışık mikroskopunda yapıldı, eklem kıkırdağı yapısında oluşan değişiklikler modifiye Mankin skoru kullanılarak değerlendirildi.^[11]

Modifiye Mankin skorlama sisteminde, eklem kıkırdağı yapıları, hücre sayıları, toluidin mavisi veya safranin-O ile boyanabilme özelliği, geçiş bölgesinin (tidemark zone) özelliği ve kıkırdak yüzeyde pannus formasyonu olup olmaması değerlendirilerek her örneğe beş ayrı kategoride puan verilir. Osteoartrit çalışmalarında kullanılan ve hiyalin eklem kıkırdağının dejeneratif değişikliklerinin histolojik olarak incelenmesine olanak veren bu skorlama sisteminde puanlama 0-32 arasında değişmekte; düşük skorlar kıkırdak dokudaki hafif değişiklikleri, büyük skorlar ise ileri derecede dejenerasyonu belirtmektedir.^[11]

İstatistiksel analiz

Veriler ortalama±standart hata şeklinde gösterildi. Gruplarda kontrollerle yapılan karşılaştırmalar için Mann-Whitney U-testi, üç grubun karşılaştırılması için ise Kruskal-Wallis varyans analizi uygulandı. P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 1. Enjeksiyonu takiben bir, iki ve dört hafta beklenen grupların modifiye Mankin skorları.

Sonuçlar

Son enjeksiyonu takiben bir hafta beklenen grup: Modifiye Mankin skorlamasıyla yapılan değerlendirmeye göre, papain uygulanan dizlerde yüzeysel bölgedeki hücrelerde şişme, boya tutma özelliğinde hafif oranda azalma gözlemlendi. Geçiş bölgesi de çok tabakalı hal almıştı. Modifiye Mankin skoru papain ve steril distile su enjekte edilen dizler arasında anlamlı farklılık gösterdi (kontrol 2.7 ± 0.5 , papain 4.3 ± 0.9 ; $p < 0.05$) (Şekil 1).

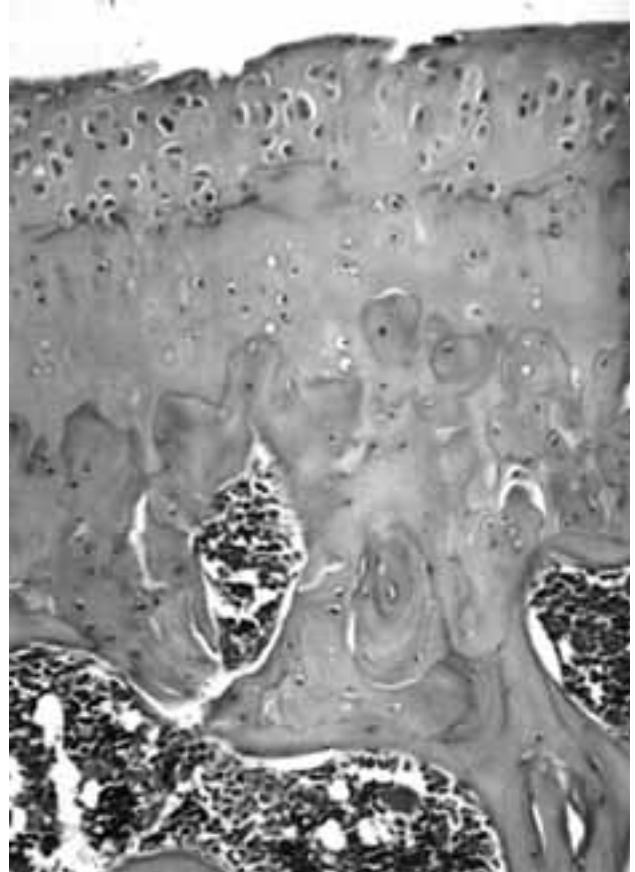
Son enjeksiyonu takiben iki hafta beklenen grup: Papain uygulanan dizlerde yüzeysel düzensizlik, yüzeysel bölgedeki hücrelerde şişme, orta ve derin bölgede az oranda hipersellülerite, boya tutma özelliğinde azalma ve geçiş bölgesinde tabakalanma gözlemlendi (Şekil 2). Kontrol dizlerle karşılaştırıldığında modifiye Mankin skoru anlamlı derecede yüksek bulundu (kontrol 4.0 ± 0.8 , papain 6.9 ± 1.3 ; $p < 0.05$) (Şekil 1).

Son enjeksiyonu takiben dört hafta beklenen grup: Papain uygulanan dizlerden elde edilen örneklerde yüzeysel düzensizlikler, yüzeysel bölgede hücre kaybı, orta bölgede hipersellülerite, derin bölgede hiposellülerite, geçiş bölgesine uzanan yarıklar, boya tutma özelliğinde azalma ve geçiş bölgesinde tabakalanma gözlemlendi (Şekil 3). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında modifiye Mankin skoru anlamlı derecede yüksek bulundu (kontrol 4.4 ± 1.0 , papain 10.4 ± 1.9 ; $p < 0.05$) (Şekil 1).

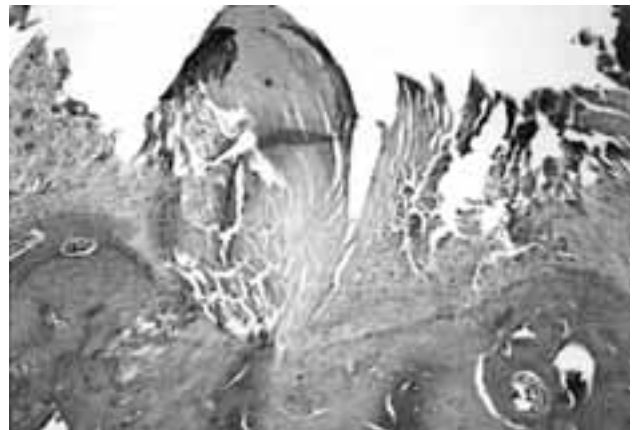
Gruplararası karşılaştırmalarda kontrol grupları arasında anlamlı farklılık bulunmazken, papain enjeksiyonundan sonra bir hafta ve dört hafta beklenen gruplar arasında anlamlı farklılık vardı ($p = 0.0471$) (Şekil 1).

Tartışma

Eklemleri oluşturan dokulardaki yapısal değişiklikleri değerlendirmede, bu değişiklikleri etkileyen risk faktörlerini belirlemede ve tedavi yaklaşımlarının etkinliğini değerlendirmede deneysel osteoartrit mo-



Şekil 2. Yüzeysel düzensizlikler, hücrelerde şişme, geçiş bölgesinde tabakalanma (H-E x 40).



Şekil 3. Orta ve derin bölgede hücre kaybı, derin yarıklar ve geçiş bölgesinde tabakalanma ve yer yer kayıplar (H-E x 100).

dellerinden yararlanılmaktadır. Oluşma mekanizmalarına göre bu modeller mekanik ve yapısal olarak iki ana gruba ayrılır.^[3] Mekanik osteoartrit modellerinde eklemde instabilite yaratılarak veya yük dağılımı değiştirilerek osteoartrit oluşturulur. Ön çapraz bağ kesilmesi, bu grubun literatürdeki çalışmalarda sık kullanılan örneğidir.^[11-15] Yapısal osteoartrit modellerinde, fiziksel, kimyasal veya enzimatik bir etken ile doğrudan kıkırdak doku kompozisyonunda değişiklikler meydana getirilerek osteoartrit oluşturulur. Osteoartrit oluşma süresi mekanik modellere göre daha kısadır.^[16]

Papain proteolitik bir enzimdir. Ekstrasellüler matrikste proteoglikanlar üzerine etkiyerek kondroitin sülfat salınımına yol açar ve sonuçta kollajen integrasyonunu bozar.^[9] Ancak, kollajen ve kondrositler üzerine doğrudan etkisi yoktur.^[17] Papainin kıkırdağın yenilenme mekanizmalarını tamamen bozmadığı ve yenilenme kapasitesinin uygulanan doz ile ters orantılı olduğu saptanmıştır.^[3,18,19] Bu durum, oluşturulacak modelde osteoartritin evrelendirilmesine ve uygun tedavi seçeceği sonuçlarının farklı evrelerde değerlendirilmesine olanak sağlayacaktır. Papainin eklemiçi enjeksiyonunun, histopatolojik olarak insan osteoartriti-ne benzer bir model oluşturduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.^[4,7-10,17] Bu çalışmalarda papain farklı dozlarda ve aralıklarla kullanılmıştır. Sonuçlar histopatolojik olarak değerlendirilmiş; ancak, karşılaştırmalı çalışmaya olanak verecek bir skorumla ile değerlendirme yapılmamıştır.

Mankin skorumla sistemi hassas bir yöntemdir ve en hafif osteoartritik değişiklikleri inceleme ve değerlendirme olanağı tanımaktadır. Dejenere kıkırdak dokudaki hücrelerin özellikleri, matriks yapısındaki değişiklikler, geçiş bölgesinin durumu, pannus oluşumu ve eklem yüzeyinin karakteristiği bu skorumla sistemiyle değerlendirilebilir.^[11] Osteoartritte görülen morfolojik değişikliklerin büyük bir bölümünü kapsaması ve değerlendirmeci-içi ve arası farklılıkların az olması nedeniyle yeterli bir sistemdir.^[20] Osteoartritin farklı evrelerinde kondrositlerin metabolik durumu ile Mankin skorumla sistemi arasında korelasyon bulunmuştur.^[21] Literatürdeki papain çalışmalarında da aynı ilişki histopatolojik olarak ortaya konmuş; ancak, istatistiksel değerlendirmeye alınmamıştır.^[4,8,9] Çalışmamızda, papainle oluşturulan osteoartrit modelinde geçen süre ile kıkırdak yapısındaki dejenerasyon derecesi arasındaki ilişkinin

doğru orantılı olduğunu saptadık ve bunu ilk kez olmak üzere skorumla sistemi ile ortaya koyduk.

Enjeksiyondan dört hafta sonra elde ettiğimiz bulguların osteoartritin erken evre bulguları ile uyumlu olduğu kanısındayız. Bu araştırma sonuçlarının erken evre osteoartrit tedavisine yönelik, tedavi edici ajanın/yöntemin araştırılacağı çalışmalara ışık tutacağını düşünüyoruz.

Kaynaklar

1. Altman RD. The syndrome of osteoarthritis. *J Rheumatol* 1997;24:766-7.
2. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect* 1998;47:487-504.
3. Pritzker KP. Animal models for osteoarthritis: processes, problems and prospects. *Ann Rheum Dis* 1994;53:406-20.
4. Bentley G. Papain-induced degenerative arthritis of the hip in rabbits. *J Bone Joint Surg [Br]* 1971;53:324-37.
5. Martel-Pelletier J. Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1998;6:374-6.
6. Moskowitz RW. Experimental models of degenerative joint disease. *Semin Arthritis Rheum* 1972;2:95-116.
7. Farkas T, Bihari-Varga M, Biro T. Thermoanalytical and histological study of intra-articular papain-induced degradation and repair of rabbit cartilage. I. Immature animals. *Ann Rheum Dis* 1974;33:385-90.
8. Farkas T, Bihari-Varga M, Biro T. Thermoanalytical and histological study of intra-articular papain-induced degradation and repair of rabbit cartilage. II. Mature animals. *Ann Rheum Dis* 1976;35:23-6.
9. Huang MH, Ding HJ, Chai CY, Huang YF, Yang RC. Effects of sonication on articular cartilage in experimental osteoarthritis. *J Rheumatol* 1997;24:1978-84.
10. Murray DG. Experimentally induced arthritis using intra-articular papain. *Arthritis Rheum* 1964;7:211-9.
11. Yoshimi T, Kikuchi T, Obara T, Yamaguchi T, Sakakibara Y, Itoh H, et al. Effects of high-molecular-weight sodium hyaluronate on experimental osteoarthrosis induced by the resection of rabbit anterior cruciate ligament. *Clin Orthop Relat Res* 1994;(298):296-304.
12. Wenz W, Breusch SJ, Graf J, Stratmann U. Ultrastructural findings after intraarticular application of hyaluronan in a canine model of arthropathy. *J Orthop Res* 2000;18:604-12.
13. Abatangelo G, Botti P, Del Bue M, Gei G, Samson JC, Cortivo R, et al. Intraarticular sodium hyaluronate injections in the Pond-Nuki experimental model of osteoarthritis in dogs. I. Biochemical results. *Clin Orthop Relat Res* 1989;(241):278-85.
14. Schiavinato A, Lini E, Guidolin D, Pezzoli G, Botti P, Martelli M, et al. Intraarticular sodium hyaluronate injections in the Pond-Nuki experimental model of osteoarthritis in dogs. II. Morphological findings. *Clin Orthop Relat Res* 1989;(241):286-99.
15. Altman RD, Tenenbaum J, Latta L, Riskin W, Blanco LN, Howell DS. Biomechanical and biochemical properties of dog cartilage in experimentally induced osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1984;43:83-90.
16. Kikuchi T, Sakuta T, Yamaguchi T. Intra-articular injection of collagenase induces experimental osteoarthritis in mature

- rabbits. *Osteoarthritis Cartilage* 1998;6:177-86.
17. Havdrup T, Henricson A, Telhag H. Papain-induced mitosis of chondrocytes in adult joint cartilage: an experimental study in full-grown rabbits. *Acta Orthop Scand* 1982; 53:119-24.
 18. Yang F, Shi Z. A study on papain-induced osteoarthritis in rabbit temporomandibular joint. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2002;20:330-2. [Abstract]
 19. Lin YS, Huang MH, Chai CY. Effects of helium-neon laser on the mucopolysaccharide induction in experimental osteoarthritis cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;14:377-83.
 20. van der Sluijs JA, Geesink RG, van der Linden AJ, Bulstra SK, Kuyper R, Drukker J. The reliability of the Mankin score for osteoarthritis. *J Orthop Res* 1992;10:58-61.
 21. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg [Am]* 1971; 53:523-37.