

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TİBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TİBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI**

**OSTEOARTRİTTE KONDROSİT DEJENERASYONUNA NEDEN
OLAN ÖLÜM YOLAKLARINDA TAURİNİN ETKİSİ**

HAZIRLAYAN

BAHTİYAR HABERAL

DOKTORA TEZİ

ANKARA - 2025

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI**

**OSTEOARTRİTTE KONDROSİT DEJENERASYONUNA NEDEN
OLAN ÖLÜM YOLAKLARINDA TAURİNİN ETKİSİ**

HAZIRLAYAN

BAHTİYAR HABERAL

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. HASİBE VERDİ

ANKARA – 2025

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Tıbbi Biyoloji Doktora Programı çerçevesinde Bahtiyar Haberal tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 21/02/2025

Tez Adı: Osteoartritte Kondrosit Dejenerasyonuna Neden Olan ÖlümYolaklarında Taurinin Etkisi

Tez Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı - Soyadı, Kurumu)

İmza

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 21 / 02 / 2025

Öğrencinin Adı, Soyadı: Bahtiyar Haberal

Öğrencinin Numarası: 21810447

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Programı: Tıbbi Biyoloji Doktora Programı.

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı: Prof. Dr. Hasibe Verdi

Tez Başlığı: Osteoartritte Kondrosit Dejenerasyonuna Neden Olan Ölüm Yolaklarında Taurinin Etkisi.

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans/Doktora tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam **90** sayfalık kısmına ilişkin, **03/02/2025** tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından **TURNITIN** adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %9'dur. Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

“Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını” inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası:.....

ONAY

Tarih: 21 / 02 / 2025

Öğrenci Danışmanı Unvan, Ad, Soyad, İmza:

TEŞEKKÜR

Çalışmam süresince tez danışmanlığımı üstlenerek bana yol gösteren, tez konumun belirlenmesinde, çalışmamın planlanmasında, gerçekleştirilmesinde ve sonuçlandırılmasında her türlü bilimsel katkı ve manevi desteğini esirgemeyen çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Hasibe VERDİ'ye,

Doktora programına beni kabul eden ve bize tüm süreç boyunca her zaman yardım eden Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. F. Belgin ATAÇ'a,

Hem doktora programı süresince yaptığımız yayınlarda hem de tez sürecinde laboratuvar aşamasında fedakarca çalışan hocalarım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Yaprak YALÇIN ve Dr. Öğr. Üyesi H. Pınar BAYSAN ÇEBİ'ye,

Yeterliliğe kadar olan sürede bilgisinden ve desteğinden hep yararlandığım hocam Sayın Prof. Dr. Erkan YURTCU'ya,

Deneylerimi yürütmemde her zaman destek olan Sağlık Teknisyeni Serap SEZER ve Sağlık Teknisyeni Yüksel SUER'e,

Tezimin değerlendirilmesi sırasında değerli katkı ve desteklerinden dolayı Başkent Üniversitesi Biyoistatistik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Meriç YAVUZ ÇOLAK ve Arş. Grv. Caner İNCEKAŞ'a,

Doktora yapmamı teşvik eden ve desteğini hep yanımda hissettiğim Başkent Üniversitesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. İ. Cengiz TUNCAY'a,

Tezimin yazım aşamasında her ihtiyaç duyduğum anda yardıma koşan Dr. Deniz Mert AYAN'a,

Tek başıma olsam bir noktada pes edeceğim bu yolun her aşamasında ve her zaman yanımda olan kardeşim Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ekin Kaya ŞİMŞEK'e,

Her zaman yanımda olan, herşeyi onlar için yaptığım canım Elifcan'a, Zeynep'e ve Ömer Ali'ye

en içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Bahtiyar Haberal, Osteoartritte Kondrosit Dejenerasyonuna Neden Olan Ölüm Yolaklarında Taurinin Etkisi, Başkent Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Doktora Programı, 2025

Osteoartrit (OA), dünya genelinde 250 milyondan fazla insanı etkileyen ve özellikle yaşlı nüfusta sık görülen kronik, ilerleyici bir eklem hastalığıdır. OA, önemli ölçüde morbidite ve yaşam kalitesinde düşüşe yol açması nedeniyle, gelişmiş ülkelerde gayri safi milli hasılanın %2'sini aşan sağlık harcamalarına neden olmaktadır. Bu nedenle, OA tedavisine yönelik yeni ve etkili yaklaşımlar üzerine çalışmalar büyük ilgi görmektedir. Güncel araştırmalar, OA patogenezinde eklem kıkırdığının dejenerasyonu ve kronik inflamasyonun ana faktörler olduğunu göstermektedir. Eklem kıkırdığı, hücre dışı matriks (ECM) ve kondrositlerden (kıkırdak hücreleri) oluşur. Eklem kıkırdığındaki tek hücre tipi olan kondrositler, sağlıklı kıkırdak yapısının ve eklem hareketliliğinin korunmasından sorumlu oldukları için OA tedavisinde hedef hücreler olarak kabul edilir. Hücre ölümü, morfolojik temelde üç ana tipe ayrılır: apoptoz, otofajik hücre ölümü ve nekroz/nekroptoz. Bu üç hücre ölümü yolu arasındaki etkileşimin net olarak anlaşılması, OA tedavisinde önemli bir adım olabilir. Taurin, özellikle uyarılabilir dokulardaki hücrelerde yüksek konsantrasyonlarda bulunan yarı esansiyel bir β -amino asittir. Memelilerde birçok fizyolojik işlevi olan taurin, araştırmacılar için en dikkat çekici özelliği hücre koruyucu (sitoprotektif) etkileridir. Bununla birlikte, taurinin OA üzerindeki etkileri konusunda sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı, taurinin OA patogenezi üzerindeki etkisini ve bunun otofaji/ apoptoz/nekroptoz ile ilişkisini göstermektir. Kelgren-Lawrence Sınıflandırmasına göre evre 3 OA tanısı alan ve total diz replasman cerrahisi yapılan hastalardan cerrahi sırasında alınan sağlıklı ve osteoartritlik kondrositler kültüre edilmiş; daha sonra taurin, apoptoz inhibitörü Z-vAD, nekroptoz inhibitörü necrostatin-1 (Nec-1) kullanılarak oluşturulan deney gruplarında uygun doz ve süreler belirlenmiştir. Otofaji belirteci Beclin1 ve p62 (SQSTM1, Sequestosome-1), nekroptoz belirteci Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3 (RIP3), apoptoz belirteci Bcl-2-associated X protein (Bax) ve B-cell leukemia/lymphoma 2 protein (Bcl-2) ve kondrosit yapısal geni aggrecanın ifadenmelerini saptamak amacı ile ters transkripsiyonlu kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR); kondrosit belirteci kolajen 2, otofaji belirteçleri light chain 3 I/II (LC3I/II), p62 ve Bcl-2 interacting protein 1 (Beclin 1) ile apoptoz

belirteçleri olan Kaspaz 3 ve Poly [ADP-ribose] polymerase 1 (Parp1) ifadenmesi Western Blot yöntemi ile analiz edilmiştir. Taurin Nec-1 ile kombinasyon halinde uygulandığında hücre canlılığını arttırıcı etkiler göstermiştir. RT-qPCR analizleri, bu grubun daha yüksek aggrekan düzeylerine sahip olduğunu göstermektedir. Kollajen 2 ölçümleri incelendiğinde, yine bu grupta en yüksek seviyede olduğu görülmektedir. Bu durum, nekroptoz inhibisyonunun kıkırdak metabolizması üzerindeki potansiyel koruyucu etkilerini ortaya koymaktadır. Bu bulgular, taurin ve Nec-1 kombinasyonunun OA tedavisinde umut verici bir yaklaşım olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Osteoartrit, Taurin, Kondrosit, Nekroptoz, Apoptoz

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no: KA21/339-KA21/400-KA22/272) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

ABSTRACT

Bahtiyar Haberal, The Effect of Taurine on Death Pathways Causing Chondrocyte Degeneration in Osteoarthritis, Başkent University, Institute of Health Sciences, PhD Program in Medical Biology, 2025

Osteoarthritis (OA) is a chronic, progressive joint disease that affects over 250 million people worldwide and is particularly prevalent among the elderly population. Due to its significant contribution to morbidity and reduced quality of life, OA leads to healthcare expenditures exceeding 2% of the gross national product in developed countries. Consequently, research into new and effective approaches for OA treatment has garnered considerable interest. Recent studies indicate that the degeneration of joint cartilage and chronic inflammation are key factors in OA pathogenesis. Joint cartilage is composed of the extracellular matrix (ECM) and chondrocytes. Chondrocytes, the only cell type in joint cartilage, are considered target cells in OA treatment because they are responsible for maintaining healthy cartilage structure and joint mobility. Cell death is morphologically categorized into three main types: apoptosis, autophagic cell death, and necrosis/necroptosis. A clear understanding of the interplay between these three cell death pathways could be a significant step in OA treatment. Taurine, a semi-essential β -amino acid, is found in high concentrations in excitable tissues and has various physiological functions in mammals. Its most notable feature, which has attracted researchers' attention, is its cytoprotective effects. However, there are limited studies on the effects of taurine on OA. The aim of this study is to demonstrate the effects of taurine on OA pathogenesis and its relationship with autophagy/apoptosis/necroptosis. Healthy and osteoarthritic chondrocytes were cultured from patients diagnosed with stage 3 OA according to the Kellgren-Lawrence Classification and who underwent total knee replacement surgery. Experimental groups were established using taurine, the apoptosis inhibitor Z-vAD, and the necroptosis inhibitor necrostatin-1 (Nec-1), with appropriate doses and durations determined. Reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR) was used to detect the expression of autophagy markers Bcl-2 interacting protein 1 (Beclin 1) and p62 (SQSTM1, Sequestosome-1), necroptosis marker Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3 (RIP3), apoptosis markers Bcl-2-associated X protein (Bax) and B-cell leukemia/lymphoma 2 protein (Bcl-2), and the chondrocyte structural gene aggrecan. Western blot analysis was performed to assess the expression of chondrocyte marker Collagen 2, autophagy markers Light chain 3 I/II

(LC3I/II), p62, and Bcl-2 interacting protein 1 (Beclin 1), as well as apoptosis markers Caspase 3 and Poly [ADP-ribose] polymerase 1 (Parp1). When taurine was combined with necrostatin-1, it showed cell viability-enhancing effects. RT-qPCR analyses revealed that this group had higher levels of aggrecan. Collagen 2 measurements also indicated the highest levels in this group. These findings suggest that necroptosis inhibition may have potential protective effects on cartilage metabolism. Overall, these results suggest that the combination of taurine and necrostatin-1 could be a promising approach in OA treatment.

Keywords: Osteoarthritis, Taurine, Chondrocyte, Necroptosis, Apoptosis

This study was approved by the Başkent University Medical and Health Sciences Research Board (Project no: KA21/339-KA21/400-KA22/272) and supported by the Başkent University Research Fund.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
TABLolar LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Osteoartrit.....	3
2.2 Hücre Ölüm Yolakları	6
2.2.1. Apoptoz	6
2.2.1.1. Dışsal apoptoz yolu (ölüm reseptörü yolak).....	7
2.2.1.2. İçsel apoptoz yolu (mitokondriyal yolak).....	8
2.2.1.3. Kondrosit apoptozunun osteoartrit ile ilişkisi ve terapötik yaklaşımlar	11
2.2.2. Nekroptoz.....	13
2.2.2.1. Nekroptoz ve OA	15
2.2.3. Otofaji	18
2.2.3.1. Seçici otofaji türleri.....	21
2.2.3.2. Osteoartrit (OA) ve otofaji ilişkisi	23
2.2.3.3. Otofajinin düzenlenmesi ve OA patogenezi	24
2.2.3.4. Kondrosit otofajisinin önemi.....	25
2.2.3.5. Otofaji ve terapötik hedefler	27
2.3. Taurin.....	27
2.3.1. Biyolojik fonksiyonları	28
2.3.2. Taurin ve apoptoz ilişkisi	28
2.3.3. Taurin ve nekroptoz ilişkisi.....	29
2.3.4. Taurin ve otofaji ilişkisi.....	29
2.3.5. Osteoartrit (OA) ve taurin	29
2.3.6. Terapötik potansiyel	29
2.4. Çalışmanın Amacı	30
3.GEREÇ VE YÖNTEM	31

3.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar, Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar.....	31
3.1.1 Çalışmada kullanılan cihazlar	31
3.1.2 Çalışmada kullanılan malzemeler	31
3.2 Yöntemler	33
3.2.1 Örnek toplama ve hazırlama	33
3.2.2 Primer kondrosit hücre kültürü	34
3.2.3 Hücrelerin dondurulması	34
3.2.4 Hücrelerin çözülmesi	34
3.2.5 Hücrelerin pasajlanması.....	36
3.2.6 Taurin hazırlama	36
3.2.7 Z-VAD hazırlama.....	36
3.2.8 Necrostatin-1 hazırlama	36
3.2.9 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)	
hücre canlılığı deneyi	37
3.2.10 Hücre kültürü materyalinden RNA izolasyonu	39
3.2.11 RNA saflığının ve miktarının tayini	40
3.2.12 Komplementer DNA (cDNA) sentezi.....	40
3.2.13. Gen ifadenmesinin ters transkripsiyonlu kantitatif gerçek zamanlı	
PZR(RT-qPCR) ile saptanması.....	41
3.2.14 Western blot analizi	42
3.3 İstatistiksel Analiz	43
4.BULGULAR	44
4.1 Hücre Kültürü Bulguları.....	44
4.2 Hücre Canlılığı Bulguları	45
4.2.1 Taurin doz ve süre analizleri.....	46
4.2.2 zVAD doz ve süre analizleri	49
4.2.3 Nekrostatin 1 doz ve süre analizleri	52
4.3 Ters Transkripsiyonlu Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR(RT-qPCR) Bulguları	
.....	57
4.4 Western Blot Analizi Bulguları.....	68
5. TARTIŞMA.....	78
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	89
KAYNAKLAR.....	91

TABLÖLER LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1. Apoptoz ve nekroptozun önemli noktaları.....	18
Tablo 3.1. Hücre Ekim Sayıları.....	35
Tablo 3.2. Çalışma deney grupları.....	38
Tablo 3.3. Kalıp-primer karışımı (1 reaksiyon için)	40
Tablo 3.4. Komplementer DNA (cDNA) karışım.....	41
Tablo 3.5. Tezde araştırılması planlanan proteinlere ait kullanılan antikorlar.....	43
Tablo 4.1. Sağlıklı ve OA'lı kondrositlerde taurin uygulamasının farklı doz ve sürelerdeki ortalama değerleri.....	46
Tablo 4.2. Taurin uygulamasının sağlıklı kondrositlerde gruplar arası çoklu karşılaştırmalara ilişkin anlamlılık değerleri.....	47
Tablo 4.3. Taurin uygulamasının OA'lı kondrositlerde gruplar arası çoklu karşılaştırmalara ilişkin anlamlılık değerleri.....	47
Tablo 4.4. Sağlıklı ve OA'lı kondrositlerde zVAD uygulamasının farklı doz ve sürelerdeki ortalama değerleri.....	49
Tablo 4.5. zVAD uygulamasının sağlıklı kondrositlerde gruplar arası çoklu karşılaştırmalara ilişkin anlamlılık değerleri.....	49
Tablo 4.6. zVAD uygulamasının OA'lı kondrositlerde gruplar arası çoklu karşılaştırmalara ilişkin anlamlılık değerleri.....	50
Tablo 4.7. Sağlıklı ve OA'lı kondrositlerde Nekrostatin-1 uygulamasının farklı doz ve sürelerdeki ortalama değerleri.....	52
Tablo 4.8. Nekrostatin-1 uygulamasının sağlıklı kondrositlerde gruplar arası çoklu karşılaştırmalara ilişkin anlamlılık değerleri.....	53
Tablo 4.9. Nekrostatin-1 uygulamasının OA'lı kondrositlerde gruplar arası çoklu karşılaştırmalara ilişkin anlamlılık değerleri.....	53
Tablo 4.10. Uygulama yapılan gruplarda saptanan ortalama değerler.....	55

Tablo 4.11. OA’li kondrositlerde uygulama grupları hücre canlılığı çoklu karşılaştırmalara ilişkin anlamlılık değerleri.....	55
Tablo 4.12. Sağlıklı kondrositlerde ACAN gen ifadenmesi ortalama ve medyan değerlerin karşılaştırılması	57
Tablo 4.13. OA’li kondrositlerde ACAN gen ifadenmesi ortalama ve medyan değerlerin karşılaştırılması	58
Tablo 4.14. Sağlıklı kondrositlerde RIPK3 gen ifadenmesi ortalama ve medyan değerlerin karşılaştırılması	59
Tablo 4.15. OA’li kondrositlerde RIPK3 gen ifadenmesi ortalama ve medyan değerlerin karşılaştırılması	60
Tablo 4.16. Sağlıklı kondrositlerde BAX ve BCL2 gen ifadenmeleri ortalama ve medyan değerlerin karşılaştırılması	62
Tablo 4.17. OA’li kondrositlerde BAX ve BCL2 gen ifadenmesi ortalama ve medyan değerlerin karşılaştırılması	63
Tablo 4.18. Sağlıklı kondrositlerde BECN1 ve SQSTM1 gen ifadenmeleri ortalama ve medyan değerlerin karşılaştırılması	66
Tablo 4.19. OA’li kondrositlerde BECN1 ve SQSTM1 gen ifadenmesi ortalama ve medyan değerlerin karşılaştırılması	67
Tablo 4.20. OA’li kondrositlerde Col2A1 protein düzeylerinin karşılaştırılması	68
Tablo 4.21. Sağlıklı kondrositlerde PARP1, Kaspaz 3 protein düzeylerinin karşılaştırılması	69
Tablo 4.22. OA’li kondrositlerde PARP1, Kaspaz 3 protein düzeylerinin karşılaştırılması	71
Tablo 4.23. Sağlıklı kondrositlerde Beclin, Lc3b, p62 protein düzeylerinin karşılaştırılması	73
Tablo 4.24. OA’li kondrositlerde Beclin, Lc3b, p62 protein düzeylerinin karşılaştırılması	75

Tablo 4.25. Beclin 1 protein düzeylerinin gruplar arası çoklu karşılaştırmalara ilişkin anlamlılık değerleri.....	75
--	----



ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Osteoartrit patogeneğinde kondrosit üzerinde etkili faktörler.....	4
Şekil 1.2. Osteoartrit patogeneğinde rol oynayan bazı hücre ölüm yolları.....	6
Şekil 1.3. Apoptozun intrinsik ve ekstrinsik aktivasyon yolları.....	10
Şekil 1.4. Osteoartritte nekroptozun rolü.....	15
Şekil 1.5. Nekroptozu inhibe eden çeşitli moleküller.....	17
Şekil 1.6. Otofajinin farklı tipleri.....	20
Şekil 1.7. Otofaji ve OA arasındaki ilişki.....	24
Şekil 1.8. Otofaji yolağındaki çeşitli potansiyel tedavi hedefleri.....	25
Şekil 4.1. Çoğalmaya başlayan primer osteoartrit hücrelerinin ışık mikroskobu altındaki görüntüleri (Olympus IX73)	44
Şekil 4.2. Aggregan gen ifadenmesinin RT-qPCR ile gösterilmesi.....	45
Şekil 4.3. Col2A1 gen ifadenmesinin RT-qPCR ile gösterilmesi.....	45
Şekil 4.4. Sağlıklı ve OA'lı kondrositlerde 25mM 24 saat Taurin uygulaması hücre canlılığı değerlerinin karşılaştırılması	48
Şekil 4.5. Sağlıklı ve OA'lı kondrositlerde zVAD uygulaması hücre canlılığı değerlerinin karşılaştırılması	51
Şekil 4.6. Sağlıklı ve OA'lı kondrositlerde Nekrostatin-1 uygulaması hücre canlılığı değerlerinin karşılaştırılması	54
Şekil 4.7. OA'lı kondrositlerde hücre canlılığı değerlerinin karşılaştırılması.....	56
Şekil 4.8. Sağlıklı kondrositlerde ACAN gen ifadenmesi qRT-PCR analizi kat artışı.....	58
Şekil 4.9. OA'lı kondrositlerde ACAN gen ifadenmesi qRT-PCR analizi kat artışı	59
Şekil 4.10. Sağlıklı kondrositlerde RIPK3 gen ifadenmesi qRT-PCR analizi kat artışı	60

Şekil 4.11. OA'lı kondrositlerde RIPK3 gen ifadenmesi qRT-PCR analizi kat artışı	61
Şekil 4.12. Sağlıklı kondrositlerde BAX ve BCL2 gen ifadenmesi qRT-PCR analizi kat artışı	62
Şekil 4.13. OA'lı kondrositlerde BAX ve BCL2 gen ifadenmesi qRT-PCR analizi kat artışı	64
Şekil 4.14. Sağlıklı kondrositlerde Bax/Bcl2 ifadenme oranları.....	65
Şekil 4.15. OA'lı kondrositlerde Bax/Bcl2 ifadenme oranları.....	65
Şekil 4.16. Sağlıklı kondrositlerde BECN1 ve SQSTM1 gen ifadenmesi qRT-PCR analizi kat artışı	66
Şekil 4.17. OA'lı kondrositlerde BECN1 ve SQSTM1 gen ifadenmesi qRT-PCR analizi kat artışı	68
Şekil 4.18. OA'lı kondrositlerde Col2A1 Western Blot analizi.....	69
Şekil 4.19. Sağlıklı kondrositlerde PARP1 ve Kaspaz 3 için Western Blot analizi.....	70
Şekil 4.20. OA'lı kondrositlerde PARP1 ve Kaspaz 3 için Western Blot analizi.....	72
Şekil 4.21. Sağlıklı kondrositlerde Beclin1, LC3B, p62 için Western Blot analizi.....	74
Şekil 4.22. OA'lı kondrositlerde Beclin1, LC3B, p62 için Western Blot analizi.....	77

SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

ACAN	aggrekan
ADAMTS	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
ALS	amyotrofik lateral skleroz
AMP	adenozin monofosfat
AMPK/mTOR	adenosine monophosphate-activated protein kinase/mechanistic (or mammalian) target of rapamycin
AMPK:	AMP ilişkili kinaz
Apaf-1	apoptotic protease activating factor-1
ATG	autophagy-related genes
ATP	adenozin trifosfat
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell leukemia/lymphoma 2 protein
Beclin 1	Bcl-2 interacting protein 1
Bid	BH3 interacting-domain death agonist
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death
BMP	bone morphogenic protein
cDNA	komplementer DNA
cFLIP	FLICE-like inhibitory protein
CHOP	C/EBP Homolog Protein
cIAP1	cellular inhibitor of apoptosis protein-1
CMA	chaperon mediated autophagy
Col2A1	kolajen tip II alfa 1 zinciri
Cyt C	sitokrom C
DAMP	damage associated molecular patterns
DISC	ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DMEM	Dulbecco modified eagle's medium
DMSO	dimetil sülfoksit
ECM	hücre dışı matriks
ELISA	enzyme linked immuno absorbant assay
EndoG	endonükleaz G
ER	endoplazmik retikulum
FADD	Fas-ilişkili ölüm domeini
GAPDH	gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
HSP	heat shock proteins
IBD	enflamatuar bağırsak hastalığı
IFN	interferon
IL-1 β	interlökin-1 beta
LAMP2A	lysosome-associated membrane protein-2A
LC3I/II	light chain 3 I/II
LKB1	liver protein kinase B1
MLKL	mixed lineage kinase domain like pseudokinase
MMP	matriks metalloproteinaz
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
Nec-1	necrostatin 1
NF-K β	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NO	nitrik oksit

Nrf-2	nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2
NSAID	non-steroid antienflamatuar ila
OA	osteroartrit
OD	optic density
OPA-1	optik atrofi-1
p53	tümör protein 53
Parp1	poly [ADP-ribose] polymerase 1
PBS	fosfat tamponlu salin
PLC�1	phospholipase C gamma-1
PVDF	polyvinylidene fl�oride
RA	romatoid artrit
RIG-I	retinoic acid-inducible gene I
RIP	receptor-interacting serine/threonine-protein kinase
ROS	reaktif oksijen türleri
RT-qPCR	kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Quantitative real-time PCR)
SOD	süperoksit dismutaz
SQSTM1	sequestosome-1
TLR	toll-like receptor
TNF- �	tumor necrosis factor alpha
TNFR	TNF Reseptörü
TRADD	TNF reseptörü ilişkili ölüm domeini
TRAF	TNF Receptor Associated Factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAILR	TRAIL reseptörleri
TRIM24	tripartite motif-containing 24
USP13	ubikitin-spesifik proteaz 13

1. GİRİŞ

Osteoartrit (OA), dünya çapında 250 milyondan fazla insanı etkileyen ve en sık geriatrik nüfusta görülen; eklemlerde kıkırdak kaybına, kıkırdak altındaki kemiğin patolojik yeniden şekillenmesine, sinoviyal membranın enflamasyonuna ve osteofit oluşumuna neden olan kronik dejeneratif ilerleyici bir hastalıktır (1). Yaşlanma, obezite, aşırı kullanım, travma, eklem instabilitesi ve benzeri diğer anormal yüklenme koşullarının OA gelişimini indüklediği ve eklem harabiyetini arttırdığı bildirilmiştir (2). Önemli morbidite ve morbidite ile ilişkili olması nedeniyle gelişmiş ülkelerde OA ile ilgili maliyetlerin gayri safi milli hasılanın %2'sini aştığı tahmin edilmektedir. Artan sağlık bakım yükü nedeniyle OA tedavisine ilişkin yeni ve etkili çalışmalar halen ilgi görmektedir (3).

OA'nın neden olduğu eklem harabiyeti sonucunda hastaların eklemleri ve bunu çevreleyen dokularda tendon kontraksiyonları, kas spazmları, bağ gevşekliklerinin neden olduğu eklem ağrısı, eklem sertlikleri ve eklem şişlikleri ortaya çıkar (2). Bu semptomların tedavisinde halihazırda kullanılan analjezikler, opioidler ve nonsteroidal antiinflatuar ilaçlar, yalnızca ağrı ve enflamasyon gibi semptomları hafifletmekteyken hastalığın ilerlemesini önlemekte başarısız olmaktadır. Diğer yandan bu ilaçlar gastrointestinal kanama başta olmak üzere çok geniş ölçekte yan etkilerle ilişkilidir (4). Eklem içi enjeksiyonların (trombositten zengin plazma, hyaluronik asit ve kortikosteroidler) ise uzun dönem takipte hastaların fonksiyonel sonuçlarını iyileştirmede bildirilmektedir. Günümüzde ağrı, fonksiyon bozukluğu ve deformiteyi düzeltmek için nihai cerrahi çözüm yöntemi olarak total diz artroplastisi kullanılmaktadır (5).

Güncel araştırmalar, OA patogenezinde rol oynayan ana faktörlerin eklem kıkırdak dejenerasyonu ve kronik inflamasyon olduğunu göstermektedir. Eklem kıkırdağı, hücre dışı matriks ve kondrositlerden oluşur. Ana patolojik belirtiler, kondrositlerin yaşlanması, çoğalmasının azalması ve apoptozunun yol açtığı kıkırdak dokunun bozulması, hücre dışı matriksin (ECM) içeriğinin değişmesi ve osteokondral kemik sklerozunun sonucunda oluşan osteofit formasyonudur (6). OA patogenezinin bu bileşenleri içinde eklem kıkırdağında yer alan tek hücre olan kondrositler, insanlarda ve hayvanlarda sağlıklı kıkırdak yapısının ve eklem hareketliliğinin korunmasından sorumlu oldukları için OA tedavisinin hedef hücreleri olarak kabul edilirler (2).

Hücre morfolojisine dayalı olarak üç ana hücre ölümü türü tanımlanmıştır: apoptoz, otofajik hücre ölümü ve nekroz ve/veya nekroptoz. Literatürde daha önce yapılan çalışmalarda, kondrositlerde bu üç tip hücre ölümünün de gözlemlendiği bildirilmiştir (7-9). Günümüzde, genellikle adaptif bir yanıt olarak otofajinin OA'in erken evrelerinde hücre ölümünü azaltabileceğine inanılmaktadır, ancak OA gelişmesiyle birlikte aşırı otofajinin de hücre ölümüne neden olabileceği düşünülmektedir. Bu üç ölüm yolu arasındaki ilişkinin net bir şekilde ortaya koyulmasının OA tedavisinde önemli bir dönüm noktası olacağı tahmin edilmektedir.

Taurin özellikle uyarılabilir dokulardaki hücreler başta olmak üzere çoğu hücrede yüksek seviyelerde bulunan yarı esansiyel bir β -amino asittir. Taurin, memelilerde birçok işleve sahip olmasına rağmen, araştırmacılar için en ilgi çekici özelliği sağlık ve beslenme durumu üzerinde etkin rol oynayan sitoprotektif fonksiyonlarıdır (10). Literatürde yapılan çalışmalar, taurinin uygun şekilde takviye edilmesinin tip 2 diyabetli hastalarda diyabete bağlı nefropati, nöropati, ateroskleroz ve kardiyomiyopati gibi patolojileri önleyebileceğini göstermiştir (11). Bununla birlikte, taurinin OA üzerindeki etkileri ile ilgili az sayıda çalışma mevcuttur (2, 12). Ancak, taurinin OA patogenezinde otofaji/apoptoz/nekroptoz arası konuşmada bir etkisinin olup olmadığı ise bilinmemektedir.

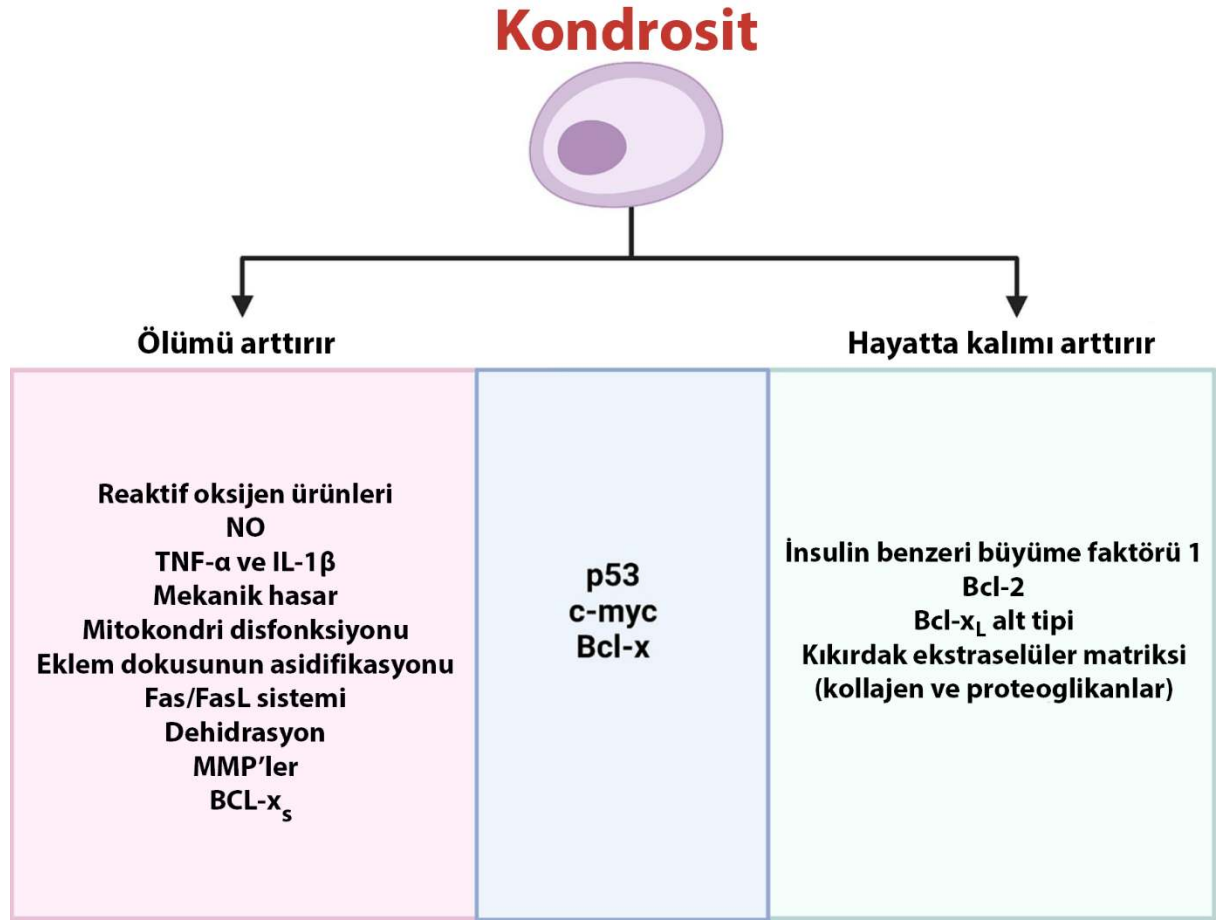
2. GENEL BİLGİLER

2.1 Osteoartrit

Osteoartrit (OA), dünya çapında 250 milyondan fazla insanı etkileyen ve en sık geriatrik nüfusta görülen; eklemlerde kıkırdak kaybına, kıkırdak altındaki kemiğin patolojik yeniden şekillenmesine, sinoviyal membranın enflamasyonuna ve osteofit oluşumuna neden olan kronik dejeneratif ilerleyici bir hastalıktır (1). Yaşlanma, obezite, aşırı kullanım, travma, eklem instabilitesi ve benzeri diğer anormal yüklenme koşullarının OA gelişimini indüklediği ve eklem harabiyetini arttırdığı bildirilmiştir (2). 2018 yılından raporlara göre 60 yaşın üzerindeki erkeklerin yaklaşık %10'u ve kadınların %18'inde OA görüldüğü tespit edilmiştir (3). OA prevalansı 65 yaş üstü erkek nüfusta yaklaşık %60 ve kadın nüfusta yaklaşık %70'tir (4). OA'nın hastalarda önemli bir morbidite sebebi olması nedeniyle gelişmiş ülkelerde ilgili maliyetlerin gayri safi milli hasılanın %2'sini aştığı tahmin edilmektedir. Artan sağlık hizmeti maliyetleri nedeniyle bir halk sağlığı sorunu olmaya devam eden OA'nın tedavisine ilişkin yeni çalışmalar halen ilgi görmektedir (3).

OA'nın neden olduğu eklem harabiyeti sonucunda hastaların eklemleri ve bunu çevreleyen dokularda tendon kontraksiyonları, kas spazmları, bağ gevşekliklerinin neden olduğu eklem ağrısı, eklem sertlikleri ve eklem şişlikleri ortaya çıkar (2). Bu semptomların tedavisinde halihazırda kullanılan analjezikler, opioidler ve non-steroid antienflamatuvar ilaçlar gibi ajanlar, yalnızca ağrı ve enflamasyon semptomlarını hafifletmekte, hastalığın ilerlemesini engellemekte başarısız olmaktadır. Diğer yandan bu ilaçlar gastrointestinal kanama dahil çeşitli yan etkilerle ilişkilidir (4). Eklem içi enjeksiyonların (trombositten zengin plazma, hiyalüronik asit ve kortikosteroidler) ise uzun dönem takipte hastaların fonksiyonel sonuçlarını iyileştirmediği bildirilmektedir. Günümüzde ağrı, fonksiyon bozukluğu ve

deformiteyi düzeltmek için nihai cerrahi çözüm yöntemi olarak total diz artroplastisi kullanılmaktadır (5).

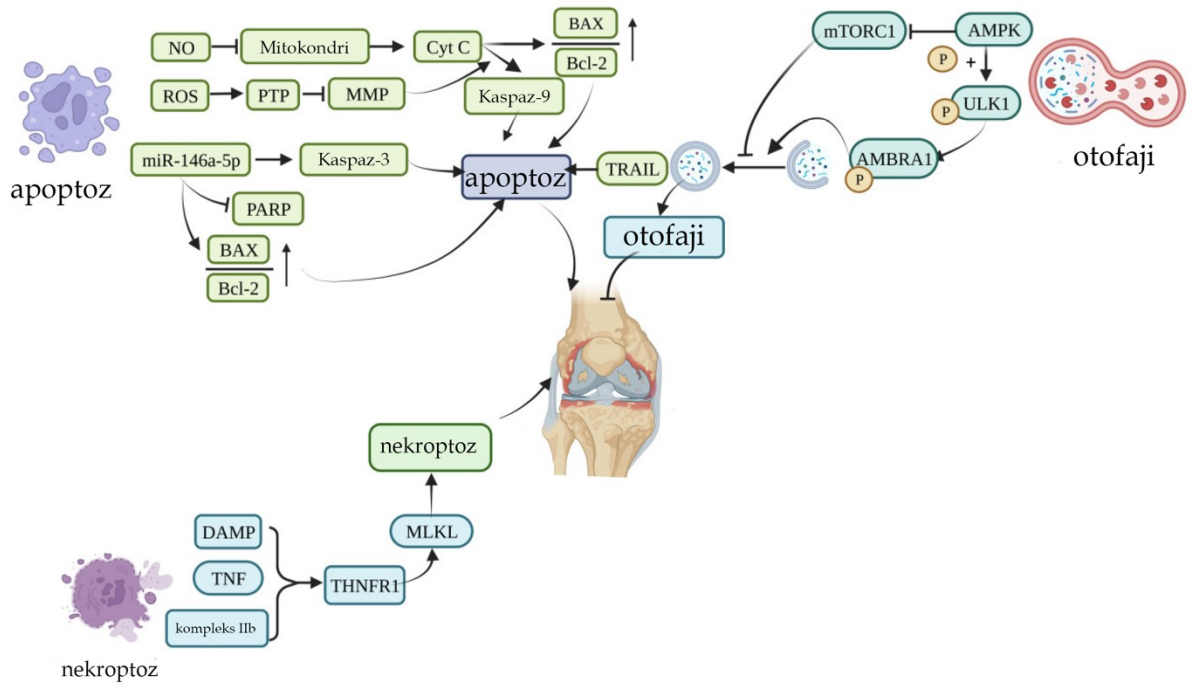


Şekil 1.1. Osteoartrit patogeneğinde kondrosit üzerinde etkili faktörler(13)

Güncel araştırmalar, OA patogeneğinde rol oynayan ana faktörlerin eklem kıkırdak dejenerasyonu ve kronik inflamasyon olduğunu göstermektedir. Eklem kıkırdağı, hücre dışı matris ve kondrositlerden oluşur. Ana patolojik belirtiler, kondrositlerin yaşlanması, çoğalmasının azalması ve apoptozunun yol açtığı kıkırdak dokunun bozulması, hücre dışı matrisin (ECM) içeriğinin değişmesi ve osteokondral kemik sklerozunun sonucunda oluşan osteofit formasyonudur (6). OA patogeneğinin bu bileşenleri içinde eklem kıkırdağında yer alan tek hücre olan kondrositler, insanlarda ve hayvanlarda sağlıklı kıkırdak yapısının ve eklem hareketliliğinin korunmasından sorumlu oldukları için OA tedavisinin hedef hücreleri olarak kabul edilirler (2). Kondrositlerin yaşam döngüsü üzerinde birçok farklı faktör etkilidir (Şekil 1.1.). Eklem kıkırdağının yıkımı ile artan inflamatuvar sitokinler ve ortaya çıkan oksidatif stres reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini tetikler. Zaman içinde reaktif oksijen ürünlerinin

birikimi sonucunda kondrosit apoptozu artar ve kondrositler yaşlanır. Bu nedenle, kondrositlerde görülen apoptoz ve yaşlanmasının araştırılması, kıkırdak yıkımının daha iyi anlaşılmasını sağlayarak OA tedavisi için yeni stratejiler geliştirilmesine katkıda bulunacaktır (14).

OA patogenezinde hücre ölüm yollarının rolü son yıllarda rağbet gören bir araştırma alanıdır (**Şekil 1.2.**). Hücre ölümünün önceden yalnızca patolojik sebeplerle gerçekleştiği düşünülse de günümüzde hücre ölümünün homeostazın korunmasında kritik bir rol oynadığı ve embriyogenez gibi çeşitli süreçlerde gerekli olduğu artık kabul görmektedir. Apoptoz, otofaji ve nekrofaji iyi tanımlanmış hücre ölüm mekanizmalarıdır ve OA patogenezindeki yerleri çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir. OA'te, aşırı apoptoz kıkırdak üretimini bozar ve eklem dejenerasyonuna sebep olur. Kaspaz aktivitesine yönelik tedavilerin (örneğin, Kaspaz-3 inhibisyonu), OA ilerlemesini yavaşlatmada faydalı olabileceği gösterilmiştir. Otofaji, hücresel bileşenleri geri dönüştürerek ve homeostazı koruyarak koruyucu bir rol oynar. İleri OA evrelerinde azalan otofaji, hücresel hasara yol açar. Adenosine monophosphate-activated protein kinase/mechanistic (or mammalian) target of rapamycin (AMPK/mTOR) yolunun modülasyonu gibi otofajiyi teşvik eden stratejiler, kıkırdak yıkımını önlemeye yardımcı olabilir. OA'da nekroptoz, inflamasyona ve kıkırdak yıkımına yol açar. Nekroptozu inhibe etmek için RIP kinazlarını hedeflemek, kondrosit fonksiyonunu korumak için potansiyel bir tedavi stratejisi olarak ortaya çıkmıştır.



Şekil 1.2. Osteoartrit patogenezinde rol oynayan bazı hücre ölüm yolları(15)

2.2 Hücre Ölüm Yolları

2.2.1. Apoptoz

Apoptoz, genetik olarak belirlenmiş programlanmış hücre ölümü sürecidir ve organizmanın gelişimi, homeostazı ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde kritik rol oynar (16). Bu süreç, embriyogenez sırasında gereksiz hücrelerin ortadan kaldırılması, bağışıklık sistemi hücrelerinin seçici olarak yok edilmesi, dokuların yenilenmesi ve hasar görmüş hücrelerin elimine edilmesi gibi birçok biyolojik olayı düzenler. Apoptozun bozulması kanser, otoimmün hastalıklar ve nörodejeneratif rahatsızlıklar gibi çeşitli patolojilere yol açabilir (17).

Apoptoz sırasında hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu artar; morfolojik olarak kromatin yoğunlaşması, çekirdek bozulması, hücrenin yuvarlaklaşması ve psödopod çekilmesi gibi özelliklerle tanımlanır. Aktive olmuş endonükleazlar ile DNA, 180-200 baz çifti veya katları şeklinde kesilir. Bu süreç, hücre içi ve dışı sinyaller tarafından tetiklenebilir ve içsel (mitokondriyal) ya da dışsal (ölüm reseptörü) yollar aracılığıyla yürütülür. Apoptozun belirgin bir özelliği, inflamasyona sebep olmamasıdır. Bu sayede sistemik veya lokalize hasar oluşmaz ve organizma korunur. Sitoplazmik bir lipid olan fosfatidilün hücre membranı dış yüzeyine çıkması “beni ye” sinyali oluşturur ve fagositik hücrelerin fosfatidilününe bağlanması sonucu apoptotik cisimlerin fagositozu ile ortam temizlenir (18).

Apoptoz, kaspazlar adı verilen sistin bağımlı aspartat yönlendirilmiş proteazlar tarafından yürütülür. Kaspazlar inaktif prokaspazlar olarak sentezlenir ve uygun sinyallerle aktive olarak hücre ölümüne neden olurlar. Apoptoz, temel olarak iki ana yolak üzerinden tetiklenir (**Şekil 1.3.**):

Dışsal Apoptoz Yolu (Ölüm Reseptörü Yolak)

İçsel Apoptoz Yolu (Mitokondriyal Yolak) (18-21)

Her iki yol da ortak bir yürütme aşamasına ulaşarak kaspaz-3 aktivasyonu aracılığıyla hücre ölümüne neden olur.

2.2.1.1. Dışsal apoptoz yolu (ölüm reseptörü yolak)

Dışsal apoptoz yolu, hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri tarafından başlatılır (22). Bu reseptörler, tümör nekroz faktörü (TNF) süper ailesine ait olup, ligandları ile etkileşime girerek hücre ölümünü başlatır. Başlıca ölüm reseptörleri şunlardır:

- **Fas (CD95/DR2)**
- **TNF Reseptörü 1 (TNFR1/DR1)**
- **TRAIL Reseptörleri (TRAILR1/DR4 ve TRAILR2/DR5)**

Ölüm reseptörleri, spesifik ligandları (FasL, TNF- α , TRAIL) ile bağlandığında, sitoplazmada bulunan Fas-ilişkili ölüm domeni (FADD) ve TNF reseptörü ilişkili ölüm domeini (TRADD) gibi adaptör proteinleri ile etkileşime girer. Bu etkileşim sonucunda **ölüm-indükleyici sinyal kompleksi (DISC)** oluşur. DISC, prokaspaz-8'i bağlayarak aktive eder ve aktif kaspaz-8, yürütücü kaspazları (özellikle kaspaz-3) aktive ederek hücrenin ölümüne neden olur.

TNFR1 aktivasyonu sırasında, iki ardışık sinyal kompleksi oluşur:

1. **Kompleks I:** TNFR1, TRADD, RIP1 ve TRAF2'den oluşur ve NF- κ B yolunu aktive ederek hücrenin hayatta kalmasını sağlayabilir.
2. **Kompleks II:** TRADD ve RIP1, FADD ve prokaspaz-8'i rekrute eder ve kaspaz-8 aktivasyonu ile hücre ölümünü başlatır.

Ayrıca, kaspaz-8 BH3 interacting-domain death agonist (Bid) proteinini keserek içsel apoptoz yolunu da tetikleyebilir. Bu şekilde dışsal yol içsel yolu destekleyerek hücre ölümünü hızlandırır.

Ekstrinsik apoptoz, immün sistem fonksiyonu için kritik öneme sahiptir. Bu mekanizma ile aktive olmuş T-lenfositler ve enfekte hücreler ile kanser hücreleri ortadan kaldırılabılır (20).

2.2.1.2. İçsel apoptoz yolu (mitokondriyal yolak)

İçsel apoptoz yolu, hücre içindeki stres faktörleri veya DNA hasarı gibi uyaranlarla tetiklenir (20, 22, 23). Bu uyaranlar arasında:

- DNA hasarı
- Hipoksi
- Endoplazmik retikulum stresi
- Sitoplazmik Ca^{2+} konsantrasyonunun aşırı yükselmesi
- Oksidatif stres
- Kemoterapötik ajanlar ve toksinler

İçsel apoptoz yolu, **Bcl-2 ailesi proteinleri** tarafından düzenlenir. Pro-apoptotik (Bax, Bak, Bid) ve anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-xL) proteinler arasındaki denge, hücrenin hayatta kalıp kalmayacağını belirler (17).

Bax ve Bak, mitokondriyal dış zar geçirgenliğini (MOMP) artırarak sitokrom c'nin sitoplazmaya salınmasını tetikler. Sitoplazmaya geçen sitokrom c, Apaf-1 ve kaspaz-9 ile birleşerek **apoptozom kompleksini** oluşturur. Bu kompleks, kaspaz-9 aktivasyonu ile kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7'yi aktive ederek hücrenin apoptoza girmesini sağlar.

Aynı zamanda, **Smac/DIABLO** ve **serin proteaz Omi/HtrA2**, apoptoz inhibe edici proteinlerin (IAP) etkisini ortadan kaldırarak kaspaz aktivitesini artırır. Ayrıca, **endonükleaz G (EndoG)** mitokondriyal DNA'yı parçalayarak kaspaz bağımsız hücre ölümüne yol açabilir. Mitokondriyal dış zar bozulmasının yanı sıra, iç mitokondriyal zarın (IMM) değişiklikleri de apoptozu etkileyebilir. **Optik atrofi-1 (OPA1)**, mitokondriyal zar bütünlüğünü koruyan bir proteindir ve kaybı, sitokrom c'nin salınımına ve kaspaz-bağımlı apoptoza neden olabilir (20, 22, 24).

Bcl-2 ailesi proteinleri hücrel stres faktörlerine yanıt veren **anti-apoptotik** ve **pro-apoptotik** proteinler olarak iki ana gruba ayrılır:

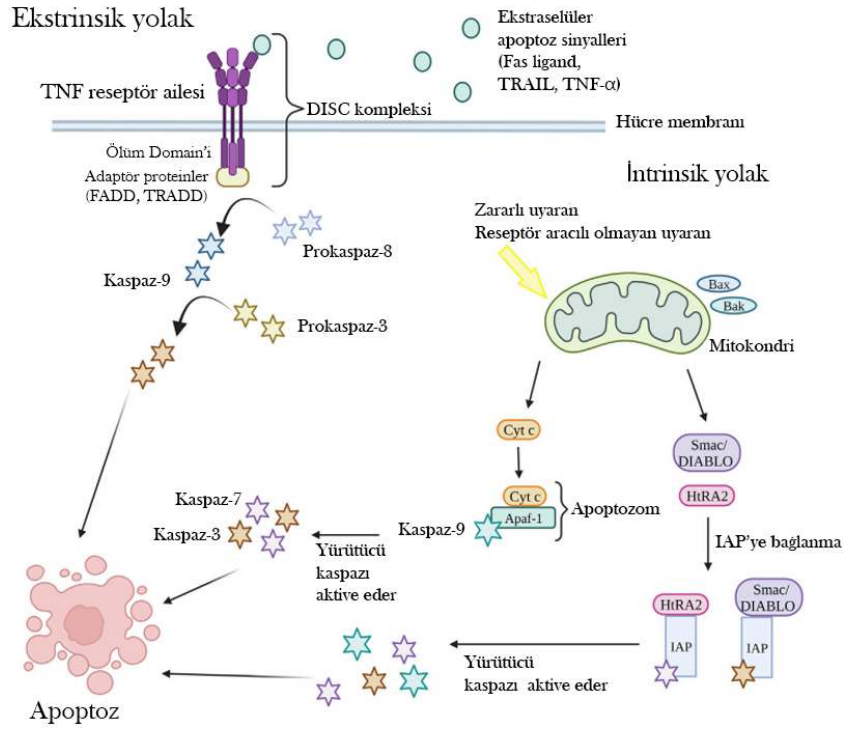
a) Anti-Apoptotik Proteinler:

- **Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1**
- Hücreyi apoptozdan korur, mitokondriyal membran bütünlüğünü sağlar.
- Pro-apoptotik proteinlerin aktivasyonunu ve oligomerizasyonunu engeller.

b) Pro-Apoptotik Proteinler:

- **Bax ve Bak** (efektör proteinler): Mitokondriyal dış membranda porlar oluşturarak MOMP'u indükler.
- **Sadece BH3 proteinler** (aktivatörler ve duyarlılaştırıcılar):
 - **Aktivatörler (Bim, tBid, Puma):** Bax ve Bak'ı doğrudan aktive eder.
 - **Duyarlılaştırıcılar (Bad, Noxa, Bik):** Anti-apoptotik proteinleri inhibe ederek Bax ve Bak'ın serbest kalmasını sağlar.

Sadece BH3 duyarlılaştırıcı proteinler (Bad, Noxa), anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerine bağlanarak onları nötralize eder. Sadece BH3 aktivatör proteinler (Bim, tBid, Puma), Bax ve Bak'a bağlanarak konformasyonel değişikliklere ve oligomerizasyonlarına neden olur. Bax ve Bak, mitokondriyal dış membranda porlar oluşturarak sitokrom c gibi apoptotik faktörlerin salınımını başlatır. Sitokrom c salınımı, apoptozom kompleksinin (sitokrom c, Apaf-1, kaspaz-9) oluşumuna yol açar. Kaspaz-9'un aktivasyonu ile efektör kaspazlar (kaspaz-3, -7) aktive olur ve apoptozun fenotipik değişiklikleri başlar. **Bcl-2/Bax oranı** hücrenin kaderini belirler.



Şekil 1.3. Apoptozun intrinsik ve ekstrinsik aktivasyon yolları(17)

Apoptotik uyarıma bağlı olarak ekstrinsik yolağın intrinsik yolak ile haberleşebildiği görülmektedir. Ekstrinsik yolda kaspaz-8 aktivasyonunu takiben sitozoldeki Bid'in kesilmesiyle oluşan tBid, intrinsik yolda olduğu gibi mitokondriden sitokrom-c salınmasına aracılık eder. Sitoplazmaya salınan sitokrom-c, adaptör protein Apoptotic protease activating factor-1 (Apaf-1) ve adenosin trifosfat (ATP) ile birleşerek apoptozom kompleksinin oluşumuna yol açar.

Apoptozis vücudun gelişimi sırasında organların şekillenmesi ve gereksiz veya hasarlı hücrelerin düzenli şekilde yok edilmesi için önemli bir süreçtir. Hücrenin ve dokuların normal işlev ve dengesi için önemli olan bu yolağın aşırı aktivasyonu nörodejeneratif hastalıklar ve otoimmün durumlarda hasara sebep olur. Apoptozun patolojik olarak baskılanması ise kansere sebep olabilir. Apoptozun baskılanması veya indüklenmesi farklı patolojiler için tedavi seçenekleri olarak incelenmektedir.

2.2.1.3. Kondrosit apoptozunun osteoartrit ile ilişkisi ve terapötik yaklaşımlar

OA'da, kaspaz ve Bcl-2 gibi genlerdeki değişiklikler hücre ölümü ve enflamasyonun düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Tümör protein 53 (p53) genindeki mutasyonlar OA gelişimiyle yakından ilişkili olsa da bazı büyüme faktörleri, sitokinler ve hormonlar da kondrositlerin gen ekspresyonunu ve apoptotik sürecini etkiler. Kondrosit apoptoz oranı belirli bir eşiği aştığında, kondrosit popülasyonunda bir azalma meydana gelir. Bu düşüş sadece kıkırdak matrisinin sentezini ve salgılanmasını engellemekle kalmaz, aynı zamanda kıkırdak matrisi sentezini ve yıkımını sürdürmekten sorumlu enzim sistemlerinin dengesini de bozar. Sonuç olarak, bu dengesizlik kıkırdak matriksinde kalitatif ve kantitatif değişikliklere yol açarak kondrosit apoptozunu daha da şiddetlendirir ve kıkırdak dejenerasyonu döngüsünü devam ettirir. Bu nedenle, kondrosit apoptozunun inhibisyonu, OA'nın önlenmesi ve tedavisi için potansiyel olarak etkili bir stratejiyi temsil etmektedir.

z-VAD (z-VAD-FMK), kaspazların aktif bölgelerine bağlanan geniş spektrumlu bir kaspaz inhibitörüdür ve apoptozu engelleyen bir bileşiktir. z-VAD, özellikle hücre ölümü mekanizmalarını araştırmak için laboratuvar çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir araçtır. z-VAD, özellikle kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 gibi önemli kaspazları inhibe eder. z-VAD, apoptozu inhibe ettiğinde, hücreler alternatif ölüm yollarına (örneğin, nekroptoz veya piroptoz) yönelebilir. Özellikle nekroptoz çalışmalarında, z-VAD kullanılarak apoptozun engellenmesi ve nekroptozun tetiklenmesi sağlanır. z-VAD'in uzun süreli kullanımı, hücrelerin alternatif ölüm yollarına (örneğin, nekroptoz) yönelmesine neden olabilir. Bu durum, sonuçların yorumlanmasını zorlaştırabilir (25).

Kaspaz-3 geninin susturulmasının TNF ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir. α TNFR1, FADD ve IL-1 β inflamatuvar genlerine aracılık ederek in vitro apoptotik yolu zayıflatmıştır. Ayrıca, Kaspaz-3 geninin susturulması, cerrahi olarak indüklenen bir sıçan OA modelinde OARSI skorlarında ve Kaspaz-3, Kaspaz-9, MMP13 ve TNF- α dahil olmak üzere OA'da rol oynayan anahtar genlerin ekspresyonunda önemli bir azalma ile sonuçlanmıştır. Bu bulgular, **Kaspaz-3 gen ekspresyonunun hedeflenmesinin** kıkırdak hasarı ve OA tedavisi için yeni bir terapötik yaklaşım olarak umut vaat edebileceğini göstermektedir (26). Ayrıca, ubiquitin-spesifik proteaz 13 (USP13) tarafından indüklenen koruyucu etkilerin, nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2'nin (Nrf-2) iyileştirilmesi ve Kaspaz-3'ün inhibisyonu ile ilişkili olduğu bulunmuştur (27). Araştırmacılar, *Oldenlandia diffusa*'nın β -sitosterol bileşeninin Bax, Bcl2 ve JUN anahtar faktörlerini hedeflediğini ve bunun da kondrosit apoptozunun inhibisyonu

ile sonuçlandığını, ayrıca enflamasyon ve kıkırdak dejenerasyonunda önemli bir azalmaya yol açtığını göstermişlerdir. Sonuç olarak, çalışma apoptoz anahtar faktörleri Bax, Bcl2 ve JUN'un hedeflenmesinin OA için terapötik hedefler olarak umut vaat edebileceğini göstermektedir (28).

Oksidatif stres ve mitokondriyal solunum fonksiyonundaki bozulmalar hücre ölümü ve dejenerasyonu ile bağlantılı olduğundan, mitokondri hücre fonksiyonu ve hayatta kalması için gereklidir. Bir proteomik analizi, enerji üretimi, mitokondriyal membran bütünlüğünün korunması ve apoptoz sırasında serbest radikallerin detoksifikasyonu ile ilgili mitokondriyal proteinlerde, mitokondriyal süperoksit dismutaz (SOD) seviyelerinin azalması ve OA'dan etkilenen kondrositlerde hücre içi ROS üretiminin artması dahil olmak üzere önemli değişiklikler olduğunu ortaya koymuştur (29). Mitokondrinin depolarizasyonu, sitokrom c, apoptozis indükleyici faktör ve kaspaz-9 gibi apoptotik faktörlerin membranlar arası boşluktan salınmasıyla sonuçlanır (30).

Yüksek oranda korunmuş bir DNA bağlayıcı protein olan PARP-1, genomik stabilitenin korunmasında, DNA hasarının onarılmasında ve transkripsiyonel süreçlerin düzenlenmesinde önemlidir. İskemi reperfüzyon hasarı, hipertansiyon, ateroskleroz ve yaşlanma gibi çeşitli enflamatuvar durumlarla yakından ilişkilidir. Ayrıca, PARP-1 hücre apoptozunda önemli bir rol oynar. Sun ve arkadaşları, insan kondrosit kültüründe, in vitro OA modelinde PARP-1 inhibisyonunun etkilerini inceledikleri çalışmalarında IL-1 β 'nin kondrositlerin canlılığını azalttığını ve hücre apoptozunu artırdığını, IL-1 β stimülasyonunun PARP-1 ekspresyonunu ve aktivitesini artırabildiğini göstermişlerdir, PARP-1 inhibisyonu IL-1 β ile indüklenen enflamasyon yanıtını azaltmıştır. Sonuçlar, PARP-1 inhibisyonunun insan kondrositlerinde etkili anti-OA aktivitesine sahip olduğunu göstermiştir (31). Liu ve arkadaşları, OA sıçan modelinde PARP-1 ekspresyon seviyesinin önemli ölçüde arttığını, PARP-1 inhibisyonu ile OA kıkırdak enflamatuvar yanıtının hafiflediğini göstermişlerdir. Ayrıca, kıkırdakta aggrecan ve kolajen tip II alfa 1 zincirinin (Col2A1) ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Aggrekan ve Col2A1'in mRNA seviyeleri OA sıçanlarında Sham sıçanlarına kıyasla önemli ölçüde azalırken, PARP-1 inhibisyonu OA sıçanlarında aggrecan ve Col2A1 ekspresyon seviyelerini artırmıştır (32).

Sonuç olarak, kondrosit apoptozu OA patogenezinde kritik bir rol oynar. Bu süreç, hücre ölümünü kontrol eden Bcl-2 ailesi proteinleri ve kaspazlar gibi genlerin ekspresyonundaki düzensizlikler ile ilişkilidir. Mitokondriyal disfonksiyon, hücre iskeleti

bozulması ve inflamatuvar sinyaller gibi birçok faktör tarafından tetiklenir. OA'da apoptozun katılımı, Kaspaz-3, Kaspaz-9 ve USP13, Bax, Bcl2 ve JUN gibi diğer hedefler de dahil olmak üzere Kaspaz ailesinin üyeleriyle karmaşık bir şekilde bağlantılıdır. Bu hedeflerin daha fazla araştırılması, OA'da apoptoz tedavisi için yeni bilgiler sunabilir. Bu faktörler, kondrositlerdeki apoptotik süreci kolaylaştırmak için sinerjik olarak etkileşime girmektedir. OA'da kondrosit apoptozunu ele almak için birincil terapötik stratejiler apoptozun inhibisyonunu, hücre rejenerasyonunun uyarılmasını ve anti-enflamatuvar müdahaleleri kapsar. Kök hücre tedavisi ve gen tedavisi gibi yeni terapötik yöntemler şu anda araştırılmaktadır ve OA hastalarında tedavi etkinliğini artırmak için umut vaat etmektedir.

2.2.2. Nekroptoz

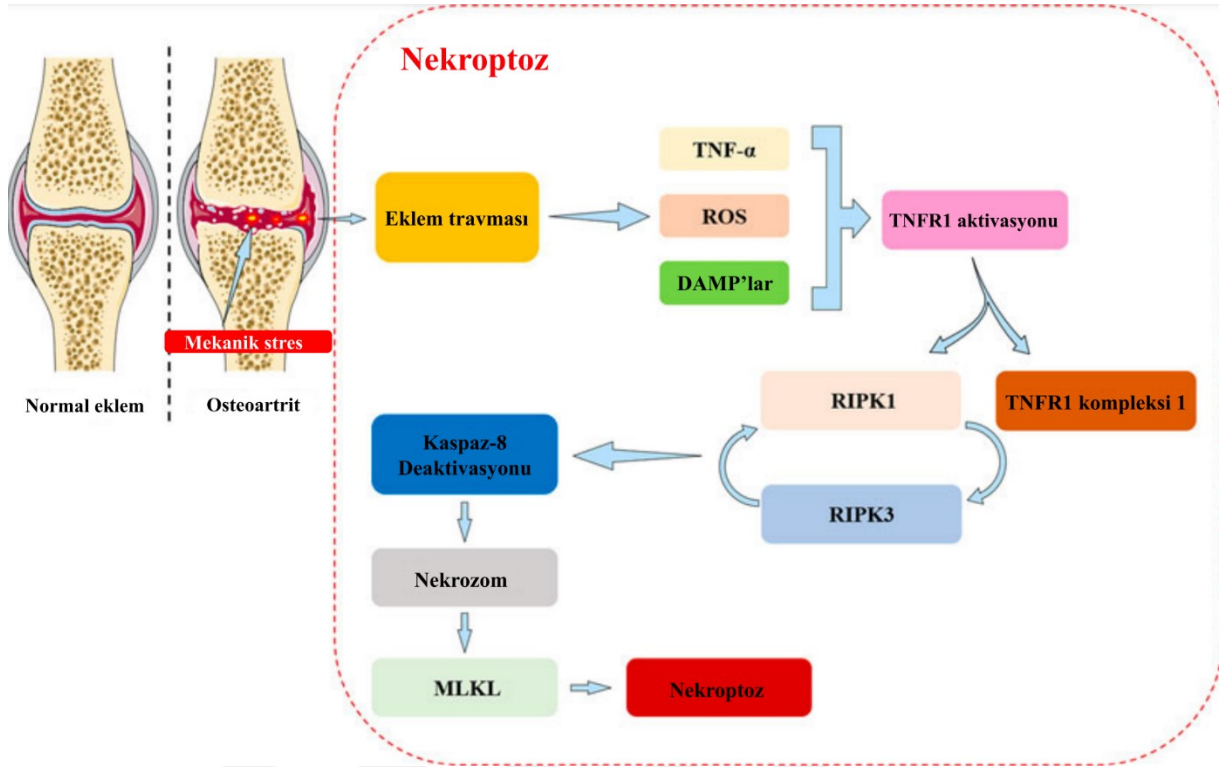
Apoptoz, ölen hücrelerin planlı bir şekilde parçalanmasını ve enflamasyona sebep olmadan uzaklaştırılmasını temsil ederken, nekroptoz ölen hücrenin lizisi ve bunun sonucunda ortaya çıkan güçlü bir inflamatuvar süreç ve potansiyel doku hasarı olarak tanımlanır. Nekroptoz, bazı dejeneratif veya inflamatuvar bozukluklar sırasında patojenle enfekte olmuş hücrelerin ve/veya hasar görmüş hücrelerin öldürülmesinde rolü olduğu düşünülen, genetik olarak programlanmış bir hücre ölüm yoludur. Kaspazlardan bağımsızdır. Nekroptoz; tümör nekroz faktör reseptörü (*tumor necrosis factor receptor*, TNFR) ve toll benzeri reseptör (*toll-like receptor*, TLR) aileleri, hücre içi DNA ve RNA sensörleri ve interferon (IFN) gibi çeşitli faktörler tarafından tetiklenebilir (33, 34). RIP1, RIP3 ve mixed lineage kinase domain like pseudokinase (MLKL) tarafından aktive edilir. Morfolojik olarak nekroza benzerdir ve bazı kaynaklarda programlı nekroz olarak tanımlanır. Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) benzeri reseptörler, TLR'ler ve ölüm reseptörleri gibi çeşitli doğal immün yollar, nekroptozu indükleyebilir. Bu süreçlerin tümü, nekroptotik kinaz olan reseptör-etkileşimli serin-treonin kinaz 3 (RIPK3)'ün fosforilasyonu ve aktivasyonu ile sonuçlanır. Özellikle, ölüm reseptörü aracılı nekroptoz yolunda RIPK1 aktivitesi gereklidir.

Tümör nekroz faktörünün (TNF), TNFR1 reseptörüne bağlanması, TNFR1 ile ilişkili ölüm bölgesi proteini (TRADD) aracılığıyla RIPK1'in fosforilasyonuna yol açar. Fosforile edilmiş RIPK1, RIPK3'ü aktive eder. Aktive edilen RIPK3, fosforilasyon yoluyla karışık seri kinaz benzeri psödokinazı (MLKL) etkinleştirir. Aktif hale gelen MLKL, hücre membranına yerleşerek membran geçirgenliğini artırır. Bu durum, hücre dışı matris oluşumuna, K⁺ ve Na²⁺ iyonlarının akışına, hücre şişmesine, membran potansiyelinin bozulmasına ve sonunda hücrenin parçalanmasına yol açar (Şekil 1.4.).

Hücre ölümü düzenleyicileri olan kaspaz-8 ve FADD benzeri apoptoz düzenleyici (cFLIP), uzun izoformlu kaspaz-8 heterodimerlerini oluşturur. Bu heterodimerler, RIPK1'i yıkıma uğratarak TNFR1 aracılı nekroptozun uyarımını inhibe edebilir. Nec-1, nekroptoz sürecini inhibe eden bir bileşiktir. Nekroptoz, apoptozdan farklı olarak kaspaz ile ilişkisi olmayan bir hücre ölümü mekanizmasıdır ve genellikle hücrenin patolojik koşullarda (enfeksiyon, inflamasyon, iskemi gibi) ölümüyle ilişkilidir. Nec-1, bu süreci engelleyerek hücre ölümünü önlemeye yönelik potansiyel terapötik etkilere sahip olabilir. Nekrostatin-1, RIPK1 aktivitesini inhibe ederek çalışır. RIPK1, nekroptoz sürecinde kritik bir rol oynar ve RIPK3 ile etkileşime girerek nekrozom adı verilen bir kompleks oluşturur. Bu kompleks, hücre ölümünü tetikler. Nec-1, RIPK1'in kinaz aktivitesini bloke ederek nekroptozu engeller ve hücrenin hayatta kalmasını destekler.

Nekrostatin-1, nekroptozun rol oynadığı Alzheimer, Parkinson, amiotrofik lateral skleroz (ALS), inflamatuvar bağırsak hastalığı (IBD), romatoid artrit (RA) ve bazı viral ve bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde ve kalp krizi veya inme sonrasında görülen reperfüzyon hasarının önlenmesi konusunda umut vadetse de nekroptoz inhibisyonunun uzun vadeli etkisi belirsizdir(35). Nec-1, nekroptozun moleküler mekanizmalarını anlamak ve bu süreci hedefleyen terapötik stratejiler geliştirmek için önemli bir araçtır. Özellikle nekroptozun rol oynadığı hastalıklarda, hücre ölümünü engellemeye yönelik potansiyel bir tedavi seçeneği olarak umut vaat etmektedir. Ancak, klinik kullanım için daha fazla araştırma gereklidir.

Nekroptozun çeşitli nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıkların etiyolojisinde rol oynadığı bulunmuştur. Kanser etyolojisinde ise vücudun apoptozise dirençli kanser hücrelerini temizlemesi için faydalı bir araç olarak rol alabilir veya doku hasarı ile kanser progresyonuna ve metastaza sebep olabilir. Nekroptozun özellikle RIP1 ve RIP3 inhibisyonu ile baskılanması enflamatuvar ve dejeneratif hastalıkların engellenmesinde önemli bir tedavi seçeneği olarak araştırılmaktadır.



Şekil 1.4. Osteoartritte nekroptozun rolü(36)

2.2.2.1. Nekroptoz ve OA

Nekroptoz ve kıkırdak dejenerasyonu arasındaki karşılıklı ilişki OA patofizyolojisinin anlaşılmasında çok önemlidir. Nekroptoz; hücre şişmesi, membran parçalanması ve hücre içeriğinin ortama salınması olarak tanımlanır. Apoptozun aksine, nekroptoz yüksek oranda enflamatuvarıdır ve OA dahil olmak üzere kronik enflamatuvar hastalıkların patofizyolojisinde kritik öneme sahiptir (37-40). OA’da, kıkırdakın birincil hücreleri olan kondrositler, TNF- α ve IL-1 β gibi enflamatuvar sitokinlere maruz kaldığında nekroptozu uğrar. Bu süreç kıkırdak bütünlüğünün ve işlevinin kaybına yol açar. Osteoartritli eklemlerde izlenen yüksek miktardaki enflamatuvar mediatörler; RIPK1, RIPK3 ve MLKL üzerinden TNFR1 aracılığıyla nekroptozu indükler (41-43). Nekroptoz, sadece enflamasyonun şiddetini arttırmak ve matriks metalloproteinaz (MMP) aktivitesini artırmakla kalmayıp aynı zamanda kondrositlerden pro-enflamatuvar sitokinlerin salınımını tetikleyerek eklem dokusu hasarını sürdüren hasarla ilişkili moleküler modelleri (*damage-associated molecular patterns*, DAMP) serbest bırakarak kıkırdak matriksini bozar (43-45). Nekroptoz, DAMP'lerden kaynaklanan güçlü enflamatuvar yanıt nedeniyle apoptozu göre daha immünojeniktir ve hücre dışı matriks bozulmasının artmasına neden olur (46). OA hastalarında izlenen yüksek RIPK3 ekspresyonu, nekroptozun apoptozu göre daha yıkıcı olduğunu göstermektedir. (47, 48).

OA patogenezinin çok yönlü doğası sadece semptomatik rahatlama sağlayan ve hastalık ilerlenmesini etkilemeyen Non-steroid antienflamatuar ilaçlar (NSAID) ve opioidler gibi mevcut tedaviler (49, 50) yerine hastalığın ilerlemesini durduran ve erken evre OA'yı tedavi eden yeni terapötikler geliştirilmesi için umut vadetmektedir (51, 52). Nekroptozun moleküler temelleri ve nekroptozun OA patogenezindeki yeri daha iyi anlaşıldıkça yeni potansiyel tedavi hedefleri ortaya çıkmaktadır. RIPK1 ve RIPK3'ü hedef alan inhibitörler, kondrosit ölümünü azaltarak ve kıkırdak bütünlüğünü koruyarak prelinik modellerde faydalı bulunmuştur (53, 54).

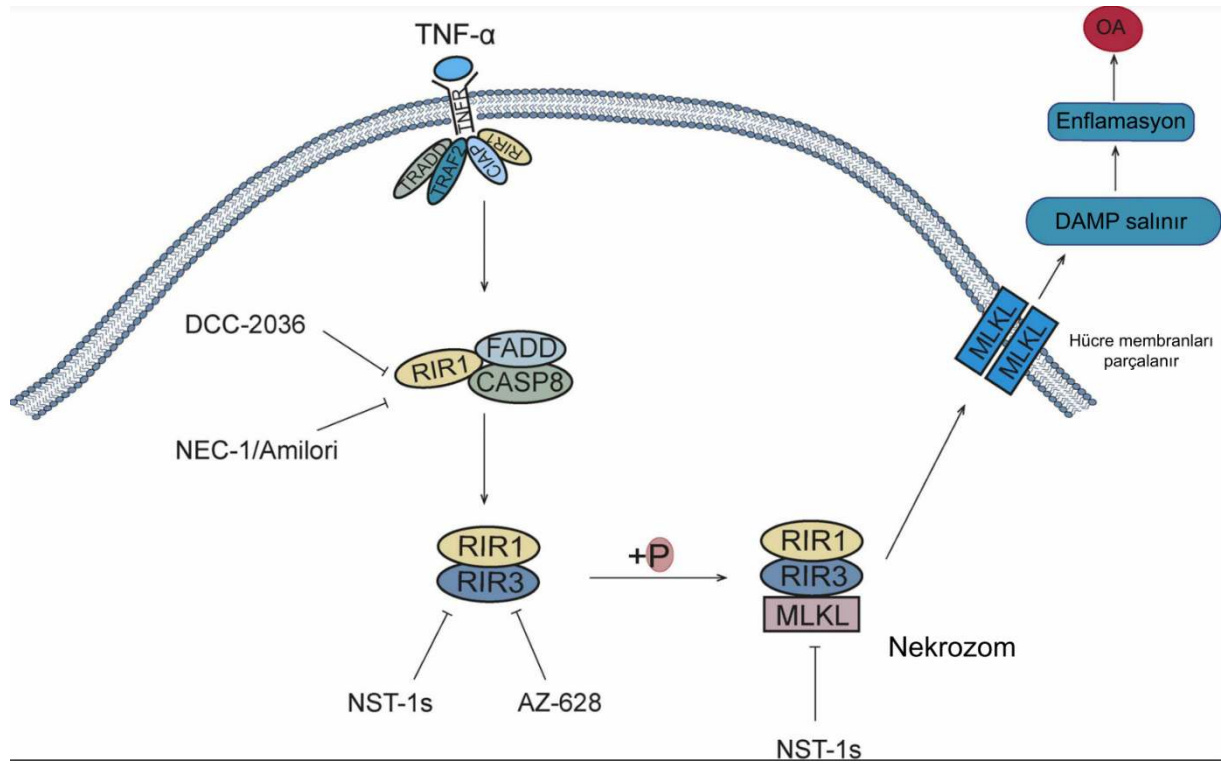
Van der Kraan, Davidson ve van Den Berg, kemik morfogenetik protein 7'nin (*bone morphogenic protein 7*, BMP7) OA ilerlemesindeki rolünü tanımlamıştır. Cheng ve ark. BMP7'nin doza bağlı bir şekilde kondrosit nekroptozunu indüklediğini ortaya koymuştur. BMP7'nin susturulması RIPK1 ile indüklenen nekroptozu azaltır ve ECM gen ekspresyonunu geri kazandırarak BMP7 aşırı ekspresyonunun OA modellerinde artan nekroptoz ve kıkırdak kaybı ile ilişkili olduğunu gösterir. Bu, RIPK1'in BMP7 aracılığıyla nekroptozu yönlendirdiği MLKL'den bağımsız yeni bir mekanizmayı vurgulamakta ve RIPK1-BMP7 etkileşimini hedeflemenin OA tedavisi için yeni terapötik yaklaşımlar sunabileceğini düşündürmektedir (55, 56).

Başka bir çalışmada, Jeon ve ark. RIPK3 ekspresyonunun OA hastalarının hasarlı kıkırdaklarında önemli ölçüde yüksek olduğunu keşfetmiştir. Geliştirdikleri fare modeli, RIPK3 aşırı ekspresyonunun kıkırdak bozulmasını hızlandığını, RIPK3 tükenmesinin ise OA şiddetini azalttığını göstermiştir. RIPK3'ün negatif bir düzenleyicisi olan üçlü motif içeren 24 (*tripartite motif-containing 24*, TRIM24) geninin baskılanması, RIPK3 ekspresyonunu artırmış ve OA ilerlemesini hızlandırmıştır (57).

Kinaz inhibitörü bir molekül olan AZ-628 ($C_{27}H_{25}N_5O_2$) güçlü bir RIPK3 inhibitörü olarak tanımlanmıştır (**Şekil 5.**). AZ-628'in RIPK3 aracılı OA patogenezinin etkili bir şekilde azalttığı gösterilmiş ve OA için terapötik bir ajan olarak potansiyeli olabileceği bulunmuştur (58, 59).

Sun ve ark., TRADD'nin N-terminal ucuna bağlanan ICCB-19 molekülü ($C_{12}H_{21}N_3OS \cdot HCl$) ile inhibe edilmesinin, RIPK1 yolunu bloke ederek kondrosit nekroptozunu ve OA'yı iyileştirdiğini bulmuşlardır. ICCB-19, kondrositleri TNF- α kaynaklı hasardan koruyarak enflamasyonu, ekstraselüler matriks dejenerasyonunu ve hücre ölümünü azaltmıştır. İn-vitro olarak, TRADD inhibisyonu TNF- α kaynaklı nekroptoz ve inflamasyonu azaltırken, in-vivo ICCB-19 enjeksiyonları bir OA modelinde kıkırdak dejenerasyonunu durdurmuştur (60).

Chen ve ark., sıçan OA modelinde, fosfolipaz C gamma-1 (*phospholipase C gamma-1*, PLC γ 1) inhibitörü U73122'nin (C₂₉H₄₀N₂O₃) düşük dozlarının tip-2 kolajen ve aggrecan seviyelerini iyileştirdiğini, yüksek dozlarının ise kondrosit apoptozunu ve nekroptozu artırdığını göstermiştir. U73122'nin hücre membranlarından geçebilen pan-kaspaz inhibitörü Z-VAD (C₂₂H₃₀FN₃O₇) ve kaspaz bağımsız hücre ölüm mekanizması olan nekroptozu RIPK1 inhibisyonu ile engelleyen nekrostatin-1 ile kombine edilmesi matris sentezini etkili bir şekilde artırmıştır (Şekil 1.5.). Bu bulgular PLC γ 1'i de hedefleyen bir kombinasyon tedavisinin umut verici bir OA tedavi stratejisi olabileceğini düşündürmektedir (61).



Şekil 1.5. Nekroptozu inhibe eden çeşitli moleküller(62)

Liang ve ark., azalmış RIPK1 ekspresyonunun TRIF/MyD88-RIPK1-TRAF2 negatif geri besleme döngüsünü bozarak OA'yı hafiflettiğini göstermiştir. İn-vivo deneylerde, IL-1 β 'ya maruz bırakılan kondrositlerde ve OA fare modellerinde RIPK1 fosforilasyonunun arttığını ve RIPK1'in azaltılmasının kıkırdak hasarını ve enflamasyonu azalttığını göstermiştir. TRIF/MyD88-RIPK1-TRAF2 yolağının bahsedilen şekilde düzenlenmesi, RIPK1'in kritik bir OA düzenleyicisi olduğunu vurgulamakta ve RIPK1 aracılı enflamatuvar yolların hedeflenmesinin OA için yeni terapötik stratejiler sunabileceğini düşündürmektedir (57, 63).

Qiu ve ark. selektif bir MEK1 ve MEK2 inhibitörü olan AZD8330'u (C₁₆H₁₇FIN₃O₄) umut verici bir OA tedavisi olarak tanımlamıştır. İn-vitro ve in-vivo çalışmalarda AZD8330'un

RIPK1 ile ilişkili nekroz sinyal yolunu inhibe etmek için apoptoz protein-1'in hücresel inhibitörünü (*cellular inhibitor of apoptosis protein-1*, cIAP1) aktive ettiğini, kondrosit nekroptozunu etkili bir şekilde önlediğini ve kırıkta bütünlüğünü koruduğunu göstermiştir (64).

Toplu olarak bakıldığında bu çalışmalar, TNF- α , SDC4, RIPK1, RIPK3, BMP7 ve PLC γ 1 gibi moleküler hedeflerin, yeni OA tedavileri bulmak için kritik olan nekroptoz ve inflamasyonu azaltmak için umut verici stratejiler sunduğunu vurgulamaktadır.

Apoptoz ve nekroptozun önemli noktaları **Tablo 1.1.**'de özetlenmiştir.

Tablo 1.1. Apoptoz ve nekroptozun önemli noktaları

	Apoptoz	Nekroptoz
Hücre morfolojisi	Küçülme	Şişme
Çekirdek	Kondensasyon ve rüptür	Kondensasyon (piknozis)
Sitoplazma	Psödopodların çekilmesi, hücre volümünün azalması	Sitoplazmik şişme, organellerin şişmesi
Hücre membranı	Baloncuklaşma	Rüptür
Kromatin	Kondanse	Parçalı
DNA	Üntranükleozomal kesim, DNA merdivenleşmesi	Rastgele kesim, DNA bulanıklaşması
Özel yapı	Apoptotik cisimler	Nekroptotik cisimler
Enflamasyon?	Hayır	Evet
Anahtar rol	Kaspaz-3, -6, -7	RIP1, RIP3, TNF- α , Fas, Nekrostatin-1, MLKL,
Sinyal yolağı	Fas-FasL, TRAIL-DR, TNFa-TNFR1, mitokondrial yolak	IKK α /IKK β , NF-Kb, TNF- α
ATP gerekli mi?	Evet	Hayır

2.2.3. Otofaji

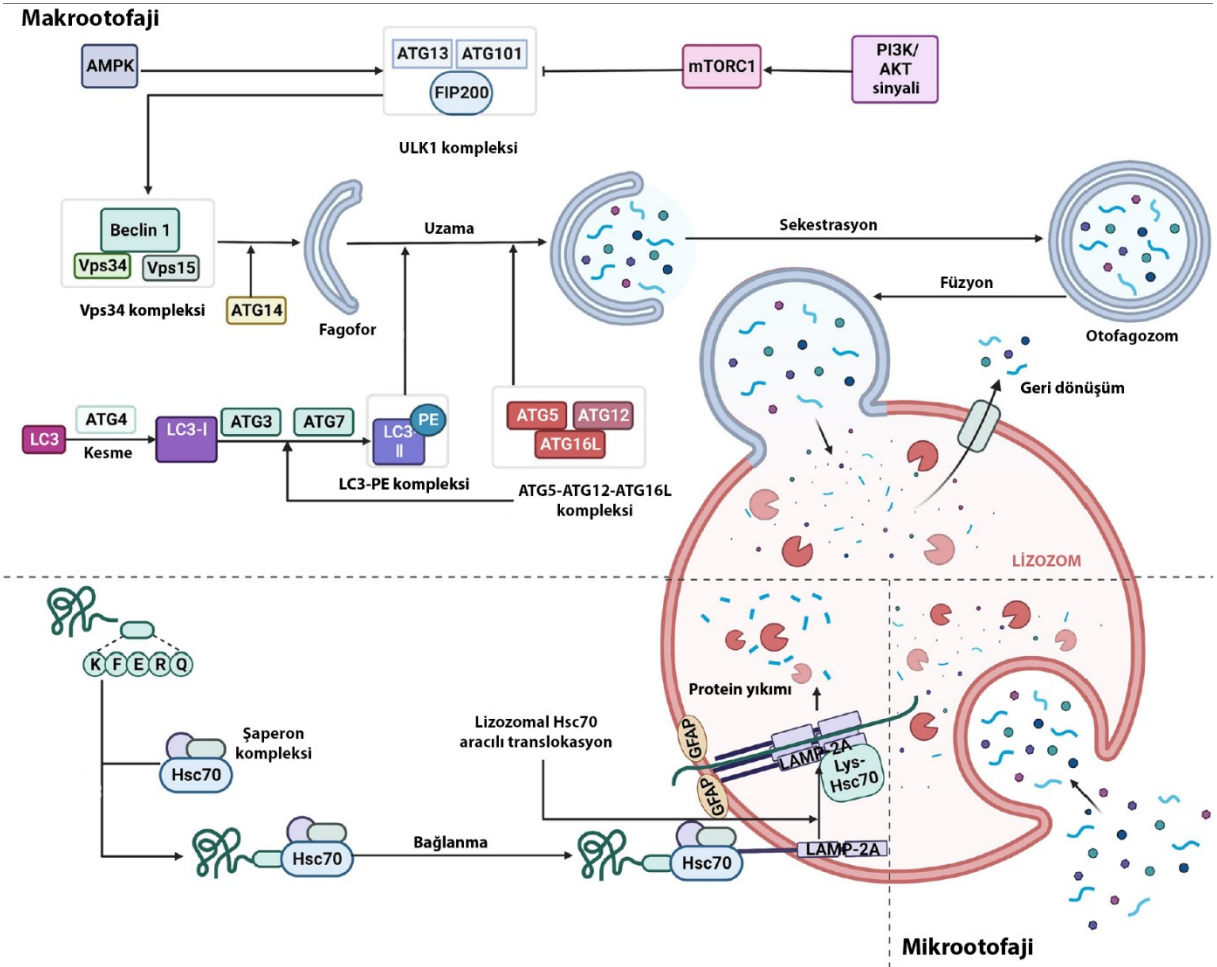
Otofaji, hücre içi yanlış katlanmış proteinlerin ve hasar görmüş organellerin lizozomal degradasyon yoluyla ortadan kaldırıldığı ve bu yolla hücre homeostazının korunduğu dinamik, fizyolojik bir süreçtir (14). Otofaji aşırı sitoplazmik vakuolizasyon ile karakterizedir ve fagositik içe alım ve lizozomal yıkım ile sonuçlanmaktadır. Otofaji besin yetersizliği, hipoksi veya hasarlı yapıların hücre içinde birikmesi gibi stres kaynaklarına yanıt olarak ULK1/Atg1

ve mTOR aktivasyonu ile başlar ve hücre içi fagofor adı verilen veziküller oluşur. Veziküller birleşerek otofagozom oluşturulur ve otofagozomlar lizozomlarla birleşir.

Otofaji, hücre materyallerinin lizozomlara taşınma şekline göre şaperon aracılı otofaji (*chaperon mediated autophagy*, CMA), mikrootofaji ve makrootofaji olmak üzere üçe ayrılmaktadır (**Şekil 1.6.**). Makrootofajide tariflenen şekilde otofagozom ile lizozom birleşimi izlenirken mikrootofajide lizozomal membranın direkt invajinasyonu ile sitoplazmik materyal sindirilir. Şaperon aracılı otofajide ise spesifik proteinler tanınır ve lizozom membranından geçirilerek yıkılır.

CMA'da ısı şoku proteinleri (*heat shock proteins*, HSP) hedef substratlara bağlanarak bu substratları yıkım için lizozomlara ulaştırmaktadırlar. Özellikle bu otofaji şeklinde, pentapeptit KFERQ ile ilgili motiflere sahip sitozolik proteinler, ısı şoku ailesi A8 (HSPA8) tarafından tanınmakta ve şaperon kompleksi, lizozom ilişkili membran proteini 2A (*lysosome-associated membrane protein-2A*, LAMP2A) vasıtasıyla lizozomun içine taşınmaktadır.

Mikrotofaji sırasında uzun ömürlü proteinler lizozomlarda parçalanmak üzere doğrudan lizozomal membran tarafından yutulabilmektedirler.



Şekil 1.6. Otofajinin farklı tipleri(13)

Makrotofaji (bu metnin devamında otofaji olarak anılacaktır), fagoforlar, otofagozomlar ve otolizozomlar gibi özgül membran yapılarının oluşumuyla karakterize edilen, dinamik ve evrimsel olarak oldukça iyi korunmuş bir katabolik süreçtir. İzolasyon membranları olarak da adlandırılan fagoforlar, çift katmanlı bir membran yapısına sahip olan otofagozomları oluşturmak için sitoplazmik bileşenleri içine alarak bu bileşenlerin izole edilmesini sağlar. Otofagozom, daha sonra lizozom ile birleşerek otolizozomları oluşturur ve bu birleşim, izole edilen sitozolik materyalin lizozomal hidrolazlar tarafından parçalanmasına neden olur. Moleküler düzeyde, otofaji sırasında membran yapılarının oluşumu, mayadan insana kadar korunan otofaji ile ilişkili genler (*autophagy-related genes*, ATG) tarafından düzenlenir. ATG genleri tarafından kodlanan proteinler, diğer düzenleyici proteinlerle birlikte

çeşitli kompleksler oluşturarak otofajinin başlatılması, uzaması, füzyonu ve degradasyonu gibi aşamalarında karmaşık roller üstlenir.

a) Başlatılma (İnisiyasyon)

- **Otofagozom oluşumunun başlatılması:** Hücre, stres (örneğin, açlık veya hasar) altında bir otofaji süreci başlatır.
- **Ultrastrüktürel değişiklikler:** Endoplazmik retikulumdan veya diğer membran kaynaklarından gelen lipitler, izole eden bir zar (fagosom zarı) oluşturur.
- **mTOR ve AMPK rolü:** Hücresel enerji durumuna bağlı olarak mTOR (mammalian target of rapamycin) baskılanır ve AMPK (AMP-activated protein kinase) aktive olur. Bu sinyaller otofaji başlatıcı kompleksleri (örneğin, ULK1 kompleksi) etkinleştirir.

b) Uzama ve Yalıtım (Elongasyon ve İzolasyon)

- **Zar uzaması:** Fagozom zarı uzar ve otofajik materyali çevreler.
- **ATG proteinlerinin rolü:** Otofajiyle ilişkili proteinler (örneğin, LC3 ve ATG proteinleri) zarın oluşumunu ve hedef materyalin seçimini düzenler.
- **Materyal yalıtımı:** Hücre içindeki zarar görmüş organeller (örneğin, mitokondriler) veya makromoleküller (örneğin, proteinler) otofagozom içine alınır.

c) Otofagozom-Lizozom Füzyonu ve Yıkım

- **Füzyon:** Otofagozom, lizozomla birleşir ve bir otofagozom-lizozom hibrit yapı (otofo-lizozom) oluşturur.
- **Hidrolitik enzimlerin rolü:** Lizozomal enzimler, hedef materyali parçalar ve bu moleküller (örneğin, amino asitler, lipitler) yeniden kullanılır.
- **Enerji geri kazanımı:** Hücre, yıkılan materyali enerji kaynağı olarak kullanır veya yeniden yapılandırmada değerlendirir.

2.2.3.1. Seçici otofaji türleri

Otofaji, **seçici otofaji** ve **seçici olmayan otofaji** olmak üzere iki ana kategoriye ayrılır. **Seçici otofaji**, hücresel kalite kontrol mekanizması olarak görev yapar ve istilacı patojenler, kümelenmiş proteinler veya hasarlı organeller gibi belirli hücresel bileşenlerin ortadan kaldırılmasını sağlar. Bu süreçte otofaji reseptörleri, otofaji substratlarını bağlayarak, bu

substratların otofajik mekanizmalar tarafından tanınmasını ve lizozomlar içinde degrade edilmesini sağlar. **Spesifik otofaji reseptörleri**, kargo tanıma ve degradasyon işlemleri için kilit rol oynar.

Örneğin, **p62** gibi kargo adaptörleri, yıkılması gereken spesifik proteinleri, protein komplekslerini veya organelleri (mitokondri, lizozom, endoplazmik retikulum, peroksizomlar) ve hatta bakteriler gibi diğer organizmaları otofagozomlara hedefler. Kargolar genellikle, poli-ubikitinlenmiş molekülleri tanıyan adaptör proteinler aracılığıyla seçilir. Bu adaptörler, LC3 veya GABARAP proteinlerindeki hidrofobik ceplere bağlanan **LC3-etkileşimli bölgeler (LIR)** üzerinden Atg8 ailesi proteinlerinin **LIR kenetlenme bölgesine (LDS)** bağlanır. LIR-LDS etkileşimi ayrıca ULK1 ve PIK3C3 gibi otofajinin yukarı akış düzenleyicileri tarafından kontrol edilebilir.

Seçici otofajinin farklı türleri şunları içerir:

- **Mitofaji:** Mitokondrilerin degradasyonu.
- **Retikülofaji:** Endoplazmik retikulumun degradasyonu.
- **Peksofaji:** Peroksizomların degradasyonu.
- **Ksenofaji:** İstilacı patojenlerin (bakteri veya virüs) ortadan kaldırılması.
- **Lipofaji:** Lipit damlacıklarının degradasyonu.
- **Zimofaji:** Zimojen granüllerinin degradasyonu.
- **Glikofaji:** Glikojenin degradasyonu.
- **DNAotofaji:** DNA'nın degradasyonu.
- **RNAotofaji:** RNA'nın degradasyonu.
- **Miyelinofaji:** Miyelinin degradasyonu.
- **Granülofaji:** Stres granüllerinin degradasyonu.
- **Proteofaji:** Proteazomların degradasyonu.
- **Agrefaji:** Protein agregatlarının degradasyonu.
- **Ferritinofaji:** Ferritinin degradasyonu.
- **Klokofaji:** ARNTL/BMAL1 proteinlerinin degradasyonu.

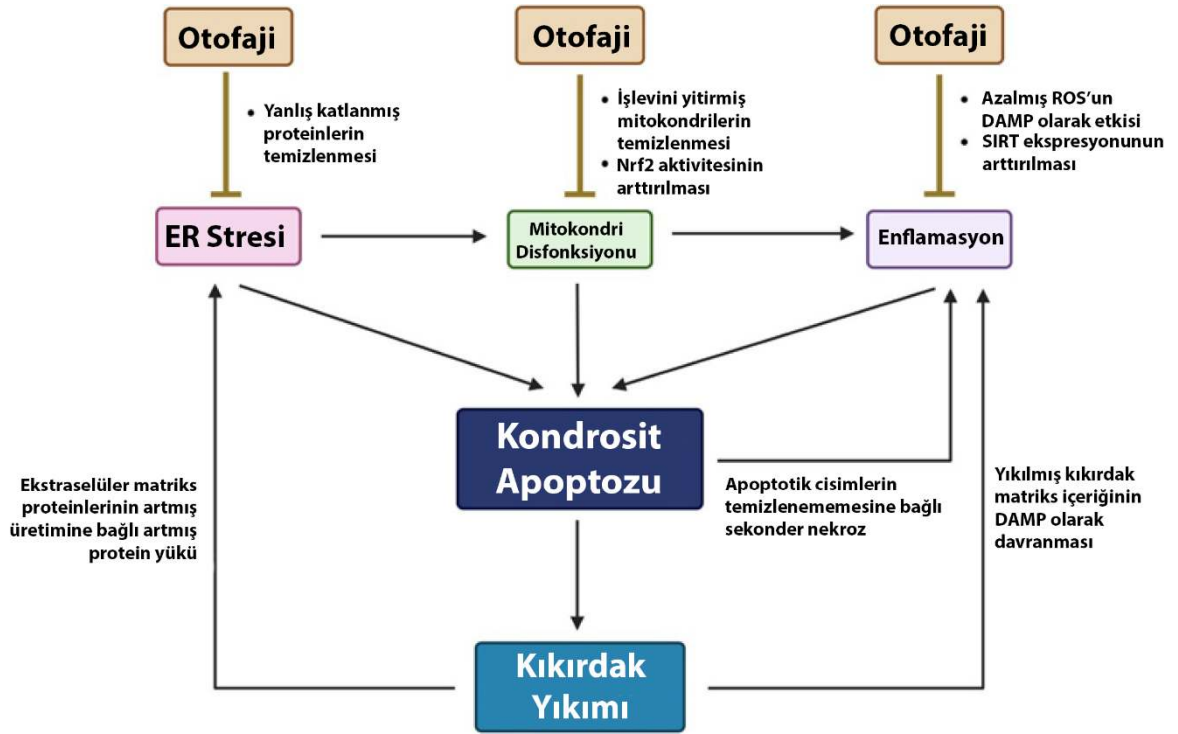
Seçici otofaji, genellikle spesifik reseptör-kargo etkileşimlerini gerektirir. Ancak bu etkileşimlerin yapısal temeli ve otofajik hedefleme için gerekli olan ubiquitin substratlarının ayrıntıları, henüz tam olarak açıklığa kavuşturulmamış ve daha fazla araştırmaya ihtiyaç duymaktadır.

Lizozomda sindirilen fonksiyonunu kaybetmiş veya görevini tamamlamış hücresel bileşenler, hücresel faaliyetlerde yeniden kullanılmak üzere döngüye kazandırılır (65, 66). Ancak, otofajinin aşırı derecede aktif hale gelmesi, tip 2 programlanmış hücre ölümü olarak bilinen bir mekanizma ile hücre ölümüne yol açabilir (11).

Otofaji, uzun ömürlü ya da hasar görmüş organelleri ve proteinleri parçalayarak hücresel homeostazın sürdürülmesine katkıda bulunur. Ancak yaşlanmayla birlikte otofaji düzeyinin azalması, çeşitli hastalıkların ortaya çıkışıyla ilişkilendirilmiştir (67). Bu azalma, makromoleküler protein agregasyonlarının artmasına neden olur; bu agregasyonlar ise hücre dejenerasyonu, fonksiyonel bozukluklar ve apoptoz ile sonuçlanabilir.

2.2.3.2. Osteoartrit (OA) ve otofaji ilişkisi

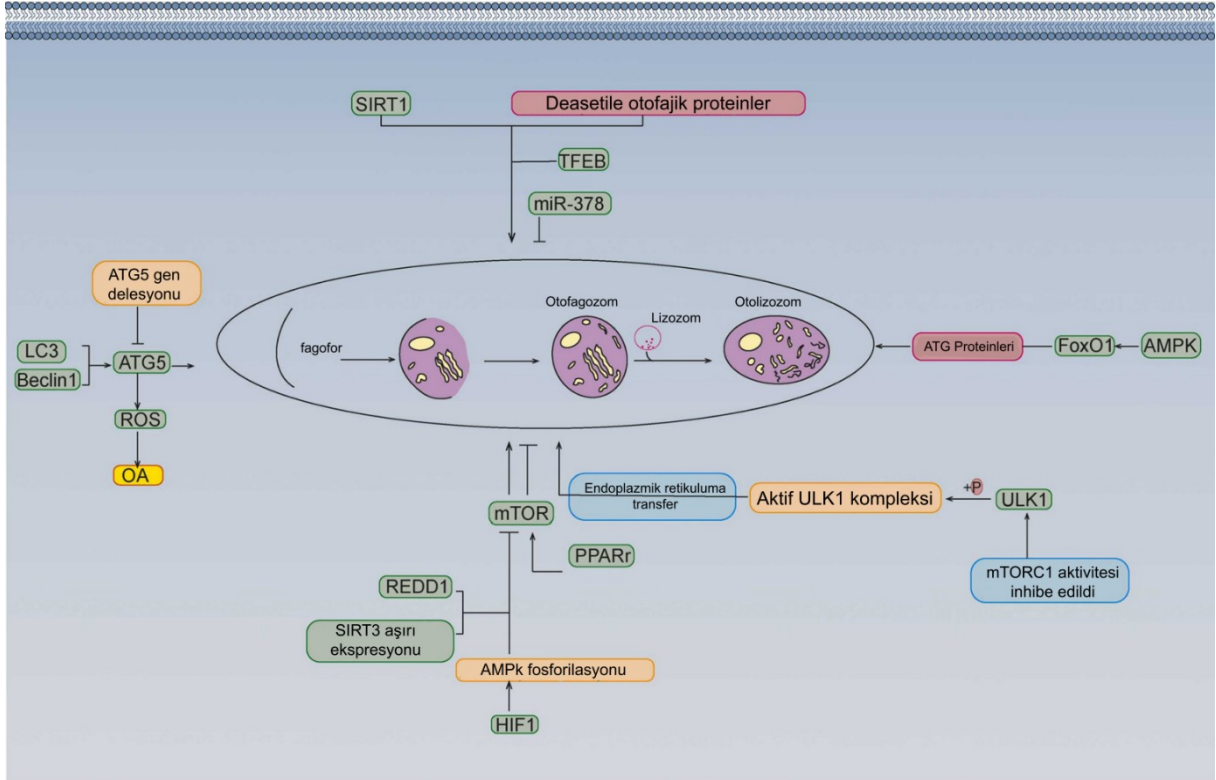
Yaşlanmayla birlikte, özellikle kronik ve dejeneratif hastalıklar bağlamında otofaji mekanizması daha fazla dikkat çekmekte ve OA patogenezi bu perspektiften incelenmektedir. OA'nın erken aşamalarında, kondrositler çevresel streslere karşı kendilerini korumak için otofajiyi etkin bir şekilde kullanır. Ancak hastalığın ilerlemesiyle birlikte otofaji azalırken, apoptoz artış gösterir (**Şekil 1.7.**) (68).



Şekil 1.7. Otofaji ve OA arasındaki ilişki(69)

2.2.3.3. Otofajinin düzenlenmesi ve OA patogenezi

OA'da otofaji, hücresel enerji sensörü olan AMPK sinyali ile düzenlenir ve bu süreçte LKB1 (Liver Protein Kinase B1), AMPK'nın ana düzenleyici kinazı olarak görev yapar. AMPK aktivasyonu, SIRT1 aracılığıyla otofajiyi artırarak kondrositlerin apoptozunu baskılar ve OA'nın etkilerini hafifletir (Şekil 1.8.) (70, 71). Ancak hastalığın ileri evrelerinde, kondrosit otofajisi azalırken apoptoz hızlanır. Apoptozun başlaması, hücre içi proteinlerin ve organellerin otofajik yıkımıyla tetiklenir ve bu durum hücre ölümüne yol açar (72).



Şekil 1.8. Otofaji yolağındaki çeşitli potansiyel tedavi hedefleri(62)

2.2.3.4. Kondrosit otofajisinin önemi

Kondrositlerde otofaji, hücresel dengeyi korumada ve kıkırdak dejenerasyonunu yavaşlatmada önemli bir rol oynar. Araştırmalar, otofajinin artırılmasının kondrosit apoptozunu ve inflamasyonu baskılayarak kıkırdak dokusunu koruduğunu ortaya koymuştur (73, 74). Örneğin, otofaji aktivasyonu, MMP3, ADAMTS5 ve CCL-1 gibi inflamatuvar katabolik genlerin ekspresyonunu düşürerek kıkırdak yıkımını engeller (75).

Song ve arkadaşlarının çalışmalarında, Beclin 1'in OA kıkırdak dokusundaki ekspresyonu ve ayrıca OA'lı hastalardan elde edilen kondrositlerde proliferasyon, apoptozis ve MMP'lerin ekspresyonundaki rolü araştırılmıştır. OA hastalarından alınan kıkırdak dokusunda ve yaş ve cinsiyet açısından eşleştirilmiş kontrollerde Beclin 1 ekspresyonu immünohistokimya, yarı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu ve western blotlama ile tespit edilmiştir. Beclin 1'in mRNA ve protein ekspresyon seviyeleri OA hastalarının kıkırdak dokusunda cinsiyet ve yaş uyumlu kontrollere kıyasla önemli ölçüde azalmıştır. OA hastalarından alınan kondrositlerde Beclin 1 aşırı ekspresyonu hücre canlılığını önemli ölçüde artırmıştır. Beclin 1 aşırı ekspresyonu ayrıca apoptoz derecesini de azaltmıştır. Beclin 1 aşırı ekspresyonunu takiben Bcl-2 yukarı regüle olmuştur. Birlikte ele alındığında, Beclin 1'in düşük ifade düzeyleri kondrositlerin dejenerasyonuna katkıda bulunabilir. Beclin 1 aşırı ekspresyonu, muhtemelen PI3K/Akt/mTOR sinyal yolu aracılığıyla hücre canlılığını artırmış, apoptozu ve

MMP'leri inhibe etmiştir. Sonuç olarak, bu çalışma Beclin 1 ekspresyonunun OA kıkırdığında aşağı regüle olduğunu göstermiştir. Beclin 1'in aşırı ekspresyonu hücre canlılığını artırmış, apoptozu azaltmış, PI3K/Akt/mTOR sinyal yolunu inhibe etmiş ve OA kondrositlerinde MMP'lerin ekspresyonunu azaltmıştır. Bu nedenle, yazarlar Beclin1'in OA tedavisi için potansiyel bir hedef olabileceği öne sürmüşlerdir. (76).

Kolajen II, özellikle eklem kıkırdığında bulunan ve kıkırdak dokusunun ve ekstraselüler matriksin yapısal bütünlüğünü sağlayan önemli proteinlerdendir. Col2A1'in bozulması, MMP ve ADAMTS gibi enzimlerin aktivasyonu ile ilişkilidir. Bu enzimler, ECM'nin parçalanmasına, IL-1 β , TNF- α gibi sitokinlerin salınımına neden olur ve bu sitokinler kondrosit apoptozunu artırır. Col2A1'in bozulması, nekroptoz gibi kaspaz bağımsız hücre ölümü mekanizmalarını da tetikleyebilir, oksidatif stresi artırabilir. Oksidatif stres, kondrositlerde apoptozu tetikleyen önemli bir faktördür. Col2A1'in korunması ise nekroptozu engelleyerek kıkırdak dokusunun bütünlüğünü koruyabilir (77).

Aggrekan, kıkırdak ekstraselüler matrikste bulunan ve özellikle su tutma kapasitesiyle dokunun mekanik özelliklerini korumada kritik rol oynayan büyük bir proteoglikan molekülüdür. Aggrekan, kıkırdığın basınca dayanıklılığını artırır ve eklemlerin sağlıklı işlev görmesini sağlar. Aggrekan'ın bozulması (degradasyonu), kıkırdak dokusunun mekanik özelliklerini kaybetmesine ve kondrositlerin (kıkırdak hücreleri) strese karşı savunmasız kalmasına neden olur ve ADAMTS ve MMP aktivasyonu ile ilişkilidir. Bu enzimler, ECM'nin parçalanmasına ve kondrositlerin ölümüne yol açar. Aggrekan'ın bozulması, oksidatif stresi artırabilir ve enflamatuvar yanıtı tetikleyebilir. Enflamasyon, IL-1 β , TNF- α gibi sitokinlerin salınımına neden olur ve bu sitokinler kondrosit apoptozunu artırır. Aggrekan'ın korunması, otofajiyi destekleyerek hücre ölümünü engelleyebilir. Aggrekan'ın bozulması, nekroptoz gibi kaspaz bağımsız hücre ölümü mekanizmalarını da tetikleyebilir. Nekroptoz, özellikle şiddetli enflamasyon ve mekanik stres koşullarında ortaya çıkar. Aggrekan'ın korunması, nekroptozu engelleyerek kıkırdak dokusunun bütünlüğünü koruyabilir (78).

Yukarıda bahsedildiği üzere nekrostatin-1, RIPK1 inhibisyonu üzerinden nekroptozu, z-VAD ise kaspaz inhibisyonu ile apoptozu engeller.

2.2.3.5. Otofaji ve terapötik hedefler

Otofajinin düzenlenmesi, OA tedavisinde umut verici bir strateji sunmaktadır. AdipoRon, AMPK/mTOR sinyal yolunu aktive ederek otofajiyi teşvik eder ve kondrositlerde kalsifikasyonu azaltır (79). Sükroz ile indüklenen otofaji, AKT/mTOR/P70S6K yolunu aktive ederek IL-1 β kaynaklı apoptozu engeller (80). Sirtuinler (ör. SIRT1), otofajiyi düzenleyerek hücre hayatta kalmayı destekler; SIRT1'in aşırı ekspresyonu ise otofajiyi engelleyebilir (81, 82).

Bazı genlerin ve proteinlerin otofaji üzerindeki etkileri dikkat çekicidir. Örneğin, PHF23'ün OA'da otofajiyi inhibe ettiği ve susturulmasının otofajiyi artırarak apoptozu azalttığı gösterilmiştir (3). Benzer şekilde, P63 ekspresyonunun artışı otofajiyi baskılayarak OA'nın ilerlemesine neden olmaktadır (83). FOXO transkripsiyon faktörlerinin azalması ise antioksidan proteinlerin ve otofaji ile ilişkili proteinlerin düşüşüne yol açar, bu da oksidatif stres kaynaklı hücre ölümüne duyarlılığı artırır (84).

Bazı ilaçlar ve doğal bileşiklerin otofaji aktivitesini artırdığı bulunmuştur. Örneğin, rapamisin ve alisin, mTOR yolunu inhibe ederek veya AMPK sinyalini aktive ederek otofajiyi destekler. Sonuç olarak otofaji, OA'nın erken evrelerinde koruyucu bir mekanizma olarak hizmet ederken, ilerleyen aşamalarda azalan otofaji kondrositlerde hasar ve hücre ölümüne yol açar. Otofaji genellikle sitoprotektiftir ve apoptoz ve nekroptoz üzerinde modülatör bir etkisi vardır. Otofaji, nekroptozu tetikleyen RIPK1 ve RIPK3 gibi proteinleri parçalayabilir veya hücre içi onarımda rol alarak apoptozu durdurabilir. Otofajinin aşırı aktivasyonu apoptoz ile hücre ölümüne, otofajinin engellenmesi ise nekroptoz ile hücre ölümüne sebep olabilir. Apoptoz ve nekroptoz ise genellikle birbirini engeller. Kaspaz-8, hem apoptozu tetikleyerek hem de nekroptozu engelleyerek bu iki hücre ölümü mekanizması arasındaki dengeyi belirler (85-87).

Bu nedenle, otofajiyi düzenleyen mekanizmaların detaylı araştırılması ve bu süreci hedefleyen yeni terapötik ajanların geliştirilmesi, OA tedavisinde etkili bir yaklaşım sunabilir.

2.3. Taurin

Taurin, vücutta sentezlenebilmesine rağmen besinlerle de alınması gereken ve yarı esansiyel olarak kabul edilen bir β -amino asittir. İlk olarak 19. yüzyılın başlarında öküz (*Bos taurus*) safrasından izole edilerek tanımlanmıştır ve adını buradan almıştır. Diğer amino asitlerden farklı olarak taurin, karboksilat grubu yerine sulfonat grubu içerir ve bilinen tek doğal sulfonik asittir. Biyolojik olarak inert bir moleküldür; hiçbir proteinin yapısına katılmaz

ve taşıyıcı RNA'sı yoktur. Suda yüksek oranda çözünürken yağda düşük çözünürlüğe sahiptir; bu nedenle biyolojik zarlar üzerinden geçişi taşıyıcı proteinler yardımıyla gerçekleşir (10, 88). Taurin, hücre sitozolünde yüksek konsantrasyonlarda bulunur ve özellikle kalp, retina, iskelet kası, beyin ve lökositler gibi dokularda yoğunlaşır. Ayrıca kemik dokusunda da tespit edilmiştir. Ancak insanda taurin biyosentezi sınırlıdır; bu nedenle majör kaynak, besin yoluyla alınan taurindir (89, 90).

2.3.1. Biyolojik fonksiyonları

Taurin, hücrel osmotik dengeyi düzenler ve hücre hacminin korunmasında önemli bir rol oynar. Hücreler, osmotik strese yanıt olarak hücrel taurin içeriklerini ayarlayarak adaptasyon sağlar. Taurin ayrıca hücre içi kalsiyum düzeylerini düzenler ve birçok kalsiyum bağı biyolojik süreçte rol oynar (88).

Beyinde, glutamattan sonra serbest halde en fazla bulunan amino asitlerden biridir ve nörotransmitter benzeri etkiler sergiler. Yapısal olarak GABA'ya benzeyen taurin, GABA ve glisin reseptörlerine bağlanarak sinir hücrelerinde koruyucu bir etki gösterir. Hücre içi kalsiyum seviyesini düşürerek ve membran depolarizasyonunu sağlayarak nöronların aşırı uyarılmasını önler (91, 92).

Kalp üzerinde inotropik, antiaritmik, hipotansif ve antioksidan etkiler gösterir. Kemik metabolizmasında ise osteoblast farklılaşmasını ve matriks oluşumunu destekleyerek kemik yapımını uyarır. Taurin, osteoklast oluşumunu baskılayarak kemik rezorpsiyonunu da azaltır (93, 94).

2.3.2. Taurin ve apoptoz ilişkisi

Taurin, güçlü bir antioksidan olarak reaktif oksijen türlerini temizler ve oksidatif stresi azaltarak ve mitokondriyal hasarı ve sitokrom-c salınımı önleyerek apoptozu engeller. Taurin aynı zamanda kaspaz aktivitesini ve NF- κ B gibi enflamatuar sinyal yollarını inhibe eder. Özellikle kaspaz-3 ve kaspaz-9 üzerinde inhibitör etkisi vardır. Taurin, ayrıca hücre içi kalsiyum dengesini koruyarak ve ER stresini azaltarak apoptozu engelleyebilir. Kalsiyum homeostazının bozulması, apoptozu tetikleyebilir (10). Moleküler olarak bakıldığında taurinin PI3K/Akt sinyal yolağı üzerinde aktive edici, p53 aktivitesini ile inhibe edici etkisi vardır. Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu artırırken Bax gibi pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu azaltır.

2.3.3. Taurin ve nekroptoz ilişkisi

Taurinin antioksidan etkisi nekroptozun engellenmesinde de önemlidir. Taurin aynı zamanda nekroptozun başlatılmasında kritik rol oynayan RIPK1 ve RIPK3 proteinlerini NF- κ B gibi enflamatuar sinyal yollarını da inhibe ederek nekroptozu baskılayabilir (10). Taurinin hücre zarı üzerindeki stabilize edici etkisi nekroptoz sırasında izlenen hücre içeriğinin dış ortama sızmasına engel olur(87).

2.3.4. Taurin ve otofaji ilişkisi

Farklı çalışmalarda taurin, otofaji mekanizmalarıyla etkileşim içinde olduğu gösterilmiştir. Taurinin nefrotoksisiteye karşı apoptozu hafiflettiği ve otofajiyi inhibe ettiği görülmüştür (95). Lipid birikimini azaltmaktan ziyade otofajik inflamasyon yolunu baskılayarak karaciğer inflamasyonunu azalttığı belirtilmiştir (96). Ayrıca, taurin, fare Leydig tümör hücrelerinde otofajiyi indükleyerek apoptozu baskılar (97). Taurinin mTOR, NRF2, AMPK/mTOR ve PPAR γ gibi yollarla otofajiyi düzenlediği de gösterilmiştir (98, 99).

2.3.5. Osteoartrit (OA) ve taurin

OA'da metabolik süreçler önemli ölçüde değişime uğrar. Kondrositler oksidatif fosforilasyondan glikolize geçer, bu da mitokondriyal fonksiyonu bozar ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimine yol açar. Bu süreç, AMPK sinyal yolunu inhibe ederek enerji metabolizmasını olumsuz etkiler (100). Taurin, ROS birikimini azaltarak hücreleri oksidatif stresten korur ve bu etkisi OA patogeneğinde önemli bir rol oynar (101).

OA hastalarının serum, subkondral kemik ve sinovyal sıvı örneklerinde taurin düzeylerinin sağlıklı bireylere kıyasla düşük olduğu tespit edilmiştir (102, 103). Osteofit dokusunda taurin seviyelerinin artışı ise kollajen çözülmesi ve osteofit oluşumuyla ilişkilendirilmiştir (104).

2.3.6. Terapötik potansiyel

Taurinin OA tedavisinde potansiyel bir ajan olarak kullanılabileceği birçok çalışmada vurgulanmıştır. Günlük taurin alımı, diz OA'li hastalarda SOD aktivitesini artırırken, hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda ağrıyı ve diz şişmesini azaltmıştır (105). Taurin, MMP-3 ve CHOP ekspresyonunu baskılayarak kıkırdak dejenerasyonunu engeller (2). Ayrıca, antioksidan etkileri sayesinde kondrosit apoptozunu ve endoplazmik retikulum stresini hafifletir (12).

Taurin, biyokimyasal özellikleri ve hücresel süreçler üzerindeki etkileriyle, OA gibi dejeneratif hastalıkların patogeneğinde önemli bir rol oynar. Oksidatif stres ve inflamasyonu düzenleme kapasitesi, kıkırdak ve kemik sağlığı üzerindeki olumlu etkileriyle birleşerek,

taurini OA tedavisinde umut verici bir terapötik ajan haline getirir. Ancak, daha geniş kapsamlı klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

2.4. Çalışmanın Amacı

Literatürde yapılan çalışmalar, taurinin uygun şekilde takviye edilmesinin diyabete bağlı nefropati, nöropati, ateroskleroz ve kardiyomiyopati gibi tip 2 diyabetli hastalarda diyabetik sendromu önleyebileceğini göstermiştir. Bununla birlikte, taurinin OA üzerindeki etkileri ile ilgili az sayıda çalışma mevcuttur. Ancak, taurinin OA patogenezinde otofaji/apoptoz/nekroptoz arası konuşmada bir etkisinin olup olmadığı ise bilinmemektedir. Bu çalışmanın amacı, taurinin OA patogenezi üzerindeki etkisini ve bunun otofaji/apoptoz/nekroptoz ile ilişkisini göstermektir. Taurin aktivitesi ile kondrositlerde otofajinin indüksiyonu arasında bir bağlantı olup olmadığını, bu bağlantının diğer ölüm yolları ile ilişkisi gösterilecektir. Böylelikle taurinin otofaji/apoptoz/nekroptoz arasında düzenleyici bir rol oynayarak OA tedavi stratejisinde kullanılabileceğini göstermek amaçlanmıştır.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar, Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar

3.1.1 Çalışmada kullanılan cihazlar

- İnkübatör: Hereaus HeraCell 150i
- Biyogüvenlik Kabini: HERASAFE KS15
- Işık Mikroskobu: Olympus CK40
- Santrifüj cihazı: Harrier 15/80
- Vorteks: BEOCO V-1 PLUS
- Spektrofotometre: Epoch, Biotek, ABD
- Otomatik mikropipet: 10µl, 100µl, 1000µl Gilson
- Otomatik çok kanallı pipet: 20-200µl Gilson
- Ph Metre: Consort C860
- Orbital shaker: DAIHAN, SHO-1D
- Manyetik karıştırıcı: VELP SCIENTIFICA
- Su banyosu: MEMMERT/WNB 10
- Hassas terazi: SARTORIUS ENTRIS 323-1S

3.1.2 Çalışmada kullanılan malzemeler

- Fetal bovine serum (FBS): CAPRICORN, FBS-12A
- DMEM : Capricorn DMEM-HA
- Kollojenaz Tip II: Sigma C2-22-1G
- L-Glutamin: Lonza BE17-605E
- Penicilin-Streptomycin Solition (100x): CAPRICORN, PS-B
- Tripsin-EDTA (%0,25, TE): WISENT, 325-043-CL
- Dimetilsülfoksit (DMSO): Sigma, D8418

- Fosfat Tuz Tamponu (PBS): Sigma, P4417
- Etil alkol: Merck, 100983.2511
- Nec-1: Selleckchem, Catalog No. S8037
- Z-VAD: Selleckchem, Catalog No.S8102
- Taurin: Sigma, W381306
- Thermo Fisher Scientific TaqMan Gene Essay p62 Assay ID: Hs01061917_g1
- Thermo Fisher Scientific TaqMan Gene Essay Beclin Assay ID: Hs00186838_m1
- Thermo Fisher Scientific TaqMan Gene Essay Bcl-2 Assay ID: Hs00608023_m1
- Thermo Fisher Scientific TaqMan Gene Essay Bax Assay ID: Hs00180269_m1
- Thermo Fisher Scientific TaqMan Gene Essay RIPK3 Assay ID: Hs00179132_m1
- Thermo Fisher Scientific TaqMan Gene Essay AggreCAN Assay ID: Hs00153936_m1
- Thermo Fisher Scientific TaqMan Gene Essay Col2A1 Assay ID: Hs00264051_m1
- Thermo Fisher Scientific TaqMan Gene Essay GAPDH Assay ID: Hs02786624_g1
- Bovine Serum Albumin (BSA): CAPRICORN, BSA-1U
- 25cm² TC Flask: Greiner, 690175
- 75cm² TC Flask: Greiner, 658175
- Hücre Dondurma tüpleri: Greiner CRYO.S, 122277
- Ependorf: Greiner, 616201
- 24 kuyulu kültür kabı: Greiner, 662160

- 96 kuyulu kültür kabı: Greiner, 655180
- Deney tüpü (15ml): Greiner, Cellstar, 188271
- Deney tüpü (50ml): Greiner, Cellstar, 227261
- Rezervuar (110 ml): ISOLAB, steril, 006.13.110
- cDNA sentez kiti: Roche 04897030001
- Cell Proliferation Kit I (MTT): Roche 11465007001
- Recombinant Anti-SQSTM1/p62 antikor: Abcam-ab 109012
- Recombinant Anti-Bec1in 1 antikor: Abcam-ab 207612
- Recombinant Anti-LC3B antikor: Abcam-ab 192890
- Recombinant Anti-Kollajen 2 antikor: Abcam-ab 188570
- Recombinant Anti-AggreCAN antikor: Abcam-ab 3778
- Anti-beta Aktin antikor: Abcam-ab 8226
- Anti-GAPDH antikor: Abcam-ab 8245

3.2 Yöntemler

3.2.1 Örnek toplama ve hazırlama

Deneklerin tamamı Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji ABD’da total diz artroplastisi olan hastalardan seçilmiştir. Diz eklemi osteoartriti tanısı Amerikan Romatoloji Koleji'nin (ACR) osteoartrit kriterlerine göre yapılmıştır. Kellgren-Lawrence (KL) ölçeğinde radyolojik olarak evre 3-4 primer diz osteoartriti olan hastalar çalışmaya alınmıştır. Dışlama kriteri olarak travma veya başka nedenlerden kaynaklanan osteoartrit belirlenmiştir. Deney grubu olarak medial femoral kondilin subartiküler kısmı, kontrol grubu olarak ise lateral femoral kondilin subartiküler kısmı örneklenmiştir. Örnekler, hastalar total diz replasmanı geçirdikten hemen sonra toplanmış ve alınan kıkırdak örnekleri, Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco, Rockville, MD, ABD) içeren düşük şekerli ortama alınmış, düşük sıcaklıkta saklanmış ve mümkün olan en kısa sürede laboratuvara aktarılmıştır. Örnek doku makası ile yaklaşık 0,5 x 0,5 cm² lik kıkırdak parçalarına kesilmiş ve

kıkırdak parçaları, oftalmik makasla yaklaşık 1 mm²'lik fragmanlara ayrılmıştır. Bu parçalar%0.25 tripsin ile sindirilmiş (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD), sonra fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkanmış ve %0,2 tip II kollajenaz içeren DMEM ortamında (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) 37 ° C'de 40 dakika inkübe edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra, santrifüjleme yoluyla kondrositler elde edilmiştir.

3.2.2 Primer kondrosit hücre kültürü

Hastanede ameliyat sonrası alınan dokular transport mediumu bulunan falkon tüplere alınır ve hücre kültürü laboratuvarına ulaştırılır. Gelen doku cam petri kabına koyulur. Bistüri ve pens yardımıyla küçük parçalara bölünür. 6 kuyucuklu plaklara aktarılır. Her kuyuya yaklaşık 1 ml tyripsin (0.5 mg/ml) koyulur ve 37°C % 5 CO₂ inkübatöründe 10 dakika bekletilir. 10 dakika sonunda pastör pipetiyle tyripsin uzaklaştırılır. Üzerine her kuyuya 3 ml kollajenaz tip II (200u/ml) koyularak 16 saat 37°C % 5 CO₂ inkübatöründe inkübe edilir. Süre sonunda doku örnekleri soğutmalı santrifüjde 4°C'de 890 g'da 10 dakika santrifüj edilerek kollajenaz uzaklaştırılır. Pelletin üzerine DMEM + FBS %10 + L-glutamin + Pen/Stp. eklenerek 6 kuyucuklu plaklara ekilir. Her gün mikroskopla kontrol edilerek hücrelerin büyümesi gözlenir. Haftada 3 kere besi yeri değiştirilerek takibi sürdürülür.

3.2.3 Hücrelerin dondurulması

Yedekleme amacıyla ve projede kullanılacak malzemeler elde edilene kadar hücreler dondurulmuş ve -196 °C azot tankında saklanmıştır. Flaskadaki hücreler yukarıda belirtilen biçimde TE ile kaldırılır ve TE'nin en az iki katı hacimde besiyeri ile inaktive edilir. Karışım 1200 rpm'de 7 dakika santrifüjlenir, süpernatant uzaklaştırılır. Pellet %10 dimetil sülfoksit (DMSO) içeren besiyeri ile açılır (DMSO en son eklenir), vial'lere (1ml/vial) aktarılarak -80 °C buzdolabında bir gece inkübe edildikten sonra azot tankına alınarak muhafaza edilir.

3.2.4 Hücrelerin çözülmesi

Azot tankında saklanan DMSO içeren besiyerinde dondurulmuş hücrelerin şişesi (vial) azot tankından çıkarılmış ve 37°C su banyosu içinde 1 dk bekletilmiştir. 15'lik tüp içine 3 ml besiyeri doldurulmuştur. Bir miktar besiyeri alınarak vial'e aktarılmış, pipetajlama yapılarak vial içindeki sıvının bir kısmı tüpe aktarılmıştır. Kalan hücreler pipetajlama işlemi 3-4 kez tekrarlanarak vialden tüpe aktarılmıştır. DMSO'yu uzaklaştırmak için tüp 7 dk 1200 rpm'de santrifüjlenmiştir ve süpernatant atılmıştır. Pellet üzerine 2 ml besiyeri eklenerek tüp dibine yapışan hücrelerin kaldırılması için pipetajlanmış ve 25 cm²'lik flaska aktarılmıştır. Flaska 3

ml daha besiyeri eklenmiştir (total 5 ml). Hücreler inverted mikroskopta incelendikten sonra CO₂ inkübatörüne kaldırılmıştır. Hücre ekim sayıları ve kültür hacimleri **Tablo 3.1.**'de sunulmuştur.

Tablo 3.1. Hücre Ekim Sayıları

Kültür Kabı	Ekilen hücre sayısı	Son hacim
25 cm ² flask	0,7 x 10⁶	5 ml
75 cm ² flask	2,1 x 10⁶	10 ml
96 kuyulu plaka	0,04 x 10⁶ hücre/kuyu	0,1 ml hücre/kuyu

3.2.5 Hücrelerin pasajlanması

Hücre pasaj protokolüne göre %90 ve üzerinde doluluğa ulaşan flasklardaki hücreler yeterli büyüme alanı sağlanan yeni ortama aktarılır. Flasklardaki eski besiyeri uzaklaştırılarak hücreler PBS ile yıkanır. Hücrelerin birbirinden ve zeminden ayrılması için TE (75'lik flask için 1 ml, 25'lik flask için 0.5 ml) eklenerek %5 CO₂, 37°C'de birkaç dakika inkübe edilir. Flasklara nazikçe vurularak mekanik kuvvetle de hücrelerin ayrılması sağlanır. Işık mikroskobu altında hücrelerin süspansiyon hale geldiği gözlemlendiğinde flaskta TE miktarının en az iki katı kadar besiyeri eklenerek TE inaktive edilir. Karışım 1200 rpm'de 7 dakika santrifüjlenir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet kademeli olarak açılır. Toma lamı ile hücre sayımı ardından belirlenen hücre sayısına göre istenilen kültür kabına ekim yapılır, uygun miktarda besiyeri eklenir.

3.2.6 Taurin hazırlama

Ticari olarak satın alınan toz haldeki Taurin Sigma W381306 (MA=125.15)'den 0,5 M stok solüsyonu hazırlanır. 1litrede 0,5 M(500mM) stok solüsyon olabilmesi için 65,575 gr taurin tartılır. Üzerine 1 litreyi tamamlayacak şekilde steril su eklenir. Manyetik karıştırıcıda taurin eriyinceye kadar karıştırılır. Taurin eridikten sonra filtreden geçirilir ve falkonlara aliquotlanarak kullanılıncaya kadar -80°C'de saklanır. Deney sırasında kullanılacağı zaman 500mM ana stoktan besi yeri ile dilüsyonlar yapılarak standardizasyon dozları belirlenir. (25mM ve 50mM)

3.2.7 Z-VAD hazırlama

Ticari olarak satın alınan toz haldeki Z-VAD (Selleckchem)'den 1mM stok solüsyonu hazırlandı. 25mg ZVAD üzerine 53,477µl DMSO eklenerek 1mM stok solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan stok solüsyon falkonlara bölünerek aliquotlandı ve kullanılıncaya kadar -80°C'ye kaldırıldı. 1mM stok solüsyon serumsuz besi yeri ile dilüe edilerek 500µl M 2. stok elde edildi. Deney sırasında 500µl M 2. stoktan normal besi yeri ile dilüsyon yapılarak 20µl M ZVAD hazırlandı.

3.2.8 Necrostatin-1 hazırlama

Ticari olarak satın alınan toz haldeki Necrostatin-1 (Selleckchem)'den 10mM stok solüsyonu hazırlandı. 10mg Nec-1 üzerine 3,85ml DMSO eklenerek 10mM stok solüsyonu hazırlandı. Karışımın çözünmesi için su banyosunda 50°C'de bekletildi. 10mM stok solüsyon serumsuz besi yeri ile dilüe edilerek 1mM 2. stok elde edildi. 1mM 2. Stok solüsyon ise tekrar

serumsuz besi yeri ile dilüe edilerek 500 µM 3. stok solüsyon elde edildi. Deney sırasında 500 µM 3. stoktan normal besi yeri ile dilüsyon yapılarak 30 µM Necrostatin-1 hazırlandı.

3.2.9 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) hücre canlılığı deneyi

MTT testi hücre canlılığını, proliferasyonunu, sitotoksitesini göstermek için metabolik aktiviteyi ölçen kolorimetrik bir testtir. Metabolik olarak aktif olan hücrelerde sarı tetrazolyum tuzunun (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolyum bromür ya da MTT) mor formazan kristallerine indirgenmesi özelliğine dayanır. Mor formazan kristalleri çözücü ile çözünerek görünür hale getirilir. Renkli çözelti çoklu kuyulu spektrometrede 500- 600 nm absorbans ile ölçüldüğünde nicel değer elde edilir. Canlı hücre sayısı arttıkça renk koyulaşır. Bu çalışmada 550 nm ve 690 nm (referans) dalga boyları kullanılmıştır. Hücrelerinin canlılığı MTT testi ile değerlendirilmiştir. Bunun için ROCHE Cell Proliferation Kit I (MTT) kiti kullanılmıştır. Kit protokolü doğrultusunda hücreler 96 kuyucuklu plaklara 40000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. 48 saat 37°C'de %5 CO₂'lik inkübatörde bekletilmiştir. Hücrelere gruplarına göre gerekli uygulamalar yapılmıştır. İnkübasyon süresi dolan uygulama plağının her kuyusuna 10 µl MTT solüsyonu eklenmiş ve 4 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Ardından her kuyuya 100 µl MTT solubilizasyon solüsyonu eklenmiş ve bir gece 37°C'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün plaklar 96 kuyucuklu Enzyme Linked Immuno Absorbant Assay (ELISA) okuyucuda (Biotek Epoch Gen5 2.0) 550 nm-690 nm dalga boylarında okunmuş ve sonuçları all-in-one microplate reader programında analiz edilmiştir.

Taurin için 25 mM ve 50 mM dozlarında 24 saat ve 48 saat uygulamaları yapılarak uygun doz ve süre teyit edilmiştir. Taurin doz/süre belirlenmesinin ardından OA'li kondrositlere literatür verilerinden elde edilen Z-VAD (106) (20µM) ve Nec-1 (30 µM) (61) doz ve süreleri kullanılarak deney grupları oluşturulmuştur. Oluşturulan gruplar **Tablo 3.2.**'de sunulmuştur. Kısaca; oluşturulan her bir grup için bir adet 96 kuyulu plakanın 60 kuyusuna 0.04×10^6 hücre/kuyu (0.1 ml hücre/kuyu) ekim yapılmış ve hücreler tutunma için en az 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kuyulardaki besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra deney grubunun maruz bırakılacağı ajanı içeren besiyeri (0.25 ml) kuyulara aktarılmış ve belirlenen sürede inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi dolan plakalardan 0.15 ml hücre kültürü ortamı geri çekilmiştir. Her bir kuyuya 0.01 ml MTT labelling reagent eklenmiş 4 saat inkübasyon ardından 0.1 ml solubilization buffer eklenmiştir. 18 saat (overnight) inkübasyon ardından spektrofotometrik mikropłaka okuması ile hücre canlılığı nicel optik yoğunluk (optic density,

OD) değerleri ölçölmüştür. MTT ajanlarıyla yapılan uygulamalar kabin ışığı kapalı gerçekleştirilmiştir, mikropkaka okuma işlemine kadar tüm plakalar ışıktan korunmuştur.

Tablo 3.2. Çalışma deney grupları

Grup No	
Grup 1	Kontrol grubu (Hiçbir muamele görmemiş primer kültür OA hücreleri)
Grup 2	25 mM Taurine 24 saat uygulanan primer kültür OA hücreleri
Grup 3	20 µM Z-vAD 2 saat uygulanan primer kültür OA hücreleri
Grup 4	30 µM Necrostatin-1 2 saat uygulanan primer kültür OA hücreleri
Grup 5	25 mM Taurine 22 saat + son 2 saat 20 µM Z-vAD uygulanan primer kültür OA hücreleri
Grup 6	25 mM Taurine 22 saat + son 2 saat 30 µM Necrostatin-1 uygulanan primer kültür OA hücreleri
Grup 7	25 mM Taurine 22 saat + son 2 saat 20 µM Z-vAD + son 2 saat 30 µM Necrostatin-1 uygulanan primer kültür OA hücreleri

Hücre canlılığını gösteren OD nicel değerlerini elde etmek için MTT kitinin üretici protokolüne uygun olarak 550 nm ve 690 nm (referans) dalga boylarında spektrofotometrik okuma yapılmıştır. Bir kuyudaki hücre canlılığı değerini (A) hesaplamak için 550 nm’de elde edilen OD değerinden (A550) 690 nm’de elde edilen OD değeri (A690) çıkartılmıştır ($A=A550-A690$). Bir gruba ait hücre canlılığı değeri o grubun tüm kuyularından elde edilen A değerlerinin ortalaması alınarak belirlenmiştir. Hücre canlılığı göreceli olarak hesaplandığından boş hücre grubunun hücre canlılık değeri %100 olarak atanmıştır ve her bir kuyunun hücre canlılığı yüzdesi boş hücre grubuna göre belirlenmiştir.

3.2.10 Hücre kültürü materyalinden RNA izolasyonu

6 kuyulu plakların her bir kuyusuna 1×10^6 hücre/kuyu olacak şekilde hücreler ekilmi  ve 72 saat sonunda bu hücrelere grubuna göre uygulama yapılmıştır. Gerekli inkübasyon süreleri sonunda hücreler bu kuyulardan tripsin ile kaldırılmıştır. 1200 rpm de 5 dakika sonunda hücreler tek bir tüpte toplanarak aşağıdaki protokol takip edilerek RNA izolasyonu yapılmıştır. (RNeasy Mini Kit (250 rxn) Cat No./ID: 74106). İzolasyon %70 etilalkol ile steril edilmiş laboratuvar ortamında RNaz açısından steril malzemeler ve filtreli pipet uçları kullanılarak yapılmıştır.

1. 6 kuyulu plaklardan toplanan hücrelerin santrifüj sonrası üst fazı uzaklaştırılır üzerine 350  lt RLT tamponu koyulur.
2. İlave olarak 350  lt DEPC'li su ile hazırlanmış olan %70 etil alkol eklenir ve tüm hacim kolonlara aktarılır. 15 saniye 13000g'de santrifüj yapıldıktan sonra toplama tüpüne toplanan faz uzaklaştırılır.
3. 700  lt RW1 tamponu eklenip 15 saniye 13000g'de santrifüj yapıldıktan sonra toplama tüpüne toplanan faz uzaklaştırılır.
4. 500  l RPE tamponu eklenip 15 saniye 13000g'de santrifüj yapıldıktan sonra toplama tüpüne toplanan faz uzaklaştırılır.
5. 500  l RPE tamponu eklenip 2 dakika 13000g'de santrifüj yapılır. Toplama tüpüne toplanan faz uzaklaştırılır.
6. Kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilip 1 dakika 13000g'de santrifüj yapılır.
7. Kolon yeni bir 1,5 ml'lik steril deney tüpüne yerleştirilip 40  l RNAaz içermeyen su eklenir ve 1 dakika 13000g'de santrifüj yapılır.

Elde edilen 40  l hacmindeki RNA'nın 6  l'si steril bir başka tüpe aktarılmıştır. Bu işlem ana stoğun sürekli dondurma-çözme süreçlerine maruz kalmasını engellemek amacı ile yapılmıştır. Ayrılan bu RNA'nın 3  l'si agaroz jelde RNA kalitesinin değerlendirilmesi, 2  l'si RNA kantitasyonu için kullanılmıştır. Stok RNA ise izolasyon sonunda -80°C ye kaldırılmıştır.

3.2.11 RNA saflığının ve miktarının tayini

İzole edilen RNA'ların saflığının kontrolü 260/280 nm'deki absorbans oranı ile saptanmıştır. Spektrofotometre cihazı olarak Epoch Gen5 2.0 ve all-in-one Reader software programı kullanılmıştır. DNA ve protein kontaminasyonu taşımayan, iyi kalitede izole edilmiş RNA'da beklenen 260/280nm absorbans oranı 1,8-2,1'dir. 2µl izole edilen RNA ve 2µl steril distile su ile karıştırılır ve okuma yapılır. Sonuçlar dilüsyon faktörü dikkate alınarak hesaplanmıştır.

3.2.12 Komplementer DNA (cDNA) sentezi

Komplementer DNA (cDNA) sentezi için ticari bir kit kullanılmıştır (Roche 05081955001). Steril, nükleaz uzaklaştırılmış PZR tüpleri ile buz üzerinde çalışılmıştır. Kalıp-primer karışımı

Tablo 3.3.'teki miktarlara göre hazırlanmıştır.

Tablo 3.3. Kalıp-primer karışımı (1 reaksiyon için)

İçerik	Hacim	Son Konsantrasyon
Toplam RNA	değişken	500 ng
Hexamer Primer	2 µl	60µM
PCR için uygun su	değişken	Son hacim 11,4 µl olacak şekilde ayarlanır
Toplam Hacim	11,4 µl	

Kalıp-primer karışımı 65°C'de 10 dakika bekletilerek denatüre edilmiştir. Bu işlem ile RNA sekonder yapıları uzaklaştırılır. İşlem sonunda tüpler hemen buz üstüne alınır ve **Tablo 3.4.**'deki protokole göre hazırlanan ters transkriptaz (reverse transcriptase, RT) karışımı kalıp-primer karışımına transfer edilmiştir.

Komplementer DNA (cDNA) Karışımı

Tablo 3.4. Komplementer DNA (cDNA) karışımı

İçerik	Hacim	Son Konsantrasyon
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5X	4 µlt	1x (8mM MgCl ₂)
ProtectorRNase İnhibitor 40U/ µlt	0,5 µlt	20U
Deoxynucleotide Mix, 10mM each	2 µlt	1mM each
DTT	1 µlt	5mM
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase	1,1 µlt	10U
Toplam Hacim	8,4 µlt	

29°C’de 10 dakika, 50 °C’de 60 dakika ve enzim inaktivasyonu için 85°C’de 5 dakika bekletilir. Tüpler buz üstüne alınarak reaksiyon sonlandırılır. Elde edilen cDNA daha sonra yapılacak çalışmalar için -20°C’ye kaldırılır.

3.2.13. Gen ifadenmesinin ters transkripsiyonlu kantitatif gerçek zamanlı PZR(RT-qPCR) ile saptanması

Otofaji belirteci Beclin1 ve p62 (sqstm1), nekroptoz belirteci RIP3, apoptoz belirteci Bax ve Bcl-2 ve kondrosit yapısal geni aggrecanın ifadenmelerini saptamak amacı ile her bir gene ait real time ready prob (<https://www.tib-molbiol.de/>) ile LightCycler 480 probe Master kiti kullanılmıştır. LightCycler 480 probe Master (Roche 04887301001) karışımı kit protokolüne uygun olarak hazırlanmıştır. Hedef gen ifadeleri gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (Glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase, GAPDH) referans gen ile normalize edilmiştir. Real-Time PCR sonucunda elde edilen Ct değerleri kullanılarak değişim katsayısı $2^{-\Delta CT} = 2^{-(Ct \text{ gen} - Ct \text{ referans gen})}$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır (Schmittgen & Livak, 2008). cDNA kalıbı yokluğunda amplifikasyon olmadığı gözlenmiştir. Tüm ifadenme çalışmaları için üç tekrar yapılmıştır.

3.2.14 Western blot analizi

Western Blot çalışmasında Başkent Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarındaki Bio-rad Mini-PROTEAN® Tetra Cell jel Yürütme ve Transfer Sistemi ile Bio-rad ChemiDoc™ Imaging Systems Görüntüleme Sistemi kullanılmıştır.

Uygulama yapılmış olan hücrelerden protein izolasyonu için ticari kit Roche Complete Lysis-M (Cat. No. 04 719 956 001) protokolüne uygun olarak kullanılmış, elde edilen proteinlerin konsantrasyonlarının belirlenmesi için ise ticari kit Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Cat. No. 23227) kullanılmıştır. Örnekler ELISA okuyucuda 562 nm’de okutularak µgr/mL cinsinden konsantrasyonları belirlenmiştir. Ölçümler Başkent Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında bulunan Epoch Gen5 2.0 Spektrofotometre cihazı aracılığıyla yapılmıştır. Elde edilen protein örnekleri Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı -80°C dondurucusunda saklanmıştır.

Konsantrasyonları belirlenen proteinlerden eşit miktarlarda örnek alınıp (5-30 µgr protein), protein yükleme tamponu (Advansta Avant™ Buffer) ile jele yüklenmiş ve Tris-Glisin-SDS (Cat. No: R-01036-020) tamponu aracılığı ile Bio-rad Mini-PROTEAN® Tetra Cell jel Yürütme Sistemi’nde jel elektroforezi yapılmıştır. Yürütülen proteinlerin kDa büyüklüklerini saptamak üzere Color Prestained Protein Standard, Broad Range (11-245 kDa, NEB Cat. No: P7719) protein ladder kullanılmıştır. Proteinler jelde yürütüldükten sonra PVDF (polyvinylidene fluoride) membrana transferi Bio-rad Mini-PROTEAN® Tetra Cell jel Transfer Sistemi aracılığı ile gerçekleştirilmiştir. Transfer işlemi için ticari ürün Advansta FLASHBlot™ Transfer Buffer (Cat. No:R-03090-D25) kullanılmıştır.

İlgilenilen proteinlerin PVDF membrana aktarılmasının ardından membran bloklaması yapılmıştır. İlgilenilen primer antikor ile gece boyu inkübasyon yapılarak peşi sıra primer antikora uygun sekonder antikor (HRP Donkey anti-rabbit IgG, HRP Goat anti-mouse IgG) ile gereken süre inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İlgilenilen antikor işaretlemesi başarılı olduğu takdirde uygun referans protein antikoruna için de aynı işlemler gerçekleştirilmiştir. İlgilenilen antikor ve referans antikor uygulamaları ardından kemiluminesans deteksiyonu için HRP substrat reaktif bileşenleri olarak ticari kit WesternBright Sirius Chemiluminescent Detection Kit (Advansta, Cat. No: K-12043-D10) kullanılarak Bio-rad ChemiDoc™ Imaging Systems Görüntüleme Sistemi ile membran görüntüsü alınmıştır. İlgilenilen protein bant büyüklüğü

referans protein bant büyüklüğü ile Image J programı aracılığı ile normalize edilip protein miktar değişimleri analiz edilmiştir.

Tezde araştırılması planlanan proteinler ve bu proteinlere uygun primer antikor listesi **Tablo 3.5.**'te verilmiştir.

Tablo 3.5. Tezde araştırılması planlanan proteinlere ait kullanılan antikorlar

Protein İşlevi	Kullanılacak Primer Antikor Adı
Referans Protein	Anti- β -Actin (kat.no.)
Otofaji belirteçleri	Anti-LC3I/II Anti-p62 Anti-BECLIN1
Apoptoz belirteçleri	Anti- pro/cleaved kaspas 3 Anti-PARP
Kondrosit belirteci	Anti-Kolajen 2

Tablo 3.5. Tezde araştırılması planlanan proteinlere ait kullanılan antikorlar

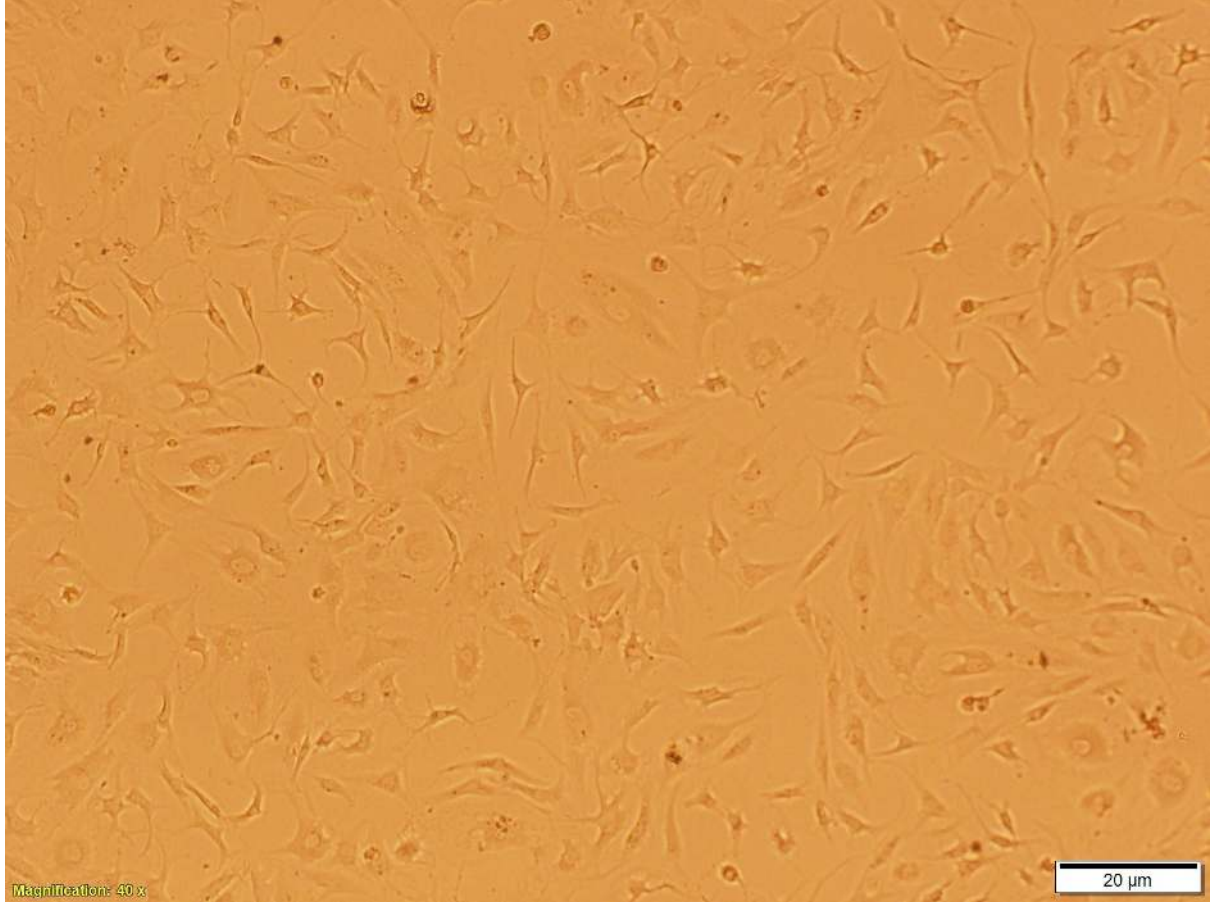
3.3 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler Statistical Package of Social Science (SPSS) sürüm 25.0 (IBM Corp., Armonk, NY, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile incelenmiştir. Tanımlayıcı istatistikler kategorik değişkenler için sayı ve yüzde, nicel değişkenler için ortalama ve standart sapma ve medyan (minimum-maksimum) olarak özetlenmiştir. Kategorik değişkenler için gruplar arasındaki farklılıklar ki-kare testi kullanılarak analiz edilmiştir. Sürekli değişkenler için ikiden fazla grup arasındaki farklılıklar Tek Yönlü ANOVA ile değerlendirilmiştir. Sıralı veya normal dağılmayan sürekli değişkenler açısından ikiden fazla grup arasındaki farkı test etmek için Kruskal Wallis Tek Yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. Gruplardaki farklılıkları tespit etmek için Dunn's Benferroni testi kullanılmıştır. Anlamlılık düzeyi $\alpha = 0.05$ olarak belirlenmiştir.

4.BULGULAR

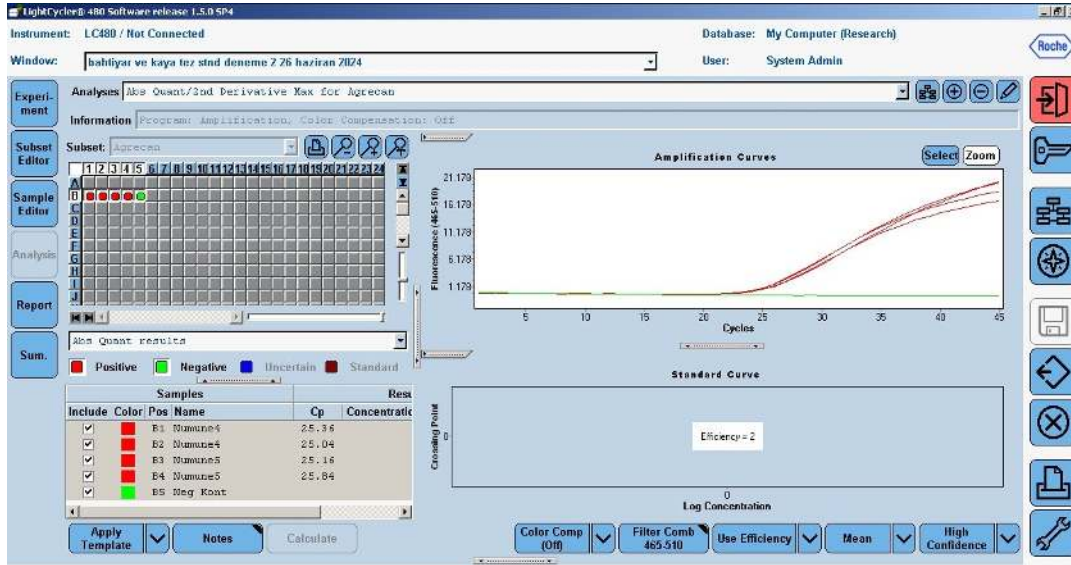
4.1 Hücre Kültürü Bulguları

Diz eklemi osteoartriti tanısı almış hastadan diz replasmanı geçirdikten hemen sonra alınan dokulardan sağlıklı ve OA etkisi altındaki kondrositler izole edilerek primer kondrosit kültürü hazırlanmış ve standardizasyonu tamamlanmıştır (**Şekil 4.1.**).

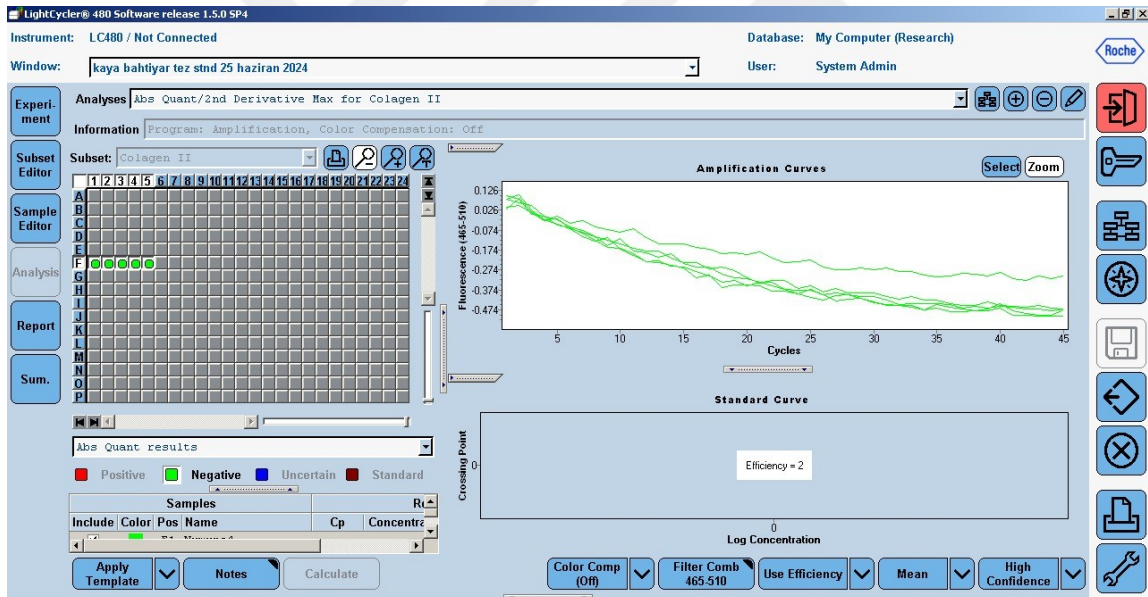


Şekil 4.1. Çoğalmaya başlayan primer osteoartrit kondrosit hücrelerinin ışık mikroskobu altındaki görüntüleri (Olympus IX73)

İzole edilen hücrelerin, farklılaşarak fibroblastlara dönüşmediğinin ve kondrosit olarak kaldığının teyit edilmesi için kondrosit spesifik gen ifadenmesi, ters transkripsiyonlu RT-qPCR ile değerlendirilmiştir. İzole edilerek kültüre edilen hücrelerin kondrosite spesifik olan aggregan genini ifadelediği (**Şekil 4.2.**) ve OA gelişimine bağlı olarak kondrositlerin farklılaşma durumlarını kaybetmesi ve katabolik süreçlerin baskın hale gelmesi sebebi ile Col2A1 ifadenmesinin azaldığı gösterilmiştir (**Şekil 4.3.**).



Şekil 4.2. Aggregan gen ifadenlenmesinin RT-qPCR ile gösterilmesi



Şekil 4.3. Col2A1 gen ifadenlenmesinin RT-qPCR ile gösterilmesi

4.2 Hücre Canlılığı Bulguları

Primer kültür hazırlandıktan sonra taurin için 25-35-50 mM dozlar, 24-48 saatlik uygulamalar (**Tablo 4.1.**); apoptoz inhibitörü Z-vAD için 10-20-50 μ M dozlar, 30-60 dakika uygulamalar (**Tablo 4.4.**); nekroptoz inhibitörü necrostatin-1 için 20-30-50 μ M dozlar, 30-60 dakika uygulamalar (**Tablo 4.7.**) kullanılarak oluşturulan deney gruplarında uygun doz ve süre belirlenmiştir.

4.2.1 Taurin doz ve süre analizleri

Tablo 4.1. Sağlıklı ve OA'li kondrositlerde taurin uygulamasının farklı doz ve sürelerdeki ortalama değerleri

			Ort. $\pm$ s.s.	Medyan (Min.-Mak.)	p
Sağlıklı	Kontrol	24 saat	0,849 $\pm$ 0,088	0,863 (0,626-0,984)	<0,001
		48 saat	0,868 $\pm$ 0,088	0,869 (0,683-1,036)	
	25mM Taurin	24 saat	0,923 $\pm$ 0,035	0,931 (0,853-1,010)	
		48 saat	0,929 $\pm$ 0,065	0,933 (0,807-1,015)	
	35mM Taurin	24 saat	0,844 $\pm$ 0,038	0,853 (0,780-0,911)	
		48 saat	0,894 $\pm$ 0,059	0,885 (0,789-0,978)	
	50mM Taurin	24 saat	0,810 $\pm$ 0,049	0,794 (0,718-0,886)	
		48 saat	0,871 $\pm$ 0,047	0,874 (0,781-0,929)	
Osteoartrit	Kontrol	24 saat	1,096 $\pm$ 0,086	1,094 (0,951-1,243)	<0,001
		48 saat	1,028 $\pm$ 0,173	1,097 (0,648-1,233)	
	25mM Taurin	24 saat	0,969 $\pm$ 0,075	0,978 (0,802-1,053)	
		48 saat	1,035 $\pm$ 0,067	1,040 (0,900-1,177)	
	35mM Taurin	24 saat	0,930 $\pm$ 0,073	0,940 (0,751-1,047)	
		48 saat	1,039 $\pm$ 0,069	1,051 (0,902-1,147)	
	50mM Taurin	24 saat	0,996 $\pm$ 0,067	0,996 (0,898-1,097)	
		48 saat	1,059 $\pm$ 0,142	1,074 (0,763-1,313)	

Kruskal Wallis Tek Yönlü ANOVA Testi

Taurin ilaç uygulamasında sağlıklı gruplara göre OD ölçüm düzeyi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık göstermektedir (p <0,001). Anlamlı farklılıklar **Tablo 4.2.**, **Tablo 4.3.** ve **Şekil 4.4.**'te verilmiştir.

Tablo 4.2. Taurin uygulamasının sağlıklı kondrositlerde gruplar arası çoklu karşılaştırmalara ilişkin anlamlılık değerleri

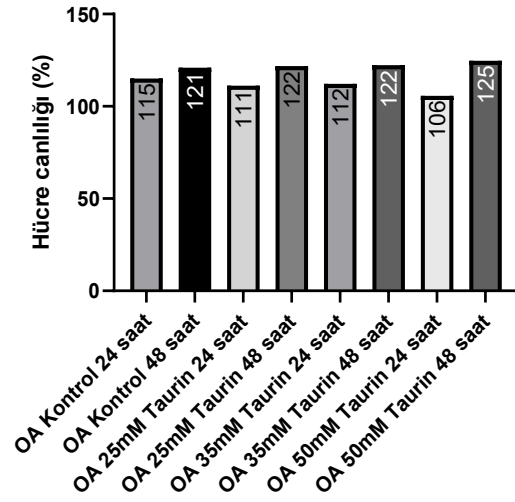
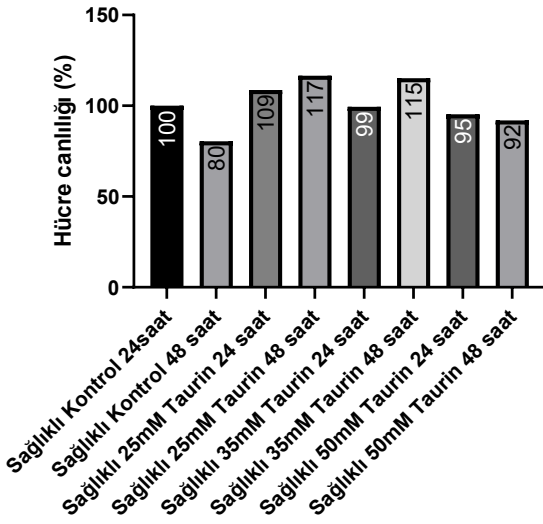
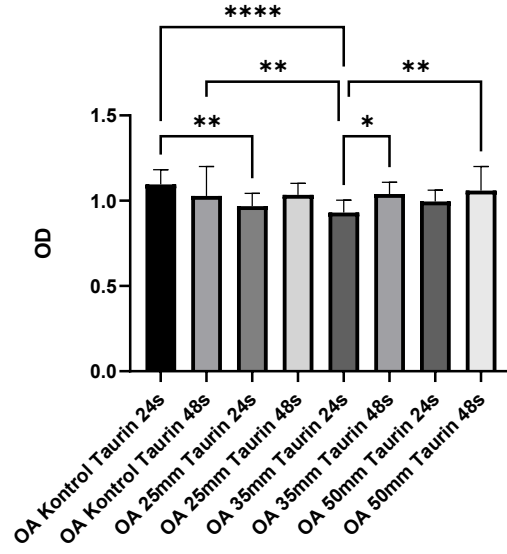
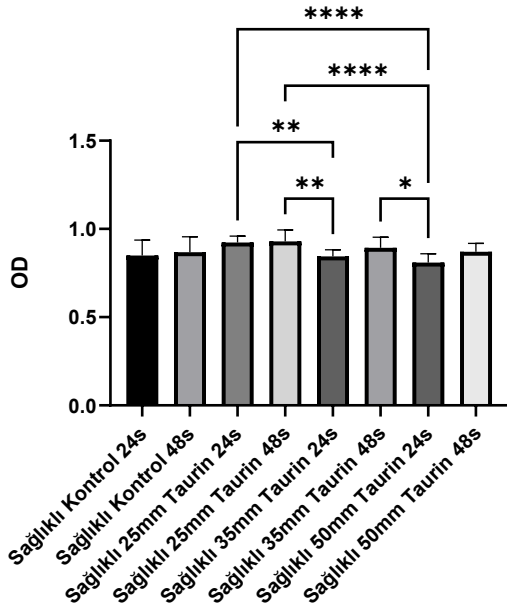
	Kontrol 24s	Kontrol 48s	25mM Taurin 24s	25mM Taurin 48s	35mM Taurin 24s	35mM Taurin 48s	50mM Taurin 24s	50mM Taurin 48s
Kontrol 24s	1	1,000	0,084	0,1442	1,000	1,000	1,000	1,000
Kontrol 48s		1	0,306	0,4935	1,000	1,000	0,442	1,000
25mM Taurin 24s			1	1,000	0,005	1,000	<0,001	0,372
25mM Taurin 48s				1	0,009	1,000	<0,001	0,594
35mM Taurin 24s					1	0,590	1,000	1,000
35mM Taurin 48s						1	0,012	1,000
50mM Taurin 24s							1	0,365
50mM Taurin 48s								1

Anlamlılık değerleri çoklu testler için Dunn's Bonferroni düzeltmesi ile ayarlanmıştır.

Tablo 4.3. Taurin uygulamasının OA'lı kondrositlerde gruplar arası çoklu karşılaştırmalara ilişkin anlamlılık değerleri

	Kontrol 24s	Kontrol 48s	25mM Taurin 24s	25mM Taurin 48s	35mM Taurin 24s	35mM Taurin 48s	50mM Taurin 24s	50mM Taurin 48s
Kontrol 24s	1	1,000	0,008	1,000	<0,001	1,000	0,079	1,000
Kontrol 48s		1	0,1957	1,000	0,004	1,000	1,000	1,000
25mM Taurin 24s			1	1,000	1,000	0,934	1,000	0,177
25mM Taurin 48s				1	0,076	1,000	1,000	1,000
35mM Taurin 24s					1	0,033	1,000	0,003
35mM Taurin 48s						1	1,000	1,000
50mM Taurin 24s							1	0,990
50mM Taurin 48s								1

Anlamlılık değerleri çoklu testler için Dunn's Bonferroni düzeltmesi ile ayarlanmıştır.



Şekil 4.4. Sağlıklı ve OA'lı kondrositlerde 25mM 24 saat Taurin uygulaması hücre canlılığı değerlerinin karşılaştırılması ($p<0,05^*$; $p<0,01^{**}$; $p<0,001^{***}$; $p<0,0001^{****}$)

Yüksek dozda (50 mM Taurin) ve uzun süreli (48 saat) uygulamalarda hücre canlılığının düştüğü görülmektedir. Taurin'in etkisi, özellikle düşük ve orta dozlarda (25 mM ve 35 mM) belirgin olup, yüksek dozlarda hücresel stres oluşturabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle etkili olan en düşük doz, en kısa sürede uygulama (25 mM, 24 saat) yapılmasına karar verilmiştir.

4.2.2 zVAD doz ve süre analizleri

Tablo 4.4. Sağlıklı ve OA'lı kondrositlerde zVAD uygulamasının farklı doz ve sürelerdeki ortalama değerleri

		Zaman	Ort.± s.s.	Medyan (Min.-Mak.)	p
Sağlıklı	Kontrol	30 dk	,528±,080	,546 (,406-,629)	<0,001
		60 dk	,562±,086	,592 (,419-,729)	
	10 µM zVAD	30 dk	,694±,029	,692 (,641-,765)	
		60 dk	,763±,033	,772 (,706-,815)	
	20 µM zVAD	30 dk	,590±,043	,599 (,480-,640)	
		60 dk	,644±,061	,650 (,522-,737)	
	50 µM zVAD	30 dk	,451±,053	,457 (,361-,515)	
		60 dk	,477±,044	,489 (,383-,527)	
Osteoartrit	Kontrol	30 dk	,780±,125	,812 (,519-,942)	<0,001
		60 dk	,918±,147	,976 (,687-1,079)	
	10 µM zVAD	30 dk	,789±,048	,793 (,675-,866)	
		60 dk	1,006±,056	1,010 (,839-1,122)	
	20 µM zVAD	30 dk	,766±,073	,761 (,648-,887)	
		60 dk	,967±,078	1,001 (,772-1,040)	
	50 µM zVAD	30 dk	,664±,084	,690 (,491-,776)	
		60 dk	,805±,120	,868 (,598-,905)	

Kruskal Wallis Tek Yönlü ANOVA Testi

Sağlıklı kondrositlerde ZVAD uygulamasının OD ölçüm düzeyi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık göstermektedir (p <0,001). Ancak 50 µM dozunda belirgin bir toksisite etkisi tespit edilmiştir. Anlamlı farklılıklar **Tablo 4.5.**, **Tablo 4.6.** ve **Şekil 4.5.**'te verilmiştir.

Tablo 4.5. zVAD uygulamasının sağlıklı kondrositlerde gruplar arası çoklu karşılaştırmalara ilişkin anlamlılık değerleri

	Kontrol 30d	Kontrol 60d	10 µM ZVAD 30d	10 µM ZVAD 60d	20 µM ZVAD 30d	20 µM ZVAD 60d	50 µM ZVAD 30d	50 µM ZVAD 60d
Kontrol 30d	1	1,000	<0,001	<0,001	1,000	0,059	1,000	1,000
Kontrol 60d		1	0,012	<0,001	1,000	0,572	0,294	1,000
10 µM zVAD 30d			1	1,000	0,141	1,000	<0,001	<0,001
10 µM ZVAD 60d				1	<0,001	0,2541	<0,001	<0,001
20 µM ZVAD 30d					1	1,000	0,030	0,182
20 µM ZVAD 60d						1	<0,001	<0,001
50 µM ZVAD 30d							1	1,000
50 µM ZVAD 60d								1

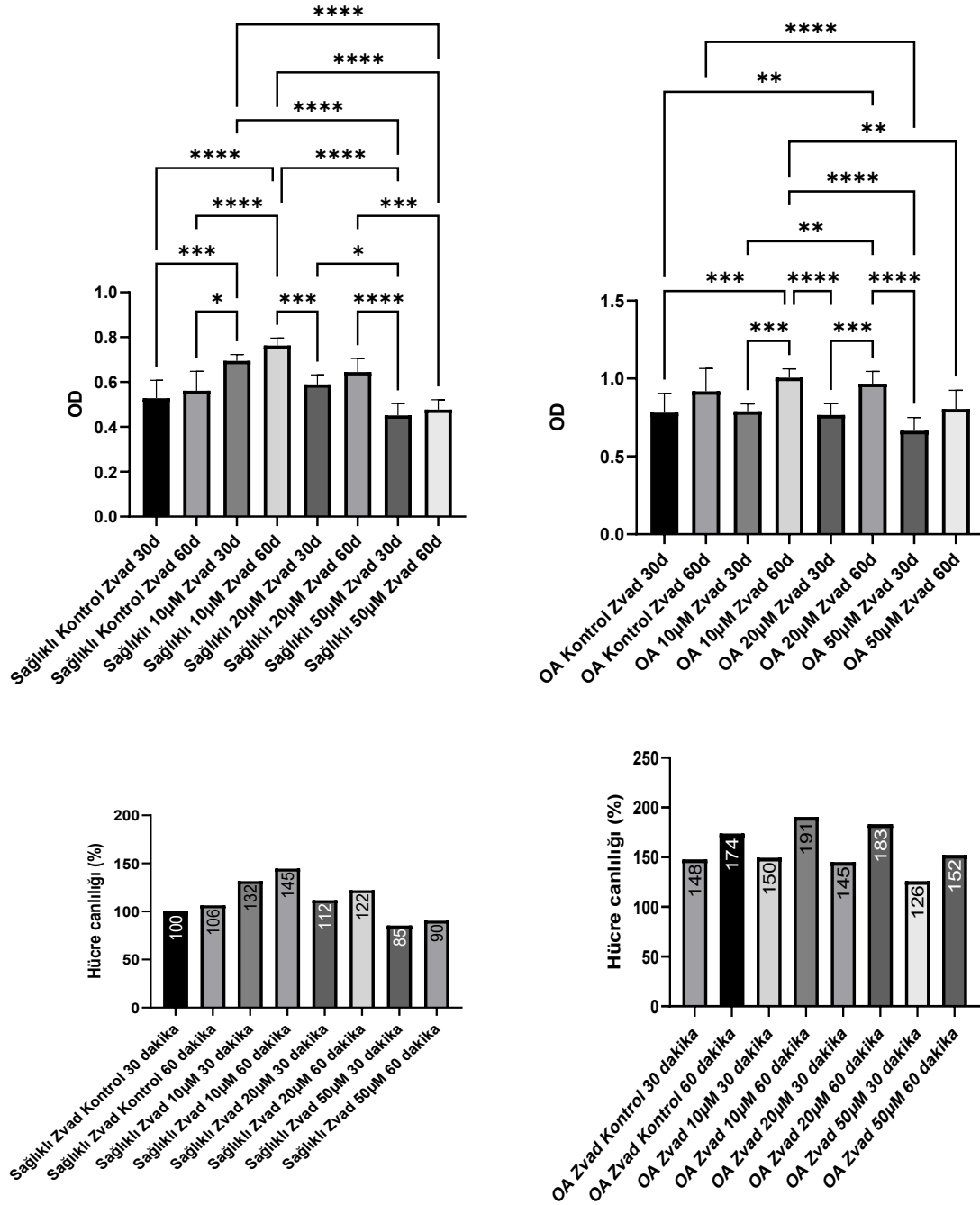
Anlamlılık değerleri çoklu testler için Dunn's Bonferroni düzeltmesi ile ayarlanmıştır.

Tablo 4.6. zVAD uygulamasının OA'lı kondrositlerde gruplar arası çoklu karşılaştırmalara ilişkin anlamlılık değerleri

	Kontrol 30d	Kontrol 60d	10 µM ZVAD 30d	10 µM ZVAD 60d	20 µM ZVAD 30d	20 µM ZVAD 60d	50 µM ZVAD 30d	50 µM ZVAD 60d
Kontrol 30d	1	0,348	1,000	<0,001	1,000	0,009	0,506	1,000
Kontrol 60d		1	0,298	1,000	0,052	1,000	<0,001	1,000
10 µM ZVAD 30d			1	<0,001	1,000	0,007	0,586	1,000
10 µM ZVAD 60d				1	<0,001	1,000	<0,001	0,006
20 µM ZVAD 30d					1	<0,001	1,000	1,000
20 µM ZVAD 60d						1	<0,001	0,057
50 µM ZVAD 30d							1	0,113
50 µM ZVAD 60d								1

Anlamlılık değerleri çoklu testler için Dunn's Bonferroni düzeltmesi ile ayarlanmıştır.

OA'lı kondrositlerde ise 20 µM ZVAD 30 dk grubunun OD ölçüm düzeyi 20 µM ZVAD 60 dk grubuna göre anlamlı düzeyde düşüktür ($p < 0,001$). 20 µM ZVAD 60 dk grubunun OD ölçüm düzeyi 50 µM ZVAD 30 dk grubuna göre anlamlı düzeyde yüksektir ($p < 0,001$). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$).



Şekil 4.5. Sağlıklı ve OA'lı kondrositlerde zVAD uygulaması hücre canlılığı değerlerinin karşılaştırılması ($p<0,05^*$; $p<0,01^{**}$; $p<0,001^{***}$; $p<0,0001^{****}$)

ZVAD uygulamasının osteoartritli hücrelerin canlılığına doz ve süreye bağlı olarak farklı etkileri olduğu görülmektedir. Düşük ve orta doz (10-20 µM) ZVAD uygulamalarının belirli sürelerde hücre canlılığını artırabileceği (apoptoz baskılayıcı etkisinin olduğu) ancak yüksek dozda veya uzun süreli uygulamada hücresel stres yaratabileceği görülmektedir. Elde

ettiğimiz veriler ve literatür verilerinden de yola çıkarak 2 saatlik 20 µM uygulama yapılmasına karar verilmiştir.

4.2.3 Nekrostatin 1 doz ve süre analizleri

Tablo 4.7. Sağlıklı ve OA'lı kondrositlerde Nekrostatin-1 uygulamasının farklı doz ve sürelerdeki ortalama değerleri

		Zaman	Ort.± s.s.	Medyan (Min.-Mak.)	p
Sağlıklı	Kontrol	30 dk	,836±,065	,871 (,731-,908)	<0,001
		60 dk	,700±,072	,692 (,590-,878)	
	20 µM Nekrostatin	30 dk	,925±,054	,907 (,874-1,042)	
		60 dk	,926±,055	,929 (,832-1,017)	
	30 µM Nekrostatin	30 dk	,898±,069	,889 (,795-1,008)	
		60 dk	,866±,062	,867 (,780-,981)	
	50 µM Nekrostatin	30 dk	,893±,052	,876 (,810-,973)	
		60 dk	,837±,050	,841 (,723-,906)	
Osteoartrit	Kontrol	30 dk	,909±,066	,936 (,735-,970)	<0,001
		60 dk	,872±,092	,878 (,658-1,055)	
	20 µM Nekrostatin	30 dk	,913±,034	,908 (,860-,975)	
		60 dk	,953±,071	,973 (,731-1,009)	
	30 µM Nekrostatin	30 dk	,980±,048	,976 (,902-1,102)	
		60 dk	,985±,106	1,018 (,667-1,113)	
	50 µM Nekrostatin	30 dk	1,042±,038	1,047 (,940-1,089)	
		60 dk	,977±,096	,964 (,736-1,172)	

Sağlıklı kondrositlerde Nekrostatin uygulamasında OD ölçüm düzeyi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık göstermektedir (p <0,001). Anlamlı farklılıklar **Tablo 4.8.** ve **Tablo 4.9.** ve **Şekil 4.6.**'da verilmiştir.

Tablo 4.8. Nekrostatin-1 uygulamasının sağlıklı kondrositlerde gruplar arası çoklu karşılaştırmalara ilişkin anlamlılık değerleri

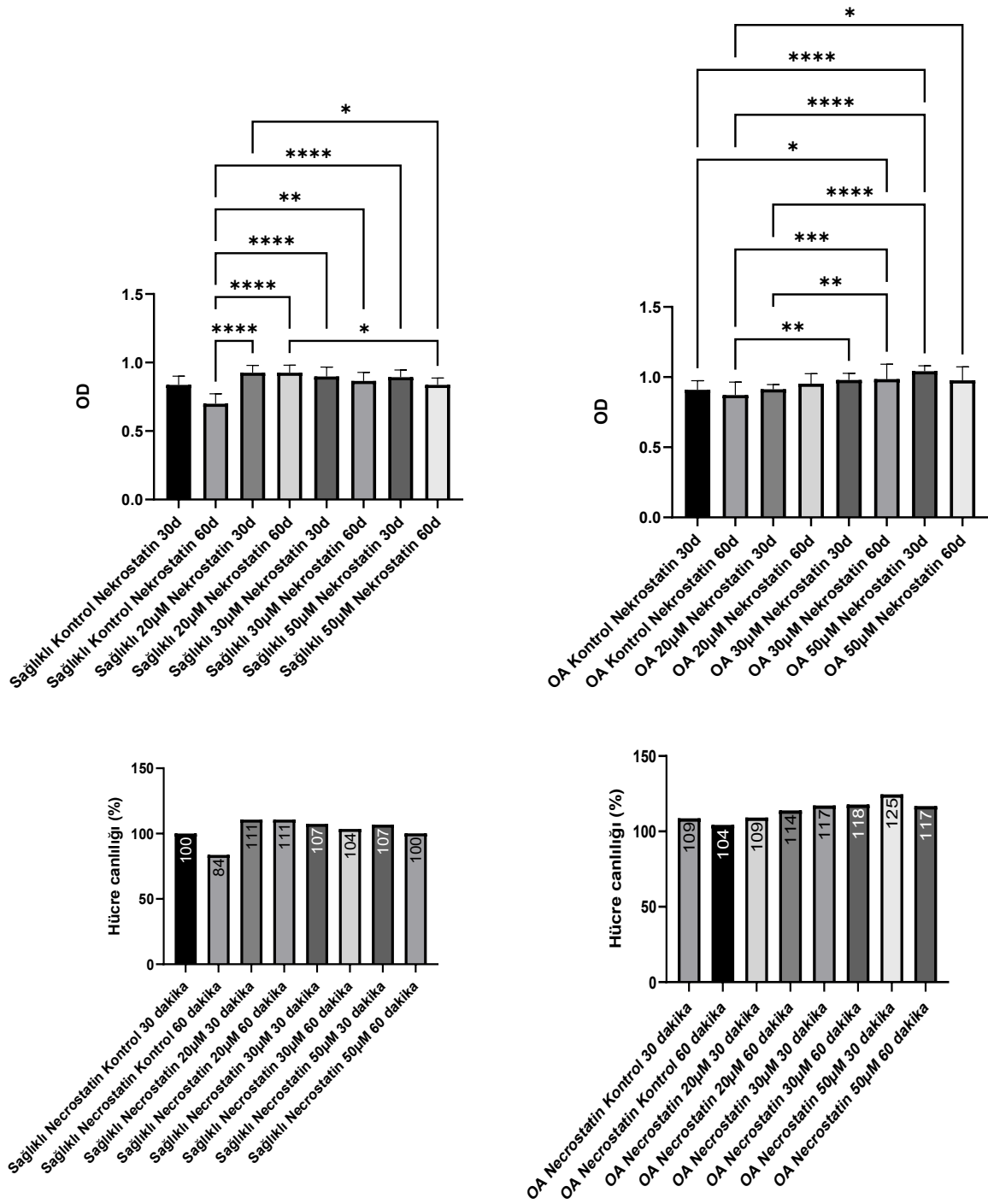
	Kontrol 30d	Kontrol 60d	20 µM Nekrostatin in 30d	20 µM Nekrostatin in 60d	30 µM Nekrostatin in 30d	30 µM Nekrostatin in 60d	50 µM Nekrostatin in 30d	50 µM Nekrostatin in 60d
Kontrol 30d	1	0,076	0,055	0,059	1,000	1,000	1,000	1,000
Kontrol 60d		1	<0,001	<0,001	<0,001	0,004	<0,001	0,157
20 µM Nekrostatin 30d			1	1,000	1,000	0,624	1,000	0,025
20 µM Nekrostatin 60d				1	1,000	0,660	1,000	0,027
30 µM Nekrostatin 30d					1	1,000	1,000	0,809
30 µM Nekrostatin 60d						1	1,000	1,000
50 µM Nekrostatin 30d							1	1,000
50 µM Nekrostatin 60d								1

Anlamlılık değerleri çoklu testler için Dunn's Bonferroni düzeltmesi ile ayarlanmıştır.

Tablo 4.9. Nekrostatin-1 uygulamasının OA'lı kondrositlerde gruplar arası çoklu karşılaştırmalara ilişkin anlamlılık değerleri

	Kontrol 30d	Kontrol 60d	20 µM Nekrostatin in 30d	20 µM Nekrostatin in 60d	30 µM Nekrostatin in 30d	30 µM Nekrostatin in 60d	50 µM Nekrostatin in 30d	50 µM Nekrostatin in 60d
Kontrol 30d	1	1,000	1,000	0,996	0,183	0,032	<0,001	0,250
Kontrol 60dk		1	1,000	0,076	0,008	<0,001	<0,001	0,012
20 µM Nekrostatin 30d			1	0,428	0,066	0,009	<0,001	0,092
20 µM Nekrostatin 60d				1	1,000	1,000	0,067	1,000
30 µM Nekrostatin 30d					1	1,000	0,4361	1,000
30 µM Nekrostatin 60d						1	1,000	1,000
50 µM Nekrostatin 30d							1	0,325
50 µM Nekrostatin 60d								1

Anlamlılık değerleri çoklu testler için Dunn's Bonferroni düzeltmesi ile ayarlanmıştır.



Şekil 4.6. Sağlıklı ve OA'lı kondrositlerde Necrostatin-1 uygulaması hücre canlılığı değerlerinin karşılaştırılması ($p<0,05^*$; $p<0,01^{**}$; $p<0,001^{***}$; $p<0,0001^{****}$)

Sağlıklı hücrelerde, 20-30 µM dozlarında 30-60 dakika süreyle uygulandığında hücre canlılığı üzerinde belirgin olumlu etkiler göstermiştir ($p<0.001$, Tablo 4.7). 50 µM dozunda ise canlılıkta düşüş gözlenmiştir. OA kondrositlerde, 30 µM Necrostatin-1, en yüksek hücre

canlılığı seviyesini sağlamıştır ($p<0.001$). Daha yüksek dozlarda ise bu etkinin azaldığı görülmüştür. Sonuç olarak elde ettiğimiz veriler ve literatür verileri de dikkate alınarak 2 saatlik 30 μM uygulama yapılmasına karar verilmiştir.

Gruplar oluşturulduktan sonra belirlenen dozlarda uygulamalar yapılmış ve elde edilen sonuçlar analiz edilmiştir (**Tablo 4.10**).

Tablo 4.10. Uygulama yapılan gruplarda saptanan ortalama değerler

Grup	OD		p
	Ort. $\pm$ s.s.	Medyan (Min.-Mak.)	
Kontrol	1,1736 $\pm$,0964	1,1835 (0,994-1,432)	<0,001
25mM Taurin 24saat (T)	1,3123 $\pm$,1263	1,3425 (0,732-1,511)	
20 μM ZVAD 2saat (Z)	1,1468 $\pm$,0743	1,1515 (0,945-1,346)	
30 μM Nec1 2 saat (N)	1,1846 $\pm$,1690	1,213 (0,609-1,44)	
25 mM Taurin 24s+20 μM ZVAD 2s (T+Z)	1,2008 $\pm$,2126	1,2695 (0,634-1,468)	
25 mM Taurin 24 saat+30 μM Nec1 2 saat (T+N)	1,3114 $\pm$,1561	1,354 (0,864-1,517)	
25 mM Taurin 24s+20 μM ZVAD2s+30 μM Nec1 2s(T+Z+N)	1,2308 $\pm$,0812	1,2315 (1,022-1,406)	

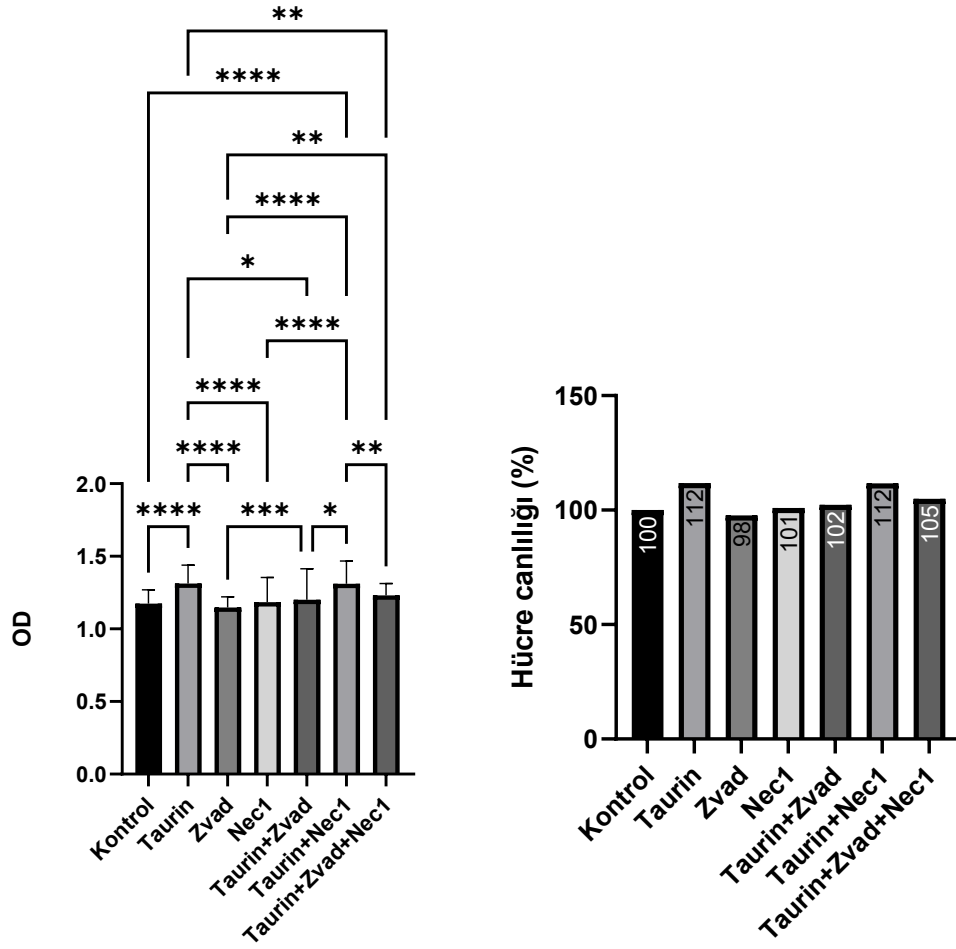
Kruskal Wallis Tek Yönlü ANOVA Testi

OA'li kondrositlerde uygulama gruplarındaki hücre canlılıkları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılıklar saptanmıştır (**Tablo 4.11.** ve **Şekil 4.7**, ($p<0,001$).

Tablo 4.11. OA'li kondrositlerde uygulama grupları hücre canlılığı çoklu karşılaştırmalara ilişkin anlamlılık değerleri

	Kontrol	Taurin	ZVAD	Nec1	Taurin+ZVAD	Taurin+Nec1	Taurin+ZVAD+Nec1
Kontrol	1	<0,001	1,000	1,000	0,057	<0,001	0,405
Taurin		1	<0,001	<0,001	0,016	1,000	0,001
ZVAD			1	0,121	<0,001	<0,001	0,006
Nec1				1	1,000	<0,001	1,000
Taurin+ZVAD					1	0,026	1,000
Taurin+Nec1						1	0,002
Taurin+ZVAD+Nec1							1

Anlamlılık değerleri çoklu testler için Bonferroni düzeltmesi ile ayarlanmıştır.



Şekil 4.7. OA'lı kondrositlerde hücre canlılığı değerlerinin karşılaştırılması ($p<0,05^*$; $p<0,01^{**}$; $p<0,001^{***}$; $p<0,0001^{****}$)

OA'lı kondrosit kontrol grubunun hücre canlılığı, Taurin ve Taurin+Nec1 gruplarından anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0,001$). Taurin, tek başına veya Nec1 ile uygulandığında, hücre canlılığını artırıcı bir etkiye sahiptir. Bu bulgular nekroptozun OA'lı kondrositlerin ölümünde etkili olduğunu belirten çalışmalar ile uyumludur.

25mM 24 saat Taurin (T) uygulamasının hücre canlılığı; Z, N, T+Z ve T+Z+N gruplarından anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Taurin, tek başına uygulandığında, diğer gruplara kıyasla hücre canlılığını en fazla artıran uygulama olarak görülmektedir.

20 μ 2 saat Z-VAD-FMK uygulamasının hücre canlılığı, T+Z, T+N ve T+Z+N gruplarından anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Nec1 ve T+Z gruplarının hücre canlılığı,

T+N grubundan anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Bu bulgu nekroptozun baskılanması ile taurin uygulamasının tek başına nekroptoz baskılanmasından daha etkili olduğunu göstermektedir. Taurin+Nec1 grubunun hücre canlılığı, Taurin+ZVAD+Nec1 grubundan anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p=0,002). ZVAD'ın Taurin+Nec1 kombinasyonuna eklenmesi, hücre canlılığını azaltmıştır.

Taurin, bu çalışmada hücre canlılığını artıran en etkili madde olarak öne çıkmaktadır. Hem tek başına hem de Nec1 ile kombinasyon halinde hücre canlılığını anlamlı düzeyde artırmıştır. Buna ek olarak tek başına ZVAD-FMK ve tek başına Nec1 uygulamaları kontrole göre anlamlı bir azalış göstermezken taurin ile kullanıldığında OA'li kondrositlerin hücre canlılığı kontrole göre T+Z uygulamasında arttığı T+N uygulamasında ise anlamlı olarak arttığı görülmektedir.

4.3 Ters Transkripsiyonlu Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR(RT-qPCR) Bulguları

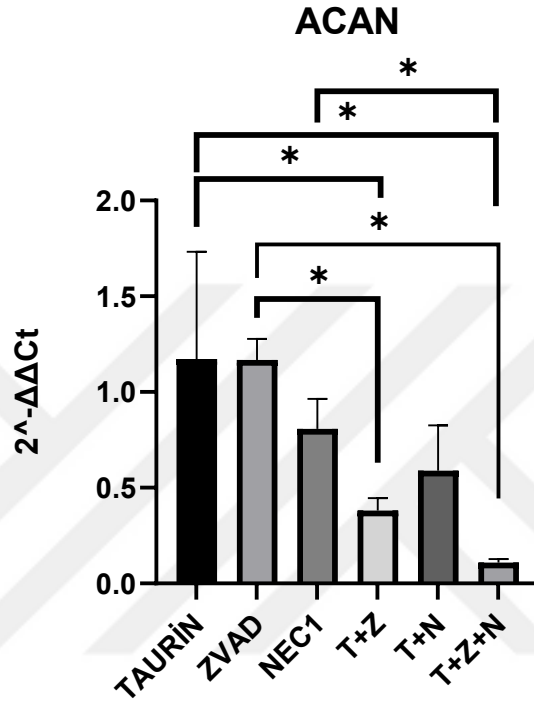
Bu tez çalışmasında taurinin osteoartrit patogenezi üzerindeki etkisini ve bunun otofaji/apoptoz/nekroptoz ile ilişkisini göstermek amacıyla oluşturulan deney gruplarında otofaji belirteci Beclin1 ve p62 (SQSTM1, Sequestosome-1), nekroptoz belirteci Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3 (RIP3), apoptoz belirteci Bcl-2-associated X protein (Bax) ve B-cell leukemia/lymphoma 2 protein (Bcl-2) ve kondrosit yapısal geni aggrecanın ifadenmelerine bakılmıştır. Referans gen olarak aktin β kullanılarak gen ifadenmelerindeki kat artış değişiklikleri incelenmiştir.

Tablo 4.12. Sağlıklı kondrositlerde ACAN gen ifadenmesi ortalama ve medyan değerlerin karşılaştırılması

		ACAN		p
		Ort. $\pm$ s.s.	Medyan (Min.-Mak.)	
Grup	Taurin	1,17 $\pm$,56	0,91 (0,79-1,82)	0,013
	ZVAD	1,17 $\pm$,11	1,14 (1,07-1,29)	
	Nec1	0,81 $\pm$,16	0,74 (0,69-0,99)	
	T+Z	0,38 $\pm$,07	0,37 (0,32-0,45)	
	T+N	0,59 $\pm$,24	0,7 (0,32-0,75)	
	T+Z+N	0,11 $\pm$,02	0,12 (0,09-0,12)	

Sağlıklı kondrositlerde ACAN ifadenme düzeyi gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık döstermiştir (p=0,013). Taurin ve Zvad gruplarının ölçüm düzeyi T+Z, T+Z+N gruplarından anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p<0,05). Benzer olarak NEC1'de ki

ifadelenme düzeyi T+Z+N grubundan anlamlı düzeyde yüksektir (Tablo 4.12, Şekil 4.8.). Sağlıklı kondrositlerde hücre ölüm yolları inhibisyonu yanında taurin uygulamasının kondrosit yapısal özelliğini bozduğu düşünülmektedir.

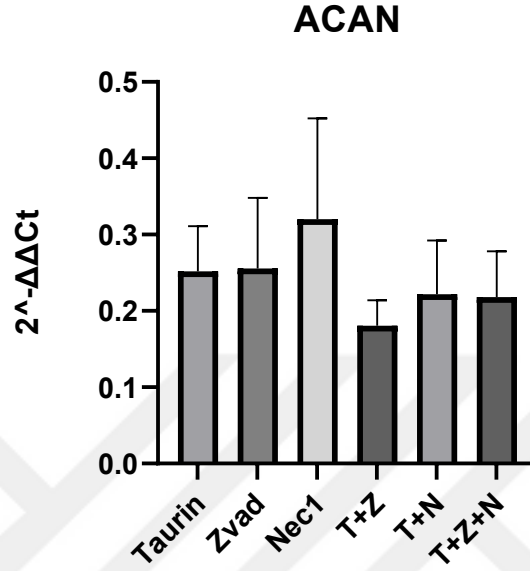


Şekil 4.8. Sağlıklı kondrositlerde ACAN gen ifadelenmesi qRT-PCR kat artışı

Tablo 4.13. OA'li kondrositlerde ACAN gen ifadelenmesi ortalama ve medyan değerlerin karşılaştırılması

		ACAN	
		Ort. ± s.s.	Medyan (Min.-Mak.)
Grup	Taurin	,252±,059	,223 (,213-,320)
	ZVAD-FMK	,256±,092	,234 (,176-,357)
	Nec1	,320±,132	,366 (,171-,423)
	T+Z	,181±,033	,176 (,150-,216)
	T+N	,222±,070	,224 (,151-,291)
	T+Z+N	,218±,060	,211 (,163-,281)

OA'li kondrositlerde ACAN ifadenme düzeyinin gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur. ($p=0,494$) (Tablo 4.13, Şekil 4.9.).



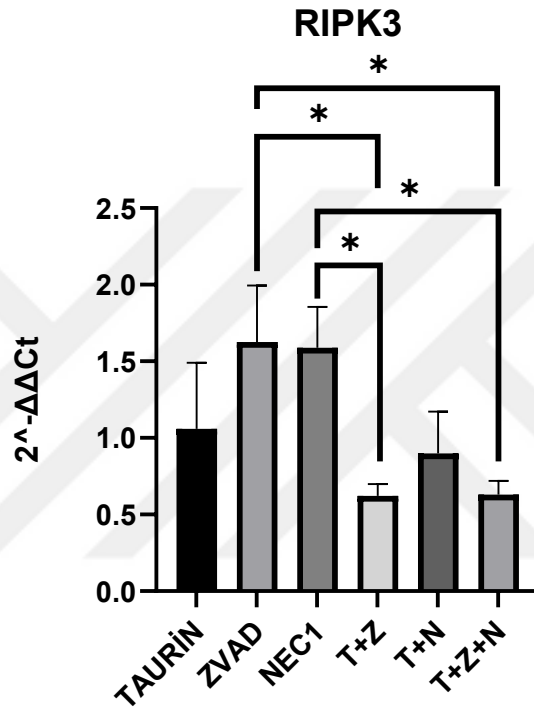
Şekil 4.9. OA'li kondrositlerde ACAN gen ifadenmesi qRT-PCR kat artışı

Ancak, nekropitozun inhibe edildiği OA'li kondrositlerde (Nec1 ve T+N) aggregan ifadenmesi diğer uygulama gruplarına göre daha yüksek bulunmuştur. Bunun nedeninin Nec1'in Adams5 ifadenmesini durdurması olduğu düşünülmektedir. Adams5 baskılanması aggregan degradasyonunu azaltacağından Nec1 uygulanan gruplarda aggregan ifadenmesi yüksek bulunmuştur.

Tablo 4.14. Sağlıklı kondrositlerde RIPK3 gen ifadenmesi ortalama ve medyan değerlerin karşılaştırılması

		RIPK3		p
		Ort. ± s.s.	Medyan (Min.-Mak.)	
Grup	Taurin	1,06±,43	0,81 (0,81-1,56)	0,023
	ZVAD	1,63±,37	1,8 (1,2-1,87)	
	Nec1	1,59±,27	1,58 (1,33-1,86)	
	T+Z	0,62±,08	0,63 (0,54-0,69)	
	T+N	0,9±,27	0,93 (0,61-1,16)	
	T+Z+N	0,63±,09	0,68 (0,52-0,69)	

Sağlıklı kondrositlerde RIPK3 ifadenme düzeyi gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermiştir ($p=0,023$). ZVAD ve NEC1 gruplarında RIPK3 ifadenme düzeyi T+Z, T+Z+N gruplarından anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 4.14, Şekil 4.10.).

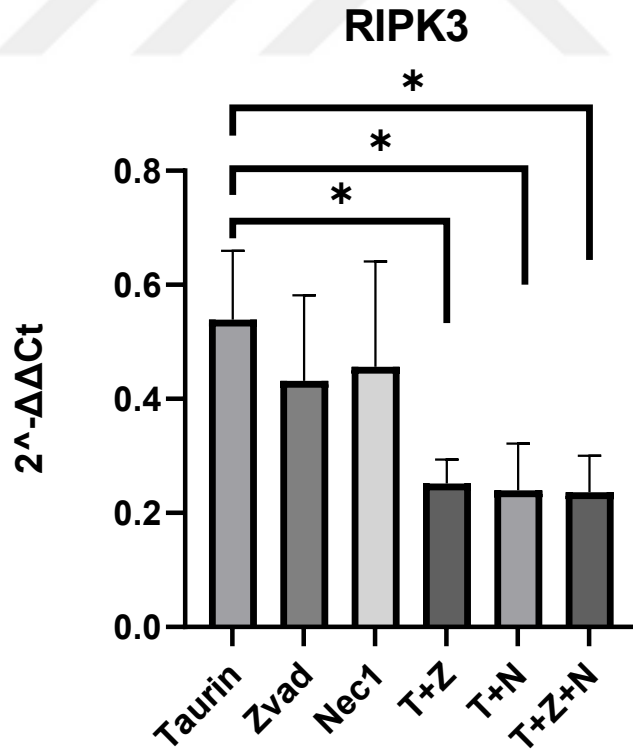


Şekil 4.10. Sağlıklı kondrositlerde RIPK3 gen ifadenmesi qRT-PCR analizi kat artışı ($p<0,05^*$)

Tablo 4.15. OA'li kondrositlerde RIPK3 gen ifadenmesi ortalama ve medyan değerlerin karşılaştırılması

		RIPK3		p
		Ort. $\pm$ s.s.	Medyan (Min.-Mak.)	
Grup	Taurin	,539 $\pm$,121	,493 (,448-,676)	0,018
	ZVAD	,432 $\pm$,150	,367 (,325-,603)	
	Nec1	,456 $\pm$,185	,514 (,249-,605)	
	T+Z	,252 $\pm$,042	,241 (,217-,298)	
	T+N	,240 $\pm$,082	,223 (,167-,329)	
	T+Z+N	,236 $\pm$,064	,226 (,178-,305)	

OA'lı kondrositlerde RIPK3 ifadenme düzeyi taurin grubunda, T+Z, T+N ve T+Z+N gruplarına göre anlamlı düzeyde yüksektir ($p<0,05$) (Tablo 4.15, Şekil 4.11.). RIPK3, nekroptoz sürecinin temel düzenleyicilerinden biridir ve hücre ölümünün tipi ile inflamatuvar yanıtların belirlenmesinde kritik bir rol oynar. Buna ek olarak apoptoz nekroptoz arası konuşmada önemli rolü bulunmaktadır. Özellikle, kaspaz-8 enzimi aktif olduğunda, RIPK1 ve RIPK3'ü inhibe ederek nekroptozu engeller ve hücreyi apoptoza yönlendirir. Kaspaz-8'in inhibe edildiği veya eksik olduğu durumlarda ise (Z-VD-FMK uygulaması), RIPK3 aracılığıyla nekroptozis indüklendiği bilinmektedir. RIPK3 gen ifadenme düzeyi en yüksek taurin uygulanan grupta görülmektedir. Bu da taurinin tek başına RIPK3 inhibisyonunda etkili olmadığına işaret eder. Ancak T+Z, T+N ve T+Z+N gruplarındaki RIPK3 ifadenmesinde görülen azalma taurinin hücre ölüm inhibitörlerinin etkisini arttırıcı yönde hareket ettiğini göstermektedir.

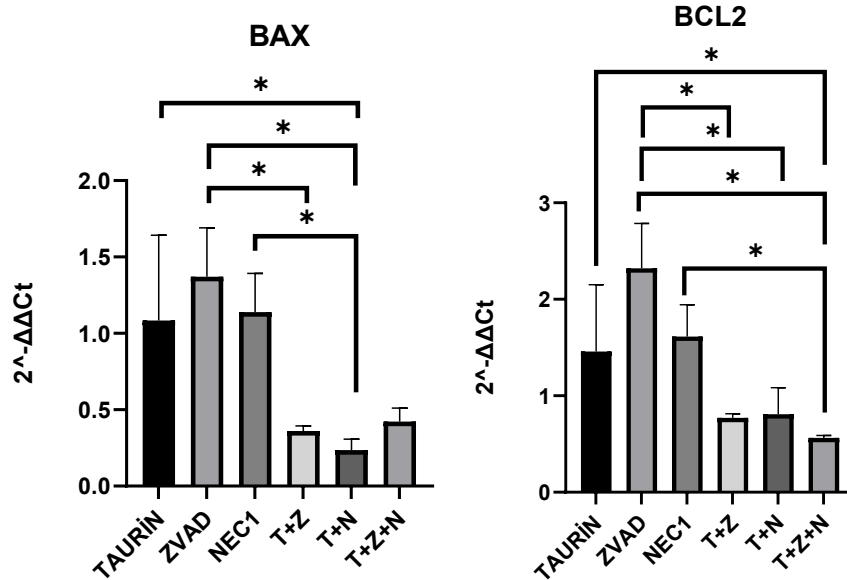


Şekil 4.11. OA'lı kondrositlerde RIPK3 gen ifadenmesi qRT-PCR analizi kat artışı ($p<0,05^*$)

Tablo 4.16. Sağlıklı kondrositlerde BAX ve BCL2 gen ifadenmeleri ortalama ve medyan değeri karşılaştırılması

	BAX		BCL2	
	Ort. $\pm$ s.s.	Medyan (Min.-Mak.)	Ort. $\pm$ s.s.	Medyan (Min.-Mak.)
Taurin	1,08 $\pm$,56	0,76 (0,76-1,73)	1,46 $\pm$,69	1,16 (0,97-2,25)
ZVAD	1,37 $\pm$,32	1,48 (1,01-1,62)	2,32 $\pm$,47	2,58 (1,78-2,6)
Nec1	1,14 $\pm$,25	1,03 (0,96-1,43)	1,61 $\pm$,33	1,76 (1,24-1,85)
T+Z	0,36 $\pm$,03	0,37 (0,33-0,39)	0,77 $\pm$,04	0,77 (0,73-0,82)
T+N	0,24 $\pm$,07	0,25 (0,16-0,3)	0,81 $\pm$,28	0,88 (0,5-1,04)
T+Z+N	0,42 $\pm$,09	0,41 (0,34-0,51)	0,56 $\pm$,02	0,56 (0,55-0,59)
p	0,012		0,016	

Sağlıklı kondrositlerde BAX ve BCL2 ifadenme düzeyleri gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık döstermiştir ($p=0,012$; $p=0,016$). BAX'ın Taurin, ZVAD ve NEC1 uygulamalarında ifadenme düzeyi T+N grubundan anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Benzer olarak ZVAD ifadenme düzeyi T+Z grubundan anlamlı düzeyde yüksektir. BCL2'nin Taurin, ZVAD ve NEC1 uygulamalarındaki ifadenme düzeyi T+Z+N grubundan anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Ek olarak ZVAD grubu T+Z ve T+N gruplarından da yüksek bulunmuştur (Tablo 4.16, Şekil 4.12).

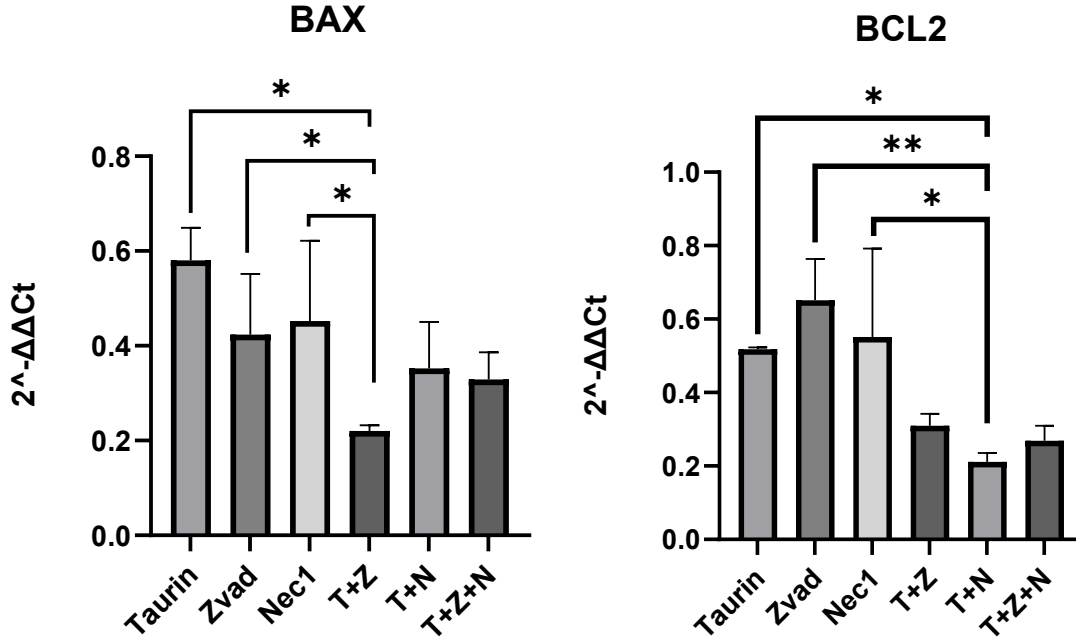


Şekil 4.12. Sağlıklı kondrositlerde BAX ve BCL2 gen ifadenmesi qRT-PCR analizi kat artışı ($p<0,05^*$; $p<0,01^{**}$)

BAX ve BCL2 apoptoz sürecinde kritik rol oynayan proteinlerdir. BAX pro-apoptotik bir protein olup, mitokondriyel dış membranın geçirgenliğini artırarak sitokrom c salınımına ve hücre ölümü kaskadının başlatılmasına neden olur. Öte yandan, BCL2 anti-apoptotik bir proteindir ve BAX'ın etkisini inhibe ederek hücreyi apoptotik uyarılara karşı korur. Proapoptotik Bax ve antiapoptotik Bcl2 genleri ifadenleme düzeyleri uygulama yapılan gruplarda incelenmiştir (**Tablo 4.17**, **Şekil 4.13**). Bax ifadenmesi beklenildiği üzere Z, T+Z ve T+Z+N gruplarında taurin uygulamasına göre anlamlı olarak düşüş göstermektedir. Ancak buradaki önemli bulgu Bax ifadenmesi T+Z grubunda Z, T+N ve T+Z+N gruplarına göre anlamlı derecede daha az bulunmasıdır. Bcl2 ifadenmesi beklenildiği üzere en yüksek Z grubunda gösterilmiştir. Bununla birlikte T+Z, T+N ve özellikle T+Z+N uygulamalarında BCL2 ifadenmesi en alt seviyededir.

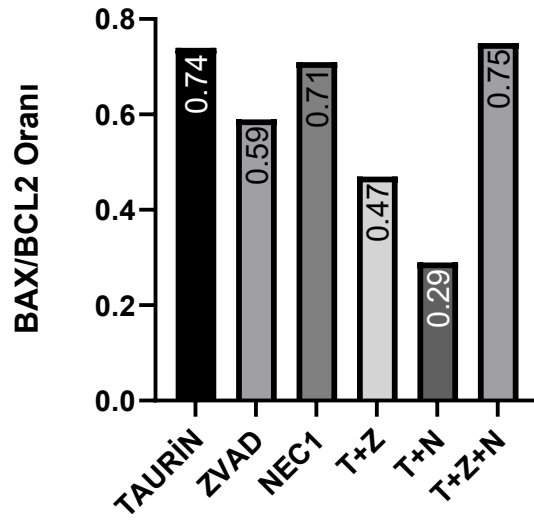
Tablo 4.17. OA'li kondrositlerde BAX ve BCL2 gen ifadenmesi ortalama ve medyan değerlerin karşılaştırılması

	BAX		BCL2	
	Ort. $\pm$ s.s.	Medyan (Min.-Mak.)	Ort. $\pm$ s.s.	Medyan (Min.-Mak.)
Taurin	,580 $\pm$,069	,543 (,538-,660)	,518 $\pm$,005	,518 (,514-,523)
ZVAD	,424 $\pm$,128	,363 (,337-,570)	,652 $\pm$,112	,618 (,561-,776)
Nec1	,452 $\pm$,170	,543 (,256-,557)	,552 $\pm$,240	,561 (,307-,787)
T+Z	,221 $\pm$,011	,218 (,211-,233)	,310 $\pm$,033	,309 (,277-,343)
T+N	,352 $\pm$,098	,318 (,276-,463)	,212 $\pm$,024	,204 (,192-,238)
T+Z+N	,329 $\pm$,057	,344 (,266-,378)	,269 $\pm$,040	,251 (,241-,315)
p	0,019		0,017	

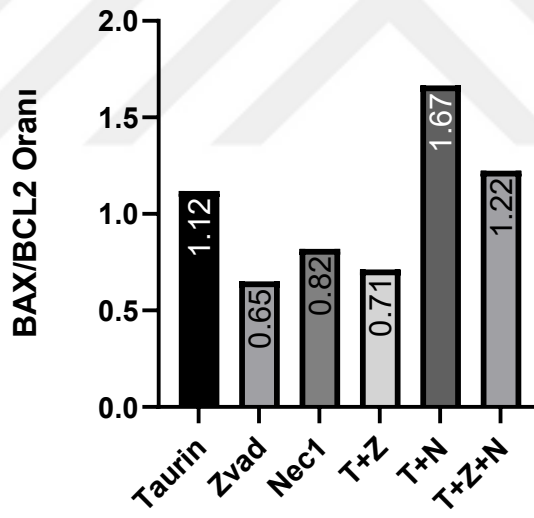


Şekil 4.13. OA'lı kondrositlerde BAX ve BCL2 gen ifadenmesi qRT-PCR analizi kat artışı ($p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$)

BAX/BCL2 oranı apoptozun belirteci olarak kullanılan önemli bir biyobelirteçtir. OA patogeneğinde artmış Bax/Bcl2 oranı kondrositlerin apoptoz seviyesinin arttığını göstermektedir. Bax/Bcl2 oranının en yüksek seviyesinin T+N ve ikinci yüksek seviyenin T+Z+N grubunda görmekteyiz. Bu bulgudan yola çıkarak nekroptozun inhibe edildiği koşullarda taurinin hücrenin bulunduğu koşullara apoptoz ile cevap vermesini desteklediğini söyleyebiliriz. (Şekil 4.14., Şekil 4.15.)



Şekil 4.14. Sağlıklı kondrositlerde Bax/Bcl2 ifadenme oranları

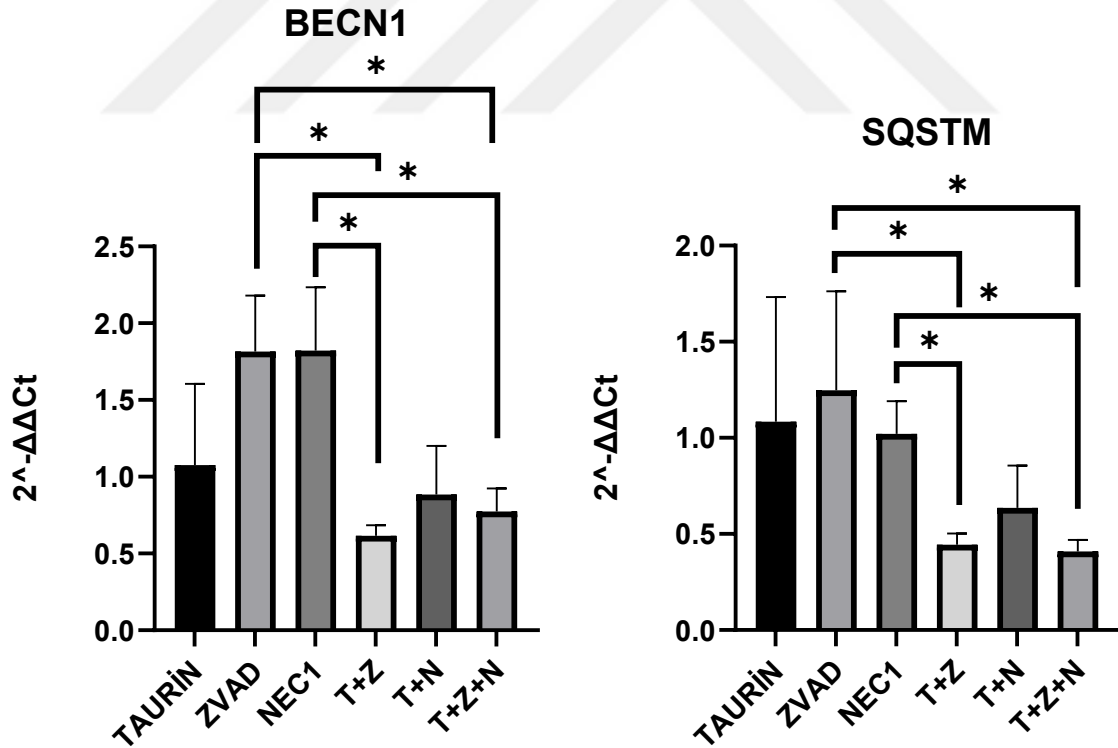


Şekil 4.15. OA'li kondrositlerde Bax/Bcl2 ifadenme oranları

Tablo 4.18. Sağlıklı kondrositlerde BECN1 ve SQSTM1 gen ifadenmeleri ortalama ve medyan değerlerin karşılaştırılması

	BECN1		SQSTM1	
	Ort. $\pm$ s.s.	Medyan (Min.-Mak.)	Ort. $\pm$ s.s.	Medyan (Min.-Mak.)
Taurin	1,08 $\pm$,53	0,79 (0,76-1,69)	1,08 $\pm$,65	0,79 (0,64-1,83)
ZVAD	1,81 $\pm$,37	1,95 (1,4-2,09)	1,25 $\pm$,52	1,07 (0,84-1,83)
Nec1	1,82 $\pm$,41	1,61 (1,55-2,3)	1,02 $\pm$,17	0,97 (0,88-1,21)
T+Z	0,61 $\pm$,07	0,58 (0,57-0,69)	0,44 $\pm$,06	0,43 (0,4-0,51)
T+N	0,88 $\pm$,32	0,93 (0,55-1,17)	0,64 $\pm$,22	0,74 (0,38-0,78)
T+Z+N	0,77 $\pm$,15	0,78 (0,62-0,92)	0,41 $\pm$,06	0,43 (0,34-0,46)
p	0,039		0,028	

Sağlıklı kondrositlerde BECN1 ve SQSTM1 ifadenme düzeyleri gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık döstermiştir (p=0,039; p=0,028). ZVAD ve NEC1 gruplarında BECN1 ifadenmesi T+Z, T+Z+N gruplarından anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p<0,05). Benzer olarak SQSTM1'in ZVAD ve NEC1 gruplarında ifadenmesi T+Z, T+Z+N gruplarından anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (Tablo 4.18, Şekil 4.16).



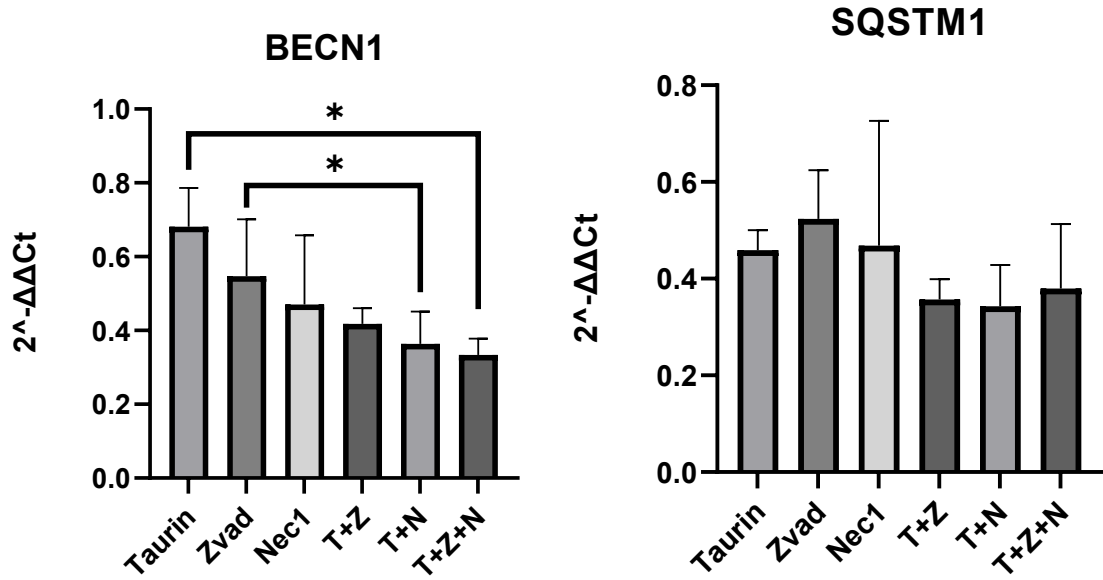
Şekil 4.16. Sağlıklı kondrositlerde BECN1 ve SQSTM1 gen ifadenmesi qRT-PCR analizi kat artışı (p<0,05*)

Tablo 4.19. OA'lı kondrositlerde BECN1 ve SQSTM1 gen ifadenmesi ortalama ve medyan değerlerin karşılaştırılması

	BECN1		SQSTM1	
	Ort. $\pm$ s.s.	Medyan (Min.-Mak.)	Ort. $\pm$ s.s.	Medyan (Min.-Mak.)
Taurin	,681 $\pm$,105	,660 (,588-,796)	,459 $\pm$,041	,437 (,434-,507)
ZVAD	,547 $\pm$,154	,468 (,448-,724)	,524 $\pm$,100	,549 (,413-,609)
Nec1	,470 $\pm$,187	,568 (,254-,588)	,469 $\pm$,258	,457 (,217-,732)
T+Z	,418 $\pm$,043	,401 (,386-,467)	,357 $\pm$,042	,354 (,316-,401)
T+N	,364 $\pm$,088	,342 (,289-,460)	,343 $\pm$,086	,338 (,260-,431)
T+Z+N	,334 $\pm$,044	,316 (,300-,384)	,380 $\pm$,133	,378 (,248-,514)
p	0,021		0,067	

BECN1 (Beclin-1) otofajinin indüklenmesinde önemli bir rol oynarken, SQSTM1 (p62) otofaji ile yıkılan bir protein olup otofaji aktivitesinin bir göstergesi olarak kabul edilir. qRT-PCR ile uygulama yapılan gruplarda bu iki genin ifadenmesi seviyeleri incelendi. BECN1'in ifadenmesi Taurin grubunda, T+N ve T+Z+N gruplarına göre anlamlı düzeyde düşüktür ($p=0,038$, $p=0,019$). Hücre ölümlerinin inhibe edildiği gruplarda BECN1'in ifadenmesi seviyelerinin (T+Z: 0,418, T+N: 0,364, T+Z+N: 0,334), özellikle T+Z+N grubunda en düşük seviyede olup, bu kombinasyonun otofaji aktivitesini önemli ölçüde azalttığını düşündürmektedir.

T+Z, T+N ve T+Z+N uygulamalarında SQSTM1 (p62) düzeyleri tek başına yapılan uygulamalardan daha düşüktür (T+Z: 0,357, T+N: 0,343, T+Z+N: 0,380). p62 seviyesinin düşük olması genellikle otofajinin aktif çalıştığını gösterir. Ancak burada hem Beclin-1 hem de p62 azalmış durumda, bu da otofajinin hem başlatılmasında hem de ilerleyişinde bir azalma olduğunu gösterebilir. ZVAD ve Nec-1 otofaji sürecini değiştirmiş olabilir, ancak baskılanmanın en belirgin olduğu kombinasyon gruplarında otofaji daha fazla inhibe olmuş gibi görünmektedir (**Tablo 4.19**, **Şekil 4.17**).



Şekil 4.17. OA'lı kondrositlerde BECN1 ve SQSTM1 gen ifadenmesi qRT-PCR analizi kat artışı artışı (p<0,05*)

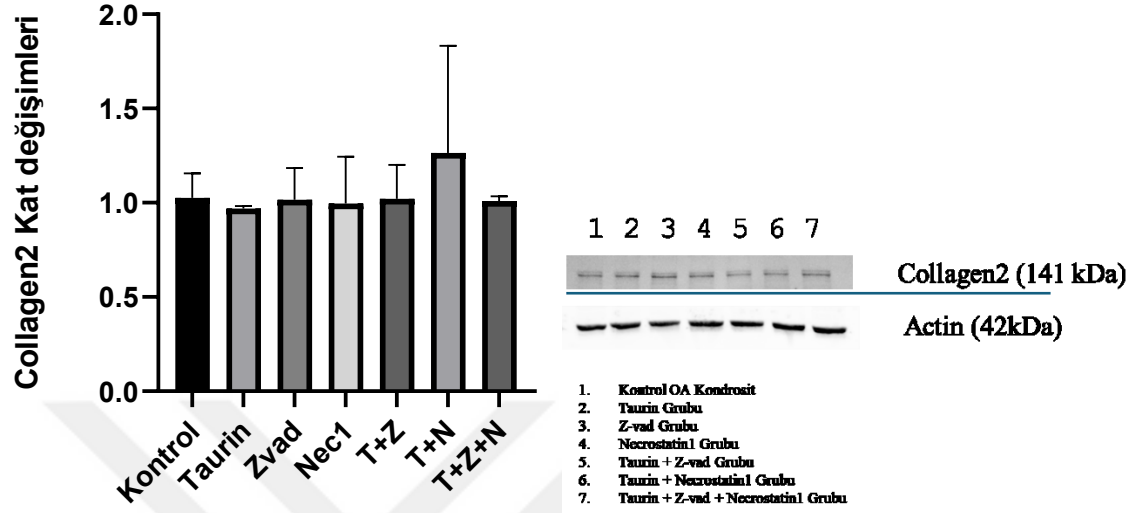
4.4 Western Blot Analizi Bulguları

Bu tez çalışmasında taurinin osteoartrit patogenezi üzerindeki etkisini ve bunun otofaji/apoptoz/nektrotoz ile ilişkisini göstermek amacıyla oluşturulan deney gruplarında kondrosit belirteci Col2A1, otofaji ile ilişkili proteinler olan LC3I/II, p62 ve Beclin 1 ile apoptoz ile ilişkili Kaspaz 3 ve Parp1 protein ifadenme düzeylerindeki değişimler Western Blot yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

Tablo 4.20. OA'lı kondrositlerde Col2A1 protein düzeylerinin karşılaştırılması

		Col2A1		p
		Ort. ± s.s.	Medyan (Min.-Mak.)	
Grup	Kontrol	1,025±,130	1,025 (,895-1,156)	0,914
	Taurin	,969±,014	,969 (,955-,983)	
	ZVAD	1,015±,168	1,015 (,847-1,184)	
	Nec1	,995±,248	,995 (,747-1,243)	
	T+Z	1,020±,181	1,020 (,839-1,201)	
	T+N	1,264±,568	1,264 (,697-1,832)	
	T+Z+N	1,009±,025	1,009 (,984-1,035)	

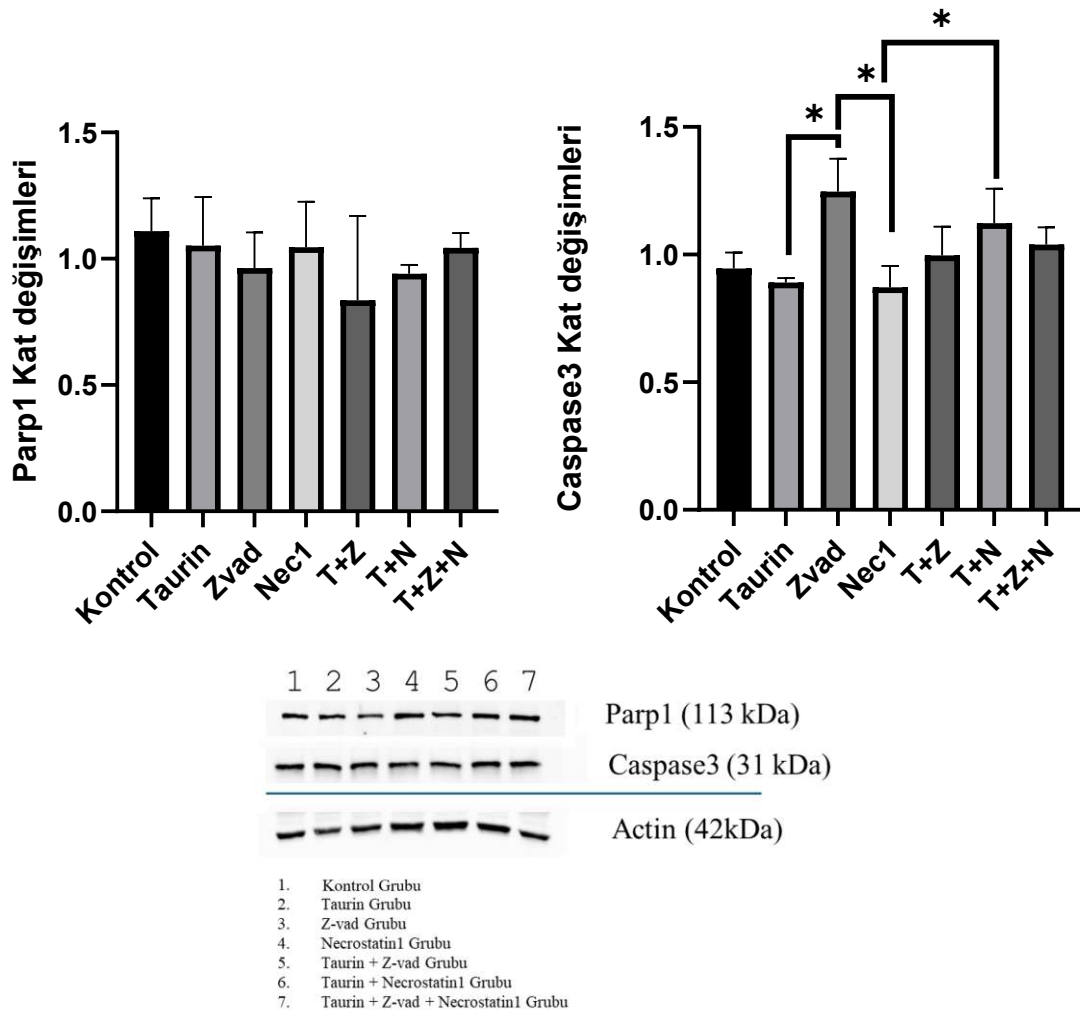
OA'lı kondrositlerde uygulama yapılan gruplarda COL2A1 ifadenme seviyesi arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark göstermemektedir. (Tablo 4.20, Şekil 4.18).



Şekil 4.18. OA'lı kondrositlerde Col2A1 Western Blot analizi

Tablo 4.21. Sağlıklı kondrositlerde PARP1, Kaspaz 3 protein düzeylerinin karşılaştırılması

	Parp1		Kaspaz 3	
	Ort. ± s.s.	Medyan (Min.-Mak.)	Ort. ± s.s.	Medyan (Min.-Mak.)
Kontrol	1,11±,13	1,11 (0,98-1,24)	0,95±,06	0,95 (0,88-1,01)
Taurin	1,05±,19	1,05 (0,86-1,24)	0,89±,02	0,89 (0,87-0,91)
ZVAD	0,96±,14	0,96 (0,82-1,1)	1,25±,13	1,25 (1,12-1,38)
Nec1	1,05±,18	1,05 (0,87-1,23)	0,87±,08	0,87 (0,79-0,96)
T+Z	0,84±,33	0,84 (0,5-1,17)	1±,11	1 (0,88-1,11)
T+N	0,94±,04	0,94 (0,9-0,98)	1,12±,14	1,12 (0,99-1,26)
T+Z+N	1,04±,06	1,04 (0,98-1,1)	1,04±,07	1,04 (0,97-1,11)
p	0,559		0,027	



Şekil 4.19. Sağlıklı kondrositlerde PARP1 ve Kaspaz 3 Western Blot analizi

Sağlıklı kondrositlerde uygulama yapılan gruplar arasında PARP1 ifadenme seviyesi istatistiksel açıdan anlamlı bir fark göstermemektedir ($p=0,559$). Sağlıklı kondrositlerde uygulama yapılan gruplar arasında Caspase3 ifadenme seviyeleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0,027$). Zvad grubunda Caspase3 ifadenme seviyesi ölçümü Taurin ve Nec1 gruplarına göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. T+N grubunda Caspase3 ifadenme seviyesi ölçümü Nec1 ölçümüne göre yüksek bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 4.21., Şekil 4.19.).

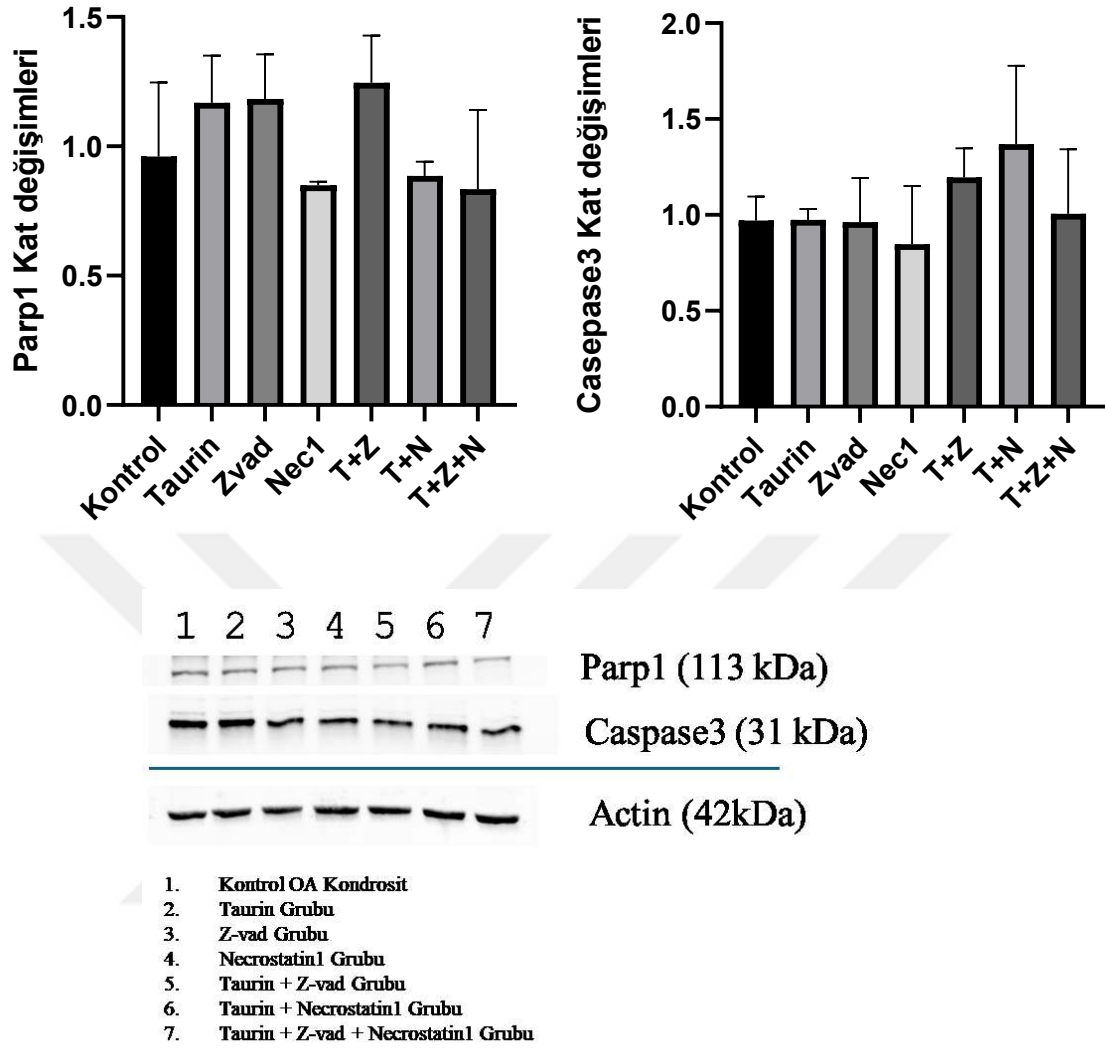
Tablo 4.22. OA’li kondrositlerde PARP1, Kaspaz 3 protein düzeylerinin karşılaştırılması

	Parp1		Kaspaz 3	
	Ort. $\pm$ s.s.	Medyan (Min.-Mak.)	Ort. $\pm$ s.s.	Medyan (Min.-Mak.)
Kontrol	,96 $\pm$,29	,96 (,67-1,25)	,970 $\pm$,125	1,013 (,829-1,069)
Taurin	1,17 $\pm$,18	1,17 (,99-1,35)	,974 $\pm$,057	1,003 (,909-1,011)
ZVAD	1,18 $\pm$,17	1,18 (1,01-1,36)	,962 $\pm$,231	1,007 (,712-1,167)
Nec1	,85 $\pm$,01	,85 (,84-,86)	,847 $\pm$,304	,697 (,646-1,197)
T+Z	1,25 $\pm$,18	1,25 (1,06-1,43)	1,196 $\pm$,151	1,186 (1,051-1,352)
T+N	,89 $\pm$,05	,89 (,83-,94)	1,369 $\pm$,408	1,228 (1,050-1,829)
T+Z+N	,83 $\pm$,31	,84 (,53-1,14)	1,007 $\pm$,336	,944 (,706-1,369)
p	0,082		0,295	

OA’de kondrositlerin dejenerasyonu ve kırıkta yıkımıyla ilişkili olduğu gösterilmiş olan PARP1, DNA hasar onarımında kritik bir enzimdir ve hücre stresi, inflamasyon ve apoptoz, parthanatos gibi farklı hücre ölümü mekanizmalarıyla bağlantılıdır. Caspase-3’ün aktif olduğu durumlarda, PARP1’i keser ve hücrede apoptoz yönünde ilerleyen bir ölüm devreye girer.

OA’li kondrositlerde uygulama yapılan gruplar arasında PARP1 ifadenme seviyesi istatistiksel açıdan anlamlı bir fark göstermemektedir ($p=0,082$). Ancak PARP1’in N, T+N ve T+Z+N ifadenme değerleri diğer uygulama gruplarına göre düşük gözlenmiştir. Apoptozun baskılandığı uygulamalarda PARP1 seviyesinin diğer gruplara göre daha yüksek çıkması ZVD-FMK’nın bir kaspaz inhibitörü olması ve Caspase3’ü inhibe etmesinden dolayı kaynaklandığı düşünülmektedir. Buna ek olarak PARP1’in parthanatos gibi rol aldığı diğer ölüm yolları ile ilişkili rolü de bir diğer faktör olabilir.

OA’li kondrositlerde uygulama yapılan gruplar arasında Caspase3 ifadenme seviyesi istatistiksel açıdan anlamlı bir fark göstermemektedir (**Tablo 4.22.**, **Şekil 4.20.**). N grubunda en düşük değerdeyken T+N grubunda en yüksek değere ulaşması ortamda bulunan taurinin hücreyi apoptoz yönünde ilerlettiği tahmin edilmektedir.

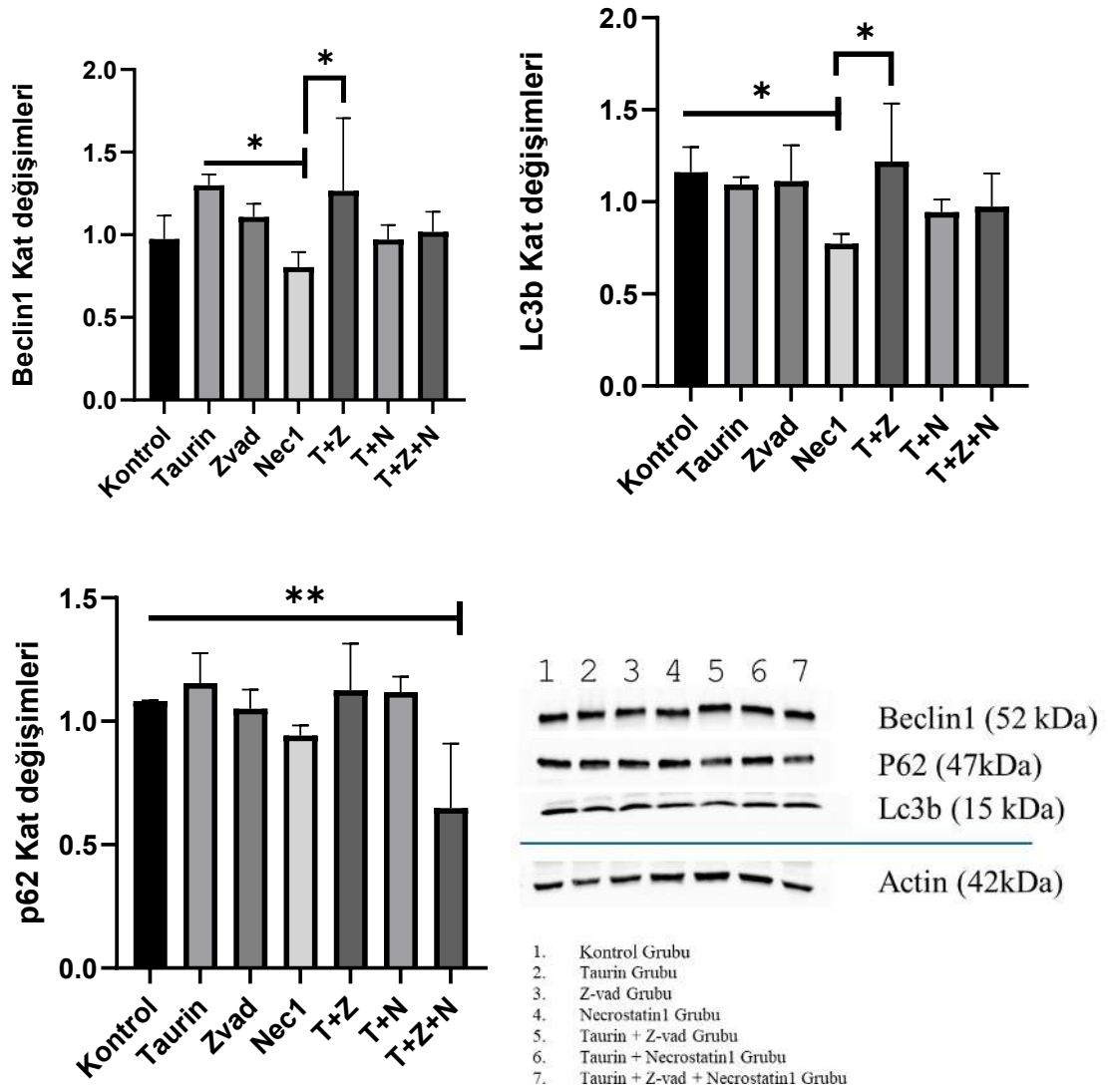


Şekil 4.20. OA'li kondrositlerde PARP1 ve Kaspaz 3 Western Blot analizi

Tablo 4.23. Sağlıklı kondrositlerde Beclin1, Lc3b, p62 protein düzeylerinin karşılaştırılması

	Beclin1		Lc3b		p62	
	Ort. $\pm$ s.s.	Medyan (Min.-Mak.)	Ort. $\pm$ s.s.	Medyan (Min.-Mak.)	Ort. $\pm$ s.s.	Medyan (Min.-Mak.)
Kontrol	0,97 $\pm$,14	0,97 (0,83-1,12)	1,16 $\pm$,14	1,16 (1,02-1,3)	1,08 $\pm$,00	1,08 (1,08-1,08)
Taurin	1,3 $\pm$,07	1,3 (1,23-1,37)	1,09 $\pm$,04	1,09 (1,05-1,13)	1,15 $\pm$,12	1,15 (1,03-1,28)
Zvad	1,11 $\pm$,08	1,11 (1,03-1,19)	1,11 $\pm$,19	1,11 (0,92-1,31)	1,05 $\pm$,08	1,05 (0,97-1,13)
Nec1	0,8 $\pm$,09	0,8 (0,71-0,9)	0,77 $\pm$,05	0,77 (0,72-0,83)	0,94 $\pm$,04	0,94 (0,9-0,98)
T+Z	1,27 $\pm$,44	1,27 (0,82-1,71)	1,22 $\pm$,31	1,22 (0,9-1,53)	1,13 $\pm$,19	1,13 (0,94-1,31)
T+N	0,97 $\pm$,09	0,97 (0,88-1,06)	0,94 $\pm$,07	0,94 (0,88-1,01)	1,12 $\pm$,06	1,12 (1,06-1,18)
T+Z+N	1,02 $\pm$,12	1,02 (0,9-1,14)	0,97 $\pm$,18	0,97 (0,8-1,15)	0,65 $\pm$,26	0,65 (0,39-0,91)
p	0,042		0,033		0,003	

Sağlıklı kondrositlerde uygulama yapılan gruplar arasında Beclin1, Lc3b ve p62 ifadenme seviyeleri istatistiksel açıdan anlamlı bir fark göstermektedir (sırasıyla p=0,041, p=0,033, p=0,003). Nec1 grubunda Beclin1 ifadenme seviyesi Taurin, Zvad ve T+Z gruplarına göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Benzer olarak Nec1 grubunda Lc3b ifadenme seviyesi kontrol, Taurin, Zvad ve T+Z gruplarına göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. T+Z+N grubunda p62 ifadenme seviyesi ölçümü diğer sağlıklı gruplara göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (Tablo 4.23., Şekil 4.21.).



Şekil 4.21. Sağlıklı kondrositlerde Beclin1, LC3B, p62 Western Blot analizi ($p<0,05^*$; $p<0,01^{**}$)

Tablo 4.24. OA’li kondrositlerde Beclin, Lc3b, p62 protein düzeylerinin karşılaştırılması

	Beclin		Lc3b		p62	
	Ort. $\pm$ s.s.	Medyan (Min.-Mak.)	Ort. $\pm$ s.s.	Medyan (Min.-Mak.)	Ort. $\pm$ s.s.	Medyan (Min.-Mak.)
Kontrol	1,075 $\pm$,050	1,075 (1,025-1,125)	1,00 $\pm$,18	1,00 (,83-1,18)	,92 $\pm$,18	,92 (,74-1,11)
Taurin	,970 $\pm$,064	,970 (,906-1,035)	,80 $\pm$,02	,80 (,78-,82)	1,11 $\pm$,06	1,11 (1,04-1,17)
ZVAD	,853 $\pm$,117	,853 (,736-,970)	,99 $\pm$,06	,99 (,92-1,05)	,86 $\pm$,00	,86 (,86-,87)
Nec1	,756 $\pm$,109	,756 (,647-,865)	,86 $\pm$,18	,86 (,68-1,05)	,99 $\pm$,05	,99 (,93-1,04)
T+Z	1,132 $\pm$,079	1,132 (1,054-1,211)	1,25 $\pm$,18	1,25 (1,07-1,43)	,97 $\pm$,32	,97 (,64-1,29)
T+N	1,480 $\pm$,475	1,480 (1,005-1,955)	1,04 $\pm$,09	1,04 (,95-1,13)	1,21 $\pm$,14	1,21 (1,07-1,34)
T+Z+N	1,043 $\pm$,163	1,043 (,880-1,207)	1,18 $\pm$,20	1,18 (,98-1,38)	,92 $\pm$,04	,92 (,88-,96)
p	0,027		0,049		0,084	

Tablo 4.25. Beclin 1 protein düzeylerinin gruplar arası çoklu karşılaştırmalara ilişkin anlamlılık değerleri

	Kontrol	Taurin	ZVAD	Nec1	Taurin+ ZVAD	Taurin+ Nec1	Taurin+ ZVAD+ Nec1
Kontrol	1	1,000	1,000	0,030	1,000	1,000	1,000
Taurin		1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
ZVAD			1	1,000	0,021	0,018	1,000
Nec1				1	0,007	0,006	1,000
Taurin+ZVAD					1	1,000	1,000
Taurin+Nec1						1	1,000
Taurin+ZVAD+Nec1							1

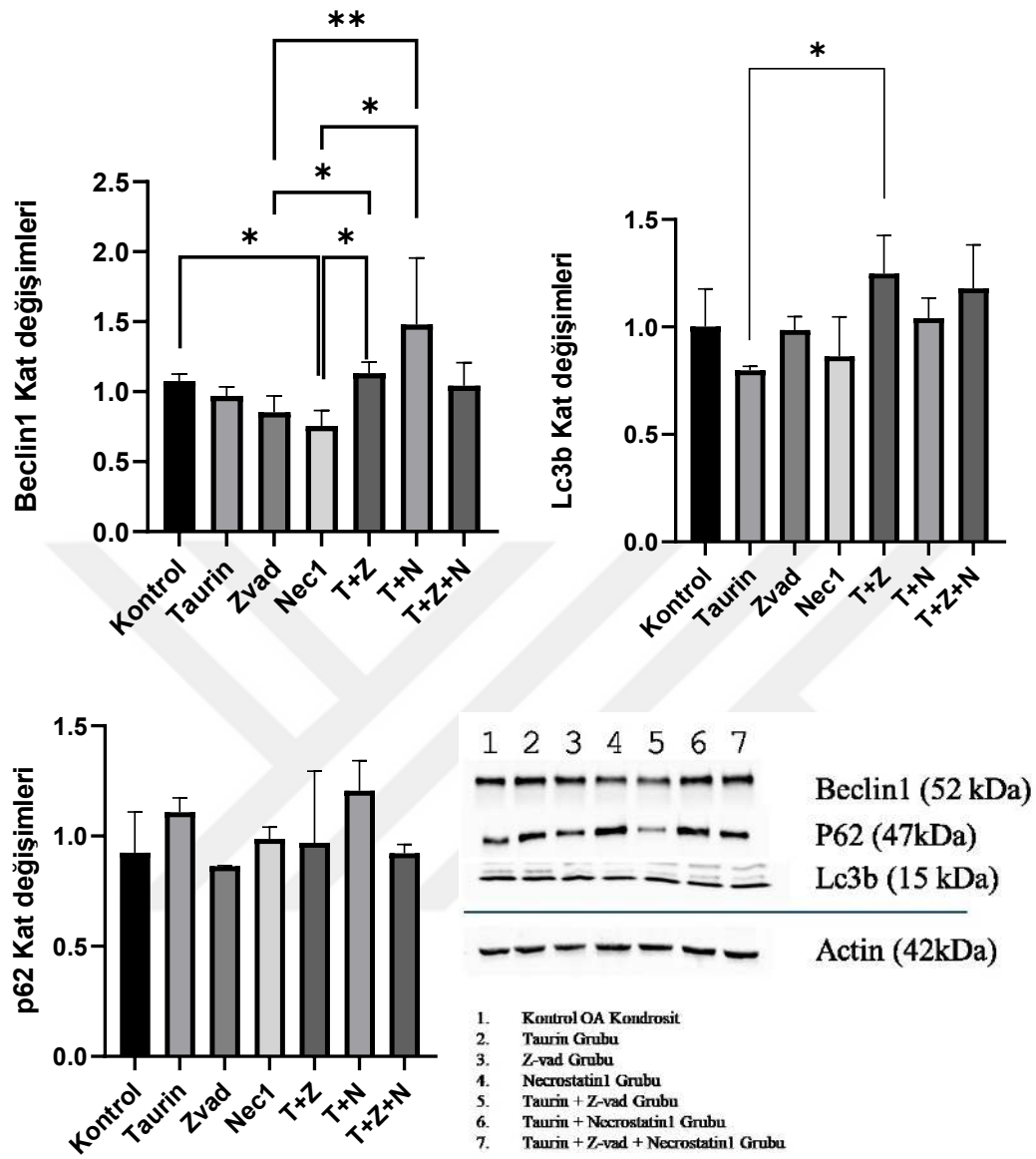
Anlamlılık değerleri çoklu testler için Bonferroni düzeltmesi ile ayarlanmıştır.

Bu tez çalışmasında OA’li kondrositlerde taurinin farklı ölüm inhibitörleri uygulamaları sonrasında otofaji mekanizması üzerindeki etkinliğini incelemek ana hedeflerden birisidir. Bu nedenle otofaji sürecini değerlendirmek için otofajinin başlatılmasında kritik bir protein olan Beclin1, otofaji veziküllerinin (otofozomların) oluşumunda rol oynayan ve otofajinin aktifliğini gösteren LC3II ve otofaji sırasında degradasyona uğrayan, azalması

otofajinin aktif olduğunu, artması ise otofaji yıkımının azaldığını gösteren p62 (SQSTM1) seçilmiştir

OA'lı kondrositlerde uygulama yapılan gruplar arasında Beclin1 ifadenme seviyesi en düşük değeri N uygulamasında elde edilirken en yüksek düzeyi T+N uygulamasında görülmüştür. Buna ek olarak kontrol, Z ve kontrol, N arasındaki azalma istatistiksel olarak anlamlıdır. Z uygulama grubunda Beclin1 ifadenme düzeyi, T+Z ve T+N uygulama gruplarına göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p=0,021$, $p=0,018$) (**Tablo 4.24, Tablo 25**).

OA'lı kondrositlerde Lc3b ifadenme seviyesinde istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p=0,049$). Taurin uygulanan grupta Lc3b ifadenme düzeyi, T+Z uygulama grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p=0,05$). p62 ifadenme düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p=0,084$). Ancak p62 Z uygulama grubu ifadenme düzeyi diğer gruplara göre düşük gözlenmiştir (**Tablo 4.25, Şekil 4.22**). Elde edilen bu bilgiler taurinin tek başına otofaji üzerinde bir etkisi olmadığını ancak apoptoz inhibe edildiğinde hücrelerin otofaji mekanizmasını daha aktif kullanma yönünde davrandığını düşündürmektedir. Benzer etki nekroptoz inhibisyonunda da söz konusu olmakla birlikte otofajinin son noktası olan kargonun degradasyon aşamasında bir inhibitör etkinin olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.22. OA'li kondrositlerde Beclin1, LC3B, p62 Western Blot analizi ($p<0,05^*$; $p<0,01^{**}$)

5. TARTIŞMA

Programlanmış hücre ölümü vücudun gelişiminde önemli bir rol oynar ve hastalıkların gelişmesini önlemek için homeostaziye korur. Apoptoz ve nekroptoz gibi hücre tarafından kontrollü bir şekilde yürütülen hücre ölümlerinin çok sayıda kronik hastalığın gelişimini düzenlediği gösterilmiştir (107). Osteoartrit (OA), aşama aşama ilerleyen, kronik dejeneratif bir hastalıktır. Birden fazla faktörün sebep olduğu OA yapısal hasar ve fonksiyonel bozukluklar sonucu olarak ortaya çıkar ve eklemlerin tüm kısımlarındaki yapılarında görülebilir (108). Farklı hücre ölümü tiplerinin OA gelişimi üzerindeki etkisi güncel bir araştırma konusudur. Bu çalışmalardan elde edilecek sonuçlar önemli tedavi stratejilerinin geliştirilebileceği konusunda umut vaat etmektedir.

Taurin (2-aminoetan sülfonik asit), çoğu memeli dokusundaki bulunan serbest amino asitlerden biridir. Taurinin, antioksidan, anti-enfeksiyon, anti-inflamasyon, ozmoregülasyon, kan basıncının düzenlenmesi, nöromodülasyon, kalp fonksiyonunun korunması, nöroendokrin aktivitenin düzenlenmesi ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesi dahil olmak üzere hem insan hem de hayvan fizyolojisinde çeşitli fonksiyonları olduğu bilinmektedir (2). Buna ek olarak taurinin yukarıdaki işlevlerinin dokuya özgü olmadığı ve anti-apoptozis ve anti-oksidasyon etkilerinin taurinin sitoprotektif aktiviteleri için önemli olduğu da bildirilmiştir. Ancak, taurinin anti-OA etkileriyle ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır.

Bu çalışmadaki amacımız, taurinin ve OA'nın patogenezinde önemli rolleri olduğu gösterilen otofaji/apoptoz/nekroptoz üzerindeki etkilerini ortaya koymaktır.

OA'lı kondrositlerde apoptozu engelleyen ve apoptozu indükleyen yeni biyolojik ve farmasötik ajanların geliştirilmesi, OA'da izlenen kırıkta dejenerasyonunun geciktirilmesi veya durdurulması için potansiyel bir tedavi yöntemidir (24). Bu konuda yapılan çalışmalarda farklı moleküllerin kondrosit ölümü ve kırıkta dejenerasyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Gastrodin ve paeoninin, BAX/BCL-2/caspase-3 sinyal yolunu düzenlediği, aynı zamanda Gastrodinin NF- κ B yolunu inhibe ederek IL-1 β kaynaklı kondrosit apoptozunu engellediği gösterilmiştir (109, 110). Nesfatin-1'in, kondrositlerde IL-1 β kaynaklı NF- κ B, MAPK ve BAX/BCL-2 sinyal yollarının aktivasyonunu inhibe ederek anti-apoptotik bir rol oynadığı saptanmıştır (111). Adrenomedullinin, sığır eklem kondrositlerinde Fas reseptörünü modüle ederek kondrosit apoptozunu azalttığı gösterilmiştir (112). Preklinik çalışmalarda doğal bileşikler, antioksidanlar, ilaçlar ve miRNA dahil olmak üzere çeşitli bileşiklerin kondrosit apoptozunu hafiflettiği ve önlediği gösterilmiştir.

Şu anda, potansiyel bir hedef olarak apoptoz alanı hala prelinik aşamadadır, çünkü prelinik bulguları klinik bir ortama dönüştürmek, güvenlik endişeleri, dozaj optimizasyonu, denek seçimi, çalışma tasarımı ve mevcut sınırlı finansman gibi faktörler olduğu için karmaşık ve zordur. Bu nedenle, günümüzde doğal bileşiklerin kullanımı tercih edilmektedir; doğal bileşikler genellikle kolay erişilebilir ve uygun maliyetlidir, ayrıca daha az yan etki ile veya hiç yan etki olmadan osteoprotektif ve kondroprotektif yetenekler gösterdiği kanıtlanmıştır (113). Bununla birlikte, bu doğal bileşiklerin kondrosit apoptozu ve OA progresyonundaki etki mekanizmalarını tam olarak anlamak ve klinik ortamlardaki potansiyel etkinliklerini ve güvenliklerini belirlemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (17). Biz de bu durumu göz önünde bulundurarak taurinin bu amaçla kullanılabileceği hipotezi ile çalışmamızı tasarladık.

Daha önce literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde taurinin antioksidan aktivitesiyle yakından ilişkili olarak, hücresel işlevlerin korunmasına yardımcı olduğu ve apoptozu düzenlediği gösterilmiştir. Patolojik durumlarda taurinin, farklı sinyal yollarını modüle ederek ER stresini hafifletebildiği ve böylece ER stres aracılı apoptozu inhibe ettiği belirtilmiştir. Ek olarak, toksik ajanların (tertbutil hidroperoksit, akrilamid ve arsenik) indüklediği apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir (114-116). Bu süreçte fosfatidilinozitol 3-kinaz/Akt yolunu aktive eder ve NF- κ B'nin nükleer translokasyonunu engellediği bildirilmiştir. Literatürde, taurinin osteosit benzeri hücreleri reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından tetiklenen hücre ölümüne karşı koruduğu gösterilmiştir (117). Taurin, ayrıca kronik stres nedeniyle dolaşımdaki yüksek kortikosteroid seviyelerine bağlı olarak nöronal hücre ölümünü engeller; bu süreçte ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz (ERK) ve Nrf2 pozitif olarak düzenlenir (118). Bu nedenle, taurinin özellikle glokom tedavisi için potansiyel bir nöroprotektif ajan olduğu öne sürülmüştür (119). Taurin ayrıca, obezite kaynaklı alkol dışı yağlı karaciğer hastalığı ve alkol kaynaklı hücre ölümünün tedavisi için potansiyel bir terapötik ajan olarak önerilmiştir (120, 121). Sonuç olarak, taurinin inme, miyokard enfarktüsü, iskemi-reperfüzyon hasarı, ateroskleroz, karaciğer hastalıkları, diyabet, geriatric hastalıklar ve kanser dahil olmak üzere birçok hastalık üzerinde olumlu etkileri gösterilmiştir (122).

OA'da nekroptozun rolü ve mekanizmaları üzerine araştırmalar giderek artan bir ilgi alanı haline gelmiştir (36). Oksidatif stres ve sitokin üretimi, nekroptoz ile kıkırdak yıkımı arasındaki ilişkiye işaret eder. TNF ve RIPK1/RIPK3 aracılı programlanmış nekroz, kıkırdak yıkımını hızlandırır. Apoptoz baskılandığında, programlanmış nekroz yolu güçlenir. TRIM24-RIP3 eksenini, MLKL'den bağımsız bir şekilde RIP3'ün kıkırdak üzerindeki işlevlerini düzenler. RIP1,

uygun sinyallerle yalnızca nekroptozu değil, aynı zamanda apoptozu da tetikleyebilir. Cheng ve ark., OA hastalarının ve sıçan modellerinin kıkırdaklarında RIP1 ekspresyonunun arttığını ve intraartiküler RIP1 aşırı ekspresyonunun OA semptomlarını tetiklemek için yeterli olduğunu göstermiştir (56). Bununla birlikte, RIP3 ve RIPK1'in kıkırdaktaki fizyolojik ve patolojik rollerinin hala araştırılması gerekmektedir (62). Nekrostatin-1 (Nec-1), RIPK1 aktivitesini güçlü bir şekilde inhibe eder ve hem travmatik hem de kimyasal olarak indüklenen hücre ölümünü büyük ölçüde azaltır. Bu durum, pro-inflamatuvar mediyatörlerin salınımını azaltarak OA tedavisinde yeni bir yön sunar (123). Nec-1 ve amilorid, kondrositlerde ASIC1a aracılı apoptozu engeller ve eklem kıkırdağı hasarını azaltır (124). Nec-1s (Nec-1'in daha stabil bir formu, NST-1 s), RIPK1, RIPK3 ve MLKL gibi nekroptozu düzenleyen faktörlerin ekspresyonunu durdurarak nekroptozu engeller ve sinoviyal membranda inflamatuvar faktörlerin seviyesini azaltır, böylece OA'nın ilerlemesini yavaşlatır (125). AZ-628, kondrosit nekroptozunu inhibe ederek OA tedavisinde kullanılabilir: NF- κ B sinyal yolunu inhibe eder, RIPK3'ü aktive eder, otofaji, MAPK ve NF- κ B yollarını baskılar. Osteoklast aktivitesini azaltır, iltihaplanmayı hafifletir ve kıkırdak yıkımını engeller (126). DCC-2036, RIPK1 ve RIPK3'ü doğrudan inhibe edebilen çok hedefli bir kinaz inhibitörüdür: Nekroptotik hastalık aktivitesini engeller, inflamatuvar yanıtı baskılar ve kondrositleri korur (106). Nimesulidin kondrosit fenotipi ve nekroptoz üzerindeki etkilerinin RT qPCR ve Western blot ile incelendiği bir çalışmada nimesulidin kondrositlerde nekroptozu azaltarak OA'yı hafifletebileceği doğrulanmıştır (127). Sonuç olarak, nekroptozun OA'nın patogenezi ve ilerlemesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. RIPK1, RIPK3 ve MLKL'yi hedef alan inhibitörler, OA tedavisinde umut vadeden stratejiler sunar. Gerek in vitro gerek in vivo çalışmalar, bu inhibitörlerin hem inflamasyonu hem de hücre ölümünü azalttığını ve OA'nın ilerlemesini yavaşlatabileceğini göstermektedir. Bu mekanizmaların daha iyi anlaşılması, daha etkili ve hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır (62).

Taurinin nekroptoz üzerine etkisini gösteren çalışmalar literatürde oldukça sınırlı sayıdadır. Khodayar ve ark., Valproik asit ile hepatotoksisite indüklenen farelerde taurinin oksidatif stres, apoptoz ve RIPK1/RIPK3/MLKL aracılı nekroptoz sinyali üzerindeki koruyucu etkisini araştırmışlardır. Bulgular, taurinin RIPK1/RIPK3/MLKL'nin aracılık ettiği nekroptoz sinyal yolunu inhibe ederek ve oksidatif stres ve apoptozu baskılayarak karaciğer dokusunu valproik asit toksisitesine karşı koruduğunu göstermektedir (128). Yin ve ark., taurinin Klebsiella enfeksiyonunun neden olduğu enflamasyonu ve hasarı hafiflettiğini; bunun altında yatan

mekanizmanın, nekrotozun taurin tarafından kısmen inhibe edilmesiyle ilgili olabileceğini ortaya koymuşlardır (129).

Yao ve arkadaşları, OA kıkırdığının kurkumin gibi bitkisel biyoaktif bileşiklerle tedavisinin otofajinin aktivasyonu, kondrosit apoptozunun inhibisyonu ve proteoglikan kaybının azalması ve Mankin skorunun iyileşmesi ile gösterildiği gibi kıkırdak bozulmasında azalma ile sonuçlandığını göstermiştir (130). Lee ve arkadaşları toplamda 25 in vitro ve in vivo çalışmayı analiz ettikleri derleme çalışmada otofajinin yaşlı/ OA'lı kondrositlerde veya OA'nın IL1 β ile indüklendiği C28/I2 hücre hattındaki rolünü araştırmıştır. On iki çalışma otofaji aktivasyonunun kondrositleri OA'dan koruduğunu bildirmiştir. Bu bulgularla tutarlı olarak, altı çalışma otofajinin inhibisyonunun OA kondrositleri için sitotoksik olduğunu bildirmiştir. Dolayısıyla, bu sonuçlar otofajinin OA gelişimini önlemedeki rolünü vurgulamıştır. Buna karşılık, geri kalan yedi çalışma otofajinin aktivasyonunun veya inhibisyonunun sırasıyla OA gelişimi veya önlenmesi ile ilişkili olduğunu göstermiştir; bu da otofaji aktivasyonunun OA kondrositlerinde otofajiye bağlı hücre ölümüne de yol açabileceğini düşündürmektedir. Bulgular, otofajinin osteoartrit gelişimindeki rolünün karmaşık doğasını vurgulamakta ve kesin süreçlerini ve potansiyel terapötik uygulamalarını açıklığa kavuşturmak için ek araştırmaların gerekliliğini vurgulamaktadır (131).

Literatüre bakıldığında, farklı dokularda taurin-otofaji ilişkisi çalışılmıştır. Taurin tedavisinin, okratoksin-A kaynaklı nefrotoksisitede apoptozu hafiflettiği ve PK-15 hücrelerinde tetiklenen otofajiyi inhibe ettiği gösterilmiştir (95). Bir başka çalışmada, taurinin lipid birikimini azaltmaktan ziyade otofajik-CTSB-NLRP3 inflamasyon yolunu inhibe ederek arsenik trioksitin neden olduğu karaciğer inflamasyonunu hafiflettiği belirtilmiştir (96). Fare Leydig tümör hücrelerinde oksidatif stres, otofaji, apoptoz ve testosteron seviyesi üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada taurinin otofajiyi indüklediği ve tümör hücrelerinde apoptozu baskıladığı gösterilmiştir (97). Sun ve ark. çalışmasında taurinin kalsiyum okzalit nefrolitiazisinin tedavisinde potansiyel bir kullanım alanı olabileceğini belirtmiştir (132). Taurinin mTOR, NRF2, AMPK / mTOR ve PPAR γ yolu yoluyla hepatositler dahil olmak üzere birçok memeli hücresinde otofajiyi inhibe ettiği bulunmuştur (98, 99, 133, 134). Bununla birlikte, taurinin gestasyonel diyabetik mellitus sıçan modelinde karaciğer otofajisini ve yavruların yaralanmasını azalttığı gösterilmiştir (11).

Taurinin sitoprotektif fonksiyonları için anti-apoptoz ve antioksidan özellikleri esastır. Önceki çalışmalar taurinin ER stresi kaynaklı apoptozu engellediğini ve akciğer hasarı, inme

ve nörodejeneratif hastalıklara karşı koruduğunu doğrulamıştır (135-137). Taurinin osteoartrit üzerine olan etkileri ile ilgili olarak literatürde çalışmalar bulunmaktadır. Liu ve ark., taurinin insan eklem kondrositlerinin çoğalması ve fenotipinin korunması üzerindeki etkisini hücre çoğalması, morfolojisi, canlılığı ve kıkırdağa özgü mRNA ve proteinlerin ekspresyonunu analiz ederek araştırmışlardır. Kondrositler insan eklem kıkırdağı dokularından izole edilmiştir. Sonuçlar, taurinin kondrosit büyümesini etkili bir şekilde desteklediğini ve aggrecan, kolajen tip II ve SOX9 dahil olmak üzere kıkırdağa özgü belirteçler için mRNA'ların göreceli ekspresyon seviyelerinde önemli artışlara neden olduğunu göstermiştir. Aggrecan kıkırdağa özgü bir proteoglikandır ve SOX9 kondrojenik bir transkripsiyon faktörüdür. Buna karşılık, kondrosit dediferansiyasyonu için bir belirteç olan kolajen tip I'in mRNA ekspresyonu, taurin ile tedavi edilen hücrelerde önemli ölçüde azalmıştır, bu da taurinin kondrosit dediferansiyasyonunu inhibe ettiğini göstermektedir. Bu çalışma, taurinin kondrositlerin proliferasyonunun teşvik edilmesinde ve fenotipinin korunmasında etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Tüm taurin grupları arasında en yüksek hücre proliferasyonu 30 µg/ml konsantrasyonda elde edilmiştir. Sonuçlar, taurinin özellikle 30 µg/ml konsantrasyonda kondrosit büyümesini kolaylaştırdığını göstermiştir (138). Taurinin, oksidatif strese duyarlı miR-146a ve miR-34a'nın ekspresyon seviyelerini değiştirerek kondrosit apoptozunu azalttığı gösterilmiştir (139). Bian ve arkadaşları, taurinin insan OA üzerindeki olası koruyucu işlevlerini incelemek için taurin tedavisinin ER stresiyle ilişkili apoptozu azaltarak OA'e karşı koruma sağlayabileceği hipotezini ortaya atmışlardır. Bunu belirlemek için, total diz replasmanı yapılan 24 OA hastasından kıkırdaklar izole ederek taurin kullanımının H₂O₂ ile uyarılan OA hastası kaynaklı kondrositler üzerinde anti-apoptotik etkileri olduğunu göstermişlerdir. Taurin tedavisi, Col2A1 ekspresyonunun yukarı regülasyonu ve ER stres belirteçlerinin ekspresyonlarının aşağı regülasyonu ile kanıtlandığı gibi, ER stres yolunu baskılayarak kondrosit canlılığını arttırmış ve kondrosit apoptozunu inhibe etmiştir. Böylece, sonuçlar taurinin umut verici bir OA terapötik ajanı olduğunu göstermiştir (12). Yine aynı şekilde deneysel sıçan modellerinde taurinin OA patogeneze olası katkısını ve altta yatan mekanizmaları göstermeyi amaçlamışlardır. Bu amaçla, OA sıçan modelleri oluşturulmuştur. OA sıçanları, ameliyattan sonra 14 hafta boyunca kuyruk veninden enjeksiyon yoluyla farklı dozlarda taurin ile tedavi edilmiştir. Sonuç olarak, taurin uygulamasının sıçanlarda OA semptomlarının alevlenmesini önemli ölçüde önlediğini göstermişlerdir. Histopatolojik analiz, taurin tedavisinin matriks kaybını ve kıkırdak dejenerasyonunu doza bağlı bir şekilde

engellediğini göstermiştir. Ayrıca, western blot analizi, taurinin OA sıçan kıkırdağında matriks metalloproteinaz-3 (MMP-3) ve C/EBP Homolog Protein (CHOP) proteininin ekspresyonunu çarpıcı bir şekilde azalttığını göstermiştir (2). Sonuç olarak taurin ER stresini modüle ederek ve ER aracılı apoptozu azaltarak osteoartriti (OA) hafifletebilir (122).

Literatürde in vitro çalışmalarda taurinin farklı dozları kullanılmıştır. Zhao ve arkadaşları, pankreas β -hücrelerinde endoplazmik retikulum stresine taurinin etkisini inceledikleri çalışmalarında, taurin konsantrasyonundaki artışla birlikte hücre canlılığının önce arttığını, sonra azaldığını ve 30 mM taurinin en iyi etkiye sahip olduğunu göstermiştir (140). Yin ve arkadaşlarının çalışmasında EpH4-Ev hücreleri 4 saat boyunca 70mM taurin ile muamele edilmiş ve ardından Klebsiella ile enfekte edilmiştir (129). Daha önce, 4 saat boyunca 70 mM taurin ile ön koşullamanın, meme epitel hücrelerinde ciddi iltihaplanma, hasar ve ölüme neden olan Streptococcus Uberis enfeksiyonunu önemli ölçüde hafifletebildiğini göstermişlerdir (141). Yang ve arkadaşları, taurinin nukleus pulposus hücrelerinde ER stresine ilişkili apoptozu azalttığını gösterdikleri çalışmalarında hücreleri tedavi etmek için artan dozlarda taurin kullanmıştır. ≤ 40 mM konsantrasyonlarda hiçbir sitotoksik etki gözlenmemiştir (142). Bian ve arkadaşları, taurinin osteoartritli hastalardan alınan kondrositlerde endoplazmik retikulum stresine etkilerini inceledikleri çalışmalarında kondrositleri 24 saat boyunca 0-35 mM taurin ile muamele etmiş ve veriler 0-25 mM taurinin kondrosit canlılığı üzerinde belirgin bir etkisi olmadığını, 30 mM veya 35 mM taurinin ise kondrositlerin hayatta kalma yüzdesinde önemli bir azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, sonraki deneyler için 25 mM taurin seçilmiştir (12).

Chen ve arkadaşları IL-1 β (36 saat boyunca 20 ng/ml) ile muamele edilen sıçan kondrositlerinde, PLC γ 1'in U73122 (12 saat boyunca 2 μ M) ile inhibisyonu ile, kıkırdak matriks bileşenleri Col2A1 ve Aggrecan seviyelerini ve ekspresyonunu artırdığını göstermişlerdir. IL-1 β + U73122 ile muamele edilmiş kondrositlerin apoptoz (Z-VAD, 10 μ M) ve nekroptoz (Nec-1, 30 μ M) inhibitörleriyle kombine muamelesi, Col2A1 ve Aggrecan seviyeleri ve ekspresyonundaki artışları arttırmış ve hücre ölümü ve ROS seviyelerindeki artışları önlemiştir. Bu sonuçlar, PLC γ 1inhibisyonunun kondrosit apoptozisi ve nekroptozisinin hedefe yönelik inhibisyonu ile birleştirilmesi halinde OA tedavisi için uygun bir yaklaşım olabileceği yönündedir (61).

Col2A1, eklem kıkırdağında yoğun olarak bulunan ve kıkırdak dokusunun yapısal bütünlüğünü sağlayan önemli bir proteindir. Bu proteinin bozulması, MMP ve ADAMTS gibi

enzimlerin aktivasyonu ile ilişkilidir. Bu enzimler, ekstraselüler matrisi (ECM) parçalayarak IL-1 β ve TNF- α gibi sitokinlerin salınımını tetikler ve bu da kondrosit apoptozunu artırır (24). Ayrıca, Col2A1'ni bozulması, kaspaz bağımsız hücre ölümü mekanizmalarından biri olan nekroptozu yol açabilir. Bunun aksine, Col2A1'in korunması, nekroptozu karşı koruma sağlayarak kıkırdak dokusunun bütünlüğünü sürdürebilir. Col2A1'nin kaybı, oksidatif stresin artmasına da neden olabilir. Oksidatif stres ise kondrositlerde apoptozu tetikleyen önemli bir faktördür (77). Çalışmamızda en yüksek Col2A1 protein ifadenme düzeyini T+N uygulama grubunda elde ettik. Her ne kadar gruplar arasında anlamlı bir farklılık çıkmamış olsa da bu veri literatür bilgileri ile uyumludur. Buna ek olarak Nec1 yanında taurinin Col2A1 ifadenmesinde önemli bir katkı yarattığını görmekteyiz.

Aggrecan, kıkırdak ekstraselüler matriksinde bulunan büyük bir proteoglikan olup, su tutma kapasitesi sayesinde dokunun mekanik dayanıklılığını korur. Bu özellik, kıkırdağın basınca karşı direnç göstermesini sağlayarak eklemlerin sağlıklı işlevini sürdürmesine yardımcı olur (61). Aggrecan'ın bozulması, kıkırdak dokusunun mekanik özelliklerini kaybetmesine ve kondrositlerin strese karşı savunmasız hale gelmesine neden olur. Bu süreç, ADAMTS ve MMP enzimlerinin aktivasyonu ile ilişkilidir ve ekstraselüler matriksin parçalanmasına, kondrosit ölümüne yol açabilir. Ayrıca, aggrecan kaybı oksidatif stresi artırarak enflamatuar yanıtı tetikleyebilir. Enflamasyon sonucunda IL-1 β ve TNF- α gibi sitokinler salınır, bu da kondrosit apoptozunu hızlandırır. Aggrecan'ın korunması, otofajiyi destekleyerek hücre ölümünü engelleyebilir. Aksi takdirde, bozulması nekroptoz gibi kaspaz bağımsız hücre ölümü mekanizmalarını tetikleyebilir. Nekroptoz özellikle yoğun enflamasyon ve mekanik stres altında ortaya çıkar. Aggrecan bütünlüğünün korunması, nekroptozu karşı koruma sağlayarak kıkırdak dokusunun stabilitesini sürdürebilir (78). ADAMTS5, OA kondrositlerde aggrecan yıkımına neden olan enzimlerden biridir ve kıkırdak dejenerasyonunda kritik rol oynar. NF- κ B, ADAMTS5'in transkripsiyonel aktivitesini artıran bir faktördür. Buna ek olarak ADAMTS5 ekspresyonu, IL-1 β ve TNF- α gibi pro-inflamatuar sitokinler tarafından indüklenebilir. Nec-1'in doğrudan ADAMTS5 ekspresyonunu inhibe ettiğine dair kanıt olmamakla birlikte Nec-1'in RIPK1 inhibisyonu yoluyla NF- κ B aktivitesini baskılaması ve inflamatuar sitokin seviyelerini düşürmesi ADAMTS5 ekspresyonunu azaltabileceği düşünülebilir (143). Buna bağlı olarak aggrecan degradasyonu azalacaktır. Çalışmamızda en yüksek aggrecan ifadenme seviyesinin N uygulama grubunda bulunmuş olması bu hipotezi doğrular niteliktedir.

Çalışmamız, Taurin'in OA'lı kondrositlerde hücre canlılığını artırdığını göstermektedir. Apoptoz inhibitörü ZVAD'in ve nekroptoz inhibitörü Nec-1'in eklenmesi hücre canlılığı üzerinde bir etki yaratmazken hücre ölümlerinin inhibe edildiği koşullarda taurinin eklenmesi canlılık üzerinde özellikle T+N uygulama grubunda anlamlı bir etki yaratmıştır. Bu bulgu bize OA'lı kondrositlerin ölüm mekanizmalarında nekroptozun daha etkili bir mekanizma olabileceğini düşündürmektedir. Buna ek olarak taurinin nekroptoz baskılanması sürecinde daha etkili olduğu bir başka bulgumuzdur. 20µM, 2 saat ZVAD-FMK uygulamasında hücre canlılığı, T+Z, T+N ve T+Z+N gruplarına oranla anlamlı derecede düşük bulunmuştur. ZVAD'in, Taurin+Nec-1 kombinasyonuna eklenmesi hücre canlılığı üzerinde benzer bir etki yaratmıştır (p=0,002). Taurin tek başına etkili olmasına rağmen, ZVAD'in eklendiği kombinasyonlarda hücre canlılığı üzerinde olumsuz bir etki yaratmasının apoptozun engellendiği durumlarda otofaji veya nekroptoz mekanizmalarını bozarak hücre canlılığını azaltıyor olabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak çalışmamızda literatür verileri ile uyumlu olarak OA'lı kondrositlerde taurinin tek başına güçlü hücre koruyucu etkiye sahip olduğunu gösterdik. Buna ek olarak, nekroptoz inhibisyonu taurin ile önemli bir hücre koruyucu etki yaratırken taurin ile apoptoz inhibisyonunun tek başına etkili olmadığı görülmektedir. ZVAD'in eklenmesi, beklenenin aksine hücre canlılığını düşürmektedir. Bu bulgular, OA'de nekroptozun ana hücre ölüm mekanizması olduğunu desteklemektedir. Ancak apoptozun inhibe edilmesinin hücre üzerinde koruyucu bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir. Bunun nedeni olarak apoptoz otofaji arasındaki denge olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca kullanılan apoptoz inhibitörü Z-VAD-FMK kaspaz inhibitörü olduğundan ve bazı kaspazların özellikle kaspaz -8'in apoptoz ile birlikte hem otofajide hem nekroptozda da fonksiyon gösterdiğinden apoptozun engellenmesi ile diğer hücre ölüm yollarındaki aktivite azalış/artışının bu bulguların çıkmasında etkili olmuş olacağını düşünmekteyiz.

RIPK3, nekroptoz sürecinin önemli düzenleyicilerinden biridir ve hücre ölümünün tipi ile inflamatuvar yanıtların belirlenmesinde kritik bir rol oynar. Buna ek olarak apoptoz nekroptoz arası konuşmada önemli rolü bulunmaktadır. Çalışmamızda qRT-PCR bulgularımızda RIPK3 ifadenme düzeyi taurin grubunda, T+Z, T+N ve T+Z+N gruplarına göre anlamlı düzeyde yüksektir bulunmuştur (p<0,05). Bu da taurin'in doğrudan RIPK3'ü inhibe etmediğini ve nekroptoz sürecini tamamen baskılamadığını gösteriyor. Ancak hücre ölüm inhibitörleriyle (ZVAD ve Nec-1) birlikte kullanıldığında, nekroptozun baskılanmasını desteklediğini

söyleyebiliriz. Kaspase-8 aktif olduğunda RIPK1 ve RIPK3'ü inhibe ederek nekroptozu durdurur ve hücreyi apoptoza yönlendirir. Kaspase-8 inhibe edildiğinde (ZVAD uygulaması), RIPK3 devreye girerek nekroptozu tetikler. Taurin'in Kaspase-8 üzerinden doğrudan bir etkisinin olup olmadığı henüz bilinmemekle birlikte ZVAD ve Nec-1 ile kombinasyon halinde RIPK3 seviyesinin düştüğü görülüyor. Sonuç olarak bulgularımız taurinin hücre ölüm süreçleri üzerinde destekleyici ancak doğrudan baskılayıcı olmayan bir rolü olabileceğini göstermektedir.

BAX ve BCL2, apoptoz sürecinde temel rol oynayan iki önemli proteindir. BAX, pro-apoptotik özellik göstererek mitokondriyel dış membranın geçirgenliğini artırır, bu da sitokrom C salınımını tetikleyerek hücre ölüm sürecini başlatır. Buna karşılık, BCL2 anti-apoptotik bir protein olup BAX'ın etkisini baskılayarak hücreyi apoptotik uyarılara karşı koruma işlevi görür. Çalışmamızda, bu iki genin ekspresyon seviyeleri uygulama grupları arasında karşılaştırılmıştır (**Tablo 4.17, Şekil 4.13**). Beklentilere uygun şekilde, Bax ekspresyonunun Z, T+Z ve T+Z+N gruplarında, Taurin uygulanan gruba kıyasla belirgin şekilde azaldığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, T+Z grubunda Bax seviyesinin Z, T+N ve T+Z+N gruplarına göre anlamlı derecede daha düşük olması dikkat çekici bir bulgudur. BCL2'nin ekspresyon düzeyi beklendiği gibi en yüksek Z grubunda saptanmıştır. Ancak T+Z, T+N ve özellikle T+Z+N gruplarında BCL2 ekspresyonunun en düşük seviyede olduğu görülmüştür. Bu bulgu BCL2'nin sadece apoptoz değil aynı zamanda Beclin-1 ile etkileşerek apoptoz otofaji dengesinin kurulmasındaki rolünden kaynaklanıyor olabileceğini düşünmekteyiz. Bcl-2 azalması apoptoz belirteci olabileceği gibi otofaji aktivitesindeki artışı da gösteriyor olabilir. Bu bilgiyi destekler bulgularımız western blot sonuçlarımızda görülmektedir. Beclin ve LC3B ifadenme seviyeleri T+Z, T+N ve T+Z+N uygulama gruplarında diğer gruplara göre daha fazladır.

PARP1, osteoartritik (OA) kondrositlerin dejenerasyonu ve kırıkta kayıpla ilişkili olan önemli bir enzimdir. Hücre stresine yanıt olarak DNA hasarını onarmada rol alırken, inflamasyon ve hücre ölümü mekanizmalarında da aktif olarak yer almaktadır. Özellikle apoptoz ve parthanatos gibi farklı hücre ölüm yollarında etkili olduğu bilinmektedir. Kaspase-3 aktivasyonu gerçekleştiğinde, PARP1 proteolize uğrayarak hücre apoptoza yönelirken, caspase-3 baskılandığında ise hücre ölümü alternatif yollara kayabilmektedir. Sun ve arkadaşları, insan kondrosit kültüründe in vitro osteoartrit (OA) modelinde yaptıkları çalışmada, IL-1 β 'nin kondrosit canlılığını azalttığını ve hücre apoptozunu artırdığını

göstermiştir. Ayrıca, IL-1 β 'nın PARP-1 ekspresyonunu ve aktivitesini artırdığı, ancak PARP-1'in inhibe edilmesiyle bu inflamatuvar yanıtın azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, PARP-1 inhibisyonunun insan kondrositlerinde anti-OA etkiler gösterebileceğini ortaya koymuştur (31).

Çalışmamızda, OA'li kondrositlerde uygulama yapılan gruplar arasında PARP1 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p=0,082$). Ancak Nec-1 (N), Taurin + Nec-1 (T+N) ve Taurin + ZVAD + Nec-1 (T+Z+N) gruplarında PARP1 seviyelerinin diğer gruplara kıyasla daha düşük olduğu belirlenmiştir. Apoptozun inhibe edildiği Z ve T+Z koşullarında, PARP1 seviyelerinin daha yüksek olması, ZVAD-FMK'nın Caspase-3 aktivitesini baskılayarak apoptoz sürecini engellemesinden kaynaklanıyor olabilir. Bunun yanı sıra, PARP1'in parthanatos gibi kaspazdan bağımsız hücre ölüm yollarında rol oynaması da bu duruma katkı sağlayan bir etken olabilir.

Buna ek olarak, Caspase-3 ekspresyonu açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (**Tablo 4.22, Şekil 4.20**). Caspase-3 seviyesinin en düşük Nec-1 (N) grubunda görülmesinin sebebi Nec1'in kaspaz 3'ün kesilmesini engellemesi olabilir (144). Buna ek olarak en yüksek seviyenin Taurin + Nec-1 (T+N) grubunda gözlemlenmesi, Taurin'in hücreyi apoptoza yönlendiren bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Bu tez araştırmasında, OA'li kondrositlerde taurin'in otofaji sürecine etkisini, farklı hücre ölüm inhibitörleri ile kombinasyon halinde değerlendirmek amaçlanmıştır. Otofaji mekanizmasını daha iyi anlamak için, sürecin farklı aşamalarında görev alan belirteçler analiz edilmiştir. Otofajinin başlatılmasını sağlayan Beclin1, otofagozom oluşumunda yer alan LC3b ve otofajik aktivitenin düzenlenmesinde rol oynayan p62 (SQSTM1) incelenmiştir. p62 seviyesindeki azalma otofajinin aktif olarak işlediğini, artışı ise otofajik yıkımın yavaşladığını göstermektedir. Çalışmada, Beclin1 seviyeleri en düşük Nec-1 (N) uygulama grubunda tespit edilirken, en yüksek ekspresyon Taurin + Nec-1 (T+N) uygulama grubunda kaydedilmiştir. Bununla birlikte, kontrol grubu ile Z ve kontrol grubu ile N arasında anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür. Z uygulanan grupta Beclin1 düzeyi, T+Z ve T+N gruplarıyla karşılaştırıldığında belirgin şekilde daha düşüktür ($p=0,021$, $p=0,018$) (**Tablo 4.24, Tablo 4.25**).

Deneyisel gruplar arasında LC3B ekspresyonunda anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p=0,049$). Ancak, Taurin uygulanan grupta LC3B seviyeleri, T+Z grubuna kıyasla daha düşük bulunmuştur ($p=0,05$). Diğer yandan, p62 ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak

anlamalı bir fark tespit edilmemekle birlikte ($p=0,084$), Z grubunda p62 seviyelerinin diğer gruplara kıyasla daha düşük olduğu belirlenmiştir (**Tablo 4.24, Şekil 4.22**).

Bu sonuçlar, Taurin'in tek başına otofajiyi doğrudan indüklediğini, ancak apoptozun inhibe edildiği durumlarda hücrelerin otofaji mekanizmasını daha etkin kullanabileceğini düşündürmektedir. Benzer bir eğilim nekroptozun baskılandığı koşullarda da gözlemlenmiş, ancak otofajinin ilerleyen aşamalarında, özellikle kargo degradasyon sürecinde bir blokaj olabileceği ihtimali öne çıkmıştır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada elde edilen veriler, otofaji ve hücre ölüm yollarının birbiriyle etkileşimli bir şekilde işlediğini ve bu süreçlerin osteoartrit gibi dejeneratif hastalıkların tedavisinde önemli bir rol oynayabileceğini ortaya koymaktadır. Taurin'in hücre koruyucu etkileri, Nec1 ve Zvad gibi inhibitörlerle yapılan kombinasyon uygulamalarının, hücre canlılığını nasıl etkileyebileceğini anlamamıza olanak sağlamıştır.

Taurin'in tek başına veya Nec1 ile kombinasyon halinde uygulandığında hücre canlılığını arttırıcı etkiler göstermesi, Taurin'in potansiyel terapötik bir ajan olarak değerlendirilmesini desteklemektedir. Nec1 ile yapılan kombinasyonun, Taurin'in hücre koruyucu etkisini sinerjik bir şekilde güçlendirmesi de önemli bir bulgudur. Ancak, Zvad'in bu etkiyi baskılayıcı bir rol üstlendiği gözlemlenmiştir.

RT-PCR analizleri, Nec1 grubu ve T+N kombinasyonunun diğer gruplara kıyasla daha yüksek ACAN düzeylerine sahip olduğunu göstermektedir. Bu durum, nekrotoz inhibisyonunun kıkırdak metabolizması üzerindeki potansiyel koruyucu etkilerini ortaya koymaktadır. Col2A1 ifadenme düzeyleri incelendiğinde, T+N grubunda Col2A1 seviyelerinin diğer gruplara kıyasla en yüksek seviyede olduğu görülmektedir. Bu durum, T+N kombinasyonunun kıkırdak dokusunun ana yapısal bileşenlerinden biri olan tip II kollajen sentezini arttırabileceğini göstermektedir. Özellikle, T+Z+N grubunda Col2A1 seviyeleri nispeten sabit kalmıştır, bu da kombinasyon tedavilerinin belirli koşullarda kıkırdak homeostazı üzerinde düzenleyici bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Özellikle kombinasyon uygulamaların RIPK3 aktivitesini daha da baskıladığı gözlemlenmiştir. Bu durum, nekrotoz apoptoz ve otofaji ile ilişkili bir rolünden kaynaklanıyor olabileceğini düşündürmektedir.

PARP1 protein seviyeleri açısından Nec1, T+N ve T+Z+N gruplarında diğer gruplara kıyasla daha düşük seviyeler gözlenmiştir. Nec1'in nekrotozu inhibe edici etkisi göz önüne alındığında, PARP1 seviyelerinin Nec1 içeren gruplarda azalması, hücre ölüm yollarının alternatif mekanizmalar ile düzenlenebileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, osteoartrit modelinde hücresel stres yanıtlarının otofaji ve hücre ölüm yolları ile yakından ilişkili olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, Taurin'in hücre canlılığını arttırmada potansiyel bir terapötik ajan olabileceğini, ancak diğer maddelerle kombinasyonlarının dikkatle değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Bu çalışmadaki amaç ilk önce büyük resmi görmektedir. Çalışma bulgularımız OA'lı kondrositlerde nekrotoz-apoptoz, nekrotoz -otofaji,

apoptoz- otofaji arasında önemli bir konuşma olduğunu göstermektedir. Ayrıca taurinin bu mekanizmalar üzerinde belli noktalarda önemli olabileceği görülmektedir. İleriki çalışmalarda, taurinin tam olarak bu mekanizmaların hangi noktasında etkili olduğunu detaylı incelenmesi osteoartrit gibi dejeneratif hastalıklarda yeni tedavi hedeflerinin belirlenmesine katkıda bulunacaktır.



KAYNAKLAR

1. Liu J, Fu Q, Liu S. Transcriptional Regulation Based on Network of Autophagy Identifies Key Genes and Potential Mechanisms in Human Osteoarthritis. *Cartilage*. 2020;1947603520951632.
2. Bian Y, Zhang M, Wang K. Taurine protects against knee osteoarthritis development in experimental rat models. *Knee*. 2018;25(3):374-80.
3. Liao FX, Huang F, Ma WG, Qin KP, Xu PF, Wu YF, et al. The New Role of Sirtuin1 in Human Osteoarthritis Chondrocytes by Regulating Autophagy. *Cartilage*. 2021;13(2_suppl):1237S-48S.
4. Zhang X, Yao J, Wu Z, Zou K, Yang Z, Huang X, et al. Chondroprotective and antiarthritic effects of Daphnetin used in vitro and in vivo osteoarthritis models. *Life Sci*. 2020;240:116857.
5. Yi H, Zhang W, Cui ZM, Cui SY, Fan JB, Zhu XH, et al. Resveratrol alleviates the interleukin-1beta-induced chondrocytes injury through the NF-kappaB signaling pathway. *J Orthop Surg Res*. 2020;15(1):424.
6. Wu SY, Du YC, Yue CF. Sirt7 protects chondrocytes degeneration in osteoarthritis via autophagy activation. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020;24(18):9246-55.
7. Lee SW, Lee HJ, Chung WT, Choi SM, Rhyu SH, Kim DK, et al. TRAIL induces apoptosis of chondrocytes and influences the pathogenesis of experimentally induced rat osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2004;50(2):534-42.
8. Lee SW, Song YS, Lee SY, Yoon YG, Lee SH, Park BS, et al. Downregulation of protein kinase CK2 activity facilitates tumor necrosis factor-alpha-mediated chondrocyte death through apoptosis and autophagy. *PLoS One*. 2011;6(4):e19163.
9. Lee SW, Song YS, Shin SH, Kim KT, Park YC, Park BS, et al. Cilostazol protects rat chondrocytes against nitric oxide-induced apoptosis in vitro and prevents cartilage destruction in a rat model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2008;58(3):790-800.
10. Schaffer S, Kim HW. Effects and Mechanisms of Taurine as a Therapeutic Agent. *Biomol Ther (Seoul)*. 2018;26(3):225-41.
11. Luo Y, Tian Y, Zhao C. Taurine attenuates liver autophagy and injury of offspring in gestational diabetic mellitus rats. *Life Sci*. 2020;257:117889.
12. Bian Y, Wang H, Sun S. Taurine alleviates endoplasmic reticulum stress in the chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Redox Rep*. 2018;23(1):118-24.

13. Zhu R, Wang Y, Ouyang Z, Hao W, Zhou F, Lin Y, et al. Targeting regulated chondrocyte death in osteoarthritis therapy. *Biochem Pharmacol.* 2023;215:115707.
14. Zheng G, Zhan Y, Li X, Pan Z, Zheng F, Zhang Z, et al. TFEB, a potential therapeutic target for osteoarthritis via autophagy regulation. *Cell Death Dis.* 2018;9(9):858.
15. Liu S, Pan Y, Li T, Zou M, Liu W, Li Q, et al. The Role of Regulated Programmed Cell Death in Osteoarthritis: From Pathogenesis to Therapy. *Int J Mol Sci.* 2023;24(6).
16. Liu X, Yang W, Guan Z, Yu W, Fan B, Xu N, et al. There are only four basic modes of cell death, although there are many ad-hoc variants adapted to different situations. *Cell & Bioscience.* 2018;8(1):6.
17. Lee YT, Mohd Yunus MH, Yazid MD, Ugusman A. Unraveling the path to osteoarthritis management: targeting chondrocyte apoptosis for therapeutic intervention. *Front Cell Dev Biol.* 2024;12:1347126.
18. Nirmala JG, Lopus M. Cell death mechanisms in eukaryotes. *Cell Biol Toxicol.* 2020;36(2):145-64.
19. Yan G, Elbadawi M, Efferth T. Multiple cell death modalities and their key features (Review). *World Acad Sci J.* 2020;2(2):39-48.
20. Green DR, Llambi F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(12).
21. Gupta R, Ambasta RK, Pravir K. Autophagy and apoptosis cascade: which is more prominent in neuronal death? *Cell Mol Life Sci.* 2021;78(24):8001-47.
22. Andón FT, Fadeel B. Programmed cell death: molecular mechanisms and implications for safety assessment of nanomaterials. *Acc Chem Res.* 2013;46(3):733-42.
23. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018;25(3):486-541.
24. Xiao SQ, Cheng M, Wang L, Cao J, Fang L, Zhou XP, et al. The role of apoptosis in the pathogenesis of osteoarthritis. *Int Orthop.* 2023;47(8):1895-919.
25. Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhuet S, Walczak H, Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(2):135-47.

26. Zhu W, Yang X, Liu S, Wang Y, Li W, Zhong Q, et al. Lentivirus-based shRNA of Caspase-3 gene silencing inhibits chondrocyte apoptosis and delays the progression of surgically induced osteoarthritis. *Biotechnol J*. 2024;19(1):e2300031.
27. Huang J, Ye Z, Wang J, Chen Q, Huang D, Liu H. USP13 mediates PTEN to ameliorate osteoarthritis by restraining oxidative stress, apoptosis and inflammation via AKT-dependent manner. *Biomed Pharmacother*. 2021;133:111089.
28. Lou C, Lin C, Wang W, Jiang H, Cai T, Lin S, et al. Extracts of *Oldenlandia diffusa* protects chondrocytes via inhibiting apoptosis and associated inflammatory response in osteoarthritis. *J Ethnopharmacol*. 2023;316:116744.
29. Zhang Y, Yan M, Shan W, Zhang T, Shen Y, Zhu R, et al. Bisphenol A induces pyroptotic cell death via ROS/NLRP3/Caspase-1 pathway in osteocytes MLO-Y4. *Food Chem Toxicol*. 2022;159:112772.
30. Shoshan-Barmatz V, Keinan N, Abu-Hamad S, Tyomkin D, Aram L. Apoptosis is regulated by the VDAC1 N-terminal region and by VDAC oligomerization: release of cytochrome c, AIF and Smac/Diablo. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1797(6-7):1281-91.
31. Sun Y, Zhou L, Lv D, Liu H, He T, Wang X. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 inhibition prevents interleukin-1 β -induced inflammation in human osteoarthritic chondrocytes. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2015;47(6):422-30.
32. Liu Z, Wang H, Wang S, Gao J, Niu L. PARP-1 inhibition attenuates the inflammatory response in the cartilage of a rat model of osteoarthritis. *Bone Joint Res*. 2021;10(7):401-10.
33. Oberst A, Green DR. It cuts both ways: reconciling the dual roles of caspase 8 in cell death and survival. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(11):757-63.
34. Kaiser WJ, Upton JW, Long AB, Livingston-Rosanoff D, Daley-Bauer LP, Hakem R, et al. RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice. *Nature*. 2011;471(7338):368-72.
35. Liang S, Lv ZT, Zhang JM, Wang YT, Dong YH, Wang ZG, et al. Necrostatin-1 Attenuates Trauma-Induced Mouse Osteoarthritis and IL-1 β Induced Apoptosis via HMGB1/TLR4/SDF-1 in Primary Mouse Chondrocytes. *Front Pharmacol*. 2018;9:1378.
36. Yang J, Hu S, Bian Y, Yao J, Wang D, Liu X, et al. Targeting Cell Death: Pyroptosis, Ferroptosis, Apoptosis and Necroptosis in Osteoarthritis. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:789948.
37. Weinlich R, Oberst A, Beere HM, Green DR. Necroptosis in development, inflammation and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017;18(2):127-36.

38. Tomassy GS, Dershowitz LB, Arlotta P. Diversity Matters: A Revised Guide to Myelination. *Trends Cell Biol.* 2016;26(2):135-47.
39. Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. RIP kinases initiate programmed necrosis. *J Mol Cell Biol.* 2009;1(1):8-10.
40. Degterev A, Hitomi J, Gemscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, et al. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol.* 2008;4(5):313-21.
41. Dondelinger Y, Declercq W, Montessuit S, Roelandt R, Goncalves A, Bruggeman I, et al. MLKL compromises plasma membrane integrity by binding to phosphatidylinositol phosphates. *Cell Rep.* 2014;7(4):971-81.
42. Vandenabeele P, Declercq W, Van Herreweghe F, Vanden Berghe T. The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis. *Sci Signal.* 2010;3(115):re4.
43. Silke J, Rickard JA, Gerlic M. The diverse role of RIP kinases in necroptosis and inflammation. *Nat Immunol.* 2015;16(7):689-97.
44. Moriwaki K, Chan FK. RIP3: a molecular switch for necrosis and inflammation. *Genes Dev.* 2013;27(15):1640-9.
45. van der Kraan PM, van den Berg WB. Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? *Osteoarthritis Cartilage.* 2012;20(3):223-32.
46. Loeser RF, Erickson EA, Long DL. Mitogen-activated protein kinases as therapeutic targets in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2008;20(5):581-6.
47. Ofengeim D, Yuan J. Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(11):727-36.
48. Sun L, Wang H, Wang Z, He S, Chen S, Liao D, et al. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell.* 2012;148(1-2):213-27.
49. Verkleij SP, Luijsterburg PA, Bohnen AM, Koes BW, Bierma-Zeinstra SM. NSAIDs vs acetaminophen in knee and hip osteoarthritis: a systematic review regarding heterogeneity influencing the outcomes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2011;19(8):921-9.
50. Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, Abramson S, Altman RD, Arden N, et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. *Osteoarthritis Cartilage.* 2008;16(2):137-62.

51. Goldring MB, Otero M. Inflammation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2011;23(5):471-8.
52. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2010;11(10):700-14.
53. Zhao J, Jiang P, Guo S, Schrodi SJ, He D. Apoptosis, Autophagy, NETosis, Necroptosis, and Pyroptosis Mediated Programmed Cell Death as Targets for Innovative Therapy in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol*. 2021;12:809806.
54. Hong JM, Kim SJ, Lee SM. Role of necroptosis in autophagy signaling during hepatic ischemia and reperfusion. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016;308:1-10.
55. van der Kraan PM, Blaney Davidson EN, van den Berg WB. Bone morphogenetic proteins and articular cartilage: To serve and protect or a wolf in sheep clothing's? *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18(6):735-41.
56. Cheng J, Duan X, Fu X, Jiang Y, Yang P, Cao C, et al. RIP1 Perturbation Induces Chondrocyte Necroptosis and Promotes Osteoarthritis Pathogenesis via Targeting BMP7. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:638382.
57. Jeon J, Noh HJ, Lee H, Park HH, Ha YJ, Park SH, et al. TRIM24-RIP3 axis perturbation accelerates osteoarthritis pathogenesis. *Ann Rheum Dis*. 2020;79(12):1635-43.
58. Gong Y, Qiu J, Ye J, Jiang T, Zhang W, Zheng X, et al. AZ-628 delays osteoarthritis progression via inhibiting the TNF- α -induced chondrocyte necroptosis and regulating osteoclast formation. *International Immunopharmacology*. 2022;111:109085.
59. Zhou Y, Lin S, Huang Z, Zhang C, Wang H, Li B, et al. Receptor-interacting protein 1 inhibition prevents mechanical stress-induced temporomandibular joint osteoarthritis by regulating apoptosis and later-stage necroptosis of chondrocytes. *Arch Oral Biol*. 2023;147:105612.
60. Sun K, Guo Z, Zhang J, Hou L, Liang S, Lu F, et al. Inhibition of TRADD ameliorates chondrocyte necroptosis and osteoarthritis by blocking RIPK1-TAK1 pathway and restoring autophagy. *Cell Death Discov*. 2023;9(1):109.
61. Chen X, Chen R, Xu Y, Xia C. PLCgamma1 inhibition combined with inhibition of apoptosis and necroptosis increases cartilage matrix synthesis in IL-1 β -treated rat chondrocytes. *FEBS Open Bio*. 2021;11(2):435-45.

62. Ji P, Zhou Z, Zhang J, Bai T, Li C, Zhou B, et al. Non-apoptotic cell death in osteoarthritis: Recent advances and future. *Biomed Pharmacother.* 2024;179:117344.
63. Liang S, Wang ZG, Zhang ZZ, Chen K, Lv ZT, Wang YT, et al. Decreased RIPK1 expression in chondrocytes alleviates osteoarthritis via the TRIF/MyD88-RIPK1-TRAF2 negative feedback loop. *Aging (Albany NY).* 2019;11(19):8664-80.
64. Qiu J, Zheng X, Cai G, Ye J, Jiang T, Chen L, et al. Upregulation of cIAP1 induced by AZD8330 alleviates osteoarthritis progression by inhibiting the RIP1-associated necrosis signaling pathway. *Int Immunopharmacol.* 2023;125(Pt B):111169.
65. Carames B, Taniguchi N, Otsuki S, Blanco FJ, Lotz M. Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage, and its aging-related loss is linked with cell death and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2010;62(3):791-801.
66. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 2008;132(1):27-42.
67. Ren J, Zhang Y. Targeting Autophagy in Aging and Aging-Related Cardiovascular Diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2018;39(12):1064-76.
68. Li YS, Zhang FJ, Zeng C, Luo W, Xiao WF, Gao SG, et al. Autophagy in osteoarthritis. *Joint Bone Spine.* 2016;83(2):143-8.
69. Kong P, Ahmad RE, Zulkifli A, Krishnan S, Nam HY, Kamarul T. The role of autophagy in mitigating osteoarthritis progression via regulation of chondrocyte apoptosis: A review. *Joint Bone Spine.* 2024;91(3):105642.
70. Almonte-Becerril M, Navarro-Garcia F, Gonzalez-Robles A, Vega-Lopez MA, Lavalle C, Kouri JB. Cell death of chondrocytes is a combination between apoptosis and autophagy during the pathogenesis of Osteoarthritis within an experimental model. *Apoptosis.* 2010;15(5):631-8.
71. Liu-Bryan R, Terkeltaub R. Emerging regulators of the inflammatory process in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11(1):35-44.
72. Carames B, Olmer M, Kiousses WB, Lotz MK. The relationship of autophagy defects to cartilage damage during joint aging in a mouse model. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(6):1568-76.
73. Sasaki H, Takayama K, Matsushita T, Ishida K, Kubo S, Matsumoto T, et al. Autophagy modulates osteoarthritis-related gene expression in human chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2012;64(6):1920-8.

74. Liu Y, Li X, Jin A. Rapamycin Inhibits Nf-KappaB Activation by Autophagy to Reduce Catabolism in Human Chondrocytes. *J Invest Surg.* 2020;33(9):861-73.
75. Ma L, Liu Y, Zhao X, Li P, Jin Q. Rapamycin attenuates articular cartilage degeneration by inhibiting beta-catenin in a murine model of osteoarthritis. *Connect Tissue Res.* 2019;60(5):452-62.
76. Song B, Song H, Wang W, Wang H, Peng H, Cui J, et al. Beclin 1 overexpression inhibits chondrocyte apoptosis and downregulates extracellular matrix metabolism in osteoarthritis. *Mol Med Rep.* 2017;16(4):3958-64.
77. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum.* 2012;64(6):1697-707.
78. Little CB, Fosang AJ. Is cartilage matrix breakdown an appropriate therapeutic target in osteoarthritis--insights from studies of aggrecan and collagen proteolysis? *Curr Drug Targets.* 2010;11(5):561-75.
79. Gomez-Virgilio L, Silva-Lucero MD, Flores-Morelos DS, Gallardo-Nieto J, Lopez-Toledo G, Abarca-Fernandez AM, et al. Autophagy: A Key Regulator of Homeostasis and Disease: An Overview of Molecular Mechanisms and Modulators. *Cells.* 2022;11(15).
80. Khan NM, Ansari MY, Haqqi TM. Sucrose, But Not Glucose, Blocks IL1-beta-Induced Inflammatory Response in Human Chondrocytes by Inducing Autophagy via AKT/mTOR Pathway. *J Cell Biochem.* 2017;118(3):629-39.
81. Le Clanche S, Bonnefont-Rousselot D, Sari-Ali E, Rannou F, Borderie D. Inter-relations between osteoarthritis and metabolic syndrome: A common link? *Biochimie.* 2016;121:238-52.
82. Li X, Yang X, Maimaitijuma T, Cao XY, Jiao Y, Wu H, et al. Plant homeodomain finger protein 23 inhibits autophagy and promotes apoptosis of chondrocytes in osteoarthritis. *Chin Med J (Engl).* 2019;132(21):2581-7.
83. Wangyang Y, Zheng X, Liu GW, Li DY, Feng YB, Guo TY, et al. Upregulation of P63 inhibits chondrocyte autophagy thereby enhancing the malignant progression of osteoarthritis. *Pharmazie.* 2017;72(6):361-4.
84. Akasaki Y, Alvarez-Garcia O, Saito M, Carames B, Iwamoto Y, Lotz MK. FoxO transcription factors support oxidative stress resistance in human chondrocytes. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(12):3349-58.

85. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018;25(3):486-541.
86. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature.* 2008;451(7182):1069-75.
87. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(10):700-14.
88. Huxtable RJ. Physiological actions of taurine. *Physiol Rev.* 1992;72(1):101-63.
89. Schuller-Levis GB, Park E. Taurine: new implications for an old amino acid. *FEMS Microbiol Lett.* 2003;226(2):195-202.
90. Lubec B, Ya-hua Z, Pertti S, Pentti T, Kitzmuller E, Lubec G. Distribution and disappearance of the radiolabeled carbon derived from L-arginine and taurine in the mouse. *Life Sci.* 1997;60(26):2373-81.
91. Bouckennooghe T, Remacle C, Reusens B. Is taurine a functional nutrient? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2006;9(6):728-33.
92. Gupta RC. Taurine analogues and taurine transport: therapeutic advantages. *Adv Exp Med Biol.* 2006;583:449-67.
93. Park S, Kim H, Kim SJ. Stimulation of ERK2 by taurine with enhanced alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in osteoblast-like UMR-106 cells. *Biochem Pharmacol.* 2001;62(8):1107-11.
94. McLoughlin DM, Stapleton PP, Bloomfield FJ. Influence of taurine and a substituted taurine on the respiratory burst pathway in the inflammatory response. *Biochem Soc Trans.* 1991;19(1):73-8.
95. Liu K, Mao X, Li H, Liu D, Le G, Gan F, et al. Regulation of taurine in OTA-induced apoptosis and autophagy. *Toxicon.* 2020;181:82-90.
96. Qiu T, Pei P, Yao X, Jiang L, Wei S, Wang Z, et al. Taurine attenuates arsenic-induced pyroptosis and nonalcoholic steatohepatitis by inhibiting the autophagic-inflammasomal pathway. *Cell Death Dis.* 2018;9(10):946.
97. Yahyavy S, Valizadeh A, Saki G, Khorsandi L. Taurine induces autophagy and inhibits oxidative stress in mice Leydig cells. *JBRA Assist Reprod.* 2020;24(3):250-6.
98. Bai J, Yao X, Jiang L, Qiu T, Liu S, Qi B, et al. Taurine protects against As₂O₃-induced autophagy in pancreas of rat offsprings through Nrf2/Trx pathway. *Biochimie.* 2016;123:1-6.

99. Zhai N, Wang H, Chen Y, Li H, Viktor K, Huang K, et al. Taurine attenuates OTA-promoted PCV2 replication through blocking ROS-dependent autophagy via inhibiting AMPK/mTOR signaling pathway. *Chem Biol Interact.* 2018;296:220-8.
100. Mobasheri A, Rayman MP, Gualillo O, Sellam J, van der Kraan P, Fearon U. The role of metabolism in the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2017;13(5):302-11.
101. Chen R, Han S, Liu X, Wang K, Zhou Y, Yang C, et al. Perturbations in amino acids and metabolic pathways in osteoarthritis patients determined by targeted metabolomics analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2018;1085:54-62.
102. Yang G, Zhang H, Chen T, Zhu W, Ding S, Xu K, et al. Metabolic analysis of osteoarthritis subchondral bone based on UPLC/Q-TOF-MS. *Anal Bioanal Chem.* 2016;408(16):4275-86.
103. Anderson JR, Chokesuwattanaskul S, Phelan MM, Welting TJM, Lian LY, Peffers MJ, et al. (1)H NMR Metabolomics Identifies Underlying Inflammatory Pathology in Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis Synovial Joints. *J Proteome Res.* 2018;17(11):3780-90.
104. Xu Z, Chen T, Luo J, Ding S, Gao S, Zhang J. Cartilaginous Metabolomic Study Reveals Potential Mechanisms of Osteophyte Formation in Osteoarthritis. *J Proteome Res.* 2017;16(4):1425-35.
105. Saraswati AAEW, Sunardi D, Lubis AMT, Heru F, Mudjihartini N. Taurine Intakes Increase Superoxide Dismutase Activity in Knee Osteoarthritis. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.* 2019;217(1):012054.
106. Piao L, Wu D, Rui C, Yang Y, Liu S, Liu J, et al. The Bcr-Abl inhibitor DCC-2036 inhibits necroptosis and ameliorates osteoarthritis by targeting RIPK1 and RIPK3 kinases. *Biomed Pharmacother.* 2023;161:114528.
107. Anderton H, Wicks IP, Silke J. Cell death in chronic inflammation: breaking the cycle to treat rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol.* 2020;16(9):496-513.
108. Loeser RF, Collins JA, Diekman BO. Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(7):412-20.
109. Chen J, Gu YT, Xie JJ, Wu CC, Xuan J, Guo WJ, et al. Gastrodin reduces IL-1 β -induced apoptosis, inflammation, and matrix catabolism in osteoarthritis chondrocytes and attenuates rat cartilage degeneration in vivo. *Biomed Pharmacother.* 2018;97:642-51.

110. Hu PF, Chen WP, Bao JP, Wu LD. Paeoniflorin inhibits IL-1 β -induced chondrocyte apoptosis by regulating the Bax/Bcl-2/caspase-3 signaling pathway. *Mol Med Rep.* 2018;17(4):6194-200.
111. Jiang L, Xu K, Li J, Zhou X, Xu L, Wu Z, et al. Nesfatin-1 suppresses interleukin-1 β -induced inflammation, apoptosis, and cartilage matrix destruction in chondrocytes and ameliorates osteoarthritis in rats. *Aging (Albany NY).* 2020;12(2):1760-77.
112. Velard F, Chatron-Colliet A, Come D, Ah-Kioon MD, Lin H, Hafsia N, et al. Adrenomedullin and truncated peptide adrenomedullin(22-52) affect chondrocyte response to apoptosis in vitro: downregulation of FAS protects chondrocyte from cell death. *Sci Rep.* 2020;10(1):16740.
113. Perez-Lozano ML, Cesaro A, Mazor M, Esteve E, Berteina-Raboin S, Best TM, et al. Emerging Natural-Product-Based Treatments for the Management of Osteoarthritis. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(2).
114. Roy A, Sil PC. Taurine protects murine hepatocytes against oxidative stress-induced apoptosis by tert-butyl hydroperoxide via PI3K/Akt and mitochondrial-dependent pathways. *Food chemistry.* 2012;131(4):1086-96.
115. Sun G, Wang X, Li T, Qu S, Sun J. Taurine attenuates acrylamide-induced apoptosis via a PI3K/AKT-dependent manner. *Hum Exp Toxicol.* 2018;960327118765335.
116. Li K, Wang D, Zhou X, Shao J, Li Y, Liu X, et al. Taurine Protects Against Arsenic-Induced Apoptosis Via PI3K/Akt Pathway in Primary Cortical Neurons. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1155:747-54.
117. Prideaux M, Kitase Y, Kimble M, O'Connell TM, Bonewald LF. Taurine, an osteocyte metabolite, protects against oxidative stress-induced cell death and decreases inhibitors of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Bone.* 2020;137:115374.
118. Sun Q, Jia N, Yang J, Chen G. Nrf2 Signaling Pathway Mediates the Antioxidative Effects of Taurine Against Corticosterone-Induced Cell Death in HUMAN SK-N-SH Cells. *Neurochem Res.* 2018;43(2):276-86.
119. Iezhitsa I, Agarwal R. New solutions for old challenges in glaucoma treatment: is taurine an option to consider? *Neural Regen Res.* 2021;16(5):967-71.
120. Gentile CL, Nivala AM, Gonzales JC, Pfaffenbach KT, Wang D, Wei Y, et al. Experimental evidence for therapeutic potential of taurine in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011;301(6):R1710-22.

121. Wu G, Yang J, Lv H, Jing W, Zhou J, Feng Y, et al. Taurine prevents ethanol-induced apoptosis mediated by mitochondrial or death receptor pathways in liver cells. *Amino Acids*. 2018;50(7):863-75.
122. Wang L, Xie Z, Wu M, Chen Y, Wang X, Li X, et al. The role of taurine through endoplasmic reticulum in physiology and pathology. *Biochem Pharmacol*. 2024;226:116386.
123. Riegger J, Brenner RE. Evidence of necroptosis in osteoarthritic disease: investigation of blunt mechanical impact as possible trigger in regulated necrosis. *Cell Death Dis*. 2019;10(10):683.
124. Chen Y, Zhu CJ, Zhu F, Dai BB, Song SJ, Wang ZQ, et al. Necrostatin-1 ameliorates adjuvant arthritis rat articular chondrocyte injury via inhibiting ASIC1a-mediated necroptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;504(4):843-50.
125. Liu Z, Qian Z, Wang Y, Wang H. Necroptosis in pathogenesis of osteoarthritis and its therapeutic implications. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2022;51(2):261-5.
126. Gong Y, Qiu J, Ye J, Jiang T, Zhang W, Zheng X, et al. AZ-628 delays osteoarthritis progression via inhibiting the TNF-alpha-induced chondrocyte necroptosis and regulating osteoclast formation. *Int Immunopharmacol*. 2022;111:109085.
127. Deng M, Tang C, Yin L, Yang J, Chen Z, Jiang Y, et al. Screening chondrocyte necroptosis-related genes in the diagnosis and treatment of osteoarthritis. *Heliyon*. 2024;10(15):e35263.
128. Khodayar MJ, Kalantari H, Khorsandi L, Ahangar N, Samimi A, Alidadi H. Taurine attenuates valproic acid-induced hepatotoxicity via modulation of RIPK1/RIPK3/MLKL-mediated necroptosis signaling in mice. *Mol Biol Rep*. 2021;48(5):4153-62.
129. Yin H, Wang Z, Yang S, Zheng X, Bao Y, Lin W, et al. Taurine inhibits necroptosis helps to alleviate inflammatory and injury induced by Klebsiella infection. *Vet Immunol Immunopathol*. 2022;250:110444.
130. Yao J, Liu X, Sun Y, Dong X, Liu L, Gu H. Curcumin-Alleviated Osteoarthritic Progression in Rats Fed a High-Fat Diet by Inhibiting Apoptosis and Activating Autophagy via Modulation of MicroRNA-34a. *J Inflamm Res*. 2021;14:2317-31.
131. Lee DY, Bahar ME, Kim CW, Seo MS, Song MG, Song SY, et al. Autophagy in Osteoarthritis: A Double-Edged Sword in Cartilage Aging and Mechanical Stress Response: A Systematic Review. *J Clin Med*. 2024;13(10).

132. Sun Y, Dai S, Tao J, Li Y, He Z, Liu Q, et al. Taurine suppresses ROS-dependent autophagy via activating Akt/mTOR signaling pathway in calcium oxalate crystals-induced renal tubular epithelial cell injury. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(17):17353-66.
133. Bai J, Yao X, Jiang L, Zhang Q, Guan H, Liu S, et al. Taurine protects against As₂O₃-induced autophagy in livers of rat offsprings through PPAR γ pathway. *Sci Rep*. 2016;6:27733.
134. Li Y, Hu Z, Chen B, Bu Q, Lu W, Deng Y, et al. Taurine attenuates methamphetamine-induced autophagy and apoptosis in PC12 cells through mTOR signaling pathway. *Toxicol Lett*. 2012;215(1):1-7.
135. Men X, Han S, Gao J, Cao G, Zhang L, Yu H, et al. Taurine protects against lung damage following limb ischemia reperfusion in the rat by attenuating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Acta Orthop*. 2010;81(2):263-7.
136. Marcinkiewicz J, Kontny E. Taurine and inflammatory diseases. *Amino Acids*. 2014;46(1):7-20.
137. Prentice H, Modi JP, Wu JY. Mechanisms of Neuronal Protection against Excitotoxicity, Endoplasmic Reticulum Stress, and Mitochondrial Dysfunction in Stroke and Neurodegenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:964518.
138. Liu Q, Lu Z, Wu H, Zheng L. Chondroprotective effects of taurine in primary cultures of human articular chondrocytes. *Tohoku J Exp Med*. 2015;235(3):201-13.
139. Cheleschi S, De Palma A, Pascarelli NA, Giordano N, Galeazzi M, Tenti S, et al. Could Oxidative Stress Regulate the Expression of MicroRNA-146a and MicroRNA-34a in Human Osteoarthritic Chondrocyte Cultures? *Int J Mol Sci*. 2017;18(12).
140. Zhao D, Zhang X, Bian Y, Meng L, Wu Y, Ma Y, et al. Taurine reduces apoptosis mediated by endoplasmic reticulum stress in islet beta-cells induced by high-fat and -glucose diets. *Food Chem Toxicol*. 2023;175:113700.
141. Wang Z, Lan R, Xu Y, Zuo J, Han X, Phouthapane V, et al. Taurine Alleviates *Streptococcus uberis*-Induced Inflammation by Activating Autophagy in Mammary Epithelial Cells. *Front Immunol*. 2021;12:631113.
142. Yang L, Li Z, Ouyang Y. Taurine attenuates ER stress-associated apoptosis and catabolism in nucleus pulposus cells. *Mol Med Rep*. 2022;25(5).

143. Cao X, Peng S, Yan Y, Li J, Zhou J, Dai H, et al. Alleviation of temporomandibular joint osteoarthritis by targeting RIPK1-mediated inflammatory signalling. *J Cell Mol Med*. 2024;28(5):e17929.
144. Lee D, Yamabe N, Lee H, Lim Lee H, Kim DW, Wook Lee J, et al. Necrostatins regulate apoptosis, necroptosis, and inflammation in cisplatin-induced nephrotoxicity in LLC-PK1 cells. *Bioorg Med Chem Lett*. 2021;48:128256.

