2020

DOKTORA TEZİ

İlkay PİŞKİN



T.C.

ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LncRNA PART1 SNP (rs8176070) POLİMORFİZMİNİN TÜRKİYE'DEKİ DİZ OSTEOARTRİTLİ HASTA POPÜLASYONUNDA DNA SEKANS ANALİZİ İLE ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

İlkay PİŞKİN

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI

Ankara, 2020

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LncRNA PART1 SNP (rs8176070) POLİMORFİZMİNİN TÜRKİYE'DEKİ DİZ OSTEOARTRİTLİ HASTA POPÜLASYONUNDA DNA SEKANS ANALİZİ İLE ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

İlkay PİŞKİN

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI

Ankara, 2020

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LncRNA PART1 SNP (rs8176070) Polimorfizminin Türkiye'deki Diz Osteoartritli Hasta Popülasyonunda DNA Sekans Analizi ile Araştırılması

İlkay PİŞKİN

Doktora Tezi

16.11.2020

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet Çevik TUFAN

Jüri Üyeleri
Prof. Dr. Ahmet Çevik TUFAN
Prof. Dr. Sevim AYDIN
Prof. Dr. Ayten TÜRKKANI
Prof. Dr. Sevil ÇAYLI
Dr. Öğr. Üyesi Hilal NAKKAŞ

Okuduğumuz ve savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Doktora derecesi için gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Prof. Dr. Seyfullah Oktay ARSLAN
Enstitü Müdürü

Bu tezin Doktora derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.
16.11.2020

İlkay PİŞKİN

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleri ile bana yardımcı olan, ilgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bilgi birikimiyle birçok problemi çözebilme ve bilimsel düşünebilme yeteneği kazandıran tez danışmanım, değerli Hocam Prof. Dr. Sayın Ahmet Çevik Tufan'a sonsuz teşekkür ederim.

Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi ve Ankara Şehir Hastanesi Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği'nden osteoartrit hasta olgularının toplanmasında bizlere yardımlarını esirgemeyen Hocam Prof. Dr. Sayın Ahmet Fırat'a çok teşekkür ederim.

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda bilgi ve tecrübeleriyle her zaman bana destek olan Prof. Dr. Sayın Habibe Meltem Özgüner'e, Prof. Dr. Sayın Sevil Çaylı'ya, Dr. Öğr. Üyesi Sayın Hilal Nakkaş'a, Dr. Öğr. Üyesi Sayın Radwan Abu-Issa'a ve Dr. Öğr. Üyesi Sayın Bahar Kartal'a çok teşekkür ederim.

Tezimde yardımlarını esirgemeyen değerli Hocalarım Gazi Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Sayın Çiğdem Elmas'a, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Sayın Sevim Aydın'a ve Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Sayın Ayten Türkkanı'ya çok teşekkür ederim.

Bölümde her zaman yanımda olan arkadaşım Dr. Ebru Alimoğulları'na, tezimin deneysel aşamalarında yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşım Uzm. Bio. Gülben Akcan'a ve bölümdeki tüm arkadaşlarıma çok teşekkür ederim. Tezimin moleküler biyolojik teknikler kullandığım deneylerinde yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve her zaman bana yardımcı olan arkadaşım Arş. Gör. Emine Terzi'ye ve diğer tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Tıbbi Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve tezimin istatistiksel analizlerini yapan arkadaşım Arş. Gör. Afra Alkan'a çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her zaman desteklerini hissettiğim benim için çok değerli sevgili annem Nahide'ye, sevgili babam Erhan'a ve sevgili kardeşim İlker'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Çalışmalarım süresince her zaman yanımda olan hayatımı paylaştığım çok sevgili eşim Emre'ye, biricik kızım İlkem'e en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**
ABSTRACT ..... **vi**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **viii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xii**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **xiv**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL BİLGİLER **4**
2.1. Kıkırdak Dokunun Genel Özellikleri 4
2.1.1. Kıkırdak Doku Hücreleri 5
2.1.2. Kıkırdak Doku Matriks Elemanları 7
2.2. Kıkırdak Doku Tipleri 11
2.2.1. Hiyalin Kıkırdak 11
2.2.2. Elastik Kıkırdak 13
2.2.3. Fibröz Kıkırdak 14
2.3. Kıkırdak Dokusunun Oluşması (Kondrogenez) ve Histolojik Gelişmesi (Histogenezi) 15
2.3.1 Embriyoda Kondrogenez 15
2.3.2. Kıkırdak Dokunun Histolojik Gelişmesi (Histogenezi) 18
2.3.3. Kıkırdak Dokunun Dejenerasyonu 20
2.4. Uzun Kemiklerde Epifiz (Büyüme) Plağı ve Eklem Kıkırdağı 22
2.4.1. Kıkırdak Doku Hastalıkları 22
2.5. Kıkırdak Dokunun Tamiri 23
2.6. Osteoartrit ile İlgili Genel Bilgiler 24
2.6.1. Osteoartrit 24
2.6.2. Osteoartritin Epidemiyolojisi 26
2.6.3. Osteoartritin Etiyolojisi 26
2.6.4. Osteoartritin Prevalansı 27

2.6.5. Osteoartritin Histolojik Özellikleri 27
2.6.6. Osteoartritin Patofizyolojisi 28
2.6.7. Osteoartritin Semptomları 29
2.6.8. Risk Faktörleri 30
2.6.9. Günümüzde Farmakolojik Ajanlar ile Osteoartrit Tedavisi 30
2.6.10. OA Patogenezinin Epigenetik Düzenlenmesi 32
2.7. Uzun Kodlayıcı Olmayan RNA'lar (LncRNA'lar) 33
2.7.1. LncRNA'lerin Biyolojik İşlevleri 36
2.7.2. LncRNA Uzunluğu 39
2.7.3. Genomdaki Lokalizasyonu 39
2.7.4. LncRNA'ların Sınıflandırılması 40
2.7.5. Osteoartritte Uzun Kodlanmayan RNA'lar 40
2.7.6. LncRNA PART1 44
2.8. Hipotez ve Çalışmanın Amacı 45
3. MATERYAL VE YÖNTEM 47
3.1. Etik Kurul Onayı 47
3.2. Katılımcıların Belirlenmesi ve Kan Örneklerinin Elde Edilmesi 47
3.3. Olguların Çalışmaya Dahil Edilmesi 47
3.3.1. Diz OA Tanı Kriterleri 47
3.3.2. WOMAC OA İndeksinin Hesaplanması 48
3.4. Deneysel Yaklaşım 55
3.5. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar 56
3.6. Periferik Kandan Genomik DNA İzolasyonu 57
3.6.1. Genomik DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrol Edilmesi 58
3.7. Nanodrop ile DNA Miktarı Ölçülmesi 60
3.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) 60
3.8.1. LncRNA PART1'e ait PCR Reaksiyon Koşulları 60

3.8.2. LncRNA PART1 SNP Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması 63
3.8.3. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrolü 64
3.9. DNA Sekans Analizi 64
3.10. Gen Bölgelerindeki Polimorfizmlerin Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ile Belirlenmesi 65
3.11. İstatistiksel Analizler 66
4. BULGULAR 67
4.1. PCR Sonuçları 67
4.2. DNA Sekans Sonuçları 68
4.3. RFLP Sonuçları 71
4.4. Sonuçların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi 73
5. TARTIŞMA 75
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 81
7. KAYNAKLAR 82
8. EKLER 95
EK-1. Etik Kurul izni 95
EK-2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu 96
EK-3. WOMAC Anketi 98
EK-4. Tez ile ilgili yayınlanmış makale 99
EK-5. Özgeçmiş 100

ÖZET

LncRNA PART1 SNP (rs8176070) Polimorfizminin Türkiye'deki Diz Osteoartritli Hasta Popülasyonunda DNA Sekans Analizi ile Araştırılması

Osteoartrit (OA); kıkırdak degredasyonu, sinoviyal inflamasyon, subkondral kemik yeniden modellenmesi ve osteofitlerin oluşumuna yol açan kronik bir hastalıktır. Hastanın yaşam kalitesini önemli ölçüde bozan ağrı ve eklem fonksiyon kaybına yol açan, subkondral kemik ve eklem kıkırdağının ilerleyici degredasyonu ile ilişkili dejeneratif bir hastalıktır. Diz OA; diz ekleminin 3 kompartmanını (medial, lateral ve patellofemoral eklem) etkilemektedir ve genellikle 10-15 yıl içinde yavaş ilerleyerek günlük yaşam aktivitelerini bozmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, kıkırdak dokusunda ve kondrositlerde kodlanmayan RNA (lncRNA) *PART1* ifadesi tespit edilmiştir. *PART1*'in miR-373-3p/SOX4 aksisini düzenleyerek OA gelişimini uyardığı belirtilmiştir. LncRNA PART1'in insana ait 5. kromozomun q12 kolunda lokalize olduğu gösterilmiştir. OA ile ilişkisi olduğu düşünülen çok sayıda tek nükleotid polimorfizm (SNP) tanımlanmıştır. LncRNA PART1'de görülen SNP'nin (rs8176070), Türkiye'deki diz OA popülasyonunda oluşturduğu riski test etmek için DNA sekans dizileme yöntemi kullanılarak analiz edilmesi çalışmamızın amacını oluşturmaktadır.

Çalışmamız için etik kurul izni alınarak, 102 primer OA hastasından oluşan çalışma grubu ve 81 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubu çalışmamıza dahil edilmiştir. Tüm katılımcıların gönüllü onamları alınarak, fiziksel ve radyolojik muayeneleri yapılmıştır. Diz OA'i belirlenen bireylerin Kellgren-Lawrence ölçeğine göre dereceleri (grade 1-4) belirlenip Western Ontario and McMaster Universities Index (WOMAC) anketleri yapılmıştır. Her katılımcıdan 5 ml periferal venöz kan alınmış ve genomik DNA izolasyonları ticari kitler ile yapılmıştır. Saflaştırılan genomik DNA'nın spektrofotometrik absorbansları ölçülerek konsantrasyonları hesaplanmış ve 1 mikrogram (µg) olacak şekilde standart polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) için kullanılmıştır. *PART1* DNA dizisi için primerler dizayn edilmiştir ve PCR koşulları optimize edilmiştir. PCR reaksiyonu sonucu 508 baz çift (bç)'lik ürün elde edilmiştir. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) yöntemi ile BseYI

restriksiyon enzimi SNP (rs8176070) polimorfizminin olduğu bölgede tanıma dizisine (5'-C▼CCAGC-3') göre enzim kesim işlemini gerçekleştirmiştir. DNA sekans analizi polimorfizm çalışmalarında için altın standart durumunda olduğu için çalışmamızdaki tüm bireylerin DNA sekans analizleri gerçekleştirilmiştir.

Çalışmaya alınan bireylerin yaş ortancası (ÇAG) OA grubunda 60.5 yıl (ÇAG: 53.8-67.0), kontrol grubunda 46.0 yıl (ÇAG: 40.5-51.0) olarak elde edilmiştir. OA grubunun %75.5'inin (n=77), kontrol grubunun %55.6'sının (n=45) kadın olduğu görülmüştür. İki grup karşılaştırıldığında, OA grubu hastaların yaş ortalaması ve cinsiyetinin kadın olma oranının kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Benzer şekilde hasta grubunda Beden Kitle İndeksi (BKİ) ve WOMAC puanı kontrol grubuna göre daha yüksek elde edilmiştir ($p\leq0.001$). Hasta grubunun Kellgren-Lawrence derecesine göre dağılımı demografik veri tablosunda (Tablo 4.1) verilmiştir. Yabanıl tip genotip (CC) "bb", heterozigot polimorfik genotip (CN) "Bb" ve homozigot polimorfik genotip (NN) "BB" olarak kodlanmıştır. OA ve kontrol grubunda genotip dağılımı incelendiğinde, OA grubunun %13.8'i (n=14) ile kontrol grubunun %13.6'sında (n=11) homozigot polimorfik (NN) "BB" genotip, OA grubunun %43.1'i (n=44) ile kontrol grubunun %45.7'sinde (n=37) heterozigot polimorfik (CN) "Bb" genotipi ve OA grubunun %43.1'i (n=44) ile kontrol grubunun %40.7'sinde (n=33) yabanıl tip (CC) "bb" genotip tespit edilmiştir (Tablo 4.2). Sonuç olarak BB veya Bb genotipleri için odds oranları istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Gruplarda allel dağılımları benzerdir($p=0.875$).

Literatürde, SNP (rs8176070) ile OA arasındaki olası ilişkiyi analiz etmiş mevcut popülasyon çalışmalarından bir kısmı pozitif ilişki tarif ederken, bir kısmı ise negatif yönde sonuç bulmuştur. Bizim çalışmamızda da, Türk diz OA'li olgularda lncRNA PART1 SNP (rs8176070) ile diz OA'i arasında anlamlı bir ilişki olmadığı gösterilmiştir. SNP(rs8176070) ile OA ilişkisini analiz eden ileri popülasyon çalışmalarına ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: LncRNA PART1, osteoartrit, SNP (rs8176070)

ABSTRACT

Investigation of LncRNA PART1 SNP (rs8176070) Polymorphism In Turkey Knee Osteoartritis Patient Population By DNA Sequence Analysis

Osteoarthritis (OA); is a chronic disease that causes cartilage degradation, synovial inflammation, subchondral bone remodeling, and osteophyte formation. It is a degenerative disease associated with the progressive degradation of the subchondral bone and joint cartilage, leading to pain and loss of joint function that significantly impairs the patient's quality of life. Knee OA affects the 3 compartments of the knee joint (medial, lateral and patellofemoral joint) and usually progresses slowly within 10-15 years and disrupts daily life activities.

In recent studies, non-coding RNA (lncRNA) *PART1* expression has been detected in cartilage tissue and chondrocytes. It is indicated that *PART1* stimulates OA development by regulating the miR-373-3p / SOX4 axis. LncRNA PART1 has been shown to be localized in the q12 arm of human chromosome 5. Numerous single nucleotide polymorphisms (SNPs) thought to be associated with OA have been identified. The aim of our study is to analyze SNP (rs8176070) seen in lncRNA PART1 using DNA sequencing method to test the risk it creates for the Turkey knee OA population.

By obtaining the permission of the ethics committee for our study, the study group consisting of 102 primary OA patients and the control group consisting of 81 healthy individuals were included in our study. Physical and radiological examinations were performed by obtaining the voluntary consent of all participants. Individuals with knee OA were determined according to the Kellgren-Lawrence scale (grade 1-4) and Western Ontario and McMaster Universities Index (WOMAC) surveys were conducted. 5 ml of peripheral venous blood was taken from each participant and genomic DNA isolations were made with commercial kits. Spectrophotometric absorbance of purified genomic DNA was measured and concentrations were calculated and used for standard polymerase chain reaction (PCR) as 1 microgram (µg). Primers for the *PART1* DNA sequence have been designed and the PCR conditions have been optimized. As a result of the PCR reaction, the product of 508

base pairs (bp) was obtained. By the Restriction fragment length polymorphism (RFLP) method, BseYI performed the enzyme cut process according to the recognition sequence (5'-C▼CCAGC-3 ') in the region of the restriction enzyme SNP (rs8176070) polymorphism. For DNA sequence analysis is the gold standard for polymorphism studies, DNA sequence analyzes of all individuals in our study has been carried out.

The median age of the subjects included in the study was 60.5 years (MP: 53.8-67.0) in the OA group, and 46.0 years (MP: 40.5-51.0) in the control group. It was observed that 75.5% (n = 77) of the OA group and 55.6% (n = 45) of the control group were women. When the two groups were compared, it was determined that the mean age and women gender of the OA group patients were significantly higher than the control group ($p < 0.05$). Similarly, Body Mass Index (BMI) and WOMAC score were higher in the patient group compared to the control group ($p \leq 0.001$). The distribution of the patient group according to the Kellgren-Lawrence degree is given in the demographic data table (Table 4.1). The wild type genotype (CC) is encoded as "bb", heterozygous polymorphic genotype (CN) "Bb" and homozygous polymorphic genotype (NN) "BB". When the genotype distribution in the OA and control groups was examined, 13.8% (n = 14) of the OA group and 13.6% (n = 11) of the control group were homozygous polymorphic genotype (NN) "BB", 43.1% (n = 44) of the OA group and the control group, 45.7% (n = 37) of the heterozygous polymorphic genotype (CN) "Bb" and 43.1% (n = 44) of the OA group and 40.7% (n = 33) of the control group, wild type genotype (CC) "bb" was detected (Table 4.2). As a result, odds ratios were not found to be statistically significant for BB or Bb genotypes ($p > 0.05$). Allele distributions in the groups are similar ($p = 0.875$).

In the literature, some of the existing population studies that analyzed the possible relationship between SNP (rs8176070) and OA described a positive relationship, while some found a negative result. In our study, it was shown that there was no significant relationship between the lncRNA PART1 SNP (rs8176070) and knee OA in cases with Turkish knee OA. Further population studies analyzing the relationship between SNP (rs8176070) and OA are needed.

Keywords: LncRNA PART1, osteoarthritis, SNP (rs8176070)

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

^{o}C	: Santigrat Derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
ACAN	: Aggrecan Geni
ACR	: American College of Rheumatology
AGC-1	: Agrekan-1
Anchorin CII	: Kıkırdak Anneksin-V
Bcl-2	: Anti-apoptotik Gen
BKI	: Beden Kitle İndeksi
BLAST	: Basic Local Alignment Search
BMP	: Kemik Morfogenetik Proteini
BMP-2	: Kemik Morfogenetik Protein-2
ÇAG	: Çalışmaya Alınan Olguların Yaş Ortancası
Cart-1	: Cartilage Paired-Class Homeoprotein 1
ceRNA	: Rekabetçi Endojen RNA
Ck-erg	: Chicken- ETS-related Gene
CMP1	: Sitidin monofosfat-1
COL1A1	: Kollajen Tip I Alfa 1 Zinciri
COL2A1	: Kollajen Tip II Alfa 1 Zinciri
COL9A1	: Kollajen Tip 9 Alfa 1 Zinciri
COL11A1	: Kollajen XI Alfa 1 Zinciri
COL11A2	: Kollajen Tip11 Alfa 2 Zinciri
COX-2	: Siklooksijenaz-2
CRC	: C reaktif Protein
dsRNA	: Çift iplikli RNA
ECM	: Ekstraselüler Matriks
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü

Endo-siRNA	: Endojen Küçük Müdahaleci RNA'lar
EM	: Elektron Mikroskopu
Gla	:Vitamin K-dependent Carboxylation/Gamma-Carboxyglutamic (GLA) Domain
GWAS	: Tüm Genomu Kapsayan Çalışmalar
GDF5	: Growth Differentiation Factor 5
FRZB	: Secreted Frizzled-related Protein 3
FGFR3	: Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptör-3
FGFR1	: Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptör-1
GAG	: Glikozaminoglikan
GER	: Granüllü Endoplazmik Retikulum
HA	: Hiyaluronik Asit
Hox	: Homeobox Geni
IL-1	: İnterlökin-1
IL-2	: İnterlökin-2
IL-6	: İnterlökin-6
IL-8	: İnterlökin-8
IL-1R	: İnterlökin-1 Reseptörü
IGF 1	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
IHH	: Indian Hedgehog
KOA	: Knee Osteoarthritis
LncRNA	: Uzun Kodlanmayan RNA
LncRNA-ATB	: LncRNA Activated By TGF-Beta
LncRNA ANRIL	: Antisense non-coding RNA in the INK4 locus
LncRNA CASC2	: Cancer Susceptibility 2
LncRNA-CIR	: LncRNA Cartilage Injury-related
LncRNA-DANCR	: Differentiation Antagonizing Non-Protein Coding RNA
LncRNA-DILC	: LncRNA Downregulated in Liver Cancer Stem Cells
LncRNA-KLF3-AS1	: KLF3 Antisense RNA 1
LncRNA-miR4435-2HG	: MIR4435-2 Host Gene

LncRNA-MALAT-1	: LncRNA Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1
LncRNA MFI2-AS1	: LncRNA MELTF Antisense RNA 1
LncRNA-p21	: Tumor Protein P53 Pathway Corepressor 1
LncRNA PACER	: Chondrocyte inflammation-associated long non-coding RNA (lncRNA)
LncRNA-PVT1	: Pvt1 Oncogene
LncRNA-TUG1	: Taurine Up-Regulated 1
LncRNA XIST	: X Inactive Specific Transcript
MATN	: Matrilin
MATN3	: Matrilin-3
MED	: Multiple Epifizeal Displazi
MEG3	: Maternally Expressed Gene 3
miRNA	: Mikro RNA
MMP	: Matriks Metallopreoteinaz
MSC	: Mezenkimal Stromal Hücre
Msx-1	: Msh Homeobox 1
Msx-2	: Msh Homeobox 2
N-CAM	: Hücre Adezyon Molekülü
NCBI	: National Center of Biotechnology Information
ncRNA	: Non-coding RNA
NSAID	: Non-steroid Anti İnflamatuvar İlaçlar
OA	: Osteoartrit
OARSI	: Osteoarthritis Research Society International
OSCC	: Oral Skuamoz Hücre Karsinomu
p53	: Tümör Protein 53 (TP53)
p63	: Transformation-Related Protein 63
PART1	: Prostate Androgen-Regulated Transcript 1
PAS	: Periyodik Asit Schiff
Pax-1	: Paired Box 1
PCA	: Prostat Karsinoma
PCR	: Polimeraz Chain Reaction
piRNA	: Piwi Etkileşimli RNA
PTH-RP	: Paratiroid Hormon İlişkili Peptid

PVT1	: Plazmasitom Varyant Translokasyonu 1
RA	: Romatoid Artrit
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
siRNA	: Small Interfering RNA
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism
SNP6	: Single Nucleotide Polymorphism 6
SOX-9	: SRY-box transkription factor-9
T3	: Triiodotironin Hormonu
TGF-β1	: Transforming Growth Factor-Beta 1
TGFBR2	: Transforming Growth Factor-Beta receptor-2
TIMP	: Metallopeptidaz İnhibitörü
TIMP3	: MMP-9 İnhibitörü
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktör-Alfa
UCSC	: Santa Cruz California University
WOMAC	: Western Ontario ve McMaster University Osteoarthritis Index
XİST	: X-inaktif Spesifik Transkript
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
vWFA	: Von Willebrand Faktör A Domain
VDR	: Vitamin D Reseptörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kıkırdak tiplerine ait ışık mikroskobik fotomikrograflar..... 6
Şekil 2.2. Kondrogenez sürecinin şematik gösterimi. 16
Şekil 2.3. Kıkırdak histogenez çeşitlerinin şematik gösterimi 19
Şekil 2.4. Kondrogenez ve kıkırdak olgunlaşması üzerine etkili faktörlerin şematik olarak gösterimi 21
Şekil 2.5. (A) Artiküler kıkırdağın diyagramı (B) fotomikrografı 22
Şekil 2.6. OA genel eklem patolojisi. 25
Şekil 2.7. OA'nın etiyolojisi. 26
Şekil 2.8. Kıkırdak dokusunun histolojik yapısı. 27
Şekil 2.9. OARSI tarafından önerilen diz eklemi OA'nin cerrahi olmayan tedavi yaklaşımları ve kullanılması önerilen farmakolojik ajanlar 31
Şekil 2.10. Osteoartritin epigenetik düzenlenmesi 32
Şekil 2.11. LncRNA'ların biyolojik süreçlerdeki çeşitli işlevleri 34
Şekil 2.12. LncRNA'ların biyogenezi ve sınıflandırılması 37
Şekil 3.1. Osteoartrit hasta olgularında Kellgren-Lawrence sınıflaması. 49
Şekil 3.2. LncRNA PART1 geni SNP (RS8176070) mutasyonunu içeren gen dizisi63
Şekil 4.1. LncRNA PART1 geni SNP (rs8176070) polimorfizminin bulunduğu K67-K73 kontrol grubu olgulara ait 508 bç'lik bölgenin aplifikasyon sonrası agaroz jelde görüntülenmesi.....67
Şekil 4.2. LncRNA PART1 geni SNP(rs8176070) polimorfizminin bulunduğu OA5-OA14 numaralı OA hasta bireylere ait 508 bç'lik bölgenin amplifikasyon sonrası agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi.. 67
Şekil 4.3. A) Homozigot BB genotipe sahip bireyin ileri (forward) okuma yönündeki DNA sekans analiz görüntüsü B) Homozigot BB genotipe sahip bireyin geri (reverse) okuma yönündeki DNA sekans analiz görüntüsü 68
Şekil 4.4. A) Heterozigot Bb genotipe sahip bireyin ileri (forward) okuma yönündeki DNA sekans analiz görüntüsü B) Heterozigot Bb genotipe sahip bireyin geri (reverse) okuma yönündeki DNA sekans analiz görüntüsü 69
Şekil 4.5. A) Homozigot bb genotipe sahip bireyin ileri (forward) okuma yönündeki DNA sekans analiz görüntüsü B) Homozigot bb genotipe sahip bireyin geri (reverse) okuma yönündeki DNA sekans analiz görüntüsü 70

Şekil 4.6. LncRNA PART1 gen bölgesinin BseY I enzimi ile kesimi sonucu K9, K1 ve K43 numaralı sağlıklı bireylerden elde edilen RFLP ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....72
Şekil 4.7. LncRNA PART1 gen bölgesinin BseY I enzimi ile kesimi sonucu OA13, OA14, OA15, OA39 ve OA42 numaralı diz OA hasta olgularından elde edilen RFLP ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....72

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Kıkırdak dokuda bulunan başlıca kollajen tipleri ve ana görevleri. 8
Tablo 2.2. Kıkırdak tipleri, özellikleri ve lokalizasyonları.....10
Tablo 2.3. Kıkırdak doku üzerine vitamin ve hormonların etkileri 18
Tablo 2.4. OA'nın histolojik özellikleri.....28
Tablo 2.5. LncRNA'ların OA üzerine etki mekanizmaları 43
Tablo 3.1. Ahlbäck ve Kellgren-Lawrence evrelemelerinin karşılaştırmalı tablosu 49
Tablo 3.2. Osteoartrit grubuna ait veriler 50
Tablo 3.3. Kontrol grubuna ait veriler.....53
Tablo 3.4. Tez çalışmamızda kullanılan kimyasal malzemeler, sarflar ve cihazlar...56
Tablo 3.5. Tez çalışmamızda kullanılan moleküler kitler 57
Tablo 3.6. LncRNA PART1 gen bölgesine ait PCR reaksiyonu için gerekenler listesi (Thermoscientific PCR 2x master karışımına göre).....61
Tablo 3.7. LncRNA PART1 gen bölgesine ait PCR reaksiyonu için gerekenler listesi (Solis BioDyne 5x PCR master karışımına göre).....61
Tablo 3.8. LncRNA PART1 genine ait PCR reaksiyon koşulları.....62
Tablo 3.9. DNA sekans analizi için örnek hazırlanması 64
Tablo 3.10. RFLP için reaksiyon koşulları.....65
Tablo 4.1. Hasta ve kontrol grubunda demografik ve klinik özelliklerin dağılımı....73
Tablo 4.2. Kontrol ve OA gruplarındaki genotip ve allel dağılımı.....74

1. GİRİŞ

Primer osteoartrit (OA), Amerika ve dünya çapında kısıtlılığa yol açan yıpranma ve yaş ile ilişkili artrit olarak bilinen, hastanın yaşam kalitesini önemli ölçüde bozan ağrı ve eklem fonksiyon kaybı ile seyreden, kıkırdak degredasyonu, sinoviyal inflamasyon, subkondral kemik yeniden modellenmesi ve osteofitlerin oluşumuna yol açan dejeneratif bir eklem hastalığı olarak tanımlanmıştır (1, 2, 3, 4).

OA hastalığının başlangıç olayları tam olarak anlaşılamamıştır. Genetik faktörler, primer OA geliştirme riskini etkilemektedir. Tüm genomu kapsayan çalışmalar (GWAS), OA hastalığına duyarlılık ile kollajen ile ilişkili genler (COL1A1, COL2A1, COL9A1 ve COL11A2), IL-1R, TGF-β1, CMP1, TIMP3, IGF1, BMP, VDR, AGC1, FRZB, GDF5 ve COX-2 gibi proteinleri kodlayan genler arasında olası bir ilişki tespit etmeye çalışmışlardır (2).

Matrilinler (MATN'ler), matrilin 1'den 4'e kadar en az dört ilgili proteinden oluşan bir oligomerik ekstrasellüler matriks (ECM) protein ailesidir. MATN'ler, von Willebrand faktör A (vWFA) domainleri, epidermal büyüme faktörü (EGF) benzeri domaini ve kıvrımlı-kıvrımlı domainler dahil olmak üzere ortak yapısal motifler içerir (5).

Matrilin-3 (*MATN3*), yalnızca bir vWFA alanı, dört EGF benzeri alan ve bir C-terminal kıvrımlı-bobin alanından oluşan, matrilin ailesinin en az karmaşık üyesidir. *MATN3* gen ve protein ifadesindeki artışın, OA hastalarında doku hasarının derecesi ile ilişkili olduğu düşünülmüştür (5). Bu bulgular, *MATN3* ifade regülasyonunun, kıkırdak ECM mikro ortamı için gerekli olduğunu göstermektedir (5).

Gu ve ark. (5) ve Diab ve ark. (2) tarafından yayınlanan araştırma makaleleri, sırasıyla Çin ve Mısır popülasyonlarında primer diz osteoartriti olan hastalarda *MATN3* polimorfizminin klinik önemini incelemişlerdir. Her iki çalışma da, *MATN3*'e ait olduğu düşünülen ve SNP6 olarak tanımlanan spesifik bir tek nükleotid

polimorfizminin (SNP) (rs8176070) OA ile ilişkili olduğunu ve diz OA riskini ve hastalığın klinik ağırlık derecesini yansıtabileceğini göstermiştir. Bu çalışmalarda *MATN3*'e ait olduğu savunulan SNP6 ilk olarak 2003 yılında Stefánsson ve ark. tarafından el OA'i için genom taraması yoluyla tanımlanmıştır (6). Literatürde yer alan ve sırasıyla 2006 ve 2007 yıllarında yayınlanan iki diğer çalışma (7, 8), *MATN3*'e ait olan SNP6 ile el OA'i arasında benzer bir ilişki olduğunu göstermiş, ancak SNP6'yı diz OA ile ilişkilendirememiştir.

MATN3'e ait olduğu düşünülen SNP6 ile ilişkili bu farklı sonuçlardan yola çıkarak, Türk popülasyonunda primer diz OA'li hastalarda önerilen *MATN3* polimorfizminin önemini araştırmak için bir çalışma planlanmıştır. Planlanan bu çalışmada, Gu ve ark. (5) ve Diab ve ark. (2) tarafından yayınlanan araştırma makalelerinde yer alan PCR-RFLP yöntemine dayalı yaklaşım seçilmiştir. Bu yaklaşım ile özetle, MATN3'e özgü PCR'ın 501 bç ürününün BseYI enzimi ile muamelesi sonucunda: yabanıl tip genotip 149 ve 352 bç'den oluşan bir çift bant oluşturmaktadır, heterozigotlar 501, 149 ve 352 bç'den oluşan üç bant üretmektedir, ve homozigotlar 501 bç'den oluşan sadece tek bir bant üretmektedir.

Laboratuvarımızda planlanan bu çalışma öncesinde yukarıda açıklanan her iki çalışmada da (2, 5) kullanılan primer çifti (ileri primer: 5′-GGACAGGATCCCACAAAAAG-3′ ve ters primer: 5′-GAAAGAGGGCTACAACAGG-3 ′), Standart Nükleotid BLAST araştırması yoluyla yeniden incelenmiştir (https: // blast. ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Bu çalışmalarda iddia edilenlerin aksine, bu primerler, kromozom 2'nin kısa kolunda, 2p24-p23 bölgesinde yer aldığı bilinen *MATN3* (2) ile eşleşmemiştir. Bunun yerine, kromozom 5'teki dizilerle eşleşmişlerdir (erişim numaraları AC022428.7 ve AC016591.6). Ek olarak, ayrıntılı olarak araştırıldığında, bilinen *MATN3* dizisinin (erişim numarası: NM_002381.5, GeneID: 4148) bir BseYI enzim kesim dizisi içermediği tespit edilmiştir.

Bu primerler ayrıca UCSC genom tarayıcısının UCSC In-Silico PCR uygulaması (https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr) aracılığıyla insan genomuna karşı [Aralık 2013 (GRCh38 / hg38)] (9) doğrulanmıştır. Sonuçlar, kromozom 5 ile eşleşen 508 bç'lik bir ürün ortaya çıkarmıştır. Bu ürünün Standart Nükleotid BLAST araştırması sonucunda, erişim numaraları AC022428.7 ve AC016591.6 olan

sekanslarla eşleştiği görülmüştür. Ayrıntılı olarak incelendiğinde, 508 bç ürünün kromozom 5 üzerindeki (chr5 konumu: 60541290-60541797; erişim numarası: NC_000005.10) prostate androgen-regulated transcript 1 (*PART1*, NCRNA00206 olarak da bilinir; GeneID: 25859) olarak bilinen diziyle eşleştiği tespit edilmiştir. Ayrıca, bu 508 bç PCR ürünü bir adet BseYI enzim kesim dizisi içermekte olup, bu enzim ile muameleden sonra 148 ve 360 bç içeren iki adet DNA fragmenti oluşturmaktadır.

Son olarak, NCBI-SNP veritabanında (www.ncbi.nlm.nih.gov/snp) SNP (rs8176070) tarandığında, bu polimorfizmin kromozom 5'te 60541649 konumunda tanımlandığı tespit edilmiştir. Tanımlanan bu konum ise *PART1* ile uyumlu bulunmuştur (10).

Gerçekleştirilen bu ön çalışmalar, literatürde Gu ve ark. (5) ve Diab ve ark. (2) tarafından *MATN3* için analiz edilen SNP (rs8176070)'nin, 2003 yılında Stefánsson ve ark.(6) tarafından el OA'i için tanımlanan SNP6'dan farklı olduğunu ve SNP (rs8176070)'nin MATN3'e değil, *PART1*'e ait olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak, kıkırdak dokularında ve kondrositlerde long noncoding RNA (lncRNA) PART1 ifadesinin tespit edildiği bildirilmiştir (11). *PART1*'in miR-373-3p/SOX4 sinyal yolağını düzenleyerek OA ilerlemesini teşvik ettiği öne sürülmüştür (11).

Sonuç olarak, Diab ve ark. (2) ve Gu ve ark. (5) tarafından yayınlanan makaleler iki nedenden dolayı yanıltıcıdır: *PART1*'e ait olan SNP (rs8176070) yanlışlıkla *MATN3*'e ait olan SNP6 olarak tanımlanmıştır ve her iki çalışmada da analiz edilen sekans *MATN3* değil, *PART1* sekansıdır. Güncel literatür, lncRNA PART1'in OA patogenezindeki olası rolünü desteklemektedir.

Bu nedenle bu tez çalışması, lncRNA PART1'e ait olan SNP (rs8176070)'in diz osteoartriti riskini yansıtabileceği hipotezini test etmek için tasarlanmıştır (10).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kıkırdak Dokunun Genel Özellikleri

Kıkırdak doku özelleşmiş bağ doku çeşitlerinden biridir. Hücreler, lifler ve amorf maddenin oluşturduğu ECM'den meydana gelen avasküler bir dokudur. Kıkırdak dokunun genç hücrelerine kondroblast adı verilirken olgun hücrelerine kondrosit denilmektedir.

Kıkırdak dokusunun ECM'si katı ve sıkı formdadır ancak fonksiyonel gerilimleri kalıcı bir şekil bozukluğu oluşmaksızın karşılayabilecek kadar da esnek yapıda oluşu kıkırdak dokuya dirençlilik özelliği kazandırmaktadır. Gerilime dirençli kollajen lif ağları ve yüksek oranda hidrate olmuş proteoglikanlar arasındaki ilişki sayesinde kıkırdağın, sinoviyal eklemler gibi hareket noktalarında ağırlığa karşı adapte olmasını sağlar. Özellikle bu dokunun düzgün yüzeyli, dirençli ve esnek oluşu eklemlerde oluşan darbeleri emmesini sağlar ve kaygan yüzeyleri ile kemik hareketlerini kolaylaştırır (12, 13, 14).

Kıkırdak doku aynı zamanda prenatal ve postnatal dönemlerde uzun kemiklerin gelişmeleri ve büyümelerinde taslak görevi görerek önemli bir rol üstlenmektedir (13). Bağ dokunun aksine kıkırdakta hiç damar ağının bulunmaması nedeniyle kıkırdak doku hücrelerinin yaşamlarını sürdürebilmeleri için ECM yapısı önem taşımaktadır. Değişen oranlardaki Tip II kollajen lifler ve glikozaminoglikan (GAG) içeriği çevre bağ dokudaki kan damarlarından veya eklem boşluğundaki sinoviyal sıvıdan kıkırdak içerisindeki hücrelere madde geçişine izin verir. Difüzyon kıkırdak dokunun canlılığını devam ettirmesini sağlar (13). Kıkırdak dokuda kan damarları, lenf damarları ve sinirler bulunmamaktadır (12).

Gelişme döneminde olan kıkırdağın çevresindeki mezenşimal hücreler fibroblastik hücrelere farklanırlar. Bu hücreler, düzensiz sıkı bağ dokusu yapısındadır ve ECM'yi organ kapsülü gibi saran perikondriyumu oluştururlar. Kıkırdağın büyümesinden, beslenmesinden ve devamlılığından sorumlu olan perikondriyum, avasküler kıkırdak dokusuna damar desteği sağlar. Aynı zamanda sinirler ve lenf damarlarını da barındırır.

Perikondriyum iki tabakadan oluşmaktadır. Dış fibröz tabaka ağırlıklı olarak tip 1 kollajen, fibroblastlar ve kan damarlarınca zengin tabakadır. İç hücresel tabaka (kondrojenik tabaka), olgun (matür) kıkırdak doku hücrelerinin progenitörlerini (kondrojenik hücreler) içerir. Bu progenitör hücreler kıkırdak kenarına paralel uzanım gösterirler ve yassıdırlar. Büyüme plağında, eklem kıkırdağında ve fibröz kıkırdakta perikondriyum bulunmaz (12).

Kıkırdak doku çeşitleri: (Şekil 2.1):

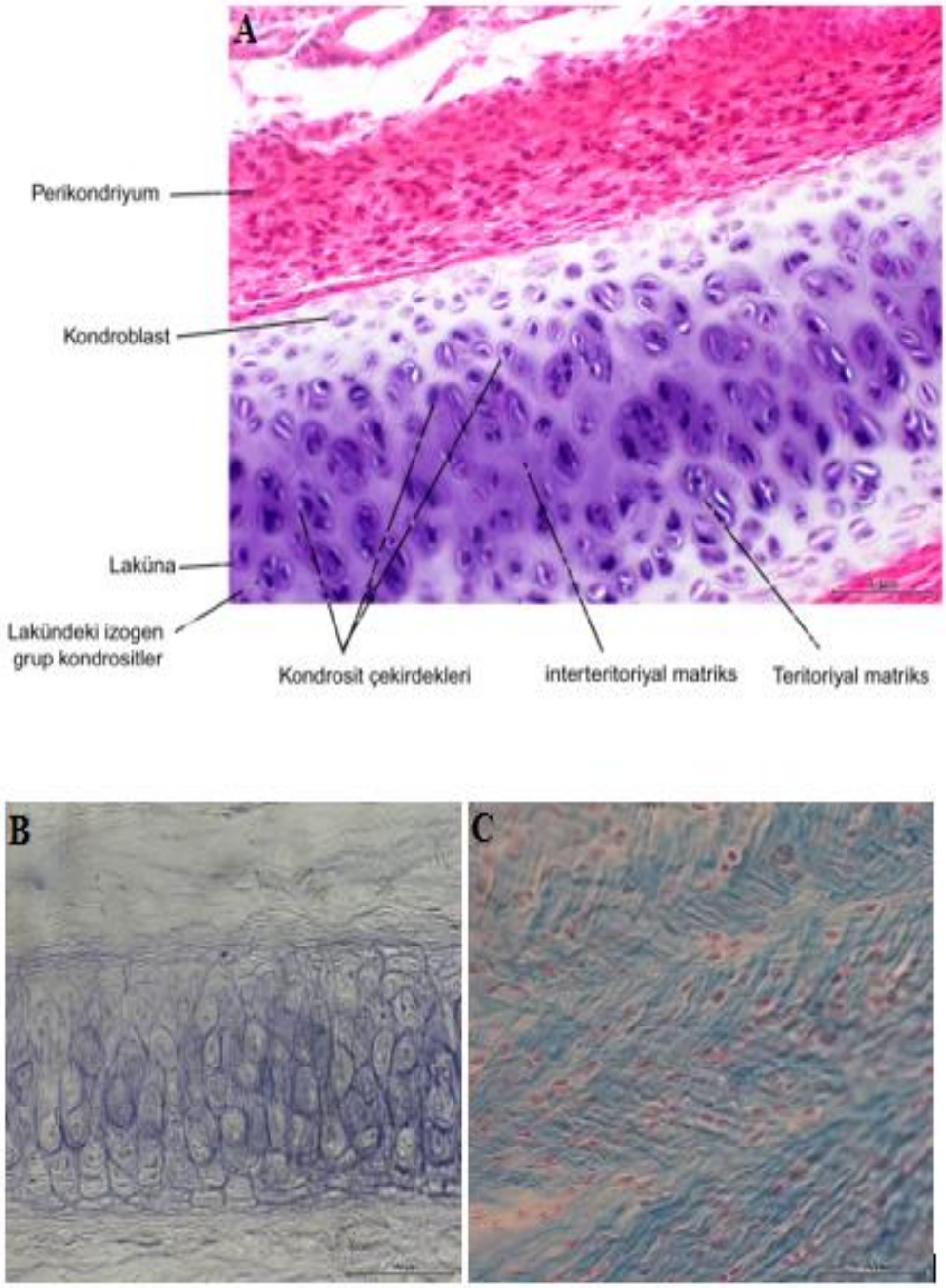
1. Hiyalin kıkırdak
2. Elastik kıkırdak
3. Fibröz kıkırdak (Fibrokartilaj)

2.1.1. Kıkırdak Doku Hücreleri

Kıkırdak ile ilişkili üç tip hücre bulunmaktadır; kondrojenik hücreler, kondroblastlar ve kondrositler (Şekil 2.1).

Kondrojenik (Kondroprogenitör) hücreler: Mezenşimal hücrelerden köken alan mekik şekilli yassı hücrelerdir. Bir ya da iki nükleolus içeren oval şekilli nukleusları bulunmaktadır. Organeller sitoplazmalarında dağınık yerleşimlidir ve elektron mikroskobik (EM) görüntüleri küçük bir Golgi cisimciği, az miktarda mitokondriyum, granüllü endoplazmik retikulum (GER) ve bir miktar serbest ribozoma sahip olduklarını göstermektedir. Kondrojenik hücreler hem kondroblastlara hem de osteoprogenitör hücrelere farklanabilmektedirler. Bu hücreler perikondriyumun iç hücresel tabakasında bulunur ve kondroblast hücrelerine farklanırlar (15).

Kondroblastlar: Kondroblastlar, kondroprogenitör hücrelerden ve kıkırdaklaşma merkezinde bulunan mezenşimal hücrelerden köken alırlar. Kondroblastlar matriks üretiminden sorumludur. Kondroblastlar iri bazofilik hücrelerdir ve çok sayıda ribozom barındırırlar. EM görüntülerinde GER'den zengin, iyi gelişmiş Golgi cisimciği, çok sayıda mitokondriyum ve salgı granüllerine sahiptir (15).



Şekil 2.1. Kıkırdak tiplerine ait ışık mikroskobik fotomikrograflar (14).
A) Hiyalin kıkırdak. Memeliye ait trakea kesiti. Boya: Hematoksilen-Eozin (H-E) B) Elastik Kıkırdak. Memeliye ait epiglottis kesiti. Boya: Verhoeff Boyası C: Fibröz Kıkırdak. Memeliye ait intervertebral disk kesiti Boya: Mallory'nin Azan Boyası Bar: 100 µm.

Kondroblastik hücreler, hiyalüronik asit, aggrecan, keratan sülfat, kondroitin sülfat olmak üzere çeşitli GAG'lar ve tip II kollajen salgılarlar. Bu süreçte hücreler birbirlerinden uzaklaşmaya başlarlar ve sentezledileri matriks içerisine hapsolurlar. Oluşan bu bağımsız bölmelere lakün ve içerisindeki olgun hücrelere kondrosit adı verilir. Bu süreçte kıkırdak dokunun çevresel olarak büyümesine appozisyonel büyüme adı verilir.

Kondrositler: Kondrositler kıkırdak dokunun olgun hücreleridir ve yaklaşık 10-30 µm çapa sahiptirler. Perikondriyuma yakın yerleşimli olanları daha oval şekilli iken iç kısımlarda bulunanlar yuvarlak şekillidir. Büyük nükleuslarının içinde belirgin bir nükleolusa sahiptirler. Genç kondrositler soluk boyanan bir sitoplazma, iyi gelişmiş Golgi cisimciği, GER ve glikojene sahiptir. Yaşlı kondrositlerin organel içerikleri azalmış ve genç kondrositlere göre daha sessizdirler. Sitoplazmalarında serbest ribozom içerdikleri için ihtiyaç halinde tekrar aktifleşerek protein sentezleyebilirler (14, 15).

Kondrositler mitotik olarak aktif hücrelerdir ve bir lakün içerisinde iki, dört ya da daha fazla sayıda bulunabilirler. Oluşan bu topluluğa izogen grup adı verilir (14, 15). Erişkin kıkırdakta çok fazla bölünmemelerine rağmen ECM sentezi ve devamlılığın korunmasında gerekli hücrelerdir. Matriks sentezlenmeye devam ettikçe lakünlerin arasındaki mesafe açılır ve kıkırdak dokusu genişlemeye başlar. Bu tip büyümeye interstisyel büyüme adı verilir (16).

2.1.2. Kıkırdak Doku Matriks Elemanları

Kıkırdak doku hacminin yaklaşık %5'i hücreler %95'ten fazlası ECM'den oluşmaktadır. ECM'de %60-80 oranında su bulunmaktadır (13). Tüm kıkırdak tipleri kollajen, hiyalüronik asit, proteoglikanlar (özellikle kondroitin sülfat ve keratan sülfattan zengin) ve az miktarda glikoprotein içermektedir (14).

2.1.2.1. Kıkırdak Dokunun Fibröz Matriksi

Kollajen, kıkırdak doku ECM'sinin ana proteinidir. Hiyalin ve elastik tip kıkırdakta ağırlıklı olarak tip II kollajen, fibröz kıkırdak tipinde ağırlık olarak tip I kollajen bulunmaktadır. Kıkırdak ECM'sinde ince ve kısa liflerin oluşturduğu üç

boyutlu ağın yapısına tip II, IX, X ve XI kollajenler katılmaktadır. Kollajen liflerin içerisinde en yoğun bulunan tip II kollajendir (13). Geniş demetler oluşturmaz ancak demetin kalınlığı lakünden olan uzaklıkla doğru orantılı olarak artar. Elastik kıkırdağın fibröz matriksinde kollajen lifler, yoğun elastik lif ağı ve elastik lameller bulunur (13, 14).

Kollajen liflerin doku içerisindeki düzenlenmesi, doku üzerine uygulanan stres ile ilişkili görünmektedir (15). Tip II, VI, IX, X ve XI kollajen yalnızca kıkırdak matriksinde belirgin miktarda bulundukları için "kıkırdağa özgü kollajen molekülleri" olarak isimlendirilirler (13) (Tablo 2.1). Tip I ve tip II kollajen oranı kıkırdağın bulunduğu yere ve bireyin yaşına göre farklılık gösterir (15).

Tablo 1.1. Kıkırdak dokuda bulunan başlıca kollajen tipleri ve ana görevleri (13).

Kollajen Tipi	**Görevi**
Tip I kollajen	Fibröz kıkırdağa sağlamlık verir. Kuvvet, gerilim ve gerilmeye karşı direnç sağlar
Tip II kollajen	Kıkırdak dokuyu korumak, desteklemek, fiziksel ve fonksiyonel özelliklerinin devamlılığını sağlamak
Tip VI kollajen	Kondrositlerin ECM'ye tutunmasını sağlamak
Tip IX kollajen	Kıkırdaktaki fibröz bileşenlerin amorf bileşenlerle etkileşimini sağlamak
Tip X kollajen	Liflerin üç boyutlu hekzagonal organizasyonunu sağlamak
Tip XI kollajen	Liflerin büyüklüklerini ayarlamak

2.1.2.2. Kıkırdak Dokunun Amorf Matriksi

Kıkırdak dokusunun amorf matriksini üç ana grup molekül oluşturmaktadır. Bu moleküller proteoglikanlar, GAG'lar ve multiadeziv glikoproteinlerdir. Kıkırdak dokusuna özgü dirençlilik, sağlamlılık ve dayanıklılığın kazanmasında bu üç molekül grubun farklı oranlarda bir araya gelmesi aracılık eder.

Kıkırdak dokunun ECM'si hiyalüronik asit, keratan sülfat ve kondroitin sülfat olmak üzere üç tip GAG içerir (13). Proteoglikan monomeri olan aggrecan, GAG moleküllerinin (kondroitin-4-sülfat, kondroitin-6-fosfat ve heparan sülfat) kovalent olarak bağlandığı bir protein öz içerir (15).

Aggrecan molekül ağırlığı 250 kilodaltondur. Aggrecanın her molekülü yaklaşık 100 kondroitin sülfat zinciri ve 60 kadar keratan sülfat molekülü içermektedir (13). 100-200 aggrecan molekülü hiyalüronik asite non-kovalent olarak (kovalent olmayan bağlarla) bağlanır ve 3-4 μm uzunluğunda büyük aggrecan kompozitleri (proteoglikan kümeleri) oluştururlar.

Proteoglikanların kimyasal bileşimindeki sülfat grupları (negatif yüklü), doku içerisindeki Na^+ iyonu ve suyu elektrostatik olarak çeker. Kıkırdak matriksi hidrate olur ve ıslak ağırlığının yaklaşık olarak %80'inini su oluşturur. Bu özellik, sinoviyal eklemler gibi hareket bölgelerinde baskı kuvvetlerine karşı direnç yeteneği oluşturur (15).

Sox9 transkripsiyon faktörü, aggrecan ve tip II kollajen gibi kıkırdağa özgü ECM elemanlarının sentezlenmesini indükler. Sox9, COL2A1 tarafından kollajen sentezini aktive eder ve Sox9 yokluğunda kondrojenik hücreler kondrosit hücrelerine farklanamaz. Bunun sonucunda kıkırdak ECM elemanlarının sentezinde bozulmalar ortaya çıkar (16).

GAG zincirleri kollajen molekülleri ile elektrostatik bağ kurar. Esas madde ile matriks liflerinin çapraz bağlanması sonucu sepet örgüsü benzeri düzenlenim gerçekleşir. Bu düzenlenim kıkırdak dokusunda gerilme kuvvetlerine karşı direnç yeteneği kazandırır (15).

Kıkırdak doku ECM'si multiadeziv glikoprotein olan kondronektin içerir. Kondronektin, tip II kollajen, kondroitin-4-sülfat, kondroitin-6-sülfat, hiyalüronik asit ile kondroblast ve kondrositlerin integrinleri (transmembran proteinleri) için bağlanma bölgeleri bulundurmaktadır. Kondronektin molekülü kıkırdak doku hücreleri ile amorf ve fibröz matriksin kompleks bağlantısına aracılık eder. Anchorin CII (cartilage annexin V) molekülü kondrosit hücrelerinin yüzeyinde kollajen reseptörü olarak görev

yapar ve fibronektin ve tenascin molekülleri kondrositlerin matrikse bağlanmasını kolaylaştıran multiadeziv glikoproteinlere örnektir (13, 14).

Kıkırdak doku, ECM özellikleri, görünüm ve mekanik özelliklerine göre 3 tipe ayrılmıştır: (Şekil 2.1 ve Tablo 2.2) (15).

1. **Hiyalin Kıkırdak;** tip II kollajen liflerce zengin ve GAGlar, proteoglikanlar ve multiadeziv glikoproteinler içeren ECM ile karakterizedir.
2. **Elastik Kıkırdak;** hiyalin kıkırdak ECM bileşenlerine ek olarak elastik lifler ve elastik lameller ile karakterizedir.
3. **Fibröz Kıkırdak;** hiyalin kıkırdak ECM elemanlarının yanı sıra baskın şekilde tip I kollajen lifler içerir.

Tablo 2.2. Kıkırdak tipleri, özellikleri ve lokalizasyonları (15).

Kıkırdak tipi	**Özellikleri**	**Perikondriyum**	**Lokalizasyonu**
Hiyalin	Tip II kollajen, bazofilik matriks, kondrositler genellikle gruplar halinde düzenlenmiş	Perikondriyum bazı bölgelerde bulunur: Epifiz ve eklem kıkırdağı hariç	-Hareketli eklemlerin artiküler yüzeyleri, -Kostaların sternum ile birleştiği uçlar, -Solunum yolu (nazal kavite, larinks kıkırdakları-tiroid, krikoid ve aritenoidler), trakea halkaları, bronş plakları), -Fetüste iskelet taslağı, -Uzun kemiklerde epifizyal büyüme plakları
Elastik	Tip II kollajen, elastik lifler	Perikondriyum var	-Kulak kepçesi, -Dış ve iç kulak yolu, -Tuba auditiva (Östaki borusu), -Larinks kıkırdakları (epiglottis, kornikulat ve küneiform kıkırdaklar)
Fibröz (Fibrokartilaj)	Tip I kollajen, asidofilik matriks, kollajen demetleri arasında kondrositler paralel diziler şeklinde düzenlenmiş	Perikondriyum yok	-İntervertebral diskler, -Simfizis pubis, -Menisküsler (diz eklemi), -Sternoklavikülar ve temporomandibular eklemler, -Tendonların kemik ile birleştiği noktalar, -Triangular fibröz kıkırdak kompleksi (bilek eklemi)

2.2. Kıkırdak Doku Tipleri

2.2.1. Hiyalin Kıkırdak

Hiyalin kıkırdak yapısal olarak yarı saydam, mavimsi-beyaz renktedir ve camsı görünümünden dolayı hiyalin (Gr. hyalos: camsı) adı verilmiştir (13). İnsanlarda en yaygın görülen kıkırdak tipidir (16). Fötal dönemde, iskeletin büyük çoğunluğu hiyalin kıkırdaktan oluşmaktadır ve iskelet sistemi için taslak oluşturur (12). Kondrositler zamanla farklı süreçlerden geçerler ve hiyalin kıkırdakta dejenerasyon başlar ve ECM'de kalsifikasyon oluşur. Bu süreç endokondral kemikleşme (ossifikasyon) olarak adlandırılır.

Hiyalin kıkırdak, erişkinde nazal kavite, larinks kıkırdakları (tiroid, krikoid ve aritenoidler) trakea halkaları ve bronş plaklarında, epifiz plaklarında, hareketli eklemlerin artiküler yüzeylerinde ve kostaların sternum ile eklem yaptıkları ön uçlarında bulunmaktadır (Tablo 2.1)(12, 14). Epifiz plaklarında ve sinoviyal eklem yüzeylerinde bulunan hiyalin kıkırdak çevresinde perikondriyum bulunmaz. Bu bölgeler hariç hiyalin kıkırdak içeren bölgelerde perikondriyum bulunur (13, 14).

Hiyalin kıkırdağın yüzeyinin pürüzsüzlüğü, baskı ve gerilme kuvvetlerine karşı koyabilmesi eklem yüzeylerindeki işlevi için önemlidir. Bu bölgelerde düşük sürtünme yüzey sağlar, uygulanan güçleri alt kısımdaki kemiğe dağıtır ve sinoviyal eklemlerin kayganlaştırılmasına yardımcı olur (13).

Hiyalin kıkırdak ECM'sinin kuru ağırlığının yaklaşık %40'ını kollajenler, proteoglikan çökeltileri (çoğunlukla aggrecan formundaki), glikoproteinler (çoğunlukla kondronektin) ve hücre dışı sıvı da içermektedir. Kollajen lifler ve ECM'nin ışık kırıcılık indeksleri yaklaşık olarak eşit olduğundan ışık mikroskobik incelemelerde hiyalin kıkırdak amorf ve homojen olarak gözlenir (13).

Hiyalin kıkırdak matriksi içeriğindeki sülfat grupları nedeniyle yüksek düzeyde hidratedir ve net ağırlığının %60-80'i sudur. Su moleküllerinin çoğu, aggrecan ve hiyalüronan kümelerine sıkıca bağlanıp dokuya direnç kazandırır. Su moleküllerinin bazıları hücreler ve ECM arasında madde difüzyonuna olanak sağlayacak şekilde gevşek bağlıdır. Basınca maruz kalan eklem kıkırdağı su içeriğinde

kalıcı olmayan ve lokal, kalıcı olmayan farklılıklar olmaktadır. İleri seviyede hidrasyon ve ECM içindeki suyun hareketli olması, kıkırdak dokunun farklı basınç koşullarına yanıt vermesine ve yük taşıma seviyesine katkı sağlar (13).

Hiyalin kıkırdak dokusunda perikondriyuma yakın olan kondroblastlar oval şekilli ve yüzeye paralel dizilimlidirler. Dokunun derinliklerine gidildikçe hücreler yuvarlak şekle sahip olur ve ECM içerisinde tek tek ya da izogen gruplar şeklinde bulunabilirler (12). Aktif bölünme geçiren hücreler kollajen ve diğer matriks proteinlerini sentezlerler ve kendilerine alan açmak için metalloproteinazları sentezleyip salgılarlar (13).

Kondrositler ECM üretiminden ve devamlılığından sorumlu özelleşmiş hücrelerdir (13). Yaş parametresi ile birlikte devamlı farklılaşan bir kıkırdak proteoglikan anabolik-katabolik döngüsü vardır. Yaş ile birlikte hormonlar ve vitaminler de kıkırdak dokunun büyümesini, gelişmesini ve işlev görmesini etkilemektedir (Tablo 2.3)(15). Hormon dengesi, kondrositlerin fonksiyonunu etkilemektedir. Testosteron, tiroksin ve büyüme hormonu ECM'de sülfatlı GAG'ların sentezini hızlandırırken, östradiol, hidrokortizon ve kortizon yavaşlatmaktadır. Hipofizden salgılanan büyüme hormonu somatotropin karaciğerde somatomedin C sentezini başlatırken, somatomedin C kıkırdak hücrelerinin büyümesini indükler.

Hiyalin kıkırdak dokusunda bulunan proteoglikanlar yüksek seviyede sülfat grubu bağladıkları için ara madde hematoksilen gibi bazik boyalar ile boyanır. Bazofili ve metakromazi sülfatlı proteoglikanların doku içerisindeki dağılımları ve oranları hakkında bilgi verir (13).

Matriks boyanma özelliklerine göre 3 farklı alan içermektedir (Şekil 2.1):

1. **Periselüler (Kapsüler) Matriks**: 1-3 μm kalınlığında, diğer alanlara göre daha yoğun boyanan lakünanın çevresinde bulunan periselüler bir alandır. Özellikle tip VI ve IX kollajenleri içeren bazal lamina benzeri bir madde içerisinde bulunur. Tip VI kollajen kondrositlerin yüzeyinde bulunan integrin reseptörlerine bağlanarak hücreleri matrikse sabitler. Lifler haricinde proteoglikanları, hiyalüronik asiti ve bazı fibronektin, dekorin ve laminin gibi

multiadeziv glikoproteinleri bulundurur (13, 14). Perisellüler matriksin kondrositleri mekanik stresten koruduğu düşünülmektedir (15).

2. **Teritoryal Matriks:** 50 μm genişliğinde, perisellüler matriksin hemen dışında ve izogen grupları çevreleyen bir banttır. Teritoryal matriks, perisellüler matrikse göre daha düşük oranda sülfatlı proteoglikan ve glikoproteince zengin bir matrikse sahiptir. Matriks içeriğinden ötürü bazofilik boyanma ve metakromazi gösterir ve PAS (Periyodik Asit-Schiff) reaksiyonu pozitiftir.Tip II ve tip XI kollajen az miktarda bulunur (14).

3. **İnterteritoryal Matriks:** Teritoryal matriksler arasında kalan alanları oluşturur. İnterteritoryal matriks, teritoryal matrikse göre tip II kollajenden daha zengin, proteoglikandan fakirdir (15). Bu nedenle daha az bazofilik ve yer yer asidofilik boyanma özelliği gösterir (14, 17).

2.2.2. Elastik Kıkırdak

Elastik kıkırdak, hiyalin kıkırdak yapısı ile histolojik olarak benzerlik gösterir ve ECM'de fazla miktarda elastik lif ve elastik lamel içermesi ile karakterize edilmektedir. Matriksinde tip II kollajen lifleri arasına dağılmış anastamoz yapan ve dallanan ince elastik lifler içerir (14, 15). Özelleşmiş matriksi belirgin esnekliğe ve deformasyon sonrası orijinal şeklini yeniden almasına olanak sağlar (14, 16).

Bileşimindeki elastik liflerden ötürü taze haldeyken sarı renkte görünür ve hiyalin kıkırdağa göre daha opak yapıdadır (15). Elastik lif ve lamel yapısı özel histolojik boyalarla (Verhoeff, Orsein ve rezorsin fuksin) parafin kesitlerde en iyi şekilde gösterilir (13, 14).

Elastik kıkırdak dokusundaki kondrositler, hiyalin kıkırdağa göre daha fazla sayıdadır ve daha yakın lokalize olmuşlardır. Teritoryal matrikste elastik lif demetleri interteritoryal matrikse göre daha geniş yapıdadır (Şekil 2.1)(15). Elastik kıkırdak matriksi yaşlanma sürecinde kalsifiye olmamaktadır (13).

Elastik kıkırdak dış ve iç kulak yolunda, kulak kepçesinde, epiglottiste, östaki borusunda (tuba auditiva) ve larinks kıkırdaklarının bazılarında (küneiform ve kornikulat kıkırdaklar) bulunur (Tablo 2.1) (14, 17). Bu bölgelerin kıkırdağının

tamamı perikondriyum ile sarılmıştır (13) ve perikondriyumun dış fibröz tabakası elastik liflerden zengindir (14, 15).

2.2.3. Fibröz Kıkırdak

Fibröz kıkırdak (Fibrokartilaj), hiyalin kıkırdak ile sıkı bağ dokunun birleşiminden oluşmaktadır. İki dokunun bileşenlerini yapısında barındırır. Kondrositler, kalın kollajen lifleri arasında tek sıra halinde dizilmiş hücre grupları halinde bulunur, izojen gruplar seyrek şekilde görülür (17). Kondrositler, genellikle dokuya uygulanan germe kuvveti yönüne paralel bir yerleşim gösterirler (Şekil 2.1) (15). Fibröz kıkırdağın çevresinde perikondriyum bulunmamaktadır, doku çevre bağ dokusu ile devamlılık gösterir (14).

Fibröz kıkırdak kollajen lifçe zengin, hücreden ve hücreler arası amorf matriksten fakirdir (17). Fibröz kıkırdak matriksinde tip I ve tip II kollajen lifleri bulunur. Kıkırdağın lokalizasyonuna ve yaşa göre bu iki tip kollajenin birbirlerine oranı değişir. Diz eklem menisküsünde çok az miktarda tip II kollajen bulunurken intervertebral disk kıkırdağında tip I- tıp II kollajen oranı birbirine yaklaşık eşittir. Yaş ile birlikte tip II kollajen miktarı artar (13).

Tip I kollajen lifler demet yapma eğiliminde bir araya gelirler ve sıkı paket yapısından dolayı ışık mikroskobunda asidofilik boyanma gösterirler. Fibröz kıkırdağın amorf matriksinde, fibroblastlarca sentezlenip salgılanan versican bir proteoglikan monomeri olup aggrecandan daha yüksek oranda bulunmaktadır. Versican, aggrecan gibi hiyalüronik asit ile birleşerek yüksek miktarda su bağlar (14, 17).

Gelişim ve erişkin sürecinde fibröz kıkırdak hücreleri geniş ölçekte matriks moleküllerini sentez ve salgılama görevlerini devam ettirirler ve bu durum mekanik basınç, beslenme koşulları ve hormonal değişiklikler gibi dış ortam koşullarına adapte olmalarına olanak sağlar (13).

Fibröz kıkırdak yüksek gerilme kuvvetine sahiptir ve intervertebral disklerde, simfizis pubiste, bazı eklemlerde (sternoklavikular eklem, temporomandibular eklem),

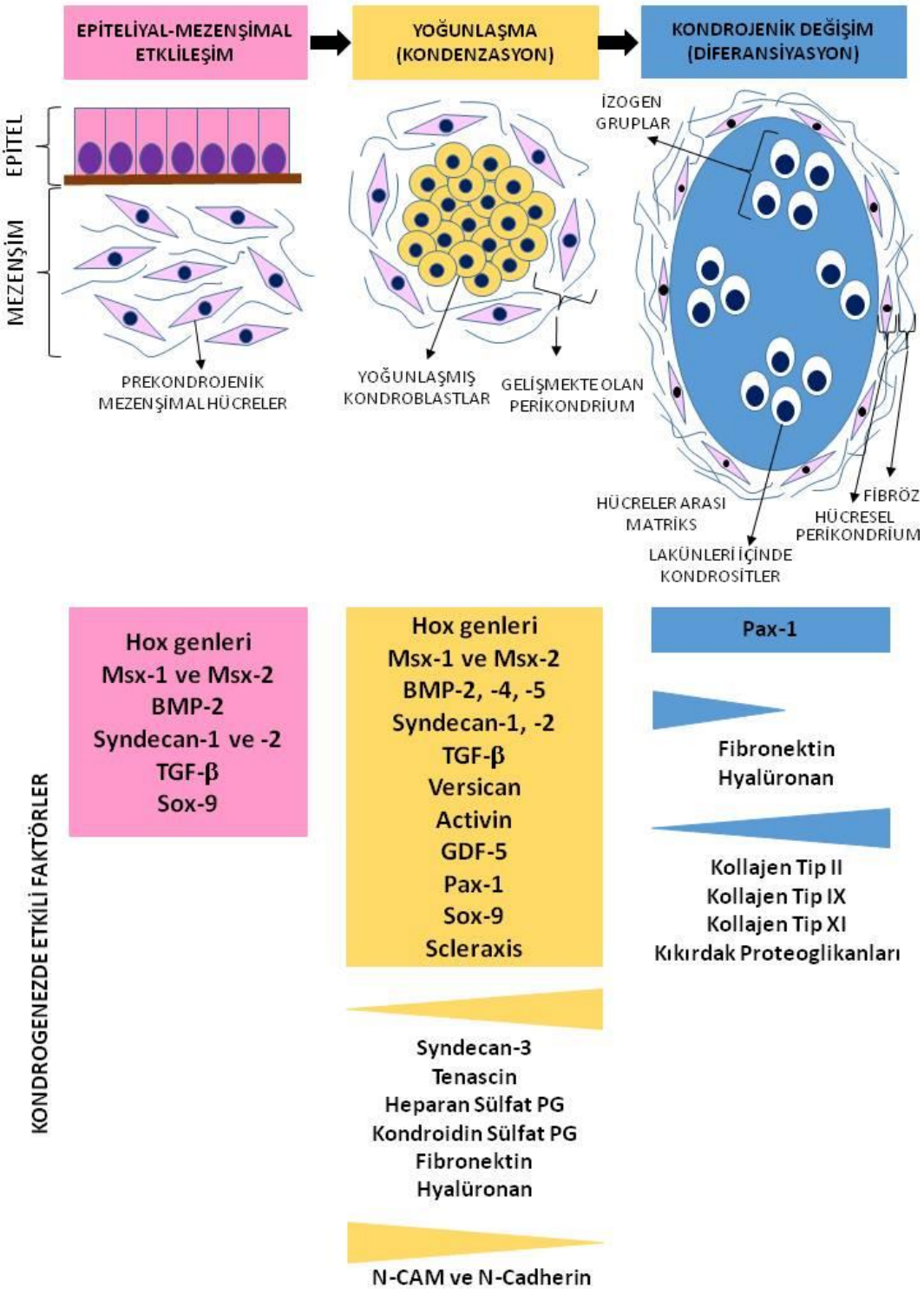
diz eklemi menisküsünde ve tendonların kemiğe tutunduğu bölgelerde bulunur (14, 17).

2.3. Kıkırdak Dokusunun Oluşması (Kondrogenez) ve Histolojik Gelişmesi (Histogenezi)

2.3.1. Embriyoda Kondrogenez

Embriyoda kıkırdak dokusu, embriyonik bağ dokusu çeşitlerinden biri olan mezenşim dokusundan farklılaşmaktadır. Embriyonun baş ve boyun bölgesinde kıkırdak dokusunun büyük bir bölümü nöral krest kökenli (krista nöralis) ektomezenşim dokusundan gelişmektedir. Hiyalin kıkırdak insan vücudunda en yaygın şekilde görülen kıkırdak tipidir. Gelişimsel olarak, hiyalin kıkırdak üç aşamadan oluşur. Gelişimsel sırasına göre epiteliyal-mezenşimal etkileşim (prekondenzasyon) evresi, yoğunlaşma (kondenzasyon) evresi ve kondrojenik değişim (diferansiasyon, farklılaşma) evresi olarak bilinmektedir (Şekil 2.2)(18, 19).

Kondrogenez sürecinin gelişimsel ilk evresi olan epitelyal-mezenkimal etkileşimde embriyoya ait olan bağ dokusunun fibroblast benzeri mezenkimal hücreleri önemli bazi genlerin (Hox genleri, Msx-1 ve Msx-2) ve büyüme faktörlerinin [Bone Morfogenetic Protein-2 (BMP-2), Transforming Growth Factor (TGF)-β1, syndecan-1 ve syndecan-2] etkilemesiyle yoğunlaşmaya başlarlar (20, 21). Etkileşim sonucunda bu hücreler kondroprogenitör (kıkırdak dokusu öncülü, prekondrojenik) mezenşim hücreleri karakterini kazanmışlardır. Kondroprogenitör hücreler var olan hücresel uyarılara ek olarak ifade düzeyleri artan versican, syndecan-3 ve tenascin etkisi altında morfolojik değişime uğrayarak öncelikle yuvarlak şekilli hücre kümeleri oluştururlar. Bu süreçte, hücreler birbirleriyle olan teması arttırır, birbirlerine yaklaşır ve hücre kümeleri oluşturmak üzere yoğunlaşırlar. Bu aşamaya yoğunlaşma (Kondenzasyon) adı verilir.



Şekil 2.2. Kondrogenez sürecinin şematik gösterimi (14).

Bu süreçte etkili olduğu bilinen bazı genler ve transkripsiyon faktörlerine (Hox genleri, Ck-erg, Cart-1) ek olarak büyüme faktörleri [activin, BMP-4, BMP-5, Growth/Differantiotion Factor-5 (GDF-5)] tanımlanmıştır (Şekil 2.2). Yoğunlaşmış

hücre kümelerinin çevresini saran mezenşim hücreleri ise kıkırdak çevresini saran dokuyu perikondriyumu oluştururlar. Perikondriyumun dış fibröz tabakasının altında iç hücresel tabakası bulunmaktadır ve bu tabakada kondroprogenitör hücreler bulunmaktadır.

Yapılan çalışmalarda prekondrojenik yoğunlaşma aşamasında, N-cadherin ve N-CAM 'in prekondrojenik hücrelerdeki ifade düzeylerinde belirgin artış olduğu ortaya konmuştur (22-23). Bu aşamada tip I kollajen, hyaluronan, tenascin ve fibronektin gibi faktörlerce zengin ECM, mezenşim hücrelerinin birbirleri ile yakın temas kurmalarına izin veren bir yapıdadır (25-27). Ek olarak, prekondrojenik mezenşimal hücrelere özgü olarak ifade edilen bir transkripsiyon faktörü olan Scleraxis'in, kıkırdağa spesifik genlerin transkripsiyonlarını tetiklediği gösterilmiştir (28). Önemli bir transkripsiyon faktörü olan Sox9 geninin de spesifik olarak prekondrojenik yoğunlaşma bölgelerinde ifade edildiği ve bir sonraki aşama olan mezenşimal-kondrojenik değişimi tetiklediği bilinmektedir (29). Sox9 mezenşimal hücrelerin kondroblastlara değişimini uyarır.

Yoğunlaşmış mezenşim hücrelerinin birbirleri ile olan hücreler arası bağlantıları kaybederek kondroblastlara diferansiyasyon döneminde N-cadherin ve N-CAM ifade düzeylerinde belirgin bir azalma gözlenir (22, 23, 30). Ayrıca, kondroblastlardan kıkırdak dokuya özgü bir hücreler arası doku depozisyonu (sentezi ve salınımı) başlar. Bu hücreler arası matriksin en önemli bileşenleri olarak kollajen tip-I yerini kollajen tip-II, -IX ve -XI'e bırakırken ilave olarak Gla proteini, heparan sülfat ve kondroidin sülfattan zengin proteoglikanlar, aggrecan proteini, ve link (bağlantı) proteini salgılanmaya başlar (25-27).

Kondrojenik değişim sürecinde etkin olduğu bilinen transkripsiyon faktörlerinden birisi de Pax-1 dir. Matriks sentezleyen kondroblastlar sürekli olarak birbirlerinden uzaklaşırlar ve bir süre sonra tamamen sentezledikleri matriks ile çepeçevre çevrelenirler. Bu aşamadan itibaren hücreler kondrosit adını alırlar. Kondrositlerin içinde yer aldıkları boşluklara ise lakün adı verilir. Kondrositler mitoz ile çoğalarak izojen kondrosit grupları oluştururlar (Şekil 2.2).

2.3.2. Kıkırdak Dokunun Histolojik Gelişmesi (Histogenezi)

Kıkırdak dokunun histogenezi her üç kıkırdak tipinde de birbirine benzer ve bazı hormonlardan ve vitaminlerden etkilenir (Tablo 2.3).

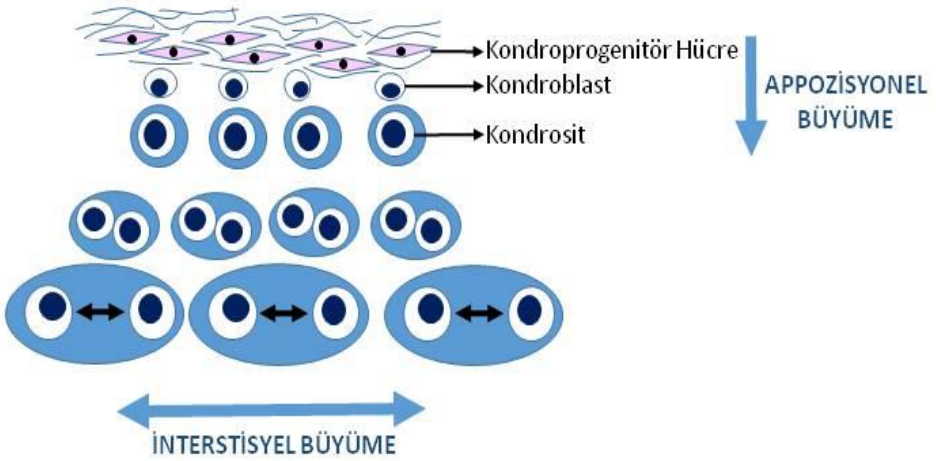
Tablo 2.2. Kıkırdak doku üzerine vitamin ve hormonların etkileri (14).

Vitamin	**Görevi**
A Vitamini Hipovitaminozu	Epifiz plağı kalınlığını azaltır. Çocukluk ve ergenlik döneminde maruz kalınırsa erişkin dönemde boy kısalığına neden olur.
A Vitamini Hipervitaminozu	Epifiz plağında kemikleşmeyi hızlandırır. Çocukluk ve ergenlik döneminde maruz kalınırsa erişkin dönemde boy kısalığına neden olur.
C Vitamini Hipovitaminozu	Hücreler arası matriks sentezi durur. Epifiz plaklarındaki sütun biçimlerinin bozulmasına dolayısıyla uzun kemiklerde şekil bozukluğu olan uzamaya neden olur. Tedavi edilmezse skorbüt hastalığı meydana gelir.
D Vitamini Hipovitaminozu	Kalsiyum ve fosfor emilimi bozulur. Epifiz kıkırdakları prolifere olur ancak ossifikasyon meydana gelmez, gelişen kemiklerde şekil bozuklukları olur. Tedavi edilmezse raşitizm hastalığı meydana gelir.
Hormonlar	**Görevi**
Tiroksin, testosteron, somatotropin	Kıkırdak histogenezini uyarırlar.
Kortizon, hidrokortizon, östradiol	Kıkırdak histogenezini baskılarlar.

Kıkırdakta histogenez başlıca iki mekanizma ile sağlanır (Şekil 2.3).

a) Interstisyel büyüme: Kıkırdak doku içerisinde var olan kondrositlerin hücresel bölünmesi mitoz ile sağlanır. Lakün içindeki kondrosit, mitoz yolu ile bölünür ve iki yavru hücre ortaya çıkar. Aynı lakünü paylaşan bu yavru hücreler de matriks sentezleyerek kendi lakünlerini oluştururlar ve birbirlerinden giderek uzaklaşırlar. Sonuç olarak kıkırdak doku kendi içinden büyüyerek gelişir. Interstisyel büyüme embriyoda kıkırdak oluşumunun erken evrelerinde, eklem yüzü kıkırdaklarında ve uzun kemiklerin epifiz plaklarında görülür (13).

b) Appozisyonel büyüme: Perikondriyumda yer alan kondrojenik progenitör hücrelerin değişimleri diferansiyasyon (farklılaşma) ile sağlanır. Perikondriyumun hücresel tabakasında yer alan fibroblast benzeri kondrojenik progenitör hücreler SOX9 adı verilen transkripsiyon faktörü etkisi altında önce yuvarlak şekilli kondroblastlara, ardından tip II kollajenden zengin matriks sentezleyerek kondrositlere dönüşürler. Böylece kıkırdak dokunun periferinden perikondriyum altından başlayarak yeni bir kondroblast ve kondrosit tabakası gelişir ve kıkırdağın periferik bölgesinde yeni bir matriks tabakası oluşumu sağlanır. Bu sürece appozisyonel veya eklenerek büyüme adı verilir (13).

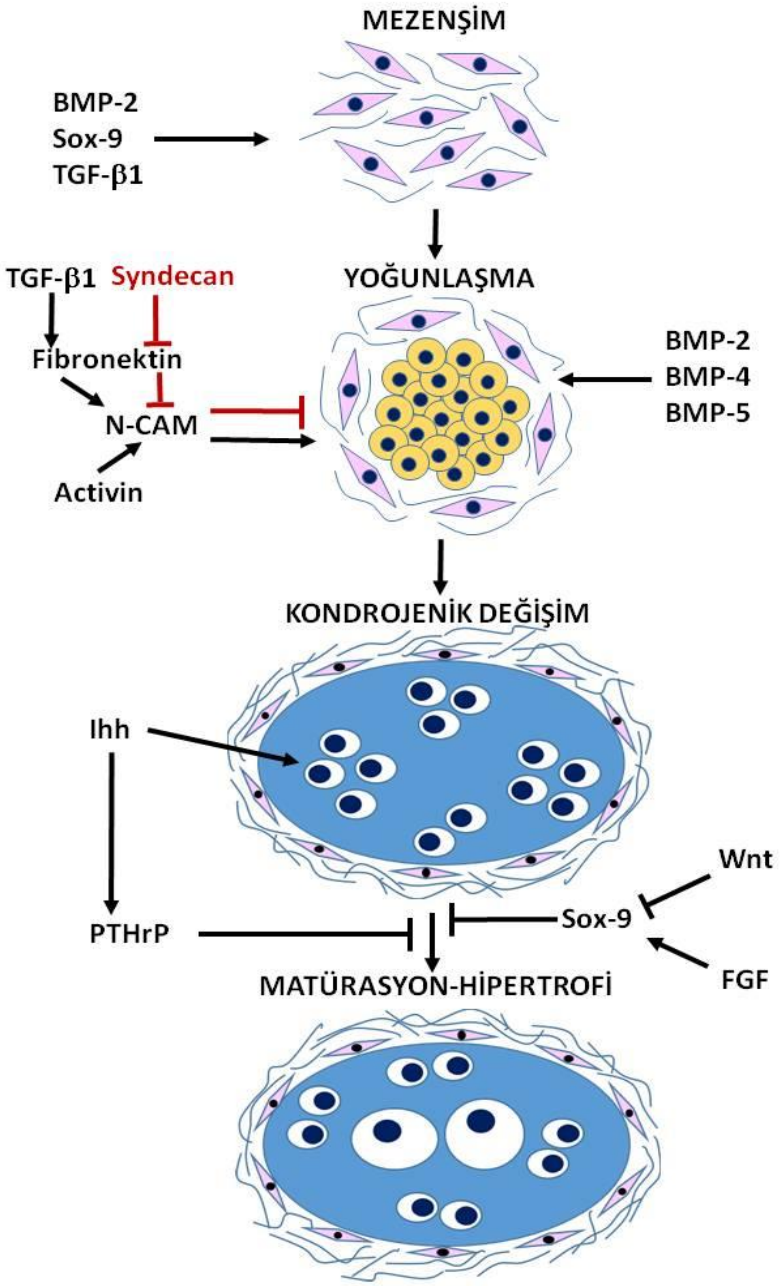


Şekil 2.3. Kıkırdak histogenez çeşitlerinin şematik gösterimi (14).

2.3.3. Kıkırdak Dokunun Dejenerasyonu

İzojen kondrosit grupları halinde gözlemlenen hücreler ilerleyen süreçte olgunlaşmaya başlar (matürasyon). Olgunlaşan kondrositler kıkırdak dokuda giderek daha merkezi (orta bölgede yer alan) bir konum alırlar (Şekil 2.4). Kondrositler olgunlaştıkça tipik olarak hücreler arası matriks kompozisyonunu değiştirmeye başlar. Hücreler arası matriks yapısında erken dönem baskın olan Tip-II, -IX, ve -XI kollajen yerlerini Tip X kollajene bırakır (25, 26, 27). Kondrosit matürasyonu hücrelerde hipertrofik değişikliklerin gelişmesi ile karakterizedir. Kondrositlerde hipertrofi ise bir yaşlanma belirtisidir (Şekil 2.4).

Kıkırdak dokuda perikondriyumun hücresel tabakasında başlayan proliferasyon ve kondrojenik farklılaşma süreci ile olgunlaşma (matürasyon-hipertrofi) süreçleri bir denge içinde çalışmak zorundadır. Bu dengenin sağlanmasında pek çok büyüme faktörü, bunlara ait reseptörler, transkripsiyon faktörleri, adezyon molekülleri, matriks proteinleri, hormon, sitokin ve hücre sinyal mekanizması rol almaktadır (Şekil 2.2 ve Şekil 2.4). Şekil 2.2'de özetlenen faktörlerin yanı sıra Fibroblast Büyüme Faktörleri (FGF) (31, 32) östrojen, tiroid hormonu ve triiyodotironin (T3) gibi hormonlar (33, 34), sinyal molekülleri Indian Hedgehog (Ihh) (35) ve Paratiroid Hormon-ilişkili Peptid (PTHrP) (36, 37), anti-apopitotik faktörlerden Bcl-2 (38-42), ayrıca Tumor Nekrozis Faktör" (TNF) (43) ve p53-tümör baskılayıcı genler grubundan p63 (44) ve benzerleri de bu mekanizmalarda düzenleyici rol oynayan faktörler arasında yer almaktadır (Tablo 2.3, Şekil 2.4). Biyomekanik güçlerin de bu süreçte önemli rol oynadığı bilinmektedir. Mekanik güçler sadece kıkırdağın şekil almasında, olgunlaşmasında, rejenerasyonunda ve yaşlanmasında önemli olmayıp, aynı zamanda hücreler ile hücreler arası matriks etkileşimlerinde de önemli görevler üstlenir.

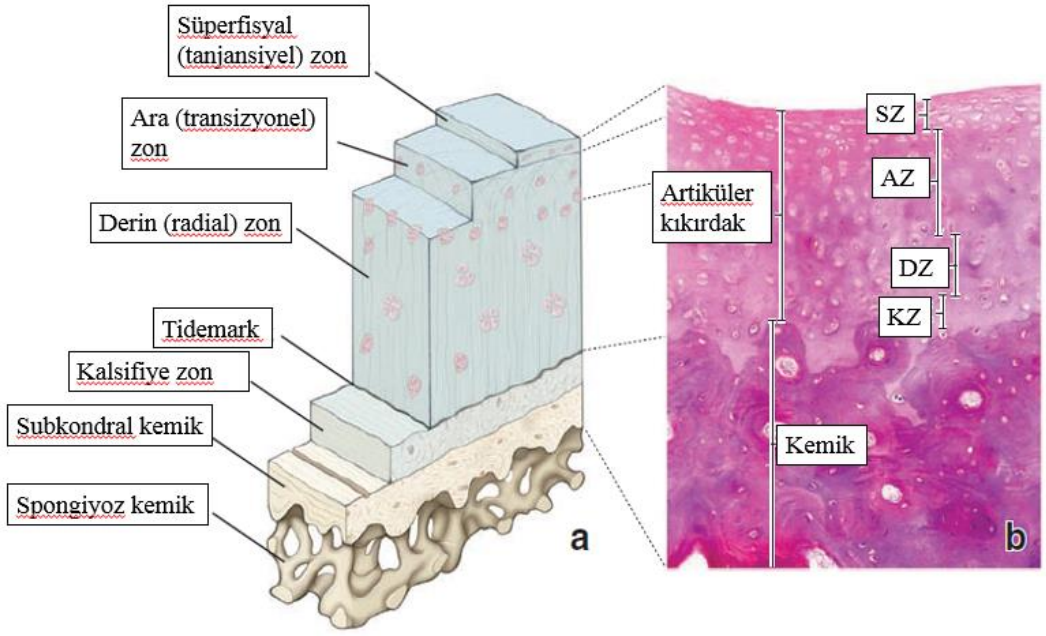


Şekil 2.4. Kondrogenez ve kıkırdak olgunlaşması üzerine etkili faktörlerin şematik olarak gösterimi (14).

Kondrositlerde hipertrofi bir yaşlanma belirtisi olup programlanmış hücre ölümü (apoptoz) ile sonlanır, matrikste kalsifikasyon görülür. Bu, insanlarda yaşlanma ile hızlanan bir süreçtir. Diğer taraftan, hiyalin kıkırdağın dejenerasyonu endokondral kemik gelişimi sürecinde görülen normal bir biyolojik olaydır. Elastik kıkırdak hiyalin kıkırdağa oranla dejenerasyona daha dayanıklıdır ve yaş ilerledikçe kalsifiye olmaz (Tablo 2.1).

2.4. Uzun Kemiklerde Epifiz (Büyüme) Plağı ve Eklem Kıkırdağı

Uzun kemiklerde epifiz (büyüme) plağını oluşturan hiyalin kıkırdak ve eklem kıkırdağını oluşturan hiyalin kıkırdak gelişimsel olarak aynı kökenden gelen ve anatomik olarak birbirlerine oldukça yakın bölgelerde bulunan dokulardır (45). Gerek eklem kıkırdağında, gerekse epifiz kıkırdağında kondrositlerin gelişimi benzer faktörlerin kontrolü altında gerçekleşir (45). Femur ve tibia gibi uzun kemiklerin endokondral kemikleşmeleri sürecinde, kemiklerin epifiz bölgelerinde yer alan sekonder kemikleşme merkezlerinin ekleme bakan yüzlerinde eklem kıkırdağı gelişirken, epifiz ile diyafiz arasında kalan bölgelerde epifiz büyüme plağı gelişimi görülür (Şekil 2.5). Her iki kıkırdakta da perikondriyum bulunmaz. Dolayısıyla eklem kıkırdağında meydana gelen hasarlar kalıcı olup, eklem hastalıklarına yol açarlar.



Şekil 2.5. (A) Artiküler kıkırdağın diyagramı ve (B) fotomikrografı (13).

2.4.1. Kıkırdak Doku Hastalıkları

2.4.1.1 Epifiz Plağı Hastalıkları

1. Epifiz plağı hiyalin kıkırdağı üzerinde etkili faktörlerin genetik mutasyonları sonucunda ortaya çıkan ve kondrodisplaziler adı verilen bir grup hastalık söz konusudur. Genellikle klinikte boy kısalığı (dwarfizm) ile

görülen bu hastalıklardan en sık görüleni FGF reseptör-3 (FGFR3) mutasyonları sonucunda ortaya çıkan Akondroplazi vakalarıdır (31, 32, 46).

2. İnsanlarda Sox9 geninde görülen mutasyonlar "Campomelik Displazi" adı verilen ve uzun kemiklerin deformite ve açılanması ile karakterize bir klinik tablonun ortaya çıkmasına yol açmaktadır (47).

2.4.1.2. Eklem Kıkırdağı Hastalıkları

1. **Artrit,** yaşlanmanın bir sonucu olarak ortaya çıkar. Özellikle kemiklerin eklem yapan yüzlerindeki hiyalin kıkırdağın dejenerasyonu sonucu gelişir. Zamanla bu dejenerasyon eklemlerde ağrı, kızarıklık, şişlik, sertleşme ve eklem hareketlerinde kısıtlanmalara yol açar (4).

2. **Osteoartrit**, hiyalin kıkırdağın dejenerasyonuna bağlı eklem kıkırdaklarında aşınma, yarılma ve yırtılmalar ile ortaya çıkar. Bu durum sonucunda zamanla eklem yapan kemik yüzlerinde kemik kemiğe sürtünme sonucu aşınma gelişir (13).

3. **Romatoid artrit**, artritin çok daha ağır bir çeşididir. İmmün sistemin kıkırdağı, kemiği ve sinoviyal membranı da içine alacak şekilde eklemin bütününü hedef aldığı bir tablodur. Tedavi edilmez ise kıkırdağı ve kemiği de içine alacak şekilde eklemde ciddi yıkım ve hasar oluşur (16).

2.5. Kıkırdak Dokunun Tamiri

Kıkırdak dokusu oldukça sınırlı yenilenme (rejenerasyon) kapasitesine sahiptir. Bunun başlıca nedenleri arasında kıkırdak dokusunun avasküler bir doku olması, olgun kondrositlerin proliferasyon gücünün düşük olması ve kondrositlerin matriks içerisinde hareketsiz olması sayılabilir. Hasar gören kıkırdak dokusunda tamir gerçekleşebilmesi için hasarlı bölgede perikondriyum dokusunun varlığına ihtiyaç vardır. Bu durumda perikondriyumun hücresel tabakasında yer alan kondrojenik prekürsör hücrelerin uyarılması ve önce kondroblastlara farklanmaları, ardından yeni matriks sentezi ve sonuçta kondrositlere farklanmaları süreçleri ardışık olarak

gerçekleşebilir. Sonuç olarak kıkırdak dokuda tamir kapasitesi oldukça sınırlı olup, hasarlı bölge genellikle bağ doku ile kaplanır.

Moleküler düzeyde incelendiğinde kıkırdak tamir sürecinin fibröz skar dokusunda yoğun olarak gözlenen kıkırdağı çevreleyen bağ doku fibroblastları kaynaklı tip I kollajen sentezi ile yeni farklanan kondroblastlar kaynaklı tip II kollajen gibi kıkırdak spesifik kollajenlerin sentezi arasında bir denge bulma süreci olduğu sonucuna varılabilir. Dolayısıyla erişkinde, hasarlı kıkırdak bölgesinde gözlenen bu bağ doku içerisinde yeni kan damarları oluşumu sonucunda sıklıkla hasarlı kıkırdak bölgesinde kalsifikasyon ve kemikleşme gözlenir. Hiyalin kıkırdakta kalsifikasyon ve kemikleşme endokondral kemikleşme mekanizması sürecinde gözlenen fizyolojik bir olgudur. Bunun yanı sıra yaşlanma hiyalin kıkırdakta kalsifikasyona yol açar. Kalsifiye kıkırdak matriksinin ortadan kaldırılmasını takiben yeni kemik dokusu oluşumu gerçekleşir (12, 13, 15, 16).

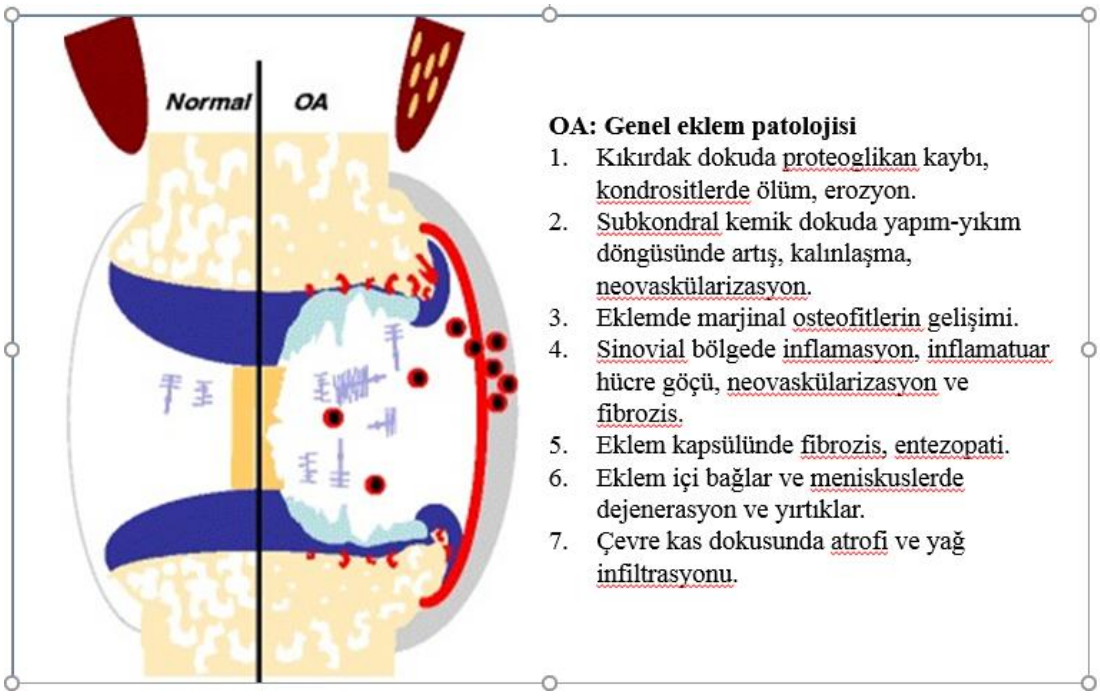
2.6. Osteoartrit ile İlgili Genel Bilgiler

2.6.1. Osteoartrit

OA, en sık görülen kas-iskelet sistemi hastalıklarından birisi olup dünya genelinde milyonlarca kişiyi etkilemektedir (48-52). OA'nın kronik bir hastalık olduğu bilinmekle birlikte ve önceden yaşlanma ile birlikte doğal olarak gelişen dejeneratif eklem hastalığı olduğu düşünülmekteydi. Günümüzde OA'in; yaşlanma, endokrin faktörler, sistemik hastalıklar, eklem bütünlüğünü etkileyen faktörler (travma vb.), genetik yatkınlık, lokal inflamasyon, mekanik güçler ile hücresel ve biyokimyasal süreçler gibi birçok faktöre bağlı olarak gelişen bir hastalık olduğu bilinmektedir (48-52).

OA'da görülen primer patolojik değişiklikler eklem kıkırdağındaki degredasyon, hasar ve sonuç olarak eklem yetmezliği tablosu şeklinde tanımlanabilir (48-52). OA, gelişen hasara ikincil olarak eklem bütünlüğünü sağlayan dokularda inflamasyon, hareket kısıtlılığı ve ilerleyici bir ağrı ile karakterizedir. Bu durum; eklem kıkırdağı, subkondral kemik, marjinal bölge, sinovium, eklem içi bağlar,

meniskusler, eklem kapsülü ve eklem çevresi kas dokusunun interaktif hasarlanmasını içeren patolojik bir süreç olarak tanımlanmaktadır (51).



Şekil 2.6. OA genel eklem patolojisi (51).

Osteoartrit, eklem bütünlüğüne katılan tüm dokuların ve eklem çevresi kasların patolojisi ile tanımlanan, dejeneratif, ilerleyici bir eklem hastalığıdır. Genel eklem patolojisi ve etkilediği eklem bileşenleri şu şekilde özetlenebilir:

1. Kıkırdak dokuda proteoglikan kaybı, kondrositlerde ölüm, erozyon.
2. Subkondral kemik dokuda yapım-yıkım döngüsünde artış, kalınlaşma, neovaskülarizasyon.
3. Eklemde marjinal osteofitlerin gelişimi.
4. Sinovial bölgede inflamasyon, inflamatuar hücre göçü, neovaskülarizasyon ve fibrozis.
5. Eklem kapsülünde fibrozis, entezopati.
6. Eklem içi bağlar ve meniskuslerde dejenerasyon ve yırtıklar.
7. Çevre kas dokusunda atrofi ve yağ infiltrasyonu.

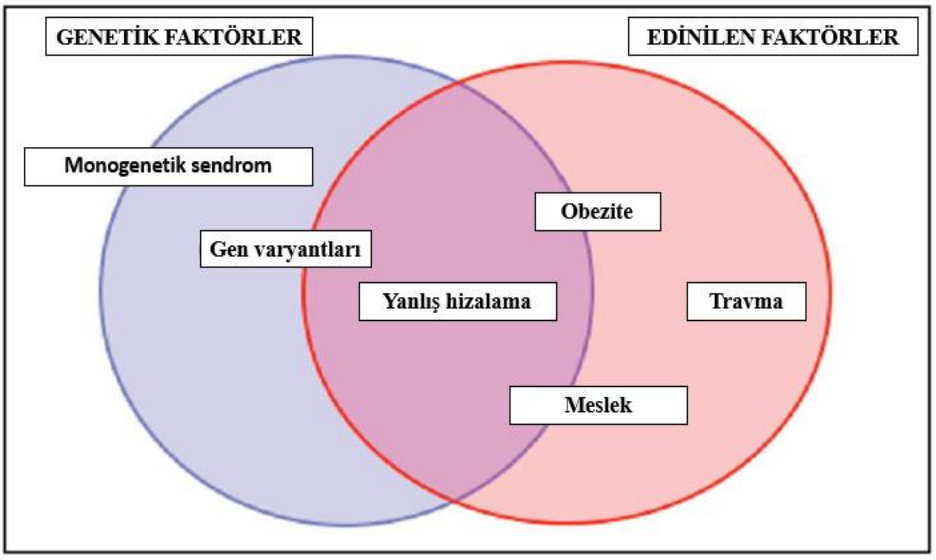
Diz OA'i, nedenine bağlı olarak primer veya sekonder olarak sınıflandırılabilir. Primer diz OA'i, bilinen bir neden olmaksızın kendiliğinden gelişen eklem kıkırdak dejenerasyonuna verilen isimdir. Bunun tipik olarak yaş, aşınma ve yıpranmaya bağlı dejenerasyon olduğu düşünülmektedir. Sekonder diz osteoartriti bilinen bir nedenden dolayı (travma vb.) eklem kıkırdağı dejenerasyonunun bir sonucudur (53, 54, 55).

2.6.2. Osteoartritin Epidemiyolojisi

Diz OA'i, teşhis edilen artritler içerisinde en yaygın olarak bulunan tiptir ve prevalansı ömür uzunluğu ve obezite artışına bağlı olarak artmaktadır. 60 yaşındaki kadınların %13'ü ve erkeklerin %10'unun diz OA semptomlarına sahip olduğu bilinmektedir. Diz OA prevalansı erkeklerde kadınlara oranla daha düşüktür(54, 56).

2.6.3. Osteoartritin Etiyolojisi

OA, çoklu risk faktörleri olan karmaşık bir hastalıktır. Bunlar hem genelleştirilmiş ana faktörleri (yaş, kadın cinsiyeti, obezite, aile öyküsü vb.) hem de lokal olumsuz mekanik faktörleri (travma vb.) içermektedir. Diz OA prevalansında önemli bir genetik bileşen vardır, ancak sorumlu genetik mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir (Şekil 2.7). Klasik ikiz çalışmaları, kadınlarda el ve diz OA gelişiminde genetik faktörlerin etkisinin % 39 ile % 65 arasında olduğunu göstermiştir (57).



Şekil 2.7.OA'nın etiyolojisi (57).

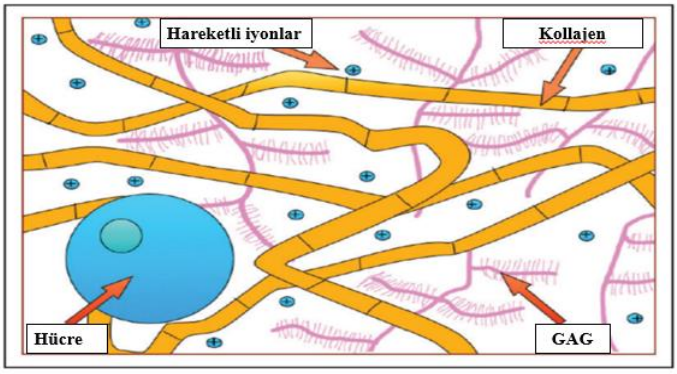
2.6.4. Osteoartritin Prevalansı

Diz OA'i, ABD'de % 33.6 (12.4 milyon) prevalans ile 65 yaş ve üstü yetişkinlerin çoğunu etkilemektedir. Kadınların prevalansı (% 42.1) erkeklerden (% 31.2) daha fazladır. Yorucu fiziksel aktivite, özellikle diz çökme, diz bükme, çömelme ve uzun süre ayakta durmayı gerektiren aktivitelerin yanı sıra diz travması ve yaralanması da semptomatik diz OA'sının yüksek prevalansıyla ilişkilendirilmiştir. Diz OA, diğer OA türlerine kıyasla daha yüksek bir prevalans oranına sahiptir (4).

2.6.5. Osteoartritin Histolojik Özellikleri

Eklem kıkırdağı avasküler, lenf içermeyen, anöral bir bağ dokusudur. Esnek aşınma direnci ve yüksek basınç dayanımı ile eklem kıkırdağı, düşük sürtünme yüzeyi sağlamada işlev görmektedir. Eklem kıkırdağında, su, yaş ağırlığın % 65-80'ini oluşturmaktadır. Kıkırdağın yaş ağırlığının %10'u, çekme mukavemeti sağlayan kollajenden oluşmaktadır (Şekil 2.8).

Tip II kollajen, toplam kollajenin % 90 ila % 95'ini oluşturan ve eklem kıkırdağına özgü olan başlıca fibriller kollajendir. Yüksek oranda çapraz bağlı birleşik, kollajen fibril ağı oluşturmaktadır. Tip II kollajen, çoğu proteaz tarafından bozunmaya karşı dirençlidir, ancak artrit patogenezinde rol oynayan kollajenazlar tarafından bozunabilir. Tip IX ve XI kollajen, eklem kıkırdağında bulunan diğer kollajen tipleridir. Bu kollajenleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar erken başlangıçlı OA'ya neden olabilmektedir (57).



Şekil 2.8. Kıkırdak dokusunun histolojik yapısı (57).

Eklem kıkırdağının ECM'si esas olarak su, yapıyı koruyan tip II kollajen ve kıkırdağa sıkıştırma ve kesme kuvvetlerine dayanma yeteneği sağlayan proteoglikanlardan oluşur. Osteoartritte erken dönemde proteoglikanların kaybı kıkırdak liflerini bozar ve kıkırdağın yumuşamasına neden olur ve su içeriğini arttırır.

Işık mikroskopisi ile gözlemlenen en erken kıkırdak hasarı işareti kondral fibrilasyon, ardından çatlaklar ve daha derin çatlaklardır. Kıkırdak kaybı kondrositlerin çoğalmasını ve aktivasyonunu uyarır. Hasarlı kıkırdak bölgesinde fibröz doku artışı, vaskülarizasyon, kalsifikasyon vb. patolojik değişiklikler görülebilir.

Hastalığın ileri döneminde subkondral kemik kalınlaşır ve sklerotik hale gelir. Eklemi yapan kemiğinin kenarlarında "kemik mahmuzları" veya "osteofit" olarak adlandırılan çıkıntılar oluşur (Tablo 2.4) (Şekil 2.6)

Tablo 2.3. OA'nın histolojik özellikleri (59).

Yaşlanmada Kıkırdak Değişimi	OA'da Kıkırdak Değişiklikleri
Su içeriği-Azalır	Su içeriği - Artar
Kollajen -Sabit	Kollajen - Dağınık
Proteoglikan içeriği-Azalır	Proteoglikan içeriği -Azalır
Proteoglikan sentezi-sabit	Proteoglikan sentezi - Artar
Kondrosit boyutu-Artar	Kondrosit boyutu - Sabit
Kondrosit sayısı-Azalır	Kondrosit sayısı - Sabit
Esneklik modülü-Artar	Esneklik modülü - Azalır

2.6.6. Osteoartritin Patofizyolojisi

Osteoartrit patogenezi çok faktörlüdür ve birbiriyle ilişkilidir. Mekanik aşınma ve yıpranma, yapısal dejenerasyon ve eklem iltihabı dahil üç ana süreç vardır. Ana sürecin eklemin aşırı yaşlanmasından kaynaklandığına inanılmaktadır, ancak etkilenen eklemlerin sinovusunda birkaç sitokin ve kemokinin seviyelerinin artması, inflamatuar

bir sürecin de mevcut olduğunu düşündürmektedir. Matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) aktive olur ve kıkırdak hücre dışı matrisinin bozulmasına neden olurlar. Kıkırdaktaki stres, kondrosit çoğalmasını ve aktivasyonunu teşvik ederek matriks parçalayıcı enzimlerin üretimine yol açmaktadır. Daha sonra hastalık durumunda, kondrositler apoptoz geçirmektedir ve hücre sayısı genel olarak azalmaktadır (58).

Eklem kıkırdağının ana maddesi öncelikle tip II kollajen, proteoglikanlar, kondrositler ve sudan oluşmaktadır. Sağlıklı eklem kıkırdağı, bileşenlerin her biri arasında sürekli bir denge sağlamaktadır, böylece kıkırdaktaki herhangi bir bozulma sentez süreci ile eşleşmektedir. Sağlıklı eklem kıkırdağı böylece korunmuş olmaktadır (60).

OA sürecinde MMP'ler veya indirgeyici enzimler aşırı ifade edilerek dengeyi bozmaktadır ve kollajen ve proteoglikanların genel kaybına neden olmaktadır. OA'nın erken aşamalarında, kondrositler MMP'lerin (TIMP'ler) doku inhibitörlerini salgılamaktadır ve bozunma sürecine uyması için proteoglikanların sentezini artırmaya çalışmaktadır. Ancak bu onarım süreci yeterli değildir. Denge kaybı, artan sentez, su içeriğinde artış, düzensiz kollajen modeli ve nihayetinde eklem kıkırdağı elastikiyetinin kaybına rağmen azalmış miktarda proteoglikan içeriğine sahiptir. Makroskopik olarak bu değişiklikler, kıkırdağın çatlaması ve sonuçta eklem yüzeyinin aşınmasıyla sonuçlanmaktadır (60). Subkondral kemik sklerozu ve kemik kisti oluşumu hastalıkta daha sonra ortaya çıkar ve eklem sertliği ve ağrısının artmasına katkıda bulunabilmektedir. İleri hastalık epizodik sinovit ile sonuçlanmaktadır. Nadiren de olsa eroziv OA'da kemik erozyonları görülebilmektedir (58). Kıkırdak degradasyonundan sorumlu enzimler diz osteoartritinde daha yüksek miktarlarda ifade edilirken, normal yaşlanan kıkırdakta normal seviyelerdedir (54).

2.6.7. Osteoartritin Semptomları

Dizde görülen semptomlar, sorunun nedenine bağlı olarak değişebilir. Diz OA'sının en yaygın semptomu diz eklemi çevresindeki ağrıdır. Ağrı donuk, keskin, sürekli veya aralıklı (kesik kesik) olabilir. Ağrı, hafif ila acı verici arasında değişebilir. Hareket kısıtlanabilir. Eklemde krepitasyon duyulabilir. Şişlik, kilitlenme görülebilir.

Esas olarak ağrı ile ilgili olan bu engellilikler genellikle yürüme, merdiven çıkma, ev işlerini yapma ve dik oturma güçlüğü ile kendini gösterir ve olumsuz psikolojik etkiye sahiptir ve bunların tümü yaşam kalitesinin düşmesine neden olabilir. Diz ağrısı yavaşça gelişebilir ve zamanla kötüleşebilir (en yaygın) veya ağrı aniden başlayabilir.

Sabahları, oturduktan veya uzun süre dinlendikten sonra yaygın olarak ağrı ve sertlik görülür. Zamanla, dinlenme sırasında veya geceleri de dahil olmak üzere ağrılı semptomlar daha sık ortaya çıkabilir. Ağrı, şiddetli aktiviteyle alevlenir. Oturduktan veya uzun süre dinlendikten sonra hastaların eklemlerinde görülen ağrı ve sertlik yaklaşık 30 dakika gibi kısa bir süre sonra geçer (4).

2.6.8. Risk Faktörleri

Yaş, OA için en belirgin risk faktörlerinden biridir. Yaşla birlikte artan OA insidansı, çeşitli risk faktörlerine kümülatif maruz kalmanın ve eklem yapılarındaki biyolojik yaşla ilişkili değişikliklerin bir sonucudur. Diz OA'i için güçlü kanıt, kadın cinsiyeti, obezite ve önceki diz yaralanması dahil olmak üzere çeşitli orta ila güçlü risk faktörlerini göstermektedir. Diz hizalanması da orta ila güçlü bir risk faktörüdür ve diz ekstansör kas zayıflığı muhtemelen zayıf bir risk faktörüdür (61).

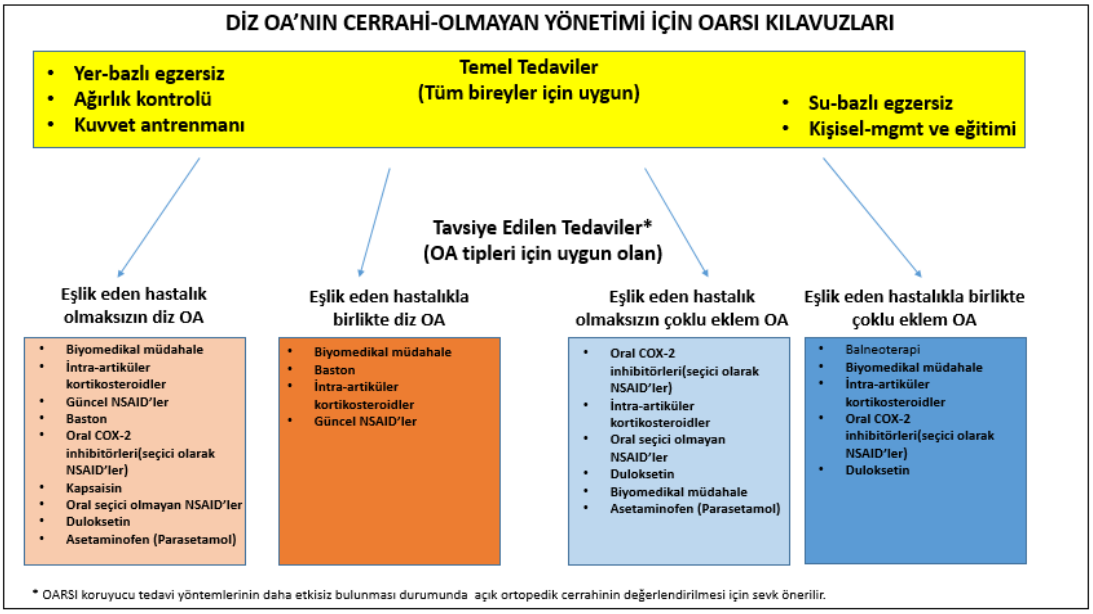
Ağır iş aktiviteleri hem kalça hem de diz OA'i için risk faktörleridir; çiftçilik veya inşaat endüstrisindeki istihdam özellikle kalça OA'i ile ilişkilidir ve sık diz çökme ve ağır kaldırma gerektiren işler diz OA'i ile ilişkilidir. Bazı yüksek etkili sporların (örneğin futbol, hentbol, hokey, güreş, ağırlık kaldırma ve uzun mesafeli koşu) kalça OA'i veya diz OA'i riskinin artmasıyla orta ila güçlü bir şekilde ilişkili olduğu bildirilmiştir (61).

2.6.9.Günümüzde Farmakolojik Ajanlar ile Osteoartrit Tedavisi

Günümüzde farmakolojik ajanlar ile OA tedavisi genellikle kronik seyir sürecindeki semptomların önlenmesine yöneliktir (62). Steroid olmayan yangı giderici ilaçlar (non-steroid anti-inflamatuar ilaçlar, NSAİİ) ve ağrı kesiciler ile semptomların baskılanamadığı döneme erişildiğinde girişimsel ortopedik cerrahi yöntemler ile eklem içine kortikosteroidlerin enjeksiyonu, eklem içi cerrahi temizleme vb. girişimler

ve son aşamaya erişen vakalarda ise total eklem protezleri ile replasman denenmektedir (63).

Farmakolojik ajanlar ile tedavi uygulamaları sürekli ve dinamik bir değişim göstermektedir (48) Bu çalışmanın da konusu olan diz eklemi OA'sının cerrahi olmayan tedavi yaklaşımlarına yönelik öneriler yakın geçmişte Osteoarthritis Research Society International (OARSI) tarafından güncellenmiş ve yayınlanmıştır (48).



Şekil 2.9. OARSI tarafından önerilen diz eklemi OA'sının cerrahi olmayan tedavi yaklaşımları ve kullanılması önerilen farmakolojik ajanlar (48).

Görüldüğü gibi egzersiz, kilo kontrolü, eklemi güçlendirme çalışmaları, yürümeye destek cihazlar, yanı sıra biyomekanik ajanlar, intra-artiküler uygulanan kortikosteroidler, topikal NSAİİ, oral COX-2 inhibitörleri, Capsaicin, oral NSAİİ, Duloxetine, Acetaminophen kullanımı gibi uygulamalar halen kabul görmektedir. Bunlar dışında kalan daha pek çok uygulama da (glukozamin, hyoluranik asit, opioidler vb.) bu derleme kapsamında değerlendirilmiş olup ya uygun olmadıklarına ya da uygulama sonuçlarının başarısının şüpheli olduğuna karar verilmiştir (48).

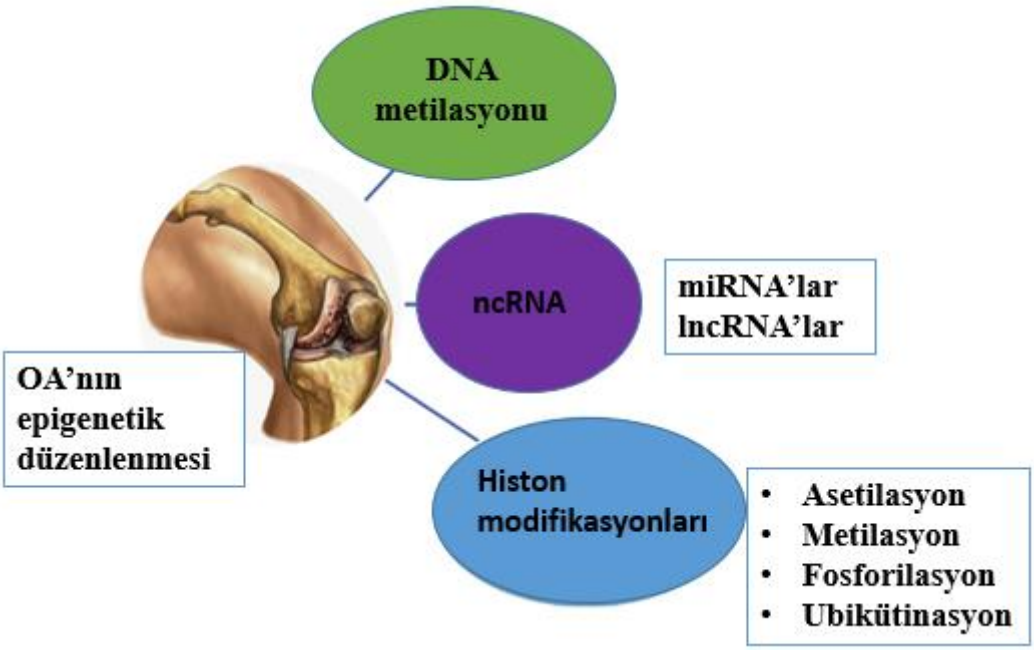
OA'nın temel patolojik mekanizmalarına göre hastalık durumunu değiştirebilir nitelikte başarılı bir farmakolojik tedavi yaklaşımının bulunmadığı ve mevcut

farmakolojik uygulamaların daha çok semptomların ortadan kaldırılmasına ve hayat kalitesinin arttırılmasına yönelik olduğu gerçeği güncel derlemelerin temel çıkarımı olmaya devam etmektedir (48-52, 54). Bu alanda geliştirilecek yeni farmakolojik ajanların; profilaktik etkiye ve/veya progresyonu yavaşlatıcı etkiye ve/veya gelişen kıkırdak hasarını geri döndürücü hastalık durumunu değiştirebilir, iyileştirebilir özelliklere sahip olması beklenmektedir.

2.6.10. OA Patogenezinin Epigenetik Düzenlenmesi

Her hücrenin epigenomu benzersiz olmasına rağmen, diyet, egzersiz, sigara ve hastalık durumu gibi çevresel uyaranlara yanıt olarak zamansal ve mekansal değişikliklere uğrayabilir.

Epigenetik faktörler, bir dizi patolojik durumla ilişkili olabilir. Bunlar DNA metilasyonunu, kodlamayan RNA'ların (ncRNA) ifadesini ve transkripsiyonel ve/veya transkripsiyon sonrası seviyelerde gen ifadesini düzenleyen histon modifikasyonlarını içermektedir (Şekil 2.10) (64).



Şekil 2.10. Osteoartritin epigenetik düzenlenmesi (64).

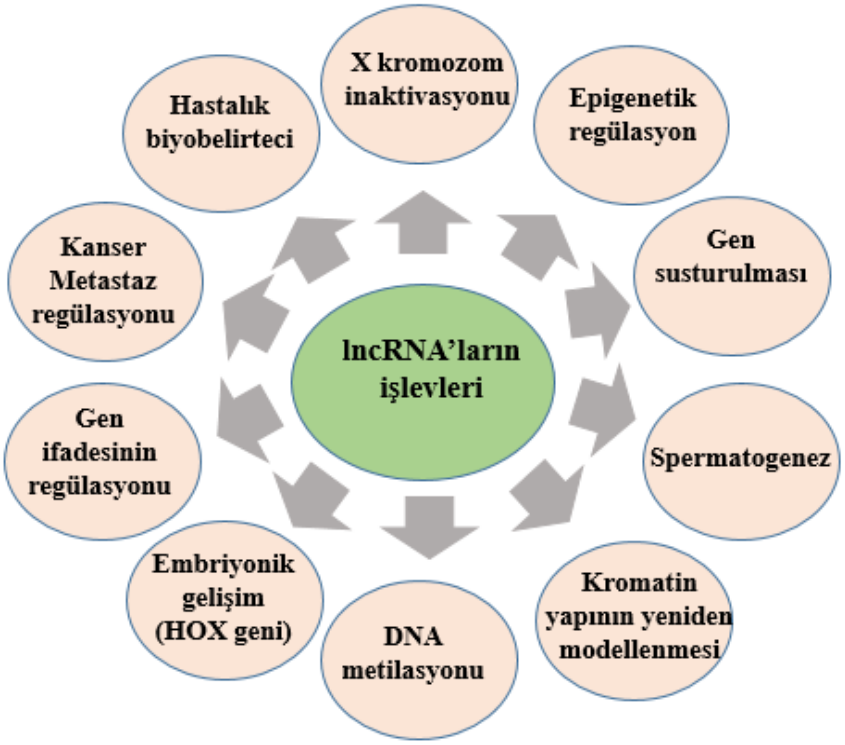
OA'nın moleküler patogenezinin üç farklı epigenetik regülasyonu bulunmaktadır. DNA metilasyonu, kodlayıcı olmayan RNA'ların (ncRNA'lar: miRNA'lar ve lncRNA'lar) ifadesi ve histon modifikasyonları bu süreçte önem taşımaktadır (Şekil 2.10)(64). Histon asetilasyonu, histon metilasyonu, fosforilasyon ve ubikuitinasyon OA'da yer alan başlıca histon modifikasyonlarıdır (64).

Khan ve Haqqi bazı kodlayıcı olmayan RNA'ların (ncRNA'lar) OA oluşumu ve gelişiminin moleküler düzenleyicileri arasında yer aldığını önermişlerdir (64). Ek olarak, Chen ve arkadaşları, lncRNA'ların, hücre dışı matriksin (ECM) bozulması ve inflamatuar yanıtlar dahil olmak üzere çeşitli OA süreçlerini kontrol ettiğini ortaya koymuştur(65). Örneğin, lncRNA MALAT1, miR-150-5p/AKT3 sinyal yolağını hedefleyerek kıkırdak matriksinin bozulmasını ve OA'yı tetiklemektedir (64).

Chen ve ark. lncRNA maternally expressed gene 3 (MEG3)'ün, OA'da miR-93 ve TGFBR2 ifadesini düzenleyerek kondrosit proliferasyonu, apoptoz ve ECM degredasyonu modüle ettikleri ve OA'nın ilerlemesinde lncRNA prostate androgen-regulated transcript-1 (*PART1*)'in altında yatan moleküler mekanizmasının miR-373-3p/sox-4 yolağı ile düzenlemekte olduğunu göstermiştir (11).

2.7. Uzun Kodlayıcı Olmayan RNA'lar (LncRNA'lar)

Uzun kodlayıcı olmayan RNA'lar (lncRNA'lar), 200 nükleotitten daha uzun yapıya sahip, yeni keşfedilen, kodlayıcı olmayan RNA (ncRNA'lar) sınıfının bir üyesidir. Son yıllarda hücresel ve biyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde önemli roller oynadıkları gösterilmiştir (Şekil 2.11). LncRNA'lar gen ekspresyonunu mikro-RNA'lar yoluyla transkripsiyon sonrası seviyede düzenler ve kromatin regülasyonu yoluyla transkripsiyonel gen susturmayı modüle ederler (66).



Şekil 2.11. LncRNA'ların biyolojik süreçlerdeki çeşitli işlevleri (67).

DNA'nın sadece % 2'si insan hücrelerindeki proteinleri kodlar. Protein kodlamayan birçok transkript yakın zamanda büyük ölçekli genomik çalışmalarda tanımlanmıştır. Bu RNA'lar ifade edilmemelerine rağmen, transkripsiyonel ve transkripsiyonel olmayan süreçlerin düzenlenmesinde kritik roller oynarlar.

Kodlamayan RNA'lar (ncRNA), gen ekspresyonunu düzenleyen ancak proteinlere çevrilmeyen fonksiyonel RNA molekülleridir. İki tip ncRNA vardır - kısa ncRNA'lar <30 nükleotid ve uzun ncRNA'lar (lncRNA'lar) >200 nükleotid uzunluğundadır (68).

Ayrıca, kısa ncRNA'lar temel olarak üç tipte sınıflandırılmıştır: mikroRNA'lar (miRNA'lar), piwi ile etkileşen RNA'lar (piRNA'lar) ve kısa müdahaleci RNA'lar (siRNA'lar). Bu ncRNA'lar, transkripsiyon veya translasyon seviyelerinde gen ekspresyonunu düzenler. miRNA'lar genel olarak protein ekspresyonunu değiştirir ve böylece hedef mRNA'daki spesifik bir tamamlayıcı diziye bağlanarak esas olarak transkripsiyon sonrası seviyede etki eder ve translasyonu bloke eder (68).

Bu kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar) geniş olarak küçük ncRNA'lar (mikroRNA'lar miRNA'lar, siRNA'lar ve piRNA'lar dahil <200 nükleotit) veya uzun kodlamayan RNA'lar (> 200 nükleotit) olarak sınıflandırılabilir. miRNA'lar, en yaygın olarak incelenen küçük ncRNA alt sınıfıdır ve hedef mRNA transkriptlerine bağlanma yoluyla çoklu genlerin ekspresyonunu post-transkripsiyonel olarak düzenleyebilirler (64).

miRNA'ların tümör oluşumu ile ilişkili olduğu bulunmuştur ve miRNA ekspresyonundaki değişikliklerin değerlendirilmesi tümör oluşumu ve ilerlemesini daha iyi anlamak için yararlı bilgiler sağlayabilir (68)

lncRNA'lar, kodlama kapasitesi olmayan ökaryotik RNA'lardır. LncRNA ekspresyonundaki değişikliğin tümör gelişimi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir ve bazı lncRNA'ların çeşitli tümör tiplerinde kanser biyobelirteçleri ve potansiyel hedefler olarak kullanıldığı bildirilmektedir (68)

lncRNA'ların, yarışan endojen RNA'lar (ceRNA'lar) olarak işlev gördükleri, burada lncRNA'ların miRNA'ları aynı kökenli mRNA hedeflerine bağladıkları ve bu hedeflerden korudukları gösterilmiştir. Dolayısıyla, mRNA'ların miRNA aracılı baskıya aracılık etmesi önlenebilir. Önceki bir çalışma, miRNA-mRNA veya miRNA-ceRNA çiftlerindeki küçük konsantrasyon değişikliklerinin, gen ekspresyon ağının düzenlenmesini önemli ölçüde etkileyebileceğini göstermiştir. Örneğin, lncRNA HULC'nin daha önce endojen bir etken gibi davrandığı ve karaciğer kanserinde tümör oluşumunda önemli bir rol oynayan miR-372'yi inhibe ettiği gösterilmiştir. Kaslara özgü lnRNA, linc-Mdi, miR-133 ve miR-135'i eksprese ederek ve böylece MaM1 ve MeF2c'nin ekspresyonunu modüle ederek kas farklılaşmasını düzenlemektedir. Fizyolojik ve patolojik süreçlerde lncRNA'ların işlev ve mekanizmalarının araştırılmasındaki son gelişmeler, lncRNA'ların miRNA aracılı gen regülasyonunun zaten karmaşık sistemi içinde işlev görme olasılığının artmasına yol açmıştır (68).

Örneğin, siRNA'lar kullanılarak, lncRNA AATBC'nin mesane kanseri hücrelerinde intrinsik apoptozu indüklediği gösterilmiştir (69).

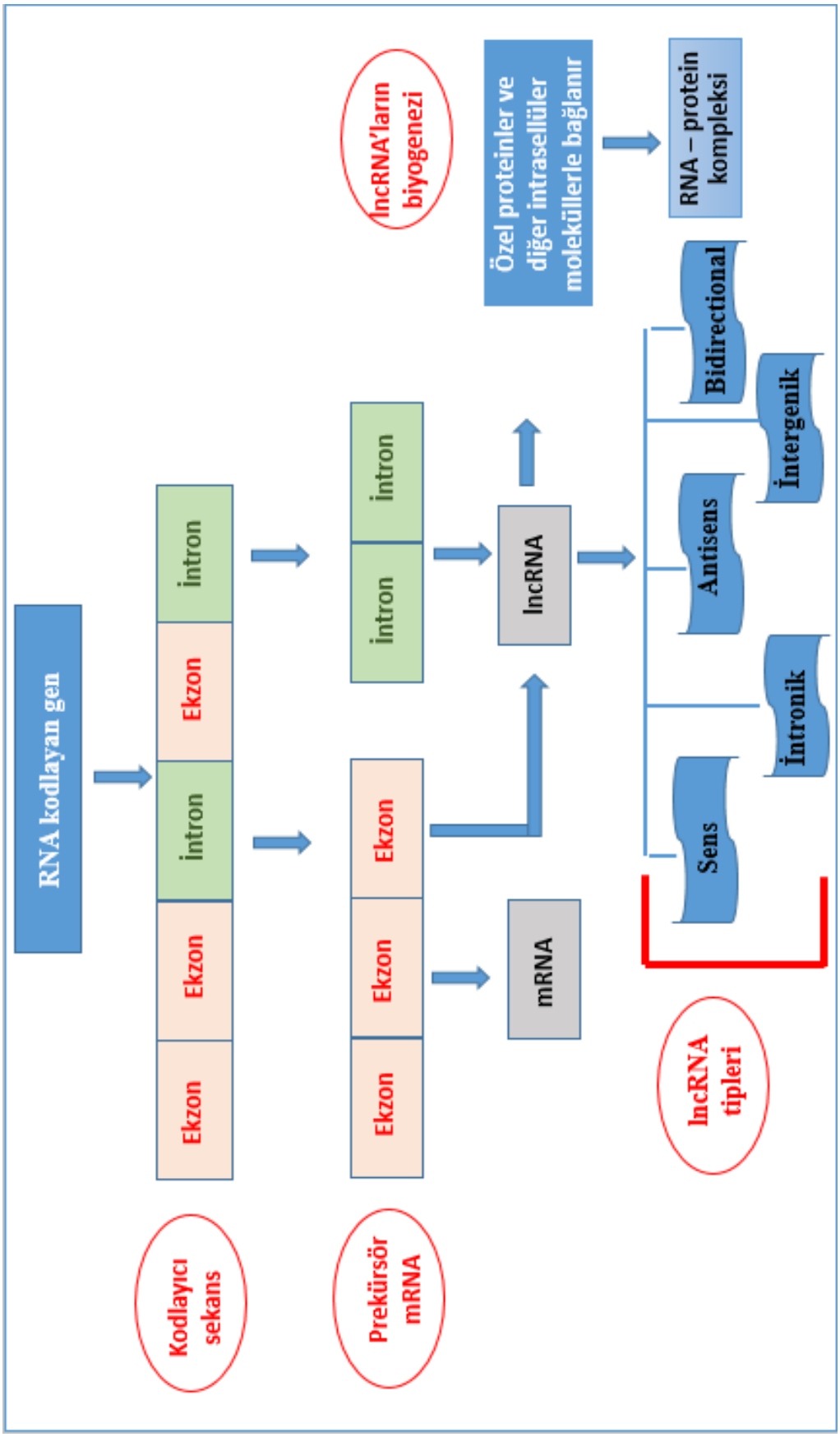
2.7.1. LncRNA’lerin Biyolojik İşlevleri

lncRNA'ların yapısal özellikteki çeşitliliklerinden çok çeşitli biyolojik işlevler tanımlanmıştır. Bu işlevler öncelikle gen transkripsiyonu, epigenomik düzenlenme, protein kodlayan genlerin translasyonu, RNA turnover, kromatin organizasyonu ve genom savunmasını içermektedir. Şimdiye kadar belirlenen fonksiyonların çoğunun, hem protein kodlayan genlerin hem de diğer kodlayıcı olmayan RNA'ların Şekil 2.12'de sunulan çok sayıda etki mekanizması yoluyla gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı belirtilmiştir (67).

Genel olarak, lncRNA'lar 5 kategoriye ayrılır:

1. sense lncRNA’lar,
2. antisense lncRNA’lar,
3. bidirectional lncRNA’lar,
4. intronic lncRNA’lar,
5. intergenic lncRNA’lar.

Yukarıda belirtilen lncRNA’ların fonksiyonlarına göre yapılan sınıflandırılmaları 3 farklı duruma göre düzenlenir. LncRNA’lar diğer proteinlere rakip olarak, DNA bağlayıcı proteinlere bağlanabilir ve diğer proteinlerin hedefe bağlanmasını engelleyebilir (transkripsiyon faktörleri örnek olarak verilebilir). Örneğin lncRNA, DNMT1 hedef DNA'ya nihai olarak bağlanabilir ve hedef genin transkripsiyonel aktivasyonunu etkileyen bağlanmayı inhibe ederek DNA metilasyonunu etkileyebilir. İkinci olarak, lncRNA bir enhancer olarak davranabilir ve lncRNA’lar epigenetik değiştiricileri bazı hedef bölgelere alarak, DNA metilasyonunu güçlendirebilir. Son olarak, lncRNA’lar, dicer gibi bazı RNazlarla sindirim yoluyla miRNA'nın bir öncüsü olarak hareket edebilir (67).



Şekil 2.12. LncRNA'ların biyogenezi ve sınıflandırılması (67).

LncRNA’ların özellikleri:

1. LncRNA transkripti, protein kodlayan genin downstream promotor bölgesinde RNA polimeraz II ile direk olarak ilişki kurabilir ve böylece protein kodlayan genin ekspresyonunu inhibe edebilir.
2. LncRNA’lar hedef genlerin transkripsiyonunu aktive edebilen spesifik gen bölgelerindeki histon modifikasyonlarını kolaylaştıran kromatin yeniden modellenmeyi bir araya getirir.
3. LncRNA antisense, splayz bölgelerinin splayzom tarafından tanınmasını engelleyerek ve böylelikle alternatif olarak eklenmiş bir transkripte yol açarak sense transkript ile overlap yaparak hibridize olabilir.
4. Alternatif olarak, lncRNA'lar, daha sonra endojen siRNA'lar (endo-siRNA'lar) üretmek için Dicer tarafından ayrılan çift sarmallı RNA'ları (dsRNA'lar) oluşturmak için sense veya antisens transkriptleri ile hibritlenir.
5. LncRNA'lar spesifik protein partnerleriyle etkileşime girer ve daha sonra aktivitelerini düzenler.
6. Bazı lncRNA'lar, protein stabilitesini korumak için RNA-protein komplekslerini oluşturan proteinlere bağlanabilir.
7. Protein aktivitesini modüle etmek ve yapısal bileşenler olarak hizmet etmeye ek olarak, lncRNA'ların proteinlere bağlanması hücre altı lokalizasyonlarını etkileyebilir.
8. miRNA'lar ve piRNA'lar gibi küçük ncRNA'lar üretmek için bir dizi lncRNA post-transkripsiyonel olarak işlenebilir.
9. LncRNA'lar, rakip endojen RNA'lar (ceRNA'lar) ya da doğal miRNA sponge olarak işlev görür. ceRNA’lar titre edilen miRNA varlığına bağlı olarak her biri yarışarak paylaşılan miRNA’ya bağlanarak birbirleri ile iletişim kurabilir ve birlikte düzenlenebilirler.

İnsan gelişimi ve hastalıklarının önemli etkileri ve gen düzenleyici ağların anlaşılmasında lncRNA ve miRNA’ların arasındaki ilişki yeni bakış açısı sağlayabilir. Ayrıca, lncRNA'lar transkripsiyonun çeşitli yönlerinden translasyona kadar hücre moleküler fonksiyonlarının çoğunda anahtar rol oynarlar. Bilinen lncRNA'ların sadece çok küçük bir kısmı bugüne kadar tamamen karakterize edilmiş olsa da, gelecekteki

çalışmalar muhtemelen bu ve diğer fonksiyonel paradigmalara uyan daha fazla transkript belirleyecektir (70, 71).

Son çalışmalar, lncRNA'ların hücre farklılaşması, hücre proliferasyonu, hücre apoptozu, kromatin regülasyonu ve hücre döngüsü progresyonu gibi sayısız moleküler süreçte yer alan temel rollerinin yanı sıra prostat kanseri de dahil olmak üzere bazı tümör başlangıcı ve progresyonunda etkili olduğunu kanıtlamıştır. Örneğin, farklı lncRNA, PCA3'ün hem mide kanserinden hem de prostat kanserinden sorumlu bir biyobelirteç olarak işlev gördüğü, böylece MEG3'ün kanser hücresi çoğalmasını kısıtlayabildiği veya prostat kanseri dokularında ve hücrelerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir (71).

Hem miRNA'ların hem de lncRNA'ların oral squamous cell carcinoma (OSCC)'de yer alan patolojik süreçlerde rol oynadığı gösterilmiştir. miRNA'lar mRNA translasyonunu baskılayabilen veya transkripsiyon sonrası RNA degradasyonunu indükleyebilen 20-25 nükleotid uzunluğunda küçük kodlayıcı olmayan RNA'lardır (72).

2.7.2. LncRNA Uzunluğu

Protein kodlamayan ve uzunluğu 200 nükleotitden fazla olan kodlayıcı olmayan transkriptler, lncRNA'lar olarak bilinir. Bir lncRNA'nın uzunluğu 2 kb'den fazla olabilirken, kodlama potansiyelleri 100 amino asitten azdır (67).

Cao ve arkadaşları, insan genomunda transkripsiyonel ilerlemenin % 20'sinin protein kodlayan genlerle ilişkili olacağını göstermiştir. Bu bilgi lncRNA'ların kodlayıcı RNA sekansından dört kat daha uzun olduğunu göstermektedir (67, 74).

2.7.3. Genomdaki Lokalizasyonu

LncRNA'lar genlerin intronik bölgeleri de dahil olmak üzere çoğunlukla genomdaki zayıf korunmuş bölgelerde bulunmaktadır. Ayrıca, bazı lncRNA'ların, protein kodlama lokusu içindeki bir DNA dizisinin ipliklerinden birinden kopyalandığı bildirilmektedir.

LncRNA'ların genomik yerleri, evrimsel korunmaları ile doğrudan ilişkilidir. Araştırma bulguları ve bilimsel tartışmalar, lncRNA'ların çokluğunun, protein kodlayan genlere kıyasla evrimsel olarak daha az korunduğunu göstermektedir. İlginç bir şekilde, lncRNA'ların promotor bölgeleri, lncRNA'ların sekansına kıyasla daha fazla korunmaktadır. Bazı lncRNA'larda açık okuma çerçevelerinin varlığı, bu moleküllerin protein kodlayan RNA'lardan ayırt edilmesini zorlaştırır.

X-kromozom inaktivasyonundan sorumlu olan lncRNA geni "X İnaktif Spesifik Transkript" (veya Xist), genomda daha az korunmuş bir bölgede bulunan lncRNA örneklerinden biridir (67).

2.7.4. LncRNA'ların Sınıflandırılması

LncRNA'lar yapı, fonksiyon, lokalizasyon, metabolizma ve protein kodlayan genler veya diğer DNA elementleri ile etkileşimine göre sınıflandırılır. LncRNA'nın sekonder ve üçüncül yapıları, birincil yapısına kıyasla büyük ölçüde korunur. Bu yüksek moleküler ağırlıklı moleküllerin yapı-işlev ilişkisini çalışması zordur çünkü kristalleşmeleri zordur. NcRNA'lar alanındaki son gelişmeler, OA dahil birçok hastalığın patogenezinde bu moleküllerin önemini ortaya çıkarmıştır (72).

Kıkırdak yaralanması ile ilişkili lncRNA, OA'da kondrosit hücre dışı matriks bozulmasını teşvik eder. Ayrıca, lncRNA Plasmacytoma variant translocation 1 (PVT1)'in ekspresyon düzeyi OA kondrositlerinde arttığı ve PVT1'in aşırı ekspresyonu normal kondrositlerin apoptozunu uyardığı gösterilmiştir. Son yıllarda, Zhao ve arkadaşları, intervertebral disk dejenerasyonu ve omurilik yaralanması olan hastalarda lncRNA'ların genom çapında tanımlanmasını belirttiler (76).

2.7.5. Osteoartritte Uzun Kodlanmayan RNA'lar

LncRNA'lar yaygın biyolojik işlevlere sahiptir ve 5′-cap, 3′-polyA kuyruğuna sahip oldukları ve transkripsiyonel aktivite sergileyen çoklu ekzonlara eklemede rol oynadıkları gösterilmiştir. Son çalışmalarda, lncRNA'ların OA kıkırdağında anormal şekilde eksprese edildiği ve bu nedenle kondrosit hücre dışı matriksin dejenerasyonuna katkıda bulunduğunu göstermiştir. Ek olarak, Fu ve meslektaşları, kıkırdak örneklerindeki normal ifade düzeylerini lncRNA ifade profiliyle karşılaştırıldığında

OA kıkırdağında 3007 ifadesi artmış lncRNA ve 1707 ifadesi azalmış lncRNA olduğunu göstermiştir. Toplamda, insan OA kıkırdağında bir dizi farklı ifade edilen lncRNA bulunmaktadır (Tablo 2.5) ve OA patogenezindeki rollerini belirlemek için bu lncRNA'nın fonksiyonel olarak araştırılması gereklidir (64).

Lu ve ark. (76) LncRNA PART1, OA'da miR - 590-3p etkeni kondrositlerin hücre canlılığını ve apoptozunu düzenlemek için TGFBR2 / Smad3'ü hedeflediğini söylemişlerdir. *PART1*'in ifadesi, OA hastalarının kıkırdak dokusunda düşük düzeyde bulunmuştur. *PART1*'in susturulmasının hücre canlılığında düşüşe neden olduğu ve kondrosit apoptozunu uyardığı bulunmuştur. *PART1*'in yüksek düzeyde ifadesi IL-1β uyarılmasının neden olduğu etkileri tersine çevirebilir ve böylece apoptozu yavaşlatabilir. Ayrıca miR-590-3, *PART1* tarafından ifadesi azaldığı için *PART1* ile negatif şekilde ilişkilendirilmiştir. Aksine TGFBR2'nin, *PART1* ile pozitif ilişkili olduğu bulunmuştur. *PART1*'in ifadesindeki azalmanın hücre canlılığında düşüşe neden olduğu ve hücre apoptozunun miR-590-3p etkeni ile susturulması ya da TGFBR2'nin ifadesindeki artış tarafından kısmen tersine çevrilerek indüklediği gösterilmiştir. *PART1*' in aşırı ifadesi hücre canlılığını arttırır. Caspase 3 aktivitesini ve apoptotik hızı azaltır ve uyarılan kondrositlerdeki miR-590-3p etkeni ifadesindeki artış ya da TGFBR2'in susturulması kısmen zayıf bir etki oluşturmuştur (78).

Zhu ve ark (11) lncRNA PART1, OA'da kondrosit proliferasyonu, apoptoz ve ECM degredasyonunu miR-373-3p/SOX4 etkeni ile düzenlemektedir. OA'daki kıkırdak dokusu ve kondrositlerde *PART1* ve SOX4 ifadesinde artma olurken miR-373-3P etkeni ifadesinde azalma meydana gelmiştir.PART1'in susturulması hücrelerin proliferasyonunu ve ECM degredasyonunu engellemiştir ve OA kondrositlerinde hücre apoptozunu tetiklemiştir.*PART1* SOX4 ifadesini, miR-373-3p hedefleyerek modüle etmiştir. MiR-373-3p etkeninin inhibisyonu, *PART1*'e müdahale ederek indüklenen hücre proliferasyonunun, ECM degredasyonunun ve apoptozun düzenlenmesini sağlamıştır. SOX4'ün ifadesindeki artış, PART1'in inhibe edilmesiyle indüklenen OA gelişimi üzerindeki etkilerini eski haline getirmiştir (11)

Lu ve ark. (76) yapmış olduğu çalışmada smad3 ifade düzeyi kontrol grubuna oranla OA hasta grubunda düşük bulunmuştur ve PART1 ifade düzeyi ile pozitif ilişkili bulunmuştur. PART1'in işlevsiz hale getirilmesi hem smad3'ün ve hem de miR-590-3p inhibisyonu ve TFGBR2 ile tersine çevrilen ifadesi artmış p-smad3'ün

protein seviyelerini düşürür. Sonuç olarak lncRNA PART1'in, TGFBR2/smad3 sinyallemesini düzenleyen miR-590-3p'nin etkisi ile OA'da kondrositlerin apoptozunu düzenlediği bulunmuştur (76).

Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar, lncRNA'ların ECM degradasyonunun düzenlenmesindeki ve inflamatuar yanıttaki rolünü tanımlamıştır. Liu ve ark., OA kıkırdak ve OA kondrositlerinde yüksek oranda eksprese edilen kıkırdak hasarı ile ilişkili lncRNA (lncRNA-CIR) olarak adlandırılan yeni bir lncRNA tanımlamışlar. OA kondrositlerinde anabolik genler COL2A1 ve ACAN olarak belirlenmiştir. Ek olarak, Pearson ve ark. OA'da inflamasyonun düzenlenmesinde rol oynayan iki yeni kondrosit lincRNA'yı (CILinc01 ve CILinc02) belirlemiştir (64).

Tablo 2. 4. LncRNA'ların OA üzerine etki mekanizmaları.

LncRNA	Etkilediği yolak	Fonksiyonu	Referans
lncRNA PART1	miR-373-3p/SOX4 axis	Kondrosit proliferasyonunu, apoptoz ve ECM degredasyonunu modüle eder.	[11]
lncRNA-ATB	Akt signaling	Kondrosit viabilitesini ve proliferasyonunu uyarır.	[77]
lncRNA PART 1	TGFBR2/Smad 3 miR-590-3p	Kondrositlerin hücre canlılığını ve apoptozunu düzenler.	[76]
lncRNA-KLF3-AS1	miR-206/GIT1 axis	Kondrosit proliferasyonunu uyarır.	[78]
lncRNA DILC	IL-6 ifadesi	Kondrositlerde IL-6 ifadesini düzenler.	[79]
lncRNA MIR4435-2HG	MIR4435-2HG	Kondrosit hücre proliferasyonunu ve apoptozu düzenler.	[80]
lncRNA MALAT1	miR-150-5p/AKT3 axis	MALAT1, hücre proliferasyonu, apoptoz ve ECM degradasyonunu düzenler.	[81]
lncRNA ANRIL	miR-122-5p/DUSP4 axis.	OA sinoviyositlerinin proliferasyonunu ve apoptozunu düzenleyerek OA'nın ilerlemesini etkiler.	[82]
lncRNA CASC2	IL-17 ifadesi	Kondrosit proliferasyonunun ve apoptozunun düzenlenmesine katılır.	[83]
lncRNA PACER	HOTAIR	Kondrosit apoptozunu ve lncRNA HOTAIR ifadesini düzenler.	[84]
lncRNA MFI2-AS1	miR-130a-3p/TCF4	Lipopolisakkarit ile indüklenen OA ilerlemesini inhibe eder.	[85]
lncRNA MALAT1/MiR-145	MALAT1/miR-145 axis	OA'da ADAMTS5 regülasyonu ile kıkırdak matriks degredasyonunu indükler.	[86]
lncRNA XIST/miR-211 axis	CXCR4 ve MAPK sinyal yolağı	OA kondrositlerinin proliferasyonunu ve apoptozunu modüle eder.	[87]
lncRNA PCGEM1	OTAIR, PCGEM1 ve GAS5	OA'nın farklı aşamaları için biyobelirteç görevi vardır.	[88]
lncRNA-p21	miR-451	OA'da kondrosit apoptozunu uyarır.	[89]
lncRNA TUG1	miR-195/MMP-13 axis	OA'nın neden olduğu kondrosit hücre dışı matrisin bozulmasını teşvik eder.	[90]
lncRNA PVT1	miR-488-3p	OA'da kondrosit apoptozunu teşvik eder.	[91]
lncRNA-CIR	Otofaji yolağı	Otofajiyi düzenleyerek osteoartritte eklem kıkırdak dejenerasyonunu destekler	[92]
lncRNA DANCR	miR-216a-5p-JAK2-STAT3 axis	OA'de kondrositlerin çoğalmasını ve apoptozunu düzenler.	[93]
lncRNA DANCR	miR-590-3p	OA'da kondrositlerin proliferasyonunu ve apoptozunu düzenler.	[94]

2.7.6. LncRNA PART1

Prostate androgen-regulated transcript 1 (*PART1*), insan prostat-spesifik ve androjen-regüle edici gen olarak bilinen uzun kodlanmayan RNA'dır. Lokalizasyonu kromozom 5q12'dir. *PART1* ekspresyonu prostat bezinde yüksek düzeyde bulunmuştur ve prostat tümörünün başlaması ile ilişkilidir. Son yıllarda, prostat kanseri dışında diğer kanser tiplerinde de *PART1* ekspresyonunda bozukluklar tespit edilmiştir (94).

LncRNA *PART1* küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve prostat kanserini içeren birçok kanserde onkogen olarak işlev gördüğü rapor edilmiştir. Bununla birlikte, *PART1*'in tümör önleyici işlevini kolorektal kanser üzerinde kullanıp kullanmadığı bilinmemektedir (95).

İleri düzeydeki küçük-hücreli olmayan akciğer kanserli dokularda *PART1* ekspresyonu anlamlı bir şekilde arttığı bilinmektedir. Yüksek düzeydeki *PART1* düzeyi bu hastalarda daha kısa sağkalım ile ilişkilidir. Özellikle, kolorektal kanserli doku ve hücrelerde, *PART1* ekspresyonu artmıştır. Bununla birlikte *PART1* geninin susturulması kolorektal kanser hücrelerinin metastazında ve proliferasyonunda inhibisyona yol açmıştır. Buna rağmen, bu kanserdeki mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (94).

PART-1 ağırlıklı olarak tükürük bezinde düşük bir ifade seviyesine sahiptir ve prostatta yüksek düzeyde ifade edilir. Bu nedenle insan prostat kanseri hücrelerinde androjenler tarafından düzenlenir. Bu veriler, normal ve neoplastik prostat gelişimi hakkında daha fazla bilgi sağlayabilecek prostat androjen yanıtta önemli bir moleküldür (96).

LncRNA PART1, prostat kanser hücrelerinde olumlu bir şekilde ifade edilen ve androjenler tarafından transkripsiyonel olarak modüle edilen yeni bir tümör belirteci olarak tanımlanmıştır (27, 96, 97)

Bununla birlikte, insan tümörlerinde *PART1*'in karakterizasyonu hala anlaşılması zordur ve ayrıca *PART1*'in insanlarda prostat kanserindeki klinik uygulaması hakkında çok az şey bilinmektedir (72).

İdrar kesesi tümörlerinde *PART1*'in ekspresyonu ve fizyolojik fonksiyonu henüz açıklığa kavuşturulamamıştır. Bir çalışmada, *PART1*'in mesane kanserinde ekspresyonlarının yüksek olduğunu gözlemlenmiştir. Ayrıca, *PART1*'in aşırı ekspresyonunun hücre canlılığını artırdığını ve hücre apoptoz oranını azalttığını; bununla birlikte, *PART1*'in ekspresyonun susurulması hücre büyümesini inhibe etmiştir ve ayrıca hücre apoptozunu desteklemiştir. Birlikte ele alındığında, bulgular *PART1*'in proliferasyon, invazyon ve apoptozun düzenlenmesi yoluyla üriner mesane kanserinin tümör oluşumunu ve ilerlemesini sağlamada önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir (69).

2.8. Hipotez ve Çalışmanın Amacı

Literatürdeki iki çalışmada *PART1*'e ait olan SNP (rs8176060) hatalı olarak MATN3'e ait olan SNP6 olarak tanımlanmıştır (2, 5). Yapılan DNA sekans analizi ve NCBI-BLAST karşılaştırmasına göre tanımlanan DNA dizisi MATN3 ile değil *PART1* sekansı ile eşleşmiştir. Ayrıca, MATN3 sekansı BseYI enzim kesim bölgesi içermemektedir. *PART1* sekansı ise bahsi geçen yayınlarda yer aldığı gibi tek bir BseYI enzim kesim bölgesi içermektedir. Bu amaçla, Türk diz OA hasta ve sağlıklı birey popülasyonunu yansıtan bir örneklem seçilerek lncRNA PART1 SNP (rs8176070) polimorfizm profilinin belirlenmesi ve allel frekanslarının tanımlanmasına yönelik bir çalışma planlanmıştır. Çalışmamız lncRNA PART1'e ait olan SNP (rs8176070) polimorfizminin diz OA riskini yansıtabileceği hipotezini test etmeyi amaçlamaktadır.

Çalışma hedefleri:

1. Uygun ölçütlere göre OA ve kontrol olgularının seçilmesi, gönüllü onamlarının alınması ve çalışmaya dahil edilmesi,
2. Diz OA hasta ve sağlıklı bireylere ait periferik kan alınması ve kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu,
3. LncRNA PART1'e ait seçilen SNP (rs8176070) bölgesinin PCR ile çoğaltılması,
4. Elde edilen amplifikasyon ürünlerinin DNA sekans analizi ile genotip profillerinin belirlenmesi,

5. Seçilen amplifikasyon ürünlerinin RFLP yöntemi kullanılarak BseYI restriksiyon enzimi ile spesifik bölgeden kesilerek, oluşan fragmentlere göre genotip profillerinin örneklenerek gösterilmesi,
6. Elde edilen sonuçların istatistiksel açıdan değerlendirilmesi ve Türk popülasyonuna göre ortaya çıkan allel frekanslarının literatürdeki diğer popülasyonlara ait çalışmalarla karşılaştırılması işlemleri gerçekleştirilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Onayı

Çalışmamız için Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı alınmıştır (Toplantı Tarihi: 13.11.2019, Karar Numarası:110).

3.2. Katılımcıların Belirlenmesi ve Kan Örneklerinin Elde Edilmesi

Araştırmamız diz osteoartrit hastaları ile sistemik açıdan sağlıklı bireyler üzerinden yürütülmüştür. T.C. Sağlık Bakanlığı Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi ve T.C.Sağlık Bakanlığı Ankara Şehir Hastanesi Ortopedi ve Travmatoloji Kliniğinde muayene olan gönüllü 102 diz OA hastası (Tablo 3.2) ve 81 sağlıklı bireyden (kontrol grubu) (Tablo 3.3) gönüllü onamları alınarak EDTA'lı vakumlu tüpler içerisine yaklaşık 5 ml periferik kan örnekleri alınmıştır ve +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

Çalışmamızın moleküler biyolojik analizleri Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya katılan bireylerde sistemik hastalık olmamasına dikkat edilmiştir ve katılımcılar çalışma hakkında bilgilendirilip, yazılı ve sözlü onayları alınmıştır. Ekte çalışmamıza ait etik kurul izinleri, gönüllü onam formları ve WOMAC anketi yer almaktadır (EK-1, 2, 3).

3.3.Olguların Çalışmaya Dahil Edilmesi

3.3.1. Diz OA Tanı Kriterleri

ACR (American College of Rheumatology) tarafından geliştirilen tanı kriterleri kabul görmektedir (98, 99)

A-Klinik Tanı Kriterleri

1. Önceki ayın çoğu gününde diz ağrısı
2. Aktif eklem hareketinde krepitasyon

3. Sabah tutukluğunun 30 dakika ve altında olması
4. 38 yaş ve üzerinde olmak
5. Muayenede dizde kemiksel genişleme saptanması

Diz OA'i tanısı için; 1,2,3,4 veya 1,2,5 veya 1,4,5 numaralı kriterlerin sağlanması gerekmektedir.

B-Klinik, Laboratuvar ve Radyolojik Tanı Kriterleri

1. Önceki ayın çoğu gününde diz ağrısı olması
2. Radyolojik olarak eklem kenarı osteofitleri
3. OA'nın tipik sinoviyal sıvı bulguları (berrak, visköz veya beyaz küre <2000/mm3'den en az ikisi)
4. 40 yaş ve üstü olmak
5. Sabah tutukluğunun 30 dakika ve altında olması
6. Aktif eklem hareketi ile krepitasyon alınması

Diz OA tanısı için: 1,2 veya 1,3,5,6 veya 1,4,5,6 numaralı kriterlerin sağlanması gerekmektedir.

Çalışmaya Alınma Kriterleri:

1. ACR kriterlerine göre primer gonartroz (diz ekleminde oluşan kıkırdak kaybına verilen addır) tanısı almış olmak
2. 40 yaş üzerinde olmak

Çalışmaya Alınmama Kriterleri:

1. Sekonder OA tanısı konması
2. Diz ve kalçaya yönelik operasyon geçirilmesi
3. Son 3 ay içinde fizik tedavi uygulanmış olması
4. Son 3 ay içinde ciddi fiziksel travma geçirilmesi gerekmektedir.

3.3.2. WOMAC OA İndeksinin Hesaplanması

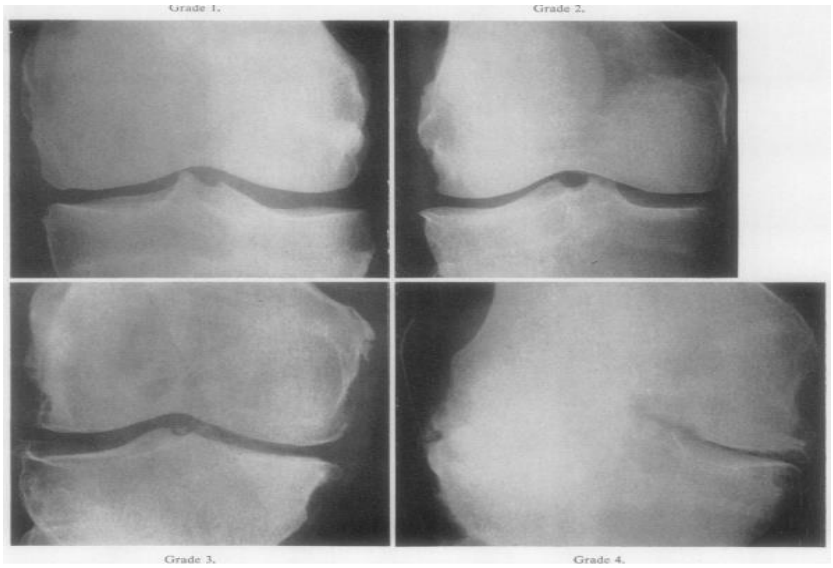
WOMAC OA indeksi hastalara anket formatında uygulanmıştır. Forma http://www.ftronline.com/womac/ (100) internet adresinden erişilebilir. Bu indeks OA'nın prognostik takibinde sıklıkla kullanılmaktadır (101, 102) (WOMAC anketi EK-3'te yer almaktadır).

3.3.3. OA Düzeyinin Radyolojik Olarak Belirlenmesi

Çalışmaya dahil edilen olguların OA düzeyleri, diz eklemi radyolojik incelemesi sonrası Ahlbäck ve Kellgren-Lawrence sınıflamaları (103) temel alınarak skorlanmıştır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Ahlbäck ve Kellgren-Lawrence evrelemelerinin karşılaştırmalı tablosu (103).

Sınıflama	**Evre ve karakteristik özelliği**				
Kellgren-Lawrence	0: Normal	1: Şüpheli osteofitler, eklem aralığı normal	2: Belirgin osteofit, eklem aralığında şüpheli daralma	3: Orta derecede osteofitler, eklem aralığında orta derecede daralma, hafif skleroz	4: Büyük osteofitler, eklem aralığında ileri derecede daralma, belirgin subkondral kemik sklerozu, kistler
Ahlbäck	0: Normal	1: Eklem aralığında daralma (< 3mm)	2: Eklem aralığının tamamen ortadan kalkması	3: Kemik defekti/kaybı (< 5 mm)	4: Kemik defekti/kaybı (5-10 mm)



Şekil 3.1. Osteoartrit hasta olgularında Kellgren-Lawrence sınıflaması Grade 1:Normal; Grade 2:Hafif, Grade 3:Orta, Grade 4:İleri (104).

Tablo 3.2. Osteoartrit grubuna ait veriler.

No	Yaşı	BMİ	Kelgren Lawrence Skor	WOMAC	Cinsiyet	Genotip
1	68	36.41	GRADE 4	69,79	1	bb
2	44	23.87	GRADE 1	30,2	2	bb
3	64	35.15	GRADE 3	83,3	2	bb
4	74	32.04	GRADE 4	64,6	2	Bb
5	67	38.66	GRADE 4	22,9	1	bb
6	75	31.55	GRADE 4	41,6	2	bb
7	73	32.03	GRADE 3	45,8	2	bb
8	60	43.33	GRADE 4	48,9	2	BB
9	71	28	GRADE 4	30,2	2	Bb
10	79	27.73	GRADE 4	67,7	2	Bb
11	54	22.71	GRADE 4	11,45	2	bb
12	74	33.87	GRADE 4	60,4	2	Bb
13	66	27.68	GRADE 4	87,5	2	bb
14	74	32.14	GRADE 4	57,2	1	Bb
15	67	25.24	GRADE 4	29,1	2	bb
16	63	39.84	GRADE 3	41,6	2	BB
17	54	34.06	GRADE 3	60,4	2	Bb
18	55	27.18	GRADE 3	60,4	2	Bb
19	45	27,06	GRADE 2	4,16	1	Bb
20	50	31.19	GRADE 2	45,8	1	Bb
21	53	31.74	GRADE 1	20,8	1	Bb
22	53	30.48	GRADE 1	33,3	2	Bb
23	59	34.19	GRADE 2	39,5	2	Bb
24	67	37.94	GRADE 2	8,33	2	BB
25	56	32.03	GRADE 1	13,5	2	bb
26	69	35.15	GRADE 1	22,9	2	Bb
27	64	26.70	GRADE 3	50	2	bb
28	77	26.83	GRADE 3	48,95	2	bb
29	57	28.28	GRADE 2	39,58	2	bb
30	65	33.35	GRADE 2	13,54	1	bb
31	44	24.48	GRADE 1	2,08	1	bb
32	74	26.81	GRADE 4	67,7	2	Bb
33	54	29.30	GRADE 2	31,25	2	BB
34	64	38.28	GRADE 4	39,58	2	bb
35	75	31.25	GRADE 4	71,87	2	bb

Tablo 3.2. (Devamı)

36	64	19.48	GRADE 3	0	2	BB
37	53	34.89	GRADE 2	77,08	2	bb
38	64	36.20	GRADE 3	66,66	2	Bb
39	59	25.60	GRADE 1	18,75	1	Bb
40	54	30.75	GRADE 4	42,7	2	Bb
41	65	33.20	GRADE 3	44,79	2	Bb
42	65	31.21	GRADE 4	45,83	2	BB
43	55	33.29	GRADE 2	54,16	2	bb
44	41	24.15	GRADE 3	40,62	2	Bb
45	45	51.55	GRADE 3	45,83	2	Bb
46	67	27.54	GRADE 3	53,12	2	Bb
47	50	25.46	GRADE 3	42,7	1	BB
48	54	31.21	GRADE 4	80,2	2	Bb
49	41	40.44	GRADE 2	30,2	2	bb
50	64	28.40	GRADE 2	16,66	1	bb
51	49	37.46	GRADE 3	37,5	2	bb
52	51	30,11	GRADE 3	17,7	2	Bb
53	60	37.10	GRADE 2	2,08	2	Bb
54	53	29.41	GRADE 2	39,58	1	bb
55	62	25.15	GRADE 2	28,12	1	bb
56	67	26.39	GRADE 1	2,08	1	Bb
57	71	27.75	GRADE 4	57,29	1	Bb
58	69	38.21	GRADE 4	80,2	2	BB
59	44	31.16	GRADE 1	14,58	2	bb
60	67	30.48	GRADE 1	15,62	1	Bb
61	76	25.78	GRADE 3	42,7	2	Bb
62	67	27.77	GRADE 4	51,04	1	Bb
63	57	29.13	GRADE 3	33,33	2	Bb
64	59	35.99	GRADE 3	31,25	2	BB
65	67	34.89	GRADE 4	54,16	2	bb
66	64	23.87	GRADE 3	14,58	1	bb
67	53	31.23	GRADE 3	38,54	2	bb
68	66	29.75	GRADE 1	14,58	2	Bb
69	57	36.62	GRADE 3	43,57	2	bb
70	65	45.43	GRADE 4	85,41	2	Bb
71	64	32.71	GRADE 3	75	2	Bb
72	49	51.36	GRADE 4	86,45	2	bb
73	50	26,35	GRADE 2	35	1	BB

Tablo 3.2. (Devamı)

74	55	37.97	GRADE 3	62.5	2	BB
75	67	21.75	GRADE 2	19.79	2	Bb
76	73	22,03	GRADE 4	70.83	2	Bb
77	53	36.85	GRADE 2	70.83	2	bb
78	47	42.87	GRADE 3	77.08	2	bb
79	55	36.73	GRADE 4	69.79	2	bb
80	65	32.44	GRADE 4	63.54	2	bb
81	60	33.59	GRADE 3	65.62	2	Bb
82	58	26.17	GRADE 2	55.02	2	bb
83	65	30,11	GRADE 3	52.08	2	BB
84	61	30.4	GRADE 4	66.6	1	bb
85	62	22.1	GRADE 1	14.58	2	Bb
86	60	34.1	GRADE 4	92.7	2	bb
87	68	39.1	GRADE 4	77.08	2	bb
88	63	27.5	GRADE 4	85.41	2	bb
89	55	31.6	GRADE 2	60.41	2	bb
90	72	35.2	GRADE 3	52.08	2	BB
91	65	27.8	GRADE 4	75	1	BB
92	55	49.2	GRADE 3	80.2	2	Bb
93	54	31.8	GRADE 2	56.25	1	Bb
94	63	38.3	GRADE 2	58.3	2	Bb
95	64	30.1	GRADE 1	57.29	1	bb
96	55	50.8	GRADE 4	96.87	2	bb
97	34	28.9	GRADE 1	62.5	2	Bb
98	48	36.3	GRADE 1	62.5	2	Bb
99	42	36.2	GRADE 3	48.95	2	bb
100	52	22.8	GRADE 2	20.83	1	Bb
101	53	28.4	GRADE 1	17,7	2	Bb
102	58	30.4	GRADE 3	40.62	1	bb

Açıklama: OA düzeyleri, diz eklemi radyolojik inceleme sonrası Kellgren Lawrence sınıflamaları Grade 1-2-3-4 olarak verilmiştir.

Kısatmalar:1: Erkek 2: Kadın; BMI: Vücut kitle indeksi; WOMAC: OA indeksi.

Tablo 3.3. Kontrol grubuna ait veriler.

No	Yaşı	BMİ	Kelgren-Lawrence Skor	WOMAC	Cinsiyet	Genotip
1	37	28,60	GRADE 0	0	2	BB
2	43	21,23	GRADE 0	0	2	bb
3	38	24,77	GRADE 0	4,17	2	bb
4	40	20,20	GRADE 0	0	2	bb
5	38	25,06	GRADE 0	0	1	bb
6	40	22,88	GRADE 0	0	1	Bb
7	48	30,93	GRADE 0	2,08	2	bb
8	38	26,30	GRADE 0	12,5	2	bb
9	52	20,24	GRADE 0	6,25	2	Bb
10	39	25,47	GRADE 0	8,33	1	Bb
11	51	29,36	GRADE 0	0	1	bb
12	57	23,37	GRADE 0	3,125	1	bb
13	36	22,15	GRADE 0	0	2	bb
14	64	34,53	GRADE 0	1,042	2	bb
15	54	24,24	GRADE 0	11,46	2	bb
16	44	28,04	GRADE 0	1,042	2	Bb
17	46	25,81	GRADE 0	4,17	2	Bb
18	40	24,98	GRADE 0	4,17	2	bb
19	44	30,47	GRADE 0	1,042	2	Bb
20	37	24,16	GRADE 0	10,42	1	bb
21	49	23,03	GRADE 0	5,21	2	bb
22	38	30,31	GRADE 0	3,125	1	Bb
23	40	26,73	GRADE 0	0	1	bb
24	46	25,88	GRADE 0	0	1	bb
25	40	33,39	GRADE 0	1,042	1	BB
26	49	21,71	GRADE 0	1,042	1	Bb
27	51	32,60	GRADE 0	0	1	bb
28	40	29,00	GRADE 0	0	2	Bb
29	40	31,44	GRADE 0	0	1	BB
30	49	22,10	GRADE 0	0	2	bb
31	49	23,62	GRADE 0	0	2	bb
32	41	27,18	GRADE 0	10,42	2	Bb
33	52	31,04	GRADE 0	7,29	2	bb
34	46	30,30	GRADE 0	4,17	2	Bb
35	45	28,72	GRADE 0	5,21	2	bb

Tablo 3.3. (Devamı)

36	49	26,12	GRADE 0	11,46	2	BB
37	50	23,44	GRADE 0	0	2	bb
38	47	36,26	GRADE 0	5,21	2	Bb
39	55	31,08	GRADE 0	0	2	BB
40	49	33,33	GRADE 0	1,042	2	Bb
41	46	27,40	GRADE 0	0	2	Bb
42	56	29,00	GRADE 0	0	2	bb
43	62	37,89	GRADE 0	7,29	2	bb
44	36	22,99	GRADE 0	0	1	Bb
45	51	33,17	GRADE 0	5,21	1	Bb
46	38	32,66	GRADE 0	0	2	bb
47	50	26,22	GRADE 0	3,125	2	Bb
48	53	26,99	GRADE 0	1,042	1	Bb
49	67	32,60	GRADE 0	0	1	Bb
50	58	43,00	GRADE 0	10,42	2	BB
51	44	30,10	GRADE 0	4,17	2	Bb
52	36	33,69	GRADE 0	0	2	bb
53	48	30,33	GRADE 0	2,08	2	bb
54	70	44,63	GRADE 0	11,46	2	Bb
55	45	20,81	GRADE 0	0	2	Bb
56	69	39,54	GRADE 0	0	2	bb
57	46	34,58	GRADE 0	1,042	2	bb
58	52	28,69	GRADE 0	4,17	1	Bb
59	44	27,47	GRADE 0	0	1	bb
60	42	30,61	GRADE 0	0	1	Bb
61	44	29,05	GRADE 0	0	1	bb
62	48	32,49	GRADE 0	0	1	Bb
63	51	29,38	GRADE 0	1,042	1	Bb
64	41	28,73	GRADE 0	0	1	BB
65	48	29,37	GRADE 0	1,042	1	Bb
66	50	30,48	GRADE 0	7,29	1	Bb
67	42	26,37	GRADE 0	1,042	1	Bb
68	42	26,89	GRADE 0	0	1	bb
69	44	30,13	GRADE 0	0	1	Bb
70	43	31,92	GRADE 0	0	1	Bb
71	47	27,43	GRADE 0	5,21	1	Bb
72	46	33,79	GRADE 0	0	1	Bb
73	52	26,93	GRADE 0	1,042	1	BB

Tablo 3.3. (Devamı)

74	45	33,90	GRADE 0	7,29	1	Bb
75	45	32,83	GRADE 0	10,42	1	Bb
76	50	31,57	GRADE 0	6,25	1	Bb
77	40	30.80	GRADE 0	17,7	2	BB
78	67	25	GRADE 0	23,9	2	BB
79	54	32.46	GRADE 0	12,5	2	Bb
80	43	40.48	GRADE 0	6,25	2	BB
81	39	21.2	GRADE 0	0	2	bb

Açıklama: Kelgren-Lawrence skoru kontrol grubu için Grade 0 olarak verilmiştir. OA düzeyleri, diz eklemi radyolojik inceleme sonrası Kellgren Lawrence sınıflamaları Grade 1-2-3-4 olarak verilmiştir. Kısatmalar:1: Erkek 2: Kadın; BMI: Vücut kitle indeksi; WOMAC: OA indeksi.

3.4. Deneysel Yaklaşım

Çalışmamızda primer diz osteoartrit tanısı alan hastalarda ve sağlıklı bireylerde lncRNA PART1 SNP (rs8176070) polimorfizminin görülme sıklığının DNA dizi analizi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda katılımcıların sırası ile:

- WOMAC Index (The Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index) skorları belirlenmiştir (100).
- Hastaların OA düzeyleri, diz eklemi radyolojik incelemesi sonrası Ahlbäck ve Kellgren Lawrence sınıflamaları (103) temel alınarak skorlanmıştır.
- Toplanan periferik kanlardan genomik DNA izolasyonu yapılmıştır.
- Genomik DNA'lardan lncRNA PART1 dizisinin PCR ile amplifikasyonu yapılmıştır.
- PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve görüntülenmiştir.
- Agaroz jelde görüntülenen PCR ürünlerinin DNA sekans analizi gerçekleştirilmiştir.
- PCR ile çoğaltılan lncRNA PART1'in SNP mutasyon bölgesinden restriksiyon endonükleaz enzimi (RE) ile kesimi RFLP yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

- RFLP yöntemi ile kesilen DNA ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve görüntülenmiştir.
- Elde edilen verilerin istatistiksel olarak analizi yapılmıştır.

3.5. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında kullanılan kimyasallar, sarflar, kitler, enzim ve cihazların listesi Tablo 3.4 ve Tablo 3.5'te verilmiştir.

Tablo 3.4. Tez çalışmamızda kullanılan kimyasal malzemeler, sarflar ve cihazlar.

Kimyasal-Sarf-Cihazlar
Blue-Ray Biotech Turbo Cycler Lite (Model: Tclt9620 Taiwan)
Prona Agarose biomax(The European Economic Community)
Ethidium Bromide Biomatik
Vwr Power Source 250v
Radwag Hassas Terazi (Model:As220.R2 Poland)
LG IWAVE Mikrodalga Fırın (Model:MS2042D)
VWR Ministar Silverline Santrifüj (Korea)
Thermo Scientific (Model:LP Vortex Mixer Korea)
Ssıbio 3225-00 Optically Clear Flat Cap PCR Tubes Natural(USA)
Ssibio 1210-00 1,5ml Graduated Microtubes,Natural (USA)
Ssibio 1310-000 2ml Graduated Microtubes,Natural (USA)
NEST 313012 1000 µl Filter Universal Pipette Tips
NEST 313012 100 µl Filter Universal Pipette Tips
NEST 313012 10µl Filter Universal Pipette Tips
Biohit proline Isolab pipette 0,5-10µl
Biohit Proline Isolab Pipette 2-20µl
Biohit Proline Isolab Pipette 10-100µl
Biohit Proline Isolab Pipette 100-1000µl
MERCK Tris (Hydroxymethyl)Amino Methane (Germany)(500g)
Bioshop EDTA (Disodium Salt,Dihydrate)(1kg)(Canada)(1 Kg)
Benchmark (Digital Heat Block)(Model:Bsh1002-E)

Tablo 3.4. (Devamı)

Nucleic Acid Analyzer (Model:Nano-200)
UVP Chemidoc-It2 Imager Bioimaging Systems Laboratory Products
Benchtop Uv Transilluminator
Agaroz jel görüntüleme Uvp Software Yazılımı
Purelab Option-Q Distile Su Cihazı (Model:DV25 ELGA)

Tablo 3.5. Tez çalışmamızda kullanılan moleküler kitler.

Kitler
Macherey-Nagel Genomic DNA from blood (NucleoSpin®Blood) kit
Axygen Biosciences AxyPrep Multisource Genomic DNA MiniPrep Kit
Thermoscientific PCR Master Mix (2x) 200 reactions (Molecular Biology)(Lithuania)
New England BioLabs BseYI 500 units (5000 units/ml)
EurX Molecular Biology Products GeneMATRIX Quick Blood DNA Purification kit (Cat No:E3565)(Poland)
Solis BioDyne 5x FIREPol Master Mix(12.5Mm MgCl2)(Estonia)

3.6. Periferik Kandan Genomik DNA İzolasyonu

Macherey-Nagel Genomic DNA from blood (NucleoSpin®Blood) kiti, Axygen Biosciences AxyPrep Multisource Genomic DNA MiniPrep Kiti ve EurX Molecular Biology Products GeneMATRIX Quick Blood DNA Purification kitlerinden birisi ile periferik kandan genomik DNA izolasyonu yapılmıştır.

Genomik DNA'lar, Axy Prep Multisource Genomic DNA Miniprep (USA) marka kandan DNA izolasyon kiti ile izole edilmiştir. DNA izolasyonu aşamaları aşağıda sırasıyla verilmiştir:

- 4500 rpm'de EDTA'lı tüpler 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatantın mononükleer hücrelerin bulunduğu fazından alınıp 15 ml'lik ependorfta 250 µl'lik PBS içerisinde lökositler süspanse edilmiştir.

- 0.8 µl RNaz A ve 8 µl Proteinaz K eklenmiştir. 15 sn vorteks yapılmıştır ve 56 ^{O}C'de inkübe edilmiştir. Kapaktaki damlaların düşmesi için kısa bir santrifüj yapılmıştır.
- 350 µl Buffer P-D örneğe eklenmiştir ve en yüksek hızda vorteks yapılarak karıştırılmıştır.
- Oda sıcaklığında hücresel debrizleri uzaklaştırmak için 12,000x g'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- 2 ml'lik mikrofüj tüpüne MiniPrep kolondan konulmuştur. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant hazırlanan kolona pipetlenmiştir. 12,000x g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Oluşan filtrat uzaklaştırılmıştır. Miniprep kolon yeni bir 2 ml'lik mikrofüj tüpe alınmıştır. Miniprep kolon üzerine 500 µl Buffer W1 pipetlenmiştir ve 12,000x g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Oluşan filtrat uzaklaştırılıp ve yeni bir 2 ml'lik mikrofüj tüpüne MiniPrep kolon konulmuştur. 700 µl Buffer W2 eklenip 12,000x g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpünden filtrat uzaklaştırılmıştır ve bu yıkama adımı 700 µl Buffer W2 ile tekrarlanmıştır ve tekrar 12,000x g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpten filtrat uzaklaştırılmıştır. MiniPrep kolon yeni bir 2 ml'lik mikrofüj tüpe alınıp 12,000x g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- 1.5 ml'lik yeni bir ependorf tüpe MiniPrep kolon transfer edilmiştir. Genomik DNA'yı elüe etmek için 100-200 µl Eluent kolonun tam ortasındaki membrana eklenmiştir. 1 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir ve 12,000x g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.

Not: 65 ^{O}C'deki elüent solüsyonu, elüsyon verimliliğini arttırmak amacıyla kullanılmıştır.

3.6.1. Genomik DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrol Edilmesi

Periferik kandan izole edilen genomik DNA'nın varlığı agaroz jel elektroforezi kullanılarak kontrol edilmiştir. Kontrol için %1'lik agaroz jel hazırlanıp ve yürütme işlemi elektroforez cihazında gerçekleştirilmiştir.

%1'lik Agaroz Jelin Hazırlanması

Hassas terazide 1 mg agaroz tartılmıştır ve 200 ml'lik erlenmayer içerisine aktarılmıştır. Üzerine 100 ml %1'lik TBE tamponu (Tris-Borat EDTA tamponu) ya da %1'lik TAE (Tris-Asetik asit-EDTA) eklenmiştir ve içerisindeki agaroz çözülünceye kadar mikrodalga fırında kaynatılmıştır.

50x TAE Tamponu (0.04M; pH:8.5)

Tris bazı (M_A=121.14g/mol) 242g
Disodyum EDTA (M_A=336.21g/mol) 18.61g
Asetik asit (M_A=60,05g/mol) 57.1g
Belirtilen miktarlar tartılır ve 1 litre distile su içerisinde çözündürülür.

10x TBE Tamponu (pH 8.0) Hazırlanması

31 g Borik asit
3.725 g EDTA
60.55 g Tris

Yukarıda verilen kimyasallar tartıldıktan sonra bir beher içerisine alınmıştır. Önce 300 ml distile su içerisinde karıştırıcıda çözdürülmüştür. Son hacim 500 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır. Elektroforez için %1'lik olarak seyreltmemiz gerekmektedir. Bu işlem için 10 ml 10x TBE tamponu üzerine 90 ml distile su ilave edilerek 100 ml %1'lik TBE tamponu hazırlanmıştır.

Elle tutulabilecek sıcaklığa (50-55 ^{O}C) düştüğünde 2 µl etidyum bromür ilave edilmiştir. Etidyum bromür kuvvetli bir mutajendir ve DNA'nın major olukları ile interkalasyon yaparak DNA'nın UV ışığı altında görülebilmesini sağlamaktadır. Agaroz jel kenar kısımları kapatılmış olan özel elektroforez kalıbına tek bir köşeden hava kabarcığı kalmayacak ve sızıntı olmayacak şekilde dökülmüştür. Kuyucukları oluşturacak taraklar yerleştirilerek jelin polimerleşmesi sağlanmıştır. Tarak dikkatlice uzaklaştırılıp jel elektroforez tankına alınmıştır. Elektroforez tankı içerisine %1'lik TBE tamponu eklenmiştir. Periferik kandan izole edilen genomik DNA'dan 10 µl; yükleme tamponundan (bromophenol blue) 2 µl karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. Yükleme tamponu DNA'nın kuyucuklara çökmesini sağlamıştır. Elektroforez cihazı 5v/cm'lik elektroforetik alanda 90V 45 dakika (VWR Power

Source cihazı) yürütülmüştür ve oluşan bantlar jel UVP marka jel görüntüleme cihazı ile görüntülenmiştir.

3.7. Nanodrop ile DNA Miktarı Ölçülmesi

1-2 µl distile su ya da tampon ölçümü yapılmıştır. Periferik kandan izole edilen genomik DNA'lardan 1 µl örnek Nucleic Acid Analyzer (Model: Nano-200) cihazına yüklenmiştir ve absorbans değerleri PCR reaksiyonunda kullanmak için elde edilmiştir.

3.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

1980'li yıllardan itibaren DNA amplifikasyonunun *in vitro* koşullar altında uygulanmasının nedenleri arasında istenilen gen bölgesine özgün olan dizinin çoğaltılması, bu özgün dizilerin moleküler analizlerinin gerçekleştirilmesi ve gen mühendisliği uygulamalarında kullanılması, vb. uygulamalarda PCR kullanılmaktadır (105).

PCR yöntemi üç temel aşamadan oluşmaktadır:

1. Denatürasyon: Çoğaltılacak DNA tek zincirli hale getirilene kadar 95 ^{O}C'de ısıtılmaktadır.
2. Bağlanma (Annealing): Primerlere özgül olmak koşuluyla sıcaklık 55°-65 °C'lere düşürülür ve primerlerin DNA tek zincirine bağlanması sağlanmaktadır.
3. Uzama (Extension): Uzamanın gerçekleştirildiği bu basamakta, ısıya dayanıklı *Taq polimeraz* enzimi ile yaklaşık 72 °C sıcaklık altında dNTP lerin DNA'ya 5' → 3' yönünde bağlanması ve çift zincirli DNA ürünün sentezlenmesi sağlanmaktadır.

3.8.1. LncRNA PART1'e ait PCR Reaksiyon Koşulları

Genomik DNA kalıp olarak kullanılarak, lncRNA PART1 geni polimorfik bölgelerinin çoğaltılması için iki set oligonükleotit primeri kullanılmıştır. Bu primerler lncRNA PART1 geninin SNP (rs8176070) bölge sekansına göre BseYI restriksiyon enzimi kesim bölgelerine göre dizayn edilmiştir. Thermoscientific PCR Master Mix

(2x) 200 reactions (Molecular Biology) (Lithuania) ve Solis BioDyne 5x FIREPol Master Mix (12.5Mm MgCl2) (Estonia) ile standart PCR uygulanmıştır. LncRNA PART1'e ait PCR reaksiyonu için gerekenlerin listeleri Tablo 3.6 ve Tablo 3.7'de ve PCR koşulları tablo 3.8'de verilmiştir. Primerler kullanılmadan önce konsantrasyonu hesaplanarak ultra saf distile su ile sulandırılıp -20 ^{O}C'de saklanmıştır ve ardından taze kullanılmak üzere 1:1 oranında karıştırılarak primer karışımı halinde kullanılmıştır.

Tablo 3.6. lncRNA PART1 gen bölgesine ait PCR reaksiyonu için gerekenler listesi (Thermoscientific 2x PCR master karışımına göre).

İçindekiler	**1 x 50 µL**
PCR Master Mix (2X)	25 µL
Forward (ileri) primer (0.1-1.0 µM)	1 µL
Reverse (geri) primer (0.1-1.0 µM)	1 µL
Kalıp DNA	5 µl
Steril distile su	40 µl
Toplam hacim	**50 µl**

Tablo 3.7. lncRNA PART1 gen bölgesine ait PCR reaksiyonu için gerekenler listesi (Solis BioDyne 5x PCR master karışımına göre).

İçindekiler	**1 x 50 µL**
5 x FIREPol Master Mix	4 µl
Forward (ileri) primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
Reverse (geri) primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
Kalıp DNA	5 µl
Steril distile su	40 µl
Toplam hacim	**50 µl**

Tablo 3.8. LncRNA PART1 genine ait PCR reaksiyon koşulları.

Step	Sıcaklık (^{O}C)	Zaman	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	95	5 dk	1
Denatürasyon	95	30 s	30
Bağlanma	54	30 s	
Uzama	72	1 dk	
Son uzama	72	10 dk	1
Saklama koşulları	+4C'de ∞		

LncRNA PART1 geni primer dizisi:

Forward (ileri) primer: 5'-GGACAGGATCCCACAAAAAG-3'

Reverse (geri) perimer: 5'-GAAAGAGGGGCTACAACAGG-3'

LncRNA PART1 gen bölgesinin PCR'si için; tablo 3.6 ve 3.7' da verilen miktarlarda hazırlanan karışım ile kalıp DNA buz üzerinde iyice karıştırılarak Blue-Ray Biotech TurboCycler Lite (Taiwan) cihazına konulmuştur. Reaksiyon yukarıda verilen sıcaklık koşullarında ve sürelerinde 30 döngü boyunca gerçekleştirilmiştir.

3.8.2. LncRNA PART1 SNP Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması

LncRNA PART1 geni SNP (RS8176070) mutasyonunu içeren gen dizisi Şekil 3.2'de verilmiştir.

PART1 lokalizasyonu: chr5:60541290-60541797

İleri primer: 5′-GGACAGGATCCCACAAAAAG-3′

Geri primer: 5′-GAAAGAGGGGCTACAACAGG-3′

PCR ürün uzunluğu: 508bç

PCR ürünü dizisi:

İleri primer ile dizileme:

GGACAGGATCCCACAAAAAGaaatttcagccttgtaacctttcttcctttgactttctgtgattagt
ttccttagtgtctggtaacagctctggttcctttgctgtagtgtggtgagcctcatctcttcaaaca
aattggttcacag**gctggg**ggatggtgggcgggagggatgaaatcattgttttgcttcaatgtcggt
tctcccctgagaggtctttcacagcaagggagtctgtatttttagaattagcatgttctgtttcaat
gttgtgaacattcatttaaacctactatatttagcagaggtttaattacccaaattgggaaactag
ttttaaaccgtcaccttctacttggttaatcaaaacagtccctaccaccagcaggggagactggcaa
tttcagtcatacagccacacctggtgagggcaactgacaaaagcaattccattgcctgagttcagca
tcttcagcacccatccagc**CCTGTTGTAGCCCCTCTTTC**

Geri primer ile dizileme:

GAAAGAGGGGCTACAACAGGgctggatgggtgctgaagatgctgaactcaggcaatggaattgcttt
tgtcagttgccctcaccaggtgtggctgtatgactgaaattgccagtctcccctgctggtggtaggg
actgttttgattaaccaagtagaaggtgacggtttaaaactagtttcccaatttgggtaattaaacc
tctgctaaatatagtaggtttaaaatgaatgttcacaacattgaaacagaacatgctaattctaaaa
atacagactcccttgctgtgaaagacctctcaggggagaaccgacattgaagcaaaacaatgatttc
atccctcccgcccaccatcc**cccagc**ctgtgaaccaatttgtttgaagagatgaggctcaccacact
acagcaaaggaaccagagctgttaccagacactaaggaaactaatcacagaaagtcaaaggaagaaa
ggttacaaggctgaaattt**CTTTTTGTGGGATCCTGTCC**

BseYI restriksiyon enzimi kesim dizisi: dizi içerisinde kırmızı renkte gösterilmiştir.

5′...C▼CCAGC...3′
3′...GGGTC▲G...5′

SNP(rs8176070): Kırmızı renkli dizi içerisinde mavi renk ile gösterilmiştir.

Yabanıl tip (CC), kodlama "bb"
Heterozigot genotip (CN), kodlama "Bb"
Homozigot genotip (NN), kodlama "BB"

Şekil 3.2. LncRNA PART1 geni SNP (RS8176070) mutasyonunu içeren gen dizisi.

3.8.3. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrolü

PCR işleminden sonra oluşan fragmentlerin kontrolü agaroz jel elektroforezi ile gerçekleştirilmiştir. Oluşan ürünlerin uzunluklarını belirlemek amacı ile 100 bp plus Opti-DNA (Abm, Canada) belirteç kullanılmıştır.

PCR işleminin ardından oluşan ürünler, 100 ml hacminde 2 µl etidyum bromür içeren % 1,5' luk agaroz jele 10 µl PCR ürünü ve 2 µl yükleme boyası [DNA Loading Dye (Abm, Canada)] olmak üzere yüklenmiştir. Oluşan bantlar 90 voltluk elektroforetik alanda (VWR Power Source) 45 dakika boyunca 1x TBE tamponu içerisinde yürütülmüş ve UVP marka jel görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir.

3.9. DNA Sekans Analizi

Polimorfizm çalışmaları için altın standart olan DNA sekans analizi, OA hasta ve kontrol grubuna ait PCR ürünleri için yapılmıştır. Elde edilen 508 bç'lik PCR ürünü, SNP (RS8176070) için DNA sekans analizine tabi tutuldu. Yabanıl tip genotip (CC) "bb", heterozigot polimorfik genotip (CN) "Bb", homozigot polimorfik genotip (NN) "BB" olarak kodlandı.

DNA dizi analizi ABI3730XL marka cihaz ile BM Laboratuvar sistemleri firması üzerinden gerçekleştirilmiştir. Sekans için hazırlanan örneklerin reaksiyon koşulları aşağıdaki Tablo 3.9'da verilmiştir.

Tablo 3.9. DNA sekans analizi için örnek hazırlanması.

PCR ürünü
Hacim: >20 uL Konsantrasyon: Agaroz jelde görülebilecek bant (>50ng/µl)
Primer
Hacim: 5uL/reaksiyon Konsantrasyon: 10pmol/uL, 10uM/uL, 20ng/uL

3.10. Gen Bölgelerindeki Polimorfizmlerin Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ile Belirlenmesi

Elde edilen 508 bç'lik PCR ürünü, SNP (RS8176070) için RFLP analizine tabi tutuldu. Yabanıl tip genotip (CC) "bb", heterozigot polimorfik genotip (CN) "Bb", homozigot polimorfik genotip (NN) "BB" olarak kodlandı. BioLabs (New England) marka BseYI restriksiyon endonükleazı kullanılmıştır. RFLP için restriksiyon endonükleaz enzimi olarak New England BioLabs BseYI 500 units (5000 units/ml) kullanılmıştır.

LncRNA PART1 genine ait PCR ürünleri, aşağıda verilen ölçülerde enzim, tampon ve su ile tepkimeye sokularak enzimin optimum çalışma sıcaklığı olan 37°C de 1 saat kesim işlemine tabii tutulmuştur. RPLP için reaksiyon koşulları Tablo 3.8'te verilmiştir.

BseYI RestriksiyonEndonükleaz Enziminin Tanıma Dizisi:

5'...C▼CCAGC...3'

3'...GGGTC▼G...5'

Tablo 3.10. RFLP için reaksiyon koşulları.

Restriksiyon enzimi	**1 µl (10 U) (10 ünite/µl)**
PCR ürünü	1 µg
10xNEBuffer	5 µl (1x)
Total Reaksiyon Hacmi	**50 µl**

Kesim sonucu oluşan fragmentler (148 bp ve 360 bp) boyutlarının küçük olması nedeniyle % 3 lük agaroz jelde yürütülmüştür. Restriksiyon ürünlerin büyüklüklerini ölçmek amacı ile 100 bp Plus Opti-DNA belirteci kullanılmıştır. Her bir kesim ürününden 10µl ve yükleme boyasından 2 µl karıştırılarak, etidyum bromür boyası eklenilen %3 lük 100 ml agaroz jele yüklenmiştir ve 1x TBE tamponu içerisinde 1 saat boyunca 60 Voltluk akımda bantların ayrılması sağlanmıştır. Oluşan bantlar UVP jel görüntüleme cihazı fotoğrafları çekilmiştir.

CC homozigot genotipine (bb) ait bireyler yabanıl tip (wild-type) 148 bp ve 360 bp kesim ürünlerine, CN heterozigot bireyler (Bb) 148 bp, 360 bp ve 508 bp kesim ürünlerine ve NN homozigot mutant bireylerde (BB) kesim gerçekleşmediği için 508 bp'lik ürünler jelde görüntülenmiştir.

3.11. İstatistiksel Analizler

Çalışmada yer alan yaş, BMİ ve WOMAC puanlarının dağılımı Shapiro-wilk's testi ile incelenmiştir. Bu değişkenler ortanca (min-max) ile özetlenmiştir. Cinsiyet, K-L grade ve genotip özellikleri için frekans (%) verilmiştir.

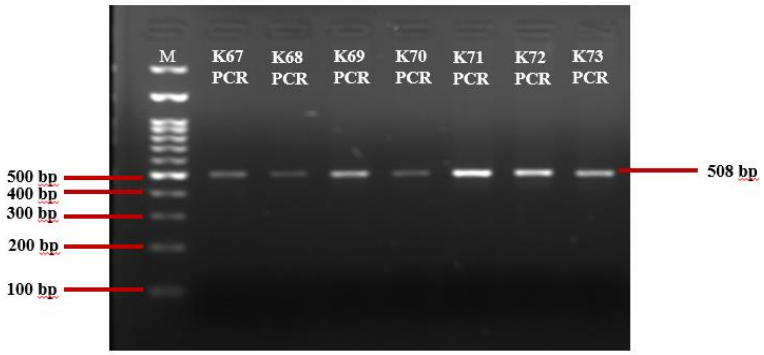
Hasta ve kontrol grubu, yaş, BMI ve WOMAC puanı (kontrol grubunda değerlendirmeye alınmamıştır) bakımından Mann-Whitney U testi ile, cinsiyet bakımından Fisher's exact testi ile karşılaştırılmıştır. SNP varyantlarının OA riski ile bağlantısı için Lojistik Regresyon analizi kullanılmıştır. Odds oranı %95 güven aralığı ile beraber verilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0.05$ kabul edilmiştir.

Tüm istatistiksel hesaplamalar ve analizlerde IBM SPSS Statistics 22.0 (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.) programı kullanılmıştır.

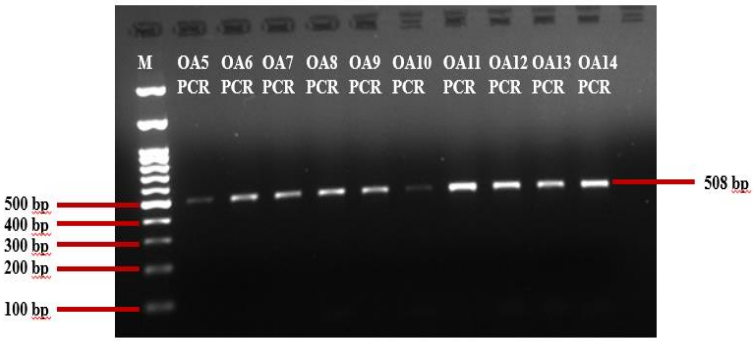
4. BULGULAR

4.1. PCR Sonuçları

LncRNA PART1 geninde SNP (rs8176070) polimorfizminin tanımlanabilmesi için standart PCR yöntemi ile 508 bç'lik bölgenin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Sonuçların kontrol edilmesi için 100 nükleotidden oluşan DNA belirteci agaroz jel içerisinde kuyucuklara yüklenmiştir. 5.bant hizasının üzerinde 508 bç'lik PCR ürünleri hem kontrol hem de OA hasta gruplarında agaroz jel görüntülerinde kontrol edilmiştir (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).



Şekil 4.1. LncRNA PART1 geni SNP (rs8176070) polimorfizminin bulunduğu K67-K73 kontrol grubu olgulara ait 508 bç'lik bölgenin aplifikasyon sonrası agaroz jelde görüntülenmesi. M harfi 100-1000 baz çiftlik DNA belirtecini ifade etmektedir.



Şekil 4.2. LncRNA PART1 geni SNP(rs8176070) polimorfizminin bulunduğu OA5-OA14 numaralı OA hasta bireylere ait 508 bç'lik bölgenin amplifikasyon sonrası agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi. M harfi 100-1000 baz çiftlik DNA belirtecini ifade etmektedir.

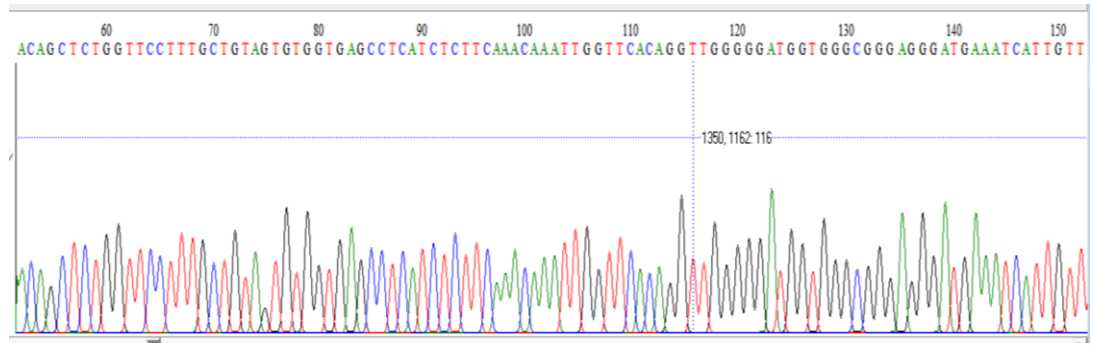
4.2. DNA Sekans Sonuçları

DNA sekans analizi polimorfizm çalışmaları için altın standart değerindedir. Çalışmamızda 102 OA hasta grubu ve 81 kontrol grubu olgularının tamamına DNA sekans analizi yapılmıştır. DNA sekans analiz yapılmadan önce tüm olguların agaroz jel elektroforezinde bant kontrolleri yapılmıştır. Elde edilen 508 bç'lik PCR ürünü, SNP (RS8176070) için DNA sekans analizine tabi tutuldu. Yabanıl tip genotip (CC) "bb", heterozigot polimorfik genotip (CN) "Bb", homozigot polimorfik genotip (NN) "BB" olarak kodlandı.

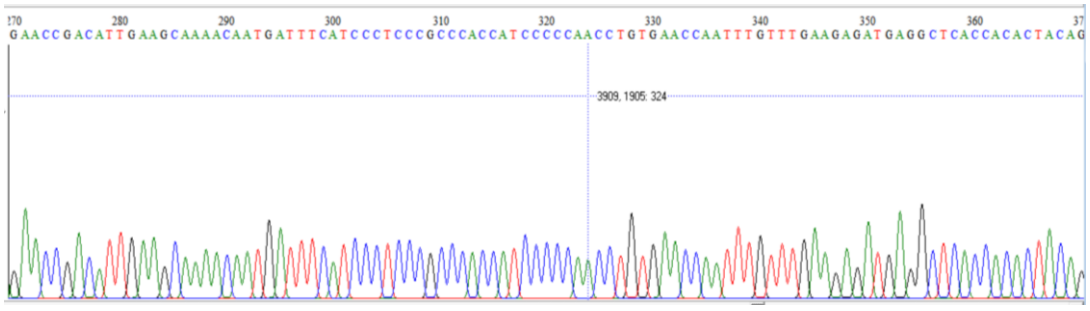
DNA sekans analizi ABI3730XL marka cihaz ile BM Laboratuvar sistemleri aracılığı ile yapılmıştır. DNA sekans analizi için BioEdit Sequence Alignment Editor yazılım programı kullanılmıştır.

Homozigot (BB) genotip

A)



B)



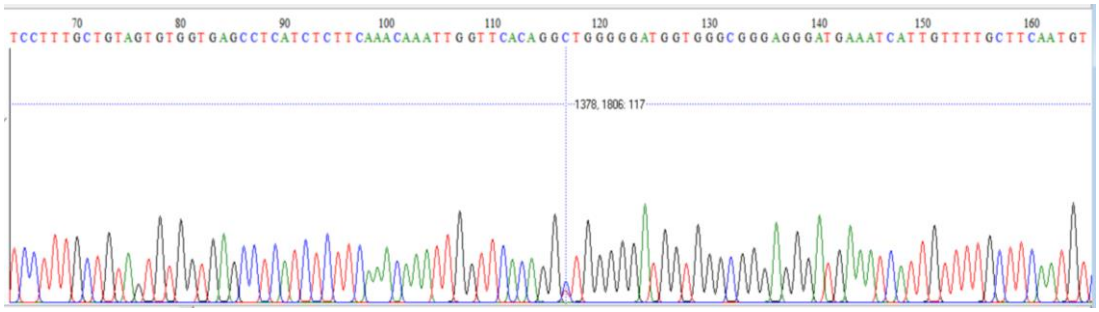
Şekil 4.3. A) Homozigot BB genotipe sahip bireyin ileri (forward) okuma yönündeki DNA sekans analiz görüntüsü B) Homozigot BB genotipe sahip bireyin geri (reverse) okuma yönündeki DNA sekans analiz görüntüsü.

Kromozom 5'te lokalize olan lncRNA PART1'in SNP (rs8176070) polimorfizmini içeren 508 bç'lik PCR ürününün DNA sekans analizi yapılmıştır. Çizgi ile gösterilen G**T**TGGG dizisi analiz edilmiştir. Analiz sonucuna göre iki allelde T nükleotitine sahip ise homozigot BB genotipini göstermektedir (Şekil 4.3-A)

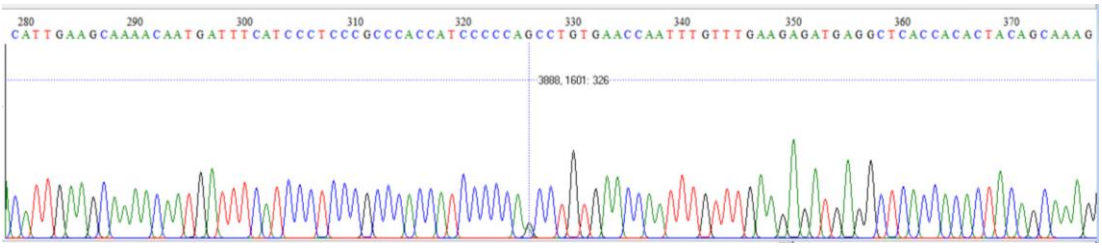
Kromozom 5'te lokalize olan lncRNA PART1'in SNP (rs8176070) polimorfizmini gösteren 508 bç'lik PCR ürününün DNA sekans analizi yapılmıştır.Çizgi ile gösterilen CCCA**C**C dizisi analiz edilmiştir. Analiz sonucuna göre iki allelde C nükleotitine sahip ise homozigot BB genotipini göstermektedir (Şekil 4.3-B)

Heterozigot (Bb) genotip

A)



B)



Şekil 4.4. A) Heterozigot Bb genotipe sahip bireyin ileri (forward) okuma yönündeki DNA sekans analiz görüntüsü B) Heterozigot Bb genotipe sahip bireyin geri (reverse) okuma yönündeki DNA sekans analiz görüntüsü.

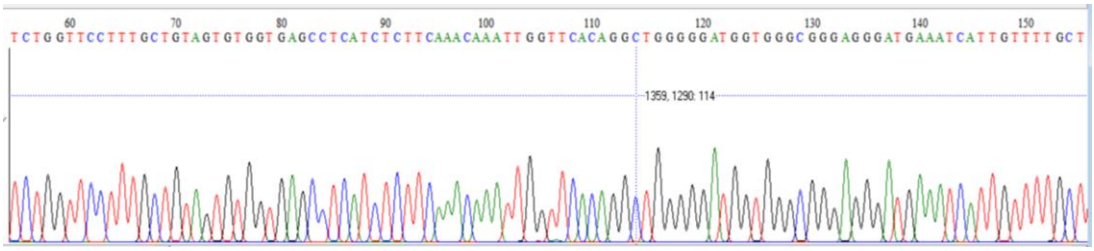
Kromozom 5'te lokalize olan lncRNA PART1'in SNP (rs8176070) polimorfizmini içeren 508 bç'lik PCR ürününün DNA sekans analizi yapılmıştır. Çizgi ile gösterilen G**C**TGGG dizisi analiz edilmiştir. Analiz sonucuna göre bir allelde C

diğer allelde T nükleotitine sahip ise heterozigot Bb genotipini göstermektedir (Şekil 4.4-A).

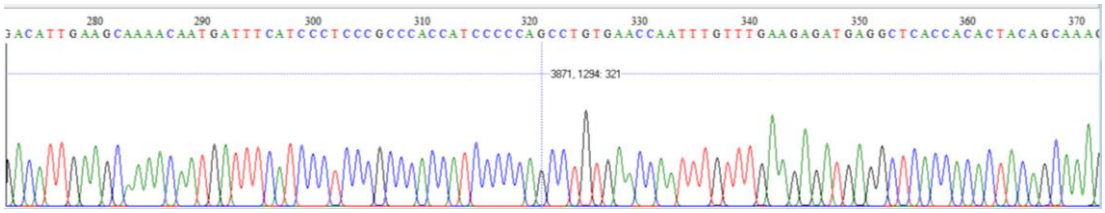
Kromozom 5'te lokalize olan lncRNA PART1'in SNP (rs8176070) polimorfizmini gösteren 508 bç'lik PCR ürününün DNA sekans analizi yapılmıştır.Çizgi ile gösterilen CCCA**G**C dizisi analiz edilmiştir. Analiz sonucuna göre bir allelde G diğer allelde A nükleotitine sahip ise heterozigot Bb genotipini göstermektedir (Şekil 4.4-B).

Yabanıl tip (bb) genotipi

A)



B)



Şekil 4.5. A) Homozigot bb genotipe sahip bireyin ileri (forward) okuma yönündeki DNA sekans analiz görüntüsü B) Homozigot bb genotipe sahip bireyin geri (reverse) okuma yönündeki DNA sekans analiz görüntüsü.

Kromozom 5'te lokalize olan lncRNA PART1'in SNP (rs8176070) polimorfizmini içeren 508 bç'lik PCR ürününün DNA sekans analizi yapılmıştır. Çizgi ile gösterilen G**C**TGGG dizisi analiz edilmiştir. Analiz sonucuna göre iki allelde C nükleotitine sahip ise homozigot bb genotipini göstermektedir (Şekil 4.5-A).

Kromozom 5'te lokalize olan lncRNA PART1'in SNP (rs8176070) polimorfizmini gösteren 508 bç'lik PCR ürününün DNA sekans analizi yapılmıştır.

Çizgi ile gösterilen CCCA**G**C dizisi analiz edilmiştir. Analiz sonucuna göre iki allelde G nükleotitine sahip ise homozigot bb genotipini göstermektedir (Şekil 4.4-B).

Yapılan DNA sekans analiz sonuçlarına göre 508 bç'lik PCR ürünü iki yönlü okunmuştur. Analiz sonuçlarına göre homozigot bb (yabanıl tip) genotipine sahip bireyler ileri (forward) okumada G**C**TGGG dizisine, geri (reverse) okumada CCCA**G**C dizisine sahip olduğu için koyu renkle gösterilen nükleotid için tek bir pik görülmüştür.

Heterozigot Bb genotipine sahip bireylerin iki yönlü okumalarında ilgili nükleotid için iki farklı pik görülmüştür.

Homozigot BB genotipine sahip bireylerde ise her iki allelde de mutasyon gerçekleştiği için ilgili nükleotid için yabanıl tipten farklı olarak tek bir pik görülmüştür.

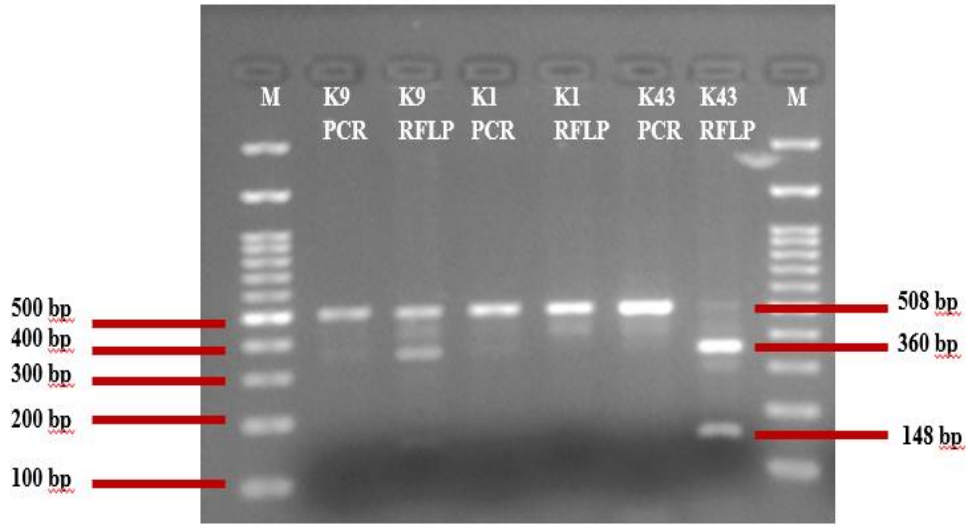
4.3. RFLP Sonuçları

Yapılan çalışmada, 102 diz OA grubu ve 81 kontrol grubundan alınan periferik kan örneklerinden elde edilen genomik DNA'nın, PCR ile çoğaltılmasından sonra LcnRNA PART1 genine ait diz OA ile ilişkisi olduğu düşünülen SNP (rs8176070) polimorfizmi RFLP yöntemi ile incelenmiştir. Elde edilen 508 bç PCR ürünü, SNP (rs8176070) için RFLP analizine tabi tutuldu. Yabanıl tip genotip (CC) "bb", heterozigot polimorfik genotip (CN) "Bb", homozigot polimorfik genotip (NN) "BB" olarak kodlandı.

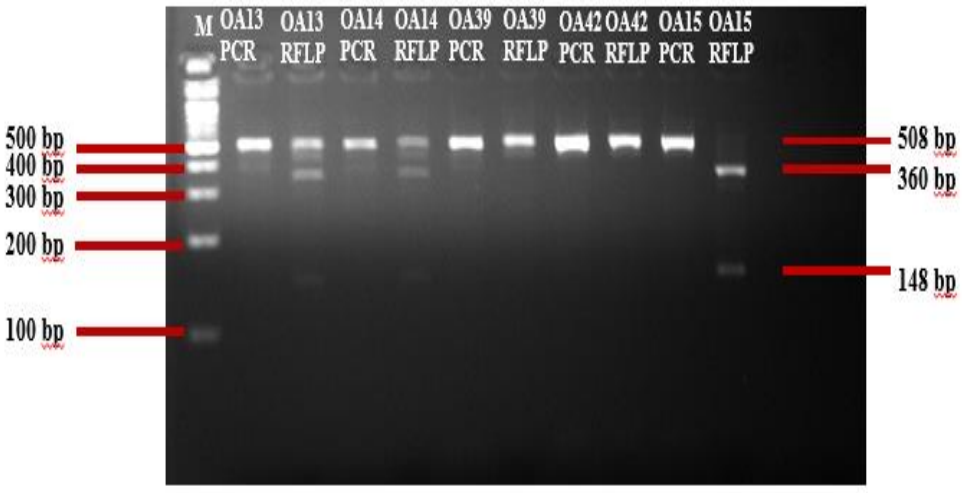
Agaroz jel elektroforezi görüntüleri sonucunda elde edilen fragmentler, BB, Bb ve bb olan üç genotip açısından değerlendirilmiş ve lncRNA PART1 SNP (rs8176070) polimorfizmine ait genotip profilleri belirlenmiştir (Şekil 4.6. ve Şekil 4.7).

Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te her iki grubun RFLP sonuçları agaroz jel elektroforezi ile gösterilmiştir. "M" harfi DNA belirtecini ifade etmektedir. %1,5 'lik konsantrasyonda hazırlanan agaroz jelin bir kuyucuğa aynı olgunun PCR, diğer kuyucuğa RFLP örneklerinden 10 µl olacak şekilde yüklenmiştir. Jel görüntüsüne göre 360 bç'lik ve 148 bç'lik iki fragmente sahip olgular yabanıl tip genotipi (CC)

"bb", 360 bç'lik, 148 bç'lik ve 508 bç'lik üç fragmente sahip olgular heterozigot polimorfik genotipi (CN) "Bb" ve 508 bç'lik tek fragmente sahip olgular homozigot polimorfik genotipi (NN) "BB" göstermiştir.



Şekil 4.6. LncRNA PART1 gen bölgesinin BseY I enzimi ile kesimi sonucu K9, K1 ve K43 numaralı sağlıklı bireylerden elde edilen RFLP ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M harfi 100-1000 baz çiftlik DNA belirtecini ifade etmektedir.



Şekil 4.7. LncRNA PART1 gen bölgesinin BseY I enzimi ile kesimi sonucu OA13, OA14, OA15, OA39 ve OA42 numaralı diz OA hasta olgularından elde edilen RFLP ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M harfi 100-1000 baz çiftlik DNA belirtecini ifade etmektedir.

4.4. Sonuçların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Çalışmaya alınan olguların yaş ortancası OA grubunda 60.5 yıl (ÇAG: 53.8-67.0), kontrol grubunda 46.0 yıl (ÇAG: 40.5-51.0) olarak elde edilmiştir (Tablo 4.2). OA grubunun %75.5'inin (n=77), kontrol grubunun %55.6'sının (n=45) kadın olduğu görülmüştür. İki grup karşılaştırıldığında, OA grubu hastalarının yaşı ve kadın oranının kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Benzer şekilde hasta grubunda BKI ve WOMAC puanı kontrol grubuna göre daha yüksek elde edilmiştir ($p\leq0.001$). Hasta grubunun Kelgren-Lawrence derecesine göre dağılımı Tablo 4.1 'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Hasta ve kontrol grubunda demografik ve klinik özelliklerin dağılımı.

	OA Grubu (n=102)	**Kontrol Grubu (n=81)**	**Test İstatistiği**	**p-değeri**
Yaş (yıl)	60.5 (53.8-67.0)	46.0 (40.5-51.0)	Z=8.310	**<0.001**
Cinsiyet (K)	77 (75.5)	45 (55.6)	χ^2=8.074	**0.004**
BKI (kg/m^2)	31.22 (27.65-36.04)	29.00 (25.27-32.19)	Z=3.395	**0.001**
WOMAC puanı	45.83 (29.93-64.85)	1.04 (0.00-5.21)	Z=10.974	**<0.001**
KL derecesi				
1	16 (15.6)			
2	22 (21.6)			
3	31 (30.4)			
4	33 (32.4)			

OA: Osteoartrit, K: Kadın, BKI: Beden kitle indeksi, KL: Kellgren-Lawrence

Sayısal veriler ortanca (1. çeyrek-3. çeyrek), kategorik veriler frekans (%) ile özetlenmiştir.

OA ve kontrol grubunda genotip dağılımı incelendiğinde, OA grubunun %13.8'i (n=14) ile kontrol grubunun %13.6'sında (n=11) mutant homozigot BB, OA grubunun %43.1'i (n=44) ile kontrol grubunun %45.7'sinde (n=37) heterozigot genotip Bb, OA grubunun %43.1'i (n=44), kontrol grubunun %40.7'sinde (n=33) homozigot bb olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.2). BB veya Bb genotipleri için odds oranları istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Gruplarda allel dağılımları benzerdir ($p=0.875$).

Tablo 4.2. Kontrol ve OA gruplarındaki genotip ve allel dağılımı.

	OA Grubu (n=102)	Kontrol Grubu (n=81)	p-değeri	OO (%95 GA)
Genotip				
bb	44 (43.1)	33 (40.7)		
Bb	44 (43.1)	37 (45.7)	0.721	0.892 (0.476-1.672)
BB	14 (13.8)	11 (13.6)	0.920	0.955 (0.384-2.370)
Allel				
b	88 (60.3)	70 (59.3)		
B	58 (39.7)	48 (40.7)	0.875	0.961 (0.586-1.577)

OA: Osteoartrit, OO: Odds oranı, GA: Güven aralığı. Veriler frekans (%) ile özetlenmiştir.

5. TARTIŞMA

OA'nın temel patolojik özelliği kıkırdak hasarıdır. Kondrosit ECM'sinin bozulması ve kondrositlerin apoptozu OA'nın önemli nedenlerinden biridir (106). Bazı çalışmalar, anormal olarak ifade edilen lncRNA'ların OA'nın birçok patolojik süreci ile yakından ilişkili olduğunu ileri sürmüştür (107, 108). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda kıkırdak dokusunda ve kondrositlerde lncRNA ifadesinin tespit edildiği bildirilmiştir. *PART1*'in miR-373-3p/SOX4 sinyal yolağını düzenleyerek OA ilerlemesini uyardığı düşünülmektedir. *SOX4* ifadesi, OA'li hastalarda kontrol grubuna göre önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur ve benzer şekilde, *SOX4*, OA kondrositlerinde yüksek oranda ifade edilmiştir. Ayrıca, SOX4'ün ifadesindeki artma, *PART1*'in ifadesinde azalmasıyla indüklenen hücre proliferasyonunun, ECM degradasyonunun ve apoptozun regülasyonunu etkilemektedir (11).

Çalışmamızda hedeflediğimiz tek nükleotid polimorfizmi (SNP) (rs8176070) NCBI-SNP veri tabanında araştırıldığında, kromozom 5 dizisinde, 60541649 baz konumunda, *PART1* ile eşleştiği tespit edilmiştir. Bu çalışma SNP (rs8176070)'nin lncRNA PART1'in fonksiyonu ile ilişkili olup olmadığını araştırmak ve bu SNP'nin olası diz OA riskini yansıtma potansiyelini ortaya çıkarmak üzere planlanmıştır.

Stefánsson ve ark. el OA için yapmış oldukları tüm genomu kapsayan çalışmalarda ilk olarak MATN3 SNP6 polimorfizmini tanımladılar (6). Diğer iki çalışmada, MATN3 SNP6 ile el OA'sı arasında benzer bir ilişki buldular ancak bunu diz OA ile ilişkilendiremediler (7, 8).

Matrilinler, makromoleküler ağları bağlayan adaptörler olarak cartilage oligomeric matrix proteini, aggrecan, tip II kollajen ve tip IX kollajen ile etkileşimlere aracılık eden proteinlerdir. *MATN3,* "matrilin-1" ila "matrilin-4" olarak adlandırılan dört ilişkili protein sınıfından biri olan kollajen olmayan bir ECM proteinidir. Gelişen iskelet sisteminde dört matrilinin tümü ifade edilir, ancak *MATN3,* özellikle epifiz kıkırdağı olmak üzere gelişen kıkırdakta sınırlı bir ifade paterni sergiler. Ayrıca MATN3, OA için ilginç bir aday gendir. (6).

MATN3 daha önce Belluoccio ve ark. (109) tarafından çalışılmıştır ve ECM'de bulunan MATN3 molekülünün kıkırdak tiplerinin tümünde ifade edildiğini

bulmuşlardır. Ayrıca, deneysel hücre kültürlerinde *MATN3*'ün, eklem kıkırdağından izole edilen hücrelerin differansiasyonunu saptamada bir indikatör olabileceğini önermişlerdir (109).

Klatt ve ark. (110) primer insan kondrositlerinin yüksek konsantrasyonlarda (5-50 μg/mL) *MATN3* ile indüklendiğinde MMP1 MMP3, MMP13, IL-1β, IL-6, IL-8, INO ve COX-2 üretiminde artış gözlenmiştir ve sonuç olarak inflamasyon ve ECM katabolizmasında artış gözlemlediklerini bildirmişlerdir. Buna ek olarak, ECM'nin degradasyonundan kaynaklanan serbest MATN3 formunun yüksek seviyeleri, ADAMTS4 ve ADAMTS5'in aşırı ekspresyonu ile indüklenmiştir (110).

Normal bir insan kıkırdağında Pullig ve ark.(8), bir osteoartritik kıkırdakta aşırı derecede eksprese edilen ve hastalığın ciddiyeti ile ilişkili olan MATN-3 mRNA'sını düşük fakat anlamlı ekspresyon gösterdiğini bulmuştur. MATN-3'ün OA progresyonunun bir göstergesi olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir (111).

Literatürde *MATN3*'ün kıkırdak homeostazındaki rolü gösterilmiştir. Bazı araştırmacılar, fareler ile yapmış oldukları çalışmalarda *MATN3*'ün fonksiyonel ifadesinin susturulmasının, yetişkin farelerde eklem kondrositlerinin erken hipertrofisine neden olarak OA gelişimini indükleyebileceğini bildirmişlerdir (112).

Vincourt ve ark. tarafından yürütülen iki çalışmada OA hastalarının hem serum hem de sinoviyal sıvısında MATN3 daha yüksek ortaya çıkmıştır (113, 114). İndüklenmiş MATN-3 gen ve protein ekspresyonunun, OA hastalarında meydana gelen doku hasarının derecesi ile ilişkili olduğu bulunmuştur (111).

Otten ve ark. MATN3 mutasyonlarının hücresel düzeyde patojenik mekanizmasını aydınlatmaya çalışmışlardır. Deneysel araştırmalarında, kondrodisplaziye (R121W ve C304S) ve SNP5'e neden olan iki nokta mutasyonu belirlenmiş ve bu genlerin ifade ürünü olan proteinler, primer eklem kondrositlerinde ifade edildiği bulmuşlardır (115).

Çin han popülasyonunu temsilen 732 OA hastası (yaş aralığı: 48-89 yaş) üzerinde yapılan çalışmada, B\B genotipinin özellikle diz OA riskini artırdığını bulmuşlardır (OR = 1.724,% 95 CI = 1.071-2.770; p = 0.025). Ayrıca, kontrol grubu

ile karşılaştırıldığında, B allelinin artmış diz OA'sı üzerinde etkisi olabileceğini bulmuşlardır (OR = 3.143,% 95 CI = 2.283-4.328; p = 0.000). Sonuç olarak, coğrafi dağılımın ilgili etnik farklılıklarla açıklanabileceğini belirtmişlerdir (5). Bu çalışma ayrıca heterozigot B\b genotipli diz OA hastalarında daha yüksek bir Lequesne skoru ve KL derecelendirmesi gösterdikleri ortaya konulmuştur. Yabanıl tip b\b genotipine sahip bireylerde, heterozigot B\b genotipine sahip olanlara göre daha az ciddi sakatlık ve radyolojik bulgular görülmüştür. Homozigot B\B genotipine sahip hastalar, en düşük Lequesne skoruna sahip olmalarına rağmen ve sakatlık ve radyolojik bulgular olarak en hafif grup olarak bulunmuştur. Bu durumda, B\b genotipine sahip hastaların, B\B ve b\b genotiplerine sahip diğer hastalara göre daha kötü klinik ve radyolojik bulgulara sahip olduğu anlamına gelmektedir (2).

Gu ve ark., mevcut çalışmasının dikkate alınması gereken bazı sınırlılıkları vardır. Birincisi, örneklem büyüklüğü nispeten küçüktür ve bu da mevcut herhangi bir ilişkiyi, özellikle de el OA'sı olan hastaların sayısını saptamak için istatistiksel gücü sınırlayabilmektedir. İkinci olarak, MATN3 ifadesinin ve *in vivo* aktivitesinin kontrolü karmaşıktır ve iyi anlaşılmamıştır ve diğer genlerdeki polimorfizmler tarafından modülasyona tabi tutulabilmektedir. Üçüncüsü, Kellgren-Lawrence derecesine sahip her hasta için orijinal veri eksikliği, MATN3 SNP6 polimorfizmi ile OA arasındaki ilişkinin daha ileri analizini sınırlandırmıştır. Dahası, hastaların tamamı Çin'in kuzeydoğu bölgesinden olduğu için sonuçları Çin'in tüm durumunu temsil etmeyebilir (5).

Çalışmamızın başlangıcında *MATN3* geninde görülen SNP6 (rs8176070) polimorfizminin Türk primer diz OA hasta popülasyonundaki korelasyon ilişkisini belirlemeyi hedefledik. Çalışmamızda PCR-RFLP tabanlı yaklaşım Diab (2) ve Gu (5) tarafından açıklandığı gibi kullanıldı. Bununla birlikte *MATN3*'e özgü 501 bç'lik PCR ürünün yayınlarında belirttikleri gibi BseYI enzimi tarafından kesilmesi ve yabanıl tip genotip için 149 ve 352 bç'lik bir çift bant, heterozigot genotip için 501, 149 ve 352 bç'lik üç bant ve homozigot polimorfik genotip için 501 bç'lik tek bir bant görülmesi bekleniyordu.

Yukarıda açıklanan her iki çalışmada da kullanılan primer çifti (ileri primer: 5'-GGACAGGATCCCACAAAAAG-3 've ters primer: 5'-

GAAAGAGGGCTACAACAGG-3'), bir Standart Nükleotid BLAST araştırması yoluyla yeniden incelendi (https: // blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Bu çalışmalarda iddia edilenin aksine, bu primerler, kromozom 2 bölgesi 2p24-p23'ün kısa kolunda yer aldığı bilinen MATN3 ile eşleşmemiştir (2). Bunun yerine, kromozom 5'teki dizi ile eşleşmiştir (erişim numaraları AC022428.7 ve AC016591.6).

Ek olarak, ayrıntılı olarak araştırıldığında, bilinen *MATN3* dizisi (erişim numarası: NM_002381.5, GeneID: 4148) bir BseYI enzim kesim bölgesi içermemektedir. Kullanılan primerler ayrıca UCSC genom tarayıcısının UCSC In-Silico PCR arayüzünde seçilen son 2013 Human Genom sekansına karşı doğrulandı (https: // genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr) [Assembly: Aralık 2013 (GRCh38 / hg38)] (9). Sonuçlar kromozom 5'te 508 bç'lik bir ürün ortaya çıkardı ve bu ürünün Standart Nükleotid BLAST araştırmasında, AC022428.7 ve AC016591.6 erişim numaraları ile aynı diziler oldukları ortaya çıkarıldı. Ayrıntılı olarak incelendiğinde, 508 bç'lik ürününün kromozom 5 üzerindeki konumu (chr5: 60541290-60541797; erişim numarası: NC_000005.10) prostat androjen tarafından düzenlenen transkript 1 (PART1, ayrıca NCRNA00206 olarak da bilinir; GeneID) ile eşleştirildi. Ayrıca, bu 508 bç'lik PCR ürünü, BseYI enziminin endonükleaz aktivitesi sonrasında 148 ve 360 bç'lik DNA fragmentleri ile sonuçlanan tek bir kesim bölgesi içeriyordu.

NCBI-SNP veritabanında son olarak yapılan (www.ncbi.nlm.nih.gov/snp) SNP (rs8176070) polimorfizm araması, 60541649 baz konumunda kromozom 5 üzerinde tanımlandığını ve kromozom 2'de yer alan *MATN3* dizisi ile eşleşmediği *PART1* dizisi ile eşleştiği ortaya çıkarıldı. Sonuç olarak, Diab ve ark. (2) ve Gu ve ark. (5) yayınladıklar çalışmalar iki nedenden dolayı yanıltıcıdır: 1) *PART1*'in SNP (rs8176070) polimorfizmi yanlışlıkla *MATN3*'ün SNP6 polimorfizmi olarak tanımlanmıştır ve *MATN3* sekansında BseYI enzim kesim noktası bulunmamaktadır. 2) *MATN3* için tasarlanıp kullanılan primerler UCSC in silico PCR arayüzünde son 2013 Human Genom sekansında kromozom 2'e değil kromozom 5 ile eşleşmiştir. Bu bölge analiz edilince bulunan sekansın lncRNA PART1' e ait olduğu bulunmuştur.

Yüz iki primer diz OA hastası ve 81 kontrol deneği bu çalışmaya dahil edildi. Tüm deneklerden yazılı onam alındı. Katılımcılar fiziksel ve radyografik olarak muayene edildi ve Kellgren-Lawrence ölçeğine göre diz OA durumları derecelendirildi. Genomik DNA'yı saflaştırmak için rutin kan testleri sırasında her

denekten 5 ml venöz kan alındı. Genomik DNA, üreticinin protokolüne göre NucleoSpin Kan Kiti (Machery-Nagel) ile saflaştırıldı. Saflaştırılan genomik DNA bütünlüğü açısından test edildi, konsantrasyonu hesaplandı ve 1µg'ı PCR için kullanıldı. PCR reaksiyonunda *PART1* için dizayn edilmiş olan primer çifti [ileri (Forward): primer 5'-GGACAGGATCCCACAAAAAAG-3' ve ters (reverse) primer:5'-GAAAGAGGGGCTACAACAGG-3') kullanıldı. Elde edilen 508 bç PCR ürünü, SNP (rs8176070) için DNA sekans analizine tabi tutuldu. Yabanıl genotip (CC) "bb", heterozigot polimorfik genotip (CN) "Bb" ve homozigot polimorfik genotip (NN) "BB" olarak kodlandı.

Deneklerin demografik özellikleri Tablo 4.2 'de özetlenmiştir. Tablo 4.2'de özetlenen sonuçlara göre, çalışmaya alınan katılımcıların yaş ortancası primer diz OA grubunda 60.5 yıl (ÇAG:53.8-67.0), kontrol grubunda 46.0 yıl (ÇAG:40.5-51.0) olarak hesaplanmıştır. Primer diz OA grubunun %75.5'inin (n=77), kontrol grubunun %55.6'sının (n=45) kadın olduğu görülmüştür. Primer diz OA ve kontrol grupları karşılaştırıldığında, primer diz OA grubu hastalarının yaşı ve kadın oranının kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Benzer şekilde primer diz OA hasta grubunda BKI ve WOMAC puanı kontrol grubuna göre daha yüksek elde edilmiştir ($p\leq0.001$). Hasta grubunun Kelgren-Lawrence derecesine göre dağılımı Tablo 4.2 'de verilmiştir.

Çalışmamıza katılan tüm olguların DNA sekans analizleri yapılmıştır. Analiz sonuçlarına göre primer diz OA ve kontrol grubunda genotip dağılımı incelendiğinde, primer diz OA grubunun %13.8'i (n=14) ile kontrol grubunun %13.6'sında (n=11) homozigot polimorfik genotipi (NN) "BB", OA grubunun %43.1'i (n=44) ile kontrol grubunun %45.7'sinde (n=37) heterozigot polimorfik genotipi (CN) "Bb", OA grubunun %43.1'i (n=44), kontrol grubunun %40.7'sinde (n=33) yabanıl tip genotipi (CC) "bb" olduğu tespit edilmiştir. Homozigot polimorfik genotipi (NN) "BB" veya heterozigot polimorfik genotipi (CN) "Bb" genotipleri için odds oranları istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Gruplarda allel dağılımlarının benzer ($p=0.875$) oldukları tespit edilmiştir (Tablo 4.3).

Sonuç olarak genomda diz OA'sı ile korelasyon ilişkisi olabilecek farklı SNP polimorfizmlerinin tespit edilerek çalışmaya dahil edilmesi ve örneklem büyüklüğünün genişletilmesi planlanmaktadır. SNP polimorfizmlerinin belirlenmesi

hastalığın patogenezine ve hastalığa yönelik yeni tedavi yöntemleri geliştirilmesine katkıda bulunabileceği öngörülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Türk diz OA'lı popülasyon ve kontrolleri üzerinde gerçekleştirilen bu çalışmada lncRNA PART1'e ait olan SNP (rs8176070) ile diz OA arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Dolayısıyla, analiz edilen popülasyonda SNP (rs8176070) diz OA riskini yansıtma potansiyeline sahip değildir. Literatürde farklı popülasyon çalışmalarında SNP (rs8176070)'nin diz OA riskini yansıtma potansiyeli açısından farklı ve bizim çalışma sonuçlarımız ile çelişen sonuçlar bulunmuştur. Bu hipotezin daha fazla popülasyon üzerinde ve daha yüksek deney sayıları ile araştırılması önem taşımaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. D'Arrigo D, Roffi A, Cucchiarini M, Moretti M, Candrian C, Filardo G. Secretome and Extracellular Vesicles as New Biological Therapies for Knee Osteoarthritis: A Systematic Review. *J. Clin. Med.* 2019, 8: 1867.

2. Diab SM, Kamal HM, Mansour AI, Fawzy RM, Azab BS. Clinical significance of Matrilin-3 gene polymorphism in Egyptian patients with primary knee osteoarthritis. *Eur. J. Rheumatol.* 2017, 4(3): 200–204.

3. Xie C, Chen Q. Adipokines: New Therapeutic Target for Osteoarthritis?. *Curr. Rheumatol. Rep.* 2019, 21(12).

4. Lespasio MJ, Piuzzi NS, Husni ME, Muschler GF, Guarino A, Mont MA. Knee Osteoarthritis: A Primer. *Perm. J.* 2017, 21: 1–7.

5. Gu J. MATN3 gene polymorphism is associated with osteoarthritis in Chinese Han population: A community-based case-control study. *Sci. World J.* 2012, 6–11.

6. Stefánsson SE. Genomewide scan for hand osteoarthritis: A novel mutation in matrilin-3. *Am. J. Hum. Genet.* 2003, 72(6): 1448–1459.

7. Min J. Association of matrilin-3 polymorphisms with spinal disc degeneration and osteoarthritis of the first carpometacarpal joint of the hand. *Ann. Rheum. Dis.* 2006, 65(8): 1060–1066.

8. Pullig O, Tagariello A, Schweizer A, Swoboda B, Schaller P,Winterpacht A. MATN3 (matrilin-3) sequence variation (pT303M) is a risk factor for osteoarthritis of the CMC1 joint of the hand, but not for knee osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2007, 66(2): 279–280.

9. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, et al. The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* 2002, 12: 996–1006.

10. Piskin I, Akcan G, Firat A, Tufan AC. A single-nucleotide polymorphism (rs8176070) of lncRNA PART1 may reflect the risk for knee osteoarthritis. *Eur. J. Rheumatol.* 2020, 7(2): 88–89.

11. Zhu YJ, Jiang DM. LncRNA PART1 modulates chondrocyte proliferation, apoptosis, and extracellular matrix degradation in osteoarthritis via regulating MIR-373-3p/SOX4 axis. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci*. 2019, 23(19): 8175–8185.

12. Anthony L. Mescher (Ed), Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, Chapter 7. 15 th Ed. *McGraw-Hill*, 2018 (ISBN:9781260288414).

13. Pawlina W, Ross MH. Histology A text and atlas with correlated cell and molecular biology. Chapter 7. 6th ed, Baltimore, *Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business*, 2011, 198-253 (ISBN: 9780781772006).

14. Tufan AC. Işık Mikroskopik Görseller ve Çizimli anlatımlarla Histoloji Laboratuvar Kitabı, 1.Baskı, *Ankara Nobel Tıp Kitapevleri*, Ankara, 2019, 59-70.

15. Gartner LP, James LH. Color Textbook of Histology. Chapter 7. 3rd *Ed.Saunders*, 2006. (ISBN:9781416029458).

16. Kierszenbaum AL. Histology and Cell Biology: An introduction to Pathology. 5th Ed. *Elsevier*, 2019, 128-132 (ISBN:9780323673211).

17. Eşrefoğlu M. Genel Histoloji. 5.Bölüm 2.Baskı. *İstanbul Tıp Kitabevleri*, 2016 (ISBN:9786054949601).

18. San Antonio JD, Tuan RS: Chondrogenesis of limb bud mesenchyme in vitro: stimulation by cations. *Dev Biol*. 1986, 115: 313-24.

19. Moore KL, Persaud TVN: The Developing Human: Clinically Oriented Embryology. 5th ed. Philadelphia, PA, *W.B. Saunders Company*, 1993.

20. Rosier RN, O'Keefe RJ, Crabb ID, Puzas JE: Transforming growth factor beta: an autocrine regulator of chondrocytes. *Connect Tissue Res.* 1989, 20: 295-301.

21. O'Keefe RJ, Crabb ID, Puzas JE, Rosier RN: Effects of transforming growth factor-beta 1 and fibroblast growth factor on DNA synthesis in growth plate chondrocytes are enhanced by insulinlike growth factor-I. *J Orthop Res.* 1994, 12: 299-310.

22. Oberlender SA, Tuan RS: Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis. *Development*. 1994, 120: 177-87.

23. Oberlender SA, Tuan RS: Spatiotemporal profile of N-cadherin expression in the developing limb mesenchyme. *Cell Adhes Commun.* 1994, 2: 521-37.

24. Tavella S, Raffo P, Tacchetti C, Cancedda R, Castagnola P: N-CAM and N-cadherin expression during in vitro chondrogenesis. *Exp Cell Res*. 1994, 215: 354-62.

25. Hall BK, Miyake T: Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited. *Int J Dev Biol*. 1995, 39: 881-93.

26. Hall BK, Miyake T: All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays*. 2000, 22: 138-47.

27. Hickok NJ, Haas AR, Tuan RS: Regulation of chondrocyte differentiation and maturation. *Microsc Res Tech*. 1998, 43: 174-90.

28. Cserjesi P: A basic helix-loop- helix protein that prefigures skeletal formation during Mouse embryogenesis. *Development*. 1995, 121: 1099-110.

29. Wright E, Hargrave MR, Christiansen J, Cooper L, Kun J: The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat Genet.* 1995, 9: 15-20.

30. Tufan AC, Tuan RS: Wnt regulation of limb mesenchymal chondrogenesis is accompanied by altered N-cadherin-related functions. *FASEB J*. 2001, 15: 1436-8.

31. Deng C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, Kuo A, Leder P: Fibroblast growth factor receptor-3 is a negative regulator of bone growth. *Cell*. 1996, 84: 911-21.

32. Webster MK, Donoghue DJ: Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor-3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. *EMBO J*. 1996,15: 520-7.

33. Kaplan SL, Grunbach MM: Pathophysiology and treatment of sexual precocity. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990, 71: 785-9.

34. Ballock RT, Reddi AH: Thyroxine is the serum factor that regulates morphogenesis of columnar cartilage from isolated chondrocytes in chemically defined medium. *J Cell Bio.* 1994, 126: 1311-8.

35. Goodrich LV, Johnson RL, Milenkovic L, McMahon JA, Scott MP: Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. *Genes Dev*. 1996, 10: 301-12.

36. Abou-Samra AB, Juppner H, Force T, Freeman MW, Kong XF: Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium. *Proc Natl Acad Sci*. 1992, 89: 2732-6.

37. Lida-Klein A, Varlotta V, Hahn TJ: Protein kinase C activity in UMR-106-01 cells: effects of parathyroid hormone and insulin. *J Bone Miner Res*. 1989, 4: 767-74.

38. Vaux DL, Cory S, Adams JM: Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature.* 1988, 335: 440-2.

39. Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, Wang K, Boise LH: Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci.* 1995, 92: 7834-8.

40. Nakayama K, Negishi I, Kuida K, Sawa H, Loh DY: Targeted disruption of Bcl-2 alpha beta in mice: occurrence of gray hair, polycystic kidney disease, and lymphocytopenia. *Proc Natl Acad Sci*. 1994, 91: 3700-4.

41. Amling M, Neff L, Tanaka S, Inoue D, Kuida K: Bcl-2 lies downstream of parathyroid hormone-related peptide in a signaling pathway that regulates chondrocyte maturation during skeletal development. *J Cell Bio.* 1997, 136: 205-13.

42. Lee K, Deeds JD, Segre GV: Expression of parathyroid hormone-related peptide and its receptor messenger ribonucleic acids during fetal development of rats. *Endocrinology*. 1995, 136: 453-63.

43. Wallen-Ohman M, Lonnbro P, Schon A, Borrebaeck CA: Antibody-induced apoptosis in a human leukemia cell line is energy dependent: thermochemical analysis of cellular metabolism. *Cancer Lett.* 1993, 75: 103-9.

44. Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N: p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature.* 1999, 398: 714-8.

45. Carballo CB, Nakagawa Y, Sekiya I, Rodeo SA. Basic Science of Articular Cartilage. *Clin Sports Med.* 2017, 36(3): 413-425.

46. Gilbert SF: Developmental Biology. 6th ed. *Sunderland*, MA, Sinauer, 2001.

47. DeLise AM, Fischer L, Tuan RS: Cellular interactions and signaling in cartilage development. *J Osteoarthritis Cartilage.* 2000, 8: 309-34.

48. McAlindon TE. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2014, 22: 363-388.

49. Fang H, Beier F. Mouse models of osteoarthritis: modelling risk factors and assessing outcomes. *Nat Rev Rheumatol*. 2014, 10(7): 413-421.

50. Teeple E, Jay GD, Elsaid KA, Fleming BC.Animal models of osteoarthritis: challenges of model selection and analysis. *AAPS J.* 2013, 15(2): 438-46.

51. Malfait AM, Little CB. (2015) On the predictive utility of animal models of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2015, 17: 225.

52. Little CB and Smith MM. Animal Models of Osteoarthritis. *Current Rheumatology Reviews*. 2008, 4: 1-8.

53. Hulshof CTJ. WHO/ILO work-related burden of disease and injury: Protocol for systematic reviews of exposure to occupational ergonomic risk factors and of the effect of exposure to occupational ergonomic risk factors on osteoarthritis of hip or knee and selected other. *Environ. Int*. 2019, 125: 554–566.

54. Hunter H, Siwiec RM. Knee Osteoarthritis. https://pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/29939661. 02.10.2020.

55. Manlapaz DG, Sole G, Jayakaran P, Chapple CM. Risk Factors for Falls in Adults with Knee Osteoarthritis: A Systematic Review. *PM R*. 2019, 11(7): 745–757.

56. Magnusson K, Turkiewicz A, Englund M. Nature vs nurture in knee osteoarthritis-the importance of age, sex and body mass index. *Osteoarthr. Cartil.* 2019, 27(4): 586–592.

57. Hussain SM, Neilly DW, Baliga S, Patil S, Meek RMD, "Knee osteoarthritis: A review of management options," *Scott. Med. J*. 2016, 61(1): 7–16.

58. Aboulenain S, Greer JM. Primary Osteoarhritis. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557808. 02.10. 2020.

59. Jeffries MA. Osteoarthritis year in review 2018: genetics and epigenetics. *Physiol. Behav.* 2018, 26(3): 304–311.

60. Kisand K, Tamm AE, Lintrop M, Tamm AO. New insights into the natural course of knee osteoarthritis: early regulation of cytokines and growth factors, with emphasis on sex-dependent angiogenesis and tissue remodeling. A pilot study. *Osteoarthr. Cartil.* 2018, 26(8): 1045–1054.

61. Hunter DJ, Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis. *Lancet.* 2019, 393(10182): 1745–1759.

62. Hunter DJ, Little CB. The great debate: Should Osteoarthritis Research Focus on "Mice" or "Men"? *Osteoarthritis Cartilage*. 2016, 24(1): 4-8.

63. American College of Rheumatology Subcommittee on Osteoarthritis Guidelines. Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee: 2000 update. *Arthritis Rheum*. 2000, 43: 1905.

64. Khan NM, Haqqi TM. Epigenetics in osteoarthritis: Potential of HDAC inhibitors as therapeutics. *Pharmacol. Res.* 2018, 128(1): 73–79.

65. Chen P. Intra-articular platelet-rich plasma injection for knee osteoarthritis: a summary of meta-analyses. *J. Orthop. Surg. Res.* 2019, 14(1): 1–11.

66. Kang M, Ren M, Li Y, Fu Y, Deng M, Li C. Exosome-mediated transfer of lncRNA PART1 induces gefitinib resistance in esophageal squamous cell carcinoma via functioning as a competing endogenous RNA. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2018, 37(1): 1–16.

67. Dhanoa JK, Sethi RS, Verma R, Arora JS, Mukhopadhyay CS. Long non-coding RNA: Its evolutionary relics and biological implications in mammals: A review. *J. Anim. Sci. Technol.* 2018, 60(1): 1–10.

68. Liu Y, Ye F. Construction and integrated analysis of crosstalking ceRNAs networks in laryngeal squamous cell carcinoma. *Peer J*. 2019, 7: e7380.

69. Hu X. Downregulated Long Noncoding RNA PART1 Inhibits Proliferation and Promotes Apoptosis in Bladder Cancer. *Technol. Cancer Res. Treat*. 2019, 18(300): 1–9.

70. Chen WK. lncRNAs: novel players in intervertebral disc degeneration and osteoarthritis. *Cell Prolif*. 2017, 50(1): 1–12.

71. Li R, Zhu H, Luo Y. Understanding the functions of long non-coding RNAs through their higher-order structures. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17(5).

72. Sun M, Geng D, Li S, Chen Z, Zhao W. LncRNA PART1 modulates toll-like receptor pathways to influence cell proliferation and apoptosis in prostate cancer cells. *Biol. Chem.* 2018, 399(4): 387–395.

73. Li S. Complex integrated analysis of lncRNAs-miRNAs-mRNAs in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2017, 73: 1–9.

74. Cao J. The functional role of long non-coding RNAs and epigenetics. *Biol. Proced. Online*. 2014, 16(1): 1–13.

75. Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and Functions of Long Noncoding RNAs. *Cell.* 2009, 136(4): 629–641.

76. Lu C, Li Z, Hu S, Cai Y, Peng K. LncRNA PART-1 targets TGFBR2/Smad3 to regulate cell viability and apoptosis of chondrocytes via acting as miR-590-3p sponge in osteoarthritis. *J. Cell. Mol. Med.* 2019, 23(12): 8196–8205.

77. Dang X., Lian L, Wu D. The diagnostic value and pathogenetic role of lncRNA-ATB in patients with osteoarthritis. *Cell Mol Biol Lett*. 2018, 27(23): 55.

78. Liu Y,Lin L, Zou R, Wen C, Wang Z, Lin F. MSC-derived exosomes promote proliferation and inhibit apoptosis of chondrocytes via lncRNA-KLF3-AS1/miR-206/GIT1 axis in osteoarthritis. *Cell Cycle*. 2018, 17(21-22): 2411-2422.

79. Huang J, Liu L, Yang J, Ding J,Xu X. lncRNA DILC is downregulated in osteoarthritis and regulates IL-6 expression in chondrocytes. *J Cell Biochem.* 2019, 120(9): 16019-16024.

80. Xiao Y, Bao Y,Tang L,Wang L. LncRNA MIR4435-2HG is downregulated in osteoarthritis and regulates chondrocyte cell proliferation and apoptosis. *J Orthop Surg Res.* 2019, 14(1): 247.

81. Zhang Y, Wang F, Chen G, He R, Yang L. LncRNA MALAT1 promotes osteoarthritis by modulating miR-150-5p/AKT3 axis. *Cell Biosci.* 2019, 1(9): 54.

82. Li X, Huang TL, Zhang GD, Jiang JT,Guo PY.LncRNA ANRIL impacts the progress of osteoarthritis via regulating proliferation and apoptosis of osteoarthritis synoviocytes. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019, 23(22): 9729-9737.

83. Huang T, Wang J, Zhou Y, Zhao Y, Hang D, Cao Y. LncRNA CASC2 is up-regulated in osteoarthritis and participates in the regulation of IL-17 expression and chondrocyte proliferation and apoptosis. *Biosci Rep.* 2019, 39(5): BSR20182454.

84. Jiang M, Liu J, Luo T, Chen Q, Lu M, Meng D. LncRNA PACER is down-regulated in osteoarthritis and regulates chondrocyte apoptosis and lncRNA HOTAIR expression. *Biosci Rep.* 2019, 39(6): BSR20190404.

85. Luo X, Wang J, Wei X, Wang S, Wang A. Knockdown of lncRNA MFI2-AS1 inhibits lipopolysaccharide-induced osteoarthritis progression by miR-130a-3p/TCF4. *Life Sci.* 2020, 240: 117019.

86. Liu C, Ren S, Zhao S, Wang Y. LncRNA MALAT1/MiR-145 Adjusts IL-1β-Induced Chondrocytes Viability and Cartilage Matrix Degradation by Regulating ADAMTS5 in Human Osteoarthritis. *Yonsei Med J*. 2019, 60(11): 1081-1092.

87. Li L,Lv G, Wang B, Kuang L.The role of lncRNA XIST/miR-211 axis in modulating the proliferation and apoptosis of osteoarthritis chondrocytes through CXCR4 and MAPK signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018, 503(4): 2555-2562.

88. Zhao Y, Xu J. Synovial fluid-derived exosomal lncRNA PCGEM1 as biomarker for the different stages of osteoarthritis. *Int Orthop*. 2018, 42(12): 2865-2872.

89. Tang L,Ding J, Zhou G,Liu Z. LncRNA-p21 promotes chondrocyte apoptosis in osteoarthritis by acting as a sponge for miR-451. *Mol Med Rep.* 2018, 18(6): 5295-5301.

90. Tang LP, Ding JB, Liu ZH, Zhou GJ .LncRNA TUG1 promotes osteoarthritis-induced degradation of chondrocyte extracellular matrix via miR-195/MMP-13 axis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018, 22(24): 8574-8581.

91. Li Y, Li S, Luo Y, Liu Y, Yu N. LncRNA PVT1 Regulates Chondrocyte Apoptosis in Osteoarthritis by Acting as a Sponge for miR-488-3p. *DNA Cell Biol*. 2017, 36(7): 571-580.

92. Wang CL, Peng JP,Chen XD.LncRNA-CIR promotes articular cartilage degeneration in osteoarthritis by regulating autophagy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018, 505(3): 692-698.

93. Zhang L, Zhang P,Sun X, Zhou L, Zhao J. Long non-coding RNA DANCR regulates proliferation and apoptosis of chondrocytes in osteoarthritis via miR-216a-5p-JAK2-STAT3 axis. *Biosci Rep.* 2018, 38(6): BSR20181228.

94. Lou T, Ke K, Zhang L, Miao C, Liu Y. LncRNA PART1 facilitates the malignant progression of colorectal cancer via miR-150-5p/LRG1 axis. *J. Cell. Biochem.* 2020, 1–11.

95. Zhou T, Wu L, Ma N, Tang F, Zong Z, Chen S. LncRNA PART1 regulates colorectal cancer via targeting miR-150-5p/miR-520h/CTNNB1 and

activating Wnt/β-catenin pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2020, 118: 105637.

96. Lin B. PART-I: A novel human prostate-specific, androgen-regulated gene that maps to chromosome 5q12. *Cancer Res*. 2000, 60(4): 858–863.

97. Sidiropoulos M, Chang A, Jung K, Diamandis EP. Expression and regulation of prostate androgen regulated transcript-1 (PART-1) and identification of differential expression in prostatic cancer. *Br. J. Cancer*. 2001, 85(3): 393–397.

98. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M.Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum.* 1986, 29(8): 1039-49.

99. Hochberg Marc C., Alan J. Silman, Josef S. Smolen, Michael E. Weinblatt, Michael H. Weisman. Rheumatology, 6th edition, *Mosby-Elsevier Ltd*. 2015, page: 1435, ISBN: 978-0-323-09138-1.

100. WOMAC anketi. http://www.ftronline.com/womac/. 02.10.2020.

101. Tüzün EH, L. Eker, A. Aytar, A. Daşkapan, and M. Bayramoğlu. Acceptability, reliability, validity and responsiveness of the Turkish version of WOMAC osteoarthritis index. *OsteoArthritis and Cartilage*. 2005, 13: 28-33.

102. Rahimzadeh P, Imani F, Faiz SHR, Entezary SR, Zamanabadi MN, Alebouyeh MR. The effects of injecting intra-articular platelet-rich plasma or prolotherapy on pain score and function in knee osteoarthritis. *Clin Interv Aging*. 2018, 13: 73-79.

103. Kohn MD, Sassoon AA, Fernando ND. Classifications in Brief: Kellgren-Lawrence Classification of Osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res*. 2016, 474(8): 1886-93.

104. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteo-arthrosis. *Ann. rheum. Dis.* 1957, 16: 494.

105. Temizkan G, Arda N. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. ISBN: 978-975-4205-83-1, Türkçe, 3. basım, 2008, 345 sayfa.

106. Lepetsos P, Papavassiliou KA, Papavassiliou AG. Redox and NF-κB signaling in osteoarthritis. *Free Radic. Biol. Med.* 2019, 132(9): 90–100.

107. Sun H, Peng G, Ning X, Wang J, Yang H, Deng J. Emerging roles of long noncoding RNA in chondrogenesis, osteogenesis, and osteoarthritis. *Am. J. Transl. Res*. 2019, 11(1): 16–30.

108. Liu Q. Long noncoding RNA related to cartilage injury promotes chondrocyte extracellular matrix degradation in osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2014, 66(4): 969–978.

109. Belluoccio D, Schenker T, Baici A, Trueb B. Characterization of Human Matrilin-3 (MATN3). *Genomics*. 1998, 53(3): 391-394.

110. Klatt AR. Matrilin-3 activates the expression of osteoarthritis-associated genes in primary human chondrocytes. *FEBS Lett.* 2009, 583(22): 3611–3617.

111. Pullig O, Weseloh G, Klatt AR, Wagener R, Swoboda B. Matrilin-3 in human articular cartilage: Increased expression in osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* 2002, 10(4): 253–263.

112. Van Der Weyden L. Functional knockout of the matrilin-3 gene causes premature chondrocyte maturation to hypertrophy and increases bone mineral density and osteoarthritis. *Am. J. Pathol.* 2006, 169(2): 515–527.

113. Vincourt JB. Increased expression of matrilin-3 not only in osteoarthritic articular cartilage but also in cartilage-forming tumors, and down-regulation of SOX9 via epidermal growth factor domain 1-dependent signaling. *Arthritis Rheum.* 2008, 58(9): 2798–2808.

114. Vincourt JB. Matrilin-3 switches from anti- to pro-anabolic upon integration to the extracellular matrix. *Matrix Biol.* 2012, 31(5): 290–298.

115. Otten C,Wagener R, Paulsson M, Zaucke F. Matrilin-3 mutations that cause chondrodysplasias interfere with protein trafficking while a mutation associated with hand osteoarthritis does not. *J. Med. Genet.* 2005, 42(10): 774–779.

8. EKLER

EK-1. Etik Kurul izni

T.C.
YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

SAYI : 26379996 / 63 22.04/2020
KONU :22.04.2020 Tarih ve 08 Sayılı Kurul Kararı

Sayın:Prof. Dr.Ahmet Cevik TUFAN
Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Sorumlu Araştırmacılığını yapmış olduğunuz **"LncRNA PART1 SNP /rs8176070) Gen Polşimorfizminin Türk Diz Osteoartritli Hasta PopülasyonundaDNA Sekans Analizi ile Araştırılması"** isimli **Dr.İlkay PİŞKİN'ın** tez çalışması Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun **22.04.2020** tarih ve **08** sayılı kararı ile başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesi etik ve bilimsel açıdan uygun bulunmuştur

(13.04.2013 tarih ve 28617 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan "İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik" gereği klinik araştırmaların etik kurul onayı alındıktan sonra yılda en az bir ara raporunun, araştırma sonlandırıldıktan sonra bir yıl içerisinde sonuç raporunun Etik Kurula geri bildirimi gerekmektedir. Gerekli bildirimi yapmayanların sonraki Etik Kurul başvuruları kabul edilmeyecektir.)

Bilgilerinize rica ederim

Doç. Dr. Halil KARA
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı

Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi - Etik Kurul Sekreteryası
Bilkent Yolu Şehir Hastanesi Yanı Çankaya /Ankara
Telefon: 0(312) 324 15 55 / 2443

EK-2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Bu katıldığınız çalışma bilimsel bir araştırma olup, araştırmanın adı 'MATN3 SNP6 Gen Polimorfizminin Türk Osteoartrit Hasta Popülasyonunda PCR-RFLP Yöntemi ile Araştırılması'dır.

Bu araştırmanın amacı Osteoartrit (OA) ile ilişkisi olduğu bilinen MATN3 SNP6 gen polimorfizminin Türk popülasyonunda etkilerinin araştırılması planlanmaktadır. SNP6 gen mutasyonunun OA ile ilişkisi olduğu literatürde birçok çalışmada gösterilmiştir. Yapılacak olan polimorfizm çalışması ülkemizde OA hastalığı görülen olgularda popülasyondaki allel durumu (Homozigot, heterozigot ve yabanıl tip genotip) hakkında bilgi sahibi olmamızı kolaylaştıracaktır. Bu amaçla OA için ilerdeki aşamalarda tek bir nokta mutasyon kiti geliştirilebilir. Böylelikle toplumumuzda OA hastalığına yatkınlık kolaylıkla değerlendirilebilir hale gelebilecektir. Farklı bir açıdan da farkli terapötik tedaviler için bir ön çalışma niteliği taşıması mümkün olabilecektir.

Bu araştırmada Ortopedi ve Travmatoloji kliniğine başvurmanıza neden olan diz eklemi şikayetleriniz nedeniyle yapılan radyografik ve fiziksel muayene ile saptanan OA gradeleme skorunuzla birlikte rutin kan verme işleminiz sırasında 1-2 ml ekstra kan EDTA'lı tüplere alınacaktır. Sırasıyla kan örneğinizden genomik DNA'larınız izole edilip PCR-RFLP yöntemi SNP6 mutasyonu taranacaktır. OA ile klinik korelasyon gösteren kıkırdak hücrelerinin etrafındaki ekstrasellüler matrikste önemli görevi olan MATN3 proteinini kodlayan gendeki nokta mutasyonu ve allel frekans durumları analiz edilecektir. Teknik olarak Genomik DNA izolasyonu, MATN3 geninin sekansı ve SNP mutasyonlarında yaygın kullanılan bir teknik olan PCR-RFLP yöntemi uygulanacaktır. Bu araştırmada yer almanız için öngörülen süre 5-10 dk olup, araştırmada yer alacak gönüllülerin sayısı en az 100 olgudur.

Bu araştırma ilgili olarak klinik muayene sırasında doğru bilgi vermeniz ve verilen soru cevap formunun gerçeği yansıtır şekilde doldurulması hastalığın derecelendirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır ve sizin sorumluluklarınızdır.

Bu araştırmada sizin için beklenen veya öngörülen herhangi bir risk ve rahatsızlık söz konusu değildir. Diğer taraftan, siz ve sizin gibi hastaların diz eklemi şikayetlerinin genetik açıdan taranması beklenen yararlar arasında sayılabilir. Bunun yanı sıra, literatüre yeni bir katkı sağlanacak olup ileride yapılacak araştırmalara da temel oluşturulması planlanmaktadır.

Araştırmaya bağlı bir zarar söz konusu olduğunda, bu durumun tedavisi sorumlu araştırıcı tarafından yapılacak, ortaya çıkan masraflar Prof. Dr. A. Çevik TUFAN (0530 3284969) tarafından karşılanacaktır. Araştırma sırasında sizi ilgilendirebilecek herhangi bir gelişme olduğunda, bu durum size veya yasal temsilcinize derhal bildirilecektir. Araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da çalışma ile ilgili herhangi bir sorun, istenmeyen etki ya da diğer rahatsızlıklarınız için 0505 4002676 no.lu telefondan Doç. Dr. Ahmet FIRAT'a başvurabilirsiniz.

Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır; ayrıca, bu araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik, testler ve tıbbi bakım hizmetleri için sizden veya bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir.

Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz; bu durum herhangi bir cezaya ya da sizin yararlarınıza engel duruma yol açmayacaktır. Araştırıcı bilginiz

EK-2. (Devamı)

dâhilinde veya isteğiniz dışında, uygulanan gerekleri yerine getirmemeniz, çalışma programını aksatmanız nedeni ile sizi araştırmadan çıkarabilir. Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır; çalışmadan çekilmeniz ya da araştırıcı tarafından çıkarılmanız durumunda, sizle ilgili tıbbi veriler de gerekirse bilimsel amaçla kullanılabilecektir.

Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz.

Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırıcıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Bu formun imzalı bir kopyası bana verilecektir.

Gönüllünün,
Adı-Soyadı:
Adresi:
Tel.-Faks:
Tarih ve İmza:

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin,
Adı-Soyadı:
Adresi:
Tel.-Faks:
Tarih ve İmza:

Açıklamaları yapan araştırmacının,
Adı-Soyadı:
Görevi:
Adresi:
Tel.-Faks:
Tarih ve İmza:

Olur alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin/görüşme tanığının,
Adı-Soyadı:
Görevi:
Adresi:
Tel.-Faks:
Tarih ve İmza:

EK-3: WOMAC Anketi

WOMAC Osteoartrit İndeksi

Hastanın Adı Soyadı: _____ Tarih: ____/____/_____

Her aktivite için tek bir numarayı işaretleyin.		Ağrı Yok	Hafif Ağrı	Orta Derecede Ağrı	Şiddetli Ağrı	Çok Şiddetli Ağrı
Ağrı	Düz zeminde yürümekle ağrı	☐0	☐1	☐2	☐3	☐4
	Merdiven inip çıkmakla ağrı	☐0	☐1	☐2	☐3	☐4
	Gece yatakta ağrı	☐0	☐1	☐2	☐3	☐4
	Oturmak veya uzanmakla ağrı	☐0	☐1	☐2	☐3	☐4
	Ayakta durmakla ağrı	☐0	☐1	☐2	☐3	☐4

Her aktivite için tek bir numarayı işaretleyin.		Sertlik Yok	Hafif Sertlik	Orta Derecede Sertlik	Şiddetli Sertlik	Çok Şiddetli Sertlik
Sertlik	Sabah ilk yürüme sırasında sertlik	☐0	☐1	☐2	☐3	☐4
	Gün içinde oturma, uzanma, istirahat sonrası sertlik	☐0	☐1	☐2	☐3	☐4

Her aktivite için tek bir numarayı işaretleyin.		Zorluk Yok	Hafif Zorluk	Orta Derecede Zor	Epey Zor	Çok Çok Zor
Fiziksel Fonksiyon	Merdiven inme	☐0	☐1	☐2	☐3	☐4
	Merdiven çıkma	☐0	☐1	☐2	☐3	☐4
	Otururken ayağa kalkma	☐0	☐1	☐2	☐3	☐4
	Ayakta durma	☐0	☐1	☐2	☐3	☐4
	Yere eğilme (çömelme)	☐0	☐1	☐2	☐3	☐4
	Düz zemin üzerinde yürüme	☐0	☐1	☐2	☐3	☐4
	Arabaya inme-binme	☐0	☐1	☐2	☐3	☐4
	Alışveriş yapma	☐0	☐1	☐2	☐3	☐4
	Çorap giyme	☐0	☐1	☐2	☐3	☐4
	Çorap çıkartma	☐0	☐1	☐2	☐3	☐4
	Yataktan kalkma	☐0	☐1	☐2	☐3	☐4
	Yatakta uzanma	☐0	☐1	☐2	☐3	☐4
	Banyo küvetine girme-çıkma	☐0	☐1	☐2	☐3	☐4
	Oturma	☐0	☐1	☐2	☐3	☐4
	Tuvalete girme-çıkma	☐0	☐1	☐2	☐3	☐4
	Ağır ev işleri	☐0	☐1	☐2	☐3	☐4
	Hafif ev işleri	☐0	☐1	☐2	☐3	☐4

Bellamy N. Osteoarthritis - An evaluative index for clinical trials. MSc Thesis. McMaster University, Hamilton, Canada. 1982

$$Toplam\ Skor = \frac{(Toplam\ Puan \times 100)}{96}$$

Toplam Skor= % _____

ftronline

www.ftronline.com

Tasarım ve düzenleme: Dr. Ender Selbaş 2016

EK-4: Tez ile ilgili yayınlanmış makale

Bu tez içerisinde yer alan araştırma ve sonuçları 13.02.2020 tarihinde European Journal of Rheumatology dergisi tarafından 0.5152/eurjrheum.2020.19210 DOI numarası ile on-line olarak yayınlanmış olup, aynı zamanda aynı dergi tarafından basılı kopya olarak da yayınlanmak üzere kabul edilmiştir. Bu yayına ilişkin Pubmed tarafından verilen 06.09.2020 tarihli künye bilgileri aşağıdaki gibidir:

Pişkin I, Akcan G, Fırat A, Tufan AC. A single-nucleotide polymorphism (rs8176070 of lncRNA PART1 may reflect the risk for knee osteoarthritis. Eur J Rheumatol. 2020 Apr;7(2):88-89. doi: 10.5152/eurjrheum.2020.19210. Epub 2020 Apr 1.

EK-5: Özgeçmiş

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	:İlkay Pişkin (Çorumluoğlu)
Doğum tarihi	:01.01.1984
Doğum yeri	:İstanbul
Medeni hali	:Evli
Uyruğu	:T.C.
Adres	: Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji & Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Tel	:+90 542 5130936
Faks	:
E-mail	:ilkaycorumluoglu@gmail.com
EĞİTİM	
Lise	: Ankara Ayrancı Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi (Fen Bilimleri)
Lisans	: Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
Yüksek lisans	: Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Kanser Biyolojisi Programı
YABANCI DİL BİLGİSİ	
İngilizce	: İyi düzeyde
ÜYE OLUNAN MESLEKİ KURULUŞLAR	
Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği	