

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

**SAĞLIKLI VE OSTEOARTRİT'Lİ KONDROSİTLERDE
MİTOHORMETİK ADAPTASYONUN İNFLAMATUAR STRESE
KARŞI OLUŞAN YANIT ÜZERİNE ETKİSİ; İN-VİTRO ÇALIŞMA**

HAZIRLAYAN

EKİN KAYA ŞİMŞEK

DOKTORA TEZİ

ANKARA- 2025

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

SAĞLIKLI VE OSTEOARTRİT'Lİ KONDROSİTLERDE
MİTOHORMETİK ADAPTASYONUN İNFLAMATUAR STRESE
KARŞI OLUŞAN YANIT ÜZERİNE ETKİSİ; İN-VİTRO ÇALIŞMA

HAZIRLAYAN

EKİN KAYA ŞİMŞEK

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. HASİBE VERDİ

ANKARA - 2025

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Ekin Kaya Şimşek tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 21/02/2025

Tez Adı: SAĞLIKLI VE OSTEOARTRİT'Lİ KONDROSİTLERDE MİTOHORMETİK ADAPTASYONUN İNFLAMATUAR STRESE KARŞI OLUŞAN YANIT ÜZERİNE ETKİSİ; İN-VİTRO ÇALIŞMA



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: ... / ... /

Öğrencinin Adı, Soyadı: Ekin Kaya Şimşek

Öğrencinin Numarası: 21810448

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

Programı: Tıbbi Biyoloji Doktora

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı:

Tez Başlığı: SAĞLIKLI VE OSTEOARTRİT'Lİ KONDROSİTLERDE MİTOHORMETİK ADAPTASYONUN İNFLAMATUAR STRESE KARŞI OLUŞAN YANIT ÜZERİNE ETKİSİ; İN-VİTRO ÇALIŞMA

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

TEŞEKKÜR

Başta tez sürecinde bilgisini, tecrübesini ve desteğini hiçbir zaman esirgmeden büyük bir heves ve sabırla bana yol gösteren danışman hocam sayın Prof. Dr. Hasibe VERDİ'ye,

Doktora programına beni kabul eden ve bu süreçte klinisyen olmamın yarattığı tüm zorluklara rağmen desteğini esirgemeyen, yeri geldiğinde tatil günlerinde bile zaman ayırarak karşısına alıp ders çalıştıran yeri geldiğinde laboratuvarlardaki sürecin devam etmesi için büyük fedakarlıklarla bize destek olan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. F. Belgin ATAÇ'a

Hem doktora programı süresince yaptığımız yayınlarda hem de tez sürecinde hoşgörülü ve yapıcı yaklaşımlarıyla Tıbbi Biyoloji Laboratuvarının kahramanları olan hocalarım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Yaprak YALÇIN ve Dr. Öğr. Üyesi H. Pınar BAYSAN ÇEBİ'ye

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

Doktoraya başlamam konusunda beni cesaretlendiren, derslere devam edebilmem için zaman yaratmama olanak sağlayan, öğrendiklerimi anlatmak için yanına her gittiğimde beni hevesle dinleyen ve başaracağıma inan Başkent Üniversitesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. İ.Cengiz TUNCAY'a

2014 yılında Ortopedi ve Travmatoloji asistanlığına başladığım günden bu yana akademik hevesimi daima destekleyen, beni devamlı olarak daha iyisi için tetikleyen, doktora süresi boyunca yol arkadaşlığını esirgemeyen dostum ve hocam Sayın Doç. Dr. Bahtiyar HABERAL'a

ÖZET

Ekin Kaya Şimşek, Sağlıklı Ve Osteoartrit’li Kondrositlerde Mitohormetik Adaptasyonun İnflamatuvar Strese Karşı Oluşan Yanıt Üzerine Etkisi; İn-Vitro Çalışma, Başkent Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Doktora Programı, 2025

Osteoartrit (OA); kronik ağrı ve hareket kısıtlılığına neden olan, dünya çapında en sık görülen kas-iskelet sistemi hastalığıdır. Her geçen gün artan kanıtlar mitokondriyonun OA patogenezinde rol oynadığını göstermektedir. Bozulmuş mitokondri fonksiyonları ve mitokondriyal kalite kontrol mekanizmalarının OA patogenezinde yer alan senesens ve kondrosit apoptozuna katkıda bulunarak OA’ın ilerlemesine neden olur. Mitohormesis; ölümcül olmayan mitokondriyal stresin hormetik yanıtı tetikleyerek hücrenin oksidatif strese karşı direncini arttırdığını ön koşullamayı ifade etmek için kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda mitokondriyal stres yollarının ile hormetik mekanizmanın aktive edilmesinin yaşam süresini uzattığının gösterilmesi bu alana olan ilgiyi her geçen gün arttırmaktadır. Dünya çapında yaygın olarak kullanılan anti-hiperglisemik ajan olan “Metformin”’in faydalı etkilerini mitokondriyal elektron taşıma zincirinin kompleks-1 aktivitesini inhibe ederek ve böylece oksidatif stresi artırıp adaptasyon mekanizmalarını tetikleyerek gösterdiği düşünülmektedir. Bu çalışmanın amacı, literatürde ilk defa osteoartritli ve sağlıklı kondrositlerin mitohormetik ön koşullama sonrasında inflamasyona direnç kazanıp kazanmadığı incelenmiştir. 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 ve sonrasında metformin aracılığıyla elektron transport zinciri elemanlarından kompleks 1 inhibe edilerek oksidatif stres indüklenmiştir. Hücre canlılığı ile yapılacak olan uygulamaların toksik doz ve süreleri MTT testi ile değerlendirildikten sonra, mitohormetik yanıtta rol oynayan FGF21, SOD2, Nrf2, mitokondriyal katlanmamış protein yanıtı elemanları ATF4, Lonp1, Trap1 ve Hsp10, apoptoz belirteçleri olan Caspase3 ve Parp1 ifadenmesi Western Blot yöntemi ile analiz edilmiştir. Reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) miktarındaki değişimler ise ROS analizi ile değerlendirilmiştir. Metformin ön koşullaması, OA’li kondrositlerde IL-1 β ile indüklenen inflamatuvar mikro çevrede oksidatif strese karşı mitokondriye spesifik SOD2 sentezini

artırarak ROS seviyelerini düşürmektedir. Bu süreç sonucunda tetiklenen mitohormetik adaptasyon, inflamatuvar stres karşısında ER stres yanıtı ile koordineli şekilde “Entegre Stres Yanıtı” üzerinden mtROS-PERK-eIF2 α -ATF4-FGF21 yolunu aktifleştirmektedir. Metformin ön koşullaması sonrasında oluşan yeni inflamatuvar strese karşı OA’li kondrositler daha güçlü bir yanıt vererek hayatta kalma yönünde adaptif bir davranış sergilemektedir. Böylece, metformin ön koşullaması, OA’li kondrositlerde mitohormetik yanıtı tetikleyerek bu hücreleri gelecekte karşılaşacakları inflamatuvar streslere karşı daha dirençli hale getirmekte ve hayatta kalmalarını sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Osteoartrit, Mitokondri, Mitohormesis, Ön koşullama, Metformin

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no: KA22/350) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

ABSTRACT

Ekin Kaya Şimşek, The Effect of Mitohormetic Adaptation on the Response to Inflammatory Stress in Healthy and Osteoarthritic Chondrocytes; In-Vitro Study, Başkent University, Institute of Health Sciences, PhD Program in Medical Biology, 2025

Osteoarthritis (OA) is the most common musculoskeletal disease worldwide, causing chronic pain and limited mobility. Increasing evidence suggests that mitochondria are involved in the pathogenesis of OA. Impaired mitochondrial function and quality control mechanisms contribute to senescence and chondrocyte apoptosis in OA pathogenesis, leading to OA progression. Mitohormesis describes the preconditioning in which non-lethal mitochondrial stress triggers a hormetic response and increases the cell's resistance to oxidative stress. Recent studies have shown that activation of mitochondrial stress pathways and hormetic mechanisms prolong life span, increasing the interest in this field daily. "Metformin", a widely used anti-hyperglycemic agent worldwide, is thought to exert its beneficial effects by inhibiting the complex-1 activity of the mitochondrial electron transport chain, thereby increasing oxidative stress and triggering adaptation mechanisms. The aim of this study was to investigate for the first time in the literature whether osteoarthritic and healthy chondrocytes acquire resistance to inflammation after mitohormetic preconditioning. Healthy and osteoarthritic chondrocytes obtained during surgery from patients with stage 3 OA, according to Kelgren-Lawrence Classification, who had undergone total knee replacement surgery, were cultured. Oxidative stress was induced by inhibiting complex 1 of the electron transport chain elements through metformin. After cell viability and toxic doses and durations of the applications were evaluated by MTT test, the expression of FGF21, SOD2, Nrf2, mitochondrial unfolded protein response elements ATF4, Lonp1, Trap1 and Hsp10, apoptosis markers Caspase3 and Parp1 were analyzed by Western Blot method. Changes in the amount of reactive oxygen products (ROS) were evaluated by ROS analysis. Metformin preconditioning decreases ROS levels by increasing mitochondria-specific SOD2 synthesis against oxidative stress in the inflammatory microenvironment induced by IL-1 β in OA chondrocytes. The mitohormetic adaptation triggered by this process activates the mtROS-PERK-eIF2 α -ATF4-FGF21 pathway through the "Integrated Stress Response" in coordination with the ER stress response to inflammatory stress. After metformin preconditioning, OA chondrocytes exhibit an adaptive behaviour towards

survival by showing a stronger response to the new inflammatory stress. Thus, metformin preconditioning triggers a mitohormetic response in OA chondrocytes, making these cells more resistant to future inflammatory stresses and ensuring their survival.

Keywords: Osteoarthritis, Mitochondria, Mitohormesis, Preconditioning, Metformin

This study was approved by the Başkent University Medical and Health Sciences Research Board (Project no: KA22/350) and supported by the Başkent University Research Fund.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
TABLolar LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	9
2.1. Eklemelerin Genel Özellikleri ve Eklemi Oluşturan Yapılar	9
2.1.1. Eklem kıkırdığı	9
2.1.2. Eklem kıkırdığının tabakalı yapısı	10
2.1.3. Eklem kıkırdığının hücresel yapısı	11
2.1.4. Ekstrasellüler matriks yapısı.....	12
2.1.5. Kıkırdak homeostazı	17
2.1.6. Esm moleküllerinin değişimi	18
2.1.7. Kondrosit – ESM etkileşimleri.....	18
2.1.8. Kondrositler ile Mekanik Yüklenme Arasındaki İlişki	19
2.1.9. Kondrosit otofajisi.....	20
2.1.10. Yaşlanmanın kıkırdak doku üzerindeki etkisi	21
2.1.11. Genetiğin kıkırdak doku üzerine etkisi.....	21
2.2. Sinoviyum ve Eklem Biyolojisi.....	22
2.2.1. Sinovial hücreler	23
2.2.2. Sinoviyal sıvı	24
2.1.3. Osteoartritte sinoviyal sıvı.....	24
2.2.4. Kemik-sinoviyum ve eklem kıkırdığı etkileşimleri.....	25
2.3. Osteoartrit.....	29
2.3.1. Osteoartrite giriş ve epidemiyoloji	29
2.3.2. Osteoartrit patofizyolojisine genel bakış.....	32
2.4 Mitokondri	35
2.4.1. Endosimbiyotik hipotez	36
2.4.2. Mitokondrinin yapısı	37
2.4.3. Mitokondriye protein transportu	42
2.4.4. Mitokondri kalite kontrolü	44

2.4.5. Mitokondriyal dinamikler	49
2.4.6. Mitofaji.....	50
2.5. Mitokondri ve OA İlişkisi.....	51
2.5.1. OA ve mitokondri disfonksiyonu.....	51
2.5.2. Mitokondriyal biyogenez.....	52
2.5.3. Mitokondriyal dinamikler	52
2.5.4. Reaktif oksijen türevleri (ROS) ve oksidatif stres	52
2.5.5. Mitofaji ve kalite kontrol mekanizmaları.....	53
2.5.6. Antioksidan savunma mekanizmaları.....	53
2.5.7. Mitokondriyal haplogruplar ve OA	54
2.6. Mitohormezis: Konsept ve Etki Mekanizması	54
2.6.1 Mitohormezis konseptinin tarihçesi	54
2.6.2. Mitohormezisin temel mekanizması.....	55
2.6.3. Mitohormezis'in moleküler yolları ve klinik perspektifler.....	55
2.6.4. Reaktif oksijen türleri (ROS) ve antioksidan yanıtlar	57
2.6.5. AMPK ve SIRT1 sinyal yolları.....	58
2.6.6. Mitokondriyal katlanmamış protein yanıtı (UPR ^{mt})	58
2.6.7. Mitokinler	60
2.6.8. TGF- β ve WNT sinyal yolları	61
2.6.9. Mitofaji ve hücre kalite kontrol mekanizmaları.....	62
2.6.10. Senolitik yollar ve hücre yaşlanma	62
2.6.11. Mekanotransdüksiyon ve mitokondri	62
2.6.12. Enerji metabolizması ve mitohormezis	62
2.6.13. Bağışıklık yanıtlarının modülasyonu	63
2.6.14. Yaşlanma sürecinde mitohormezisin rolü	63
2.6.15. Kanser hücrelerinde mitohormezis	63
2.7. Metformin, Mitokondri ve OA.....	64
2.7.1. Metformin ve etki mekanizmaları	64
2.7.2. Metformin-mitokondri ilişkisi	64
2.7.3. Metformin'in osteoartritteki olası etkileri.....	65
3. GEREÇ ve YÖNTEM	70
3.1. Örnek Toplama ve Hazırlama.....	70
3.2 Hücrelerin Çözülmesi.....	70
3.3 Hücrelerin Çoğaltılması ve İdamesi.....	71
3.4. Hücrelerin Pasajlanması	72

3.5. Hücrelerin Kondrosit Olduğunun Doğrulanması	72
3.6. Hücre Canlılığı ve Sitotoksikite Testi.....	72
3.7. Grupların Oluşturulması	74
3.8. ROS Analizi	74
3.9. Western Blot Analizi:	75
3.10. İstatistiksel Analiz.....	76
4. BULGULAR	77
4.1. Primer Kondrosit Hücre Kültürünün Hücre Canlılığının doğrulanması	77
4.2. Primer Kondrosit Hücre Kültürünün Doğrulanması	77
4.3. Metformin Uygulamasının Doz ve Sürelerinin Belirlenmesi	79
4.4. IL1 β Uygulamasının Doz ve Sürelerinin Belirlenmesi	81
4.5 Uygun Doz ve Sürelerin Belirlenmesi Sonrasında Hücre Canlılığı Testleri....	82
4.6. ROS Analiz Bulguları.....	82
4.7. Western Blot Analizi Bulguları.....	84
5. TARTIŞMA.....	96
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	102
KAYNAKLAR.....	104

TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Ekstrasellüler matriks yapısında bulunan bileşenler	12
Tablo 2.2. Mitokondriyal translokazlar	43
Tablo 3.1. Çalışmada değerlendirilen proteinler	76



ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Eklem kıkırdığının tabakalı yapısı.....	10
Şekil 2.2. Kıkırdak matriksinin bölgeleri.....	13
Şekil 2.3. Agregan ve hyaluronik asitin yapısı.....	15
Şekil 2.4. ESM kollajen olmayan molekülleri.....	17
Şekil 2.5. Normal ve osteoartritik eklem karşılaştırılması.....	23
Şekil 2.6. Osteoartritik eklem makroskopik yapısı.....	33
Şekil 2.7. Endosimbiyotik hipotez.....	36
Şekil 2.8. Mitokondrinin yapısı.....	37
Şekil 2.9. Mitokondri dış membranındaki VDAC kanallarının fonksiyonları.....	39
Şekil 2.10. Mitokondri kristasında enerji üretimi.....	41
Şekil 2.11. Mitokondri genomunun yapısı.....	42
Şekil 2.12. Mitokondriye protein hedeflenmesi.....	44
Şekil 2.13. Ubikülin-Proteazom sistemi.....	46
Şekil 2.14. Mitonükleer iletişim.....	56
Şekil 2.15. Mitohormetik adaptasyon mekanizmaları.....	56
Şekil 2.16. Nrf2 yanıtı ve gen düzenlenmesi.....	57
Şekil 2.17. Entegre stres yanıtı.....	60
Şekil 2.18. Mitokondriyal mitokinler ve özellikleri.....	61
Şekil 2. 19. Metforminin AMPK bağımlı etkisi.....	66
Şekil 2.20. Metformin'in mitokondriyal etki yolları.....	67
Şekil 2.21. Metformin ve mitofaji.....	68
Şekil 3.1. İzole edilen kondrositler.....	71

Şekil 4.1. Primer kondrosit hücre kültürü'nde hücre canlılıklarının değerlendirilmesi.....	77
Şekil 4.2. Aggrecan gen ifadenmesinin gösterilmesi.....	78
Şekil 4.3. Kolajen 2 ifadenmesinin gösterilmesi.....	78
Şekil 4.4. Kolajen 2 ifadenmesinin protein düzeyinde gösterilmesi.....	79
Şekil 4.5. 12 Saatlik metformin uygulamasının gruplarda hücre canlılığı üzerine etkisi....	80
Şekil 4.6. 18 Saatlik metformin uygulamasının gruplarda hücre canlılığı üzerine etkisi....	80
Şekil 4.7. 24 Saatlik metformin uygulamasının gruplarda hücre canlılığı üzerine etkisi....	81
Şekil 4.8. Çalışma gruplarında hücre canlılığının değerlendirilmesi.....	82
Şekil 4.9. Osteoartritli kondrositlerde DFCDA analizi OD değer grafiği.....	83
Şekil 4.10. Osteoartritli kondrositlerde DFCDA analizi OD değer grafiği.....	84
Şekil 4.11. Western Blot uygulamasında standardizasyonun gösterilmesi.....	85
Şekil 4.12. Western Blot analizinde tüm proteinlerin ifadenmelerinin gösterilmesi.....	86
Şekil 4.13. Çalışma gruplarında FGF21 ifadenmesinin gösterilmesi.....	87
Şekil 4.14. Çalışma gruplarında SOD2 ifadenmesinin gösterilmesi.....	88
Şekil 4.15. Çalışma gruplarında Nrf2 ifadenmesinin gösterilmesi.....	89
Şekil 4.16. Çalışma gruplarında Atf4 ifadenmesinin gösterilmesi.....	90
Şekil 4.17. Çalışma gruplarında Lonp1 ifadenmesinin gösterilmesi.....	91
Şekil 4.18. Çalışma gruplarında Trap1 ifadenmesinin gösterilmesi.....	92
Şekil 4.19. Çalışma gruplarında HSP10 ifadenmesinin gösterilmesi.....	93
Şekil 4.20. Çalışma gruplarında Caspase 3 ifadenmesinin gösterilmesi.....	94
Şekil 4.21. Çalışma Gruplarında Parp1 ifadenmesinin gösterilmesi.....	95

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

AMPK	AMP-activated protein kinase
ATF4	Aktivasyon Transkripsiyon Faktörü 4
ATF5	Aktivasyon Transkripsiyon Faktörü 5
COMP	Kartilaj Oligomerik Matris Proteinini
Drp1	Dinamin ilişkili protein 1
eIF2 α	Eukaryotic Initiation Factor 2-alpha
FGF21	Fibroblast Büyüme Faktörü 21
Hsp10	Heat shock protein 10
IL-1 β	İnterlökin-1 Beta
Lonp1	Lon proteaz 1
MAD	Mitokondri ile ilişkili yıkım
MAPL	Mitokondriye çapalı protein ligaz
Mfn1, Mfn2	Mitofusin 1 ve Mitofusin 2
MICOS	Mitokondri Temas Bölgesi ve Krista Organizasyon Sistemi
MMP-13	Matriks Metalloproteinaz 13
mtDNA	Mitokondri DNA'sı
Nrf2	Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2
NO	Nitrik oksit
OA	Osteoartrit
OPA1	Optik Atrofi 1 Proteinini
OXA1	Mitokondriyal Oksidaz Yerleştirme Proteinini
PARL	Mitokondri içi proteaz
PERK	Protein kinaz RNA-benzeri endoplazmik retikulum kinaz
PGE2	Prostaglandin E2
PINK1	PTEN-indüklenen kinaz 1
ROS	Reaktif oksijen türleri
SIRT1	Sirtuin 1
SLRP	Küçük lösin açısından zengin proteoglikanlar
SOD2	Süperoksit Dismutaz 2
TIM	İç membran translokazı

TOM	Translokaz dış mitokondriyal membran
TrAP1	TNF Receptor-Associated Protein 1
UPR _{mt}	Mitokondriyal katlanmamış protein yanıtı
VDAC	Voltaj bağımlı anyon kanalı
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü



1. GİRİŞ

Osteoartrit (OA); kronik ağrı ve hareket kısıtlılığına neden olan, dünya çapında en sık görülen kas-iskelet sistemi hastalığıdır. Yaşlı hastalarda yaşam kalitesini düşürmekte, engelliliğe ve sağlık sistemleri üzerine ciddi ekonomik yük oluşturmaktadır (1). Önümüzdeki 30 yıl içinde OA'li hasta sayısının iki katına çıkması beklenmektedir (2).

OA, patogenezinde eklem kıkırdak hasarı, subkondral kemik sklerozu, osteofit oluşumu ve sinoviyal membranların inflamasyonunun yer aldığı kompleks bir hastalıktır (3). Her ne kadar kıkırdak dejenerasyonu eklem dejenerasyonuna neden olan tek faktör olmasa da OA patogenezindeki rolü tartışmasızdır (2). Kondrositler, kıkırdak dokuda yerleşik olan tek hücre grubudur ve ekstrasellüler matriks üreterek yapısal ve fonksiyonel bütünlüğün devamlılığını sağlarlar. Anormal mekanik yüklenme veya pro-inflamatuar sitokinlerin neden oldukları hasar sonucunda kondrositler hasarlanabilmektedir. Bunun sonucunda inflamatuvar ve katabolik yanıt oluşur ve kıkırdak matriks dejenerasyonu ile OA ilerler (4). Eklem kıkırdağında patolojik değişikliklere neden olan diğer bir önemli faktör ise apoptoz ve otofaji arasındaki dengesizliktir (2).

Son yıllarda biyomedikal çalışmalar, yaşlanma ve hastalık patolojilerinde ortaya çıkan rolü nedeni ile mitokondriye odaklanmaktadır. Her geçen gün artan kanıtlar mitokondriyonun OA patogenezinde rol oynadığını göstermektedir. Mitokondriyon, adenosin-trifosfat (ATP) üreterek hücrenin enerji ihtiyacını karşılayan enerji reaktörüdür. Ayrıca reaktif oksijen radikalleri (ROR) üretimi, hücre içi metabolizma, kalsiyum tamponlanması, hücre çoğalması, yaşlanma ve apoptozda rol oynayarak hücrenin stabilize edilmesinde rol alır. ROR üretiminin ve nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) transfer düzenlenmesinin bozulması ATP üretimini bozarak hücresel fonksiyonları olumsuz etkiler. Bu nedenle mitokondrial sistemin düzenlenmesini sağlayan “Mitokondrial kalite kontrol” (MKK) mekanizmaları kıkırdak canlılığının sürdürülmesinde önemli role sahiptir (2, 5).

MKK mekanizmaları, temelde 3 basamağı kontrol eder. Bunlar sırasıyla; mitokondri biyogenezi (mitogenez), mitokondrial dinamikler ve mitokondrial otofaji (mitofaji) dir. MKK, mitokondriyi fonksiyonel ve yapısal olarak intakt tutar (1).

Oksidatif stres, ROR üretimi ve majör mitokondrial antioksidan protein olan süperoksit dismutaz 2 (SOD2) ekspresyonu arasındaki dengesizlik gibi mitokondrial homeostazdaki bozulmaların OA patogeneze katkıda bulunduğunu gösterilmiştir (1) (6). Mitokondri fonksiyonunu bozan metabolik hastalıklar da OA gelişiminde ayrıca önemlidir. Ek olarak bozulmuş mitokondri fonksiyonları ve MKK mekanizmaları OA patogenezinde yer alan senesens ve kondrosit apoptozuna katkıda bulunmaktadır. Bu nedenle MKK mekanizmalarında yer alan sinyal yolları ve anahtar düzenleyicileri hedef alan çalışmalar OA'nın tanısı ve tedavisinde yeni yöntemlerin ortaya koyulması için önemlidir.

Mitokondrial integrite, kalite kontrol sistemi tarafından yakından kontrol edilmektedir. Mitokondrial strese cevabı, nükleusta kodlanan transkripsiyon faktörleri ve retrograd mito-nükleer sinyalleşme ile koordine edilir. Stres ile indüklenen transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, tekrarlayan sitoprotektif ve mitoprotektif adaptasyonların gelişmesine ve strese karşı direnç oluşmasına yol açar. Bu süreç mitohormesis olarak adlandırılır. Mitohormesis; organizmal metabolizmayı, sağlığı ve ömrü etkilemektedir(7).

“Hormesis” terimi ilk kez 19. Yüzyılda ortaya çıkmış ve düşük dozlarda stimulan etki gösterirken yüksek dozda toksik etki gösteren bifazik doz yanıtına sahip maddeler veya bileşikler tanımlamak için kullanılmıştır. Günümüzdeki biyolojik tanımı ise düşük doz stres uyarımı karşısında adaptif yanıtları aktive ederek hücrelerin ve organizmaların homeostazını sağlayan ve böylece sağlığa ve ömür üzerinde etkili olan, fakat yüksek dozda ise hücreler ve organizma için zararlı etkiye sahip olan durumları tanımlamak için kullanılmaktadır. “Mitohormesis” terimi ise ölümcül olmayan mitokondrial stresin hormetik yanıtı

tetikleyerek canlılığı arttırdığı teorisine dayanarak ilk kez 2006 yılında kullanılmıştır ve takip eden çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile bu teori desteklenmiştir. Yapılan çalışmalarda mtROR (mitokondrial ROR)'lerinin ve diğer mitokondrial stres yollarının hormetik mekanizmanın kontrol altına alındığı ve yaşam süresini uzattığının gösterilmesi hormetik yanıtı olan ilginin her geçen gün artmasına neden olmaktadır(8).

Mitokondri, alfa protobakterilerin ökaryotik hücre içine alınması ve simbiyotik yaşamın başlaması ile ortaya çıkmış dinamik organeldir. Bu endosimbiyotik evrimsel süreç içerisinde mitokondrial genleri kodlayan mitokondrial DNA (mtDNA) kaybı ortaya çıkmış ve bunun sonucunda 1000 den fazla protein içeren bu organelin yalnızca 13 proteini mtDNA tarafından kodlanır hale gelmiştir. Bunlar oksidatif fosforilasyon (OKSFOS) sisteminin alt ünitelerini oluşturan proteinlerdir. Ek olarak mtDNA 22 transfer RNA (tRNA) ve 2 ribozomal RNA (rRNA) kodlamaktadır. Diğer tüm proteinler ise ökaryotik hücre nükleusunda kodlanır ve ilkönce sitoplazmaya ardından mitokondri içine transfer edilir ve burada fonksiyonel olabilmeleri için katlanır. Bu kompleks sistemin koordineli şekilde çalışması, çok sayıda taşıyıcı, şaperon ve proteazın rol oynadığı mitonükleer iletişim ile mümkündür. Mitokondrial fonksiyonu düzenlemek üzere nükleus, dış uyarıları algılayıp mitokondri ile anterograd olarak iletişim kurar, mitokondri ise içinde bulunduğu stres durumunu (OKSFOS disfonksiyonu, mtDNA defekti, mitokondrial membran potansiyelinin bozulması, ATP üretiminin azalması, ROR artması ve kalsiyumun sitozole salınımı vb..) retrograd olarak nükleusa bildirir ve nükleus, organelin buna cevap vermesini sağlayacak genlerin ekspresyonunu aktive eder. Mitokondrial stresin üstesinden gelmek için eksprese edilen proteinler genellikle proteaz ve şaperonlardır(8).

Mitokondrial stres koşulları altında aktive olan mitonükleer iletişimin amacı stresi mitokondrial, hücresel yada doku seviyesinde ortadan kaldırmaktır. İşte bu iletişim, mitohormetik cevabı da düzenler. Mitohormezis'in en önemli sinyalleri ya da süreçleri;

ROR, mitokondrial metabolitler, proteotoksik sinyaller, mitokondri-sitozol stres yanıtı ve mitokin salınımıdır.

Günümüzde ROR'lar, hücrel fonksiyonların düzenlenmesindeki temel sinyal moleküllerinden biri olarak kabul edilmektedir (8). ROR her ne kadar mitokondride gerçekleşen hücrel respirasyon sırasında oluşan yan ürünler olarak kabul edilse de, hücreler aktif olarak NADPH oksidaz (NOX) aracılığıyla bu molekülleri üreterek sinyal molekülü olarak kullanırlar. Bu sinyal ile hücrenin değişen enerji ihtiyacına karşılık olarak elektron transport sisteminin içeriği ve birlikteliği değiştirilebildiği gibi mitokondrial biyogenez de arttırılabilmektedir. ROR'lerinin çok az bir miktarı, sinyal molekülü olarak görev yapması için yeterlidir ve bu miktar ROR üretimi ile yıkımı arasındaki ince bir denge ile yönetilmektedir(9). Artmış ROR seviyeleri ise mitokondrial fonksiyonun bozulmasına, buna bağlı gelişen yaşlanmaya, kalp damar hastalıklarına, nörodejeneratif hastalıklara ve kansere neden olurlar (8, 9). Mitokondrial toksinler, hipoksi, gibi mitokondrial strese neden olan olaylar ile egzersiz gibi hücrelerin enerji statüsünü değiştiren olaylar ROR seviyelerinin yükselmesine neden olur (8). Oksidatif stres altında hücrede, redoks homeostazının sağlanması için başta NF-E2-iliskili faktör 2 (Nrf2) olmak üzere bazı stres cevabı elemanları aktive edilir. Nrf2, antioksidasyon, antioksidan biyosentezi ve metabolik kaymadan sorumlu temel düzenleyici olarak bilinmektedir. Stres koşullarında Nrf2, Kelch-like ECH-iliskili protein 1 (Keap1) ve Cullin-3 E3 ligaz tarafından yapısal olarak ubiquitinlenir ve 26S proteozomal yol ile yıkılır. Keap 1 aracılı Nrf2 yıkımı, Keap1 oksidasyonu sonucunda inhibe edilir. Keap1'in Nrf2 bağlayıcı bölgelerinin saturasyonu sonrasında yeni üretilen Nrf2, Keap1 tarafından bağlanamadığı için nükleusa transloke olur ve antioksidan yanıt elemanlarının (AREs) transkripsiyonel aktivasyonunu gen düzenleyici bölgeleri üzerinden etki ederek sağlar(9). ROR aynı zamanda mitohormetik düzenlemenin ana sinyali olarak rol oynamaktadır (8, 9). Mitokondri, ROR'lerinin majör hücrel kaynağıdır. Oksidatif

fosforilasyon ile O_2 , H_2O 'ya dönüştürülür fakat O_2 'nin küçük bir kısmı ise süperoksit anyonuna (O_2^-) dönüşmektedir. Süperoksit ise süperoksit dismutaz (SOD) enzimi aracılığı ile O_2 ve H_2O_2 'ye dönüştürülür. Ökaryotlarda 3 farklı SOD geni mevcuttur. SOD1 sitoplazmik Cu/Zn-SOD'u, SOD2 mitokondrial Mn-SOD'u ve SOD3 ise hücre dışı Cu/Zn-SOD'u kodlamaktadır⁸. Sonuç olarak; ROR miktarındaki artış, bir geri-besleme mekanizmasını aktive ederek, mitohormetik cevabı aktive eder (8). Bunun sonucunda ise konak anti-oksidan savunma mekanizmaları antioksidan enzimler: katalaz ve süperoksit dismutaz (SOD) aktive olur, mitokondrial biyogenez ve mitokondrial stres direnci artar. ROR seviyesi ise azalır (7, 8).

Mitokondrial proteazların kaybı, hasarlı ya da yanlış katlanmış proteinlerin mitokondri matriksinde birikimine yol açar. Bunun sonucunda proteazların yeniden aktivasyonunu sağlamak için mitokondrial stres yanıtı tetiklenir. Bu yanıtın ana yolağı olan mitokondrial katlanmamış protein yanıtı (UPRmt) ilk olarak memelilerde tanımlanmıştır ve bu yolağın temel düzenleyicileri proteazlar ve şaperonlardır. UPRmt sinyal yolağı günümüzde en çok C.Elegans'da çalışılmıştır. Bu sinyal yolağı solucanlarda bir transkripsiyon faktörü olan atfs-1 tarafından düzenlenmektedir. Atfs-1 mitokondriyal ve nükleer olmak üzere iki hedefleme sekansına sahiptir. Stresin olmadığı durumlarda atfs-1 mitokondriye transloke olur ve Lon proteaz tarafından hızlıca degrade edilir. Mitokondrial katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinler mitokondri matriksinde birikmeye başladığında ise stres oluşur ve UPRmt aktive olur. Mitokondrial matriks proteazı olan CLPP-1 bu hasarlanmış proteinleri parçalar ve oluşan peptidler HAF-1 transporter ile sitoplazmaya aktarılır. Sitoplazmada bu peptidlerin birikmesi atfs-1'in mitokondriye girişini engeller ve nükleusa yönlendirir. Nükleusta atfs-1, diğer transkripsiyonel düzenleyicilerle birlikte UPRmt genlerinin aktivasyonunu sağlar. Bu genler; proteazlar ve şaperonlar, mitokondrial transporterlar ve antioksidan enzimler, mitokondrial fisyon, glikoliz ve

detoksifikasyonda rol oynayan proteinlerdir. Bunun sonucunda ise stres çözülmeye ve hücrel metabolik fonksiyonları yeniden sağlanması amaçlanır. Memelilerde ise UPRmt aktive olduğunda CLPP-1 analogu olan proteaz ATF5 ekspresyonu ile HSP60, HSP10 ve mtHSP70, LONP-1 gibi şaperonların ekspresyonu artmaktadır (8).

Mitokondrial stres aynı zamanda traslasyonel ve post-traslasyonel düzeyde farklı sitozolik stres yanıtlarını aktive ederek hücrel proteazların devamlılığını sağlayacak yolları aktive eder. Entegre stres yanıtı (ESR), protein sentezinin düzenlenmesini sağlayan genel stres yanıtıdır. Bu yanıt, endoplazmik retikulum (ER) stresi, aminoasit açlığı, düşük hemoglobin seviyeleri, çift iplikli RNA ve mitokondrial stres ile tetiklenebilir. Bu stres koşulları, hücrel kinazları aktive ederek, traslasyon başlatıcı faktör eIF2 α 'yı fosforiller. Bu fosforilasyon ise kanonik protein sentezini inhibe ederek ATF4 ve ATF5 gibi kimi stres genlerinin traslasyonunu artırır. Mitokondrial stresin, memelilerde ATF4'ü arttırdığı daha önce yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Bu yolağın aktivasyonu ile mitokondrial aktivite azaltılmaya çalışılır (8). Kanser hücre serilerinde yapılan çalışmalarda ATF4'ün Nrf2'nin ana downstream efektörü olarak fonksiyon gösterdiği, her geçen gün artan sayıda bildirilmektedir. Bu bulgular, Nrf2 ve ATF4'ün redoks homeostazını sağlamak için birlikte çalıştığını göstermektedir. Diğer yandan ilginç olarak, proteozom inhibitörleri ile tedavi edilen tiroid kanser hücre serilerinde ATF4 tarafından indüklenen CHOP ekspresyonunun Nrf2 tarafından negatif olarak düzenlendiği gösterilmiştir. CHOP'un apoptozisi indükleyen transkripsiyon faktörlerinden biri olduğu göz önüne alındığında, Nrf2'nin aktivasyonunun apoptotik gen ekspresyonunu azaltıp sitoprotektif genleri artırarak hücreyi apoptozdan koruğu düşünülebilir (9).

Mitokondrial stresin oluşturduğu sinyaller, hücre dışı iletişimde de görev alırlar. Mitokondrial stresin aktive ettiği sinyal yolları "mitokin" adı verilen moleküllerin üretilmesine neden olur. Mitokinler membranlardan diffüze olarak hücrelerden diğer

hücrelere ve dokulara salınırlar. Mitokinler; mitokondri-kaynaklı peptidler ve metabolik sitokinler olmak üzere iki ana gruba farklılaşır. Mitokondri kaynaklı peptidler (humanin, humanin benzeri peptidler ve 12S rRNA-c'nin mitokondrial ORF'si) , mtDNA tarafından kodlanan peptidlerdir ve kısa açık okuma çerçevelerine sahiptirler. Bu mitokinlerin nöroprotektif, hücre metabolizmasını arttırıcı, apoptozdan koruyucu ve böylece hücre viabilitesini arttırıcı etkileri mevcuttur. Ek olarak bazı sitokinler, farklı mitokondrial zorlanmalar ile karşılaşıldığında eksprese edildiği ve metabolizmayı arttırdığı için mitokin olarak da değerlendirilmektedir. Bunlardan en iyi çalışılanları fibroblast büyüme faktörü 21 (FGF21) ve büyüme farklılaşma faktörü 15 (GDF15) dir. Bu iki molekülün farklı mitokondrial streslerde ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Genel olarak bu sitokinler, glukoz ve lipid metabolizmasını arttırarak hücrenin enerji metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar. Son yapılan çalışmalar, GDF15'in mitokondri dışı olaylarda da yükseldiğini göstermiş ve FGF21'in mitokondriye daha spesifik olduğunu bildirmiştir (8).

Metformin, tip 2 diyabetin tedavisinde dünya çapında yaygın olarak kullanılan anti-hiperglisemik ajandır. Amerikan Diyabet Birliği ve Avrupa Diyabet Çalışmaları Birliği tarafından oluşturulan rehberlerde ilk tedavi tercihi olarak bildirilmektedir. Metformin her ne kadar yıllardır klinik olarak kullanımda olsa da, glukozu nasıl düşürdüğü tam olarak bilinmemektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, metformin'in faydalı etkilerini hücresel enerji ve beslenme sensörü olan ve artmış AMP:ATP oranı veya hipoksi, glukoz azlığı gibi çeşitli streslere yanıt olarak oluşan ATP üretiminin azalması sonucu aktive olan AMPK üzerinden gösterdiğini bildirmektedir. Diğer bir çalışmada ise metforminin hepatik glukoz üretimini, hepatik enerji üretimini azaltarak düşürdüğü bildirilmiştir. Kim ve ark.'nın yaptıkları çalışmada ise metforminin mitokondrial kompleks-1 aktivitesini inhibe ederek

FGF21 gen ekspresyonunu ve PERK-eIF2 α -ATF4 yolağı üzerinden sekresyonunu arttırdığını fare ve insan denekler üzerinde gösterilmiştir (10).

Bu çalışma ile literatürde ilk defa sağlıklı ve osteoartritli insan kondrosit kültürlerinde metformin kullanılarak indüklenen oksidatif stres sonucunda aktive edilen mitohormetik mekanizmanın, kondrositler üzerinde oluşturulan akut şiddetli oksidatif strese karşı koruyuculuğunun gösterilmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Eklemelerin Genel Özellikleri ve Eklemi Oluşturan Yapılar

Eklem, vücudun hareket ve yük taşıma işlevlerini yerine getirebilmesi için farklı dokuların koordineli bir şekilde çalıştığı kompleks bir anatomik yapıdır. Eklemi oluşturan temel yapılar arasında kıkırdak, sinoviyal membran, sinoviyal sıvı, subkondral kemik, bağlar, menisküs ve çevresel yumuşak doku elemanları yer almaktadır. Her bir bileşen, eklemün biyomekanik dayanıklılığını sağlamak ve patolojik süreçlere karşı direncini artırmak için spesifik işlevler üstlenir.

2.1.1. Eklem kıkırdağı

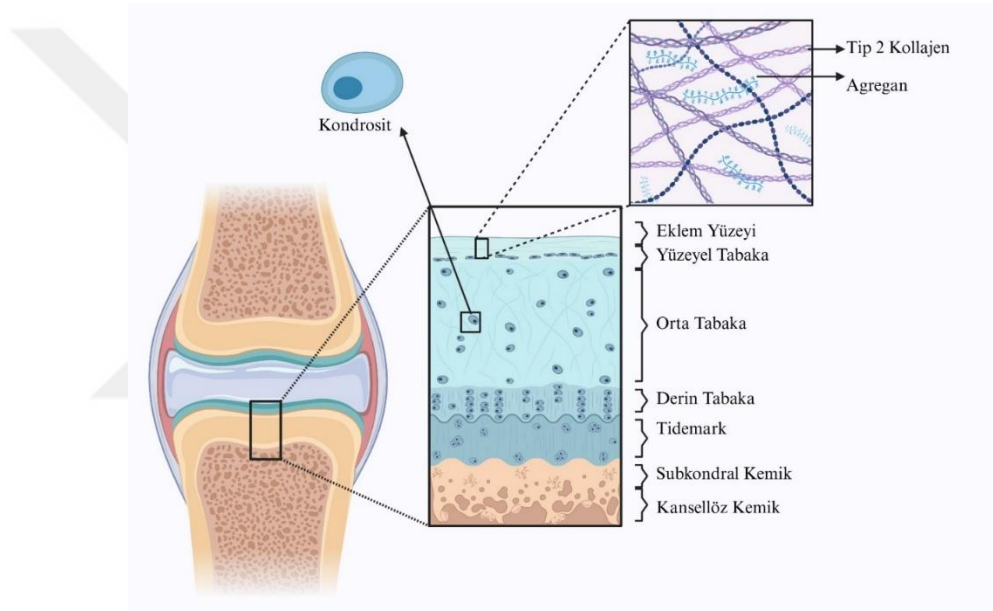
İnsan vücudunda bulunan ve serbest hareket etmeye olanak tanıyan eklem olan diyatrodial eklemlerde (örn: diz, omuz, kalça ve dirsek vb.) kemiğin eklem ile ilişkili yüzeyini kaplayan hyalin kıkırdak; beyaz ve pürüssüz bir dokudur. Yetişkin eklem kıkırdağı %15-40 oranında ekstrasellüler matriksten ve %60-85 oranında sudan oluşmaktadır. Bu yapının temel hücreleri mezenkimal kök hücrelerden köken alan kondrositlerdir. Kondrogenез yani kıkırdak oluşumu, kıkırdak dokunun bütünlüğünün devamını sağlayan birçok kıkırdak spesifik yapısal bileşenin ve düzenleyici faktörlerin genlerini transkripsiyonel olarak aktive eden temel transkripsiyon faktörlerinden biri olan SOX9'a ihtiyaç duyar.

Hyalin kıkırdak, sinoviyal eklemlerde eklemle ilişkili kemik yüzeyi (subkondral kemik) örter ve yüzeyi eklem boşluğuna bakar. Eklem boşluğunda yer alan ve sinoviyal dokudaki sinovisitlerce üretilen sinoviyal sıvı ile devamlı temas halindedir. Kıkırdağın eklem içindeki bölgesel yapısal organizasyonu doğrudan dokunun kesme, kompresyon ve gerilme kuvvetlerinin etkisi altında şekillenir. Bu nedenle eklem kıkırdağı sağlığı için, kıkırdağın biyomekanik olarak yüklenmesi hayati öneme sahiptir. Örnek olarak kişilerin bireysel fiziksel aktivite farklılıklarına bağlı olarak kıkırdak dokudaki hücre dışı matriks bileşenlerinin miktarı lokal olarak değişebilmektedir.

Sinoviyum, kemik, bağlar, tendonlar ve diz eklemünde menisküs ile kıkırdak doku, eklemün bir bütün olarak uygun şekilde hareket etmesini sağlar. Günlük hayatta bu yapılar, hareket sırasında farklı derecelerde ve yönlerde biyomekanik kuvvetlere maruz kalırlar. Eklem kıkırdağının benzersiz yapısı, kemiklerin birbirine neredeyse sürtünmesiz bir yüzey aracılığı ile temas etmesine ve böylece hareketine olanak tanır. Bu sayede eklemler, vücut ağırlığının birkaç katına kadar yük taşıma kapasitesini kazanmış olurlar.

2.1.2. Eklem kıkırdığının tabakalı yapısı

Kondrositler, kıkırdak doku hacminin %1-5'ini oluştururlar. Kondrositleri, dokuları oluşturan diğer hücre türlerinden ayıran temel özellik, birbirleri ile temaslarının olmamasıdır. Her kondrosit kendisini çevreleyen ekstrasellüler matriksi (ESM) sentezleyen ve devamlılığını sağlayan, birbirinden bağımsız fonksiyonel bir metabolik birim olarak işlev görür. Kondrositlerin oluşturduğu ESM'in temel makromolekülleri Tip II Kollajen ve yüksek molekül ağırlıklı bir proteoglikan olan agregan'dır. Kıkırdak makroskopik olarak sıkışmaya dirençli, pürüzsüz ve beyaz görünümündedir. Mikroskopik olarak ise yapısı derinliğine göre değişen farklı tabakalardan oluşmaktadır. Bu tabakalar, farklı kıkırdak bölgelerinin işlevine göre uygun şekilde düzenlenmiştir. (ŞEKİL 2.1)



Şekil 2.1. Eklem Kıkırdığının Tabakalı Yapısı

Yüzeyin hemen altındaki ilk %10'luk kıkırdak dokusu, yüzeyel tabaka olarak adlandırılır. Bu tabaka, yassılaştırmış kondrositler ve kıkırdak yüzeye paralel olarak uzanan tip 2 kollajen lifleri ile karakterizedir. Kollajen lifleri paralel olarak yerleşerek, yüzeydeki osmotik şişmeyi baskı altına alır ve yapıyı çekme kuvvetlerine karşı dirençli hale getirir. Bu tabakada proteoglikan içeriği düşüktür. Bu tabakanın temel işlevi, eklem yüzeylerinin düşük sürtünme ile birbiri üzerinde kaymasını ve böylece eklem hareketini sağlamaktır.

Yüzeyel tabakanın hemen altında yer alan, orta veya geçiş tabakası olarak adlandırılan tabakada ise kondrositler tek hücre birimleri halinde bulunurlar ancak tip 2 kollajen lifleri yüzeye paralel olarak değil düzensiz şekilde dağılmıştır. Bu tabakada

kondroitin sülfat ile modifiye edilmiş proteoglikanlar en yüksek yoğunlukta bulunurlar. Kıkırdağın kesme ve sıkışma kuvvetlerine karşı direnç göstermesine katkı sağlarlar.

Derin veya radyal tabaka olarak adlandırılan alanda ise beş ile sekiz hücreden oluşan dikey kolonlar şeklinde kümelenmiş yuvarlak kondrositler vardır. Bu tabakada kollajen lifleri kıkırdak yüzeyine dik olarak yerleşmiştir. Proteoglikan içeriği en yüksek olan bu tabaka, sıkışma kuvvetleri en dirençli tabakadır.

Derin tabakanın hemen altında, kalsifiye olmuş kıkırdak tabakasını eklem kıkırdağından ayıran tidemark bulunur. Kalsifiye kıkırdak, hipertrofik kondrositler içerir ve eklem kıkırdağını subkondral kemiğe tutturun yapıdır.

Subkondral kemik plağı, vaskülarize bir yapıdır ve kalsifiye kıkırdak tabakasına uzanan damarlar mevcuttur. Bu vasküler kanallarda nöronların da olduğu bilinmektedir. Kıkırdak-kemik ara yüzü yani osteokondral bileşke, osteoartrit gibi patolojilerde hastalık patogenezinde rol oynayabilmektedir.

2.1.3. Eklem kıkırdağının hücresel yapısı

Eklem kıkırdağı, avasküler ve anöral bir dokudur. Bu dokuda bulunan tek hücre türü kondrositlerdir. Yetişkin bireylerde, eklem kıkırdağının hücresel yoğunluğu doku derinliğine bağlı olarak belirgin farklılıklar gösterir. Hücresel yoğunluğun en yüksek olduğu bölge yüzeyel tabakadır. Bu bölgede kondrositler, doku hacminin %10'undan azını oluştururlar. Derine doğru inildikçe kondrosit yoğunluğu kademeli olarak azalır. Diz eklemine femoral kıkırdaktaki hücresel yoğunluk, kıkırdak kalınlığı ile ters orantılıdır fakat kıkırdağın kalın olması yük taşıma kapasitesini arttırmaktadır.

Her eklemden, eklem kıkırdağının hücresel yoğunluğu ve dağılımı birbirinden farklıdır. Örneğin, ayak bileği eklemine yüzeyel tabakada diğer eklemlere göre daha incedir. Bunun sebebinin o eklem etki eden kuvvetlere bağlı olduğu düşünülmektedir. Derin tabakadaki hücre yoğunluğu ise eklemden eklem kısmen sabit kalır.

Kondrositlerin çevresindeki geniş ESM, hem kondrositleri korur, hem de kondrositler tarafından devamlı olarak sentezlenerek devamlılığı sağlanır. Kondrositlerin fenotipi, bulundukları doku bölgelerine göre değişiklik göstermektedir. Kondrositlerin morfolojisi ve salgıladıkları ESM'in içeriği, yerleştikleri derinliğe göre farklılık göstermektedir. Yüzeyel tabakada yer alan kondrositler, eklem yüzeyini kayganlaştıran "lumbricin" adı verilen bir molekül üretirler. Farklı olarak yapısal stabiliteyi ve biyomekanik

kuvvetlere karşı direnci sağlayan orta ve derin tabakada ise bol miktarda tip 2 kollajen ve agregan üretimi mevcuttur. Bu tabakada kondrositler ve onları çevreleyen ESM birlikte “kondron” adı verilen fonksiyonel birimi oluşturur.

Avasküler ve anöral olan kıkırdak dokusunun, sınırlı bir iyileşme kapasitesi vardır. Kıkırdak hasarı ve dejenerasyonu için önemli bir risk faktörüdür. Son yıllarda yapılan çalışmalarda kıkırdak kökenli progenitör hücreler (CSPC) gözlemlenmiş olup bu hücrelerin kıkırdak yaralanması sonrasında ortaya çıkarak hasarlı bölgeye göç ettiği ve doku onarımına katıldığı düşünülmektedir. Fakat bu hücreler ile ilişkili veriler literatürde oldukça sınırlıdır.

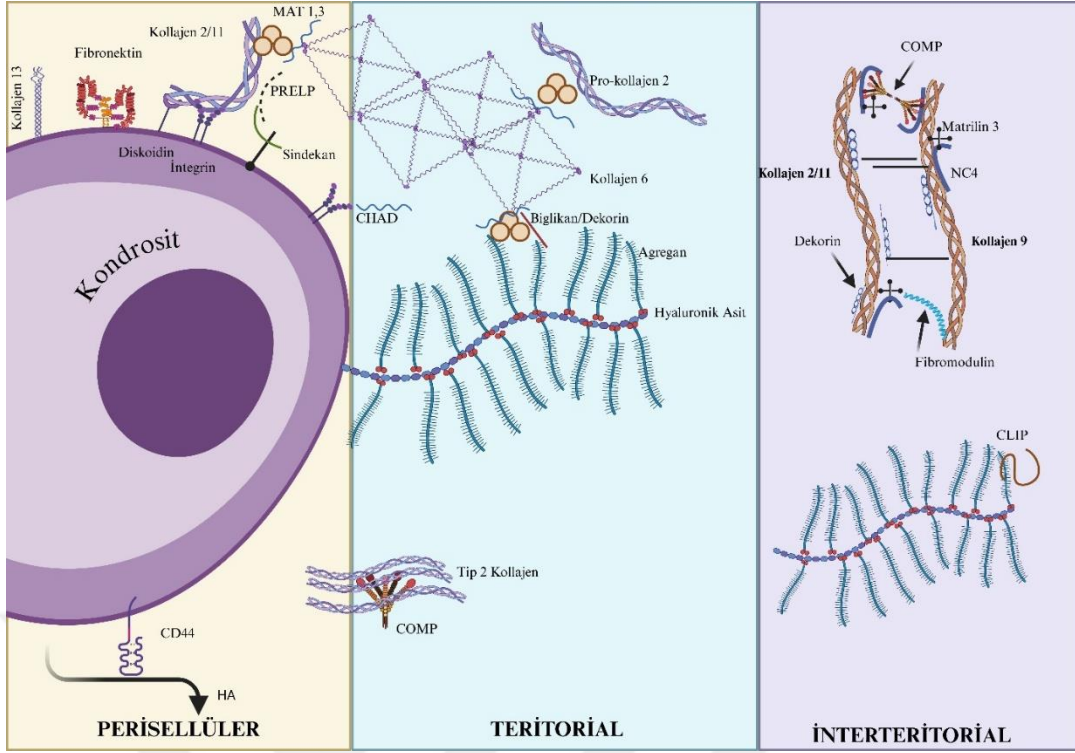
2.1.4. Ekstrasellüler matriks yapısı

Eklem kıkırdağının kendine özgü biyomekanik özellikleri, özelleşmiş moleküler organizasyonundan ve ana bileşenlerinin biyokimyasal özelliklerinden kaynaklanmaktadır. (Tablo 1)

Tablo 2.1. Ekstrasellüler Matriks Yapısında Bulunan Bileşenler

Kollajenler	Proteoglikanlar	Kollajen Olmayan Proteinler	Membran Proteinleri
Tip 2	Agregan	Fibronektin	Syndecan
Tip 3	Biglikan	Trombospondin 5 (COMP)	CD44
Tip 9	Dekorin	Matrilin-1	Integrinler • $\alpha 1$ • $\alpha 2$ • $\alpha 3$ • $\alpha 5$ • $\alpha 6$ • $\alpha 10$ • $\beta 1$ • $\beta 3$ • $\beta 5$
Tip 10	Fibromodülin	Matrilin-2	
Tip 11	Lumican	Matrilin-3	
Tip 7	Asporin	Tenascin-C	
Tip 12/14	Kondroaderin	Trombomodülin	
Tip 13	Osteoaderin	Kondroaderin	
	Prolargin (PRELP)	Kıkırdak intermediate layer protein (CILP)	
		Fibulin	

Sağlıklı kıkırdakta hücre dışı matris (ECM) moleküllerinin bağlantısı ve doku içerisindeki dağılımı, matrisin kondrositlere yakınlığına göre değişkenlik göstermektedir. Temelde kıkırdak matrisi, her biri kendine özgü moleküler organizasyona sahip olan perisellüler, teritoryal ve interteritoryal matris olmak üzere üç alana ayrılabilir. (Şekil 2.2)



Şekil 2.2. Kıkırdak Matriksinin Bölgeleri

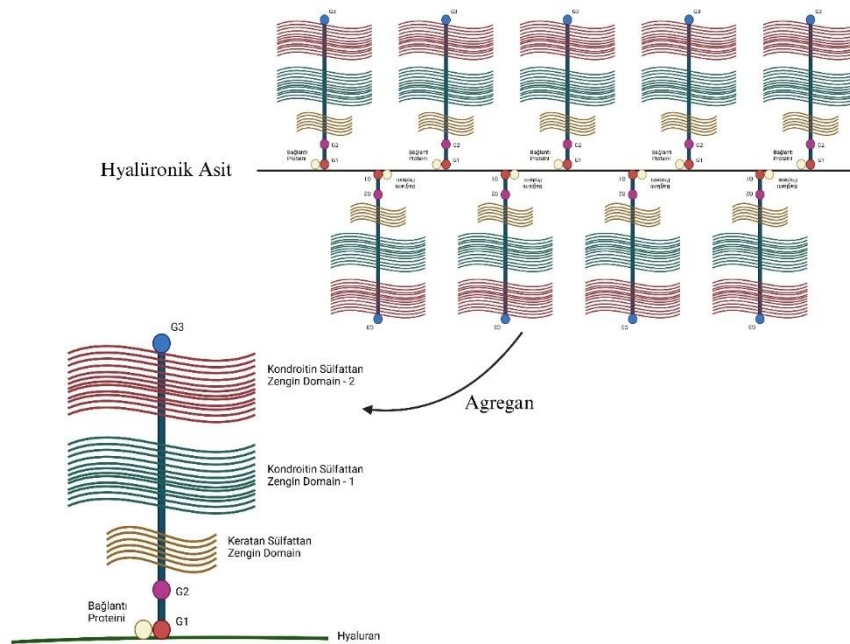
Bu üç alanda kollajen farklı şekilde organize olmuştur. Her kondrositin doğrudan çevresini saran perisellüler matriks, her bir kondrositin etrafında sıkı dokulu, yuva benzeri bir yapı oluşturan tip VI kollajen liflerinden oluşur ve kalınlığı 2 ila 4 μm arasında değişir. Perisellüler matriksin çevresindeki 5 ila 10 μm kalınlığındaki bölge ise teritoryal matriks olarak adlandırılır ve burada daha kalın kollajen lifleri bir hücre veya hücre grubunun etrafında radyal demetler oluşturur. Son olarak, interteritoryal matriks, geniş tip II kollajen demetlerini içerir. Farklı matriks bölgelerinde diğer proteinler de farklı düzeylerde eksprese edilir. Örneğin, perisellüler matriks, hücre-matriks etkileşimleri ve büyüme faktörü tutulumuyla kondrosit aktivitesini düzenleyebilen fibronektin, biglikan ve perlekan gibi proteoglikanlar açısından zengindir. Buna karşılık, kıkırdak oligomerik matriks proteini (COMP) yalnızca interteritoryal matriks bölgesinde eksprese edilir ve burada kollajen çapraz bağlarının oluşumunda rol oynar. Bu bölgelerin mekanik özellikleri de farklılık göstermektedir. Perisellüler matriksin, kondrositlerden daha sert olan yapısı, mekanik uyarıları filtreler ve kondrositlerin mekanotransdüktör olarak rol oynamasına yardımcı olur. Kondrositler, perisellüler matriks ile primer silyum adı verilen organeller aracılığıyla iletişim kurar. Bu silyumlar, hücre membranından dışarı doğru uzanarak matriks ile etkileşime girer.

Bu etkileşimde integrinlerden ve geçici reseptör potansiyel vanilloid 4 (TRPV4) gibi iyon kanalları kullanılır.

Normal kıkırdak su içeriği, ıslak ağırlığının %65'i ile %80'i arasında değişir. Dokudaki su akışı; fizyolojik, mekanik ve kimyasal yasalara bağlı olarak gerçekleşir. Avasküler olan kıkırdak dokunun beslenmesi de bu sayede olur. Eklem kıkırdağı güçlü bir şekilde su tutma kapasitesine sahiptir. Bu kapasite, tip 2 kollajen ve proteoglikanların teması ile sağlanır.

Eklem kıkırdağına mekanik kuvvetlere dayanma kuvveti veren yapı; yoğun şekilde çapraz bağlanmış, bulunduğu derinliğe göre organizasyonu değişen kollajen fibrillerdir. Eklem kıkırdağındaki ana kollajen türü COL2A1 geni kaynaklı üç özdeş α zincirinden oluşan tip 2 kollajen üçlü sarmalıdır. Prokollajen'in iki farklı izotopu bulunmaktadır. Tip 2A izoformu kondroprogenitör hücreler, Tip 2B izoformu ise yetişkin kıkırdak dokusu için spesifiktir. Her bir α zinciri birbiri ile sarmal oluşturarak kollajen molekülünü oluşturur. Bunlar da bir araya gelerek çekme kuvvetlerine dayanıklılık sağlayan uzun ve dallanmamış bantlı fibriller meydana getirir. Tip 2 kollajen fibrilleri, fibrillerinin içerisinde ya da çevresinde çok az miktarda minör kollajenler içerirler. Minör kollajenler sırasıyla Tip 3, Tip 6, Tip 9 ve Tip 11 kollajenlerdir. Tip 3 kollajen; ESM hasarına yanıtta, yaşlanma ve osteoartritte ortaya çıkan zayıflamış tip 2 kollajen ağırlığının bütünlüğünün artırılmasında rol oynar. Tip 6 kollajen; mikrofilamentlerle birlikte sıkı bir örgü oluşturarak kondrositlerin etrafında yuva benzeri yapı oluşturur. Kondrositle birlikte çevresindeki yuva kondron olarak adlandırılır. Bu yapı, hücre ile çevresi arasındaki iletişimin gerçekleştiği alandır. Tip 9 kollajen; tip 2 kollajen liflerinin yüzeyini kaplar, ESM'de fibronektin gibi diğer moleküllerle köprüler kurarak yapısal stabiliteyi destekler. Tip 11 kollajen ise heterofibrillerin lateral büyümesini düzenleyen ana temeli oluşturur. Yaşlanma ile N-propeptidleri işlenmemiş olan tip 3 kollajen molekülleri, tip 2 kollajen'e çapraz şekilde bağlanır. Tip 3 kollajen'in doku iyileşme ve onarım bölgelerinde fazla miktarda bulunduğu göz önüne alındığında, zayıflamış tip 2 kollajen fibril ağını sağlamlaştıran bir düzenleyici olduğu düşünülmektedir. Kıkırdak dokunun hidrofilik yapısını sağlayan temel yapı, proteoglikanlardır. Kıkırdakta başlıca bulunan proteoglikan "agregan" olup 220-250 kDa protein çekirdeğine sahip üç globüler domain'den (G1, G2 ve G3) oluşur. G1 ve G2 bölgeleri, amino terminale yakındır ve kısa bir bağlantı ile birbirlerine bağlıdırlar. G3 bölgesi ile korboksil terminalde yer alır ve G2-G3 bölgeleri arasında kalan alan yoğun keratan sülfat ve yaklaşık 100 kondroitin sülfat glikozaminoglikanlarından (GAG) oluşur. (Şekil 3) Tüm GAG'lar tekrar eden karboksil

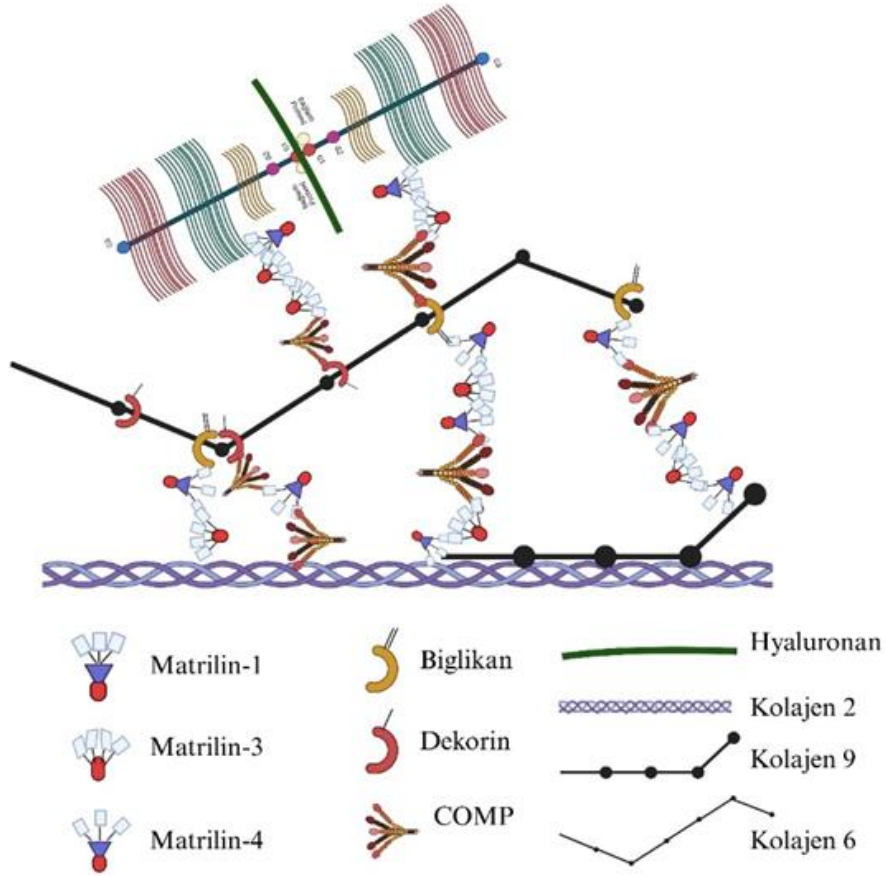
(COOH) ve sülfat (SO₄) gruplarına sahiptir ve çözeltide iyonize olarak COO⁻ ve SO₃⁻ yüklerini alırlar. Bu durum dokuya negatif yük kazandırır. Aggrekan monomerleri, polisakkarit hyaluronan ile etkileşim yoluyla çok büyük agregatlar oluşturur. G1 domaini, hyaluronan ile kovalent olmayan bir şekilde bağlanır ve bu etkileşim, 45 kDa'lık bağlantı proteini ile stabilize edilir ve böylece 200 MDa'dan büyük moleküler ağırlığa sahip agregatlar oluşur. Negatif yüklü bu agregatlar kollajen fibril ağında sıkıca paketlenildiğinden, sabit yükler arasındaki mesafe sadece 10 ila 15 Å kadardır ve bu, güçlü yük-yük itici kuvvetlerine neden olur. Bu nedenle, proteoglikan agregatlarının hapsedildiği kollajen ağı içinde oluşan sınırlayıcı kuvvetler, suyu kuvvetle tutan sağlam ve kohezyonlu bir matrisi destekler. Aggrekan “jeli”, aynı zamanda kıkırdaktaki kollajen fibrillerini kollajenaz enzimi tarafından bozulmaya karşı korur. Yapılan deneylerde, agreganı tükenmiş dondurulup çözülmüş kıkırdakta kollajenin matris metalloproteinaz (MMP)-1 ile inkübasyonu sonrasında tamamen parçalandığı, buna karşın agreganı sağlam olan kıkırdakta kollajenin bozulmadığı gösterilmiştir. Ayrıca, MMP aktivitesini engellemeyen ancak agreganaz inhibitörleri ile tedavi edilen kıkırdak örneklerinde, katabolik sitokinlere maruz kalındığında hem agreganın parçalanmasının hem de kollajenolizisin önlendiği gözlemlenmiştir. Bu bulgular, agreganın kollajen fibrillerinin patolojik yıkımını önleyici koruyucu bir rol oynadığını göstermektedir.



Şekil 2.3. Agregan ve Hyaluronik Asitin Yapısı

2.1.4.1. Kıkırdak ESM'indeki kollajen olmayan moleküller ve işlevleri

Kıkırdak dokuda ESM içerisinde bulunan kollojen olmayan moleküller, dokunun organizasyonu ve özelliklerinin korunmasında önemli işlevler üstlenirler. Perisellüler matrikste yer alan perlekan, bir heparan sülfat proteoglikanıdır ve kondrositlere fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF2) sunulmasının düzenlenmesinde kritik rol oynarlar. Ayrıca yine perisellüler matriksteki tip 6 kollajen ağ yapısının oluşması; dekorin, biglikan, luminikan ve fibromodulin gibi küçük lösin açısından zengin proteoglikanlar (SLRP) tarafından düzenlenir. Bu küçük proteoglikanlar, agregan gibi agregat oluşturmazlar ve daha kısa protein çekirdeğine sahiptir. Biglikan, iki kondroitin veya dermatan sülfat zinciri ile glikozillenmiştir. Dekorin, tek bir kondroitin veya dermatan sülfat zinciri taşır. Fibromodulin ise beş adede kadar keratan sülfat zinciri ile glikozillenebilir. Dekorin ve fibromodulin, tip I ve tip II kollajene bağlanabilir ve kollajen ağının düzenlenmesi ve stabilizasyonunda rol oynayabilir. SLRP'ler ayrıca trombomodulin 5 (COMP) ve matrilinler gibi diğer moleküllerle de etkileşime girebilir. Matrilin 1-4, geniş bir dağılım gösteren ve genellikle protein-protein etkileşimlerinde yer alan von Willebrand Faktör A (vWFA) domainleri içeren protein ailesini oluşturur. Kıkırdakta matrilin-1 ve matrilin-3 baskındır ve farklı kollajen tiplerine ve agregana bağlanarak fibriller bileşenleri birbirine bağlayıp kollajen ağları ile agregan arasındaki etkileşimleri kurarak matris montajını destekler. COMP da bu karmaşık yapının bir parçasıdır. Beş özdeş alt birimden oluşur ve bu alt birimler N-terminal bölgesinde coil-coil domaini ile bir arada tutulur. C-terminal bölgesi ise diğer matris moleküllerine bağlanan globüler bir domeine sahiptir. COMP'nin beş kat bağlanma kapasitesi sayesinde tek bir COMP molekülü, beş kollajen molekülünü hızlı bir şekilde bir araya getirebilir ve bu sayede erken kollajen fibril oluşumunda katalizör görevi görebilir. Ancak, osteoartrit sırasında COMP seviyeleri dramatik şekilde artar ve tek bir COMP molekülü, bir kollajen molekülündeki tüm bağlanma bölgelerini işgal edebilir. Bu durum, fibril oluşumunu engelleyerek doku onarımını etkili bir şekilde aksatır. (Şekil 4)



Şekil 2.4. ESM Kollajen Olmayan Molekülleri

2.1.4.2 Lumbrikin ve proteoglikan 4

Eklem hareketlerinin en az sürtünme altında sağlanabilmesi için kondrositler ve sinoviyositler tarafından mürin benzeri bir glikoprotein olan “lumbrikin” salgılanır. Proteoglikan 4 (PRG4) olarak da bilinen lumbrikinin temel işlevlerinden biri eklem kayganlığının sürdürülmesi ve hücre yapışmanın önlenmesidir. Lumbrikin ifadenmesinin yetersizliği, erken eklem dejenerasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Ancak eklem kıkırdak yüzeyindeki çok düşük miktardaki sürtünmeyi yalnızca lumbrikin ile açıklamak mümkün değildir. Güncel araştırmalar, hyaluronan moleküllerinin lumbrikin ile birlikte hidrasyon tabakaları oluşturduğunu ortaya koymaktadır.

2.1.5. Kıkırdak homeostazı

Kıkırdak dokunun homeostazından, bu dokudaki tek hücre tipi olan kondrositler sorumludur. Kondrosit metabolizması, bu dokunun avasküler, alenfatik ve anöral olması nedeniyle gerekli desteklerden yoksun olarak çalışır. Bu nedenle kondrositler, ihtiyacı olan hammaddeleri sinoviyal sıvı ve subkondral kemikten difüzyon yoluyla almaktadır. Kondrositler bu ortamda enerjilerini büyük ölçüde oksijensiz olarak glikoliz ile elde ederler.

Genel olarak kıkırdak dokusunun mikro çevresi hipoksiktir. Oksijen seviyeleri doku derinliğinin artması ile giderek azalır. Normal koşullarda kondrositler bölünmez ve kıkırdak hasarını tamir kapasiteleri oldukça sınırlıdır.

2.1.6. ESM moleküllerinin değişimi

Sağlıklı kıkırdakta ESM yenilenmesi yavaş gerçekleşir. ESM'in ana bileşeni olan tip 2 kollajen (ortalama 100 yıl) ve agregan gibi moleküllerin yarılanma ömrü oldukça uzundur. Osteoartritli bireyler de dahil olmak üzere iskelet olgunluğuna ulaşmış bireylerde kollajen döngüsünün düşük olduğu gösterilmiştir. Moleküler yaş belirteci olarak aspartik asit rasemizasyonu kullanılarak yapılan çalışmalarda, insan kıkırdağındaki büyük aggregan monomerinin yarı ömrünün 3,4 yıl, serbest hyaluronan bağlanma bölgesi fragmanlarının yarı ömrünün ise 25 yıl olduğu önerilmiştir. Bu bulgu, büyük monomerin oluşum ve değişim hızının, serbest bağlanma bölgesi parçalarının nihai yıkımından çok daha hızlı olduğunu ve yaşlanma ile birlikte bu parçaların kıkırdakta biriktiğini açıklamaktadır.

Artrit hastalıklarda sitokinler, kondrositleri proteolitik enzimler salgılamaya teşvik ederek matriksin yıkımına neden olur. ADAMTS-4 ve ADAMTS-5 olarak bilinen trombospondin motifli metaloproteinazlar (agreganazlar), agregan çekirdek proteinini beş farklı bölgeden keserek sinoviyal sıvıya difüze olan çok sayıda fragman oluşturur. Agregan çekirdek proteininin interglobüler domenindeki Glu373 ve Ala374 amino asitleri arasındaki parçalanma, agreganın GAG taşıyan büyük kısmının matriksten kaybolmasına ve işlevinin bozulmasına yol açar. ADAMTS-5, osteoartrit tedavisinde bir hedef olarak büyük ilgi görmektedir ve çeşitli şirketler, bu enzimin aktivitesini engelleyen küçük moleküller veya antikörlerin hastalığı modifiye edici etkilerini araştırmaktadır. ADAMTS-4'ün matrilin-3 proteinini, ADAMTS-7 ve ADAMTS-12'nin ise COMP proteinini parçalayabildiği bildirilmiştir. Sürecin devam etmesi ile, kollajen ağı özellikle MMP-13 gibi kollajenazların etkisine karşı daha savunmasız hale gelir. Oluşan spesifik parçalanma ürünleri sinoviyal sıvıda ve hatta idrarda izlenebilmekte ve osteoartritin patogeneziyle ilişkin değerli bilgiler sağlamaktadır.

2.1.7. Kondrosit – ESM etkileşimleri

ESM bileşenleri, çevresel değişikliklere hücre cevabının verilmesinde, farklılaşma ve hayatta kalma gibi süreçlerde önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin, SLRP gen ailesi üyeleri, sinyal molekülleri olarak işlev görebilir ve çözünebilir SLRP'ler, insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) reseptörü ve epidermal büyüme faktörü reseptörü gibi çeşitli hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanarak hücrel davranışları düzenleyen aşağı akış sinyal

olaylarını tetikleyebilir. Ayrıca bu glikoproteinler, farklı sitokinlere, büyüme faktörlerine ve morfojenlere (örneğin, TGF- β) bağlanarak bunları tutabilir ve sinyal yollarını etkileyebilir. Sağlıklı kıkırdakta TGF- β ekspresyonu, biyomekanik sinyallerle düzenlenir ve kondrosit fenotipinin korunmasında rol oynar. Ancak osteoartritte TGF- β seviyeleri yükselir ve bu durum fibrozis ve kemik değişikliklerini teşvik eder. TGF- β seviyesindeki bu artış, kıkırdak matriks moleküllerinin parçalanması sonucu bağlı büyüme faktörlerinin serbest kalmasından veya eklemdeki diğer hücreler tarafından artan üretimden kaynaklanabilmektedir. Perisellüler matriks içinde, matriks molekülleri hücre yüzeyi reseptörleriyle etkileşime girer. Fibronektin, integrinler ve syndecan gibi heparan sülfat proteoglikanlarına, Kollajen, diskoid domain reseptörlerine (DDR), hyaluronan ise CD44 reseptörlerine bağlanır. Kondrosit yüzeyindeki bu reseptörlere bağlanan birçok molekül, hücreden uzakta yer alan teritoryal matriks içindeki moleküllerle de etkileşime girerek matriks ve kondrosit arasında bir iletişim kurar. Bu sayede kondrosit, matrikste neler olup bittiğini algılayabilir ve buna uygun şekilde yanıt verebilir. Perisellüler matrikste bulunan matrilin seviyesinin, kondrositlerin mekanik hassasiyetini değiştirebileceği öne sürülmüştür.

ESM yaşlanma, artrit veya yaralanma gibi patolojik süreçler nedeniyle değiştiğinde, moleküler etkileşimler ve hücresel yanıtlar büyük ölçüde değişir, bu da metabolik çevrenin bozulmasına ve genellikle kıkırdak işlevinin zarar görmesine yol açar. Ek olarak, matriksten serbest kalan aktif moleküller inflamasyona katkıda bulunabilir. Örneğin, fibromodulin ve COMP gibi moleküller komplemanı aktive edebilir ve böylece inflamasyona katkıda bulunur ve bu durum matriksin daha fazla yıkımına neden olur. Fibronektin, plazma ve dokularda bulunan multimerik bir glikoproteindir ve normal kıkırdakta az miktarda bulunur. Ancak osteoartritlik kıkırdak, 10 kat daha fazla fibronektin içerir ve bu, sinoviyal sıvıda da artış gösterir. Fibronektin parçalanma ürünleri, kondrositlerde katabolik bir fenotipi indükleyebilir ve bu parçaların MMP-13 ve ADAMTS-4/5 gibi enzimleri uyardığı gösterilmiştir. Osteoartritlik kıkırdakta ADAM-8, spesifik fibronektin parçalarını oluşturmakla ilişkilendirilmiştir. Tenaskin-C, fibronektin ve hyaluronik asit parçaları gibi matriks bileşenleri, Toll-benzeri reseptörler (TLR) aracılığıyla bağlanarak kondrositler, sinoviositler ve makrofajlar gibi birçok hücrede kemokin ve sitokin salınımına yol açar.

2.1.8. Kondrositler ile mekanik yüklenme arasındaki ilişki

Kıkırdak doku, günlük yaşamda farklı stres türlerine maruz kalır. ESM'in yapısı bu gereksinimleri karşılayacak şekilde organize olmuştur. Böylece günlük aktiviteler sırasında

oluşan farklı yön ve şiddetteki biyomekanik kuvvetler karşısında verdiği hücresel yanıtlarla altında yer alan subkondral kemiği korur.

ECM içinde kollajen lifleri, çekme ve kesme kuvvetlerine direnç gösterecek şekilde tasarlanmıştır. Buna karşılık, agregan molekülleri, negatif yüklü glikozaminoglikan (GAG) yan zincirlerine sahip bir protein çekirdeğinden oluşur. Bu negatif yük, elektrostatik itme ve ozmotik şişmeye neden olarak kıkırdağın sıkışma kuvvetlerine ve sıvı akışına direnç göstermesini sağlar. Kollajen lifleri, proteoglikanların ozmotik olarak şişmesini sınırlandırır.

Kondrositler farklı türde mekanik yüklenmeleri algılayabilir ve bunlara yanıt verebilir. Örneğin, fizyolojik yüklenme, diz eklem kıkırdağının yük taşıyan bölgelerinde agregan üretiminin artmasına neden olurken, aşırı yüklenme, ESM'yi parçalayan enzimlerin artışına yol açar. Ancak kondrositlerin çevredeki mekanik uyarıları algılamak için hangi molekülleri kullandığı henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Bu süreçte integrinler ve farklı iyon kanalları rol oynamaktadır. Kuvvet algılama, gen ekspresyonunu, protein üretimini ve modifikasyonunu değiştirebilen aşağı akış sinyal kaskadlarını başlatır. Son zamanlarda, TRPV4 iyon kanalının fizyolojik yüklenmeye kondrosit yanıtında önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. Ayrıca, son yıllarda Piezo1 ve Piezo2 olarak adlandırılan iki mekanosensitif iyon kanalı keşfedilmiştir ve bu kanallar kondrositler ile duyuşal nöronlar gibi diğer hücre tiplerinde de eksprese edilir. Kondrositlerde, bu kanallar, kıkırdağa zarar verebilecek büyük kuvvetlerin algılanmasında rol oynamaktadır.

2.1.9 Kondrosit otofajisi

Otofaji, birçok hücre tarafından hasarlı hücre içi bileşenlerin temizlenmesi yoluyla homeostazın sürdürülmesi ve çevresel streslere uyum sağlanması için kullanılan bir sitoplazmik mekanizmadır. Kondrositler sınırlı hücresel yenilenme kapasitesine sahip olduklarından, hasarlı hücre içi moleküllerin temizlenmesi ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminin engellenmesi açısından otofaji önemli bir mekanizmadır. Özellikle yüzeyel tabaka, ULK1, Beclin1 ve LC3 gibi otofaji düzenleyicilerinin güçlü bir şekilde ifade edildiği bir bölgedir. Histolojik olarak otofaji, kondrositlerde otofagozomların oluşumu ile tanımlanabilir. Erken osteoartrit evresinde otofaji yolları aktif hale gelir; çünkü kondrositler ESM yıkımına karşı koymaya çalışmaktadır. Ancak osteoartritin ileri evresinde otofaji azalır ve bu durum kondrosit apoptozunu teşvik eder. Otofajik yollar, yaşlanmaya bağlı osteoartritte potansiyel bir tedavi hedefi olarak görülmektedir.

2.1.10. Yaşlanmanın kıkırdak doku üzerindeki etkisi

Kıkırdak dahil dokuların yaşlanması, zamanla ortaya çıkan işlev kaybı olarak tanımlanabilir ve yaşlanma, osteoartritin ana risk faktörlerinden biridir. Hem kondrositler hem de ESM, yaşlanmaya bağlı süreçlerden etkilenir ve bu durum dokuyu daha savunmasız hale getirebilir. Yaşlanmanın farklı dokuları etkileyen ortak yollarına dayalı olarak tanımlanan dokuz yaşlanma belirtisi sırasıyla; genomik kararsızlık, telomer kısalması, epigenetik değişiklikler, proteostaz kaybı, düzenlenmemiş besin algılama, mitokondrial disfonksiyon, hücresel yaşlanma (senesens), kök hücre sayısının azalması ve hücreler arası değişmiş iletişimidir. Özellikle son yıllarda hücresel yaşlanma ve mitokondriyal disfonksiyonun birincil osteoartritin gelişimi ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir. Yaşlanma ve osteoartrit ile birlikte kondrositlerin pro-inflamatuar moleküllerin artışı ile karakterize edilen yaşlanma ile ilişkili salgı fenotipi (SASP) sergilediği gösterilmiştir. Yaşlanma ayrıca otofaji düzeyinin azalmasına yol açar ve bu durum yaşlanmaya bağlı mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stres ile birleşerek reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikmesine neden olur.

Eklem kıkırdağı ESM'i, yaşlanma ile değişir. Glikasyon son ürünlerinin (AGE) oluşumu, kollajen ağının çapraz bağlanmasını artırarak kıkırdağı daha sert hale getirir. GAG bileşimindeki yaşa bağlı değişiklikler, yalnızca kıkırdağın biyomekanik özelliklerini etkilemekle kalmaz, aynı zamanda agregan çekirdek proteininin agreganazlar tarafından parçalanabilirliğini de önemli ölçüde değiştirir. Agregan çekirdek proteininin Glu373 ve Ala374 amino asitleri arasında agreganazlar tarafından parçalanması, matrikste G1 domaini ile hyaluronan arasındaki etkileşim yoluyla tutulabilen küçük parçalar oluşturur. Bu parçalar, bireyin yaşamı boyunca kıkırdakta birikir. G1-agregan parçaları hyaluronana bağlı kalır ve yeni sentezlenen agregan moleküllerinin bağlanması gereken bölgeleri işgal ederek kıkırdağın onarımını engeller.

2.1.11. Genetiğin kıkırdak doku üzerine etkisi

Kıkırdak matriks proteinlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar, özellikle kollajen genlerinde, yaygın olarak görülebilir. Örneğin, COLII, COLIX ve COLXI genlerindeki mutasyonlar, kondrodizplazilere ve erken yaşta osteoartrit gelişimine yol açar. Osteoartrit ile popülasyon kohortlarındaki genetik varyasyonların ilişkisini anlamayı amaçlayan son genetik ilişkilendirme çalışmaları, bazı kıkırdak moleküllerinin işlevleri hakkında yeni bulgular ortaya koymuştur. Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), diz osteoartriti ile ilgili birkaç genetik ilişkiyi tanımlamıştır. Örneğin, Asya popülasyonlarında

von Willebrand Faktör A (DVWA) genindeki tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) diz osteoartriti ile ilişkilendirilmiştir, ancak bu ilişki Avrupa kohortlarında tekrarlanamamıştır. Daha sonra, bu yeni tanımlanan genin, eklem kıkırdağında eksprese edilmediği düşünülen bir kollajen varyantı olan kollajen VI alfa 4 (COL6A4)'ü kodladığı bulunmuştur. Bu nedenle, bu SNP'nin kıkırdak biyolojisi ile ilişkili önemi belirsizdir.

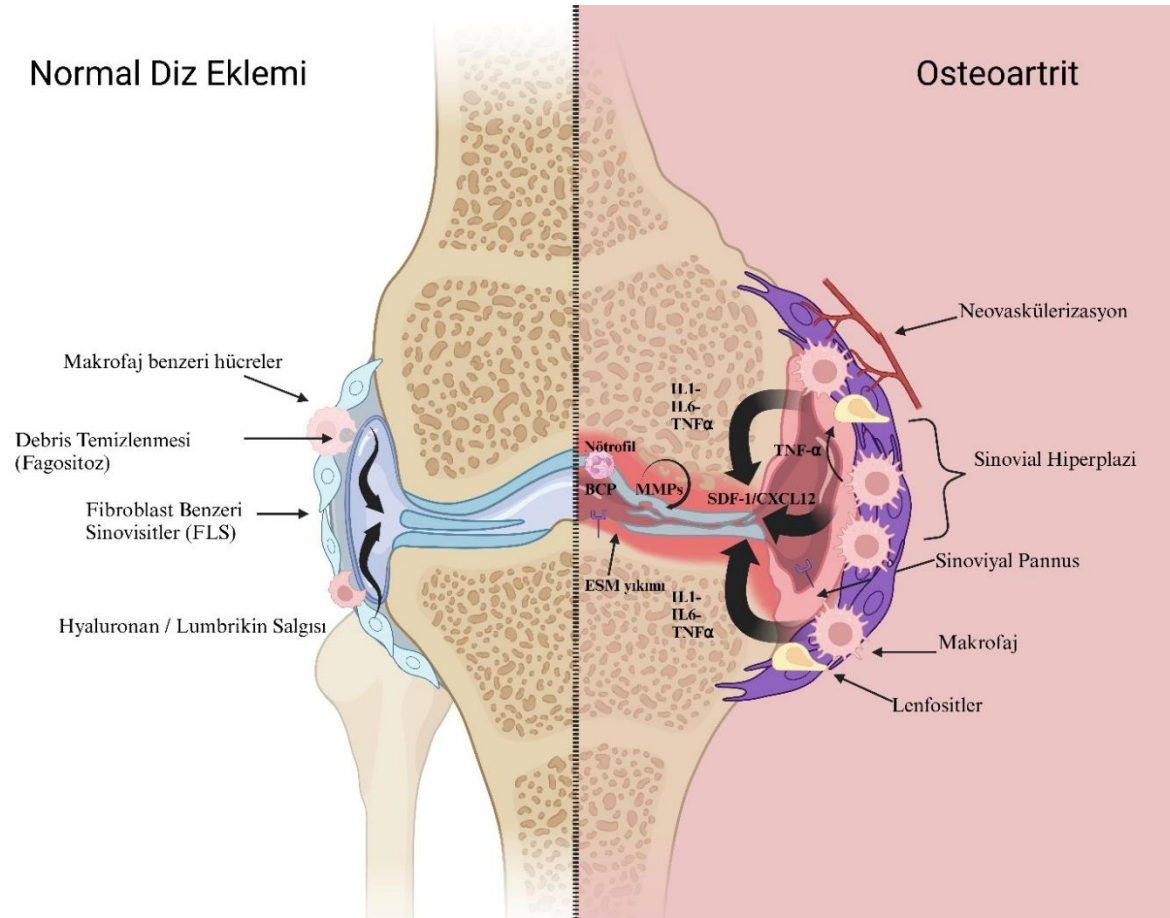
Diz osteoartriti ile ilişkili başka polimorfizmler de keşfedilmiştir. Bunlardan biri, asporin adlı matriks molekülünü kodlayan gendeki bir polimorfizmdir. Asporin, TGF- β aracılı aggregan ve tip II kollajen ekspresyonunu baskılar. Matrilin-3 proteinini kodlayan gendeki bir mutasyon, el osteoartriti ile ilişkilendirilmiştir. Bu spesifik T298M mutasyonunun, in vitro deneylerde kıkırdak kollajen fibril oluşumunu belirgin şekilde etkilediği gösterilmiştir. Kalça osteoartriti gibi yüksek kalıtsal özellik gösteren hastalıklarla ilişkili olan genler arasında, eklem şeklinin gelişimi ve korunması ile ilgili olanlar yer alır. Bu genler arasında Wingless (Wnt) ve kemik morfogenetik protein (BMP) ailesi üyeleri bulunmaktadır. Özellikle erkeklerde kalça osteoartriti riskinde artışla güçlü bir şekilde ilişkili olan bir SNP, DOT1L genindedir. Kalça eklemi mimarisinin bazı özellikleri, örneğin asetabular displazi, piston grip deformitesi, geniş femur boynu ve değişmiş femur boyun-gövde açısı, osteoartrit patogenezinde önemli bir rol oynamakta olup, klinik osteoartrit belirtilerinin ortaya çıkmasından onlarca yıl önce görülebilir. Ayrıca, son dönemlerde DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlamayan RNA'lar gibi epigenetik mekanizmalar üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu mekanizmaların kıkırdak homeostazında önemli bir rol oynadığı ve osteoartrit patogenezinde etkili olabileceği düşünülmektedir. DOT1L polimorfizmi ile kalça osteoartriti arasındaki güçlü ilişki, araştırmacıları histon metilasyonu ile ilgili bir enzim olan DOT1L'in kıkırdak homeostazındaki rolünü araştırmaya teşvik etmiştir. Mekanistik olarak, DOT1L'nin koruyucu işlevinin, eklem hastalıklarına yol açabilecek şekilde aşırı aktif hale gelen Wnt sinyal yolunu baskılamasından kaynaklandığı bulunmuştur.

Son olarak, kondrositlerde mitokondriyal disfonksiyon, yaşlanma ve osteoartrit ile ilişkilendirilmiştir ve diz osteoartriti kohortlarında mitokondriyal DNA'da keşfedilen mutasyonların hastalığın ilerleme riskini azalttığı gösterilmiştir (11).

2.2. Sinoviyum ve Eklem Biyolojisi

Eklemdeki farklı dokuları birleştiren bağ dokusu olan sinoviyum, eklem iç boşluğunu döşemekle birlikte salgılarıyla eklem boşluğundaki kimyasal ve biyolojik ortamı düzenler. Sinovium yapısal olarak eklem iç yüzeyini kaplayarak kemik, eklem kıkırdağı,

eklem kapsülü ve bağ dokuya bağlanır. Böylelikle sinoviyal sıvının eklem boşluğunda hapsolmesini sağlar. İşlevsel olarak eklem sıvısını kayganlaştıran hyoluronan ve lumbrikin (PRG4) sentezini yapar. Eklem kıkırdağının aksine, sinovium vasklülerize bir yapıdır. Bu nedenle gerekli ham maddelerin taşınması, atıkların uzaklaştırılması, immün sistemin ve böylece eklemdaki inflamasyonun düzenlenmesinde önemli rol oynar. Bu işlevler, sinoviyal dokuda yerleşmiş hücreler sayesinde gerçekleştirilir. Bu nedenle osteoartrit, romatoid artrit ve diğer inflamatuvar hastalıklarda doğrudan rol oynamaktadır. (Şekil 5)



Şekil 2.5. Normal ve Osteoartrit Eklemi Karşılaştırılması

2.2.1. Sinovial hücreler

Sinovial membrandaki ana hücreler makrofaj benzeri hücreler (Tip A) ve fibroblast benzeri sinovisitler (Tip B) bulunur. Tip A hücreler monosit kökenlidir ve sinoviyal membrandaki hücrelerin dörtte birini oluşturur. Bu hücreler, eklem iç yüzeyinde fagositoz yoluyla sinoviyal sıvıdaki artıkları temizler. Yoğun enerjinin harcandığı bu süreçte

mitokondriler hayati önem taşımaktadır. Tip B hücreler ise mezenkimal kök hücre kaynaklıdır. Bu hücreler başlıca hyaluronan ve lumbrikin gibi başlıca ESM proteinlerinin sentezinden ve salgılanmasından sorumludur. Hyaluronan eklem sıvısının vizikositesini sağlarken, lumbrikin eklem yüzeyini kayganlaştırır. Bu hücrelerde ise endoplazmik retikulum hayati öneme sahiptir. Ayrıca bu hücreler, kıkırdak tamirinde hücre kaynağı olarak kullanılabilir.

2.2.2. Sinoviyal sıvı

Sinovial sıvının mekanik özellikleri, viskozite, statik basınç, kesme gerilimi ve akış potansiyellerini etkiler. Bu fiziksel özelliklerin normal fizyolojik aralığın dışına çıkması; eklemde kıkırdak yüzey hasarına, hücre ölümüne, aşınmaya neden olur. Kimyasal olarak, sinoviyal sıvı ve kan arasında oksijen, karbondioksit ve metabolitlerin sürekli olarak değişimi mevcuttur. Bu sayede avasküler olan kıkırdak dokuya metabolik destek sağlanır.

Biyolojik olarak, temas ettiği dokular için bir mikro-çevre görevi de görür. Sinoviyal sıvı; immün sistem hücrelerini, ekstrasellüler vezikülleri, matriks proteinlerini, sitokinleri, kemokinleri ve büyüme faktörlerini içerir. Normal bir eklem sıvısında $<100\text{mm}^3$ lökosit bulunur. Bunların da büyük çoğunluğu monositlerdir. Sinovial sıvıda yer alan bu biyolojik bileşenler, eklem boşluğu içinde birbirinden uzak noktalarda bulunan doku ve hücreler arasında iletişimi sağlar. Ayrıca bu faktörler, inflamatuvar durumlarda doku dejenerasyonu üzerinde de etkilidir.

2.1.3.osteoartritte sinoviyal sıvı

Literatürdeki araştırmalar; eklem kıkırdak hücreleri, sinovyal hücreler ve mezenkimal kök hücrelerin osteoartrit sırasında hücresel yaşlanma, telomer kısalması ve yaşlanmaya bağlı salgısal fenotip (SASP) oluşumu gösterdiğini ortaya koymuştur. Her ne kadar deneysel hayvan modellerinde senolitiklerin kullanılması osteoartrit patogenezi engellese de, günümüzde hastalığı modifiye edici bir tedavi bulunmamaktadır.

Her ne kadar osteoartrit klasik bir inflamatuvar eklem hastalığı olmasa da, sinoviyal inflamasyon ve sinovit OA'ın ilerlemesine neden olmaktadır. Erken evre OA'de sinoviyal dokuda hafif bir inflamasyon izlenir ve orta evrelerde hipervaskülerize olur. Geç evrede ise sinoviyal villöz hipertrofiye uğramış ve neovaskülerizasyonun da etkisiyle kalınlaşmıştır.

OA'de en sık rol oynayan immün sistem hücreleri makrofajlar, T hücreleri ve mast hücreleridir. OA patogenezi etkisi gösterilmiş başlıca proinflamatuvar sitokinler IL-1, IL-6 ve TNF- α 'dır. TNF- α esas olarak sinoviumdaki ve kemikteki immün sistem hücrelerinden

sentezlenir. Kondrositlerden ise proinflatuar koşullar altında IL-1 ve IL-6 üretilebilir. Diğer yandan sinoviyumdaki yaşlanmış hücrelerden IL-1 ve IL-6 ve MMP'ler sentezlenmektedir.

İnflatuar sitokinlerin vasküler geğirgenliği arttırması sonrasında ortama gelen mononükleer hücreler, immün sistem aktivasyonuna neden olarak proinflatuar kaskadı besler. Enflamasyonun artışı, katabolik yanıtı sebep olur.

Sinovyumdaki tip A ve tip B hücreleri ayrıca büyüme faktörleri de sentezler. Eklem sağlığı ve hastalıklarında önemli bir büyüme faktörü ailesi, TGF- β /BMP/GDF ailesidir. GDF-5 eklem oluşumunda yer alırken, TGF- β mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşmasını ve kıkırdak oluşumunu teşvik etmede önemli bir rol oynar. Ancak TGF- β sinyali, sinovyum ve subkondral kemikte fibrozis, kemik oluşumu ve OA patogenezi ile ilişkilendirilmiştir. Kemik morfogenetik protein (BMP) sinyali, mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik ve osteojenik farklılaşması için gereklidir. Ancak, aşırı BMP sinyali, osteoartritte kıkırdak hipertrofisine ve osteofit oluşumuna neden olabilir.

2.2.4. Kemik-sinoviyum ve eklem kıkırdakı etkileşimleri

Eklemi oluşturan dokular devamlı olarak birbiri ile iletişim halindedir. Normal koşullarda bu dokular sinyal molekülleri (sitokinler, büyüme faktörleri, eksozomlar vb.) ile haberleşerek yük altındaki eklemde sadece fiziksel olarak değil biyokimyasal olarak da birlikte çalışırlar. Böylece eklemi oluşturan dokuların homeostazı düzenlenmiş olur. Eklemi oluşturan yapılardan bir ya da birkaçının hasar görmesi durumunda ise bu iletişim ağı tersine işleyerek eklem hasarını arttıran bir yanıtı neden olabilir. OA günümüzde, eklemi oluşturan yapıların koordineli bir şekilde bozulduğu tüm eklemi ilgilendiren bir hastalık olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle hem patofizyolojisinin anlaşılmasında hem de tedavi stratejileri geliştirilmesinde hastalığa bu perspektiften bakılması gerekmektedir (12).

Eklemin iç yüzeyini döşeyen sinoviyal dokunun inflamasyonu sinovit olarak adlandırılır. Sinovit, OA'de genellikle kıkırdak hasarından önce ortaya çıkmaktadır. OA kliniğinde görülen ağrının da kaynağı olan inflame sinoviyumda sinovisitler hipertrofiye olur. Sinoviyal dokuya göç eden lenfositler ve makrofajlardan salgılanan sitokinler, nitrik oksit (NO), prostaglandin E2 (PGE2) ve nöropeptidler proinflatuar etkileriyle katabolik metabolik süreci baskın hale getirir. Ayrıca ortama salgılanan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) neovaskülarizasyona neden olarak sinoviyal hipertrofiye katkıda bulunur.

OA patogenezindeki en önemli proinflatuar sitokin interlökin 1 β (IL-1 β) ve tümör nekrozis faktör- α (TNF- α)'dır. Bu sitokinler doğrudan kıkırdak yıkımına sebep olacağı gibi, proinflatuar kaskadı da besleyerek dejenerasyonun ilerlemesine neden olurlar. Ayrıca eklem kıkırdağının parçalanması sonrasında sinoviyal sıvıya dağılan hücrel moleküller ve ESM bileşenleri doğrudan sinoviti tetikleyebilmektedir. Ayrıca inflame sinoviyuma çekilen makrofajlar, osteoklastlara farklılaşarak kemik rezorpsiyona neden olabilmekte bu da OA kliniğinde görülen kemik rezorpsiyonuna sebep olmaktadır.

2.2.4.1. Biyolojik faktörler

Eklemi oluşturan dokular arasındaki etkileşim değerlendirilirken, etki eden faktörlerin yalnızca ekspresyonu değil aynı zamanda lokalizasyonunun da değerlendirilmesi gerekir. Örneğin MMP-13 kemikteki kanaliküler yapının korunması için gerekli bir proteaz olsa da subkondral kemikteki değişiklikler ve ekleme etki eden artmış mekanik kuvvetlerin baskın olarak izlendiği eklem bölgelerinde ifadelenmesi artabilir ve bunun sonucunda kıkırdak dokudaki tip 2 kolajenin parçalanmasını bu bölgelerde arttırabilir.

2.2.4.2. İnflamasyon

Her ne kadar OA'de inflamasyon, diğer artritlerdeki kadar belirgin olmasa da, inflamatuvar yolakların hastalığın ilerlemesindeki etkisi aşikârdır. Proinflatuar yolakların kontrolsüz olarak tetiklediği inflamatuvar süreç, kısır bir döngü oluşturarak inflamasyonu devamlı besler. Bu süreçte alarminler, kemokinler ve fibronektin, küçük lösin açısından zengin proteoglikanlar ve kolajen parçaları gibi kıkırdak matriks yıkım ürünlerinin sinoviyal sıvıya salınımı, integrinleri aktive ederek bu dejeneratif döngüyü daha da hızlandırır. Sklerotik kemikten salınan osteoblastlar, kondrositlerde MMP-13 ekspresyonunu indükleyen yüksek seviyelerde IL-6, IL-8 ve prostaglandin E2 salgılayarak inflamatuvar fenotipe katkıda bulunur.

2.2.4.3. Hipoksinin etkisi

Hipoksiye duyarlı faktörler (HIF'ler), OA'da da önemli bir rol oynar. Normal kondrositler hipoksik bir durumda yaşar ve apoptozdan korunmalarını sağlayan HIF-1 α 'yı eksprese ederler. OA'daki subkondral kemiğin vaskülerizasyonunun artması ve bu alanda damarsal geçirgenliğin artması nedeniyle oksijen seviyesinin yükselmesi, kondrosit davranışını değiştirebilir. Normoksik ortamda kültürlenmiş kondrositler, hipoksik ortamda kültürlenene göre daha az HIF-1 α , tip II kollajen ve agregan, ancak daha fazla MMP-13 ve agreganaz (MMP-3) üretir. IL-1 α ve TNF- α 'ya maruz kaldıklarında, normoksik kondrositler hipoksik hücrelere kıyasla daha fazla nitrik oksit ve prostaglandin E2 gibi

proinflamatuar mediyatör üretirler. HIF-1'in baskılanması farelerde kıkırdak dejenerasyonunu ve osteofit oluşumunu teşvik ettiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.. Buna karşın HIF-2 α , osteoartritlik kıkırdakta yüksek düzeyde eksprese edilir ve agreganazlar ile MMP'lerin üretimini artırır. Dolayısıyla, kondrositlerde HIF-1 α 'dan HIF-2 α 'ya geçiş, tüm eklemde katabolizmayı etkileyen kritik bir eşiktir.

2.2.4.4. Wnt sinyalizasyonu

Kemik ve kıkırdakta β -katenin aracılığıyla gerçekleşen kanonik Wnt sinyalizasyonu, kemik oluşumu için güçlü bir agonisttir ve aktivitesi Wnt antagonistleri tarafından düzenlenir. Örneğin, sklerostin, osteositler ve kondrositler tarafından mekanosensitif bir şekilde eksprese edilerek uygunsuz kemik oluşumunu baskılar. OA'daki eklem aşırı yüklenmesi, sklerostin baskılanmasına, anormal Wnt aktivasyonuna ve sonunda subkondral kemik sklerozuna katkıda bulunabilmektedir.

Kondrositlerde, β -katenin ekspresyonu birincil ve ikincil ossifikasyon merkezlerinin oluşumu için gereklidir ve Wnt sinyali kondrositler için apoptozu engelleyerek bir hayatta kalma sinyali işlevi görür. Ancak OA hastalarından alınan sinovyal fibroblastlar ve kondrositlerde yüksek düzeyde Wnt sinyalizasyonu tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada fare modelinde Wnt aktivasyonunun baskılanması, kıkırdak dejenerasyonunu ve sinoviti azaltmıştır.

2.2.4.5. TGF- β sinyalizasyonu

Kemikte osteoklastlar, kemik rezorpsiyonu sırasında TGF- β ligandı salgılar ve bu ligand osteoprogenitör hücrelerin toplanmasını ve proliferasyonunu teşvik eder. Ancak, TGF- β terminal osteoblast farklılaşmasını ve matriks mineralizasyonunu baskılar. Farelerde TGF- β inhibisyonu trabeküler kemik yoğunluğunu arttırdığı gösterilmiştir.

Cerrahi ile indüklenen OA hayvan modellerinde, subkondral kemikteki yüksek TGF- β seviyeleri, kıkırdak dejenerasyonu, subkondral kemik yeniden şekillenmesi ve düşük trabeküler kemik yoğunluğu ile ilişkilendirilmiştir. Bu modelde, nötralize edici TGF- β antikoru, sağlıklı kıkırdak ve subkondral kemik fenotipini korumaya yardımcı olmuştur.

Öte yandan, kondrositlerde TGF- β sinyalizasyonunun baskılanması OA'yı şiddetlendirebilir, çünkü TGF- β normalde temel kıkırdak matriks bileşenleri olan kollajen II ve agregan üretimini teşvik eder ve MMP-13 gibi proteazların ekspresyonunu baskılar. İnsanlarda TGF- β yolunun efektörü olan Smad3'teki mutasyonların OA ile ilişkilendirilmesi bu mekanizmanın önemini vurgulamaktadır. TGF- β yolunun mekanosensitif olması ve

eklem dokularının mekanik özelliklerini düzenleyebilmesi nedeniyle, OA tedavilerine yönelik klinik stratejiler, bu büyüme faktörünün her eklem bölümündeki farklı rollerini dikkatle ele almalıdır.

2.2.4.6. Mekanik faktörler

Mekanik sinyaller, hücre içi efektörleri ve transkripsiyonel düzenleyiciler gibi ekstraselüler matriks proteinleri, ligandlar ve reseptörler üzerinde bir dizi aktiviteyi tetikleyerek hücrel yanıtı başlatır. Eklem dokuları gelişim sürecinde veya hastalık sırasında değiştikçe, değişen fiziksel ortam, eklem biyolojik ve mekanik homeostazını etkileyen hücrel aktivitelerde değişimlere neden olur.

Eklem için yeterli ve uygun mekanik uyarı miktarı, gelişim sürecinden itibaren normal işlev için gereklidir. Anne karnında embriyonik kas kasılmaları, kemik şeklinin ve tendon ile bağlara bağlanma bölgelerinin oluşumunu yönlendirir. Kıkırdakta, düşük yoğunluklu döngüsel yükleme agregan üretimini artırır, proteaz ekspresyonunu baskılar ve kondrositlerin inflamatuvar sitokinlere karşı katabolik yanıtını azaltır. Pasif harekete tabi tutulan diz eklemleri, sinovyal sıvıya daha fazla hyaluronan salgılayarak eklemi yağlar.

Bu mekanosensitif işlevler normal mekanik uyarılardaki artış veya azalması durumunda bozulabilir ve hastalıklı bir fenotipin ortaya çıkmasına katkıda bulunabilir. Yatak istirahati veya mikro yerçekimine maruz kalan kişiler hızla kemik kütlesi kaybeder. Kemirgenlerde arka bacak immobilizasyonu, kıkırdak proteoglikan içeriğinin azalması ve agreganaz ekspresyonunun artması ile OA'ya neden olur. Yaralanma yüküne maruz kalan kondrositler inflamatuvar bir yanıt sergiler ve MMP-13, IL-1 β , nitrik oksit sentaz (NOS) ve prostaglandin (PG) üretimini artırır. Ekstraselüler matriks sertliğindeki değişiklikler, TGF- β gibi sitokinlerin ligandlara bağlanmasını değiştirebilir.

2.2.4.7. İntegrinler aracılı mekanik sinyalleşme

OA'da kemik yeniden şekillenmesi ve kıkırdak dejenerasyonu hücrenin bazal mekanik ortamını değiştirir ve bu da integrinler aracılığıyla algılanan hücrel sinyalleri etkiler. Ekstraselüler matriks proteinlerine bağlandıktan sonra transmembran integrinler, "fokal adezyon" adı verilen bir hücre içi protein kompleksi oluşturur. Fokal adezyon proteinlerindeki aktif sinyalleşme kompleksleri, integrinlerin hücrel mekanikleri, sinyalleri ve işlevleri fiziksel çevredeki değişimlere göre kalibre etmesine olanak tanır. Fizyolojik yükün kondrositler üzerindeki koruyucu etkileri, integrinlere bağımlıdır; çünkü integrin inhibisyonu sonrasında ve OA'da bu yanıt kaybolur.

2.2.4.8. Sıvı akışı ve mekanik uyarılar

Mekanik yüklenme nedeniyle oluşan sıvı akışı başlı başına bir uyarıcı işlevi görür. TRPV4, kıkırdak, kemik ve sinovyumda eksprese edilen, mekanosensitif, kalsiyum geçirgen bir katyon kanalıdır. Normal hareket sırasında kıkırdağa yük bindiğinde ve boşaldığında sıvı dokudan dışarı çıkar ve tekrar girer, bu da ozmotik basınçta büyük dalgalanmalara neden olarak TRPV4 sinyalleşmesini aktive eder. Mekanik olarak uyarılmış TRPV4 aracılığıyla kalsiyum girişinin, katabolik ve proinflamatuvar faktörleri baskıladığı ve Col2a1 gen ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir. Farelerde TRPV4 işlevinin kaybı, muhtemelen eklem iletişiminin bozulması nedeniyle kıkırdak fibrilasyonu ve proteoglikan kaybına yol açar. TRPV4 kanalları hücrelerde mekanotransdüksiyon için özel organeller olan birincil silialarda lokalizedir.

2.2.4.9. Kemik ve kıkırdak doku kalınlaşması

Eklem kıkırdağı, kalsifiye kıkırdak ve subkondral kemik ile birlikte uygulanan yüklerin enerjisini absorbe eden bir birim olarak çalışır. Ancak OA sırasında bu sert katmanların kalınlaşması, bu tabakaların esnekliğini sınırlar ve bu da alttaki kemikte ve kemik üzerindeki kıkırdakta stres yoğunluk ve dağılımını değiştirir. Eklem esnekliğindeki %10'luk bir azalma, kıkırdaktaki kompresif stresi %15 ila %20 artırabilir ve bu durum kondrositlerin homeostatik mekanosensitif uyarıyı algılama ve yanıt vermesini geciktirebilir. OA'de subkondral kemiğin sertleşmesi, alttaki trabeküler kemiği stresten koruyarak kemik rezorpsiyonuna sebep olur. Bu da yük dağılımını bozarak eklem biyomekaniğini değiştirir. Bu nedenle, subkondral kemiğin kalınlaştığı ve mineralizasyonun arttığı bölgeler, kıkırdak lezyonları ile gözlenir (13).

2.3. Osteoartrit

2.3.1. Osteoartrite giriş ve Epidemiyoloji

Osteoartrit (OA), ağrı, fonksiyon kaybı ve yaşam kalitesinde (YK) belirgin düşüş ile karakterize kronik ve dejeneratif bir eklem hastalığıdır (11, 14). Osteoartrit (OA), global düzeyde en yaygın görülen kas-iskelet sistemi hastalığıdır (11). 2020 yılı itibarıyla OA'nin dünya çapında 595 milyon bireyi etkilediği ve dünya nüfusunun %7'sini kapsadığı tahmin edilmektedir (15).

2.3.1.1. Yaş ve prevalans

OA prevalansı yaşla birlikte önemli ölçüde artmaktadır. Özellikle 65 yaş ve üzeri bireylerde diz, kalça ve el osteoartriti yaygındır. 70 yaşın üzerindeki bireylerde osteoartrit en sık 7. Sakatlık sebebidir ve 70 yaşından büyük bireylerin yaklaşık üçte biri osteoartritten

etkilenmektedir. 50-69 yaş aralığındaki bireylerde prevalans oranı 23237/100000 olarak hesaplanmıştır(16). Kadınlarda OA prevalansı, menopoiz sonrası dönemde hormonal değışiklikler nedeniyle belirgin bir artış göstermektedir (15). Kıkırdak dokuyu koruyucu etkisi olan östrojen seviyelerindeki düşüşün, eklem bozulmasını hızlandırdığı düşünülmektedir. Buna karşın erkeklerde genç yaşlarda görülen OA vakaları genellikle travma, spor yaralanmalarına ve ağır fiziksel aktivitelere bağlıdır (17). Yaşlanma sürecinde eklem yapılarının biyolojik dayanıklılığının azalması, artan mekanik yüklenmelerle birleşerek OA gelişimini hızlandırır. Eklem çevresindeki kas kütesinin azalması ve postüral dengenin bozulması da yaşa bağlı risk faktörleri arasında yer almaktadır. Kronik ağrı, eklem sertliği ve hareket kısıtlılığı gibi semptomlarla seyreden bu hastalık yaşlı bireylerin yaşam kalitesinde ciddi düşüşlere yol açarak bağımsız yaşam yetisini sınırlamakta ve sosyal izolasyonu artırmaktadır

2.3.1.2. Cinsiyet farklılıkları

OA'nın prevalansı ve şiddeti cinsiyetler arasında farklılık göstermektedir. Kadınlarda diz ve el OA'i daha yaygın gözlenirken, erkeklerde kalça OA'i daha sık görülür. Kadınlarda görülen prevalans artışı, östrojenin anti-inflamatuar etkilerinin menopoiz sonrası azalması ve kemik mineral yoğunluğunun düşmesi ile ilişkilidir. Erkeklerde ise OA genellikle yoğun fiziksel aktiviteler veya travmalarla ilişkilidir ve genellikle daha lokalize bir dağılım sergiler (18).

2.3.1.3. Risk faktörleri

OA risk faktörleri temelde değıştirilemeyen ve değıştirilebilir risk faktörleri olarak ikiye ayrılmaktadır.

OA'nin oluşumunda ve ilerlemesinde genetik yatkınlık, yaş, cinsiyet ve genetik yatkınlık değıştirilemeyen faktörler arasında yer alır. Kalıtsallık tahminleri %39 ile %65 arasında değışmekte olup genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), OA ile ilişkili 100'den fazla genetik lokus tespit etmiştir (19). DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi epigenetik mekanizmalar, genetik yatkınlığın hastalığın başlangıcına ve ilerlemesine nasıl katkıda bulunduğunu açıklamıştır. MGP ve ALDH1A2 genleri gibi bazı genetik varyantlar, kıkırdak homeostazının korunmasında önemli bir rol oynamaktadır (19).

Obezite, OA gelişiminde değıştirilebilir önemli bir risk faktörüdür ve yalnızca mekanik yüklenmeyi artırmakla kalmaz, aynı zamanda yağ dokusundan salgılanan leptin gibi proinflamatuar sitokinler aracılığıyla sistemik inflamasyon sürecini tetikler (Roelofs &

De Bari, 2023). Yüksek vücut kitle indeksi, 2020 yılında osteoartrit yükünün %20,4'ünden sorumludur, özellikle diz ve kalça osteoartritinde etkili bir risk faktörüdür. Metabolik sendrom ve dislipidemi, hastalığın sistemik doğasını yansıtarak OA riskini bağımsız olarak artırır (16). Buna ek olarak, sporcularda ve ağır işlerde çalışan bireylerde sık görülen menisküs yırtıkları ve çapraz bağ yaralanmaları gibi travmatik eklem hasarları, erken başlangıçlı OA için risk faktörüdür.

2.3.1.4. Sosyoekonomik ve bölgesel farklılıklar

OA prevalansı, coğrafi ve sosyoekonomik faktörlere göre farklılık gösterebilmektedir. Yüksek gelirli ülkelerde, yaşam süresinin uzaması ve sedanter yaşam tarzının yaygınlaşması nedeniyle OA vaka sayısı artmaktadır. Buna karşın düşük gelirli ülkelerde, erken tanı ve tedavi olanaklarının sınırlı olması nedeniyle hastalığın ilerlemesi daha ciddi komplikasyonlarla sonuçlanmaktadır (14). Global Burden of Disease (GBD) verileri, OA'nin neden olduğu yeti kaybı yılının (YKY) özellikle diz ve kalça OA'sinde yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Global Burden of Disease (GBD), dünya genelinde sağlık sorunlarının neden olduğu hastalık yükünü kapsamlı bir şekilde değerlendiren ve kıyaslayan en geniş kapsamlı projedir. GBD çalışmaları, hastalıkların, yaralanmaların ve risk faktörlerinin küresel, bölgesel ve ulusal düzeyde halk sağlığı üzerindeki etkilerini ölçmek için "disability-adjusted life years (DALY)", "years of life lost (YLL)" ve "years lived with disability (YLD)" gibi metrikleri kullanmaktadır (16). 2021 yılında yayınlanan ve 1990-2020 yılları arasında 204 ülkenin osteoartrit ile ilişkili verilerinin analiz edildiği GBD 2021 çalışmasında diz, kalça, el ve diğer eklemler (Omuz, dirsek vb.) incelenmiştir. En yüksek prevalans yüksek gelirli Asya-Pasifik (100.000'de 8.632 vaka) ülkelerinde görülürken, en düşük prevalans Güneydoğu Asya ve Sahra Altı Afrika (100.000'de 5.800 vaka) ülkelerinde görülmektedir. En yüksek ulusal prevalans ise %8,7 ile Amerika Birleşik Devletleri'ne aittir. 2050 yılı projeksiyonlarında küresel osteoartrit vaka sayısının 1 milyar kişiye ulaşması beklenmektedir. 2020-2050 yılları arasında osteoartrit türlerindeki sırasıyla diz OA (%74,9), el OA (%48,5), kalça OA (%78,6) ve diğer OA'ler (%95,1) artış beklenmektedir (16).

2.3.1.5. Klinik ve ekonomik etkiler

OA, günlük yaşam aktivitelerini kısıtlayan ve hastaların iş gücüne katılımını azaltan bir hastalıktır. Merdiven çıkma, oturma ve yürüme gibi temel hareketlerde yaşanan zorluklar, bireylerin sosyal yaşamdan uzaklaşmasına ve zihinsel sağlığının bozulmasına neden olabilir. Kronik ağrı, uyku bozuklukları ve depresyon gibi sekonder etkiler de OA'nin klinik yükünü artırmaktadır. OA tedavisinde kullanılan farmakolojik ve cerrahi yaklaşımlar semptomatik

rahatlama sağlamaktadır; ancak hastalığın progresyonunu durdurmaya yönelik kesin bir tedavi yöntemi henüz bulunmamaktadır. Özellikle diz ve kalça protezi ameliyatları, maliyetli olmasına rağmen yaşam kalitesini artıran etkili çözümler arasında yer alır. Ancak bu cerrahi işlemler, sağlık sistemleri üzerinde büyük bir ekonomik yük oluşturmaktadır (20). Dünya genelinde ulusal düzeyde en yüksek OA prevalansına sahip Amerika Birleşik Devletleri'nde OA'nın ekonomik yükü yıllık tıbbi harcamalar ve kaybedilen gelirler dâhil olmak üzere 303 milyar dolar olarak hesaplanmaktadır (14). Bu tutar, sanayileşmiş ülkelerin gayri safi yurt içi hasılasının yaklaşık %0,5'ine tekabül etmektedir (11).

2.3.2. Osteoartrit patofizyolojisine genel bakış

Geleneksel olarak OA, eklemlerin aşırı kullanımı sonucu ortaya çıkan mekanik bir "aşınma ve yıpranma" hastalığı olarak görülmekteyken, güncel araştırmalar patogenezinde biyokimyasal, genetik ve inflamatuvar faktörlerin kompleks bir etkileşimini ortaya koymaktadır (14, 18).

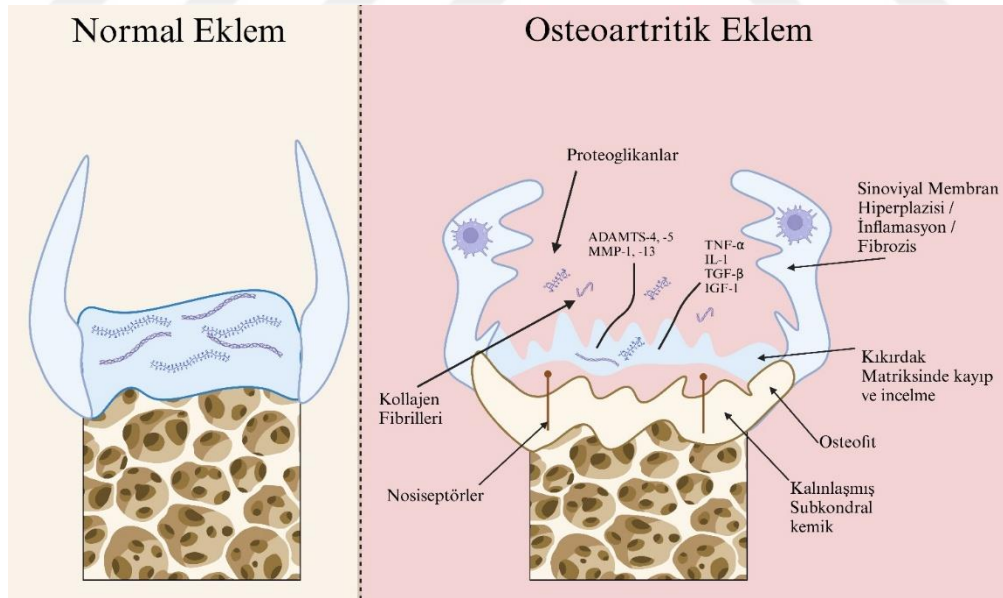
Patofizyolojik süreç temel olarak, kıkırdak dejenerasyonu, subkondral kemik değişiklikleri, sinovyal inflamasyon ve osteofit oluşumu gibi birden fazla faktörün etkileşimi sonucunda şekillenir (21). Mekanik aşınma ve yıpranma önemli bir faktör olsa da; OA'nın patogenezi genetik faktörler, hücrel sinyal yolları ve inflamasyon süreçleri ile yakından ilişkilidir (14, 18). Her ne kadar yapısal dejenerasyon mekanizmaları uzun yıllardır iyi şekilde incelenmiş olsa da OA biyolojisi henüz tam olarak anlaşılmış değildir.

OA'deki patolojik süreç eklem homeostazını bozarak ağrı, sertlik ve hareket kısıtlılığına yol açar. Kıkırdak dokusunun ana hücreleri olan ve bu dokunun bütünlüğünü korumakla görevli kondrositler, oksidatif stres ve mekanik yüklenme altında işlev kaybı yaşayarak doku bozulmasına katkıda bulunur (18). İşlevsel bir eklemi oluşturan tüm bileşenler, entegre bir organ olarak çalışmak zorundadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, eklemi oluşturan dokular arasındaki bu etkileşimlerin OA gelişimindeki rolünü daha iyi ortaya koymaktadır. Sinoviyum, menisküs, subkondral kemik ve periartiküler yağ dokusu gibi eklem dokuları, sitokinler, matriks parçalayıcı enzimler ve biyoaktif lipidler salarak kıkırdak hasarını artırıcı bir etki göstermektedir (17).

Eklem kıkırdağı OA'de en çok incelenen dokuların başında gelmektedir. Her ne kadar tarihsel olarak OA dejeneratif kıkırdak hastalığı olarak kabul edilse de günümüzde sinoviyal eklemin bir organ olarak dejenerasyonu olarak kabul edilmektedir. OA sürecinde kondrositler, aşırı mekanik yüklenme, oksidatif stres ve inflamatuvar faktörlerin etkisiyle

homeostazı sağlayan anabolik özelliklerini kaybederek katabolik bir fenotip kazanır. Bu fenotip değişimi sonucunda matris metalloproteinazlar (özellikle MMP-13) ve agregan yıkıcı enzimler (özellikle ADAMTS-4 ve -5) üretilir, bu da kıkırdak yıkımına yol açar (Han, 2022). Interlökin 1 (IL-1) ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) gibi katabolik sitokinlerin devamlı üretimi yıkım sürecini daha da artırır. Yetişkin kıkırdak metabolik olarak aktif bir doku olsa da, temelde iyileşme kapasitesi sınırlıdır ve OA'de kondrositler stabil tip-2 kollajen liflerini üretemezler. Kollajen ağrının bozulması, matriks yapısını bozarak kıkırdakın kompresif yüklere karşı dayanıklılığını kaybetmesine neden olur. Dejeneratif süreç ilerledikçe kondrositler apoptoza uğrar ve dejeneratif süreç hızlanır.

Eklem boşluğunun iç yüzeyini döşeyen sinoviyal membran (sinoviyum), OA'de inflammatuar süreçlerin başlıca kaynağı haline gelir. OA'de düşük dereceli ancak kronik bir inflamasyon süreci gözlenir. Sinovial dokuda yer alan sinovyal makrofajlar ve fibroblast benzeri sinoviyositler, IL-1 β , TNF- α ve IL-6 gibi sitokinler salgılayarak inflamasyonun kronikleşmesine neden olur (21). Bu inflammatuar ortam, kondrositlerin anabolik aktivitelerini baskılayarak eklem dokusunun kendini onarma kapasitesini sınırlandırır. Sonuç olarak, kondrositlerde katabolik süreç baskın hale gelir ve üretilen katabolik enzimler eklemi oluşturan dokularda kısır bir döngüye neden olur.



Şekil 2.6. Osteoartritik Eklem Makroskopik Yapısı

Subkondral kemik, eklem stabilitesini sağlayan ve kıkırdak dokuyu destekleyen önemli bir yapıdır. OA sürecinde subkondral kemikte trabeküler kalınlaşma, skleroz ve

mikrokırıklar meydana gelir. Bu değişiklikler, eklemdaki mekanik yük dağılımını bozarak kıkırdığın maruz kaldığı stresi artırır. Ayrıca, osteoklastlar tarafından üretilen eksozomlar kemik yeniden şekillenmesini etkileyerek patolojik değişikliklerin hızlanmasına katkıda bulunur (17).

Osteofitler, eklem kenarlarında oluşan yeni kemik çıkıntılarıdır ve genellikle OA'nin ilerleyen evrelerinde ortaya çıkar. Osteofit oluşumu, kemik hücrelerinin büyüme faktörlerine, özellikle TGF- β ve WNT sinyal yollarına verdiği yanıtlardan kaynaklanır (22). Bu yeni kemik oluşumları, eklem hareket açıklığını azaltarak ağrı ve sertlik hissini artırır.

2.3.2.1. Kondrosit hasarı ve dejenerasyon mekanizmaları

2.3.2.1.1. Oksidatif stres ve ROS birikimi

Mitokondriler, hücresel enerji üretiminde merkezi bir rol oynar ve oksidatif fosforilasyon sırasında ROS üretir. Normal koşullarda ROS, hücresel sinyal iletiminde rol oynar. Ancak aşırı ROS üretimi, oksidatif strese neden olarak hücresel yapıların hasar görmesine yol açar (4). OA'li kıkırdak dokusunda artan ROS seviyeleri, mitokondriyal membran potansiyelinin kaybına ve ATP üretim kapasitesinin düşmesine neden olur (6).

SOD2 enzimi, süperoksit radikallerini hidrojen peroksit'e dönüştürerek oksidatif hasarı sınırlar (23). Ancak OA'ye bağlı kıkırdak dokusunda SOD2 ekspresyonunun azaldığı ve ROS seviyelerinin yükseldiği gösterilmiştir (24). Katalaz ve peroksiredoksin gibi enzimlerin yaşa bağlı olarak etkinliğini kaybetmesi, oksidatif stresi daha da şiddetlendirebilir (25).

2.3.2.1.2. Kıkırdak dejenerasyonunda AMPK yolağı

AMP-aktif protein kinaz (AMPK), enerji homeostazının korunmasında ve eklem kıkırdaklarının biyolojik dengesinin sağlanmasında kritik bir role sahip olan bir serin/treonin protein kinaz kompleksidir. AMPK'nin aktivitesi, enerji dengesizlikleri, inflamasyon ve oksidatif stres gibi patolojik durumlar nedeniyle belirgin bir şekilde azalmaktadır. Bu düşüş, osteoartrit (OA) gibi dejeneratif eklem hastalıklarının patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır.

AMPK, enerji seviyelerindeki değişimlere hassas bir sensör olarak görev yapar ve enerji dengesiyle birlikte kıkırdakta mitokondriyal fonksiyonların sürdürülmesini destekler. Sağlıklı kıkırdakta, AMPK'nin aktif hale gelmesi ototrofik mekanizmaları tetikleyerek enerji homeostazını sağlar ve metabolik esnekliği korur. Ancak OA'nin ilerlemesiyle birlikte

AMPK aktivitesindeki azalma, mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres artışı ve inflamatuvar sitokin üretiminin yükselmesi gibi patolojik süreçlerle ilişkilidir. Bu değişiklikler, kıkırdak matriks yıkımı, sinovyal inflamasyon ve subkondral kemik remodelasyonu gibi OA'ye özgü bozuklukları tetiklemektedir. sitokinlerin aşırı üretimi ile ilişkili bulunmuştur. Bu değişiklikler, kıkırdak yıkımı, sinovyal inflamasyon ve subkondral kemik remodelasyonu gibi OA'nin temel patolojik özelliklerini tetikler (26).

2.3.2.1.3. İnflamasyon ve katabolik sinyaller

Proinflamatuvar sitokinler, kondrositlerin ECM sentez kapasitesini baskılayarak katabolik enzimlerin salınımını artırır. IL-1 β ve TNF- α , MMP (matriks metalloproteinaz) ve aggreganaz gibi enzimlerin ekspresyonunu artırarak ECM'nin yıkımına neden olur (27). ECM bileşenlerinin bozulması, kıkırdağın mekanik dayanıklılığını azaltır ve hücrel stres yanıtlarını tetikler (28).

2.3.2.1.4. Apoptoz ve mitokondriyal disfonksiyon

Mitokondriyal disfonksiyon, kondrositlerde apoptozu tetikleyen önemli bir faktördür. Mitokondri dış membranında porların açılması ve sitokrom c'nin sitoplazmaya salınması, apoptotik süreçlerin başlamasına neden olur (25). ROS seviyelerindeki artış, apoptotik sinyal yollarını aktive ederek hücre ölüm oranını artırır (29). Bu süreç, OA'nin ilerlemesine katkıda bulunur ve kıkırdak dokusunda hücre kaybına yol açar (6).

2.3.2.1.5. Mekanik yük ve hücrel stres yanıtları

Aşırı mekanik yüklenme, hücrelerin mekanosensör proteinlerini aktive ederek hücrel stres yanıtlarını başlatır (30). Yüklenmeye bağlı Ca²⁺ akışı ve ROS üretimi, kondrositlerin enerji metabolizmasını olumsuz etkiler (19). Bu durum ECM yapısının bozulmasına ve inflamatuvar sinyallerin kronikleşmesine neden olur (28).

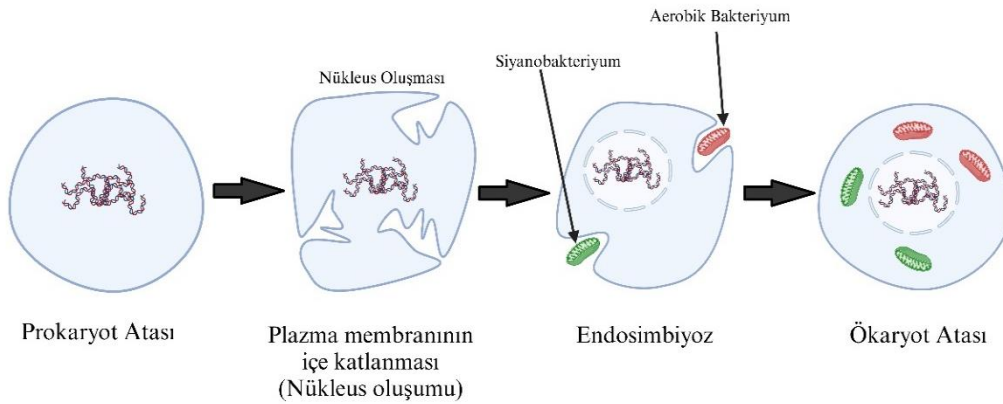
2.4 Mitokondri

Mitokondriyon, adenosin-trifosfat (ATP) üreterek hücrenin enerji ihtiyacını karşılayan organeldir. Hücrede çok sayıda bulunması nedeniyle mitokondri olarak adlandırılmaktadır. Semiotonom olarak çalışan bu organel, hücrel solunumu sağlar. Ayrıca reaktif oksijen radikalleri (ROR) üretimi, hücre içi metabolizma, kalsiyum tamponlanması, hücre çoğalması, yaşlanma ve apoptozda rol oynayarak hücrenin stabilize edilmesinde rol alır. İlk kez 19. Yüzyılın sonlarında tanımlanmasının ardından geçen yüz yılda fonksiyonları farklı çalışmalarla ortaya koyulmuş, 1995 yılında Wang ve ark. tarafından sitokrom c

salınımıyla apoptozu indüklediğinin anlaşılması sonrasında ise hücre ölümü ile karakterize edilen çeşitli nörodejeneratif hastalıklar, tip 2 diyabet, kanser ve kas hastalıklarının da dahil olduğu hastalıkların patogenezindeki rolü araştırılmaya başlanmıştır. Organel stresi alanındaki çalışmaların hız kazanması ile hastalıkların patogenezindeki rolü her geçen gün daha iyi anlaşılmaktadır (31). Son yıllarda biyomedikal çalışmalar, yaşlanma ve hastalık patolojilerinde ortaya çıkan rolü nedeni ile mitokondriye odaklanmaktadır. Her geçen gün artan kanıtlar mitokondriyonun OA patogenezinde de rol oynadığını göstermektedir (1).

2.4.1. Endosimbiyotik hipotez

Mitokondrinin bakterilerle ortak birçok özelliğinin olması, mitokondrinin kökeni ile ilişkili olarak endosimbiyotik hipotezin öne çıkmasına neden olmuştur. Bu teoriye göre ana hücre olan prokaryot, fagositoz yoluyla fotosentez yapabilen siyanobakterileri ve serbest oksijeni kullanabilen α -prokaryotları yutarak simbiyotik bir ilişki kurmuş ve böylece ökaryot hücreler oluşmuştur. Bunun sonucunda prokaryot hücre, endosimbiyotlara korunaklı bir ortam sağlamış, kendisi de enerji üretimini arttırmıştır. (Şekil 2.7) (31).

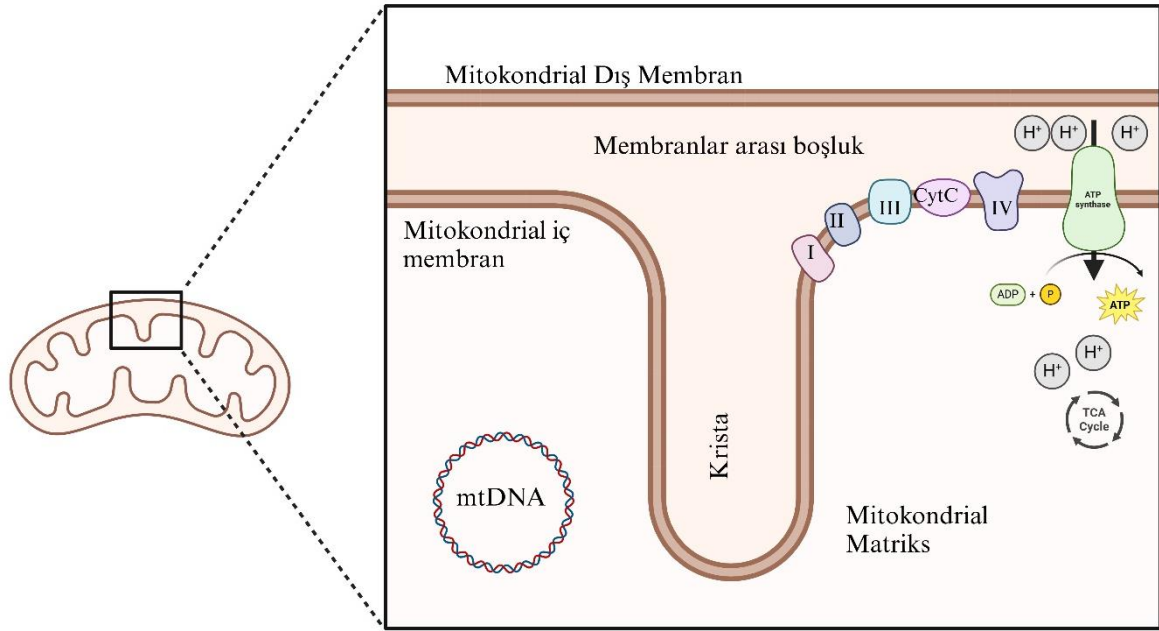


Şekil 2.7. Endosimbiyotik Hipotez

Simbiyotik yaşamın başlaması sonrasında hücrenin asıl enerji kaynağını sağlayan mitokondriler, hücrenin enerji santrali olarak kabul edilmektedir. Hücre içindeki mitokondri sayısı, hücrenin enerji ihtiyacı ile doğru orantılı olarak artmakta ya da azalmaktadır. Bu ihtiyaç aynı zamanda mitokondrinin büyüklüğü ve şeklini de etkilemektedir. Mitokondrinin hücrenin talebi doğrultusunda morfolojik ve işlevsel değişikliklere uğraması GTPaz aktivitesi ile düzenlenir.

2.4.2. Mitokondrinin yapısı

Mitokondri, 4 membrana sahip bir organel olup mitokondrial dış membran, membranlar arası boşluk, mitokondri iç membranı ve matriks olmak üzere 4 temel bölüme ayrılır. (Şekil 2.8)



Şekil 2.8. Mitokondrinin Yapısı

2.4.2.1. Mitokondri membranı

Mitokondri çift membranlı bir organeldir. Membran bileşenleri, işlevsel farklılıklara göre değişebilmektedir. Fosfolipid yapıda olan bu membran, farklı lipid kompozisyonu ve asimetrik fosfolipid dağılımı sayesinde farklı işlevler üstlenmektedir. Lipidden zengin dış membran akışkandır. Bu akışkan özellik; moleküler transportta, füzyon, fisyon ve/veya mitokondri kalite kontrolünde kilit rol oynamaktadır. İç membranda ise dış membrana göre daha az lipid, daha fazla protein bulunmaktadır. Daha az geçirgen olan iç membran üzerine yerleşmiş olan elektron transport zinciri (ETZ) ve bunun gerçekleştirdiği oksidatif fosforilasyon için gerekli olan elektrokimyasal gradient, membranlar arasındaki yapısal farklılıklar sayesinde sağlanır. İç membranda krista adı verilen katlantılar sayesinde oluşturulan kıvrımlı yapı, bu membrana daha geniş bir yüzey alanı sağlamaktadır.

2.4.2.1.1 Mitokondri dış membranı (MDM)

Her ne kadar iç membrana göre daha az protein içerse de dış membranda protein çeşitliliği iç membrana göre daha yüksektir. Bunun nedeni, mitokondrinin diğer organel membranları ile fiziksel temasının buradan olması, mitokondriyal dinamiklerin, mitokondri kalite kontrol sistemi (MKK) işlemlerinin, mitokondriye protein transportunun ve hücrel stres yanıtı yollarının önemli bir bölümünün burada gerçekleşmesidir.

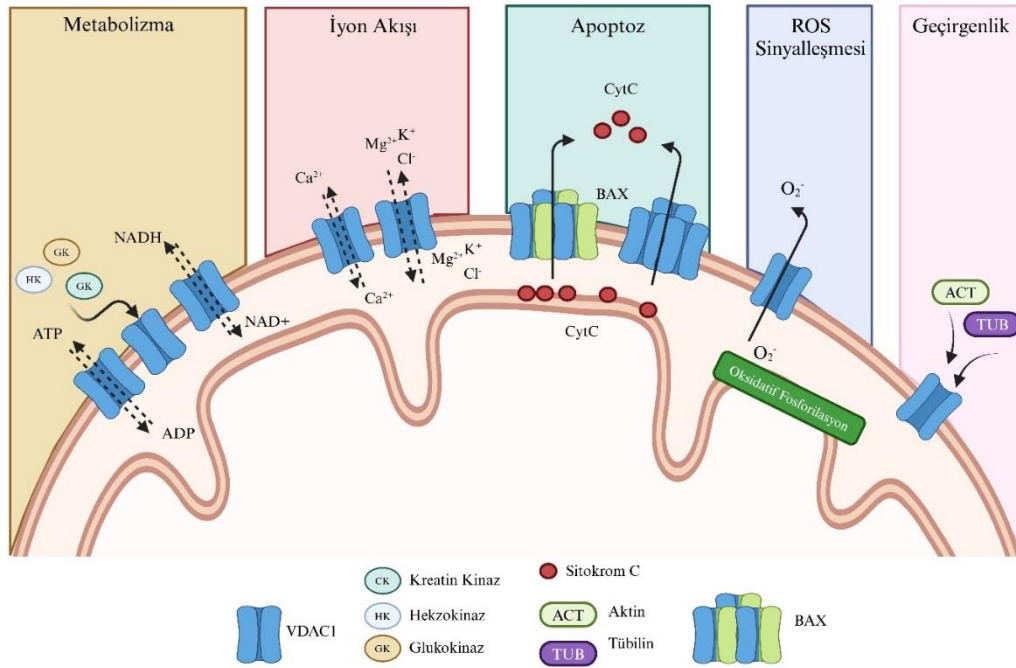
Mitokondri dış membranında öncül protein translokasyonu bileşenleri, por oluşturan proteinler, füzyon ve fisyon aracılık eden proteinler de yer almaktadır. Bu nedenle dış membran mitokondri biyogenezinde ve morfolojisinde önemli bir yere sahiptir. Diğer proteinler ise ısı şoku proteinleri (Heat shock protein, HSP), mitokondri fisyon proteini 1 (Fis1), mitokondri dış membran translokazı 70 (Translocase of outer membrane, TOM70), adenin nükleotit translokator 1, vezikül ilişkili membran proteini ile ilişkili protein B (Vesicle-associated membrane protein-associated protein B, VAMP-B), metaksin-2 ve optik atrofi protein1 (Opa1) dir.

2.4.2.1.1.1. Porin kompleksi

Mitokondrinin biyogenez ve işlevselliği için gerekli metabolitlerin, enzimlerin ve lipidlerin sitoplazmadan alınıp doğru bölgeye yerleşmesi için gerekli olan su dolu kanallar olarak tanımlanan porinler dış membran üzerinde yer almaktadır. Bu kanal ailesinin bir üyesi olan ve küçük metabolitlerin değiş tokuşunda önemli rol oynayan voltaj bağımlı anyon kanalı (Voltage-dependent anion channel, VDAC) üzerinde çalışmalar giderek artmaktadır. Diğer dış membran proteinlerinden olan TOM40, Sam50 gibi 600 kDa'dan küçük hidrofilik moleküllerin geçişini kontrol eden kanal proteinlerinden VDAC'ı ayıran en önemli özellik, 1500Da'a kadar olan moleküllerin geçişine izin vermesidir. VDAC'lar;

1. İyonların ve metabolitlerin akışını kontrol eden kanallar oluşturarak, mitokondrinin diğer organellerle iletişimini sağlar.
2. ATP/ADP, NAD⁺/NADH gibi metabolitler, Krebs döngüsünün ana ürünleri, kolesterol ve glutamat için dış membrandan geçişi sağlar.
3. Heksokinaz, glukokinaz ve kreatin kinaz gibi bir çok sitozolik enzim ile etkileşime girerek, enzim aktivitesi için gerekli olan ATP kaynağını sağlar.
4. Sitozolik Ca²⁺ seviyesinin fizyolojik aralıkta kalmasına ek olarak magnezyum, klorür ve potasyum iyonlarının akışını kontrol eder.
5. Oksidatif fosforilasyon sırasında açığa çıkan ROS, süperoksit anyonunun sitozole aktarılmasını sağlar.

6. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik faktörlerle etkileşim sonucunda mitokondri aracılı hücre ölümü ve hayatta kalma sinyal yolları için kontrol görevi görür.
7. Sitozol ve mitokondri arasındaki ara yüzde hücre yaşamının ve ölümünün düzenlenmesinde işlevsel olan proteinlerin mitokondride yerleşimine olanak sağlayarak apoptozun düzenlenmesinde görev alır.
8. Dış ve iç membran arasında lipidlerin transferini kolaylaştırarak kardiyolipin sentezini sağlar. (Şekil 2.9)



Şekil 2.9. Mitokondri Dış Membranındaki VDAC Kanallarının Fonksiyonları

2.4.2.1.2. Membranlar arası boşluk (MAB)

Mitokondride, membranlar arası boşluk ve matriks olmak üzere iki sulu ortam bulunmaktadır. Membranlar arası boşluk sitozol ve matriks arasında bulunması nedeniyle taşıma ve sinyal merkezi olarak çok sayıda metabolik enzimi barındırmaktadır. Kreatin kinaz ve nükleotit kinaz gibi nükleotit metabolizması ile ilgili enzimler de membranlar arası boşlukta yer almaktadır. Bunlara ek olarak matriks ve sitozol arasında proteinlerin, lipidlerin ve metal iyonların değişimi, apoptotik yolağın başlangıcı, solunum zinciri tarafından üretilen ROS'tan korunma veya mitokondri morfogenezi gibi süreçlerin koordinasyonunda da membranlar arası boşluk görev almaktadır.

2.4.2.1.2. Mitokondri iç membranı (MİM)

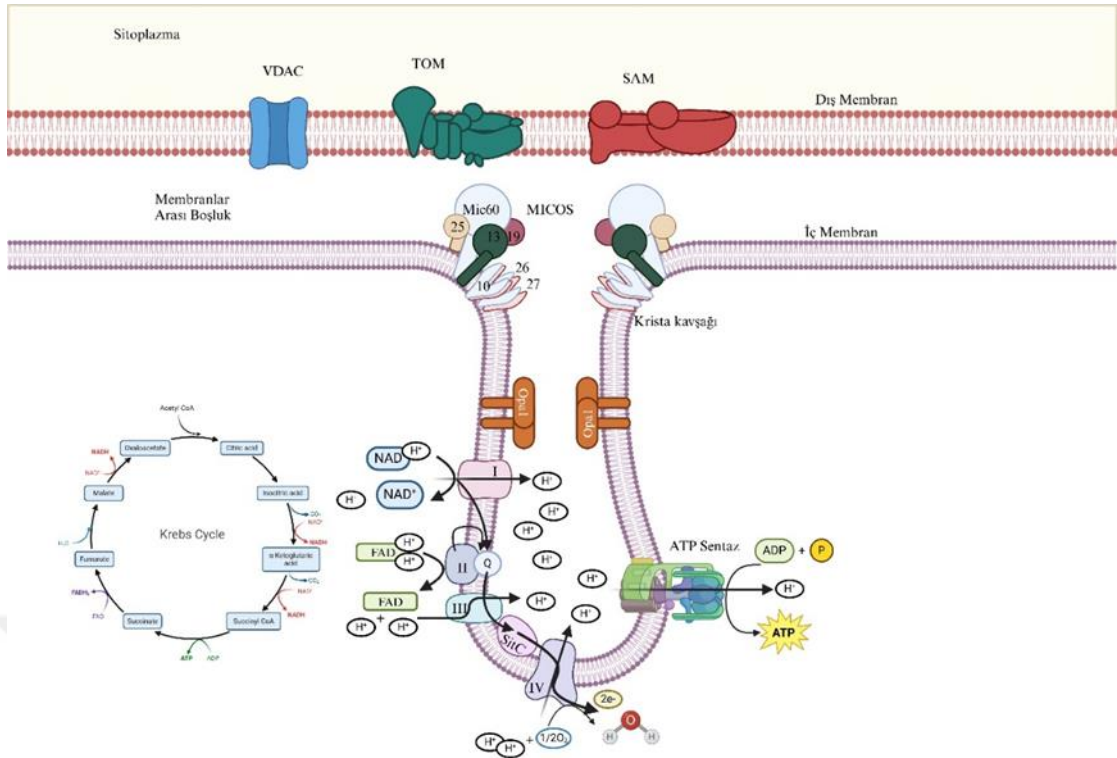
Mitokondri iç membranı, mitokondrial matriksi membranlar arası boşluktan ayırmaktadır. İç membran, kendi içinde krista adı verilen invajinasyonlar yaparak yüzey alanını genişleten bu alanlarda oksidatif fosforilasyonu gerçekleştirir. Bu nedenle mitokondri iç membranının yüzey alanı, hücrenin ihtiyacı ile doğru orantılı olarak artar. Mitokondri iç membranında, oksidatif fosforilasyon sistemi, iç membran translokazı (Translocase of the inner membran, TIM) 22, TIM23 ve mitokondri oksidaz yerleştirme proteini 1 (Oxidase assembly protein 1, OXA1), metabolit akışına aracılık eden taşıyıcı proteinleri, kalite kontrol proteazları ve fosfolipit metabolize eden enzimleri bulundurur. İç membran, ETZ tarafından üretilen proton gradyanını koruyan sağlam bir difüzyon bariyeridir.

İç membranın krista yapısının oluşmasında kardiyolipin önemli bir görev üstlenmektedir. Kardiyolipinin mitokondrideki işlevleri temelde üç ana başlık altında toplanmaktadır.

1. Mitokondri biyogenezindeki en önemli yapılar olan iç ve dış membran translokazlarının yerleşimine katkıda bulunur.
2. ATP sentaz oligomerlerinin yerleşimini destekler.
3. Antijenik yapıda olan kardiyolipinin mitokondri dış membranına yerleşimi, mitofaji veya apoptotik hücre ölümü için sinyal oluşturur.

Kristalarda, artan redoks potansiyeline göre sıralanmış olan nikotinamid adenin dinükleotit dehidrogenaz (NADH), unikinon oksidoredüktaz (kompleks I), süksinat ubikinon oksidoredüktaz (kompleks II), ubikinol sitokrom c oksidoredüktaz / sitokrom bc1 kompleksi (kompleks III), sitokrom c oksidaz (kompleks IV), ATP sentaz ve krista lümeninde ise sitokrom c olarak adlandırılan proteinler bulunmaktadır.

Krista, oksidatif fosforilasyonun meydana geldiği ETZ'yi içeren yapıdır. Bu özelliği nedeniyle kristada ortaya çıkan morfolojik değişiklikler mitokondride işlevsel farklılığa neden olarak çeşitli hastalıkların moleküler patogenezinde rol oynarlar. Mitokondri iç membranında tanımlanan mitokondri temas bölgesi ve krista organizasyon bölgesi (Mitochondrial contact site and cristae organizing system, MICOS) krista oluşumunda ve stabilizasyonunda önemli göreve sahiptir. Mic60 ve Mic10 gibi çoklu protein komplekslerinden oluşan bu yapı dış membran proteinleri ile etkileşime girerek iç ve dış membranlar arasında temas bölgesi oluşturur. (Şekil 2.10)



Şekil 2.10. Mitokondri Kristasında Enerji Üretimi

2.4.2.2. Mitokondrial matriks

Matriks yapısı jel kıvamında olup mitokondri DNA'sı, ribozom, çözünür enzimleri, küçük organik molekülleri, nükleotit kofaktörlerini ve inorganik iyonları içermektedir. Bu enzimler, iç membranda yerleşmiş oksidatif enzimlerle iş birliği yaparak besinlerin CO₂ ve H₂O'ya indirgenmesi sonucunda ATP üretimini sağlar. Matriks içinde Krebs döngüsü ve yağ asitlerinin β oksidasyonu gerçekleşmektedir. Yaklaşık 1500 proteinden oluşan mitokondri proteomunun yalnızca 13 tanesi mitokondri genomu tarafından kodlanmakta ve kompleks I, III, IV ve ATP sentazda işlev görmektedir. Söz konusu bu proteinler matriksteki ribozomlar tarafından sentezlendikten sonra OXA1 isimli translokaz yardımı ile iç membrana entegre edilmektedir. Mitokondri proteomunu oluşturan diğer proteinler ise nükleer genom tarafından kodlanarak translasyon sonrası transport ile yönlendirilmektedir.

geçişin olabilmesi, mitokondrial proteinlerin katlanmasının doğru yapıda olması ile mümkündür. Bu süreç, sitozolik HSP70 şaperonu tarafından sağlanmaktadır.

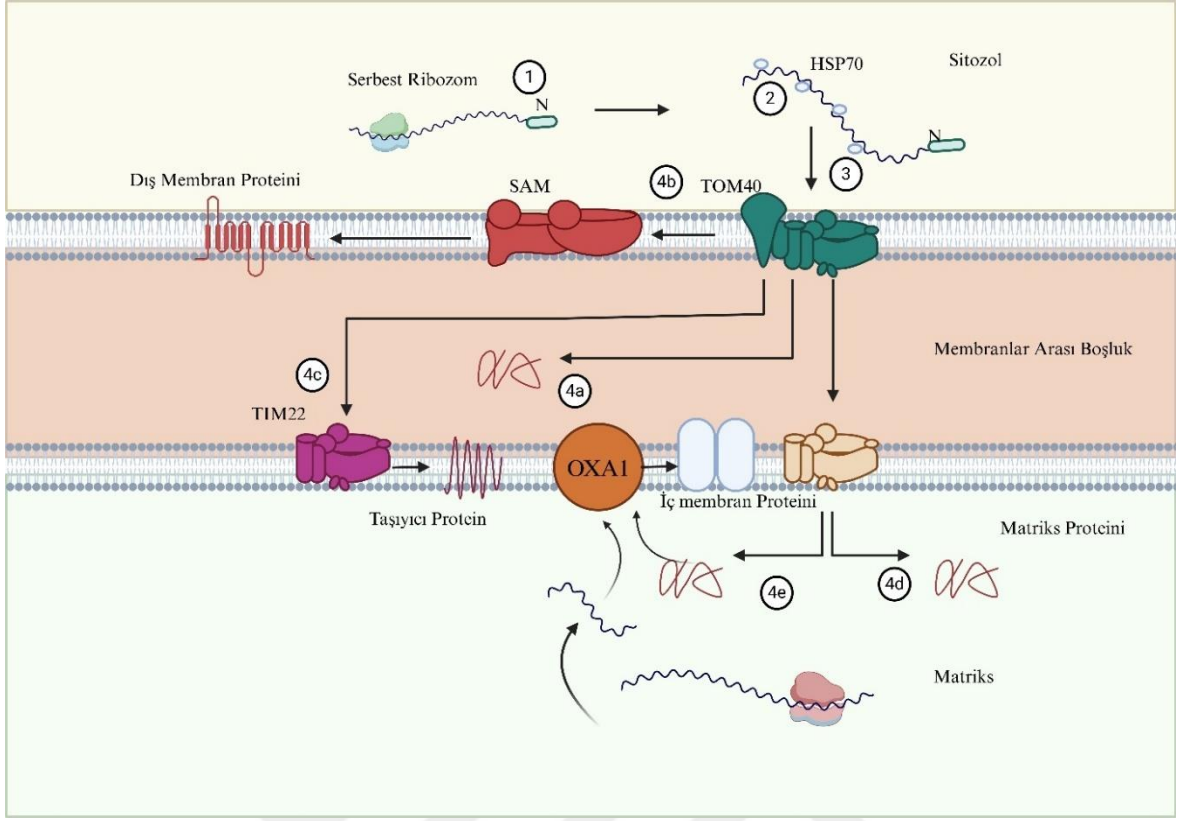
Mitokondride işlevsel olan proteinlerin matrikse geçebilmesi için hem dış zarda hem de iç zarda farklı kanalları kullanması gerekmektedir. Translokazlar ve özellikleri tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2.2. Mitokondriyal Translokazlar

Dış Membran Translokazı (Translocase of the outer membrane, TOM)	Çoklu alt birimlerin oluşturduğu kompleks bir proteindir. Hem reseptör hem de kanal görevi yapar. Ör: TOM40, TOM20, TOM22 ve TOM70
İç Membran Translokazı (Translocase of the inner membrane, TIM)	Mitokondrinin farklı bölümlerine protein hedeflenmesi ile ilişkilidir. Ör: TIM23/27 (matriks), TIM44, TIM54, TIM22 (iç membran), TIM9/10.
OXA1 Translokazı	Sitoplazmadan matrikse aktarılan veya mitokondri tarafından sentezlenen proteinlerin iç membrana yerleşmesinden sorumludur.

Mitokondriye protein hedeflenmesi şu şekilde özetlenebilir (Şekil 2.12):

1. Sitoplazmadaki serbest ribozomlarda protein sentezi tamamlanır.
2. Sentezlenen proteine HSP70 bağlanarak doğrusal yapısı korunur.
3. N Terminaldeki sinyal, TOM40 translokazındaki reseptör tarafından algılanır. HSP70 proteinden ayrılır ve protein ATP harcanarak membranlar arası boşluğa iletilir.
4. Membranlar arası boşluktaki protein, aminoasit dizisine göre;
 - a. Membranlar arası boşlukta işlevsel protein aktive olur
 - b. Mitokondri dış membranında işlevsel olan β -tabakalı proteinler sınıflama ve yönlendirme merkezi olan SAM (Sorting and assembly machinery) tarafından membrana yerleştirilir.
 - c. İç membranda işlevsel olan proteinler TIM22 tarafından iç membrana yerleştirilir.
 - d. TIM23, proteinleri iç membrana veya matrikse yönlendirerek geçişi sağlar. Matrikste aktif proteinler, burada şaperonlarca katlanırlar.
 - e. Sitoplazmada sentezlenerek matrikse geçen veya matrikste sentezlenen proteinler OXA1 aracılı olarak membrana yerleştirilir.



Şekil 2.12. Mitokondriye Protein Hedeflenmesi

2.4.4. Mitokondri kalite kontrolü

Mitokondri, hücre homeostazının korunmasında kilit bir rol oynamaktadır. Doğası gereği, ROS üretimi nedeniyle, mitokondri bileşenleri hızla dejenere olarak işlev kaybına uğrayabilmektedir. Mitokondri veya nükleer genomdaki mutasyonlar sonucunda oluşan anormal yapıdaki proteinler de yine artmış ROS üretimine ve işlev kaybına neden olmaktadır. Bu değişikliklerin, birçok hastalığın patogenezinde rol oynadığı bilinmektedir.

Mitokondride, nükleer genom ve mitokondrial genom birlikte çalışır. Elektron transport zincirinin çalışabilmesi için her iki genom aracılığıyla üretilen proteinlerin uygun biçimde birleştirilmeleri gerekmektedir. Bu süreçte gerçekleşen hatalar, doğru katlanmamış proteinlerin ortaya çıkmasına ve bunların agregatlar oluşturmalarına neden olur. ATP üretiminin yan ürünü olan ROS ise, DNA ve lipidler gibi diğer moleküllerle etkileşerek oksidatif hasarın etkisini daha da artırır ve iç membranın depolarizasyonuna sebep olabilir. Sonuç olarak pro-apoptotik proteinler sitozole geçer ve apoptozu uyarır.

Mitokondrinin düzgün çalışıp çalışmadığı, mitokondri proteomunun bütünlüğünü ve homeostazı, mitokondri kalite kontrol mekanizmaları tarafından denetlenir. Ek olarak mitokondrinin morfolojik yapısı da düzgün işlev göstermesi bakımından önemlidir.

1. Şaperon Aracılı Kalite Kontrol Mekanizması

Nükleer genom tarafından kodlanan proteinler, dış membrandan katlanmadan geçerek mitokondriye taşınmaktadır. Hedef bölgeye ulaştıktan sonra katlanarak işlevsel hale gelmektedir. Katlanma işleminin kontrolü, ağırlıklarına göre adlandırılan HSP (heat shock protein) adı verilen mitokondrial şaperonlar aracılığıyla yapılır. Bu şaperonlar, hatalı katlanmış proteinleri yıkıma yönlendirirler. Mitokondride görev alan bazıları HSP27, HSP60, HSP70, HSP72 ve HSP90'dır.

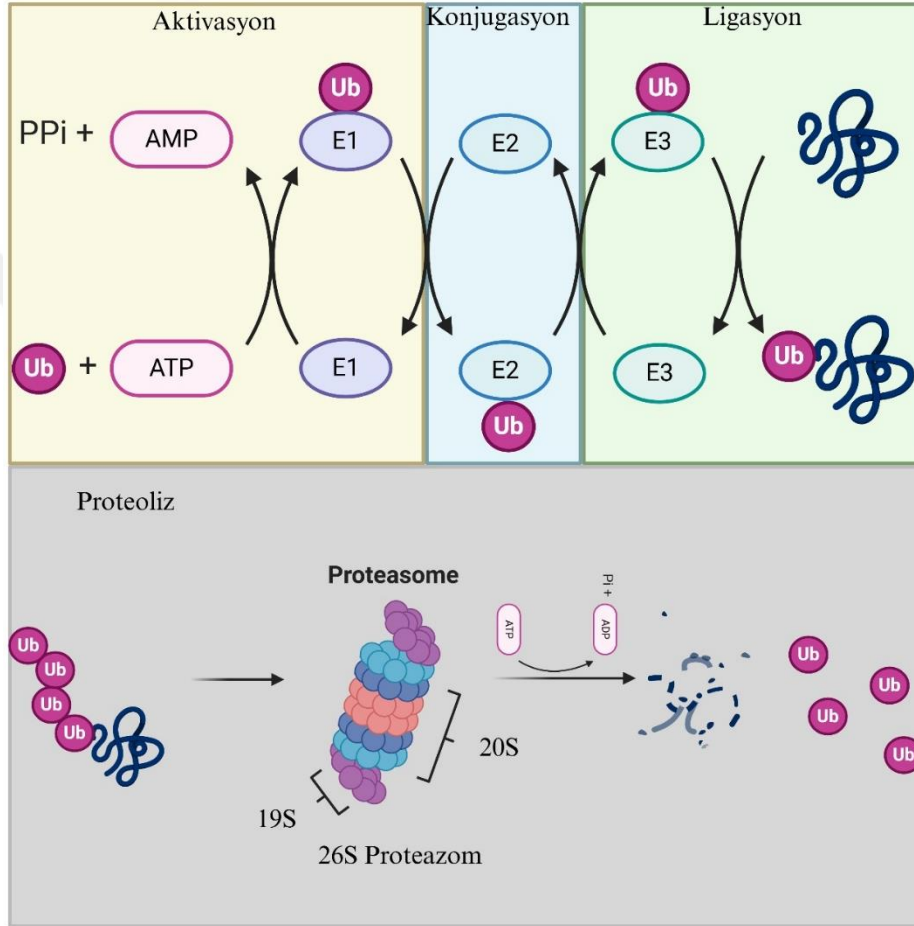
2. Mitokondri Proteazları

Mitoproteaz olarak da adlandırılan mitokondri proteazları, kalite kontrol sisteminin bileşenidir. Memelilerde yerleşik ve geçici olmak üzere 2 ana sınıfta incelenir. Yerleşik olanlar, mitokondri dış membranı, membranlar arası boşluk, mitokondri iç membranı ve matrikste bulunurlar. Mitoproteazlar, mitokondrinin homeostazını korumak, yanlış katlanmış veya hasarlı proteinleri ortadan kaldırmak ve mitokondrinin fonksiyonlarını sürdürmek için oldukça önemlidir.

Lon proteaz (LonP) ve ATP bağımlı Clp proteaz proteolitik alt birim (ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit, ClpP) CLPP (AAA proteazları) mitokondrial matrikste yer alır. Hasarlı matriks proteinlerinin uzaklaştırılmasını sağlarlar. Matriks AAA (mAAA) ve iç membran AAA (iAAA) olarak ikiye ayrılan bu proteazlar, protein kalite kontrolünün büyük kısmını yönetmektedir. mAAA proteaz sisteminin katalitik yüzeyi matrikse bakar ve mitokondrial translasyonun düzenlenmesinde işlevseldir. iAAA proteaz sistemi, YME1L, OMA1 ve ATP23 proteazlarından oluşur. Bu proteazlar dış membranda yerleşmiştir ve katalitik yüzeyi membranlar arası boşluğa bakmaktadır. ATP23, mitokondrial fosfolipid metabolizması ile ETZ komplekslerinin korunmasında yer alır. Ek olarak OPA1 proteolizi yoluyla mitokondri dinamiklerini de yönetmektedir. Oksidatif stres durumlarında dış membranın yeniden şekillenmesini sağlar. Serin proteaz HTRA2/OMİ, apoptozda rol oynamasının yanında hasarlı iç membran proteinlerinin yıkımında görevlidir. Dış membranda bulunan, ubikütin spesifik peptidaz 30 (USP30) ise, deubikütinasyondan sorumludur. PINK1/Parkin tarafından indüklenen ubikütinasyonu antagonize ederek mitokondrinin fazla/gereksiz mitofajiden korunmasını sağlar.

3. Ubikütin-Proteozom Sistemi (UPS)

Hasarlanmış ya da işlevini yitirmiş küçük ve kısa ömürlü proteinlerin seçici olarak yıkılmasını sağlar. Hangi lizinin (K) übikütilendiğine bağlı olarak, substratın kaderi belirlenir. Proteozomal yıkım, K11 veya K48 pozisyonundan 4-6 übikülin zincirinin bağlanması ile gerçekleşir. K63 pozisyonu ise otofajik yıkıma neden olur. Bu sistem übikütilenme ve deübikütilenme/yıkım aşaması olmak üzere birbirini takip eden süreçlerden oluşur. (Şekil 2.13)



Şekil 2.13. Übikülin-Proteazom Sistemi

Übikütilenme aşaması, ATP yıkımı ile aktive olarak başlar. Aktivasyon sonrasında gerçekleşen konjugasyon ve ligasyon basamaklarının sonucunda übikülin hedef substrata bağlanmış olur. Yıkım, 26S Proteozom'da gerçekleşmektedir. Substratı yakalayan 2 adet 19S'lik düzenleyici kompleks bölgesi ve proteaz işlevini gerçekleştiren 20S'lik fiçli şekilli gövdeden oluşmaktadır. Bu sistem dış membran proteinlerinin yapım/yıkım döngüsünü de kontrol etmektedir.

4. Mitokondri İlişkili Yıkım

Mitokondri ilişkili yıkım (Mitochondria associated degredation, MAD), proteozom tarafından dış membran proteinlerinin übikütinlenmesi ve übikütin-proteaz sistemi ile yıkılmasını ifade etmektedir. Matriks ve membranlar arası boşluktaki proteinler, dış membrana retransloke edilir ve proteozomda yıkılırlar.

5. Mitokondriden Köken Alan Veziküller

Fizyolojik koşullarda ve stres altında mitokondride yer alan bazı proteinlerin ve lipidlerin oksidasyonuna bağlı işlev bozukluğu gelişmesi sonucunda, organel işlevinin korunması için bu hasarlı yapılar büyüklüğü 50-150nm'lik veziküller ile lizozoma veya peroksizoma yönlendirilir ve burada yıkılırlar.

Mitokondriden ayrılan bu veziküllerde mitokondriye çapalı protein ligaz (Mitochondrial-anchored protein ligase; MAPL), mitokondri E3 übikütin ligaz 1 (mul1, MULAN, GIDE veya HADES) proteinleri varsa bu vezikül doğrudan peroksizoma taşınmaktadır. Eğer veziküllerin üzerinde TOM20, PINK1, Parkin, Drp1 gibi proteinler varsa bu veziküller lizozoma yönlendirilirler. Mitokondriden köken alan bu veziküller;

- Mitokondri proteomunu korur. Tüm organelin mitofaji ile yıkılmasından önce hasarlı bileşenleri uzaklaştırarak hasarı telafi eden “ilk savunma sistemi”ni oluşturur.
- Uzaklaştırılan hasarlı protein ve lipidlerin yerine yenilerinin yapılmasını sağlar.
- Mitokondri ile diğer organeller arasında iletişim sağlar.
- Bağışıklık toleransı ve mitokondriyal antijen sunumuna aracılık eder.
- Peroksizomların de novo viyogenezinde işlevseldir.

6. Mitokondriyal Katlanmamış Protein Yanıtı

Nükleus ve mitokondri arasındaki iletişim, karşılıklı sinyallerin birbirine aktarılması ile olur. Nükleustan mitokondriye aktarılan sinyaller anterograd sinyalleşmeyi oluştururken, mitokondriden nükleusa aktarılan sinyaller ise retrograd sinyalleşmeyi oluşturmaktadır. Mitokondri, dış çevreden gelen uyarılara hücreyel yanıtın düzenlenmesinde önemli bir yere sahiptir. Mitokondriden nükleusa yollanan sinyaller ile nükleer genlerin ekspresyonu sağlanmaktadır. Proteaz bozuklukları, oksidatif/metabolik stres, mitkondride hatalı katlanan/hasarlanan proteinlerin birikmesi, mtDNA mutasyonları sonucu oluşan stresle başa çıkabilmek için mitokondriyal şaperonların, proteazların, mitokondri dinamikleri üzerinde işlevsel olan proteinlerin, mitokinlerin ve antioksidanların ekspresyonunun arttırılması ve böylece homeostazın sağlanması “mitokondri katlanmamış protein yanıtı (Mitochondrial

unfolded protein response, UPR^{mt}) ile sağlanır. Bu yanıt, 4 farklı mekanizmadan oluşmaktadır.

1. Kanonikal mitokondri katlanmamış protein yanıt yolağı:

Entegre stres yanıtı olarak da adlandırılan hücresel yanıt ile homeostaz yeniden sağlanır. Bu yolak, ökaryotik başlatma faktörü 2'nin (Eukaryotic initiation factor 2a, eIF2a) fosforlanması ile global protein sentezinin azaltılmasını, transkripsiyon faktörlerinden aktive edici transkripsiyon faktör 4 (Activating transcription factor 4, ATF4) ile hücresel hasarın azaltılması, hücre sağkalımına yönelik seçili genlerin ekspresyonlarının artırılmasını hedefler. Bu yolak, hücreyi yaşamaya yönelik uyarlayabilir. Stres uyarılarının doğası ve yoğunluğunun artması durumunda ise hücreyi ölüme de yönlendirebilmektedir.

Mitokondride oluşan stres; C/EBP homolog protein (C/EBP homologous protein; CHOP), ATF4 ve ATF5'i de uyararak UPR^{mt}'nin retrograd sinyal yolağını aktif hale getirmektedir. ATF4, ATF5 ve CHOP'tan oluşan üçlü yapı nükleusa geçerek şaperon ve proteazların ekspresyonunu indükleyerek mitokondrideki proteinlerin katlanma kapasitesini artırmaya katkı sağlamaktadır.

2. UPR^{mt}-Sirtuin Yolağı:

Mitokondriyal işlev kaybı, organelde oksidatif strese neden olmaktadır. UPR^{mt}-Sirtuin Yolağı (SIRT) ile antioksidan kapasitenin artması sağlanarak stres yanıtı oluşturulur. Sirtuinler, lizin deasetilazlar ve ADP-riboziltransferazlardır. Bu ailenin üyesi olan SIRT3, UPR^{mt}-Sirtuin yolağının bir parçası olarak aktive olur ve transkripsiyon faktörlerinden Forkhead box O3 A'yı (FOXO3A) uyararak deasetilasyonuna sebep olur. Deasetile FOXO3A ise nükleusta antioksidan yanıt elemanlarından süperoksit dismutaz 2 (SOD2) ve katalaz genlerinin ekspresyonunu sağlar.

3. Mitokondri tRNA işlenmesinin UPR^{mt} ile düzenlenmesi

Mitokondriyal genom tarafından sentezlenen proteinlerin ortaya çıkardığı yükü azaltmak için mitokondriyal translasyonun durdurulması ile düzenlenir. İnsan mitokondri tRNA'sı (mt-tRNA) transkripsiyon sonrası modifikasyonlar ile işlevsel hale gelir. Bu süreçte RNazP ve RNazZ aktivitesine sahip ELAC2 proteini görev alır.

RNazP ailesi üyesi olan mitokondriyal RNazP protein (MRPP); MRPP1, MRPP2 ve MRPP3 olmak üzere üç alt üiteden oluşmakta ve tRNA'nın 5' ucunun işlenmesinde görev almaktadır. Mitokondri stresi ile aktive olan UPR yanıtı elemanlarında LonP, substratı olan

MRPP3'ün yıkımını arttırarak mt-tRNA modifikasyonunu inhibe eder ve protein sentezini azaltır.

4. Membranlar arası boşlukta katlanmamış protein yanıtı (UPR^{MAB})- Östrogen Reseptör Alfa (ER α) yolağı

Membranlar arası boşluktaki hatalı katlanmış proteinler, matriksdeki UPR'den bağımsız olarak CHOP yolağını kullanmadan membranlar arası boşlukta katlanmamış protein yanıtı (UPR^{MAB}) olarak adlandırılan mekanizma ortadan kaldırılmaktadır. Membranlar arası boşluktaki proteinlerin yıkımı ise HTRA2/OMİ tarafından gerçekleştirilir.

Membranlar arası boşlukta hatalı katlanan proteinler ve artan ROS nedeni ile aktive olan AKT sinyal yolağı ER α 'nın fosforlanmasına neden olur. Bu sürece bağlı olarak indüklenen nükleer solunum faktörü (Nuclear respiratory factor1, NRF1) proteazların ve proteozomda işlevsel olan genlerin ekspresyonunu sağlayarak UPR^{MAB} kapasitesini arttırır. Bu yolak ER α 'yı eksprese eden dokularda aktiftir.

2.4.5. Mitokondriyal dinamikler

Mitokondri dinamikleri, birbiri ile koordineli gerçekleşen fisyon ve füzyon döngülerinden oluşur. Bu döngü özellikle postmitotik hücreler için hayati öneme sahiptir. Bu sayede mitokondri içeriği verimli bir şekilde dağıtılır ve sağlıklı mitokondri havuzu ile optimal oksidatif fosforilasyon aktivitesi kurulur.

Mitokondri dinamikleri; hücre döngüsü, apoptoz, hücre göçü, mitofaji ve ROS üretimi dahil olmak üzere çeşitli hücresel olaylarla bağlantılıdır. Bu nedenle fisyon/füzyon dengesi sağkalım için önemlidir. Mitokondrinin sahip olduğu plastisite, mitokondri ağının devamlı olarak uzamasına ya da bölünmesine olanak sağlar. Fisyon; özelliğini yitirmiş, hasarlı protein içeriğine sahip, membran stabilizasyonunu sağlayamayan, mtDNA mutasyonuna ya da hasarına sahip mitokondrinin ikiye bölünmesidir. Füzyon ise, iki farklı mitokondrinin membranları aracılığı ile birbiri ile birleşmesi ve ortak mitokondriyal matrikse sahip olması demektir (31).

Fisyon, yani mitokondri bölünmesi, GTPaz aktivitesine sahip dinamin ilişkili protein 1 (Dynamin related protein, Drp1) tarafından düzenlenmektedir. Drp1 proteini, fisyon mekanizmasının ana düzenleyicisidir ve hücresel enerji ihtiyacına göre bu süreci yönlendirir (32). Mikrotübüller tarafından mitokondri dış membranına taşınan Drp1; Fis1, mitokondriyal dinamik proteinleri olan Mid49, Mid51 ve mitokondriyal fisyon faktörü (Mff)

gibi Drp1 reseptörleri ile etkileşerek mitokondrinin koparılacak bölgesinin etrafını sarmakta, GTP hidrolizi ile de membranların ayrılması sağlanmaktadır.

Mitokondri ve endoplazmik retikulum membranları arasında Ca^{+2} transportu, apoptotik sinyalizasyon ve lipid metabolizmasına aracılık eden yakın mekânsal ve fiziksel temas bölgeleri bulunmaktadır. Filyon sırasında da bu temas gerçekleşmektedir. Endoplazmik retikulum tübüleri, mitokondrinin etrafına sarılarak nereden boğumlanacağına yol gösterir.

Mitokondriyal fizyon, 3 aşamada gerçekleşir. Önce mitokondriler karşılıklı olarak tutunur. Membran kenetlenmesi ve temas yüzeylerinin arttırılması ile aralarındaki mesafe daraltılır. Mitokondri dış membranı GTP hidrolizi sonucu oluşan konformasyonel değişikliklerle birleşir. Dış membran füzyonu sonrasında iç membranlar da füzyona uğrar. Füzyon proteini OPA1, mitofusin 1 (Mfn1) ve mitofusin 2 (Mfn2) olmak üzere 3 farklı GTPaz tarafından katalizlenir. Mfn1 ve 2 dış membran, OPA1 ise iç membran birleşmesinden sorumludur. Ayrıca OPA1, mitokondriyal iç membranın stabilizasyonunu sağlayarak ATP üretiminin devamlılığını destekler (24).

2.4.6. Mitofaji

Organel sayısının ayarlanması ve hasarlanan organellerin ortadan kaldırılması için organellere özgü otofaji tipleri bulunmaktadır. Mitofaji, mitokondrinin seçici olarak lizozomlarda parçalanmasını tanımlamak için kullanılan terimdir. Organel sayısının ayarlanması kadar, elektrokimyasal gradiyenti bozulmuş ve hasarlanmış mitokondrilerin hücreden seçici olarak uzaklaştırılmasına olanak sağlar. Parkin ve parkin bağımsız (reseptör aracılı) mitofaji olmak üzere 2 farklı mitofaji türü tanımlanmıştır.

- PTEN'in indüklediği Kinaz 1 (PTEN-induced putative kinase1, PINK1)-Parkin Aracılı Mitofaji

Sitoplazmada sentezlenen PINK1 proteini üzerinde bulunan mitokondri hedefleme dizisi sayesinde mitokondrinin dış membranında konumlanmış olan TOM kompleksinden geçerek iç membranda bulunan rhomboid-benzeri serin proteaz (Mitochondrial intramembrane cleaving protease, PARL) tarafından mitokondrinin parçalanması gerçekleştirilir. Elektrokimyasal gradiyentini kaybetmiş mitokondride; TOM kompleksinden içeriye geçemeyen PINK1 proteini hasarlı mitokondri üzerinde birikir. Bu sayede hasarlı proteinler işaretlenmiş olur. Üzerinde PINK1 biriken mitokondri E3 ubiquitin ligaz aktivitesine sahip parkin proteinin hasarlı mitokondriye yönelmesini sağlamaktadır.

Mitokondri dış membranına yönelen söz konusu E3 übikülin ligazın substratları arasında Mfn1/2 ve VDAC1 bulunmaktadır. Übikülinlenen Mfn1/2 hasarlı mitokondrinin füzyona gitmesini engelleyerek hasarın yayılmasını önlemektedir. VDAC1'in übikülinlenmesi ise hücrenin apoptoza gitmesini engelleyerek hücrenin sağ kalım mekanizmasını aktive etmesini sağlar. Übikülinlenmiş proteinlerin bulunduğu mitokondri otofaji reseptörleri (P62, optineurin, NDP52, NBR1 vb.) aracılığı ile fagofor içine alınarak imha edilmek üzere lizozoma aktarılmaktadır.

- **Parkin bağımsız – Reseptör Aracılı Mitofaji**

Bu süreçte, mitokondri dış membranında bulunan ve LC3 etkileşim bölgesi (LC3 intracting region, LIR) domaini içeren transmembran reseptörler görev almaktadır. Söz konusu bu yapı LC3 ile etkileşim bölgesine sahip olduğu için parkin proteinine gerek olmadan otofagozom membranına yıkılacak substratın bağlanmasını sağlamaktadır. En iyi tanımlanan örneği eritrositlerdir. Eritrosit membranında bulunan Nix diğer adı ile BNIP3L aracılığı ile otofagozoma bağlanarak lizozoma yönlendirilmektedir.

Diğer bir dış membran proteini olan FUN 14 Domaini içeren protein 1 (FUN 14 domain containing1, FUNDC1), hipoksinin indüklediği parkin bağımsız mitofajide reseptör olarak görev almaktadır. Bu reseptörlere ek olarak, bazı lipidler de mitofajiyi indüklemek için LC3'e bağlanabilmektedir. Normal koşullar altında, kardiyolipin (CL) iç membranda bulunur ve mitokondride stres meydana geldiğinde dış membran mitofajiyi doğrudan tetiklemek için LC3'e bağlanır.

2.5. Mitokondri ve OA ilişkisi

Son yıllarda biyomedikal çalışmalar, yaşlanma ve hastalık patolojilerinde ortaya çıkan rolü nedeni ile mitokondriye odaklanmaktadır. Her geçen gün artan kanıtlar mitokondriyonun OA patogenezinde rol oynadığını göstermektedir (31).

2.5.1. OA ve mitokondri disfonksiyonu

OA patogenezi içerisinde mitokondrial disfonksiyon, kondrositlerin sağlığını doğrudan etkiler (25). Ancak, yaşlanma, inflamatuvar mediyatörler ve mekanik stres, mitokondriyal membran potansiyelinde düşüşe ve ROS birikimine neden olabilmektedir (Xu et al., 2020). ROS birikimi, protein, lipid ve DNA'da oksidatif hasara yol açar ve hücrel ölüm sürecini başlatır (24).

mtDNA mutasyonları ve protein fonksiyonlarındaki değişiklikler, OA'de sık görülür. mtDNA hasarı, ATP üretiminde düşüşe ve ROS üretiminde artışa neden olur, bu da kondrositlerde homeostaz kaybına yol açar (23). Bunun sonucunda, hücre hayatta kalma mekanizmaları zayıflar ve inflamasyon tetiklenir (28).

2.5.2. Mitokondriyal biyogenez

Mitokondriyal biyogenez, PGC-1 α ve NRF1 gibi transkripsiyonel düzenleyiciler tarafından kontrol edilen yeni mitokondri oluşum sürecidir (23). Bu süreç, oksidatif stresin arttığı koşullarda hücreSEL enerji üretiminin devamlılığını sağlar. OA patolojisinde mitokondriyal biyogenez mekanizmasının zayıflaması, ATP üretiminin azalmasına ve enerji metabolizmasının bozulmasına neden olur (29). Enerji metabolizmasındaki bu bozulma, ROS birikimine ve hücreSEL fonksiyonların aksamasına yol açar (28).

2.5.3. Mitokondriyal dinamikler

Mitokondriyal dinamikler, hücre içi enerji metabolizmasının düzenlenmesi, organel bütünlüğünün korunması ve stres yanıtlarının yönetilmesinde temel bir süreçtir. Füzyon, fisyon, biyogenez ve mitofaji gibi mekanizmalar, mitokondrilerin sağlıklı işleyişini sürdürmek için birlikte çalışır (5, 23). Bu mekanizmaların dengesindeki bozulmalar, OA gibi dejeneratif hastalıklarda kondrosit sağkalımını azaltarak kırıldak bütünlüğünü zayıflatır (23).

2.5.4. Reaktif oksijen türevleri (ROS) ve oksidatif stres

Mitokondriler, oksidatif fosforilasyon sürecinde en büyük ROS üretim merkezidir. Bu süreç sırasında kompleks I ve kompleks III seviyelerinde süperoksit radikalleri oluşur (4). ROS hücreSEL sinyal yollarında düzenleyici bir rol oynar. Normal şartlar altında, antioksidan savunma mekanizmaları bu radikalleri nötralize eder; ancak mitokondriyal disfonksiyon durumunda ROS üretimi artar ve savunma mekanizmaları yetersiz kalır (24). Ancak ROS üretiminin artması, mitokondriyal membran potansiyelinde kayıplara ve ATP üretim kapasitesinin azalmasına neden olur (6).

Aşırı ROS seviyeleri, proteinlerin, lipidlerin ve DNA'nın yapısal bütünlüğünü bozarak hücreSEL işlevleri olumsuz etkiler (25). Protein oksidasyonu, enzim aktivitesinde değişikliklere ve hücreSEL stres yanıtlarının artmasına yol açabilir (28). Lipid peroksidasyonu, hücre membran bütünlüğünün bozulmasına neden olarak hücre içi iyon dengesini bozar (27). Ayrıca, mitokondriyal DNA (mtDNA), histon koruması bulunmaması nedeniyle ROS hasarına karşı özellikle savunmasızdır (30).

OA patogenezinde oksidatif stresin merkezi bir rol oynadığı geniş çapta kabul görmektedir. Artan ROS seviyesi, inflamatuvar sitokinlerin salınımını artırarak eklem dokusunda hasarı şiddetlendirir (32). IL-1 β ve TNF- α gibi sitokinler, ROS üretimini artıran sinyal yollarını aktive eder ve hücre içi redoks dengesini bozar (29). Bu durum, kıkırdak hücrelerinde apoptozun artmasına ve hücrel sağkalım mekanizmalarının zayıflamasına yol açar (6).

OA'de ROS seviyesi, mitokondriyal membran potansiyelinde kayba ve ATP üretiminin azalmasına neden olur (4). Antioksidan savunma mekanizmaları, ROS'u etkisiz hale getirmek için gereklidir. SOD2 (süperoksit dismutaz) enzimi, süperoksit radikallerini hidrojen peroksit'e dönüştürerek oksidatif hasarı azaltır (23). Ancak OA'de SOD2 aktivitesinin azaldığı ve bunun kıkırdak yıkımına katkıda bulunduğu görülmüştür (24). Katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi diğer enzimler de ROS'un etkisiz hale getirilmesinde görev alır; ancak bu enzimlerin yaşla birlikte etkinliklerinin azaldığı bilinmektedir (25).

2.5.5. Mitofaji ve kalite kontrol mekanizmaları

Mitokondriyal stres faktörleri, PINK1-Parkin sinyal yolunu aktive ederek disfonksiyonel mitokondrilerin ubiquitinasyonu ve otofagozomlarla taşınmasını sağlar (32). Parkin, E3 ubiquitin ligaz aktivitesi göstererek hasar görmüş mitokondrilerin otofaji sürecine dahil edilmesini kolaylaştırır (28). Parkin yetersiz olduğunda, disfonksiyonel mitokondrilerin birikimi hücrel stresin artmasına ve apoptoza yol açar (25). Yapılan çalışmalar, mitofaji süreçlerinin bozulmasının mitokondriyal membran potansiyel kaybını artırdığını ve kondrosit ölüm oranlarını yükselttiğini göstermiştir (6). Mitokondri sağlığını korumak için trehaloz ve rapamisin gibi otofaji indükleyicilerin mitofaji süreçlerini desteklediği ve OA modellerinde kıkırdak dejenerasyonunu azalttığı gösterilmiştir (24).

2.5.6. Antioksidan savunma mekanizmaları

Hücreler, oksidatif stresi dengelemek için çeşitli antioksidan savunma mekanizmalarına sahiptir. SOD, katalaz ve peroksiredoksinler gibi enzimler, ROS'u etkisiz hale getirme görevini üstlenir (23). Ancak, OA ile SOD2 ve katalaz seviyelerinin düşmesi, ROS birikimi ve mitokondriyal disfonksiyon riskini artırır (33).

Peroksiredoksinlerin hiperoksidasyona uğraması, hücrel antioksidan kapasitenin azalmasına ve oksidatif hasarın şiddetlenmesine neden olur (25). Özellikle yaşlanma ile bu enzimlerin işlevlerinde kayıplar gözlemlenmiştir. Adenoviral MCAT (mitokondriye özgü

katalaz) ekspresyonunun ROS seviyelerini düşürdüğü ve kıkırdak hücrelerinin hayatta kalma oranlarını artırdığı kanıtlanmıştır (24).

2.5.7. Mitokondriyal haplogruplar ve OA

Mitochondrial DNA (mtdna) haplogrupları, hücresel enerji üretimi ve ROS seviyeleri üzerinde genetik farklılıklara neden olabilir (23). Haplogrup J, düşük ROS seviyeleri ile ilişkilendirilmiş ve kıkırdağın daha az dejenerasyona uğramasıyla bağdaştırılmıştır (27). Buna karşın, haplogrup h'nin artan ROS üretimi ile kıkırdak yıkımına yatkınlık gösterdiği bildirilmiştir (30).

Mitokondriyal haplogruplar, hücresel enerji üretimi, ROS kontrolü ve mitokondriyal metabolizmayı etkileyen genetik belirleyiciler olarak öne çıkmaktadır. Yapılan çalışmalar, mtDNA farklılıklarının OA patogeneğinde genetik bir belirleyici olabileceğini göstermiştir (28).

2.6. Mitohormezis: Konsept ve Etki Mekanizması

Mitohormezis, mitokondriyal işlev bozukluklarının hücre ve organizma genelinde adaptif yanıtları tetiklediği ve biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde kritik bir rol oynadığı önemli bir konsepttir. Bu mekanizma, subletal düzeyde mitokondriyal stresin, hücresel dayanıklılığı artıran ve homeostazı koruyan yanıtlar oluşturması ilkesine dayanır (34). Mitohormetik yanıtlar, reaktif oksijen türleri (ROS), metabolik sinyaller ve proteotoksik stres faktörleri aracılığıyla mitokondri-nükleus etkileşimini modüle eder (35).

2.6.1 Mitohormezis konseptinin tarihçesi

“Hormesis” terimi ilk kez 19. Yüzyılda ortaya çıkmış ve düşük dozlarda stimulan etki gösterirken yüksek dozda toksik etki gösteren bifazik doz yanıtına sahip maddeler veya bileşikler tanımlamak için kullanılmıştır. Günümüzdeki biyolojik tanımı ise düşük doz stres uyarımı karşısında adaptif yanıtları aktive ederek hücrelerin ve organizmaların homeostazını sağlayan ve böylece sağlığa ve ömür üzerinde etkili olan, fakat yüksek dozda ise hücreler ve organizma için zararlı etkiye sahip olan durumları tanımlamak için kullanılmaktadır. “Mitohormesis” terimi ise ölümcül olmayan mitokondriyal stresin hormetik yanıtı tetikleyerek canlılığı arttırdığı teorisine dayanarak ilk kez 2006 yılında kullanılmıştır. Başta bu teori; aralıklı oruç ve buna bağlı kalori kısıtlaması, egzersiz ve diyetle alınan bazı bitkisel kökenli besinlerin üretimini etkilediği mitokondriyal reaktif oksijen ürünlerinin (mtROS) olası etki mekanizmasını açıklamak üzere ortaya atılmıştır. Bu teorinin ortaya atılmasından 1 yıl sonra, Ristow ve ark. solucanlarda glikoz kısıtlamalarının mitokondri üzerindeki

etkisini incelediği çalışması ile desteklenmiştir. Ristow ve ark. glikoz kısıtlamasının mtROS'larını ve mitokondrial solunumu arttırarak solucanların yaşam süresini uzattıklarını göstermiştir. Bu çalışmada artmış mtROS'larının, katalaz aktivitesini arttırarak oksidatif stres yanıtını arttırdığı gösterilmiştir. Hatta, antioksidan kullanımı ile mtROS'larının baskılanmasının yaşam süresindeki uzamayı ortadan kaldırdığı da bildirilmiştir. Bu çalışmalar ile mitokondrial stres yollarının ortaya koyulması ve mtROS'larının öneminin anlaşılması, hormetik mekanizmaların tetiklenmesi sonucunda yaşam süresinin uzayıp uzamayacağına dair bir merak uyandırmıştır.

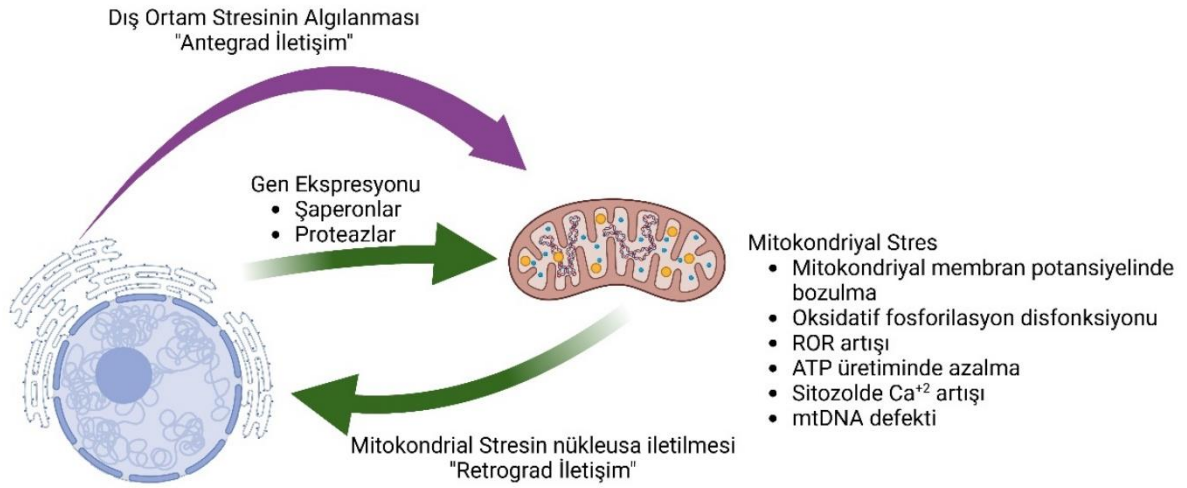
2.6.2. Mitohormezisin temel mekanizması

Mitohormezis, hücrelerin düşük düzeyli stres faktörlerine yanıt olarak uyum sağlayıcı mekanizmalar geliştirdiği bir süreçtir. ROS, hücre içi oksidatif stres savunmasını artıran genlerin ekspresyonunu indükleyerek önemli bir sinyal molekülü görevi görür. Özellikle Nrf2 transkripsiyon faktörünün aktivasyonu, antioksidan genlerin ve şaperon proteinlerin üretimini destekleyerek mitokondriyal biyogenezi teşvik eder (36).

Mitokondriyal füzyon ve fisyon süreçleri, mitohormezisin temel bileşenlerindendir. Mitokondri dinamiklerinin düzenlenmesi, hücrenin enerji üretim kapasitesinin dengelenmesini ve hasarlı mitokondrilerin elimine edilmesini sağlar. Fisyon mekanizması, hasarlı mitokondrilerin otolitik süreçlerle ortadan kaldırılmasını desteklerken, füzyon mekanizması, mitokondriyal DNA içeriğinin paylaşımını ve bütünlüğünü korur (Zhu et al., 2020).

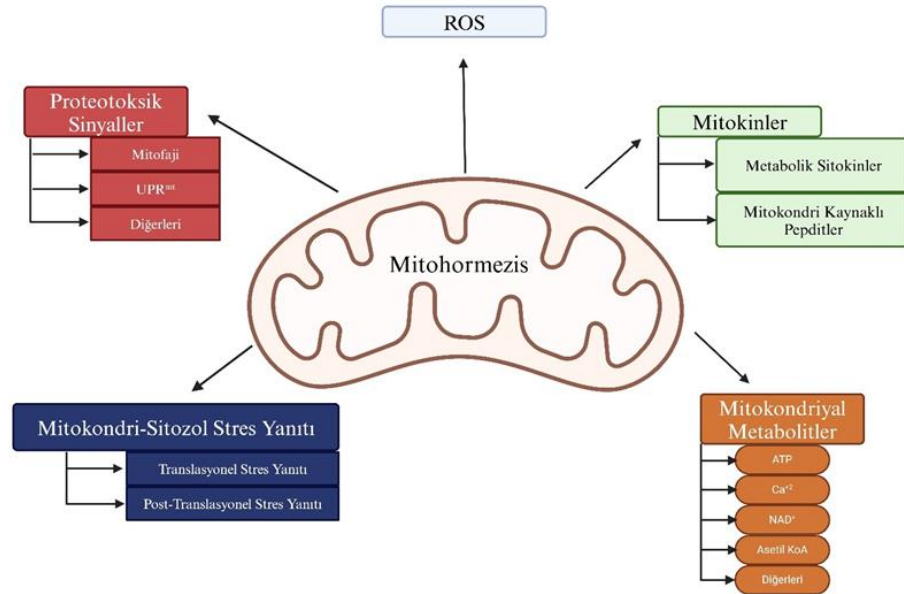
2.6.3. Mitohormezis'in moleküler yolları ve klinik perspektifler

Mitokondrial fonksiyonu düzenlemek üzere nükleus, dış uyarıları algılayıp mitokondri ile anterograd olarak iletişim kurar, mitokondri ise içinde bulunduğu stres durumunu (oksidatif fosforilasyon disfonksiyonu, mtDNA defekti, mitokondrial membran potansiyelinin bozulması, ATP üretiminin azalması, ROR artması ve kalsiyumun sitozole salınımı vb..) retrograd olarak nükleusa bildirir ve nükleus, organelin buna cevap vermesini sağlayacak genlerin ekspresyonunu aktive eder. Mitokondrial stresin üstesinden gelmek için eksprese edilen proteinler genellikle proteaz ve şaperonlardır. Mitokondrial stres koşulları altında aktive olan mitonükleer iletişimin amacı stresi mitokondrial, hücresel ya da doku seviyesinde ortadan kaldırmaktır. (Şekil 2.14)



Şekil 2.14. Mitonükleer İletişim

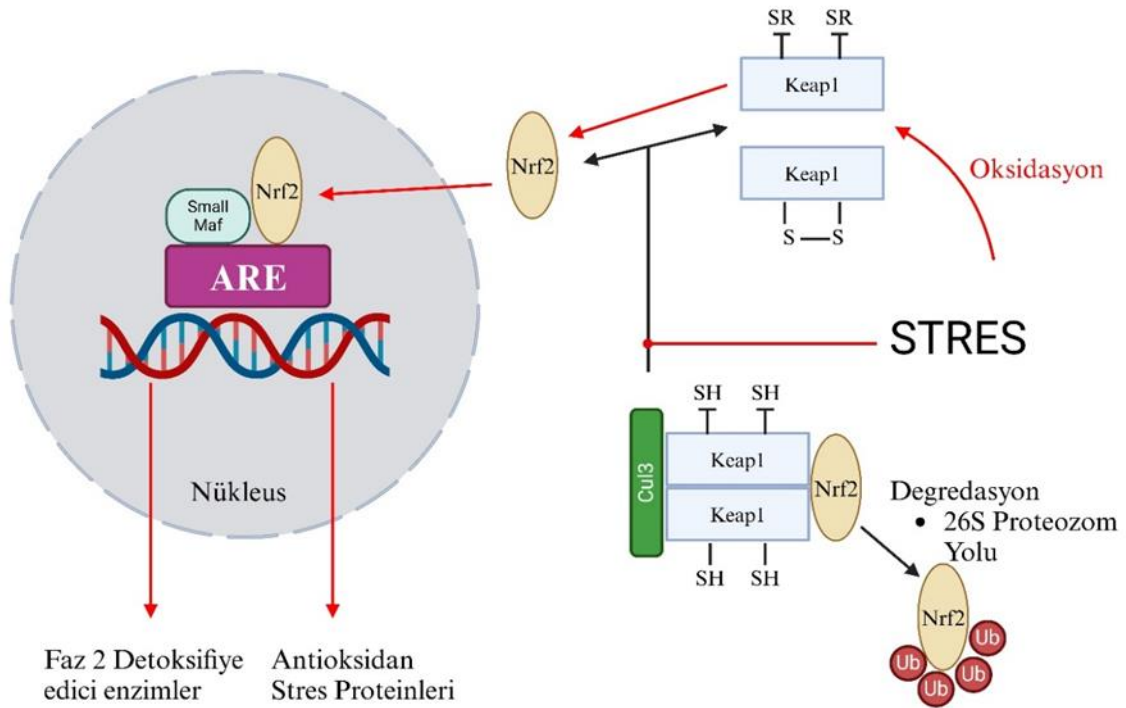
İşte bu iletişim, mitohormetik cevabı da düzenler. Mitohormezis'in en önemli sinyalleri ya da süreçleri; ROR, mitokondriyal metabolitler, proteotoksik sinyaller, mitokondri-sitozol stres yanıtı ve mitokin salınımıdır. (Şekil 2.15)



Şekil 2.15. Mitohormetik Adaptasyon Mekanizmaları

2.5.4. Reaktif oksijen türleri (ROS) ve antioksidan yanıtlar

Mitohormezisin önemli bir bileşeni ROS üretimidir. Mitokondri, elektron taşıma zincirinde enerji üretimi sırasında NADPH Oksidaz (NOX) aracılı olarak ROS üretir ve bu moleküller, sinyal iletimi için kritik öneme sahiptir. Düşük düzeyde ROS artışı, hücre içi antioksidan savunma mekanizmalarını aktive eder. Nrf2 sinyal yolağı, ROS'un etkisiyle aktive olan ve antioksidan enzimlerin (örneğin glutatyon peroksidaz) üretimini teşvik eden bir transkripsiyon faktörüdür (7, 35). Nrf2, antioksidasyon, antioksidan biyosentezi ve metabolik kaymadan sorumlu temel düzenleyici olarak bilinmektedir. Stres koşullarında Nrf2, Kelch-like ECH-ilişkili protein 1 (Keap1) ve Cullin-3 E3 ligaz tarafından yapısal olarak ubiquitinlenir ve 26S proteozomal yol ile yıkılır. Keap 1 aracılı Nrf2 yıkımı, Keap1 oksidasyonu sonucunda inhibe edilir. Keap1'in Nrf2 bağlayıcı bölgelerinin saturasyonu sonrasında yeni üretilen Nrf2, Keap1 tarafından bağlanamadığı için nükleusa transloke olur ve antioksidan yanıt elemanlarının (AREs) transkripsiyonel aktivasyonunu gen düzenleyici bölgeleri üzerinden etki ederek sağlar (9). (Şekil 2.16)



Şekil 2.16. Nrf2 Yanıtı ve Gen Düzenlenmesi

ROR aynı zamanda mitohormetik düzenlemenin ana sinyali olarak rol oynamaktadır. Mitokondri, ROR'lerinin majör hücresel kaynağıdır. Oksidatif fosforilasyon ile O₂, H₂O'ya dönüştürülür fakat O₂'nin küçük bir kısmı ise süperoksit anyonuna (O₂⁻) dönüşmektedir.

Süperoksit ise süperoksit dismutaz (SOD) enzimi aracılığı ile O₂ ve H₂O₂'ye dönüştürülür. Ökaryotlarda 3 farklı SOD geni mevcuttur. SOD1 sitoplazmik Cu/Zn-SOD'u, SOD2 mitokondrial Mn-SOD'u ve SOD3 ise hücre dışı Cu/Zn-SOD'u kodlamaktadır⁸. Sonuç olarak; ROR miktarındaki artış, bir geri-besleme mekanizmasını aktive ederek, mitohormetik cevabı aktive eder. Bunun sonucunda ise konak anti-oksidan savunma mekanizmaları (antioksidan enzimler: katalaz ve süperoksit dismutaz (SOD) aktive olur, mitokondrial biyogenez ve mitokondrial stres direnci artar. ROR seviyesi ise azalır (7-9).

ROS sinyalleşmesi, mitofaji mekanizmasını da düzenler. Artan ROS seviyeleri, PINK1 ve Parkin proteinlerinin aktivasyonunu tetikler ve hasarlı mitokondrilerin otofajik süreçlerle temizlenmesini sağlar (37). OA'da mitofaji mekanizmasının bozulması, hasarlı mitokondrilerin birikmesine ve inflamasyonun artmasına neden olur.

2.6.5. AMPK ve SIRT1 sinyal yolları

AMPK (AMP-aktif protein kinaz) ve SIRT1, hücrel enerji homeostazının korunmasında merkezi rol oynar. AMPK aktivasyonu, hücredeki düşük enerji durumunda ATP üretimini teşvik ederken anabolik süreçleri baskılar. SIRT1 ise NAD⁺ seviyelerine duyarlı bir deasetilaz olup mitokondriyal biyogenez artırır ve hücrel metabolizmayı yeniden düzenler (37).

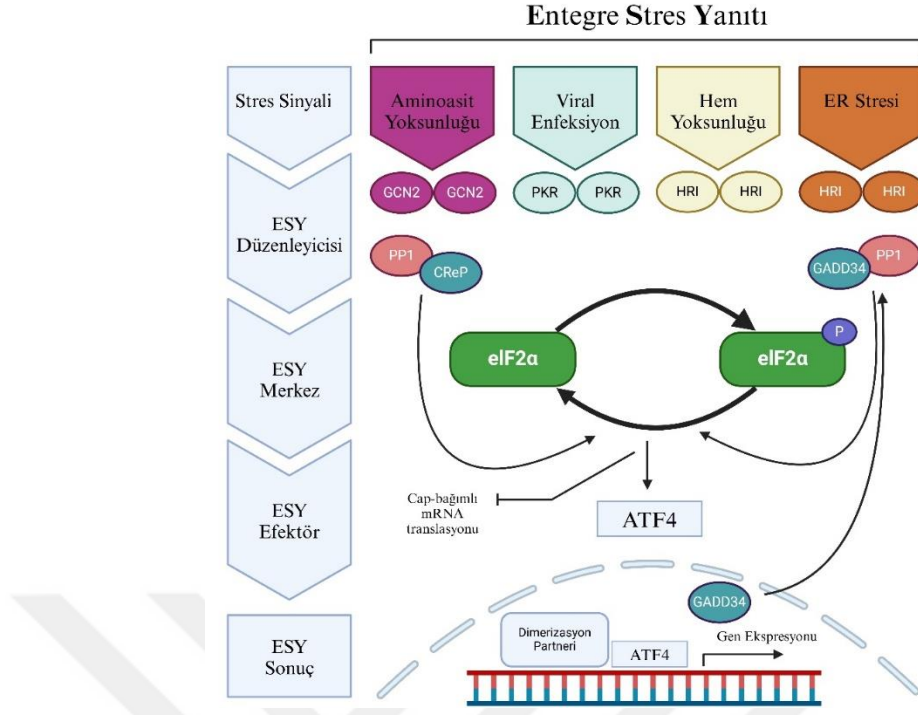
Bu yollar, FOXO protein ailesinin aktivasyonunu sağlayarak otofaji ve hücrel onarım mekanizmalarını destekler. OA'da NAD⁺ seviyelerinin azalması, SIRT1 ve AMPK yollarını zayıflatarak mitokondriyal disfonksiyonu derinleştirir ve kıkırdak dejenerasyonunu hızlandırır (5), NAD⁺ artırıcı terapiler, mitokondri işlevini destekleyerek eklem sağlığının korunmasına katkıda bulunabilir.

2.6.6. Mitokondriyal katlanmamış protein yanıtı (UPR^{mt})

Mitokondrial proteazların kaybı, hasarlı ya da yanlış katlanmış proteinlerin mitokondri matriksinde birikimine yol açar. Bunun sonucunda proteazların yeniden aktivasyonunu sağlamak için mitokondrial stres yanıtı tetiklenir. Bu yanıtın ana yolağı olan mitokondrial katlanmamış protein yanıtı (UPR^{mt}) ilk olarak memelilerde tanımlanmıştır. UPR^{mt}, mitokondride yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine karşı adaptif bir yanıt mekanizmasıdır. Mitokondri içindeki şaperon proteinler ve proteazlar, hatalı proteinlerin temizlenmesini sağlar ve hücrel homeostazın devamlılığını korur (38). UPR^{mt} sinyal yolağı günümüzde en çok C.Elegans'da çalışılmıştır. Bu sinyal yolağı solucanlarda bir transkripsiyon faktörü olan atfs-1 tarafından düzenlenmektedir. Atfs-1 mitokondriyal ve

nükleer olmak üzere iki hedefleme sekansına sahiptir. Stresin olmadığı durumlarda atfs-1 mitokondriye transloke olur ve Lon proteaz tarafından hızlıca degrade edilir. Mitokondrial katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinler mitokondri matriksinde birikmeye başladığında ise stres oluşur ve UPRmt aktive olur. Mitokondrial matriks proteazı olan CLPP-1 bu hasarlanmış proteinleri parçalar ve oluşan peptidler HAF-1 transporter ile sitoplazmaya aktarılır. Sitoplazmada bu peptidlerin birikmesi atfs-1'in mitokondriye girişini engeller ve nükleusa yönlendirir. Nükleusta atfs-1, diğer transkripsiyonel düzenleyicilerle birlikte UPRmt genlerinin aktivasyonunu sağlar. Bu genler; proteazlar ve şaperonlar, mitokondrial transporterlar ve antioksidan enzimler, mitokondrial fisyon, glikoliz ve detoksifikasyonda rol oynayan proteinlerdir. Bunun sonucunda ise stres çözülmeye ve hücrel metabolik fonksiyonları yeniden sağlanması amaçlanır. Memelilerde ise UPRmt aktive olduğunda CLPP-1 analogu olan proteaz ATF5 ekspresyonu ile HSP60, HSP10 ve mtHSP70, LONP-1 gibi şaperonların ekspresyonu artmaktadır (8).

Mitokondrial stres aynı zamanda traslasyonel ve post-traslasyonel düzeyde farklı sitozolik stres yanıtlarını aktive ederek hücrel proteazların devamlılığını sağlayacak yolları aktive eder. Entegre stres yanıtı (ESR), protein sentezinin düzenlenmesini sağlayan genel stres yanıtıdır. Bu yanıt, endoplazmik retikulum (ER) stresi, aminoasit açlığı, düşük hemoglobin seviyeleri, çift iplikli RNA ve mitokondrial stres ile tetiklenebilir. Bu stres koşulları, hücrel kinazları aktive ederek, translasyon başlatıcı faktör eIF2 α 'yı fosforiller. Bu fosforilasyon ise kanonik protein sentezini inhibe ederek ATF4 ve ATF5 gibi kimi stres genlerinin translasyonunu artırır. (Şekil 2.17)

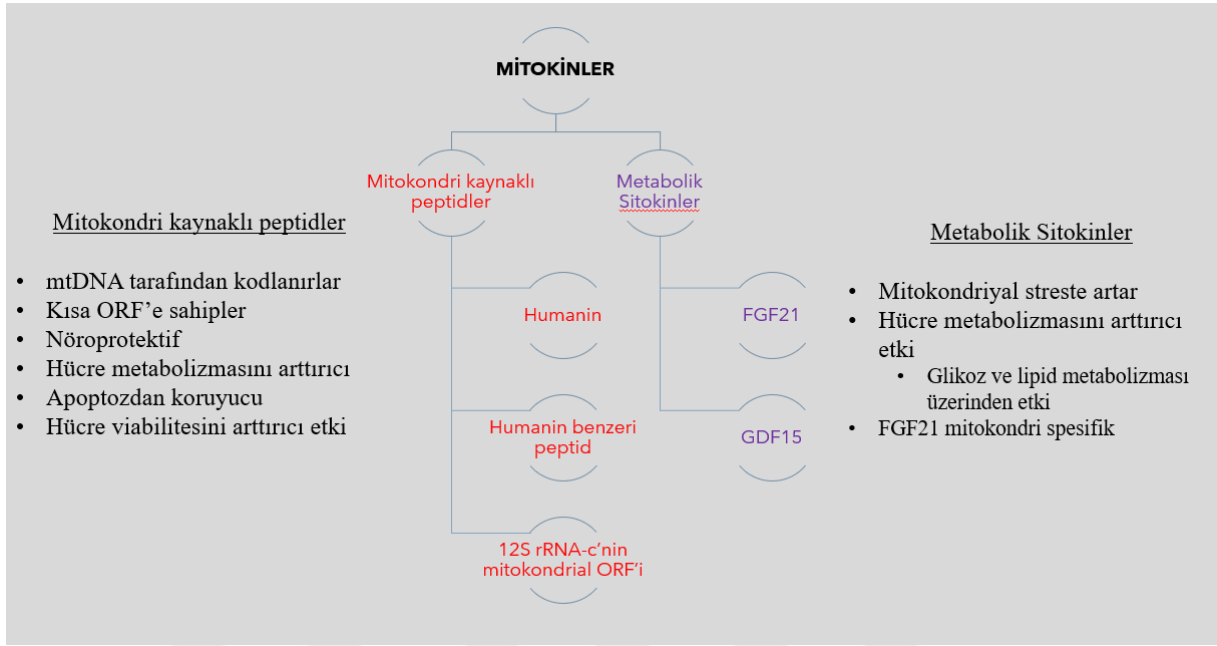


Şekil 2.17. Entegre Stres Yanıtı

Mitokondrial stresin, memelilerde ATF4'ü arttırdığı daha önce yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Bu yolağın aktivasyonu ile mitokondrial aktivite azaltılmaya çalışılır. Kanser hücre serilerinde yapılan çalışmalarda ATF4'ün Nrf2'nin ana downstream efektörü olarak fonksiyon gösterdiği, her geçen gün artan sayıda bildirilmektedir. Bu bulgular, Nrf2 ve ATF4'ün redoks homeostazını sağlamak için birlikte çalıştığını göstermektedir. TRPV2 gibi kalsiyum kanallarının işlev kaybı, mitokondri içi Ca^{2+} dengesizliğine yol açarak UPR^{mt} 'yi bozabilir ve inflamasyonu tetikleyebilir (39). OA'da UPR^{mt} 'nin etkinliğinin azalması, kıkırdak hücrelerinin dayanıklılığını düşürür.

2.6.7. Mitokinler

Mitokondrial stresin oluşturduğu sinyaller, hücre dışı iletişimde de görev alırlar. Mitokondrial stresin aktive ettiği sinyal yolları "mitokin" adı verilen moleküllerin üretilmesine neden olur. Mitokinler membranlardan diffüze olarak hücrelerden diğer hücrelere ve dokulara salınırlar. Mitokinler; mitokondri-kaynaklı peptidler ve metabolik sitokinler olmak üzere iki ana gruba ayrılır. (Şekil 2.18)



Şekil 2.18. Mitokondriyal Mitokinler ve Özellikleri

Mitokondri kaynaklı peptidler (humanin, humanin benzeri peptidler ve 12S rRNA-c'nin mitokondrial ORF'si), mtDNA tarafından kodlanan peptidlerdir ve kısa açık okuma çerçevelerine sahiptirler. Bu mitokinlerin nöroprotektif, hücre metabolizmasını arttırıcı, apoptozdan koruyucu ve böylece hücre viabilitesini arttırıcı etkileri mevcuttur. Ek olarak bazı sitokinler, farklı mitokondrial zorlanmalar ile karşılaşıldığında eksprese edildiği ve metabolizmayı arttırdığı için mitokin olarak da değerlendirilmektedir. Bunlardan en iyi çalışılanları fibroblast büyüme faktörü 21 (FGF21) ve büyüme farklılaşma faktörü 15 (GDF15) dir. Bu iki molekülün farklı mitokondrial streslerde ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Genel olarak bu sitokinler, glukoz ve lipid metabolizmasını arttırarak hücrenin enerji metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar. Son yapılan çalışmalar, GDF15'in mitokondri dışı olaylarda da yükseldiğini göstermiş ve FGF21'in mitokondriye daha spesifik olduğunu bildirmiştir (8).

2.6.8. TGF- β ve WNT sinyal yolları

TGF- β (transforming growth factor-beta) ve WNT sinyal yolları, hücresel mekanotransdüksiyon ve mitokondriyal dinamiklerin düzenlenmesinde önemli roller oynar. TGF- β sinyal yolu, hücrelerin mekanik strese karşı dayanıklılığını arttırmak için enerji üretimini düzenler. OA'da bu yolağın bozulması, kıkırdak hücrelerinde dejenerasyona ve anormal protein birikimine yol açabilir.

WNT sinyal yolağı ise hücre proliferasyonu ve farklılaşmayı kontrol eder. WNT5A/ROR2 aksının anormal aktivasyonu, kalsiyum homeostazını bozarak oksidatif stres seviyelerini artırır ve hücresel yaşlanmayı hızlandırır (39).

2.6.9. Mitofaji ve hücresel kalite kontrol mekanizmaları

Mitofajiyi düzenleyen PGC-1 α ve AMPK-SIRT1 aksı, mitokondriyal biyogenezin artırılmasında kritik rol oynar (34). PGC-1 α seviyelerindeki azalma, yaşa bağlı mitokondri kaybını hızlandırabilir ve OA gelişimini tetikleyebilir.

Mitofaji mekanizmasının bozulması, hücrede ROS birikimine ve kıkırdak hücrelerinin hayatta kalma oranında azalmaya neden olur. Bu durum, eklem dokusunda inflamasyonun artması ve doku bütünlüğünün kaybı ile ilişkilendirilmiştir.

2.6.10. Senolitik yollar ve hücresel yaşlanma

Hücresel yaşlanma (senesans), mitokondri kaynaklı sinyaller aracılığıyla inflamasyonu artıran bir süreçtir. Senesans hücreleri, sitokinlerin, kemokinlerin ve metalloproteinazların salgılanması ile "senesans ilişkili sekresyon fenotipi" (SASP) adı verilen bir durum oluşturur. UBX0101 gibi senolitik ajanlar, bu hücreleri hedefleyerek inflamasyonu azaltabilir ve eklem bütünlüğünü koruyabilir (22).

Senolitik tedaviler, ROS seviyelerini azaltarak mitokondriyal işlevlerin korunmasına katkı sağlar ve hücresel yaşlanma ile ilişkili hasar mekanizmalarını baskılar (5).

2.6.11. Mekanotransdüksiyon ve mitokondri

Eklem hücreleri mekanik yüke maruz kaldıklarında enerji üretimini artırmak için mitokondriyal mekanizmaları kullanır. Ancak OA'da bu süreç bozulur ve hücrede kalsiyum dengesizlikleri oluşur. TRPV2 ve TRPV4 gibi mekanosensör kanallar, Ca²⁺ homeostazının korunmasında ve mitokondri içi sinyalleşmenin düzenlenmesinde önemli rol oynar (39).

Bu mekanosensörlerin disfonksiyonu, ROS üretimini artırarak inflamatuvar yanıtları tetikler ve hücre ölümü mekanizmalarını aktive eder. Mekanotransdüksiyon yolağının modülasyonu, yeni tedavi stratejileri için önemli bir hedef olarak değerlendirilmektedir.

2.6.12. Enerji metabolizması ve mitohormezis

Mitohormezis, enerji metabolizmasında yeniden yapılanmayı teşvik eder. NAD⁺/NADH dengesi gibi koenzimlerin düzenlenmesi, enerji homeostazının temel unsurlarından biridir. Mitokondriyal NAD⁺ seviyelerinin artışı, AMPK ve SIRT1 gibi enerji

sensörlerinin aktivasyonunu sağlayarak oksidatif fosforilasyonu ve mitokondriyal biyogenezi destekler (34).

ROS üretiminin kontrol altına alınması, mitokondriyal kompleks I ve III üzerinden gerçekleşir. Bu kompleksler, ROS sinyalleşmesini adaptif bir geri bildirim döngüsü ile dengeleyerek enerji üretim sürecinin düzenlenmesine katkıda bulunur. Mitohormetik yanıt, ROS seviyelerinin optimal düzeyde tutulması sayesinde hücrel hasarı en aza indirir (36).

2.6.13. Bağışıklık yanıtlarının modülasyonu

Mitohormezis, bağışıklık hücrelerinin işlevlerinde de önemli bir adaptif rol oynar. Makrofajlarda yapılan araştırmalar, mitokondriyal stresin bağışıklık tolerans mekanizmalarını desteklediğini göstermiştir. LPS ile tetiklenen inflamatuvar yanıtların, mitokondriyal stres yanıtı ile düzenlenerek aşırı sitokin üretiminin baskılandığı ve inflamatuvar doku hasarının engellendiği ortaya konmuştur (7).

Mitohormezis ayrıca mitokondri kaynaklı metabolitlerin bağışıklık yanıtına etkisini düzenler. Itakonat gibi metabolitler, ROS seviyelerini düşürerek inflamasyonu baskılar ve patojenlere karşı bağışıklık hücrelerinin direnç kazanmasına yardımcı olur. Bu mekanizma, homeostazın korunmasında kritik bir rol oynar (7).

2.6.14. Yaşlanma sürecinde mitohormezisin rolü

Mitohormezis, yaşlanma sürecine eşlik eden biyokimyasal değişiklikleri dengeleyen mekanizmalardan biridir. Yaş ilerledikçe mitokondriyal disfonksiyon ve ROS birikimi artar; ancak düzenli fiziksel aktivite gibi düşük düzeyli stres faktörleri, mitokondriyal biyogenezi uyararak sarkopeniyi geciktirebilir (36).

Egzersiz sırasında artan ROS üretimi, antioksidan savunma sistemlerinin güçlenmesini sağlar ve mitokondriyal proteinlerin dayanıklılığını artırır. Mitokondri dinamiklerinin korunması, mitokondri kaybını azaltarak hücre yaşlanmasını yavaşlatır. Ek olarak, berberin gibi mitokondriyi hedefleyen moleküller, AMPK sinyalleşmesi yoluyla oksidatif stresi hafifletir ve hücrel dayanıklılığı artırır (37).

2.6.15. Kanser hücrelerinde mitohormezis

Kanser hücreleri, mitohormezis mekanizmalarını manipüle ederek zorlu çevresel koşullara adapte olabilir. Mitokondriyal DNA mutasyonları, UPR^{mt}'yi aktive ederek hücrelerin hayatta kalma kapasitesini artırabilir (40). Ancak bu adaptasyon, tümör hücrelerinin kemoterapi ve radyoterapiye direnç geliştirmesine yol açabilir.

2.7. Metformin, Mitokondri ve OA

2.7.1. Metformin ve etki mekanizmaları

Metformin, dünya genelinde Tip 2 diyabet tedavisinde birinci basamak ilaç olarak yaygın bir şekilde kullanılan, etkinliği ve güvenilirliği kanıtlanmış bir antihiperглиsemik ajandır. Bu ilaç, Galega officinalis bitkisinden türetilen biguanid sınıfının bir üyesidir ve hipoglisemi riskini artırmadan kan şekeri seviyelerini düzenler (41). Metformin hem monoterapi olarak hem de diğer antihiperглиsemik ajanlarla kombinasyon halinde kullanılabilir. Kilo alımına neden olmaması ve düşük maliyetli olması, onun tercih edilen bir tedavi seçeneği olmasında etkili faktörlerdir.

2.7.2. Metformin-mitokondri ilişkisi

Metformin, mitokondriyal fonksiyon üzerindeki etkisi ile enerji metabolizmasında düzenleyici bir rol oynar. Bu etkiler, mitokondriyal kompleks I'in inhibisyonu ile başlar. Mitokondriyal kompleks I, oksidatif fosforilasyon sürecinde ATP üretiminin anahtar enzimlerinden biridir. Metformin, kompleks I'i hedef alarak ATP üretimini azaltır ve AMP/ATP oranını artırır. Bu enerji dengesi değişimi, hücrel enerji sensörü olan AMP-aktif protein kinazın (AMPK) aktive edilmesine yol açar (10, 41).

1. Mitokondriyal Kompleks I'in İnhibisyonu:

Metformin, mitokondri içindeki NADH:ubikinon oksidoredüktaz aktivitesini inhibe ederek elektron taşınım zincirinin başlangıcını etkiler. Bu durum, mitokondriyal membran potansiyelinin düşmesine ve ATP üretiminin azalmasına neden olur. ATP üretiminin azalması, hücrede enerji bağımlı süreçlerin yavaşlamasına yol açar. Özellikle karaciğer hücrelerinde, glukoneogenez için gerekli olan enerji kaynağı sınırlanır ve hepatik glukoz üretimi baskılanır (42).

2. AMPK Aktivasyonu:

Metformin'in enerji üretimini sınırlaması, hücrel AMP seviyesinin artmasına ve dolayısıyla AMP/ATP oranının yükselmesine neden olur. Bu enerji dengesizliği, AMPK'nın fosforilasyon yoluyla aktif hale gelmesini tetikler. AMPK, enerji homeostazını sağlamak için glukoz alımını artırır, lipid oksidasyonunu teşvik eder ve enerji harcamasını optimize eder. Bu mekanizma, metformin'in hem diyabetik hastalarda kan şekeri kontrolünü sağlamada hem de lipid metabolizmasını düzenlemede önemli bir role sahip olduğunu açıklar (26).

3. Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Azaltılması:

Mitokondriyal kompleks I'in inhibisyonu, ROS üretiminde bir azalmaya yol açar. ROS, hücrel oksidatif stresin temel nedenlerinden biridir ve mitokondriyal disfonksiyonun önemli bir göstergesidir. Metformin, ROS seviyelerini düşürerek hücrel stres yanıtını baskılar ve mitokondriyal sağlığın korunmasına katkı sağlar. Bu etki, aynı zamanda mitohormetik yanıtı tetikleyerek hücrelerin strese karşı adaptasyonunu artırır (43).

4. Mitofaji ve Mitokondriyal Biyogenez:

Metformin, hasarlı mitokondrilerin ortadan kaldırılması ve yenilerinin üretilmesi süreçlerini destekler. Mitofaji, mitokondriyal işlev bozukluğunun giderilmesinde kritik bir rol oynar. Metformin'in, PINK1/Parkin yolu üzerinden mitofajiyi teşvik ettiği ve bu mekanizma ile hücrel enerji metabolizmasını dengelediği gösterilmiştir. Ayrıca, mitokondriyal biyogenez sürecini destekleyerek yeni ve işlevsel mitokondrilerin oluşumuna katkıda bulunur (4).

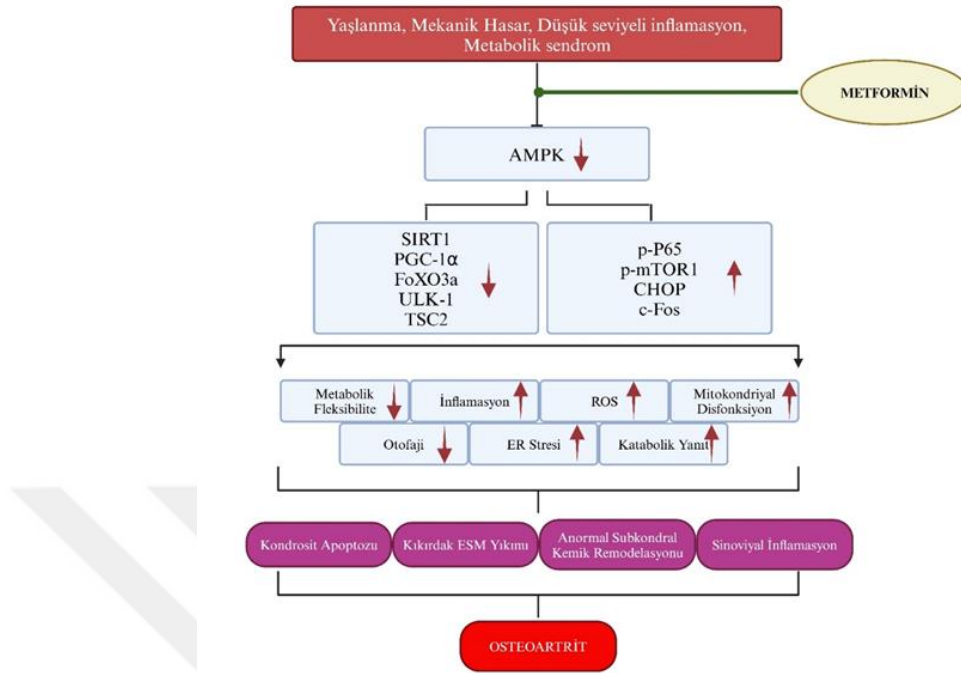
5. Hücrel Metabolizmanın Yeniden Programlanması:

Metformin, mitokondriyal enerji metabolizmasını düzenlemenin ötesinde, hücrel metabolizmayı yeniden programlar. AMPK aktivasyonu, glikolitik yolu teşvik ederken lipogenez gibi enerji tüketen süreçleri baskılar. Bu değişim, özellikle karaciğer ve kas dokusunda metabolik esnekliği artırır ve insülin duyarlılığını geliştirir (29, 41).

2.7.3. Metformin'in osteoartritteki olası etkileri

OA patogenezinde temel mekanizmalar, metforminin hedeflediği yollar ile kesişmektedir. Bu nedenle son yıllarda yapılan çalışmalar, metforminin osteoartritte potansiyel bir terapötik ajan olabileceğini gündeme getirmektedir. Metforminin osteoartritteki olası etkileri şu yollar üzerinden olabilir:

AMPK Aktivasyonu ve Kıkırdak Korunması:



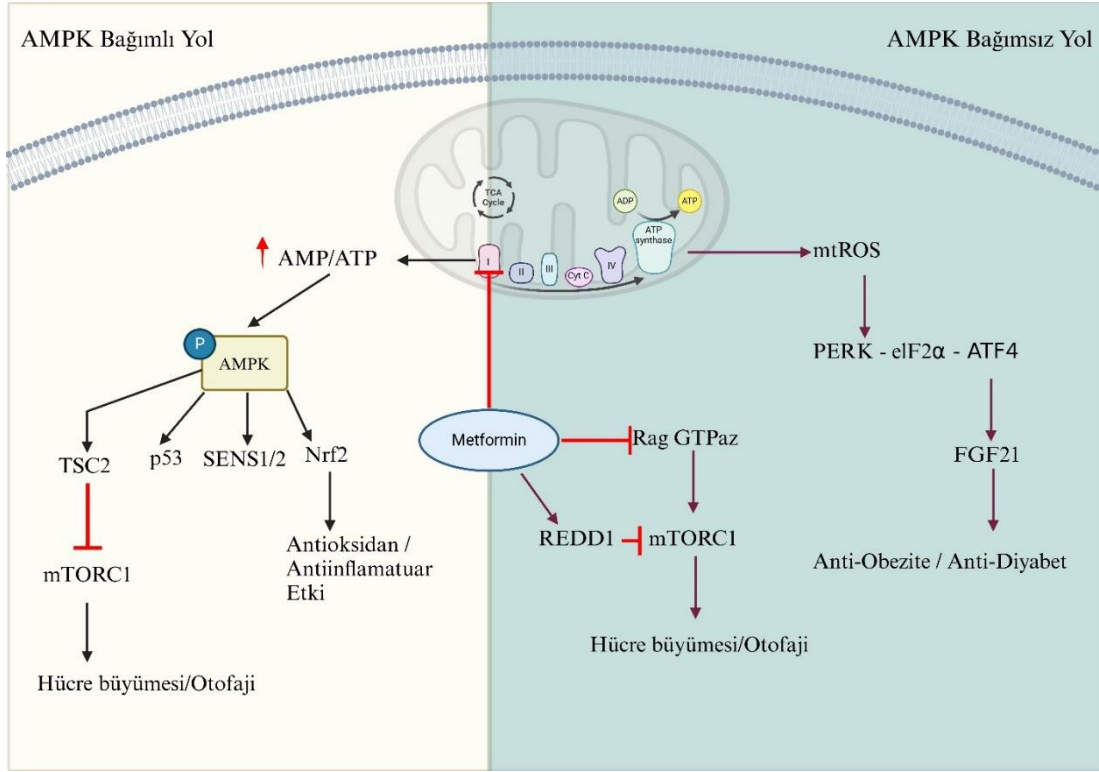
Şekil 2. 19. Metforminin AMPK Bağımlı Etkisi

Metformin'in AMPK'yı aktive etmesi, kıkırdak hücrelerinde enerji metabolizmasını yeniden düzenler ve anabolik süreçleri destekler. AMPK aktivasyonu, kıkırdak hücrelerinde tip II kollajen sentezini artırır ve metalloproteinazlar (MMP3, MMP13) gibi katabolik enzimlerin ifadesini baskılar. Bu mekanizma, kıkırdak matrisinin korunmasına yardımcı olur (26, 42). (Şekil 18)

AMPK Bağımsız Kıkırdak Korunması

Metformin, mitokondriyal solunum zincirinin birinci kompleksini (Kompleks I) inhibe ederek ATP üretimini azaltmakta ve hücre içinde AMP/ATP oranını artırmaktadır. Bu durum, hücresel enerji sensörü olan AMPK'yi (AMP-aktif protein kinaz) enerji dengesizliği yanıtı olarak aktive etmektedir. İlginç bir şekilde son yıllarda Kim ve ark. tarafından yapılan çalışmada, bu sürecin AMPK'dan bağımsız olarak PERK-eIF2 α -ATF4 (PKR-benzeri ER kinaz – eukaryotik translasyon faktörü 2 α – Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 4) sinyal yolları aracılığıyla mitokondriye özgü bir mitokin olan fibroblast büyüme faktörü 21 (FGF21) ekspresyonunun artışı tetiklediğini göstermiştir. (Şekil 2.20) Bu ekspresyondaki artış, metabolik yeniden düzenlenmeye katkı sağlamaktadır. Metformin'in bu etkilerinin AMPK bağımsız olması, daha önce düşünülen enerji sensörü rolünün ötesinde farklı mekanizmaları da içerdiğini göstermektedir. Bu veriler ışığında,

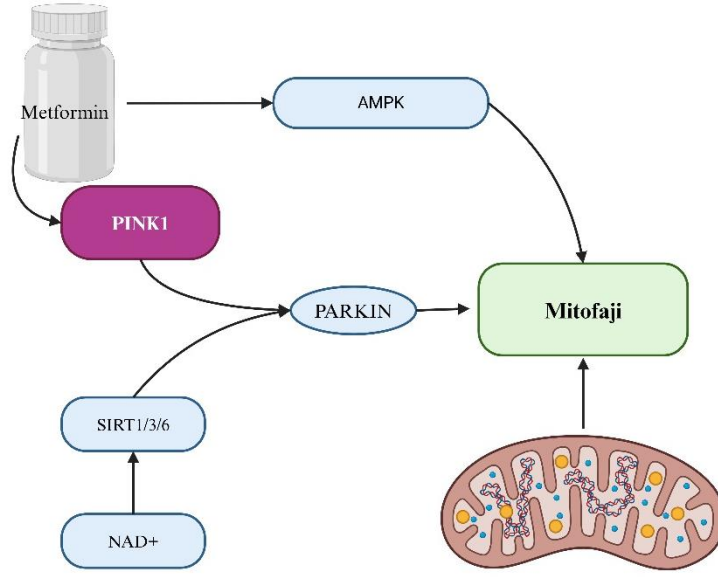
metforminin sadece glikoz regülasyonu üzerinde değil, aynı zamanda enerji metabolizmasının yeniden programlanmasında ve endokrin sinyal yollarında geniş etkileri olabileceğini düşünülmektedir (44).



Şekil 2.20. Metformin'in Mitokondriyal Etki Yolakları

Mitofaji ve Mitokondriyal Sağlık:

Osteoartritte hasarlı mitokondrilerin birikimi, hücresel stres ve inflamasyon düzeylerini artırır. Metformin, PINK1/Parkin aracılı mitofajiyi tetikleyerek bu hasarlı mitokondrilerin ortadan kaldırılmasını sağlar. (Şekil 2.21) Aynı zamanda, mitokondriyal biyogenezi destekleyerek yeni ve sağlıklı mitokondrilerin oluşumunu teşvik eder (4, 43).



Şekil 2.21. Metformin ve Mitofaji

İnflamasyonun Azaltılması:

Metformin, hücrel inflammatuar yanıtları baskılayarak osteoartritte ağrı ve doku hasarını azaltabilir. Bu etkiler, ROS üretiminin azaltılması ve inflammatuar sitokinlerin (örneğin IL-1 β ve TNF- α) ifadesinin düşürülmesi ile ilişkilidir (26). Metformin, IL-1 β ve TNF- α gibi proinflammatuar sitokinlerin tetiklediği MMP3, MMP13, ADAMTS4 ve ADAMTS5 gibi katabolik enzimlerin üretimini azaltır. Aynı zamanda Col2a1, Sox9 ve agregan gibi anabolik faktörlerin seviyelerini artırır.

Hücrel Yaşlanmanın Önlenmesi:

Osteoartritte kıkırdak hücrelerinin yaşlanması, matris dejenerasyonunu hızlandırır. Metformin, hücrel yaşlanmayı azaltarak kıkırdak hücrelerinin işlevselliğini korur. Alg/Metformin hidrojel gibi yenilikçi tedavi yöntemleri ile bu etkiler artırılabilir (4).

Metformin'in bu çok yönlü etkileri, osteoartrit tedavisinde sadece semptomları değil, aynı zamanda hastalığın ilerlemesini hedef alan potansiyel bir ajan olarak değerlendirilmesini sağlamaktadır. AMPK aktivasyonu, mitofaji, inflamasyon kontrolü ve hücrel yaşlanmayı azaltıcı etkileri, metformin'in osteoartritteki rolünü destekleyen temel mekanizmalardır.

Bu alışma ile literatürde ilk defa sağlıklı ve osteoartritli insan kondrosit kültürlerinde metformin ön koşullama ile indüklenen mitohormetik yanıtın, IL1 β uygulaması ile oluşturulan akut strese karşı koruyuculuğunun gösterilmesi amaçlanmıştır.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, *in vitro* olarak tasarlanmış deneysel bir çalışmadır. Araştırma Başkent Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın etik onayı Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu'ndan alınmıştır. (KA22/350)

3.1. Örnek toplama ve hazırlama

Deneklerin tamamı Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji A.B.D'da total diz artroplastisi cerrahisi geçiren hastalardan seçilmiştir. Diz eklemi osteoartriti tanısı Amerikan Romatoloji Koleji'nin (ACR) osteoartrit kriterlerine göre yapılmıştır. Biyoistatistiksel analiz sonrası Kellgren-Lawrence (KL) ölçeğinde radyolojik olarak evre 3 primer diz osteoartriti olan 3 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Travma veya başka nedenlerden kaynaklanan osteoartriti olan hastalar çalışmaya alınmamıştır. Deney grubu olarak osteoartrit etkisinde olan medial femoral kondil kırıkdağı, kontrol grubu olarak ise sağlıklı lateral femoral kondilin kırıkdağı örneklenmiştir.

Hastalardan total diz replasmanı cerrahisi sırasında toplanan kırıkdağ örnekleri, Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco, Rockville, MD, ABD) içeren düşük şekerli ortama alındıktan sonra, düşük sıcaklıkta saklanarak mümkün olan en kısa sürede laboratuvara aktarıldı. Örnek doku makası ile yaklaşık 0,5 x 0,5 cm² lik kırıkdağ parçalarına kesildi ve kırıkdağ parçaları, oftalmik makasla yaklaşık 1 mm²'lik fragmanlara ayrıldı. Bu parçalar, % 0.25 tripsin ile sindirildi (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD), sonra fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı ve % 0.2 tip II kollajenaz içeren DMEM ortamında (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) 37 ° C'de 40 dakika inkübe edildi. Süpernatant atıldıktan sonra, santrifüjleme yoluyla primer kondrositler elde edildi. Elde edilen kondrositler 50-L lik sıvı nitrojen kabına aktarılıp ve analize kadar -80 ° C'de saklanmıştır.

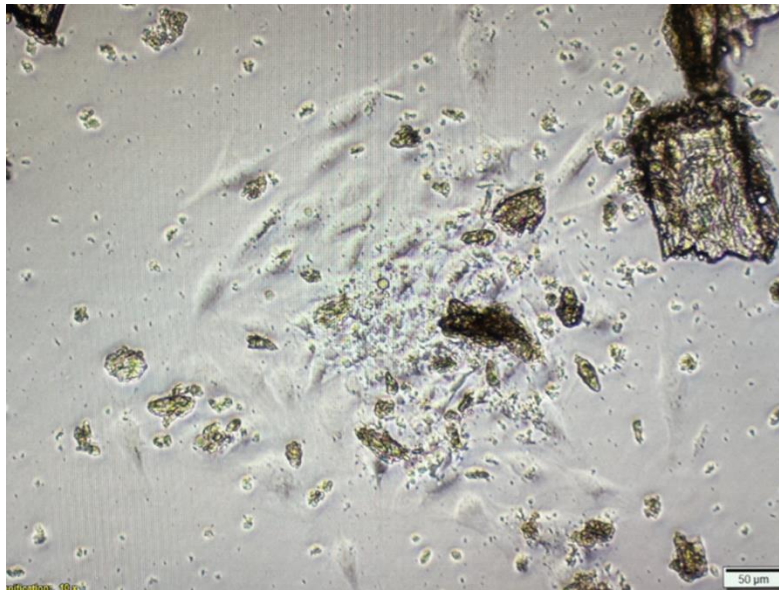
3.2 Hücrelerin Çözülmesi

Azot tankında saklanan DMEM-F12 besiyerinde dondurulmuş hücrelerin şişesi (vial) azot tankından çıkarılmış ve çözücü ekstraksiyonundan önce numunedeki potansiyel bileşen değişiklikleri en aza indirmek için, tüm numuneler 20 dakika buz üzerinde çözdürülmüştür. 15'lik tüp içine 3 ml besiyeri doldurulmuştur. Bir miktar besiyeri alınarak vialle aktarılmış, pipetajlama yapılarak vial içindeki sıvının bir kısmı tüpe aktarılmıştır. Kalan hücreler pipetajlama işlemi 3-4 kez tekrarlanarak vialden tüpe aktarılmıştır. DMEM'i 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.

3.3 Hücrelerin Çoğaltılması ve İdamesi

Sağlıklı ve Osteoartritli kondrositler için 50ml FSB, 5,5ml Oen/stp ve 5,55ml L-Glutamin içeren besiyeri kullanılmıştır. Hücreler çoğaltma sırasında %5 CO₂ içeren 37°C'lik inkübatörlerde nemli atmosferde tutulmuştur. Hücreler ekildikleri flaskları kapladığında tripsinizasyonla pasajlanmış deney için 6'lık weller'lere ekilmiştir. Tripsinizasyon prosedürüne göre pasajlanacak flaskın besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra flask tabanı PBS ile yıkanmıştır, uygun miktarda TE flask tabanına yayılarak yaklaşık 2-3 dk inkübe edilmiştir (25 cm² için 0.5 ml, 75 cm² için 1 ml). Hücrelerin flask tabanından kalkıp kalkmadığı inverted mikroskopla kontrol edilmiştir. TE'nin toksik etkisini ortadan kaldırmak için en az iki katı kadar besiyeri eklenmiştir. Flasktaki hücre, besiyeri ve TE karışımı tüpe aktararak 7 dk 1200 rpm'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet besiyeriyle pipetajlanarak açılmıştır. Flasklar 2-3 gün aralıklarla düzenli olarak canlılık, çoğalma ve kontaminasyon açısından inverted mikroskopta incelenmiştir. İnkübe edilen hücrelerin besiyeri 2-3 gün aralıklarla değiştirilmiştir. Pasajlama işlemi hücre doluluk oranı inverted mikroskopla takip edilmiştir. Kültür devamlılığı için en az %70 doluluk oranına sahip flasklar haftada bir (ortalama süre) pasajlanmıştır. Deneyler 8-40 pasaj aralığındaki hücrelerle gerçekleştirilmiştir. (Şekil 3.1)



Şekil 3.1. İzole Edilen Kondrositler

3.4. Hücrelerin Pasajlanması

Hücre pasaj protokolüne göre %70 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 süspanse hale geldiği gözlemlendiğinde flaska 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. Tomalamı ile hücre sayımı ardından belirlenen hücre sayısına göre istenilen kültür kabına ekim yapılır, uygun miktarda besiyeri eklenir.

3.5. Hücrelerin Kondrosit Olduğunun Doğrulanması

İnsan kondrosit hücre kültüründe pasajlanma sayısının artması ile kondrositlerin fibroblast benzeri bir yapıya transforme olabildikleri bilinmektedir. Çalışmamızda, hücre kültüründe elde edilen hücrelerin kondrosit özelliklerini koruyup korumadığını doğrulamak amacıyla “gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu” (RT-qPCR) ve Western blot analizleri kullanılmıştır. Kondrositlerin temel matriks proteinlerinden biri olan kollajen tip II (COL2A1) ve proteoglikan yapısının önemli bir bileşeni olan agregan (ACAN) gen ifadenmesi, RT-qPCR yöntemiyle nicel olarak analiz edilmiştir. Bu doğrulama yöntemi, kondrositlerin ekstrasellüler matriks (ECM) sentezinde görevli spesifik genleri aktif olarak ifade edip etmediğini göstererek hücrelerin fenotipik özelliklerini kanıtlamaktadır. Ayrıca, protein düzeyinde doğrulama için Western blot analizi gerçekleştirilmiş ve kollajen tip II'nin sentezlenip sentezlenmediği tespit edilmiştir. Western blot, kondrositlerin fonksiyonel matriks proteinlerini üretme kapasitelerinin değerlendirilmesinde güvenilir bir yöntemdir. Her iki yöntemden elde edilen sonuçlar, hücrelerin kondrosit fenotipini koruyup korumadığını genetik ve protein seviyesinde kanıtlamak amacıyla birlikte değerlendirilmiştir.

3.6. Hücre Canlılığı ve Sitotoksikite Testi

MTT testi (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid), hücre canlılığını ve proliferasyonunu değerlendirmek amacıyla kullanılan renk bazlı bir biyolojik analiz yöntemidir. Bu testin temel prensibi, canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrojenaz enzimleri aracılığıyla MTT'yi çözünmeyen mor formazan kristallerine dönüştürmesine dayanır. Oluşan formazan kristalleri, DMSO veya izopropanol gibi uygun bir çözücü ile

mitohormetik adaptasyonu gösteren optimal doz ve sürenin belirlenebilmesi için toksik doz ve süre tespiti 1,1.5,2 mM ve 12-18-24 saat olarak test edildi. Bunun için primer kültürü hazırlanan OA hücreleri 96 kuyucuklu plaklara ekildi ve takiben metformin ile muamele edildi. Bu işlem sırasında ROCHE Cell Proliferation Kit I (MTT) kiti kullanıldı ve elde edilen veriler 96 kuyucuklu ELISA okuyucuda (Biotek Epoch Gen5 2.0) 550 nm-690 nm dalga boylarında okundu ve sonuçları all-in-one microplate reader programında analiz edildi.

3.7. Grupların Oluşturulması

Toksik doz ve sürenin tanımlanmasından sonra;

1. Sağlıklı kıkırdaktan elde edilen kondrosit grubu (Sağlıklı Kontrol Grubu)
2. Sağlıklı kıkırdaktan elde edilen kondrositler + Metformin
3. Sağlıklı kıkırdaktan elde edilen kondrositler + IL-1 β
4. Sağlıklı kıkırdaktan elde edilen kondrositler + Metformin + IL-1 β
5. OA'lı kıkırdaktan elde edilen kondrosit grubu (OA Kontrol Grubu)
6. OA'lı kıkırdaktan elde edilen kondrositler + Metformin
7. OA'lı kıkırdaktan elde edilen kondrositler + IL-1 β
8. OA'lı kıkırdaktan elde edilen kondrositler + Metformin + IL-1 β

3.8. ROS Analizi

Kondrositlerdeki reaktif oksijen türleri (ROS) ve süperoksit düzeylerini tespit etmek amacıyla hücre kültürü deneyleri gerçekleştirilmiştir. Her bir kuyuya 1 x 10⁴ hücre ekilecek şekilde 96 kuyuluk plaklar hazırlanmış ve hücreler 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda her bir gruba uygun kimyasal ajanlar eklenmiş ve belirlenen süre boyunca inkübe edilmiştir. Hücrelerdeki ROS ve süperoksit üretimini ölçmek için Total ROS/Superoxide Detection Kit (ENZO-ENZ-51010) kullanılmıştır. Bu analizde, ROS tespiti için kullanılan dihidrokloroflorescein diasetat (DCFH-DA, Sigma-Aldrich, Katalog No: D6883), hücre içine girdikten sonra esterase tarafından DCF'ye (dihloroflorescein) dönüştürülmüş ve ROS varlığında oksitlenerek güçlü bir yeşil floresan sinyal oluşturmuştur. Süperoksit tespiti için ise dihidroetidyum (DHE, Sigma-Aldrich, Katalog No: D7008) kullanılmış ve süperoksit anyonları ile reaksiyon sonucu oluşan kırmızı floresan sinyaller belirlenmiştir. Floresan sinyaller, 96 kuyucuklu ELISA okuyucu (Biotek Epoch Gen5 2.0) ile ölçülmüştür. ROS sinyalleri için 488 nm uyarma (Ex) ve 520 nm emisyon (Em) dalga boyları, süperoksit sinyalleri için ise 550 nm uyarma ve 610 nm emisyon filtre setleri kullanılmıştır. Elde edilen veriler, all-in-one microplate reader programı ile analiz edilerek, oksidatif stresin kondrosit fonksiyonları üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir.

3.9. Western Blot Analizi:

Yapılacak olan 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 kullanılacaktır.

Uygulama yapılmış olan hücrelerden protein izolasyonu için ticari kit Roche Complete Lysis-M (Cat. No. 04 719 956 001) protokolüne uygun olarak kullanılacak, elde edilen proteinlerin konsantrasyonlarının belirlenmesi için ise ticari kit Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Cat. No. 23227) kullanılacaktır. Örnekler ELISA okuyucuda 562 nm’de okutularak $\mu\text{g}/\text{mL}$ cinsinden konsantrasyonları belirlenecektir. Ölçümler Başkent Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında bulunan Epoch Gen5 2.0 Spektrofotometre cihazı aracılığıyla yapılacaktır. Elde edilen protein örnekleri Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı -80oC dondurucusunda saklanacaktır.

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

İlgilenilen proteinlerin PVDF membrana aktarılmasının ardından membran blokaması yapılacaktır. İlgilenilen primer antikor ile gece boyu inkübasyon yapılacak peşi sıra primer antikora uygun sekonder antikor (HRP Donkey anti-rabbit IgG, HRP Goat anti-mouse IgG) ile gereken süre inkübasyon gerçekleştirilecektir. İlgilenilen antikor işaretleme başarılı olduğu takdirde uygun referans protein antikoruna için de aynı işlemler gerçekleştirilecektir. 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 alınacaktır. İlgilenilen protein bant büyüklüğü referans protein bant büyüklüğü ile Image J programı aracılığı ile normalize edilip protein miktar değişimleri analiz edilecektir.

Tezde araştırılması planlanan proteinler ve bu proteinlere uygun primer antikör listesi Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada Değerlendirilen Proteinler

Protein İşlevi	Kullanılacak Primer Antikör Adı
Referans Protein	Anti- β -Actin
Mitohormezis Belirteçleri	Anti-FGF21 Anti-SOD2 Anti-Nrf2
mtUPR yanıtı belirteçleri	Anti-ATF4 Anti-Hsp10 Anti-Trap1 Anti-Lonp1
Apoptoz belirteçleri	Anti-Caspase 3 Anti-Parp1
Kondrosit belirteçleri	Anti-AGRECCAN Anti-KOLLAGEN2

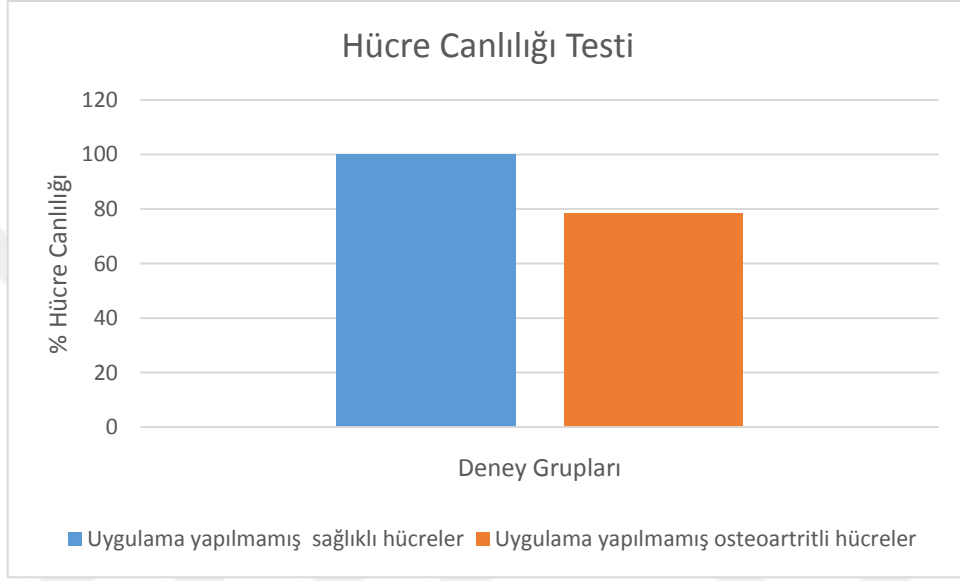
3.10. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler IBM SPSS Statistics 25 programı kullanılarak gerçekleştirilmiş, grafikler ise Microsoft Excel programında hazırlanmıştır. Verilerin normal dağılıma uygun olup olmadığı, örneklem büyüklüğüne bağlı olarak Shapiro-Wilk veya Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirilmiştir. Üç veya daha fazla deney grubu arasındaki farklılıkların analizi, verilerin normal dağılıma uygunluğu ve varyansların homojenlik durumuna göre farklı istatistiksel yöntemlerle yapılmıştır. Normal dağılım gösteren ve varyansları homojen olan verilerde parametrik tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılırken, varyansları homojen olmayan veriler için Welch ANOVA istatistiği uygulanmıştır. Normal dağılıma uymayan verilerde ise parametrik olmayan Kruskal-Wallis H testi tercih edilmiştir. Varyansların homojenliği Levene Testi ile kontrol edilmiştir. Farklılığa neden olan grupları belirlemek amacıyla Games-Howell post-hoc testi uygulanmış ve Bonferroni düzeltmesi yapılmıştır. İkili grup karşılaştırmalarında, normal dağılım gösteren veriler için Student T testi, normal dağılıma uymayan verilerde ise Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Tüm analizlerde anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Primer Kondrosit Hücre Kültürünün Hücre Canlılığının Doğrulanması

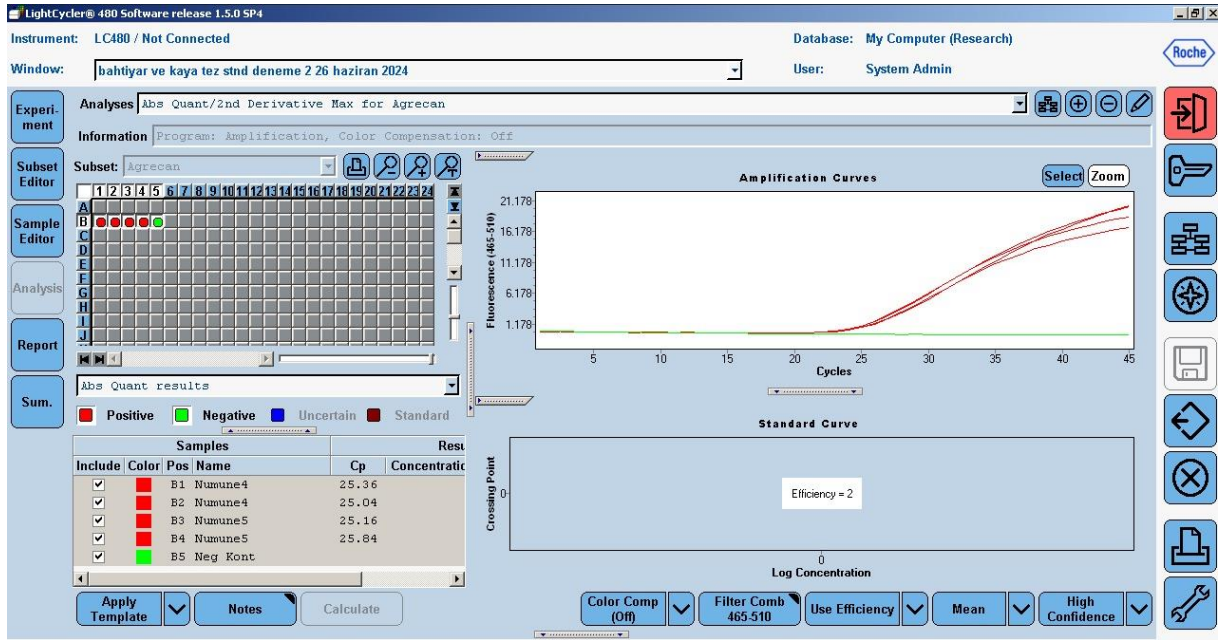
Hem sağlıklı hem de OA'lı grupta hücre canlılığının değerlendirilmesi için ROCHE Cell Proliferation Kit I (MTT) kiti kullanılmış ve 96 kuyucuklu ELISA okuyucuda (Biotek Epoch Gen5 2.0) 550 nm-690 nm dalga boylarında okunmuş ve sonuçları all-in-one microplate reader programında analiz edilmiştir. (Şekil 4.1)



Şekil 4.1. Primer Kondrosit Hücre Kültürü'nde hücre canlılıklarının değerlendirilmesi

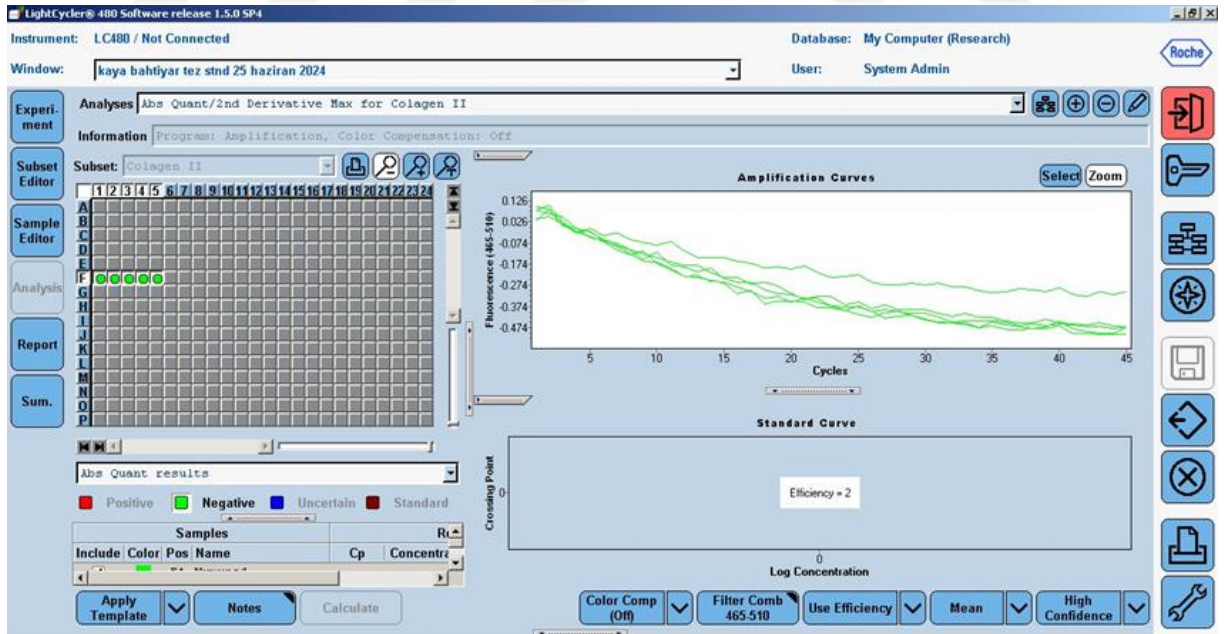
4.2. Primer Kondrosit Hücre Kültürünün Doğrulanması

Kondrosit spesifik gen ifadenmesi, ters transkripsiyonlu kantitatif gerçek zamanlı PZR(RT-qPCR) ile değerlendirilmiştir. Aggrecan gen ifadenmesi RT-qPCR ile gösterilmiştir. (Şekil 4.2)



Şekil 4.2. Aggrean gen ifadenlenmesinin gösterilmesi

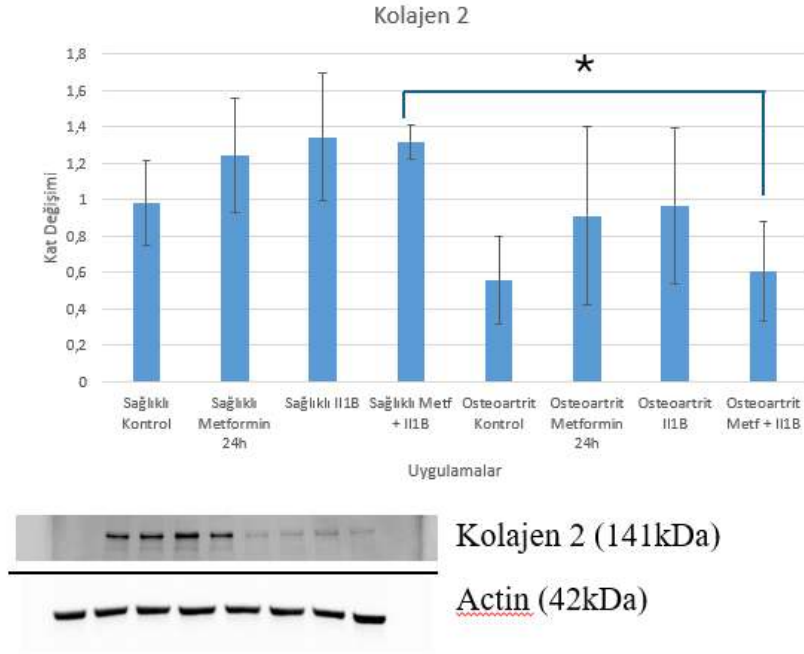
Kolajen 2 ifadelemesi RT-qPCR ile gösterilmiştir. (Şekil 4.3)



Şekil 4.3. Kolajen 2 ifadenlenmesinin gösterilmesi

Elde edilen ifadenleme profilleri, hücrelerin kondrosit fenotipinde olduğunu göstermektedir.

Kollajen 2 için yapılan Western Blot analizine ait elde edilen ölçümlerin kat değişimi cinsinden verileri şekilde gösterilmiştir. (ŞEKİL 4.4) Osteoartritli hücrelerde IL1B ve metformin varlığında, kollajen sentezi kontrole göre anlamlı olarak artmaktadır. ($p=0,013$)



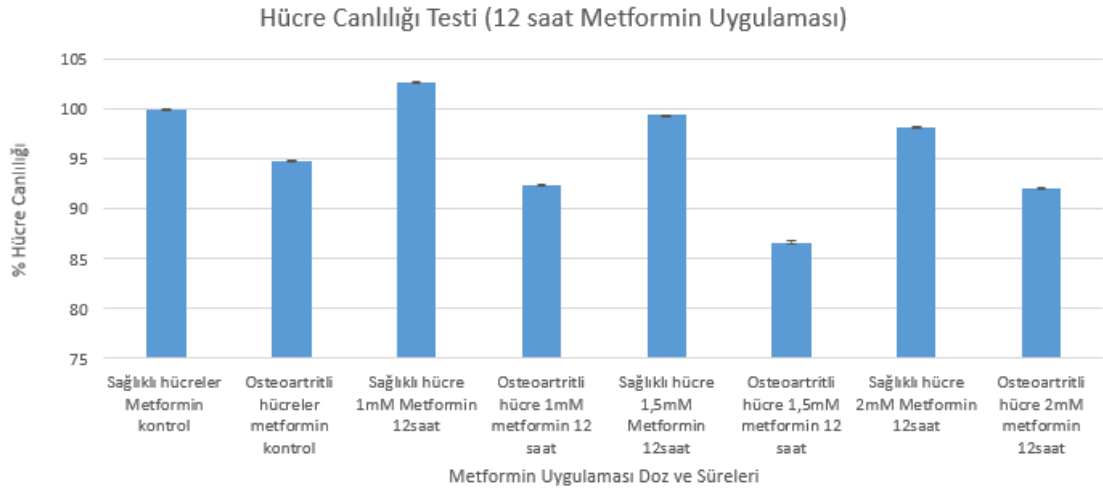
Şekil 4.4. Kolajen 2 ifadenmesinin protein düzeyinde gösterilmesi

*: $p=0,013$

4.3. Metformin Uygulamasının Doz ve Sürelerinin Belirlenmesi

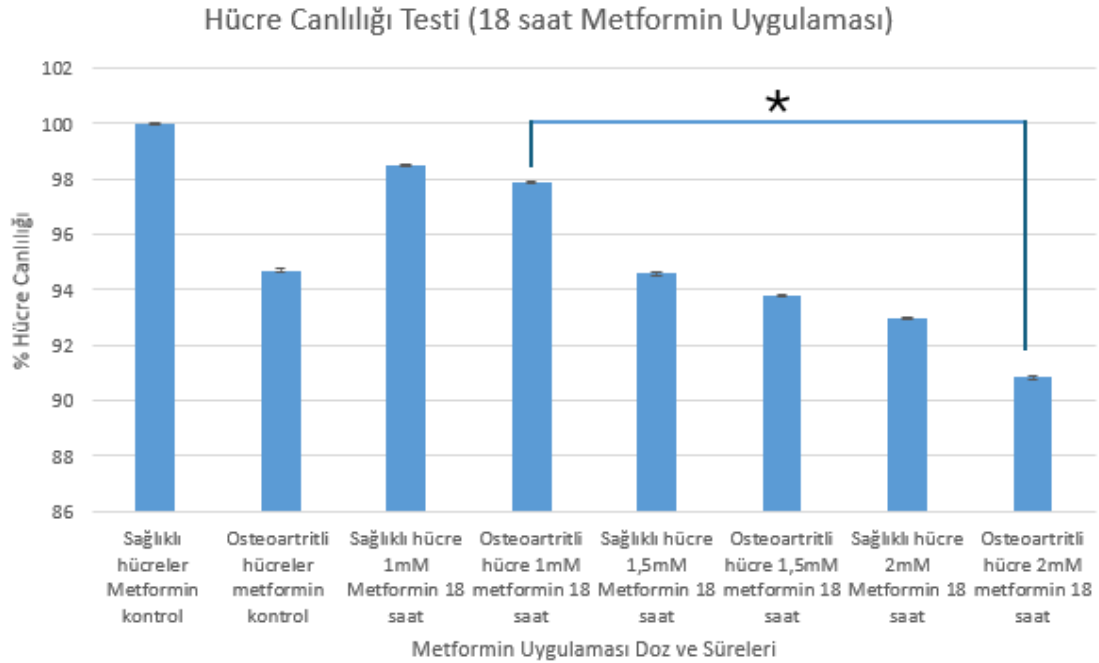
Normal inkübasyon koşullarında metforminin etkisini gözlemlemek ve ileri deneylerde kullanılacak metformin doz ve inkübasyon süresini belirlemek amacıyla sağlıklı ve OA'lı konositler 1, 1.4 ve 2 mM konsantrasyonlarında ve 12,18 ve 24 saat inkübasyon sürelerinde metformine maruz bırakılmıştır. PBS (pH 7.2) metforminin negatif kontrolü olarak kullanılmıştır.

MTT deneylerinde 12 saat metformin uygulaması yapıldığında, hücre canlılığı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. (ŞEKİL4.5)



Şekil 4.5. 12 Saatlik Metformin Uygulamasının Gruplarda Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

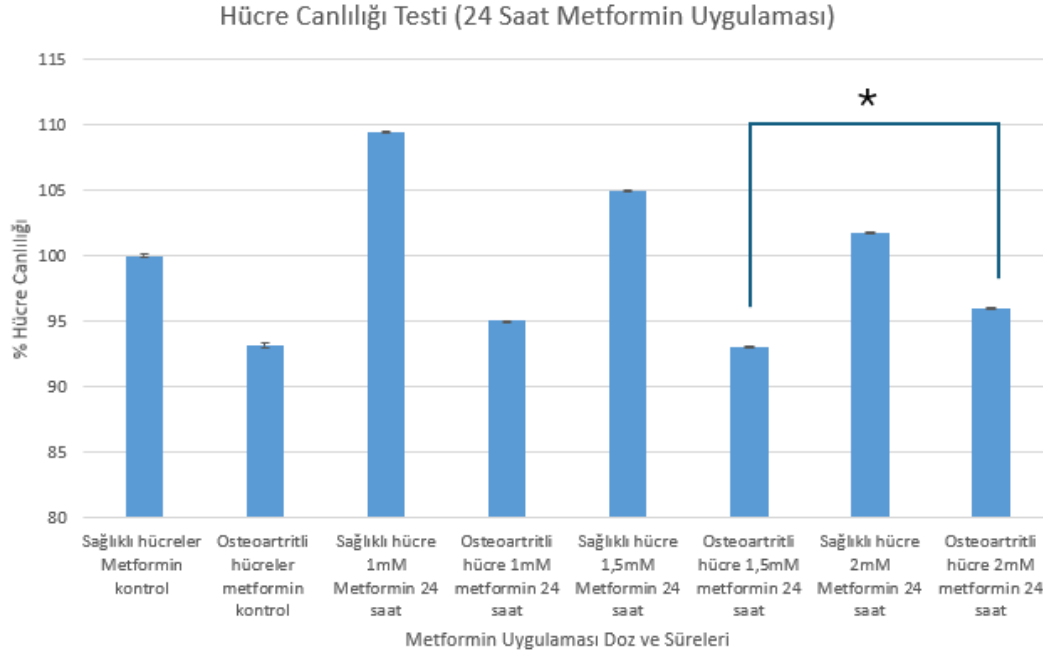
MTT deneylerinde 18 saat metformin uygulaması yapıldığında, OA fenotipindeki kondrositlerde 1mM ve 2mM uygulanan gruplar arasında hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu tespit edilmiştir. ($p < 0,001$) (ŞEKİL 4.6)



Şekil 4.6. 18 Saatlik Metformin Uygulamasının Gruplarda Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

*: $p < 0,001$

MTT deneylerinde 24 saat metformin uygulaması yapıldığında, OA fenotipindeki kondrositlerde 1,5mM ve 2mM uygulanan gruplar arasında hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu tespit edilmiştir. ($p=0,029$) (ŞEKİL 4.7)



Şekil 4.7. 24 Saatlik Metformin Uygulamasının Gruplarda Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

*: $p=0,029$

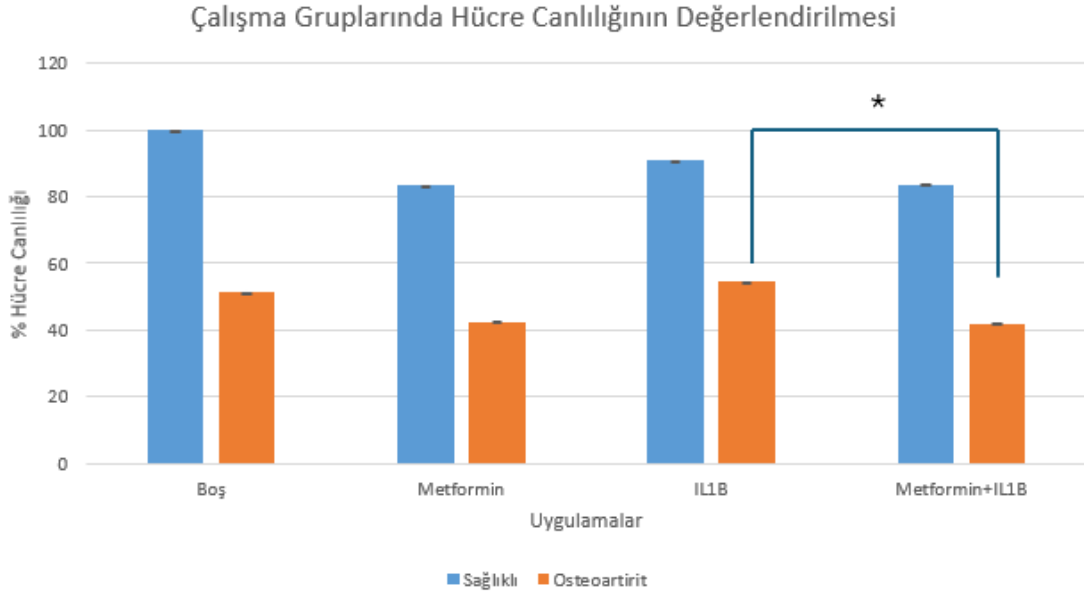
Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda, deneysel uygulama kolaylığı açısından 24 saat ve en düşük etkili doz olması açısından 1mM Metformin uygulaması deneysel uygulama için seçilmiştir.

4.4. IL1 β Uygulamasının Doz ve Sürelerinin Belirlenmesi

Kondrosit hücre kültürü çalışmalarında IL1 β 'nin doz bağımlı etkisi olduğu bildirilmektedir. Literatürde 5-10 ng/mL uygulama ile kondrositlerde şiddetli katabolik aktivitenin ve yoğun enflamatuvar yanıtın tetiklendiği bildirilmektedir (45). Çalışmamızda literatürde metforminin kıkırdak hücre kültürü üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği diğer çalışmalara (26, 43) benzer olarak 10 ng/mL 4 saat IL1 β uygulaması yapılmıştır.

4.5 Uygun Doz ve Sürelerin Belirlenmesi Sonrasında Hücre Canlılığı Testleri

Uygun doz ve süre belirlendikten sonra çalışma gruplarında uygulanan hücre canlılığı testinin sonuçları şekil 4.8’de verilmiştir. Osteoartritli hücelere IL-1 β uygulandığında, metformin ve IL-1 β ’nın birlikte uygulandığı osteoartritli hücelere göre hücre canlılığında anlamlı fark oluşmaktadır ($p<0,001$).

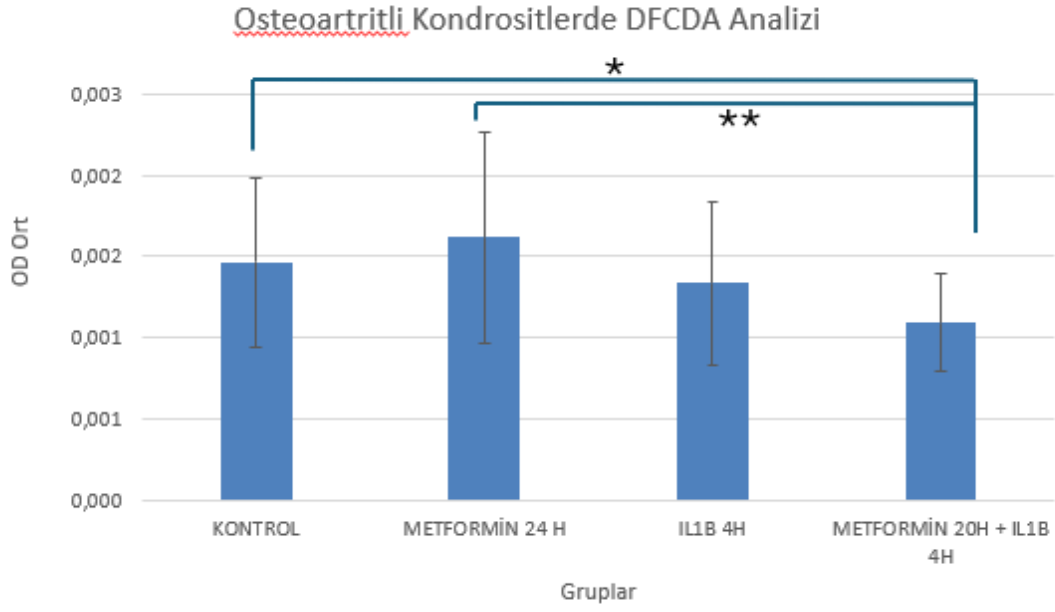


Şekil 4.8. Çalışma Gruplarında Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

*: $p<0,001$

4.6. ROS Analiz Bulguları

Özellikle hidrojen peroksit tespitinde kullanılan yöntem olan DCF-DA yöntemi ile yapılan ROS ölçümünden elde edilen veriler ve istatistiksel karşılaştırılması şekilde verilmiştir. (ŞEKİL) Osteoartritli hücelerde metformin uygulaması, kontrole göre hücredeki ROS miktarını bir miktar arttırmakta fakat IL1B uygulaması ise ROS miktarını bir miktar azaltmaktadır. Bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Fakat Osteoartrit fenotipindeki hücelere IL1B ile metformin uygulandığında ROS seviyeleri anlamlı şekilde ($p=0,04$) azalmıştır. Bu da SOD2 nin artışı ile uyumludur.

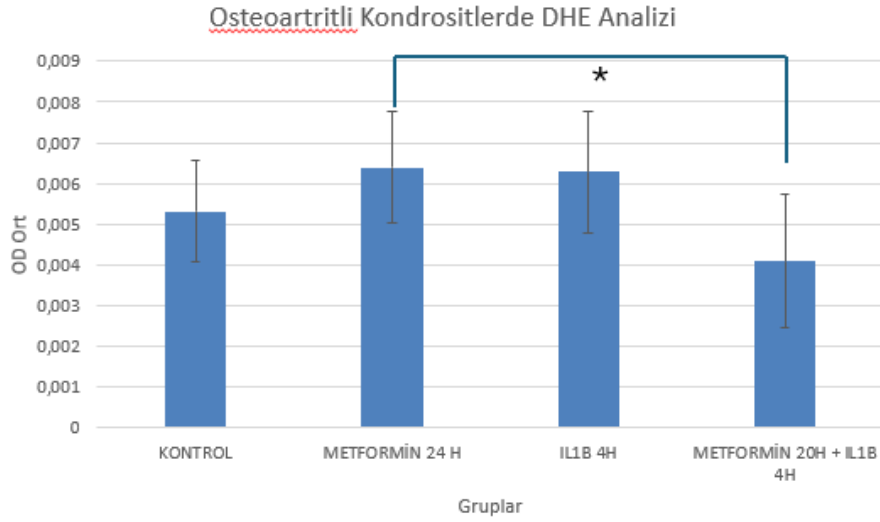


Şekil 4.9. Osteoartritli Kondrositlerde DFCDA analizi OD değeri grafiği

*: $p=0,048$

** : $p=0,022$

Özellikle süperoksit anyonunun tespitinde kullanılan DHE yöntemi ile yapılan ROS ölçümünden elde edilen veriler ve istatistiksel karşılaştırılması şekilde verilmiştir. (Şekil 4.10) Osteoartritli hücrelere ayrı ayrı metformin ve IL1B uygulaması kontrole göre ROS seviyelerini bir miktar arttırmaktadır. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Fakat IL1B ile birlikte metformin uygulanması, ROS seviyelerini düşürmektedir. ($p=0,002$) Bu da SOD2 artışı ile uyumludur. Ayrıca her iki sonuç osteoartrit fenotipindeki kondrositlerde metformin etkisinin inflamatuvar ortamda daha belirgin olduğunu, hücre stres altındayken metforminin daha etkili olarak çalıştığını göstermektedir.



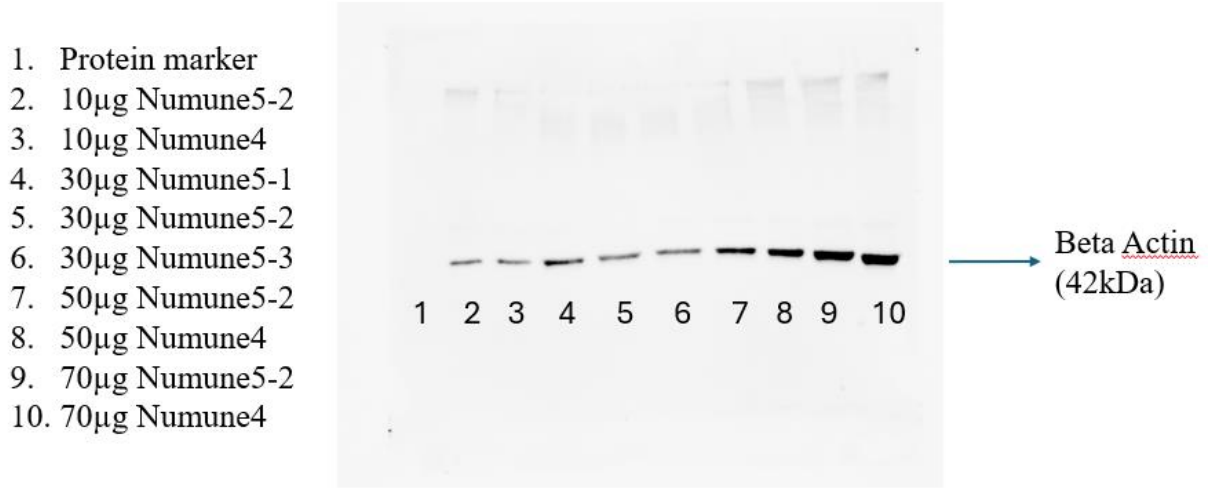
Şekil 4.10. Osteoartritli Kondrositlerde DFCDA analizi OD değeri grafiği

*: $p < 0,001$

4.7. Western Blot Analizi Bulguları

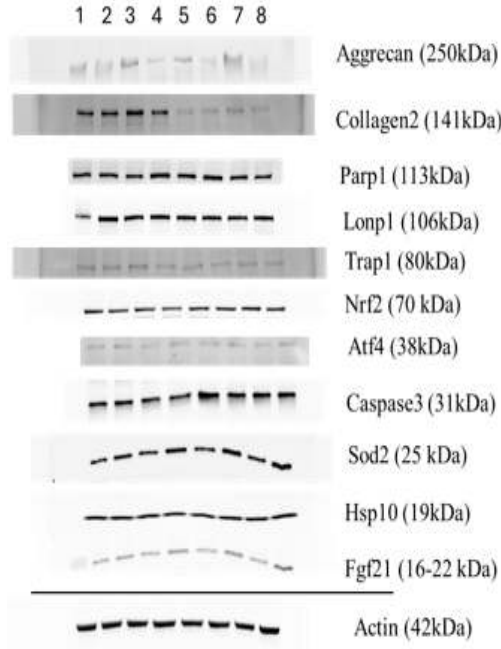
Bu tez çalışmasında, sağlıklı ve osteoartritli kondrositlerde metformin ön koşullamasının IL1 β uygulaması ile oluşturulan inflamatuvar mikroçevredeki koruyucu etkisini mitokondride hangi yolları aktive ederek sağladığını göstermek için western blot analizleriyle protein ifadenmesi incelenmiştir. Bu amaçla; oluşturulan gruplarda kültüre edilmiş hücrelerin kondrosit olduğunun kanıtlanması için kollajen 2; metformin uygulaması sonrasında non-lethal ETZ kompleks 1 inhibisyonuna cevabın gösterilmesi için FGF21, oksidatif strese karşı oluşan artmış antioksidan yanıtın mitokondri spesifik olarak gösterilmesi için SOD2, antioksidan stres yanıtının yolağının gösterilmesi için Nrf2, mitokondri katlanmamış protein yanıtının gösterilmesi için ATF4, Lonp1, Trap1, ve HSP 10, apoptozun gösterilmesi için ise Caspase 3 ve Parp1 genlerinin protein ifadenme değişimleri incelenmiştir.

Bunun için ilk olarak yapılan protein izolasyonu ardından yüklenecek protein miktarlarının standardize edildi. Bunun sonucunda deney grubu proteinlerden 50-70µg arası yükleme yapılmasına karar verildi. (Şekil) Sonrasında spesifik protein analizine geçildi. (Şekil 4.11)

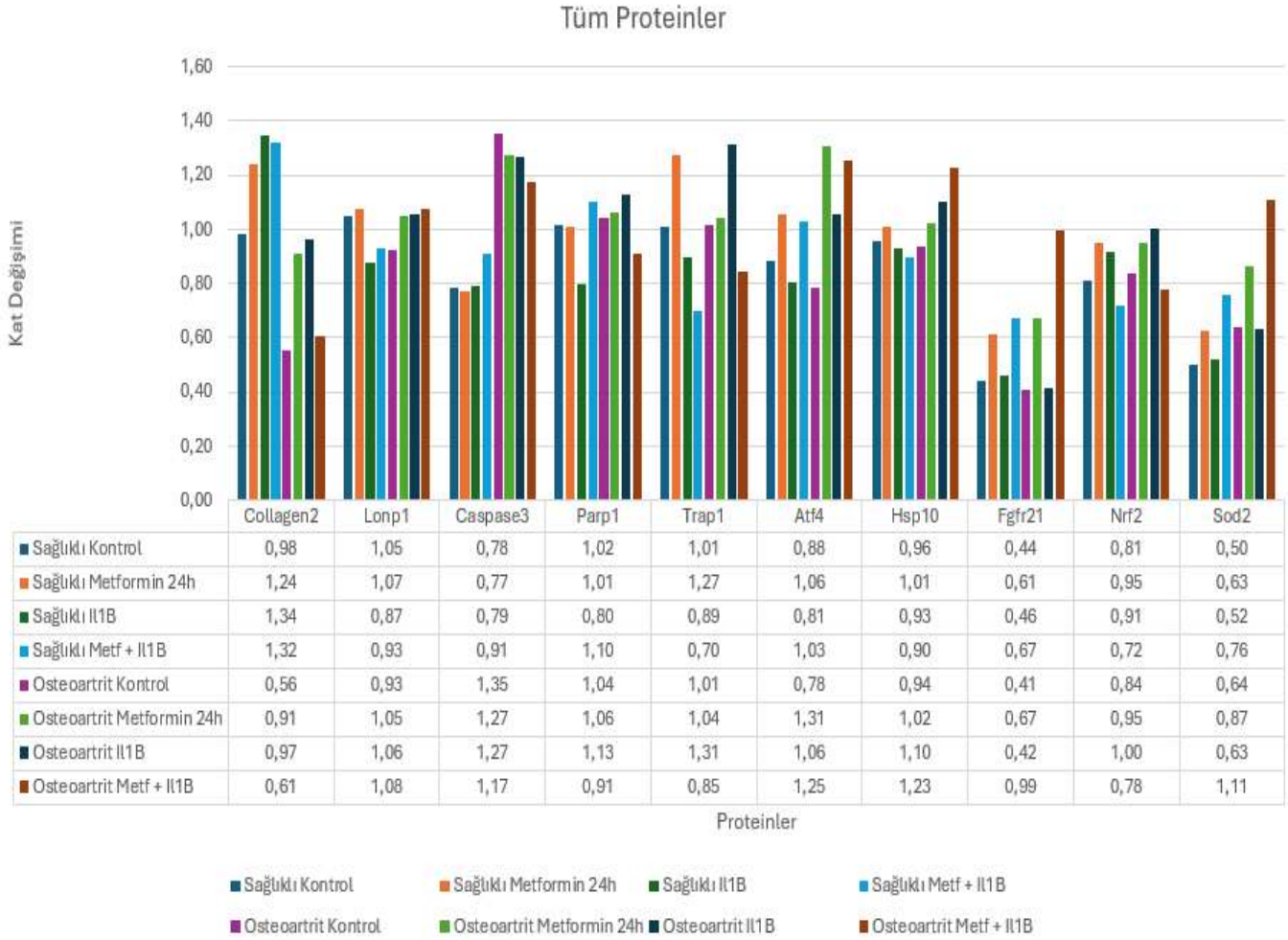


Şekil 4.11. Western Blot Uygulamasında Standardizasyonun Gösterilmesi

1. Sağlıklı Kontrol
2. Sağlıklı Metformin 24h
3. Sağlıklı Il1B
4. Sağlıklı Metf + Il1B
5. Osteoartrit Kontrol
6. Osteoartrit Metformin 24h
7. Osteoartrit Il1B
8. Osteoartrit Metf + Il1B

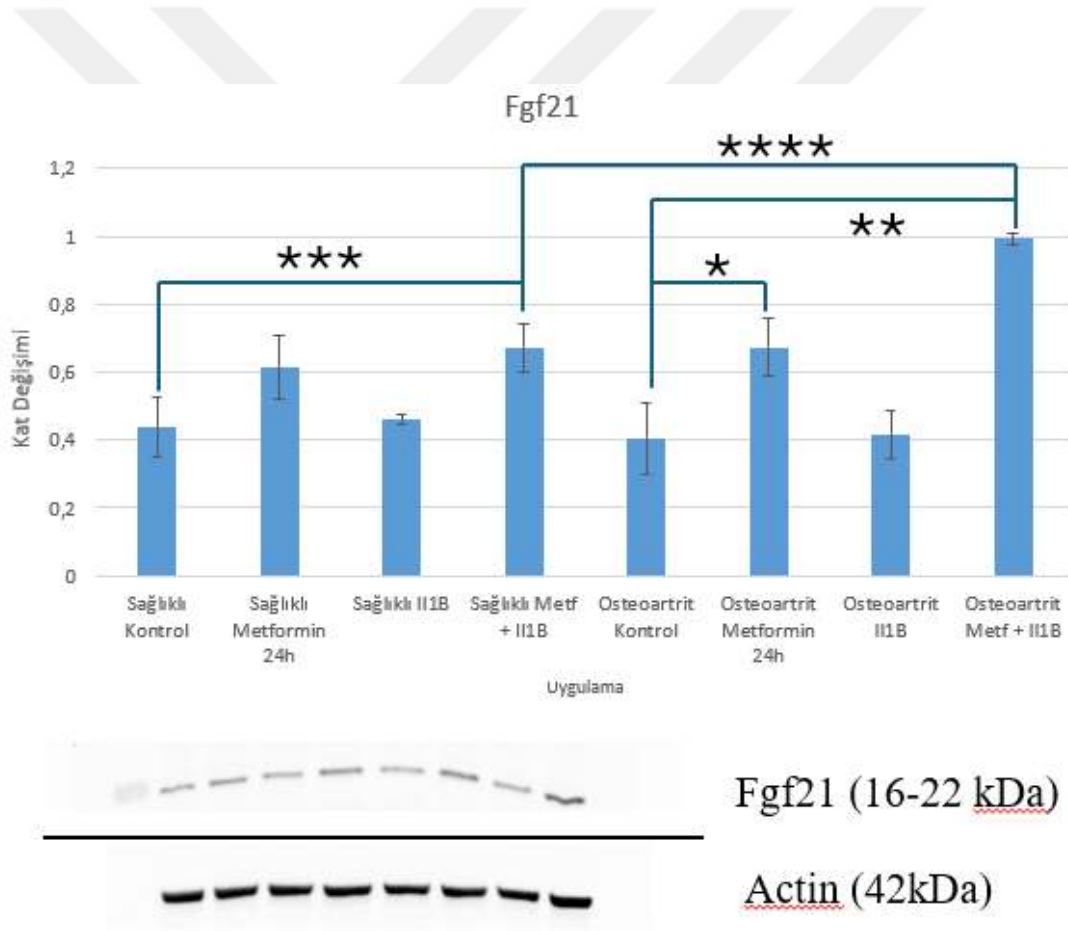


Kat Değişimi



Şekil 4.12. Western Blot analizinde tüm proteinlerin ifadenmelerinin gösterilmesi

FGF21 için yapılan Western Blot analizine ait elde edilen ölçümlerin kat değişimi cinsinden verileri şekilde gösterilmiştir. (ŞEKİL 4.11) FGF21, sağlıklı ve OA'lı kondrositlerde benzer oranda ifadenmektedir ($p=0,695543$). Hem sağlıklı ($p=0,704319$) hem de OA'lı kondrositler ($p=0,89639$) IL1B'ya maruz kaldıklarında FGF düzeylerinde anlamlı bir artış olmamaktadır. Fakat her iki hücre grubu IL1B'ya maruz kaldıklarında, ortama eklenen metformin hem sağlıklı ($p=0,022$) hemde OA'lı ($p<0,001$) hücrelerde FGF21 ekspresyonu kontrole göre anlamlı şekilde artmaktadır. Sağlıklı hücre grubundan farklı olarak osteoartrit fenotipindeki kondrositlerde metformin kontrole göre FGF21'i anlamlı olarak arttırmakta ($p=0,027$) ve ayrıca bu artış IL1B varlığında ($p=0,030$) daha da kuvvetli olmaktadır. Metforminin, IL1B varlığında osteoartritli hücrelerde sağlıklı hücrelere göre FGF21 ekspresyonunu anlamlı şekilde kuvvetli olarak arttırdığı tespit edilmiştir. ($p=0,001$)



Şekil 4.13. Çalışma Gruplarında FGF21 ifadenmesinin gösterilmesi

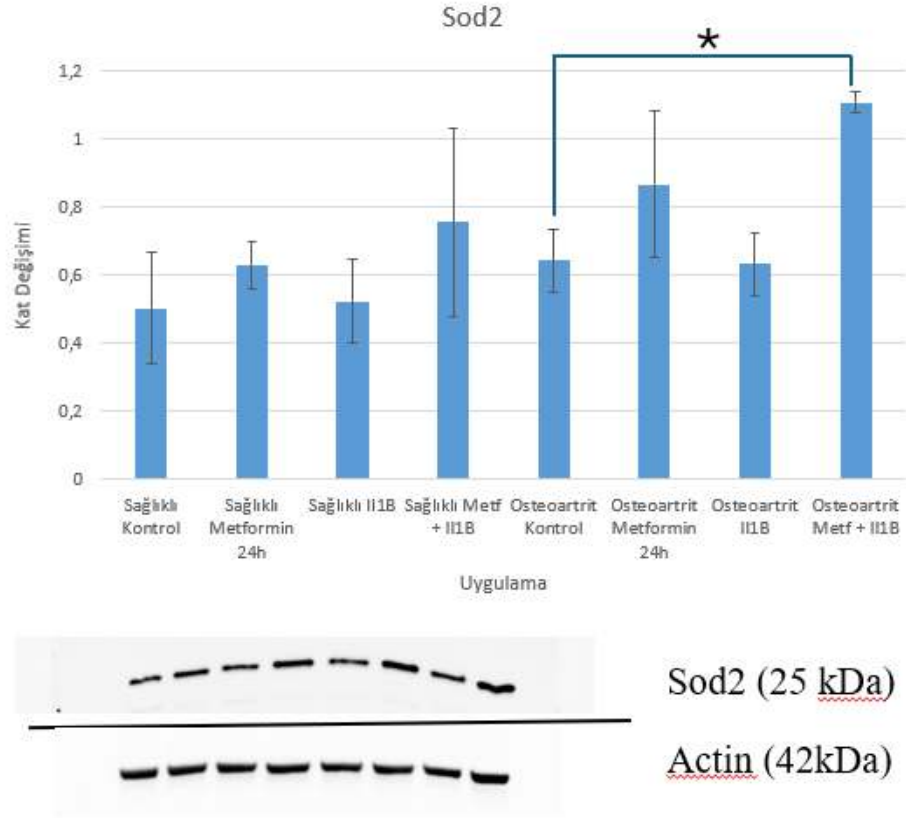
*: $p=0,027$

** : $p<0,001$

***: $p=0,022$

****: $p=0,001$

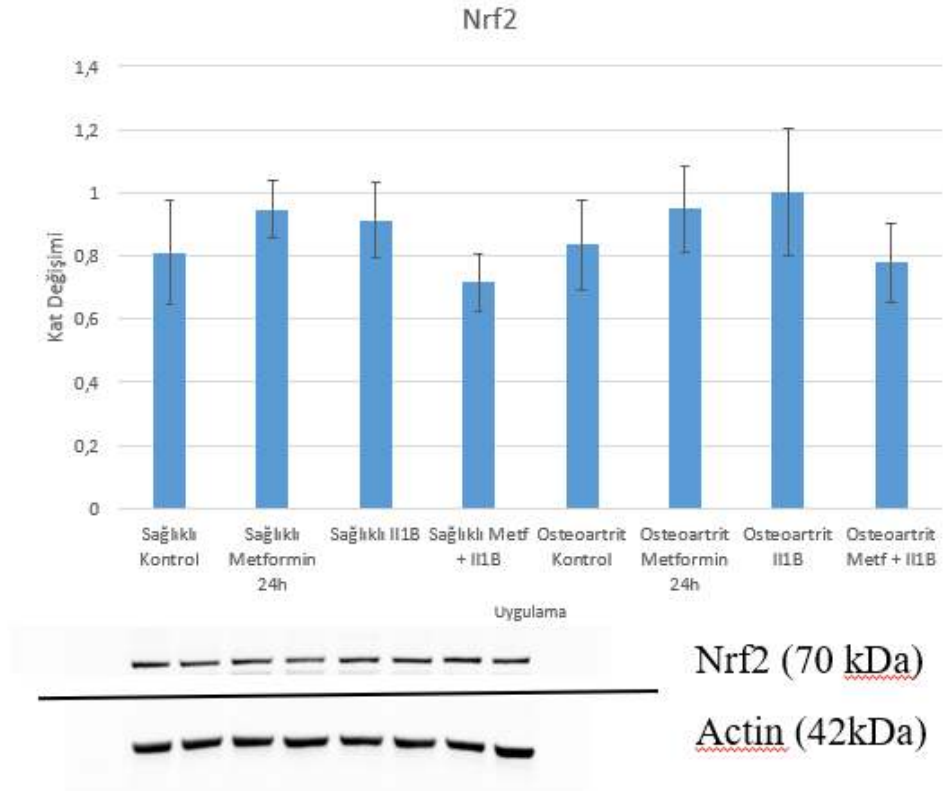
SOD2 geninin protein düzeyinde ifadenmesi için yapılan Western Blot analizine ait elde edilen ölçümlerin kat değişimi cinsinden verileri şekilde gösterilmiştir. (ŞEKİL 4.12) Mitokondriye özgü olan SOD2 ise osteoartrit fenotipindeki kondrositlerde inflamatuvar mikroçevre varlığında metformin uygulaması ile anlamlı olarak ($p=0,001$) artmaktadır.



Şekil 4.14. Çalışma Gruplarında SOD2 ifadenmesinin gösterilmesi

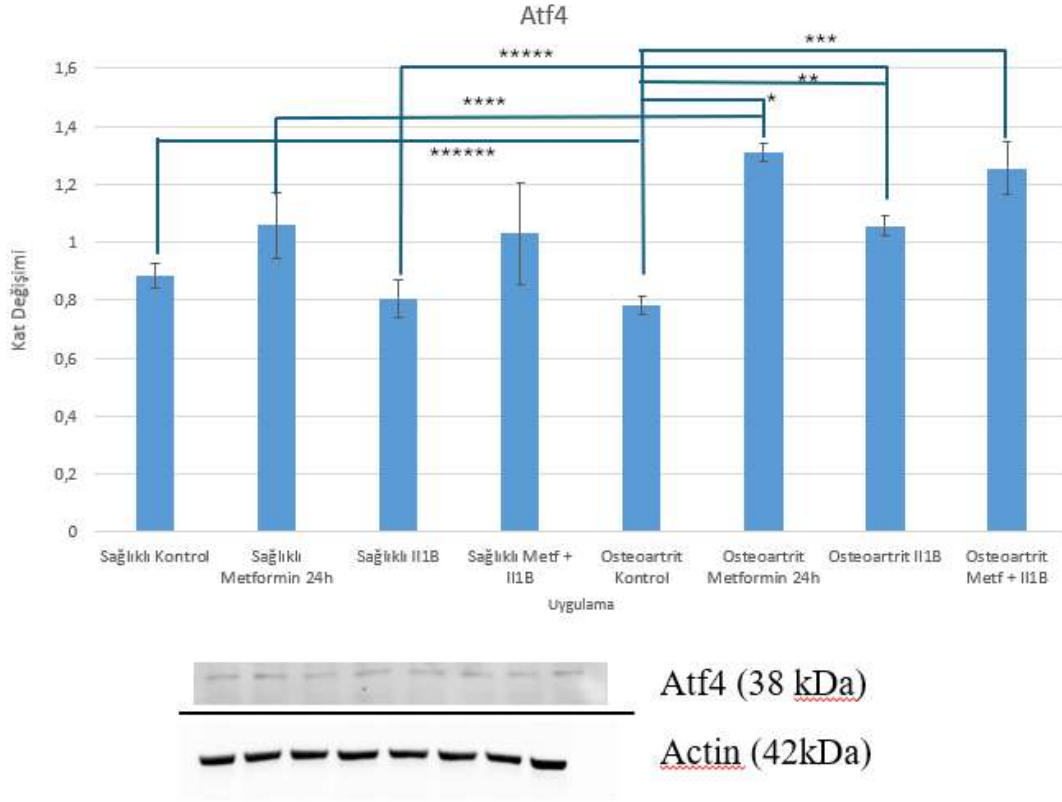
*: $p=0,001$

Nrf2 geninin protein düzeyinde ifadenmesi için yapılan Western Blot analizine ait elde edilen ölçümlerin kat değişimi cinsinden verileri şekilde gösterilmiştir. (Şekil 4.13) Nrf2 ekspresyonu açısından, tüm uygulamalarda ve koşullarda hem sağlıklı hem de osteoartrit fenotipindeki hücreler arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.



Şekil 4.15. Çalışma Gruplarında Nrf2 ifadenmesinin gösterilmesi

ATF4 geninin protein düzeyinde ifadenmesi için yapılan Western Blot analizine ait elde edilen ölçümlerin kat değişimi cinsinden verileri şekilde gösterilmiştir. (Şekil 4.14) OA'li hücrelere metformin verilmesi ($p < 0.001$) veya IL1B stresine maruz kalması ATF4 ekspresyonunu arttırmaktadır ($p < 0.001$). Metformin uygulaması, IL1B uygulamasına göre ATF4 ifadenmesini daha fazla arttırmaktadır. OA'li hücreler IL1B stresine maruz kaldıklarında da yine ATF4 anlamlı şekilde arttırmaktadır. ($p = 0.0005$). IL1B uygulanmış OA'li hücrelere metformin verildiğinde de ATF4 ekspresyonu osteoartritli kontrole göre anlamlı şekilde yüksek olmaktadır. ($p = 0.001$) OA fenotipindeki hücrelere uygulanan metformin, sağlıklı hücrelere oranla ATF4 ekspresyonunu daha güçlü arttırmaktadır. Yine osteoartritli hücrelerin IL1B'ya maruz kalması, sağlıklı hücrelere göre ATF4 ekspresyonunu anlamlı şekilde arttırmaktadır.



Şekil 4.16. Çalışma Gruplarında Atf4 ifadelenmesinin gösterilmesi

*: $p < 0,001$

** : $p < 0,001$

***: $p < 0,01$

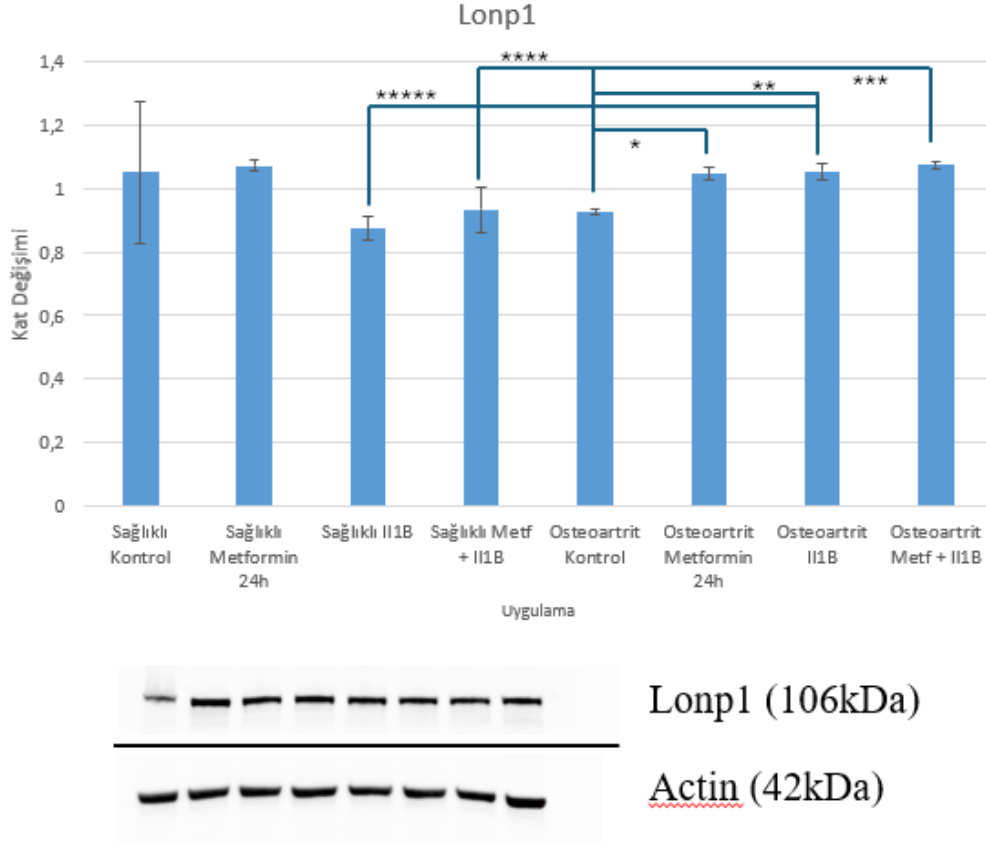
****: $p = 0,0005$

*****: $p < 0,01$

*****: $p < 0,01$

Lonp1 geninin protein düzeyinde ifadelenmesi için yapılan Western Blot analizine ait elde edilen ölçümlerin kat değişimi cinsinden verileri şekilde gösterilmiştir. (Şekil 4.15) Osteoartritli hücrelerde metformin verilmesi kontrole göre Lonp1 ekspresyonunu anlamlı olarak arttırmıştır. ($p = 0,0006$) Benzer şekilde IL1B maruziyeti de osteoartritli hücrelerde Lonp1 ekspresyonunu anlamlı olarak arttırmaktadır ($p = 0,001$). Osteoartritli hücrelere metformin ile birlikte IL1B uygulanması da yine kontrole göre Lonp1 ifadelenmesini anlamlı olarak arttırmaktadır. ($p < 0,001$) Yalnızca metformin uygulanması hem sağlıklı hem de osteoartritli hücrelerde Lonp1 ekspresyonunu benzer şekilde arttırmaktadır. Fakat,

yalnızca IL1B ve IL1B ile birlikte metformin uygulandığında osteoartritli hücrelerin Lonp1 ekspresyonu, sağlıklı hücrelere göre anlamlı olarak daha kuvvetli olmaktadır. (p=0,002)(p=0,025)



Şekil 4.17. Çalışma Gruplarında Lonp1 ifadenmesinin gösterilmesi

*: p=0,001

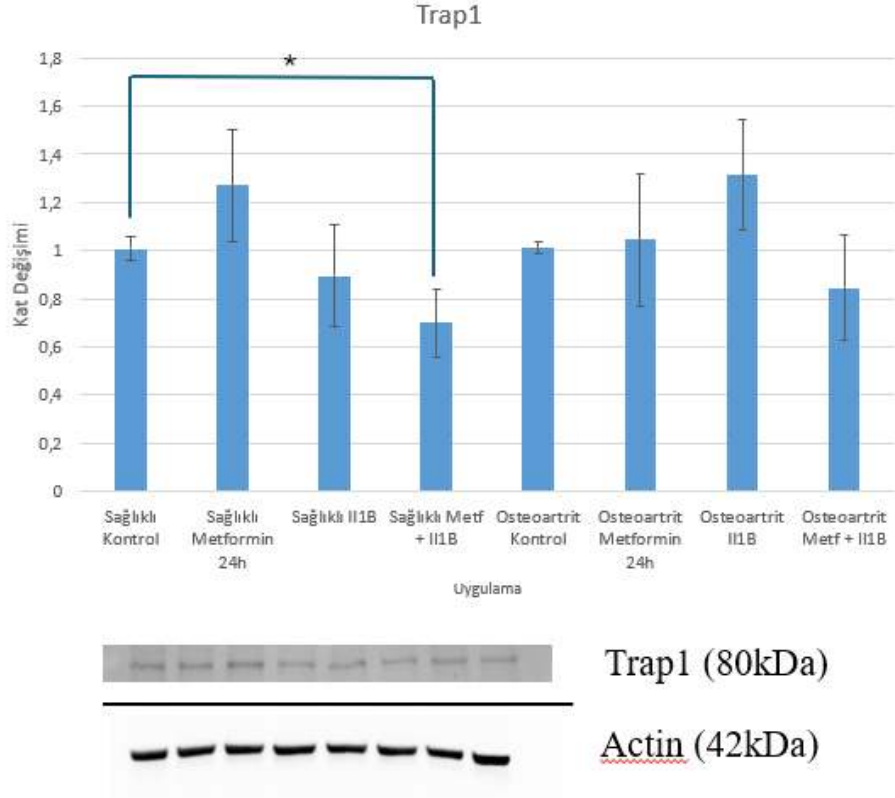
** : p<0,001

***: p<0,001

****: p=0,025

*****: p=0,002)

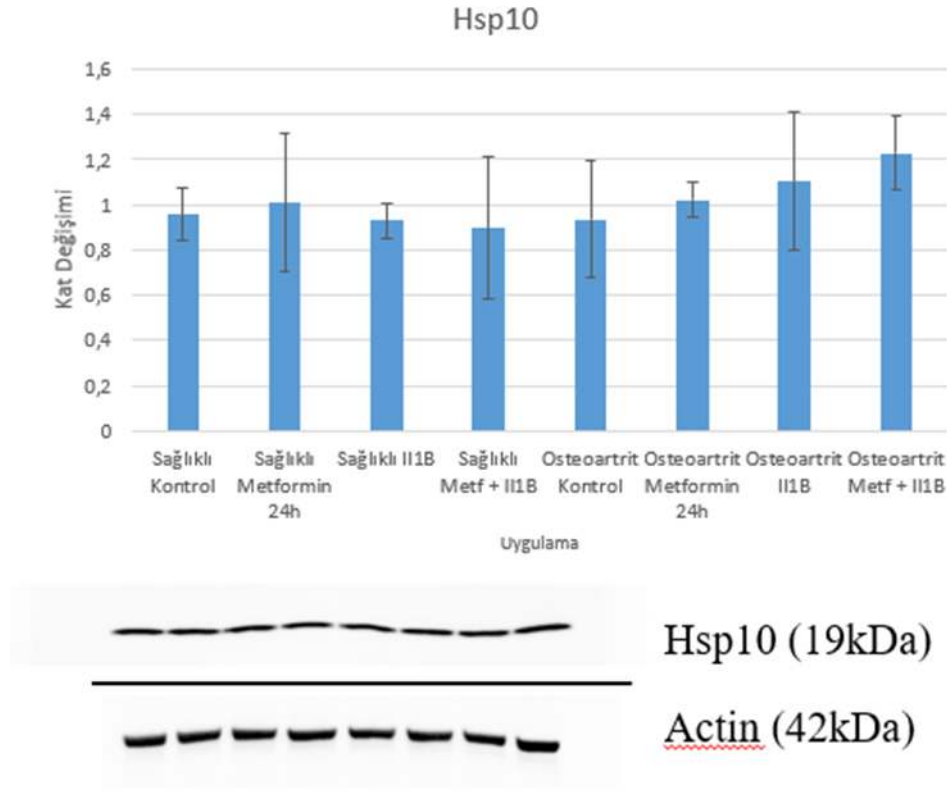
Trap1 geninin protein düzeyinde ifadenmesi için yapılan Western Blot analizine ait elde edilen ölçümlerin kat değişimi cinsinden verileri şekilde gösterilmiştir. (Şekil 4.16) Trap1 ifadenmesi osteoartritli hücrelerde, sağlıklı hücreler göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. (p=0,023)



Şekil 4.18. Çalışma Gruplarında Trap1 ifadenmesinin gösterilmesi

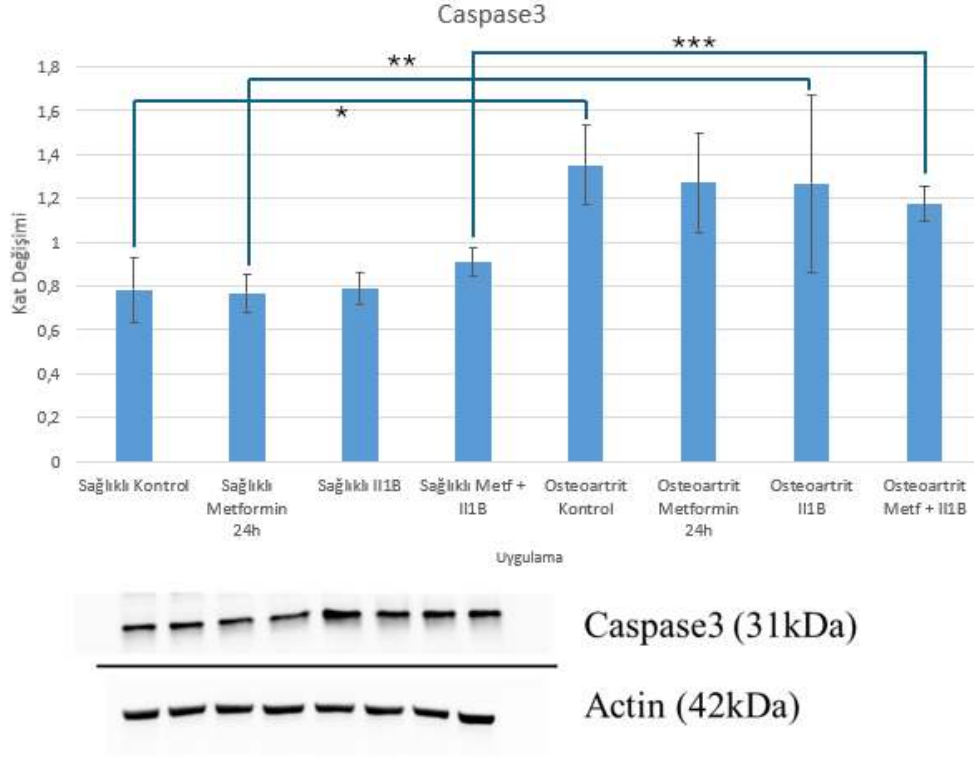
*: $p=0,023$

HSP10 geninin protein düzeyinde ifadenmesi için yapılan Western Blot analizine ait elde edilen ölçümlerin kat değişimi cinsinden verileri şekilde gösterilmiştir. (Şekil 4.17) Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bir yoktur.



Şekil 4.19. Çalışma Gruplarında HSP10 ifadenmesinin gösterilmesi

Caspase 3 ve Parp1 geninin protein düzeyinde ifadenmesi için yapılan Western Blot analizine ait elde edilen ölçümlerin kat değişimi cinsinden verileri şekilde gösterilmiştir. (Şekil 4.18 – Şekil 4.19) Caspase 3, osteoartritli kondrositlerde sağlıklı kondrositlere oranla anlamlı şekilde $p=0,013$) daha fazla sentezlenmektedir. Gruplarda, kendi içinde uygulamalara bağlı olarak Parp1 ekspresyonunun anlamlı olarak değişmemektedir.

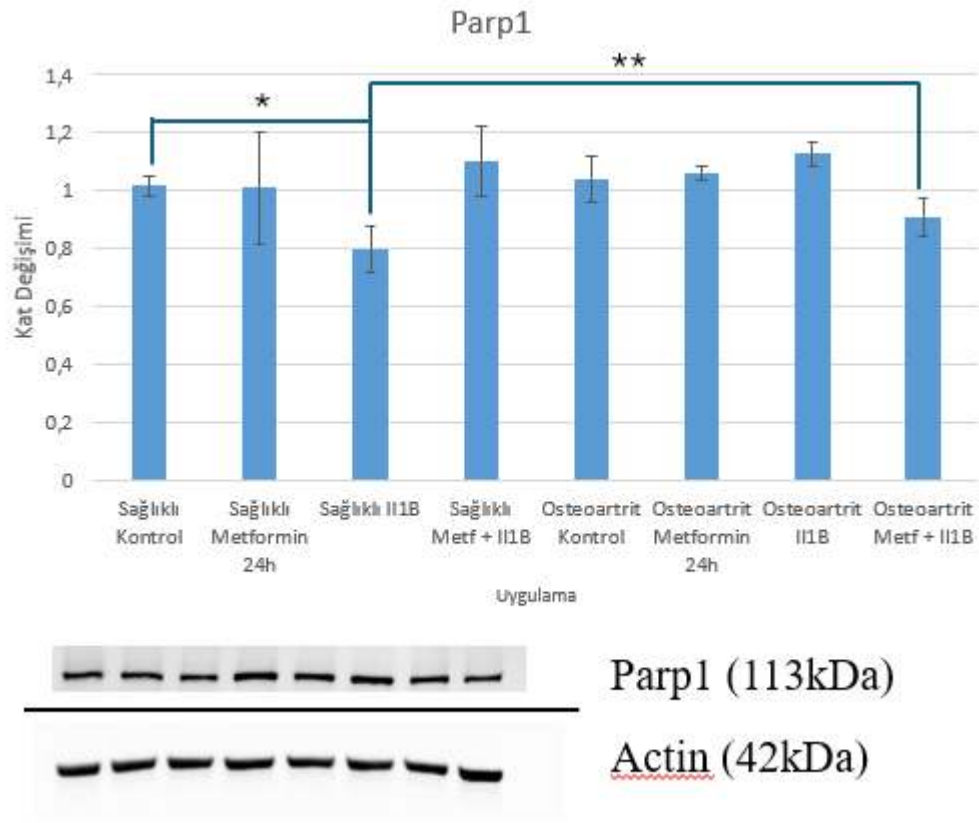


Şekil 4.20. Çalışma Gruplarında Caspase 3 ifadenmesinin gösterilmesi

*: $p=0,013$

**: $P=0,022$

***: $p=0,01$



Şekil 4.21. Çalışma Gruplarında Parp1 ifadenmesinin gösterilmesi

*: $p=0,01$

** : $p=0,003$

5. TARTIŞMA

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar; insandan elde edilen sağlıklı ve OA'lı kondrosit kültürlerinde metformin ile yapılan ön koşullamanın, IL-1 β ile oluşturulan inflamatuvar mikroçevreye karşı koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Bu etki OA fenotipi sergileyen kondrositlerde daha kuvvetli olarak ortaya çıkmaktadır. Bu etki mekanizmasının açıklanması için mitohormetik yollar incelendiğinde ise metforminin kıkırdak koruyucu etkisini Nrf2'nin aktif rol oynadığı AMPK bağımlı yolağın yerine mtROS – PERK – eIF2 α – ATF4 – FGF21 yolağı üzerinden endoplazmik retikulum stres yolağı ile koordineli şekilde entegre stres yanıtını uyararak yapmaktadır. Bu yolağın aktivasyonu, mitokondri spesifik antioksidan gen olan SOD2'nin protein düzeyinde ifadenmesini arttırmakta ve reaktif oksijen radikallerini azaltarak hücreleri hayatta kalma yönünde desteklemekte ve apoptozdan korumaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, yaşlanma ve hastalık patolojilerinde ortaya çıkan rolü nedeni ile mitokondriye odaklanmaktadır. Tip 2 diyabetin tedavisinde dünya çapında yaygın olarak kullanılan anti-hiperglisemik ajan olan metforminin faydalı etkilerini hücreler enerji ve beslenme sensörü olan ve artmış AMP: ATP oranı veya hipoksi, glukoz azlığı gibi çeşitli streslere yanıt olarak oluşan ATP üretiminin azalması sonucu aktive olan AMPK üzerinden gösterdiğini bildirmektedir. Diğer bir çalışmada ise metforminin hepatik glukoz üretimini, hepatik enerji üretimini azaltarak düşürdüğü bildirilmiştir. Kim ve ark.'nın yaptıkları çalışmada ise metforminin mitokondrial kompleks-1 aktivitesini inhibe ederek FGF21 gen ekspresyonunu ve PERK-eIF2 α -ATF4 yolağı üzerinden sekresyonunu arttırdığını fare ve insan denekler üzerinde gösterilmiştir (10).

Mitokondriye spesifik bir mitokin olan FGF21 farklı hücrelerde eksprese edilmektedir. Hepatositlerden salgılanan FGF21, glukoz ve lipid metabolizmasını düzenler. GLUT1 ekspresyonunu artırarak insülin bağımsız glukoz alımını teşvik ettiği ve böylece insülin duyarlılığını arttırdığı Pedersen ve ark. insanlar üzerinde yaptığı çalışma ile gösterilmiştir(46). Kondrositlerde ise mitokondriyal biyogenezi ve enerji üretimini optimize ederek hücreler metabolizmayı desteklediği bilinmektedir. Bu etkisini AMPK'yı aktive ederek, ATP üretimini arttırması ve oksidatif fosforilasyonu düzenlemesi sayesinde hücreler enerji seviyesini dengelemesi ile yapmaktadır(47). Diğer bir çalışmada ise insan kondrosit kültürlerinde FGF21'in mitohormetik yanıtta ROS seviyelerinin aşırı yükselmesini engelleyen antioksidan mekanizmaları aktive ettiği bildirilmiştir. Nrf2 yolağını uyararak SOD, katalaz gibi antioksidan enzimlerin üretimini arttırmakta ve oksidatif hasarı

azaltmaktadır. Ayrıca hasarlı mitokondrilerin temizlenmesi için mitofaji sürecini başlattığı ve mitokondriyal kalite kontrol mekanizmasını güçlendirmektedir (38). Torres ve ark. çalışmasında ise *c.elegans* ve fare kökenli kondrosit kültürlerinde FGF21'in mitohormetik süreçte UPRmit'i aktive ederek mitokondri içindeki proteostazı sağladığı ve böylece kondrositlerin sağlıklı işleyişini sürdürmesine yardımcı olduğu gösterilmiştir(48). Diğer yandan FGF21, mitokondriyal metabolizmanın yan ürünleri olan bazı metabolitlerin, örneğin asetil-KoA, NAD⁺, ATP gibi moleküllerin dengede kalmasını sağlar. Buna göre enerji gereksinimi ve oksidatif stres arasında denge kurarak mitohormetik etkinin sürdürülmesine katkıda bulunur (8). Tüm bu etkilerinin sonucunda ise apoptozun önlenmesine yardımcı olmaktadır. Özellikle mitokondri kaynaklı apoptoz sinyalini baskılamakta ve stres altındaki hücrelerin sağ kalmasını arttırmaktadır. Da ve ark. fare çalışmalarında elde ettikleri sonuçlara göre FGF21'in bu etkisini PI3K-Akt ve MAPK yolları aracılığıyla anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu artırarak gerçekleştirdiği bildirilmiştir. Ayrıca yine bu çalışmada, mitokondriyal fisyon ve füzyon süreçlerini dengelediği ve böylece mitohormetik süreçte kritik bir adaptif yanıt sağlayarak ve mitokondri ağının stabilitesini arttırdığı raporlanmıştır (47). Tüm bu veriler, oksidatif stres altındaki hücrelerde, mitohormetik yanıtın aktivasyonunda FGF21 önemli bir mitokin olduğunu göstermektedir. Bizde bu çalışmada IL1B ile indüklenmiş inflamatuvar mikroçevrede bulunan sağlıklı ve AO'lu insan kondrositlerinde metforminön koşullaması sonucunda FGF21 ekspresyonunu anlamlı şekilde arttırmasının, metforminin non-lethal ETZ inhibisyonunu yaptığının kanıtı olarak gösterdik. Elde ettiğimiz sonuçlara göre osteoartrit fenotipindeki kondrositlerde bu ekspresyon, sağlıklı kondrositlere oranla anlamlı olarak daha fazla kuvvetlenmektedir.

Metformin uygulanmasına bağlı olarak mitokondriyal kompleks 1'in aktive olması sonucunda ortaya çıkan mitokondriyal stres AMPK ve mtROS olmak üzere başlıca 2 yolağı aktive edebilir. Bu yolların aktivasyonu sonucunda antioksidan yanıtın kuvvetlendirilmesine yönelik genler aktive olur ve SOD ve katalaz gibi antioksidan yanıt elemanlarının ekspresyonu artar. Metformin uygulanması sonrasında kondrositlerde oksidatif fosforilasyonun düzenlendiği bildirilmiştir (44). Pedersen ve ark. yaptıkları çalışmada, metforminin mitokondriyal biyogenezi artırarak ve mitokondriyal füzyonu destekleyerek bu süreci desteklediği bildirilmiştir. Ayrıca metforminin, PGC-1 α , mitofuzin-1 (MFN1) ve mitofuzin-2 (MFN2) gibi mitokondriyal füzyon faktörlerini artırarak oksidatif fosforilasyondaki düşüşü tersine çevirdiği bildirilmiştir. Bu çalışmada ayrıca, metforminin,

IL-1 β gibi inflamatuvar uyarıcılarla indüklenen ROS seviyelerini düşürerek oksidatif stresi azalttığı ve bunu SIRT3 ve AMPK sinyal yollarının etkisiyle gerçekleştirir. Nrf2 yolağının aktivasyonu sonucunda SOD2 ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (46). Biz çalışmamızda metformin ön koşullama sonrasında IL1B ile oluşturulan inflamatuvar mikro çevrede OA'li kondrositlerin anlamlı olarak daha fazla SOD2 eksprese ettiğini gösterdik. Bu durum metformin ön koşullama ile uyarılan mitohormetik yanıtın, var olan hücresel stres altında (osteoartrit) ek inflamatuvar strese karşı (IL1B) FGF21 üzerinden düzenlendiğini düşündürmektedir. Stres altındaki hücre, hayatta kalmak için mitohormetik yanıtı daha kuvvetli aktive ederek, antioksidan SOD2'yi arttırmaktadır. Diğer çalışmalardan farklı olarak bizim çalışmamızda Nrf2 ekspresyonu sağlıklı ve OA'li kondrositlerde ön koşullama sonrasında artmış olsa da gruplar arasında anlamlı bir artış tespit edilmemiştir. Bunun nedeni, elde edilen antioksidan yanıtın AMPK yolağı üzerinden değil daha baskın olarak mtROS yolağı üzerinden PERK- eIF2 α -ATF4-FGF21 yolu ile gerçekleştiğini göstermektedir.

Çalışmamızda, antioksidan yanıtın etkili olup olmadığını değerlendirmek için ROS analizi yaptığımızda ise OA fenotipindeki kondrositlere uygulanan metforminin kontrole göre hücredeki ROS miktarını bir miktar arttırmakta fakat IL1B uygulaması ise ROS miktarını bir miktar azaltmakta olduğu tespit edilmiştir. Fakat ön koşullama sonrasında Osteoartrit fenotipindeki hücrelere IL1B uygulandığında ROS seviyeleri anlamlı şekilde azalmıştır ve elde edilen bu sonuç SOD2 seviyelerindeki artışı ile koreledir. Elde ettiğimiz sonuçlar, osteoartrit fenotipindeki kondrositlerde metformin etkisinin inflamatuvar ortamda daha belirgin olduğunu, hücre stres altındayken metforminin daha etkili olarak çalıştığını göstermektedir. Metformin ile ön koşullama sonrasında hem FGF21 artışı hem de buna yanıt olarak SOD2'nin artmasıyla birlikte ROS miktarının azalması kondrositlerin hayatta kalmaya yönelik refleks gösterdiğini kanıtlamaktadır.

Metformin, mitokondriyal katlanmamış protein yanıtını (UPRmt) aktive ederek mitokondriyal protein homeostazını ve hücresel kalite kontrol mekanizmalarını desteklemektedir (48). Metforminin mitokondriyal kompleks I'ı inhibe etmesiyle başlayan süreçte ATP seviyeleri düşer ve düşük seviyede reaktif oksijen türleri (mtROS) üretilir (38). Bu ROS üretimi, ER-UPR elemanları PERK-eIF2 α -ATF4 yolunun uyarımıyla UPRmit aktivasyonunu tetikleyerek mitokondriyal stres yanıtını başlatır (47). Aktive olan ATF4 transkripsiyon faktörü, mitokondriyal şaperonlar (mtHSP60, mtHSP70) ve proteazlar (Lon proteaz gibi) dahil olmak üzere katlanmamış proteinlerin temizlenmesi için gerekli genlerin

ekspresyonunu artırır (35). Ayrıca metformin, SIRT3 aracılığıyla oksidatif stresin azaltılmasına ve Lon proteaz yoluyla mitokondri içinde yanlış katlanmış proteinlerin ortadan kaldırılmasına katkı sağlar (38). Bu süreç, mitokondriyal füzyon ve fizyon dengesinin korunmasıyla birlikte mitokondriyal adaptasyonu destekler ve enerji metabolizmasını optimize eder (Da et al., 2024). Böylece metformin, mitohormetik mekanizmalarla düşük düzeyde kontrollü stres yaratır ve adaptif hücresel yanıtları tetikleyerek oksidatif hasarın ve yaşlanmaya bağlı mitokondriyal disfonksiyonun önlenmesinde rol oynar (48). Biz de çalışmamızda metformin ön koşullamanın sağlıklı ve OA'li kondrositlerdeki UPRmit yanıtını nasıl değiştirdiğini göstermek için ATF4, Lonp1, Trap1 ve Hsp10 ifadenmesi üzerindeki etkisini değerlendirdik.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar; OA'li hücrelere metformin verilmesi veya IL1B stresine maruz kalması ATF4 ekspresyonunu anlamlı olarak arttırdığını göstermektedir. Metformin uygulaması, IL1B uygulamasına göre Atf4 ifadenmesini daha fazla arttırmaktadır. OA'li hücreler IL1B stresine maruz kaldıklarında da yine ATF4 anlamlı şekilde arttırmaktadır. IL1B uygulanmış OA'li hücrelere metformin verildiğinde de ATF4 ekspresyonu osteoartritli kontrole göre anlamlı şekilde yüksek olmaktadır. OA fenotipindeki hücrelere uygulanan metformin, sağlıklı hücrelere oranla ATF4 ekspresyonunu daha güçlü arttırmaktadır. Yine osteoartritli hücrelerin IL1B'ya maruz kalması, sağlıklı hücrelere göre ATF4 ekspresyonunu anlamlı şekilde arttırmaktadır. ATF4 ifadenmesi, FGF21 ile birlikte yorumlandığında, metformin uygulandığında ortaya çıkan mitohormetik cevabın osteoartritli hücrelerde daha kuvvetli olduğu söylenebilir. Elde edilen veriler, metforminin osteoartritli kondrositlerde mitohormetik etkilerini PERK/eIF2 α /ATF4/FGF21 yolağı üzerinden gösterdiğini düşündürmektedir. OA'li kondrositlerde ER stresi daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (49). Çalışmamızda gösterdiğimiz FGF21 ve ATF4 artışı, metformin ön koşullamanın oluşturduğu kompleks 1 inhibisyonu sonucu oluşan oksidatif strese karşı tetiklenen mitohormetik yanıtın, mitokondri-ER çapraz konuşması ile koordineli şekilde yürütüldüğünü düşündürmektedir. Bu nedenle OA'li kondrositlerde metformin uygulamasının “Entegre Stres Yanıtı”nı uyardığı ve hayatta kalmayı arttırdığı söylenebilir. Bu veriler, metforminin endoplazmik retikulum katlanmamış protein yanıtı üzerinden özellikle PERK-ATF4 yolağını aktive ederek kondrosit fonksiyonlarını düzenliyor olabileceğini göstermektedir.

Lonp1, mitokondriyal katlanmamış protein yanıtında (UPRmt) önemli bir proteaz olarak görev yapar ve bu süreçte ATF4 ve ATF5 gibi transkripsiyon faktörleri tarafından

ekspresyonu artırılarak mitokondri içindeki yanlış katlanmış veya hasar görmüş proteinlerin temizlenmesini sağlar (48). Bu durum, mitokondriyal kalite kontrol mekanizmasını güçlendirerek hücrel homeostazın korunmasına katkıda bulunur. Lonp1 aynı zamanda oksidatif stres sırasında mitokondriyal matrikste biriken protein agregatlarının yıkılmasını sağlayarak oksidatif stresin kontrol altına alınmasında kilit rol oynar (47). Ancak aşırı reaktif oksijen türleri (ROS) birikimi, Lonp1 aktivitesinin yetersiz kalmasına ve mitokondriyal disfonksiyonun gelişmesine neden olabilir (35). Bu çalışmada OA'li hücelere ayrı ayrı hem metformin hem de IL1 β uygulanması kontrole göre Lonp1 ekspresyonunu anlamlı olarak arttırmıştır. Fakat, yalnızca IL1 β ve IL1 β ile metformin uygulandığında osteoartritli hücrelerin Lonp1 ekspresyonu, sağlıklı hücelere göre anlamlı olarak daha kuvvetli olmaktadır. Bu durum osteoartritli kondrositlerin sağlıklı kondrositlere göre, stres altında katlanmamış protein yanıtını daha kuvvetli şekilde verdiğini göstermektedir.

Trap1, protein birikimini önlemeye yardımcı olan bir mitokondriyal şaperondur. Oksidatif stres sırasında koruyucu bir rol oynar ve UPRmt'nin önemli bir bileşeni olarak mitokondriyal fonksiyonu destekler. HSP10 ise HSP60 ile birlikte çalışarak mitokondri içindeki proteinlerin doğru şekilde katlanmasını sağlar ve yanlış katlanmış proteinlerin birikimini azaltır. UPRmt aktivasyonu sırasında, HSP10 seviyeleri artarak mitokondriyal şaperon kapasitesini artırır ve proteostazın yeniden sağlanmasına yardımcı olur (48, 50). Çalışmamızda Trap1 ifadenmesi, OA'li grupta artmıştır ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. TRAP1'in aktivasyonunun daha çok oksidatif stresin aşırı olduğu durumlarda veya metabolik yeniden yapılanmaya ihtiyaç duyulduğunda arttığı bildirilmiştir. Trap1, çalışmamızda metformin ve IL1 β uygulanan OA'li grupta, sadece IL1 β uygulanan gruba göre daha az ifadenmektedir. Bunun nedeni ROS seviyelerinin Lonp1 veya SOD2 tarafından yeterince kontrol ediliyor olması olabilir. Bu durum Trap1 aktivasyon seviyelerinin yükselmemesine sebep olmuş olabilir. Bu sonuçlar da yine hücrelerin hayatta kalma yönünde çalıştıklarının bir göstergesidir. HSP10 ifadenmesi açısından ise gruplar arasında anlamlı fark yoktur. Bunun nedeni, Lonp1'in yüksek aktivitesinin mitokondride yanlış katlanmış proteinlerin etkili bir şekilde yıkımını sağlaması ve bu nedenle HSP10'un artışına gerek kalmaması olabilir. HSP10'un artış göstermemesi, mitokondriyal stresin protein katlanması üzerindeki etkisinin, Lonp1 tarafından yeterince düzenlendiğini ve şaperon gereksinimini azaltmış olabileceğini gösterebilir.

Metformin, osteoartrit patofizyolojisinde apoptoz, oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyon gibi temel süreçlerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. AMPK

yolunu aktive ederek pro-inflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β , TNF- α) neden olduğu katabolik etkileri baskılar ve tip II kolajen (Col2a1) gibi anabolik faktörlerin ekspresyonunu artırır (47). Metformin ayrıca, SIRT3-PINK1/Parkin yolu aracılığıyla mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stresin neden olduğu apoptozu azaltır ve mitofajiyi aktive ederek hasarlı mitokondrilerin elimine edilmesini sağlar (38). ER stresinin tetiklediği apoptozu baskılamak amacıyla AMPK-SIRT1 yolunu aktive eder ve böylece kıkırdak dokusunun korunmasına katkıda bulunur (35). Metformin uygulaması ile MMP3 ve MMP13 gibi katabolik faktörlerin ekspresyonu azalırken, Col2a1 ve Sox9 gibi anabolik faktörler artırılarak kıkırdak matriksinin korunması sağlanır (48). Biz de bu çalışmada metformin ön koşullaması sonrasında apoptozu caspase 3 ve Parp1 ekspresyonunun analizi ile değerlendirdik. Caspase 3, beklendiği üzere osteoartritli kondrositlerde sağlıklı kondrositlere oranla anlamlı şekilde daha fazla sentezlenmektedir. Caspase 3 ifadenmesi, IL1B ve metformin maruziyeti altındaki osteoartritlik hücrelerde kontrole göre anlamlı bir artış göstermemektedir. Bu da hücrelerin kontrolden farklı bir apoptoz eğilimi göstermediğinin göstergesidir. Yani hücreler hayatta kalma yönünde çalışmaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bir kere geliştikten sonra eklemde ilerleyici yıkımına neden olan ve henüz altın standart bir tedavi yöntemi bulunmayan, mevcut tedavilerin sadece ağrıyı ve enflamatuvar etkileri azalttığı, ileri dönemde ihtiyaç duyulan artroplastik gibi yüksek maliyetli tedaviler nedeniyle bireye ve topluma önemli yük getiren osteoartrit patofizyolojisinin tam olarak aydınlatılması ile hastalığı modifiye edici tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi mümkün olacaktır. Birçok dejeneratif hastalığın patogeneğinde merkezi rol oynayan mitokondrilerin OA patogeneindeki rolü ile ilişkili bilgiler her geçen gün artmaktadır. Mitohormetiz üzerine yapılan hem in-vivo hem de in-vitro çalışmalarda, mitohormetik adaptasyonların canlıların sağlığını ve yaşam süresini uzattığının saptanması, son yıllarda ilginin giderek bu alana kaymasına neden olmaktadır. Bununla birlikte mitohormetik adaptasyon mekanizmalarının hem sağlıklı kondrositlerdeki hem de osteoartritli kondrositlerde nasıl etkili olduğunu gösteren herhangi bir çalışma bugünkü bilgilerimize göre literatürde mevcut değildir. Bu çalışma ile güncel literatürde ilk defa mitohormetiz'in sağlıklı ve OA'li kondrositler üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Bu tez çalışmasının sonuçlarına göre

- Metformin uygulaması, sağlıklı ve OA'li insan kondrosit hücre kültürlerinde mitokondriyal ETZ kompleks 1 inhibisyonu yaparak kondrositleri ölümcül olmayan oksidatif strese sokmaktadır.
- Metformin ön koşullaması, IL-1 β ile indüklenen inflamatuvar mikro çevrede oksidatif strese karşı mitokondriye spesifik SOD2 sentezini arttırmakta ve ROS seviyelerini düşürmektedir.
- Metformin ön koşullaması sonrasında tetiklenen mitohormetik adaptasyon ortaya çıkan inflamatuvar stres karşısında, ER stres yanıtı ile koordineli olarak "Entegre Stres Yanıtı" üzerinden mtROS-PERK-eIF2 α -ATF4-FGF21 yolunu aktive etmektedir.
- Metformin ön koşullama sonrasında yeni oluşan inflamatuvar strese karşı OA'li kondrositler daha kuvvetle cevap vermekte ve hayatta kalma yönünde hareket etmektedirler.
- Metformin ön koşullaması, OA'li kondrositlerde mitohormetik yanıtı tetikleyerek ve bu kondrositleri ortaya çıkacak inflamatuvar streslere karşı dirençli hale getirerek hayatta kalmasını sağlar. Bu nedenle metformin eklemde başlamış olan OA'in ilerlemesini yavaşlatacak potansiyel bir terapötik ajandır. Bununla birlikte in vitro ve in vivo çalışmaların sonuçları

farklılık gösterebilir. Bu yüzden bu çalışmada elde edilen bulguların in vivo çalışmalarla değerlendirilmesi gerekmektedir.



KAYNAKLAR

1. Liu D, Cai ZJ, Yang YT, Lu WH, Pan LY, Xiao WF, et al. Mitochondrial quality control in cartilage damage and osteoarthritis: new insights and potential therapeutic targets. *Osteoarthritis Cartilage*. 2022;30(3):395-405.
2. Blanco FJ, Rego-Perez I. Mitochondria and mitophagy: biosensors for cartilage degradation and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2018;26(8):989-91.
3. Liu H, Li Z, Cao Y, Cui Y, Yang X, Meng Z, et al. Effect of chondrocyte mitochondrial dysfunction on cartilage degeneration: A possible pathway for osteoarthritis pathology at the subcellular level. *Mol Med Rep*. 2019;20(4):3308-16.
4. Xu L, Ma F, Huang J, Frankie Leung KL, Qin C, Lu WW, et al. Metformin Hydrochloride Encapsulation by Alginate Strontium Hydrogel for Cartilage Regeneration by Reliving Cellular Senescence. *Biomacromolecules*. 2021;22(2):671-80.
5. Jiang Y. Osteoarthritis year in review 2021: biology. *Osteoarthritis Cartilage*. 2022;30(2):207-15.
6. Xu L, Wu Z, He Y, Chen Z, Xu K, Yu W, et al. MFN2 contributes to metabolic disorders and inflammation in the aging of rat chondrocytes and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2020;28(8):1079-91.
7. Timblin GA, Tharp KM, Ford B, Winchester JM, Wang J, Zhu S, et al. Mitohormesis reprogrammes macrophage metabolism to enforce tolerance. *Nat Metab*. 2021;3(5):618-35.
8. Barcena C, Mayoral P, Quiros PM. Mitohormesis, an Antiaging Paradigm. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2018;340:35-77.
9. Kasai S, Shimizu S, Tataru Y, Mimura J, Itoh K. Regulation of Nrf2 by Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Physiology and Pathology. *Biomolecules*. 2020;10(2).
10. Kim KH, Jeong YT, Kim SH, Jung HS, Park KS, Lee HY, et al. Metformin-induced inhibition of the mitochondrial respiratory chain increases FGF21 expression via ATF4 activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;440(1):76-81.
11. Miller R, Malfait A. Biology of Articular Cartilage. In: Roy A, editor. *Orthopaedic Basic Science: Foundations of Clinical Practice*. 5 ed. Illinois: Wolters Kluwer - American Academy of Orthopaedic Surgeons; 2021. p. 315-36.
12. Miyaki S, Lotz MK. Extracellular vesicles in cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2018;30(1):129-35.

13. Chen Q, Gao Y. Synovium and Joint Biology. In: Roy A, editor. Orthopaedic Basic Science: Foundations of Clinical Practice. 5 ed. Illinois: Wolters Kluwer - American Academy of Orthopaedic Surgeons; 2021. p. 381-94.
14. Abramoff B, Caldera FE. Osteoarthritis: Pathology, Diagnosis, and Treatment Options. *Med Clin North Am.* 2020;104(2):293-311.
15. Courties A, Kouki I, Soliman N, Mathieu S, Sellam J. Osteoarthritis year in review 2024: Epidemiology and therapy. *Osteoarthritis Cartilage.* 2024;32(11):1397-404.
16. Collaborators GBDO. Global, regional, and national burden of osteoarthritis, 1990-2020 and projections to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet Rheumatol.* 2023;5(9):e508-e22.
17. Jenei-Lanzl Z, Zaucke F. Osteoarthritis year in review 2024: Biology. *Osteoarthritis Cartilage.* 2025;33(1):58-66.
18. Han S. Osteoarthritis year in review 2022: biology. *Osteoarthritis Cartilage.* 2022;30(12):1575-82.
19. Boer CG. Osteoarthritis year in review 2024: Genetics, genomics, and epigenetics. *Osteoarthritis Cartilage.* 2025;33(1):50-7.
20. Welhaven HD, Welfley AH, June RK. Osteoarthritis Year in Review 2024: Molecular biomarkers of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2025;33(1):67-87.
21. Roelofs AJ, De Bari C. Osteoarthritis year in review 2023: Biology. *Osteoarthritis Cartilage.* 2024;32(2):148-58.
22. Jiang W, Liu H, Wan R, Wu Y, Shi Z, Huang W. Mechanisms linking mitochondrial mechanotransduction and chondrocyte biology in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ageing Res Rev.* 2021;67:101315.
23. Bolduc JA, Collins JA, Loeser RF. Reactive oxygen species, aging and articular cartilage homeostasis. *Free Radic Biol Med.* 2019;132:73-82.
24. Farnaghi S, Prasadam I, Cai G, Friis T, Du Z, Crawford R, et al. Protective effects of mitochondria-targeted antioxidants and statins on cholesterol-induced osteoarthritis. *FASEB J.* 2017;31(1):356-67.
25. Delco ML, Bonnevie ED, Szeto HS, Bonassar LJ, Fortier LA. Mitoprotective therapy preserves chondrocyte viability and prevents cartilage degeneration in an ex vivo model of posttraumatic osteoarthritis. *J Orthop Res.* 2018.
26. Wang J, Li J, Song D, Ni J, Ding M, Huang J, et al. AMPK: implications in osteoarthritis and therapeutic targets. *Am J Transl Res.* 2020;12(12):7670-81.

27. Sun K, Jing X, Guo J, Yao X, Guo F. Mitophagy in degenerative joint diseases. *Autophagy*. 2021;17(9):2082-92.
28. Rego-Perez I, Duran-Sotuela A, Ramos-Louro P, Blanco FJ. Mitochondrial Genetics and Epigenetics in Osteoarthritis. *Front Genet*. 2019;10:1335.
29. Kim D, Song J, Jin EJ. BNIP3-Dependent Mitophagy via PGC1alpha Promotes Cartilage Degradation. *Cells*. 2021;10(7).
30. Blanco FJ, Fernandez-Moreno M. Mitochondrial biogenesis: a potential therapeutic target for osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2020;28(8):1003-6.
31. Yalçın Y, Ataç B. Mitokondri ve Peroksizom. In: Sunguroğlu A, Erdem Yurter H, Ataç B, Aydos S, editors. *İnsan Moleküler Biyolojisi*. 1 ed. Ankara: Hipokrat Yayıncılık; 2023. p. 237-58.
32. Ansari MY, Khan NM, Ahmad I, Haqqi TM. Parkin clearance of dysfunctional mitochondria regulates ROS levels and increases survival of human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2018;26(8):1087-97.
33. van den Bosch MHJ. Osteoarthritis year in review 2020: biology. *Osteoarthritis Cartilage*. 2021;29(2):143-50.
34. Cheng YW, Liu J, Finkel T. Mitohormesis. *Cell Metab*. 2023;35(11):1872-86.
35. Fischer F, Ristow M. Endogenous metabolites promote stress resistance through induction of mitohormesis. *EMBO Rep*. 2020;21(5):e50340.
36. Musci RV, Hamilton KL, Linden MA. Exercise-Induced Mitohormesis for the Maintenance of Skeletal Muscle and Healthspan Extension. *Sports (Basel)*. 2019;7(7).
37. Zhu X, Wei Y, Yang B, Yin X, Guo X. The mitohormetic response as part of the cytoprotection mechanism of berberine : Berberine induces mitohormesis and mechanisms. *Mol Med*. 2020;26(1):10.
38. Barzegari A, Aaboulhassanzadeh S, Landon R, Gueguen V, Meddahi-Pelle A, Parvizpour S, et al. Mitohormesis and mitochondrial dynamics in the regulation of stem cell fate. *J Cell Physiol*. 2022;237(9):3435-48.
39. Zhu L, Zhou Q, He L, Chen L. Mitochondrial unfolded protein response: An emerging pathway in human diseases. *Free Radic Biol Med*. 2021;163:125-34.
40. Kenny TC, Gomez ML, Germain D. Mitohormesis, UPR(mt), and the Complexity of Mitochondrial DNA Landscapes in Cancer. *Cancer Res*. 2019;79(24):6057-66.
41. Güner G. Rat Pankreatik Beta Hücre Hattında (INS-1E) Metformin Ön Koşullamasının Er Stres Belirteçleri Üzerindeki Etkisi. Ankara: Başkent Üniversitesi; 2023.

42. Li J, Zhang B, Liu WX, Lu K, Pan H, Wang T, et al. Metformin limits osteoarthritis development and progression through activation of AMPK signalling. *Ann Rheum Dis*. 2020;79(5):635-45.
43. Wang C, Yang Y, Zhang Y, Liu J, Yao Z, Zhang C. Protective effects of metformin against osteoarthritis through upregulation of SIRT3-mediated PINK1/Parkin-dependent mitophagy in primary chondrocytes. *Biosci Trends*. 2019;12(6):605-12.
44. Park J, Joe Y, Ryter SW, Surh YJ, Chung HT. Similarities and Distinctions in the Effects of Metformin and Carbon Monoxide in Immunometabolism. *Mol Cells*. 2019;42(4):292-300.
45. Murata M, Yudoh K, Nakamura H, Kato T, Inoue K, Chiba J, et al. Distinct signaling pathways are involved in hypoxia- and IL-1-induced VEGF expression in human articular chondrocytes. *J Orthop Res*. 2006;24(7):1544-54.
46. Pedersen AKN, Gormsen LC, Nielsen S, Jessen N, Bjerre M. Metformin Improves the Prerequisites for FGF21 Signaling in Patients With Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2024;109(2):e552-e61.
47. Da W, Chen Q, Shen B. The current insights of mitochondrial hormesis in the occurrence and treatment of bone and cartilage degeneration. *Biol Res*. 2024;57(1):37.
48. Torres AK, Fleischhart V, Inestrosa NC. Mitochondrial unfolded protein response (UPR(mt)): what we know thus far. *Front Cell Dev Biol*. 2024;12:1405393.
49. Hughes A, Oxford AE, Tawara K, Jorcyk CL, Oxford JT. Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response in Cartilage Pathophysiology; Contributing Factors to Apoptosis and Osteoarthritis. *Int J Mol Sci*. 2017;18(3).
50. Shpilka T, Haynes CM. The mitochondrial UPR: mechanisms, physiological functions and implications in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(2):109-20.