



Eklem immobilizasyonu reaktif oksijen ürünlerini artırmaktadır: Deneysel çalışma

Joint immobilization increases reactive oxygen species: an experimental study

Mehmet ERDEM, Taner GÜNEŞ, Cengiz ŞEN, Bora BOSTAN,
Hüseyin ASLAN,¹ Hüseyin ÖZYURT,² Reşit Doğan KÖSEOĞLU³

*Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı,
¹Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, ²Biyokimya Anabilim Dalı, ³Patoloji Anabilim Dalı*

Amaç: Klinik çalışmalarda, osteoartrit başlangıç ve ilerlemede reaktif oksijen ürünlerinin (ROÜ) katkısının olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, farklı sürelerde immobilizasyon uygulanan tavşan dizlerinde, kıkırdak yıkımı ve diz eklemi sinovyal sıvısı ve kanda oksidatif stres parametreleri araştırıldı.

Çalışma planı: Yirmi sekiz adet erişkin Yeni Zelanda albino türü erkek tavşan, her grupta yedi hayvan olmak üzere dört gruba bölündü. Gruplardan üçünde, dizler 3, 6 ve 9 hafta süreyle sentetik rijit alçı ile immobilize edildi. Stereolojik yöntem ile femur kondilleri ve tibia platosu kıkırdak dokusundaki kondrositlerin toplam sayısı, toplam hacmi ve sayısal yoğunluğu ölçüldü. Sinovyal sıvı ve kanda süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) antioksidan enzimlerin aktivitesi ve oksidatif stres parametrelerinden nitrik oksit (NO) ve malondialdehit (MDA) düzeyleri ölçüldü.

Sonuçlar: Immobilizasyonun üçüncü haftasında, femur kondili ve tibia platosunda kondrositlerin toplam sayısı ve toplam hacmi kontrol grubuna göre anlamlı düşüş, sayısal yoğunluğu anlamlı artış gösterdi. Altı ve dokuz haftalık immobilizasyon sonrasında bu parametrelerin hepsinde (kondrosit toplam sayısı, toplam hacmi ve sayısal yoğunluğu) belirgin azalma görüldü ($p<0.001$). Kontrol grubuna göre en belirgin azalma dokuz haftalık immobilizasyon grubunda idi ($p<0.001$). Immobilizasyon süresi boyunca diz eklemi sinovyal sıvı ve kan plazmasında SOD, CAT, GSH-Px enzim aktiviteleri ve MDA ve NO düzeyleri, kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek bulundu. Bu farklılık, immobilizasyon süresi uzadıkça artmakta idi ($p<0.001$).

Çıkarımlar: Kan ve sinovyal sıvıda ROÜ artışı kıkırdak yıkımı oluşturabilir ve ROÜ osteoartrit etyopatogenezinde potansiyel faktörlerden biri olabilir; ayrıca, ortopedik hastaların tedavisinde uzun süreli eklem immobilizasyondan mümkün olduğunca kaçınmak gerekir.

Anahtar sözcükler: Antioksidan; kıkırdak, eklem/patoloji; immobilizasyon; diz eklemi; osteoartrit; oksidatif stres; tavşan; reaktif oksijen ürünleri; tibia/patoloji; zaman faktörü.

Objectives: It has been shown that reactive oxygen species (ROS) contribute to the onset and progression of osteoarthritis. We investigated cartilage destruction and oxidative stress parameters in the blood and synovial fluid of knee joints of rabbits exposed to varying periods of immobilization.

Methods: Twenty-eight mature New Zealand albino male rabbits were divided into four groups equal in number. In three groups, the knees were immobilized with a rigid cast for 3, 6 and 9 weeks, respectively. The cartilaginous tissue of the femoral condyles and tibial plateau were analyzed with respect to total count, total volume, and numerical density of chondrocytes using stereohistological methods. Antioxidant activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GSH-Px), and oxidative stress parameters including nitric oxide (NO) and malondialdehyde (MDA) levels were measured in the plasma and synovial fluid.

Results: Compared to the control group, total count and total volume of chondrocytes in the femoral condyle and tibial plateau showed significant decreases, while numerical density showed a significant increase at 3 weeks of immobilization. Subsequent immobilization periods resulted in significant decreases in all these parameters, being most remarkable compared to the control group at the end of nine weeks ($p<0.001$). In plasma and knee joint synovial fluid, all antioxidant enzyme activities (SOD, CAT, and GSH-Px) and oxidative stress parameters (NO and MDA) showed consistent increases compared to the control group throughout the immobilization period ($p<0.001$).

Conclusion: Increased levels of ROS in the blood and synovial fluid might result in cartilage destruction and ROS may be one of the potential factors involved in the etiopathogenesis of osteoarthritis. Prolonged joint immobilization should be avoided in the treatment of orthopedic diseases.

Key words: Antioxidants; cartilage, articular/pathology; immobilization; knee joint; osteoarthritis; oxidative stress; rabbits; reactive oxygen species; tibia/pathology; time factors.

Yazışma adresi / Correspondence: Dr. Mehmet Erdem. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, 60100 Tokat. Tel: 0356 - 212 95 00 / 1282 e-posta: mehmederdem71@hotmail.com

Başvuru tarihi / Submitted: 24.09.2008 **Kabul tarihi / Accepted:** 26.06.2009

© 2009 Türk Ortopedi ve Travmatoloji Derneği / © 2009 Turkish Association of Orthopaedics and Traumatology

Eklem immobilizasyonunun, eklem kıkırdak dokusunda osteoartrit benzeri yıkıma neden olduğu iyi bilinmektedir.^[1-3] İmmobilizasyon, kıkırdak hücre nekrozuna ve total glukozaminoglikan kitlesinde azalmaya neden olarak kıkırdak atrofini oluşturmaktadır. Bu durumun kıkırdak dokusunda yumuşamaya yol açması nedeniyle kıkırdağın biyomekanik dayanıklılığı azalmaktadır.^[1,4-7] İmmobilizasyonun oluşturduğu kıkırdak doku atrofini ve yumuşamanın mobilizasyona dönüşmesiyle tamamen düzelmediği ortaya konmuştur.^[5,6]

Reaktif oksijen ürünleri (ROÜ) osteoartrit etyolojisinde rol oynayan önemli metabolik faktörlerden biri olarak kabul edilir.^[8-10] Bunlar vücutta normal metabolik yollarla üretilir ve hücreyi uyarılma ve hücre yıkımı gibi çeşitli fizyolojik süreçlere neden olur. Reaktif oksijen ürünleri, katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi enzimler ve enzimatik olmayan antioksidanların oluşturduğu antioksidan savunma sistemi tarafından temizlenir ve bu durum normal vücutta bir denge halindedir.^[8,11,12] Ancak, oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki bu denge kaybının büyük olması hücreyi ve hücre dışı dokuda anormal katabolik olaya neden olur ve bu durum oksidatif stres olarak adlandırılır.^[8] Reaktif oksijen ürünleri, başlıca süperoksit anyon (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH^-), hipoklorid iyonu (OCl^-) ve nitrik oksidi (NO) kapsamaktadır. Kondrositler tarafından üretilen NO ve O_2^- , ONOO⁻ ve H_2O_2 'yi de içeren zararlı radikaller dönüşürler ve bu ürünler, kondrosit hücre ölümü ve hücre dışı matriks yıkımına yol açarak kıkırdak doku yıkımına neden olabilmektedir.^[8,10]

Bu deneysel çalışmada, kıkırdak yıkımı ile oksidatif stres artışı arasındaki ilişkiyi araştırmak amacıyla, tavşan diz eklemi immobilize edilerek kıkırdak dokuda oluşturulan yıkım histolojik stereolojik inceleme ile değerlendirildi. Eklem sinovyal sıvısı ve plazmada SOD, CAT, GSH-Px antioksidan enzim aktiviteleri ile NO radikali ve ROÜ göstergesi olan lipid peroksidasyon ürünü malondialdehit (MDA) düzeyleri incelendi.

Gereç ve yöntem

Yirmi sekiz erişkin Yeni Zelanda albino türü tavşan (yaş 8-12 ay, ağırlık 3.2-4.0 kg), 3, 6, 9 haftalık immobilizasyon grupları ve diz hareketinin serbest bırakıldığı kontrol grubu olmak üzere yedişerli dört gruba ayrıldı. Tavşanların sağ alt ekstremiteleri, sentetik rijit alçı (Dynacast, Smith & Nephew Medical,

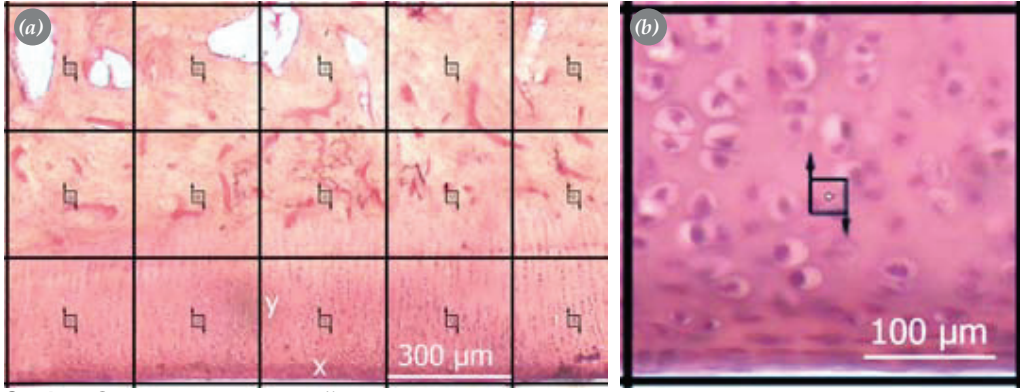
Hull, İngiltere) ile diz 90° fleksiyonda, kasıktan parmaklara kadar immobilize edildi. Bu işlem, ketamin (10 mgr/kg) ve ksilazin (8 mgr/kg) anestezisi altında gerçekleştirildi. Tavşanlar kafesleri içinde serbest bırakıldı ve serbest yemleme yapıldı. Diz immobilizasyon süresi sonunda, hayvanlar ketamin ve ksilazin anestezisi altında iken insülin enjektörü ile sağ diz eklem boşluğuna %0.9 sodyum klorit 2 ml enjekte edildi. Diz eklemine 10 kez pasif tam fleksiyon-ekstansiyon uygulamasından sonra, diz eklem sinovya sıvısı aspire edildi.^[13] Hayvanların karınları açıldı ve vena kava inferiordan kan örnekleri alındı. Kan örnekleri -70° altında saklandı. Hayvanlar, yüksek dozda intravenöz pentotal kullanarak öldürüldü. Çalışma için hastanemizin Yerel Etik Komitesinden onay alındı.

Doku hazırlığı

Tüm hayvanların dizleri dizüstünden ampute edilerek %10 nötral-tamponlu formalin ile tespit edildi ve sonrasında %5 hidroklorik asit ile dekalsifiye edildi. On iki saat musluk suyu ile yıkandıktan sonra, dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi, ksilen ile şeffaflaştırıldı ve parafin içine gömüldü. Proksimal tibia ve distal femurdan, döner mikrotom (RM 2125 RT, Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Almanya) kullanılarak sagittal planda 40 µm kalınlıkta seri kesitler alındı. Kesitler jelatinli lam üzerine yerleştirildi ve termostatik olarak kontrol edilebilen, sıcaklığı 60 °C olan etüvde bekletilme sonrasında mikroskopik inceleme için hematoksilen-eosin ile boyandı.

Stereolojik yöntem

Femur ve tibia eklem kıkırdağında kondrosit sayısı hesabı. Her bir femur ve tibia da toplam kondrosit sayısı, optik parçalama (optical fractionator) yöntemi kullanılarak hesaplandı.^[14] Toplam kondrosit sayısının tarafsız hesabı, femur ve tibiadan sistematik rastgele örnekleme işlemine göre her bir 30. kesit seçilerek elde edildi.^[15] Bu çalışma için 1225/90000 µm²'lik bir örnekleme alanı, en uygun alan olarak bulundu. Mikrotomla her kesme işlemi sırasında, kesitin alt ve üst yüzeyinde, önceki veya sonraki kesite ait bazı partiküller (hücreler) kesilmeden kalabileceğinden, bazı partikül uçları ise kesildikten sonra boyama sırasında yerinden ayrılp düşebileceğinden (lost caps), kesitin üst ve alt kısmındaki, güvenlik kuşağı adı verilen, yüksekliği partikül yarıçapından az olmayan bölgeler sayım harici tutuldu. Yani, partikül sayımı kesit kalınlığının tamamında değil, alt ve üst kısmı hariç tu-



Şekil 1. Optik parçalama tekniğinin uygulamasını göstermek için kullanılan tibia kesitinin panoramik görünümü. Her bir örneklenen kesit ve örnekleme alanı sistematik rastgele yöntemle seçildi. (a) Tibia kesitlerinin eklem kıkırdağında hücre sayımı için sistematik rastgele olarak örneklenen alan, tarafsız sayım çerçevesi ile birlikte kareler olarak gösterildi. Karelerin her bir kenarı örneklenen alanların x ve y adım büyüklüğünü göstermektedir (H-E x 4). (b) Sayım çerçevesi bu örnekleme alanlarından biri büyütüldü. Tarafsız sayım çerçevesi kurallarına göre kondrosit sayımları yapıldı (H-E x 100).

tularak, kesit kalınlığı örnekleme (h/t) yapıldı. Kesit kalınlığının en üstündeki 5 µm'lik bölge, üst güvenlik kuşağı olarak bırakıldı, disektör yüksekliği 10 µm olarak seçildi.^[15] Böylece, kesit kalınlığı örnekleme oranı 10 µm/t olarak kullanıldı. Burada "t" ortalama kesit kalınlığını temsil etmektedir. Stereolojik analiz için yarıotomatik stereoloji iş istasyonu kullanıldı. Bu sistem CCD dijital kamera (Nikon Coolpix E 4500, Tokyo, Japonya), bilgisayar, bilgisayar kontrollü motorize mikroskop tablası (Prior Scientific, Rockland, MA, ABD), mikrokator (Heidenhein GmbH, Traunreut, Almanya) ve ışık mikroskopundan (Nikon, Eclips E 600) oluşuyordu. Kıkırdak hücreleri 100 büyütme Nikon Plan Apo objektif (NA 1.40) kullanılarak sayıldı. Dijital kamera büyütmesi ile birlikte toplam büyütme 1680 olarak ölçüldü. Her bir kıkırdak hücresi tarafsız sayım kurallarına göre sayıldı.^[16] Toplam kondrosit sayısı (N) aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$N = \sum Q \frac{1}{ssf} \times \frac{1}{asf} \times \frac{1}{tsf}$$

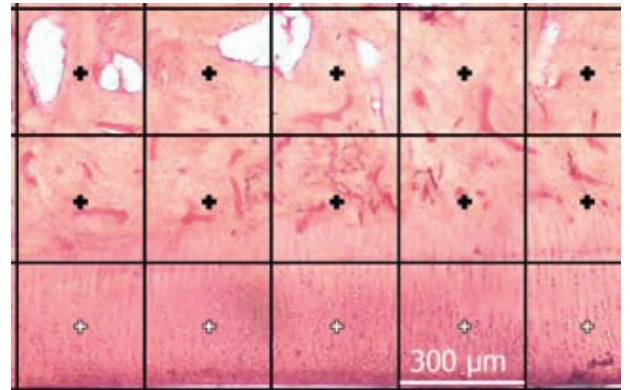
Bu formülde $\sum Q$ tibia ve femur eklem kıkırdaklarının optik olarak örneklenen alanlarında sayılan toplam kıkırdak hücrelerini, *ssf* 1/30 olan kesit örnekleme oranını, *asf* 1225/90000 olan alan örnekleme oranını, *tsf* 10/ortalama kesit kalınlığı olarak alınan kalınlık örnekleme oranını temsil eder (Şekil 1).

Eklem kıkırdağı hacminin hesaplanması. Kıkırdak hücresi sayımının yapıldığı femur ve tibiadan sistematik rastgele olarak alınan kesitler kullanılarak

Cavalieri prensibi ile femur ve tibia eklem kıkırdağı hacmi hesaplaması yapıldı. Kondrosit sayımı yapılırken uygulanan alan örneklemesindeki her bir adım alanı, Cavalieri prensibinde kullanılan her biri belirli bir alanı temsil eden noktalar olarak kullanıldı. Kondrosit sayımı sırasında, sayılacak hücre olsun veya olmasın, eğer adım eklem kıkırdağına isabet etmişse hacim hesaplaması için kullanılan nokta olarak kullanıldı. Böylece, örneklenen kesitler üzerindeki toplam adımlar, toplam noktalar olarak kullanılarak toplam eklem kıkırdağı hacmi aşağıdaki formülle hesaplandı:

$$V_{(\text{eklem kıkırdağı})} = a(p) \times \sum P \times ssf \times t$$

Bu formülde, *a(p)* her bir noktanın temsil ettiği alanı (çalışmamızda adım alanı), $\sum P$ toplam nokta sayısını (çalışmamızda toplam adım sayısı), *ssf* kesit örnekleme oranını ve *t* ortalama kesit kalınlığını (Şekil 2) temsil



Şekil 2. Tibia kesitleri üzerinde Cavalieri prensibinin uygulanması.

etmektedir.^[16] Örneklemenin etkinliği ve toplam kondrosit sayısı için örneklenen hücrelerin yeterliliği ile hacim hesaplaması için adım sıklığı, daha önce tarif edildiği şekilde, hata katsayısı hesabı ve varyasyon katsayısı hesabı ile kontrol edildi.^[15,17]

Sayısal yoğunluk değerinin hesaplanması. Deneklerde hücre sayısı ile hücreler arası matris farklı oranlarda etkilendiğinde ve vücut büyüklükleri farklı olduğu durumlarda sayısal yoğunluk değeri (N_v) (birim hacimdeki hücre sayısı) dokular için daha kullanışlı parametre olmaktadır. Toplam hücre sayısının (N) toplam hacme (V) bölünmesi ile hesaplanır.

Süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi

Sun ve ark.nın^[18] yöntemiyle, ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgemesi esasına dayanır. Oluşan renkli formazonun 560 nm'de absorbanası ölçülerek enzim aktivitesi tayin edildi. Eklem sinovya sıvısı ve plazmadaki SOD aktivitesi U/ml olarak tanımlandı.

Katalaz aktivitesinin belirlenmesi

Aebi^[19] yöntemine göre, deney ortamına eklenen hidrojen peroksit katalaz tarafından su ve oksijene parçalanır. Bu sıradaki absorbanas azalması 240 nm'de ölçülerek enzim aktivitesi tayin edildi. Eklem sinovya sıvısı ve plazmadaki CAT aktivitesi U/ml olarak tanımlandı.

Glutasyon peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi

Paglia ve Valentine'nin^[20] yöntemine göre, GSH-Px, hidrojen peroksit varlığında redükte glutasyonun okside glutatona yükseltgenmesini katalizler. Bu reaksiyonda kullanılan NADPH'nin NADP'ye (nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) yükseltgenmesi sırasındaki absorbanas azalması 340 nm'de ölçülerek enzim aktivitesi hesaplandı. Eklem sinovya sıvısı ve plazmadaki GSH-Px aktivitesi U/l olarak tanımlandı.

Malondialdehit düzeyinin belirlenmesi

Tiobarbitürik asit ile 90-95 °C'de reaksiyona giren MDA ve diğer TBARS (tiobarbitürik asit reaktif maddeler) pembe renkli kromojen oluşturur. On beş dakika sonra hızla soğutulmuş örneklerin absorbanaları 532 nm'de spektrofotometrik olarak okunarak MDA düzeyleri ölçüldü. Eklem sinovya sıvısı ve plazmadaki MDA düzeyi, $\mu\text{mol/l}$ olarak tanımlandı.^[21]

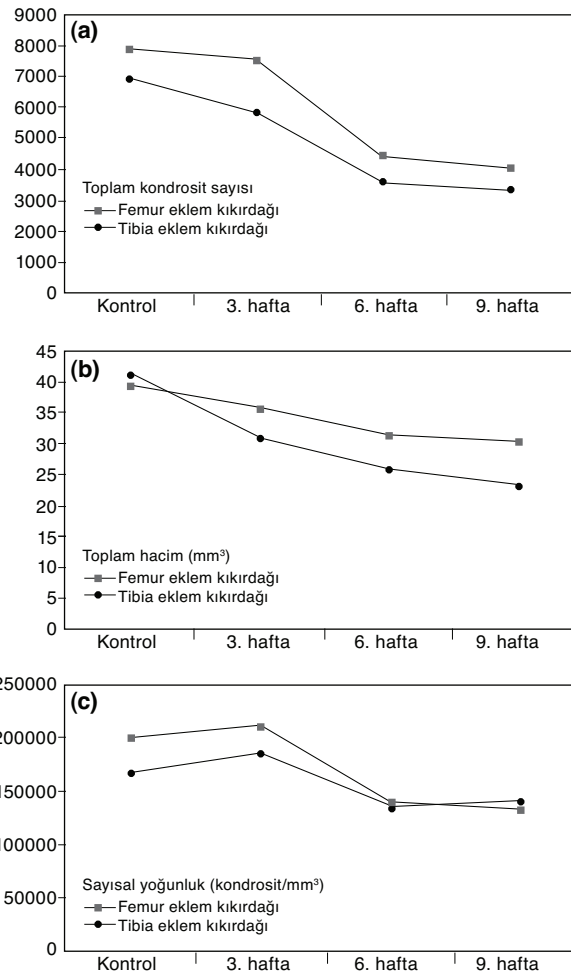
Nitrik oksit düzeyinin belirlenmesi

Griess reaksiyonu ve modifiye kadmiyum reaksiyonu ile üretilen nitrit sülfanilamid ve buna bağlı

NNDA (N-naftiletilediamin) diazotizasyonu ile reaksiyon sonucu oluşan rengin 545 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile belirlendi. Eklem sinovya sıvısı ve plazmadaki NO düzeyi $\mu\text{mol/l}$ birimiyle tanımlandı.^[22]

İstatistiksel değerlendirme

Grupların dağılımı, tek örnekli Kolmogorov-Smirnov testi ile yapıldı. Tekrarlayan ölçümler için ANOVA testi, çoklu karşılaştırmalar için çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Çalışılan testler arasındaki



Şekil 3. Kontrol ve immobilizasyon gruplarının femur kondilleri ve tibia platolarındaki (a) toplam kondrosit sayısı, (b) toplam hacim (mm³) ve (c) sayısal yoğunluk (kondrosit/mm³) grafikleri. Hem femur hem de tibia kıkırdak dokuda, immobilizasyon süresi arttıkça toplam kondrosit sayısı ve toplam hacim tedrici olarak azalmakta ($p < 0.001$). Sayısal yoğunluk açısından ise, üç haftalık immobilizasyon grubunda arttığı, altı haftalık grupta azaldığı, dokuz haftalık grupta ise azalmanın durağanlaştığı gözlenmektedir ($p < 0.001$).

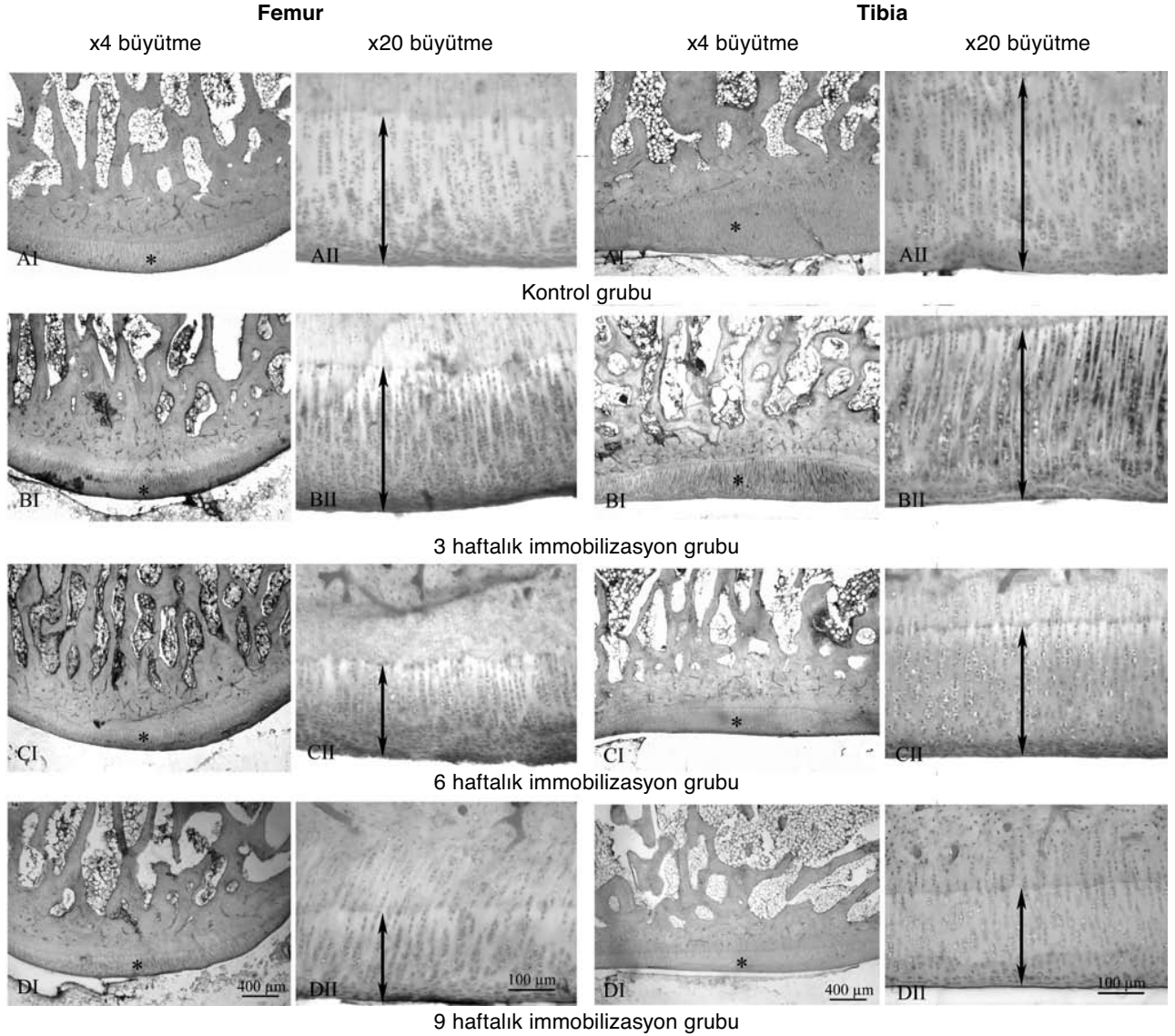
ilişkiyi göstermek için Pearson korelasyon katsayısı kullanıldı. Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi; istatistiksel hesaplamalar için SPSS istatistik programı kullanıldı. $P<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Sonuçlar

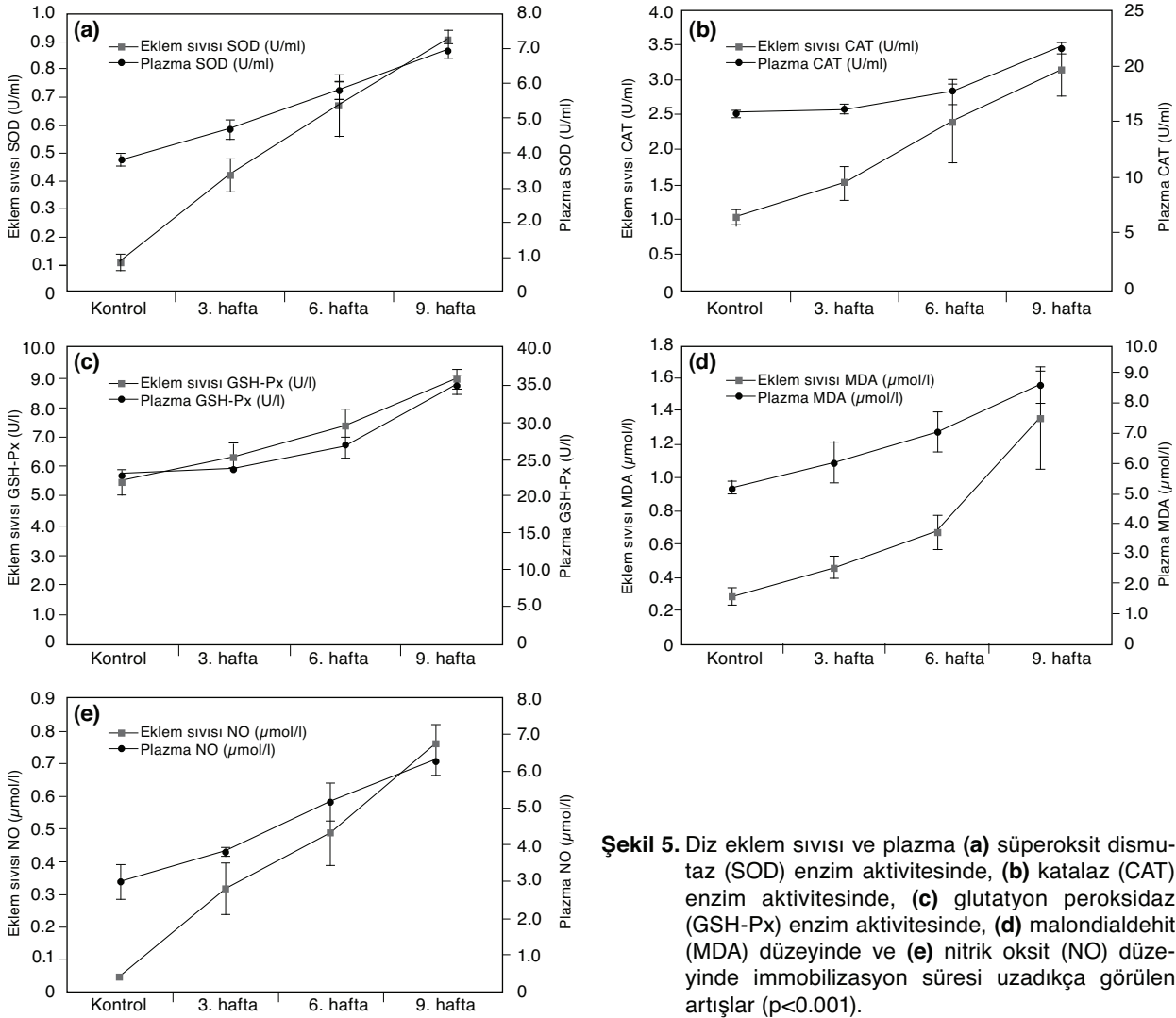
İmmobilizasyon süresinin sonuna doğru, diz eklemlerinin hem femur kondilleri hem de tibia platolarında toplam kondrosit hacmi ve sayısında belirgin azalma saptandı ($p<0.001$) (Şekil 3, 4). İmmobilizasyonun üçüncü haftasında, femur kondil ve tibia platosu kondrositlerinin sayısal yoğunluğunda, kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı

artış gözlenmesine karşın, altı ve dokuz haftalık immobilizasyon süresi sonrasında kondrosit sayısal yoğunluğu belirgin azalma gösterdi ($p<0.001$; Şekil 3c). Toplam kondrosit sayısı, hacmi ve sayısal yoğunluğunda, kontrol grubuna göre en belirgin azalma dokuz haftalık immobilizasyon grubunda görüldü ($p<0.001$).

İmmobilizasyon gruplarında sinovyal sıvı ve kan plazmasında SOD, CAT, GSH-Px enzimatik aktiviteleri ve MDA ve NO düzeyleri, kontrol grubundan belirgin şekilde daha yüksek bulundu. Kontrol grubu ile immobilizasyon grubu arasındaki bu farklılık, immobilizasyon süresi uzadıkça artmakta idi ($p<0.001$) (Şekil 5).



Şekil 4. Tavşan dizlerinden elde edilen femur ve tibia mikrografileri. İmmobilizasyon gruplarında, diz immobilizasyon süresi arttıkça eklem kıkırdak kalınlığında belirgin azalma gözlenmektedir.



Şekil 5. Diz eklem sıvısı ve plazma (a) süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesinde, (b) katalaz (CAT) enzim aktivitesinde, (c) glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktivitesinde, (d) malondialdehit (MDA) düzeyinde ve (e) nitrik oksit (NO) düzeyinde immobilizasyon süresi uzadıkça görülen artışlar ($p<0.001$).

Tartışma

Eklem immobilizasyonunun kıkırdak dokuda dejeneratif ve atrofik değişikliklere neden olduğu yapılan deneysel çalışmalarla ortaya konmuştur.^[1-3] Immobilizasyon, kıkırdak dokuda, glukozaminoglikanlar ve kolajen çapraz bağlantılarında (cross-linking) azalmaya, kıkırdak dokuda yumuşama ve dejeneratif değişikliklere neden olmaktadır.^[1,3,5,7,23] Ayrıca, immobilizasyon sonrasında gelişen kıkırdak atrofisinin, tekrar mobilizasyonla tamamen düzelmediği gösterilmiştir.^[5]

Immobilizasyon sonrasında kıkırdak dokusunda meydana gelen dejeneratif değişikliklerin, mekanik streslerin artması veya sinovyal membranın dejenerasyonundan dolayı eklem kıkırdağının beslenmemesinin bir sonucu olduğu bildirilmektedir.^[1,3,5,7]

Fakat, bunun biyokimyasal mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Paukkonen ve ark.^[3] ekstansiyonda sekiz hafta immobilizasyon uyguladıkları tavşan dizlerinde stereolojik çalışmayı sadece tibia lateral platosunda yapmışlar, bu bölgedeki toplam hücre sayısında değişiklik bulmamalarına karşın, kondrositlerde dejeneratif değişiklikler saptamışlardır. Biz de, immobilizasyonun eklem kıkırdak dokusu üzerindeki bu olumsuz etkisini stereolojik çalışma ile ortaya koyduk. Çalışmamızda, stereolojik histolojik incelemede farklı sonuç elde ettik. Çalışmamız, anılan çalışmadan farklı olarak, tüm tibia platosu ve femur kondilinde yapıldı. Tüm immobilizasyon gruplarında toplam hücre sayısı ve toplam kıkırdak hacminde kontrol grubuna göre belirgin azalma saptandı ($p<0.001$). Altı ve dokuz haftalık immobilizasyon gruplarında sayısal yoğunluk azalırken ($p<0.001$), üç haftalık im-

mobilizasyon grubunda sayısal yoğunluğun artması ($p<0.001$) kıkırdak hücre sayısında azalmaya oranla, kıkırdak matriks doku glukozaminoglikan içeriğinin daha belirgin azalmasına atfedilebilir.

Diz osteoartritinin, kıkırdak metabolizmasında bozukluğa neden olan ve ilerleyici kıkırdak yıkımı ile seyreden kronik bir hastalık olduğu bilinmektedir. Kıkırdak metabolizması bozulmasının mekanizması tamamiyle anlaşılammıştır; bundan genetik, yaşlanma, mekanik ve metabolik faktörler sorumlu tutulmaktadır.^[24] Osteoartritli hastaların eklemiçi sıvılarında çok yüksek düzeyde saptanan ROÜ, osteoartrit etyolojisindeki esas etken faktörlerden biri olarak kabul edilmekte ve eklem kıkırdak yıkımından sorumlu tutulmaktadır.^[9-11,25,26] Çalışmamızda da, immobilizasyon gruplarında sinovyal sıvı ve plazmada oksidatif stres artışının bir göstergesi olan MDA, NO düzeyleri ve antioksidan enzim aktiviteleri kontrol grubuna göre oldukça yüksek bulundu. Bu biyokimyasal parametreler, dokuz haftalık immobilizasyon grubunda en yüksek değere ulaştı ($p<0.001$). Bu nedenle ROÜ, immobilizasyon süresince oluşan kıkırdak doku yıkımından sorumlu etken faktörlerden biri olabilir. Bu çalışmada, oksidanların düzeyinin artışı ile birlikte antioksidan enzim aktivitelerinin de yüksek bulunmasını, artan oksidatif strese karşı oluşan kompensatif bir mekanizma sonucu antioksidan enzimlerin aktivitelerindeki artışa bağlıyoruz.

Reaktif oksijen ürünleri, vücutta normal metabolik yollarla üretilir ve hücre fizyolojisinde görevi vardır.^[8,11] Normal koşullarda ROÜ, temizleyiciler (scavenger) tarafından elimine edilir ve antioksidan enzimlerce katalize edilir. Bir metalloprotein olan SOD enzimi, ROÜ'ye karşı ilk savunma sistemidir ve O_2^- radikalini H_2O_2 ve O_2 'ye dönüştürür. Ayrıca, CAT ve GSH-Px antioksidan enzimleri, H_2O_2 'yi, H_2O ve O_2 'ye dönüştürerek detoksifiye ederler ve böylece bu serbest radikalın hücre ve dokularda hasar oluşturmasını önlerler.^[8] Reaktif oksijen ürünleri üretimindeki artış veya antioksidan savunma sistemindeki yetersizlik sonucu, ROÜ hücre membranındaki doymamış yağ asitlerine saldırarak lipid peroksidasyonuna neden olur. Malondialdehit düzeyindeki artış, lipid peroksidasyonunun bir göstergesidir ve diz osteoartritli hastaların sinovyal sıvılarında MDA ve ROÜ yüksek oranda bulunmuştur.^[10,26] Çalışmamızda da immobilizasyon süresinin artışı ile orantılı olarak sinovyal sıvı ve kan MDA düzeyinde belirgin artış görülmesi daha önce yapılmış klinik çalışmaları desteklemektedir.

Klinik çalışmalarda, diz osteoarriti olan hastaların sinovyal sıvılarında antioksidan enzim aktiviteleri, MDA ve ROÜ düzeyinde, kontrol grubuna göre belirgin artış görülmüştür.^[10,26] Bu nedenle, oksidatif stres, osteoartrit etyolojisinde olası metabolik etkenlerden biri olabilir. Çalışmamızda da, immobilize tavşan dizlerinde kıkırdak hücre sayısı ve hacmindeki azalma stereolojik çalışma ile gösterilmiştir. Hücre sayısındaki bu azalma kıkırdak yıkımının bir göstergesidir. Eklem sıvısında ve plazmada NO ve MDA düzeyleri ve SOD, CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinin immobilizasyon süresinin artışı ile orantılı olarak yükseldiği gözlenmiştir ($p<0.001$). Immobilizasyon süresinin artması, kan ve sinovyal sıvıdaki bu biyokimyasal parametreler ile kıkırdak hücresi sayısı arasında negatif bir ilişkiyi ortaya çıkarmakta idi. Kıkırdak dokuya gelen sürekli statik kompresif stresler, kondrositlerden oksidan maddelerin salınımını artırmakta ve oksidatif stres oluşturmakta, bunun sonucunda kıkırdak doku yıkımının oluştuğunu düşünmekteyiz. Bu sonuç, ROÜ ve osteoartrit arasındaki ilişkiyi ortaya koyan klinik çalışmaları destekleyici özelliğindedir.^[10,26]

Sonuç olarak, eklem immobilizasyonu, immobilizasyon süresiyle orantılı olarak oksidatif stres artışı ve kıkırdak doku yıkımına neden olabilir. Bu nedenle, ortopedik hastaların tedavisinde uzun süreli eklem immobilizasyonundan mümkün olduğunca kaçınmak gerekir. Ayrıca, osteoartrit etyolojisinde, ROÜ yaşlanma ve mekanik faktörlere ek olarak önemli bir metabolik etken olabilir.

Kaynaklar

1. Akeson WH, Amiel D, Abel MF, Garfin SR, Woo SL. Effects of immobilization on joints. Clin Orthop Relat Res 1987;(219):28-37.
2. Langenskiöld A, Michelsson JE, Videman T. Osteoarthritis of the knee in the rabbit produced by immobilization. Attempts to achieve a reproducible model for studies on pathogenesis and therapy. Acta Orthop Scand 1979;50:1-14.
3. Paukkonen K, Jurvelin J, Helminen HJ. Effects of immobilization on the articular cartilage in young rabbits. A quantitative light microscopic stereological study. Clin Orthop Relat Res 1986;(206):270-80.
4. Behrens F, Kraft EL, Oegema TR Jr. Biochemical changes in articular cartilage after joint immobilization by casting or external fixation. J Orthop Res 1989;7:335-43.
5. Haapala J, Arokoski JP, Hyttinen MM, Lammi M, Tammi M, Kovanen V, et al. Remobilization does not fully restore immobilization induced articular cartilage atrophy. Clin

- Orthop Relat Res 1999;(362):218-29.
6. Haapala J, Arokoski J, Pirttimäki J, Lyyra T, Jurvelin J, Tammi M, et al. Incomplete restoration of immobilization induced softening of young beagle knee articular cartilage after 50-week remobilization. *Int J Sports Med* 2000;21:76-81.
 7. Jurvelin J, Kiviranta I, Tammi M, Helminen JH. Softening of canine articular cartilage after immobilization of the knee joint. *Clin Orthop Relat Res* 1986;(207):246-52.
 8. Henrotin Y, Kurz B, Aigner T. Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13:643-54.
 9. Martin JA, Brown TD, Heiner AD, Buckwalter JA. Chondrocyte senescence, joint loading and osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res* 2004;(427 Suppl):S96-103.
 10. Ostalowska A, Birkner E, Wiecha M, Kasperczyk S, Kasperczyk A, Kapolka D, et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in synovial fluid of patients with primary and secondary osteoarthritis of the knee joint. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;14:139-45.
 11. Henrotin YE, Bruckner P, Pujol JP. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11:747-55.
 12. Regan E, Flannelly J, Bowler R, Tran K, Nicks M, Carbone BD, et al. Extracellular superoxide dismutase and oxidant damage in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2005;52:3479-91.
 13. Messner K, Gillquist J, Björnsson S, Lohmander LS. Proteoglycan fragments in rabbit joint fluid correlated to arthrosis stage. *Acta Orthop Scand* 1993;64:312-6.
 14. Tunç AT, Turgut M, Aslan H, Sahin B, Yurtseven ME, Kaplan S. Neonatal pinealectomy induces Purkinje cell loss in the cerebellum of the chick: a stereological study. *Brain Res* 2006;1067:95-102.
 15. Gundersen HJ, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 1987; 147:229-63.
 16. Howard CV, Reed MG, editors. *Unbiased stereology: three dimensional measurement in microscopy*. Oxford: Bios Scientific Publishers: 1998.
 17. Schmitz C, Hof PR. Recommendations for straightforward and rigorous methods of counting neurons based on a computer simulation approach. *J Chem Neuroanat* 2000;20:93-114.
 18. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988;34:497-500.
 19. Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press: 1974. p. 673-7.
 20. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-69.
 21. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. In: Packer L, Glazer AN, editors. *Methods in enzymology*. Vol. 186, Oxygen radicals in biological systems. California: Academic Press; 1990. p. 407-21.
 22. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990;36:1440-3.
 23. Vanwanseele B, Lucchinetti E, Stüssi E. The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concepts and future directions. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:408-19.
 24. Guilak F, Fermor B, Keefe FJ, Kraus VB, Olson SA, Pisetsky DS, et al. The role of biomechanics and inflammation in cartilage injury and repair. *Clin Orthop Relat Res* 2004;(423):17-26.
 25. Gutteridge JM. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radic Res Commun* 1993;19:141-58.
 26. Haklar U, Yüksel M, Velioğlu A, Türkmen M, Haklar G, Yalçın AS. Oxygen radicals and nitric oxide levels in chondral or meniscal lesions or both. *Clin Orthop Relat Res* 2002;(403):135-42.