



**OSTEOARTRİT (OA) PATOGENEZİNDE POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN
REDOX STRES ARACILI HASARA KARŞI REJENERATİF ETKİLERİ VE
ETKİ MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

Zehra AYDIN BEK

**UZMANLIK TEZİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

ŞUBAT 2021

**Bu Tez, bir kısmı 315S012 numaralı TUBİTAK projesinden olmak üzere
Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
01/2018-37 proje numarası ile desteklenmiştir**

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Zehra AYDIN BEK

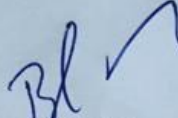
**Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tez Sınav Tutanağı**

Adı ve Soyadı	Zehra AYDIN BEK
Baba Adı	Mehmet AYDIN
Doğum Yeri/Tarihi	22.10.1989
Diploma Tarihi / Diploma No	01.07.2013 No:1/300
Mezun Olduğu Fakülte	Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
İhtisas Yaptığı Anabilim Dalı/Bilim Dalı	Tıbbi Farmakoloji
İhtisas Süresi	Yıl: 4 Ay:
Sınav Yapılmasını İsteyen Makam	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı

UZMANLIK TEZİNİN ADI: Osteoartrit (OA) Patogenezinde Polifenolik Bileşiklerin Redox Stres Aracılı Hasara Karşı Rejeneratif Etkileri ve Etki Mekanizmalarının Araştırılması

JÜRİ KARARI: Oy birliği ile başarılı bulunmuştur.

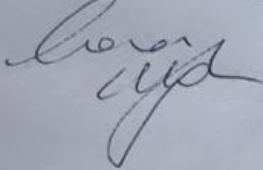
JÜRİ ÜYELERİ


BAŞKAN

Prof. Dr Berna Göker

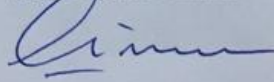
ÜYE

Prof. Dr Canan Uluoğlu



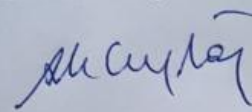
ÜYE

Prof. Dr. Çimen Karasu



ÜYE

Prof. Dr. Ash Ceylan Işık



OSTEOARTRİT (OA) PATOGENEZİNDE POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN REDOX
STRES ARACILI HASARA KARŞI REJENERATİF ETKİLERİ VE ETKİ
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI
(Uzmanlık Tezi)

Zehra AYDIN BEK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

Şubat 2021

ÖZET

Osteoartrit (OA), ileri yaşlarda sıklığı giderek artan, ağrı ve fonksiyon kaybı nedeniyle yaşam kalitesini düşüren, dejeneratif eklem hastalığıdır. Patogenezinde genetik, metabolik, yapısal çok sayıda faktör rol oynamaktadır. Dünya genelinde OA tedavisinde istenen başarı ne yazık ki sağlanamamıştır. DSÖ'nün, araştırılması öncelikli hastalıklar listesinde OA' da yer almaktadır. OA'da ortaya çıkan kıkırdak hasarının patogenezinden kondrositlerin redoks strese verdiği adaptasyon yanıtlarındaki bozuklukları sorumlu tutan çalışmalar artmaktadır. Son zamanlarda fitofenolik bileşikler, antioksidan, antiinflamatuvar doğal redoks düzenleyici etkileri sayesinde araştırmalarda odak noktası haline gelmiştir. Buradan hareketle, OA'nın başlamasında ve ilerlemesinde rol oynayan hücre içi redoks mekanizmaları hedefleyerek, fitokimyasal ajanlarla OA tedavisini yönetmeyi amaçlamaktayız. Çalışmamızda dut yaprağının (*Morus alba*) standart ekstraktlarının (ImmunFLEX®) yanı sıra ekstre içeriğinde bulunan kersetin ve deoksinojirimisin ayrıca içerikte bulunmayan oleuropeinin etkileri test edilmiştir. Kullandığımız ajanların etkileri evre-4 osteoartritli hastaların eklem kıkırdağından izole edilen primer kondrosit hücre kültürlerinde çalışılmıştır. Oksidatif stres parametreleri (ROS, 4-HNE, Pentosidin, 3-NT), apoptotik belirteçler ve yöntemler (kaspaz-3, anneksin V, mitokondri membran potansiyeli) kullanarak etkilerini test ettiğimiz ajanlar genel olarak, mitokondri membran potansiyelini artırmış, oksidatif ve apoptotik parametrelerde farklı oranlarda azalma sağlamıştır. Bu etkiler sayesinde kondrositlerde redoks stres aracılı erken apoptoz inhibe olmuş ve hücrelerde sağ kalım artmıştır. Çalışmamız ile polifenolik ajanların OA tedavisine kazandırılmaları sürecine kanıtlar sunulmuştur. Gazi Üniversitesi BAP'a projeyi desteklediği için teşekkür ederiz.

Anahtar Kelimeler : Osteoartrit, Primer Kondrosit, Oksidatif Stres, *Morus Alba* Yaprağı, Kersetin, Deoksinojirimisin, Oleuropein

Danışman : Prof. Dr. Çimen KARASU

INVESTIGATION OF REGENERATIVE EFFECTS AND MECHANISMS OF ACTION
OF THE POLYPHENOLIC COMPOUNDS ON REDOX STRESS MEDIATED INJURY
IN THE PATHOGENESIS OF OSTEOARTHRITIS (OA)

(Speciality Thesis)

Zehra AYDIN BEK

GAZI UNIVERSITY
FACULTY OF MEDICINE
DEPARTMENT OF MEDICAL PHARMACOLOGY

February 2021

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a degenerative joint disease characterized by progressive pain and loss of function elderly patients. Structural, genetic and metabolic factors are involved in the pathogenesis of OA. Unfortunately, there has been no success in treating OA worldwide. OA is included in WHO's list of priority medicine. The increasing evidence of the cartilage damage occurred in OA is related with disturbances of redox stress response of chondrocytes. Polyphenolic compounds have become in focus, due to their antioxidant, anti-inflammatory and redox-regulatory effects in recent studies. So we aimed to reorchestrate the OA therapy with phytochemicals via targeting redox pathways involved in early or onset OA. In our study, a standardized mulberry extracts (ImmunFLEX®) and their major bioactive components, Quercetin and Deoxynojirimycin, and also Oleuropein were tested on primary chondrocyte cell cultures isolated from knees of the grade 4 OA patients. The effects of agents on oxidative stress (ROS, 4-HNE, Pentosidine, 3-NT) and apoptotic markers (caspase-3, flow cytometry/annexin V, mitochondrial membrane potential) were investigated. As a result, agents increased mitochondrial membrane potential at different rates and decreased oxidative and apoptotic parameters. Thus, redox stress-mediated early apoptosis was inhibited and the survival rate in cells increased. Our study provides evidences for the crucial role of supplementing polyphenolic agents in OA therapy. We thank Gazi University BAP for supporting the project.

Key Words : Osteoarthritis, Primary Chondrocyte, Oxidative Stress, Morus Alba Leaf, Quercetin, Deoxynojirimycin, Oleuropein

Advisor : Prof. Dr. Çimen KARASU

TEŞEKKÜR

Fakülte hayatımdan sonra bana yeni bir akademik anlayış kazandıran, laboratuvarı sevdiren, çalışmalarımda teşvik eden, uzmanlık eğitimi boyunca her türlü desteğini gerek bilimsel gerek manevi olarak esirgemeyen, bu çalışmanın bir fikirden projeye ve teze dönüşmesinde emeği çok olan tez danışmanım Prof. Çimen KARASU'ya,

Eğitimim boyunca senelerimizi aynı laboratuvarı geçirdiğimiz, laboratuvarı öğreten, hücreyi sevdiren, bilimsel yardımlarını ve dostluğunu hep hissettiğim Zübeyir ELMAZOĞLU'na,

Gece, gündüz, hafta sonu demeden çalışmalarımın beni yalnız bırakmayan, evin ve çocukların sorumluluğunu üstlenerek her türlü desteği, anlayışı gösteren, yüzümü her daim güldüren sevgili eşim EBUBEKİR'e

Sabırla bekleyip beni görünce gözleri parlayan, tez dönemimi hem zorlu hem eğlenceli kılan, en büyük moral ve motivasyon kaynağım olan, şu sıralar çok özlediğim çocuklarım Kerem ve Feyruz'a,

Her darımda yardıma koşan, beni benden daha iyi bilen, türlü fedakarlıklar gösteren, kendimi daima değerli hissettiren çok kıymetli ailem Anneme ve Babama

Üzerimde emeği olan tüm Hocalarıma ve Arkadaşıma

01/2018-37 numaralı proje kapsamında tezimi maddi olarak destekleyen, katkı sağlayan Gazi Üniversitesi BAP'a ve Proje Ekibine

En İçten Duygularıyla Teşekkürlerimi Sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Osteoartrit.....	3
2.2. Osteoartrit Patogenezi ve Hücre İçi Değişiklikler.....	4
2.3. Osteoartrit Tedavisi	6
2.4. Polifenolik Bileşikler	7
2.5. Osteoartritin Önlenmesi ve Tedavisinde Polifenolik Bileşiklerin Rolü.....	8
2.6. <i>Morus</i> (Dut) Bitkisi	10
2.7. <i>Morus Alba</i> (Beyaz Dut) Yaprğındaki Biyoaktif Fitokimyasallar	10
2.8. <i>Morus Alba</i> Yapraklarındaki Fitokimyasalların Farmakolojik Etkileri	12
2.9. Çalışmanın Temel Konusu ve Hedefleri	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	16
3.1. Etik Kurul Kararı, OA'lı Hastalar ve Dokuların Toplanması	16
3.2. Primer Kondrosit Hücre Kültürü.....	17
3.3. Hücre Canlılığı Analizi	18
3.4. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türevleri (ROS) Oluşumunun Ölçülmesi	18

	Sayfa
3.5. ELISA ve Western Blot Deneyleri İçin Protein İzolasyonu	19
3.6. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Deneyleri	19
3.7. Western Blot Deneyi	20
3.8. Akım Sitometrisi Ölçümü	21
3.9. Mitokondri Membran Potansiyeli Ölçümü ($\Delta\Psi_m$)	21
3.10. Dokuların çıkarılması ve Hematoksilen-Eozin (HE) Boyama	22
3.11. Kullanılan Kitler ve Başlıca Kimyasallar	22
3.12. Tez Proje Ekibi	23
3.13. Verilerin Analizi	24
4. BULGULAR	25
4.1. Osteoartritli Kıkırdak Dokular ve Histomorfolojileri	25
4.2. Primer Kondrositlerin Morfolojileri	26
4.3. Primer Kondrositlerde Osteoartrit Patolojisinin Gösterilmesi	30
4.4. Fitokimyasalların Canlılık Üzerine Etkileri/ Sitotoksite Analizi	31
4.5. Fitokimyasalların ROS Düzeylerine Etkileri	33
4.6. Fitokimyasalların Pentosidin Düzeylerine Etkileri	34
4.7. Fitokimyasalların 4-HNE Eklenti Düzeylerine Etkileri	34
4.8. Fitokimyasalların 3-Nitrotirozin (3-NT) Düzeylerine Etkileri	34
4.9. Fitokimyasalların Kaspaz-3 Düzeylerine Etkileri	35
4.10. Akım Sitometri Analizi Sonuçları	37
4.11. Mitokondri Membran Potansiyeli ($\Delta\Psi_m$) Üzerine Etkileri	40
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇ	49
KAYNAKLAR	51
EKLER	67
EK-1. Etik Kurul Kararı	68
ÖZGEÇMİŞ	69

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Dut Yaprağında bulunan biyoaktif bileşikler	12
Çizelge 3.1. Doku örneklerinin alındığı hastaların demografik ve laboratuvar verileri	17



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 4.1. Primer kondrositlerde p-JNK/pan-JNK oranının (A) ve ROS türevleri seviyelerinin (B), pasaj 0-1, pasaj 2-3 ve H ₂ O ₂ uygulanan konrosit gruplarında karşılaştırılması. ## P<0.01 vs. H ₂ O ₂ ; ϕ P<0.001 vs. H ₂ O ₂	31
Şekil 4.2. Primer kondrositlerde COMP ve MMP9 düzeyleri. LC: Sağlıklı kondrositler; HC: H ₂ O ₂ ile indüklenmiş sağlıklı kondrositler, OAC: Osteoartritli kondrositler.....	31
Şekil 4.3. Kersetin, Oleuropein, Deoksinojirimisin (1 nM-100 µM) (A) veya Morus alba yapraklarından hazırlanan etanolik ve sulu ekstrelerin (1ng/mL-100 µg/mL) (B), primer osteoartritlik kondrosit hücrelerine 24 saat süreyle uygulanması sonucunda hücre canlılığında meydana gelen değişim (n=5-6) kontrol grubuna göre	32
Şekil 4.4. Kersetin, Oleuropein, Deoksinojirimisin (1 nM-100 µM) (A) veya Morus alba yapraklarından hazırlanan etanolik ve sulu ekstrelerin (1ng/mL-100 µg/mL) (B), primer osteoartritlik kondrosit hücrelerine 24 saat süreyle uygulanması sonucunda hücre içi reaktif oksijen türevleri (ROT) düzeylerinde meydana gelen değişim (n=5-6). *p < 0.05, şp<0.01, fp<0.001, kontrol grubuna göre	33
Şekil 4.5. Kersetin, Oleuropein, Deoksinojirimisin (100 nM, 1 veya 10 µM) veya Morus alba yapraklarından hazırlanan etanolik ve sulu ekstrelerin (100ng/mL, 1 veya 10 µg/mL) primer osteoartritlik kondrosit hücrelerine 24 saat süreyle uygulanması sonucunda hücre içi pentozidin (A), 4-hidroksinonenal (4-HNE) (B) ve 3-nitrotirozin (3-NT) (C) seviyelerinde meydana gelen değişim (n=3). *p < 0.05, şp<0.01, fp<0.001, kontrol grubuna göre.	35
Şekil 4.6. Kersetin, Oleuropein, Deoksinojirimisin (100 nM, 1 veya 10 µM) (A) veya Morus alba yapraklarından hazırlanan etanolik ve sulu ekstrelerin (100ng/mL, 1 veya 10 µg/mL) (B), primer osteoartritlik kondrosit hücrelerine 24 saat süreyle uygulanması sonucunda kaspaz-3 aktivitesinde meydana gelen değişim (n=3). *p < 0.05, şp<0.01, fp<0.001, kontrol grubuna göre	36
Şekil 4.7. Kersetin, Oleuropein, Deoksinojirimisin (10 µM) veya Morus alba yapraklarından hazırlanan etanolik ve sulu ekstrelerin (10 µg/mL) primer osteoartritlik kondrosit hücrelerine 24 saat süreyle uygulanması sonucunda apoptoz oranlarında (%) meydana gelen değişim.....	37
Şekil 4.8. Kontrole(A) göre, Deoksinojirimisin (B), Kersetin (C), Oleuropein (D) 10 µM ve Morus alba yapraklarından hazırlanan sulu (E) ve etanolik (F) ekstrelerin 10 µg/mL, primer osteoartritlik kondrosit hücrelerine 24 saat süreyle uygulanması sonrası akım sitometri ile apoptozun (Anneksin V) gösterilmesi.....	38

Şekil	Sayfa
Şekil 4.9. Primer kondrositlerde, uyguladığımız ajanların kontrole göre aktif kaspaz-3 düzeylerinde yaptığı değişiklik.....	39
Şekil 4.10. Kersetin, Oleuropein, Deoksinojirimisin (10 µM) ve Morus alba yapraklarından hazırlanan etanolik/ sulu ekstrelerin (10 µg/mL) primer osteoartritik kondrositlere 24 saat süreyle uygulanması sonucunda kaspaz-3 düzeylerinde (%) kontrole göre meydana gelen değişim.....	40
Şekil 4.11. Kersetin, Oleuropein, Deoksinojirimisin (10 µM) veya Morus alba yapraklarından hazırlanan etanolik ve sulu ekstrelerin (10 µg/mL) primer osteoartritik kondrosit hücrelerine 24 saat süreyle uygulanması sonucunda mitokondriyal membran potansiyelinde meydana gelen değişim meydana gelen değişim (n=4). Yeşil: JC-1 monomer; Kırmızı: JC-1 agregat. *p < 0.05, §p<0.01, fp<0.001, kontrol grubuna göre	41

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. (A): Medial femoral kondil; (B): Lateral femoral kondil; (C) Medial ve lateral tibial kondil. Mavi ok: Kondral doku; Beyaz ok: Subkondral kemik. Eklem kıkırdağında hematoksin ve eozin (HE) boyama (büyütme 100 ×) ile osteoartrit temsil histopatolojik bulguları. Tibia (E) ve femurda (F) kıkırdak dejenerasyonu, kısmen kondrosit proliferasyonu (yeşil oklar) ve kondromatoz doku fragmentasyonları (F, G). Kemik dokusunda osteoklastlı yıkım ve boş osteosit lakün.....	25
Resim 4.2. Osteoartritli hastalardan alınan tibia (A; kemik), (B,C; kemik-kartilaj), (D; kartilaj) ve femur (E; kemik), (F; kemik-kartilaj), (G; kemik) (H; kartilaj) doku örnekleri. Kartilaj dokudaki dejenerasyon ince oklarla, Kemik dokudaki dejenerasyon kalın oklar ile işaretlenmiştir.....	26
Resim 4.3. Primer kondrositlerin izolasyon sonrası 1-14. gün arasındaki morfolojik değişimi. Inverted mikroskop, Leica.....	27
Resim 4.4. Primer kondrositlerin izolasyon sonrası 21-35. gün arasındaki morfolojik değişimi. Inverted mikroskop, Leica.....	28
Resim 4.5. Primer kondrositlerin farklı pasaj dönemlerindeki sembolik mikroskop görüntüleri. İğ ve çokgen şekilli hücreler görülmektedir. Inverted mikroskop, Leica.....	30

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simge ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda verilmiştir.

Simgeler	Açıklamalar
°C	Derece Celsius (Selsiyus)
mA	Miliamper
mg	Miligram
mL	Mililitre
ng	Nanogram
nM	Nanomolar
$\Delta\Psi_m$	Mitokondriyal Membran Potansiyeli
μM	Mikromolar

Kısaltmalar	Açıklamalar
AGE	İleri Glikasyon Son Ürünleri
AMPK	AMP ile aktive edilen protein kinaz
APC	Otolog Trombosit Konsantrasyonu
BCA	Bikinkoninik Asit
COMP	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
COX	Siklooksijenaz
DCFH-DA	2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
ELISA	Enzim Bağlı Immünoabsorbent Deneyi
ER	Endoplazmik Retikulum
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HNE	Hidroksinonenal
IL-1	Interlokin-1
JNK	C-Jun N-Terminal Kinaz
MMP	Mitokondriyal Membran Potansiyeli
MSC	Mezenkimal Stromal Hücreler

Kısaltmalar	Açıklamalar
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
NSAİİ	Non-Steroidal Anti-İnflamatuvar İlaçlar
OA	Osteoartrit
OAC	Osteoartritli Primer Kondrosit
P-0	0. Pasaj
PRP	Platelet Zengin Plasma
ROS/ ROT	Reaktif Oksijen Türleri
SIRT-1	Sirtuin-1
SOD	Süper Oksid Dismutaz
TIMP-1	Doku Metalloproteinaz İnhibitörü
TNF	Tümör Nekroz Faktör

1. GİRİŞ

Osteoartrit (OA), eklem kartilajında meydana gelen ilerleyici ve geri dönüşümsüz hasara bağlı olarak eklemlerde ağrı ve fonksiyon kaybı ile karakterize dejeneratif bir hastalıktır. Dünyada en yaygın görülen eklem hastalığıdır [1]. Yaşlanan nüfus ve artan obezite sonucunda sıklığı giderek artmaktadır [2]. OA, orta yaş ve yaşlılık döneminde engelliliğin başlıca nedenleri arasında olup, kişilerin sosyal yaşantılarını kısıtlaması, bedensel sağlığın yanı sıra ruh sağlığını da olumsuz yönde etkilemesi, hem tedavi masrafları hem de iş gücü kaybına bağlı olarak ülke ekonomisine maliyetinin yüksek olması sebebiyle bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir [3,4]. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) hastalığın küresel yükünü de göz önüne alarak hazırladığı öncelikli ilaçlar raporuna OA'yı da dahil etmektedir [5].

Günümüzde OA tedavisine yönelik birçok çalışma devam etmekte ancak henüz OA'nın oluşmasını ya da ilerlemesini engelleyebilecek radikal tedaviler bulunmamaktadır. Mevcut modern tedaviler semptomları hafifleterek, yaşam kalitesini artırmaya odaklanmıştır. OA da kullanılan analjezik anti-inflamatuvar ilaçlar, steroidler tedavide yeterli olamamakta hatta uzun süre kullanıldıklarında istenmeyen olumsuz etkiler oluşturmaktadırlar [6,7]. Hiyaluronik asit, glukozamin, kondroitin sülfat gibi destekleyiciler hastalığın prognozunda kısmen etkilidirler. Biyomateryal enjeksiyonları, kök-hücre ve gen transferi gibi uygulamalar ise başarı şansları hala tartışmalı olan pahalı yaklaşımlardır [8]. Bu nedenle, OA'nın oluşmasında ve ilerlemesinde rol oynayan birden fazla hücre içi kaskadı hedefleyerek rejeneratif yolları indükleyebilen farmakolojik ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Hastalığın patofizyolojisinde biyomekanik, biyokimyasal, genetik, metabolik çok sayıda faktörün etkili olduğu gösterilmiştir [9]. OA; anormal eklem doku metabolizması, eklem iltihabı ve uyumsuz onarım yanıtı ile karakterize bir hastalıktır [10,11]. OA'nın ayırt edici özelliği olan kıkırdak dejenerasyonu, kondrositlerin doku homeostazını sürdürme yeteneğinin bozulmasının bir sonucudur. OA hastalarında, eklem dejenerasyonunu artıran önemli mekanizmalardan biri, inflamatuvar yanıtları tetikleyen ve hücreleri erken apoptoza yönlendiren redoks disregülasyondur [12]. Kondrositlerde ve sinoviyositlerde redoks homeostazın oksidasyon lehine bozulması bu hücrelerin oksidan strese tepkilerinin ve metabolik adaptasyonlarının kademeli olarak bozulmasıyla sonuçlanır [13,14]. Kondrojenik hücrelerde redoks sinyal yolağı ile ilişkili değişikliklerin, inflamatuvar

yolaklara ve sağ kalım süreçlerine dolayısıyla OA patogenezinin etkilerinin anlaşılması, tedaviyi planlamaya yön verecek, hücre içi yeni hedeflerin ve bu hedeflere yönelik yeni ajanların bulunmasına ışık tutacaktır.

Artan sayıda bilimsel araştırma, bazı polifenolik fitokimyasalların deneysel OA'yı önleme veya tedavi etme potansiyeline sahip olduklarını ve bu bileşiklerin en azından antioksidan ve anti-inflamatuvar etkileri sebebiyle anti-osteoartritik faydaları olacağını öne sürmektedir [15, 16]. Polifenoller bakımından zengin diyetin, OA'lı hastalarda; serum interlökin-1 β (IL-1 β), tümör nekroz faktör- α (TNF- α), matris metalloproteinazlar (MMP-1 ve MMP-13) gibi inflamatuvar molekülleri azalttığı gösterilmiştir [17]. Benzer olarak, zeytin yapraklarından elde edilen polifenolik bileşiklerin, deneysel artrit modellerinde ve kendi hücre kültürü çalışmalarımızda anti-artrit ajan olarak etki gösterdikleri ortaya çıkarılmıştır [18, 21]. Randomize çift kör plasebo kontrollü bir klinik çalışma, oral Hidroksitirazol takviyesinin diz OA üzerindeki etkilerini test ederek plasebo grubuna kıyasla hidroksitirazol grubunun daha yüksek bir iyileşme gösterdiğini ortaya koymuştur [22]. Kersetinin; kondrositlerin inflamasyonunu ve apoptozunu inhibe ederek, oksidatif stresi zayıflatarak pro-kondrojenik bir ortam oluşturduğu, kondroprotektif etkiler gösterdiği son birkaç yıl içerisinde çok sayıda makalede gösterilmiştir [23,25]. Bir secoiridoid olan oleuropeinin, kartilaj katabolik biyobelirteçlerini ve OA lezyonlarının ilerlemesini önemli ölçüde azalttığı [26], anti-inflamatuvar etkileri olduğu [27,30] ve otofajiyi arttırdığı gösterilmiştir [31]. *Morus alba* L. ekstreleri verilen OA'lı sıçanlarda inflamasyonun önlendiğini ve ağrının giderildiğini gösteren çeşitli makaleler bulunmaktadır [32,33].

Çalışmamızda, evre 4 OA'lı hastaların kartilaj dokusundan izole edilen primer kondrosit hücre kültürlerinde, Immunflex adlı ticari preparatın içeriğini oluşturan beyaz dut (*Morus alba* L) bitkisinin yaprak ekstreleri kullanılmış, ayrıca ekstre içeriğinde bulunan polifenolik bileşiklerden kersetin, deoksinojirimisin ve içerikte bulunmayan oleuropein ile etkileri karşılaştırmalı olarak test edilmiştir.

Araştırmamızda, OA'da etkili olabilecekleri ön çalışmalarla gösterilmiş ya da literatür ile desteklenmiş, yukarıda adı geçen bitkisel ekstre ve polifenolik bileşiklerin, OA tedavisinde potansiyel yeni ajanlar olup olamayacağına dair bilimsel kanıt oluşturulması hedeflenmiştir. Ayrıca OA'da dejenerasyona giden süreçte redoks aktif mekanizmaların

hangi yollar üzerinden hangi sinyalleri etkileyerek fizyopatolojiye katıldığı araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Osteoartrit

Osteoartrit (artroz, dejeneratif artrit, dejeneratif eklem hastalığı, kireçlenme), sinovyal eklemlerde kıkırdak kaybı (kondropati) ve eşlik eden periartiküler kemik tutulumu bulguları ile karakterizedir. Özellikle ileri yaşlarda sık görülen, hareketliliği kısıtlayan, kronik fonksiyon kaybı ile hastayı dış desteğe bağımlı kılan, ağrılı, dejeneratif bir eklem hastalığıdır [9]. En sık rastlanan eklem hastalığı olmakla beraber, tüm dünyada engelliliğin de başlıca sebepleri arasındadır [34].

Semptomatik ve radyolojik osteoartrit prevalansı yaş ile artmaktadır. Yetmişli yaşlarda bireylerin büyük kısmında radyolojik olarak osteoartrit saptanmakla birlikte bu bireylerin yarısından daha azında semptomlar ortaya çıkmaktadır. Dünyada farklı bölgelerde ve farklı zamanlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalarda 65 yaş ve üstü popülasyonda semptomatik diz OA varlığı %10-30 arasında değişmekteydi [35]. Genel olarak kadınlardaki prevalansı erkeklerden daha fazladır. Türkiye’de yapılan bir prevalans çalışmasında ise 50 yaş ve üzeri popülasyonda semptomatik diz OA prevalansı %14.8 olarak rapor edilmiştir. Dünya genelinde ortalama yaşam süresinin uzaması ve artan obeziteye bağlı olarak hastalığın prevalansının da giderek artacağı tahmin edilmektedir [1,36,37].

Osteoartrit için günümüzde bilinen, kıkırdağı yenileyen radikal bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Geri dönüşü olmayan bu hastalık için öncelikle egzersiz, kilo kontrolü, fizik tedavi, ilaç tedavileri ve bazı invaziv yöntemler kullanılmakta, bu tedavilerden fayda görmeyen ağır hastalarda ise çeşitli cerrahi girişimler uygulanmaktadır [36].

Osteoartrit; kıkırdak, subkondral kemik, eklem kapsülü, sinovyum, menisküs, tendonlar, ligamanlar olmak üzere eklemün tüm yapılarını ilgilendiren bir hastalıktır ve patogeneğinde çoklu mekanizmaların rol aldığı bilinmektedir

Sinovyal eklemlerin önemli bir parçası olan kıkırdak (kartilaj); damar, sinir ve lenfatik yapılar içermez. Kartilaj, ekstraselüler matriks ve bu doku içine seyrek olarak dağılmış kondrositlerden oluşmuştur. Ekstraselüler matriks, kondrositler tarafından sentezleniyor olup esas olarak kollajen (yaklaşık %50) ve proteoglikanlardan meydana gelmektedir. Kıkırdak dokunun iyileşme/ kendini yenileme kapasitesi zamanla azalmaktadır [38].

Önceden OA'nın; yaşlanmanın fizyolojik bir sonucu olduğu, mekanik aşınma ve yıpranmaya bağlı olarak geliştiği düşünüldüğünden dejeneratif eklem hastalığı şeklinde isimlendirilmiştir. Ancak OA üzerine yapılan birçok çalışmada, OA'nın yaşlanmadan bağımsız bir şekilde ortaya çıkabileceği, yaşlanmanın yalnızca bir faktör olduğu; eklem bütünlüğü, genetik yatkınlık, lokal inflamasyon, mekanik kuvvetler, hücresel ve biyokimyasal süreçler dahil olmak üzere yapısal ve mekanik birçok faktörün etkileşimi sonucu OA' nın meydana geldiği gösterilmiştir [39].

Epidemiyolojik çalışmalarda osteoartritin tanımlanması ve hastalık şiddetinin değerlendirilmesi için radyolojik kriterler kullanılmaktadır. En sık kullanılan radyolojik kriterler 1957 yılında Kellgren ve Lawrence tarafından tanımlanan kriterlerdir. Çalışmamızda evre 4 hastalar kullanılmıştır. Kellgren ve Lawrence'a göre evre 4, büyük osteofitler, eklem aralığında ileri derecede daralma, belirgin subkondral kemik sklerozu ile karakterizedir [40].

2.2. Osteoartrit Patogenezi ve Hücre İçi Değişiklikler

Kondrositler metabolik olarak kıkırdağın fonksiyonel bir birimidir ve çevresindeki ekstrasellüler matriksin oluşturulması ve homeostazın idamesinden sorumludur. Kondrositler yaşam boyunca matriks makromoleküllerini yıkıp yeniden sentezlerler. Bu döngü hayatın erken dönemlerinde hızlı iken ilerleyen yaşla beraber yavaşlamaktadır. Bu anabolik ve katabolik aktiviteler arasındaki denge önemlidir ve her iki olayda da çeşitli mesajcı proteinler, büyüme faktörleri, sitokinler ve enzimler rol alır. Kıkırdak ve subkondral kemikte, yapım ve yıkım arasındaki dengeyi sağlamaya yönelik dinamik süreç OA varlığında bozulmuştur [8, 41].

Osteoartritik süreçte en önemli rolü olan hücreler kondrositlerdir. OA'nın erken dönemlerinde, kondrositlerde proliferasyon ve sekresyonda artış görülmektedir. Bu

dönemde kondrositlerden degradasyonu arttıran birçok proteolitik enzim (MMP-9, MMP-13, ADAMTS-5, kollajenaz vb) ve proinflamatuvar molekül (IL-1, IL-6, TNF-a, COX-2, iNOS) salıverildiği insan ve hayvan çalışmalarında gösterilmiştir [42, 43]. Mobasher, Musumeci ve arkadaşlarının osteoartrit patogenezi üzerine yaptığı çalışmalar, ayrıca bizim laboratuvarımızda yürütmekte olduğumuz araştırmalar OA'da anormal fizyolojik cevaba yol açan birden fazla hücrel faktörün redoks stres ile ilişkisini ortaya koymuştur [13, 21, 44-46]. Benzer çalışmalar, OA'da ortaya çıkan kıkırdak hasarının patogenezinin, kondrositlerin ve sinoviyositlerin redoks strese verdiği adaptasyon yanıtlarının bozulmasını ve böylece dejeneratif süreçlerin tetiklenmesini sorumlu tutmaktadır [13, 14, 34, 47, 48]. Kondrojenik proteinlerin ileri oksidasyonu, fizyolojik sinyal iletiminin bozulmasına, hücre harabiyetine ve erken apoptoza neden olur [49]. İleri derecede oksitlenen proteinler fonksiyonlarını yitirerek kondrositlerde birikmeye başlarlar; bu durum klinikte kıkırdak deformabilitesinin hızlanmasıyla karakterizedir [11]. Hücre içinde osteoartritik değişiklikler başladığında birçok oksidan faktörün (peroksinitrit, alkoksi, peroksi grupları vb) dejeneratif sürece katıldığı [50] ve oksidatif stres belirteçlerinin plazma düzeylerinin arttığı görülmüştür [42, 51]. Stres altında ve anormal metabolik koşullarda, kondrositlerde gliko-lipo-oksidasyon reaksiyonları artar ve sonrasında oluşan ileri glikasyon/gliko-oksidasyon son ürünleri ve ileri peroksidasyon/lipo-oksidasyon son ürünleri kıkırdak temel bileşenlerine atak yaparak disfonksiyonel protein eklentileri oluştururlar [52,54]. Disfonksiyonel protein eklentileri özellikle diyabet ve obezite ile ilişkili olarak ortaya çıkan OA'da patolojiyi tetikleyen önemli faktörler olarak bildirilmektedir [52, 55]. Son yıllarda yayımlanan makalelerde, OA'nın tip 2 diyabetlilerde, metabolik sendromu olan obez bireylerde görülme sıklığı arttığı için, OA metabolik bir hastalık olarak da tanımlanmaktadır [56, 57].

Osteoartritli kondrositlerde redoks homeostazın bozulması, mitokondri ve endoplazmik retikulumda stres oluşturarak erken senesensi tetikleyici ve kondrositleri apoptoza sürükleyici süreçleri başlatır. Mitokondri önemli bir ROS (Reaktif Oksijen Türevleri) kaynağı olduğundan, hücrede ROS üretimi ile antioksidan kapasite arasında bir dengesizliğe yol açan mitokondriyal disfonksiyon, OA gelişimine katkıda bulunmaktadır [58]. Bu değişikliklere kollajen sentezinin bozulması, kondrojenik aktivitenin azalması ve onarım mekanizmalarının yavaşlaması eşlik eder [59,61]. OA'da eklem kıkırdağında meydana gelen dejenerasyonun nedeni, inflamatuvar değişiklikler, katabolik genlerin ekspresyonunu artıran oksitlenmiş disfonksiyonel proteinlerin yığılması, erken apoptoz

gibi çok faktörlü olaylara atfedilmektedir [12, 48]. Bu nedenle OA'ya müdahale etmek için tasarlanmış farmakolojik yeni bir ajanın, patogenezin oluşmasına ve ilerlemesine yol açan redoks değişikliklere hedeflendirilmesi akılcı yaklaşımdır.

2.3. Osteoartrit Tedavisi

Osteoartritin günümüz şartlarında radikal tedavisi olmadığı gibi, patolojiyi oluşturan hücre içi mekanizmalara yönelik özgün bir tedavisi de bulunmamaktadır. Bunun temel sebebi hastalığın patofizyolojisinin yeterince anlaşılamamasıdır. Bu yüzden osteoartrit tedavisi semptomatik olup ileri vakalarda eklem replasmanı yapılmaktadır. OA tedavisinde kullanılmakta olan nonsteroid anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ), hastalığın bazı semptomlarını hafifletse de, hastalığın ilerlemesini önlemede yetersiz kalmakta, hatta uzun süre kullanıldıklarında istenmeyen etkiler oluşturmaktadırlar. İntra-artiküler glukokortikoid enjeksiyonu [62], stronsiyum renelat [63, 64] ya da glukozamin, kondroitin sülfat [65] gibi destekleyici tedaviler kullanılarak hastalığın semptomları hafifletilmeye çalışılmaktadır. Benzer şekilde, alendronat, hyaluronik asit, kollajen hidrolizat, vitamin C, vitamin D, aspirin klinik çalışmalarda pozitif sonuçlar göstermiştir. Diğer yandan, kalsitonin, rizedronat, doksisisiklin, selesoksib klinik çalışmalarda hastalığın progresyonunu hafifletmemiştir [66]. MMP, ADAMTS gibi kıkırdak yıkımından sorumlu enzim ailelerinin kimyasal inhibisyonu ise insan klinik deneylerinde güvenlik sorunları oluşturmaktadır. Diğer sistemik ilaçlar ya da destekleyiciler olan teriparatid, leptin, zoledronik asit, bevakizumab, atorvastatin, omega-3 yağ asitleri, donepezil, naproksen, etodolak, ursadeoksikolik asit, lityum klorid, rebamipid in vitro hayvan çalışmalarında pozitif sonuçlar göstermelerine rağmen kartilaj onarımına etkileri klinik çalışmalarla desteklenmelidir. Likofelon, sklerostin, siklopamin, siklodekstrin, osteoprotegerin, β -kriptoksantinosteojenik protein-1, fibroblast büyüme faktörü-2 gibi birçok molekül henüz pazarda olmamalarına rağmen kartilaj iyileşmesinde umut vadetmektedirler [67, 68]. İlerlemiş OA vakalarına uygulanan rekonstrüktif cerrahi yöntemleri, gen transferi yaklaşımları, mezenşimal kök hücre nakilleri (MSC), biyomateryal implantasyonları (PRP, ACS) ve kıkırdak doku mühendisliği umut verici ancak uygulanabilirliği zor, pahalı, ağırlı, etkinin sürdürülebilirliği bakımından zayıf ve yaygın klinik kullanım kriterleri dikkate alındığında ses getirecek bir başarıya henüz ulaşamamış gelişmelerdir [69,72].

OA tedavisi, dünyada henüz karşılanmamış medikal gereksinimlerden biri olarak tanımlanmakta ve radikal çözüm arayışları devam etmektedir⁵. Bu nedenle, OA'nın kompleks patolojisinin birden fazla basamağına hedeflendirilmiş, pratik kullanımı olan ve farmakoekonomik özellik taşıyan, OA'lı hastalarda güvenle kullanılabilen farmakolojik ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Böyle bir ajanın keşfi dünya sağlık otoritelerinin de öncelikli hedeflerindendir [5, 73]. Kıkırdığın iyileşme kapasitesinin kısıtlı olması dikkate alındığında, oksidatif dejeneratif hasara karşı özellikle "rejenerasyon" süreçlerine etkili olabilecek redoks modülatör ajanlar ile OA'nın muhtemel tedavisinin planlanması haklı yaklaşımdır. OA ve polifenolik bileşikler üzerine çalışmalar yapan Mobasheri, Musumeci ve arkadaşları, ayrıca literatürdeki başka birçok bilimsel araştırma, polifenolik fitokimyasalların deneysel OA'yı önleme veya tedavi etme potansiyeline sahip olduklarını ve bu bileşiklerin en azından antioksidan ve anti-inflamatuvar etkileri sebebiyle klinikte anti-osteoartritik faydaları olacağını öne sürmektedir [15, 16, 73, 74].

2.4. Polifenolik Bileşikler

Bitkiler, içeriklerinde bulunan biyolojik aktif bileşiklerin zenginliği nedeniyle birçok hastalıkta umut vadetmekte bu sebeple dünya çapında ilaç keşfi ve pazarında önemli rol oynamaktadırlar. Yeni bir ilacın geliştirilmesi yaklaşık 15 yıl ve 800 milyon dolara mal olmakta iken, toplumda güvenliliği/etkililiği bilinen, bitki kaynaklı bir ilacın geliştirilmesi 10 yıldan daha az zaman almakta ve yaklaşık 80 milyon dolara mal olmaktadır [75, 76]. Business Communications Company Research (BCC) raporunda, 2017'de bitkisel kaynaklı ilaç pazarının 29,4 milyar dolar değerinde olduğu, bu rakamın 2022'de tahminen 39,6 milyar dolara ulaşacağı belirtilmiştir [77].

Biyoaktiviteleri in vivo ve in vitro çalışmalarla son yıllarda daha çok araştırılan fitokimyasallar (fito; yunancada bitki), özellikle minimal işlenmiş bitkilerde bulunan, temel besin maddesi olmaktan ziyade hücresel düzeyde faydalı işlevleri olan bileşiklerdir. Fitokimyasallar arasında en çok bilinen bileşikler; polifenoller, alkaloidler, fitosteroller ve karotenoidlerdir. Fenolik asitler ve flavonoidlerin de dahil olduğu polifenolik grubu bileşiklerle yapılan sitoprotektif çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Bu bileşiklerin antioksidan, anti-inflamatuvar, rejeneratif etkileri sayesinde hiperglisemi, hiperkolesterolemi, hiperlipidemi, ateroskleroz, obezite, gibi birçok metabolik hastalıkta,

kardiyovasküler hastalıklarda, kanser ve nörodejeneratif hastalıklarda umut vaat eden etkileri gösterilmiştir [78,79,45,46,80,88].

2.5. Osteoartritin Önlenmesi ve Tedavisinde Polifenolik Bileşiklerin Rolü

Osteoartrit ile sonuçlanan bozuklukların hücre içi mekanizmalarında sadece bir yolağı hedefleyen ve tek etken maddeden oluşan sentetik ilaçlara kıyasla, örneğin ekstraselüler matriks metabolizmasını düzenleyen, matriks metalloproteinazları inhibe eden, inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu kontrol eden, erken apoptozu önleyerek hücre homeostazını fizyolojik sınırlarda tutan, kondrojenezi stimüle eden özgün fitokimyasal formülasyonların, içerikleri standardize edilmiş bitkisel ekstraktların, etkili çözüm araçları olabileceğini gösteren deneysel/ klinik çalışmaların ve pratik bilimsel uygulamaların sayısı giderek artmaktadır [16, 73, 89, 95]. Örneğin polifenolikler içerisinde son yıllarda ilgi odağı olan kurkuminin, inflamatuvar sitokinleri inhibe eden, kondroprogenitör fonksiyonları düzenleyen, mezenkimal hücrelerde kondrojenik farklılaşmayı tetikleyen fitokimyasal bir ajan olarak OA’da etkililiği kanıtlanmış ve bu amaçla nutrasötik formları bulunmaktadır [41,73,92,96,97]. Benzer şekilde, berberin, sıçan kondrositlerinde ve kondrosit hücre kültürlerinde etkililiği ve etki mekanizmaları gösterilmiş bir fitokimyasaldır [98]. Bitkilerden izole edilen bir başka alkaloid olan harmin ile yapılan deneysel çalışmalar bu molekülün kondrojenik ve kondroprotektif etkilerini ortaya koymuştur [91]. Saygın çalışmalar, polifenolik içeriği yüksek bitkisel diyetin, en azından anti-inflamatuvar etkileri nedeniyle, OA’lı hastalarda kullanılmaları konusuna vurgu yapmaktadırlar [99]. Fitokimyasalların, OA tedavisinde sık kullanılan glukozamin ve kondroitine kıyasla, OA’nın ilerlemesini anlamlı olarak azalttığını gösteren çalışmalar mevcuttur [100]. Polifenolik fitokimyasallardan resveratrol ve mangiferin ile yapılan çalışmalarda OA’nın önlenmesi ve kıkırdak rejenerasyonunun sağlanması konularında olumlu bulgular elde edilmiştir [101, 102]. OA oluşturulmuş deney hayvanlarında, fitokimyasal karışımların, kıkırdak metabolizmasını düzelttiklerini, ekstraselüler matriks degradasyonunu ve erken apoptozu önlediklerini, eklemlerde dejenerasyonu azalttıklarını, kondrogenez ve osteogenezi arttırdıklarını gösteren çalışmalar vardır [103,105]. OA’lı 440 hastada gerçekleştirilen, randomize kontrollü, çift kör, çok merkezli klinik bir çalışma, etkileri glukozamin sülfat ve selesokzib ile karşılaştırılan ayurvedik bitkisel bir formülasyonun (*Tinospora cordifolia*, *Zingiber officinale*, *Emblica officinalis*, *Boswellia serrata* ekstraktları içeriyor) 24 hafta boyunca OA’lı hastalara verilmesinin diğer tedavi

ajanlarına oranla dejenerasyonu anlamlı olarak gerilettiğini ve kondrojenik etkisiyle kıkırdak rejenerasyonu gerçekleştirdiğini ortaya koymuştur [106]. Başka bir klinik çalışma, *Harpagophytum procumbens*, *Curcuma longa* ve bromelain karışımından hazırlanmış bir nutrasötik (AINAT®, 650 mg), OA'lı hastalarda ağrıyı giderdiğini, kıkırdak dejenerasyonunu gerilettiğini bildirmektedir [107]. Benzer şekilde, willow bark ekstresi (STW 33-I, Proaktiv®) verilen OA'lı hastalarda semptomların gerilediği ve ağrının azaldığı bildirilmiştir [108]. Deneysel OA modelinde kıkırdak hasarı belirteçlerinin zeytinyağı uygulaması sonrasında düzeldiği gösterilmiştir [20]. Kersetin glikozitleri ve kondroitin sülfat, OA'lı hastalarda beraber kullanıldığında, plasebo grubuna oranla, kıkırdakta kollajen yıkımının azaldığı, kollagen sentezinin arttığı bildirilmiştir [109]. OA'lı hastaların diz eklemi içerisine enjekte edilen, kersetin içeren polifenolik karışımın, inflamasyonun eşlik ettiği dejenerasyonu iyileştirdiği de kanıtlanmıştır [110]. Plasebo kontrollü çift kör klinik bir çalışmada, zeytin yaprağının başlıca polifenolik bileşiklerinden hidroksitirazol ile dört hafta boyunca tedavi edilen gonartroz'lu hastalarda eklem ağrısı anlamlı olarak azalmıştır [22]. Yine oleuropein ve rutin tüketiminin de kobaylarda OA gelişimini önlediği gösterilmiştir [26].

Zeytin yaprağı ekstresi ile beslenen sıçanlarda lubrisin ve IL-6 ifadelenmelerinin azaldığı ve kıkırdak oligomerik matriks proteini (COMP) seviyelerinin arttığı gösterilmiştir [20]. Oleuropein [111] güçlü bir antioksidan [28, 112], anti-inflamatuvar [30] ve otofaji uyarıcı [31] olarak kartilaj katabolik biyobelirteçlerini azaltmış ve OA lezyonlarının ilerlemesini önlemiştir [26].

Doğada birçok bitkide bulunan bir flavanoid olan kersetin'in OA'ya karşı faydalı etkilerini hücresel düzeyde gösteren ve etki mekanizmalarını açıklayan makaleler vardır [23,25]. Kersetin, SOD ve TIMP-1'i artırabilir, MMP-13'ü azaltabilir ve oksidatif stres tepkilerini zayıflatarak, kıkırdak hücre dışı matriksinin bozulmasını önleyerek OA'nın oluşturduğu dejenerasyonu engelleyebilir [113]. Kersetin, kondrositlerin inflamasyonunu ve apoptozunu inhibe ederek, OA mevcudiyetinde kıkırdak onarımını arttırmak için pro-kondrojenik bir ortam oluşturarak kondroprotektif etkiler gösterir [24]. Yine kersetin, OA sıçan modelinde, kondrositlerde endoplazmik retikulum (ER) stresin SIRT1/AMPK aracılı inhibisyonu ile oksidatif stres kaynaklı apoptozu azaltır ve OA'nın ilerlemesini önler [25]. Yukarıda bahsedilen çalışmalar ve buna benzer daha birçok çalışma, bitkisel polifenolik bileşiklerin OA tedavisinde faydalı olabilecek etkilerine vurgu yapmaktadır. Bu bilgiler

doğrultusunda çalışmamızda; oleuropein, dut yaprağı ekstreleri ve dut yaprağı içerisinde bulunan polifenollerden kersetin ve deoksinojirimisin ile OA tedavisini hedef almamız akılcı bir adım olmuştur.

2.6. *Morus* (Dut) Bitkisi

Moraceae (dutgiller) familyasından *Morus* (dut) cinsi; ilaç, gıda ve kozmetik endüstrisinde kullanımı yaygın olan, biyoaktif içeriği zengin önemli bitkilerdendir. *Morus* cinsi genel olarak farklı iklim şartlarına uygun türler içerir. Dünya genelinde yaygın olan üç ana türü vardır; beyaz, kırmızı ve kara dut (*Morus alba*, *rubra*, *nigra*). Ülkemizde de dut ağaçları yaygın olarak yetişmektedir. Yetişen bu ağaçların %95'i *Morus alba* L., %3'ü *Morus rubra* L. ve %2'si *Morus nigra* L. türüne aittir. *Morus alba* ise yaygın olarak Doğu Anadolu Bölgesi'nde yetişmektedir. *Morus alba* bitkisinin farklı kısımlarının ve meyvelerinin kullanılışı M.Ö. 3000 yıllarına kadar uzanmaktadır [114,116].

Geleneksel çin tıbbında ateşi önleme, görmeyi iyileştirme, sakinleştirme, kan basıncını düşürme, idrar çıkışını artırma, eklemleri güçlendirme amaçlarıyla dut ağacının meyve, yaprak ve kabuk kısımları çok eskilerden beri kullanılmaktadır [117]. Hindistan, Çin, Kore ve Japonyada dut yapraklarının çeşitli gıda ve çaylar içerisinde günlük hayatta kullanımı da mevcuttur [118].

2.7. *Morus Alba* (Beyaz Dut) Yaprakındaki Biyoaktif Fitokimyasallar

Morus alba L. (Dut) yaprağı ekstrelerinin; antioksidan, antidiyabetik, antiinflamatuvar, antianksiyete, antimikrobiyal ve antiviral etkileri bir çok çalışma ile ortaya çıkarılmıştır [114,118]. Bu etkilerden dut yaprağı içeriğindeki biyoaktif fitokimyasallar sorumlu tutulmaktadır.

Dut yaprağında bulunan başlıca fitokimyasallar Çizelge 2.1'de verilmiştir [103, 118,120]. Bu bileşiklerin farmakolojik etkilerini ayrı ayrı gösteren çalışmaların sayısı çok azdır. Dut yaprağı içerisinde antioksidan etkilerden sorumlu olan çok sayıda polifenol bulunmaktadır [103, 118]. Fenolik içeriği yüksek olan bitkilerin antioksidan özelliğe sahip oldukları bilinmektedir. Fenolik bileşiklerden antosiyanince zengin olan olgun dut meyveleri, C vitamininden daha güçlü radikal süpürme aktivitesine sahiptir. M.alba'nın yaprak

ekstrelerinin total fenolik içeriği, serbest radikal süpürme aktivitesi, ferrik indirgeme gücü, demirli iyon Őelatlama etkisi; meyvelerinden çok daha yüksektir. Antioksidan aktivite sıralaması: geliŐmekte olan yapraklar > genç yapraklar ~ olgun yapraklar > olgun meyvelerdir [116].

Dut yaprağında bulunan ve antioksidan ya da redoks modülatör etkiden sorumlu olabileceği düŐünülen flavonoidler, floanlar ya da bazı diğer polifenoliklerin OA patogenezinin karşı etkili olabilecekleri [118] düŐüncesinden yola çıkılarak bu tez çalışması tasarlanmıŐtır.



Çizelge 2.1. Dut Yaprığında bulunan biyoaktif bileşikler

Flavonoids Atalantoflavone Benzyl D-glucopyranoside Brosimine B Cyclomulberrin Deguelin 2',7-Dihydroxy-4'-methoxy-8-prenylflavan 2',4'-Dihydroxy-7'-methoxy-8-prenylflavan 3',8-Diprenyl-4',5,7-trihydroxyflavone 3'-Geranyl-3-prenyl-2',4',5,7-tetrahydroxyflavone 6-Geranylapigenin 8-Geranylapigenin 8-Hydroxyethyl-7,4'-dimethoxyflavane-2'-O-β-D-glucopyranoside Kaempferol Kaempferol-3-β-D-glucopyranoside Kaempferol-7-O-glucoside Kaempferol-3-O-(6-malonyl)-glucoside Kaempferol-3-O-glucopyranosyl-(1,6)-β-D-glucopyranoside Kuwanon C, J, S Luteolin 7-Methoxyl-8-ethyl-2',4'-dihydroxyflavane-2''-O-β-D-glucopyranoside 7-Methoxyl-8-hydroxyethyl-2',4'-dihydroxyflavane Morusin Myricetin Naringenin Norartocarpetin Quercetin Quercetin-3-O-glucoside Quercetin hydrate Quercetin-3-O-(6-malonyl)-β-D-glucopyranoside Quercetin-3,7-D-O-β-D-glucopyranoside Quercetin 3-(6-malonyloglucoside) Quercetin-3-O-glucoside-7-O-rhamnoside Quercetin-3-O-rhamnoside-7-O-glucoside Rutin Roseoside II Sanggenon J, K Scopolin Skimmin Chalcones Isobavachalcone Morachalcones A, B, C	Phenolic acids Caffeic acid 1-Caffeoylquinnic acid 4-Caffeoylquinnic acid 5-Caffeoylquinnic acid Chlorogenic acid m-Coumaric acid p-Coumaric acid Ferulic acid Gallic acid p-Hydroxybenzoic acid Protocatechuic acid Protocatechuic aldehyde Sinapic acid Syringaldehyde Syringic acid Vanillic acid Coumarins 7-Hydroxycoumarin 7-Hydroxy-6-methoxycoumarin Polyhydroxyalkaloids 1-Deoxynojirimycin 2-O-α-D-Galactopyranosyl-deoxynojirimycin D-Fagomine 4-O-β-D-Glucopyranosyl-fagomine 3-epi-fagomine cis-5-Hydroxypipicolinic acid trans-5-Hydroxypipicolinic acid Isofagomine Methylpyrrolidine carboxylic acid Pipicolinic acid Catechins Catechin Epicatechin Gallocatechin Gallocatechin gallate Terpenoids α-Amyrin Lupeol Loliolide Stilbenoids Chalcomoracin Moracin C, D, M, N, P, V-Y Mulberrofuran F1 Mulberrofuran F Mulberroside F
---	--

2.8. *Morus Alba* Yapraklarındaki Fitokimyasalların Farmakolojik Etkileri

Dut yaprağında bulunan başlıca flavonoidler kercetin, luteolin, kaempferol, rutin, apigenin, naringin olarak bildirilmiştir. Ayrıca, morusin, mulberrin gibi flavonlar, fenolik asitler, stilbenoidler, kalkonlar ve polihidroksillenmiş piperidin alkaloidi deoksinojirimisin dut ekstresi içerisinde bulunan önemli bileşiklerdir [121, 122]. Dut yapraklarında bulunan

polifenolik bileşiklerin antidiyabetik, antimikrobiyal, anti-aterosklerotik, antiartrit, nöroprotektif vb farmakolojik etkilere sahip olduğu, kan glukozu ve kolesterol düzeylerini düşürdüğü çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır [88, 115, 123,125].

Moranolin olarak da bilinen 1-Deoksinojirimisin dut yaprağında yüksek miktarda bulunan bir biyoaktiftir ve güçlü a-glukozidaz inhibitörü etkisine sahiptir [123]. Oral antidiyabetik ilaçlardan olan miglitol, 1-deoksinojirimisinin sentetik türeviyken, akarboz ve vogliboz da bu bileşiğe yapıca benzerlik göstermektedir [126,127]. Klorojenik asit ve rutin ise dut yapraklarının anti-diyabetik etkisinde rol oynayan diğer bileşiklerdir [127].

Dut yaprağı ekstrelerinin antimikrobiyal (antiviral ve antibakteriyel) etkilerinden morusin, deoksinojirimisin ve bazı kimyasallar (kuwanon G, leachianone) sorumlu tutulmaktadır [128,132].

Bazı kanser türlerinde caspaz-3 üzerinden apoptozu indükleyerek antikanser aktivite gösteren dut yaprağının, ayrıca inflamatuvar mediyatörlerin indüklemesiyle sentezi birçok patolojide artan iNOS'u downregüle ettiği ve NO üretimini azalttığı böylece antiinflamatuvar aktivite gösterdiği önceki çalışmalarla ortaya koyulmuştur [133].

Dut yaprağı kersetin, luteolin, rutin ve izokersitrin gibi flavonoidlerden zengin yapısı sayesinde yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir. Bu antioksidanların, LDL oksidasyonunu dolayısıyla ateroskleroza inhibe ederek kardiyovasküler koruma sağladığı [88] hücre çalışmalarında gösterilen nöroprotektif etkileri sayesinde nörodejeneratif bozukluklara iyi gelebileceği [134,136], redoks stres varlığında, reaktif oksijen türlerini ve nitrojen türevlerini azaltarak anti-oksidan ve redoks modülatör etkileriyle anti-dejeneratif ve kondroprotektif olduğu birçok çalışma tarafından kanıtlanmıştır [137]. Kendi laboratuvarımızda da polifenolik bileşikler ile yaptığımız çalışmalarda luteolin, oleuropein ve kersetinin hem kondrositler hem de farklı hücre hatları üzerinde oksidatif stres hasarına karşı hücreleri koruduğu gösterilmiştir [80, 84, 86, 138, 139].

Literatürde *Morus alba* L ekstrelerinin OA'lı hastalarda ağrıyı ve bazı semptomları azalttığına dair randomize kontrollü bir çalışma yayımlanmıştır [33]. Öte yandan, *Morus alba* L ekstreleri verilen OA'lı sıçanlarda inflamasyonun önlendiğini ve ağrının giderildiğini gösteren makaleler bulunmaktadır [32, 140, 144]. Mevcut literatüre

bakıldığında, OA'lı hastalardan izole edilmiş kondrosit hücrelerinde *Morus alba* yapraklarından hazırlanmış ekstrater ile yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.

2.9. Çalışmanın Temel Konusu ve Hedefleri

Osteoartritin semptomlarını gidermek için kullanılan mevcut ilaçlar, hastalığın kompleks patolojisini önlemede, geciktirmede ya da tamamen iyileştirmede sınırlıdır. Çalışmamız, OA'nın oluşumundan sorumlu hücre içi biyokimyasal değişiklikleri önleyen, progresyonu engelleyen, hasarı restore ederken rejeneratif süreçleri indükleyen, OA'lı hastalarda güvenle kullanılabilecek, istenmeyen etki potansiyeli düşük farmakolojik ajanlara ulaşmayı hedeflemiştir. Fitokimyasal ajanlar bu bağlamda umut vaat etmektedir.

Bu tez çalışmasında Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Fitoterapi Eğitim, Uygulama ve Araştırma Merkezinde (BİTEM) ekstrakte ve standardize edilen, bakanlık onaylı, ImmunFLEX® ticari ismiyle piyasada olan ürünün içeriğini oluşturan, Kemaliye-Eğir'e özgü *Morus alba* yaprak ekstrateri kullanılmış ve içeriğini oluşturan bazı polifenoller ve oleuropein ile karşılaştırmalı olarak, OA'lı kondrositlerdeki farmakolojik etkileri test edilmiştir. Çalışmamızın amacı; OA'lı hastalardan izole edilen primer kondrositlerde, kullandığımız polifenolik bileşiklerin hücre canlılığı, hücre proliferasyonu, sağkalım mekanizmaları, redoks biyobelirteçler ve sinyal proteinleri üzerindeki etkilerinin açığa çıkarılmasıdır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Kararı, OA'lı Hastalar ve Dokuların Toplanması

Osteoartritli hastaların patolojik dokuları ile yürüttüğümüz deneysel çalışmalarımız için gerekli etik kurul onayı ekte mevcut olup, Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan alınmıştır.

Sayı: 2012-KAEK-15/1718 Tarih: 08.08.2018.

Çalışmaya alınan hastalar, operasyon öncesi klinikte bir romatolog ve ortopedist tarafından fizik muayeneleri yapılarak uygunluğu değerlendirilen hastalardır. Hastalara olgu rapor formları, bilgilendirilmiş onam formları ve çalışma içeriği, yarar-zarar dengesi, olası riskler, çalışmanın amacı, hedefleri gibi temel bilgiler uygun bir biçimde, açık ve tarafsız bir şekilde anlatılmıştır. Onam formları romatoloji uzmanı tarafından alınmıştır. Hastaların diz operasyonu öncesinde rutinde çekilen diz grafileri dışında ek radyografik inceleme yapılmamıştır. Gönüllülerin araştırmaya dahil edilme kriterleri: **1.** >18 yaşında olmak; **2.** Diz osteoartriti nedeniyle total diz artroplastisi geçiriyor olmak; **3.** Son 6 ay içerisinde glukozamin-kondroitin sülfat ve herhangi bir geleneksel bitkisel tıbbi ürün almamış olmak. Gönüllülerin araştırmaya dâhil edilmeme kriterleri: **1.** <18 yaş olmak; **2.** OA dışında romatizmal hastalığının olması (romatoid artrit ya da ankilozan spondilit gibi); **3.** Diabetes mellitus ve kronik böbrek yetmezliğine sahip olmak; **4.** Sigara ve alkol kullanıyor olmak. Çalışmaya dâhil edilen gönüllü hastalara çalışmada kullanılmak üzere herhangi bir sentetik veya fitokimyasal ajan uygulanmamıştır. Tüm çalışmalar, hastalardan izole edilen kartilaj dokusu kullanılarak yapılmıştır. Çalışmamızda, özellikle patolojik dokudan elde edilen hücrelerin sağ kalım ve çoğalma potansiyellerinin düşük olması ve primer hücre kültürlerinin yüksek pasajlara kadar kullanılabilirliğinin kısıtlı olması sebebiyle hasta sayısı Kraus ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma dikkate alınarak belirlenmiştir [145]. Hastaların demografik ortalamaları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Doku örneklerinin alındığı hastaların demografik ve laboratuvar verileri

	Ortalama±SD	Dağılım
Hasta sayısı	34	K:24 / E:10
Yaş	66.81 ± 6.51	59-83
Vücut kitle indeksi	39.97 ± 4.39	18-42
Total kolesterol (mg/dl)	196.16 ± 38.78	149-296
LDL (mg/dl)	120.60 ± 35.23	65-194
HDL (mg/dl)	50.48 ± 14.17	27-80
Ürik asit (mg/dl)	6.01 ± 1.19	3-8
HbA1c (%)	5.64 ± 0.73	5-8
Sedimentasyon (mm/saat)	18.06 ± 8.74	3-40
CRP (mg/dl)	3.68 ± 3.34	1-7

Osteoartritli hastalardan total diz artroplastisi esnasında çıkarılan kırıkta doku parçaları (femur lateral/ medial kondil, tibia lateral/medial kondil) % 10 FBS ve % 1 penisilin/ streptomisin ile desteklenmiş DMEM/ Hams-F12 besiyeri içerisine aktararak, kuru buz içerisinde 45 dakikayı geçmeyecek şekilde hızlıca Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AbD, CSRS Araştırma Laboratuvarına taşınmıştır.

Alınan doku örnekleri, laboratuvarımızda 4000 rpm +4 °C'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra, taşıma ve çalışma sırasında olası mikrobiyal kontaminasyonu önlemek üzere 4 defa %1 penisilin/streptomisin, %0.5 gentamisin ve %0.5 amfoterisin B ile desteklenmiş HBSS ile yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Yıkanan doku örnekleri Class II UV-LAF kabini içerisinde steril bistüri yardımıyla yaklaşık 1cm² lik küçük parçalara ayrılmış böylece enzimatik parçalama öncesi yüzey alanı artırılmıştır.

3.2. Primer Kondrosit Hücre Kültürü

Küçük parçalar şeklinde kesilen doku parçacıkları, steril fosfat tamponu (0.01 M PBS, pH 7.4) ile 3 kez yıkanarak 1 mg/ml pronaz içeren DMEM Hams-F12 besiyerinde 30 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. Bu işlemi takiben ikincil bir enzimatik yıkım işlemi için dokular 1 mg/ml kollajenaz II içeren %10 FBS, %1 penisilin/ streptomisin ve %0.05 amfoterisin B ile desteklenmiş DMEM Ham's-F12 besiyerinde 18-24 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Parçalanmayan dokular 70 µm'lik süzgeçten geçirilerek ayrıştırılmış, altta kalan filtrat santrifüj edilerek hücre pelleti elde edilmiştir. Pellet PBS ile 3 defa yıkandıktan sonra %10 FBS, %1 penisilin/ streptomisin, %0.05 amfoterisin B ile desteklenmiş DMEM Ham's-F12 besiyeri içerisinde 25 veya 75 cm² lik flasklara ekilerek %5 CO₂, 37 °C'de

yapışıp çoğalmak üzere inkübasyona bırakılmıştır. Besiyeri her 2-3 günde tazelenmiş ve hücreler % 70-80 yoğunluğa ulaştığında pasajlanmıştır [146, 147].

3.3. Hücre Canlılığı Analizi

Klasik hücre canlılık analizi protokolü olarak kabul edilen MTT analizi, canlı hücrelerin metabolik aktivitesine bağlı olarak sarı renkli MTT çözeltisinden mor renkli formazan kristallerinin oluşması esasına dayanmaktadır [148]. Oluşan formazan kristalleri genellikle dimetil sülfoksit veya sodyum dodesil sülfat gibi çözücülerle çözülerek renkli bir çözelti elde edilir. Bu renkli çözeltinin absorbansı, bir spektrofotometre ile belirli bir dalga boyunda ölçülerek belirlenir.

Deneyde, izole edilen P0-P1 primer kondrosit hücreleri, 5×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde 96'lık kültür kaplarına ekilerek % 5 CO₂, 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Yavaş çoğalan, metabolik aktiviteleri düşük ve yapışma potansiyeli az olan primer kondrositler 96'lık kültür kaplarında % 70-90'lık yoğunluğa ulaşmaya kadar kültürlenmişlerdir. Bu süre sonunda etkilerini test ettiğimiz ajanların stok çözeltilerinden besi yeri ile seyreltilerek hazırlanan farklı konsantrasyonları (1nM - 100 µM) 24 saat süreyle hücrelere ayrı ayrı uygulanmışlardır. Muamele süreleri sonunda medium (ortam) uzaklaştırılarak her kuyucuğa 100 µL taze besiyeri koyulmuş ve üzerlerine 10 µL MTT çözeltisi (5 mg/mL PBS içerisinde) ilave edilerek 37 °C'de inkübe edilmiştir. Formazan kristallerin oluşum hızı hücre tiplerine göre değişiklik göstermektedir. Çalışmamızda hücrelere MTT uygulandıktan sonra inverted-mikroskop ile saatlik takip yapılmış ve formazan kristallerin 4. saatten sonra belirgin hale geldiği saptanmıştır. Süre sonunda besiyeri uzaklaştırılarak, oluşan formazan kristalleri 100 µL DMSO'da çözülmüş ve mikropilaka okuyucuda 570 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür (Bio-Tek ELX800, BioTek Instruments Inc., Winooski, VT). Okunan değerler kontrol gruplarının yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

3.4. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türevleri (ROS) Oluşumunun Ölçülmesi

DCFH-DA (2',7'-diklorofluoresin diasetat), ROS'un saptanması için yaygın olarak kullanılan bir metottur. DCFH-DA hücre içinde ROS ve diğer peroksidlerin etkisiyle okside olarak floresan yöntemlerle tespit edilebilen DCF haline gelmektedir [151]. Deneyde ilk önce, 5×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyuluk kültür kaplarına ekilen hücreler,

yüzeye yapışıp yeterli yoğunluğa ulaşmaya kadar birkaç gün kültürlenmişlerdir. Ardından 24 saat boyunca polifenolik ajanların farklı konsantrasyonları ile muamele edilmişlerdir. Daha sonra hücreler taze besiyerinde 20 μ M DCFH-DA ile 37 °C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. DCF floresan ışıması, 488 nm eksitasyon ve 530 nm emisyon olacak şekilde mikropilaya okuyucuda 15 dakika arayla iki kez ölçülmüştür [28]. Ölçülen değerler kontrol grubu ile kıyaslanarak yüzde değişim biçiminde ifade edilmiştir [152].

3.5. ELISA ve Western Blot Deneyleri İçin Protein İzolasyonu

Tüm ELISA kitlerinde ve western blot deneyinde kullanılacak protein lizatları şu şekilde elde edilmiştir: 6’lık kültür kaplarına ekilen primer kondrosit hücreleri yeterli yoğunluğa ulaştıktan ve ilgili deney için gerekli işlemler yapıldıktan sonra hücreler yüzeylerden kazınarak 1.5 mL’lik steril tüplere alınmış ve santrifüj yapılmıştır. Elde edilen hücre pelletleri PBS içerisinde proteaz ve fosfataz inhibitörleri ile desteklenen 1X RIPA tamponu ile +4 °C’de (buz üzerinde) 30 dakika muamele edilmiş ardından problu sonikatör yardımıyla parçalanmıştır. Elde edilen lizat 12000g +4 °C’de santrifüj edilerek proteinleri içeren supernatan kısım yeni steril ependorf tüplere alınmıştır.

BCA protein miktar tayin kiti kullanılarak lizatların protein miktarı belirlenmiştir. BCA protein miktar tayin kiti, bikinkoninik asitin (BCA) proteinlerle etkileşerek renk verme esasına dayanmaktadır [153]. Bu renk değişimi spektrofotometre ile ölçülünerek BCA kit standartlarına göre kalibre edilmiş ve lizatlardaki protein miktarı μ g/mL cinsinden hesaplanmıştır.

3.6. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Deneyleri

Karbonhidrat, lipit ve proteinlerin oksidasyonu ile oluşan ara ürünlerin bazıları AGE/ Pentosidin, 4-HNE ve 3-NT’dir. Bu ara ürünler oksidatif stresin değerlendirilmesinde önemli parametrelerdir. Etkisini test ettiğimiz ajanların oksidatif parametreler üzerindeki etkilerini değerlendirmek adına; Pentosidin, 4-hidroksinonenal (4-HNE) ve 3-Nitrotirozin (3-NT) ELISA kitleri ayrıca apoptoz üzerine etkilerini test etmek için de Caspase-3 ELISA kiti kullanılmıştır. Ayrıca c - Jun N - terminal kinazlar (p - JNK / pan - JNK) da hem sağlıklı hem patolojik dokularda ölçülünerek kullandığımız hücrelerin OA patolojisini taşıyıp taşımadığı gösterilmiştir.

ELISA deneyleri, kit protokolleri esas alınarak yapılmıştır. Elde edilen protein lizatları, eşit miktarda olacak şekilde kit içerisinden çıkan 96'lı kuyucuklara eklenmiştir. Primer ve sekonder antikorlarla inkübasyonları, yıkama işlemleri kit içeriği ve protokole uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Lizatın verdiği ışıma 450 nm'de mikropłaka okuyucuda okutulmuştur. Meydana gelen renk değişiminin absorbans değerleri elisa kitlerindeki standartların absorbans değerleri ile kalibre edilerek hesaplanmış ve BCA kitiyle tayin edilen protein miktarlarına göre normalize edilmiştir [46, 81].

3.7. Western Blot Deneyi

Osteoartritli hastaların diz eklemi artroplastisi sırasında çıkarılan dokularından elde ettiğimiz kondrositlerde, OA patolojisini göstermek adına, OA için biyobelirteç niteliğindeki MMP-9 ve COMP ekspresyon düzeylerine western blot ile bakılmıştır. Sadece bu deneyde, bir kereye mahsus olmak üzere, sağlıklı kondil ve patolojik kondil kartilaj dokularından ayrı ayrı hücreler elde edilmiş, hücreler yeterince çoğaldıktan sonra her iki hücrenin protein lizatları ile deneyimiz gerçekleştirilmiştir. Protein lizatlarından her bir örnek için 30 µg protein, Laemmli yükleme tamponu (% 12 SDS, %30 Beta-merkaptetanol, %30 Gliserol, % 0.2 Bromofenol mavisi, 0.375 M Tris HCl pH:6.8) ile karıştırılmış ve 5 dakika süresince 95°C'de ısıtılarak proteinler denatüre edilmiştir. Hazır hale getirilen proteinler, %4 lük yükleme jeli kuyucuklarına yüklenerek SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforez sistemi (Biorad) ile %10-12 lik ayırma jeli üzerinde dikey elektroforez yöntemiyle ayrıştırılmıştır (buz üzerinde 4°C'de, 120V'da, yaklaşık 2 saatte). Ardından proteinler, Bio-Rad Trans-Blot sistemi kullanılarak buz üzerinde, 250 mA'de, yaklaşık 2 saat süreyle SDS-PAGE jelden 0.2 µm nitroselüloz membrana transfer edilmiştir. Transfer sonunda membran, %5'lik BSA ile oda sıcaklığında düşük hızda çalkalanarak 1 saat süresince bloklanmıştır. Membranlar %5 BSA, %0,1'lik 1x TBS-Tween (TBS-T) içinde dilüe edilen uygun konsantrasyonlardaki primer antikorlar ile (β -Aktin, MMP-9, COMP 1:1000) 4°C'de gece boyu hafifçe çalkanarak inkübe edilmiştir. Ertesi gün membran %0,1 TBS-T tamponu ile 15'er dakika boyunca üç kez yıkanmıştır. Yıkama sonunda membran %5 lik BSA, %0,1 TBS-T içinde anti-mouse (1:1000) veya anti-rabbit (1:1000) horseradish peroksidaz (HRP) konjuge ikincil antikor ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Üç kez, 15'er dakikalık yıkamanın ardından nitroselüloz membran üzerine kemilüminesans (ECL) substrat uygulanarak ışıma oluşumu sağlanmış ve Syngene marka GBOX Chemi XRQ görüntüleme sistemi ile protein bantları tespit edilmiştir.

3.8. Akım Sitometrisi Ölçümü

Akım sitometrik inceleme için hücreler 4×10^7 hücre/ kuyu olacak şekilde 6 lı kültür kaplarına ekildikten ve yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra, çalışmaya dahil ettiğimiz ajanların belirlenen konsantrasyonlarıyla 24 saat muamele edilmişlerdir. Tedavi süreleri sonunda hücreler tripsin ile yüzeyden kaldırılmış ve PBS ile yıkandıktan sonra süspande edilerek ölçüm için hazır hale getirilmişlerdir.^{154,155} Akım sitometri uygulaması ile Annexin V ve kaspaz-3 olmak üzere iki parametre değerlendirilmiştir. Hücre numuneleri, apoptotik hücreleri tanımlamak için, Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit konjugatı ile ve ölü hücreleri tanımlamak için de propidyum iyodür ile inkübasyona tabi tutulmuştur. Ardından Beckman Coulter Navios akım sitometri cihazında okutularak, Beckman Coulter-Kaluza programı ile analiz edilmiştir. Aktif kaspaz-3' te ise antikor inkübasyonundan önce farklı olarak permeabilite çözeltisi eklenerek benzer işlemler yapılmış ve cihazda okutulup analiz edilmiştir.

3.9. Mitokondri Membran Potansiyeli Ölçümü ($\Delta\Psi_m$)

Deney, hücrelerdeki mitokondri hasarının ve membran potansiyelindeki değişimin değerlendirilmesi için JC-1 probu kullanılarak fluoresan boyama yapılması esasına dayanmaktadır [156]. Hücreler 5×10^5 hücre/ kuyu olacak şekilde 48'li kültür kaplarına ekildikten sonra, çalıştığımız ajanların belirlenen konsantrasyonlarıyla 24 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonrası, hücreler PBS ile yıkanmış ve 10 μ M JC-1 ile karanlıkta 37°C'de 30 dakika muamele edilerek fluoresan mikroskopta incelenmiştir. İncelemeler Leica LAS AF7000 software sistemi ile 485 nm eksitasyon, 525/590 nm emisyonunda yapılmış olup Leica DM6000/ Leica DFC420 kamera sistemiyle görüntüler alınmıştır.

JC-1, mitokondri membran potansiyelinin az olduğu apoptotik hücrelerde monomerik halde kalarak fluoresan mikroskopta yeşil ışığa verirken, sağlıklı hücrelerin mitokondrilerinde j agregatları oluşturarak kırmızı ışığa vermektedir. Kırmızı/Yeşil (agregat/monomer) fluoresan boyanma oranına bakılarak mitokondri membran potansiyelindeki değişim değerlendirilmiştir. Kırmızı ve yeşil renklerin piksel yoğunluğu Image J 1.50i programı ile ölçülerek istatistiksel değerlendirme yapılmıştır. Deneyler 3 tekrarlı olarak ve her kuyudan 5-6 adet görüntü alınarak gerçekleştirilmiştir.

3.10. Dokuların çıkarılması ve Hematoksilen-Eozin (HE) Boyama

Ortopedistler, total diz artroplastisi ameliyatı sırasında önce medial sonra da diğer femoral kondillerin en uygun bölgelerinden kartilaj dokuyu çıkarmışlardır. İkinci adımda tibial kemik bloğunu çıkarmışlar ve hastalığın tuttuğu patolojik kısımdan kartilaj doku kesitleri almışlardır. Kondral dokuları subkondral kemik dokularından ayırarak uygun besiyeri içerisinde hücre laboratuvarımıza ulaştırmışlardır. Çıkarılan dokulardan biri ise patoloji laboratuvarına gönderilerek Hematoksilen-Eozin (HE) boyama yapılmış ve osteoartritteki histomorfolojik değişiklikler gösterilmiştir.

3.11. Kullanılan Kitler ve Başlıca Kimyasallar

Deneylerde kullanılan başlıca kimyasallar ve kitler aşağıda belirtilmiştir.

DMEM-F12 besi yeri, Fötal sıgır serumu (FBS), Tripsin, Penisilin/streptomisin Capricorn (Almanya); Amfoterisin B Cegrogen (Almanya); Hank's Balanced tuz çözeltisi (HBSS), PBS Lonza (İsviçre); DMSO Merck (Almanya), Pronaz, MTT Sigma-Aldrich (ABD); Kollajenaz tip II Worthington Biochemical Corp. (ABD); ELISA kitleri Bioassay Technology Laboratory (Çin); BCA protein tahlil kiti Thermo Fisher Scientific (ABD); Tris, NaCl, EDTA, Triton X-100, gliserol, SDS, PMSF, Anti-tavşan COMP, anti-tavşan MMP-9 Abcam (İngiltere); anti-tavşan IgG HRP-konjuge Cell Signaling Tech. (Hollanda); β -Aktin Santa Cruz (ABD), ECL substrate Bio-Rad Products (ABD); DCFDA Cayman (ABD); JC-1 kit Abcam (İngiltere).

Kullandığımız fitokimyasallar; Oleuropein O12247, Quercetin Q4951 Sigma Aldrich (ABD); 1- Deoksinojirimisin Cayman (ABD); dut yaprağı ekstreleri ise Bezmialem Fitoterapi Eğitim Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilmiştir.

Kemaliye-Eğin Dutundan elde edilmiş olan yaprak ekstresi, piyasada ImmunFLEX® adıyla patentli (11.07.2018 Tarihli, Dosya No 2018/09908) olarak bulunan ürünün içeriğinde yer almaktadır. İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, İstanbul Üniversitesi Teknoloji Transfer Merkezi, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Fitoterapi Merkezi ve Tübitak Gıda Enstitüsü iş birliğiyle geliştirilmiş olan Immunflex'in içeriğini oluşturan dut yaprağı ekstresinin, sulu ve etanolik olmak üzere iki farklı standart ekstresi toz halinde laboratuvarımıza ulaşmıştır. Toz halindeki kuru ekstrelerin sulu formu; %4,4 ve etanolik formu %8,6 toplam fenolik içerik bulundurmaktadır. Toz halindeki ekstreler tartılıp 50 mg/mL olacak şekilde distile su veya etil alkol ile çözülmüş ve 0,2 µm'lik filtrelerden geçirilerek ana stok çözeltiler oluşturulmuştur.

Çalışmada kullandığımız tüm fitokimyasallar, deneyler sırasında besiyeri ile dilüe edilerek hedeflenen konsantrasyonlarda hücre kültürlerine uygulanmışlardır.

3.12. Tez Proje Ekibi

Bu tez çalışması bir kısmı bursiyeri olduğum 315S012 kodlu TUBİTAK Projesi tarafından olmak üzere **01/2018-37** nolu proje kapsamında Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) tarafından maddi olarak desteklenmiştir. Tez Danışmanı Prof Dr Çimen KARASU (Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji ABD), araştırma konusunun belirlenmesi, proje ekibinin bir araya gelmesi, projenin yazımı, deneysel süreçlerin değerlendirilmesi, çalışmanın tez ve diğer bilimsel etkinliklere dönüştürülmesi gibi süreçlerde projeye yürütücülük yapmıştır. BAP projede ekibinde yer alan araştırmacılar; Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Romatoloji BD öğretim üyesi DOÇ. DR. Berivan BİTİK; osteoartritli hastaların takibinde, Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji ABD öğretim üyesi Prof Dr Cem Nuri AKTEKİN; OA'lı dokuların temininde, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji ABD Araştırma Görevlisi Dr ZEHRA AYDIN BEK (tez sahibi); kondrosit izolasyonu ve belirlediğimiz ajanların hücrelere etkilerini test etme gibi deneysel süreçlerin gerçekleştirilmesinde projeye katkı sağlamışlardır.

3.13. Verilerin Analizi

Her deney, verilerin tekrarlanabilirliğini sağlamak için en az sekiz OA hastasından elde edilen primer kondrositler üzerinde tekrarlanmıştır. İstatistiksel analizler, GraphPad Prism sürüm 8.0 (GraphPad Software, Inc. ABD) kullanılarak yapılmıştır. Tüm veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak ifade edilmişlerdir. Verilerin karşılaştırılması, uygun post hoc testlerle tek yönlü varyans analizi (ANOVA) veya Kruskal wallis kullanılarak parametrik veya parametrik olmayan değerlerle gerçekleştirilmiş ve $P < 0.05$ ile olan farklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmişlerdir. Verilerin analizi Dr. Ecz Zübeyir Elmazoğlu tarafından gerçekleştirilmiştir.

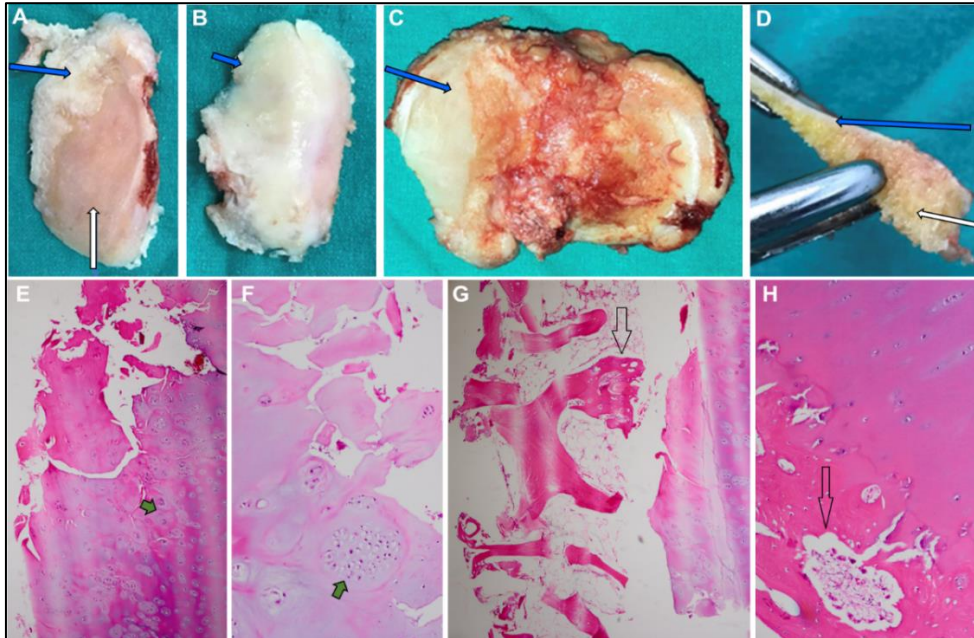


4. BULGULAR

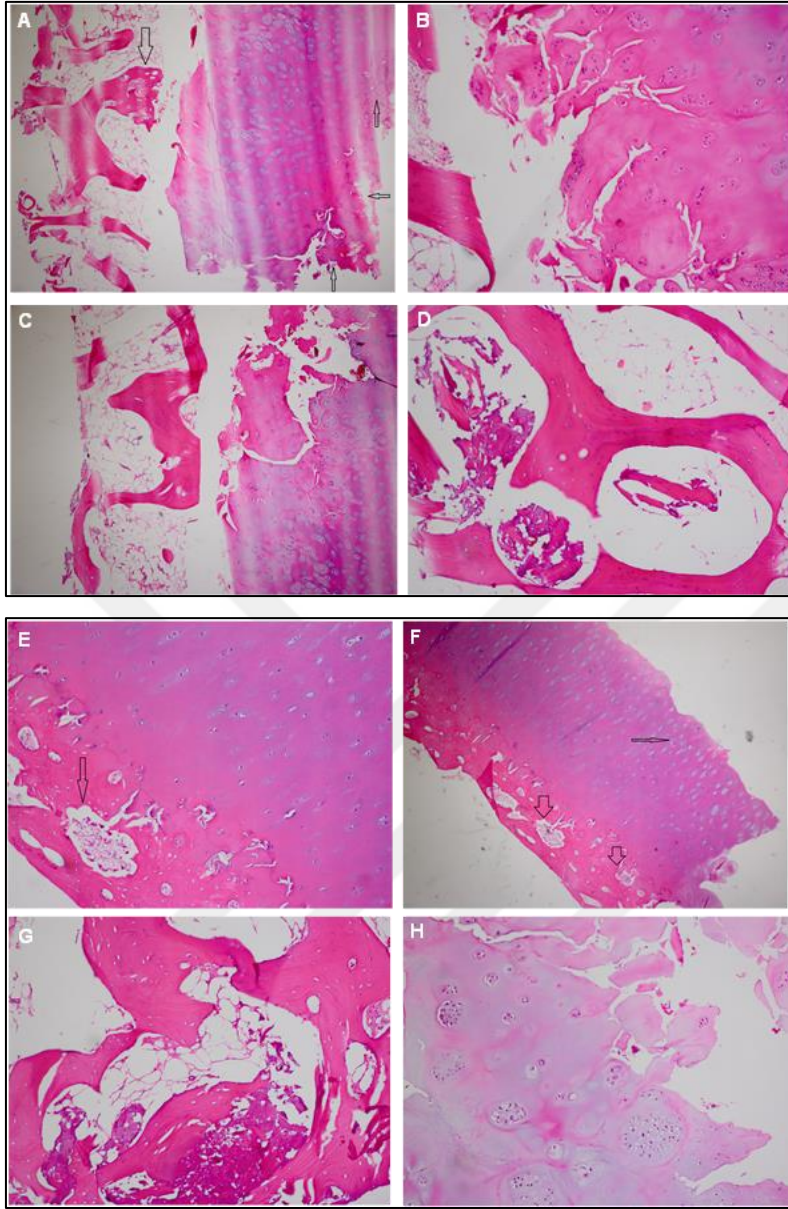
4.1. Osteoartritli Kıkırdak Dokular ve Histomorfolojileri

Osteoartritli hastalardan protez ameliyatı sırasında alınan tibia ve femur kartilaj dokularında histomorfolojiyi değerlendirmek için Hematoksilen-Eozin (HE) boyası kullanılmıştır. HE boyamalarında, tibia da; kemik dejenerasyonu, sekestre olmuş kemik doku fragmanları ve osteosit sayısında azalma dikkati çekmiştir. Lakünler boş olarak izlenmiştir. Kemik ve kartilajda dejenerasyon ve fragmentasyon görülmüştür (Resim 4.1 ve 4.2).

Femurda ise kemik dokusunda dejenerasyon mevcuttur; destrüksiyon ve osteoklastlar izlenmiştir. Kartilaj dejenerasyonu, kemik dokudaki dejenerasyona eşlik etmektedir. Osteosit lakünlerinin bir kısmı boş olarak görülmüştür. Femura ait kartilaj dokuda dejenerasyon ve yer yer kondrosit proliferasyonu izlenmiştir. Fakat asıl değişiklikler başta eklem kıkırdağının kaybı olmak üzere, osteofit oluşumu ve subkondral kemiğin yeniden şekillenmesini içermektedir (Resim 4.1 ve 4.2). Bulgularımız diğer araştırmacıların OA bulguları ile uyumlu olup çalışmamızın bu bulguları daha önce yayımlanmıştır [21, 157].



Resim 4.1. (A): Medial femoral kondil; (B): Lateral femoral kondil; (C) Medial ve lateral tibial kondil. Mavi ok: Kondral doku; Beyaz ok: Subkondral kemik. Eklem kıkırdağında hematoksilin ve eozin (HE) boyama (büyütme 100 ×) ile osteoartritin temsili histopatolojik bulguları. Tibia (E) ve femurda (F) kıkırdak dejenerasyonu, kısmen kondrosit proliferasyonu (yeşil oklar) ve kondromatoz doku fragmentasyonları (F, G). Kemik dokusunda osteoklastlı yıkım ve boş osteosit lakün (G, H; boş oklar)

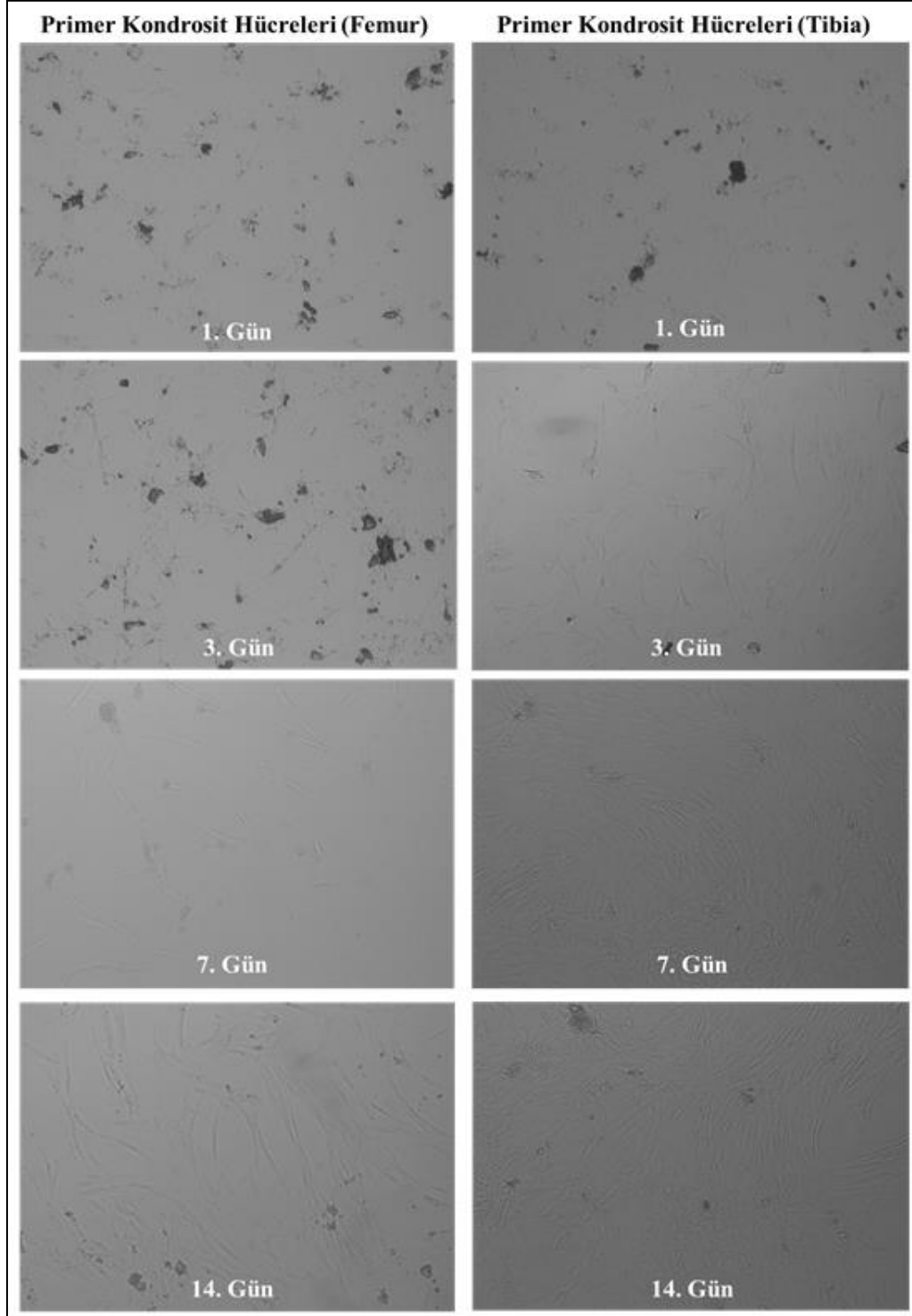


Resim 4.2. Osteoartritli hastalardan alınan tibia (A; kemik), (B,C; kemik-kartilaj), (D; kartilaj) ve femur (E; kemik), (F; kemik-kartilaj), (G; kemik) (H; kartilaj) doku örnekleri. Kartilaj dokudaki dejenerasyon ince oklarla, Kemik dokudaki dejenerasyon kalın oklar ile işaretlenmiştir (H&E x40)

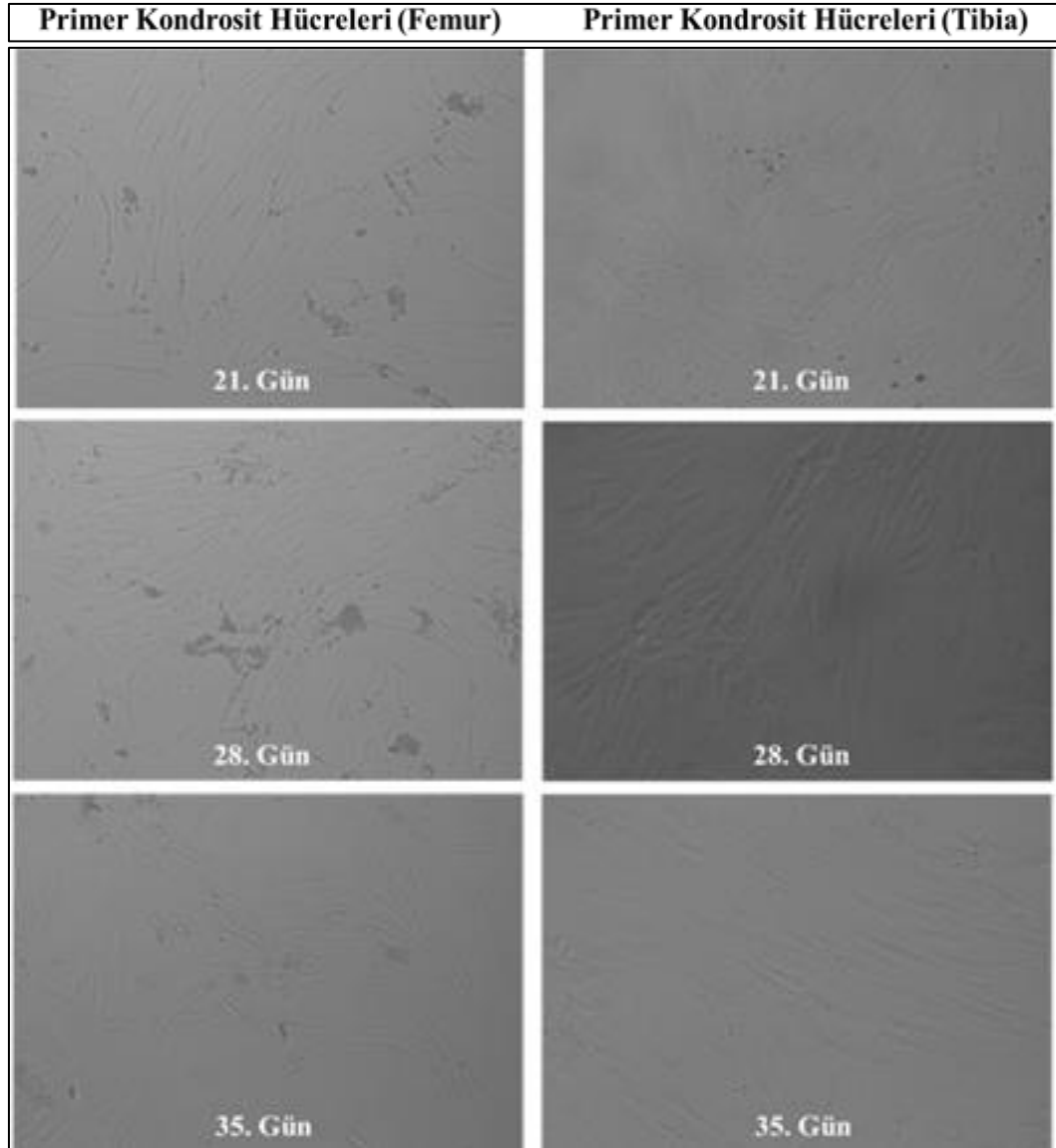
4.2. Primer Kondrositlerin Morfolojileri

Kondrositler hem matriks yapımında, hem de yıkımında görev alırlar. OA'lı hastalardan total diz artroplastisi esnasında alınan femur lateral/medial kondil ve tibia lateral/medial kondil doku örneklerinden izole edilen primer kondrosit hücrelerinin morfolojik değişimleri, çoğalma kapasitesi, ekim-pasaj ve besiyeri değişimi ile ilgili süreçleri inverted-mikroskop yardımıyla incelenmiştir. Yapılan mikroskobik incelemeler sonucunda izole edilen hücrelerin 14-21 günlerde özgül morfolojilerine kavuştuğu, ekim-pasaj işlemleri için uygun doygunluğa ulaştıkları

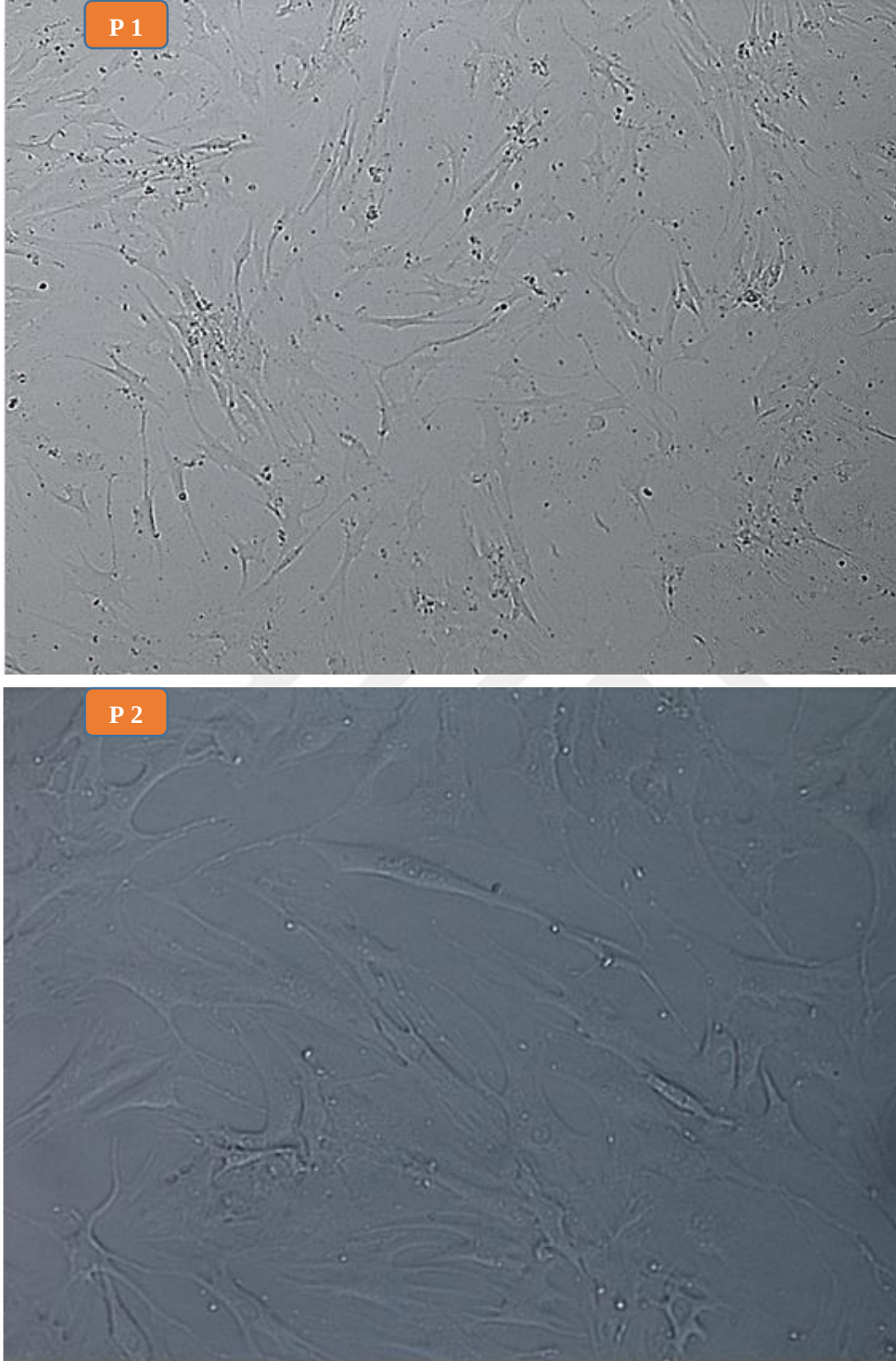
gözlendi (% 70-90). Resim 4.3'te primer kondrosit (OAC) hücrelerinin izolasyon sonrası 1, 3, 7, 14. günlerdeki, Resim 4.4'te ise 21, 28 ve 35. günlerdeki morfolojik değişimlerine ait inverted mikroskop görüntüleri verilmiştir. Ayrıca Resim 4.5'te sırasıyla pasaj 1, pasaj 2 ve pasaj 3'te OAC'lerin inverted mikroskop altındaki görüntülerinden sembolik örnekler eklenmiştir.



Resim 4.3. Primer kondrositlerin izolasyon sonrası 1-14. gün arasındaki morfolojik değişimi. Inverted mikroskop, Leica



Resim 4.4. Primer kondrositlerin izolasyon sonrası 21-35. gün arasındaki morfolojik değişimi. Inverted mikroskop, Leica



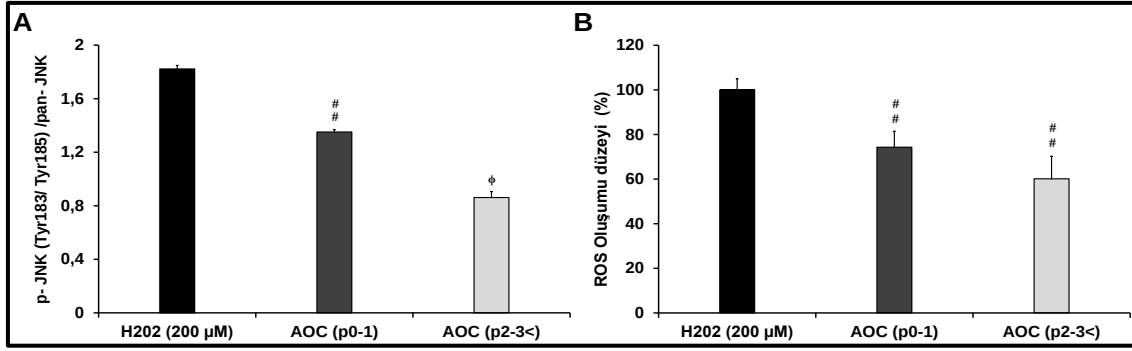
Resim 4.5. Primer kondrositlerin farklı pasaj dönemlerindeki sembolik mikroskop görüntüleri. İğ ve çokgen şekilli hücreler görülmektedir. Inverted mikroskop, Leica (X100)



Resim 4.5. (devam) Primer kondrositlerin farklı pasaj dönemlerindeki sembolik mikroskop görüntüleri. İğ ve çokgen şekilli hücreler görülmektedir. Inverted mikroskop, Leica (X100)

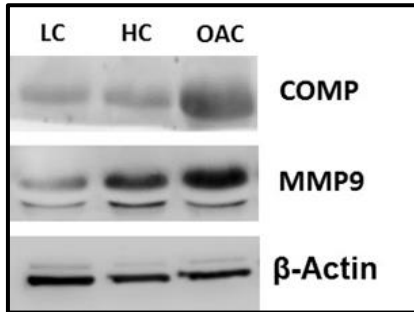
4.3. Primer Kondrositlerde Osteoartrit Patolojisinin Gösterilmesi

Çalışmalarımızda, osteoartritli kondrositlerin (OAC) patolojik durumunu test etmek için p-JNK/pan-JNK oranı ve ROS düzeyleri, H_2O_2 varlığında saptanan düzeyler ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen bulgular, Şekil 4.1’de verilmiştir. OAC’lerin pasaj 0-1 deki p-JNK/pan-JNK oranları ve ROS düzeyleri, pasaj 2 ve üzerindeki alt kültürlerle oranla istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde yüksek bulunmuştur. Bu nedenle, çalışmalarımızın tümünde patolojiye daha yakın olan ilk pasajlar yani p0-1 OAC’ler kullanılmıştır [21].



Şekil 4.1. Primer kondrositlerde p-JNK/pan-JNK oranının (A) ve ROS türevleri seviyelerinin (B), pasaj 0-1, pasaj 2-3 ve H₂O₂ uygulanan konrosit gruplarında karşılaştırılması. ## P<0.01 vs. H₂O₂; φ P<0.001 vs. H₂O₂ [21]

Primer kondrosit hücrelerinde osteoartritin güçlü biyo-belirteçlerinden olan kartilaj oligomerik matriks protein COMP ve katabolik matriks metalloproteinazlardan (MMPs), MMP9'un protein düzeyleri, çalışmamızda Western Blot analiz yöntemi ile incelenmiştir [158, 159] Şekil 4.2'de, Artroplasti sırasında çıkarılan eklemin, osteoartrit tutulumu olmayan lateral kondil kartilajından izole edilen sağlıklı primer kondrositlerde, hidrojen peroksitle (H₂O₂) indüklenen sağlıklı primer kondrositlerde ve osteoartritli kartilajdan izole edilen primer kondrositlerde (OAC) COMP ve MMP9 düzeyleri görülmektedir. COMP ve MMP 9 düzeyleri OAC'lerde sağlıklılara oranla belirgin olarak artmıştır [21] (Şekil 4.2).

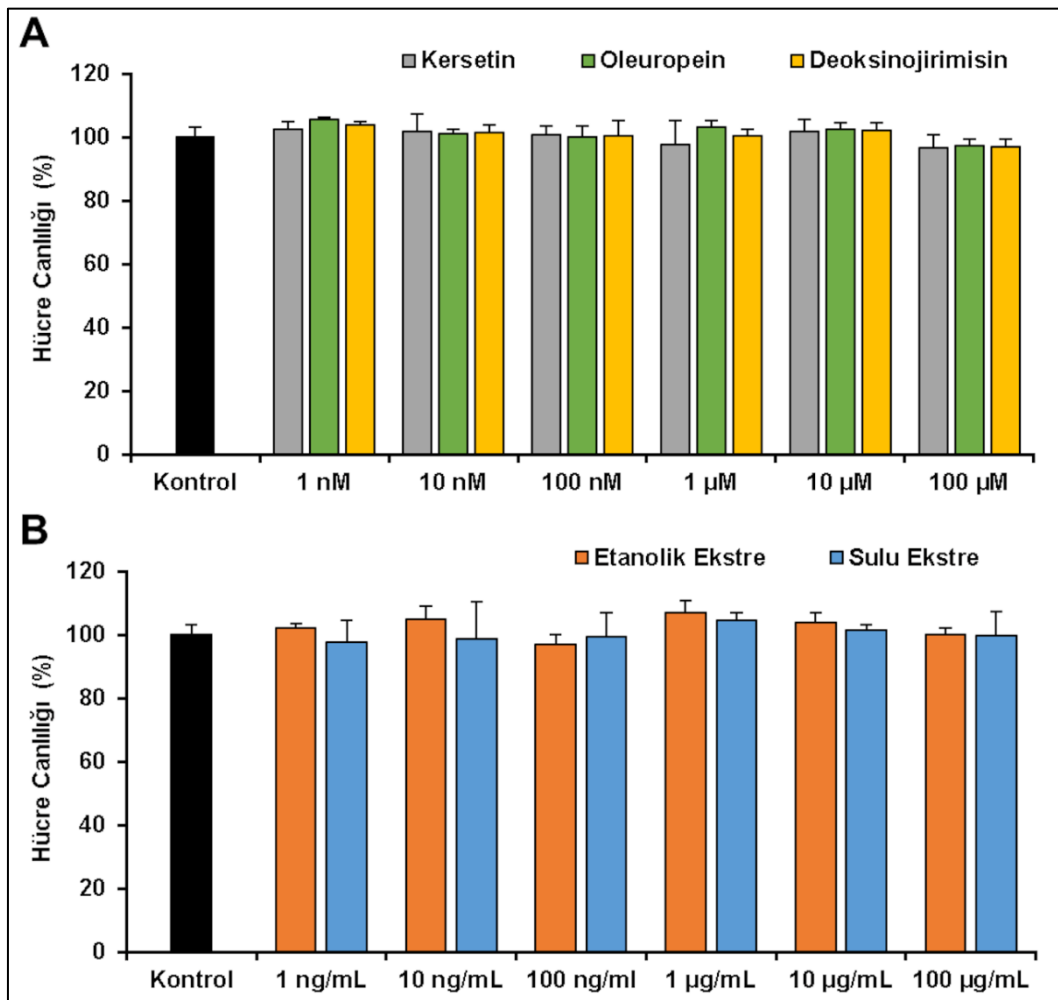


Şekil 4.2. Primer kondrositlerde COMP ve MMP9 düzeyleri. LC: Sağlıklı kondrositler; HC: H₂O₂ ile indüklenmiş sağlıklı kondrositler, OAC: Osteoartritli kondrositler [21]

4.4. Fitokimyasalların Canlılık Üzerine Etkileri/ Sitotoksiste Analizi

MTT analizi, hücre canlılığını değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolium bromürün MTT-formazan'a enzimatik olarak indirgenmesinin mitokondriyal süksinat dehidrojenaz tarafından katalize edildiği dikkate alındığında, MTT analizinin mitokondriyal solunuma bağlı olduğunu ve dolaylı olarak bir hücrenin hücresel enerji kapasitesini değerlendirmeye yaradığını bildirmek

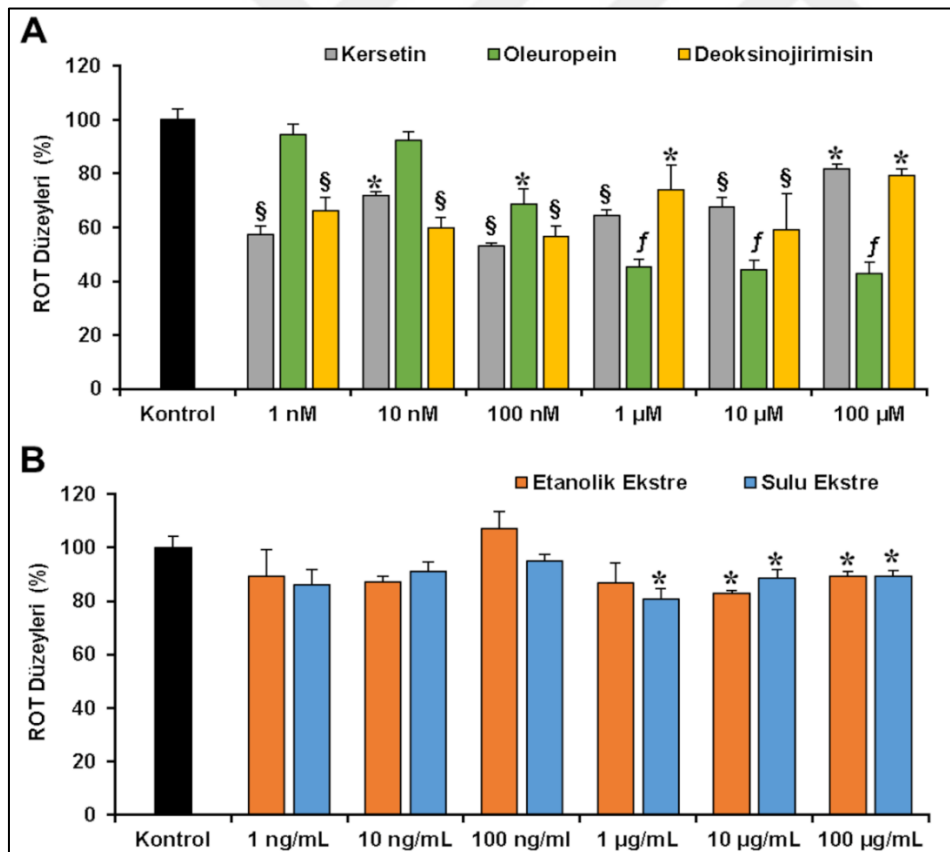
gerekir [149]. MTT analizi, hücre aktivitesi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki sayesinde hücrelerin büyüme hızını ölçtüğü için hücre proliferasyonunun kantitatif ve duyarlı bir tespitidir [150]. Fitokimyasal ajanların, Osteoartritli Primer Kondrositlerin canlılığı/ proliferasyonu üzerine etkileri MTT analizi ile değerlendirilmiştir. Şekil 4.3’de çalışmadaki fitokimyasal ajanların; oleuropein, kersetin, deoksinojirimisin ile dut yaprağının etanolik ve sulu ekstrelerinin farklı konsantrasyonlarda (1 nM – 100 µM), hücre canlılığı/proliferasyonu üzerine etkileri görülmektedir. Uyguladığımız ajanlar, hücreler üzerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir değişikliğe sebep olmamıştır.



Şekil 4.3. Kersetin, Oleuropein, Deoksinojirimisin (1 nM-100 µM) (A) veya Morus alba yapraklarından hazırlanan etanolik ve sulu ekstrelerin (1ng/mL-100 µg/mL) (B), primer osteoartritlik kondrosit hücrelerine 24 saat süreyle uygulanması sonucunda hücre canlılığında meydana gelen değişim (n=5-6) kontrol grubuna göre (Kontrol: OAC/OA’lı kondrosit)

4.5. Fitokimyasalların ROS Düzeylerine Etkileri

Osteoartritli hastaların patolojik kartilaj dokularından elde edilen primer kondrositlerde ROS düzeylerinde meydana gelen değişim, (DCFH-DA) fluoresan probu kullanılarak yapılan deneylerin sonuçlarına göre değerlendirilmiştir. OA'lı kondrositlerde, çalıştığımız farmakolojik ajanların Reaktif Oksijen Türevlerinin (ROS) oluşumu üzerine etkileri Şekil 4.3'de gösterilmiştir. OA'lı kondrositlerde saptanan artmış ROS oluşumu ile kıyaslandığında, çalıştığımız ajanlar içerisinde oleuropein, 1-100 μM konsantrasyonlarda ROS miktarını en belirgin şekilde azaltan molekül olmuştur. Kersetin ve deksinojirimisin tüm konsantrasyonları ROS seviyelerini anlamlı olarak azaltırken, dut yaprağı ekstreleri 1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonlarında ROS oluşumunu azaltmıştır. ROS oluşumunu azaltması polifenolik ajanlardan beklenen bir sonuç olmakla birlikte, OA'lı insan kondrosit kültürlerinde ilk kez bizim laboratuvarımızda gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Kersetin, Oleuropein, Deksinojirimisin (1 nM-100 μM) (A) veya *Morus alba* yapraklarından hazırlanan etanolik ve sulu ekstrelerin (1ng/mL-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (B), primer osteoartritlik kondrosit hücrelerine 24 saat süreyle uygulanması sonucunda hücre içi reaktif oksijen türevleri (ROT) düzeylerinde meydana gelen değişim (n=5-6). *p < 0.05, §p<0.01, fp<0.001, kontrol grubuna göre (Kontrol: OAC/OA'lı kondrositler) (Tek-yönlü ANOVA post hoc Dunnet testi)

4.6. Fitokimyasalların Pentosidin Düzeylerine Etkileri

İleri glikasyon-glukoksidasyon ürünleri olan pentosidinler özellikle bozulmuş glukoz metabolizmasına bağlı olarak oluşan ileri oksidasyon son ürünleri olup HNE ürünleriyle benzer şekilde hücresel efektörlere bağlanarak yapısal ve fonksiyonel bozukluk oluştururlar ve OA'da patolojiyi hem başlatabilir, hem de ilerletirler [54, 160-162]. ELISA kiti ile test ettiğimiz pentosidin düzeyi bulgularımıza göre, osteoartritli kondrositlerde pentosidin düzeylerinin arttığını, kullandığımız fitokimyasal ajanların bu artışı değişik oranlarda anlamlı olarak azalttığını söyleyebiliriz. Genel olarak ajanların hepsi pentosidin düzeylerinde doz bağımlı bir azalmaya neden olmuştur. Fitokimyasalların OA'lı kondrositlerde karbonil son ürünler üzerine etkileri Şekil 4.5'de gösterilmiştir.

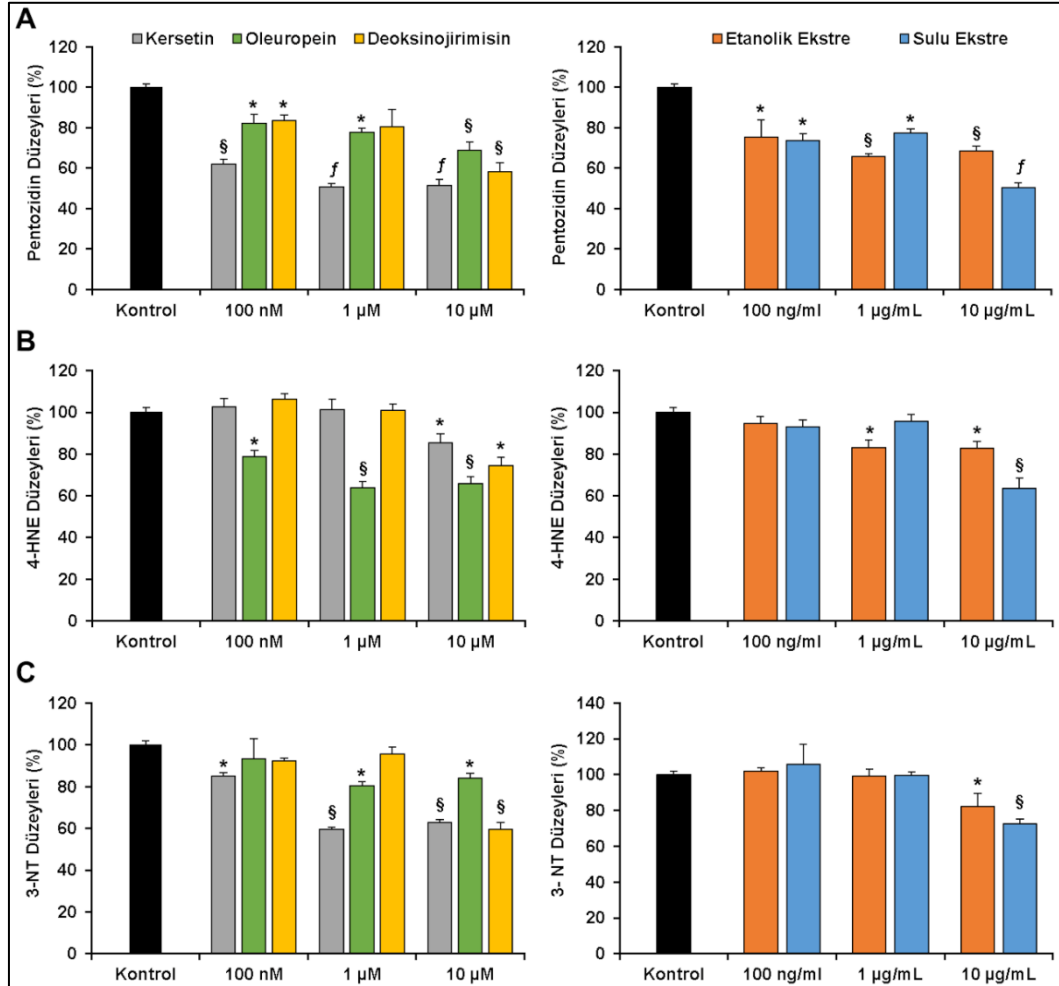
4.7. Fitokimyasalların 4-HNE Eklenti Düzeylerine Etkileri

4-HNE (4-hidroksinonenal), lipid hidroperoksidasyonu sonucu oluşan karbonil türevi bir bileşiktir. Hücrelerde oksidatif hasara bağlı olarak gerçekleşen lipid peroksidasyonunun önemli bir belirteci olarak değerlendirilmektedir [161, 163, 164]. Özellikle hücrelerin protein, fosfolipit ve nükleik asit yapılarına bağlanarak disfonksiyonel veya patolojik son ürünlerin (HNE-adduct) oluşmasına aracılık eder. 4-HNE'nin proteinlerle yaptığı komplekslerin saptanması, proteinlerde ileri oksidasyonun derecesini, bunun diğer sinyal proteinlerine, ER ve mitokondriyal strese, dolayısıyla hücresel dejenerasyon süreçlerine katkısını görebilmek için önemlidir. Fitokimyasal ajanların 4-HNE eklenti düzeylerine etkileri ELISA kiti ile ölçülmüş ve bu bulgularımız Şekil 4.5'de gösterilmiştir. Bulgularımıza göre; OAC'lerde, oleuropein tüm konsantrasyonlarda 4-HNE düzeylerini anlamlı olarak azaltırken, kersetin ve deoksinojirimisin yalnızca 100 μM ' da azaltmıştır. Dut yaprağının etanolik ekstresi 1 ve 10 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda 4-HNE'ye anlamlı etki gösterirken, sulu ekstre yalnızca 10 $\mu\text{g/ml}$ ' de etki ederek 4-HNE seviyelerini azaltmıştır.

4.8. Fitokimyasalların 3-Nitrotirozin (3-NT) Düzeylerine Etkileri

Peroksinitritin yıkılma ürünü olan 3-nitrotirozin (3-NT), protein oksidatif hasarı için bir biyobelirteçtir. Nitrozatif stresin göstergesi sayılan peroksinitrit oluşumundaki artış, metabolizması sonucunda artan 3-NT'in ölçülmesi ile değerlendirilmektedir. 3-NT ELISA kiti sonuçlarına göre, bulgularımız, OA'lı kondrositlerde peroksinitrit oluşumunun yani

nitroztatif stresin arttığını (NO'nun süperoksit ile reaksiyonu sonucunda oluşan ürün), ajanlarımız içerisinde kersetinin tüm konsantrasyonlarında 3-NT düzeylerini anlamlı şekilde düşürdüğünü diğer fitokimyasallarımızın sadece 10 μ M konsantrasyonda anlamlı bir azalmaya neden olduğunu göstermektedir (Şekil 4.5).

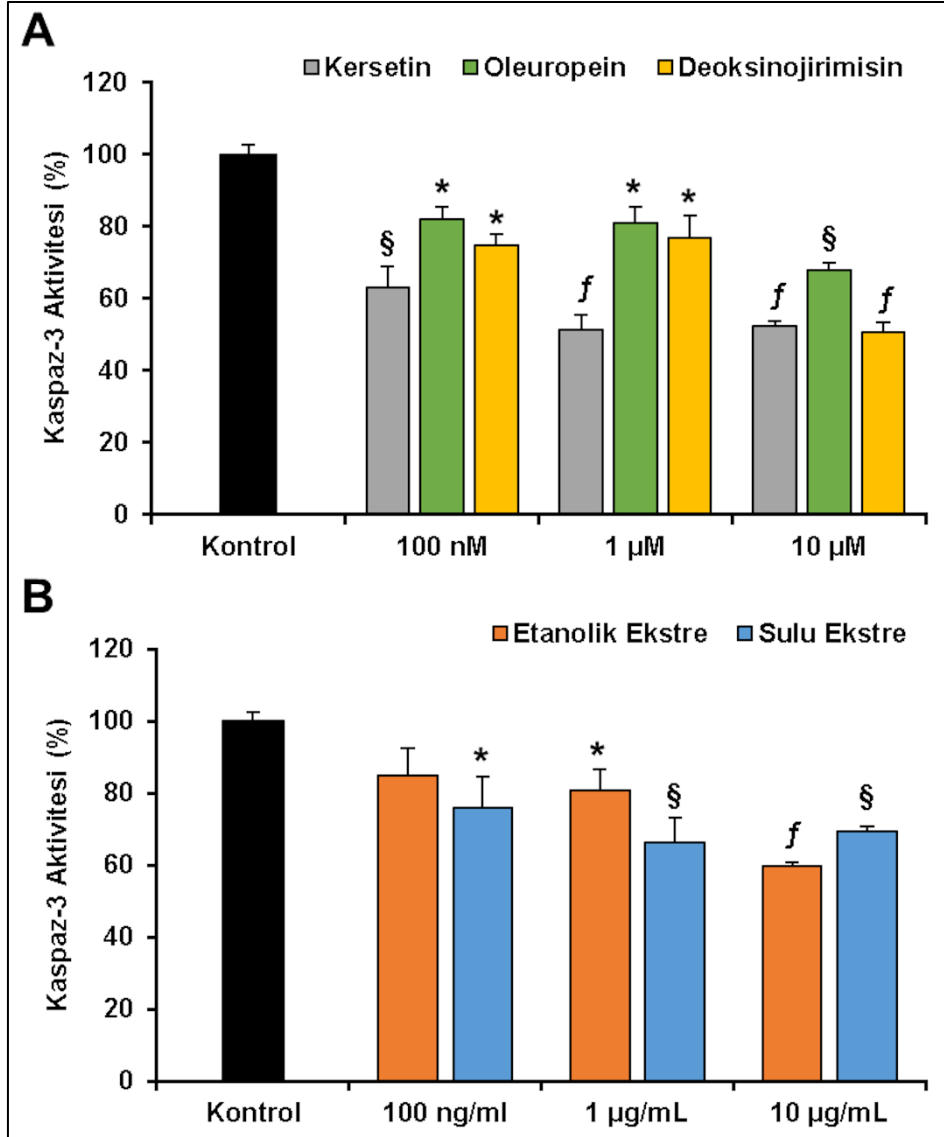


Şekil 4.5. Kersetin, Oleuropein, Deoksinojirimisin (100 nM, 1 veya 10 μ M) veya Morus alba yapraklarından hazırlanan etanolik ve sulu ekstrelerin (100ng/mL, 1 veya 10 μ g/mL) primer osteoartritik kondrosit hücrelerine 24 saat süreyle uygulanması sonucunda hücre içi pentozidin (A), 4-hidroksinonenal (4-HNE) (B) ve 3-nitrotirozin (3-NT) (C) seviyelerinde meydana gelen değişim (n=3). *p < 0.05, \$p<0.01, fp<0.001, kontrol grubuna göre. (Kontrol: OAC/OA'lı kondrosit) (Kruskal Wallis post hoc Dunn's testi)

4.9. Fitokimyasalların Kaspaz-3 Düzeylerine Etkileri

Oksidatif hasarlanmaya cevaben hücrelerde meydana gelen apoptotik sinyaller, kaspaz 3'ü aktiveştirerek DNA fragmentasyonuna ve hücre ölümüne sebep olmaktadır. ELISA kiti ile değerlendirdiğimiz apoptoz yolağı aktivasyon belirteci olan kaspaz 3 düzeyleri [165]

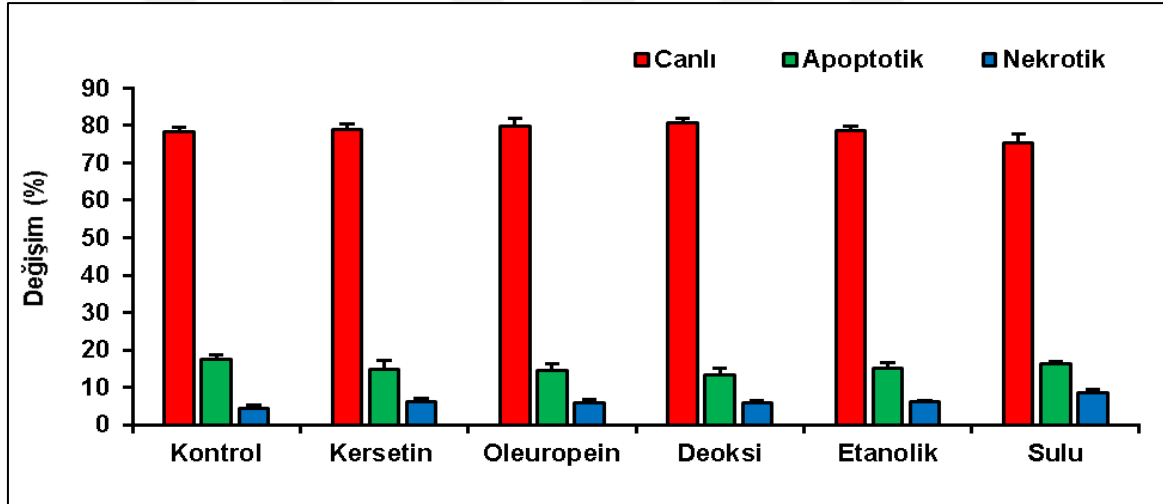
oleuropein, deoksinojirimisin, kersetin ve dut yaprağının sulu/ etanolik ekstralarının tüm konsantrasyonlarında farklı oranlarda anlamlı olarak azalmıştır. Özellikle Kersetinin 1 ve 10 μM konsantrasyonları kaspaz düzeylerinde belirgin azalmaya sebep olurken, deoksinojirimisin ve etanolik dut yaprağı ekstresi de 10 μM ' da belirgin azalmaya yol açmıştır (Şekil 4.6).



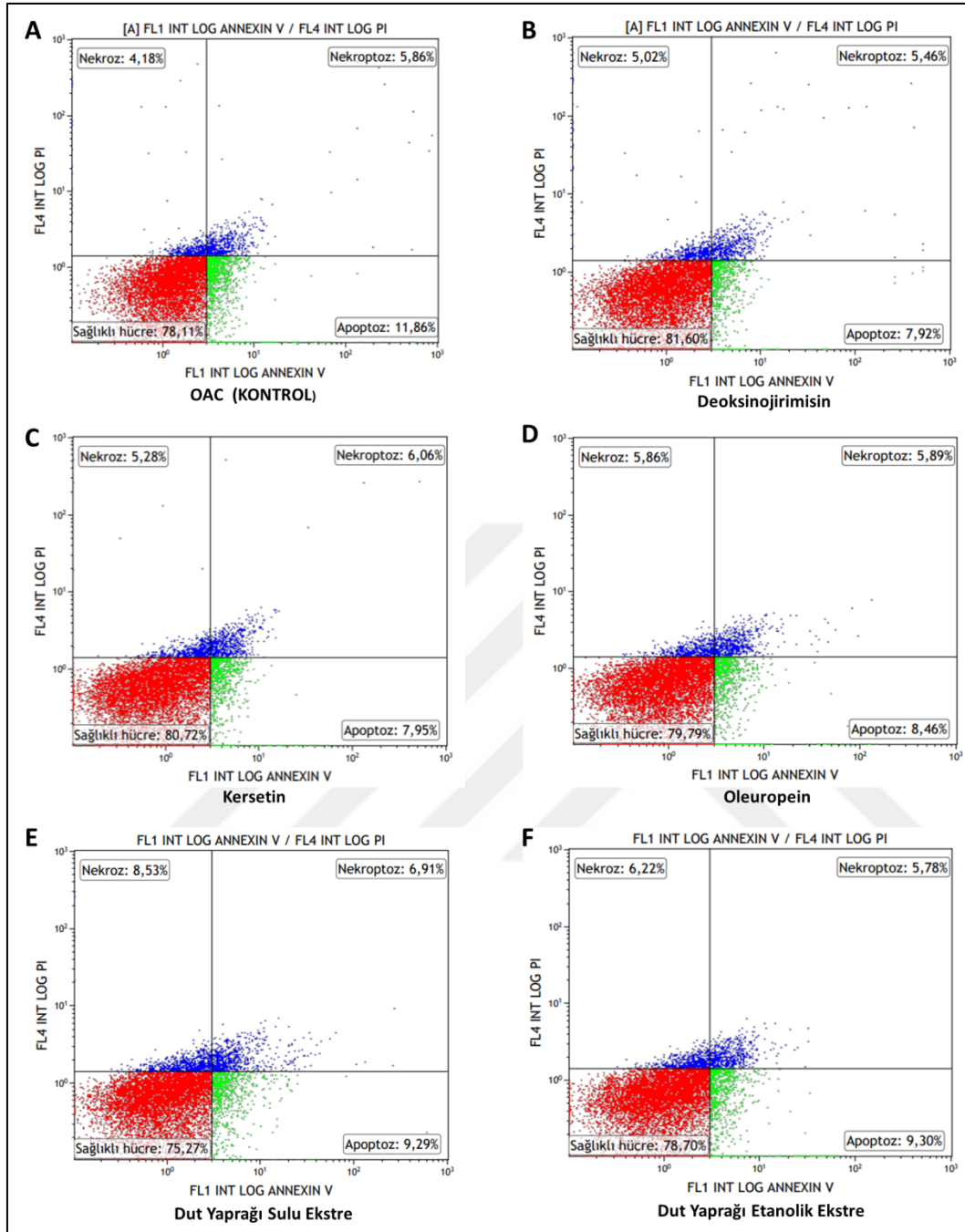
Şekil 4.6. Kersetin, Oleuropein, Deoksinojirimisin (100 nM, 1 veya 10 μM) (A) veya Morus alba yapraklarından hazırlanan etanolik ve sulu ekstralarının (100ng/mL, 1 veya 10 $\mu\text{g/mL}$) (B), primer osteoartritik kondrosit hücrelerine 24 saat süreyle uygulanması sonucunda kaspaz-3 aktivitesinde meydana gelen değişim (n=3). * $p < 0.05$, § $p < 0.01$, $f p < 0.001$, kontrol grubuna göre (Kruskal Wallis post hoc Dunn's testi)

4.10. Akım Sitometri Analizi Sonuçları

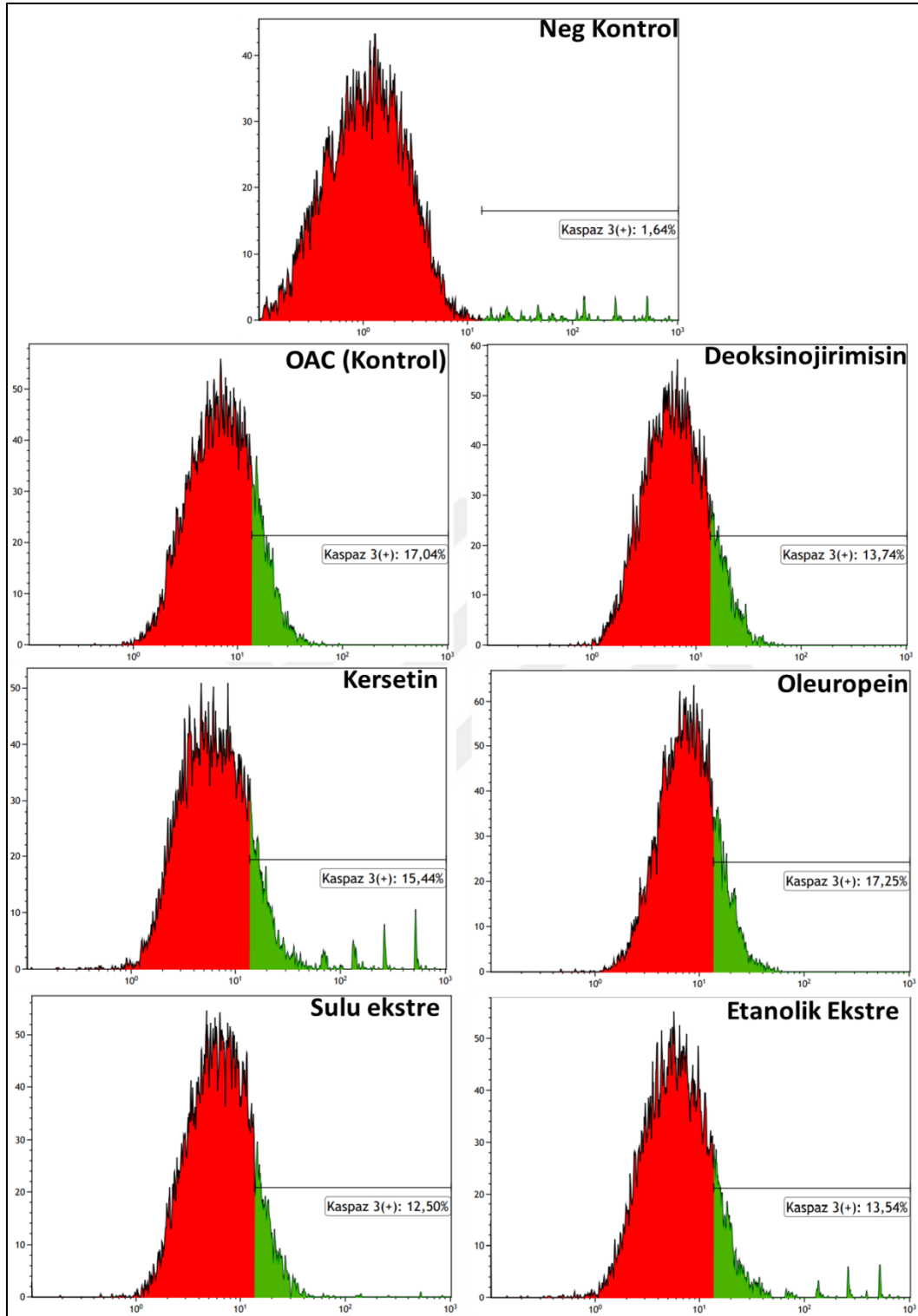
Akım sitometrisinde kullandığımız Annexin V boyama ve aktif kaspaz-3, apoptotik hücrelerin saptanması ve erken apoptoz da aktive olan kaspaz-3 düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan yaygın yöntemlerdir. Anneksin V konjugatları, apoptozun ara aşamalarının bir göstergesi olan fosfatidilserinin eksternalizasyonunu (hücre zarının iç yüzeyinden dış yüzeyine çıkışını), yüksek afinitesi sayesinde saptayarak apoptotik hücreleri tespit eder. Ancak yapışan hücreler tripsinizasyondan olumsuz etkilenebilir ve üzerindeki fosfatidilserinin saptanması yanlış olabilir. Ajanlarımız ile tedavi edilen hücrelerde, Anneksin V deney sonuçlarına göre apoptoz, nekroz oranları (Şekil 4.7, 4.8) ve Kaspaz-3 düzeyleri (Şekil 4.9, 4.10) aşağıda gösterilmektedir.



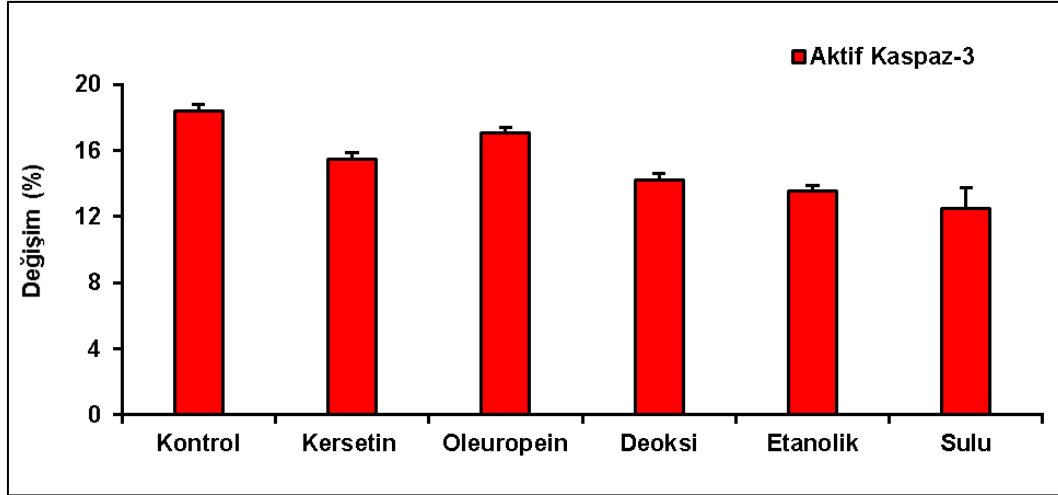
Şekil 4.7. Kersetin, Oleuropein, Deoksinojirimisin (10 μ M) veya Morus alba yapraklarından hazırlanan etanolik ve sulu ekstraktların (10 μ g/mL) primer osteoartritlik kondrosit hücrelerine 24 saat süreyle uygulanması sonucunda apoptoz oranlarında (%) meydana gelen değişim.



Şekil 4.8. Kontrole(A) göre, Deoksinojirimisin (B), Kersetin (C), Oleuropein (D) 10 μ M ve *Morus alba* yapraklarından hazırlanan sulu (E) ve etanolik (F) ekstrelerin 10 μ g/mL, primer osteoartritlik kondrosit hücrelerine 24 saat süreyle uygulanması sonrası akım sitometri ile apoptozun (Anneksin V) gösterilmesi



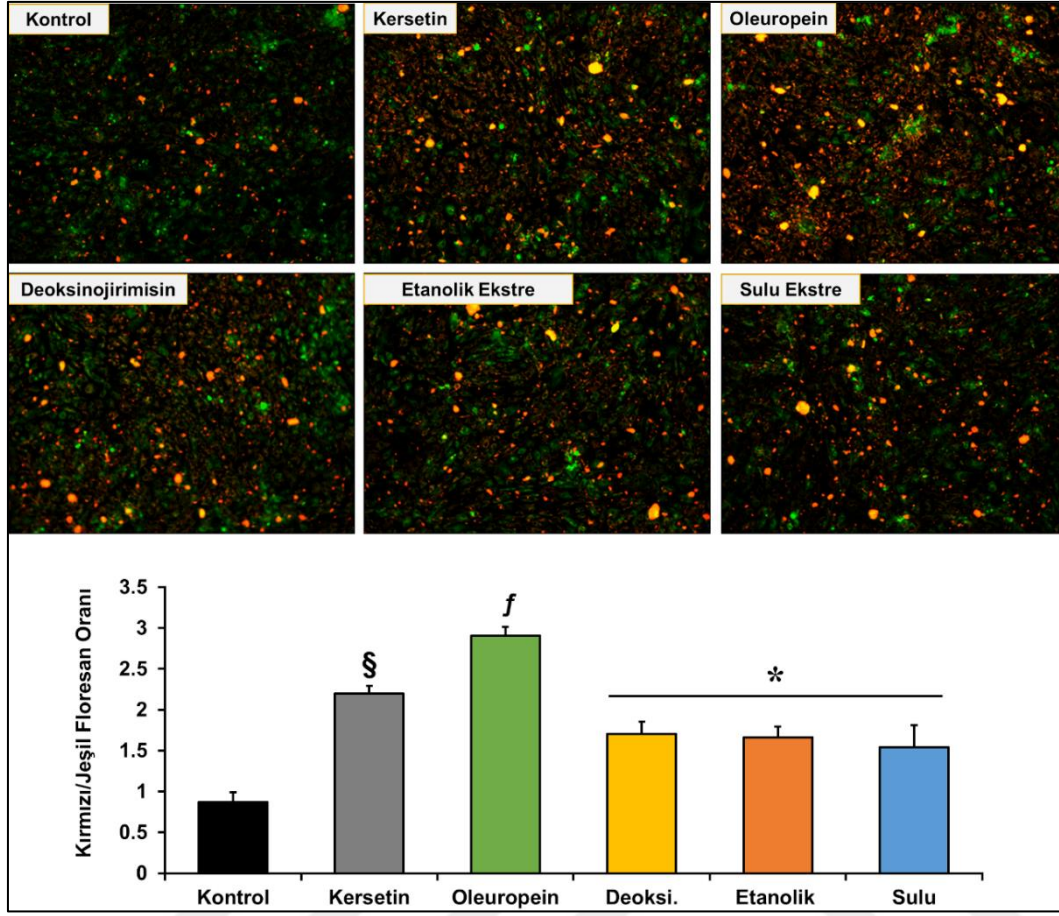
Şekil 4.9. Primer kondrositlerde, uyguladığımız ajanların kontrole göre aktif kaspaz-3 düzeylerinde yaptığı değişiklik (akım sitometri)



Şekil 4.10. Kersetin, Oleuropein, Deoksinojirimisin (10 μ M) ve Morus alba yapraklarından hazırlanan etanolik/ sulu ekstrelerin (10 μ g/mL) primer osteoartritik kondrositlere 24 saat süreyle uygulanması sonucunda kaspaz-3 düzeylerinde (%) kontrole göre meydana gelen değişim

4.11. Mitokondri Membran Potansiyeli ($\Delta\Psi_m$) Üzerine Etkileri

Mitokondri membran potansiyeli, hücrelerin fonksiyonel durumunun bir göstergesidir. Hücrenin enerji metabolizmasından sorumlu olmasının yanı sıra ROS üretimi, apoptoz ve sinyal iletiminde önemli rol oynamaktadır. Mitokondride oksidatif fosforilasyon sonucu oluşan ROS ancak mitokondriyal disfonksiyon durumlarında hücreye zarar verecek düzeye ulaşır. Mitokondri membran potansiyelindeki azalma, mitokondri disfonksiyonunun bir göstergesi olup, apoptozun erken dönemlerinde bu düşüş meydana gelmektedir. Uyguladığımız ajanlar, mitokondri membran potansiyelini, tedavi almayan OA'lı kondrositlere göre farklı oranlarda anlamlı olarak artırmıştır. Dut yaprağı ekstreleri ile deoksinojirimisin benzer oranda etki gösterirken, en belirgin artış oleuropein uygulanan hücrelerde görülmüştür (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Kersetin, Oleuropein, Deoksinojirimisin (10 μ M) veya *Morus alba* yapraklarından hazırlanan etanolik ve sulu ekstrelerin (10 μ g/mL) primer osteoartritlik kondrosit hücrelerine 24 saat süreyle uygulanması sonucunda mitokondriyal membran potansiyelinde meydana gelen değişim meydana gelen değişim (n=4). Yeşil: JC-1 monomer; Kırmızı: JC-1 agregat. *p < 0.05, §p<0.01, fp<0.001, kontrol grubuna göre (Kruskal Wallis post hoc Dunn's testi) (Ölçek: 100 μ m)



5. TARTIŞMA

Osteoartrit (OA), eklemlerdeki kıkırdak, kemik ve sinoviyumun interaktif hasarlanması sonucu ağrı, sertlik ve eklem hareketinde azalma ile karakterize, multifaktöryel, kronik, inflamatuvar, dejeneratif bir sinoviyal eklem hastalığıdır [1,3]. Yaşlanan nüfusun yaklaşık % 15'ini etkileyen OA, sakatlığa neden olan hastalıkların da başında gelmektedir [166]. Kıkırdak dokunun temel hücreleri olan kondrositler, yaşam boyunca, bozulmuş matriks makromoleküllerini yıkıp, yeni sentezlenmiş bileşenlerle değiştirdikçe kıkırdak doku sürekli olarak yeniden modellenmektedir. Kondrositlerde, hücre dışı matriks bileşenlerinin sentezi ve yıkılması arasındaki homeostazi sürdürme yeteneğinin kaybolması, OA'da temel patoloji kabul edilmektedir [158]. Kollajen ve proteoglikanın yıkımı ile açığa çıkan moleküller, dejeneratif enzimlerin ve proinflamatuvar sitokinlerin salıverilmesine [167] ve kondrositlerde apoptozisin artmasına yol açar [12]. Kıkırdak oluşumunda görev alan kondrositlerin apoptozis ile kademeli olarak artan kaybı OA'da kıkırdak erozyonunu başlatır [57].

OA, moleküler düzeyde; sitokinlerin, metalloproteinazların (MMPs) ve bunların doğal inhibitörlerinin (TIMPs) sentezi arasındaki dengenin bozulması ve nihayetinde eklem kıkırdağında yıkım, subkondral kemik ve sinovyal membranda dejenerasyonun meydana getirdiği histomorfolojik bozukluklar ile karakterizedir [168].

İlaç tasarımları konusunda yürütülen yeni çalışmalar, OA'da patolojiye neden olan metabolik bozukluklar ve sinyal değişikliklerinde birden fazla yolağı hedefleyebilen ve farmakodinamik etkililikleri, güvenilirlikleri sentetik türevlere oranla oldukça yüksek olan fitokimyasal yeni ajanların umut vaat ettiğini vurgulamaktadır [169,172]. Buradan hareketle çalışmamızda, hücre içi redoks süreçleri etkileyerek homeostazi düzenleme potansiyelleri olan fitokimyasal ajanların OA patogeneziye etkilerinin ve etki mekanizmalarının, primer kondrosit kültürlerinde araştırılması planlanmıştır. Çalışmamızda kullandığımız oleuropein, kersetin, deoksinojirimisin ve dut yaprağının etanolik/ sulu ekstratlarının, OA'lı primer kondrositlerde dejeneratif ve rejeneratif süreçlere katkıda bulunan redoks mekanizmaların bir kısım sinyal yolları üzerine etkileri araştırılmıştır.

OA patogeneziyi aydınlatmaya yönelik mevcut bilimsel araştırmalar genellikle hayvan modeli ve dokularda çalışılmıştır. Literatürde, primer insan kondrositlerinde yapılan çalışmaların sayısının az olduğu, hücre kültürlerinde yapılan mevcut çalışmaların da büyük oranda hücre

hatlarında yapıldığı ve OA patolojisinin sitokin indüksiyonu ile taklit edilmeye çalışıldığı görülmektedir [173]. Çalışmamız, OA'lı hastaların eklem kıkırdağından elde edilen ve OA patolojisi taşıyan primer kondrosit hücre kültürlerinde yürütüldüğü ve moleküler düzeyde gerçekleştirildiği için özgündür. Literatürde, OA patogeneziye yönelik klinik öncesi araştırmalarda genellikle inflamatuvar süreçlere ve semptomların giderilmesine odaklanılmış buna karşın redoks stresle tetiklenen dejenerasyondan sorumlu hücre içi yollar üzerinde yeterince durulmamıştır.

Bulgularımıza göre, OA'lı primer kondrositlerde pasaj sayısı arttıkça; ROS düzeylerinde düşme, pJNK / JNK oranlarında azalma görüldüğü, buna göre, hücrelerin patolojik özelliklerini yitirdiği saptanmıştır. Pasaj sayısı artan primer kondrositler, OA patolojisinden uzaklaştığı için deneylerimizde p0 ve p1 hücreler kullanılmıştır. Ayrıca sağlıklı dokudan elde edilen kondrositlerle OA'lı dokudan elde edilen kondrositleri karşılaştırdığımız western blot deneyi ile, OA'lı primer kondrositlerin MMP-9 ve COMP ekspresyonlarının yüksek olduğu gösterilmiş, hücrelerin OA patolojisini taşıdığı kanıtlanmış ve çalışmalarımız bu şekilde patolojik dokulardan elde edilen hücrelerde (OAC) sürdürülmüştür. Çalışmada kullandığımız fitokimyasal ajanlara ilk aşamada toksisite analizi yapılarak çalışmaya devam edeceğimiz konsantrasyonların belirlenmesi amaçlanmıştır. Canlılık ve toksisite analizi sonuçlarına göre (MTT), kullandığımız polifenolik ajanların osteoartritli primer kondrositler tarafından iyi tolere edildiklerini, hücre proliferasyonu üzerinde toksisiteye neden olmadıklarını, bu bağlamda farmakolojik olarak uygulanabilir nitelikte olduklarını söyleyebiliriz [174]. Uyguladığımız ajanlar hücrelere toksik olmadığı gibi hücre çoğalmasını arttırıcı yönde bir etki de göstermemişlerdir. Ancak kondrositler metabolizmaları çok yavaş hücreler olduğundan ve bölünme sayıları sınırlı olduğundan bu beklenen bir bulgudur [175]. Ayrıca canlı hücrelerin fonksiyonel mitokondrilerini yansıtan MTT deneylerinin sonuçları bu ajanların, sağ kalıma aracılık eden mitokondriyal biyogenezi veya aktivasyonu indükleyebildiği anlamına da gelmektedir [149]. Bu çıkarımımız mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) ölçüm sonuçlarıyla da doğrulanmıştır. OA'lı kondrositlerde düşük çıkan mitokondri membran potansiyeli, kullandığımız fitokimyasalların etkisiyle artmış bulunmuştur. MMP'nin artması, ajanların hücreleri apoptoza karşı koruduğunun, kondrosit ölümünü azalttığının ve hücrelerde sağkalımı artırdığının ayrıca mitokondriyal disfonksiyona bağlı ROS üretimini de azalttığının bir göstergesidir. Oleuropein ve kersetin MMP'yi arttırmada diğer ajanlara kıyasla daha etkili bulunmuştur ve bu etkileri daha önce yapılan çalışmalarla uyumludur [21,80,81]. Benzer şekilde ajanların, ELISA ve akım sitometride aktif Kaspaz-3 düzeylerine ve canlı hücrelerde

akım sitometri ile anneksin V boyanma (apoptoz) düzeylerine bakılarak, primer kondrositlerde sağ kalım ve apoptoz üzerine etkileri test edilmiştir. Seçtiğimiz konsantrasyonlarda yalnızca dut yaprağının etanolik ekstresi 100 nM'da kaspaz düzeylerine etki etmemiştir. Diğer tüm konsantrasyonlarda ve ajanlarda kaspaz düzeyleri anlamlı olarak azalmıştır. Akım sitometrisi sonuçlarımızda ise kontrol grubuna kıyasla ajanlar apoptotik hücre yüzdelerini düşürmüştür. Osteoartritik süreçte kondrositlerin erken apoptoza gidişi hastalığın patogenezinde ve kıkırdak kaybının ilerlemesinde önemlidir [12]. OA varlığında erken apoptoza giden kondrositlerin, uyguladığımız ajanlar sayesinde, sağkalımı artmış, erken apoptoza gidişi azalmıştır. Çalışmamız, kullandığımız fitokimyasalların kondrositler üzerindeki bu olumlu etkilerinden yola çıkarak, ajanların kondroprotektif etkileri olduğunu, hücresel düzeyde ortaya çıkarmıştır.

Öte yandan fitofenollerin bilinen antioksidan etkileri çalışmamızla da ortaya koyulmuştur. Reaktif oksijen türevleri (ROS) hücreyi ölüme götüren birçok hücre içi yolağın tetikçisi sayılmaktadır ve hücredeki en önemli oksidandır [176]. Dut yaprağı ekstreleriyle muamele edilen kondrositlerde 1 µg/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarda ROS düzeylerinde anlamlı düşüş meydana gelirken, diğer polifenoller de farklı oranlarda ROS oluşumu seviyelerini düşürmüştür. MTT ve ROS deneylerinin sonuçlarına göre, ELISA deneyleri için ajanların 100nM, 1µM ve 10µM konsantrasyonları ile devam edilmeye karar verilmiştir. ELISA ile değerlendirmiş olduğumuz oksidatif parametreler, protein ve lipidlerin oksidasyonu ve karbonhidrat glikasyonu ile oluşan son ürünler olup oksidatif stres belirteci olarak kullanılmaktadır. Eklem kıkırdığı diğer dokulara göre kollajen, proteoglikan gibi yarı ömrü daha uzun molekülleri fazlaca içerdiğinden, oksidatif stresle ilişkili moleküllerin birikimine (ileri glikasyon son ürünleri, lipid peroksidasyon ürünleri, nitrozile proteinler) karşı oldukça duyarlıdır [177,179]. İleri glikasyon son ürünlerinden (AGE) olan pentosidin, yaşlandıkça artiküler kıkırdakta birikmeye başladığı ve osteoartrit (OA) patogenezinde katkıda bulunduğu literatürde birçok makalede geçmektedir. Pentosidin, AGE'ler içerisinde sensitivitesi yüksek bir son üründür. Pentosidin birikimi sonucunda artan reaktif oksijen türevleri, eklem kıkırdığında moleküler, biyokimyasal ve biyofiziksel hasara neden olarak OA'nın başlamasında ve ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır [179]. DeGroot ve arkadaşları OA'lı hastaların sinoviyal sıvılarında ve serumlarında hastalığı olmayanlara kıyasla daha yüksek pentosidin seviyeleri tespit etmiştir [179]. Mevcut başka çalışmalar OA'lı hastaların serum ve kıkırdak dokularında, model oluşturulmuş deney hayvanlarında pentosidin düzeylerinin arttığını göstermiştir. Bir klinik çalışmada ise OA'lı hastaların ve sağlıklı kişilerin sinoviyal sıvılarında, pentosidin ile kıkırdak oligomerik matriks proteini (COMP) seviyeleri arasındaki

ilişki, OA için belirteç olması açısından araştırılmış, OA varlığında her iki molekülün de korele bir şekilde yüksek olduğu gösterilmiştir [179]. Kondrositler tarafından sentezlenen COMP, hiyalin kıkırdığın önemli bir bileşeni olup kıkırdak yıkımının da önemli bir göstergesi olarak kabul edilmektedir [181,183]. Öte yandan AGE'lerin (pentosidin), reseptörleri olan RAGE'ler ile etkileşimi, hücre içinde oksidatif stresi artırarak nükleer faktör κ B (NF- κ B) ve MAPK yollarını aktive ettiği neticesinde pro-inflamatuvar genlerin ve matriks metaloproteinazların (MMP) transkripsiyonuna yol açtığı bilinmektedir [21, 184]. Bu bağlamda osteoartritte AGE-RAGE etkileşimi potansiyel terapötik hedeftir [21]. Çalışmamızda, OA'lı kondrositlere uyguladığımız fitofenolik ajanların tamamı pentosidin düzeylerinde kontrole göre anlamlı bir düşüşe neden olmuş, pentosidin oluşumunu inhibe etmiştir. Diyabet, çalışmaya aldığımız hastalarda dışlama kriteri olduğu için, bu bulgu, diyabet teşhisi almamış kişilerde dahi bir ileri glikasyon son ürünü olan pentosidin OA patolojisinde rol oynayabildiğini bildiren raporları desteklemektedir [14].

Lipit peroksidasyonunun kuvvetli bir göstergesi olan 4-HNE'nin, OA'lı hastaların eklem dokularında arttığı, MMP-13'ü, proinflamatuvar ve apoptotik sinyal yollarını aktive ettiği ayrıca kıkırdak proteinlerine eklenti oluşturarak yapılarını bozduğu böylece OA patogenezinde rol oynadığı *in vivo* ve *in vitro* olarak gösterilmiştir [180, 185, 187]. 4-HNE'nin proteinlerle yaptığı eklentilerin/ komplekslerin saptanması, proteinlerde ileri oksidasyonun derecesini, bunun diğer sinyal proteinlerine, ER ve mitokondriyal strese, dolayısıyla hücresel dejenerasyon süreçlerine katkısını görebilmek için önemlidir. Çalışmamızda, fitokimyasal ajanların HNE-adduct (eklenti) oluşumunu inhibe ettiği gözlenirken, oluşan cevabın konsantrasyondan bağımsız geliştiği izlenimi oluşmuştur. OA'lı kondrositlerde yüksek olan HNE-eklenti seviyeleri, oleuropein uygulanan hücre gruplarında ve dut yaprağı sulu ekstresinin 10 μ g/mL konsantrasyonunda belirgin olarak azalırken, diğer ajanlar kısmen anlamlı olacak şekilde HNE düzeylerine etki etmişlerdir. Osteoartritli insan primer kondrositlerinde bu ajanların HNE-eklenti düzeylerine etkilerini gösteren başka bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalıştığımız bir diğer oksidatif parametre olan 3-NT (3-nitrotrozin); Peroksinitritin yıkılma ürünü olup, OA patogenezinde önemli bir biyobelirteç olarak vurgulanmaktadır [188]. 3-NT'nin osteoartritli hastaların sinoviyal sıvılarında sağlıklılara göre yüksek bulunduğu, iNOS ve inflamatuvar yollarla ilişkisinden dolayı OA patogenezinde katkıda bulunduğu ortaya

koyulmuştur [189]. Çalıştığımız ajanların 3-NT üzerindeki etkileri, çalışmamız dışında OA'lı insan kondrositlerinde (OAC) henüz bildirilmemiştir.

Kondrositler kıkırdak bileşenlerini sentezlemek için, fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) /Akt ve mitojenle aktive edilen protein kinazlar (MAPK'lar; p38, ERK) ile c-Jun N-terminal kinaz (JNK) dahil olmak üzere birkaç sinyalleme kaskadı aracılığı ile terminal farklılaştırma işlemine katılırlar. Sinyal yollarındaki bozulma, proteolitik enzimlerin artışına ve kıkırdak degradasyonuna yol açarken bir taraftan da kondrositlerin terminal farklılaştırma davranışında değişikliğe neden olarak kıkırdağın kemikle yer değiştirmesine katkıda bulunur [190]. Bunu kanıtlar nitelikte, p0-1'deki OAC'ler, p2-3 < OAC'lerden daha yüksek bir pJNK / JNK oranı ve daha fazla ROS oluşumu göstermiştir. Ayrıca, ROS ve JNK yolu arasındaki etkileşimin, çalışmamızda kullandığımız erken pasajlı yüksek patolojili OA'lı kondrositlerde, OA patogenezi hafif gösteren geç pasajlı kondrositlere oranla yüksek bulunması bize yüksek ROS seviyelerinin PI3K/ Akt yolu ve MEK / ERK yolunu inhibe ettiğini düşündürmektedir [191,193]. pJNK / JNK, MAPK yolunun oksidatif stres aracılı aktivasyonunun apoptoz ve inflamasyon gibi çeşitli hücrel olayları düzenlediği ve p38, JNK ve ERK dahil olmak üzere fosforlanmış MAPK seviyelerinin OA kıkırdağında yukarı regüle olduğu gösterilmiştir [191, 194-196]. JNK'lar, insan kondrositlerinde apoptotik faktörlerin salıverilmesini indükleyen proapoptotik kinazlar gibi işleve sahip olduğundan, çalışmamızda p2-3'deki kondrositlere kıyasla, p0 kondrositler daha yüksek pJNK / JNK oranı, daha fazla aktive olmuş intrinsik apoptotik yolları işaret etmektedir [21].

Lateral kondil sağlıklı kıkırdaktan elde edilen normal kondrositlerle karşılaştırıldığında, p0'daki OAC'lerde artmış düzeyde COMP ve aktive olmuş MMP-9 ekspresyonu görülmektedir. Çalışmamızla uyumlu olarak, kıkırdak ekstrasellüler matriksi oluşumunda ve organizasyonunda kritik rol oynadığı bilinen COMP ve MMP-9'un kıkırdak dejenerasyonunun şiddetiyle orantılı olarak arttığı gösterilmiştir [197,199].

Bulgularımız, inflamasyon ve matriks bozulmasına yol açan, katabolik yolların aktivasyonunu arttıran MMP'lerin ve ROS ile ilişkili glikasyon, glukoksidasyon, lipoksidasyon, karbonilasyon, nitrosilasyon reaksiyonlarının OA patogeneziinde arttığını desteklemektedir.

Çalışmamızı destekler nitelikteki makaleler son yıllarda uluslararası literatürde artmıştır. Bu bağlamda redoks modülatör, doğal polifenolik bileşiklerin OA'nın önlenmesi ya da tedavisinde en azından prognozunun yavaşlatılması süreçlerinde etkili terapötikler olabilecekleri gerçeği bilimsel kanıtlarla güçlenmektedir. Aslında polifenolik karışımlar, “nutrasötik” “OTC”, “dietary supplement” kapsamında çok sayıda inflamatuvar hastalığa karşı destek amaçlı pazarlanmaktadır.

Çalışmamızın kısıtlı yönleri olarak 4. evre OA'lı hastalardan elde edilen kondrositlerde çalışmış olmamız sayılabilir ki çalışmada kullandığımız ajanların etkilerinin farklı klinik derecelerdeki OA'lı hastalardan alınacak doku örneklerinde çalışılması önemlidir. Ayrıca, tüm deneylerin sağlıklı kondrositlerle de karşılaştırılabilir olması çalışmamızı daha anlamlı hale getirecektir, ancak sağlıklı insan eklem dokularının elde edilmesi etik nedenlerden dolayı zordur.

In-vitro modellerin genel olarak dezavantajı, doku/ hücre üzerindeki tüm sistemik etkilerin ortadan kalkması ve hastalık için gerekli olan eklem bileşenlerinin dokular arası iletişimini birarada bulunduramamasıdır [200]. Ayrıca çalışmamızda cerrahinin uygun olduğu ileri evre (evre-4) hastaların dokularını kullanmamız, erken hastalık sürecini incelemeyi zorlaştırmaktadır. Bu yüzden yaptığımız çalışma hayvan modelleri ile desteklenerek erken aşamaların da taklit edildiği daha ileri düzeye taşınabilir. Ancak unutulmamalıdır ki her modelin avantajları olmasına rağmen, hiçbir model hastalığı bir bütün olarak inceleme fırsatı sunamaz. Örneğin 3D modeller ve doku kültürlerinin üretilmesi ve hücre canlılığının uzun süreler boyunca sürdürülmesi zordur. Ayrıca her hücre tipinin kültürlenmesi için farklı koşullar gereklidir. Hücre kültürlerine nazaran doku kültürlerinde deneyler arası değişkenlik daha sık olmaktadır. Bu yüzden hücre kültürü modelleri OA patofizyolojisinde yer alan moleküler mekanizmaları ve yolları aydınlatmak için önemlidir ve kullanılmaktadır. Primer hücre kültürlerinin çok çabuk farklılaşmaya gidiyor olması bir dezavantaj gibi görülse de bu bir avantaj olabilir, çünkü zaten patolojik koşullar altında, eklem kondrositleri normal fenotiplerini yitirerek hipertrofiye doğru farklılaşmakta ve sonunda apoptoza gitmektedir [200, 201].

Çalışmamız hem osteoartrit patofizyolojisinde rol alan redoks mekanizmaların değerlendirilmesi hem de kullandığımız ajanların etkilerinin test edilmesi açısından önemlidir ve mevcut böyle bir çalışma bulunmadığından literatüre katkı sağlamıştır.

6. SONUÇ

Bu tez çalışmasında; etanolik ve sulu olmak üzere iki farklı form dut yaprağı ekstresi ve ekstre içeriğinde doğal olarak bulunan polifenolik fitokimyasallardan kersetin, deoksinojirimisin ile ekstrenin içeriğinde yer aldığı bildirilmeyen oleuropein, OA'lı hastaların eklem kıkırdaklarından izole edilen primer kondrosit hücre kültürlerine uygulanarak, OA patogeneze etkileri açısından test edilmişlerdir. Ajanların etkileri dejeneratif/ rejeneratif yolaklar, redoks belirteçler, nitrozatif/oksidatif stres belirteçleri, stresle aktive edilen apoptoz belirteçleri kapsamında araştırılmıştır. Araştırmayı uygun bulduğumuz fitokimyasal ajanları tercih etme sebebimiz hücre içi redoks süreçleri etkileyerek homeostazı düzenleme potansiyellerinden kaynaklanmaktadır. Çalışılan tüm polifenolik bileşiklerin, değerlendirdiğimiz parametreler bakımından kondrosit ölümünü ve kıkırdak yıkımını azaltmaya yönelik hücre içi molekülleri hedefledikleri gösterilmiştir. Projemiz kapsamındaki ajanlardan deoksinojirimisinin hücresel etkileri bu proje kapsamında ilk kez çalışılmış olmakla birlikte, seçtiğimiz polifenolik bileşiklerin etkilerinin OA'lı primer insan kondrositlerinde moleküler düzeyde çalışıldığını gösteren literatür ya nadirdir ya da yoktur.

Son çalışmalar, en azından antiinflamatuvar ve antioksidan aktivitelerinden dolayı doğal polifenolik bileşiklerin OA'nın önlenmesi ve/veya tedavisi için iyi birer aday olduklarını göstermiştir [101,113,129,202]. Bu bağlamda, yürüttüğümüz tez çalışması ile kullandığımız polifenolik bileşiklerin; OA'lı insan kondrositlerinde, stresle aktive edilen proinflamatuvar faktörlerin salıverilmesini uyaran, kondrosit proliferasyonunu inhibe eden, mitokondriyal disfonksiyona yol açan, apoptozu arttıran oksidatif/ karbonil/ nitrosatif stresleri farklı oranlarda azalttığı gösterilmiştir. Redoks disregülasyonun modülasyonu, aslında hücreleri oksidatif stres kaynaklı hücre ölümüne karşı koruyarak kondroprotektif, antiosteoartritik etkileri açığa çıkarılmıştır.

Etkilerini elimizdeki imkanlar dahilinde test ettiğimiz polifenolik ajanlar, daha ileri çalışmalarla araştırılıp geliştirilerek, nutrasötik ya da farmasötik bir formül dahilinde, osteoartritin önlenmesi, prognozunun yavaşlatılması veya hastalığın tedavisinde, kondroprotektif ve rejeneratif hücre içi yolaklara hedeflenmiş ajan(lar) olarak klinik çalışmalara alınma potansiyeli taşımaktadırlar.



KAYNAKLAR

1. O'Neill TW, Felson DT. Mechanisms of Osteoarthritis (OA) Pain. *Curr Osteoporos Rep.* 2018 Oct;16(5):611-616.
2. Hunter DJ, Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis (seminar). *Lancet* 2019; 393(10182):1745-1759.
3. Bodur H. Dünyada ve Türkiye’de Osteoartrite Güncel Bakış; Epidemiyoloji ve Sosyoekonomik Boyut. *Türk Geriatri Dergisi* 2011; Özel Sayı 4 / (7-14)
4. Vina ER, Kwoh CK. Epidemiology of Osteoarthritis: Literature Update. *Curr Opin Rheumatol.* 2018; 30(2): 160–167
5. WHO /Priority Medicines for Europe and the World 2013 Update
6. Rani N, Sabbioni G, Mazzotta A, Rocchi M, Stagni C, Filanti M, et al. Infiltrative therapy as conservative treatment in hip osteoarthritis: a literature review. *HIP International* 2016;26,Suppl-1:8-13.
7. Kolasinski SL, Neogi T, Hochberg MC, Oatis C, Guyatt G, Block J, et al. American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the Management of Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee. *Arthritis Care Research*; 2020;72:149-162.
8. Adatia A, Rainsford KD, Kean WF. Osteoarthritis of the knee and hip. Part II: therapy with ibuprofen and a review of clinical trials. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2012;64:626-36.
9. Musumeci G, Aiello FC, Szychlińska MA, Di Rosa M, Castrogiovanni P, Mobasher A. Osteoarthritis in the XXIst century: risk factors and behaviours that influence disease onset and progression. *Int J Mol Sci.* 2015;16(3):6093-6112.
10. Kraus VB, Blanco FJ, Englund MA, Karsdal LS, Lohmander LS. Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. *Osteoarthritis Cartilage* 2015;23:1233-1241
11. Portal-Núñez S, Esbrit P, Alcaraz MJ, Largo R. Oxidative stress autophagy epigenetic changes and regulation by miRNAs as potential therapeutic targets in osteoarthritis. *Biochemical Pharmacology* 2016;108:1-10.
12. Minguzzi M, Cetrullo S, D'Adamo S, Silvestri Y, Flamigni F, Borzì RM. Emerging Players at the Intersection of Chondrocyte Loss of Maturational Arrest, Oxidative Stress, Senescence and Low-Grade Inflammation in Osteoarthritis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018;2018:3075293
13. Musumeci G, Castrogiovanni P, Trovato FM, Weinberg AM, Al-Wasiyah MK, Alqahtani MH, et al. Mobasher. Biomarkers of chondrocyte apoptosis and autophagy in osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences* 2015;16:20560-20575.

14. Hardin JA, Cobelli N, Santambrogio L. Emerging Players at the Intersection of Chondrocyte Loss of Maturational Arrest Oxidative Stress Senescence and Low-Grade Inflammation in Osteoarthritis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018;8:3075293.
15. Oliviero F, Scanu A, Zamudio-Cuevas Y, Punzi L, Spinella P. Spinella Anti-inflammatory effects of polyphenols in arthritis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2018; 98:1653-1659.
16. Guan VX, Mobasheri A, Probst YC, Probst A. Systematic review of osteoarthritis prevention and management with dietary phytochemicals from foods. *Maturitas* 2019; 122:35-43.
17. Ghoochani N, Karandish M, Mowla K, Haghighizadeh MH, Jalali MT. The effect of pomegranate juice on clinical signs matrix metalloproteinases and antioxidant status in patients with knee osteoarthritis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016; 96:4377-4381.
18. Gong D, Geng C, Jiang L, Wang L, Yoshimura H, Zhong L. Mechanisms of olive leaf extract-ameliorated rat arthritis caused by kaolin and carrageenan. *Phytotherapy Research*, 2012 ;26:397-402.
19. Takuma M, Haruka K, Mutsuto W, Toshiki M, Kenshiro M, Akane, T, et al. Olive leaf extract prevents cartilage degeneration in osteoarthritis of STR/ort mice. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 2018;82:1101-1106.
20. Szychlinska MA, Castrogiovanni P, Trovato FM, Nsir H, Zarrouk M, Lo Furno D, et al. Musumeci Physical activity and Mediterranean diet based on olive tree phenolic compounds from two different geographical areas have protective effects on early osteoarthritis muscle atrophy and hepatic steatosis. *European Journal of Nutrition* 2019; 58:565-581.
21. Elmazoglu Z, Bek ZA, Sarıbaş GS, et al. TLR4, RAGE, and p-JNK/JNK mediated inflammatory aggression in osteoarthritic human chondrocytes are counteracted by redox-sensitive phenolic olive compounds: Comparison with ibuprofen. *J Tissue Eng Regen Med*. 2020;14(12):1841-1857.
22. Takeda R, Koike T, Taniguchi I, Tanaka K. Double-blind placebo-controlled trial of hydroxytyrosol of *Olea europaea* on pain in gonarthrosis. *Phytomedicine* 2013;20:861-864.
23. Qiu L, Luo Y, Chen X. Quercetin attenuates mitochondrial dysfunction and biogenesis via upregulated AMPK/SIRT1 signaling pathway in OA rats. *Biomedical Pharmacotherapy* 2018; 103:1585-1591.
24. Hu Y, Gui Z, Zhou Y, Xia L, Lin K, Xu Y. Quercetin alleviates rat osteoarthritis by inhibiting inflammation and apoptosis of chondrocytes, modulating synovial macrophages polarization to M2 macrophages. *Free Radical Biology and Medicine* 2019;145:146-160.

25. Feng K, Chen Z, Pengcheng L, Zhang S, Wang X. Quercetin attenuates oxidative stress-induced apoptosis via SIRT1/AMPK-mediated inhibition of ER stress in rat chondrocytes and prevents the progression of osteoarthritis in a rat model. *Journal of Cellular Physiology* 2019; 234:18192-18205
26. Horcajada MN, Sanchez C, Membrez Scalfo F, Drion P, Comblain F, Taralla S, et al. Oleuropein or rutin consumption decreases the spontaneous development of osteoarthritis in the Hartley guinea pig. *Osteoarthritis and Cartilage* 2015; 23:94-102.
27. Cumaoglu A, Rackova L, Kartal M, Karasu C. Effects of olive extracts on free radical metabolism and glucose stimulated insulin release in INS-1E cell line exposed to H₂O₂. *FEBS Journal* 2008;275:99-437.
28. Cumaoglu, A, Ari N, Kartal M, Karasu C. Polyphenolic extracts from *Olea europea* L. protect against cytokine-induced β -cell damage through maintenance of redox homeostasis. *Rejuvenation Research* 2011;14:325-334.
29. Cumaoglu A, Rackova L, Stefek M, Kartal M, Maechler P, Karasu C. Effects of olive leaf polyphenols against H₂O₂ toxicity in insulin secreting β -cells. *Acta Biochimica Polonica* 2011;58:45-50.
30. Bali EB, Ergin V, Rackova L, Bayraktar O, Küçükboyacı N, Karasu Ç. Olive leaf extracts protect cardiomyocytes against 4-hydroxynonenal-induced toxicity in vitro: comparison with oleuropein, hydroxytyrosol, and quercetin. *Planta Med.* 2014 Aug;80(12):984-92.
31. Achour I, Arel-Dubeau AM, Renaud J, Legrand M, Attard E, Germain M. Oleuropein Prevents Neuronal Death Mitigates Mitochondrial Superoxide Production and Modulates Autophagy in a Dopaminergic Cellular Model. *International Journal of Molecular Sciences* 2016;17:1293.
32. Yimam M, Lee YC, Kim TW, Moore B, Jiao P, Hong M et all. Analgesic and anti-Inflammatory effect of UP3005, a botanical composition Containing two standardized extracts of *Uncaria gambir* and *Morus alba*. *Pharmacognosy Res.* 2015 Jun;7(Suppl 1):S39-46.
33. Kalman DS, Hewlings SJ. The Effects of *Morus alba* and *Acacia catechu* on Quality of Life and Overall Function in Adults with Osteoarthritis of the Knee. *J Nutr Metab.* 2017;2017:4893104.
34. Mobasheri A, Batt M. An update on the pathophysiology of osteoarthritis. *Ann Phys Rehabil Med.* 2016 Dec;59(5-6):333-339
35. Musculoskeletal Health in Europe: Report v5.0. European Musculoskeletal Conditions Surveillance and Information Network, 2012.
36. Bilge A, Ulusoy RG, Üstebay S, Öztürk Ö. Osteoartrit. *Kafkas J Med Sci* 2018; 8 (Ek1)133-142
37. Guler Uysal F, Başaran S. Kneeoteoarthritis Turl *J Phys Med Rehab.* 2009;55 Suppl1;1-7

38. Kuettner KE, Thonar EJ-MA. Osteoarthritis and related disorders: Cartilage integrity and homeostasis. In: Klippel JH, Dieppe PA eds. *Rheumatology*. London: Mosby, 1998;8.6.1-8.6.16.
39. Lespasio MJ, Piuze NS, Husni ME, Muschler GF, Guarino AJ, Mont MA. Knee Osteoarthritis: A Primer. *Perm J* 2017;21:16-183
40. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological Assessment of Osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1957;16:494-501.
41. Rahimnia AR, Panahi Y, Alishiri G, Sharafi M, Sahebkar A. Impact of Supplementation with Curcuminoids on Systemic Inflammation in Patients with Knee Osteoarthritis: Findings from a Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Trial. *Drug Research* 2015;65:521-525
42. Erden M, Ediz L, Hız Ö, Tuluçe Y, Ozkol H, Toprak M, et al. Effect of colchicine on total antioxidant capacity, antioxidant enzymes and oxidative stress markers in patients with knee osteoarthritis. *International Journal of Clinical Medicine* 2012;3:377-382.
43. Mehana EE, Khafaga AF, El-Blehi SS. The role of matrix metalloproteinases in osteoarthritis pathogenesis: An updated review. *Life Sciences* 2019;234:116786.
44. Mobasheri A, Matta C, Zákány R, Musumeci G. Chondrosenescence: definition, hallmarks and potential role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Maturitas*. 2015 Mar;80(3):237-44.
45. Elmazoglu Z, Yarayıcı S, Aydın Bek Z, Aytekin CN, Bitik B, Göker B, Karasu C. Targeting Oxidative Degeneration by Redox Modulating Phytoconstituents in Osteoarthritic Articular Chondrocyte Cultures. 2017: The 67th Czech and Slovak Pharmacological Days. *Interdisciplinary Toxicology* Vol. 10 (Suppl.2), p30.
46. Elmazoglu Z, Colakoglu M, Banerjee S, Bitik B, Aytekin CN, Göker B, Karasu C. Verbascoside and hydroxytyrosol down regulate stress-related pathways in human osteoarthritic articular chondrocytes. *Annals of the Rheumatic Diseases (ARD)*. 2018. Vol. 77 - Suppl 2, A1241.
47. Drevet S, Gavazzi G, Grange L, Dupuy C, Lardy B. Reactive oxygen species and NADPH oxidase 4 involvement in osteoarthritis. *Exp Gerontol*. 2018 Oct 1;111:107-117.
48. Khan NM, Ahmad I, Haqqi TM. Nrf2/ARE pathway attenuates oxidative and apoptotic response in human osteoarthritis chondrocytes by activating ERK1/2/ELK1-P70S6K-P90RSK signaling axis. *Free Radic Biol Med*. 2018 Feb;20;116:159-171.
49. Michigami T. Current Understanding on the Molecular Basis of Chondrogenesis. *Clinical Pediatric Endocrinology* 2014;23:1-8.
50. Abramson SB. Osteoarthritis and nitric oxide. *Osteoarthritis and Cartilage* 2008; 16,15-20.

51. Tetik S, Ahmad S, Alturfan A A, Fresko I, Disbudak M, Sahin Y, et al. Determination of oxidant stress in plasma of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis patients, *Indian J Biochemistry and Biophysics* 2010;47:353-358.
52. Zhang W, Randell EW, Sun G, Likhodii S, Liu M, Furey A, Zhai G. Hyperglycemia-related advanced glycation end-products is associated with the altered phosphatidylcholine metabolism in osteoarthritis patients with diabetes. *PLoS One*. 2017 Sep 12;12(9):e0184105.
53. Rasheed Z, Haqqi TM. Endoplasmic reticulum stress induces the expression of COX-2 through activation of eIF2 α , p38-MAPK and NF- κ B in advanced glycation end products stimulated human chondrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012;1823:2179-2189.
54. Yamabe S, Hirose J, Uehara Y, Okada T, Okamoto N, Oka K, et al. Intracellular accumulation of advanced glycation end products induces apoptosis via endoplasmic reticulum stress in chondrocytes. *FEBS Journal* 2013;280:1617-1629.
55. Thijssen E, van Caam A, van der Kraan PM. Obesity and osteoarthritis, more than just wear and tear: pivotal roles for inflamed adipose tissue and dyslipidaemia in obesity-induced osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2015 Apr;54(4):588-600.
56. Pappachan JM, Viswanath AK. Metabolic surgery: A paradigm shift in type 2 diabetes management. *World Journal of Diabetes* 2015;6:990-998.
57. Kluzek S, Newton JL, Arden NK. Is osteoarthritis a metabolic disorder?. *British Medical Bulletin* 2015;115:111-121.
58. Loeser, R., Collins, J. & Diekman, B. Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 12, 412–420 (2016).
59. Bentley G, Bhamra JS, Gikas PD, Skinner JA, Carrington R, Briggs TW. Repair of osteochondral defects in joints-how to achieve success. *Injury* 2013;44:3-10
60. Li X, Lang W, Ye H, Yu F, Li H, Chen J, et al. Tougu Xiaotong capsule inhibits the tidemark replication and cartilage degradation of papain-induced osteoarthritis by the regulation of chondrocyte autophagy. *International Journal of Molecular Medicine*, 2013;31:1349-1356
61. Courties A, Gualillo O, Berenbaum F, Sellam J. Metabolic stress-induced joint inflammation and osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2015;23:1955-1965.
62. Van Middelkoop M, Dziedzic KS, Doherty M, Zhang W, Bijlsma JW, McAlindon TE, et al. Individual patient data meta-analysis of trials investigating the effectiveness of intra-articular glucocorticoid injections in patients with knee or hip osteoarthritis: an OA Trial Bank protocol for a systematic review. *Systematic Reviews* 2013;2:54
63. Reginster JY, Beaudart C, Neuprez A, Bruyère O. Strontium ranelate in the treatment of knee osteoarthritis: new insights and emerging clinical evidence. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease* 2013;5:268-276

64. Gelber AC. Conventional medical therapy for osteoarthritis: current state of the evidence. *Current Opinion in Rheumatology* 2015;27:312-317.
65. Erickson JM, Messer TM. Glucosamine and chondroitin sulfate treatment of hand osteoarthritis. *The Journal of Hand Surgery* 2013;38:1638-1640.
66. Zhang W. The powerful placebo effect in osteoarthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology* 2019;37 Suppl 120:118-123.
67. Apostu D, Lucaciu O, Mester A, Oltean-Dan D, Baciut M, Baciut G, et al. Systemic drugs with impact on osteoarthritis. *Drug Metabolism Reviews* 2019;51:498-523.
68. Dadabo J, Fram J, Jayabalan P. Noninterventional Therapies for the Management of Knee Osteoarthritis. *Journal of Knee Surgery* 2019;32:46-54.
69. Ge Z, Li C, Heng BC, Cao G, Yang Z. Functional biomaterials for cartilage regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2012;100:2526-2536.
70. Madry H, Cucchiaroni M. Advances and challenges in gene-based approaches for osteoarthritis. *The Journal of Gene Medicine* 2013;15:343-355.
71. Keerthi N, Chimutengwende-Gordon M, Sanghani A, Khan W. The potential of stem cell therapy for osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Current Stem Cell Research and Therapy* 2013;8:444-450.
72. Mora JC, Przkora R, Cruz-Almeida Y. Knee osteoarthritis: pathophysiology and current treatment modalities. *Medicine*, 2016, Volume 59, Issues 5–6 Pages 333-339
73. Henrotin Y, Priem F, Mobasheri A. Curcumin: a new paradigm and therapeutic opportunity for the treatment of osteoarthritis: curcumin for osteoarthritis management. *Springerplus* 2013;2:1-9.
74. Ravalli S, Szychlinska MA, Leonardi RM, Musumeci G. Recently highlighted nutraceuticals for preventive management of osteoarthritis. *World Journal of Orthopedics* 2018;9:255-261
75. <https://www.pfizer.com.tr/arge/yeni-ilac-gelistirme-sureci> (28.01.2021)
76. Kyungseop Ahn. The worldwide trend of using botanical drugs and strategies for developing global drugs. *BMB Rep.* 2017; 50(3): 111-116
77. BCC, 2017 raporu. Botanical and Plant-derived Drugs: Global Markets
78. Romain C, Piemontese A, Battista S, Bernini F, Ossoli A, Strazzella A et al. Anti-Atherosclerotic Effect of a Polyphenol-Rich Ingredient, Oleactiv(®), in a Hypercholesterolemia-Induced Golden Syrian Hamster Model. *Nutrients*. 2018 Oct 15;10(10).
79. Filosa S, Di Meo F, Crispi S. Polyphenols-gut microbiota interplay and brain neuromodulation. *Neural Regen Res.* 2018 Dec;13(12):2055-2059.

80. Elmazoglu Z, Aydin Bek Z, Goker B, Bitik B, Aktekin CN, Karasu C. Effects of Quercetin on Oxidative and inflammatory Stress Pathways in Human Osteoarthritic Chondrocytes. ISPBS – 5. The Fifth International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences. 26-28 April 2019; Cappadocia. ISBN: 978-605-61261-7-8 (PDF), PP,41.
81. Elmazoglu Z, Aydin Bek Z, Goker B, Bitik B, Aktekin CN, Karasu C. Olea europaea Leaf Polyphenols Promote Survival and Regeneration of Osteoarthritic Human Chondrocytes by Controlling Redox-Sensitive Inflammation, Carbonyl/Nitrosative Stress, Advanced Protein Oxidative Modifications, TLR4, RAGE and JNK signaling: Comparison with Ibuprofen. *InflammoPharmacology* 2020;ID:IPHM-D-20-00007.
82. Elmazoglu Z, Aydin Bek Z, Tezcan ME, Bitik B, Aktekin CN, Goker B, et al. “S-allyl-L-cysteine attenuates inflammation related oxidative stress parameters and increases adhesion capacity of primary human osteoarthritic articular chondrocytes”. Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2019, Abst. 6046, 12-15 June Madrid, Spain. *Annals of the Rheumatic Diseases* 78(Suppl 2),1514.2-1515. DOI: 10.1136/annrheumdis-2019-eular.6046.
83. Elmazoglu Z, Colakoglu M, Banerjee S, Bitik B, Aktekin CN, Goker B, et al. Verbascoside and hydroxytyrosol downregulate stress-related pathways in human osteoarthritic articular chondrocytes. EULAR Annual European Congress of Rheumatology, 13–16 June 2018 in Amsterdam, Netherlands. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2018-EULAR.7038, 2018.
84. Elmazoglu Z, Goker B, Bitik B, Aktekin CN, Karasu C. Luteolin modulates glyco-lipo-oxidative protein modifications and inhibits inflammatory cytokine release in human osteoarthritic articular chondrocytes: comparison with colchicine. American College of Rheumatology, 2018 ACR/ARHP Annual Meeting, October 19-24, Chicago, IL. USA. *Arthritis Rheumatol.* 70(suppl 10), Abstract Number: 1990.
85. Elmazoglu Z, Yar Saglam AS, Sonmez C, Karasu C. Luteolin protects microglia against rotenone-induced toxicity in a hormetic manner through targeting oxidative stress response, genes associated with Parkinson's disease and inflammatory pathways. *Drug Chem Toxicol* 2018;43(1):96–103.
86. Elmazoglu Z, Ergin V, Sahin E, Kayhan H, Karasu C. Oleuropein and rutin protect against 6-OHDA-induced neurotoxicity in PC12 cells through modulation of mitochondrial function and unfolded protein response. *Interdiscip Toxicol.* 2017 Dec;10(4):129-141.
87. Aydin Bek Z, Elmazoglu Z, Goker B, Bitik B, Aktekin CN, Karasu C. Icariin inhibits inflammatory Degeneration in Human Osteoarthritic Chondrocytes Via Modulation of Redox Stress-induced Pathways. ISPBS – 5. The Fifth International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences. 26-28 April 2019; Cappadocia. ISBN: 978-605-61261-7-8 (PDF), PP,42
88. Thaipitakwong T, Numhom S, Aramwit P. Mulberry leaves and their potential effects against cardiometabolic risks: a review of chemical compositions, biological properties and clinical efficacy. *Pharm Biol.* 2018 Dec;56(1):109-118.

89. Mobasheri Ali. Intersection of inflammation and herbal medicine in the treatment of osteoarthritis. *Current Rheumatology Reports* 2012;14:604-616
90. Xu YP, Xie LM, Wang WY. Meta-analysis on efficacy and safety of external use of tradition Chinese medicines and western medicines in treating knee osteoarthritis. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2012;37:2977-2984.
91. Hara ES, Ono M, Kubota S, Sonoyama W, Oida Y, Hattori T, Nishida T, Furumatsu T, Ozaki T, Takigawa M, Kuboki T Novel chondrogenic and chondroprotective effects of the natural compound harmine. *Biochimie* 2013;95:374-381
92. Panahi Y, Rahimnia AR, Sharafi M, Alishiri G, Saburi A, Sahebkar A. Curcuminoid treatment for knee osteoarthritis: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Phytotherapy Research* 2014;28:1625-1631.
93. Moreau M, Lussier B, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Bédard C, Gauvin D, et al. A medicinal herb-based natural health product improves the condition of a canine natural osteoarthritis model: a randomized placebo-controlled trial. *Research in Veterinary Science* 2014;97:574-581
94. Magdalou J, Chen LB, Wang H, Qin J, Wen Y, Li X J, et al. *Angelica sinensis* and osteoarthritis: a natural therapeutic link?. *Bio-Medical Materials and Engineering* 2015;25:179-186
95. Farzaei MH, Farzaei F, Gooshe M, Abbasabadi Z, Rezaei N, Abdolghaffari AH. Potentially effective natural drugs in treatment for the most common rheumatic disorder: osteoarthritis. *Rheumatology International* 2015;35:799-814.
96. Henrotin Y, Malaise M, Wittoek R, de Vlam K, Brasseur JP, Luyten FP et all. Bio-optimized *Curcuma longa* extract is efficient on knee osteoarthritis pain: a double-blind multicenter randomized placebo controlled three-arm study. *Arthritis Res Ther.* 2019 Jul 27;21(1):179. Asher GN, Spelman K. Clinical utility of curcumin extract. *Alternative Therapies In Health And Medicine* 2013;19:20-22
97. Asher GN, Spelman K. Clinical utility of curcumin extract. *Alternative Therapies In Health And Medicine* 2013;19:20-22
98. Zhao H, Zhang T, Xia C, Shi L, Wang S, Zheng X, et al. Berberine ameliorates cartilage degeneration in interleukin-1 β -stimulated rat chondrocytes and in a rat model of osteoarthritis via Akt signaling. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2014;18:283-292.
99. Shen CL, Smith BJ, Lo DF, Chyu MC, Dunn DM, Chen CH, et al. Dietary polyphenols and mechanisms of osteoarthritis. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2012;23:1367-1377
100. Green JA, Hirst-Jones KL, Davidson RK, Jupp O, Bao Y, MacGregor AJ, et al. The potential for dietary factors to prevent or treat osteoarthritis. *Proceedings of the Nutrition Society* 2014;73:278-288.

101. Wei Y, Jia J, Jin X, Tong W, Tian H. Resveratrol ameliorates inflammatory damage and protects against osteoarthritis in a rat model of osteoarthritis. *Molecular Medicine Reports* 2018;17:1493-1498
102. Li Y, Wu Y, Jiang K, Han W, Zhang J, Xie L, et al. Mangiferin Prevents TBHP-Induced Apoptosis and ECM Degradation in Mouse Osteoarthritic Chondrocytes via Restoring Autophagy and Ameliorates Murine Osteoarthritis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019;2019:8783197
103. Singh R, Bagachi A, Semwal A, Kaur S, Bharadwaj A. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Morus alba* Linn: A review. *J Medicinal Plants Res.* 2013 March 7;461-469.
104. Monsefi M, Parvin, F, Talaei-Khozani T. Effects of pomegranate extracts on cartilage, bone and mesenchymal cells of mouse fetuses. *British Journal of Nutrition*, 2012;107:683-690.
105. Lu H, Jiang J, Xie G, Liu W, Yan G. Effects of an aqueous extract of *Eucommia* on articular cartilage in a rat model of osteoarthritis of the knee. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2013;6:684-688.
106. Chopra A, Saluja M, Tillu G, Sarmukkaddam S, Venugopalan A, Narsimulu G, et al. Ayurvedic medicine offers a good alternative to glucosamine and celecoxib in the treatment of symptomatic knee osteoarthritis: a randomized, double-blind, controlled equivalence drug trial. *Rheumatology (Oxford)* 2013;52:1408-1417
107. Conrozier T, Mathieu P, Bonjean M, Marc JF, Renevier JL, Balblanc JC. A Complex of Three Natural Anti-inflammatory Agents Provides Relief of Osteoarthritis Pain. *Alternative Therapies In Health And Medicine* 2014;20:32-37.
108. Uehleke B, Müller J, Stange R, Kelber O, Melzer J. Willow bark extract STW33-I in the long-term treatment of outpatients with rheumatic pain mainly osteoarthritis or back pain. *Phytomedicine* 2013;20:980-984.
109. Kanzaki N, Saito K, Maeda A, Kitagawa Y, Kiso Y, Watanabe K, et al. Effect of a dietary supplement containing glucosamine hydrochloride, chondroitin sulfate and quercetin glycosides on symptomatic knee osteoarthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2012;92:862-869.
110. Natarajan V, Madhan B, Tikku ML. Intra-Articular Injections of Polyphenols Protect Articular Cartilage from Inflammation-Induced Degradation: Suggesting a Potential Role in Cartilage Therapeutics. *PLoS One* 2015;10(6):e0127165.
111. El SN, Karakaya S. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutrition Review* 2009;67:632-638.
112. Gorzynik-Debicka M, Przychodzen P, Cappello F, Kuban-Jankowska A, Marino Gammazza A, Knap N, et al. Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols. *International Journal of Molecular Sciences* 2018;19:686.

113. Wei B, Zhang Y, Tang L, Ji Y, Yan C, Zhang X. Protective effects of quercetin against inflammation and oxidative stress in a rabbit model of knee osteoarthritis. *Drug Development Research* 2019;80:360-367.
114. Güler G G. Morus alba L.'nin Gıda, Kozmetik ve İlaç Sanayisinde Kullanımı ve Değerlendirilmesi. Bitirme Projesi. Bezmialem Vakıf Üniversitesi. Danışman Prof. Murat Kartal. Haziran-2018.
115. Zhang H, Ma ZF, Luo X, Li X. Effects of Mulberry Fruit (*Morus alba* L.) Consumption on Health Outcomes: A Mini-Review. *Antioxidants (Basel)*. 2018 May 21;7(5). pii: E69.
116. Zheng XK, Cao YG, Ke YY, Zhang YL, Li F, Gong JH et al. Phenolic constituents from the root bark of *Morus alba* L. and their cardioprotective activity in vitro. *Phytochemistry*. 2017 Mar;135:128-134.
117. Bae SH, Suh HJ. Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea [J]. *LWT Food Sci Technol*, 2007,40(6): 955-962.)
118. Chan EW, Lye PY, Wong SK. Phytochemistry, pharmacology, and clinical trials of *Morus alba*. *Chin J Nat Med*. 2016;14(1):17-30.
119. Gryn-Rynko A, Bazylak G, Olszewska-Slonina D. New potential phytotherapeutics obtained from white mulberry (*Morus alba* L.) leaves. *Biomed Pharmacother*. 2016 Dec;84:628-636.
120. He X, Fang J, Ruan Y, Wang X, Sun Y, Wu N et al. Structures, bioactivities and future prospective of polysaccharides from *Morus alba* (white mulberry): A review. *Food Chem*. 2018 Apr 15;245:899-910.
121. Deepa M, Sureshkumar T, Satheeshkumar PK, Priya S. Antioxidant rich *Morus alba* leaf extract induces apoptosis in human colon and breast cancer cells by the downregulation of nitric oxide produced by inducible nitric oxide synthase. *Nutr Cancer*. 2013;65(2):305-10.
122. Park YJ, Seong SH, Kim MS, Seo SW, Kim MR, Kim HS. High-throughput detection of antioxidants in mulberry fruit using correlations between high-resolution mass and activity profiles of chromatographic fractions. *Plant Methods*. 2017 Dec 6;13:108.
123. Ye F, Shen Z, Xie M. Alpha-glucosidase inhibition from a Chinese medical herb (*Ramulus mori*) in normal and diabetic rats and mice. *Phytomedicine*. 2002 Mar;9(2):161-6.
124. Chatterji S, Fogel D. Study of the effect of the herbal composition SR2004 on hemoglobin A1c, fasting blood glucose, and lipids in patients with type 2 diabetes mellitus. *Integr Med Res*. 2018 Sep;7(3):248-256.
125. Choi JW, Synytsya A, Capek P, Bleha R, Pohl R, Park YI. Structural analysis and anti-obesity effect of a pectic polysaccharide isolated from Korean mulberry fruit Oddi (*Morus alba* L.). *Carbohydr Polym*. 2016 Aug 1;146:187-96.

126. Oku T, Yamada M, Nakamura M, Sadamori N, Nakamura S. Inhibitory effects of extractives from leaves of *Morus alba* on human and rat small intestinal disaccharidase activity. *Br J Nutr*. 2006 May;95(5):933-8.
127. Hunyadi A, Martins A, Hsieh TJ, Seres A, Zupkó I. Chlorogenic acid and rutin play a major role in the in vivo anti-diabetic activity of *Morus alba* leaf extract on type II diabetic rats. *PLoS One*. 2012;7(11):e50619
128. Thabti I, Albert Q, Philippot S, et al. Advances on Antiviral Activity of *Morus* spp. Plant Extracts: Human Coronavirus and Virus-Related Respiratory Tract Infections in the Spotlight. *Molecules*. 2020;25(8):1876. Published 2020 Apr 18.
129. Wei H., Zhu J.J., Liu X.Q., Feng W.H., Wang Z.M., Yan L.H. Review of bioactive compounds from root barks of *Morus* plants (Sang-Bai-Pi) and their pharmacological effects. *Cogent Chem*. 2016;2:1212320.
130. Koirala P., Seong S.H., Zhou Y., Shrestha S., Jung H.A., Choi J.S. Structure–Activity Relationship of the Tyrosinase Inhibitors Kuwanon G, Mulberrofuran G, and Albanol B from *Morus* Species: A Kinetics and Molecular Docking Study. *Molecules*. 2018;23:1443.
131. Patharakorn T., Talawat S., Promboon A., Wetprasit N., Ratanapo S. Antimutagenicity and Anti-HSV-2 Activity of Mulberry Tea (*Morus rotundiloba* Koidz) *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 2010;44:5.
132. Choi DW, Cho SW, Lee SG, Choi CY. The Beneficial Effects of Morusin, an Isoprene Flavonoid Isolated from the Root Bark of *Morus*. *Int J Mol Sci*. 2020;21(18):6541.
133. Deepa M, Sureshkumar T, Satheeshkumar PK, Priya S. Antioxidant rich *Morus alba* leaf extract induces apoptosis in human colon and breast cancer cells by the downregulation of nitric oxide produced by inducible nitric oxide synthase. *Nutr Cancer*. 2013;65(2):305-310.
134. Rebai O, Belkhir M, Boujelben A, Fattouch S, Amri M. *Morus alba* leaf extract mediates neuroprotection against glyphosate-induced toxicity and biochemical alterations in the brain. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2017;24(10):9605-9613.
135. Kang TH, Oh HR, Jung SM, et al. Enhancement of neuroprotection of mulberry leaves (*Morus alba* L.) prepared by the anaerobic treatment against ischemic damage. *Biol Pharm Bull*. 2006;29(2):270-274.
136. Yadav AV, Kawale LA, Nade VS. Effect of *Morus alba* L. (mulberry) leaves on anxiety in mice. *Indian J Pharmacol*. 2008;40(1):32-36.
137. Crascì L, Cardile V, Longhitano G, Nanfitò F, Panico A. Anti-degenerative effect of Apigenin, Luteolin and Quercetin on human keratinocyte and chondrocyte cultures: SAR evaluation. *Drug Res*. 2018 Mar;68(3):132-138.

138. Aydin Bek Z, Elmazoglu Z, Goker B, Bitik B, Aktekin CN, Karasu C. Effects of Mulberry (*Morus alba* L.) Leaf Extract (Immunflex®) on MMP-9, BMP-2 and COMP in Human Osteoarthritic Chondrocytes in vitro. MESMAP-5. The Fifth International Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants. 24-26 April 2019; Cappadocia. ISBN: 978-605-61261-6-1 (PDF), PP,108.
139. Goker B, Elmazoglu Z, Bitik B, Aytekin CN, Karasu C. Luteolin Modulates Glyco-Lipo-Oxidative Protein Modifications and Inhibits Inflammatory Cytokine Release in Human Osteoarthritic Articular Chondrocytes: Comparison with Colchicine. *Arthritis & Rheumatology* 2018;70 Suppl 10: Abs Number 1990.
140. Choi EM, Hwang JK. Effects of *Morus alba* leaf extract on the production of nitric oxide, prostaglandin E2 and cytokines in RAW264.7 macrophages. *Fitoterapia*. 2005;76(7-8):608-613
141. Barve RA, Minnerly JC, Weiss DJ, Meyer DM, Aguiar DJ, Sullivan PM, Weinrich SL, Head RD. Transcriptional profiling and pathway analysis of monosodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats: relevance to human disease. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007 Oct;15(10):1190-8.
142. Khunakornvichaya A, Lekmeechai S, Pham PP, Himakoun W, Pitaksuteepong T, Morales NP, Hemstapat W. *Morus alba* L. Stem Extract Attenuates Pain and Articular Cartilage Damage in the Anterior Cruciate Ligament Transection-Induced Rat Model of Osteoarthritis. *Pharmacology*. 2016;98(5-6):209-216.
143. Jeong JW, Lee HH, Lee KW, Kim KY, Kim SG, Hong SH, Kim GY, Park C, Kim HK, Choi YW, Choi YH. Mori folium inhibits interleukin-1 β -induced expression of matrix metalloproteinases and inflammatory mediators by suppressing the activation of NF- κ B and p38 MAPK in SW1353 human chondrocytes. *Int J Mol Med*. 2016 Feb;37(2):452-60.
144. Jeong JW, Lee HH, Kim J, Choi EO, Hwang-Bo H, Kim HJ, Kim MY, Ahn KI, Kim GY, Lee KW, Kim KY, Kim SG, Hong SH, Park C, Cha HJ, Choi YH. Mori Folium water extract alleviates articular cartilage damages and inflammatory responses in monosodium iodoacetate induced osteoarthritis rats. *Mol Med Rep*. 2017 Oct;16(4):3841-3848.
145. Kraus VB, Stabler TV, Kong SY, Varju G, McDaniel G. Measurement of synovial fluid volume using urea. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15:1217-1220.
146. Naranda J, Gradišnik L, Gorenjak M, Vogrin M, Maver U. Isolation and characterization of human articular chondrocytes from surgical waste after total knee arthroplasty (TKA). *PeerJ*. 2017;5:e3079.
147. Isolation and Cell Culture of Primary Human Chondrocytes Technical Reference Guide. BioResearch. LONZA.
148. Marshall NJ, Goodwin CJ, Holt SJ. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regulation* 1995;5:69-84.

149. Rai Y, Pathak R, Kumari N, Sah DK, Pandey S, Kalra N, et al. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. *Science Report* 2018;8:1531.
150. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 1983;65:55-63.
151. Rajneesh, Pathak J, Chatterjee A, Singh SP, Sinha R P. Detection of Reactive Oxygen Species (ROS) in Cyanobacteria Using the Oxidant-sensing Probe 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate (DCFH-DA). 2017. *Bio-protocol* 7(17)
152. Rosenkranz AR, Schmaldienst S, Stuhlmeier KM, Chen W, Knapp W, Zlabinger GJ. A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate. *Journal of Immunological Methods* 1992;156:39-45.
153. He, F. (2011). BCA (Bicinchoninic Acid) Protein Assay. *Bio-101*: e44.
154. Wang XS, Lau HY. Prostaglandin E potentiates the immunologically stimulated histamine release from human peripheral blood-derived mast cells through EP1/EP3 receptors. *Allergy*. 2006 Apr;61(4):503-6.
155. Khan A, Gillis K, Clor J, Tyagarajan K. Simplified evaluation of apoptosis using the Muse cell analyzer. *Postepy Biochem*. 2012;5(4):492-6.
156. Abcam, JC-1 - Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit ab113850 / Product datasheet
157. Paul J, Barg A, Kretzschmar M, Pagenstert G, Studler U, Hügler T, et al. Increased Osseous (99m)Tc-DPD Uptake in End-Stage Ankle Osteoarthritis: Correlation Between SPECT-CT Imaging and Histologic Findings. *Foot & Ankle International* 2015;36:1438-1447.
158. Tseng S, Reddi AH, Di Cesare PE. Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP): A Biomarker of Arthritis. *Biomarker Insights* 2009;4:33-44.
159. Barreto G, Soininen A, Ylinen P, Sandelin J, Konttinen YT, Nordström DC, et al. Soluble biglycan: a potential mediator of cartilage degradation in osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2015;17:379.
160. Takahashi M, Kushida K, Ohishi T, et al. Quantitative analysis of crosslinks pyridinoline and pentosidine in articular cartilage of patients with bone and joint disorders. *Arthritis and Rheumatism*. 1994 May;37(5):724-728.
161. Calabrese V, Cornelius C, Leso V, Trovato-Salinaro A, Ventimiglia B, Cavallaro M et al. Oxidative stress, glutathione status, sirtuin and cellular stress response in type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta*. 2012 May;1822(5):729-36.
162. Chen YJ, Sheu ML, Tsai KS, Yang RS, Liu SH. Advanced glycation end products induce peroxisome proliferator-activated receptor γ down-regulation-related inflammatory signals in human chondrocytes via Toll-like receptor-4 and receptor for advanced glycation end products. *PLoS One* 2013;8(6):e6661.

163. Yang H, Jin X, Kei Lam CW, Yan SK. Oxidative stress and diabetes mellitus. *Clin Chem Lab Med.* 2011;49(11):1773- 1782
164. S. Toyokuni, S. Yamada, M. Kashima, Y. Ihara, Y. Yamada, T. Tanaka, H. Hiai, Y. Seino, K. Uchida Serum 4-hydroxy-2-nonenal-modified albumin is elevated in patients with type 2 diabetes mellitus. *Antioxid. Redox Signal.*, 2 (2000), pp. 681-685
165. Wang Z, Boyko T, Tran MC, LaRussa M, Bhatia N, Rashidi V et al. DEL1 protects against chondrocyte apoptosis through integrin binding. *J Surg Res.* 2018 Nov;231:1-9.
166. Lawrence RC, Helmick GG, Arnett DF, et al. Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum*1998;41:778–788.
167. Hoff P, Buttgereit F, Burmester GR, Jakstadt M, Gaber T, Andreas K, et al. Osteoarthritis synovial fluid activates pro-inflammatory cytokines in primary human chondrocytes. *International Orthopaedics* 2013;37:145-151.
168. Iannone F, Lapadula G. The pathophysiology of osteoarthritis. *Aging Clin Exp Res.* 2003 Oct;15(5):364-72.
169. Dean E, Hansen RG. Prescribing optimal nutrition and physical activity as "first-line" interventions for best practice management of chronic low-grade inflammation associated with osteoarthritis: evidence synthesis. *Arthritis* 2012;2012:560634.
170. Howes MJ, Houghton PJ. Ethnobotanical treatment strategies against Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research* 2012;9:67-85.
171. Rojas P, Montes P, Rojas C, Serrano-García N, Rojas-Castañeda JC. Effect of a phytopharmaceutical medicine, Ginko biloba extract 761, in an animal model of Parkinson's disease: therapeutic perspectives. *Nutrition* 2012;28:1081-1088.
172. Süntar I, Akkol EK. Beneficial effects of plant sources on the treatment of osteoporosis. *Current Drug Targets*, 2013;14:1611-1618.
173. Johnson CI, Argyle DJ, Clements DN. In vitro models for the study of osteoarthritis. *Vet J.* 2016 Mar;209:40-9.
174. Martel J, Ojcius DM, Ko YF, Ke PY, Wu CY, Peng HH, et al. Hormetic Effects of Phytochemicals on Health and Longevity. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2019;30:335-346.
175. Evans CH, Georgescu HI. Observations on the senescence of cells derived from articular cartilage. *Mech Ageing Dev.* 1983 Jun;22(2):179-91.
176. O Özcan, H Erdal, G Çakırca, Z Yönden. Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations* 2015; 6 (3): 331-336

177. Chenevier-Gobeaux C, Simonneau C, Lemarechal H, Bonnefont-Rousselot D, Poiraudau S, Rannou F, et al. Effect of hypoxia/reoxygenation on the cytokine-induced production of nitric oxide and superoxide anion in cultured osteoarthritic synoviocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2013; 21: 874– 81.
178. Sell DR, Monnier VM. Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. *J Biol Chem* 1989; 264: 21597–602
179. Verzijl N , DeGroot J, Oldehinkel E, Bank RA, Thorpe SR, Baynes JW, et al. Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. *Biochem J* 2000; 350: 381–387
180. Šenolt L, Braun M, Olejárová M. Increased pentosidine, an advanced glycation end product, in serum and synovial fluid from patients with knee osteoarthritis and its relation with cartilage oligomeric matrix protein. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2005; 64: 886-890.
181. Neidhart M , Hauser N, Paulsson M, DiCesare PE, Michel BA, Hauselmann HJ. Small fragments of cartilage oligomeric matrix protein in synovial fluid and serum as markers for cartilage degradation. *Br J Rheumatol* 1997; 36: 1151–60
182. Larsson E, Erlandsson Harris H, Lorentzen JC, Larsson A, Mansson B, Klareskog L, et al. Serum concentrations of cartilage oligomeric matrix protein, fibrinogen and hyaluronan distinguish inflammation and cartilage destruction in experimental arthritis in rats. *Rheumatology (Oxford)* 2002; 41: 996–1000.
183. Saxne T , Heinegard D. Cartilage oligomeric matrix protein: a novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood. *Br J Rheumatol* 1992; 31: 583–91.
184. Bongarzone S, Savickas V, Luzi F, Gee AD. Targeting the Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): A Medicinal Chemistry Perspective. *J Med Chem.* 2017; 60(17): 7213-7232.
185. Morquette B, Shi Q, Lavigne P, Ranger P, Fernandes JC, Benderdour M. Production of lipid peroxidation products in osteoarthritic tissues: new evidence linking 4-hydroxynonenal to cartilage degradation. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 271– 81.
186. Shah R, Raska K Jr, Tiku ML. The presence of molecular markers of in vivo lipid peroxidation in osteoarthritic cartilage: a pathogenic role in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2799– 807.
187. Poli G, Schaur RJ, Siems WG, Leonarduzzi G. 4-hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Med Res Rev* 2007; 28: 569– 631.
188. Ahsan H. 3-Nitrotyrosine: A biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmunogenic conditions. *Human Immunology* 2013; 74: 1392-1399.

189. Suantawee T, Tantavisut S, Adisakwattana S, Tanpowpong T, Tanavalee A, Yuktanandana P et al. Upregulation of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in primary knee osteoarthritis. *J Med Assoc Thai*. 2015 Jan;98 Suppl 1:S91-7.
190. Ge HX, Zou FM, Li Y, Liu AM, Tu M. JNK pathway in osteoarthritis: pathological and therapeutic aspects. *Journal of Receptors and Signal Transduction* 2017;37:431-436.
191. Lepetsos P, Papavassiliou KA, Papavassiliou AG. Redox and NF- κ B signaling in osteoarthritis. *Free Radical Biology and Medicine*, 2019. 132,90-100.
192. Charlier E, Relic B, Deroyer C, Malaise O, Neuville S, Collée J et al. Insights on Molecular Mechanisms of Chondrocytes Death in Osteoarthritis. *Int J Mol Sci*. 2016 Dec 20;17(12):2146.
193. Loeser RF. Molecular mechanisms of cartilage destruction: mechanics, inflammatory mediators, and aging collide. *Arthritis Rheum*. 2006 May;54(5):1357-60.
194. Lu H, Hou G, Zhang Y, Dai Y, Zhao H. c-Jun transactivates Puma gene expression to promote osteoarthritis. *Mol Med Rep*. 2014 May;9(5):1606-12.
195. Sun HY, Hu KZ, Yin ZS. Inhibition of the p38-MAPK signaling pathway suppresses the apoptosis and expression of proinflammatory cytokines in human osteoarthritis chondrocytes. *Cytokine*. 2017 90:135-143.
196. Liu JW, Hao CW, Wang Z, Jin D. Nobiletin Inhibits Expression of Inflammatory Mediators and Regulates JNK/ERK/p38 MAPK and PI3K/Akt Pathways in Human Osteoarthritic Chondrocytes. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2016. 15. 535. 10.4314/tjpr.v15i3.15.
197. Millerand M, Berenbaum F, Jacques C. Danger signals and inflammaging in osteoarthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 2019. 37/ 120,48-56.
198. Aydin Bek Z, Elmazoglu Z, Goker B, Bitik B, Aktekin CN, Karasu C. Effects of Mulberry (*Morus alba* L.) Leaf Extract (Immunflex) on MMP-9, BMP-2 and COMP in Human Osteoarthritic Chondrocytes in vitro. *MESMAP-5*, 2019. The Fifth International Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants. PP,108.
199. Verma P, Dalal K. Serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in knee osteoarthritis: a novel diagnostic and prognostic biomarker. *Journal of Orthopaedic Research*, 2013. 31,999-100.
200. Cope PJ, Ourradi K, Li Y, Sharif M. Models of osteoarthritis: the good, the bad and the promising. *Osteoarthritis Cartilage*. 2019 Feb;27(2):230-239.
201. Thysen S, Luyten FP, Lories RJ. Targets, models and challenges in osteoarthritis research. *Dis Model Mech*. 2015 Jan;8(1):17-30.
202. Grover AK, Samson SE. Benefits of antioxidant supplements for knee osteoarthritis: rationale and reality. *Nutrition Journal* 2016;15:1.



EK-1. Etik Kurul Kararı

 T.C. Sağlık Bakanlığı	T.C. ANKARA VALİLİĞİ İL SAĞLIK MÜDÜRLÜĞÜ SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ Ankara Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Baştabipliği Klinik Araştırmalar Etik Kurulu	
Sayı : 2012-KAEK-15/1718 Konu: Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurul Kararı		08.08 .2018
KEÇİÖREN EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ KLİNİK ARAŞTIRMA ETİK KURULU		
"Osteoartrit Patogenezinde Redoks Modölatör Ajanların Rejeneratif Etki ve Etki Mekanizmalarının Araştırılması "adlı klinik araştırma değişikliği (süre uzatma) hakkında etik kurul üyeleri bilgilendirilmiş, kurulumuz kararının başvuru sahibi tarafından Sağlık Bakanlığı'na arzına gerek olmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.		
Op.Dr. Ömer Faruk TANER		

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Zehra AYDIN BEK :

Doğum Yeri ve Tarihi

Eğitim Derecesi	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Tıpta Uzmanlık	Gazi Üniversitesi /Tıbbi Farmakoloji	2015-2021
Lisans	Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi	2007-2013
Lise	Çorum Fen Lisesi	2004-2007

Yabancı Dili : İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türk Farmakoloji Derneği (TFD)

Bilimsel Etkinlikleri :

Burs: 315S012 Numaralı Tubitak Projesi Bursu

Projeler :

1. Osteoartrit Patogenezinde Redoks Modülatör Ajanların Rejeneratif Etki ve Etki Mekanizmalarının Araştırılması. 315S012 / TUBİTAK (bursiyer)
2. Osteoartrit (OA) Patogenezinde Polifenolik Bileşiklerin(Dut Yaprağı) Redox Stres Aracılı Hasara Karşı Rejeneratif Etkileri ve Etki Mekanizmalarının Araştırılması. 01/2018-37 BAP / Gazi Üniversitesi (Tez Projesi)

Yayın, Sözlü Bildiri ve Poster

1. Elmazoglu Z, Bek ZA, Sarıbaş GS, Özoğul C, Goker B, Bitik B, Aktekin CN, Karasu Ç. ‘TLR4, RAGE, and p-JNK/JNK mediated inflammatory aggression in osteoarthritic human chondrocytes are counteracted by redox-sensitive phenolic olive compounds: Comparison with ibuprofen’. J Tissue Eng Regen Med. 2020 Dec;14(12):1841-1857. doi: 10.1002/term.3138.
2. Z Elmazoglu, B Goker, ZA Bek, CN Aktekin, B Bitik, C Karasu. Standardized extract of Olea europaea leaves suppresses pro-inflammatory cytokines through regulating redox signaling pathways in human chondrocytes.Osteoarthritis and Cartilage 2020; 28, S105-S106. (poster)

3. Z Elmazoglu, ZA Bek, B Göker, B Bitik, CN Aktekin, ME Tezcan, C Karasu. S-Allyl-L-Cysteine Attenuates Inflammation Related Oxidative Stress Parameters And Increases Adhesion Capacity Of Primary Human Osteoarthritic Articular Chondrocytes. *Annals of the Rheumatic Diseases* 78 (Suppl 2), 1514-1515. EULAR 2019. Madrid. (Conference Paper).
4. Therapeutic Potential of Olive Leaf Polyphenols (ZeyEX®) in Human Osteoarthritic Chondrocytes in Vitro. The Fifth International Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants. 2019 Nevşehir/Türkiye (Uluslararası Sözlü Sunum, Zehra Aydın Bek).
5. Aydın Z, Elmazoglu Z, Goker B, Bitik B, Aktekin C, Karasu C. Effects of mulberry (morus alba L) leaf extract (immunflex®) on MMP-9 BMP-2 and COMP in human osteoarthritic chondrocytes in vitro. The 5th International Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants. 2019 Türkiye/ Nevşehir (Uluslararası Poster/kendisi).
6. Aydın Z, Elmazoglu Z, Goker B, Bitik B, Aktekin C, Karasu C. Icariin Inhibits Inflammatory Degeneration in Human Osteoarthritic Chondrocytes via Modulation of Redox Stress-Induced Pathways. The Fifth International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences. 2019 Türkiye/ Nevşehir (Uluslararası Poster, kendisi).
7. Dut Yaprığı (Morus alba L.) Standart Ekstresinin (ImmunFLEX®) ve Major Biyoaktif Komponentlerinden Deoksinojirimisin'in İnsan Osteoartritik Primer Kondrositler Üzerine Etkileri, in vitro. Türk Farmakoloji Derneği 25. Ulusal Kongresi. 2019. Türkiye/Aydın (Ulusal Poster Sunumu/ Kendisi).
8. HNE-AGE-Induced Inflammatory Signals Via RAGE And TLR4 Affect The Survival Of Osteoarthritic Human Chondrocytes And Matrix Peptides: Comparison Between Olive Leaf Extract Zeyex And Ibuprofen. COST, NutRedOx Meeting. 2020 Sırbistan/ Belgrad (poster).
9. Colchicine Provides Chondrocyte Survival as a Redox Modulator in Human Osteoarthritis. OARSI 2020, Osteoarthritis Research Society International World Congress. 2020. Avusturya/ Vienna (Uluslararası Basılı Bildiri).
10. Zeytin Yaprığı Polifenolik Ekstresinin (ZeyEX®) Osteoartritik İnsan Kondrositlerinde Etkileri: Ibuprofen ile Kıyaslama. Uluslararası Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Kongresi. 2019 Türkiye/ İstanbul (Uluslararası Poster).
11. Effects of Quercetin on Oxidative and Inflammatory Stress Pathways in Human Osteoarthritic Chondrocytes. The Fifth International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences 24.4.2019 Türkiye/Nevşehir (Uluslararası Poster).
12. Elmazoglu Z, Yarayici S, Aydın Z, Aktekin C, Bitik B, Goker B, Karasu C. Targeting Oxidative Degeneration by Redox Modulating Phytoconstituents in Osteoarthritic Articular Chondrocyte Cultures. Targeting Oxidative Degeneration by Redox Modulating Phytoconstituents in Osteoarthritic Articular Chondrocyte Cultures. The 67th Czech and Slovak Pharmacological Days. 13. 09. 2017 Slovak Cumh./ Bratislava (Uluslararası Bildiri).

13. Osteoartritlik İnsan Kondrositlerinde Oleuropein ve Zeytin Yaprğı Polifenolik Bileşiklerinin (ZeyEx) Kondroprotektif Etkileri. Ankara Romatoloji Toplantısı, 2019. Türkiye/Nevşehir (Ulusal/ Poster).
14. Elmazoglu Z, Oguz D, Aydın Z, Rangel-López E, Santamaría A, Karasu C. S-Allyl-L-Cysteine And Luteolin Prevents Hyperglycemia Induced Aβ1-42 Injury In An Alzheimer's Disease Cell Model. COST Action NutRedOx-CA16112. Lisbon-Portugal. 2019 (Conference Paper).
15. Afandiyeva N, Elmazoglu Z, Aydın Z, Ceylan A, Stefek M, Kavutcu M, Karasu C. Comparative Effects Of Cemtirestat, Stobadine And Epalrestat On Glutathione-S-Transferase And Catalase Activities In The Liver And Lung Of Diabetic Rats Given High Fructose Diet And Streptozotocin. 2019 (Poster).





GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..