



T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OSTEOARTRİT'TE UCMA'NIN MOLEKÜLER MEKANİZMASININ İNCELENMESİ

Hamza Malik OKUYAN
DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ahmet ARSLAN

GAZİANTEP

2017

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OSTEOARTRİT’TE UCMA’NIN MOLEKÜLER
MEKANİZMASININ İNCELENMESİ**

Hamza Malik OKUYAN
DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ahmet ARSLAN

GAZİANTEP

2017

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

OSTEOARTRİT’TE UCMA’NIN MOLEKÜLER MEKANİZMASININ
İNCELENMESİ

Hamza Malik OKUYAN

Doktora Tezi

Tez Savunma Tarihi: 09.02.2017

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir “Doktora” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Doç. Dr. Can DEMİREL

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı V.

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet ARSLAN

Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi İmzası:

Prof. Dr. Ahmet ARSLAN

Prof. Dr. Ecir Ali ÇAKMAK

Doç. Dr. Şeniz DEMİRYÜREK

Yrd. Doç. Dr. Feridun AKKAFA

Yrd. Doç. Dr. Elif PALA

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Hamza Malik OKUYAN

09.01.2017

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ilgi ve desteğini esirgemeyen, değerli ve özverili katkılarıyla tez çalışmalarımı yönlendiren kıymetli hocam Prof. Dr. Ahmet ARSLAN'a

Doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı değerli öğretim üyelerine ve asistanlarına

Tez çalışmalarım sırasında yardımlarını ve katkılarını esirgemeyen Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı değerli öğretim üyelerine ve asistanlarına

Maddi ve manevi desteğiyle her zaman yanımda olan Ailem'e

Desteğiyle her zaman yanımda olan sevgili eşim Canan'a sabrı ve hoşgörüsü için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR ve SİMGELER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
RESİMLER LİSTESİ	xiii
ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Osteoartrit	5
2.1.1. Osteoartrit Epidemiyolojisi.....	6
2.1.2. Osteoartrit Hastalığının Yüğü	7
2.1.3. Osteoartrit'in Risk Faktörleri.....	7
2.1.4. Osteoartrit'in Sınıflandırılması	11
2.1.5. Osteoartrit'in Klinik Özellikleri.....	12
2.1.6. Osteoartrit'in Laboratuvar Bulguları	13
2.1.7. Osteoartrit'in Tanısı	13
2.1.8. Osteoartrit'in Tedavisi	14
2.1.9. Osteoartrit Hastalığının Gelişimini Sağlayan Moleküler Değişimler.....	16
2.1.9.1. Osteoartrit'te Eklem Kıkırdağı	17
2.1.9.2. Osteoartrit'te Subkondral Kemik.....	19
2.1.9.3. Osteoartrit'te Sinoviyal Zar	25
2.1.9.4. Osteoartrit'te Uyarı İleti Yolakları	27
2.1.9.4.1. NF-κB Uyarı-İleti Yolağı.....	28
2.1.9.4.1.1. NF-κB Etkinleşmesinin Eklem Kıkırdağındaki Rolü	30

2.1.9.4.1.2. NF- κ B Etkinleşmesinin Sinoviyumdaki Rolü	31
2.1.9.4.1.3. NF- κ B Etkinleşmesinin Subkondral kemikteki Rolü	31
2.1.9.4.2. WNT Uyarı Yolağı	32
2.1.9.4.3. MAPK Uyarı Yolağı	33
2.1.9.4.4. TGF- β /BMP Uyarı Yolağı	35
2.2. UCMA	36
2.2.1. UCMA Geni ve Protein Yapısı	36
2.2.2. UCMA Gen İfade Düzeyleri	38
2.2.3. UCMA Gen İfadesinin Düzenlenmesi	40
2.2.4. UCMA'nın Moleküler İşlevi ve Fizyolojik Rolü	41
2.2.5. UCMA'nın Genomik Çeşitliliği (Varyantları) ve Transkriptleri	41
2.2.6. UCMA ile İlişkili Hastalıklar	41
3. GEREÇ VE YÖNTEM	43
3.1. Hücre Kültürü Deneyleri	43
3.1.1. Hücre Kültür Vasatının Hazırlanması	43
3.1.2. hFOB1.19 Hücrelerinin Kaldırılması	44
3.1.3. hFOB1.19 Hücrelerinin Sayılması	44
3.1.4. hFOB1.19 Ekimi ve Hücrelerin Serumsuz Besi Ortamına (SF'e) Alınması	45
3.1.5. hFOB1.19 Hücrelerinin IL-1 β ile Uyarılması	45
3.2. Eş Zamanlı PCR (Real Time-Polymerase Chain Reaction) ile Gen İfade Analizleri	46
3.2.1. RNA Eldesi	47
3.2.2. RNA Ölçümü	48
3.2.3. cDNA Elde Edilmesi	48
3.2.4. Real Time PCR	49
3.2.5. Verilerin Analizi	51
3.3. Western Blot Analizleri	52

3.3.1. Protein Eldesi	53
3.3.2. BCA Assay Kit ile Protein Ölçümü	53
3.3.3. Sodyum Dodesil Sülfat & Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS & PAGE)	54
3.3.4. Blotlama.....	55
3.3.5. Perdeleme (Blokaj)	55
3.3.6. İnkübasyon ve Görüntüleme	56
3.3.7. Analiz.....	57
3.4. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Deneyleri	58
4. BULGULAR.....	59
4.1. <i>İn vitro</i> Osteoartrit Modelinde Gen İfade Düzeyleri	59
4.1.1. IL-1 β ile Uyarılmanın UCMA Geni İfade Düzeylerine Etkisi	59
4.1.2. IL-1 β ile Uyarılmanın MGP Geni İfade Düzeylerine Etkisi.....	61
4.1.3. IL-1 β ile Uyarılmanın Ürotensin II Geni İfade Düzeylerine Etkisi.....	62
4.1.4. <i>İn vitro</i> Osteoartrit Modelinde NF- κ B Geni İfade Düzeyleri	63
4.1.5. <i>İn vitro</i> Osteoartrit Modelinde BGLAP Geni İfade Düzeyleri	65
4.1.6. <i>İn vitro</i> Osteoartrit Modelinde SPP1 Geni İfade Düzeyleri.....	66
4.1.7. <i>İn vitro</i> Osteoartrit Modelinde RANKL Geni İfade Düzeyleri.....	68
4.1.8. <i>İn vitro</i> Osteoartrit Modelinde OPG Geni İfade Düzeyleri	69
4.1.9. <i>İn vitro</i> Osteoartrit Modelinde MMP1 Geni İfade Düzeyleri	71
4.1.10. <i>İn vitro</i> Osteoartrit Modelinde BMP2 Geni İfade Düzeyleri.....	71
4.1.11. <i>İn vitro</i> Osteoartrit Modelinde BMP7 Geni İfade Düzeyleri.....	72
4.1.12. Pro-enflamasyonun Osteoblast Farklılaşması Üzerine Etkisi.....	75
4.1.13. <i>İn vitro</i> Osteoartrit Modelinde Apoptozis Genlerinin İfade Düzeyleri.....	77
4.2. Osteoartrit Modelinde UCMA Protein Seviyeleri	88
4.2.1. IL-1 β ile Uyarılan hFOB1.19 Hücre Dizilerinde UCMA Protein Düzeyleri	88
4.3. Pro-enflamasyonun hFOB1.19 Hücrelerinin Salgısı Üzerine Etkileri.....	89
4.3.1. IL-1 β ile Uyarılmanın MMP1 Protein Düzeyleri Üzerine Etkisi	89

4.3.2. IL-1 β ile Uyarılmanın OPG Protein Düzeyleri Üzerine Etkisi.....	90
4.3.3. IL-1 β ile Uyarılmanın IL-17 Protein Düzeyleri Üzerine Etkisi.....	91
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	93
6. KAYNAKLAR	104
ÖZGEÇMİŞ	136



KISALTMALAR ve SİMGELER

ALP	Alkaline phosphatase
BGLAP	Bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein, Osteoklasin
BMP2	Bone morphogenetic protein 2
BMP7	Bone morphogenetic protein 7
CASPASE 3	Cysteine-aspartic acid protease 3
CASPASE 8	Cysteine-aspartic acid protease 8
CASPASE 9	Cysteine-aspartic acid protease 9
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GRP	Gla-rich Protein
hFOB1.19	İnsan osteoblast hücre hattı
IL	Interleukin
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MGP	Matrix Gla Protein
MMP1	Matrix Metalloproteinase-1
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
OPG	Osteoprotegerin
OA	Osteoartrit
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
ROS	Reactive oxygen species
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
SB	Subkondral Kemik
SP7/OSX	Transcription factor SP7
SPP1	Secreted Phosphoprotein 1, Osteopontin
UCMA	Upper Zone of Growth Plate and Cartilage Matrix Associated
UTS2	Urotensin 2

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2. 1. Osteoartrit'in Sınıflandırılması (51).	12
Tablo 2. 2. Diz OA'nın belirti ve bulguları (51).	13
Tablo 2. 3. Diz OA için ACR ölçütleri (51).	14
Tablo 2. 4. OA'nın sınıflandırılması (51).	14
Tablo 2. 5. OA için tedavi yöntemleri (51).	15
Tablo 2. 6. UCMA geninin ifade edildiği bölgeler (24).	39
Tablo 2. 7. Çeşitli in vitro sistemlerde UCMA'nın ifade düzeni (24).	40
Tablo 2. 8. Hastalıklı koşullarda UCMA protein birikim bölgeleri (24).	42
Tablo 3. 1. Hücre kültürü malzemeleri	43
Tablo 3. 2. Deney tasarımı	45
Tablo 3. 3. Gen ifade analizlerinde kullanılan malzemeler	47
Tablo 3. 4. cDNA sentezinde kullanılan karışım	48
Tablo 3. 5. cDNA sentezi için sıcaklık döngüleri	49
Tablo 3. 6. qRT-PCR reaksiyon karışımı.	49
Tablo 3. 7. qRT-PCR için reaksiyon koşulları	49
Tablo 3. 8. Çalışmaya dahil edilen genlerin listesi	50
Tablo 3. 9. Western Blot deneylerinde kullanılan malzemeler	53
Tablo 3. 10. ELİSA ile analizi yapılan parametreler	58

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2. 1. İnsan vücudunda Osteoartrit'ten etkilenen bölgeler (33).	6
Şekil 2. 2. Osteoartrit'te rol alan risk faktörleri (51).	8
Şekil 2. 3. OA hastalarının tedavisinde kullanılan adım adım algoritma (102).	15
Şekil 2. 4. Normal ve Osteoartritli diz eklemi (102).	16
Şekil 2. 5. Osteoartrit'te Kıkırdak Metabolizması (51, 117).	19
Şekil 2. 6. Şematize edilmiş normal ve osteoartritli eklem kıkırdığı ve subkondral kemik anatomisi (130).	20
Şekil 2. 7. OA'lı eklem şematize edilmiş işlevleri ile ilgili NF- κ B uyarı ileti yolağı (187).	27
Şekil 2. 8. Klasik ve diğer NF- κ B etkinleştirme yolları (187).	29
Şekil 2. 9. Omurgalı UCMA geninin ve protein yapısının şematik gösterimi (24).	37
Şekil 2. 10. Gla kalıntısı içeren UCMA'nın dört değişik yapısının şematik gösterimi (24).	37
Şekil 3. 1. Gen ifade analizleri iş akışı gösterimi.	46
Şekil 3. 2. Western Blot'ta iş akışı gösterimi.	52
Şekil 4. 1. UCMA geni ifade düzeyi değişimleri. T48 için hFOB1.19 hücre hattında gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.	60
Şekil 4. 2. UCMA geni ifade düzeyi değişimleri. T72 için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.	60
Şekil 4. 3. MGP geni ifade düzeyi değişimleri. T48 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.	61
Şekil 4. 4. MGP geni ifade düzeyi değişimleri. T72 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.	62
Şekil 4. 5. IL-1 β uyarımından sonra UTS2 geni ifade düzeyi değişimleri. T48 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.	63

Şekil 4. 6. NF-κB geni ifade düzeyi değişimleri. T48 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.	64
Şekil 4. 7. NF-κB geni ifade düzeyi değişimleri. T72 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.	64
Şekil 4. 8. BGLAP=Osteocalcin geni ifade düzeyi değişimleri. T48 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.	65
Şekil 4. 9. BGLAP=Osteocalcin geni ifade düzeyi değişimleri. T72 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.	66
Şekil 4. 10. SPP1 geni ifade düzeyi değişimleri. T48 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.	67
Şekil 4. 11. SPP1 geni ifade düzeyi değişimleri. T72 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.	67
Şekil 4. 12. RANKL = TNFSF11 geni ifade düzeyi değişimleri. T48 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.	68
Şekil 4. 13. RANKL = TNFSF11 geni ifade düzeyi değişimleri. T72 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.	69
Şekil 4. 14. OPG geni ifade düzeyi değişimleri. T48 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.	70
Şekil 4. 15. OPG geni ifade düzeyi değişimleri. T72 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.	70
Şekil 4. 16. MMP1 geni ifade düzeyi değişimleri. T48 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.	71

Şekil 4. 17. IL-1 β 'nın BMP2 geni ifade düzeyi değişimleri üzerine etkisi. T48 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.	72
Şekil 4. 18. IL-1 β 'nın BMP7 geni ifade düzeyi değişimleri üzerine etkisi. T48 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.	73
Şekil 4. 19. UCMA ve Osteoartritle ilişkili genlerin ifade düzeylerinin karşılaştırılması.	74
Şekil 4. 20. IL-1 β ile tetiklenen RUNX2 gen ifade düzeyi değişimleri. T48 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.	75
Şekil 4. 21. IL-1 β ile tetiklenen OSX/SP7 geni ifade düzeyi değişimleri. T48 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.	76
Şekil 4. 22. UCMA, MGP, UTS2, RUNX2 ve OSX/SP7 genlerinin ifade düzeyi değişimlerinin karşılaştırılması.	77
Şekil 4. 23. IL-1 β ile tetiklenen Caspase-3 geni ifade düzeyi değişimleri. T48 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.	78
Şekil 4. 24. IL-1 β ile tetiklenen Caspase-3 geni ifade düzeyi değişimleri. T72 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.	79
Şekil 4. 25. IL-1 β ile tetiklenen Caspase-8 geni ifade düzeyi değişimleri. T48 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.	80
Şekil 4. 26. IL-1 β ile tetiklenen Caspase-9 geni ifade düzeyi değişimleri. T48 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.	81
Şekil 4. 27. IL-1 β ile tetiklenen Caspase-9 geni ifade düzeyi değişimleri. T72 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.	81
Şekil 4. 28. UCMA, MGP, UTS2 ve apoptozis genlerinin ifade düzeyi değişimlerinin karşılaştırılması.	82

Şekil 4. 29. T48 sürelerinde tüm genlerin ifade durumu, kontrol grubu ile grup 1(5ng/ml)'in karşılaştırılması. Yukarı düzenlenmiş gen ifadesine sahip genler sarı ile değişmemiş gen ifadesine sahip gen ise siyah ile gösterilmiştir.....	83
Şekil 4. 30. T48 sürelerinde tüm genlerin ifade durumu, kontrol grubu ile grup 2 (10 ng/ml)'in karşılaştırılması. Yukarı düzenlenmiş gen ifadesine sahip genler sarı ile değişmemiş gen ifadesine sahip gen ise siyah ile gösterilmiştir.....	84
Şekil 4. 31. Gen ifadesi büyüklüğünün gruplar arasında karşılaştırılması (T48).	85
Şekil 4. 32. T72 sürelerinde tüm genlerin ifade durumu, kontrol grubu ile grup 1(5ng/ml)'in karşılaştırılması. Yukarı düzenlenmiş gen ifadesine sahip genler sarı ile değişmemiş gen ifadesine sahip genler ise siyah ile gösterilmiştir.	86
Şekil 4. 33. T72 sürelerinde tüm genlerin ifade durumu, kontrol grubu ile grup 2 (10 ng/ml)'in karşılaştırılması. Yukarı düzenlenmiş gen ifadesine sahip genler sarı ile değişmemiş gen ifadesine sahip genler ise siyah ile gösterilmiştir.	87
Şekil 4. 34. IL-1 β ile uyarılan hFOB1.19 hücrelerinde 48 saatlik sürenin sonundaki UCMA protein ifadelerinin karşılaştırılması. Sadece 5 ng/ml ile uyarılan grupta artış olduğu görülmektedir. (I-5: 5 ng/ml IL-1 β ile uyarılan grup, I-10: 10 ng/ml IL-1 β ile uyarılan grup).....	88
Şekil 4. 35. IL-1 β ile uyarılan hFOB1.19 hücrelerinde 72 saatlik sürenin sonundaki UCMA protein ifadelerinin karşılaştırılması. UCMA protein düzeyleri tüm gruplarda benzerdi. (I-5: 5 ng/ml IL-1 β ile uyarılan grup, I-10: 10 ng/ml IL-1 β ile uyarılan grup).	88
Şekil 4. 36. MMP1 protein seviyelerinin karşılaştırılması. T48 süreleri için hFOB1.19 hücrelerinin MMP1 salgılarının karşılaştırılması şekilde gösterilmektedir. 5 ve 10 ng/ml IL-1 β ile uyarılmanın hücrelerde MMP1 salgısı açısından benzer bir etkiye sahip olduğu görülmektedir.....	89
Şekil 4. 37. MMP1 protein seviyelerinin karşılaştırılması. T72 süreleri için hFOB1.19 hücrelerinin MMP1 salgılarının karşılaştırılması şekilde gösterilmektedir. 5 ve 10 ng/ml IL-1 β ile uyarılmanın hücrelerde MMP1 salgısı açısından benzer bir etkiye sahip olduğu görülmektedir.....	90
Şekil 4. 38. OPG protein seviyelerinin karşılaştırılması. T48 süreleri için hFOB1.19 hücrelerinin OPG salgılarının karşılaştırılması şekilde gösterilmektedir. 5 ve 10 ng/ml IL-1 β ile uyarılmanın hücrelerde OPG salgısı açısından benzer bir etkiye sahip olduğu görülmektedir.....	91

Şekil 4. 39. OPG protein seviyelerinin karşılaştırılması. T72 süreleri için hFOB1.19 hücrelerinin OPG salgılarının karşılaştırılması şekilde gösterilmektedir. 5 ve 10 ng/ml IL-1 β ile uyarılmanın hücrelerde OPG salgısı açısından benzer bir etkiye sahip olduğu görülmektedir..... 91

Şekil 4. 40. IL-17 protein seviyelerinin karşılaştırılması. T48 süreleri için hFOB1.19 hücrelerinin IL-17 salgılarının karşılaştırılması şekilde gösterilmektedir. 5 ve 10 ng/ml IL-1 β ile uyarılmanın hücrelerde herhangi bir anlamlı değişikliğe neden olmadığı görülmektedir..... 92



RESİMLER LİSTESİ

Resim 3. 1. Gen ifade analizlerinde kullanılan program (QIAGEN, Rotor-Gene-Q, Software Version 2.3.1).....	51
Resim 3. 2. Sodyum Dodesil Sülfat & Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS&PAGE)	55
Resim 3. 3. Oda ısısında süt tozu ile muamele.....	56
Resim 3. 4. Western Blot'ta kullanılan analiz programı (Bio-Rad Laboratories, Image Lab. Version 5.0 Build 18)	58



ÖZET

OSTEOARTRİT'TE UCMA'NIN MOLEKÜLER MEKANİZMASININ İNCELENMESİ

Hamza Malik OKUYAN
Doktora Tezi
Gaziantep Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ARSLAN
Şubat-2017, 136 Sayfa

Osteoartrit (OA), dünyada en yaygın görülen dejeneratif eklem hastalığıdır. OA'nın tedavisi ve önlenmesi için yeni tedavi edici ajanların ve moleküler hedeflerin tanımlanmasına önemli derecede ihtiyaç duyulmaktadır. UCMA K vitaminine bağımlı bir proteindir. UCMA'nın moleküler fonksiyonu henüz tam olarak bilinmemekle beraber güncel çalışmalarda yangı ve kalsifikasyonla ilişkili olabileceği vurgulanmaktadır. Bu çalışmada, OA'da UCMA'nın moleküler mekanizmasını inceledik. IL-1 β ile uyarılan hFOB1.19 hücre dizileri kullanarak UCMA'nın OA ile ilişkili genler arasındaki ilişkisini gösterdik. Bu çalışmada, 16 tane genin ifade düzeyi Real Time PCR yöntemi ile analiz edildi. UCMA protein düzeyleri ise Western Blot yöntemi ile gösterildi. Hücre kültürü süpernatantlarında MMP1, IL-17 ve OPG seviyeleri ELISA ile analiz edildi. *In vitro* OA modelinde, UCMA gibi yeni moleküler hedef olabilecek MGP, UTS2 genlerinin ifade düzeylerinde anlamlı düzeyde artış olduğunu gözlemledik. Çalışmamızda, IL-1 β 'nın kemik oluşumunda rol alan temel transkripsiyon faktörlerini (RUNX2 ve OSX) tetiklediğini ve UCMA'nın bu genlerle ilişki içerisinde olabileceğini belirledik. Ayrıca, ilk defa OA gelişiminde rol alan pek çok gen ile UCMA arasında pozitif bir korelasyon olduğunu, OA'dan en fazla etkilenen genin UCMA olduğunu gösterdik. Ek olarak, hFOB1.19 hücre dizilerinde IL-1 β ile tetiklenen Caspase-3,-8,-9 yolu aracılığıyla apoptozda UCMA'nın gen ifadesinde anlamlı düzeyde artış olduğunu belirledik. MMP1 ve OPG salgıları kontrole göre anlamlı düzeyde artmıştı. Bu çalışmadan elde edilen bulgular, UCMA'nın osteoblast farklılaşmasında, kemik oluşumunda, OA gelişiminde ve osteoblast apoptozunda rol alabileceğini göstermektedir. Sonuç olarak, bu çalışma OA patofizyolojisinde UCMA'nın potansiyel değeri için iyi bir kanıt sağlamaktadır ve UCMA'nın OA'ya karşı yeni tedavi edici yaklaşımlar geliştirmek için gelecek vaat eden bir moleküler hedef olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Osteoartrit, UCMA, GRP, hFOB1.19, IL-1 β

ABSTRACT
INVESTIGATION OF MOLECULAR MECHANISM OF UCMA IN
OSTEOARTHRITIS

Hamza Malik OKUYAN
Ph.D. Thesis
Gaziantep University, Institute of Health Sciences
Department of Medical Biology

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ARSLAN
February-2017, 136 Pages

Osteoarthritis (OA) is the most prevalent degenerative joint disease worldwide. The identification of novel therapeutic agents and molecular targets are crucially needed for the treatment and prevention of OA. UCMA is a vitamin K-dependent protein. Along with the fact that the exact molecular function of UCMA is still unknown, it is suggested in the current studies that it can be related to the inflammation and calcification processes. In this present study, we investigated the molecular mechanism of UCMA in OA. We showed the relationship of UCMA with the OA-related genes by using an osteoblast cell line, called hFOB1.19, induced with IL-1 β . In our study, the expression levels of 16 genes were analyzed with real-time PCR method. The protein levels of UCMA were measured with the Western Blot method. Besides, MMP1, IL-17 and OPG protein levels in the supernatants of cell lines were analyzed with ELISA. In our *in vitro* OA model, we observed a significant increase in the expression levels of MGP and UTS2 which can be novel therapeutic targets, like UCMA. In our study, we established that IL-1 β triggers the main transcription factors (RUNX2 ve OSX) playing role during bone formation and UCMA can be associated with these factors. We showed for the first time that, there is a positive correlation between UCMA and several genes playing role in OA progression and the most affected gene from OA is UCMA. In addition, during IL-1 β -induced apoptosis mediated through caspase-3, -8 and -9 pathway in hFOB1.19 cell line, we assessed a significant increase in UCMA expression levels. Besides MMP1 and OPG secretions increased significantly compared to control group. The findings in our study may suggest that, UCMA involves in osteoblast differentiation, bone formation, OA progression, and osteoblast apoptosis. In conclusion, our study provides good evidence about the potential value of UCMA in the pathophysiology of OA and shows that UCMA is a promising molecular target to develop therapeutic approaches against OA.

Key words: Osteoarthritis, UCMA, GRP, hFOB1.19, IL-1 β

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Osteoartrit (OA), dünyada en yaygın görülen dejeneratif eklem hastalığıdır (1). Hayat kalitesinin düşmesine ve sağlık harcamalarının artmasına neden olan bu hastalık gelişmiş ülkelerde fiziksel özür lülüğün en önemli nedenidir ve sıklığının 2020 yılına kadar iki katına çıkacağı tahmin edilmektedir (2-4). Patogenezi (esas ı ve gelişimi) tam olarak bilinmeyen bu hastalık kemik, kıkırdak ve sinoviyum gibi tüm eklem bölgelerinde yapısal kusurlara ve hücre sel değ iş ikliklere neden olur (5, 6). Hem bireylere hem de sağ lık sistemine önemli derecede yük getiren bu hastalıkta, eklem ağ rıları ve azalmış eklem fonksiyonu (iş levi) gibi klinik semptomlar (belirtiler) hastaların yaşam kalitelerini günden güne olumsuz etkilemektedir (7, 8). Osteoartrit'in kesin tedavisi yoktur ve güncel farmakolojik tedavisi ise sadece belirtileri gidermeye yöneliktir. OA tedavisinde cerrahi yaklaş ım son seç enek olarak değ erlendirilmekle beraber bu tedavi ş eklinin de birçok olumsuz etkileri vardır (9, 10).

Osteoartrit'in tanısı klinik bulguları destekleyen radyolojik görüntüleme yöntemleriyle konulmaktadır. Ancak osteoartrit, radyolojik bulguları belirginleşmeden yıllar önce ortaya çıkmaktadır. Özellikle erken evrede radyolojik yöntemler duyarlı değildir. Erken tanı, eklem in harabiyete uğ ramadan koruyucu yöntemlerle hastalığın tedavisine olanak sağlayabilmektedir (6, 11, 12). Bu nedenle, hastalığın erken teş hisinde ve seyrini tahmin etmede kullanılabilecek biyokimyasal belirteçlerin belirlenmesi OA'nın tedavisinde ve önlenmesinde önemli bir konudur.

UCMA (Upper Zone of Growth Plate And Cartilage Matrix Associated) / GRP (Gla rich protein) K vitaminine bağı mlı protein ailesinin en yeni üyelerinden biridir. UCMA ayrıca kalsiyum mineraline yüksek bağ lanma eğ ilimli ve 16 gla kalıntısı barındıran bir proteindir (13). UCMA'nın moleküler iş levi henüz tam olarak bilinmemekle beraber OA'da enflamatuvar (yangılı) ve kalsifikasyon süreçleriyle ilişkili mediyatör (aracı molekül) olabileceğ i yapılan çalış malarda gösterilmiştir (14). Güncel çalış malarda, OA'nın temel kalsiyum fosfat kristalleri birikimi ile doğ rudan ilişkili olduğ u gösterilmiştir (15-19). UCMA'nın BMP2 (Bone morphogenetic protein 2, Kemik Morfojenik Protein 2) tarafından baskılandığı yapılan çalış malarda belirtilmiştir (20). BMP2 osteogenez sırasında Osx/Sp7 (Transcription factor, Transkripsiyon etmeni), gen ifadesinin

tetiklenmesinden sorumludur (14, 20). Alkalen fosfataz (ALP) osteogenik farklılaşma ve kalsifikasyon mekanizmasında görev alan bir enzimdir. ALP aktivitesi BMP2 tarafından düzenlenir (21). Ayrıca, BMP-2'nin kemik metabolizmasında görev alan RUNX2 (Runt-related transcription factor 2), OSX/SP7, ALP, BGLAP (Bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein, Osteoklasin), tip-1 kollajen ve SPP1 (Secreted Phosphoprotein 1, Osteopontin)'in gen ifadesini uyardığı gösterilmiştir (22, 23). UCMA birçok yolak üzerinden OA hastalığının gelişiminde görev alan moleküllerle ilişki içerisinde. Ayrıca, yapılan çalışmalarda UCMA'nın bazı hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için biyobelirteç veya moleküler hedef olma olasılığı da vurgulanmaktadır (24). Bizim hipotezimize göre; UCMA osteoartrit gelişiminde enflamatuvar (yangılı) ve mineralizasyon süreçlerinde rol alan yolaklarla (özellikle BMP2, NF-κB, Osteokalsin ile ilişkili yolaklar) etkileşime girerek etkili olmaktadır. Böylelikle, UCMA'nın bu hastalığın patogeneziindeki rolünün belirlenmesi ile, bu molekülün hem OA'nın erken tanısında bir biyobelirteç olarak hem de OA tedavisinde bir seçenek olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Bu tez kapsamında, Osteoartrit'te UCMA'nın moleküler mekanizmasının incelenmesi amaçlandı. Henüz yeni keşfedilmiş olan bu molekülün insan hastalıklarının gelişiminde rolü, tam olarak bilinmemekle beraber kemik metabolizmasıyla ilgili rolü keşfedilmeye açıktır. UCMA'nın osteoartrit için güçlü bir moleküler hedef olabileceğini düşünüyoruz. Bu tez çalışması ile birlikte *in vitro* deney düzeneklerinde UCMA'nın osteoartrit için biyobelirteç ya da moleküler hedef olma durumu ve osteoblast hücrelerinin sentez ve salgıları ile ilişkisi incelendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Osteoartrit

Osteoartrit (OA), hayat kalitesini olumsuz etkilemekle birlikte sağlık harcamalarının artmasına neden olan ve dünyada yaygın görülen dejeneratif bir eklem hastalığıdır (1, 2). Bu hastalık kemik, kıkırdak ve sinoviyum gibi tüm eklem bölgelerinde yapısal kusurlara ve hücresel düzeyde bazı değişikliklere neden olur (5). OA, özellikle eklem kıkırdağının kademeli bir şekilde kaybı, osteofit oluşumu (kemikte patolojik olarak oluşan çıkıntı), subkondral kemikte sklerozis, yangı ve sinoviyal proliferasyon (çoğalma) ile eklem çevresindeki anormalliklerle kendini gösterir (25-27). OA'da ağrı sıklıkla eklem hareketliliği ile ilişkilidir. Sürekli ağrı ise hastalığın ileri aşamalarında bir özellik haline gelir (28). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, OA'ya bağlı ağrı hastanın psikolojik durumuna uygun olarak yorumlanması ve düşünülmesi gerektiği ifade edilmiştir (29). Bununla beraber ağrı, hastaların yaşadığı OA'nın tek bir sonucu değildir. Ağrı eklem işlevi ile bağlantılıdır, fiziksel hareketler ağrıyı tetiklerken ağrı da zamanla fiziksel işlevlerin sınırlandırılmasına neden olur (30). Günlük hareketlerde kısıtlılık OA'da önemli bir unsurdur. OA sıklıkla eklem hareketliliğinde kısıtlanma, sertlik ve krepitasyon (çıtırdama) ile ilişkilidir (31). Eklem işlevselliği anlamında önemli derecede değişikliklere neden olan OA' da hasta bireyler sıklıkla fiziksel olarak sınırlandırılır, kişisel bakımlarında zorlanırlar, çalışma yeteneklerinde ve hatta kendi ev yaşantılarını sürdürmelerinde bile birçok sorun yaşayabilirler (31, 32). Şekil 2.1'de insan vücudunda OA'dan etkilenen eklem bölgeleri gösterilmektedir.



Şekil 2. 1. İnsan vücudunda Osteoartrit'ten etkilenen bölgeler (33). Şekilde Osteoartrit'ten etkilenen vücudun farklı eklem bölgeleri (boyun, omurga, kalça, el ve ayak parmakları, diz) gösterilmektedir.

2.1.1. Osteoartrit Epidemiyolojisi

Dünyada en yaygın kas-iskelet bozukluğu olan OA giderek daha da önemli bir halk sağlığı sorunu olmaktadır (34, 35). OA herhangi bir eklemden gelişebilir ancak daha sık bir şekilde diz, kalça ve el ekleminde gözlenmektedir. OA'nın prevalansı (yaygınlık oranı, yaygınlık) kullanılan tanımlamaya, cinsiyete, yaşa ve çalışılan coğrafik bölgeye bağlı olarak büyük ölçüde değişkenlik göstermektedir (36, 37). OA'nın 40 yaş öncesinde sıklığı düşüktür ve bu yaş grubunda OA sıklıkla travmaya (yaralanma) bağlı ikincil olarak gelişebilir (31). Hastalığın yaygınlık oranı 40-60 yaşları arasında artmaktadır ve daha sonraki yaşlarda ise yaygınlıkta doğrusal bir artış söz konusudur (30). Dünya çapındaki hastalık tahminlerine göre, 60 yaş ve üzeri kadınların % 18'i, erkeklerin ise % 9.6'sı OA bulgusu taşımaktadır (38). Yapılan çalışmalar incelendiğinde, diz OA'nın yaygınlığı % 6.3'ten (Yunanistan) ile % 68.4 (Birleşik Krallık) arasında, Kalça OA'nın yaygınlığı % 0.9 (Yunanistan) ile % 23 (Hırvatistan) arasında, el OA'nın yaygınlığı ise % 2 (Yunanistan) ile % 77 (İsrail) arasında değişkenlik göstermektedir. (39-42). Dünyada OA insidansı (görülme sıklığı, sıklık) yaygınlık ile karşılaştırıldığında OA görülme sıklığı ile ilgili çok az veri bulunmaktadır (43). Örneğin Amerika Birleşik Devletlerinde, belirli yaş

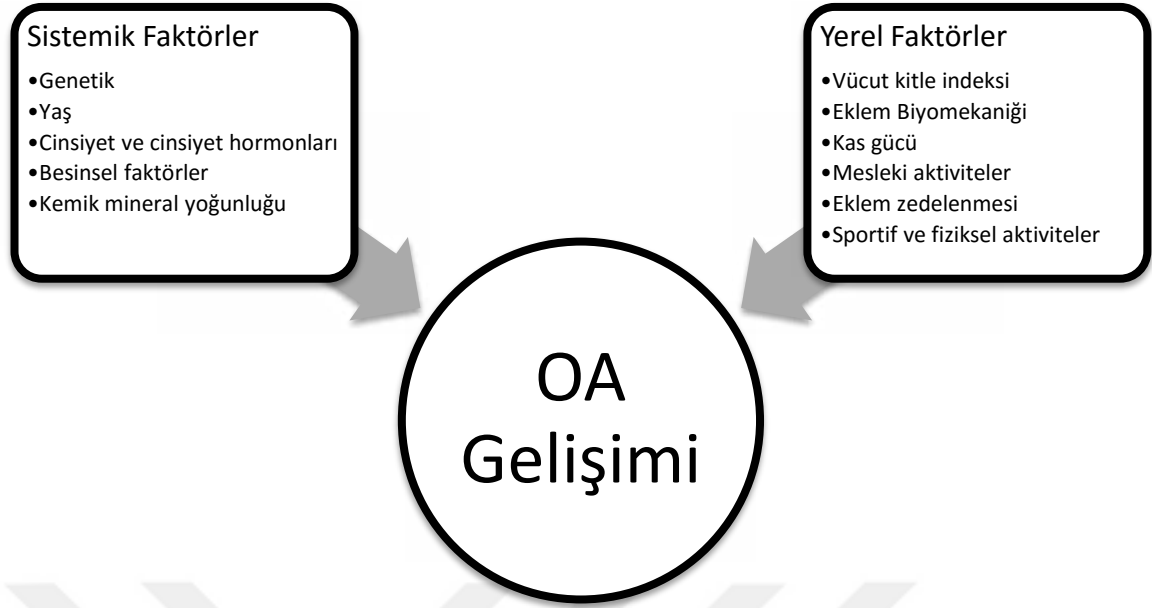
ve cinsiyet grubunda belirtili OA'nın görülmek sıklığı diz için 0.24 (kişi/yıl), kalça için 0.09 (kişi/yıl), el için ise 0.1 (kişi/yıl) olarak belirlenmiştir (44).

2.1.2. Osteoartrit Hastalığının Yükü

Osteoartrit hastalığının yükünü belirlemek için ekonomik, sosyal ve psikolojik maliyetleri ya da bireysel, ailesel ve sosyal kayıpları göz önünde bulundurmak gerekir (45). OA hem yaygın hem de ağır bir hastalık olarak kabul edilmesine rağmen dünyada çok az sayıda çalışma bu soruna odaklanmıştır (2). OA'nın neden olduğu maliyetler doğrudan ve dolaylı olarak iki ayrı başlıkta sınıflandırılabilir. Araştırmalarda kullanılan kaynaklar,  nleme, tespit ve hastalığın tedavisi OA'nın doğrudan maliyetleri arasındadır. Azalmış iş gücünden dolayı üretim kaybı, gelir kaybı, vergi geliri kaybı, ev ya da ailenin yardıma ihtiya ından kaynaklanan devlet desteğinin artması gibi durumlar OA'nın dolaylı maliyetleri arasında yer alır (1, 2). OA'nın doğrudan ve dolaylı maliyetlerinin dışında, hastanın yaşam kalitesindeki değişiklik, ağrı, acı gibi maddi olmayan maliyetler de bulunmaktadır (46, 47). OA patolojisi ruhsal esenlik ve duygusal ilişkilerde dahil olmak üzere bireyin günlük hayatının birçok yönünü derinden etkileyebilir. Bunlar aynı zaman da OA'nın değerlendirilmesi için önemli konulardır. Ancak genellikle maliyetin bu yönünü değerlendirmek oldukça zor olduğundan bu tür durumlar çoğunlukla hastalığın maliyeti olarak kabul edilmez (48).

2.1.3. Osteoartrit'in Risk Faktörleri

Risk faktörlerinin önemi hastalığın evresine ve eklem bölgesine göre değişkenlik gösterebilir (34, 49). Hastalığın gelişiminde yalnız tek bir faktörün m  yoksa birden fazla faktörün m  etkili olduğunu tespit etmek oldukça zordur (50). OA'da rol alan risk faktörlerini sistemik ve yerel faktörler olmak üzere kabaca iki gruba ayırabiliriz. Sistemik faktörler eklem kıkırdağını hasarlanmaya daha yatkın hale getirir ve tamir mekanizmalarının çalışmasını önler. Yerel faktörler ise mekanik etkilerden dolayı eklem hasarına doğrudan katkı sağlarlar (51). şekil 2.2'de OA'da rol alan risk faktörleri gösterilmektedir.



Şekil 2. 2. Osteoartrit'te rol alan risk faktörleri (51). Osteoartrit birden fazla etmenin (multifaktöriyel) rol aldığı bir hastalıktır. Yapılan çalışmalarda OA gelişiminde rol alan bazı önemli risk faktörleri tanımlanmıştır (52-54). OA gelişiminde rol alan bu risk faktörleri şekilde görüldüğü gibi sistemik ve lokal (yerel) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır (51).

Sistemik Faktörler

Genetik

Birçok genetik yaklaşım OA'da rol alan yeni biyolojik yollar bulmaya yönelik çalışmalara odaklanmıştır (55). İkiz çalışmaları sayesinde, OA ve onun iç fenotipleri büyük ölçüde genetik olarak belirlenmiştir. Ancak genetik çeşitlilik (varyantlar) tam olarak bilinmemektedir (55, 56). Yapılan çalışmalarda genetik yaklaşımların hastalıkla ilişkili genetik faktörlerin tanımlanmasında faydalı olduğu gösterilmiştir (28, 49, 55, 57).

Yaş

Yaş, OA gelişiminin en güçlü belirleyicisidir (58). Eklem savunmasızlığı hastalığa daha yatkın hale getiren yaşlanma sürecinin bir parçası olarak meydana gelir (48). Eklem kırıkdağında meydana gelen yaş ile ilişkili morfolojik değişiklikler kondrositlerin doku bütünlüğünü muhafaza etme ve onarma kabiliyetindeki azalmadan kaynaklanır (26). Kondrositlerde yaşlanmaya bağlı olarak mitotik ve yapay etkinlikte azalma, anabolik büyüme faktörlerine yanıtızsızlık, hücre dışı matriks sentezinde azalma gibi durumlar

gözlenir (26). Kıkırdagın onarım kapasitesinde azalma, hormonal değişiklikler, çevresel maruziyetlerin birikmiş yoğun etkileri yaşla ilişkili diğer mekanizmalardır (59).

Cinsiyet ve Cinsiyet Hormonları

OA gelişimi cinsiyete bağlı olarak farklılık göstermektedir. Kadınlarda OA gelişim riski erkeklere göre daha yüksektir. OA gelişimi ile ilgili olarak cinsiyet farklılıkları ileri yaşlarda daha az belirgin farklılık göstermektedir (60). OA gelişiminin kadın ve erkekte farklı olmasının nedeni tam olarak açık değildir. Ancak bununla ilgili bazı açıklamalar vardır. Örneğin eklem kondrositleri fonksiyonel östrojen almacına sahiptir ve östrojenin proteoglikan sentezini başlatıp ilerletebileceğine veya tetikleyebileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır (26). Ayrıca, bulgular her zaman tutarlı olmasa da (61, 62), östrojen yerine koyma (replasman) tedavisinin hastalığın görülme sıklığını azaltabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (63).

Besinsel Faktörler

Beslenme faktörlerinin de OA gelişiminde önemli rolü olabilir. Antioksidanların tıpkı diğer yaşla ilişkili hastalıklarda olduğu gibi bu hastalığın gelişimine karşı da koruma sağladığı düşünülmektedir (48). Kondrositler kıkırdak kollojenine, sinoviyal sıvı hyaluronatına, sinoviyal sıvının viskozitesinden sorumlu makromoleküllere zarar verebilen reaktif oksijen türleri (ROS) üretebilirler (64). Ayrıca, glutatyon peroksidazın kofaktörü olan selenyumun OA gelişimini azalttığı ve yavaşlattığı fare OA modelinde gösterilmiştir (65). Bu çalışma glutatyon antioksidanının OA gelişimindeki etkinliğinin anlaşılmasında son derece önemlidir. Bir selenosistein tripeptidi olan glutatyonun OA üzerine etkinliğinin yanı sıra N-asetil sistein (66)'ninde kondrositlerin apoptozunu engellediğı ve OA gelişimini önlediğı deneysel sıçan modelinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (67). Mikrobesein antioksidanlar doku hasarına karşı savunma sağlar ve ayrıca bu mikrobeseinlerin yüksek miktarda alımı OA'ya karşı koruyucu olarak tercih edilebilir (68). Yapılan çalışmalarda, C vitamininin yüksek miktarda alımı dizlerde OA gelişimini ve ağrıların azaltabileceğı gösterilmiştir. Ancak hastalığın başlamasını önlemede veya geciktirilmesinde C vitaminin etkinliğinin çalışılmasının gerektiğı anlaşılmaktadır (68).

Kemik Mineral Yoğunluğu

Yüksek kemik mineral yoğunluğunun da OA gelişimi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (60, 69, 70).

Yerel Risk Faktörleri

Vücut Kütle İndeksi ve Obezite

Kontrol edilebilen risk faktörleri arasında aşırı kilo ve şişmanlık (obezite) hem hastalığın başlaması hem de hastalığın gelişimi ile ilgili risk faktörleri olarak tanımlanmıştır (48, 59). Bu faktörler muhtemelen eklemdaki stres, eklem yüklenmenin artışı ve/veya sistemik değişiklikler ilişkili olabilir (60, 71, 72). Mekanik yüklenmeyi artıran aşırı kilo ve obezite dejeneratif sürecin hızlandırılmasına katkı sağlayan muhtemel birincil faktörlerdir (26). Vücut kitle indeksinin osteoartrit üzerine olan etkisini açıklamanın başka bir yolu da yağ dokunun ürettiği pro-inflamatuvar sitokinlerin sistemik düşük dereceli yangı ile olan ilgisidir (73, 74). Yapılan çalışmalarda adipositlerin OA gelişimine sebep olmakla birlikte eklem bölgesindeki kemik, kıkırdak ve diğer doku hücrelerinin düzenlenmesinde de önemli rol oynadığı gösterilmiştir (75).

Mesleki Faktörler

Belirli bir eklem sürekli ve yineleyen bir şekilde kullanımını gerektiren bazı meslek gruplarında OA gelişimi olabilmektedir. Örneğin uzun süreli diz çökmeyi veya çöelmeyi gerektiren mesleki etkinliklerin diz OA riskini arttırdığı bilinmektedir (76). Madencilerde diz OA, çiftçilerde kalça OA, inşaat işçilerinde diz OA'nın daha fazla geliştiği ifade edilmiştir (77, 78).

Spor ve Fiziksel Aktiviteler

Aşırı eklem hareketliliği veya stres OA gelişimini tetikler (79). Eklemle aşırı yüklenmeyi gerektiren meslekler hastalığın gelişimi ile ilişkilidir (48). Yapılan çalışmalarda, fiziksel işler diz, kalça ve el OA için risk faktörü olduğu tespit edilmiştir (79-82). Düşük eğitim seviyesi ile ölçülen düşük sosyoekonomik duruma sahip bireyler daha az konforlu ve yoğun hareketlilik gerektiren işlerde çalışabilmektedirler ve bu durum yüksek OA yaygınlığı ile ilişkilidir (48, 83). Aslında fiziksel aktivitenin eklem sağlığı, kas güçlenmesi, kilo kontrolü gibi sağlık açısından birçok faydası bulunmaktadır

(84). Orta derecede fiziksel aktivite OA gelişimine karşı koruyucu etkiye sahip gibi görünmektedir (85). Aksine aşırı fiziksel aktivite OA için risk olarak görülmektedir (86).

Eklem Biyomekaniği

Eklemde anormal yük dağılımına yol açan bazı hastalıklar OA riskini arttırmaktadır. Örneğin; Legg-Calve-Perthes hastalığı, femur başı epifiz kayması ve gelişimsel kalça displazisi gibi doğumsal kusurlar kalça OA riskini artırdığı bilinmektedir (60). Varus ve valgus gibi ‘kalça-diz-ayak bileği’ hizalanmasını bozan bazı durumlar diz eklemine binen yük dağılımını etkileyerek diz OA gelişimine katkı sağlamaktadır (51, 87).

Kas Güçsüzlüğü

Diz OA olan hastalarda kuadriseps (dört başlı kas) kas kuvvetinde azalma olduğu bilinmektedir. Kas güçsüzlüğünün nedeni ağrıya bağlı olarak eklem kullanılmaması ile ortaya çıkan kas zayıflamasından kaynaklanır (88). Bununla birlikte, yapılan çalışmalarda kas güçsüzlüğünün diz OA gelişimi ile ilgili olarak bir risk faktörü olduğu belirtilmiştir (51, 88).

2.1.4. Osteoartrit’in Sınıflandırılması

OA’ da hastalığın nedeni ve tutulan eklem göz önünde bulundurularak sınıflandırma yapılabilmektedir (31, 51). Bunun dışında, OA’nın radyolojik ve patolojik özelliklerinin tanımlanması ile OA birincil (primer, sebebi bilinmeyen, idiyopatik) ve sekonder (ikincil) olarak sınıflandırılmıştır. Tablo 2.1’de OA’nın sınıflandırılması üç ana başlık halinde ele alınmıştır; 1. Tutulan eklem göre sınıflandırma, 2. Nedenine bağlı sınıflandırma ve 3. Özgün özelliklerin varlığına göre sınıflandırma.

Tablo 2. 1. Osteoartrit'in Sınıflandırılması (51).

1. Tutulan Ekleme Göre Sınıflandırma
Monoartiküler (Bir eklem tutulumu)
Oligoartiküler (Birkaç eklem tutulumu)
Poliartiküler (Çok fazla eklem tutulumu)
2. Etiyolojik Sınıflandırma
Birincil OA (İdiyopatik)
İkincil OA
• Metabolik ✓ Akromegali ✓ Kalsiyum kristal depolanması • Anatomik ✓ Blount hastalığı ✓ Legg-Perthes hastalığı ✓ Bacak uzunluğu eşitsizliği • Yaralanma ile ilgili ✓ Eklem yaralanması ✓ Bir eklem yönelik yaralanma ✓ Eklem cerrahisi ✓ Kronik hasar • Yangısal ✓ Herhangi bir yangılı artrit ✓ Septik artrit
3. Belirli Özelliklerin Varlığına Göre Sınıflandırma
✓ Aşındırıcı (Eroziv) OA ✓ Yangılı OA ✓ Körelmiş (Atrofik) OA ✓ Kıkırdak kalsifikasyonu (Kalsiyum birikimi) (Kondrokalsinozis) ile OA

2.1.5. Osteoartrit'in Klinik Özellikleri

OA sürecinde eklem bölgelerinde meydana gelen değişiklikler çeşitli klinik belirtilere yol açar. Hastalığın başlangıcı yavaş ve sinsidir. OA' da en sık görülen belirti ağrıdır. Ağrı özellikle hareketliliğin özelliğine bağlı olarak artar (89). Tutukluluk ve sertlik ise hareketsiz dönemlerden sonra görülen bir belirtidir (90, 91). Diz OA'nın belirti ve bulguları aşağıdaki tabloda özetlenmiştir (51).

Tablo 2. 2. Diz OA'nın belirti ve bulguları (51).

Semptomlar (Belirtiler)	Bulgular
Ağrı	Hassasiyet
Tutukluluk	Hareket sınırlanması
Şişlik	Kırt kırt sesin çıkması (Krepitasyon)
İşlevsel Değişim	Eklem Kenarlarında Genişleme
Güçsüzlük	Yürüme bozukluğu
Şekil bozukluğu (Deformite)	Şekil bozukluğu (Deformite)
Dengesizlik (İnstabilite)	Dengesizlik (İnstabilite)

2.1.6. Osteoartrit'in Laboratuvar Bulguları

Birincil OA'da tanı koydurucu özgül herhangi bir laboratuvar bulgusu yoktur. Birincil OA'lı hastalarda eritrosit sedimentasyon hızı, tam kan sayımı, idrar tetkiki ve kan biyokimyası normal sınırlar içindedir (92). Çoğu girişimsel olmayan ve nispeten ucuz olan biyokimyasal belirteçler potansiyel olarak faydalıdır. Gittikçe artan sayıda önerilen belirteçlerin çok azı OA'da kullanılabilir; COMP, antijenik keratan sülfat, hiyaluronik asit, YKL-40, tip III kollajen, N-propeptid ve üriner glikosil-galaktosil piridinolin en umut verici belirteçler arasındadır (93). Bununla birlikte, bu moleküllerin karmaşık metabolizmalarından dolayı serum ve idrar tayinlerinin yorumlanması oldukça güçtür (93).

2.1.7. Osteoartrit'in Tanısı

OA hastalığının tanısı hastanın yaşı ve hikâyesi, patolojik eklemlerin yeri ve radyolojik bulgularla konur (94). OA çok farklı sebeplerden kaynaklanan bir hastalık olduğundan çeşitli eklem bölgeleri için (el, diz, kalça) farklı tanı ölçütleri geliştirilmiştir. En yaygın kullanılan tanı ölçütleri Amerikan Romatoloji Kurulu (American College of Rheumatology, ACR) tarafından geliştirilmiştir (95). Diz OA için ACR tarafından belirlenen Klinik ve Klinik ve Radyografik değerlendirmelerin yapıldığı ölçütler tablo 2.3'de gösterilmiştir.

Tablo 2. 3. Diz OA için ACR ölçütleri (51).

Diz	Klinik
1.	Önceki ayın çoğu günü için diz ağrısı
2.	Eklem hareketinde kısıtlama (krepitasyon)
3.	30 dakika veya daha az süren sabah tutukluluğu
4.	38 yaş ve üzerinde olmak
5.	Diz ekleminde büyüme
Klinik ve Radyografik	
1.	Önceki ayın çoğu günü için diz ağrısı
2.	Eklem kenarlarında osteofitler
3.	OA'nın tipi sinoviyal sıvısı
4.	40 yaş ve üzerinde olmak
5.	30 dakika veya daha az süren sabah tutukluluğu
6.	Eklem hareketinde kırıltı sesi

Epidemiyolojik çalışmalarda da OA tanısı 1957 yılında Kellgren ve Lawrence tarafından tanımlanan karakteristik radyolojik özelliklere dayanır (51, 96). Kellgren ve Lawrence'ın geliştirdiği radyografik evreleme cetveli tablo 2.4'de gösterilmiştir (51, 96) .

Tablo 2. 4. OA'nın sınıflandırılması (51).

Evre	Sınıflandırma	Tanım
0	Normal	OA bulguları yok
1	Şüpheli	Varlığı belirsiz, küçük osteofitler
2	Hafif	Kesin osteofitler, normal eklem aralığı
3	Orta	Eklem aralığında orta dereceli azalma
4	Şiddetli	Eklem aralığında ileri dereceli azalma, Subkondral sklerozis

2.1.8. Osteoartrit'in Tedavisi

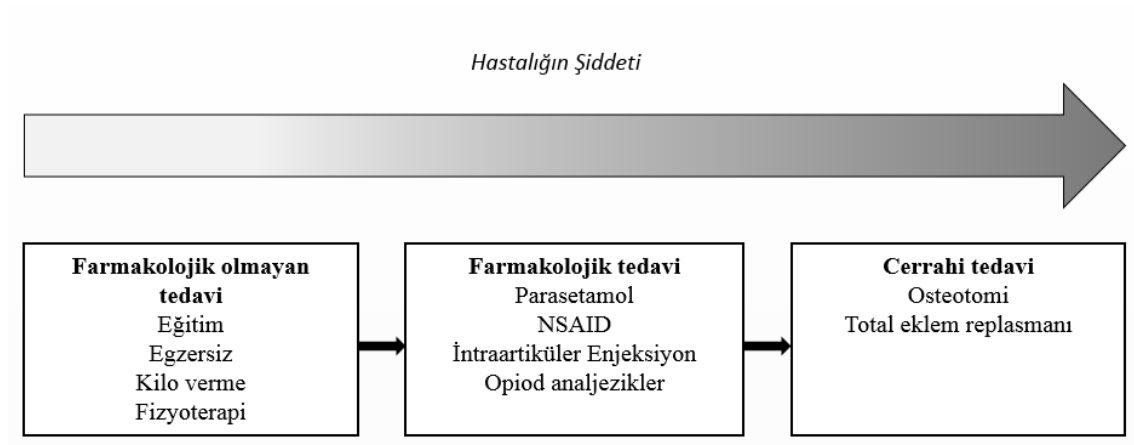
Tedavide temel amaç ağrıyı kontrol etmek, eklem hareketliliğini ve işlevselliğini geliştirmek veya muhafaza etmek ve yaşam kalitesini arttırmaktır (97, 98). OA zaman içinde gelişir ve yavaş yavaş değişim gösterir. OA patolojisi çok fazla farklılık gösterebilmektedir (99). Bu nedenle, tedavi bireye özgü olmalıdır ve OA tedavisinde etkin bir yaklaşım sıklıkla farmakolojik, farmakolojik olmayan (eğitim, egzersiz, düzenli beslenme gibi) ve cerrahi tedavilerin birlikte kullanılmasını gerektirir (100, 101). OA için tedavi yöntemleri tablo 2.5'de özetlenmiştir. Tabloda görülen tedavi yaklaşımlarının

OA’da belirli oranda etkili oldukları bilinmektedir (51). Bu tedavi yöntemleri pratik uygulamalarda birlikte kullanılmaktadır (51).

Tablo 2. 5. OA için tedavi yöntemleri (51).

Farmakolojik Olmayan	Farmakolojik	Cerrahi
Eğitim	Parasetamol	Artroskopi
Egzersiz	NSAİİ	Osteotomi
Tabanlıklar	Opiod analjezikler	UDR
Ortezler (baston vb)	Seks hormonları	(Unikompartmental
Kilo verme	SYSADOA (Symptomatic slow acting	diz replasmanı)
Lazer	drugs for OA)	TDR (Total Diz
Spa	Psikotrop ilaçlar	Replasmanı)
Vitamin / mineral	Topikal NSAİİ	
EMA (elektromanyetik alan)	Cilt üstü (Topikal) Kapsaisin	
Ultrason	İntraartiküler (Kortikosteroid,	
TENS (Transkütanöz elektriksel sinir stimülasyonu)	Hyaluronik asit, Irrigasyon)	
Akupunktur		
Gıdasal ilaçlar		
Bitkisel ilaçlar		

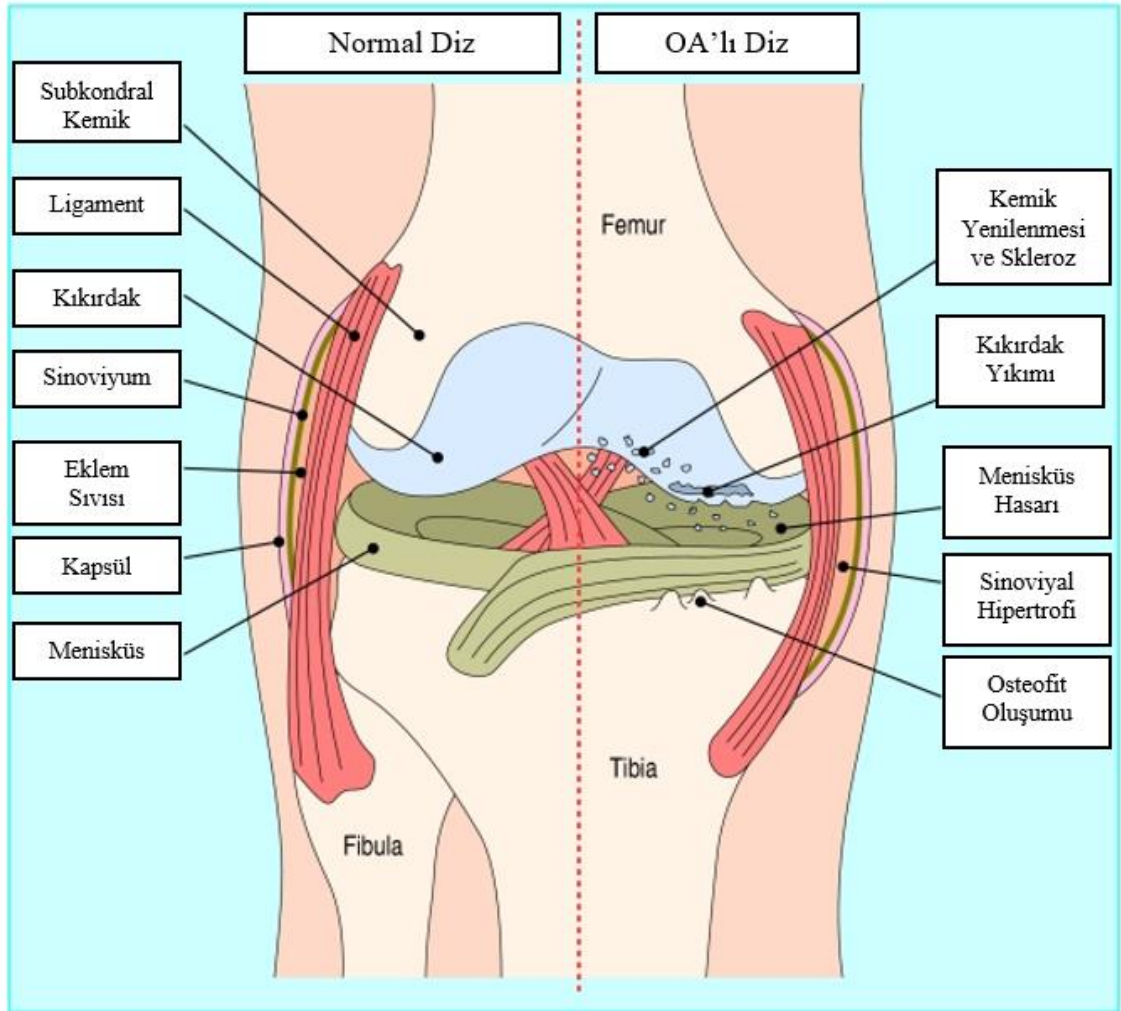
Ayrıca, OA hastalarının tedavisinde kullanılan hastalığın şiddetine bağlı tedavi aşamaları şekil 2.3’de gösterilmiştir. Bu hastanın tedaviye cevabına ve klinisyenin tercihinə göre değişebilen tedavi algoritmasının bir örneğidir (102).



Şekil 2. 3. OA hastalarının tedavisinde kullanılan adım adım algoritma (102). Farmakolojik olmayan tedavi tüm OA’lı hastalarda birinci aşama olarak göz önünde bulundurulmaktadır. Hastalığın ileri evrelerinde farmakolojik tedavi son aşamasında ise cerrahi tedaviye başvurulmaktadır (102).

2.1.9. Osteoartrit Hastalığının Gelişimini Sağlayan Moleküler Değişimler

Osteoartrit eklem işlevlerinde kayba ve ağrıya neden olan geri dönüşümsüz bir hastalıktır. OA'nın temel ayırıcı niteliği (karakteristiği), eklem kıkırdığında kayıp ve subkondral kemikte sklerozis (sertleşme) ile ilişkilidir (73). Hastalık histolojik olarak kıkırdak yüzeyinde parçalanma, kondrosit kümelenmesi, kıkırdakta dikey yarıklar, kristal birikimi, yenilenme ve damarlanma ile kendini gösterir (74). OA yapısal, mekanik ve biyolojik yolların rol aldığı karmaşık bir hastalık süreci olup kıkırdak, subkondral kemik, sinoviyum, ligament, kapsül, eklem çevresi kas dokusu gibi tüm eklem bölgesini etkilemektedir (39, 74). Normal ve Osteoartritli diz eklemi şekil 2.4'de gösterilmiştir.



Şekil 2. 4. Normal ve Osteoartritli diz eklemi (102). Osteoartritli dizde değişmiş kemik yenilenmesi, kıkırdak yıkımı, menisküs hasarı, sinoviyal hipertrofi (hacim artışı), sklerozis (sertleşme) ve osteofit (kemik çıkıntısı) gelişimi şematize edilmiştir.

2.1.9.1. Osteoartrit'te Eklem Kıkırdağı

Tüm yaşam boyunca eklem kondrositleri ve subkondral kemik hücreleri akut (ani) veya kronik (uzun süreli) strese maruz kalırlar ve buna sürekli tepki oluştururlar. Eklem homeostazının (iç dengesinin) sürdürülmesinde biyomekanik stres gereklidir çünkü hareketsiz eklemlerde proteoglikan kaybı son derece hızlıdır (103). OA sürecinde, homeostatik (iç denge) ve onarım mekanizmaları yeterince etkin bir şekilde işlev gösterememektedir (102).

Yapılan *in vitro* çalışmalara göre, zarar veren statik sıkıştırma/yüklenme hem kollajen ağına zarar verebilir hem de proteoglikanların tükenmesini uyarır. Burada belirtilen olaylar kıkırdak matriks proteinlerinin sentezini azaltırken dinamik sıkıştırma ise matriksin sentetik etkinliğini artırır (104). Kıkırdak uzun süre eklem temas bölgelerindeki yüksek gerilime ve yırtılmalara dayanamaz. OA'lı kıkırdak, kollajen ağının bozulması ve ardından üst bölgede proteoglikan kaybı ile kendini gösterir (105). Hastalığın ilerleyen aşamalarında, kıkırdak matriksinin organizasyonu ve moleküler bileşimindeki değişiklikler eklem yüzeyinin ve hyalin kıkırdağın yapısal bütünlüğünün bozulmasına yol açar (105).

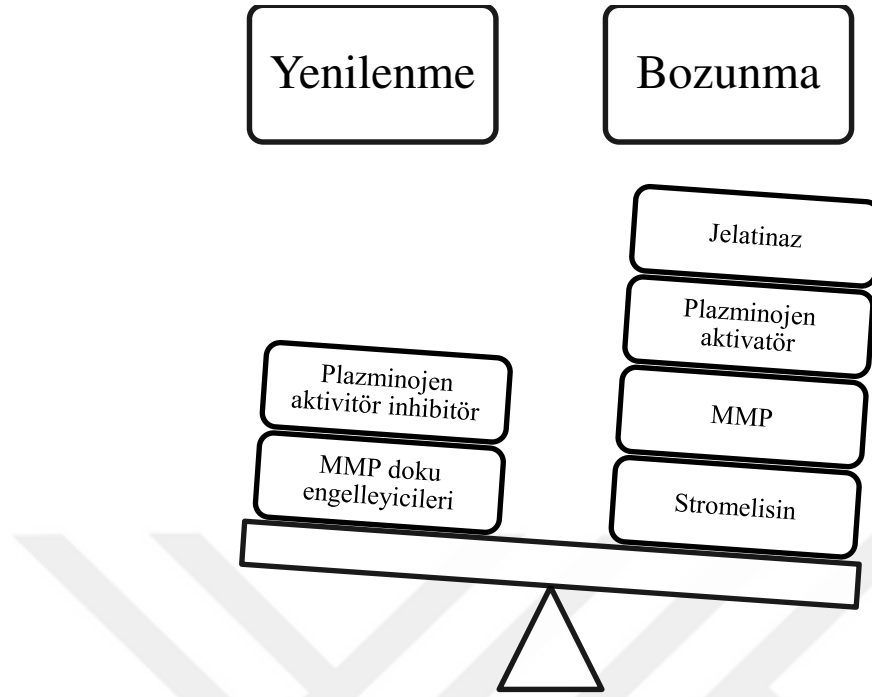
OA'da Kondrositlerin Fizyolojisi

Eklem kıkırdağı ve OA'da onun bozunmasına yol açan hastalık süreci yoğun bir şekilde çalışılmıştır (106). Eklem kondrositleri eklem kıkırdağındaki tek hücre tipidir ve eklem kıkırdak hacminin yaklaşık %2-5'ni oluştururlar (107). Diğer kalan kısım ise proteoglikanlar ve kollajenler ile hidratlanmış hücre dışı matriksi oluştururlar (107). Kondrositlerin temel işlevi kıkırdak bütünlüğünü muhafaza etmektir. Bununla birlikte, OA gelişiminde kıkırdağın biyokimyasal ve biyomekanik çevresi değiştiği için belirli değişimler kondrositlerin davranışlarında da olur (107). Büyüme plağında görüldüğü gibi, OA'lı eklem kıkırdağındaki kondrositlerde çoğalma, hacim genişlemesi ve apoptoza yol açan farklılaşma yolağını bloke ettiği görülür (108). Bu daha fazla yıkıcı fenotip ile hücre dışı matriks sentezinin azalması ile birlikte MMP (matriks metalloproteaz) ve agrekanaz gibi yıkıcı enzimlerin artması ile kendini gösterir (107, 108).

OA'yı başlatan faktörler tam olarak tespit edilememiştir (109). Çıkarılan yetişkin insan eklem kıkırdağının mikrodizin analizi, mekanik hasarın genlerin büyük çoğunluğunun ifadesini önemli ölçüde düzenlediğini ve morfojenik yolağın yeniden etkinleştiğini göstermektedir (109). Yaralanma ile birlikte ifadesi artmış genlerden ilki WNT-16'dır

(110). Normalde WNT-16 gen ifadesi OA'lı eklemde kıkırdak korumuş bölgelerinde çok düşük iken orta ve ciddi kıkırdak hasarı olan kıkırdak bölgelerinde gen ifadesi yüksek derece artmıştır (110). İlginçtir ki, WNT antagonisti olan sklerostin, insan OA'lı kıkırdakların en son halinde yüksek seviyede ifade edildiği bulunmuştur (110). Benzer şekilde fare ve koyun OA modellerinde oluşturulan kıkırdak hasarının olduğu bölgelerde de yüksek derecede ifade edildiği bulunmuştur (110). Aynı çalışmada, eklem kondrositlerinde sklerostini kodlayan SOST gen ifadesinin IL-1 (Interleukin) tarafından artırıldığı gösterilmiştir (110). Rekombinant sklerostin proteininin eksplant kültürüne eklenmesi IL-1'in agrekanaz uyaran etkisini durdurmaktadır (110). Bu durum OA'lı kıkırdakta sklerostin'in yıkıcılık metabolizmasını durdurduğunu düşündürmektedir (110). OA'lı kıkırdakta WNT yolunun önemli rolü olduğu düşünülmektedir (111). WNT antagonisti DKK-1'in aşırı ifadesi OA'lı hayvan modellerinde kıkırdak yıkımına karşı koruyucudur (111). Bundan başka WNT yolunu tetikleyen WNT-3A, primer hücre kültüründe MMP13 ve ADAMTS-4 ifadesini uyardığı gösterilmiştir (112). Eklem kondrositlerinde yıkıcı metabolik fenotip oluşturmak için IL-1 ve TNF- α kullanılmaktadır (112). Bu yıkıcı fenotipi IL-1 ve TNF- α WNT yoluyla aracılığıyla yapabilir (112). Eklem kıkırdakına benzer bir doku olarak omurlar arası diskte, TNF- α , β -katenin ve MMP13 ifadesi artırmıştır ve proteoglikan ile tip II kollajen sentezini önemli ölçüde durdurmuştur (113). Ayrıca IL-1 ve TNF- α nın yıkım etkisi DKK1 tarafından engellenebilmektedir (113).

Yangısal sitokinler tüm dokuların onarımında önemli bir role sahipken bunların kronik (uzun süreli) maruziyeti onarımı riske atmak gibi görünmektedir. Kıkırdakta sürekli yangı, yetersiz matriks ve düşük kalitede kıkırdak yol açan hücre dışı matriks yenilenmesini artırır (114). Biyomekanik yıkım, yangı ve kondrositler tarafından üretilen proteazlar arasındaki ilişki OA'lı fare cerrahi modelinde gösterilmiştir (114). Ameliyattan sonra IL-1, IL-6, MMP3 ve ADAMTS-1.4.5 gibi genlerin tamamının ifadesi artmış durumdadır (114). Böylelikle, bu genlerin ifadesi yüksek derecede mekanosensitif olduğu gösterilmiştir (114). Böylece, mekanik yüklenme sağlıklı kıkırdak için gereklidir ve kollar ve bacaklardaki (ekstremitelerdeki) hareketsizlik kıkırdak kaybına yol açmaktadır (115). Yüklenmeye bağlı yaralanma ya da ekleme kronik aşırı yüklenme matriks bütünlüğü için uzun vadeli sonuçlar doğuran kondrosit davranışlarında değişime yol açabilir (115). OA'ya bağlı değişmiş kıkırdak metabolizmasına ait şekil 2.5'de gösterilmiştir (51, 116).

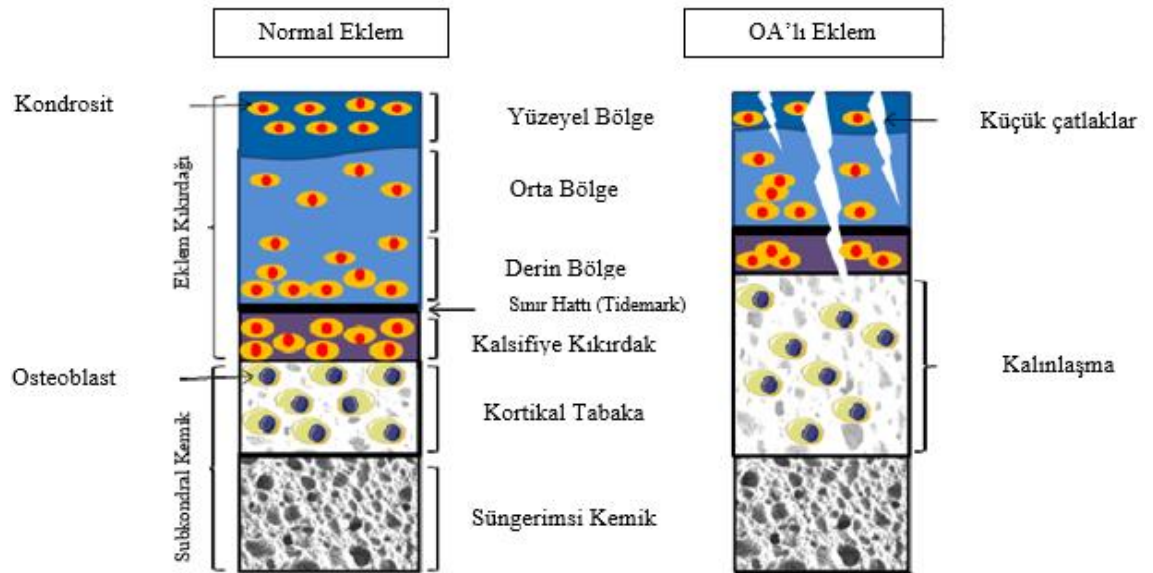


Şekil 2. 5. Osteoartrit'te Kıkırdak Metabolizması (51, 117). Osteoartrit'te kıkırdak metabolizmasının değişimi kıkırdak yenilenmesi ve parçalanması arasındaki dengenin bozulması şeklinde kendini gösterir. Dolayısı ile OA'nın gelişimi kıkırdak yaşlanması ve yıpranmasının bir sonucu olduğu söylenebilir. Şekile bakıldığında OA'nın gelişimi kıkırdak dokusunu parçalayan enzimlerin, özellikle MMP'lerin artması sonucu ve dengenin öbür tarafındaki engelleyicilerinin yeterli olamamasından kaynaklandığı anlaşılmaktadır.

2.1.9.2. Osteoartrit'te Subkondral Kemik

Subkondral kemik (SB) eklem kıkırdağının altındaki epifiziyel kemik bölgesidir (118). Subkondral kemik tabakası, kireçlenmiş (kalsifiye) kıkırdak ve ince kabuksal (kortikal) kemik tabakası içeren eklem kıkırdağının zonal olarak derin bölgesidir (118). Kireçlenmiş kıkırdağın kireç izi (tide mark) ile hiyalin kıkırdağından ayrılır (119, 120). Mevcut görüntüleme yöntemleri ile incelendiğinde SB'nin bölgeleri arasında belirgin bir anatomik sınır yoktur (119). SB normal kemiğin korunmasında önemli bir etken olarak kabul edilmektedir (119). Aslında, SB normal eklem işlevlerini destekleyici ve şok emici özelliğe sahiptir (119). SB eklem kıkırdağına mekanik bir zemin sağlayarak eklem yüklenmesini yaklaşık olarak %30 oranında azaltır (119). Ayrıca SB, kıkırdağın beslenmesini sağlar ve metabolik atıkların uzaklaştırılmasına yardımcı olur (119, 121).

OA sürecinde, SB artmış kemik döngüsü, mikro kırıklar, anjiyogenez (damarlanma) ve son aşamada kemik sklerozisi (sertleşme) gibi değişikliklere uğrar. Ayrıca, histopatolojik açıdan hiyalin kıkırdak inceler, yeni kan damarları SB'den kalsifiye kıkırdığa nüfuz eder ve SB kalınlığında artış meydana gelir (122-129). Bu değişiklikler hem eklem kıkırdığının biyomekanik özelliklerini hem de kıkırdak ve subkondral kemiğin biyolojik ilişkisini etkiler (118). Bunların dışında, OA sürecinde her bir SB anatomik bölgesi farklı yanıtlar oluşturabilir. Dolayısıyla, SB'de meydana gelen değişiklikler OA gelişiminin ve ilerlemesinin bir sonucudur. Normal ve Osteoartritli eklem kıkırdığı ve subkondral kemik anatomisi şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2. 6. Şematize edilmiş normal ve osteoartritli eklem kıkırdığı ve subkondral kemik anatomisi (130). Yüzeyel bölgede kıkırdak hücreleri nispeten azalmış, orta ve derin bölgelerde de benzer şekilde kıkırdak hücrelerinde fark edilir bir azalma, kalsifiye kıkırdak altı kemiklerde kalınlaşma görülmektedir.

Normal eklem kıkırdığı yüzeysel bölge, orta bölge, derin bölge ve kalsifiye kıkırdak bölgesi olmak üzere 4 ayrı bölgede incelenebilir (130). Bu bölgeler kollajen matrikse sıkışmış az sayıda kondrosit içermektedir (130). Kalsifiye kıkırdak derin bölgeden bir sınır hattı ile (tidemark) ayrılır ve doğrudan SB üzerine oturur (130). Eklem kıkırdığının altındaki subkondral kemik kabuk plakası ve süngerimsi kemik olmak üzere iki tabakada organize edilir (130). SB eklem kıkırdığının bütünlüğünün korunmasına yardımcı olmaktadır (130). OA'lı eklemdeki değişiklikler eklem kıkırdığındaki kollajen matriksin

bozulması ve SB kalınlaşması ile temsil edilmektedir (130). Eklem kıkırdağındaki yarıklar kıkırdak damarlanmasını tetikler (130). Subkondral kemikteki mikro çatlaklar ile eklem kıkırdağında incelme, subkondral kemiğin kabuğunda (korteksinde) kalınlaşmaya neden olur (130). Subkondral sklerozis OA ilerlemesinin bir sonucudur (130).

OA'nın başlamasında ve ilerlemesinde SB'nin rolü olduğu Rodin ve Rose tarafından önerilmiştir (131). SB'de meydana gelen sertlik onun esneklik ve şok emici kapasitesinin azalmasına neden olur (131). Sonuçta fazla mekanik yüklenmeler ile kıkırdak yüzeyi dağılır (131). SB ve eklem kıkırdağı arasındaki yakın ilişki ile ilgili mevcut bilgiler ışığında, kıkırdakta meydana gelen olumsuz değişiklikler bitişindeki SB'yi etkiler (25). Eklem kıkırdağının bütünlüğü, hem mekanik özellikler kazandıran ve kıkırdak yenilenmesini etkileyen SB'ye hem de SB altındaki subartiküler kemiğe bağlıdır (25).

Eklem kıkırdağı ve SB OA'da etkilenen iki önemli eklem bölgesidir (130). Birbirine yakın konumda olan bu iki eklem bölgesinde hastalığın seyri boyunca paralel tipik değişimler meydana gelmektedir (132). Hem eklem kıkırdağı hem de SB'deki değişimlere, buraya yerleşmiş hücreler (osteoblast ve kondrosit) aracılık eder (132). Kıkırdaktaki kondrositler, subkondral kemikteki osteoblast, osteoklast, osteosit hücreleri bu dokuların işlevinin sürdürülmesi ve bütünlüğünün muhafaza edilmesinde birincil rol alırlar (132).

Hastalıklı eklemde değişmiş mekanik ve biyokimyasal ortamına yanıt olarak osteoblast ve kondrositlerin fizyolojileri de değişir (131, 132). Bu hücre grupları özellikle hastalık boyunca farklı hücresel davranış ve farklı gen ifade düzeni göstermektedirler. Ayrıca, kıkırdak ve subkondral kemik hücreleri arasında kimyasal bir iletişim olduğu *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir (132). Sonuçta bu hücrelerin fizyolojisindeki değişiklikler SB ve kıkırdaktaki yapısal değişikliği açıklar (132). Eğer gerçekten kıkırdak ve SB işlevsel bir birim gibi davranıyorsa, bir birimdeki hücre davranışlarının normalize edilmesi her iki dokuya da fayda sağlayabilir (132).

Osteoartrit'te Osteoblast Fizyolojisi

Gerek insan kemik numunelerinde yapılan çalışmalardan gerekse hayvan modellerindeki çalışmalardan elde edilen veriler OA'da değişmiş kemik yenilenmesini göstermektedir (133, 134). Hücresel düzeyde, kemik yenilenmesi ve kemik erimesine yol açan osteoklast ve kemik oluşumuna katılan osteoblast hücreleri tarafından gerçekleştirilmektedir (133,

134). Bu iki hücre tipinin aktiviteleri kemik matriksine gömülü osteositler tarafından düzenlenmektedir (133-135). OA'da ekleme aşırı yüklenme SB'de mikrokırıkların ve mikro hasarın artışına neden olmaktadır (134, 136, 137). Osteositler mineralize kemik matriksinin hasarını algılar ve etkilenen kemikteki hedeflenen osteoklastik erimeyi başlatarak onarımı yönlendirir (138).

Son çalışmalarda, olgun kemikte osteositlerin osteoklast farklılaşma sitokini, RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) ürettiği belirtilmiştir (139). Ayrıca, kemik yenilenme oranının hastalığın seyri boyunca değiştiği gösterilmiştir (140). Böylelikle, OA'nın erken evrelerinde SB'de artan damarlanmaya bağlı olarak yenilenme artarken hastalığın geç evresi azalmış kemik erimesi ile kendini gösterir (141, 142).

Parçalanan kırıkdağın altındaki subkondral bölgede azalmış mineralizasyonla birlikte artmış trabekül sayısı, azalmış trabekül boşluğu ve kemik sağlamlığını düşürür (143, 144). BML (bone marrow lesions) fazla yüklenme bölgelerinde ortaya çıkar (145). BML azalmış mineral yoğunluğu ile kemik sklerozis bölgeleri ve osteosit ölüm alanlarında bulunur (145). OA'lı kemik yapısındaki değişimler hücresel işlevlerin değişiminden kaynaklanır (146). Bu değişen davranışların nedeni henüz bilinmemekle beraber birkaç olası nedeni olabilir. Yukarıda belirtildiği gibi, ekleme aşırı yüklenme kemik matriksinde hasarın birikmesine yol açabilir (146). OA'lı kemik osteoblastları, değişmiş fenotipe sahiptirler ve bu hücrelerin gen ifade seviyeleri normal veya osteoporotik kemik osteoblastlarından farklıdır (132). Örneğin, OA'lı osteoblastlardaki alkalen fosfataz (ALP) ve osteokalsin (BGLAP) seviyesi normal osteoblastlara göre yüksektir oysa osteopontin seviyesi normal osteoblastlara benzerlik göstermektedir (147, 148). OA'lı osteoblastlar normal hücrelere göre farklı mineralizasyon gösterir (147, 148).

Couchourel ve arkadaşları (147) yaptıkları bir çalışmada, OA'lı osteoblastlarda mineralizasyon azalmasına COL1A1/COL1A2 mRNA oranının artmasının eşlik ettiğini göstermişlerdir (147, 149). İlginç bir şekilde, OA'lı osteoblastlar normal osteoblastlardan daha fazla TGF-1 β (Transforming growth factor beta 1) üretir (149). OA'lı osteoblastlarda TGF-1 β baskılanması anormal COL1A1 (Tip I kollajen α -1 zinciri)/COL1A2 (Tip I kollajen α -2 zinciri) oranını düşürerek hücre mineralizasyonunu düzeltmişti (149). OA'lı hücrelerde artan TGF-1 β proteini DKK-2 (Dickkopf-related protein 2)'nin seviyesini arttırır ve bu hücrelerde TGF-1 β veya DKK-2'nin susturulması OA mineralizasyon fenotipini normalize ettiği bulunmuştur (150). Massicotte ve

arkadaşlarının (151) yaptıkları bir çalışmada, OA'lı SB'deki osteoblastların IL-6 ve prostaglandin E2 üretimine bağlı olarak iki alt grup içerdiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca, TGF-1 β seviyelerinin normale göre tüm OA'lı osteoblastlarda arttığını göstermişlerdir (151). Kumarasinghe ve arkadaşları (148) OA'lı ve sağlıklı kontrol femoral kemik (uyluk kemiği) primer osteoblast hücrelerinde gen ifade analiz yaptılar. Bu çalışmalarda, OA'lı kemikte TWIST1 (Twist-related protein 1), TGF β 1 ve SMAD3 (Smad ailesi üyesi hücre içi protein) mRNA'larının düzensiz ifade edildiği gözlemlenmiştir (148). OA'lı osteoblast hücreleri *in vitro* ortamda kültüre edildiği durumda da bu düzensiz gen ifadesi değişmemiştir (148). Böylelikle OA oluşumunun en azından bir kısmında bu osteoblast hücrelerinin değişmiş içsel özelliklerinin rolü olduğu öne sürülmüştür (148). Güncel çalışmalar, OA'lı insan ve fare subkondral kemiğinde TGF-1 β yüksek derişimini doğrulamaktadır ve TGF-1 β 'nin subkondral kemikteki aşırı ifadesi OA'yı uyarmaktadır (152). TGF-1 β baskılanmasının olumlu etkileri TGF-1 β etkinliğini baskılayan sistemik yaklaşımlarda görülmez çünkü TGF-1 β kıkırdak iç dengesi için gereklidir ve TGF-1 β baskılanması eklem kıkırdağında TGF-1 β uyarılmasını engeller (152). Böylelikle araştırmacılar, subkondral kemikteki TGF-1 β 'nin yüksek derişikliği, anormal kemik oluşumunu ve OA gelişimini uyardığı sonucuna varmışlardır (152).

Osteoartrit'te Osteoblast ve Kondrosit Arasındaki İletişim

Kondrosit ve kemik hücreleri aynı çevresel uyaranlara karşı birbirinden bağımsız yanıtlar oluşturabilirler (153). Ayrıca, bu birimlerin birinde meydana gelen hücresel değişiklikler diğer birimin hücrelerini etkileyebilir. Hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalarda kondrositlerin ve osteoblastların birbirlerini etkileyebileceğini gösteren kanıtlar bulunmaktadır (153). Örneğin, OA'nın iyi tanımlanmış sıçan modelinde MIA (Monosodyum Asetat) eklem içine enjekte edilir. Başlangıçta kıkırdak ilaca maruz kalmaktadır. Bununla birlikte, sadece iki hafta sonra bu model belirgin ölçüde kemik kaybı göstermektedir (153). Daha sonra bu modelde kıkırdak yıkımına paralel olarak osteofitler, SB sklerozu ve kistlerin oluşumu ile trabeküler kalınlaşma gözlenmektedir (153). Ayrıca, SB'nin osteoblast hücrelerindeki EPHB4 (Ephrin type-B receptor 4, almac tirozin kinaz) almacının aşırı ifadesinin farede oluşturulan OA'ya karşı koruyucu etki yaptığı rapor edilmiştir (154). Dolayısı ile elde edilen bulgularda bu iki dokunun birbirine bağımlı olduğu görülmektedir. Bu yüzden OA hayvan modellerinde uygulanan tedavide özgül hedef olarak seçilen SB'nin hastalığın ilerlemesini önleyebileceği ve iyileştirebileceği düşünülmektedir. Örneğin, diz OA sıçan modelinde, Biyofosfonat ve

Alendronat hem SB erimesinin hem de diz eklemindeki OA gelişimini baskıladığı bulunmuştur (155). Fare OA modelinde, OPG (Osteoprotegerin)'nin zerk edilmesi RANKL aracılı kemik yenilenmesini önler. Ayrıca, OPG menistektomi ile oluşturulan OA modeline karşı önemli ölçüde koruyucudur (156). Menisektominin akabinde, OPG eklem kondrositlerinde ADAMTS-4 ve ADAMTS-5 gen ifadelerini önemli ölçüde azaltır (157). Çok sayıda *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda SB'deki değişimlerin kıkırdak yüzeyini doğrudan etkileyebileceği gösterilmiştir (132). Eklem kıkırdağından subkondral kemik eksizyonu (çıkartılıp atılması) özellikle kıkırdağın yüzeysel bölgesindeki kondrositlerde 7 gün içerisinde hızla öldükleri gösterilmiştir (158). Bununla birlikte, subkondral kemikten salınan aracı moleküllerden dolayı, kültür ortamında daha önce çıkartılan subkondral kemiğin varlığı kondrosit ölüm artışını durdurmuştu (158).

Sanchez ve arkadaşları (159) yeni bir kültür sistemi tanımladı. Bu sistemde, OA'da insan SB bölgelerindeki sklerotik ya da sklerotik olmayan osteoblastlar, kondrositlerin oluşturduğu bir zarla ayrılmıştır (159). Sklerotik osteoblastlar'ın varlığında kültüre edilen kondrosit hücreleri arasında iletişim olduğunu göstermişlerdir (159). Ayrıca bu hücrelerde agregan üretiminde, MMP3 ve MMP13 ifadelerinde artış gözlenmiştir (159). Osteoblast hücreleri IL-6, IL-1 ya da Oncostatin (OSM) gibi yangısal ara moleküllerle muamele edildiğinde agregan üretiminde, MMP3 ve MMP13 seviyelerinde artış gözlemlenmiştir (159). Araştırmacılar OA'lı kondrositler tarafından aşırı ifade edilen IL-1, IL-6 veya OSM'nin yakınındaki osteoblastları etkileyerek geri besleme döngüsü oluşturabileceğini düşünmektedirler (159).

Osteositler kemikte en bol bulunan ve birincil mekanik strese hassas hücre tipidir (133, 135). Ancak, bu osteosit hücre grubunun birincil önemi ile ilgili çok az bilgi rapor edilmiştir (132). Yapılan çalışmalarda *in vivo* osteoblast/osteosit ve kondrositler arasındaki moleküler etkileşim potansiyeli gösterilmiştir (132). Ancak, eklem kıkırdağı ve SB arasındaki etkileşim olasılığının çok az olduğu düşünülmektedir (132). Bununla beraber, Imhof ve arkadaşları (119) kemik ve kıkırdak arasındaki iletişime izin veren kıkırdağa yakın yoğun subkondral damarlanmalar ve subkondral mineralizasyon tabakasına nüfuz etmiş mikro kanalların varlığını göstermişlerdir (119).

Imhof ve arkadaşları daha sonra kıkırdak sentezi için gereken metabolik enerji glikoz, oksijen ve suyun % 50'den fazlasının subkondral damarlardan perfüzyon (kanlanma) ile sağlandığını ifade ettiler (119). Damarlanma da olan bu düzensizliklere bağlı OA'da kanlanma bozuklukları gösterilmiştir (160). Özellikle subkondral bölgelerde kemik iliği

lezyonları MR (Manyetik Rezonans) görüntüleme sistemiyle belirlenmiştir (160). Daha önce belirtildiği gibi bu bölgeler hasarlı kıkırdağın altındaki bölgelerdir (161-163). Floresans boyaların kullanıldığı hassas deneylerde Pan ve arkadaşları (164) kemik iliği ve eklem aralığı arasındaki bu küçük moleküllerin dağılımını gösterdiler (164). Bu gözlemler en azından küçük moleküller için SB ve eklem kıkırdağı arasındaki doğrudan uyarılma olasılığını düşündürmektedir (165). Ayrıca araştırmacılar, eklem bozulması ve onarımında rol oynayabilecek hem mekanik hem de biyokimyasal iki işlevsel birim önermektedirler (165). Bu sonuçlar diğer bazı gözlemler ile tutarlılık gösterir (165). Subkondral kemik ve kalsifiye kıkırdağın arasındaki ara yüzün ince yapısında bu dokuların iletişim kurabileceği çeşitli damarlar bulundurmaktadır (165). İnsan kondro-kemik eklemi ile ilgili yeni bir çalışma şimdiye kadar fark edilmemiş bir bileşeni ortaya çıkardı (166). Ayrıca, bu ara yüz OA'dan etkilenir ve bu alanlar dokular arasındaki sıvısal aracı moleküllerin trafiğine imkân tanır (167).

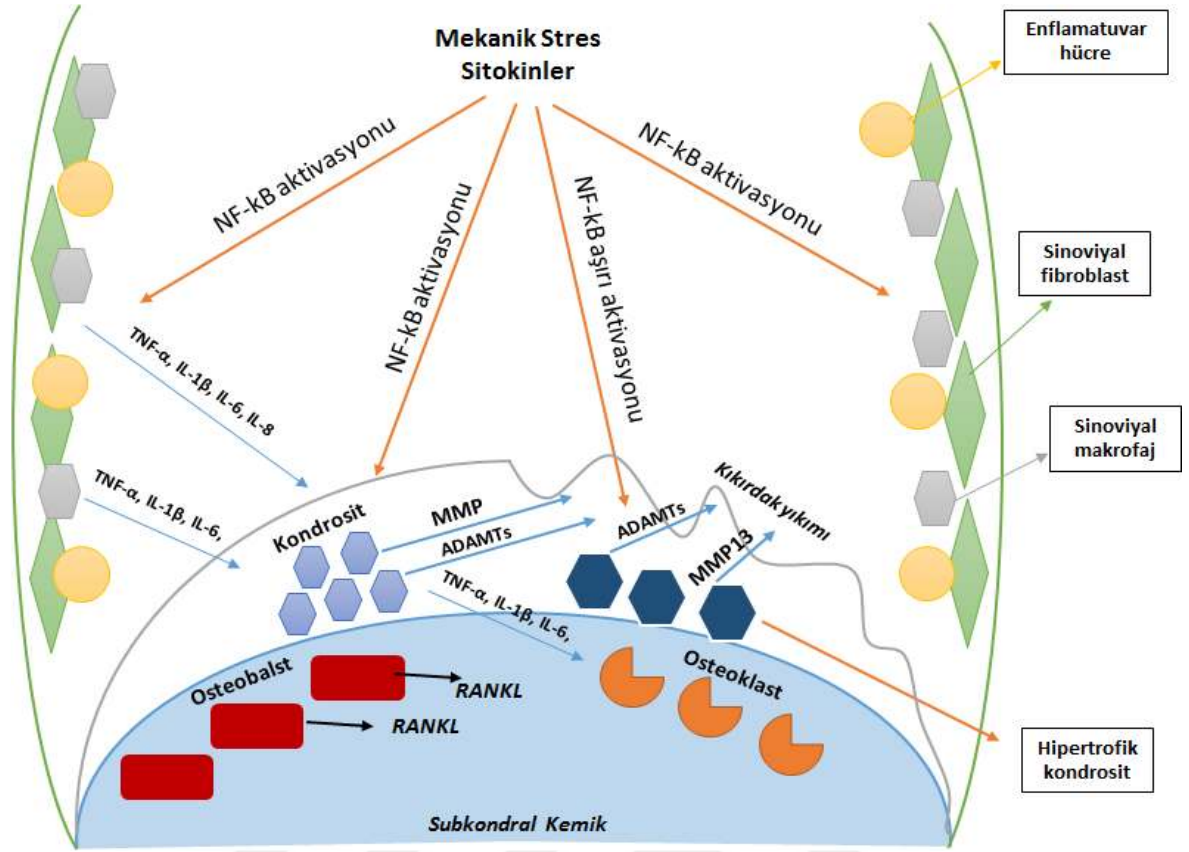
Sonuç olarak, yapılan güncel çalışmalarda OA fare modelindeki hastalık gelişiminde subkondral plaka gözeneklerinde büyük artış olduğu gösterildi ve bu gözenekler subkondral kemik ve kıkırdak arasındaki ilişkiyi artırabileceği düşünülmektedir (167). Ek olarak, sitokin büyüklüğündeki moleküller sağlıklı ya da hasta dokuda kemik ve kıkırdak arasında geçiş yapabilirler (144). Ancak, daha önce düşünülen büyük moleküllerde osteosit kanilikülüne geçebilirler ve bu moleküllerin taşınımı kemik üzerine yük binmesiyle artar (168). Kıkırdak ile ilgili olarak, metabolitlerin difüzyonu da etkilidir. Örneğin, IGF (insulin-like growth factor) kıkırdakta önemli rollere sahiptir. Ancak, IGF dolaşımında az miktarda üretilir ve büyük miktarlarda kıkırdağa taşınır (169). Bu taşıma kısmen difüzyon ile gerçekleşir (170).

2.1.9.3. Osteoartrit'te Sinoviyal Zar

OA sürecinde, OA bulgusu olan bireylerin çoğunda belirli derecelerde sinoviyal yangı ve sinoviyal hacim artışı gözlenir (172). Sinoviyositin OA'yı başlatan ana faktör olmadığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, sinoviyosit öncü yangısal etkenlerin üretimi ile hastalığın ilerlemesine ve ağrıya katkı sağlar (173-176).

OA'lı eklem sinoviyal zarı (171) histolojik olarak değerlendirildiğinde sinoviyal hücre tabakasında hiperplazi (aşırı gelişim) ve buna eşlik eden monosit ve lenfositlerin sayıca yerel artışı gözlenebilir (177). Sinoviyal hücreler ve OA'lı kondrositler MMP-1, MMP-3, MMP-9 ve MMP13 gibi matriks metalloproteinazlarını büyük oranda sentezlerler

(178). Sinoviyal hücreler sadece burada belirtilen protein parçalayıcı enzimleri salgılamazlar ayrıca yangısal sitokinleri de (IL-1 β , TNF- α , IL-6) sentezlerler (179). Resistin gibi adipokinler OA sırasında sinoviyumdan sentezlenir. Böylelikle sinoviyal doku OA'lı eklemden adipokinlerin temel kaynağı gibi görünmektedir (180, 181). Osteopontin hastalığının seyri ile ilişkili olup OA'lı sinoviyal dokuda yüksek miktarlarda ifade edilen bir sitokindir (182). Kıkırdak doku otokrin (kendi kendini etkileyebilen) ve parakrin (yakınındaki hücre grubunu etkileyebilen) şekilde bazı yıkıcı molekülleri sentezlemekle beraber sinoviyal dokuda kıkırdağı yıkabilen bazı kemokinler ve metalloproteinazları da sentezlemektedir (183). Mekanik ve enzimatik olarak oluşan kıkırdak yıkım ürünleri sinoviyal hücrelerden hidrolitik enzimlerin ve kollajenazların salınımını uyarabilir (184). Sinoviyumdaki yeniden damarlanmanın sağlanmasında öncül damarlanma etkenleri salgılayan makrofajlar da rol alabilir (184, 185). Salgılanan bu etmenler endotelial hücreleri ve fibroblastları da uyarırlar ve sonuçta damarlanmayı teşvik eden VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor) ve diğer faktörlerin sentezi arttırılmış olur (184, 185). Kan damarı geçirgenliği ve adezyon moleküllerinin artışı yangısal yanıtı sürdüren damarlanmanın bir parçası olarak görülür (182). Sinoviyumda damarlanma kronik sinoviyosit ile yakından ilişkilidir ve OA'nın tüm aşamalarında meydana gelebilir (186).



Şekil 2. 7. OA'lı eklem şematize edilmiş işlevleri ile ilgili NF-κB uyarı ileti yolağı (187). Eklem bölgesinde NF-κB uyarı ileti yolağı kondrosit ve sinoviyosit hücrelerinde mekanik streslere veya sitokinlere (TNF-α) bağlı olarak uyarılır. Uyarılmanın sonucunda eklem hücreleri işlevsel özellik kazanarak muhtelif MMPs, ADAMTs, apoptotik moleküller (COX2, NO, PGE2), kemokinler (IL-8) ve sitokinleri (TNF-α, IL-1β, IL-6) sentezler ve bu moleküller kıkırdak yıkımı ile sinoviyum zarının yangılanması (sinoviyositis) ile ilgilidir. Ayrıca, kondrositler ve sinoviyositler tarafından salınan TNF-α, IL-1β, IL-6 osteoblastları uyararak sentezlenen RANKL ve sitokinler osteoklast aracılığıyla kemik erimesine yol açarlar. Sonuç olarak, NF-κB etkinliğinin sürmesi bazı kondrositlerin irileşmesine (hipertrofik) yol açar. Kondrositlerin rastgele irileşmesi COL10A1, MMP9, MMP13, VEGF, osteokalsin ve ADAMTS5'in artmış sentezleri ile ilgilidir (187).

2.1.9.4. Osteoartrit'te Uyarı İleti Yolakları

Eklem içi metabolik denge (homeostaz) uyarı yolları arasındaki çeşitli anabolik ve katabolik dengeye bağlıdır (121). Eklem bölgelerindeki uyarı mekanizmaları eklem kıkırdak ve subkondral kemiğin fenotipinin dayanıklı sağlam kalmasında, hücre dışı matriksin devamlılığında, kemik yenilenme sürecinin dengelenmesinde önemli rol oynar (130). Eklem bütünlüğünün muhafaza edilmesinde ve iç dengenin (homeostazın) sürdürülmesinde bir takım uyarı yollarının bir arada bulunduğu rapor edilmiştir (130). Bununla birlikte, bu uyarı mekanizmaları arasındaki çok küçük dengesizlik, OA

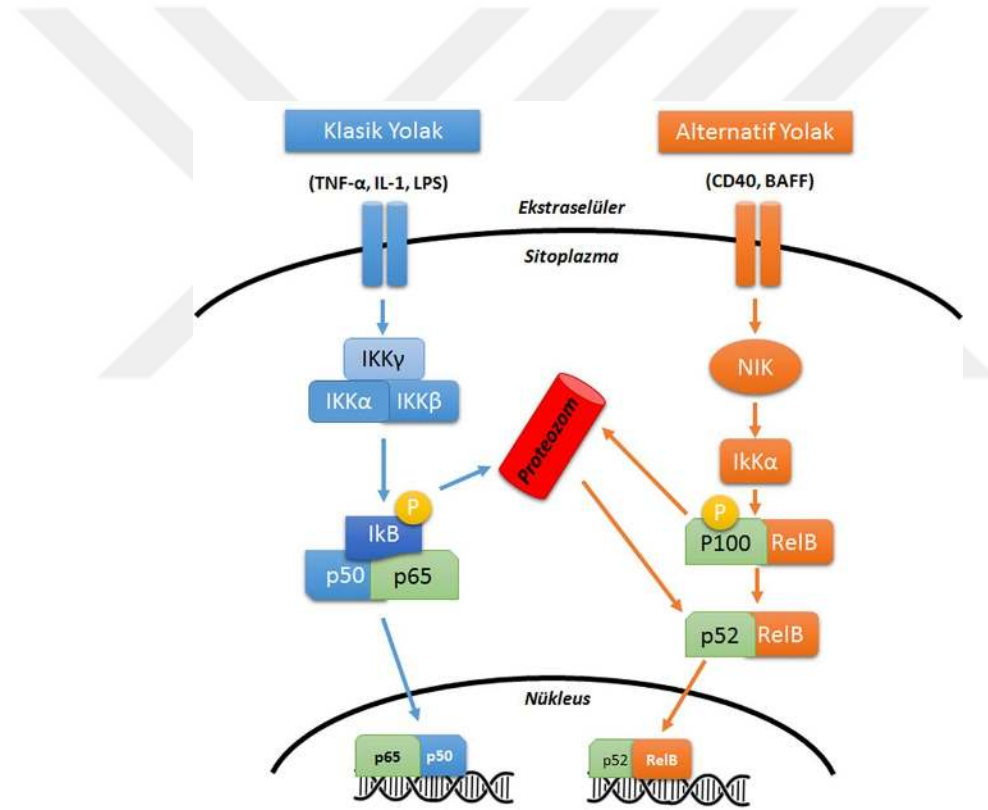
gelişimine katkı sağlayan kıkırdak kalitesinin bozulmasına ve SB'nin kalınlığında artışa neden olur (130).

2.1.9.4.1. NF-κB Uyarı-İleti Yolağı

NF-κB (nükleer faktör kappa B) bağışıklık, yangı, çoğalma, hücre ölümü ve gelişim gibi pek çok hücresel süreçte rol alan yazılım etmeni (transkripsiyon faktörü) ailesidir (188). Yangısal süreçler eklem hastalıklarında önemli rol oynamaktadır (189). Bu sebeple, pek çok *in vivo* ve *in vitro* çalışmada NF-κB uyarı yolağının osteoartrit hastalığının gelişimindeki rolü incelenmiştir (189). Memeli NF-κB ailesi 5 üyeden oluşur: Rel A (p65), Rel B, c-REL, NF-κB1 (p50 ve öncüsü p105) ve NF-κB2 (p52 ve öncüsü p100). Bu proteinler kendi özgül gen setlerini etkinleştirmek için çeşitli homodimerler (aynı ikileşme) ve heterodimerler (farklı ikileşme) oluştururlar. Ayrıca NF-κB ailesi proteinler; DNA bağlanması, ikileşme ve çekirdeğe göç etmede rol alan 300 amino asit uzunluğunda Rel homoloji (kökenden) bölgesi içermektedir (190). NF-κB proteinleri gen ifadesini artış yönünde düzenlerler ve uyarılmamış hücresel koşullarda sitoplazmada IκB (Inhibitory NF-κB proteins, durdurucu NF-κB proteinleri) proteinleri tarafından etkisiz olarak tutulurlar (191). NF-κB proteinlerinin etkinleşmesi, çeşitli kimyasal ve mekanik uyarıların hücreleri uyarması sonucu IKK'ların (IκB kinases, IκB [durdurucu NF-κB proteinleri] kinaz) IκB'yi fosforillemesi ile başlar (192). IκB proteinlerinin proteozomlar aracılığıyla yıkımından sonra NF-κB ikilileri serbestleşerek çekirdeğe göç eder. Çekirdeğe geçen NF-κB 150'den fazla genin ifadesini düzenler (193). RANKL, TNF-α, IL-1 gibi sitokinler, Lipopolisakkarid (LPS), Sfingomiyelinaz, Tax proteinleri gibi bakteriyel ve viral ürünler, Reaktif oksijen araçları (ROI), UV (Ultraviyole, Mor ötesi) ışığı, γ-ışınları gibi öncü apoptotik ve nekrotik etmenler NF-κB için güçlü uyarılardır (189, 192, 194, 195).

NF-κB uyarı ileti silsilesini etkinleştiren iki farklı yolak vardır (Şekil 2.7) (187). Bunlardan ilki TNF (Tümör Nekrozu Faktör), Toll-like veya T-hücre almaç aracılı klasik yolak olarak adlandırılır (187). Bu yolda IKKs (IKKα/IKKβ/IKKγ-NEMO [NF-κB Essential Modulator]) bileşimi tetiklenir ve bu bileşenin uyarılması ile de IκB moleküllerinin fosforilasyonu ve ubiquitin-proteozom sistemi aracılı yıkımı gerçekleşir (187). Öte yandan, diğer yolak BAFF-R (B-cell activating factor, B hücresi aktive edici faktör almaç, BAFF-R), CD-40 (Cluster of differentiation-40), veya LTB-R (Lymphotoxin beta receptor, Lenfotoksin beta almaç) uyarılmasını içerir (187). Bu

yolağın etkinleşmesi IKK α kinazları fosforilasyon aracılığıyla etkinleştiren NIK'a (NF- κ B Inducing Kinase, NF- κ B uyarıcı kinaz) bağlıdır (187). Bu aşamadan sonra IKK α , hedef genlerin yazılımını başlatabilen olgun RelB:p52 ikili proteininin salınımı için fosforilasyon bağımlı p100'ün parçalanmasını tetikler (187, 191, 196-198). NF- κ B etkinleşmesine yol açan mekanizmalar hakkında bildiklerimiz çoğunlukla onun etkinsizleştirilmesini düzenleyen mekanizmalar hakkında bildiklerimizden daha fazladır (187). NF- κ B yanıtının sonlanmasında kabul edilen iyi çalışmış mekanizma I κ B proteinlerinin sentezi ile ilgilidir (199). Aktifleşmiş NF- κ B tarafından uyarılan I κ B proteinleri yeniden sentezlenir. Yeni sentezlenen I κ B α , çekirdeğe girer ve NF- κ B moleküllerini DNA'dan ayırır ve sonrasında bu moleküllerin yeniden sitoplazmaya yerleşmesine imkân sağlar (200).



Şekil 2. 8. Klasik ve diğer NF- κ B etkinleştirme yolları (187). Klasik yolak TNF-R, TL-R, veya TC-R'ın ilgili uyarımları (ligands) ile birlikte etkinleştirilir. Klasik yolağın etkinleşmesi IKKs (IKK α /IKK β /IKK γ -NEMO) bileşeninin oluşumunu sağlar. Bu bileşen I κ B'nin ubiquitinleşmesini ve proteozom yoluyla parçalanmasını gerçekleştirir. I κ B'nin parçalanması ile birlikte p50/p65 farklı ikilemi gibi etkinleştirilmiş NF- κ B ikilemi çekirdeğe geçer ve ilgili hedef genlerin yazılımını (mRNA) uyarırlar. BAFF-R, CD40-R veya LT β -R ile tetiklenmiş diğer yolak ile IKK α kinaz etkinleşir ve Ub-proteozom yoluyla p100 proteininin işlenmesini ve işlevsel hale gelmesini sağlar. Ub-proteozom proteolitik yoluyla işlenmiş p100 (p52) molekülü, RelB molekülü ile birlikte farklı ikili

olarak nukleusa göç eder ve NF- κ B'nin düzenlediği hedef genlerin özendirici bölgelerine (promotor) bağlanarak mRNA'larını sentezler (187).

2.1.9.4.1.1. NF- κ B Etkinleşmesinin Eklem Kıkırdığındaki Rolü

Eklem yüzeyinde kıkırdak kaybı ile kendini gösteren kondrosit hücrelerindeki değişiklikler OA hastalığının gelişiminde etkin bir şekilde rol oynamaktadır. Kondrosit hücreleri yüzeylerinde TNF-R (Tumor Necrosis Factor Receptor), mekanik almaç, TL-R (Toll-like Receptor) gibi almaçları ifade ederler. OA'lı kondrositlerde, yaşlanma faktörleri, mekanik stres, TNF- α , IL-1 β gibi aracı moleküler bu almaçları etkinleştirerek NF- κ B uyarı yolağının etkinleşmesine yol açarlar (201). NF- κ B uyarı yolağı ya tek başına ya da diğer uyarı yolakları ile birlikte kondrosit hücrelerinin anabolik aktivitelerini baskılar. Sonuçta bu daha fazla yıkıcı durum azalmış hücre dışı matriks sentezi ile birlikte yıkım enzimlerinin (MMP ve agrekanaz gibi) artmış üretimi ile kendini gösterir (107, 108, 202) (Şekil 2.7). Ayrıca, Osteoartritte Matriks Mettalloproteazlar (MMP); IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α ve RANKL gibi çeşitli katabolik etkenler ile uyarılabilir. Bu sitokinler ve kemokinler hücre dışı matriks (proteoglikan, kollajen) sentezini azaltır ve NF- κ B'nin tetiklenmesine katkı sağlarlar (203). NF- κ B molekülleri OA'lı kondrositlerin apoptozunu, kıkırdak yangısını ve yıkıcı etkenlerin salınımını teşvik eden PGE2 (Prostaglandin E2), NO (Nitrik Oksit), NOS (Nitrik Oksit Sentetaz), COX2 (cyclooxygenase-2) gibi molekülleri uyarak kıkırdak hasarına katkı sağlar (204-207).

NF- κ B moleküllerinin uzun süreli etkinleşmesi HIF-2 α (Hypoxia-Inducible Factors), RUNX-2 (Runt-Related Transcription Factor 2) ve ELF-3 (ETS-Related Transcription Factor-3) gibi diğer bazı düzenleyici yazılım etmenlerini de etkiler (208, 209). IL-1, TNF- α ve LPS tarafından tetiklenen yangısal yanıtta ELF-3 merkezi bir aracı molekül olarak çalışır (210). ELF-3 kondrositlerde IL-1 aracılı tip II kollajenin baskılanmasından sorumludur ve IL-1 tarafından uyarılmış MMP-13 ifadesine katılır (211, 212). Böylelikle, NF- κ B proteinleri BMP2, IL-8, GRO- α (Growth Regulated Protein Alfa) ve GADD45- β (Growth Arrest and DNA-Damage-Inducible, Beta) moleküllerinin sentezini uyarır (213, 214). Ayrıca ELF-3 (ETS-related transcription factor-3) ve HIF-2 α yolağı ile birlikte tip X kollajen ifadesini, MMP9, MMP13, ALP, VEGF ve BGLAP sentezini uyarır (208, 215). OA'da yukarıda belirtilen metabolik değişikliklerin sonucunda osteofit oluşumu, kondrosit kalsifikasyonu, hacimsel artışı olan kondrosit fenotipi gözlenir (208, 215). ,

2.1.9.4.1.2. NF-κB Etkinleşmesinin Sinoviyumdaki Rolü

Sinoviyal zar (171) ya da sinoviyum 2 ya da 3 fibroblast benzeri sinoviyosit hücre tabakası ile az miktarda yangısal hücrelerden oluşan ince damarlı bir dokudur (5). Bu hücreler yoğun ve yağlayıcı bir sinoviyal sıvı salgırlar (5). Bu sıvı eklem kıkırdığı arasında sürtünmeyi azaltır, oksijeni ve besinleri kondrositlere taşır ve kıkırdaktan metabolik atıkları uzaklaştırır (5). OA ilerleyişi sırasında, SZ aynı zamanda eklem matriks yıkımına katkı sağlayan katabolik ve öncü yangı ürünlerini sentezler (5). Dolayısıyla osteoartritte, sinoviyal zardaki değişiklikler kıkırdak koruyucu etkenlerin azalmasına ve eklem matriksi hasarına katkı sağlayan etkenlerin artmasına neden olur (5, 183).

OA'lı eklemden yangının fizyolojisine katılan sitokin, kemokin ve adhezyon gibi molekülleri kodlayan pek çok gen NF-κB proteinleri tarafından düzenlenmektedir (201). Sinoviyal hücrelerde NF-κB etkinleşmesi kıkırdak kökenli matriks parçaları, sitokinler, stres gibi çeşitli uyarılar sayesinde gerçekleştirilir (216, 217). Sinoviyal hücreler yüzeylerindeki almaçlar aracılığıyla NF-κB yolağını etkinleştirirler (5, 218). Daha sonra uyarılmış NF-κB molekülleri kıkırdak yıkımına ve artmış sinoviosite neden olan çeşitli sitokin ve kemokinleri (IL-1β, IL-6, TNF-α, RANKL, IL-8), damarlanma etkenlerini (VEGF, FGF-b) ve yıkıcı enzimlerin (MMP1-13, ADAMTS4, ADAMTS5) salınımını uyarır (183).

2.1.9.4.1.3. NF-κB Etkinleşmesinin Subkondral kemikteki Rolü

Subkondral kemik eklem kıkırdığının altındaki epifiziyel kemik tabakasıdır (25). Osteoartrit gelişiminde eklem kıkırdığının yanı sıra subkondral kemik de kritik role sahiptir (219, 220). Kondrosit hücreleri kıkırdak dokusunun iç metabolik dengesini korurken osteoblast ve osteoklast hücreleri de SB'nin anabolik ve katabolik sürecinde rol almaktadır (120, 221). SB hücreleri ile eklem kıkırdığı hücreleri arasında yakın bir biyolojik iletişim söz konusudur (123, 222). Çeşitli sitokinler, büyüme etkenleri, prostaglandinler ve lökotrienler SB hücrelerinden özellikle osteoblastlardan sentezlenirler ve bu moleküller kıkırdak yıkımında rol alırlar (123, 223-226). Osteoartrit sürecinde osteoblast hücreleri normal olmayan metabolik işlevleri ile birlikte sentez ve salgıları da değişir (123, 223-226).

2.1.9.4.2. WNT Uyarı Yolağı

WNT (Wingless Type) uyarı yolağı organ gelişimi, erken gelişim evresi ve doku iç dengesindeki sürdürülmesinde önemli rol oynamaktadır (227). Fare ve insan çalışmalarında, farklı hücre içi uyarı silsilesini uyaran yapısal olarak glikoprotein ile ilişkili en az 19 grup olduğu gösterilmiştir. WNT yolağı klasik ve klasik olmayan yolak olarak sınıflandırılmıştır (228). GSK-3p ile β -katenin fosforilasyonunu baskılama ve daha sonra yıkıma uğratma yeteneğine bağlı yolak klasik yolak olarak adlandırılır, β -katenin yolağı dışındaki yolak ise klasik olmayan yolak olarak adlandırılır.

WNT uyarı yolağı iskelet gelişimi sırasında önemli rol oynamaktadır ve doğum sonrası dönemdeki sağlık ve hastalıkla ilişkili durumu iyi bir şekilde anlaşılmıştır (130, 229). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, WNT uyarı yolağının kırıkta, kemik ve eklem gelişiminde hayati rol oynadığı rapor edilmiştir (130, 229). Yapılan çalışmalarda, WNT uyarı yolağı kondrositlerde hücre ölümünü baskılayarak hücrenin hayatta kalmasını teşvik eden bir uyarı mekanizması olarak işlev gösterdiği vurgulanmaktadır (130, 230). Farklı çalışmalarda, WNT'nin aşırı ifadesi OA gibi hastalıklara yol açabilen kırıkta yıkımını uyardığı ifade edilmiştir (230). WNT uyarısındaki artışın kırıkta hasarına katkı sağlayan MMP ve agrekanazlar gibi katabolik etkenlerin uyarılmasını sağladığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (230).

Kondrosit gelişiminden başka, WNT uyarı yolağı kemik gelişimi ve iç katabolik dengesindeki muhafaza edilmesi içinde gereklidir (231). Artmış WNT uyarısı kemikte sklerozisi tetikleyebilir (232). OA sırasında SB'de kalınlaşmaya yol açan subkondral kabuk ve trabeküler kemikte aşırı bir yeniden modellenme söz konusudur (130). OA gelişiminde sklerotik SB'nin rolü olduğu bilinmektedir (130). Ancak bu konu henüz açıklık kazanmamıştır (130). Artmış mekanik yüklenme koşullarında kırıkta yıkımına bu durumun katkı sağlayabileceği öne sürülmüştür (130). SB ve kırıkta ile ilgili artan kanıtlar, WNT sinyal yolağının kemik-kırıkta biyomekanik biriminin etkinliğinin muhafaza edilmesinde önemli rol oynadığını göstermektedir (130).

Antagonistler (zıt etki yapan) ile WNT sinyal yolağının baskılanması, hem kırıkta hem de subkondral kemikte önemli değişikliklere neden olabilir (130). Bunlar; subkondral kemiğin yenilenme süresince değişiklikler ve kondrosit katabolik enzimlerinin ifadelerindeki değişikliklerdir (130). Farklı olarak, WNT uyarı agonistleri (tetikleyici etki

yapan) doğrudan kondrositlerde MMP ve agrekanaz gibi moleküllerin sentez ve salgılarını uyarak kırıldak yıkımını tetiklerler (130).

Sonuç olarak WNT uyarı yolağı kondrosit, osteoblast ve osteoklast fizyolojisinde etkin bir şekilde rol alır (130). Bu sebeple, WNT uyarı yolağı tedavi edici yaklaşımların geliştirilmesinde olası bir hedef olarak kullanılabilir (130, 233).

2.1.9.4.3. MAPK Uyarı Yolağı

Mitojen tetikleyici protein kinazlar (MAPK) tüm ökaryotik hücrelerde bulunan bir dizi serin treonin kinazdır. MAPK ailesi kinazların üç temel sınıf içerir; ERK (Extracellular Signal-Regulated Kinases), JNK (Stress-Activated Protein Kinases/c-Jun *N*-terminal Kinases) ve p38 kinazlar (130, 234). MAPK sinyal yolağı hem kırıldak hem de kemik biyolojisinde önemli rol oynar (234). Kondrosit oluşumu sırasında kondrositlerde tüm MAPK'ların etkinliği belirlenmiştir (234). Kondrosit oluşumu sırasında kırıldak nodül oluşum sürecini p38 ve ERK proteinleri düzenler (234). MAPK ailesi aynı zamanda kırıldak gelişiminde mekanik uyarıların iletilmesinde rol alır (235). MAPK ailesinin kemik biyolojisinde, özellikle kemik kütlesinin düzenlenmesinde önemli rol oynadığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (236). ERK sinyal yolağı RUNX2 ve ATF4 (Activating Transcription Factor 4) gibi anahtar yazılım etmenlerinin fosforilasyonu ile osteoblast farklılaşma sürecine aracılık etmektedir (236). Benzer şekilde p38'de osteoblast farklılaşmasını DLX5, osteriks, RUNX2'nin fosforilasyonu aracılığı ile teşvik eder. ERK, p38 ve JNK aracılığı AP1 (Activator Protein 1) işlevini düzenleyerek osteoklast farklılaşmasını teşvik eder (236). Ayrıca, kemik hücreleri ERK etkinleşmesi ile bağlayıcı hücre dışı matriks ve mekanik yüklenmeye yanıt verir (236). Böylelikle, MAPK ailesi OA gelişiminde rol aldığı öne sürülmektedir. Dahası, ERK ve p38 eklem kırığının yıkımına yol açan süreçlerde de rol oynadığı bilinmektedir (237). ERK ve p38'in her ikisinin etkinleşmesi MMP ifadesi ve etkinleşmesi için gereklidir (237). Oysa sadece ERK etkinleşmesi agrekanaz aracılığı kırıldak yıkımında gereklidir (237). Osteoblastlarda mekanik yüklenme ile uyarılma ERK etkinleşmesi aracılığı MMP-13 üretimi meydana gelir (238). Mekanik yüklenmeye tepki olarak SB osteoblastlarından MMP-13 üretiminin başlaması OA sırasında gözlenen kırıldak bozulmasını teşvik edebilir (238). OA eklem kondrositleri normal subkondral osteoblastlardaki osteokalsin, osteopontin, alkalen fosfataz ve RUNX2 gibi osteoblast farklılaşma belirteçlerini artırır (238). Oysa normal eklem kondrositleri farklılaşma sürecini geciktirir (238). OA'lı eklem

kondrositleri tarafından uyarılan normal subkondral osteoblastlardaki değişiklikler ERK fosforilasyonu aracılı gerçekleştiği yapılan çalışmalarda ifade edilmiştir (238).

Yapılan farklı bir çalışmada, OA'lı subkondral osteoblastlarda p38 uyarısının aşağı düzenlenmesi ve tetikleyici ERK uyarı etkinliği, eklem kondrositlerinde matriks kalsifikasyonunu ve hacimsel kondrosit artışının gen ifadesini uyardığı gösterilmiştir (239). ERK uyarı yolağının PD98059 ile baskılanması etkilenmiş kondrosit ve subkondral osteoblastlardaki ADAMTS ve MMP enzimlerinin aşırı ifadesini tersine döndürür (240). MMP ve ADAMTS enzimlerinin OA'lı eklemde anormal miktarlardaki ifadesi OA gelişiminde önemli rol oynamaktadır (240). Subkondral osteoblastlar ve eklem kondrositlerindeki karşılıklı uyarı mekanizmalarında meydana gelen değişikliklerin kıkırdak ve kemik dokusunun kritik özelliklerini etkilediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (240). Ayrıca, OA'lı eklem kıkırdağından ve subkondral kemikten salınan bilinmeyen diğer faktörler, ERK uyarı yolağının etkinleşmesi aracılığıyla MMP ve ADAMTS salınımına aracılık eder (240). Yukarıda belirtilen *in vitro* alışmalara göre, eklem kıkırdağı ve subkondral kemik arasında MAPK ailesinin aracı olarak görev aldığı anlaşılmaktadır (130).

PAR-2 (Proteinaz işlerlik kazandırdığı almaçlar, Proteinase activated receptors) 7-zar geçişli G-protein eşli almalardır (241). İşlerliği için proteoliz kesim işlemi serin proteazlar tarafından gerçekleştirilir (241). Osteoblastlar ve kondrositler hücre yüzeylerinde zar bağımlı PAR-2'yı sentezlerler (242, 243). OA'lı eklem kıkırdağı ve SB normale göre daha fazla PAR-2 sentezlerler (242, 243).

Yangı tetikleyici sitokinler IL-1 β , TNF α , TGF- β kıkırdakta PAR-2 sentezini arttırır (242). OA'lı kıkırdaklarda PAR-2 sentezinin artışının önemli katabolik ve MMP-1, MMP13, COX-2 gibi nyangı aracı moleküllerinin sentezini tetiklemesi ERK ve p38 uyarıcılarının yolaklarının iştiraki ile OA ilerlemesini hızlandırır (242). Aynı durum SB'de IL-1 β , TNF- α ve prostaglandin E2 varlığında osteoblastlarda gözlenmiştir (243). OA'lı subkondral osteoblast hücrelerinde PAR-2'nin etkinleşmesi MMP-1, MMP-9, RANKL ve IL-6 (OPG ve MMP13 hariç) gibi moleküllerin ifadelerindeki artış ile kemik erimesini de hızlandırır (243). PAR-2 etkinliği osteoblastlarda ERK ve JNK yolağının etkinleşmesine paralel olarak artar ancak p38 yolağının PAR-2 etkinliği ile ilişkisi görülmemektedir (243). PAR-2'nin MAPK yolağını tetiklemesi OA benzeri belirtileri

ortaya koyması sebebiyle, PAR-2 seviyesinin azaltılması OA'nın yavaşlatılmasında ve belirtilerinin azaltılmasında ümit verici olarak gözükmemektedir (130).

2.1.9.4.4. TGF- β /BMP Uyarı Yolu

TGF- β (The Transforming Growth Factor Beta, Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta) ve BMP (Bone Morphogenetic Protein, Kemik Morfojenik Protein) dahil olmak üzere sitokin TGF- β ailesi, embriyonik gelişim, yetişkin doku içi metabolik dengesinde ve çeşitli hastalıkların gelişiminde kritik bir rol oynamaktadır (130). BMP'ler kemiklerin yeniden modellenmesi ve hücre dışı matriks sentezinin düzenlenmesinde rol alan korunmuş proteinlerdir (130). BMP'nin uyarılması kemik uyarı sürecini düzenler ve endokondral kemik oluşumu için gerekli olarak kabul edilir (244). Kemik oluşumu sırasında bir ara aşama olarak, BMP kondrosit oluşumunun tüm aşamalarında rol alması beklenir (244). Kondrosit çoğalması ve matriks sentezi için BMP-2, 4 ve 5 gereklidir (245). Ayrıca, BMP-2'nin kondrosit oluşumu için gerekli olan SOX-9 (transcriptional factor sex determining region Y-box 9)'un etkinliğini ve ifadesini düzenlediği gösterilmiştir (246). BMP'ler güçlü bir osteojenik uyarıcıdır (246). *In vivo* ve *in vitro* da BMP'nin osteoblast ve osteoklast etkinliğini düzenleme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (247). Güncel çalışmalarda, GDF5 (Growth differentiation factor 5) BMP'nin uyarılmasında rol aldığı vurgulanmaktadır (248). Ayrıca, GDF5 yok edilmiş farelerde, azalmış SB yoğunluğu ve kemik kollajen liflerinin düzenlenmesinde bozukluk olduğu ifade edilmektedir (248).

2.2. UCMA

Son yıllarda, genom dizileme teknolojisinin gelişmesiyle birlikte, insan hastalıklarıyla ilişkili fenotiplerin ortaya çıkmasında yeni gen ürünlerinin katkılarına yönelik çalışmalar ilgi odağı haline gelmiştir (24, 249). Daha güçlü ve etkili bu dizileme teknikleri, özgül hücre ve doku tipine yönelik transkriptom (bir hücre veya dokudaki mRNA'ların tümü) analizine olanak sağladı (24, 249). Aynı zamanda, bu teknoloji hücre içi yolaklarda rol alan yeni moleküler hedeflerin tanımlanmasını ve bu moleküllerin hastalıklı ve sağlıklı durumdaki rollerinin belirlenmesini kolaylaştırdı (24, 249). Çalışmaların çoğu memelilerde geliştirilmiş olmasına rağmen, genetik ve normal olmayan değişikliklerin altında yatan mekanizmaların anlaşılmasında balıklar üzerinde yapılan çalışmalar değerli bir kaynak olarak kabul edilmiştir (24, 249).

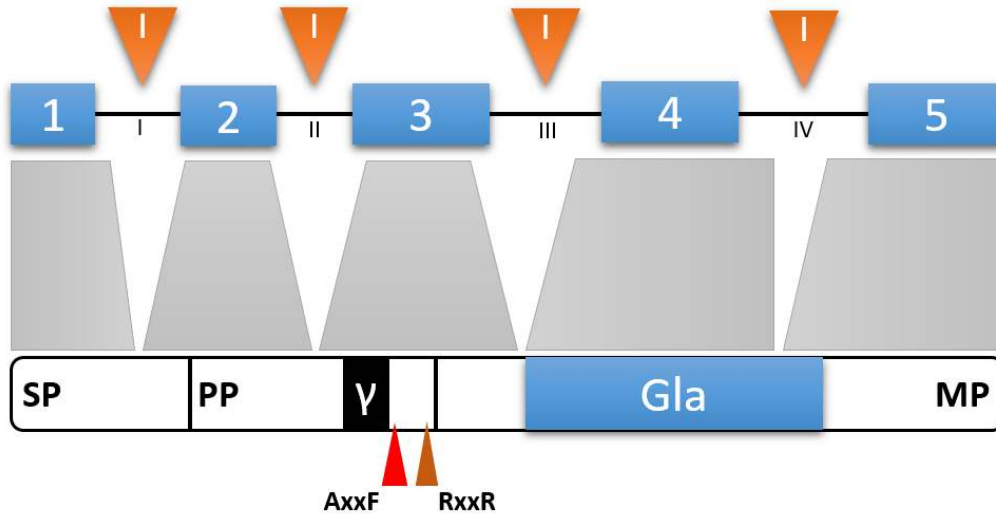
İlk kez '*Sturgeon (mersin balığı)*' balığının kalsifiye (kalsiyum içeren) kıkırdığında keşfedilen Gla (gamma-carboxyglutamate) rich protein (GRP, Gla-zengin protein) veya Upper Zone of Growth Plate and Cartilage Matrix Associated (UCMA, Büyüme tabakasının üst bölgesi ve kıkırdak matriksi ile ilişkili protein), K vitaminine bağımlı protein ailesinin en yeni üyelerinden birisidir. Kıkırdakta kalsiyum birikimi ile GRP veya UCMA'nın ilişkisi kalsiyum mineraline yüksek bağlanma eğilimi ve 16 Gla kalıntısı içeren bir protein oluşu ile ilgilidir (13, 20, 250).

2.2.1. UCMA Geni ve Protein Yapısı

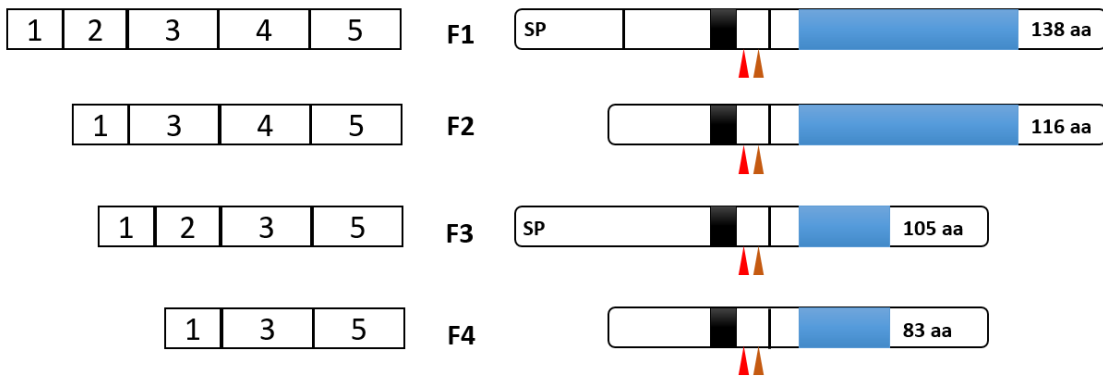
Omurgalı UCMA geni intronlar ile ayrılmış 5 ekzon içermektedir ve 135 amino asit uzunluğunda prepropeptid kodlamaktadır (13). UCMA geni insanda 10. kromozomda farede ise 2. kromozomda bulunmaktadır (13). İnsan ve *Sturgeon* balığında sırasıyla 15 ve 16 Gla kalıntısının varlığından dolayı GRP bu güne kadar tanımlanmış en yoğun gamma karboksillenmiş proteindir (13). Gla kalıntılarının çoğu 4. ekzon üzerinde bulunmaktadır (13).

UCMA'nın diğer önemli özellikleri; 1) propeptid üzerinde γ -karboksilaz için yerleşme bölgesi içerir; 2) propeptid üzerinde AxxF motifi içerir (bu bölge aynı zaman Matriks Gla proteinde de bulunan proteolitik ayrılma bölgesidir); 3) birçok bölgede kısmen sülfatlanmış tirozin kalıntıları içerir; 4) olgun peptid içerisinde halkalı çok alt birimli alan içerir (20, 24). UCMA'nın fosforilasyon, glikozilasyon gibi protein sentezi sonrası değişiklikleri ile ilgili herhangi bir ek bilgi yoktur. Ayrıca, UCMA'nın 3 boyutlu yapısı ile ilgili bilgiler henüz netlik kazanmamıştır (20, 24). UCMA Osteokalsin, MGP ve

pıhtılaşma faktörleri ile yakın bir ilişki içerisinde olabilir (20, 24). UCMA geninin ve protein yapısı şekil 2.9’da gösterilmiştir.



Şekil 2. 9. Omurgalı UCMA geninin ve protein yapısının şematik gösterimi (24). Gen yapısında 1-5 arasındaki ekzon bölgeleri mavi kutucuklar ile gösterilmektedir. İntron bölgeleri ise Romen rakamları ile siyah çizgi halinde gösterilmiştir. Protein yapısında ise Gla içeren bölge mavi kutucuk şeklinde gösterilmektedir. Kırmızı ve kahverengi üçgenler sırasıyla AxxF ve RxxR proteolitik ayrılma bölgelerini ifade etmektedir. γ ise γ-Glutamil karboksilazın yerleşme bölgesini göstermektedir. (*SP: Sinyal (uyarı-ileti) peptidi, PP: Propeptid, MP: Olgun Peptid) (24).



Şekil 2. 10. Gla kalıntısı içeren UCMA'nın dört değişik yapısının şematik gösterimi (24). Sol tarafta genin ekzonik yapıları ve sağ tarafta protein yapıları ve büyüklükleri her proteinin amino asit uzunlukları Gla kalıntısından sonra belirtilmiştir. Yapısal farklılık gösteren bu GRP proteinlerinden F1 çeşidi eksiksiz işlevsel tam bir protein, F2'de önder peptid dizisi olmadığından hücre içi (sitoplazmik), F3 çeşidi 4 bölgesini içermediği için Gla kalıntı dizilerini içermez ve kalsiyum bağlama özelliği yoktur. F4 çeşidi 2 ve 4 bölgesini içermeyen dolayısıyla önder peptid dizisinden ve Gla tekrar dizi kalıntılarından yoksun sitoplazmik protein olup işlevi hakkında henüz çalışmalar mevcut değildir (24).

2.2.2. UCMA Gen İfade Düzeyleri

UCMA'nın gen ifade bölgeleri ve seviyeleri çeşitli omurgalı türlerinin gelişimi sırasında ve yetişkin doku türlerinde belirlenmiştir (24). *Sturgeon* (Mersin balığı) ve *Zebrafish* (*Zebra balığı*) üzerinde yapılan çalışmalarda, UCMA'nın tüm dokularda ifade edildiği ve en yüksek seviyede ifade edildiği bölgelerin ise kıkırdak dokusu olduğu gözlenmiştir (Tablo 2.6) (24). *Sturgeon* balığında, omurga ve alt çene kemiğinin olgun veya olgun olmayan kondrositlerinde ve notokord'un (sırt ipliğinin) kondroblastlarında UCMA'nın ifadesi *in situ* hibridizasyon yöntemi ile gösterilmiştir (13).

Zebra balığı üzerinde yapılan çalışmalarda, her bir genin farklı düzenleyici yollarla ilişkisinden dolayı UCMA paraloglarının (işlevleri farklılaşmış benzer genler) zaman farklı gen ifade düzenine sahip olduğu görülmüştür (251, 252). Bu genlerin ifade düzeyleri arasında ters bir ilişki olduğu belirtilmiştir. UCMA-1 (GRP-1, UCMAa) gelişimin erken döneminde ifade edilirken UCMA-2 (GRP-2, UCMAb) ifadesi daha yavaş gelişmekle beraber daha ileri larval ve ergenlik döneminde artmaktadır ve yetişkin dokuda daha baskın durumda olduğu görülmüştür (20).

Farelerde UCMA transkriptleri ilk defa *in situ* hibridizasyon yöntemi ile fetüs omurgasında belirlenmiştir (20). Yetişkin farelerde, UCMA transkriptleri kemik-kıkırdak ara yüzüne yakın büyüme plağı kıkırdağında gözlenmiştir (253). Yine yapılan çalışmalarda işlenmiş UCMA'nın kıkırdak matriks içerisinde yer aldığı vurgulanmıştır (13). Böylelikle sıçanlarda, omurga, femur (uyluk kemiği), kaburga ve kuyruk hacmi genişlemiş kondrositlerinde UCMA transkripti belirlenmiştir (13). UCMA ve MGP'nin karşılaştırmalı gen ifade analizinde, MGP'nin olgun olmayan, etkin çoğalma gösteren ve hacimce genişlemiş kondrositler gibi daha sınırlanmış bölgelerde ifade olduğu, UCMA ifadesinin ise tüm kondrosit tiplerinde geniş bir dağılım gösterdiği tespit edilmiştir (13). Mevcut veriler ışığında UCMA'nın kondrositlerle ilişkili olarak olası bir işlevinin olduğu söylenebilir (13). Ayrıca, UCMA ifadesi osteoblast, osteosit gibi diğer iskelet hücre tiplerinde belirlenmiştir (13). UCMA'nın farklı evrelere ait ifade düzeni çeşitli *in vitro* hücre sistemlerinde de analiz edilmiştir (Tablo 2.7) (24).

Tablo 2. 6. UCMA geninin ifade edildiği bölgeler (24).

Doku	Orijin	Hücre tipi	Yöntem	Referans
Fetal büyüme plağı kırırdağı	İnsan	Kondrosit	cDNA sekanslama	(250)
Fetal uzuvlar	Fare	Henüz tanımlanmamış	NB	(250)
Fetal kafatası ve iskelet elemanları	Fare	Henüz tanımlanmamış	NB	(250)
Gelişen kırırdağ	Fare	Distal kondrosit, Gelişen epifiz	ISH, IHC	(20, 250, 254)
Epifizel kırırdağ	Fare	Kondrosit	ISH, IHC, qPCR, Xgal	(20, 254) (253)
Tiroid, Trakea (Soluk borusu)	Fare	Henüz tanımlanmamış	Xgal	(253)
Alt çene kemiği	Sturgeon balığı	Kondroblast, kondrosit	qPCR, ISH	(13)
Embriyo	Zebrafish	GRP1 (UCMAa) notokord ve kranio-fasiyal kırırdağlı yapılar GRP2 (UCMAb) Trabeküler kırırdağ,	ISH	(251)
Gelişmekte olan balıklar	Zebrafish		qPCR	(255)
Yetişkin	Zebrafish	GRP2>GRP1 tüm dokularda ekspresyon analizinde durum,	qPCR	(255)
Damar sistemi	Sıçan, İnsan	Vasküler düz kas hücreleri	qPCR, IHC, ISH	(13, 256)
Deri ve uzantıları	Sıçan ve İnsan	Epidermis, Dermis, Fibroblast, kıl folikülü, bez yapıları	qPCR, IHC, ISH	(13, 256)
Kaburga	Sıçan	Kondrosit, osteoblast, osteosit	qPCR, IHC, ISH	(13)
Dış kulak	Sıçan	Elastik kırırdağın kondrositleri, Deri ve uzantıları,	qPCR, IHC, ISH	(13, 256)
Tırnak	Sıçan	Kondrosit, osteosit	qPCR, IHC, ISH	(13, 256)
Burun	Sıçan	Elastik kırırdağın kondrositleri, deri ve uzantıları	qPCR, IHC, ISH	(256)

*qPCR: Kantitatif (niceleyici) PCR, ISH: In Situ Hibridizasyon, IHC: İmmünohistokimya, NB: Northern Blot, Xgal: X-gal boyama.

Tablo 2. 7. Çeşitli *in vitro* sistemlerde UCMA'nın ifade düzeni (24).

Sistem	Tür, Adlandırma	Hücre Tipi	İfade Düzeyleri	Referans
Hücre dizileri	ATDC5 (Fare)	Kondrosit	++	(20, 250)
	MC615 (Fare)	Kondrosit	++++	(20)
	C3H10T (Fare)	Fibroblast	-	(20)
	C2C12 (Fare)	Miyoblast	-	(20)
	MC3T3-E1 (Fare)	Pre-osteoblast	+	(20)
	NIH3T3 (Fare)	Fibroblast	+	(20)
Primer hücre kültürleri	RC (Fare)	Kaburga kondrositleri	++++	(20)
	CC (Fare)	Kafatası Osteoblastları	++	(20)
	RZ (Sığır)	Epifizel Kondrosit	++	(20)
	HZ (Sığır)	Epifizel Kondrosit	-	(20)
	BAA1F (Sturgeon)	Omurlardan türevlenen hücreler	+++	(257)
	Van2H (Sturgeon)	Brakiyal arklardan türevlenen hücreler	+++	(257)
	E11.5 (Fare)	Fetal uzuvlardaki farklılaşmamış hücreler	-	(258)
	E11.5 (Fare)	Gelişimsel kıkırdak hücreleri	+++	(258)
	E18.5 (Fare)	Kondrosit	+++	(258)

UCMA ifadesi farklılaşmanın erken aşamalarında yüksek seviyede olmasına rağmen çoğalma aşamasında azalmakta, hacimce genişlemiş kondrositlerde ise neredeyse gözden kaybolmaktadır (20, 24). Ayrıca UCMA'nın tip II kollajen (COL2) ifadesi ile paralellik gösterirken, tip X kollajen (COL10) ile ters orantılı olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür (20, 24). Böylelikle, eldeki verilere dayanarak UCMA'nın kondrosit farklılaşmasında uygun bir belirteç olabileceğini söyleyebiliriz (250, 259). Ek olarak, UCMA transkriptlerinin sıçan ve insanın bazı dokularında (deri, kan damarı, serum) varlığı tespit edilmiştir (256). Elde edilen veriler kondrositlerin UCMA'nın fazlaca ifade edildiği bölgelerden biri olduğunu gösterse de UCMA'nın sadece kıkırdağa özgül bir protein olmadığı anlaşılmıştır (24).

2.2.3. UCMA Gen İfadesinin Düzenlenmesi

UCMA'nın gen ifadesinin düzenlenmesi ile ilgili bilgiler oldukça azdır. UCMA geninin Kemik Morfojenik Protein 2 (BMP2) ve Dönüştürücü Büyüme Faktörü- β 1 (TGF- β 1)'nin

maruziyeti ile baskılandığı gösterilmiştir (20, 259). Bununla birlikte, UCMA'nın doğrudan yazılımsal (transkripsiyonel) düzenlemesi ile ilgili herhangi bir bilgi yoktur.

2.2.4. UCMA'nın Moleküler İşlevi ve Fizyolojik Rolü

UCMA'nın moleküler işlevi henüz tam olarak bilinmemektedir (20, 24). UCMA'nın kalsiyum iyonlarına yüksek bağlanma ilgisi fazlaca Gla kalıntısı içeren bölgesinden kaynaklanır (20, 24). Ayrıca, UCMA'nın hastalıklı kalsifikasyon (kalsiyum içeren) bölgelerinde birikmesi, onun kalsiyum kullanılabilirliğinde düzenleyici işlevi olabileceğini göstermektedir (20, 24). UCMA'nın fibriller tip II, V, IX ve XI kollajenlerle (tip I yok) ilişkisinden dolayı, UCMA'nın kıkırdak matriksinin sağlamlaştırılmasında, düzenlenmesinde ve kıkırdak oluşumunda rol alabileceği düşünülmektedir (20, 24). Preosteoblast (MC3T3-E1) hücre hattı ve fare birincil kafatası kemiği hücrelerindeki UCMA'nın olumsuz etkisine dayanarak bu molekülün kemik oluşumunda durdurucu olarak işlev gösterebileceği söylenebilir (20, 24).

2.2.5. UCMA'nın Genomik Çeşitliliği (Varyantları) ve Transkriptleri

Özgün UCMA transkriptlerine ek olarak, farelerde ve daha sonra zebra balığında 2. ekzonun (sinyal/önder peptidi kodlar) veya 4.ekzonun (Gla parçasının çoğunu kodlar) olmadığı 3 varyant daha belirlenmiştir (Şekil 2.10) (251, 252, 259). Farelerde F2 ve F4 varyantları 2. ekzonu içermezler ve böylelikle işlevsel önder peptidi salgılanmaz ve bu varyantlar hücre içerisinde birikirler (259). UCMA varyantlarının biyolojik önemi tam olarak aydınlatılamamıştır (259). UCMA/GRP-F1 benzer formunun (tam protein) kıkırdak oluşumu sırasında tam olarak ifade edildiği gösterilmiştir (259). Oysa GRP-F3 (Gla parçası eksik) benzer formunun ise kondrositlerin olgunlaşması sırasında hızlıca ifade edildiği bilinmektedir (259). Buna göre, Gla kalıntılarının sayılarındaki farklılıklar UCMA'nın ifade edildiği bölgelerde işlevinin düzenlenmesine katkı sağlayabilir.

2.2.6. UCMA ile İlişkili Hastalıklar

UCMA'nın farklı hastalıklarda normal yerinin dışında (ektopik) kalsifikasyon (kalsiyum içeren) bölgelerinde biriktiği gösterilmiştir (Tablo 2.8) (13, 256). Ayrıca, UCMA sağlıklı meme bezi dokusunda da tespit edilmiştir ve onun bu dokuda birikiminin meme kanserinin birkaç tipinde büyük ölçüde arttığı gösterilmiştir (260, 261). UCMA'nın yapısında çok sayıda Gla kalıntısının varlığı muhtemelen onun kalsiyum içeren bölgelerde birikmesini teşvik eder (261). Ancak bu yerleşim ile UCMA'nın işlevi

arasındaki ilişki henüz açıklığa kavuşmuş değildir (261). Ayrıca gerek dolaşımında gerekse doku bozukluğu (lezyon) bölgesine sızmış kan hücrelerinde UCMA'nın varlığı tespit edilmiştir (261). Yapılan bu çalışmalara göre, normal yerinin dışında (ektopik) kalsifikasyon gösteren insan hastalıklarındaki yangısal süreçlerde UCMA'nın rol alabileceği söylenebilir (262, 263). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, OA ilişkili dokularda UCMA'nın ifadesi de incelenmiştir (262, 263). Bu araştırmaların bir kısmı UCMA'nın rolü ile ilgili net bilgiler ortaya koyamamaktadır (262, 263). Ancak yapılan bir çalışmada, UCMA'nın anormal ifadesi ile OA arasında bir ilişki olabileceği vurgulanmaktadır (66).

Tablo 2. 8. Hastalıklı koşullarda UCMA protein birikim bölgeleri (24).

Doku	Köken	UCMA İfade Eden Hücre Tipleri	Yöntem	Referans
Dermatomiyozit (iltihaplı kas romatizmalarından biri)	İnsan	Kalsifiye (kalsiyum içeren) insan derisi	IHC	(256)
Yara izi	İnsan	Kalsifiye (Kalsiyum içeren) yara izi içeren doku	IHC	(256)
Kronik (Uzun süreli) Böbrek hastalığı	İnsan	Kalsifiye (Kalsiyum içeren) arterler	IHC	(256)
Cerrahi OA fare modeli	Fare	Diz eklem dokuları	Mikroarray	(264)

*IHC: immünohistokimya

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü Deneyleri

Bu tez çalışmasında, SV40 büyük T antijeni ile transfeke edilmiş hFOB1.19 (American Type Culture Collection, Manassas, VA 20108, USA) insan kemik osteoblast hücre hattı kullanılmıştır. Hücre kültürü deneyleri sırasında kullanılan bazı malzemeler aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Tablo 3. 1. Hücre kültürü malzemeleri

Kullanılan Malzeme	Marka	Katalog No
HFOB1.19 Hücre hattı	ATCC®	CRL-11372™
IL-1 β	R&D Systems	201-LB
HBSS	İnvitrogen	14175-053
DMEM/F12	İnvitrogen	21041-025
FBS	İnvitrogen	10270106
Trypsin EDTA (1X)	İnvitrogen	R-001-100
G418, disulfat salt powder bioreagent	Sigma	A1720-1G
Trypan Blue	Sigma	T6146-5G
Cryotube	Thermo	375418

3.1.1. Hücre Kültür Vasatının Hazırlanması

hFOB1.19 hücreleri için DMEM:F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium / Nutrient Mixture / F-12) ile hazırlanan kültür vasatı kullanıldı.

Kültür Vasatının Hazırlanması

DMEM:F12	500 ml
Fötal Sığır Serum	50 ml (%10)
G418	150 mg

Serumsuz Vasat Hazırlanması

DMEM:F12	500 ml
G418	150 mg

3.1.2. hFOB1.19 Hücrelerinin Kaldırılması

Hücreler % 10 oranında fetal sığır serumu (Fetal bovine serum) ve G418 içeren DMEM-F12 (Dulbecco's modified eagle's medium) besi yerinde, % 5 CO₂, % 95 nem ve 34 °C sıcaklık sağlayan karbondioksit inkübatöründe kültüre edilmiştir. Kültür vasatı haftada iki kez değiştirildi ve hücreler yeterli sayıya ulaştıklarında deneylerde kullanıldı. Çoğaltılan hücreler kabin içerisine alındıktan sonra hücre kültür kaplarındaki DMEM:F12 vasatı vakum ile çekildi. Hücrelerin üzerine 5 ml HBSS'e (Hank's Balanced Salt Solution, Gibco, Invitrogen) eklenerek hücreler yıkandı. Hücrelerin üzerine seyreltilmiş 1X'lik Trypsin-EDTA karışımı (Gibco, Invitrogen, 25300) eklenip, 37 °C' de 3-5 dakika kadar beklendi. Hücrelerin kalkıp kalkmadığı mikroskopta kontrol edildi. Hücreler kalktıktan sonra Trypsini etkisizleştirmek için hücre kültür kabına %10 FCS içeren kültür vasatı eklendi. Kültür kabındaki hücreler steril santrifüj tüpüne alınarak 1500 rpm'de ve 5 dakika santrifüj yapıldı.

3.1.3. hFOB1.19 Hücrelerinin Sayılması

Zar yapısı bozulmamış canlı hücreler Trypan mavisi boyasını geçirmezler ancak ölü hücrelerde zar yapısı bozulduğu için boyayı geçirirler. Bu yöntemde hücre süspansiyonu Trypan mavisi boyası ile karıştırılır ve daha sonra hücrelerin mikroskopta boyayı alıp almadığı kontrol edilir. Canlı hücreler parlak ve temiz bir sitoplazmaya sahipken ölü hücreler mavi sitoplazmalı olarak görülmektedir.

Santrifüj işleminin ardından kabin içerisinde üst faz uzaklaştırıldı ve tüpün alt kısmında kalan hücreler tüpün kenarlarına yavaşça vurularak homojen hale getirildi ve üzerine 5 ml kültür vasatı eklendi. Hücre sayımı için aşağıdaki karışım hazırlandı.

Hücre süspansiyonu	20µl
%0,5'lik Trypan-mavisi (Sigma-Aldrich, T6146)	20 µl
Hücre kültür vasatı	160 µl

Hazırlanan bu karışım Thoma Lamına aktarılarak birim alandaki hücreler sayıldı.

3.1.4. hFOB1.19 Ekimi ve Hücrelerin Serumsuz Besi Ortamına (SF'e) Alınması

Sayılan hücreler 5000 hücre/ml olacak şekilde hücre vasatına eklendi. Daha sonra hFOB1.19 hücreleri 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. Hücreler yaklaşık 72 saat inkübatörde bekletildi. Hücreler, kültür kabının %80'inini kapladıktan sonra kültür kaplarındaki hücre vasatı vakumla çekilerek SF ile yıkandıktan sonra her bir kuyucuğa 2.7 ml SF konularak 24 saat inkübatörde bekletildi.

3.1.5. hFOB1.19 Hücrelerinin IL-1 β ile Uyarılması

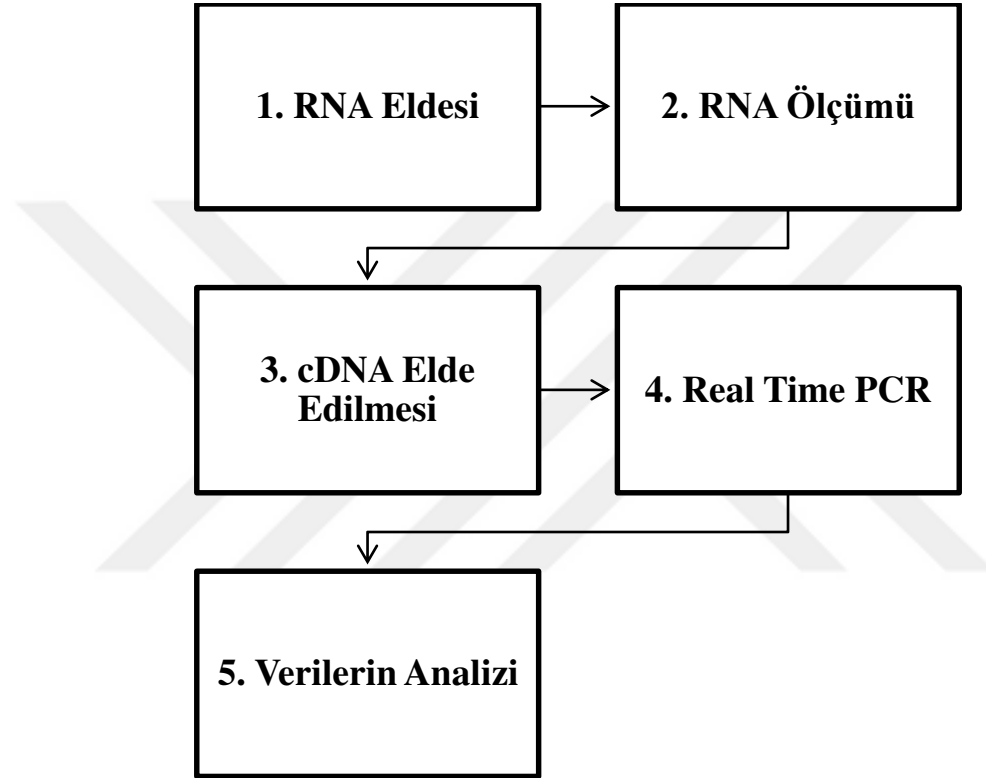
SF uygulamasından sonra hücreler IL-1 β (R&D Systems, 201-LB) ile uyarıldı. IL-1 β , % 0.1 sığır serum albümini içeren PBS içerisinde 25 μ g/ml olacak şekilde hazırlandı. Daha sonra, hücreler SF içerisinde hazırlanmış IL-1 β 'ya farklı doz ve sürelerde (5 ng/ml ve 10 ng/ml, 48 ve 72 saat) maruz bırakıldı. Deney sürelerinin sonunda kültür kaplarındaki süpernatantlar ELİSA deneylerinde kullanılmak üzere 1.5 veya 2 ml'lik Eppendorf mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Kültür kaplarındaki hücrelerden ise RNA eldesi ve Protein eldesi gerçekleştirildi.

Tablo 3. 2. Deney tasarımı. hFOB1.19 hücre hattı kültür kaplarına ekildikten sonra farklı doz (5-10 ng/ml) ve sürelerde (48 ve 72 saat) IL-1 β 'ya maruz bırakıldı. Aşağıdaki tabloda ifade edildiği gibi Deney grubu 1'de hücreler farklı sürelerde 5 ng/ml IL-1 β ile, Deney grubu 2'de ise farklı sürelerde 10 ng/ml IL-1 β ile uyarılmıştır.

Deney Grupları	Kontrol Grubu	Deney grubu 1	Deney grubu 2
Yapılan Uygulama	Uygulama yok	5 ng/ml dozunda IL-1 β ile 48 saat boyunca hücreler uyarıldı.	10 ng/ml dozunda IL-1 β ile 48 saat boyunca hücreler uyarıldı
	Uygulama yok	5 ng/ml dozunda IL-1 β ile 72 saat boyunca hücreler uyarıldı	10 ng/ml dozunda IL-1 β ile 72 saat boyunca hücreler uyarıldı

3.2. Eş Zamanlı PCR (Real Time-Polymerase Chain Reaction) ile Gen İfade Analizleri

Hücre kültürü deneyleri sonunda öncelikle RNA eldesi gerçekleştirilerek gen ifadesi analizlerine devam edildi. Gen ifade analizleri için iş akışı Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Ayrıca, bu yöntemde kullanılan bazı laboratuvar malzemeleri aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.



Şekil 3. 1. Gen ifade analizleri iş akışı gösterimi. Tüm genlerin ifade analizi 5 aşamada gerçekleştirilmiştir. Hücre kültür deneylerinin sonunda hücrelerden toplam RNA eldesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA’larda kalite ve miktar tayini spektrofotometrik olarak yapılmıştır. Daha sonra RNA hesaplaması yapılarak seyreltme işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA’lardan cDNA sentezi üretici firmanın protokolüne göre yapılmıştır. Sybr Green boyası ile gen ifade analizi Real Time PCR yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Verilerin analizi ise QIAGEN’in çevrimiçi sitesi (DATA Analysis Center) aracılığıyla gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3. 3. Gen ifade analizlerinde kullanılan malzemeler

Kullanılan Malzeme & Cihaz	Marka	Katalog No
miRNeasy kit	Qiagen	217004
RT ² HT First Strand Kit	Qiagen	330411
RT ² Sybr Green qPCR Mastermixes	Qiagen	330503
RT ² Tüp ve kapakları	Qiagen	981103
Nükleaz Free Water	Qiagen	129115
Real Time Cihazı	Rotor-gene	
Multiskan Go Spektrofotometresi	Thermo Scientific	

3.2.1. RNA Eldesi

Hücre kültürü deneylerinin sonunda toplam RNA eldesi miRNeasy Mini Kit (Katalog no: 217004, QIAGEN, Almanya) kullanılarak yapılmıştır. Toplam RNA eldesi üretici firmanın önerdiği protokol doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. RNA eldesi protokolü şöyledir;

1. 6 kuyucuklu kültür kaplarında ekilen hücreler 48 ve 72 saatlik inkübasyondan sonra tripsinle muamele edilerek 15 ml'lik Falcon tüplere alındı ve 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Daha sonra üst kısım (supernatant) uzaklaştırıldı ve alt kısım (pellet) üzerine 700 µl QIAzol Lysis Reagent eklendi ve pelletin homojen olarak dağılması sağlandı.
2. Elde edilen homejenat 2 ml'lik Eppendorf mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve oda ısısında 5 dakika inkübe edildi ve üzerine 140 µl kloroform eklendi ve kuvvetlice çalkalandı. Daha sonra karışım oda ısısında 2-3 dakika bekletildi.
3. Bu karışım +4 °C'de 12,000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi. Daha sonra üst faz yeni bir toplama tüpüne aktarıldı.
4. Numunenin 1,5 katı % 100 etanol (Genellikle 525 µl) eklendi ve pipetle köpükleştirilmeden çekme boşaltma yoluyla iyice karıştırıldı.
5. 2 ml'lik toplama tüpü içerisindeki RNeasy Mini kolona içine hiç bir çökelti içermeyen 700 µl örnek pipetlendi. Ardından kapak kapatıldı ve oda sıcaklığında 15-20 saniye 8000 g'de santrifüj yapıldı. Toplama tüpünde biriken kalıntı atıldı. Örneğin kalan miktarı içinde bu adım tekrarlandı.
6. Temiz bir toplama tüpüne alınan RNeasy Mini kolona 700 µl RWT tampon eklendi ve oda sıcaklığında 15-20 saniye boyunca 8000 g'de santrifüj yapıldı ve toplama tüpünde biriken kısım akış yönü atıldı.

7. Temiz bir toplama tüpüne alınan RNeasy Mini kolon üzerine 500 µl RPE tampon pipetlendi ve oda sıcaklığında 15-20 saniye boyunca 8000 g’de santrifüj yapıldı. Toplama tüpünde altta toplanan sıvı kısım atıldı.
8. Temiz bir toplama tüpüne alınan RNeasy Mini kolon üzerine 500 µl RPE tampon pipetlendi ve bu sefer bir önceki aşamadan farklı olarak oda sıcaklığında 2 dakika boyunca 8000 g’de santrifüj yapıldı. Toplama tüpünde altta toplanan sıvı kısım atıldı.
9. RNeasy mini kolon yeni 1.5 ml’lik toplama tüpüne aktarıldı ve üzerine doğrudan 30–50 µl RNase-içermeyen su eklendi ve 1 dakika beklendi. Daha sonra 1 dakika boyunca 8000 g’de santrifüj yapıldı. RNase-içermeyen su 20 µl olacak şekilde bu adım tekrarlandı. Toplama tüpünde biriken sıvı total RNA’yı içermektedir.

3.2.2. RNA Ölçümü

Elde edilen RNA’lar kalite ve miktar tayini için Thermo Scientific, MultiskanGo cihazı ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. Daha sonra, RNA’lar seyreltilerek 50 ng derişiklikte sabitlendi ve RNA’lar -80 °C’ de saklandı.

3.2.3. cDNA Elde Edilmesi

Tamamlayıcı DNA (complementary DNA, cDNA) sentezi QIAGEN RT² HT First Strand Kit (Katalog no: 330411, QIAGEN, Almanya) kullanılarak yapıldı. cDNA sentezi üretici firmanın önerdiği protokole göre yapılmıştır. cDNA sentezi reaksiyonu aşağıdaki gibi hazırlandı.

Tablo 3. 4. cDNA sentezinde kullanılan karışım

Bileşen	Miktar
BC4	6 µl
RNase free Water	4 µl
RNA (50 ng’a seyreltilmiş)	10 µl

BC4 ve RNase Free Water (RNaz içermeyen su) miktarları örnek sayısına göre belirlendi ve bir tüpte hazırlanan karışımdan 10 µl alınarak ayrı ayrı 0.2 lik PCR tüplerine aktarıldı. Daha sonra her tüpe 10 µl RNA eklendi. Böylelikle reaksiyon için son hacim 20 µl oldu.

Tablo 3. 5. cDNA sentezi için sıcaklık döngüleri

Sıcaklık	Süre
42 °C	15 dakika
95 °C	5 dakika
4 °C	∞

Reaksiyon sonrası cDNA örnekleri üzerine 90 µl Nükleaz içermeyen su eklenerek sulandırıldı. Elde edilen cDNA'lar qRT-PCR analizleri yapılınca kadar -20 °C de saklandı.

3.2.4. Real Time PCR

Aşağıdaki tabloda (Tablo 3.6) belirtilen genlerin ifade analizleri qRT-PCR yöntemiyle Rotor Gene 600 cihazı (QIAGEN Rotor-Gene Q) kullanılarak yapıldı. Gen ifade analizleri için SYBR Green qPCR Mastermix (QIAGEN, RT² SYBR Green qPCR Mastermix, USA) kiti kullanıldı.

Tablo 3. 6. qRT-PCR reaksiyon karışımı.

Bileşen	Miktar
Mix	7.5 µl
Primer	0.6 µl
Rnase Free Water	3.9 µl
cDNA	3 µl

Reaksiyonun toplam hacmi 15 µl olacak şekilde (12 µl qRT-PCR karışımı + 3 µl cDNA) reaksiyon tüplerine aktarıldı. Döngü sayısı 40 olarak belirlenmiştir. Reaksiyon koşulları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

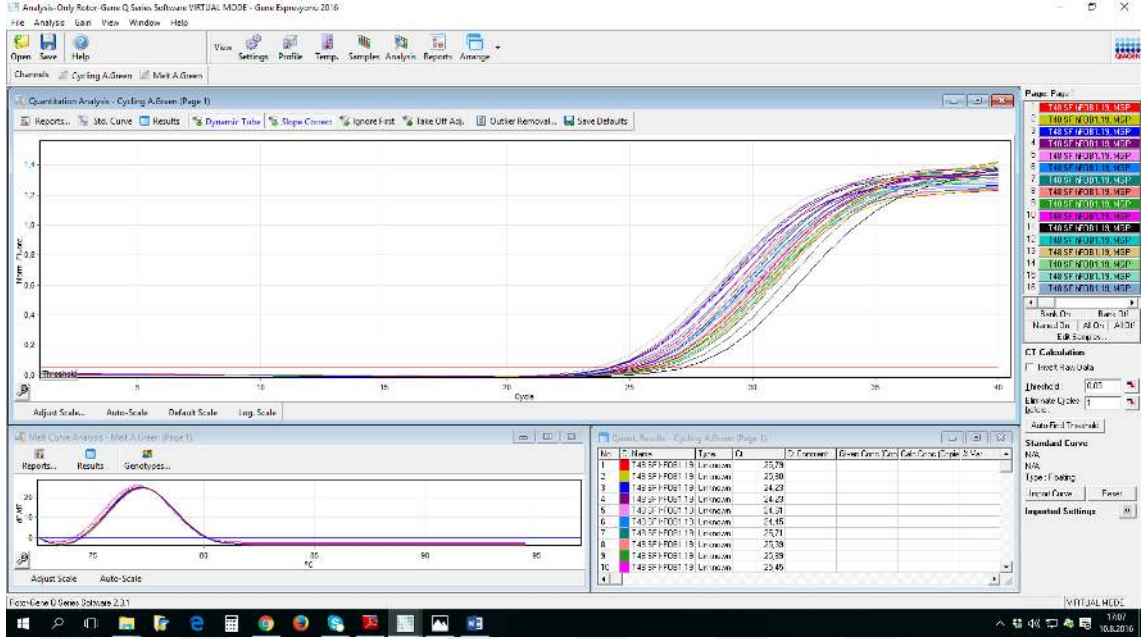
Gen ifade analizinde kullanılan primerler QIAGEN firmasından hazır olarak satın alınmıştır.

Tablo 3. 7. qRT-PCR için reaksiyon koşulları

Sıcaklık	Süre
95 °C (Başlangıç sıcaklığı)	10 dakika
95 °C (döngü)	15 saniye
60 °C (döngü)	1 dakika

Tablo 3. 8. Çalışmaya dahil edilen genlerin listesi

	Gen	Açık Adı	İşlevi
1	UCMA	Upper Zone of Growth Plate and Cartilage Matrix Associated	Henüz tam olarak anlaşılmamakla beraber enflamasyon ve kalsifikasyonla ilişkili
2	MGP	Matrix Gla Protein	Henüz tam olarak anlaşılmamış
3	NF- κ B	Nuclear Factor kappa B	Enflamatuvar süreçler
4	BGLAP	Bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein, Osteoklasın	ECM kalsifikasyonunda
5	SPP1	Secreted Phosphoprotein 1, Osteopontin	Ekstraselüler yapısal protein
6	RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand	Kemik yenilenmesi
7	OPG	Osteoprotegerin	RANK'ın tuzak reseptörü
8	MMP1	Matrix Metalloproteinase 1	Ekstraselüler degradatif enzim
9	UTS2	Urotensin 2	Henüz tam olarak anlaşılmamakla beraber fibroziste etken
10	BMP7	Bone morphogenetic protein 7	TGF-1b ailesi üyesi, kemik homeostazı,
11	BMP2	Bone morphogenetic protein 2	Kemik ve kıkırdak gelişimi
12	RUNX2	Runt-related transcription factor 2	Osteoblast Farklılaşması
13	SP7	Transcription factor SP7	Osteoblast Farklılaşması
14	CASPASE 3	cysteine-aspartic acid protease 3	Programlı Hücre Ölümü
15	CASPASE 8	cysteine-aspartic acid protease 8	Programlı Hücre Ölümü
16	CASPASE 9	cysteine-aspartic acid protease 9	Programlı Hücre Ölümü
17	GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Hamarat gen (Housekeeping gen)



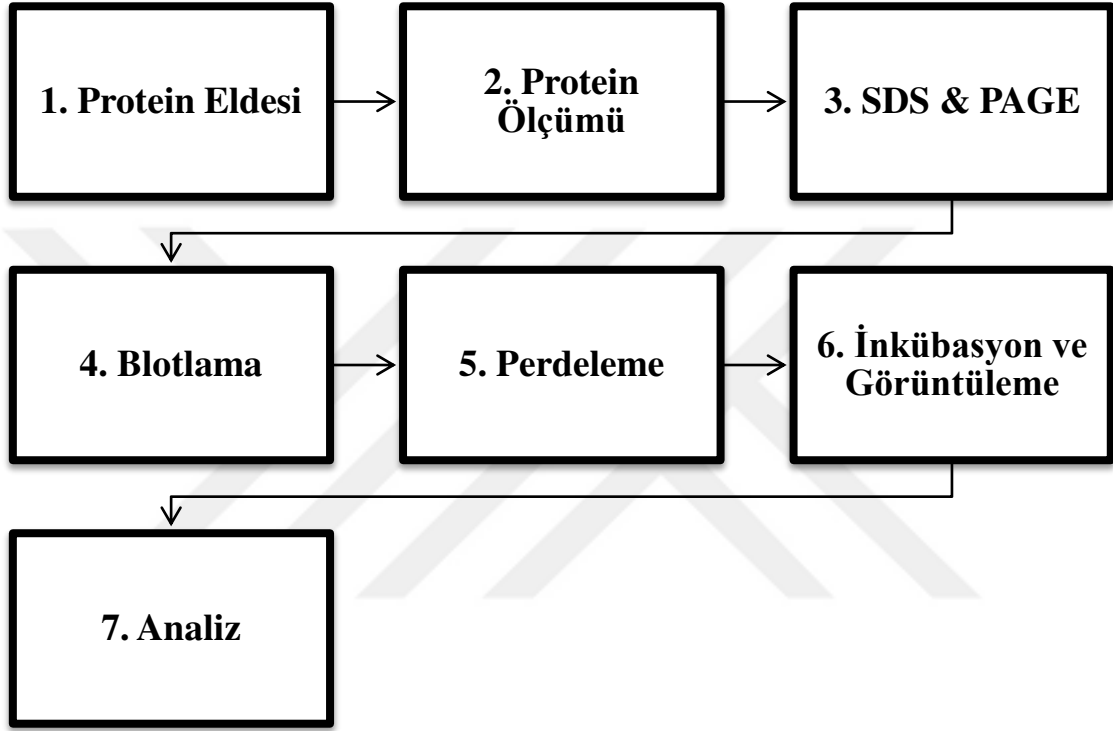
Resim 3. 1. Gen ifade analizlerinde kullanılan program (QIAGEN, Rotor-Gene-Q, Software Version 2.3.1).

3.2.5. Verilerin Analizi

Elde edilen verilerin analizi QIAGEN'in çevrimiçi programı Data Analysis Center-RT² Primer Assay (<http://www.qiagen.com/tr/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>) ile yapılmıştır. P değerlerinin hesaplanmasında kontrol ve uygulama grubundaki her bir gen için kopya $2^{-\Delta Ct}$ değerlerinin *Students T* testine dayanılarak hesaplandı ve 0.05 altındaki P değerleri anlamlı kabul edildi. Gen ifadesindeki değişimler katlı değişim yani *Fold Change* olarak grafiklerde ifade edildi. GAPDH 'hamarat gen (housekeeping)' olarak normalizasyonda kullanıldı.

3.3. Western Blot Analizleri

Protein analizleri için hücre kültür deneyleri yukarıda belirtilenden farklı olarak 75 cm² kültür kaplarında gerçekleştirildi. Western Blot analizleri için iş akışı şekil 3.2’de gösterilmiştir. Ayrıca, western blot analizlerinde kullanılan laboratuvar malzemeleri tablo 3.9’da belirtilmiştir.



Şekil 3. 2. Western Blot’ta iş akışı gösterimi. Western Blot çok aşamalı bir analiz yöntemidir. Öncelikli olarak hücre kültür deneylerinin sonunda kültür kaplarından protein eldesi gerçekleştirildi. Daha sonra her kuyucuğa eşit miktarda protein yükleyebilmek için protein ölçümü BCA Assay kit ile gerçekleştirildi. Proteinlerin ağırlıklarına göre hareket ayırıştırılması için SDS&PAGE elektroforezi yapıldı. Daha sonra Proteinleri antikorla işaretleyebilmek için jeldeki proteinleri PVDF zara aktardık. Antikor ile hedef protein arasındaki özgül olmayan bağlanmaları en aza indirmek için ise perdeleme (blokaj) işlemi gerçekleştirildi. Bu aşamadan sonra PVDF zar hem birincil hem de ikincil antikor ile muamele edilmiştir. PVDF zarın görüntülenmesinde *Bio-rad* Chemidoc görüntüleme sistemi kullanıldı. Son aşamada ise *Bio-rad* firmasına ait yazılım (*Image lab.*) kullanılarak bantların yoğunlukları hesaplandı.

Tablo 3. 9. Western Blot deneylerinde kullanılan malzemeler

Kullanılan Malzeme & Cihaz	Marka	Katalog No
Multiskan Go	Thermo Scientific	
Elektroforez Ünitesi	Biorad	
Semi-Dry Blotlama Sistemi	Biorad	
ChemiDoc	Biorad	
M-PER mamalian protein extraction reagent	Thermo scientific	prod 78501
Pierce BCA Prtoein assay Kit	Thermo scientific	23225 23227
HALT protease inhibitor cocktail 100x	Thermo scientific	prod 87786
Mini protean TGX gel	Biorad	456-8123
Mini protean TGX gel	Biorad	456-8126
Transfer Pack, Mini PVDF	Biorad	170-4156
Transfer Pack, Midi PVDF	Biorad	170-4157
Running Buffer	Biorad	161-0732
Standart	Biorad	161-0393

3.3.1. Protein Eldesi

IL-1 β ile uyarılan hFOB1.19 hücrelerinden inkübasyon sonunda aşağıdaki protokole göre protein eldesi gerçekleştirildi.

1. Hücreler soğuk HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) ile yıkandı ve kültür kaplarından hücre kazıyıcı yardımıyla kazınarak bir falkona alındı.
2. Daha sonra +4°C, 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
3. Santrifüjden çıkan falkonun üst fazı atıldı ve üzerine 1:100 oranında proteaz inhibitör kokteyl içeren 500 μ l M-PER (Mammalian Protein Extraction Reagent) eklenerek hücreler homojen hale getirildi.
4. Homojen hale gelen hücrelere sıvı azot ile dondur-çöz yapıldı.
5. 4°C, 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
6. Proteinleri içeren üst faz yeni bir tüpe alındı.
7. Elde edilen protein eriyikleri sıvı azotta dondurularak -80°C'de saklandı.

3.3.2. BCA Assay Kit ile Protein Ölçümü

İzole edilen örneklerin total protein seviyeleri Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo, Scientific, USA, 23225 23227) ile yapıldı.

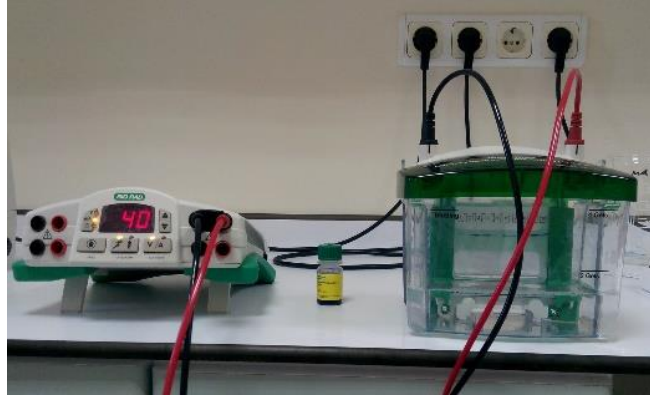
Protein ölçümü yapıldıktan sonra tüm kuyucuklara eşit miktarda protein yüklemek için $C_1.V_1 = C_2.V_2$ formülü kullanılarak protein hesaplaması yapıldı.

Protein hesaplamasının ardından proteinleri jele yüklemeye hazır hale getirmek için protein çözeltisi içerisinde SDS ve β -merkaptoetanol bulunan 4X Laemli buffer (Bio-rad, 161-0747) ile karıştırıldı. Ardından 95 °C de 5 dakika kaynatma işlemi yapıldı. Bu işlemin amacı, kaynatarak proteinler arasındaki bağlar kırılır ve proteinler denatüre (doğal olmayan yapı) hale getirilir. SDS ile proteinlerin negatif yüklenmesi sağlanır. β -merkaptoetanol ile ise proteinlerin yapısındaki disülfid bağları kırılır. Proteinlerin elektriksel alan içerisindeki göçü proteinlerin doğal moleküler ağırlığını verir.

3.3.3. Sodyum Dodesil Sülfat & Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS & PAGE)

Elektrophorez molekülerin elektrik akımı etkisi ile hareket ettirilmesi esasına dayanan bir yöntemdir. Bu elektrophorez tipinde (SDS-PAGE) moleküller ağırlıklarına göre ayırt edilmektedir.

1. Elektrophorez tankının içerisine yürütme tamponu (Running Buffer, Biorad, 161-0732) ile dolduruldu.
2. Hazır jel paketinden açıldıktan sonra alt kısımdaki yeşil etiket çıkartıldı.
3. Hazır jel, jel tutucu aparata takılıp daha sonra tanka yerleştirildi.
4. Jelde bulunan taraklar dikkatli ve yavaş bir şekilde çıkarıldı.
5. Jeldeki hava kabarcıkları ve kristalleri ortadan kaldırmak için pipetleme yapıldı.
6. Daha sonra kuyucuklara yükleme yapıldı. İlk olarak standart yüklendi (4 μ L), ardından örnekler kuyucuklara tek tek dikkatlice yüklendi.
7. Daha sonra tankın kapağı kapatıldı. Böylelikle, bir önceki aşamada tamamen negatif yükle yüklenmiş proteinler yürütmeye hazır hale getirilmiş oldu.
8. Yürütme öncelikle düşük 80 Volt ile başlatıldı daha sonra 120 Volt'a yükseltildi.
9. Yürütme esnasında proteinlerin durumu boyadan takip edildi ve bu işlem yaklaşık 45 dakika sürdü.



Resim 3. 2. Sodyum Dodesil Sülfat & Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS&PAGE). Western Blotta kullanılan dikey elektrofrez şekilde gösterilmektedir. Negatif yüklenmiş proteinler yukarıdan aşağıya doğru (negatiften pozitive doğru) hareket ettirilmektedir.

3.3.4. Blotlama

Jelde ayrıştırılan proteinlerin antikorlar işaretlenebilmesi için PVDF zara aktarılması gerekir. Bunun için Biorad Semi-Dry (Yarı-kuru) blotlama sistemi kullanılarak aktarma işlemi gerçekleştirildi.

1. Tranfer işlemi için jel tanktan çıkarıldı ve üst kısmı kesilip atıldı.
2. Jel daha sonra transfer tampona alındı.
3. Çalışmamızda PVDF zar kullandığımızdan etkinleştirilmesi gerekir, bunun için önce zar en fazla 30 saniye olacak şekilde içinde metanol olan bir kapta bekletildi, sonra 2 dakika distile suda ve daha sonra 5 dakika aktarım tamponu içerisinde bekletildi.
4. Kurutma kağıtları transfer tampon ile ıslatılarak etkinleştirildi.
5. Kasete 3 Kurutma Kağıdı + PVDF zar + Jel + 3 Kurutma Kağıdı olacak şekilde sıralandı, zar ile jel arasındaki hava kabarcıklarını uzaklaştırmak için kurutma kağıdı üzerinden silindirik düzeneğe birkaç kez geçerek olabilecek hava kabarcıklarının oluşumu engellendi ve kapak kapatıldı.
6. Daha sonra Semi-Dry (yarı kuru) sistem için transfer koşulları: 25V---2,5A--- 7 dakika olacak şekilde ayarlandı.

3.3.5. Perdeleme (Blokaj)

Perdeleme, PVDF zar içine gömülmüş proteinlerin antikora bağlanmasını engelleyerek antikora özgün proteinlerin seçiciliğini artırmak için uygulanan bir işlemdir. PVDF zarında ilgilenilen protein ile antikor arasındaki etkileşimi sağlamak için seyreltilmiş

protein çözeltisi ile muamele edilmiş PVDF zarı (Yağsız Süttozu+TBS-T karışımı) oda sıcaklığında 1 saat, zarın zarar görmeyeceği yavaşlıkta çalkalayıcıda gerçekleştirildi. Yağsız Süttozu+TBS-T karışımı (% 5'lik süt tozu) sabitleme çözeltisi hazırlamak için 2.5 gr süt tozu (Fluka, Skim milk powder, 70166-500G) tartıldı ve 50 ml TBS-T içerisinde çözüldü.

TBS-T hazırlanmasında kullanılan protokol

- ✓ 8,8 g Trisma Base
- ✓ 1,2 g NaCl
- ✓ 500 µL Tween 20
- ✓ 750 µL dH₂O
- ✓ En son pH = 7,5 olarak ayarlanır ve 1L'ye tamamlanır.



Resim 3. 3. Oda ısısında süt tozu ile muamele. Blotlama aşamasından sonra antikorun özgül olmayan bağlanmalarını en aza indirmek için yağsız süt tozu içeren TBS-T çözeltisinde PVDF zar oda ısısında 1 saat çalkalandı.

3.3.6. İnkübasyon ve Görüntüleme

Zarın perdeleme işleminden sonra PVDF zarı primer (birincil) antikorla soğuk ortamda bir gece muamele ettikten sonra sekonder (ikincil) antikorlar ile muamele ederek görüntülemeye hazır hale getirildi.

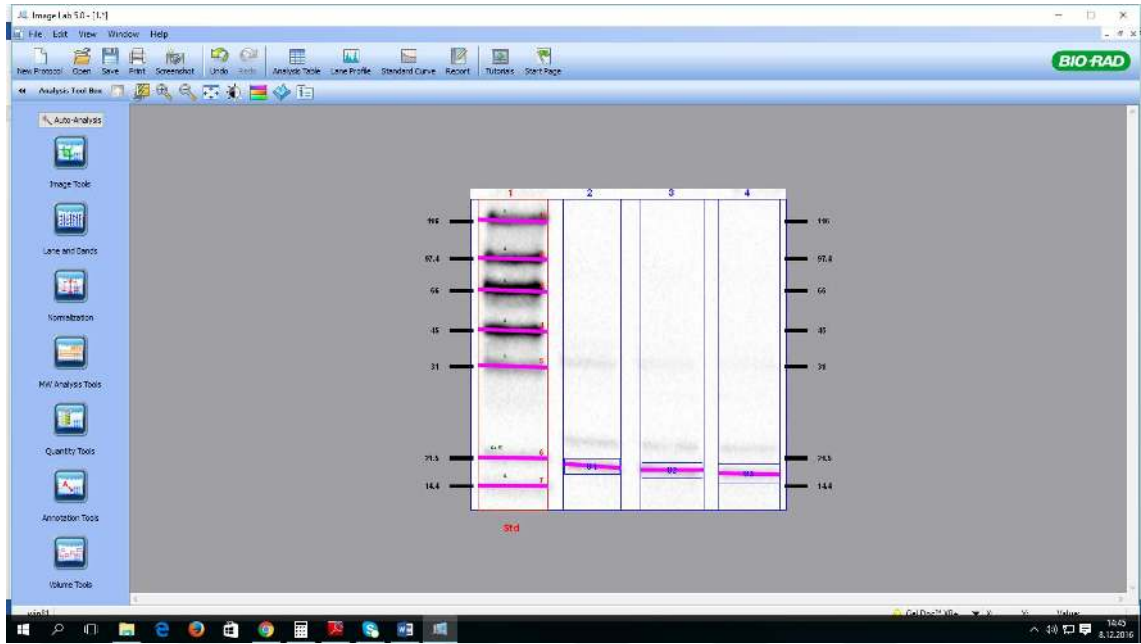
Primer antikor ile inkübasyon protokolü;

1. Birincil antikor 1/1000 oranında seyreltildikten sonra kullanıldı.

2. PVDF zarını seyreltilmiş birincil antikor ile muamele etmek için hazırladığımız çözelti; % 2.5'luk süt tozu içerisinde 1/1000 oranında antikor eklendi. (25 µl primer antikor + 25 ml % 2.5'lik süt tozu).
3. Membran kapaklı bir kap içerisindeki antikor süt tozu karışımına alınarak 1 gece +4 °C de çalkalayıcıda sallandı.
4. Bir gece sonunda PVDF zarı birincil antikor süt tozu karışımından alındı ve TBS-T solüsyonu içerisinde 3 kez 5'er dakika yıkandı.
5. Bu sırada yıkama devam ederken ikincil antikor hazırlandı.
6. % 2.5'luk süt tozu çözeltisi 15/1 oranında streptaktin (standartın antikoru) eklendi.
7. Seyreltme oranına göre ikincil antikor eklenerek 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda sallandı.
8. PVDF zarı sekonder antikor süt tozu karışımından alınarak TBS-T solüsyonu ile 3 defa 5'er dakika ara ile yıkandı, bu yıkamaların sebebi başka zayıf bağlanmaları ortadan kaldırmaktır.
9. Bu aşamadan sonra ECL çözeltisi hazırlandı ve streç film gergince cam üzerine serildi. Üzerine ECL solüsyonu eklendi, üzerine PVDF zarı konuldu, 5 dakika karanlıkta kalması sağlanarak üst kısmı da kapatılarak bekletildi. Üzerinden fazla ECL solüsyonu silinerek okumaya hazır hale getirildi.
ECL solüsyonu;
 - a. 150 µL Lumi A (Solüsyon A)
 - b. 150 µL Lumi B (Solüsyon B)
 - c. 2,7 µL dH₂O
10. PVDF zarının görüntülenmesi Biorad ChemiDoc™ Imaging System ile gerçekleştirildi.

3.3.7. Analiz

Western Blot analizleri, bantların görüntülenmesi ve normalizasyon işlemi için '**Bio-Rad Laboratories-Image Lab Version 5**' programı kullanılarak yapıldı.



Resim 3. 4. Western Blot'ta kullanılan analiz programı (Bio-Rad Laboratories, Image Lab. Version 5.0 Build 18)

3.4. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Deneyleri

Hücre kültürü deneyleri sonunda alınan süpernatantlardan (üst fazlardan) OA ilişkili proteinlerin analizleri ELISA ile yapılmıştır. Analizi yapılan parametreler aşağıdaki tabloda belirtilmiştir. Deneyler sonunda -80°C 'de saklanan süpernatantlardan ELISA kitleri (R&D Systems) kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokole göre analiz yapıldı. ELISA okuyucu spektrofotometre olarak Multiskan Go (Thermo Fisher Scientific, FINLAND) cihazı kullanıldı. *Thermo Scientific SkanIt* programı kullanılarak örnekler uygun dalga boyunda okutulup, özgül protein derişimi standartlarla karşılaştırılarak belirlendi.

Tablo 3. 10. ELISA ile analizi yapılan parametreler

Protein	Açık Adı:	Kullanılan Kit
1 MMP1	Matrix Metalloproteinase 1	DuoSet ELISA, DY901, R&D Systems
2 OPG-TNFRSF11B	Osteoprotegerin	DuoSet ELISA, DY805, R&D Systems
3 IL-17	Interleukine 17	DuoSet ELISA, DY317, R&D Systems

Çalışmadaki tüm istatistiksel analizlerde ve grafiklerin oluşturulmasında *GraphPad Prism 5* Programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

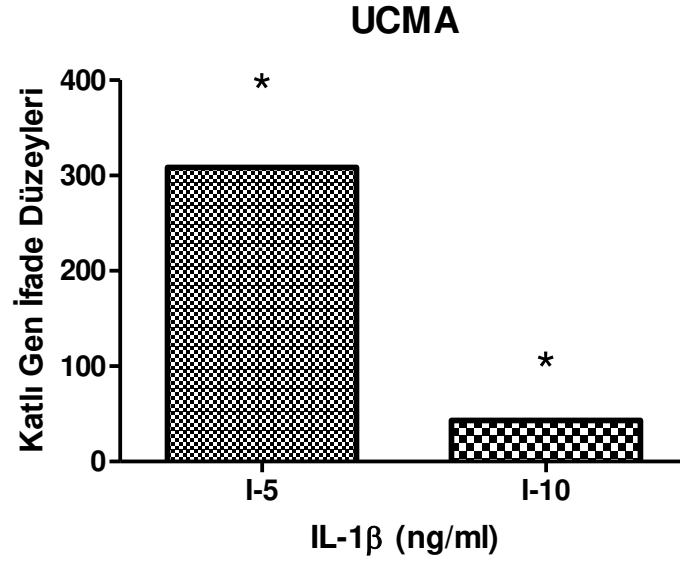
Bu tez çalışması kapsamında insan osteoblast hFOB1.19 hücre hatları kullanılmıştır. hFOB1.19 hücre hatları ATCC firmasından (Manassas, VA 20108, USA) satın alındıktan sonra laboratuvarında uygun koşullarda çözdürölüp költür kaplarına ekilmiştir.

4.1. *İn vitro* Osteoartrit Modelinde Gen İfade Düzeyleri

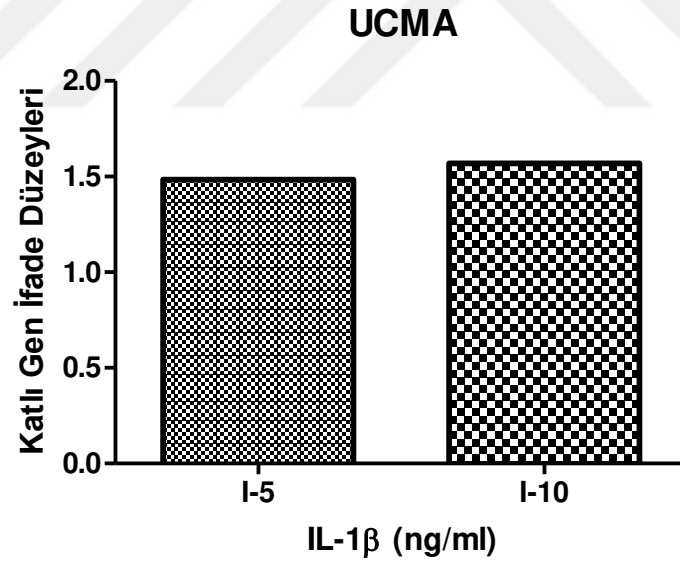
IL-1 β ile uyarılan hFOB1.19 hücre hatlarında UCMA, MGP, UTS2, NF- κ B, BGLAP, SPP1/OPN, RANKL, OPG, MMP1, BMP2, BMP7, RUNX2, OSX/SP7, CAS-3, CAS-8 ve CAS-9 olmak üzere toplamda 16 genin ifade düzeyleri incelenmiştir. Hedef genlerin ifadelerinin düzeyleri GAPDH hamarat geninin (housekeeping gen) ifade düzeyi ile oranlanarak tayin edilmiştir. Gen ifade analizleri Rotor gene Corbett cihazında gerçekleştirilmiştir. Grafiklerde gen ifade düzeyi değişimleri katlı değişim (*Fold Change*) şeklinde ifade edilmiştir.

4.1.1. IL-1 β ile Uyarılmanın UCMA Geni İfade Düzeylerine Etkisi

Farklı doz ve sürelerde IL-1 β ile uyarılan hFOB1.19 hücre hatlarında UCMA (Upper Zone of Growth Plate and Cartilage Matrix Associated) geni ifade düzeyi değişimleri T48 için şekil 4.1’de T72 için ise şekil 4.2’ de gösterilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında grafikte gösterilen katlı değişim (Fold Change) düzeyleri sırasıyla 5 ng/ml IL-1 β (T48) verilen grupta 308 kat ($P < 0.0001$) ve 10 ng/ml IL-1 β (T48) verilen grupta ise 43 kat ($P < 0.001$) artış olduğu görölmektedir. Şekil 4.2’de gösterildiği gibi T72 sürelerinde UCMA geni ifade düzeyi değişimleri 5 ng/ml için 1.4, 10 ng/ml için ise 1.5 kat olarak bulunmuştur. Bu grupta anlamlı bir farklılık görölmemiştir ve katlı değişimi (Fold change) ikinin altındadır ($P > 0.05$).



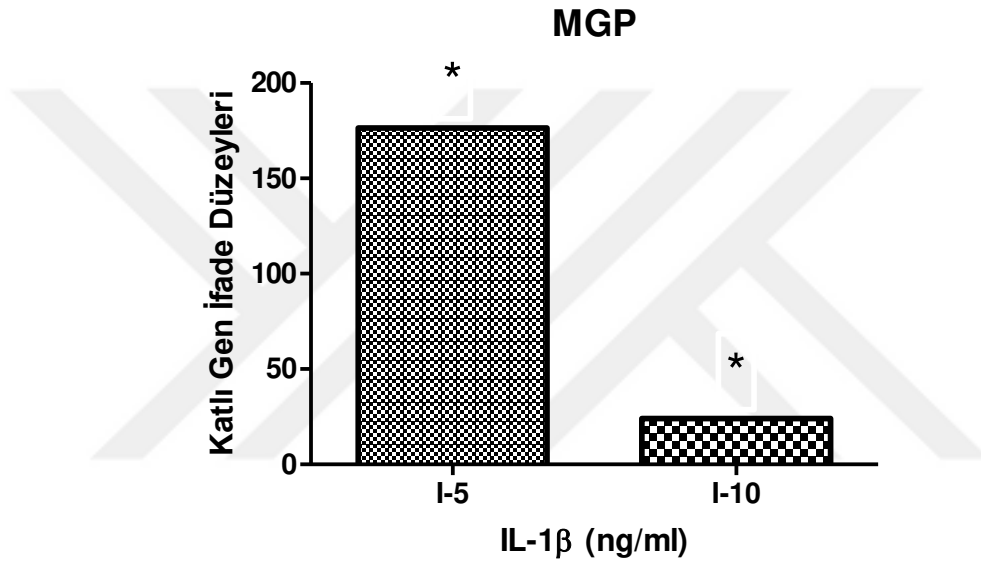
Şekil 4. 1. UCMA geni ifade düzeyi değişimleri. T48 için hFOB1.19 hücre hattında gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.



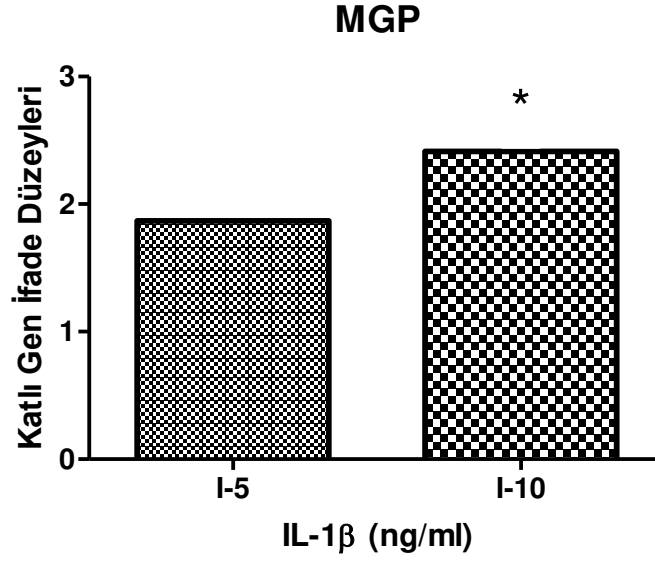
Şekil 4. 2. UCMA geni ifade düzeyi değişimleri. T72 için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.

4.1.2. IL-1 β ile Uyarılmanın MGP Geni İfade Düzeylerine Etkisi

IL-1 β ile uyarılan hFOB1.19 hücre hatlarında MGP (Matrix Gla Protein) geni ifade düzeyi değişimleri T48 için şekil 4.3’de T72 için ise şekil 4.4’de gösterilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında grafikte gösterilen katlı değişim düzeyleri sırasıyla 5 ng/ml IL-1 β (T48) verilen grupta 176 kat ($P<0.001$) ve 10 ng/ml IL-1 β (T48) verilen grupta ise 24 kat ($P<0.01$) artış olduğu görülmektedir. T72 süreleri için 5 ng/ml IL-1 β verilen grupta 1.8 kat ($P>0.05$) ve 10 ng/ml IL-1 β verilen grupta ise 2.4 kat ($P<0.05$) artış olduğu görülmektedir.



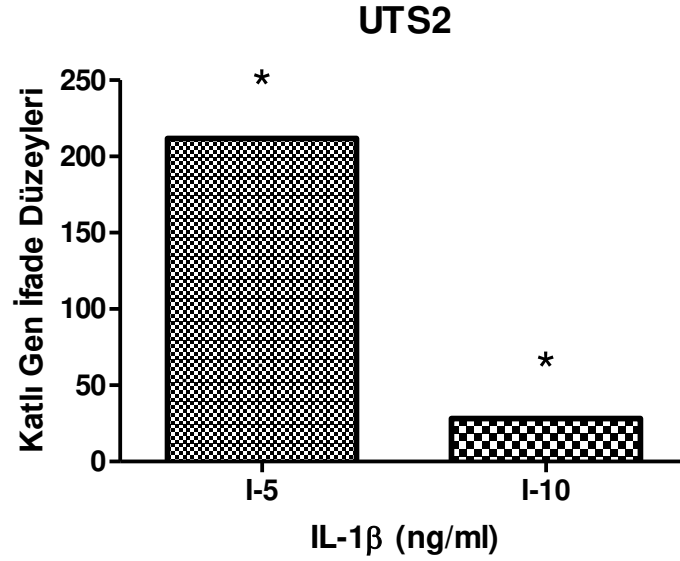
Şekil 4. 3. MGP geni ifade düzeyi değişimleri. T48 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.



Şekil 4. 4. MGP geni ifade düzeyi değişimleri. T72 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.

4.1.3. IL-1β ile Uyarılmanın Ürotensin II Geni İfade Düzeylerine Etkisi

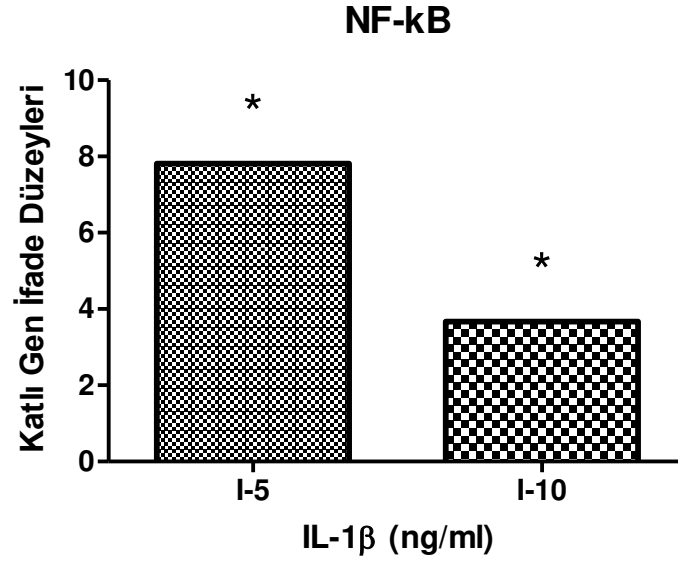
IL-1β ile uyarılan hFOB1.19 hücre hatlarında UTS2 (Ürotensin II) geni ifade düzeyi değişimleri şekil 4.5’de gösterilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında grafikte gösterilen katlı değişim düzeyleri sırasıyla 5 ng/ml IL-1β (T48) verilen grupta 211 kat ($P<0.0001$) ve 10 ng/ml IL-1β (T48) verilen grupta ise 28 kat ($P<0,05$) artış olduğu görülmektedir.



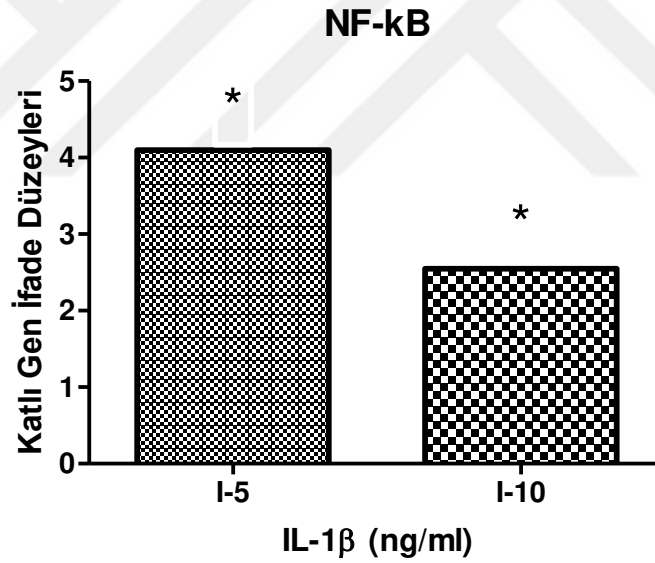
Şekil 4. 5. IL-1 β uyarımından sonra UTS2 geni ifade düzeyi değişimleri. T48 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.

4.1.4. *In vitro* Osteoartrit Modelinde NF- κ B Geni İfade Düzeyleri

IL-1 β ile uyarılan hFOB1.19 hücre hattında NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) geni ifade düzeyi değişimleri T48 için şekil 4.6’da, T72 için ise şekil 4.7’de gösterilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında grafikte gösterilen katlı değişim düzeyleri sırasıyla 5 ng/ml IL-1 β (T48) verilen grupta 7.8 kat ($P<0.0001$) ve 10 ng/ml IL-1 β (T48) verilen grupta ise 3.6 kat ($P<0.0001$) artış olduğu görülmektedir. T72 sürelerinde ise 5 ng/ml IL-1 β verilen grupta 4.09 kat ($P<0.01$) ve 10 ng/ml IL-1 β verilen grupta ise 2.5 kat ($P<0.05$) artış olduğu görülmektedir.



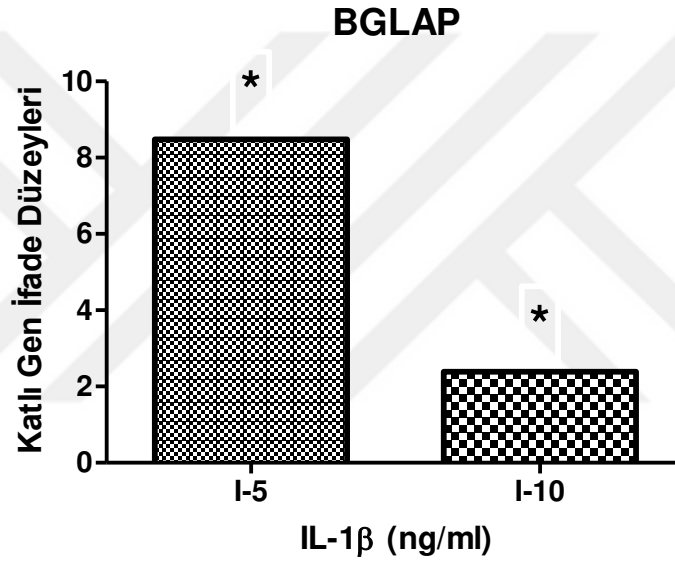
Şekil 4. 6. NF-κB geni ifade düzeyi değişimleri. T48 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.



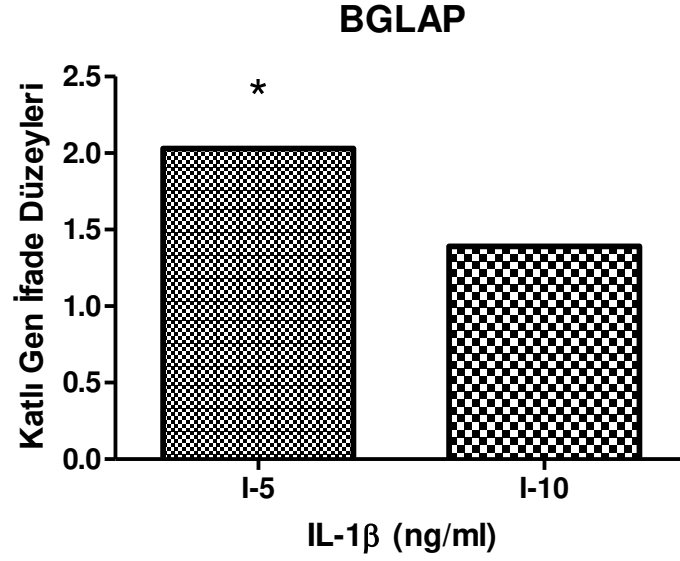
Şekil 4. 7. NF-κB geni ifade düzeyi değişimleri. T72 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.

4.1.5. *In vitro* Osteoartrit Modelinde BGLAP Geni İfade Düzeyleri

IL-1 β ile uyarılan hFOB1.19 hücre hattında BGLAP (Bone Gamma-Carboxyglutamic Acid-Containing Protein=Osteocalcin) geni ifade düzeyi değişimleri T48 için şekil 4.8’de, T72 için ise şekil 4.9’da gösterilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında grafikte gösterilen katlı değişim düzeyleri sırasıyla 5 ng/ml IL-1 β (T48) verilen grupta 8.4 kat ($P<0.0001$) ve 10 ng/ml IL-1 β (T48) verilen grupta ise 2.3 kat ($P<0.0001$) artış olduğu görülmektedir. T72 sürelerinde ise 5 ng/ml IL-1 β verilen grupta 2 kat artış olduğu gözlemlenmiştir. ($P<0.05$). 10 ng/ml IL-1 β verilen grupta ise 1.3 kat ($P>0.05$) artış olduğu görülmektedir.



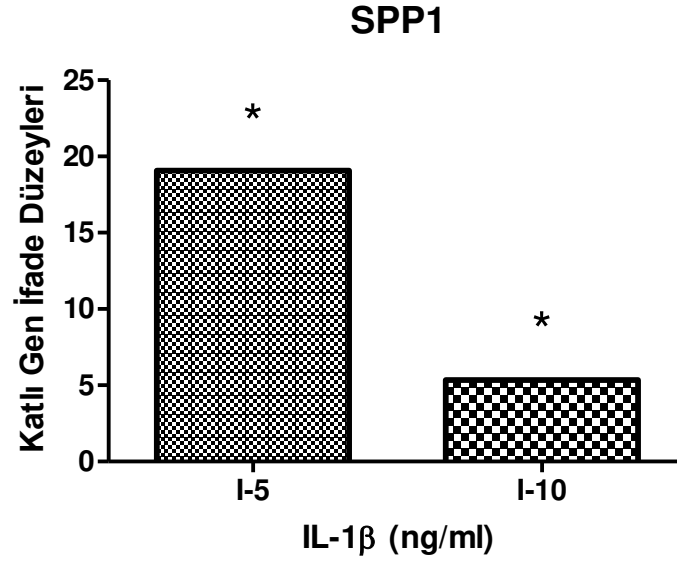
Şekil 4. 8. BGLAP=Osteocalcin geni ifade düzeyi değişimleri. T48 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.



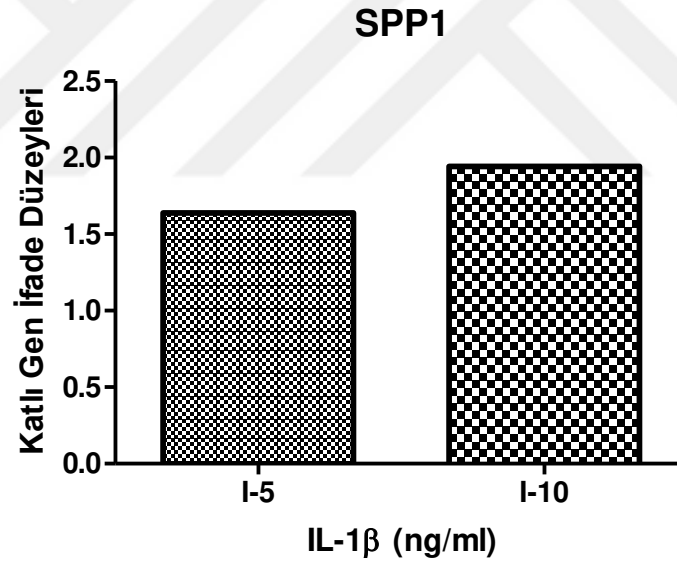
Şekil 4. 9. BGLAP=Osteocalcin geni ifade düzeyi değişimleri. T72 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.

4.1.6. *In vitro* Osteoartrit Modelinde SPP1 Geni İfade Düzeyleri

IL-1 β ile uyarılan hFOB1.19 hücre hattında SPP1 (Secreted Phosphoprotein 1) geni ifade düzeyi değişimleri T48 için şekil 4.10’da, T72 için ise şekil 4.11’de gösterilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında grafikte gösterilen katlı değişim düzeyleri sırasıyla 5 ng/ml IL-1 β (T48) verilen grupta 19 kat ($P<0.0001$) ve 10 ng/ml IL-1 β (T48) verilen grupta ise 5.3 kat ($P<0,01$) artış olduğu görülmektedir. T72 sürelerinde ise 5 ng/ml IL-1 β verilen grupta katlı değişim düzeyi 1.6 iken 10 ng/ml IL-1 β verilen grupta ise katlı değişim düzeyi 1.9 kat olarak gözlemlenmiştir ve bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P>0.05$).



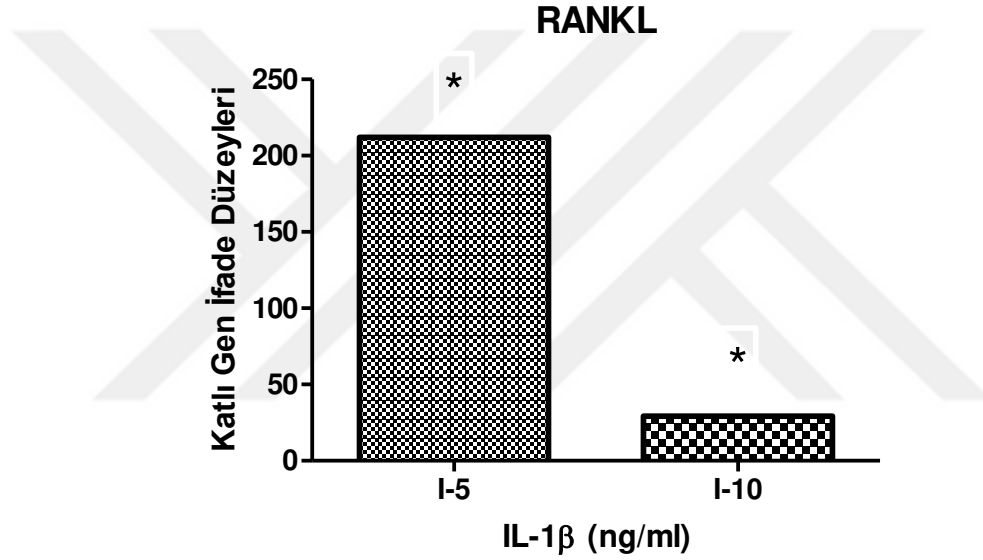
Şekil 4. 10. SPP1 geni ifade düzeyi değişimleri. T48 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.



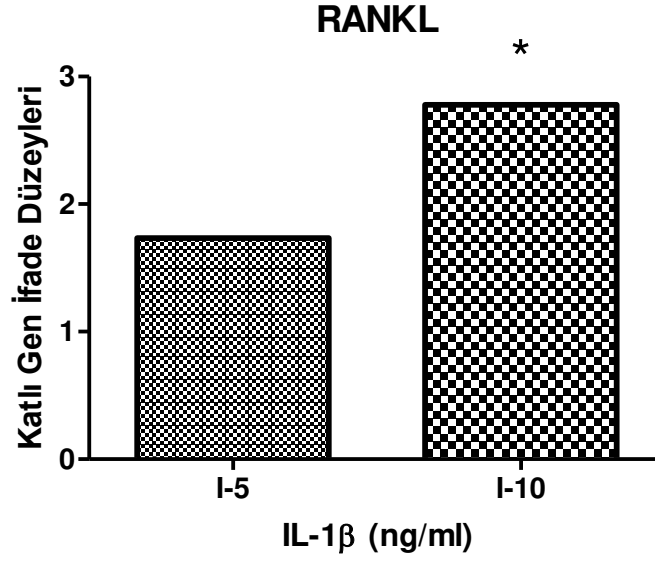
Şekil 4. 11. SPP1 geni ifade düzeyi değişimleri. T72 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.

4.1.7. *In vitro* Osteoartrit Modelinde RANKL Geni İfade Düzeyleri

IL-1 β ile uyarılan hFOB1.19 hücre hattında RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand = tumor necrosis factor ligand superfamily member 11 = TNFSF11) geni ifade düzeyi değişimleri T48 için şekil 4.12’de, T72 için ise 4.13’de gösterilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında grafikte gösterilen katlı değişim düzeyleri sırasıyla 5 ng/ml IL-1 β (T48) verilen grupta 211 ve 10 ng/ml IL-1 β (T48) verilen grupta ise 29 kat artış olduğu görülmektedir. T72 sürelerinde ise 5 ng/ml IL-1 β verilen grupta katlı değişim düzeyi 1.7’dir ve bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P>0.05$). 10 ng/ml IL-1 β verilen grupta ise 2.7 kat artış olduğu görülmüştür ($P<0.01$).



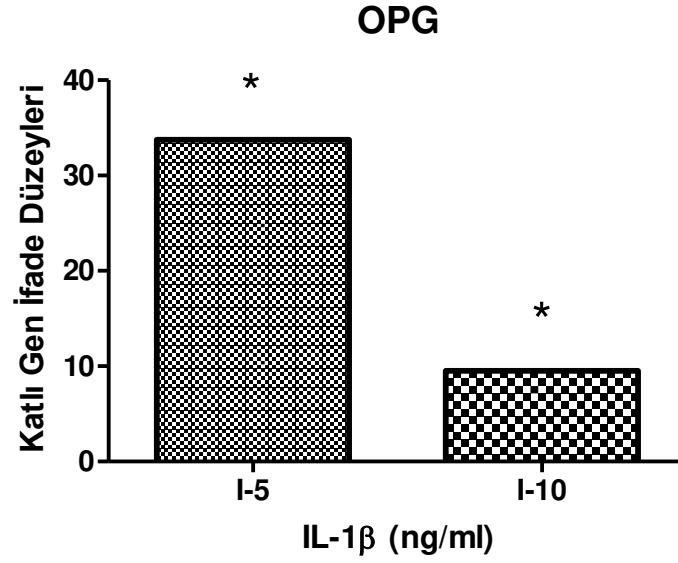
Şekil 4. 12. RANKL = *TNFSF11* geni ifade düzeyi değişimleri. T48 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.



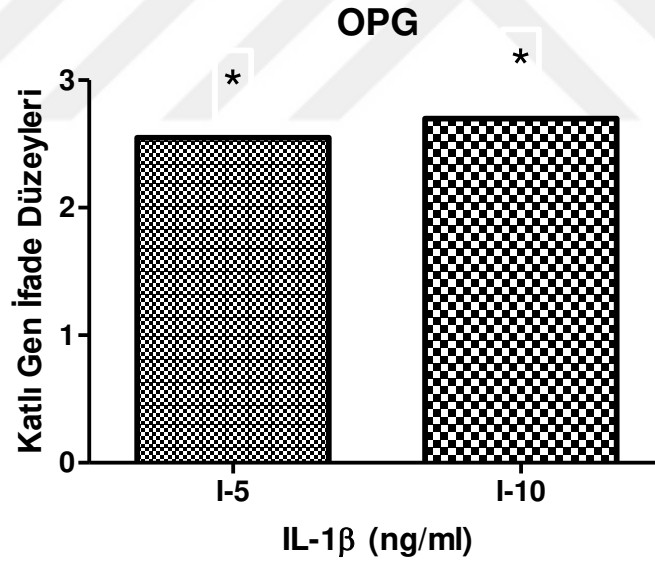
Şekil 4. 13. RANKL = *TNFSF11* geni ifade düzeyi değişimleri. T72 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.

4.1.8. *In vitro* Osteoartrit Modelinde OPG Geni İfade Düzeyleri

IL-1 β ile uyarılan hFOB1.19 hücre hattında OPG (Osteoprotegerin) geni ifade düzeyi değişimleri T48 için şekil 4.14’de, T72 için ise 4.15’de gösterilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında grafikte gösterilen katlı değişim düzeyleri sırasıyla 5 ng/ml IL-1 β (T48) verilen grupta 33 kat ($P<0.0001$) ve 10 ng/ml IL-1 β (T48) verilen grupta ise 9.5 kat ($P<0.01$) artış olduğu görülmektedir. T72 sürelerinde ise 5 ng/ml IL-1 β verilen grupta katlı değişim düzeyi 2.5’dir ($P<0.05$). 10 ng/ml IL-1 β verilen grupta ise 2.6 kat artış olduğu görülmüştür ($P<0.05$).



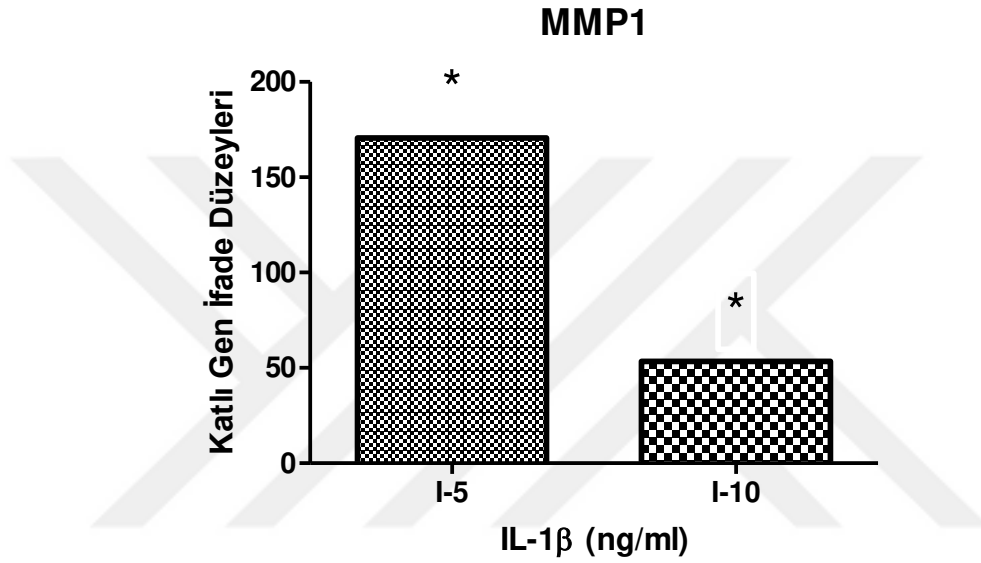
Şekil 4. 14. OPG geni ifade düzeyi değişimleri. T48 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.



Şekil 4. 15. OPG geni ifade düzeyi değişimleri. T72 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.

4.1.9. *In vitro* Osteoartrit Modelinde MMP1 Geni İfade Düzeyleri

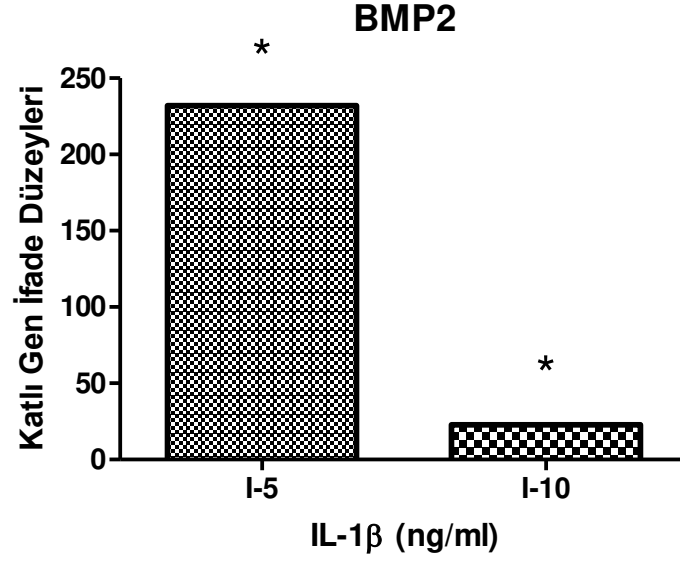
IL-1 β ile uyarılan hFOB1.19 hücre hattında MMP1 (Matrix metalloproteinase-1) geni ifade düzeyi değişimleri şekil 4.16'da gösterilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında grafikte gösterilen katlı değişim düzeyleri sırasıyla 5 ng/ml IL-1 β (T48) verilen grupta 170 kat ve 10 ng/ml IL-1 β (T48) verilen grupta ise 53 kat artış olduğu görülmektedir ve bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$).



Şekil 4. 16. MMP1 geni ifade düzeyi değişimleri. T48 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.

4.1.10. *In vitro* Osteoartrit Modelinde BMP2 Geni İfade Düzeyleri

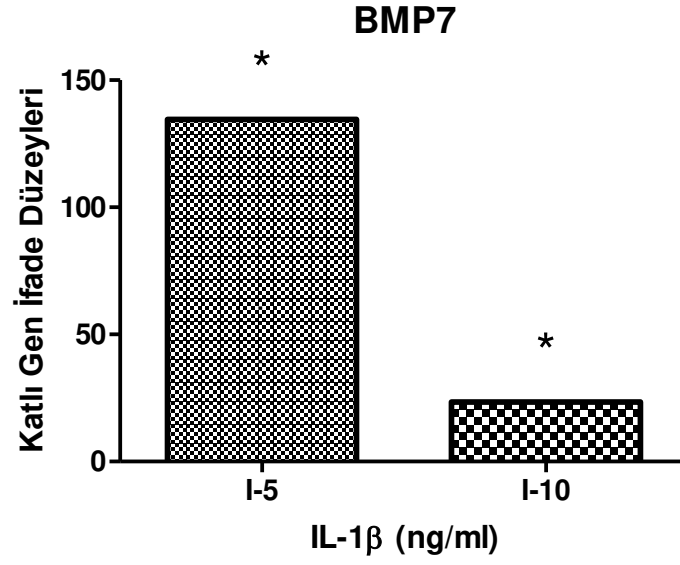
IL-1 β ile uyarılan hFOB1.19 hücre dizilerinde BMP2 (Bone Morphogenetic Protein 2) geni ifade düzeyi değişimleri şekil 4.17'de gösterilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında grafikte gösterilen katlı değişim düzeyleri sırasıyla 5 ng/ml IL-1 β (T48) verilen grupta 231 kat ($P < 0.0001$) ve 10 ng/ml IL-1 β (T48) verilen grupta ise 22 kat ($P < 0.01$) artış olduğu gözlemlenmiştir ve bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



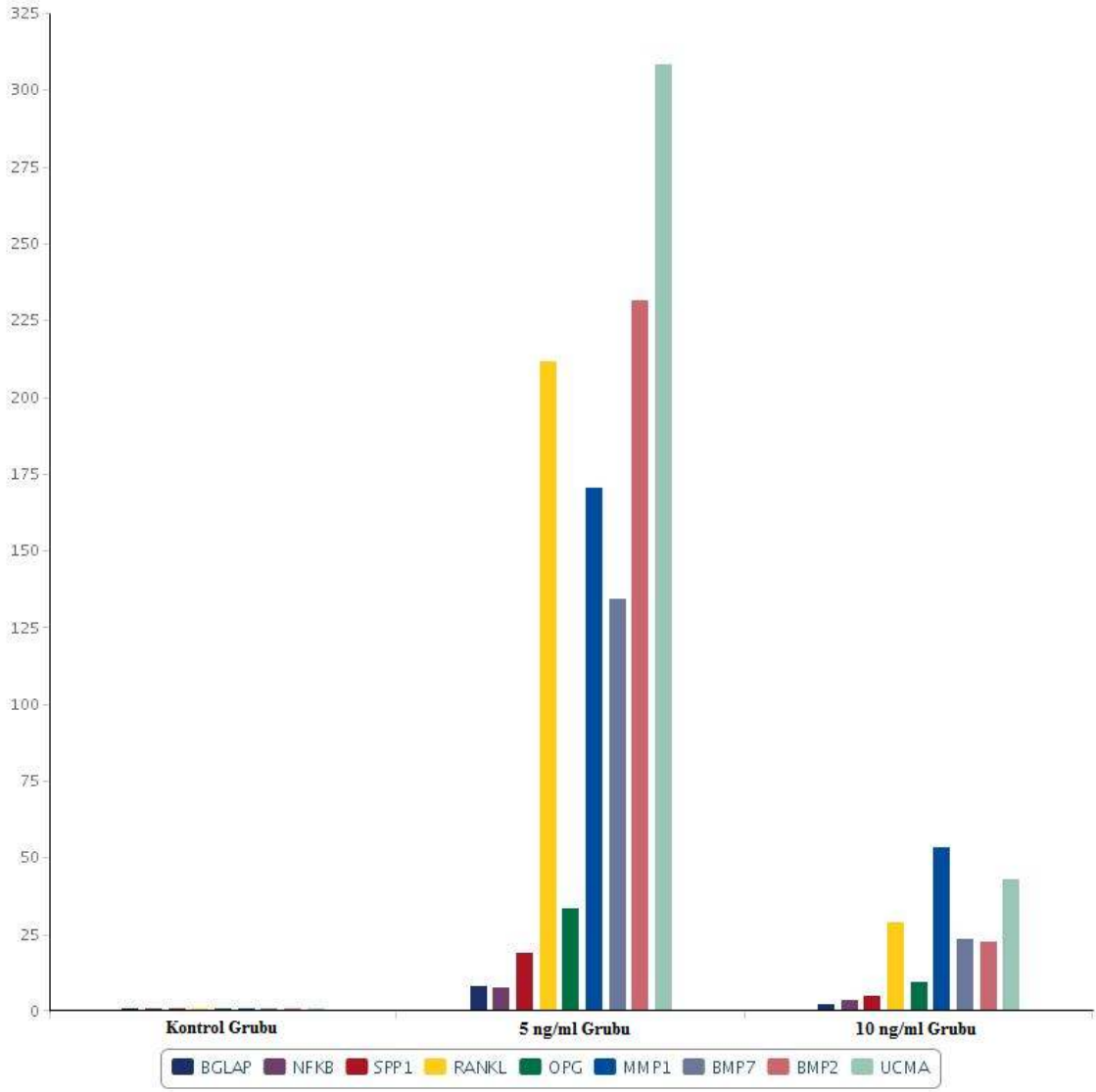
Şekil 4. 17. IL-1 β 'nın BMP2 geni ifade düzeyi değişimleri üzerine etkisi. T48 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.

4.1.11. *In vitro* Osteoartrit Modelinde BMP7 Geni İfade Düzeyleri

IL-1 β ile uyarılan hFOB1.19 hücre dizilerinde BMP2 (Bone morphogenetic protein 7 = Osteogenic Protein-1) geni ifade düzeyi değişimleri şekil 4.18' de gösterilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında grafikte gösterilen katlı değişim düzeyleri sırasıyla 5 ng/ml IL-1 β (T48) verilen grupta 134 kat ($P < 0.0001$) ve 10 ng/ml IL-1 β (T48) verilen grupta ise 23 kat ($P < 0.01$) artış olduğu gözlemlenmiştir ve bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



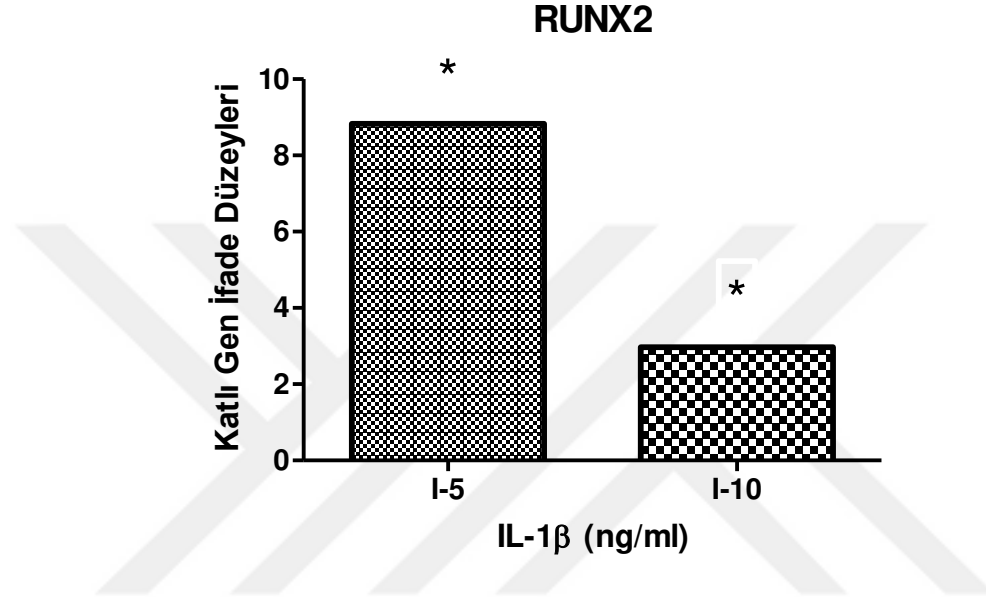
Şekil 4. 18. IL-1 β 'nın BMP7 geni ifade düzeyi değişimleri üzerine etkisi. T48 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.



Şekil 4. 19. UCMA ve Osteoartritle ilişkili genlerin ifade düzeylerinin karşılaştırılması. *İn vitro* OA modelinde, hFOB1.19 hücreleri IL-1 β ile uyarıldığında UCMA'nın gen ifadesi, analizi yapılan genler arasında en yüksek seviyede olduğu görülmektedir. Bu bulgular UCMA'nın yangı ile tetiklenebileceğinin önemli bir göstergesidir. Ayrıca, UCMA gen ifade düzeni mineralizasyonla ilişkilendirilmiş osteokalsin (BGLAP) ve osteopontin (SPP1) gibi genlerle pozitif ilişki gösterdiği görülmektedir. Eklem iç dengesinde rol alan RANKL/OPG sistemi ile ilgili olarak, RANKL'nin IL-1 β ile tetiklenebileceği ve RANKL'nin gen ifade artışının UCMA'dan sonra en fazla artış gösteren genlerden biri olduğu şekilde görülmektedir. RANKL'nin tuzak almacı olan OPG'nin de kontrole göre anlamlı düzeyde artış gösterdiği görülmektedir. BMP2 ve BMP7 genlerinin IL-1 β ile tetiklenebileceği şekilde görülmektedir. Ek olarak, IL-1 β ile OA gelişiminde rol alan NF- κ B ve MMP1 gibi önemli moleküllerin tetiklendiği görülmektedir.

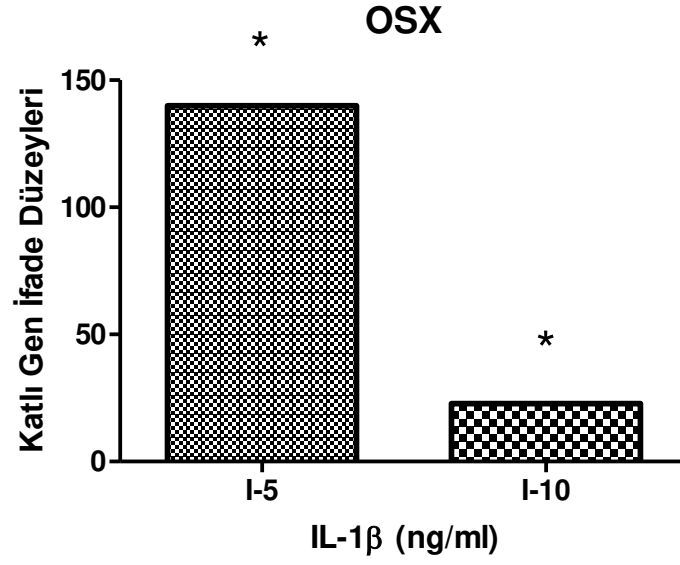
4.1.12. Pro-enflamasyonun Osteoblast Farklılaşması Üzerine Etkisi

IL-1 β ile uyarılan hFOB1.19 hücre hattında RUNX2 (Runt-related transcription factor 2 = core-binding factor subunit alpha-1 = CBF-alpha-1) geni ifade düzeyi değişimleri şekil 4.20’de gösterilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında grafikte gösterilen katlı değişim düzeyleri sırasıyla 5 ng/ml IL-1 β (T48) verilen grupta 8.8 kat ($P<0.0001$) ve 10 ng/ml IL-1 β (T48) verilen grupta ise 2.9 kat ($P<0.0001$) artış olduğu görülmektedir.

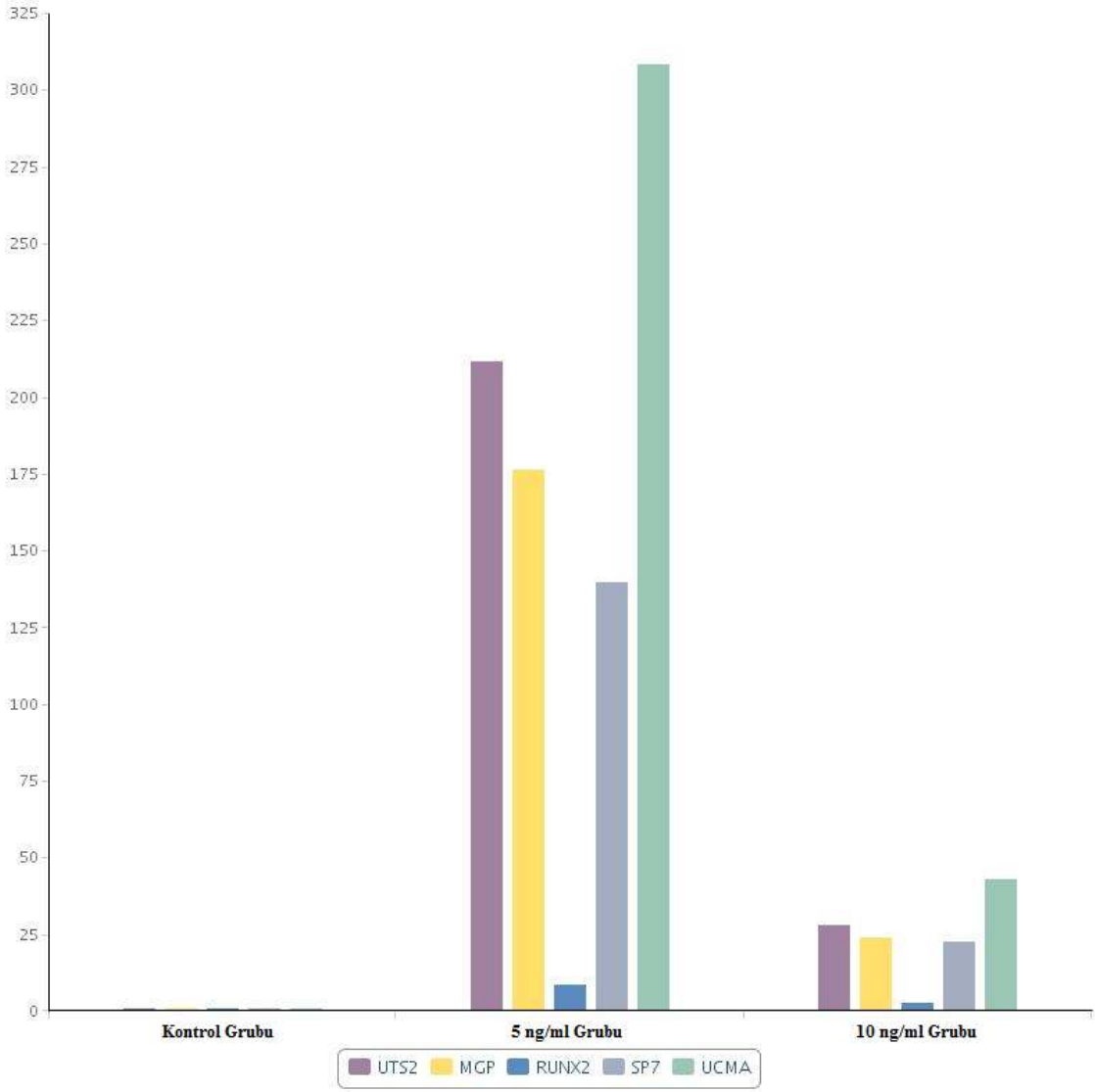


Şekil 4. 20. IL-1 β ile tetiklenen RUNX2 gen ifade düzeyi değişimleri. T48 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.

IL-1 β ile uyarılan hFOB1.19 hücre hattında OSX/SP7 (Transcription factor Sp7) geni ifade düzeyi değişimleri şekil 4.21’de gösterilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında grafikte gösterilen katlı değişim düzeyleri sırasıyla 5 ng/ml IL-1 β (T48) verilen grupta 139 kat ($P<0.0001$) ve 10 ng/ml IL-1 β (T48) verilen grupta ise 22 kat ($P<0.01$) artış olduğu görülmektedir.



Şekil 4. 21. IL-1 β ile tetiklenen OSX/SP7 geni ifade düzeyi değişimleri. T48 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.

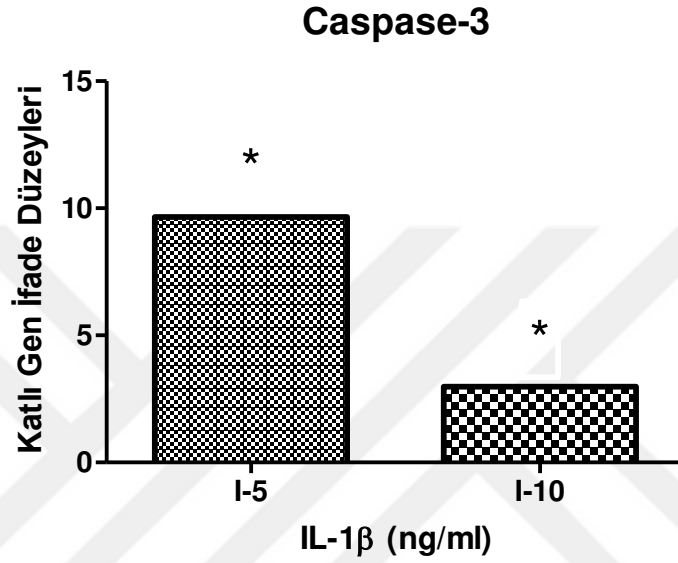


Şekil 4. 22. UCMA, MGP, UTS2, RUNX2 ve OSX/SP7 genlerinin ifade düzeyi değişimlerinin karşılaştırılması. RUNX2 ve SP7/OSX osteoblast farklılaşmasında rol alan temel transkripsiyon faktörleridir. Bu transkripsiyon faktörlerinin hFOB1.19 hücrelerinde IL-1 β ile tetiklenebileceği görülmektedir. Ayrıca, UCMA gibi vitamin K bağımlı bir protein olan MGP'nin de IL-1 β ile tetiklendiği görülmektedir. OA'nın moleküler mekanizması ile ilişkisi henüz tam olarak açıklanmamış bir molekül olan UTS2'nin gen ifade düzeyleri de IL-1 β ile tetiklendiği görülmektedir. Bu bulgular UCMA, MGP ve UTS2'nin de osteoblast farklılaşmasında rol alabileceğinin önemli göstergeleridir.

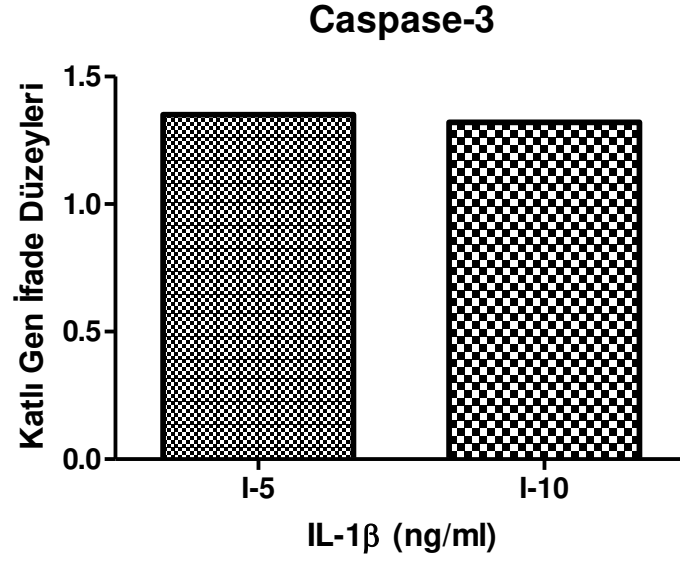
4.1.13. *In vitro* Osteoartrit Modelinde Apoptosis Genlerinin İfade Düzeyleri

IL-1 β ile uyarılan hFOB1.19 hücre hattında Caspase-3,8,9 (Cysteine-Aspartic Proteases, Cysteine Aspartases or Cysteine-Dependent Aspartate-Directed Proteases) genlerinin analizi yapılmıştır. Caspase-3 geni ifade düzeyi değişimleri T48 için şekil 4.23'de, T72 için ise şekil 4.24'de gösterilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

grafikte gösterilen katlı değişim düzeylerinde 5 ng/ml IL-1 β (T48) verilen grupta 9.6 kat, 10 ng/ml IL-1 β (T48) verilen grupta ise 2.9 kat artış olduğu görölmektedir ve bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0.01$). T72 sürelerinde ise katlı değişim düzeyleri 5 ng/ml IL-1 β verilen grupta 1.35, 10 ng/ml IL-1 β verilen grupta ise 1.32 olduğu gözlemlenmiştir ve bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P>0.05$).

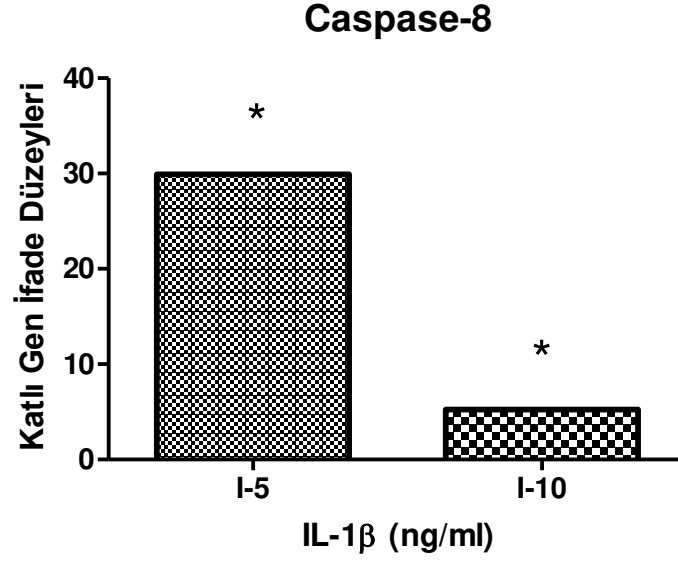


Şekil 4. 23. IL-1 β ile tetiklenen Caspase-3 geni ifade düzeyi değişimleri. T48 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.



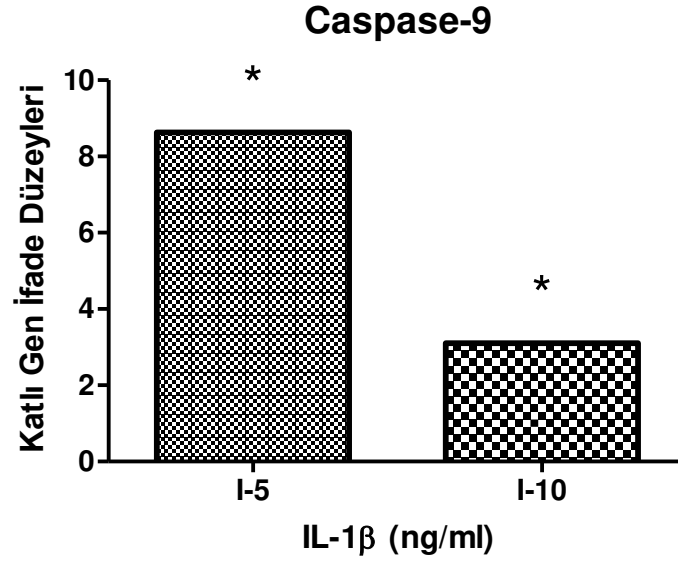
Şekil 4. 24. IL-1 β ile tetiklenen Caspase-3 geni ifade düzeyi değişimleri. T72 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.

IL-1 β ile uyarılan hFOB1.19 hücre dizilerinde Caspase-8 geni ifade düzeyi değişimleri şekil 4.25’de gösterilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında grafikte gösterilen katlı değişim düzeylerinde 5 ng/ml IL-1 β (T48) verilen grupta 29.9 kat, 10 ng/ml IL-1 β (T48) verilen grupta ise 5.25 kat artış olduğu görülmektedir ve bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0.01$).

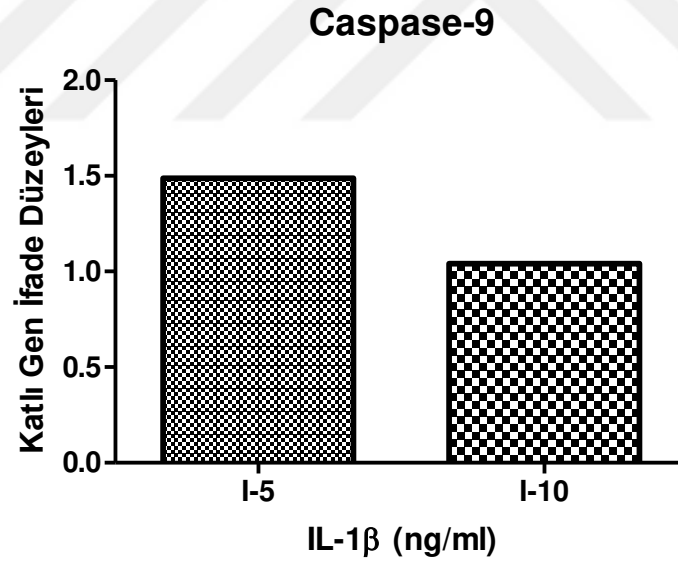


Şekil 4. 25. IL-1 β ile tetiklenen Caspase-8 geni ifade düzeyi değişimleri. T48 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.

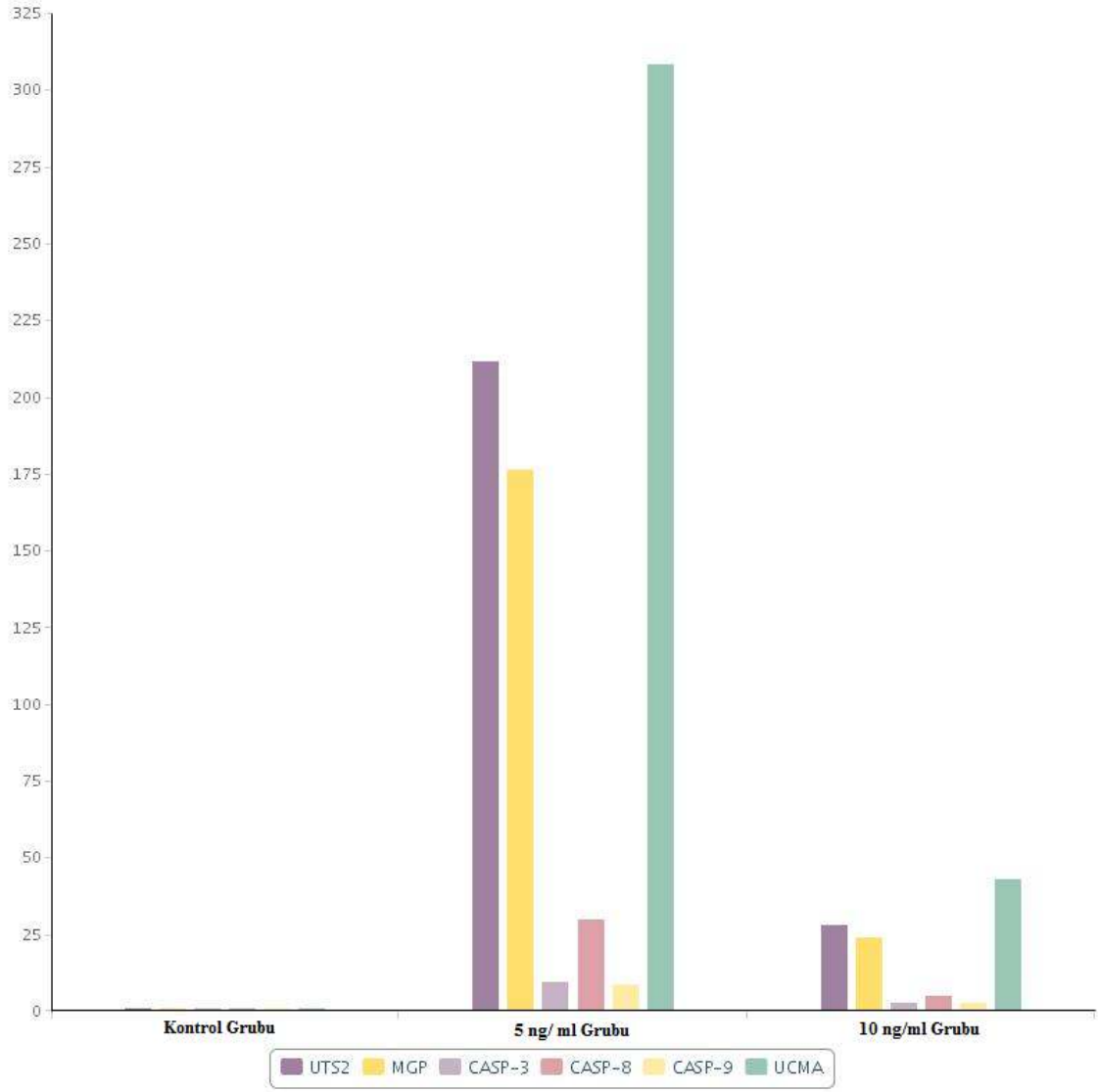
IL-1 β ile uyarılan hFOB1.19 hücre hattında Caspase-9 geni ifade düzeyi değişimleri T48 için şekil 4.26'da, T72 için ise şekil 4.27'de gösterilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında grafikte gösterilen katlı değişim düzeylerinde 5 ng/ml IL-1 β (T48) verilen grupta 8.6 kat, 10 ng/ml IL-1 β (T48) verilen grupta ise 3.1 kat artış olduğu görülmektedir ve bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P < 0.001$). T72 sürelerinde ise katlı değişim düzeyleri 5 ng/ml IL-1 β verilen grupta 1.48, 10 ng/ml IL-1 β verilen grupta ise 1.04 olduğu gözlemlenmiştir ve bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P > 0.05$).



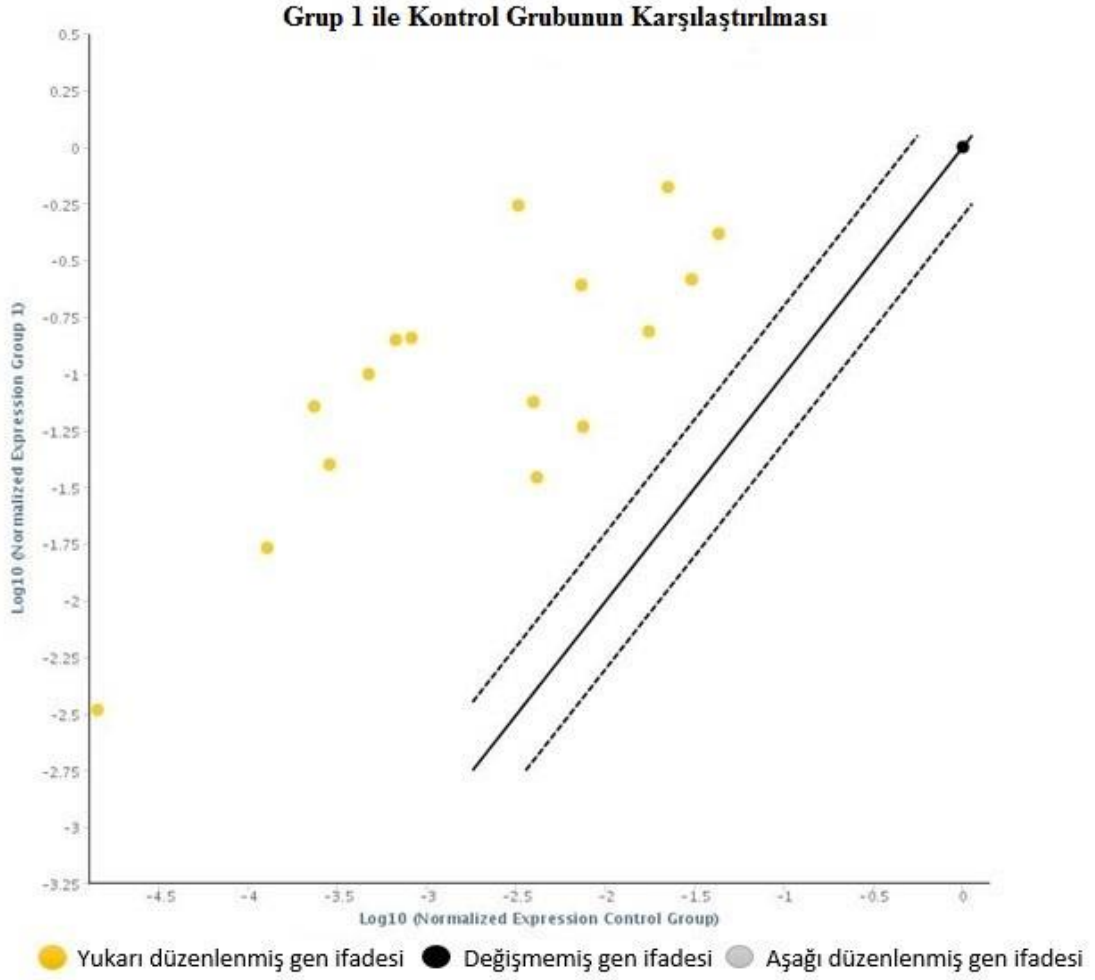
Şekil 4. 26. IL-1 β ile tetiklenen Caspase-9 geni ifade düzeyi değişimleri. T48 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.



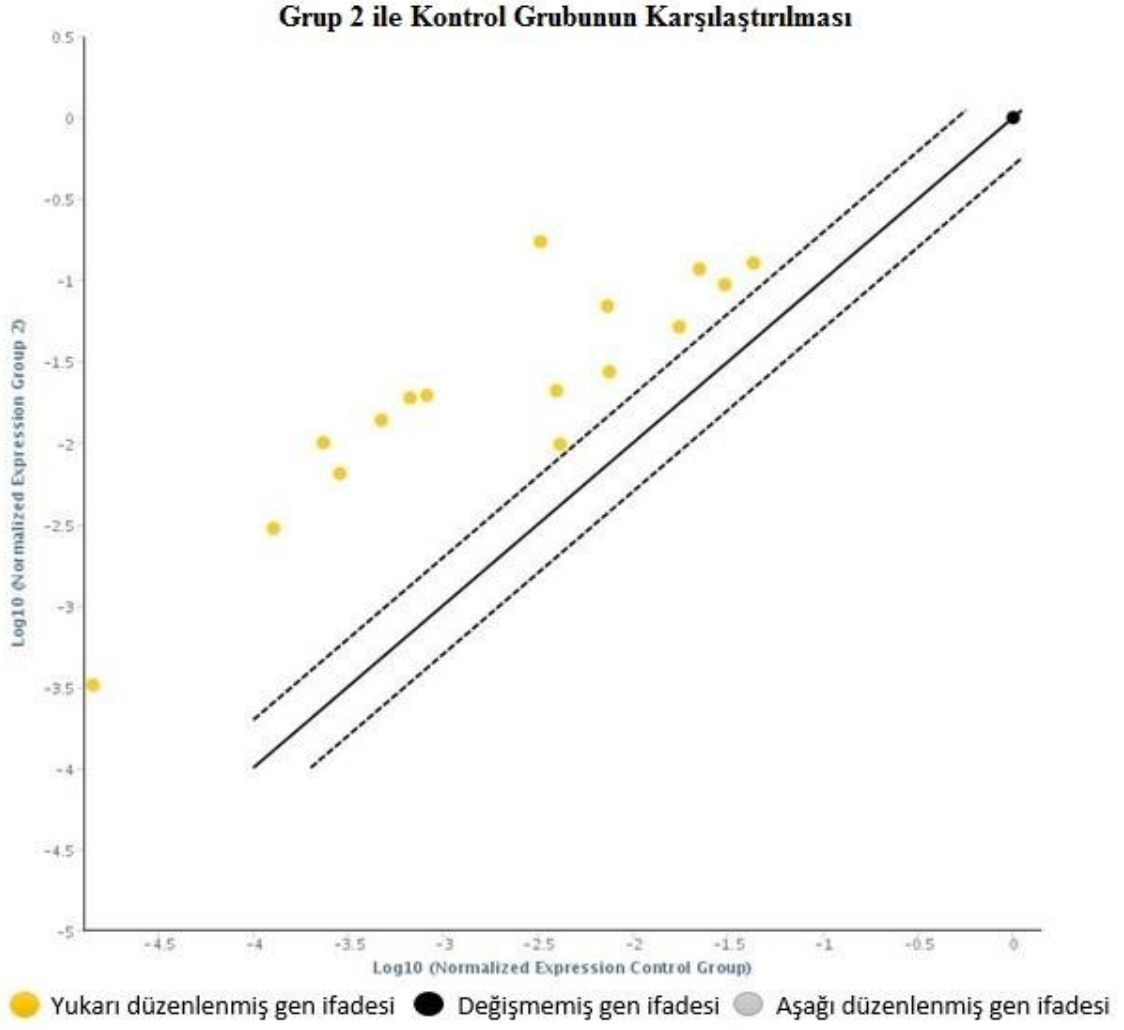
Şekil 4. 27. IL-1 β ile tetiklenen Caspase-9 geni ifade düzeyi değişimleri. T72 süreleri için hFOB1.19 hücre hattının gen ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak katlı değişim (Fold Change) olarak gösterilmiştir.



Şekil 4. 28. UCMA, MGP, UTS2 ve apoptozis genlerinin ifade düzeyi değişimlerinin karşılaştırması. IL-1 β ile uyarılan hFOB1.19 hücre hatlarında, bizim uyguladığımız dozlara bağlı olarak Caspase-3,8,9 gen ifade düzeylerinin tetiklenmesiyle apoptozisin uyarıldığı belirlenmiştir. Her iki doza bağlı uyarılda Caspase-8'in gen ifadesinde en fazla artış olduğu görülmüştür. Ayrıca bu apoptotik genlerin ifade düzeyleri ile UCMA, MGP ve UTS2 genlerinin ifade düzeyleri arasında aynı yönde ilişki olduğu görülmektedir.



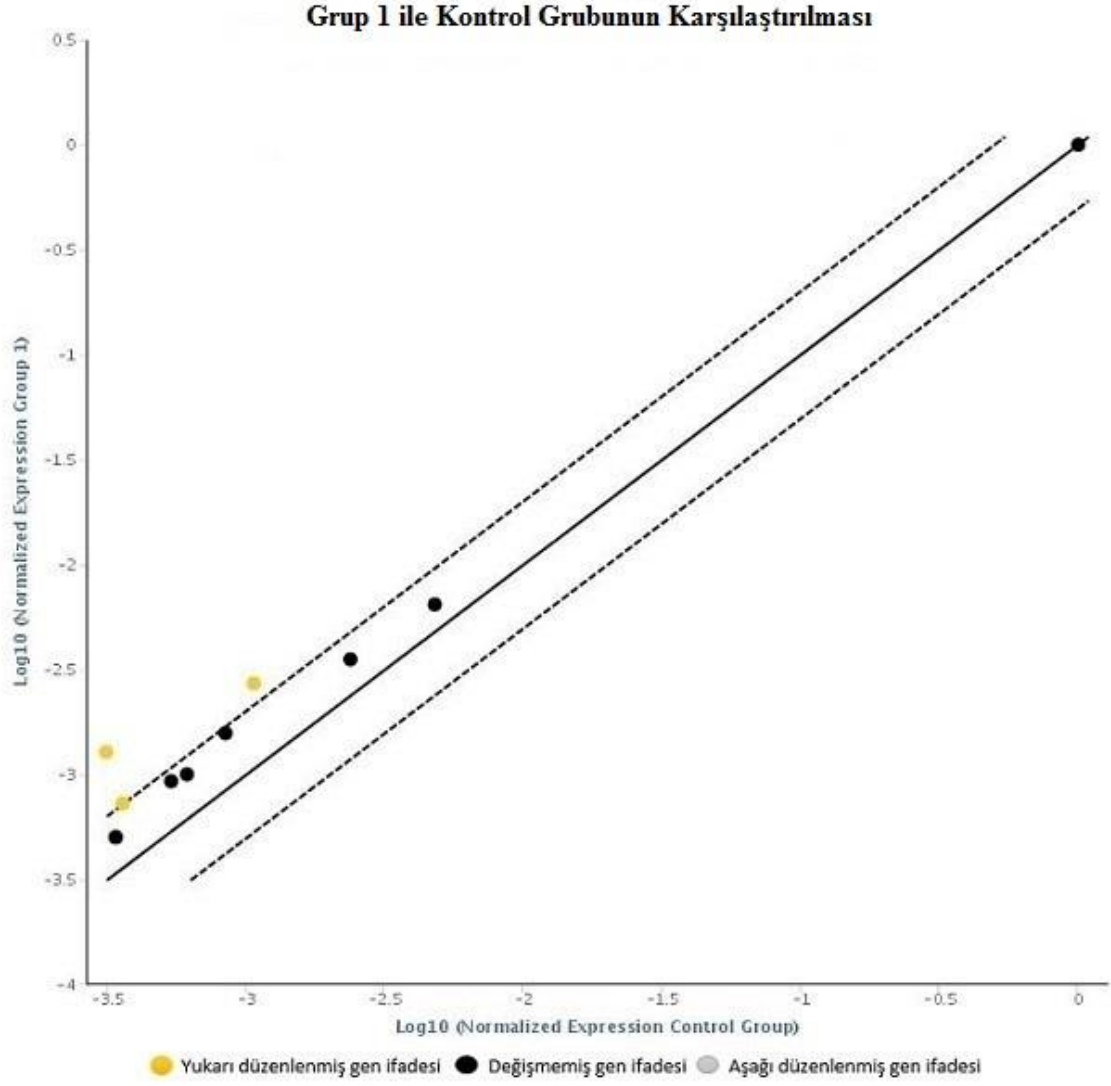
Şekil 4. 29. T48 sürelerinde tüm genlerin ifade durumu, kontrol grubu ile grup 1(5ng/ml)'in karşılaştırılması. Yukarı düzenlenmiş gen ifadesine sahip genler sarı ile değişmemiş gen ifadesine sahip gen ise siyah ile gösterilmiştir.



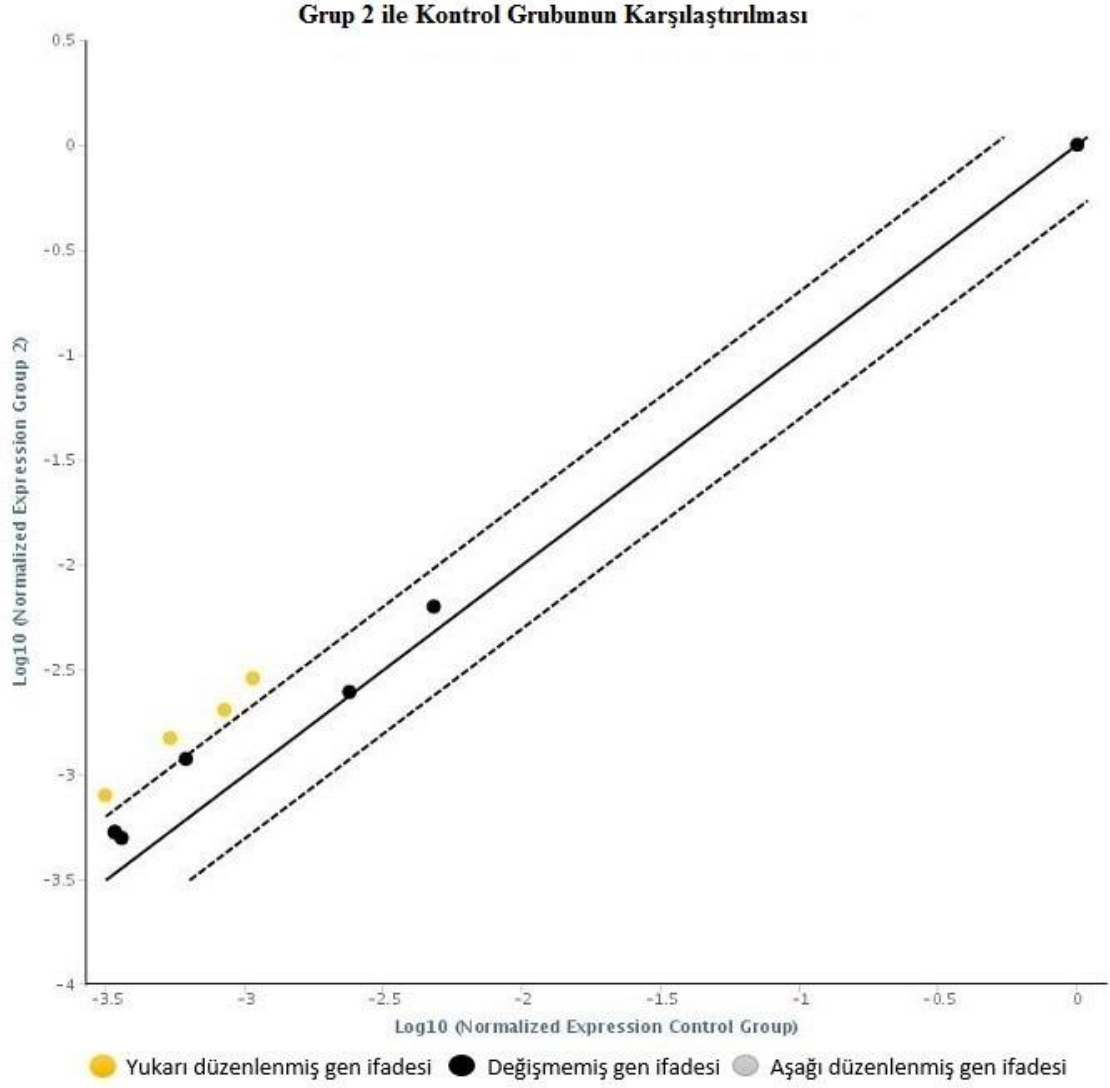
Şekil 4. 30. T48 sürelerinde tüm genlerin ifade durumu, kontrol grubu ile grup 2 (10 ng/ml)'in karşılaştırılması. Yukarı düzenlenmiş gen ifadesine sahip genler sarı ile değişmemiş gen ifadesine sahip gen ise siyah ile gösterilmiştir.



Şekil 4. 31. Gen ifadesi büyüklüğünün gruplar arasında karşılaştırılması (T48).



Şekil 4. 32. T72 sürelerinde tüm genlerin ifade durumu, kontrol grubu ile grup 1(5ng/ml)'in karşılaştırılması. Yukarı düzenlenmiş gen ifadesine sahip genler sarı ile değişmemiş gen ifadesine sahip genler ise siyah ile gösterilmiştir.

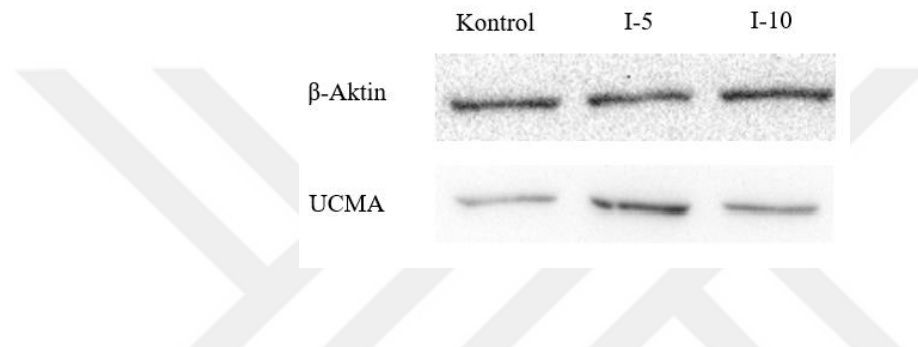


Şekil 4. 33. T72 sürelerinde tüm genlerin ifade durumu, kontrol grubu ile grup 2 (10 ng/ml)'in karşılaştırılması. Yukarı düzenlenmiş gen ifadesine sahip genler sarı ile değişmemiş gen ifadesine sahip genler ise siyah ile gösterilmiştir.

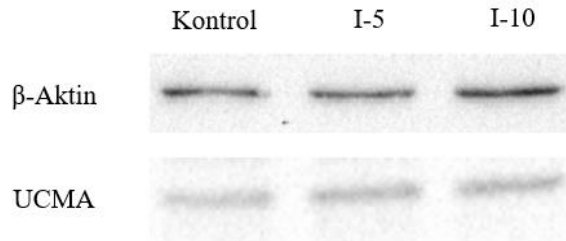
4.2. Osteoartrit Modelinde UCMA Protein Seviyeleri

4.2.1. IL-1 β ile Uyarılan hFOB1.19 Hücre Dizilerinde UCMA Protein Düzeyleri

Farklı dozlarda (5 ng/ml, 10 ng/ml) IL-1 β ile uyarılan hFOB1.19 hücreleri 48 ve 72 saatlik süreler sonunda kültür kaplarından protein eldesi gerçekleştirilerek Western Blot analizi yapıldı. 5 ng/ml IL-1 β ile 48 saat boyunca uygulama yapılan grupta UCMA protein seviyeleri kontrole göre anlamlı bir şekilde arttığı bulundu (Şekil 4.34). Ancak 72 saat boyunca uygulama yapılan grupta IL-1 β 'nin her iki dozu için anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Şekil 4.35).



Şekil 4. 34. IL-1 β ile uyarılan hFOB1.19 hücrelerinde 48 saatlik sürenin sonundaki UCMA protein ifadelerinin karşılaştırılması. Sadece 5 ng/ml ile uyarılan grupta artış olduğu görülmektedir. (I-5: 5 ng/ml IL-1 β ile uyarılan grup, I-10: 10 ng/ml IL-1 β ile uyarılan grup).



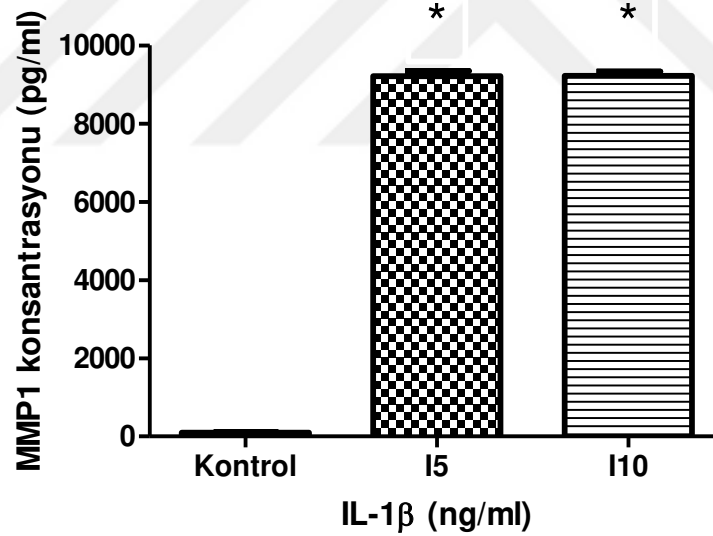
Şekil 4. 35. IL-1 β ile uyarılan hFOB1.19 hücrelerinde 72 saatlik sürenin sonundaki UCMA protein ifadelerinin karşılaştırılması. UCMA protein düzeyleri tüm gruplarda benzerdi. (I-5: 5 ng/ml IL-1 β ile uyarılan grup, I-10: 10 ng/ml IL-1 β ile uyarılan grup).

4.3. Pro-enflamasyonun hFOB1.19 Hücrelerinin Salgısı Üzerine Etkileri

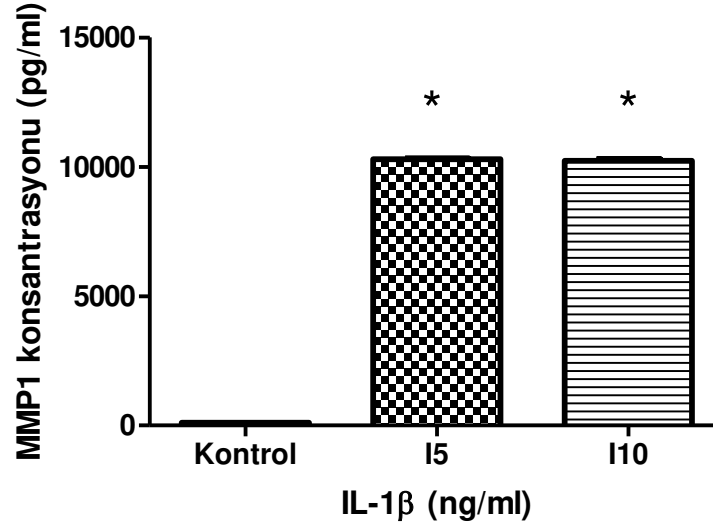
Hücre kültürü deneylerinde hFOB1.19 hücreleri belirlenen doz ve sürelerde IL-1 β ile uyarıldıktan sonra hücre süpernatantları (üst fazları) alınıp ELISA kitleri kullanılarak MMP1, OPG, IL-17 protein seviyeleri analiz edilmiştir.

4.3.1. IL-1 β ile Uyarılmanın MMP1 Protein Düzeyleri Üzerine Etkisi

OA gelişiminde ve kemik yıkımdan rol alan MMP-1 (Matrix metalloproteinase-1)'ın IL-1 β ile tetiklendiği çalışmamızda gösterilmiştir. IL-1 β ile uyarılan hFOB1.19 hücrelerinin süpernatantlarında MMP1 (Matrix metalloproteinase-1) protein seviyeleri T48 süreleri için şekil 4.36'da gösterilmiştir. 5 ng/ml ve 10 ng/ml IL-1 β verilen grupta MMP1 protein seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur ($P<0.01$). T72 süreleri için MMP1 protein seviyeleri ise şekil 4.37'de gösterilmiştir ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında T48'e paralel olarak her iki grupta anlamlı bir artış bulunmuştur ($P<0.01$).



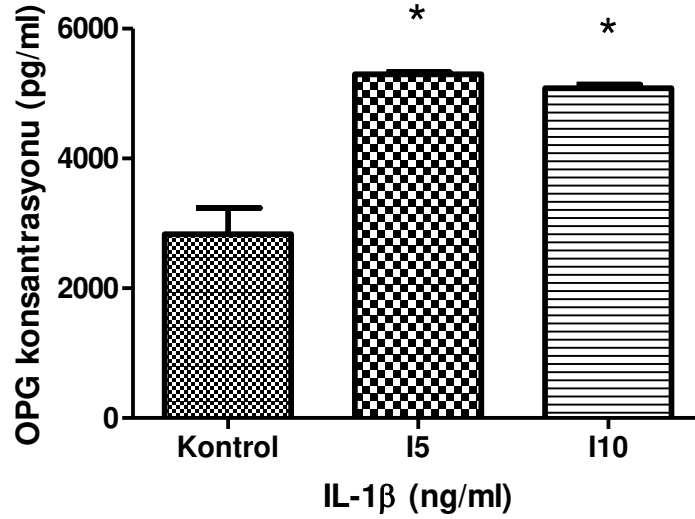
Şekil 4. 36. MMP1 protein seviyelerinin karşılaştırılması. T48 süreleri için hFOB1.19 hücrelerinin MMP1 salgılarının karşılaştırılması şekilde gösterilmektedir. 5 ve 10 ng/ml IL-1 β ile uyarılmanın hücrelerde MMP1 salgısı açısından benzer bir etkiye sahip olduğu görülmektedir.



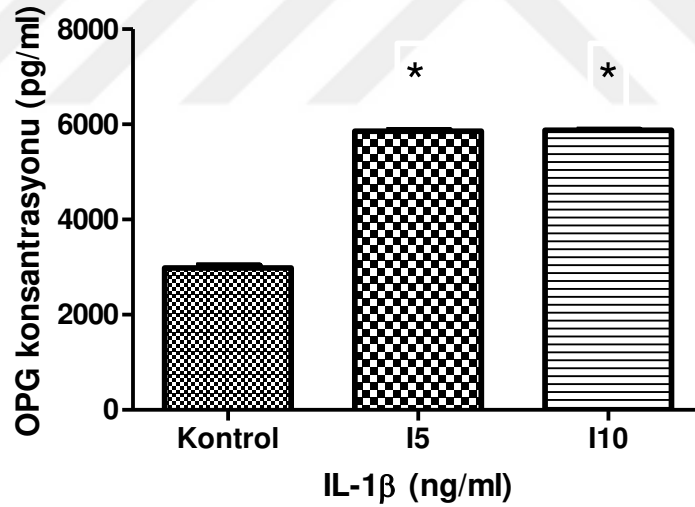
Şekil 4. 37. MMP1 protein seviyelerinin karşılaştırılması. T72 süreleri için hFOB1.19 hücrelerinin MMP1 salgılarının karşılaştırılması şekilde gösterilmektedir. 5 ve 10 ng/ml IL-1 β ile uyarılmanın hücrelerde MMP1 salgısı açısından benzer bir etkiye sahip olduğu görülmektedir.

4.3.2. IL-1 β ile Uyarılmanın OPG Protein Düzeyleri Üzerine Etkisi

IL-1 β ile uyarılan hFOB1.19 hücrelerinin süpernatantlarında OPG (Osteoprotegerin) protein seviyeleri T48 süreleri için şekil 4.38’de gösterilmiştir. 5 ng/ml ve 10 ng/ml IL-1 β verilen grupta OPG protein seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur ($P<0.01$). T72 süreleri için OPG protein seviyeleri ise şekil 4.39’da gösterilmiştir ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında T48’e paralel olarak her iki grupta anlamlı bir artış bulunmuştur ($P<0.01$).



Şekil 4. 38. OPG protein seviyelerinin karşılaştırılması. T48 süreleri için hFOB1.19 hücrelerinin OPG salgılarının karşılaştırılması şekilde gösterilmektedir. 5 ve 10 ng/ml IL-1 β ile uyarılmanın hücrelerde OPG salgısı açısından benzer bir etkiye sahip olduğu görülmektedir.

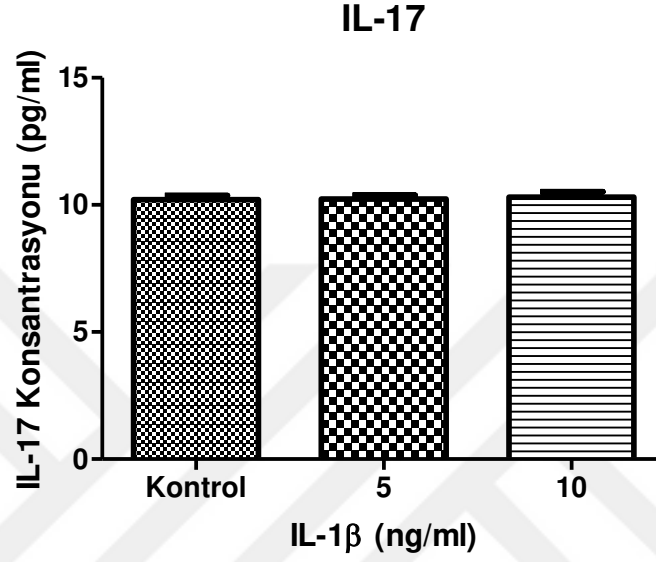


Şekil 4. 39. OPG protein seviyelerinin karşılaştırılması. T72 süreleri için hFOB1.19 hücrelerinin OPG salgılarının karşılaştırılması şekilde gösterilmektedir. 5 ve 10 ng/ml IL-1 β ile uyarılmanın hücrelerde OPG salgısı açısından benzer bir etkiye sahip olduğu görülmektedir.

4.3.3. IL-1 β ile Uyarılmanın IL-17 Protein Düzeyleri Üzerine Etkisi

Enflamatuvar (yangısal) bir sitokin olan IL-17 kemik metabolizmasında önemli rol oynamaktadır. Çalışmamızda, oluşturduğumuz *in vitro* OA modelinde IL-17'nin IL-1 β

ile tetiklenmediği görülmüştür. IL-1 β ile uyarılan hFOB1.19 hücrelerinin süpernatantlarında IL-17 (Interleukine-17) protein seviyeleri T48 süreleri için şekil 4.40'da gösterilmiştir. 5 ng/ml ve 10 ng/ml IL-1 β verilen grupta IL-17 protein seviyeleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($P>0.05$).



Şekil 4. 40. IL-17 protein seviyelerinin karşılaştırılması. T48 süreleri için hFOB1.19 hücrelerinin IL-17 salgılarının karşılaştırılması şekilde gösterilmektedir. 5 ve 10 ng/ml IL-1 β ile uyarılmanın hücrelerde herhangi bir anlamlı değişikliğe neden olmadığı görülmektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Osteoartrit (OA) dünyada en yaygın görülen dejeneratif eklem hastalığıdır (1). Bu hastalık hayat kalitesinin düşmesine ve sağlık harcamalarının artmasına neden olmaktadır (1-3). OA gelişmiş ülkelerde fiziksel özürlülüğün en önemli nedenidir ve sıklığının 2020 yılına kadar iki katına çıkacağı tahmin edilmektedir (1-3).

İlk kez ‘*Sturgeon (mersin balığı)*’ balığının kalsifiye (kalsiyum içeren) kıkırdağında keşfedilen Gla-rich protein (GRP, Gla-zengin protein) veya Upper Zone of Growth Plate and Cartilage Matrix Associated (UCMA, Büyüme tabakasının üst bölgesi ve kıkırdak matriksi ile ilişkili protein), K vitaminine bağımlı protein ailesinin en yeni üyelerinden biridir. UCMA/GRP kalsiyum mineraline yüksek bağlanma eğilimli ve 16 Gla kalıntısı barındıran bir proteindir (13, 20, 250). UCMA’nın moleküler işlevi henüz tam olarak bilinmemekle beraber OA’da enflamatuvar (yangılı) ve kalsifikasyon süreçleriyle ilişkili mediyatör (aracı molekül) olabileceği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında, bildiğimiz kadarıyla ilk defa hFOB1.19 (insan osteoblast hücresi) hücre hatları kullanarak UCMA’nın osteoartritte moleküler hedef olma durumunu inceledik. Bu kapsamda, *in vitro* osteoartrit modeli oluşturduğumuz hFOB1.19 hücre hatlarında, UCMA geni ve bazı OA ile ilişkili genler üzerinde analizler yaptık.

T48 süresi ve sırasıyla 5 ve 10 ng/ml dozlarında IL- β ile uyarılan hFOB1.19 hücre hattında, UCMA geni ifade düzeyinin kontrol grubuna kıyasla sırasıyla 308 ve 43 kat arttığını belirledik (Şekil 4.1). *In vitro* OA modelinde, gen ifade analizini yaptığımız tüm genler arasında en fazla artışı UCMA geninde tespit ettik. Hipotezimizi destekler nitelikte olan bu bulgu aynı zamanda UCMA’nın OA’da güçlü bir moleküler hedef olabileceğinin göstergesidir. Cavaco ve ark. (2016) yaptıkları bir çalışmada, UCMA’nın OA’da enflamatuvar (yangılı) ve kalsifikasyon süreçleriyle ilişkili mediyatör (aracı molekül) olabileceğini ifade ettiler (14). Araştırmacılar, OA’lı eklem kıkırdağı ve sinoviyum hücrelerinde UCMA/GRP’nin ifade düzeylerinde normale göre anlamlı düzeyde artış olduğunu gösterdiler (14). OA’da eklem kıkırdağı, sinoviyum ve kemik gibi tüm eklem bölgesi etkilenmektedir (5).

Cavaco ve arkadaşlarının (2016) yaptıkları çalışmadan farklı olarak bizim çalışmamızda, subkondral kemik ile ilişkili olarak osteoblast hücre hattında UCMA geni ifade düzeyini inceledik. Dolayısıyla, bu tez çalışması bildiğimiz kadarıyla ilk defa OA'dan etkilenen subkondral kemikteki UCMA'nın rolü ile ilgili önemli bilgiler sunmaktadır.

Cavaco ve ark. (2016) UCMA'nın enflamatuvar (yangısal) rolünü değerlendirmek için sinoviyosit ve kondrosit hücrelerini IL-1 β ile uyardılar. Daha sonra, UCMA ve bazı OA ile ilişkili genlerin (COX2 ve MMP13) ifade düzenini incelediklerinde, uyarıldıktan 3 saat sonra bu genlerin ifade seviyelerinin en yüksek düzeyde olduğunu, 6. saatten itibaren 72. saate kadar ise kontrole göre aşamalı bir şekilde azaldığını belirlediler (14). Benzer şekilde çalışmamızda, osteoblast hücreleri IL-1 β ile uyarıldıktan sonra 48. saatte UCMA ve OA ile ilişkili genler (RANKL, MMP1, OPG, MGP, OC, OPN) en yüksek seviyede ifade edilirken 72. saatte ise bu gen ifade düzeyleri azalmıştı. Daha önce yapılmış çalışmalar ve bizim çalışmamız göz önünde bulundurulduğunda, IL-1 β ile uyarılma, OA'dan etkilenen 3 önemli hücre grubunda (osteoblast, kondrosit, sinoviyosit) benzer bir etki gösterdiği söylenebilir. Deneylerimizde, UCMA ve yangı ile tetiklenen belirteçler arasında yüksek düzeyde benzer gen ifade düzeni bulunmaktadır. Bu durum özellikle UCMA'nın yangı ile tetiklenerek OA'da rol alabileceğini akla getirmektedir.

Rafael ve arkadaşları (2014) yaptıkları bir çalışmada, OA'lı kıkırdak ve sinoviyal zar dokularında UCMA transkriptlerinin ifade analizini yaptılar. UCMA-F1 transkriptinin her iki (kıkırdak ve sinoviyal zar) OA'lı dokuda F5 transkriptinden daha fazla ifade edildiğini, F5 transkriptinin ise F1'den her iki dokuda daha az ifade edildiğini gösterdiler (9). Bu çalışmada F1 varyantının daha baskın olduğu vurgulanmaktadır (9).

Vieagas ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda UCMA'nın hücre dışı matrikste kalsiyum kullanılabilirliğinde düzenleyici olabileceğini belirtmektedirler (256, 265). Bununla birlikte, UCMA ile ilgili literatürde bazı çelişkili veriler de bulunmaktadır. Eitzinger ve arkadaşları (2012) yaptıkları bir çalışmada, UCMA'nın özellikle fare iskelet dokularındaki işleviyle ilişkili olarak, UCMA yok edilmiş farelerin kemik ve kıkırdağında belirgin bir fenotipik değişiklik olmadığını gözlemlemişlerdir (253). Oysa Neacsu ve arkadaşları (2011) zebra balığı üzerinde yaptıkları çalışmalarında, UCMA'nın iskelet gelişimi ve kalsifikasyon için gerekli olduğunu göstermişlerdir (251).

UCMA gibi MGP (Matriks Gla-zengin protein) ve BGLAP/OC (Osteokalsin)'de vitamin K bağımlı protein ailesinin üyeleridir (14). Oluşturduğumuz *in vitro* OA modelinde, MGP ve BGLAP seviyelerini kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığını bulmuştuk (Şekil 4.3-4 ve Şekil 4.8-9). T48 sürelerinde 5-10 ng/ml IL-1 β ile uyarılan hFOB1.19 hücrelerinde MGP'nin gen ifade düzeyleri sırasıyla 176 ve 24 kat arttığı görüldü. Benzer şekilde, BGLAP'ın gen ifade düzeylerinin de sırasıyla 8.4 ve 2.3 kat arttığı belirlenmiştir. Vitamin K bağımlı protein sınıfının üyeleri olan UCMA, MGP ve BGLAP'ın gen ifade düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon (aynı yönde ilişki) olduğu çalışmamızda gösterilmiştir. Ayrıca, çalışmamızda bu 3 genin ifade düzeyleri arasında en fazla artış UCMA geninde gözlemlendi (Şekil 4.19 ve 4.22). UCMA'nın yanı sıra, MGP ve BGLAP seviyelerinin eklem kıkırdağı ve sinoviyal hücrelerde OA gelişimine katkı sağlayan kalsifikasyona bağlı olarak arttığı gösterilmiştir (14). Yapılan farklı bir çalışmada, UCMA aşırı gen ifadesi olan osteoblastlarda, BGLAP gen ifade seviyelerinin de yukarı düzenlenim gösterdiği ve her iki genin ifade düzeninin birbirine benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (266). Bu veriler bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulguları (Şekil 4.19) destekler niteliktedir. Benzer şekilde, bizim çalışmamızda, IL-1 β ile tetiklenmiş UCMA gen ifadesine paralel olarak BGLAP gen ifade düzeyleri yükseldi (Şekil 4.8-9). Bununla birlikte, UCMA'nın BGLAP gen ifade seviyesini doğrudan artırıp artırmadığı konusu henüz netlik kazanmamıştır (266). Farklı bir çalışmada ise, γ -karboksilasyonu zayıflamış MGP'nin OA'lı kıkırdağın artmış mineralizasyonu ile ilişkilendirilmiştir (267). Bununla birlikte, serum ve sinoviyal sıvıda karboksillenmiş MGP seviyeleri artrit için olası yangısal belirteç olabileceği vurgulanmaktadır (268). Yaptığımız analizler sonucunda, tıpkı UCMA gibi MGP'nin de OA için güçlü bir moleküler hedef olabileceğini söyleyebiliriz.

BMP uyarı yolağı osteogenezin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (269) . Ek olarak, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda BMP'nin osteoblast ve osteoklast etkinliğini düzenleme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (247). Fukui ve arkadaşları (2003) OA'lı kondrositlerde BMP-2 mRNA seviyelerinde artma olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, yaptıkları hücre kültür deneylerinde BMP-2 seviyelerinin IL-1 β ile tetiklenebileceğini tespit ettiler (270). Çalışmamızda, hFOB1.19 hücrelerini IL-1 β ile uyardığımızda, BMP-2 ve BMP-7'nin gen ifade seviyelerinin anlamlı düzeyde arttığını gözlemledik (Şekil 4.17-18). T48 sürelerinde, BMP-2 mRNA seviyeleri 5-10 ng/ml derişimleri için sırasıyla 231 ve 23 kat arttığını belirledik (Şekil 4.17). T48 sürelerinde

BMP-7 mRNA seviyelerini ise 5-10 ng/ml derişimleri için sırasıyla 134 ve 23 kat arttığını belirledik (Şekil 4.18). Bu bulgular göz önünde bulundurulduğunda, hem kondrosit hem de osteoblast hücre grubunda BMP-2 ve BMP-7'nin IL-1 β aracılı osteoartrit gelişiminde rolü olabileceği söylenebilir. Öte yandan, BMP osteoblastlarda RUNX2, OSX gibi bir dizi transkripsiyon faktörünü hedefler (271). RUNX2 ve OSX kemik oluşumunda rol alan temel transkripsiyon faktörleridir (266). Çalışmamızda, T48 sürelerinde ve 5-10 ng/ml IL-1 β dozlarında RUNX2 seviyelerini sırasıyla 8.8 ve 2.9 kat arttığını (Şekil 4.20), OSX için artışın ise sırasıyla 139 ve 22 kat (Şekil 4.21) olduğunu belirlemiştik. Burada, RUNX2 ve OSX gen ifade artışlarının IL-1 β 'nin doğrudan doğruya mı yoksa BMP-2 aracılı olarak mı gerçekleştirdiği konusunun aydınlatılması için ileri çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak, osteogenez sırasında BMP-2'nin OSX'in yukarı düzenleniminden sorumlu olduğu bilinmektedir (20). Bu durumda, OSX gen ifade artışının BMP-2 aracılı olduğunu düşünebiliriz.

Surmann-Schmitt ve arkadaşları (2007) yaptıkları çalışmalarında, UCMA'nın osteoblast farklılaşmasının erken aşamalarında ifade edildiğini ve osteogenik farklılaşmanın olumsuz düzenleyicisi olarak fonksiyon gösterdiğini rapor ettiler (20). İlginç bir şekilde, Lee ve arkadaşlarının (2015) yaptıkları bir çalışmada, RUNX2 ve OSX'in doğrudan transkripsiyonel hedefi olan UCMA'nın osteoblast farklılaşması ve kemik oluşumunda uyarıcı bir faktör olduğunu gösterdiler (266). Lee ve arkadaşları, MC3T3-E1 (fare, kemik Preosteoblast hücre hattı) hücre hatlarındaki çalışmalarında, farklılaşmanın ileri aşamalarında UCMA gen ifadesinde artış gözlemlediler (266). Farklılaşmanın erken aşamalarında RUNX2 ve OSX'in gen ifadesinin yukarı düzenlenimine rağmen UCMA gen ifadesi oldukça düşüktü (266). Bu bulgular ne RUNX2'nin ne de OSX'in tek başına farklılaşmanın erken aşamalarında UCMA gen ifadesinin artışı için yeterli olmadığını göstermektedir (266). Aynı çalışmada, RUNX2 ve OSX yok edilmiş farelerde UCMA gen ifadesinin anlamlı düzeyde azaldığı gösterilmiştir (266). Araştırmacılar, UCMA gen ifadesinin RUNX2 ve OSX tarafından nasıl düzenlendiğini analiz etmek için, MC3T3-E1 (fare, kemik Preosteoblast hücre hattı) RUNX2, OSX ve her ikisini birlikte kodlayan vektörler ile transfekte ettiler (266). Elde edilen sonuçlara göre UCMA gen ifadesi RUNX2 ve OSX ile ayrı ayrı aşırı ifade edilmiş osteoblastlarda artmıştı (266). Buna ek olarak, her iki genin (RUNX2 ve OSX) birlikte aşırı ifade edildiği osteoblastlarda UCMA gen ifadesi artmıştır (266). Bu sonuçlar MC3T3-E1 hücre hatlarında, RUNX2 ve OSX'nin birlikte UCMA gen ifadesini düzenlediğini göstermektedir (266). Bu

Çalışmalardan farklı olarak bizim çalışmamızda, hFOB1.19 hücre dizilerinde UCMA, RUNX2 ve OSX gen ifade düzeylerinin IL-1 β ile tetiklenebileceğini gösterdik (şekil 4.22).

Ancak, daha önce yapılmış bir farklı bir çalışmada, UCMA'nın OSX'in yukarı dzenleniminden sorumlu olan BMP-2 proteini tarafından baskılandığı ifade edilmiştir (20). Bu tartışmalı veriler, UCMA'nın moleküler mekanizmasının anlaşılması için bu konuda ileri çalışmaların yapılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Osteopontin (OPN) hücre dışı yapısal bir proteindir ve kemik hücrelerinde (osteoblast, preosteoblast) gen ifadesi bulunmaktadır (272, 273). OPN mineralizasyon, kemik morfogenezi, yangı gibi pek çok hücresel süreçte rol aldığı daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (274). Çalışmamızda, T48 sürelerinde OPN gen ifade düzeylerini 5 ve 10 ng/ml derişimleri için sırasıyla 19 ve 5.3 kat arttığını bulmuştuk. hFOB1.19 hücre hatlarında belirlediğimiz bu bulgular (şekil 4.10) daha önce farklı hücre hatlarında yapılan çalışmalara benzerlik göstermektedir. Fibroblast benzeri sinoviyosit hücrelerinde, mineralizasyonun tetiklenmesiyle OPN gen ifade düzeylerinin arttığı gösterilmişti. Aynı alışmada, UCMA, MGP ve BGLAP ifade düzeni OPN gen ifade seviyelerindeki artışa benzerlik göstermekteydi (14). Öte yandan, osteoblast farklılaşma süreçlerinin incelendiği farklı bir çalışmada, aşırı ifade edilmiş UCMA içeren hücrelerde OPN gen ifade seviyelerinin artmış olduğu gösterilmiştir (266). Çalışmamızda, osteoblast hücreleri için önemli bir gen olan OPN'nin hFOB1.19 hücre hatlarında IL-1 β ile tetiklenebileceğini ve bu gen ifade düzeninin UCMA'ya benzerlik gösterdiği ilk defa belirlenmiştir.

rotensin II (UTS-2) en güçlü damar bzc ajanlardan biri olarak bilinmektedir (275). Sinoviyal fibrozis OA'nın başlıca sonuçlarından biridir (276). Bazı alışmalarda, UTS2'nin kardiyovasküler sistem, akciğerler ve karaciğerde TGF- β uyarılmasıyla fibrozise neden olabileceği ifade edilmektedir (277-280). Daha nce OA'lı hastaların sinoviyal sıvılarında UTS2 seviyelerini normal sağlıklı gruba göre anlamlı seviyede yüksek olduğunu bulmuştuk (276). OA ile UTS2'nin arasındaki ilişkiyi ilk defa inceleyen bu çalışmadaki bulgularımız UTS-2'nin OA'daki sinoviyal fibroziste rol alabilecek moleküler bir hedef olduğunun önemli göstergesiydi. Çalışmamızda, hFOB1.19 hücrelerini IL-1 β ile uyardığımızda, UTS2'nin gen ifadesinin 5 ve 10 ng/ml derişimlerinde sırasıyla 211 ve 28 kat arttığını tespit etmiştik. Ayrıca, analizini yaptığımız OA ile ilişkili genler arasında UTS2, UCMA'dan sonra gen ifadesinde en fazla artışı

gösteren genlerden biriydi (Şekil 4.22). Bu bulgular bize UTS2'nin yangısal süreçlerle ve OA gelişiminin moleküler mekanizması ile ilgili güçlü bir moleküler hedef olabileceğini düşündürmektedir.

NF- κ B (Nükleer Faktör kappa B) iskelet gelişiminde, osteoblast ve osteoklast işlevlerinde ve yaygın kemik hastalıklarında rol alan yazılım etmeni (transkripsiyon faktörü) ailesidir (188, 190). Özellikle mekanik stres veya sitokinlerle uyarılan kondrosit ve sinoviyosit hücreleri TNF- α , IL-1 β , IL-6 gibi sitokinler salgırlar. Bu sitokinler, osteoblast hücrelerinden osteoklastogenezele ilgili NF- κ B yazılım etmenlerini etkinleştirir ve RANKL salınımını tetikler (281, 282). Etkinleşmiş NF- κ B molekülleri kemik erimesine yol açan IL-1 β , IL-6, PGE2 gibi birkaç osteoklastogenik etmenin ifadesini uyarır (283, 284). Çalışmamızda, hFOB1.19 hücrelerini IL-1 β ile uyardığımızda NF- κ B gen ifade düzeylerini T48 sürelerinde sırasıyla 5-10 ng/ml derişimleri için 7.8 ve 3.6 kat arttığını tespit etmiştik (Şekil 4.6). T72 sürelerinde ise sırasıyla 5-10 ng/ml derişimleri için 4 ve 2.5 kat arttığını görmüştük (Şekil 4.7). Daha önceki çalışmaları destekler nitelikteki bu bulgular çalışmamızdaki yangının tetiklenmesi ve *in vitro* OA modelinin oluşturulmasını teyit etmek açısından önemliydi. NF- κ B uyarı yolağı osteoklastlardan daha az osteoblastlarda çalışılmıştır (190). Ayrıca, daha önce yapılan çalışmalarda, uyarılmış NF- κ B molekülleri kırıldak yıkımına ve artmış sinoviyosite neden olan çeşitli sitokin ve kemokinleri (IL-1 β , IL-6, TNF- α , RANKL, IL-8), damarlanma etkenlerini (VEGF, FGF-b) ve yıkıcı enzimlerin (MMP1-13, ADAMTS4, ADAMTS5) salınımını uyardığı rapor edilmiştir (183).

Güncel çalışmalarda, OA'lı subkondral kemikte gözlenen değişikliklerle OPG (Osteoprotegerin) / RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor) / RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor Ligand) sistemi arasında yakın bir ilişki olduğu vurgulanmaktadır (285). Eklem iç dengesi OPG/RANK/RANKL uyarı yolağı ile düzenlenmektedir ve OA sürecinde bu yolağın düzenlenmesi bozulmaktadır (285). Osteoartritli hastalardan elde edilen osteoblastlarda OPG ve RANKL'nin normal olmayan ifadesi rapor edilmiştir (285). Çalışmamızda, hFOB1.19 hücrelerinde RANKL gen ifadesini kontrole göre T48 sürelerinde sırasıyla 5-10 ng/ml derişimleri için 211 ve 29 kat arttığını bulmuştuk (Şekil 4.12). T72 sürelerinde ise 5-10 ng/ml derişimleri için 1.7 ve 2.7 kat arttığını belirlemiştik (Şekil 4.13). Elde ettiğimiz bu bulgular literatürle uyum göstermektedir. Özellikle kondrosit ve sinoviyosit hücrelerinden salgılanan IL-1 β , TNF- α gibi sitokinler osteoblast hücrelerinden RANKL salınımını tetikler (281, 282).

RANKL, RANK'a bağlanarak NF- κ B transkripsiyon faktörlerini etkinleştirir (281, 282). Etkinleşen NF- κ B molekülleri çeşitli osteoklastogenik faktörlerin salınımını tetikler (283, 286). Öte yandan, hFOB1.19 hücrelerinde OPG gen ifadesini kontrole göre T48 sürelerinde sırasıyla 5-10 ng/ml derişimleri için 33 ve 9 kat arttığını belirlemiştik (Şekil 4.14). Benzer şekilde, OPG seviyelerindeki artışı hücre süpernatantlarında (üst fazlarında) da belirledik (Şekil 4.38-39). RANK/RANKL arasındaki etkileşimi düzenleyen OPG tuzak reseptörü RANKL'yi baskılayarak kemik oluşumunu teşvik etmektedir (287). OA'da OPG/RANKL oranında azalma görülür. Böylelikle, subkondral kemik, aşırı osteoklast etkinliğine neden olarak osteoartrit ilerlemesine katkı sağlayan kemik erimesi ve subkondral yoğunluk artar (25, 288-290). Gen ifade analizleri sonucunda çalışmamızda, daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu olarak OPG/RANKL oranında azalma olduğunu tespit ettik. Ayrıca, osteoklastogeneizde etkin bir şekilde rol oynayan RANKL'nin gen ifade düzeylerini UTS2'nin gen ifade düzeylerine çok yakın olduğu hFOB1.19 hücrelerinde ilk defa bu çalışmada gösterilmiş oldu (Şekil 4.19 ve Şekil 4.22). IL-1 β ile uyarılmanın akabinde gen ifadesi en fazla tetiklenen genlerden biride RANKL oldu. Çalışmamızda, gen ifadesi UCMA'dan sonra en yüksek seviyede anormal artış gösteren genler RANKL ve UTS2 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.19 ve Şekil 4.22). IL-1 β , OA gelişiminde rol alan anahtar sitokinlerden biridir (291). IL-1 β kırıkta yıkımına neden olan matriks metallo proteazlar ve diğer enzimlerin sentezini tetiklemektedir (292). Matriks metalloproteinaz 1 (MMP-1)'in OA gelişimi ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (293, 294). Zayed ve arkadaşlarının (2008) yaptıkları bir çalışmada insan osteoartritli kondrositlerinde IL-1 β ile MMP-1 uyarıldığını gösterdiler. Çalışmamızda, IL-1 β ile uyarılan hFOB1.19 hücrelerindeki MMP-1 gen ifade düzeylerinde anlamlı seviyede artış olduğu görüldü (Şekil 4.16). Benzer şekilde, MMP-1 protein seviyelerindeki artışı hücre üst fazlarında belirledik (Şekil 4.36 ve Şekil 4.37). Yapılan çalışmalarda osteoblast hücreleri kemik matriks yıkımının yangısal silsilesinde doğrudan rol aldığı ifade edilmiştir (295). Tip I kollajen, kemik hücre dışı matriksinin birincil organik bileşenidir ve osteoblastların farklılaşması için gereklidir (296-300). Kollajenazlar arasında, MMP-1 tip I kollajenin yıkımında rol alan temel bir enzimdir (301, 302). Elde ettiğimiz bulgular daha önce yapılan çalışmaları destekler niteliktedir. IL-1 β 'nın MMP-1 aracılı kemik yıkımında rol alabileceğini söyleyebiliriz.

Eklem bölgesi hücrelerindeki (kondrosit, osteoblast ve osteosit) hücre ölümü osteoartrit gelişiminin yanı sıra iskelet gelişiminde, bakımında ve onarımında önemli rol oynadığı

daha önce yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (303). Bu tez çalışması kapsamında incelediğimiz diğer bir mekanizma osteoblast hücrelerindeki apoptozisdir. Osteoblast apoptozisi kemik gelişiminde ve bakımında önemli rol oynamaktadır (303). Bu nedenle, hFOB1.19 hücrelerinde IL-1 β ile uyarılan apoptozisde UCMA'nın rolünü inceledik. Kemik erimesinde osteoblastların neredeyse %60-80 apoptozis ile ortadan kalktığı tahmin edilmektedir (304-311). Ayrıca, cinsiyet steroid hormonu yetersizliği, glukokortikoid fazlası ve yaşlanmanın neden olduğu kemik kaybı osteoblast ve osteositlerde apoptozise katkı sağlar. Paratiroid hormon, bifosfonat ve kalsitonin osteoblast ve osteositlerde apoptozisi baskılayarak anabolik etki oluşturduğu ifade edilmektedir (304-311). Çalışmamızda apoptozis ile ilişkili olarak Caspase-3,8,9 genlerinin ifade düzeylerini inceledik. IL-1 β (5-10 ng/ml) ile uyarılan hFOB1.19 hücrelerindeki her üç geninde ifade düzeyi T48 sürelerinde kontrole göre anlamlı düzeyde arttığını bulmuştuk (Şekil 4.28). T72 sürelerinde ise herhangi bir değişiklik görülmemiştir. T48 sürelerinde Caspase-3 geni ifade düzeylerinde (5-10 ng/ml) sırasıyla 9.6 ve 2.9 kat artış olduğunu belirledik (Şekil 4.23). Caspase-8 geni ifade düzeylerinde ise (5-10 ng/ml) derişimleri için sırasıyla 29.9 ve 5.25 kat artış olduğunu tespit etmiştik (Şekil 4.25). Ayrıca, caspase-8 gen ifade analizini yaptığımız apoptotik genler arasında en fazla artışı gösterdiği hFOB1.19 hücrelerinde bildiğimiz kadarıyla ilk defa çalışmamızda belirlenmiştir. Caspase-9 geni ifade düzeylerinde ise (5-10 ng/ml) derişimleri için sırasıyla 8.6 ve 3.1 kat artış görülmüştür (Şekil 4.26). Bu bulgularımız bazı çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Ozeki ve arkadaşlarının (2002) MC3T3-E1 (Fare Preosteoblast) hücre dizilerinde yaptıkları bir çalışmada, TNF- α , IL-1 β ve interferon- γ 'dan oluşan sitokin karışımının apoptotik hücre ölümüne neden olduğunu gösterdiler (312). Bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak insan osteoblast hücre hattı yerine fare pre-osteoblast hücre hattı kullanılmıştır. Deneysel olarak da hücreler sitokin karışımı (TNF- α , IL-1 β ve IFN- γ) ile uyarılmıştır (312). Bizim çalışmamızda ise hücreler sadece IL-1 β ile uyarılmıştır. Bizim çalışmamıza göre bazı deneysel farklılıklar olsa da birden fazla sitokin bir arada apoptotik hücre ölümünü tetiklediği bulgusuna benzer şekilde bizim çalışmamızda tek bir sitokin ile apoptoz tetiklenmiştir (Şekil 4.28). Ozeki ve arkadaşlarının çalışmalarında, pro-enflamatuvar (öncü yangısal) sitokinlerin osteoblastik hücrelerde apoptozu teşvik etme kabiliyeti bazı hastalıkların başlaması ve gelişiminde etkili olabileceğini ifade etmektedirler (312).

Taburee ve arkadaşlarının (2010) yaptıkları farklı bir çalışmada, lösemik hücre hatlarında, IL-1 β ve TNF- α 'nın apoptoz uyarılması üzerine etkilerini incelediler. Lösemik hücre hatları (K562 ve HL60) çeşitli derişimlerde IL-1 β ve TNF- α ile uyarıldılar (313). Bu çalışmanın sonuçları hem IL-1 β hem de TNF- α 'nın lösemik hücre dizilerinde hücre canlılığını azalttığını ve apoptozu tetiklediğini gösterdi (313). Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz IL-1 β ile ilgili bulgulara apoptozun tetiklendiği görülmektedir (Şekil 4.28).

Tsuboi ve arkadaşlarının yaptıkları (1999) bir çalışmada, FAS aracılı apoptoz üzerine TNF- α , IL-1 β ve IL-6'nın etkilerini incelediler (314). Araştırmacılar, insan osteoblast hücresi olarak MG-63 hücre hatları ile kemik biyopsisinden elde edilen osteoblast benzeri hücreleri kullandılar (314). Çalışmalarında, IL-1 β ve TNF- α ile uyarılan hücrelerde FAS aracılı apoptoz belirgin şekilde arttığı gösterilmiştir (314). Sonuçta bu çalışmanın bulguları IL-1 β ve TNF- α 'nın osteoblastlarda apoptozu tetikleyerek osteoblast hücre sayısını düzenlediğini göstermektedir. Bizim çalışmamızda bu çalışmadan farklı olarak IL-1 β 'nın caspase-3, 8 ve 9 aracılı apoptozu tetiklediğini bulmuştuk (Şekil 4.28). Ayrıca, Tsuboi ve arkadaşları TNF- α 'nın FAS aracılı apoptozisi IL-1 β 'dan daha etkin bir şekilde artırdığı göstermişlerdir (314).

Kuzushima ve arkadaşlarının (2006) MC3T3-E1 hücre hatlarındaki yaptıkları bir çalışmada öncü yangısal sitokinlerin (TNF- α , IL-1 β ve IFN- γ) apoptozu tetiklediğini gösterdiler (315). Bu bulgular Ozeki ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma ile benzerlik göstermektedir (312). Bu çalışmalara paralel olarak yaptığımız çalışmada, hFOB1.19 hücrelerinde IL-1 β 'nın caspase 3-8-9 aracılı apoptozisi tetiklediği ve bu bulguların literatür ile uyumlu olduğu görüldü (314) .

İnterlökin 17 (IL-17) ailesi bir grup enflamatuvar (yangısal) sitokin olup hem bağışıklık hem de kemik metabolizmasında önemli rol oynadığı yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (171, 316). Eklemden IL-17'den etkilenen temel hücreler kondrositler ve fibroblast benzeri sinoviyositlerdir (317). Chen ve arkadaşlarının (2014) yaptıkları bir çalışmada, OA'lı hastaların sinoviyal sıvılarında ve serumlarında IL-17 seviyesinin arttığını ve bu artışın OA'nın radyolojik bulguları ile pozitif korelasyon (aynı yönde ilişki) gösterdiğini ifade ettiler (318). Çalışmamızda, uyguladığımız doz ve sürelerle ilgili olarak IL-1 β ile uyardığımız hFOB1.19 hücrelerinin süpernatantlarında (üst fazlarında) kontrole göre IL-17 seviyelerinde anlamlı bir farklılık bulamadık (Şekil 4.40). Şekil 4.40'da görüldüğü gibi bulgularımız hFOB1.19 osteoblast hücrelerinde IL-17'nin

salgısının IL-1 β ile tetiklenmediği anlaşılmaktadır. Elde edilen bu bulgular bize OA sürecinde IL-17'nin farklı bir mekanizma aracılığıyla tetiklendiğini düşündürmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda, IL-17'nin Romatoid artrit osteoklast aktivasyonunu ve eklem yıkımını artırdığı rapor edilmiştir (319). Bununla birlikte, IL-17'nin kemik erimesini teşvik ettiğine dair yeterli sayıda kanıt olmasına rağmen IL-17'nin kemik oluşumuna katkısı ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır (316). Huang ve arkadaşları (2009) yaptıkları bir çalışmada, IL-17'nin insan mezankimal kök hücrelerinin çoğalmasını tetiklediğini ifade ettiler (320). Ayrıca, IL-17'nin hem insan mezankimal kök hücrelerinin osteogenik farklılaşmasını hem de bu hücrelerden RANKL ve M-CSF (Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör) gen ifadesini tetiklediği gösterilmiştir (316). RANKL ve M-CSF gen ifade seviyeleri ile ilişkilmesi IL-17'nin kemik yenilenmesindeki rolüne işaret etmektedir (316). Öte yandan, MC3T3-E3 pre-osteoblast hücrelerinde yapılan çalışmalarda IL-17'nin PGE2 (Prostaglandin E2) üretimini uyardığı belirtilmektedir (321, 322). Yukarıdaki çalışmalarda belirtildiği gibi IL-17 kemik metabolizmasında etkin bir şekilde rol oynamaktadır. Bizim çalışmamızda oluşturduğumuz *in vitro* OA modelinde IL-17 seviyelerinde herhangi bir anlamlı değişiklik yoktu (Şekil 4.40).

Özetle, bu tez çalışması kapsamında bildiğimiz kadarıyla ilk defa Osteoartritli osteoblast hücre hattında UCMA'nın moleküler mekanizması araştırılmış oldu. Elde edilen sonuçlara göre, osteoblast hücre hattında UCMA gen ve protein ifadesinin IL-1 β tarafından tetiklenebileceği belirlendi. Ayrıca, oluşturulan *in vitro* OA modelinde, UCMA gibi vitamin K bağımlı protein olan MGP gen ifade düzeylerinin IL-1 β ile tetiklendiği görüldü. Benzer şekilde, OA ile ilişkili diğer genlerle (RANKL, MMP1, OPG, OPN, BGLAP) UCMA arasında aynı yönlü ilişki olduğu görüldü. OA için henüz yeni bir aday molekül olan UTS-2 gen ifade düzeylerinin IL-1 β ile tetiklenebileceği çalışmamızda ilk defa gösterilmiş oldu. Bunların dışında, osteoblast farklılaşma faktörleri (RUNX2 ve OSX/SP7) ile UCMA arasında aynı yönlü (pozitif korelasyon) bir ilişki olabileceği çalışmamızda belirlendi. Osteoblast hücre hattında apoptozisin caspase-3,8,9 aracılı IL-1 β ile tetiklenebileceği ve bu apoptotik genlerin ifade düzeyleri ile UCMA arasında aynı yönlü bir ilişki olduğu belirlendi. Oluşturduğumuz *in vitro* OA modelinde, kemik metabolizmasında etkin bir şekilde rol alan IL-17'nin ilginç bir şekilde IL-1 β uyarımından etkilenmediği belirlendi. Bu tez çalışmasında elde edilen bulgular, UCMA'nın yangısal ve OA ile ilişkili süreçlerde rol alabileceğini göstermektedir.

Yukarıda belirtildiği gibi, her ne kadar literatürde UCMA ile ilgili bazı çelişkili veriler bulunsa da (14, 251, 253), insan hastalıklarının gelişiminde özellikle OA’da UCMA’nın güçlü bir moleküler hedef olabileceğini söyleyebiliriz. Bu konuda ileri çalışmaların yapılması UCMA’nın Osteoartrit’teki olası rolünün aydınlatılmasına önemli katkılar sağlayacaktır. Bu konuda yapılacak ileri çalışmalara bazı öneriler şunlar olabilir;

- ✓ *İn vitro ve in vivo* OA modeli oluşturulduktan sonra ortama dışarıdan UCMA proteininin verilmesi ve daha sonra OA’da etkin bir şekilde rol alan uyarı yollarının incelenmesi.
- ✓ *İn vitro* OA modelinde, UCMA geninin susturulması ve sonrasında OA belirteçlerinin (SPP1, OPN, BGLAP, MMPs, RANKL, OPG) incelenmesi.
- ✓ *İn vitro* OA modelinde, UCMA’nın yangısal sitokinlerle (TNF- α , IL-6, IL-8 vb) düzenlenmesinin incelenmesi.

Sonuç olarak, bu tez çalışması OA gelişiminde UCMA’nın potansiyel değeri ile ilgili iyi bir kanıt sağlamaktadır ve OA’ya karşı yeni tedavi edici yaklaşımlar geliştirmek için UCMA’nın gelecek vaat eden bir moleküler hedef olduğunu göstermektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Pereira D, Ramos E, Branco J. Osteoarthritis. *Acta medica portuguesa*. 2015;28(1):99-106.
2. Bitton R. The economic burden of osteoarthritis. *The American journal of managed care*. 2009;15(8 Suppl):S230-5.
3. Hosnijeh FS, Runhaar J, van Meurs JB, Bierma-Zeinstra SM. Biomarkers for osteoarthritis: Can they be used for risk assessment? A systematic review. *Maturitas*. 2015;82(1):36-49.
4. Cross M, Smith E, Hoy D, Nolte S, Ackerman I, Fransen M, Bridgett L, Williams S, Guillemin F, Hill CL, Laslett LL, Jones G, Cicuttini F, Osborne R, Vos T, Buchbinder R, Woolf A, March L. The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. *Annals of the rheumatic diseases*. 2014;73(7):1323-30.
5. Scanzello CR, Goldring SR. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone*. 2012;51(2):249-57.
6. Kirwan JR, Elson CJ. Is the progression of osteoarthritis phasic? Evidence and implications. *The Journal of rheumatology*. 2000;27(4):834-6.
7. Buckwalter JA, Martin JA. Osteoarthritis. *Advanced drug delivery reviews*. 2006;58(2):150-67.
8. Aigner T, Sachse A, Gebhard PM, Roach HI. Osteoarthritis: pathobiology-targets and ways for therapeutic intervention. *Advanced drug delivery reviews*. 2006;58(2):128-49.
9. Rafael MS, Cavaco S, Viegas CS, Santos S, Ramos A, Willems BA, Herfs M, Theuwissen E, Vermeer C, Simes DC. Insights into the association of Gla-rich protein and osteoarthritis, novel splice variants and gamma-carboxylation status. *Molecular nutrition & food research*. 2014;58(8):1636-46.
10. Michael JW, Schluter-Brust KU, Eysel P. The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee. *Deutsches Arzteblatt international*. 2010;107(9):152-62.
11. Vignon E, Garnero P, Delmas P, Avouac B, Bettica P, Boers M, Ehrich E, MacKillop N, Rovati L, Serni U, Spector T, Reginster JY, Respect of E, Excellence

- in Science : Osteoarthritis S. Recommendations for the registration of drugs used in the treatment of osteoarthritis: an update on biochemical markers. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2001;9(4):289-93.
12. Kellgren JH, Lawrence JS. Rheumatism in miners. II. X-ray study. *British journal of industrial medicine*. 1952;9(3):197-207.
 13. Viegas CS, Simes DC, Laize V, Williamson MK, Price PA, Cancela ML. Gla-rich protein (GRP), a new vitamin K-dependent protein identified from sturgeon cartilage and highly conserved in vertebrates. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(52):36655-64.
 14. Cavaco S, Viegas CS, Rafael MS, Ramos A, Magalhaes J, Blanco FJ, Vermeer C, Simes DC. Gla-rich protein is involved in the cross-talk between calcification and inflammation in osteoarthritis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2016;73(5):1051-65.
 15. Liu YZ, Jackson AP, Cosgrove SD. Contribution of calcium-containing crystals to cartilage degradation and synovial inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2009;17(10):1333-40.
 16. Fuerst M, Bertrand J, Lammers L, Dreier R, Echtermeyer F, Nitschke Y, Rutsch F, Schafer FK, Niggemeyer O, Steinhagen J, Lohmann CH, Pap T, Ruther W. Calcification of articular cartilage in human osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2009;60(9):2694-703.
 17. O'Connell JX. Pathology of the synovium. *American journal of clinical pathology*. 2000;114(5):773-84.
 18. Hernandez-Santana A, Yavorsky A, Loughran ST, McCarthy GM, McMahon GP. New approaches in the detection of calcium-containing microcrystals in synovial fluid. *Bioanalysis*. 2011;3(10):1085-91.
 19. Ea HK, Nguyen C, Bazin D, Bianchi A, Guicheux J, Reboul P, Daudon M, Liote F. Articular cartilage calcification in osteoarthritis: insights into crystal-induced stress. *Arthritis and rheumatism*. 2011;63(1):10-8.
 20. Surmann-Schmitt C, Dietz U, Kireva T, Adam N, Park J, Tagariello A, Onnerfjord P, Heinegard D, Schlotzer-Schrehardt U, Deutzmann R, von der Mark K, Stock M. Ucma, a novel secreted cartilage-specific protein with implications in osteogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(11):7082-93.
 21. Chen G, Deng C, Li YP. TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *International journal of biological sciences*. 2012;8(2):272-88.

22. Sun J, Li J, Li C, Yu Y. Role of bone morphogenetic protein-2 in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Molecular medicine reports*. 2015;12(3):4230-7.
23. Lysdahl H, Baatrup A, Foldager CB, Bunger C. Preconditioning Human Mesenchymal Stem Cells with a Low Concentration of BMP2 Stimulates Proliferation and Osteogenic Differentiation In Vitro. *BioResearch open access*. 2014;3(6):278-85.
24. Cancela ML, Conceicao N, Laize V. Gla-rich protein, a new player in tissue calcification? *Advances in nutrition*. 2012;3(2):174-81.
25. Castaneda S, Roman-Blas JA, Largo R, Herrero-Beaumont G. Subchondral bone as a key target for osteoarthritis treatment. *Biochemical pharmacology*. 2012;83(3):315-23.
26. Abramson SB, Attur M. Developments in the scientific understanding of osteoarthritis. *Arthritis research & therapy*. 2009;11(3):227.
27. Blanco FJ. Osteoarthritis: something is moving. *Reumatologia clinica*. 2014;10(1):4-5.
28. Felson DT. Developments in the clinical understanding of osteoarthritis. *Arthritis research & therapy*. 2009;11(1):203.
29. Pereira D, Severo M, Barros H, Branco J, Santos RA, Ramos E. The effect of depressive symptoms on the association between radiographic osteoarthritis and knee pain: a cross-sectional study. *BMC musculoskeletal disorders*. 2013;14:214.
30. Altman RD. Early management of osteoarthritis. *The American journal of managed care*. 2010;16 Suppl Management:S41-7.
31. Arden N, Nevitt MC. Osteoarthritis: epidemiology. *Best practice & research Clinical rheumatology*. 2006;20(1):3-25.
32. March LM, Schwarz JM, Carfrae BH, Bagge E. Clinical validation of self-reported osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 1998;6(2):87-93.
33. Osteoarthritis, <http://www.medicalassessmentonline.net/terms.php?R=285>, Erişim: 27.12.2016.
34. Zhang W, Nuki G, Moskowitz RW, Abramson S, Altman RD, Arden NK, Bierma-Zeinstra S, Brandt KD, Croft P, Doherty M, Dougados M, Hochberg M, Hunter DJ, Kwoh K, Lohmander LS, Tugwell P. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis: part III: Changes in evidence following systematic

- cumulative update of research published through January 2009. Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society. 2010;18(4):476-99.
35. Sun BH, Wu CW, Kalunian KC. New developments in osteoarthritis. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 2007;33(1):135-48.
 36. Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG, Arnold LM, Choi H, Deyo RA, Gabriel S, Hirsch R, Hochberg MC, Hunder GG, Jordan JM, Katz JN, Kremers HM, Wolfe F, National Arthritis Data W. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. Arthritis and rheumatism. 2008;58(1):26-35.
 37. van Saase JL, van Romunde LK, Cats A, Vandenbroucke JP, Valkenburg HA. Epidemiology of osteoarthritis: Zoetermeer survey. Comparison of radiological osteoarthritis in a Dutch population with that in 10 other populations. *Annals of the rheumatic diseases*. 1989;48(4):271-80.
 38. Woolf AD, Pfleger B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bulletin of the World Health Organization*. 2003;81(9):646-56.
 39. Andrianakos AA, Kontelis LK, Karamitsos DG, Aslanidis SI, Georgountzos AI, Kaziolas GO, Pantelidou KV, Vafiadou EV, Dantis PC, Group ES. Prevalence of symptomatic knee, hand, and hip osteoarthritis in Greece. The ESORDIG study. *The Journal of rheumatology*. 2006;33(12):2507-13.
 40. Peat G, Thomas E, Duncan R, Wood L, Hay E, Croft P. Clinical classification criteria for knee osteoarthritis: performance in the general population and primary care. *Annals of the rheumatic diseases*. 2006;65(10):1363-7.
 41. Cvijetic S, Campbell L, Cooper C, Kirwan J, Potocki K. Radiographic osteoarthritis in the elderly population of Zagreb: distribution, correlates, and the pattern of joint involvement. *Croatian medical journal*. 2000;41(1):58-63.
 42. Caspi D, Flusser G, Farber I, Ribak J, Leibovitz A, Habot B, Yaron M, Segal R. Clinical, radiologic, demographic, and occupational aspects of hand osteoarthritis in the elderly. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2001;30(5):321-31.
 43. Chaisson CE, Zhang Y, McAlindon TE, Hannan MT, Aliabadi P, Naimark A, Levy D, Felson DT. Radiographic hand osteoarthritis: incidence, patterns, and influence of pre-existing disease in a population based sample. *The Journal of rheumatology*. 1997;24(7):1337-43.

44. Oliveria SA, Felson DT, Reed JI, Cirillo PA, Walker AM. Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization. *Arthritis and rheumatism*. 1995;38(8):1134-41.
45. March LM, Bachmeier CJ. Economics of osteoarthritis: a global perspective. *Bailliere's clinical rheumatology*. 1997;11(4):817-34.
46. Xie F, Thumboo J, Li SC. True difference or something else? Problems in cost of osteoarthritis studies. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2007;37(2):127-32.
47. Stafinski T MD. The burden of osteoarthritis in Canada: a review of literature. Alberta, Canada: National Library Canada;. 2001.
48. Felson DT, Nevitt MC. Epidemiologic studies for osteoarthritis: new versus conventional study design approaches. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 2004;30(4):783-97, vii.
49. Kopec JA, Rahman MM, Berthelot JM, Le Petit C, Aghajanian J, Sayre EC, Cibere J, Anis AH, Badley EM. Descriptive epidemiology of osteoarthritis in British Columbia, Canada. *The Journal of rheumatology*. 2007;34(2):386-93.
50. Zhang W, Doherty M, Arden N, Bannwarth B, Bijlsma J, Gunther KP, Hauselmann HJ, Herrero-Beaumont G, Jordan K, Kaklamanis P, Leeb B, Lequesne M, Lohmander S, Mazieres B, Martin-Mola E, Pavelka K, Pendleton A, Punzi L, Swoboda B, Varatojo R, Verbruggen G, Zimmermann-Gorska I, Dougados M, Therapeutics ESCfICSI. EULAR evidence based recommendations for the management of hip osteoarthritis: report of a task force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT). *Annals of the rheumatic diseases*. 2005;64(5):669-81.
51. SARIDOĞAN M. Tanıdan Tedaviye Osteoartrit. Nobel Tıp Kitabevi. 2007.
52. Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, Hirsch R, Helmick CG, Jordan JM, Kington RS, Lane NE, Nevitt MC, Zhang Y, Sowers M, McAlindon T, Spector TD, Poole AR, Yanovski SZ, Ateshian G, Sharma L, Buckwalter JA, Brandt KD, Fries JF. Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Annals of internal medicine*. 2000;133(8):635-46.
53. Blagojevic M, Jinks C, Jeffery A, Jordan KP. Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2010;18(1):24-33.
54. Risk Factors for Osteoarthritis, <http://www.healthline.com/health/osteoarthritis-risk-factors#Causes1>. Erişim Tarihi: 27.12.2016

55. van Meurs JB, Uitterlinden AG. Osteoarthritis year 2012 in review: genetics and genomics. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2012;20(12):1470-6.
56. Loughlin J. The genetic epidemiology of human primary osteoarthritis: current status. *Expert reviews in molecular medicine*. 2005;7(9):1-12.
57. Zhai G, Stankovich J, Ding C, Scott F, Cicuttini F, Jones G. The genetic contribution to muscle strength, knee pain, cartilage volume, bone size, and radiographic osteoarthritis: a sibpair study. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(3):805-10.
58. Du H, Chen SL, Bao CD, Wang XD, Lu Y, Gu YY, Xu JR, Chai WM, Chen J, Nakamura H, Nishioka K. Prevalence and risk factors of knee osteoarthritis in Huang-Pu District, Shanghai, China. *Rheumatology international*. 2005;25(8):585-90.
59. Petersson IF, Jacobsson LT. Osteoarthritis of the peripheral joints. Best practice & research *Clinical rheumatology*. 2002;16(5):741-60.
60. Felson DT, Zhang Y. An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis and rheumatism*. 1998;41(8):1343-55.
61. Richette P, Corvol M, Bardin T. Estrogens, cartilage, and osteoarthritis. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*. 2003;70(4):257-62.
62. Zhang Y, McAlindon TE, Hannan MT, Chaisson CE, Klein R, Wilson PW, Felson DT. Estrogen replacement therapy and worsening of radiographic knee osteoarthritis: the Framingham Study. *Arthritis and rheumatism*. 1998;41(10):1867-73.
63. Hanna FS, Wluka AE, Bell RJ, Davis SR, Cicuttini FM. Osteoarthritis and the postmenopausal woman: Epidemiological, magnetic resonance imaging, and radiological findings. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2004;34(3):631-6.
64. Ameye LG, Chee WS. Osteoarthritis and nutrition. From nutraceuticals to functional foods: a systematic review of the scientific evidence. *Arthritis research & therapy*. 2006;8(4):R127.
65. Kurz B, Jost B, Schunke M. Dietary vitamins and selenium diminish the development of mechanically induced osteoarthritis and increase the expression of antioxidative enzymes in the knee joint of STR/1N mice. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2002;10(2):119-26.

66. Wang Q, Rozelle AL, Lepus CM, Scanzello CR, Song JJ, Larsen DM, Crish JF, Bebek G, Ritter SY, Lindstrom TM, Hwang I, Wong HH, Punzi L, Encarnacion A, Shamloo M, Goodman SB, Wyss-Coray T, Goldring SR, Banda NK, Thurman JM, Gobezie R, Crow MK, Holers VM, Lee DM, Robinson WH. Identification of a central role for complement in osteoarthritis. *Nature medicine*. 2011;17(12):1674-9.
67. Nakagawa S, Arai Y, Mazda O, Kishida T, Takahashi KA, Sakao K, Saito M, Honjo K, Imanishi J, Kubo T. N-acetylcysteine prevents nitric oxide-induced chondrocyte apoptosis and cartilage degeneration in an experimental model of osteoarthritis. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2010;28(2):156-63.
68. McAlindon T, Felson DT. Nutrition: risk factors for osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 1997;56(7):397-400.
69. Goerres GW, Hauselmann HJ, Seifert B, Michel BA, Uebelhart D. Patients with knee osteoarthritis have lower total hip bone mineral density in the symptomatic leg than in the contralateral hip. *Journal of clinical densitometry : the official journal of the International Society for Clinical Densitometry*. 2005;8(4):484-7.
70. Hochberg MC, Lethbridge-Cejku M, Tobin JD. Bone mineral density and osteoarthritis: data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2004;12 Suppl A:S45-8.
71. Cooper C, Snow S, McAlindon TE, Kellingray S, Stuart B, Coggon D, Dieppe PA. Risk factors for the incidence and progression of radiographic knee osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2000;43(5):995-1000.
72. Cooper C, McAlindon T, Snow S, Vines K, Young P, Kirwan J, Dieppe P. Mechanical and constitutional risk factors for symptomatic knee osteoarthritis: differences between medial tibiofemoral and patellofemoral disease. *The Journal of rheumatology*. 1994;21(2):307-13.
73. van der Kraan PM. Osteoarthritis year 2012 in review: biology. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2012;20(12):1447-50.
74. Madry H, Luyten FP, Facchini A. Biological aspects of early osteoarthritis. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA*. 2012;20(3):407-22.
75. Teichtahl AJ, Wang Y, Wluka AE, Cicuttini FM. Obesity and knee osteoarthritis: new insights provided by body composition studies. *Obesity*. 2008;16(2):232-40.

76. Coggon D, Croft P, Kellingray S, Barrett D, McLaren M, Cooper C. Occupational physical activities and osteoarthritis of the knee. *Arthritis and rheumatism*. 2000;43(7):1443-9.
77. MC. H. *Epidemiology of the Rheumatic Diseases*. Oxford. 2001.
78. O'Reilly SC, Muir KR, Doherty M. Occupation and knee pain: a community study. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2000;8(2):78-81.
79. Rossignol M, Leclerc A, Hilliquin P, Allaert FA, Rozenberg S, Valat JP, Avouac B, Coste P, Savarieau B, Fautrel B. Primary osteoarthritis and occupations: a national cross sectional survey of 10 412 symptomatic patients. *Occupational and environmental medicine*. 2003;60(11):882-6.
80. Juhakoski R, Heliovaara M, Impivaara O, Kroger H, Knekt P, Lauren H, Arokoski JP. Risk factors for the development of hip osteoarthritis: a population-based prospective study. *Rheumatology*. 2009;48(1):83-7.
81. Yoshimura N, Nishioka S, Kinoshita H, Hori N, Nishioka T, Ryujin M, Mantani Y, Miyake M, Coggon D, Cooper C. Risk factors for knee osteoarthritis in Japanese women: heavy weight, previous joint injuries, and occupational activities. *The Journal of rheumatology*. 2004;31(1):157-62.
82. Kalichman L, Hernandez-Molina G. Hand osteoarthritis: an epidemiological perspective. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2010;39(6):465-76.
83. Grotle M, Hagen KB, Natvig B, Dahl FA, Kvien TK. Prevalence and burden of osteoarthritis: results from a population survey in Norway. *The Journal of rheumatology*. 2008;35(4):677-84.
84. Hootman JM, Macera CA, Helmick CG, Blair SN. Influence of physical activity-related joint stress on the risk of self-reported hip/knee osteoarthritis: a new method to quantify physical activity. *Preventive medicine*. 2003;36(5):636-44.
85. Lane NE, Oehlert JW, Bloch DA, Fries JF. The relationship of running to osteoarthritis of the knee and hip and bone mineral density of the lumbar spine: a 9 year longitudinal study. *The Journal of rheumatology*. 1998;25(2):334-41.
86. Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Naimark A, Weissman B, Aliabadi P, Levy D. Risk factors for incident radiographic knee osteoarthritis in the elderly: the Framingham Study. *Arthritis and rheumatism*. 1997;40(4):728-33.

87. Sharma L, Song J, Felson DT, Cahue S, Shamiyeh E, Dunlop DD. The role of knee alignment in disease progression and functional decline in knee osteoarthritis. *Jama*. 2001;286(2):188-95.
88. Slemenda C, Heilman DK, Brandt KD, Katz BP, Mazzuca SA, Braunstein EM, Byrd D. Reduced quadriceps strength relative to body weight: a risk factor for knee osteoarthritis in women? *Arthritis and rheumatism*. 1998;41(11):1951-9.
89. Kokino S BMOkIGT. Romatizmal Hastalıkların Tanı ve Tedavisi. . Yüce Yayıncılık. 2002; 2002;388-404((ed).).
90. Karaarslan Y. Osteoartrit. Ankara: MD Yayıncılık. 2000.
91. M. S. Clinical findings of osteoarthritis according to the joints. *Turkish Journal of Geriatrics Supplement* 2011;2011;14(1):31-6.
92. Doral MN DG, Atay OA, Bozkurt M, Leblebicioglu G, Uzumcugil A, Aydoğ T. Dejeneratif Eklem Hastalıkları. *Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği Dergisi* 2007;2007;6(1-2):56-65.).
93. Punzi L, Oliviero F, Ramonda R, Valvason C, Sfriso P, Todesco S. Laboratory investigations in osteoarthritis. *Aging clinical and experimental research*. 2003;15(5):373-9.
94. Kalunian KC TPGJ. Diagnosis and classification of osteoarthritis, pathogenesis of osteoarthritis, clinical manifestations of osteoarthritis,risk factors for and possible causes of osteoarthritis. In: UpToDate, Basow, DS (Ed), UpToDate, Waltham, MA, . 2010.
95. Minafra L, Bravata V, Saporito M, Cammarata FP, Forte GI, Caldarella S, D'Arienzo M, Gilardi MC, Messa C, Boniforti F. Genetic, clinical and radiographic signs in knee osteoarthritis susceptibility. *Arthritis research & therapy*. 2014;16(2):R91.
96. Nigel Arden CC. Osteoarthritis Handbook. BI 1:1-21 Taylor Francis 2006 Bath UK.
97. Juni P, Reichenbach S, Dieppe P. Osteoarthritis: rational approach to treating the individual. *Best practice & research Clinical rheumatology*. 2006;20(4):721-40.
98. Hochberg MC. Osteoarthritis year 2012 in review: clinical. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2012;20(12):1465-9.
99. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Raynauld JP. Most recent developments in strategies to reduce the progression of structural changes in osteoarthritis: today and tomorrow. *Arthritis research & therapy*. 2006;8(2):206.

100. Brand C, Cox S. Systems for implementing best practice for a chronic disease: management of osteoarthritis of the hip and knee. *Internal medicine journal*. 2006;36(3):170-9.
101. Manek NJ, Lane NE. Osteoarthritis: current concepts in diagnosis and management. *American family physician*. 2000;61(6):1795-804.
102. Hunter DJ, Felson DT. Osteoarthritis. *Bmj*. 2006;332(7542):639-42.
103. Guilak F. Biomechanical factors in osteoarthritis. *Best practice & research Clinical rheumatology*. 2011;25(6):815-23.
104. Guilak F, Fermor B, Keefe FJ, Kraus VB, Olson SA, Pisetsky DS, Setton LA, Weinberg JB. The role of biomechanics and inflammation in cartilage injury and repair. *Clinical orthopaedics and related research*. 2004(423):17-26.
105. Goldring MB, Goldring SR. Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1192:230-7.
106. Rothschild BM. Principles of osteoarthritis - its definition, character, derivation, and modality-related recognition :602 pages.
107. Van der Kraan PM, van den Berg WB. Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2012;20(3):223-32.
108. Pesesse L, Sanchez C, Delcour JP, Bellahcene A, Baudouin C, Msika P, Henrotin Y. Consequences of chondrocyte hypertrophy on osteoarthritic cartilage: potential effect on angiogenesis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2013;21(12):1913-23.
109. Dell'accio F, De Bari C, Eltawil NM, Vanhummelen P, Pitzalis C. Identification of the molecular response of articular cartilage to injury, by microarray screening: Wnt-16 expression and signaling after injury and in osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2008;58(5):1410-21.
110. Chan BY, Fuller ES, Russell AK, Smith SM, Smith MM, Jackson MT, Cake MA, Read RA, Bateman JF, Sambrook PN, Little CB. Increased chondrocyte sclerostin may protect against cartilage degradation in osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2011;19(7):874-85.
111. Oh H, Chun CH, Chun JS. Dkk-1 expression in chondrocytes inhibits experimental osteoarthritic cartilage destruction in mice. *Arthritis and rheumatism*. 2012;64(8):2568-78.

112. Maldonado M, Nam J. The role of changes in extracellular matrix of cartilage in the presence of inflammation on the pathology of osteoarthritis. *BioMed research international*. 2013;2013:284873.
113. Ye S, Wang J, Yang S, Xu W, Xie M, Han K, Zhang B, Wu Z. Specific inhibitory protein Dkk-1 blocking Wnt/beta-catenin signaling pathway improve protectives effect on the extracellular matrix. *Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao Yixue Yingdewen ban*. 2011;31(5):657-62.
114. Burleigh A, Chanalaris A, Gardiner MD, Driscoll C, Boruc O, Saklatvala J, Vincent TL. Joint immobilization prevents murine osteoarthritis and reveals the highly mechanosensitive nature of protease expression in vivo. *Arthritis and rheumatism*. 2012;64(7):2278-88.
115. Houard X, Goldring MB, Berenbaum F. Homeostatic mechanisms in articular cartilage and role of inflammation in osteoarthritis. *Current rheumatology reports*. 2013;15(11):375.
116. By Shari M. Ling MDaJMB, M.D. . Osteoarthritis: Pathophysiology
117. Bathon SMLaJM. Osteoarthritis: Pathophysiology. Johns Hopkins Arthritis center. 27 March 2012.
118. Burr DB. Anatomy and physiology of the mineralized tissues: role in the pathogenesis of osteoarthrosis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2004;12 Suppl A:S20-30.
119. Imhof H, Sulzbacher I, Grampp S, Czerny C, Youssefzadeh S, Kainberger F. Subchondral bone and cartilage disease: a rediscovered functional unit. *Investigative radiology*. 2000;35(10):581-8.
120. Goldring MB, Marcu KB. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis research & therapy*. 2009;11(3):224.
121. Lories RJ, Luyten FP. The bone-cartilage unit in osteoarthritis. *Nature reviews Rheumatology*. 2011;7(1):43-9.
122. Goldring SR. Role of bone in osteoarthritis pathogenesis. *The Medical clinics of North America*. 2009;93(1):25-35, xv.
123. Lajeunesse D, Reboul P. Subchondral bone in osteoarthritis: a biologic link with articular cartilage leading to abnormal remodeling. *Current opinion in rheumatology*. 2003;15(5):628-33.

124. Pastoureau PC, Chomel AC, Bonnet J. Evidence of early subchondral bone changes in the meniscectomized guinea pig. A densitometric study using dual-energy X-ray absorptiometry subregional analysis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 1999;7(5):466-73.
125. Day JS, Ding M, van der Linden JC, Hvid I, Sumner DR, Weinans H. A decreased subchondral trabecular bone tissue elastic modulus is associated with pre-arthritis cartilage damage. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2001;19(5):914-8.
126. Hayami T, Pickarski M, Zhuo Y, Wesolowski GA, Rodan GA, Duong LT. Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. *Bone*. 2006;38(2):234-43.
127. Herrero-Beaumont G, Roman-Blas JA, Largo R, Berenbaum F, Castaneda S. Bone mineral density and joint cartilage: four clinical settings of a complex relationship in osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011;70(9):1523-5.
128. Nevitt MC, Zhang Y, Javaid MK, Neogi T, Curtis JR, Niu J, McCulloch CE, Segal NA, Felson DT. High systemic bone mineral density increases the risk of incident knee OA and joint space narrowing, but not radiographic progression of existing knee OA: the MOST study. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69(1):163-8.
129. Calvo E, Castaneda S, Largo R, Fernandez-Valle ME, Rodriguez-Salvanes F, Herrero-Beaumont G. Osteoporosis increases the severity of cartilage damage in an experimental model of osteoarthritis in rabbits. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2007;15(1):69-77.
130. Sharma AR, Jagga S, Lee SS, Nam JS. Interplay between cartilage and subchondral bone contributing to pathogenesis of osteoarthritis. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(10):19805-30.
131. Radin EL, Rose RM. Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clinical orthopaedics and related research*. 1986(213):34-40.
132. Findlay DM, Atkins GJ. Osteoblast-chondrocyte interactions in osteoarthritis. *Current osteoporosis reports*. 2014;12(1):127-34.
133. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2011;26(2):229-38.

134. Li ZC, Dai LY, Jiang LS, Qiu S. Difference in subchondral cancellous bone between postmenopausal women with hip osteoarthritis and osteoporotic fracture: implication for fatigue microdamage, bone microarchitecture, and biomechanical properties. *Arthritis and rheumatism*. 2012;64(12):3955-62.
135. Atkins GJ, Findlay DM. Osteocyte regulation of bone mineral: a little give and take. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2012;23(8):2067-79.
136. Malekipour F, Whitton C, Oetomo D, Lee PV. Shock absorbing ability of articular cartilage and subchondral bone under impact compression. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 2013;26:127-35.
137. Fazzalari NL, Kuliwaba JS, Forwood MR. Cancellous bone microdamage in the proximal femur: influence of age and osteoarthritis on damage morphology and regional distribution. *Bone*. 2002;31(6):697-702.
138. Mori S, Burr DB. Increased intracortical remodeling following fatigue damage. *Bone*. 1993;14(2):103-9.
139. O'Brien CA, Nakashima T, Takayanagi H. Osteocyte control of osteoclastogenesis. *Bone*. 2013;54(2):258-63.
140. Burr DB, Gallant MA. Bone remodelling in osteoarthritis. *Nature reviews Rheumatology*. 2012;8(11):665-73.
141. Fazzalari NL, Parkinson IH. Femoral trabecular bone of osteoarthritic and normal subjects in an age and sex matched group. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 1998;6(6):377-82.
142. Kumarasinghe DD, Hopwood B, Kuliwaba JS, Atkins GJ, Fazzalari NL. An update on primary hip osteoarthritis including altered Wnt and TGF-beta associated gene expression from the bony component of the disease. *Rheumatology*. 2011;50(12):2166-75.
143. Dall'Ara E, Ohman C, Baleani M, Viceconti M. Reduced tissue hardness of trabecular bone is associated with severe osteoarthritis. *Journal of biomechanics*. 2011;44(8):1593-8.
144. Li B, Aspden RM. Material properties of bone from the femoral neck and calcar femorale of patients with osteoporosis or osteoarthritis. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation*

- for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA. 1997;7(5):450-6.
145. Hunter DJ, Gerstenfeld L, Bishop G, Davis AD, Mason ZD, Einhorn TA, Maciewicz RA, Newham P, Foster M, Jackson S, Morgan EF. Bone marrow lesions from osteoarthritis knees are characterized by sclerotic bone that is less well mineralized. *Arthritis research & therapy*. 2009;11(1):R11.
 146. Taljanovic MS, Graham AR, Benjamin JB, Gmitro AF, Krupinski EA, Schwartz SA, Hunter TB, Resnick DL. Bone marrow edema pattern in advanced hip osteoarthritis: quantitative assessment with magnetic resonance imaging and correlation with clinical examination, radiographic findings, and histopathology. *Skeletal radiology*. 2008;37(5):423-31.
 147. Couchourel D, Aubry I, Delalandre A, Lavigne M, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Lajeunesse D. Altered mineralization of human osteoarthritic osteoblasts is attributable to abnormal type I collagen production. *Arthritis and rheumatism*. 2009;60(5):1438-50.
 148. Kumarasinghe DD, Sullivan T, Kuliwaba JS, Fazzalari NL, Atkins GJ. Evidence for the dysregulated expression of TWIST1, TGFbeta1 and SMAD3 in differentiating osteoblasts from primary hip osteoarthritis patients. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2012;20(11):1357-66.
 149. Truong LH, Kuliwaba JS, Tsangari H, Fazzalari NL. Differential gene expression of bone anabolic factors and trabecular bone architectural changes in the proximal femoral shaft of primary hip osteoarthritis patients. *Arthritis research & therapy*. 2006;8(6):R188.
 150. Chan TF, Couchourel D, Abed E, Delalandre A, Duval N, Lajeunesse D. Elevated Dickkopf-2 levels contribute to the abnormal phenotype of human osteoarthritic osteoblasts. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2011;26(7):1399-410.
 151. Massicotte F, Lajeunesse D, Benderdour M, Pelletier JP, Hilal G, Duval N, Martel-Pelletier J. Can altered production of interleukin-1beta, interleukin-6, transforming growth factor-beta and prostaglandin E(2) by isolated human subchondral osteoblasts identify two subgroups of osteoarthritic patients. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2002;10(6):491-500.
 152. Zhen G, Wen C, Jia X, Li Y, Crane JL, Mears SC, Askin FB, Frassica FJ, Chang W, Yao J, Carrino JA, Cosgarea A, Artemov D, Chen Q, Zhao Z, Zhou X, Riley L,

- Sponseller P, Wan M, Lu WW, Cao X. Inhibition of TGF-beta signaling in mesenchymal stem cells of subchondral bone attenuates osteoarthritis. *Nature medicine*. 2013;19(6):704-12.
153. Mohan G, Perilli E, Kuliwaba JS, Humphries JM, Parkinson IH, Fazzalari NL. Application of in vivo micro-computed tomography in the temporal characterisation of subchondral bone architecture in a rat model of low-dose monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Arthritis research & therapy*. 2011;13(6):R210.
 154. Valverde-Franco G, Pelletier JP, Fahmi H, Hum D, Matsuo K, Lussier B, Kapoor M, Martel-Pelletier J. In vivo bone-specific EphB4 overexpression in mice protects both subchondral bone and cartilage during osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2012;64(11):3614-25.
 155. Hayami T, Pickarski M, Wesolowski GA, McLane J, Bone A, Destefano J, Rodan GA, Duong LT. The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis: reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the rat anterior cruciate ligament transection model. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(4):1193-206.
 156. Kadri A, Ea HK, Bazille C, Hannouche D, Liote F, Cohen-Solal ME. Osteoprotegerin inhibits cartilage degradation through an effect on trabecular bone in murine experimental osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2008;58(8):2379-86.
 157. Funck-Brentano T, Lin H, Hay E, Ah Kioon MD, Schiltz C, Hannouche D, Nizard R, Liote F, Orcel P, de Vernejoul MC, Cohen-Solal ME. Targeting bone alleviates osteoarthritis in osteopenic mice and modulates cartilage catabolism. *PloS one*. 2012;7(3):e33543.
 158. Amin AK, Huntley JS, Simpson AH, Hall AC. Chondrocyte survival in articular cartilage: the influence of subchondral bone in a bovine model. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 2009;91(5):691-9.
 159. Sanchez C, Deberg MA, Piccardi N, Msika P, Reginster JY, Henrotin YE. Osteoblasts from the sclerotic subchondral bone downregulate aggrecan but upregulate metalloproteinases expression by chondrocytes. This effect is mimicked by interleukin-6, -1beta and oncostatin M pre-treated non-sclerotic osteoblasts. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2005;13(11):979-87.

160. Aaron RK, Dyke JP, Ciombor DM, Ballon D, Lee J, Jung E, Tung GA. Perfusion abnormalities in subchondral bone associated with marrow edema, osteoarthritis, and avascular necrosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1117:124-37.
161. Dore D, Martens A, Quinn S, Ding C, Winzenberg T, Zhai G, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abram F, Cicuttini F, Jones G. Bone marrow lesions predict site-specific cartilage defect development and volume loss: a prospective study in older adults. *Arthritis research & therapy*. 2010;12(6):R222.
162. Hunter DJ, Zhang Y, Niu J, Goggins J, Amin S, LaValley MP, Guermazi A, Genant H, Gale D, Felson DT. Increase in bone marrow lesions associated with cartilage loss: a longitudinal magnetic resonance imaging study of knee osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2006;54(5):1529-35.
163. Felson DT, McLaughlin S, Goggins J, LaValley MP, Gale ME, Totterman S, Li W, Hill C, Gale D. Bone marrow edema and its relation to progression of knee osteoarthritis. *Annals of internal medicine*. 2003;139(5 Pt 1):330-6.
164. Pan J, Zhou X, Li W, Novotny JE, Doty SB, Wang L. In situ measurement of transport between subchondral bone and articular cartilage. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2009;27(10):1347-52.
165. Clark JM, Huber JD. The structure of the human subchondral plate. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 1990;72(5):866-73.
166. Lyons TJ, McClure SF, Stoddart RW, McClure J. The normal human chondro-osseous junctional region: evidence for contact of uncalcified cartilage with subchondral bone and marrow spaces. *BMC musculoskeletal disorders*. 2006;7:52.
167. Botter SM, van Osch GJ, Clockaerts S, Waarsing JH, Weinans H, van Leeuwen JP. Osteoarthritis induction leads to early and temporal subchondral plate porosity in the tibial plateau of mice: an in vivo microfocal computed tomography study. *Arthritis and rheumatism*. 2011;63(9):2690-9.
168. Wang B, Zhou X, Price C, Li W, Pan J, Wang L. Quantifying load-induced solute transport and solute-matrix interaction within the osteocyte lacunar-canalicular system. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2013;28(5):1075-86.

169. Zhang L, Gardiner BS, Smith DW, Pivonka P, Grodzinsky AJ. On the role of diffusible binding partners in modulating the transport and concentration of proteins in tissues. *Journal of theoretical biology*. 2010;263(1):20-9.
170. Zhang L, Gardiner BS, Smith DW, Pivonka P, Grodzinsky A. The effect of cyclic deformation and solute binding on solute transport in cartilage. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2007;457(1):47-56.
171. Wojdasiewicz P, Poniatowski LA, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators of inflammation*. 2014;2014:561459.
172. Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, van den Berg WB, Bresnihan B. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2005;64(9):1263-7.
173. Loeuille D, Chary-Valckenaere I, Champigneulle J, Rat AC, Toussaint F, Pinzano-Watrin A, Goebel JC, Mainard D, Blum A, Pourel J, Netter P, Gillet P. Macroscopic and microscopic features of synovial membrane inflammation in the osteoarthritic knee: correlating magnetic resonance imaging findings with disease severity. *Arthritis and rheumatism*. 2005;52(11):3492-501.
174. Baker K, Grainger A, Niu J, Clancy M, Guermazi A, Crema M, Hughes L, Buckwalter J, Wooley A, Nevitt M, Felson DT. Relation of synovitis to knee pain using contrast-enhanced MRIs. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69(10):1779-83.
175. Liu-Bryan R, Terkeltaub R. Emerging regulators of the inflammatory process in osteoarthritis. *Nature reviews Rheumatology*. 2015;11(1):35-44.
176. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis and rheumatism*. 2012;64(6):1697-707.
177. Brandt KD, Dieppe P, Radin E. Etiopathogenesis of osteoarthritis. *The Medical clinics of North America*. 2009;93(1):1-24, xv.
178. Yuan GH, Tanaka M, Masuko-Hongo K, Shibakawa A, Kato T, Nishioka K, Nakamura H. Characterization of cells from pannus-like tissue over articular cartilage of advanced osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2004;12(1):38-45.
179. Sellam J, Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nature reviews Rheumatology*. 2010;6(11):625-35.

180. Lee JH, Ort T, Ma K, Picha K, Carton J, Marsters PA, Lohmander LS, Baribaud F, Song XY, Blake S. Resistin is elevated following traumatic joint injury and causes matrix degradation and release of inflammatory cytokines from articular cartilage in vitro. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2009;17(5):613-20.
181. Presle N, Pottier P, Dumond H, Guillaume C, Lapicque F, Pallu S, Mainard D, Netter P, Terlain B. Differential distribution of adipokines between serum and synovial fluid in patients with osteoarthritis. Contribution of joint tissues to their articular production. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2006;14(7):690-5.
182. Hasegawa M, Segawa T, Maeda M, Yoshida T, Sudo A. Thrombin-cleaved osteopontin levels in synovial fluid correlate with disease severity of knee osteoarthritis. *The Journal of rheumatology*. 2011;38(1):129-34.
183. Krasnokutsky S, Attur M, Palmer G, Samuels J, Abramson SB. Current concepts in the pathogenesis of osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2008;16 Suppl 3:S1-3.
184. Ashraf S, Walsh DA. Angiogenesis in osteoarthritis. *Current opinion in rheumatology*. 2008;20(5):573-80.
185. Bonnet CS, Walsh DA. Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology*. 2005;44(1):7-16.
186. Man GS, Mologhianu G. Osteoarthritis pathogenesis - a complex process that involves the entire joint. *Journal of medicine and life*. 2014;7(1):37-41.
187. Rigoglou S, Papavassiliou AG. The NF-kappaB signalling pathway in osteoarthritis. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2013;45(11):2580-4.
188. Sun SC, Chang JH, Jin J. Regulation of nuclear factor-kappaB in autoimmunity. *Trends in immunology*. 2013;34(6):282-9.
189. Roman-Blas JA, Jimenez SA. NF-kappaB as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2006;14(9):839-48.
190. Boyce BF, Yao Z, Xing L. Functions of nuclear factor kappaB in bone. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1192:367-75.
191. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*. 2008;132(3):344-62.

192. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2009;1(4):a000034.
193. Carlsen H, Alexander G, Austenaa LM, Ebihara K, Blomhoff R. Molecular imaging of the transcription factor NF-kappaB, a primary regulator of stress response. *Mutation research*. 2004;551(1-2):199-211.
194. Ikeda F, Nishimura R, Matsubara T, Tanaka S, Inoue J, Reddy SV, Hata K, Yamashita K, Hiraga T, Watanabe T, Kukita T, Yoshioka K, Rao A, Yoneda T. Critical roles of c-Jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL-regulated osteoclast differentiation. *The Journal of clinical investigation*. 2004;114(4):475-84.
195. Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, Hofstetter W, Felix R, Fleisch HA, Wagner EF. c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science*. 1994;266(5184):443-8.
196. Niederberger E, Geisslinger G. The IKK-NF-kappaB pathway: a source for novel molecular drug targets in pain therapy? *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2008;22(10):3432-42.
197. Pomerantz JL, Baltimore D. Two pathways to NF-kappaB. *Molecular cell*. 2002;10(4):693-5.
198. Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in immunology*. 2004;25(6):280-8.
199. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 1999;18(49):6853-66.
200. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes & development*. 2004;18(18):2195-224.
201. Yasuda T. Activation of Akt leading to NF-kappaB up-regulation in chondrocytes stimulated with fibronectin fragment. *Biomedical research*. 2011;32(3):209-15.
202. Ge XP, Gan YH, Zhang CG, Zhou CY, Ma KT, Meng JH, Ma XC. Requirement of the NF-kappaB pathway for induction of Wnt-5A by interleukin-1beta in condylar chondrocytes of the temporomandibular joint: functional crosstalk between the Wnt-5A and NF-kappaB signaling pathways. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2011;19(1):111-7.
203. Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nature reviews Rheumatology*. 2011;7(1):33-42.

204. Marcu KB, Otero M, Olivotto E, Borzi RM, Goldring MB. NF-kappaB signaling: multiple angles to target OA. *Current drug targets*. 2010;11(5):599-613.
205. Ulivi V, Giannoni P, Gentili C, Cancedda R, Descalzi F. p38/NF-kB-dependent expression of COX-2 during differentiation and inflammatory response of chondrocytes. *Journal of cellular biochemistry*. 2008;104(4):1393-406.
206. DeGroot J, Verzijl N, Wenting-van Wijk MJ, Jacobs KM, Van El B, Van Roermund PM, Bank RA, Bijlsma JW, TeKoppele JM, Lafeber FP. Accumulation of advanced glycation end products as a molecular mechanism for aging as a risk factor in osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(4):1207-15.
207. Steenvoorden MM, Huizinga TW, Verzijl N, Bank RA, Roday HK, Luning HA, Lafeber FP, Toes RE, DeGroot J. Activation of receptor for advanced glycation end products in osteoarthritis leads to increased stimulation of chondrocytes and synoviocytes. *Arthritis and rheumatism*. 2006;54(1):253-63.
208. Goldring MB, Otero M, Plumb DA, Dragomir C, Favero M, El Hachem K, Hashimoto K, Roach HI, Olivotto E, Borzi RM, Marcu KB. Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. *European cells & materials*. 2011;21:202-20.
209. Hirata M, Kugimiya F, Fukai A, Saito T, Yano F, Ikeda T, Mabuchi A, Sapkota BR, Akune T, Nishida N, Yoshimura N, Nakagawa T, Tokunaga K, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. C/EBPbeta and RUNX2 cooperate to degrade cartilage with MMP-13 as the target and HIF-2alpha as the inducer in chondrocytes. *Human molecular genetics*. 2012;21(5):1111-23.
210. Grall F, Gu X, Tan L, Cho JY, Inan MS, Pettit AR, Thamrongsak U, Choy BK, Manning C, Akbarali Y, Zerbini L, Rudders S, Goldring SR, Gravallesse EM, Oettgen P, Goldring MB, Libermann TA. Responses to the proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in cells derived from rheumatoid synovium and other joint tissues involve nuclear factor kappaB-mediated induction of the Ets transcription factor ESE-1. *Arthritis and rheumatism*. 2003;48(5):1249-60.
211. Peng H, Tan L, Osaki M, Zhan Y, Ijiri K, Tsuchimochi K, Otero M, Wang H, Choy BK, Grall FT, Gu X, Libermann TA, Oettgen P, Goldring MB. ESE-1 is a potent repressor of type II collagen gene (COL2A1) transcription in human chondrocytes. *Journal of cellular physiology*. 2008;215(2):562-73.

212. Otero M, Plumb DA, Tsuchimochi K, Dragomir CL, Hashimoto K, Peng H, Olivotto E, Bevilacqua M, Tan L, Yang Z, Zhan Y, Oettgen P, Li Y, Marcu KB, Goldring MB. E74-like factor 3 (ELF3) impacts on matrix metalloproteinase 13 (MMP13) transcriptional control in articular chondrocytes under proinflammatory stress. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(5):3559-72.
213. Merz D, Liu R, Johnson K, Terkeltaub R. IL-8/CXCL8 and growth-related oncogene alpha/CXCL1 induce chondrocyte hypertrophic differentiation. *Journal of immunology*. 2003;171(8):4406-15.
214. Ijiri K, Zerbini LF, Peng H, Otu HH, Tsuchimochi K, Otero M, Dragomir C, Walsh N, Bierbaum BE, Mattingly D, van Flandern G, Komiya S, Aigner T, Libermann TA, Goldring MB. Differential expression of GADD45beta in normal and osteoarthritic cartilage: potential role in homeostasis of articular chondrocytes. *Arthritis and rheumatism*. 2008;58(7):2075-87.
215. Husa M, Liu-Bryan R, Terkeltaub R. Shifting HIFs in osteoarthritis. *Nature medicine*. 2010;16(6):641-4.
216. Liu SC, Hsu CJ, Chen HT, Tsou HK, Chuang SM, Tang CH. CTGF increases IL-6 expression in human synovial fibroblasts through integrin-dependent signaling pathway. *PloS one*. 2012;7(12):e51097.
217. Hou CH, Tang CH, Hsu CJ, Hou SM, Liu JF. CCN4 induces IL-6 production through alphavbeta5 receptor, PI3K, Akt, and NF-kappaB signaling pathway in human synovial fibroblasts. *Arthritis research & therapy*. 2013;15(1):R19.
218. Bruhl H, Mack M, Niedermeier M, Lochbaum D, Scholmerich J, Straub RH. Functional expression of the chemokine receptor CCR7 on fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology*. 2008;47(12):1771-4.
219. Buckland-Wright C. Subchondral bone changes in hand and knee osteoarthritis detected by radiography. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2004;12 Suppl A:S10-9.
220. Thambyah A, Broom N. On new bone formation in the pre-osteoarthritic joint. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2009;17(4):456-63.
221. Redlich K, Hayer S, Ricci R, David JP, Tohidast-Akrad M, Kollias G, Steiner G, Smolen JS, Wagner EF, Schett G. Osteoclasts are essential for TNF-alpha-mediated joint destruction. *The Journal of clinical investigation*. 2002;110(10):1419-27.

222. Moreno-Rubio J, Herrero-Beaumont G, Tardio L, Alvarez-Soria MA, Largo R. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and prostaglandin E(2) modulate the synthesis of osteoprotegerin and RANKL in the cartilage of patients with severe knee osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2010;62(2):478-88.
223. Corrado A, Cantatore FP, Grano M, Colucci S. Neridronate and human osteoblasts in normal, osteoporotic and osteoarthritic subjects. *Clinical rheumatology*. 2005;24(5):527-34.
224. Dequeker J, Mohan S, Finkelman RD, Aerssens J, Baylink DJ. Generalized osteoarthritis associated with increased insulin-like growth factor types I and II and transforming growth factor beta in cortical bone from the iliac crest. Possible mechanism of increased bone density and protection against osteoporosis. *Arthritis and rheumatism*. 1993;36(12):1702-8.
225. El Miedany YM, Mehanna AN, El Baddini MA. Altered bone mineral metabolism in patients with osteoarthritis. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*. 2000;67(6):521-7.
226. Hilal G, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Ranger P, Lajeunesse D. Osteoblast-like cells from human subchondral osteoarthritic bone demonstrate an altered phenotype in vitro: possible role in subchondral bone sclerosis. *Arthritis and rheumatism*. 1998;41(5):891-9.
227. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology*. 2004;20:781-810.
228. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental cell*. 2009;17(1):9-26.
229. Lodewyckx L, Lories RJ. WNT Signaling in osteoarthritis and osteoporosis: what is the biological significance for the clinician? *Current rheumatology reports*. 2009;11(1):23-30.
230. Lodewyckx L, Luyten FP, Lories RJ. Genetic deletion of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 increases cartilage degradation in instability-induced osteoarthritis. *Rheumatology*. 2012;51(11):1973-8.
231. Jenkins ZA, van Kogelenberg M, Morgan T, Jeffs A, Fukuzawa R, Pearl E, Thaller C, Hing AV, Porteous ME, Garcia-Minaur S, Bohring A, Lacombe D, Stewart F, Fiskerstrand T, Bindoff L, Berland S, Ades LC, Tchan M, David A, Wilson LC, Hennekam RC, Donnai D, Mansour S, Cormier-Daire V, Robertson SP. Germline

- mutations in WTX cause a sclerosing skeletal dysplasia but do not predispose to tumorigenesis. *Nature genetics*. 2009;41(1):95-100.
232. Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nature medicine*. 2013;19(2):179-92.
 233. Nalesso G, Sherwood J, Bertrand J, Pap T, Ramachandran M, De Bari C, Pitzalis C, Dell'accio F. WNT-3A modulates articular chondrocyte phenotype by activating both canonical and noncanonical pathways. *The Journal of cell biology*. 2011;193(3):551-64.
 234. Oh CD, Chang SH, Yoon YM, Lee SJ, Lee YS, Kang SS, Chun JS. Opposing role of mitogen-activated protein kinase subtypes, erk-1/2 and p38, in the regulation of chondrogenesis of mesenchymes. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(8):5613-9.
 235. Stanton LA, Underhill TM, Beier F. MAP kinases in chondrocyte differentiation. *Developmental biology*. 2003;263(2):165-75.
 236. Greenblatt MB, Shim JH, Glimcher LH. Mitogen-activated protein kinase pathways in osteoblasts. *Annual review of cell and developmental biology*. 2013;29:63-79.
 237. Sondergaard BC, Schultz N, Madsen SH, Bay-Jensen AC, Kassem M, Karsdal MA. MAPKs are essential upstream signaling pathways in proteolytic cartilage degradation--divergence in pathways leading to aggrecanase and MMP-mediated articular cartilage degradation. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2010;18(3):279-88.
 238. Yang CM, Chien CS, Yao CC, Hsiao LD, Huang YC, Wu CB. Mechanical strain induces collagenase-3 (MMP-13) expression in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(21):22158-65.
 239. Prasad I, van Gennip S, Friis T, Shi W, Crawford R, Xiao Y. ERK-1/2 and p38 in the regulation of hypertrophic changes of normal articular cartilage chondrocytes induced by osteoarthritic subchondral osteoblasts. *Arthritis and rheumatism*. 2010;62(5):1349-60.
 240. Prasad I, Crawford R, Xiao Y. Aggravation of ADAMTS and matrix metalloproteinase production and role of ERK1/2 pathway in the interaction of osteoarthritic subchondral bone osteoblasts and articular cartilage chondrocytes -- possible pathogenic role in osteoarthritis. *The Journal of rheumatology*. 2012;39(3):621-34.

241. Hollenberg MD, Compton SJ. International Union of Pharmacology. XXVIII. Proteinase-activated receptors. *Pharmacological reviews*. 2002;54(2):203-17.
242. Boileau C, Amiable N, Martel-Pelletier J, Fahmi H, Duval N, Pelletier JP. Activation of proteinase-activated receptor 2 in human osteoarthritic cartilage upregulates catabolic and proinflammatory pathways capable of inducing cartilage degradation: a basic science study. *Arthritis research & therapy*. 2007;9(6):R121.
243. Amiable N, Tat SK, Lajeunesse D, Duval N, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Boileau C. Proteinase-activated receptor (PAR)-2 activation impacts bone resorptive properties of human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts. *Bone*. 2009;44(6):1143-50.
244. Blaney Davidson EN, van der Kraan PM, van den Berg WB. TGF-beta and osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2007;15(6):597-604.
245. Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. The control of chondrogenesis. *Journal of cellular biochemistry*. 2006;97(1):33-44.
246. Zhao L, Li G, Zhou GQ. SOX9 directly binds CREB as a novel synergism with the PKA pathway in BMP-2-induced osteochondrogenic differentiation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2009;24(5):826-36.
247. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocrine reviews*. 2000;21(4):393-411.
248. Daans M, Luyten FP, Lories RJ. GDF5 deficiency in mice is associated with instability-driven joint damage, gait and subchondral bone changes. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011;70(1):208-13.
249. Gong Z KV. Fish development and genetics: the zebrafish and medaka models World Scientific Publishing;. 2004(Singapore).
250. Tagariello A, Luther J, Streiter M, Didt-Koziel L, Wuelling M, Surmann-Schmitt C, Stock M, Adam N, Vortkamp A, Winterpacht A. Ucma--A novel secreted factor represents a highly specific marker for distal chondrocytes. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2008;27(1):3-11.
251. Neacsu CD, Grosch M, Tejada M, Winterpacht A, Paulsson M, Wagener R, Tagariello A. Ucmaa (Grp-2) is required for zebrafish skeletal development. Evidence for a functional role of its glutamate gamma-carboxylation. *Matrix*

- biology : journal of the International Society for Matrix Biology. 2011;30(7-8):369-78.
252. C. Fazenda IALS, M. L. Cancela, N. Conceição. Molecular characterization of the two genes encoding Gla-rich protein (Grp) in zebrafish. 2012.
 253. Eitzinger N, Surmann-Schmitt C, Bosl M, Schett G, Engelke K, Hess A, von der Mark K, Stock M. Ucma is not necessary for normal development of the mouse skeleton. *Bone*. 2012;50(3):670-80.
 254. Koyama E, Yasuda T, Minugh-Purvis N, Kinumatsu T, Yallowitz AR, Wellik DM, Pacifici M. Hox11 genes establish synovial joint organization and phylogenetic characteristics in developing mouse zeugopod skeletal elements. *Development*. 2010;137(22):3795-800.
 255. Fazenda C SI, Cancela ML, Conceição N. . Molecular characterization of the two genes encoding Gla-rich protein (Grp) in zebrafish. . *J Appl Ichthyology*. 2012.
 256. Viegas CS, Cavaco S, Neves PL, Ferreira A, Joao A, Williamson MK, Price PA, Cancela ML, Simes DC. Gla-rich protein is a novel vitamin K-dependent protein present in serum that accumulates at sites of pathological calcifications. *The American journal of pathology*. 2009;175(6):2288-98.
 257. Viegas CSB CN, Fazenda C, Simes DC, Cancela ML. Expression of Gla-rich protein (GRP) in newly developed cartilage-derived cell cultures from sturgeon (*Acipenser naccarii*). *J Appl Ichthyology*. 2010;2010;26:214–8.
 258. Le Jeune M TN, Tian TV, Flourens A, Marchand N, Camuzeaux B, Mallein-Gerin F, Duterque-Coquillaud M. Identification of four alternatively spliced transcripts of the Ucma/GRP gene, encoding a new Gla-containing protein. *Exp Cell Res* 2010;2010;316:203–15.
 259. Le Jeune M, Tomavo N, Tian TV, Flourens A, Marchand N, Camuzeaux B, Mallein-Gerin F, Duterque-Coquillaud M. Identification of four alternatively spliced transcripts of the Ucma/GRP gene, encoding a new Gla-containing protein. *Experimental cell research*. 2010;316(2):203-15.
 260. Viegas CSB MJ, Teixeira A, João A, Ferreira A, Neves PL, Smith E, Herfs M, Vermeer C, Simes DC. . GRP is a new VKD protein associated with ectopic calcifications and potential application in clinical diagnostics. *FASEB Summer Conference Carefree*. 2011.

261. CSB. V. Identification and characterization of a new calcium binding protein from sturgeon, Gla rich protein or GRP. Contribution to unveil its function in vertebrates. 2010.
262. Simes D CS, Ramos A, Silva J, Morera JL, Teixeira A, Smith E, Herfs M, Vermeer C, Viegas C. . Insights into the relation between Gla-rich protein (GRP) and osteoarthritis. Molecular, Structural and Clinical Aspects of Vitamin K and Vitamin K-Dependent Proteins, . MFASEB Summer Conference Carefree. 2011.
263. Le Jeune M D-CM, Flajollet S, Tian T, Legeai-Mallet L, Tomavo N, Flourens A, Holder-Espinasse M, Galéra P, Mallein-Gerin, F. The expression of GRP gene, encoding four new Gla-rich protein isoforms, is finely regulated in cartilage. Osteoporos Int 2011;22 Suppl 1: S52. 2011.
264. Loeser RF, Olex AL, McNulty MA, Carlson CS, Callahan MF, Ferguson CM, Chou J, Leng X, Fetrow JS. Microarray analysis reveals age-related differences in gene expression during the development of osteoarthritis in mice. Arthritis and rheumatism. 2012;64(3):705-17.
265. Viegas CS, Herfs M, Rafael MS, Enriquez JL, Teixeira A, Luis IM, van 't Hoofd CM, Joao A, Maria VL, Cavaco S, Ferreira A, Serra M, Theuwissen E, Vermeer C, Simes DC. Gla-rich protein is a potential new vitamin K target in cancer: evidences for a direct GRP-mineral interaction. BioMed research international. 2014;2014:340216.
266. Lee YJ, Park SY, Lee SJ, Boo YC, Choi JY, Kim JE. Ucma, a direct transcriptional target of Runx2 and Osterix, promotes osteoblast differentiation and nodule formation. Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society. 2015;23(8):1421-31.
267. Neogi T, Booth SL, Zhang YQ, Jacques PF, Terkeltaub R, Aliabadi P, Felson DT. Low vitamin K status is associated with osteoarthritis in the hand and knee. Arthritis and rheumatism. 2006;54(4):1255-61.
268. Silaghi CN, Fodor D, Cristea V, Craciun AM. Synovial and serum levels of uncarboxylated matrix Gla-protein (ucMGP) in patients with arthritis. Clinical chemistry and laboratory medicine. 2011;50(1):125-8.
269. Massague J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. Genes & development. 2005;19(23):2783-810.
270. Fukui N, Zhu Y, Maloney WJ, Clohisy J, Sandell LJ. Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF-alpha in normal and

- osteoarthritic chondrocytes. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2003;85-A Suppl 3:59-66.
271. Lian JB, Stein GS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Montecino M, Hassan MQ, Gaur T, Lengner CJ, Young DW. Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2006;7(1-2):1-16.
 272. Fisher LW, Fedarko NS. Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connective tissue research*. 2003;44 Suppl 1:33-40.
 273. Bülent Gögebakan Mİ, Hamza Malik Okuyan and Leyla Ataç. Biomarkers for Early Diagnosis of Osteoarthritis. *SMGr up*. 2016.
 274. Lund SA, Giachelli CM, Scatena M. The role of osteopontin in inflammatory processes. *Journal of cell communication and signaling*. 2009;3(3-4):311-22.
 275. Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, Willette RN, Aiyar NV, Romanic AM, Loudon CS, Foley JJ, Sauermelch CF, Coatney RW, Ao Z, Disa J, Holmes SD, Stadel JM, Martin JD, Liu WS, Glover GI, Wilson S, McNulty DE, Ellis CE, Elshourbagy NA, Shabon U, Trill JJ, Hay DW, Ohlstein EH, Bergsma DJ, Douglas SA. Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature*. 1999;401(6750):282-6.
 276. Gogebakan B, Uruc V, Ozden R, Duman IG, Yagiz AE, Okuyan HM, Aldemir O, Dogramaci Y, Kalaci A. Urotensin II (U-II), a novel cyclic peptide, possibly associated with the pathophysiology of osteoarthritis. *Peptides*. 2014;54:159-61.
 277. Dai HY, He T, Li XL, Xu WL, Ge ZM. Urotensin-2 promotes collagen synthesis via ERK1/2-dependent and ERK1/2-independent TGF-beta1 in neonatal cardiac fibroblasts. *Cell biology international*. 2011;35(2):93-8.
 278. Liu DG, Wang J, Zhang ZT, Wang Y. The urotension II antagonist SB-710411 arrests fibrosis in CCL4 cirrhotic rats. *Molecular medicine reports*. 2009;2(6):953-61.
 279. Onat AM, Turkbeyler IH, Pehlivan Y, Demir T, Kaplan DS, Taysi S, Ceribasi AO, Tutar E, Kisacik B. The efficiency of a urotensin II antagonist in an experimental lung fibrosis model. *Inflammation*. 2012;35(3):1138-43.
 280. Pehlivan Y, Gogebakan B, Oztuzcu S, Ozgen M, Cetin GY, Bayraktar R, Cengiz B, Kisacik B, Koca SS, Donmez S, Sayarlioglu M, Demiryurek AT, Onat AM.

- Association between Thr21Met and Ser89Asn polymorphisms of the urotensin II gene and systemic sclerosis. *The Journal of rheumatology*. 2012;39(1):106-11.
281. Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae. *Journal of immunology*. 2002;169(6):3353-62.
 282. Xing L, Carlson L, Story B, Tai Z, Keng P, Siebenlist U, Boyce BF. Expression of either NF-kappaB p50 or p52 in osteoclast precursors is required for IL-1-induced bone resorption. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2003;18(2):260-9.
 283. Rauner M, Sipos W, Pietschmann P. Osteoimmunology. *International archives of allergy and immunology*. 2007;143(1):31-48.
 284. Nakashima T, Takayanagi H. The dynamic interplay between osteoclasts and the immune system. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2008;473(2):166-71.
 285. Kwan Tat S, Pelletier JP, Lajeunesse D, Fahmi H, Lavigne M, Martel-Pelletier J. The differential expression of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts is an indicator of the metabolic state of these disease cells. *Clinical and experimental rheumatology*. 2008;26(2):295-304.
 286. Nakashima T TH. The dynamic interplay between osteoclasts and the immune system. . *Archives of biochemistry and biophysics*. 2008.
 287. Sagar DR, Ashraf S, Xu L, Burston JJ, Menhinick MR, Poulter CL, Bennett AJ, Walsh DA, Chapman V. Osteoprotegerin reduces the development of pain behaviour and joint pathology in a model of osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2014;73(8):1558-65.
 288. Kwan Tat S, Amiable N, Pelletier JP, Boileau C, Lajeunesse D, Duval N, Martel-Pelletier J. Modulation of OPG, RANK and RANKL by human chondrocytes and their implication during osteoarthritis. *Rheumatology*. 2009;48(12):1482-90.
 289. Trouvin AP, Goeb V. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. *Clinical interventions in aging*. 2010;5:345-54.
 290. Martin TJ. Historically significant events in the discovery of RANK/RANKL/OPG. *World journal of orthopedics*. 2013;4(4):186-97.

291. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual review of immunology*. 2009;27:519-50.
292. Jacques C, Gosset M, Berenbaum F, Gabay C. The role of IL-1 and IL-1Ra in joint inflammation and cartilage degradation. *Vitamins and hormones*. 2006;74:371-403.
293. Zeng GQ, Chen AB, Li W, Song JH, Gao CY. High MMP-1, MMP-2, and MMP-9 protein levels in osteoarthritis. *Genetics and molecular research : GMR*. 2015;14(4):14811-22.
294. Tchetverikov I, Lohmander LS, Verzijl N, Huizinga TW, TeKoppele JM, Hanemaaijer R, DeGroot J. MMP protein and activity levels in synovial fluid from patients with joint injury, inflammatory arthritis, and osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2005;64(5):694-8.
295. Jonitz-Heincke A, Lochner K, Schulze C, Pohle D, Pustlank W, Hansmann D, Bader R. Contribution of human osteoblasts and macrophages to bone matrix degradation and proinflammatory cytokine release after exposure to abrasive endoprosthetic wear particles. *Molecular medicine reports*. 2016;14(2):1491-500.
296. Andrianarivo AG, Robinson JA, Mann KG, Tracy RP. Growth on type I collagen promotes expression of the osteoblastic phenotype in human osteosarcoma MG-63 cells. *Journal of cellular physiology*. 1992;153(2):256-65.
297. Franceschi RT, Iyer BS. Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1992;7(2):235-46.
298. Franceschi RT, Iyer BS, Cui Y. Effects of ascorbic acid on collagen matrix formation and osteoblast differentiation in murine MC3T3-E1 cells. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1994;9(6):843-54.
299. Hayami T, Kapila YL, Kapila S. MMP-1 (collagenase-1) and MMP-13 (collagenase-3) differentially regulate markers of osteoblastic differentiation in osteogenic cells. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2008;27(8):682-92.
300. Mizuno M, Fujisawa R, Kuboki Y. Type I collagen-induced osteoblastic differentiation of bone-marrow cells mediated by collagen- α 2 β 1 integrin interaction. *Journal of cellular physiology*. 2000;184(2):207-13.

301. Partridge NC, Walling HW, Bloch SR, Omura TH, Chan PT, Pearman AT, Chou WY. The regulation and regulatory role of collagenase in bone. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*. 1996;6(1):15-27.
302. Varghese S, Canalis E. Regulation of collagenase-3 by bone morphogenetic protein-2 in bone cell cultures. *Endocrinology*. 1997;138(3):1035-40.
303. Komori T. Cell Death in Chondrocytes, Osteoblasts, and Osteocytes. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(12).
304. O'Brien CA, Jia D, Plotkin LI, Bellido T, Powers CC, Stewart SA, Manolagas SC, Weinstein RS. Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength. *Endocrinology*. 2004;145(4):1835-41.
305. Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L, Han K, DiGregorio GB, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Roberson PK, Weinstein RS, Jilka RL, Manolagas SC. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell*. 2001;104(5):719-30.
306. Stanislaus D, Yang X, Liang JD, Wolfe J, Cain RL, Onyia JE, Falla N, Marder P, Bidwell JP, Queener SW, Hock JM. In vivo regulation of apoptosis in metaphyseal trabecular bone of young rats by synthetic human parathyroid hormone (1-34) fragment. *Bone*. 2000;27(2):209-18.
307. Gohel A, McCarthy MB, Gronowicz G. Estrogen prevents glucocorticoid-induced apoptosis in osteoblasts in vivo and in vitro. *Endocrinology*. 1999;140(11):5339-47.
308. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *The Journal of clinical investigation*. 1998;102(2):274-82.
309. Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *The Journal of clinical investigation*. 1999;104(10):1363-74.
310. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM, Manolagas SC. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *The Journal of clinical investigation*. 1999;104(4):439-46.

311. Tomkinson A, Reeve J, Shaw RW, Noble BS. The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1997;82(9):3128-35.
312. Ozeki N, Mogi M, Nakamura H, Togari A. Differential expression of the Fas-Fas ligand system on cytokine-induced apoptotic cell death in mouse osteoblastic cells. *Archives of oral biology*. 2002;47(7):511-7.
313. Pochawan Taburee DS, Nuttapong Wongjindanon, Suthat Fucharoen and Dalina Itchayanan Tanyong. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha induced apoptosis via caspase in leukemic K 562 and HL-60 cell lines. *Songklanakarin J Sci Technol*. 2011.
314. Tsuboi M, Kawakami A, Nakashima T, Matsuoka N, Urayama S, Kawabe Y, Fujiyama K, Kiriya T, Aoyagi T, Maeda K, Eguchi K. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta increase the Fas-mediated apoptosis of human osteoblasts. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1999;134(3):222-31.
315. Kuzushima M, Mogi M, Togari A. Cytokine-induced nitric-oxide-dependent apoptosis in mouse osteoblastic cells: involvement of p38MAP kinase. *Archives of oral biology*. 2006;51(11):1048-53.
316. Kim YG, Park JW, Lee JM, Suh JY, Lee JK, Chang BS, Um HS, Kim JY, Lee Y. IL-17 inhibits osteoblast differentiation and bone regeneration in rat. *Archives of oral biology*. 2014;59(9):897-905.
317. Honorati MC, Neri S, Cattini L, Facchini A. Interleukin-17, a regulator of angiogenic factor release by synovial fibroblasts. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2006;14(4):345-52.
318. Wang K, Xu J, Cai J, Zheng S, Han W, Antony B, Ding C. Serum levels of interleukin-17 and adiponectin are associated with infrapatellar fat pad volume and signal intensity alteration in patients with knee osteoarthritis. *Arthritis research & therapy*. 2016;18:193.
319. Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, Saito S, Inoue K, Kamatani N, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *The Journal of clinical investigation*. 1999;103(9):1345-52.
320. Huang H, Kim HJ, Chang EJ, Lee ZH, Hwang SJ, Kim HM, Lee Y, Kim HH. IL-17 stimulates the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem

- cells: implications for bone remodeling. *Cell death and differentiation*. 2009;16(10):1332-43.
321. Zhang F, Tanaka H, Kawato T, Kitami S, Nakai K, Motohashi M, Suzuki N, Wang CL, Ochiai K, Isokawa K, Maeno M. Interleukin-17A induces cathepsin K and MMP-9 expression in osteoclasts via celecoxib-blocked prostaglandin E2 in osteoblasts. *Biochimie*. 2011;93(2):296-305.
322. Zhang F, Koyama Y, Sanuki R, Mitsui N, Suzuki N, Kimura A, Nakajima A, Shimizu N, Maeno M. IL-17A stimulates the expression of inflammatory cytokines via celecoxib-blocked prostaglandin in MC3T3-E1 cells. *Archives of oral biology*. 2010;55(9):679-88.



ÖZGEÇMİŞ

Hamza Malik OKUYAN, 1984 yılında Sakarya’da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Sakarya’da tamamladı. 2009 yılında Lisans eğitimini Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nde tamamladı. 2011 yılında Yüksek Lisans eğitimini aynı üniversitenin, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalında tamamladı. 2012 yılında Gaziantep Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Doktora eğitimine başladı.

