

YÜCEL BİLGİN

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2023



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

DİZ EKLEMİNE LOKAL RİFAMİSİN SV
UYGULAMASININ EKLEM KIKIRDAKLARI ÜZERİNE
POTANSİYEL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜCEL BİLGİN

DANIŞMAN
PROF. DR. ELİF ÖZKÖK

LABORATUAR HAYVANLARI BİLİMİ ANABİLİM
DALI
DENEY HAYVANLARI BİYOLOJİSİ VE
BİYOMEDİKAL UYGULAMA TEKNİKLERİ

İSTANBUL-2023





İTHAF

Değerli eşim Dr. Gizem Sayar Bilgin, kızım İpek Bilgin ve sevgili aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırmaları Enstitüsü Deneysel Hayvanları Anabilim Dalı'nda Deneysel Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Teknikleri Yüksek Lisans programındaki eğitim sürecimde katkıları bulunan Dr. Öğr. Üyesi Mutlu KÜÇÜK, Dr. Öğr. Üyesi Aydın ÇEVİK, Doç. Dr. Rivaze Kalaycı ve Arş. Gör. Dr. Gül BAKIRER ÖZTÜRK hocalarıma teşekkür ederim

Eğitim sürecimizin teorik kısmında yayın etiğiyle ilgili bizleri değerli bilgileriyle ve tecrübeleriyle donatan tez sürecinde de tez danışmanım olarak görev alan ve tezimin her sürecinde bana destek olan değerli hocam Prof. Dr. Elif ÖZKÖK'e ayrıca teşekkür ederim.

Eğitimimiz süresince bizlere her zaman yardımcı olan İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırmaları Enstitüsü'nün değerli çalışanlarına da teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	Vİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Vİİİ
ÖZET	X
ABSTRACT.....	Xİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. RİFAMİSİNLER.....	2
2.1.1. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1.2. ETKİ MEKANİZMASI.....	2
2.1.3. TÜREVLERİ.....	2
2.1.4. ETKİ SPEKTRUMU.....	3
2.1.5. FARMAKOKİNETİK.....	3
2.1.6. İSTENMEYEN ETKİLER.....	3
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	4
3.1. ENJEKSİYON TEKNİĞİ.....	4
3.1. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME.....	6
3.3. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME.....	12
4. BULGULAR.....	12
4.1. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR.....	12
5. TARTIŞMA.....	21
KAYNAKLAR.....	24
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	28

TABLULAR LİSTESİ

Tablo-1: Uluslararası Osteoartrit Araştırma Derneği (OARSI - Osteoarthritis Research Society International) kıkırdak histopatolojik derecelendirme sistemi⁷

Tablo-2: Uluslararası Osteoartrit Araştırma Derneği (OARSI - Osteoarthritis Research Society International) kıkırdak histopatolojik evrelendirme sistemi⁷.

Tablo-3: Uluslararası Osteoartrit Araştırma Derneği (OARSI - Osteoarthritis Research Society International) kıkırdak histopatolojik derecelendirme ve evrelendirme sistemi skor hesaplaması⁷.

Tablo-4: Sıçanların diz eklemlerinde görülen histopatolojik inflamatuvar değişikliklerin derecelendirilmesi.

Tablo-5: D1 ve K1 gruplarındaki sıçanların diz eklemlerinde görülen histopatolojik kıkırdak değişikliklerinin derecelendirilmesi

Tablo-6: D1 ve K1 gruplarındaki sıçanların diz eklemlerinde görülen histopatolojik kıkırdak değişikliklerinin evrelendirilmesi

Tablo-7: D1 ve K1 gruplarındaki sıçanların diz eklemlerinde görülen histopatolojik kıkırdak skorları

Tablo-8: D2 ve K2 gruplarındaki sıçanların diz eklemlerinde görülen histopatolojik kıkırdak değişikliklerinin derecelendirilmesi

Tablo-9: D2 ve K2 gruplarındaki sıçanların diz eklemlerinde görülen histopatolojik kıkırdak değişikliklerinin evrelendirilmesi

Tablo-10: D2 ve K2 gruplarındaki sıçanların diz eklemlerinde görülen histopatolojik kıkırdak skorları

Tablo-11: D1 ve K1 gruplarındaki sıçanların diz eklemlerinde görülen sinovyal inflamasyon dereceleri

Tablo-12: D2 ve K2 gruplarındaki sıçanların diz eklemlerinde görülen sinovyal inflamasyon dereceleri

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil-1: Sağ diz üzerinde enjeksiyon öncesi patella, patellar tendon ve tüberositas tibianın belirlenmesi

Şekil-2: İntra-artiküler rifamisin SV enjeksiyonunun uygulanması

Şekil-3: Tüm örneklerin numaralandırılmış %10 formaldehit içeren kaplara alınmış görüntüsü

Şekil-4: Distal femur eklem kıkırdaklarının makroskopik görünümü

Şekil-5: Proksimal tibia eklem kıkırdaklarının makroskopik görünümü

Şekil-6: 1. Derece kıkırdak hasarı tespit edilen örneğin histopatolojik görünümü

Şekil-7: 2. Derece kıkırdak hasarı tespit edilen örneğin histopatolojik görünümü

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

D1: Deney grubu 1

D2: Deney grubu 2

K1: Kontrol grubu 1

K2: Kontrol grubu 2

OARSI: Osteoarthritis Research Society International



ÖZET

Bilgin Y. Diz Eklemine Lokal Rifamisin SV Uygulamasının Eklem Kıkırdakları Üzerine Potansiyel Etkilerinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Deney Hayvanları ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2023.

Rifamisin geniş spektrumlu antimikrobiyal bir ajan olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, Rifamisin SV'nin anti-enflamatuvar özelliği gösterilmiştir.

Çalışmamızda, Rifamisin SV'nin eklem içi kullanımının eklem kıkırdakları üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Wistar albino cinsi erkek sıçanlar deney ve kontrol gruplarını oluşturmak üzere (n=8 her bir grup içinde) 32 adet sıçan çalışmaya alındı. Deney grubunu (D1 ve D2) oluşturan sıçanların sağ dizlerine 5mg/kg doz olacak şekilde Rifampisin SV (Rif; Koçak Farma, Türkiye) enjeksiyonu yapılırken, kontrol grubu için (K1 ve K2) ayrılan sıçanların sağ dizlerine % 0,9'luk izotonik sodyum klorür / 20 mikrolitre uygulaması yapıldı. D1 ve K1 gruplarındaki sıçanlar 7. gün, D2 ve K2 gruplarındaki sıçanlar ise 28. günde sakrifiye edildiler. Diz eklem bağlarıyla birlikte femur ve tibia kemik örnekleri kas dokularından ayrılarak %10 formaldehit içine konuldu. Eklem kıkırdak yapıları ve sinovyal inflamasyonun incelenmesi makroskopik ve histopatolojik değerlendirmelerle gerçekleştirildi. Kıkırdak yapılarının değerlendirilmesinde Uluslararası Osteoartrit Araştırma Derneğinin (OARSI) histopatolojik derecelendirme ve evrelendirme sistemi kullanıldı. Çalışmamızda anlamlılık derecesi olarak $p<0,05$ alınmıştır.

D1 ve K1 grupları arasında kıkırdak hasarı dereceleri, evreleri ve skorları açısından fark bulunmadı ($p=0,117$, $p=0,197$, $p=0,197$; sırasıyla). Aynı şekilde, D2 ve K2 grupları arasında kıkırdak hasarı dereceleri, evreleri ve skorları arasında anlamlı fark tespit edilmedi ($p=0,077$, $p=0,061$, $p=0,062$; sırasıyla). D1 ve K1 grupları sinovyal inflamasyon dereceleri yönünden incelendiğinde rifamisin SV uygulanan grupta sinovyal inflamasyonun daha fazla olduğu saptandı ($p<0,001$). Buna karşılık, D2 ve K2 grupları arasında sinovyal inflamasyon derecelerinin anlamlı fark oluşturmadığı bulundu ($p=0,256$).

Çalışmamızın sonucunda eklem içi rifamisin SV uygulamasının eklem kıkırdakları üzerine olumsuz etki yapmadığı, erken dönemde sinovyal inflamasyonu arttırmış olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Rifamisin, diz, kıkırdak, enjeksiyon, lokal

ABSTRACT

Bilgin Y. Tezin Investigation of the Potential Effects of Local Rifamycin SV Application to the Knee Joint on Articular Cartilages. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Experimental Animals, Thesis, İstanbul, 2023.

Rifamycin is widely used as a broad-spectrum antimicrobial agent. In recent studies, the anti-inflammatory properties of Rifamycin SV have been demonstrated.

In our study, it was aimed to examine the effect of intra-articular use of Rifamycin SV on articular cartilages. Wistar albino male rats were included in the study to form the experimental and control groups (n=8 in each group). While a 5mg/kg dose of Rifampicin SV (Rif; Koçak Farma, Turkey) was injected into the right knees of the rats in the experimental group (D1 and D2), 0.9% isotonic sodium was applied to the right knees of the rats allocated for the control group (K1 and K2). chloride / 20 microliter was applied. The rats in groups D1 and K1 were sacrificed on the 7th day, and the rats in the D2 and K2 groups were sacrificed on the 28th day. The femur and tibia bone samples, together with the knee joint ligaments, were separated from the muscle tissues and placed in 10% formaldehyde. Examination of articular cartilage structures and synovial inflammation was performed by macroscopic and histopathological evaluations. The histopathological grading and staging system of the International Society for Osteoarthritis Research (OARSI) was used to evaluate the cartilage structures. In our study, $p < 0.05$ was taken as the degree of significance.

There was no difference between D1 and K1 groups in terms of cartilage damage degrees, stages and scores ($p=0.117$, $p=0.197$, $p=0.197$, respectively). Likewise, no significant difference was found between the degrees of cartilage damage, stages and scores between the D2 and K2 groups ($p=0.077$, $p=0.061$, $p=0.062$, respectively). When the D1 and K1 groups were examined in terms of the degree of synovial inflammation, it was found that synovial inflammation was more common in the rifamycin SV group ($p < 0.001$). On the other hand, synovial inflammation degrees did not differ significantly between D2 and K2 groups ($p=0.256$).

As a result of our study, it was determined that intra-articular administration of rifamycin SV did not have a negative effect on articular cartilages and increased synovial inflammation in the early period.

Keywords: Rifamycin, knee, cartilage, injection, local

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diz eklemi, hareket kabiliyetini sağlayan ve vücut ağırlığını destekleyen önemli bir yapıdır. Eklem kıkırdağı, bu eklemin sağlıklı işlevini korumak ve kıkırdak hasarı sonucu ortaya çıkan eklem rahatsızlıklarını önlemek için önemli bir rol oynar. Diz eklemi kıkırdak hastalıkları, dejeneratif değişiklikler, travmatik yaralanmalar ve septik artrit gibi durumlar nedeniyle yaygın olarak görülmektedir. Mevcut tedavi seçenekleri genellikle semptomları hafifletmek veya hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak amacıyla kullanılan ağrı kesiciler, anti-enflamatuvar ilaçlar ve fizyoterapi gibi yöntemleri içermektedir. Ancak, bu tedavi yöntemleri genellikle sınırlı etkinlik göstermektedir ve eklem kıkırdağı onarılamaz hasarlarla karşı karşıya kalabilmektedir.

Rifamisinler oldukça geniş spektrumlu antimikrobiyal ajanlardır. Yaygın olarak bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, son çalışmalar, rifamisin SV'nin anti-enflamatuvar ve hücre sel koruyucu özelliklere sahip olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, rifamisin SV'nin diz eklemi kıkırdakları üzerindeki etkisini değerlendirmek ileride septik artrit tedavisinde potansiyel bir tedavi stratejisi olarak kullanılabilirliğini belirlemek için önemli olabilir.

Bu hayvan deneyi çalışmasının amacı, rifamisin SV'nin intraartiküler uygulamasının diz eklemi kıkırdakları üzerindeki etkisini histopatolojik analizler kullanarak araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Rifamisinler

2.1.1. Genel Bilgiler

Rifamisinler ilk olarak 1957'de Sensi tarafından Dow-Lepetit Araştırma Laboratuvarında keşfedilen antimikrobiyal ilaç grubudur¹. Toprak örneğinden izole edilen yeni bir aktinomiçes şusu olan *Streptomyces mediterranei*'nin kültürü sırasında Gram pozitif bakterileri ön planda inhibe eden moleküller ürettiği tespit edilmiştir. Bu moleküllere rifamisin A, B, C, D ve E isimleri verilerek rifamisin kompleks aile olarak tanımlanmıştır². Rifamisin B'nin okside edilip hidrolize edilerek rifamisin SV üretilmiştir. Parenteral uygulama yoluyla etkili olan rifamisin SV, klinik olarak kullanılan ilk rifamisinidir².

2.1.2. Etki Mekanizması

Rifamisinler, RNA(Ribonükleik asit) polimerazın β alt ünitesine bağlanarak etki gösterir. RNA polimeraz aktivitesini inhibe eder. Rifamisinler bakteriler başta olmak üzere prokaryotik canlılarda RNA polimerazı güçlü bir şekilde inhibe ederken memeliler başta olmak üzere ökaryotik canlılarda RNA polimerazı inhibe etmemektedirler³.

2.1.3. Türevleri

Streptomyces mediterranei tarafından sentezlenen rifamisin A,B,C,D ve E doğal rifamisinlerdir. Rifamisin B kullanılarak sentetik diğer rifamisin türleri üretilmiştir. Bunların başlıcaları; rifampisin, rifabutın, rifamid, rifamisin SV, rifapentin ve rifaksimindir⁴.

2.1.4. Etki Spektrumu

Oral veya parenteral yolla kullanılan rifamisinlerin etki spektrumu oldukça geniştir. Streptococcus pneumoniae başta olmak üzere streptokok türlerinin çoğunda, neisseria meningitidis, neisseria gonorrhoeae, clamidia ve brucella türlerine etkilidir. Metisiline dirençli stafilokok ve vankomisin dirençli entrokoklara karşı tedavi de kullanılmaktadır. Tüberküloz tedavisinde tüm kombinasyonlarda yer alır⁴. Stafilokokal biyofilmlere karşı etkinlikleri nedeniyle stafilokokal periprostetik eklem enfeksiyonlarının tedavisi için de önerilmektedir⁵.

2.1.5. Farmakokinetik

Oral veya parenteral yolla vücuda alınan rifamisinler karaciğerde metabolize olarak aktif metabolitler şeklinde safra içeriğiyle birlikte barsak yoluyla vücuttan atılır. Barsaktan metabolitlerin geri emilimi bulunmamaktadır. Ayrıca bir miktar idrarla da atılımı mevcuttur⁴. Karaciğer yetmezliği olan hastalarda doz ayarı yapılmalıdır.

2.1.6. İstenmeyen Etkiler

Hepatik ve immunoallerjik istenmeyen etkiler görülebilir. Hepatik toksisite doza bağlıdır. Esas olarak altta yatan karaciğer hastalığı olan hastalarda gözlemlenmiş olsa da, immünoallerjik etkiler genellikle aralıklı veya uzun süreli tedavi ile ilişkilidir. İmmünoallerjik etkiler majör veya minör olabilir. Başlıca minör etkiler; gastrointestinal veya influenza etkilerdir. Başlıca majör etkiler; hemolitik anemi, şok veya böbrek yetmezliği şeklindedir⁶.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız için İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 2021/17 karar nosuyla etik kurul onayı alınmıştır. Çalışmanın deneysel bölümü İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırmaları Enstitüsü Deney Hayvanları Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada 9-10 aylık, 380-420 gr ağırlıklarda, 32 adet Wistar albino cinsi erkek sıçan kullanılmıştır. Denekler rastlantısal olarak 8'er sıçan içeren 4 gruba ayrılmıştır. Grupların ikisi deney grubu 1 (D1) ve deney grubu 2 (D2) olarak tanımlanmıştır. Diğer iki grup kontrol grubu 1 (K1) ve kontrol grubu 2 (K2) olarak tanımlanmıştır. Çalışma süresince sıçanlara standart pelet kemirgen yemi (ad libitum) verilmiştir ve suya ulaşmaları serbest bırakılmıştır. Hayvanlar 12 saat gece, 12 saat gündüz ritmiyle $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta ve $\% 55 \pm 10$ nem düzeyinde standart oda koşullarında uygun kafeslerde barındırılmıştır.

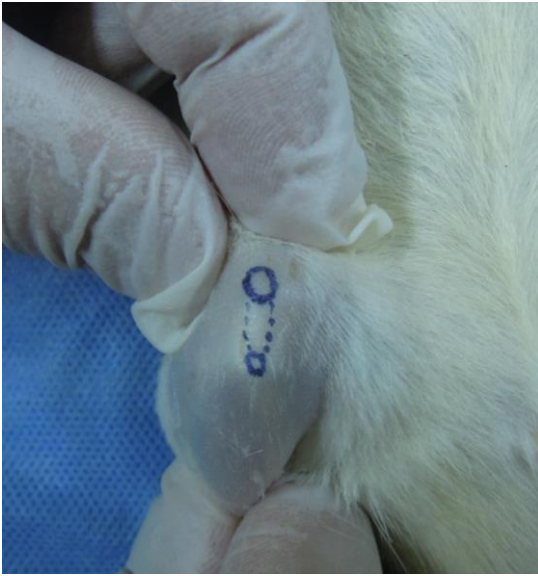
Deney gruplarındaki sıçanların sağ dizlerine 5mg/kg dozunda rifampisin SV (Rif; Koçak Farma, Türkiye) ve kontrol gruplarındaki sıçanların sağ dizlerine $\%0,9$ 'luk izotonik sodyum klorür (Polifleks; Polifarma, Türkiye) 20 mikrolitre enjekte edildi.

D1 - K1 grubundaki denekler 7. günün bitiminde ve D2 - K2 grubundaki denekler 28. günün bitiminde sakrifiye edildi. Sakrifikasyon yüksek doz 200 mg/kg pentotal kullanılarak yapıldı. Sakrifikasyon sonrası deneklerin sağ alt ekstremitesi uygun şekilde antisepsi ve hazırlık işlemi sonrası kalça dezartikülasyonu uygulanarak alındı. Kas dokuları ayrıldı. Sağ femur ve tibia kemikleri diz eklemi bağlarıyla birlikte korunarak $\%10$ formaldehit solüsyonu içeren örnek kaplarına teker teker numaralandırılarak yerleştirildi. İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Laboratuvarına histopatolojik inceleme için ulaştırıldı.

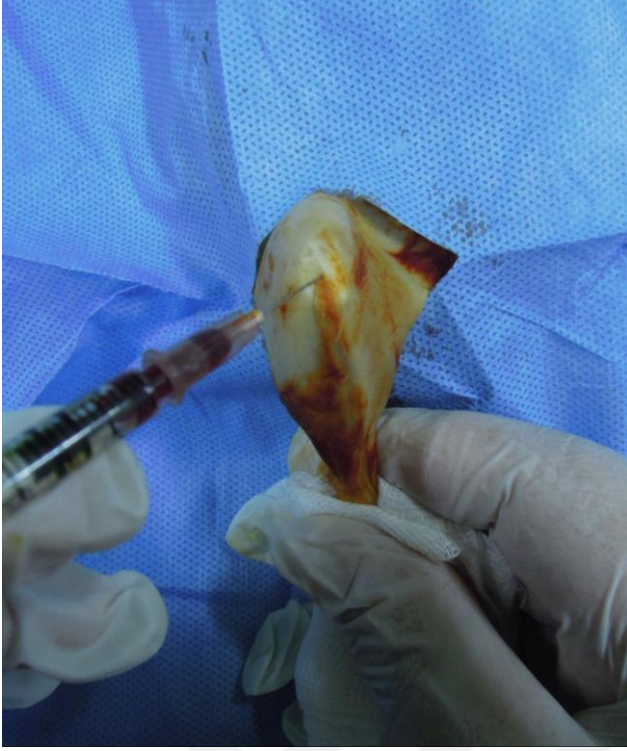
3.1. Enjeksiyon Tekniği

İşlemler öncesi tüm hayvanlar tartılıp ağırlıkları kayıt altına alındı. Anestezi işlemi olarak 5 mg/kg xylazine hydrochloride (Rompun; Bayer Healthcare, Leverkusen, Almanya) ve 50 mg/kg ketamine hydrochloride (Ketalar; Pfizer, Türkiye) intraperitoneal uygulandı. Ardından hayvanların supin pozisyonda sağ dizleri traş

edildi. Patella, patellar tendon ve tuberositas tibia cilt kalemiyle cilt üzerinde işaretlendi (Şekil-1). 10% povidone iodine (Batticon; Adeka, Türkiye) ile cilt antisepsisi sağlandı. Enjeksiyonlar patella ile tuberositas tibia arasının orta yerinden transpatellar yol kullanılarak yapıldı. Enjeksiyonlar 26G kalınlığında iğne ucu bulunan tüberkülin enjektörleri kullanılarak yapıldı (Şekil-2). Deney gruplarındaki (D1-2) tüm hayvanlara 1,5mg / 20 mikrolitre rifampisin SV (Rif; Koçak Farma,Türkiye) ve kontrol gruplarındaki (K1-2) hayvanlara %0,9'luk izotonik sodyum klorür / 20 mikrolitre enjekte edildi. Anestezinin etkisi tamamlanınca deneklerin kafes içinde yük vermelerine ve serbest dolaşımına izin verildi. Ağrı takibi yapıldı. Enjeksiyon sonrası diz hareketlerinde etkilenme ve yürüme bozukluğu gelişme ihtimali dolayısıyla işlem sonrası her deney hayvanı bir kafeste olacak şekilde barınma ve bakım koşulları sağlandı. 24 saat sonra tüm deneklerin aktif olduğu ve ağrı belirtisi göstermediği tespit edilerek 4 hayvanlık sosyal kafes düzenin geçilerek takip edildi.



Şekil-1: Sağ diz üzerinde enjeksiyon öncesi patella, patellar tendon ve tüberositas tibianın belirlenmesi



Şekil-2: İntra-artiküler rifamisin SV enjeksiyonunun uygulanması

3.2 Histopatolojik Değerlendirme

Histopatolojik inceleme İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Laboratuvarında gerçekleştirildi. %10 formaldehit içeren numaralandırılmış örnek kaplarında (Şekil-3) diz eklemi korunmuş femur ve tibia içeren materyallere mikroskopik inceleme için %10 hidroklorik asit kullanılarak dekalsifikasyon uygulandı (Şekil-4,5). Sonrasında mikrotom kullanılarak eklem yüzeyine dik olacak şekilde 5 – mikrometre kalınlığında longitudinal kesitler alındı. Hematoksilen eosine ve Safranin O boyaları kullanılarak boyama işlemi yapılarak ışık mikroskobu (Olympus® BX51) altında incelendi. Kıkırdak yapıların değerlendirilmesi için Uluslararası Osteoartrit Araştırma Derneği (OARSI - Osteoarthritis Research Society International) kıkırdak histopatolojik derecelendirme ve evrelendirme sistemi kullanıldı (Tablo-1,2,3) (Şekil-6,7) ⁷. Bu sistemde kıkırdak hasarları derecelendirmekte ve evrelendirilmektedir. Tespit edilen derece ve evre değerleri çarpılarak osteoartrit skoru hesaplanmaktadır. Ayrıca sinovyal inflamasyon histopatolojik incelemesinde H. Özyuvacı ve ark. yayınlarında kullandığı beş puanlık bir skalaya göre derecelendirilme yapıldı (Tablo-4) ⁸.



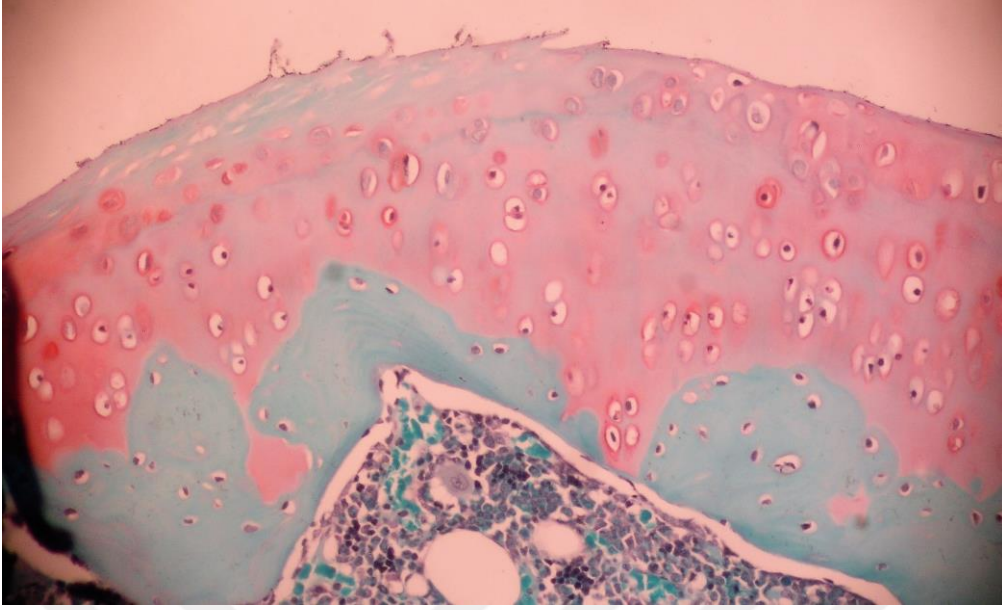
Şekil-3: Tüm örneklerin numaralandırılmış %10 formaldehit içeren kaplara alınmış görüntüsü



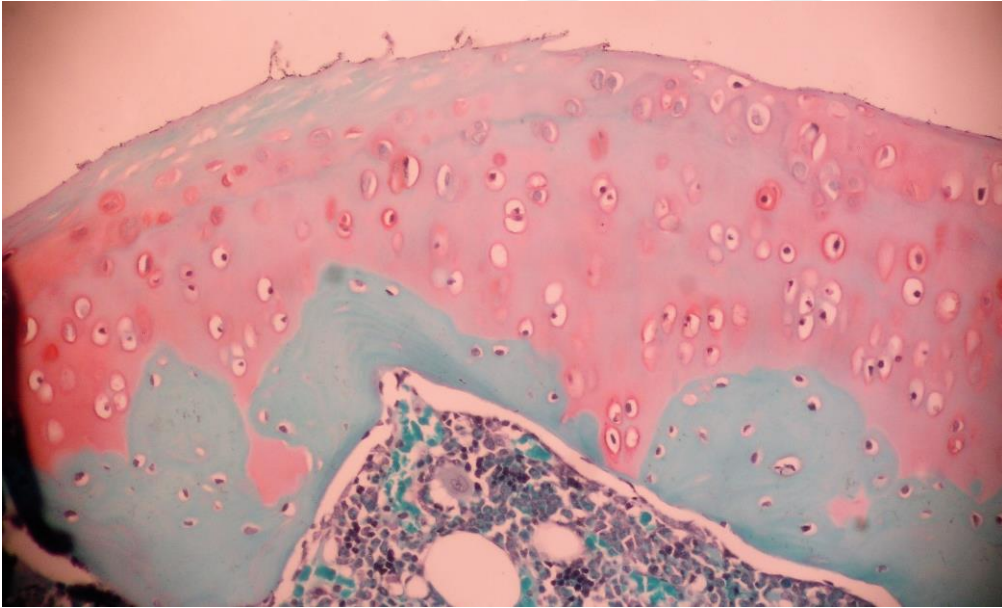
Şekil-4: Distal femur eklem kıkırdaklarının makroskopik görünümü



Şekil-5: Proksimal tibia eklem kıkırdaklarının makroskopik görünümü



Şekil-6: 1. Derece kıkırdak hasarı tespit edilen örneğin histopatolojik görünümü



Şekil-7: 2. Derece kıkırdak hasarı tespit edilen örneğin histopatolojik görünümü

Örnekler hangi grupta olduğu belirtilmeden numaralandırılarak patoloji laboratuvarına gönderildi. Tüm örneklerin histopatolojik incelemesi tek patolog (Uzm.Dr. Merve CİN) tarafından yapıldı.

Tablo-1: Uluslararası Osteoartrit Araştırma Derneği (OARSI - Osteoarthritis Research Society International) kıkırdak histopatolojik derecelendirme sistemi⁷

Derece (Anahtar Özellik)	İlgili Kriterler (Doku Reaksiyonu)
Derece 0: Yüzey sağlam, kıkırdak morfolojisi normal.	Matris: normal mimari Hücreler: bozulmamış, uygun oryantasyonda
Derece 1: Yüzey sağlam.	Matris: yüzeysel bölge sağlam, ödem ve/veya yüzeysel fibrilasyon (aşınma), fokal yüzeysel matris yoğunlaşması Hücreler: ölüm, çoğalma (kümeler), hipertrofi, yüzeysel bölge Reaksiyon yalnızca yüzeysel fibrilasyondan daha fazla olmalıdır Yukarıdaki gibi + Yüzeysel bölgede matris devamsızlığı (derin fibrilasyon)
Derece 2: Yüzeyde devamsızlık.	± Kıkırdak üst 1/3'te katyonik boyanmada matrisin azalması (Safranin O veya Toluidin Mavisi) ± Fokal perikondronal artmış boyanma (orta bölge) ± Kondral sütunlarının oryantasyon bozukluğu Hücreler: ölüm, çoğalma (kümeler), hipertrofi Yukarıdaki gibi
Derece 3: Dikey çatlaklar (yarıklar)	Orta bölgede matris dikey çatlakları, dallanmış çatlaklar ± Kıkırdağın alt 2/3'üne (derin bölge) katyonik boyanma kaybı (Safranin O veya Toluidin Mavisi) ± Yeni kolajen oluşumu (polarize ışık mikroskobu,

	Picro Sirius Red boyama)
	Hücreler: ölüm, rejenerasyon (kümeler), hipertrofi, fissürlere bitişik kıkırdak alanları
Derece 4: Erozyon	Kıkırdak matris kaybı: yüzeysel tabakanın delaminasyonu, orta tabakada kist oluşumu Oyuk: matris kaybı yüzeysel katman ve orta katman
Derece 5: Soyulma	Yüzey: soyulmuş yüzey içinde fibrokartilaj dahil olmak üzere sklerotik kemik veya onarıcı doku. Kemik yüzeyiyle sınırlı onarımlı mikrokırık.
Derece 6: Deformasyon	Kemik yeniden şekillenmesi (sadece osteofit oluşumundan daha fazlası). Kapsananlar: önceki yüzeyin üzerine uzanan fibrokartilajinöz ve kemik onarımlı mikrokırık

Tablo-2: Uluslararası Osteoartrit Araştırma Derneği (OARSI - Osteoarthritis Research Society International) kıkırdak histopatolojik evrelendirme sistemi⁷.

Evre	% Etkilenim (yüzey, alan, hacim)
Evre 0	Osteoartrit yok.
Evre 1	<% 10
Evre 2	% 10-25
Evre 3	% 25-50
Evre 4	>% 50

Tablo-3: Uluslararası Osteoartrit Araştırma Derneği (OARSI - Osteoarthritis Research Society International) kıkırdak histopatolojik derecelendirme ve evrelendirme sistemi skor hesaplaması⁷.

Derece	Evre			
	E1	E2	E3	E4
D1	1	2	3	4
D2	2	4	6	8
D3	3	6	9	12
D4	4	8	12	16
D5	5	10	15	20
D6	6	12	18	24

Tablo-4: Sıçanların diz eklemlerinde görülen histopatolojik inflamatuvar değişikliklerin derecelendirilmesi.

Derece	Histopatolojik Değişiklikler
Derece 1	İnflamasyon yok.
Derece 2	Minimal inflamasyon: hafif konjesyon ve ödem.
Derece 3	Hafif inflamasyon: eklem yüzeyinde aşınma, konjesyon ve ödem, az sayıda nötrofil.
Derece 4	Orta derecede inflamasyon: nötrofiller ve makrofajlar, sinoviyal hiperplazisi.
Derece 5	Şiddetli inflamasyon: nötrofiller ve makrofajlar, sinoviyal hiperplazi, fibrin eksüdasyonu.

3.3 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için SPSS 23.0 (IBM Corp. Released 2015. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.) programı ve örneklem hesabı için G Power 3.1.9.7 (Franz Faul, Germany) programı kullanılmıştır.

Örneklem hesabı için Jacobs HN. ve arkadaşlarının “Intra-articular Injection of Urinary Bladder Matrix Reduces Osteoarthritis Development?” çalışmasındaki veriler kullanılarak yapılan hesaplamada etki büyüklüğünün $d: 0.849$ olacağı varsayılmıştır. Belirlenen etki büyüklüğü ve %95 güç, %5 hata payıyla yapılan hesaplamada toplam en az 32 örneklem ile çalışılması gerektiği belirlenmiştir.

Kıkırdak skorları ve sinovyal inflamasyon dereceleri arasında karşılaştırma Mann Whitney U testi kullanılarak yapılmıştır. $P < 0.05$ anlamlılık derecesi olarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

Çalışma süresince deney hayvanlarında herhangi bir kayıp ve çalışma dışına alınmasını gerektirecek herhangi bir durum gelişmemiştir. Deney hayvanlarının bağımsız mobilizasyonlarında herhangi bir sorun gözlenmemiş olup enjeksiyon sonrası enfeksiyon durumuyla karşılaşılmamıştır.

4.1 Histopatolojik Bulgular

OARSI kıkırdak histopatolojik derecelendirme ve evrelendirme sistemi kullanılarak yapılan değerlendirme sonuçlarına göre 7. Gün bitiminde sakrifiye edilen sıçanlardan oluşan D1-K1 grupları arasında kıkırdak hasarı dereceleri açısından fark tespit edilmedi ($p=0.117$) (Tablo-5). Kıkırdak hasarı evreleri açısından fark tespit edilmedi ($p=0.197$) (Tablo-6). Kıkırdak skoru açısından fark tespit edilmedi ($p=0.197$) (Tablo-7).

Tablo-5: D1 ve K1 gruplarındaki sıçanların diz eklemlerinde görülen histopatolojik kırkırdak değışikliklerinin derecelendirilmesi

D1 Grubu Sıra No	Kırkırdak Hasarı Derecesi	K1 Grubu Sıra No	Kırkırdak Hasarı Derecesi
1	1	1	0
2	0	2	1
3	0	3	0
4	1	4	0
5	1	5	0
6	0	6	0
7	0	7	0
8	1	8	0
p skoru	0.117		

Tablo-6: D1 ve K1 gruplarındaki sıçanların diz eklemlerinde görülen histopatolojik kırkırdak değışikliklerinin evrelendirilmesi

D1 Grubu Sıra No	Kırkırdak Hasarı Evresi	K1 Grubu Sıra No	Kırkırdak Hasarı Evresi
1	1	1	0
2	0	2	2
3	0	3	0
4	1	4	0
5	1	5	0
6	0	6	0
7	0	7	0
8	1	8	0
p skoru	0.197		

Tablo-7: D1 ve K1 gruplarındaki sıçanların diz eklemlerinde görülen histopatolojik kıkırdak skorları

D1 Grubu Sıra No	Kıkırdak Skoru	K1 Grubu Sıra No	Kıkırdak Skoru
1	1	1	0
2	0	2	2
3	0	3	0
4	1	4	0
5	1	5	0
6	0	6	0
7	0	7	0
8	1	8	0
p skoru	0.197		

28. Gün bitiminde sakrifiye edilen sıçanlardan oluşan D2-K2 grupları arasında kıkırdak hasarı dereceleri açısından fark tespit edilmedi ($p=0.077$) (Tablo-8). Kıkırdak hasarı evreleri açısından fark tespit edilmedi ($p=0.061$) (Tablo-9). Kıkırdak skoru açısından fark tespit edilmedi ($p=0.062$) (Tablo-10).

Tablo-8: D2 ve K2 gruplarındaki sıçanların diz eklemlerinde görülen histopatolojik kıkırdak değişikliklerinin derecelendirilmesi

D2 Grubu Sıra No	Kıkırdak Hasarı Derecesi	K2 Grubu Sıra No	Kıkırdak Hasarı Derecesi
1	2	1	0
2	0	2	2
3	1	3	0
4	3	4	1
5	1	5	0
6	0	6	0
7	1	7	0
8	1	8	0
p skoru	0.077		

Tablo-9: D2 ve K2 gruplarındaki sıçanların diz eklemlerinde görülen histopatolojik kırıldak değişikliklerinin evrelendirilmesi

D2 Grubu Sıra No	Kırıldak Hasarı Evresi	K2 Grubu Sıra No	Kırıldak Hasarı Evresi
1	3	1	0
2	0	2	2
3	1	3	0
4	2	4	1
5	1	5	0
6	0	6	0
7	2	7	0
8	1	8	0
p skoru	0.061		

Tablo-10: D2 ve K2 gruplarındaki sıçanların diz eklemlerinde görülen histopatolojik kıkırdak skorları

D2 Grubu Sıra No	Kıkırdak Skoru	K2 Grubu Sıra No	Kıkırdak Skoru
1	6	1	0
2	0	2	4
3	1	3	0
4	6	4	1
5	1	5	0
6	0	6	0
7	2	7	0
8	0	8	0
p skoru	0.062		

7. gün bitiminde sakrifiye edilen sıçanlardan oluşan D1-K1 grupları sinovyal inflamasyon dereceleri açısından karşılaştırıldığında rifamisin SV uygulanan grupta sinovyal inflamasyon daha fazla tespit edildi ($p<0.001$) (Tablo-11).

Tablo-11: D1 ve K1 gruplarındaki sıçanların diz eklemlerinde görülen sinovyal inflamasyon dereceleri

D1 Grubu Sıra No	Sinovyal İnflamasyon Derecesi	K1 Grubu Sıra No	Sinovyal İnflamasyon Derecesi
1	3	1	1
2	2	2	1
3	2	3	1
4	2	4	1
5	2	5	1
6	2	6	1
7	2	7	1
8	3	8	1
p skoru	<0.001		

28. gün bitiminde sakrifiye edilen sıçanlardan oluşan D2-K2 grupları sinovyal inflamasyon dereceleri açısından karşılaştırıldığında her iki grup arasında fark tespit edilmedi ($p=0.256$) (Tablo-12).

Tablo-12: D2 ve K2 gruplarındaki sıçanların diz eklemlerinde görülen sinovyal inflamasyon dereceleri

D2 Grubu Sıra No	Sinovyal İnflamasyon Derecesi	K2 Grubu Sıra No	Sinovyal İnflamasyon Derecesi
1	2	1	1
2	2	2	4
3	1	3	1
4	2	4	2
5	2	5	1
6	2	6	1
7	1	7	1
8	1	8	1
p skoru	0.256		

5. TARTIŞMA

Rifamisinler RNA polimerazı inhibe ederek etki gösteren antimikrobiyal ailesidir. Rifamisin SV de ilk kullanıma giren rifamisin grubu antimikrobiyaldir. Rifamisinlerin antimikrobiyal etkiler dışında literatürde antiinflamatuvar etkilerinin de bulunduğu gösterilmiştir. Bu etkilerin lipopolisakarit ile aktive olan THP-1 tipi monositlerden ve makrofajlardan sitokin sentezini inhibe ederek gösterdiği tespit edilmiştir⁹. Rifamisinlerin ayrıca TNF-a ve LPS ile indüklenen NFκB aktivitesini antagonize ettiği ve IL1β üzerinden indüklenen enflamatuvar kemokinler ile IL8 sentezini inhibe ettiği gösterilmiştir¹⁰.

Rifamisinler oral veya parenteral yolla kullanılabilen antibiyotiklerdir. Fakat literatürde çeşitli lokal kullanımlarına ait çalışmalar mevcuttur. Bruni ve ark. rifamisin SV'yi herpes zoster tedavisinde topikal kullanılarak olumlu sonuçlar bildirmişlerdir¹¹. Boztaş ve ark. çalışmalarında pilonidal sinüs hastalığının tedavisinde rifamisin SV'yi lokal olarak kullanmışlardır ve tedaviye fayda sağladığını tespit etmişlerdir¹². Bu nedenle çalışmamızda da farklı bir uygulama olarak intra-artiküler enjeksiyon uygulaması yapılmıştır.

Rifamisinin hem geniş spektrumlu bir antimikrobiyal ajan olması, hem de antiinflamatuvar etkilerinin olması dolayısıyla eklem içi meydana gelen enfeksiyonlarda eklem içi lokal kullanımının güvenli olup olmadığı sorusu çalışmamızın çıkış noktasını oluşturmuştur. Literatür incelendiğinde rifamisinlerin eklem içi kullanımına ait çalışmalar bulunmaktadır. Rifamisinler ilk olarak romatoid artrit tedavisinde eklem içi yolla kullanılmıştır. Randomize, prospektif bir çalışmada, romatoid aritri olan hastalara 10 hafta boyunca haftalık toplam 525 mg rifamisin eklem içi uygulanmıştır. Klinik bulgularda, eritrosit sedimentasyon hızı ve C-reaktif protein düzeyinde önemli ölçüde düzelme tespit edilmiştir¹³. 20 yıllık verilerin incelendiği bir literatür derlemesinde de eklem içi rifamisinin aktif sinovite karşı etkili olduğu ve yavaş etkili antiromatizmal ilaçlarla birlikte kullanılabileceği belirtilmiştir¹⁴. Rifamisin SV, romatoid aritri ve inatçı diz sinoviti olan 87 hasta üzerinde yapılan randomize kontrollü bir çalışmada triamsinolon asetonid ile karşılaştırılmıştır. Romatoid sinovitin lokal tedavisinde rifamisin SV'nin triamsinolon asetonidden daha az yararlı olduğu sonucuna

varılmıştır¹⁵. Farklı bir çalışmada da eklem için rifamisin uygulamasının romatoid artrit hastalarında ağrıyı azaltmada etkili olduğu gösterilmiştir¹⁶.

Rifamisinlerin eklem içi kullanıldığı diğer bir hastalık da hemofilik artropati olmuştur. 2018 yılında Kore'den yapılan çalışmada hemofilik hastalarda rifamisin ile kimyasal sinovektominin hemartrozu önleyebileceği ve klinik semptomları iyileştirebileceği gösterilmiştir. Özellikle eklem aralığında daralmanın olmadığı artropatinin erken evrelerinde eklemi koruduğu tespit edilmiştir¹⁷. Caviglia ve ark. 2001 yılında yaptıkları çalışmada hemofilik artropati tedavisinde intraartiküler rifampisin kullanımını incelemişlerdir. Rifampisin küçük eklemlerde (dirsek ve ayak bileği) kullanıldığında büyük eklemlere (diz) göre daha etkili olduğu ve çok sayıda enjeksiyonun başarısızlığı öngördüğü belirtilmiştir¹⁸.

Literatürdeki çalışmalarda eklem için rifamisin uygulamasının romatolojik hastalıklarda inflamasyonu azalttığı ve hemofilik hastalarda eklem içi kanamaları azaltarak faydalı olduğu gösterilmiştir. Fakat bu hastalıklarda kıkırdak harabiyeti gelişimi mevcut hastalıkların sonucu olarak görülmekte olduğundan rifamisinlerin kıkırdak üzerinde herhangi bir olumlu veya olumsuz etkisinin olup olmadığını, güvenilir olup olmadığını göstermemektedir.

Çalışmamızda eklem içi rifamisin SV uygulaması sonrası kıkırdak yapılar sıçanlar üzerinde OARSI skalası ile incelenmiştir. Bu skala bir derecelendirme, evrelendirme ve skorlama yöntemidir⁷. Hayvan seçimi ve kullanılan skala literatürdeki benzer kıkırdak çalışmalarıyla uyumludur¹⁹.

Sıçanlara uygulanacak intra-artiküler enjeksiyon hacmi de önemlidir. Fazla uygulama durumunda eklem kapsülü hasar görüp ilaç ekstreasyonu gerçekleştirebilmektedir. Bu durumda hem ilaç etkisini göstermede sorun ve ek komplikasyonlara yol açabilmektedir. Literatürde bu konuda yapılan bir çalışmada rat dizine maksimum 30 mikrolitre enjeksiyonun yapılabilindiği belirlendiğinden çalışmamızda enjeksiyon hacmi olarak 20 mikrolitre kullanılmıştır²⁰. Sakrifiye edilen hayvanlarda da rifamisin SV nin kırmızı renkli olduğu düşünülerek yapılan makroskopik incelemede ciltaltı dokuda renk değişimi gözlenmemiştir.

Uygulana ilaç dozu literatürdeki önceki çalışmalara göre belirlenmiştir. Lee ve ark. çalışmasında tavşan hemofilik artropati modelinde çalışılmıştır. Diz içine 2000

gr'lık tavşanlarda 10 mg rifamisin enjekte edilmiştir²¹. Bizim çalışmamızda da doz 5mg/kg olarak uygulanmıştır.

Çalışmamızda gerek erken dönemde ve gerek geç dönemde kontrol grubuna göre kıkırdak hasarı açısından anlamlı fark tespit edilmeyerek rifamisin Sv nin eklem içi kullanımının güvenilir olduğu gösterilmiştir. Fakat rifamisin SV uygulanan grupta erken dönemde sinovyal inflamasyonda anlamlı artış tespit edilmiştir. Bu nedenle septik artrit gibi ek sinovyal inflamasyon yaratan hastalıkların tedavisinde kullanımı konusunda güvenilirlik açısından çalışmalara ihtiyaç vardır.

Literatürde bizim çalışmamızla benzer hipotezle yola çıkan Kwon Kwon ve ark. çalışmasında MRSA septik artritinde lokal rifamisin uygulaması incelenmiştir. Eklem içi enflamasyonun eşzamanlı olarak hafifletilmesi ve hücre içi bakterilerin hedeflenmesi dolayısıyla lokal rifamisin uygulamasının septik artrit için umut verici yeni bir terapötik strateji olabileceği belirtilmiştir²².

KAYNAKLAR

1. Van Ingen J, Aarnoutse RE, Donald PR, et al. Why do we use 600 mg of rifampicin in tuberculosis treatment? *Clin Infect Dis.* 2011;52(9). doi:10.1093/cid/cir184
2. Sensi P. History of the Development of Rifampin. *Rev Infect Dis.* 1983;5(July-August):403-406.
3. Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, et al. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase. *Cell.* 2001;104(6):901-912. doi:10.1016/S0092-8674(01)00286-0
4. Töreci K. Kinolonlar Dışında Nükleik Asit Sentezini ve Sitoplazma Zarını Etkileyen Antibakteriyeller. *Ankem Derg.* 2003;17(3):212-215.
5. Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, et al. Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2013;56(1). doi:10.1093/CID/CIS803
6. Grosset J, Leventis S. Adverse effects of rifampin. *Rev Infect Dis.* 1983;5 Suppl 3:S440-S446. doi:10.1093/CLINIDS/5.SUPPLEMENT_3.S440
7. Pritzker KPH, Gay S, Jimenez SA, et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: Grading and staging. *Osteoarthr Cartil.* 2006;14(1):13-29. doi:10.1016/j.joca.2005.07.014
8. Ozyuvaci H, Bilgic B, Ozyuvaci E, Altan A, Altug T, Karaca C. Intra-articular injection of tenoxicam in rats: Assessment of the local effects on the articular cartilage and synovium. *J Int Med Res.* 2004;32(3):312-316. doi:10.1177/147323000403200311
9. Rosette C, Buendia-Laysa F, Patkar S, et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of rifamycin SV. *Int J Antimicrob Agents.* 2013;42(2):182-186. doi:10.1016/J.IJANTIMICAG.2013.04.020
10. Rosette C, Agan FJ, Rosette N, et al. Rifamycin SV exhibits strong anti-inflammatory in vitro activity through pregnane X receptor stimulation and NFκB inhibition. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2019;34(3):172-180. doi:10.1016/J.DMPK.2019.01.002
11. Bruni L, Tagliapietra G, Innocenti P. Herpes zoster treatments: results of a clinical trial relative to the use of rifamycin SV versus neuramide. *J Int Med Res.*

- 1984;12(4):255-260. doi:10.1177/030006058401200406
12. Boztaş A, Ünsal A, Ersoy Ö, Kale H, Güven H. Pilonidal Sinüs Hastalarında İntraoperatif Topikal Rifamisin Uygulanması Yara İyileşmesinde Faydalı mı ? *Ankara Eğitim ve Araştırma Hastan Tıp Derg.* 2022;55(December):233-236. doi:10.20492/aeahtd.1154790
 13. Caruso J, Boccassini L, Cazzola M, et al. Multiple intra-articular treatment of rheumatoid arthritis: a randomized prospective study comparing rifamycin SV with pefloxacin. *J Int Med Res.* 1992;20(1):27-39. doi:10.1177/030006059202000104
 14. Caruso I. Twenty years of experience with intra-articular rifamycin for chronic arthritides. *J Int Med Res.* 1997;25(6):307-317. doi:10.1177/030006059702500601
 15. Marchesoni A, Sinigaglia L, Ranza R, Varenna M, Battafarano N, Tosi S. Rifamycin SV versus triamcinolone in local treatment of rheumatoid synovitis. *Scand J Rheumatol.* 1993;22(4):194-198. doi:10.3109/03009749309099270
 16. Blyth T, Stirling A, Coote J, Land D, Hunter JA. Injection of the rheumatoid knee: does intra-articular methotrexate or rifampicin add to the benefits of triamcinolone hexacetonide? *Br J Rheumatol.* 1998;37(7):770-772. doi:10.1093/RHEUMATOLOGY/37.7.770
 17. Suh HC, Kim DK, Kang SH, et al. Clinical and radiological evaluation after chemical synovectomy with rifampicin in hemophilic arthropathy: Korean experience with a 2-week interval protocol. *Ann Rehabil Med.* 2018;42(3):449-456. doi:10.5535/arm.2018.42.3.449
 18. Caviglia HA, Fernandez-Palazzi F, Galatro G, Perez-Bianco R. Chemical synoviorthesis with rifampicin in haemophilia. *Haemophilia.* 2001;7(SUPPL. 2):26-30. doi:10.1046/j.1365-2516.2001.00105.x
 19. Sukur E, Kucukdurmaz F. Comparison of Cytotoxic Effects of Intra-Articular Use of Tranexamic Acid versus Epinephrine on Rat Cartilage. *Med Sci Monit.* 2018;24:1166-1170. doi:10.12659/MSM.908560
 20. Aytekin K, Uysal M, Şahiner GG, et al. Evaluation of different intraarticular injection volumes to assess optimum efficient amount; an experimental study in rat knee joints. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2020;101. doi:10.1016/J.VASCN.2019.106658

21. Lee S-H, Lee Y-A, et al. The Suppressive Effect of Rifampicin in Animal Model of Hemophilic Synovitis. *J Korean Rheum Assoc.* 2007;14(3):201-207. doi:10.4078/JKRA.2007.14.3.201
22. Kwon HK, Lee I, Yu KE, et al. Dual therapeutic targeting of intra-articular inflammation and intracellular bacteria enhances chondroprotection in septic arthritis. *Sci Adv.* 2021;7(26). doi:10.1126/SCIADV.ABF2665





İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

DİZ EKLEMİNE LOKAL RİFAMİSİN SV UYGULAMASININ EKLEM KIKIRDAKLARI ÜZERİNE POTANSİYEL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 15	% 15	% 5	% 5
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 4
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 2
3	www.thieme-connect.com İnternet Kaynağı	% 1
4	acikerisim.selcuk.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
6	doaj.org İnternet Kaynağı	% 1
7	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
8	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	% 1

acikerisim.uludag.edu.tr

