



**T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Osteoartritli Hastalarda Jun-N-terminal Kinaz (JNK),  
Nükleer Faktör Kappa B (NF- $\kappa$ B), miRNA-146a ve  
miRNA-155 İlişkisinin Araştırılması**

**DOKTORA TEZİ**

**AHU SOYOCAK**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. HASAN VEYSİ GÜNEŞ**

**2014**



**T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Osteoartritli Hastalarda Jun-N-terminal Kinaz (JNK),  
Nükleer Faktör Kappa B (NF- $\kappa$ B), miRNA-146a ve  
miRNA-155 İlişkisinin Araştırılması**

**DOKTORA TEZİ**

**AHU SOYOCAK**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. HASAN VEYSİ GÜNEŞ**

**Proje No: 201111027**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Ahu SOYOCAK'ın Doktora Tezi olarak hazırladığı "Osteoartritli Hastalarda Jun-N-terminal Kinaz (JNK), Nüklear Faktör Kappa B (NF-κB), miRNA-146a ve miRNA-155 İlişkisinin Araştırılması" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

Tarih  
08/09/2014

Üye: Prof. Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ (Danışman)

Üye: Prof. Dr. Solmaz ERDEM

Üye: Prof. Dr. Ruhi UYAR

Üye: Prof. Dr. İrfan DEĞİRMENCI

Üye: Doç. Dr. Hülyam KURT

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 16 /09. /2014 tarih ve 1014/4728 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

  
Prof. Dr. Kazım ÖZDAMAR  
Enstitü Müdürü

## Özet

Osteoartrit (OA) kıkırdak, kemik ve sinoviyal dokularda çeşitli travmatik, biyomekanik, gelişimsel, metabolik ve genetik faktörlerin etkisiyle meydana gelen, kıkırdak yapımı ve yıkımı arasındaki dengenin bozulması ile ortaya çıkan, biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler ile karakterize bir eklem hastalığıdır. OA'da hücre uyarı yollarının tam olarak bilinmesiyle eklemde kaybolan homeostazın yeniden yapılanması ve tamir mekanizmasının gelişmesi mümkün olabilecektir. Bu uyarı yollarında önemli bir role sahip olan mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK)'ın OA'yı da içeren çeşitli hastalıklarda teröpatik hedef olabileceği düşünülmektedir. Bir MAPK olan Jun-N-terminal kinaz (JNK); tümör nekroz faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ) ve interlökin-1beta (IL-1 $\beta$ ) gibi proinflamatuvar sitokinlere cevap olarak aktive olmaktadır. Bu kinazlar özellikle nükleer faktör kappa b (NF- $\kappa$ B) olmak üzere çeşitli transkripsiyon faktörlerini aktifleştirir. İnflamatuvar yolda önemli bir yeri olan NF- $\kappa$ B; TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , lipopolisakkarit ve serbest oksijen radikallerini içeren birçok farklı uyarıcı tarafından aktive edilmektedir.

mikroRNA (miRNA)'ların gelişim, homeostaz ve bağışıklık fonksiyonlarında önemli rol oynadığı, kanserden inflamasyona kadar çoğu hastalıkla ilişkili olduğu bilinmektedir. miRNA ekspresyonlarının özel immün cevabı ve inflamatuvar uyarıyı da düzenledikleri belirlenmiştir. miRNA-146a ve miRNA-155; TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  gibi pro-inflamatuvar araçlarla uyarılan miRNA'lardır. Bu miRNA'ların ekspresyon mekanizmalarını içeren çalışmalarda NF- $\kappa$ B'nin inflamatuvar uyarıya cevapta merkezi bir rol oynadığı gösterilmiştir. Bununla birlikte bu miRNA'ların seviyelerinin düzenlenmesinde MAPK uyarısının önemli bir role sahip olduğu ve JNK'nin bu ekspresyonu düzenlediği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, OA hastalığının patofizyolojisinin anlaşılmasına katkı sağlamak için, yeni bir terapötik hedef olan miRNA'lardan miRNA-146a ve miRNA-155, yine birçok hastalık için potansiyel terapötik hedef olarak tanımlanan MAPK'lardan JNK ve transkripsiyon faktörlerinden NF- $\kappa$ B'nin OA hastalığındaki rollerinin belirlenmesi amaçlandı.

Çalışmada OA tanısı alan 100 hasta ve 50 sağlıklı bireyden periferik mononükleer kan hücreleri elde edildi. Bu hücrelerde miRNA-146a, miRNA-155 ve JNK gen ekspresyonları real-time PCR yöntemiyle ve NF- $\kappa$ B aktivitesi ELISA yöntemiyle belirlendi.

Çalışma sonuçlarına göre; OA hasta grubunda miRNA-155 ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği bulundu. Sonuçlar cinsiyetlere göre incelendiğinde, OA'lı kadınlarda miRNA-146a ve miRNA-155 ekspresyon seviyelerindeki artışın anlamlı düzeyde olduğu belirlendi. miRNA-146a, miRNA-155 ve JNK ekspresyonları ile NF- $\kappa$ B aktivitesinin hasta grubunda tanısal değerleri incelendiğinde, miRNA-146a

ve miRNA-155 ekspresyonunun hassasiyeti hastalarda yüksek olmasına rağmen özgülüğünün düşük olması bu verilerin tek başlarına hastalık tanısında kullanılamayacağını gösterdi. Bununla birlikte bu 4 parametre birlikte değerlendirildiğinde en yüksek hassasiyet ve özgülüğe ulaşıldığı görüldü.

Bu sonuçlara göre yaygın ve kompleks bir hastalık olan OA'nın moleküler mekanizmasında miRNA-146a, miRNA-155, JNK ve NF-κB'nin ilişkisi olduğu ancak bu ilişkinin daha detaylı araştırılması ve böylece hastalığın ilerlemesi ve patogeneğinde kullanılmak üzere yeni birer biyobelirteç olarak miRNA'ların kullanılıp kullanılmayacağını anlaşılmasının tam olarak ortaya konulması mümkün olacaktır.

**Anahtar Sözcükler :** Osteoartrit, İnflamasyon, JNK, NF-κB, miRNA-146a, miRNA-155.

## Summary

Osteoarthritis (OA) is a disease characterized by biochemical and morphological changes resulting from unbalanced cartilage anabolism and catabolism that occur under the effects of several traumatic, biomechanical, developmental, metabolic and genetic factors in cartilage, bone and synovial tissues. If the cell signal pathways that regulate these activities are fully understood, restructuring of homeostasis and development of repair mechanisms in joints can be possible in OA. Mitogen activated protein kinases (MAPK) are considered to be potential therapeutic targets for several diseases, including OA. Jun-N-terminal kinase (JNK), is activated in response to cytokines, such as tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ). These kinases activate several transcription factors, particularly nuclear factor kappa b (NF- $\kappa$ B). NF- $\kappa$ B is activated by various stimuli including TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , lipopolysaccharide and free oxygen radicals in inflammatory processes.

microRNA (miRNA) has an important role in development, homeostasis and immune functions. miRNA was shown to be associated with several diseases from cancer to inflammation. miRNA regulates the specialized immune response and inflammatory stimulus. miRNA-146 and miRNA-155 are induced by proinflammatory stimuli, such as TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . Studies related to expression mechanisms of miRNA-146a and miRNA-155 suggests a central role in inflammation for the proinflammatory transcription factor, NF- $\kappa$ B. JNK may regulate miRNA-155 expression. This study aims to investigate the expression of miRNA-146a, miRNA-155 and JNK, activity of NF- $\kappa$ B in OA.

In this study, peripheral mononuclear blood cells were drawn from 100 patients with a diagnosis of OA and from 50 healthy subjects. miRNA-146a, miRNA-155 and JNK expressions were analyzed by qRT-PCR. NF- $\kappa$ B levels were determined by ELISA in nuclear extracts.

Our results show that miRNA-155 expression increased significantly in OA patients. Analyzing the results by gender, miRNA-146a and miRNA-155 levels increased significantly in women with OA. When miRNA-146a, miRNA-155 and JNK expressions and NF- $\kappa$ B activity values of patient analyzed, specificity of the miRNA-146a and miRNA-155 expressions were found to be low even sensitivity to them are high at patients. Therefore, it is not suggested to use each of those parameters alone in diagnosis of OA. However when these 4 parameters evaluated all together, the highest specificity and sensitivity might be obtained.

According to these results, miRNA-146, miRNA-155, JNK and NF- $\kappa$ B are related to molecular mechanisms of OA. This evidence could lead to elucidation of the mechanism underlying OA pathogenesis and hence to a novel therapeutic strategy for OA.

**Key words:** Osteoarthritis, Inflammation, JNK, NF- $\kappa$ B, miRNA-146a, miRNA-155.





2.1.7.3- Sinoviyal doku.....	13
2.2 – Osteoartritte Terapötik Hedefler.....	14
2.2.1- Mitojenle aktive olan protein kinaz uyarı iletimi.....	14
2.2.2- Transkripsiyon faktörü nüklear faktör kappa B.....	15
2.2.3- Kodlamayan RNA'lar.....	17
2.2.3.1- MikroRNA (miRNA).....	17
2.2.3.2- miRNA biyogenezi.....	18
2.3 – miRNA ve Osteoartrit.....	20
3 - GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	24
3.1 – Gereç.....	24
3.1.1- Çalışma grubu.....	24
3.1.2- Kullanılan cihazlar.....	25
3.1.3- Kullanılan malzemeler ve kimyasallar.....	25
3.2 – Yöntem.....	27
3.2.1- Periferik mononükleer kan hücre (PMKH) eldesi.....	27
3.2.2- Gen ifadelerinin belirlenmesi.....	27
3.2.2.1- RNA izolasyonu.....	27
3.2.2.2- Komplementer DNA (cDNA) hazırlanması.....	28
3.2.2.3- Real-Time PCR (qRT-PCR).....	30
3.2.3- Nükleer faktör kappa B (NF-κB) aktivitesinin belirlenmesi.....	31
3.2.3.1- Nükleer ekstrakt hazırlanması.....	31
3.2.3.2- Nükleer faktör kappa B aktivitesinin belirlenmesi.....	32
3.2.4- İstatistiksel Analiz.....	33
4- BULGULAR.....	34
4.1- miRNA-146a gen ekspresyonu.....	40
4.2- miRNA-155 gen ekspresyonu.....	43
4.3- Jun-N-terminal Kinaz (JNK) gen ekspresyonu.....	46
4.4- Nükleer faktör kappa B (NF-κB) aktivitesi.....	49
4.5- miRNA-146a, miRNA-155, NF-κB ve JNK korelasyon analizi.....	52

4.6- miRNA-146a, miRNA-155, NF- $\kappa$ B ve JNK'nın ROC analiziyle tanısal değerinin belirlenmesi.....	57
5- TARTIŞMA.....	62
6- SONUÇ VE ÖNERİLER.....	67
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	69
Özgeçmiş.....	80

<b>Tablo Dizini</b>	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 2.1</b> Diz OA' sında ARD tanı kriterleri.....	4
<b>Tablo 2.2</b> Osteoartrit sınıflandırması.....	5
<b>Tablo 2.3</b> Osteoartritte sistemik ve lokal risk faktörlerinin.....	6
<b>Tablo 2.4</b> Kellgren Lawrence radyolojik evreleme sistemi.....	9
<b>Tablo 2.5</b> Küçük kodlamayan RNA'lar.....	17
<b>Tablo 3.1</b> Çalışmaya alınma ve çalışmadan dışlanma kriterleri.....	24
<b>Tablo 3.2</b> Kullanılan primer-prob setleri.....	28
<b>Tablo 3.3</b> cDNA sentezi için reaksiyon başına gerekli kit bileşenleri.	29
<b>Tablo 3.4</b> cDNA sentezi için gerekli PCR koşulları.....	29
<b>Tablo 3.5</b> cDNA sentezi için reaksiyon başına gerekli kit bileşenleri.	29
<b>Tablo 3.6</b> cDNA sentezi için gerekli PCR koşulları.....	30
<b>Tablo 3.7</b> Real-time PCR için reaksiyon başına gerekli kit bileşenleri	30
<b>Tablo 3.8</b> Real-time PCR koşulları.....	30
<b>Tablo 3.9</b> Real-time PCR için reaksiyon başına gerekli kit bileşenleri	31
<b>Tablo 3.10</b> Real-time PCR koşulları.....	31
<b>Tablo 3.11</b> Nükleer ekstrakt kit içeriğinin hazırlanışı.....	32
<b>Tablo 3.12</b> Kit protokolünde belirtilen reaktiflerin hazırlanışı.....	32
<b>Tablo 3.13</b> Kuyucuklara örneklerin yüklenmesi.....	33
<b>Tablo 4.1</b> Çalışmaya alınan bireylerin demografik özellikleri.....	34
<b>Tablo 4.2</b> Çalışmaya alınan bireylerin evrelere göre demografik özellikleri.....	35
<b>Tablo 4.3.1</b> Çalışma grubunda incelenen biyokimyasal parametreler..	36
<b>Tablo 4.3.2</b> Çalışma grubunda incelenen biyokimyasal parametreler..	37
<b>Tablo 4.4.1</b> Çalışma grubunda evrelere göre incelenen biyokimyasal parametreler.....	38
<b>Tablo 4.4.2</b> Çalışma grubunda evrelere göre incelenen biyokimyasal parametreler.....	39
<b>Tablo 4.5</b> Kontrol ve hasta grubunda miRNA-146a gen ekspresyonu.....	40

<b>Tablo 4.6</b>	Cinsiyete göre kontrol ve hasta grubunda miRNA-146a gen ekspresyonu.....	41
<b>Tablo 4.7</b>	Evrelere göre kontrol ve hasta grubunda miRNA-146a gen ekspresyonu.....	42
<b>Tablo 4.8</b>	Kontrol ve hasta grubunda miRNA-155 gen ekspresyonu.	43
<b>Tablo 4.9</b>	Cinsiyete göre kontrol ve hasta grubunda miRNA-155 gen ekspresyonu.....	44
<b>Tablo 4.10</b>	Evrelere göre kontrol ve hasta grubunda miRNA-155 gen ekspresyonu.....	45
<b>Tablo 4.11</b>	Kontrol ve hasta grubunda JNK gen ekspresyonu.....	46
<b>Tablo 4.12</b>	Cinsiyete göre kontrol ve hasta grubunda JNK gen ekspresyonu.....	47
<b>Tablo 4.13</b>	Evrelere göre kontrol ve hasta grubunda JNK gen ekspresyonu.....	48
<b>Tablo 4.14</b>	Kontrol ve hasta grubunda NF- $\kappa$ B düzeyi.....	49
<b>Tablo 4.15</b>	Cinsiyete göre kontrol ve hasta grubunda NF- $\kappa$ B aktivitesi.....	50
<b>Tablo 4.16</b>	Evrelere göre kontrol ve hasta grubunda NF- $\kappa$ B aktivitesi	51
<b>Tablo 4.17</b>	Çalışma grubunda belirlenen korelasyon analizi.....	52
<b>Tablo 4.18</b>	Kontrol grubunda belirlenen korelasyon analizi.....	53
<b>Tablo 4.19</b>	Hasta grubunda belirlenen korelasyon analizi.....	53
<b>Tablo 4.20</b>	Evrelerde yaş ile ekspresyon ve protein aktivitesi arasındaki korelasyon.....	54
<b>Tablo 4.21</b>	Evrelerde VKİ ile ekspresyon ve protein aktivitesi arasındaki korelasyon.....	54
<b>Tablo 4.22</b>	Evre (0) ile ekspresyon ve protein aktivitesi arasındaki korelasyon.....	55
<b>Tablo 4.23</b>	Evre (1) ile ekspresyon ve protein aktivitesi arasındaki korelasyon.....	55
<b>Tablo 4.24</b>	Evre (2) ile ekspresyon ve protein aktivitesi arasındaki korelasyon.....	56

<b>Tablo 4.25</b>	Evre (3) ile ekspresyon ve protein aktivitesi arasındaki korelasyon.....	56
<b>Tablo 4.26</b>	Evre (4) ile ekspresyon ve protein aktivitesi arasındaki korelasyon.....	56
<b>Tablo 4.27</b>	miRNA-146a, miRNA-155 ve JNK gen ekspresyonları ile NF- $\kappa$ B protein aktivitesinin ROC analizi.....	57

## **Şekil Dizini**

Sayfa

**Şekil 2.1** Normal ve OA'lı diz yapısı.....3

**Şekil 2.2** miRNA biyogenezi..... 20

## Grafik Dizini

Sayfa

<b>Grafik 4.1</b>	Kontrol ve hasta grubunda miRNA-146a gen ekspresyonu.....	40
<b>Grafik 4.2</b>	Kontrol ve hasta grubunda cinsiyete göre miRNA-146a gen ekspresyonu.....	41
<b>Grafik 4.3</b>	Evrelere göre kontrol ve hasta grubunda miRNA-146a gen ekspresyonu.....	42
<b>Grafik 4.4</b>	Kontrol ve hasta grubunda miRNA-155 gen ekspresyonu.....	43
<b>Grafik 4.5</b>	Cinsiyete göre kontrol ve hasta grubunda miRNA-155 gen ekspresyonu.....	44
<b>Grafik 4.6</b>	Evrelere göre kontrol ve hasta grubunda miRNA-155 gen ekspresyonu.....	45
<b>Grafik 4.7</b>	Kontrol ve hasta grubunda JNK gen ekspresyonu.....	46
<b>Grafik 4.8</b>	Cinsiyete göre kontrol ve hasta grubunda JNK gen ekspresyonu.....	47
<b>Grafik 4.9</b>	Evrelere göre kontrol ve hasta grubunda JNK gen ekspresyonu.....	48
<b>Grafik 4.10</b>	Kontrol ve hasta grubunda NF- $\kappa$ B aktivitesi.....	49
<b>Grafik 4.11</b>	Cinsiyete göre kontrol ve hasta grubunda NF- $\kappa$ B aktivitesi.....	50
<b>Grafik 4.12</b>	Evrelere göre kontrol ve hasta grubunda NF- $\kappa$ B aktivitesi.....	51
<b>Grafik 4.13</b>	miRNA-146a (A), miRNA-155 (B) ve JNK (C) gen ekspresyonları ile NF- $\kappa$ B (D) protein aktivitesinin ROC analizi sonuçları, hassasiyet ve özgüllük değerleri.....	58
<b>Grafik 4.14</b>	miRNA-146a, miRNA-155 ve JNK gen ekspresyonları ile NF- $\kappa$ B protein aktivitesinin ikili kombinasyonlarının ROC analizi sonuçları, hassasiyet ve özgüllük değerleri.....	59

- Grafik 4.15** miRNA-146a, miRNA-155 ve JNK gen ekspresyonları ile NF- $\kappa$ B protein aktivitesinin üçlü kombinasyonlarının ROC analizi sonuçları, hassasiyet ve özgüllük değerleri..... 60
- Grafik 4.16** miRNA-146a, miRNA-155 ve JNK gen ekspresyonları ile NF- $\kappa$ B protein aktivitesinin kombinasyonun ROC analizi sonuçları, hassasiyet ve özgüllük değerleri..... 61



## Simge ve Kısaltmalar Dizini

<b>%</b>	Yüzde
<b>ADAM</b>	Disintegrin-metalloproteinaz domaini- A disintegrin and metalloprotease domain
<b>ADAMTS5</b>	Disintegrin-metalloproteinaz trombospodin motif 5- A disintegrin and metalloprotease with thrombospodin motifs 5
<b>Ago</b>	Argonat proteini
<b>ANA</b>	Antinükleer antikor
<b>AP-1</b>	Aktivatör protein-1
<b>ARD</b>	Amerikan Romatizma Derneği
<b>cDNA</b>	Komplementer DNA
<b>COX-2</b>	Siklooksijenaz-2
<b>c-PLA2</b>	c-fosfolipaz 2
<b>CRP</b>	c-reaktif protein
<b>DGCR8</b>	DiGeorge critical region 8
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
<b>ERK</b>	Ekstrasellüler uyarı düzenleyici kinaz
<b>ESH</b>	Eritrosit sedimantasyon hızı
<b>FLS</b>	Fibroblast-benzeri sinoviyosit
<b>ICAM-1</b>	İntersellüler adhezyon molekülü 1
<b>IGFBP-5</b>	İnsülin benzeri büyüme faktör bağlayıcı protein 5
<b>IKK</b>	I $\kappa$ B kinaz
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	İnterlökin-1beta
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	NF- $\kappa$ B hücre içi inhibitörü
<b>iNOS</b>	Uyarılabilir nitrik oksit sentaz
<b>JNK</b>	Jun-N-terminal kinaz
<b>K-L</b>	Kellgreen Lawrence sınıflaması
<b>lncRNA</b>	long non-coding RNA, uzun kodlamayan RNA
<b>MAP</b>	Mitojenle aktive olan protein
<b>MAPK</b>	MAP kinaz

<b>MAPKK</b>	MAP kinaz kinaz
<b>MCP-3</b>	Monosit kemoatraktan protein-3
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	Makrofaj inflamatuvar protein-1 $\alpha$
<b>mikroRNA</b>	Mikro ribonükleik asit
<b>miRNA</b>	mikro RNA
<b>MMP</b>	Matriks metalloproteinaz
<b>mRNA</b>	mesajcı ribonükleik asit
<b>mRNA</b>	mesajcı RNA
<b>ncRNA</b>	non-coding RNA, kodlamayan RNA
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nüklear faktör kappa b
<b>NO</b>	Nitrik oksit
<b>OA</b>	Osteoartrit
<b>ORF</b>	Açık okuma çerçevesi- Open reading frame
<b>p38</b>	38 kd protein kinaz
<b>PAZ</b>	Piwi – Argonaute - Zwillie
<b>PBS</b>	Fosfat tamponlu tuz, phosphate buffer saline
<b>PCR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>PI3K</b>	Fosfoinozitol 3 kinaz
<b>piRNA</b>	Piwi-associated RNA
<b>PMKH</b>	Periferal mononüklear kan hücresi
<b>pre-miRNA</b>	Prekürsör-miRNA
<b>pri-miRNA</b>	Primer-miRNA
<b>qRT-PCR</b>	Kantitatif eş zamanlı reves transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu- Quantitative real time reverse transcriptase polymerase chain reaction
<b>RF</b>	Romatoid faktör
<b>RHD</b>	Rel Homoloji Bölgesi
<b>RISC</b>	RNA ile tetiklenen sessizleştirici kompleks- RNA induced silencing complex
<b>RNA</b>	Ribonükleik asit
<b>ROC eğrisi</b>	Alıcı İşlem Karakteristik Eğrisi-Receiver Operating Characteristic Curve

<b>SAPK</b>	Stres ile aktive olan protein kinaz
<b>siRNA</b>	Small interfering RNA
<b>snoRNA</b>	Small nucleolar RNA
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming büyüme faktörü-beta
<b>TIMP</b>	Doku metalloproteaz inhibitörleri
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tümör nekroz faktör-alfa
<b>TRBP</b>	Transaktivasyon cevabı oluşturan RNA bağlanma proteini-Transactivation-responsive RNA-binding protein
<b>UTR</b>	Çevirime uğramayan bölge-Untranslated region
<b>VCAM-1</b>	Vasküler hücre adhezyon molekülü
<b>VKI</b>	Vücut kitle indeksi
<b>XPO5</b>	Exportin-5

## 1- GİRİŞ VE AMAÇ

Osteoartrit (OA) kıkırdak, kemik ve sinoviyal dokularda çeşitli travmatik, biyomekanik, gelişimsel, metabolik ve genetik faktörlerin etkisiyle meydana gelen kıkırdak yapımı ve yıkımı arasındaki dengenin bozulması ile ortaya çıkan, biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler ile karakterize bir hastalıktır (Sharma, Kapoor, & Issa, 2006). Noninflamatuvar bir hastalık olarak bilinmesine rağmen son zamanlarda yapılan çalışmalarda, sinovitin ve düşük derece inflamasyonun OA patofizyolojisinde rol oynadığı gösterilmiştir (Pelletier, Martel-Pelletier, & Abramson, 2001; Saxne, Lindell, Mansson, Petersson, & Heinegard, 2003). Kıkırdak metabolizmasında yer alan enzimlerdeki değişiklikler tek başına OA'daki yıkımı açıklayamamaktadır (Van der Kraan & van den Berg, 2000).

Anabolik ve katabolik aktiviteler arasındaki dengenin bozulması sonucu oluşan OA'da, bu aktiviteleri düzenleyen hücre uyarı yollarının tam olarak bilinmesiyle eklemde kaybolan homeostazın yeniden yapılması ve tamir mekanizmasının gelişmesi mümkün olabilecektir. Mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK) hücre çoğalması ve sağ kalımı kontrolünde, matriks sentezinde ve ağrı araçlarının üretilmesindeki uyarı yollarında merkezi bir düzenleyicidir. Bu nedenle MAPK'lar OA'yı da içeren çeşitli hastalıkların potansiyel teröpatik hedefleri olarak düşünülmektedir (Loeser, Erickson, & Long, 2008). MAPK'ların 3 uyarı grubu vardır, bunlar Ekstrasellüler uyarı düzenleyici kinaz (ERK), Jun-N-terminal kinaz (JNK) ve 38 kd protein kinaz (p38) dir. ERK, sitokin ve büyüme faktörleri tarafından aktive edilirken, JNK ve p38, tümör nekroz faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ), interlökin-1beta (IL-1 $\beta$ ) gibi sitokinlere cevap olarak aktive olur (Harris et al., 2006d) Bu kinazlar özellikle nüklear faktör kappa b (NF- $\kappa$ B) olmak üzere çeşitli transkripsiyon faktörlerini aktifleştirir (Roach, 2008). Hücre farklılaşması, canlılığı ve aktivasyonu için gerekli olan NF- $\kappa$ B inflamatuvar yoldaki en önemli transkripsiyon faktörlerinden birisidir (Harris et al., 2006d). NF- $\kappa$ B; TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , lipopolisakkarit ve serbest oksijen radikallerini içeren birçok farklı uyarı tarafından aktive edilir (Harris et al., 2006d). NF- $\kappa$ B, eklem kıkırdağında matriks metalloproteinaz (MMP) gen ekspresyonu oluşmasında ve çok sayıda pro-inflamatuvar aracının salınmasında rol alır (Harris et al., 2006d). NF- $\kappa$ B, inflamatuvar sitokinlerle birlikte çeşitli hücre dışı matriks yıkım proteinlerinin ekspresyonlarını artırır (Roach, 2008). NF- $\kappa$ B'nin OA'lı hasta kondrositlerinde, anormal gen ürünlerinin uyarılması ve normal kondrosit gen ürünleri üretiminin baskılanmasında etkili olduğu ileri sürülmüştür (Roach, 2008).

Küçük kodlamayan RNA'ların bir sınıfı olan mikroRNA (miRNA)'lar gelişim, homeostaz ve bağışıklık fonksiyonlarında önemli rol oynar (Iliopoulos, Malizos, Oikonomou, & Tsezou, 2008; Luo, Tsai, Shen, & Yu, 2010). miRNA'ların kanserden inflamasyona kadar çoğu hastalıkla ilişkili

olduğu gösterilmiştir (Sonkoly & Pivarcsi, 2009). mRNA yıkılması veya translasyon baskılanması ile gen ekspresyonunu düzenleyen miRNA'ların, çeşitli hastalıklardaki rollerinin öğrenilmesi onların yeni bir biyobelirteç olarak değerlendirilmesine yol açmaktadır (Sonkoly & Pivarcsi, 2009). miRNA'ların ekspresyonlarının hücre kaderinin belirlenmesindeki önemli rolü dışında, özel immün cevabı ve inflamatuvar uyarıyı da düzenledikleri belirlenmiştir (Sheedy & O'Neill, 2008). Eklem kıkırdağında miRNA ekspresyonlarının araştırılması OA gibi hastalıklarda hedeflerin tanımlanmasına imkan sağlayabilir (Dunn, DuRaine, & Reddi, 2009).

miRNA-146a ve miRNA-155; IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  gibi pro-inflamatuvar aracılar tarafından uyarıldığı bilinen miRNA'lardır (Sheedy & O'Neill, 2008). miRNA-146a ve miRNA-155'in ekspresyon mekanizmalarını içeren çalışmalar pro-inflamatuvar transkripsiyon faktörü NF- $\kappa$ B'nin inflamatuvar uyarıya cevapta merkezi bir rol oynadığını göstermektedir (Ceppi et al., 2009; Taganov, Boldin, Chang, & Baltimore, 2006). Bununla birlikte miRNA-155 seviyesinin düzenlenmesinde MAPK uyarısının önemli bir role sahip olduğu ve JNK'nın bu ekspresyonu düzenlediği düşünülmektedir (O'Connell, Taganov, Boldin, Cheng, & Baltimore, 2007). Yapılan araştırmalarda, bu bağlantıyı destekleyen deneysel kanıtlar az olduğundan uyarı yolağında miRNA-146a, miRNA-155, JNK ve NF- $\kappa$ B arasındaki ilişkisinin anlaşılması için daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Eklem hasarı veya tamiri sırasında çeşitli biyobelirteçler menisküs ve ligamentler, eklem kıkırdağı, kemik doku, osteofitler ve sinoviyal zardan salınarak sinoviyal sıvı havuzuna ve buradan da lenfatik dolaşıma ve sistemik dolaşıma katılmaktadır (zgl, 2002). Bu biyobelirteçlerin serum, idrar veya kanda belirlenmesi, OA'nın erken dönemde saptanması, hastalığın seyrinin ve tedaviye cevabının izlenmesi için önemlidir.

Bu nedenlerle bu çalışmada, OA mekanizmasının anlaşılmasına katkı sağlamak için yeni bir terapötik hedef olan miRNA'lardan miRNA-146a ve miRNA-155, yine birçok hastalık için potansiyel terapötik hedef olarak tanımlanan MAPK'lardan JNK ve transkripsiyon faktörlerinden NF- $\kappa$ B'nin OA patofizyolojisindeki rollerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

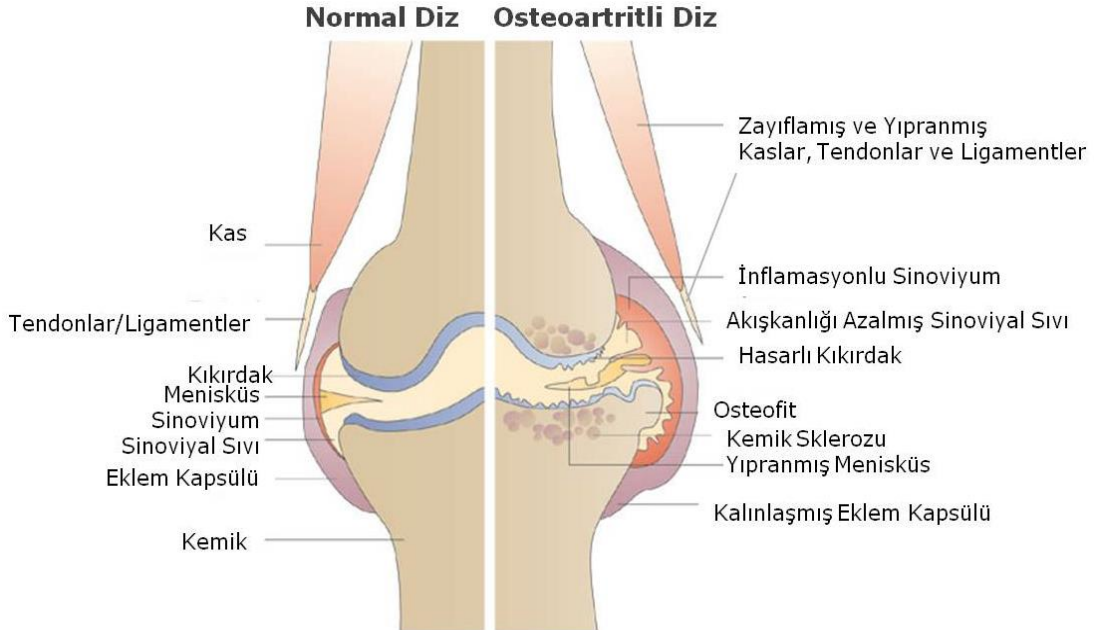
## 2- GENEL BİLGİLER

### 2.1 – Osteoartrit

Osteoartrit (OA) kıkırdak, kemik ve sinoviyal dokularda çeşitli travmatik, biyomekanik, gelişimsel, metabolik ve genetik faktörlerin etkisiyle meydana gelen kıkırdak yapımı ve yıkımı arasındaki dengenin bozulması ile ortaya çıkan, biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler ile karakterize bir eklem hastalığıdır (Sharma et al., 2006).

İnsan vücudunun en büyük eklemi olan diz eklemi OA'nın sıklıkla görüldüğü eklemlerdendir. Yürüme, denge, durma, eğilme ve çömelmede önemli bir eklem olan dizde görülen OA, yürüme, merdiven inip çıkma gibi alt ekstremitelerin temel günlük yaşam aktivitelerini olumsuz yönde etkileyerek sakatlığa ve sonuçta sosyoekonomik problemlere neden olmaktadır (Akçavuş, Karagöz, Aybay, Çelik, & Yücel, 2001; Samancı, Kaçar, Sayın, & Tuncer, 2003).

Diz OA'sında (gonartroz), dizin fonksiyon ve stabilizesini sağlayan eklem kapsülü, kemik yapılar, eklemin dış ve iç bağları, menisküsler, kaslar, kıkırdak, sinoviyal zar ve sinoviyal sıvı önemli rol oynar (Samancı et al., 2003). Diz OA'sı normal eklem aşırı yüklenme veya anormal eklem normal yüklenme sonucu gelişebilir. Diz OA gelişimi dize binen stresin artması ve buna kas iskelet sisteminin cevap vermesidir. Ancak çoğu olguda diz OA'nın gelişmesine yol açacak neden bulunamaz (Oğuz, 1992a) (**Şekil 2.1**).



**Şekil 2.1** Normal ve OA'lı diz yapısı  
(Wieland, Michaelis, Kirschbaum, & Rudolphi, 2005)

Diz OA'sı tanısında yaygın olarak klinik, laboratuvar ve radyolojik verilerin kombinasyonundan oluşan, Amerikan Romatoloji Derneği (ARD) tarafından önerilen kriterler kullanılır (**Tablo 2.1**) (Altman et al., 1986).

**Tablo 2.1** Diz OA' sında ARD tanı kriterleri

<b>Klinik</b>	<b>Gerekli kriterler</b>
1. Önceki ayın çoğu gününde diz ağrısı	
2. Aktif eklem hareketi ile krepitasyon varlığı	1,2,3,4 veya
3. Dizde 30 dakika veya altında sabah sertliği	1,2,5 veya
4. Yaşın 38 ya da üzerinde olması	1,4,5
5. Muayenede dizde kemiksel genişleme varlığı	
<b>Klinik, Laboratuvar ve Radyolojik</b>	
1. Önceki ayın çoğu gününde diz ağrısı olması	
2. Radyolojik olarak eklem köşelerinde osteofitler	
3. OA' nın tipik sinoviyal sıvı bulguları (berrak, visköz veya beyaz küre < 2000/mm <sup>3</sup> den en az ikisi )	1,2 veya 1,3,5,6 veya 1,4,5,6
4. Yaşın 40 veya üzerinde olması	
5. Dizde sabah sertliğinin 30 dakika ya da altında olması	
6. Dizin aktif hareketlerinde krepitasyon varlığı	

### **2.1.1- Osteoartrit sınıflandırması**

OA için yaygın olarak tutulan ekleme, etiyolojiye ve spesifik özelliklere göre değişik sınıflamalar kullanılır (**Tablo 2.2**) (Loeser et al., 2008; Pelletier et al., 2001).

OA, geleneksel olarak primer (idiopatik) ve sekonder olarak iki tipe ayrılır. Eklem dejenerasyonunun nedeni bilinmiyorsa buna primer OA denir ve OA'in en sık görülen formudur. Altta yatan etkenin belli olduğu durumlar ise sekonder OA olarak isimlendirilir. Primer OA 40 yaşından önce nadir görülür. Travma, infeksiyon, avasküler nekroz, hemofili gibi nedenlere bağlı sekonder OA ise daha çok genç erişkinlerde görülür (Pelletier et al., 2001).

**Tablo 2.2** Osteoartrit sınıflandırması

<b>1-Tutulan Eklem Göre Sınıflandırma</b>
a) Tutulan eklem sayısına göre (mono, oligo ve poliartiküler)
b) Tutulan eklem lokalizasyonuna göre (kalça, diz, el, vertebra OA)
<b>2-Etyolojiye Göre Sınıflandırma</b>
a) Primer (idiopatik) OA
b) Sekonder OA
1. Metabolik sebepler
2. Anatomik sebepler
3. Travmatik sebepler
4. İnflamatuvar sebepler
<b>3- Spesifik Özelliğın Varlığına Göre Sınıflandırma</b>
a) İnflamatuvar OA
b) Eroziv OA
c) Atrofik veya destriktüf OA
d) Kondrokalsinozis ile OA
e) Diğerleri

### **2.1.2- Osteoartrit prevalansı ve insidansı**

OA tüm ırkları ve her iki cinsi etkileyen, dünyada en sık görülen ve fiziksel bozukluğa yol açan bir eklem sorunudur. 55 yaşın üzerindeki bireylerin % 80'inden fazlasında OA'ya ait radyografik bulgular saptanır (Atay, 2011). Ülkemizde yapılmış olan genel bir OA prevalans çalışması bulunmamaktadır. Bununla birlikte, 2005 yılında yapılan 50 yaşın üstünde 655 kişinin katıldığı bir araştırmada semptomatik diz OA prevalansı % 14,8 (kadınlarda % 22,5 ve erkeklerde % 8) olarak bildirilmiştir (Kaçar et al., 2005). Amerika Birleşik Devleti'nde erişkinlerde klinik OA prevalansının % 4,5 olduğu, yaşla prevalansın arttığı (60 yaş üzerinde erkeklerde % 17 ve kadınlarda % 29,6) belirlenmiştir (Hooper, Holderbaum, & Moskowitz 2005; Tuncer & Gilgil, 2007). Yine ABD'de ileri yaştaki kadınlarda OA insidansının yaklaşık % 1' olduğu bildirilmiştir. Yılda her 100.000 kişi için el OA insidansı 100, diz OA insidansı 240 ve kalça OA insidansı 88 bulunmuştur (Dennison & Cooper, 2003).

### **2.1.3- Osteoartrit risk faktörleri**

OA ile ilişkili risk faktörleri hastalığın gelişiminde, ilerlemesinde, radyografik ya da semptomatik oluşunda göreceli olarak tutulan eklem ve hastalığın evresine göre değişkenlik göstermektedir. Genel olarak risk faktörleri sistemik ve lokal olmak üzere iki kısımda incelenebilir. İleri yaş, kadın cinsiyeti, kalıtsal ve etnik özellikler, kemik mineral yoğunluğunda artış gibi sistemik faktörler eklem kıkırdağını zedelenmeye yatkın hale getirir. Obezite, sportif ve mesleki aktiviteler, eklem zedelenmesi, eklem



yapısal özellikleri, eklem laksitesi ve kas gücünde azalma veya artma gibi lokal faktörler de mekanik etkilerinden dolayı eklem dejenerasyonuna doğrudan katkıda bulunurlar (**Tablo 2.3**) (Bodur, 2011; Dennison & Cooper, 2003; Harris et al., 2006c; Tuncer & Gilgil, 2007).

**Tablo 2.3** Osteoartritte sistemik ve lokal risk faktörleri

<b>Sistemik Faktörler</b>	<b>Lokal Faktörler</b>
Yaş	Obezite
Cinsiyet	Sportif ve Mesleki Aktiviteler
Kalıtsal Özellikler	Eklem Zedelenmesi
Etnik Özellikler	Eklem Biyomekaniği
Kemik Mineral Yoğunluğu	Kas Gücü

#### *2.1.3.1- Sistemik risk faktörleri*

##### *2.1.3.1.1- Yaş*

Tüm eklemlerdeki OA insidansı ve prevalansı yaşla birlikte artmaktadır. Yaşın ilerlemesiyle vücutta kıkırdak yapısını etkileyen birçok biyolojik değişiklik ortaya çıkmaktadır. Bu değişikliklerin sonucunda da eklemler daha kolay zedelenebilir hale gelmektedir. Felson ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 63 yaş üzeri bireylerin diz eklemleri radyolojik olarak incelenmiş ve 70 yaş altında osteoartrit sıklığının % 27 olduğu, 80 üzerinde ise sıklığın % 44'e çıktığı belirlenmiştir (Atay, 2011; Dennison & Cooper, 2003; Felson et al., 1987; Hooper et al., 2005; Tuncer & Gilgil, 2007).

##### *2.1.3.1.2- Cinsiyet*

OA kadınlarda erkeklere göre daha sık görülmektedir ve erkeklerle karşılaştırıldığında kadınlarda daha çok eklemi tutma eğilimindedir. OA görülme sıklığı kadınlarda 50 yaştan önce daha azken, 50 yaşından sonra kadınlar belirgin olarak daha fazla etkilenirler. Kadınlarda OA görülme sıklığının artmış olmasının genetik yapıya ya da hormonal nedenlere bağlı olabileceği düşünülmektedir (Atay, 2011; Harris et al., 2006c; Tuncer & Gilgil, 2007).

##### *2.1.3.1.3- Kalıtsal faktörler*

Aile ve ikiz çalışmaları OA'da kalıtımın etkisinin % 50-65 düzeyinde olduğunu göstermektedir (Atay, 2011). Kadınlarda OA için kalıtsallığın etkisi erkeklere nazaran daha fazla görülmektedir (Hooper et al., 2005; Tuncer & Gilgil, 2007). Heberden nodülleri ile birlikte seyreden primer

generalize OA'nın kadınlarda dominant erkeklerde resessif olan otozomal bir gen ile taşındığı bildirilmiştir (Dennison & Cooper, 2003). Diz ve kalça OA'sı için de genetik yatkınlık olduğunu düşündüren çalışmalar vardır (Lanyon, Muir, Doherty, & Doherty, 2000; Neame, Muir, Doherty, & Doherty, 2004; Spector, Cicuttini, Baker, Loughlin, & Hart, 1996). Eklem kıkırdağını oluşturan majör kollajen olan tip 2 kollajen gen polimorfizmlerinin generalize OA ile ilişkisi gösterilmiştir (Meulenbelt et al., 1999; Uitterlinden et al., 2000). Vitamin D reseptör gen polimorfizmi ile OA ilişkisi tespit edilmiştir (Zhu et al., 2014). OA'da birden fazla yatkınlık geni olabileceği üzerinde durulmaktadır (Atay, 2011; Harris et al., 2006c).

#### *2.1.3.1.4- Etnik ve ırksal özellikler*

OA'da tutulan eklemler ırklara göre bazı varyasyonlar gösterebilmektedir. Afrikalı-Amerikalılarda diz OA'sı beyazlardan daha yüksek oranda ve daha şiddetli görülmektedir (Dennison & Cooper, 2003; Hooper et al., 2005). Kalça OA yaygınlığı Avrupa'lı beyazlarda Afrikalı-Amerikalılardan daha yüksektir. Çinlilerde el ve kalça OA'sı beyazlara göre daha düşük oranda görülmektedir. Buna karşılık lateral diz OA'sına Çinlilerde daha çok rastlanmaktadır (Hooper et al., 2005; Tuncer & Gilgil, 2007). OA prevalansı ve şiddetindeki etnik farklılıkların genetik etkenlere veya bazı durumlarda eklem aşırı kullanımı veya hasarlanmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir (Atay, 2011).

#### *2.1.3.1.5- Kemik mineral yoğunluğu*

Yüksek kemik kitlesine sahip kadınlarda diz ve kalça OA gelişme riski daha yüksek bulunmuştur. Diğer yandan yüksek kemik kitlesinin yeni başlamakta olan diz OA riskini artırdığı ancak hastalık gelişmiş olanlarda radyografik ilerleme riskini azalttığı gösterilmiştir (Atay, 2011). Kemik mineral yoğunluğunda azalmayla karakterize olan osteoporozlu hastalarda OA beklenenden daha az görülmektedir. Osteoporozla bağlı kemik kitlesindeki azalma subkondral kemiğin şok absorbe edici yeteneğini arttırmakta, böylece kıkırdak hasarı ve dolayısıyla OA gelişmesi engellenmektedir (Dennison & Cooper, 2003; Tuncer & Gilgil, 2007).

#### *2.1.3.2 - Lokal risk faktörleri*

##### *2.1.3.2.1- Obezite*

Obezite diz OA'sının hem oluşumu hem de seyri açısından önemli bir risk faktörüdür (Atay, 2011; Dennison & Cooper, 2003; Harris et al., 2006c). Diz OA riskinin, vücut kitle indeksi (VKİ) <25 bireylere göre, VKİ ≥30 olan bireylerde yaklaşık sekiz kat fazla olduğu gösterilmiştir (Coggon et al., 2000). Kadınlarda VKİ'deki 2 birimlik azalmanın (yaklaşık 5 kg) semptomatik diz OA gelişmesi prevalansını yaklaşık % 50 azalttığı gösterilmiştir (Felson, Zhang, Anthony, Naimark, & Anderson, 1992). Ayrıca obezite radyolojik bulguların ilerlemesi için de bir risk faktörüdür

(Harris et al., 2006c). Obezite ve OA ilişkisinin kalça, el ve generalize OA'da diz OA'sındaki kadar belirgin olmaması obezitenin bir risk faktörü olarak sistemik etkilerinden çok mekanik etkilerinin daha ağır bastığını göstermektedir (Atay, 2011; Tuncer & Gilgil, 2007).

#### *2.1.3.2.2- Sportif ve fiziksel aktiviteler, mesleki faktörler ve travma*

Profesyonel olarak spor yapan kişilerde erken diz OA riskinin arttığı (Kujala et al., 1995; Spector, Harris, et al., 1996; Tuncer & Gilgil, 2007), bununla birlikte amatör olarak spor yapan kişilerde böyle bir riskin söz konusu olmadığı bildirilmiştir (Hannan, Felson, Anderson, & Naimark, 1993; Tuncer & Gilgil, 2007). Hatta düzenli olarak spor yapanlarda diz ve kalça OA riskinin azaldığı gösterilmiştir (Rogers, Macera, Hootman, Ainsworth, & Blair, 2002). Spesifik eklemlerin uzun süreli ve tekrarlı kullanımını gerektiren meslek sahibi kişilerde OA gelişebilmektedir. Çeşitli araştırmalarda madencilerde omurga ve diz, rıhtım işçilerinde el ve diz, pnömomatik kompresör kullanan işçilerde dirsek ve el bileği, çiftçilerde kalça ve inşaat işçilerinde diz eklemlerinde OA'nın daha fazla geliştiği belirtilmiştir (Atay, 2011; Tuncer & Gilgil, 2007). Uzun süreli diz bükmeyi ve çömelmeyi gerektiren mesleki aktivitelerin de diz OA riskini artırdığı bulunmuştur (Tuncer & Gilgil, 2007). Büyük travmalar sonucunda da OA gelişebilmektedir. Yapılan bir çalışmada ağır diz yaralanmasının diz OA gelişim riskini erkeklerde 3,5 kat, kadınlarda 2,2 kat artırdığı gösterilmiştir (Atay, 2011; Maetzel, Mäkelä, Hawker, & Bombardier, 1997).

#### *2.1.3.2.3- Eklem biyomekaniği*

Eklem biyomekaniğindeki bozukluklar OA'ya yol açabilir. Eklem kapsülü ve ligamentlerindeki gevşeklik sonucu eklemde instabilite gelişimi OA riskini arttırmaktadır (Tuncer & Gilgil, 2007). Değişen eklem geometrisi eklem kıkırdağının beslenmesini etkileyebilir veya yük dağılımını değiştirebilir ve bunlardan herhangi biri kıkırdağın biyokimyasal yapısını değiştirerek diz OA'sının oluşumuna ve ilerlemesine katkıda bulunabilir (Harris et al., 2006c).

#### *2.1.3.2.4- Kas gücü*

Kas gücünün azalması veya artması OA gelişiminde bir risk faktörü olarak ortaya çıkmaktadır (Tuncer & Gilgil, 2007). Bacağın, kalçadan diz eklemine dek uzanan üst bölümünde yer alan kuadriseps kasının kuvvetinde meydana gelen azalmanın diz OA'sının bir sonucu olarak düşünülürken, yapılan bir çalışmada başlangıçta OA saptanmayan kadınlarda kuadriseps kasının güçsüzlüğünün radyografik OA gelişime riskini artırdığı gösterilmiştir (Atay, 2011).

### **2.1.4- Osteoartritin klinik bulguları**

OA'da belirtiler genellikle yavaş ve sinsi seyirli başlar ve etkilenen eklem lokalizedir. OA'nın başlıca klinik özellikleri ağrı, eklem tutukluğu, eklem şişliği, krepitasyon (çıtırdama), deformite (biçim bozukluğu) ve sublüksasyon (eklem yüzlerinin birbirinden tamamen uzaklaşmadan, kısmen ayrılması, kısmi çıkık), lokal hassasiyet ve hareketle ağrı, hareket kısıtlanması ve fonksiyon kaybı olarak sıralanabilir (Atay, 2011; Ergin, 2007; Eskiuyurt, 2000; Kirazlı, 1999; Oğuz, 1992b).

### **2.1.5- Osteoartritin radyolojik bulguları**

Direkt radyografi çok hassas olmamasına karşın diz OA tanısında en faydalı görüntüleme yöntemidir. OA'da sık görülen radyolojik bulgular, eklem aralığında asimetrik daralma, subkondral kemikte skleroz (eburnasyon), subkondral kistler ve eklem kenarlarındaki osteofitlerdir. Deformiteler, sublüksasyon ve eklem fareleri daha çok ileri vakalarda görülür (Atay, 2011).

Diz OA'sında hastalığın radyolojik olarak evrelendirilmesinde, klinik olarak OA ile uyumu gösterilmiş olan Kellgren-Lawrence skalası (K-L) kullanılır (Kellgren & Lawrence, 1957) (**Tablo 2.4.**).

**Tablo 2.4** Kellgren-Lawrence radyolojik evreleme sistemi

<b>Evreler</b>	<b>Tanım</b>
<b>Evre 0</b>	Normal
<b>Evre 1</b>	Eklem aralığında şüpheli daralma, osteofit olasılığı
<b>Evre 2</b>	Kesin osteofit, eklem aralığında şüpheli daralma
<b>Evre 3</b>	Orta derece osteofit, eklem aralığında kesin daralma, hafif skleroz
<b>Evre 4</b>	Geniş osteofit, eklem aralığında belirgin daralma, deformite

### **2.1.6- Osteoartritin laboratuvar bulguları**

OA için özgül bir tanısal test yoktur. Primer OA'da eritrosit sedimentasyon hızı (ESH), c-reaktif protein (CRP), rutin kan sayımları ve biyokimyasal analizler normaldir. Romatoid faktör (RF) ve antinükleer antikor (ANA) negatiftir. Sinoviyal sıvıda hafif inflamasyona ait nonspesifik özellikler görülür. Bunlar; hacimde artış, viskozitede azalma, hafif pleositoz ve proteinde hafif artıştır (Evcik & Babaoğlu, 2007). Eklem sıvısında kalsiyum pirofosfat dihidrat veya hidroksiapatit kristalleri saptanabilir (Atay, 2011; Doğanavşargil & Gümüşdiş, 2003).

### **2.1.7- Osteoartrit patogenezi**

OA eklemi oluşturan kıkırdak, subkondral kemik, sinoviyal doku, eklem kapsülü, ligamentler ve kaslar gibi eklem tüm elemanlarını etkilemesine rağmen, primer değişiklikler eklem kıkırdağının kaybını, subkondral kemiğin yeniden Őekillenmesini ve kemik çoğalması sonucu oluşan osteofitlerin gelişimini içermektedir (Harris et al., 2006c). OA yaŐlanan kıkırdaktan farklı bir süreç olarak kabul edilmekte, tüm eklem dinamik, biyomekanik ve hücresel işlevlerini olumsuz yönde etkileyen bir patoloji olarak düşünülmektedir. Bu nedenle, patolojik sürecin merkezinde eklem kıkırdağı, subkondral kemik ve sinoviyal doku bulunmaktadır (Lohmander, 2000).

#### **2.1.7.1- Eklem kıkırdağı**

Normal eklem kıkırdağı fonksiyonu gereği yarı-katı yapı gerektiren eklem aralıklarında Şekil oluŐturmak, esneklik, dayanıklılık ve yüke uyum sağlamak üzere bulunan çok özel bir dokudur (Atay, 2011). Kıkırdak, %65-80'i su, %20-35'i katı olan bir hücre dışı matriks ve bu matriks içine dağılmış olan kondrositlerden meydana gelir (Atay, 2011; Sarpel, 2007). Kondrositler, hem yapım hem de yıkımdan sorumlu hücreler olarak kıkırdak homeostazını sağlar, değişen kimyasal ve mekanik Őartlara göre perisellüler matriksin yapımı, idamesi, yıkımı ve gerekirse yeniden Őekillenmesini gerçekleştirir (Atay, 2011). Hücre dışı matriks başlıca kollajen lifler ve proteoglikanlardan olmak üzere nonkollajen z asidik glikoproteinler, lipidler ve kalsiyum tuzlarından meydana gelir (Sarpel, 2007). Matriks içeriğinin yarısından fazlasını en çok tip II kollajen lif oluşturur. Kollajen liflerin arası glikozaminoglikan zinciri içeren bir protein olan proteoglikanlarla doludur. Kıkırdakta en çok bulunan proteoglikan agrekan proteindir (Atay, 2011; Harris et al., 2006a; Sarpel, 2007). Başlıca glikozaminoglikanlar ise hiyaluronik asit, kondroidin sülfat, keratan sülfat ve dermatan sülfat olarak sıralanabilir (Sarpel, 2007). Kıkırdağın su içeriği, kollajen aė ve negatif yüklü proteoglikan zincirlerinin oluŐturduėu basınçla dengede tutulur. Bu nedenle kıkırdağın esnekliği yani hidrolitik permeabilite, kıkırdağın su ve proteoglikan içeriği ile doğru orantılıdır (Atay, 2011; Harris et al., 2006a). Kıkırdağın fonksiyonel özelliklerini belirleyen bu biyokimyasal temel göz önüne alındığında su kapsamı, proteoglikanlar ve kollajen fibriller arasında hem fizyolojik koşullarda hem eklem üzerine y k bindiğinde son derece karmaŐık etkileŐimler gerçekleşir (Atay, 2011; Harris et al., 2006a). Kıkırdakta hücre dışı matriks elemanları ve büyüme faktörleri gibi çeşitli kimyasal ailelere ait makromoleküller de bulunur. Bu moleküller hem kıkırdağın yapısını oluŐturmakta hem de hücre işlevlerinin düzenlenmesinde rol alırlar. Normal kıkırdağın fonksiyonel özellikleri, kıkırdağın ana hücresi olan kondrositler ile matriks ve diğer matriks molekülleri arasındaki ilişki OA patogenezinin daha iyi anlaşılması açısından önem taŐır (Atay, 2011; Evcik & Babaoğlu, 2007; Harris et al., 2006a; Sarpel, 2007).

OA gelişim sürecinde morfolojik olarak eklem kıkırdağı yüzeyinde düzensizleşme, yüzeysel çatlaklarda belirginleşme, proteoglikan dağılımında değişim görülür. OA ilerledikçe bu çatlaklar derinleşir, yüzeyin düzensizliği artar, eklem kıkırdağı ülserleşir ve altta yatan kemik açığa çıkar (Harris et al., 2006c; Kuru, 2000). Kemik proliferasyonunun sonucu eklem kenarlarında ve kıkırdak tabanında osteofit adı verilen çıkıntılar oluşur ve bunların üzerleri yeni oluşan, düzensiz yapıdaki hyalin ve fibröz kıkırdak ile kaplanır. Osteofitler kısmen OA'daki ağrı ve eklem hareketindeki kısıtlılıktan sorumludur (Atay, 2011; Harris et al., 2006c).

OA'da zaman içerisinde eklem kıkırdağının kaybına biyokimyasal ve metabolik değişimler de eşlik eder (Atay, 2011; Harris et al., 2006c). OA'nın ilk evresinde kondrositlerde geçici bir çoğalma yanıtı, hücre dışı matriks sentezinde artış, sitokin ve proteinaz enzim aktivitelerinde artış gözlenir. Eklem dokusu tarafından üretilen en önemli sitokin ve aracılığı interlökin-1beta (IL-1 $\beta$ ) ve tümör nekroz faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) iken; proteinazlar, matriks metalloproteinaz (MMP)'ler (kollojenaz, jelatinaz, stromelizin, matrilisin ve disintegrin-metalloproteinaz ailesi (ADAM)), aspartik proteinazlar, sistein proteinazlar ve serin proteinazlardır. Kondrositlerde gözlenen bu aktivite artışı erken dönemde ortaya çıkan "doku onarımı yanıtı" olarak kabul edilir (Evcik & Babaoğlu, 2007; Goldring, 2000b; Taskiran, 2007).

İkinci evrede kondrositler, doku hasarı ile osmolarite ve yük yoğunluğundaki değişikliği farkedip hızla hücrel yanıtı uyaran araçlar salgırlar (Harris et al., 2006b, 2006c). Matriks makromoleküllerinin sentezinde ve kondrositlerin çoğalmasında anabolik ve mitojenik faktörlerin önemli rolü vardır. Kondrositler birtakım mekanik ve kimyasal streslere yanıt olarak serbest bir radikal olan nitrik oksit (NO) üretirler. NO hızla yayılır ve matriks makromoleküllerinin yıkılmasına yol açan IL-1'in salınımını uyarır (Evcik & Babaoğlu, 2007; Harris et al., 2006c). IL-1 matriks bileşenlerinin sentezini azaltır, yıkıcı enzimlerin yapımını artırır ve kondrosit çoğalmasını baskılar. Kondrosit aktiviteleri üzerinde TNF- $\alpha$ 'nın da etkisi vardır (Evcik & Babaoğlu, 2007; Van der Kraan & van den Berg, 2000; Westacott & Sharif, 1996). Sitokinlerin yanı sıra, yine kondrosit ve sinoviyositlerden salınan bazı büyüme faktörleri proteolitik enzimlerin inhibisyonu, proteoglikan ve kollajen sentezinin uyarılması ve hasar gören kıkırdak dokusunun onarımında ve korunmasında görev yaparlar. Bu evrede tamir yanıtı proteazların katabolik etkisine karşı koyabilir ve bazen dokunun tamirini sağlayabilir. Tamir yanıtı yıllarca sürebilir; bazen hastalığın gidişini geçici de olsa durdurabilir (Evcik & Babaoğlu, 2007; Goldring, 2000b; Harris et al., 2006b, 2006c; Taskiran, 2007).

Stabilizasyon veya tamir girişiminin başarısız olması hastalığın üçüncü evresinin oluşumuna yol açar. İlerleyici bir kıkırdak kaybı, kondrositik anabolik ve çoğalma yanıtlarında azalma söz konusu olur. Bu azalma fonksiyonel ve stabilize bir matriks tarafından korunulmayan kondrositlerin mekanik hasarından ve ölümünden kaynaklanabileceği gibi, kondrositlerin

anabolik sitokinlere cevabındaki azalmadan da kaynaklanabilir (Harris et al., 2006c; Martel-Pelletier, Lajeunesse, & Pelletier, 2005; Wolheim, 2003).

OA'nın ileri döneminde özellikle tip 2 kollajen ve agrekan sentezindeki azalma kıkırdağın gergin yapısını bozar ve kıkırdak dejenerasyonunu dönüşü olmayan bir evreye sokar (Goldring, 2000a).

OA'nın derecesiyle orantılı olarak eklem kıkırdağının proteoglikan içeriği azalır, proteoglikanların glikozaminoglikanlar ile birleşmesi azalır. Hastalık ilerledikçe proteoglikan konsantrasyonu normal konsantrasyonun yarısının altına iner ve glikozaminoglikan zincirleri kısalır (Sarpel, 2007). Kollajenaz, kollajen liflerinde inceltme yapar, kollajen ağını gevşetir ve matrikste şişmeye neden olur. Bu değişiklikler kıkırdağın kompresyon ve mekanik streslere daha dirençsiz hale gelmesine ve ilerleyici bir kıkırdak kaybına yol açar (Martel-Pelletier et al., 2005).

OA'daki kıkırdak yıkımında dokuda yüksek oranda bulunan MMP'ler önemli rol oynamaktadır. OA'da bu aileden kollajenaz (MMP-1, MMP-8 ve MMP-13), sitromelisin (MMP-3, MMP-10) ve jelatinaz enzimlerinin (MMP-2, MMP-9) yüksek olduğu görülmektedir (Atay, 2011; Martel-Pelletier et al., 2005).

OA'da kollajenaz, sitromelisin ve jelatinaz kondrositler tarafından proenzim olarak salgılanmakta ve IL-1 ve TNF tarafından bu sekresyon arttırılmaktadır (Martel-Pelletier et al., 2005). Kollajenaz doğal kollajenin, stromelisin proteoglikanların yıkımından sorumlu iken jelatinaz denatüre kollajenin yıkımından sorumludur (Martel-Pelletier et al., 2005; Wolheim, 2003). MMP'ler, tip 9 ve 11 kollajenler ve diğer moleküllerin degradasyonunu sağlayarak tip 2 kollajen lif ağını destabilize ederler (Harris et al., 2006c; Martel-Pelletier et al., 2005; Wolheim, 2003).

Eklem kıkırdağında yıkımın başlamasından sorumlu gerçek kollajenaz olarak MMP-13 saptanmıştır (Evcik & Babaoğlu, 2007). MMP-13, tip 2 kollajeni spesifik parçaladığı için önemlidir ve OA'nın başlangıç döneminde sentezi artmaktadır (Martel-Pelletier et al., 2005; Wolheim, 2003). Fizyolojik koşullarda enzimlerin yıkıcı etkileri doku metalloproteinaz inhibitörü (TIMP) adı verilen moleküllerle baskı altında tutulur. Bu inhibitörler transforming büyüme faktörü-beta (TGF- $\beta$ ) kontrolü altında sentezlenirler. Bu inhibitör moleküller, enzim-inhibitör kompleksleri oluşturarak MMP'leri etkisiz hale getirirler (Martel-Pelletier et al., 2005). Eğer aktif enzimlere göre sentezleri daha azsa artmış matriks yıkımı gözlenir. OA kıkırdağı TIMP açısından fakirdir. Normal kıkırdakta TIMP 1 ve 2 bulunmaktayken OA kıkırdağında sadece TIMP 1 saptanmıştır (Evcik & Babaoğlu, 2007; Harris et al., 2006c; Martel-Pelletier et al., 2005).

### 2.1.7.2- Subkondral kemik doku

Subkondral kemik viskoelastiktir, kıkırdak dokuya göre daha iyi şok emicidir. Ani aşırı yüklenmelerde kıkırdak dokuyu koruyucu davranarak yük dağılımında görev alır ve kıkırdaktan çok daha fazla oranlarda yükü karşılar (Evcik & Babaoğlu, 2007; Hough, 2005).

OA'da eklem aşırı yüklenme ile subkondral kemik yoğunluğunda ve sertliğinde artış olur, ancak eklem yük dağıtım kapasitesi azalır. Subkondral kemik yoğunluğundaki artışın erken dönemde geliştiği ve sonrasında tüm kalınlık boyunca kıkırdak kaybına kadar ilerlediği gösterilmiştir (Evcik & Babaoğlu, 2007). OA ilerledikçe ağırlık taşıyan eklemlerdeki mekanik stress, subkondral kemik tabakası ve kıkırdakta mikrofraktürlerin gelişimine katkıda bulunabilir. Mikrofraktürler iyileşirken kemik sertliğinde artış meydana gelir. Kıkırdak hasarı arttıkça subkondral skleroz ve sertlik ilerler. Subkondral kemik, ortaya çıkan bu tekrarlayıcı uyarılara yeniden yapılanma ve sertleşmiş kemik dokusu ile cevap verir. Ancak bu yeni kemiğin şok emici özelliği azalmıştır. Çalışmalar, subkondral kemik kalınlığı ile OA şiddeti arasında yakın ilişki olduğunu göstermiştir (Evcik & Babaoğlu, 2007; Hough, 2005; Kuru, 2000).

### 2.1.7.3- Sinoviyal doku

Sinoviyal doku, sinoviyal zar ve sinoviyal sıvıdan oluşur. Sinoviyal zar eklem kapsülünün arka iç yüzeyi boyunca yayılan, eklem kıkırağını örtmeyen, damardan zengin bir bağ dokudur (Doral et al., 2007). Sinoviyal zar normalde bir veya iki hücre kalınlığındadır (Harris et al., 2006a). Bu hücreler sinoviositler olarak bilinir ve plazmanın ultrafiltrasyonu ile sinoviyal sıvı oluşmasından sorumludurlar. Sinoviyal tabakada bulunan bu hücreler, makrofaj benzeri etki gösterir ve hyaluronik asit, proteoglikan, kollajen tip I-III, TIMP, latent proteinaz ve kollajenaz sentezler. Sinoviyal doku vasküler beslenmesi iyi olduğu için yüksek yenilenme kapasitesine sahiptir. Sinoviyal sıvı, plazmanın sinoviyal aralığa geçen bir filtratıdır. Sinoviyal sıvı miktarı 2-4 ml arasındadır. Renksiz, berrak, viskozitesi yüksek bir sıvıdır. (Apraş & Çobankara, 2000; Doral et al., 2007; Kuru, 2000). Viskosite hyaluronik asit içeriğine bağlıdır. Sinoviyal sıvı eklemde difüzyon yoluyla eklemi çevreleyen lenfatik ve kapillerlere atılırken normal döngü sürecine uğrar. Sinoviyal sıvı eklem çevresindeki kıkırdağa besin desteği sağlar ve eklem binen yüke bağlı olarak eklem kayganlaştırıcı veya şok absorbe edici olarak görev yapar. Sinoviyal sıvı bariyer dışlama olarak adlandırılan yüksek molekül ağırlıklı hyaluronat moleküllerinin kesilmesine bağlı olarak inflamatuvar hücre (örneğin, nötrofil) ve moleküler debrisin eklem içinde hareket etmesini sınırlar (Apraş & Çobankara, 2000; Kuru, 2000).

OA noninflamatuvar bir hastalık olarak bilinmesine rağmen son zamanlarda yapılan çalışmalarda, sinovitin ve düşük derece inflamasyonun OA patofizyolojisinde rol oynadığı gösterilmiştir (Atay, 2011; Pelletier et



al., 2001; Saxne et al., 2003). Kıkırdak yıkımı sonucu kıkırdaktan parçalanmış makromoleküller ile OA'da sinoviyal inflamasyon başlar. Kollajen, proteoglikan ve diğer matriks parçaları sinoviyal sıvıya geçer ve sinoviyal makrofajlar tarafından fagosite edilir. Bunlar antijen gibi hareket ederek IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  gibi sitokinlerin salınımına yol açar (Evcik & Babaoğlu, 2007; Harris et al., 2006c). Artan sitokin sentezi kıkırdak yıkımını artırır ve bu parçalanma ürünleri inflamasyonun daha da artmasına neden olur. Sinoviyal inflamasyon, sinoviyositler ve kondrositler tarafından yapılan biyokimyasal faktörler, prostanooidler, sitokinler ve reaktif oksijen türleri tarafından kontrol edilmektedir (Henrotin, Bruckner, & Pujol, 2003).

## **2.2 – Osteoartritte Terapötik Hedefler**

Eklem hasarı veya tamiri sırasında çeşitli biyobelirteçler menisküs ve ligamentler, eklem kıkırdağı, kemik doku, osteofitler ve sinoviyal zardan salınarak sinoviyal sıvı havuzuna ve buradan da lenfatik dolaşıma ve sistemik dolaşıma katılırlar (Özgül, 2002). Bu biyobelirteçlerin serum, idrar veya kanda belirlenmesi, OA'nın erken dönemde saptanması, hastalığın seyrinin ve tedaviye cevabının izlenmesi için önemlidir. Bu nedenle hastalığın erken dönemlerinde eklemlerdeki değişimleri nicel, güvenilir ve duyarlı biçimde saptayabilecek yeni terapötik hedeflere ve alternatif yöntemlere ihtiyaç vardır.

### **2.2.1- Mitojenle aktive olan protein kinaz uyarı iletimi**

Hücre uyarı mekanizması; hücrenin normal işlevlerinin devamlılığı için gerekli iletişim ve etkileşimden sorumludur. Ökaryotik hücrelerin tamamında yer alan bu proteinler hücre zarından çekirdeğe bilgi aktarılmasında önemli görevlere sahiptir. Protein fosforilasyonu bu uyarı iletim yollarında, hücre dışı uyarılara yanıt vermek için hücreler tarafından en sık kullanılan mekanizmadır. Uyarı ileti yolu embriyogenezis, yaşama, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz gibi biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol alır (Cooper & Hausman, 2006a; Firestein & Manning, 1999; Loeser et al., 2008).

MAP kinaz yolu reseptör aracılığıyla uyarının hücre içine iletiminden sorumludur. Uyarı iletimi G-proteinin aktive olması ile başlar (Ras aktivasyonu) ve MAPKKK'nın (MAP kinaz kinaz kinaz) aktivasyonundan sonra sırasıyla MAPKK (MAP kinaz kinaz) ve MAPK (MAP kinaz) aktive olmasıyla devam eder. Aktif MAPK, sitoplazmik substratları ve/veya nükleus transkripsiyon faktörlerini fosforilasyon yoluyla aktive eder ve hücrenin bu uyarıya karşı vereceği biyolojik yanıtı oluşturur. MAP kinaz ailesinin 3 üyesi vardır. Bunlar Ekstrasellüler uyarı-düzenleyici kinaz (ERK), Jun-N-terminal kinaz (JNK) ve 38 kd protein kinaz (p38) dir (Cooper & Hausman, 2006a; Güneş, 2013; Harris et al., 2006d; Loeser et al., 2008).

Hücresel birçok olayda önemli roller oynayan JNK, hücre gelişimi, büyümesi, apoptoz ve immün cevaptan sorumludur. Stres faktörlerine cevap sırasında aktive olduğu için stres ile aktive olan protein kinaz (Stress-activated protein kinase, SAPK) olarak da bilinir. JNK; JNK1, JNK2 ve JNK3 genleri tarafından kodlanır. Hücrede stres oluşturan ısı şoku, osmolarite değişimleri ve DNA hasarına hemen her zaman JNK ve p38 aktivasyonu eşlik eder (Bogoyevitch, Ngoei, Zhao, Yeap, & Ng, 2010; Davis, 2000).

JNK uyarı iletiminin bozulması nörodejenerasyon, doğum kusurları, kanser, iskemi/reperfüzyon hasarı ve kronik inflamasyon gibi birçok hastalığın gelişimine katkı sağlamaktadır (Johnson & Nakamura, 2007).

JNK, c-Jun'u fosforlayarak transkripsiyon faktörlerini aktive eden AP-1 (Aktivatör protein-1)'i aktive etmede merkezi bir rol oynar (Weston & Davis, 2002). JNK, MMP üretimini düzenler ve TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  gibi pro-inflamatuar sitokinlere cevap olarak aktive olur (Bogoyevitch et al., 2010; Han et al., 2001; Harris et al., 2006d; Loeser et al., 2008). Bu kinazlar özellikle NF- $\kappa$ B olmak üzere çeşitli transkripsiyon faktörlerini aktive eder (Roach, 2008). AP-1 kollajenaz genini düzenlediğinden, JNK artritte terapötik bir hedef olarak görülmektedir. Sinoviyositlerde JNK aktivasyonunun artmış olduğu gösterilmiştir (Han et al., 1999). Seçici bir JNK inhibitörünün adjuvan artritte görülen radyolojik hasarı ve hastalık şiddetini azalttığı bildirilmiştir (Han et al., 1999; Han et al., 2001; Harris et al., 2006e). Yapılan çalışmalarda aktif JNK düzeyinin OA'lı kıkırdakta normal insan kıkırdağından daha fazla olduğu görülmüştür (Clancy et al., 2001; Fan, Söder, Oehler, Fundel, & Aigner, 2007; Loeser et al., 2008).

### **2.2.2- Transkripsiyon faktörü nükleer faktör kappa B**

Nükleer faktör kappa B (NF- $\kappa$ B), ilk olarak matür B lenfositlerinin çekirdeklerinde, immünglobulin kappa hafif zincir enhancer bölgesinde 10 baz çiftlik DNA elemanına bağlanan bir transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmıştır (Sen & Baltimore, 1986).

Memeli hücrelerinde beş ayrı NF- $\kappa$ B üyesi bulunmaktadır. Bunlar; NF- $\kappa$ B1 (p50/p105), NF- $\kappa$ B2 (p52/p100), RelA (p65), RelB ve c-Rel (Rel)'dir. Bu proteinler homodimerik ve heterodimerik halde sitoplazmada bulunur (Chen, Castranova, Shi, & Demers, 1999; Marcu, Otero, Olivotto, Borzi, & Goldring, 2010; Perkins, 2007). NF- $\kappa$ B üyeleri amino uç bölgelerinde 'kappa B' DNA bağlanma bölgesi veya 'Rel Homoloji Bölgesi' (RHD) olarak bilinen yüksek derecede korunmuş ortak bir DNA bağlanma/dimerizasyon bölgesi içerir. Bu bölge NF- $\kappa$ B'nin hücre içi inhibitörü (I $\kappa$ B) ile ilişki kurmasında da rol oynar (Baldwin Jr, 1996; Chen et al., 1999; Perkins, 2007). Sitoplazmada I $\kappa$ B proteini ile inaktif şekilde bulunan NF- $\kappa$ B aktivasyonu I $\kappa$ B protein ailesiyle düzenlenmektedir. I $\kappa$ B protein ailesi üyeleri I $\kappa$ B-alfa (I $\kappa$ B- $\alpha$ ), I $\kappa$ B-beta (I $\kappa$ B- $\beta$ ), I $\kappa$ B-gama (I $\kappa$ B- $\gamma$ ), I $\kappa$ B-epsilon

(I $\kappa$ B- $\epsilon$ ), I $\kappa$ B-zeta (I $\kappa$ B- $\zeta$ ), p100, p105 ve Bcl-3'den oluşmaktadır (Baldwin Jr, 1996; Perkins, 2007; Yamazaki, Muta, & Takeshige, 2001). NF- $\kappa$ B uyarı yolağı inflamatuvar araçlarla I $\kappa$ B kinazın (IKK) fosforlanmasıyla aktifleşmektedir. Aktif IKK, I $\kappa$ B'nin yıkımına yol açarak NF- $\kappa$ B'nin aktifleşmesine ve gelen uyarıyı çekirdeğe taşımasını sağlar. Böylece hedef gen transkripsiyonu gerçekleşir (Cooper & Hausman, 2006b; Güneş, 2013; Harris et al., 2006d; Perkins, 2007).

NF- $\kappa$ B normal fizyolojik süreç için önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Bununla birlikte NF- $\kappa$ B aktivitesinde orataya çıkan düzensizlikler romatoid artrit, osteoartrit, astım, multiple skleroz, inflamatuvar bağırsak hastalığı, tip II diyabet ve kanser gibi çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol oynamaktadır (Chen et al., 1999; Marcu et al., 2010; Roman-Blas & Jimenez, 2006; Tak & Firestein, 2001)

NF- $\kappa$ B transkripsiyon faktörleri pro-inflamatuvar sitokinler, aşırı mekanik stres ve hücre dışı matriks yıkım ürünlerini içeren stres ilişkili uyarılarla aktifleşebilir. Aktif NF- $\kappa$ B sitokinlerin, kemokinlerin, adhezyon moleküllerinin, inflamatuvar araçlarının ve çeşitli matriks yıkım enzimlerinin ekspresyonunu düzenler. NF- $\kappa$ B uyarı yolağı sadece kondrositlerin stresle ilişkili pro-inflamatuvar yanıtında merkezi bir rol oynamaz, aynı zamanda kondrositlerin farklılaşmasının kontrolünde de görev yapar (Marcu et al., 2010).

NF- $\kappa$ B; TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , lipopolisakkarit ve serbest oksijen radikallerini içeren birçok farklı uyan tarafından aktive edilir. Hücreler TNF- $\alpha$  veya IL-1 $\beta$ 'ya maruz kaldıklarında I $\kappa$ B fosforlanır, bu da NF- $\kappa$ B'nin serbestleşip nükleusa girerek gen ekspresyonunu aktive etmesine neden olmaktadır (Baldwin Jr, 1996; Harris et al., 2006d).

NF- $\kappa$ B, eklem kıkırdağında MMP gen ekspresyonu oluşmasında ve çok sayıda pro-inflamatuvar aracının salınmasında rol alır. Bunlar; TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, nitrik oksit indükleyici (iNOS), siklooksijenaz (COX)-2, c-fosfolipaz (c-PLA2), intersellüler adhezyon molekülü (ICAM)-1, vasküler hücre adhezyon molekülü (VCAM)-1 ve E-selektin gibi hücre adhezyon molekülleri, makrofaj inflamatuvar protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) ve monosit kemoatraktan protein-3 (MCP-3) gibi kemokinlerdir (Harris et al., 2006d; Liacini, Sylvester, Li, & Zafarullah, 2002; Roman-Blas & Jimenez, 2006). NF- $\kappa$ B, inflamatuvar sitokinlerle birlikte çeşitli hücre dışı matriks yıkım proteinlerinin ekspresyonlarını artırır (Roach, 2008). NF- $\kappa$ B'nin OA'lı hasta kondrositlerinde, anormal gen ürünlerinin uyarılması ve normal kondrosit gen ürünleri üretiminin baskılanmasında etkili olduğu ileri sürülmüştür (Roach, 2008). Romatoid artrit sinoviyumunda NF- $\kappa$ B proteinleri p50 ve p65'in makrofajlarda, sinoviyal örtü hücrelerinde ve vasküler endotelde bol miktarda bulunması NF- $\kappa$ B'nin romatoid artrit için patolojik olduğunu düşündürmektedir (Handel, Mcmorrow, & Gravallese, 1995). NF- $\kappa$ B aktivasyonunun sinoviyal örtü hücrelerinde apoptozu engelleyerek aşırı hücre çoğalmasına yani hiperplaziye neden olabileceği düşünülmektedir

(Harris et al., 2006e). Fibroblast-benzeri sinoviyosit (FLS) hücrelerin kültür ortamında, NF- $\kappa$ B'nin aktifleşmesini sağlayan IKK'ların salındığı ve bunun TNF ve IL-1 tarafından uyarıldığı gösterilmiştir (Aupperle et al., 2001). İn vivo ve in vitro çalışmalar artritte NF- $\kappa$ B'nin hedef alınması düşüncesini destekler niteliktedir (Harris et al., 2006e).

### 2.2.3- Kodlamayan RNA'lar

İnsan genomunda 30.073 gen olduğu bilinmektedir. Bu genlerden 21.598 tanesi protein kodlamada görev alırken, 8.475 tanesi RNA genleri olarak görev yapar (Tobias, Connor, & Ferguson-Smith, 2014). Hücrede proteine çevrilmeyen RNA molekülleri, kodlamayan RNA'lar (non-coding RNAs, ncRNA'lar) olarak adlandırılır. ncRNA'lar, uzun kodlamayan RNA'lar (long non-coding RNA, lncRNA), küçük kodlamayan RNA'lar (snoRNA'lar, piRNA'lar, siRNA'lar ve miRNA'lar) olarak ikiye ayrılır (**Tablo 2.5**). Kodlamayan RNA'lar biyolojik sürecin düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir (Barter & Young, 2013; Derrien et al., 2012; Djebali et al., 2012).

**Tablo 2.5** Küçük kodlamayan RNA'lar

Kodlamayan RNA'lar	İşlevi
<b>snoRNA</b> (Small Nucleolar RNA)	Ribozomal RNAların modifikasyonlarını gerçekleştirir.
<b>piRNA</b> (Piwi-associated RNA)	Embriyo gelişimi sırasında transpozonların susturulmasında ve spermatogenezde görev alır.
<b>siRNA</b> (small interfering RNA)	Post-transkripsiyonel gen susturmasında rol oynar.
<b>miRNA</b> (micro RNA)	Gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel düzenlenmesinde görev alır.

#### 2.2.3.1- MikroRNA (miRNA)

mikroRNA (miRNA) yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda tek iplikçikli RNA molekülüdür ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynar (Ha & Kim, 2014; Huntzinger & Izaurralde, 2011). miRNA'nın etkileri ilk 1993'te Lee ve çalışma arkadaşları tarafından Victor Ambros laboratuvarında *C. elegans* solucanında keşfedilmiş ve varlıkları çeşitli bitki ve hayvanlarda gösterilmiştir (R. C. Lee, Feinbaum, & Ambros, 1993). Her geçen gün sayısı artan miRNA'lara ait bilgiler miRBase isimli merkezi bir veri tabanında toplanmaktadır (Griffiths-Jones, Saini, van Dongen, & Enright, 2008). Haziran 2014 tarihi itibarıyla bu veri tabanına giriş yapılan miRNA sayısı 28.645'e ulaşmıştır (miRBase).

mRNA parçalanması veya translasyon inhibisyonu ile gen ekspresyonunu düzenleyen, küçük kodlamayan RNA'ların bir sınıfı olan mikroRNA (miRNA)'ların keşfiyle normal gelişim süreci ve hastalıklardaki rollerinin araştırılması onları yeni bir biyobelirteç sınıfı yapmaktadır (Nakasa, Nagata, Yamasaki, & Ochi, 2011; Sonkoly & Pivarcsi, 2009). miRNA'ların gelişim, homeostaz ve bağışıklık fonksiyonlarında önemli bir

rol oynadığı, hücre çoğalmasını ve apoptozu düzenlediği gösterilmiştir (Callis, Chen, & Wang, 2007; He, He, Lowe, & Hannon, 2007; Nakasa et al., 2011; Sonkoly & Pivarcsi, 2009). miRNA'ların kanserden inflamasyona kadar çoğu hastalıkla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte birçok miRNA'nın dizileri, temel ekspresyon bilgileri ve fonksiyonları hakkında yapılan araştırmalar gün geçtikçe artmaktadır (Nakasa et al., 2011; O'Connell, Rao, Chaudhuri, & Baltimore, 2010; Sonkoly & Pivarcsi, 2009).

miRNA'lar diğer genler gibi DNA üzerinden transkribe edilir ve proteine dönüştürülmeden küçük RNA molekülleri halinde gen regülasyonunda görev alır (Filipowicz, Bhattacharyya, & Sonenberg, 2008). miRNA'lar post-transkripsiyonel olarak gen ekspresyonunu kontrol eden moleküllerdir. mRNA'ların 3' çevirime uğramayan bölgeleriyle (UTR-untranslated region) baz eşleşmesi yaparak onların yıkımını sağlar veya translasyona uğramalarını engellerler (Filipowicz et al., 2008; O'Connell et al., 2010; Yates, Norbury, & Gilbert, 2013).

#### 2.2.3.2- miRNA biyogenezi

miRNA'lar miRNA genlerinden RNA Polimeraz II tarafından transkribe edilir. Oluşturulan transkript 'cap' ve 'poli(A)' kuyruğuna sahiptir. Bu oluşan ilk transkript primer-miRNA (pri-miRNA) olarak isimlendirilir. pri-miRNA'lar saç tokası (İng. hairpin) şeklindedir. Bu yapıda olgun miRNA dizisi ilmeğin (İng. loop) yakınındaki sap kısmında (İng. stem) bulunur (Carthew & Sontheimer, 2009; Kim, Han, & Siomi, 2009).

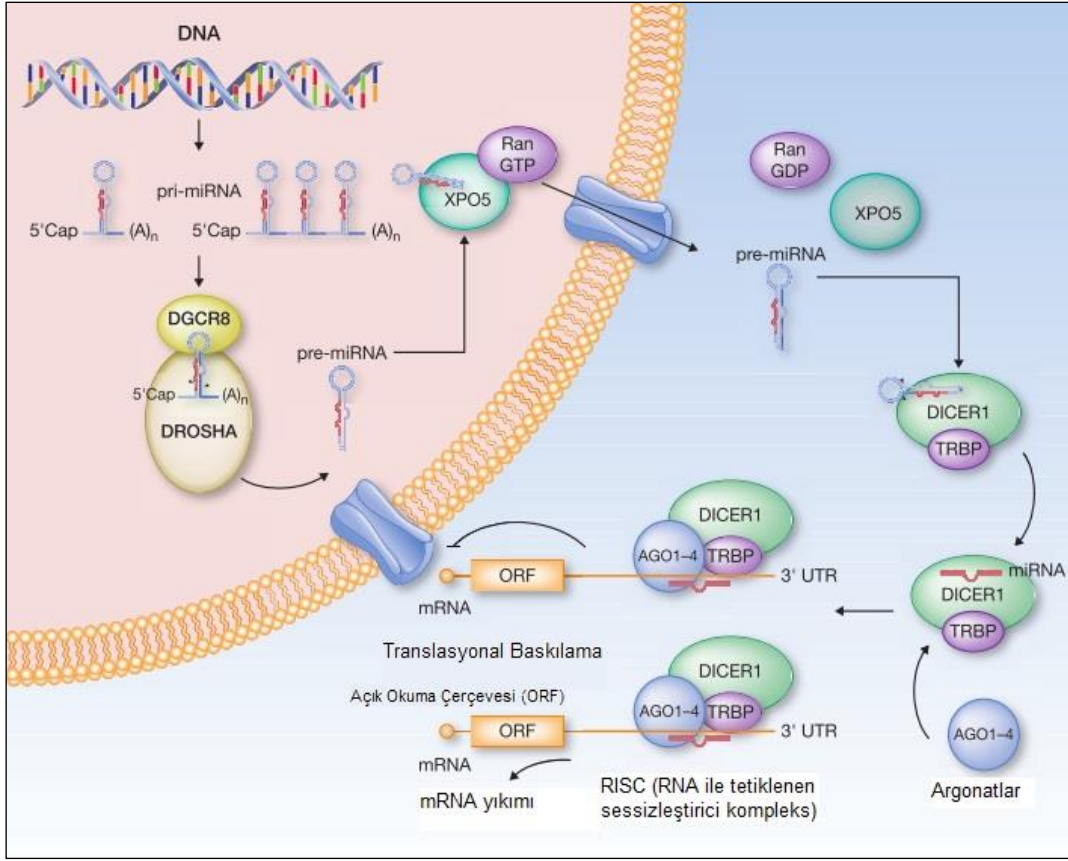
pri-miRNA iki adımlı bir süreçten geçerek olgun ve işlevsel miRNA haline gelir. İlk adım çekirdekte gerçekleşir ve pri-miRNA 'mikroişlemci kompleks' adlı bir protein kompleksi tarafından kesilir. Mikroişlemci komplekste Drosha adlı bir nükleaz ve DGCR8 (DiGeorge critical region 8) adlı çift iplikçikli RNA bağlayıcı protein bulunur (Filipowicz et al., 2008; Yoontae Lee et al., 2003; Y Lee, Han, Yeom, Jin, & Kim, 2006). Drosha enzimi pri-miRNA'nın sap-ilmek yapısını tanıyarak sap kısmında belli bir noktadan kesim yapar (Yoontae Lee et al., 2003; Y Lee et al., 2006; Melo & Kalluri, 2012; O'Connell et al., 2010; Yates et al., 2013). 160 kD'luk bir nüklear ribonükleaz III endonükleaz olan Drosha, yaklaşık 200 nükleotit büyüklüğündeki pri-miRNA'yı keserek 70-80 nükleotitlik sap-ilmek şekilli, öncül (prekürsör)-miRNA'yı ortaya çıkarır. Drosha'nın tanımadaki bu özgülüğü, yardımcı proteinlerle sağladığı düşünülmektedir (Filipowicz et al., 2008; Y Lee et al., 2006; Yates et al., 2013). Pre-miRNA'lar nükleustan sitoplazmaya Exportin-5 (XPO5) isimli taşıyıcı protein ile tanışır. XPO5, Ran-GTP ve pre-miRNA ile heterotrimerik yapı oluşturur (Yi, Qin, Macara, & Cullen, 2003). Bu yapı pre-miRNA'nın yapısını stabilize ederek hücre zarında bulunan porlardan sitoplazmaya taşınmasını sağlar. Sitoplazmada Ran-GTP'nin Ran-GDP'ye hidrolize olmasıyla pre-miRNA serbest kalır (Lund, Güttinger, Calado, Dahlberg, & Kutay, 2004).

İkinci adım sitoplazmada gerçekleşir ve pre-miRNA 200 kD'luk sitoplazmik ribonükleaz III enzimi Dicer ve çift zincirli RNA bağlanma proteini olan TRBP (İng. Transactivation-responsive RNA-binding protein-Transaktivasyon cevabı oluşturan RNA bağlanma proteini) tarafından ilmek kısmından kesilerek çift dal RNA dubleks (miRNA:miRNA\*) oluşturulur. Bu dubleks yapıda hem olgun miRNA dalı hem de onun tamamlayıcı dalı (miRNA\*) birlikte bulunur. Tamamlayıcı dal uzaklaştırılarak yaklaşık 22 nükleotitik uzunluğunda tek zincirli olgun miRNA oluşur (Carthew & Sontheimer, 2009; Chendrimada et al., 2005; Filipowicz et al., 2008; Y Lee et al., 2006; Melo & Kalluri, 2012; Yates et al., 2013).

Olgun miRNA'lar işlevlerini gerçekleştirmek için başka proteinlere de ihtiyaç duyar. Bu proteinlerle birlikte 'RNA ile tetiklenen sessizleştirici kompleks' (İng. RNA-induced silencing complex; RISC)'i oluştururlar. Bu yapıda en iyi tanımlanmış proteinler Argonat (İng. Argonaute; Ago) ailesi proteinleridir (Carthew & Sontheimer, 2009; Filipowicz et al., 2008; Meister, 2013; O'Connell et al., 2010; Yates et al., 2013). Olgun miRNA bu yapıya katılırken tek zincir hale geçer. Argonat protein ailesinin üyeleri Dicer'a benzeyen PAZ bölgesiyle tek zincir RNA'nın 3' ucuna bağlanır. Yapılan çalışmalar Argonat proteinlerinin hedef mRNA'yı kesen endonükleazlar olduğunu göstermektedir (Carthew & Sontheimer, 2009; Y Lee et al., 2006; Meister, 2013; Yates et al., 2013).

RISC kompleksi miRNA'ların sahip oldukları 6-8 nükleotitik tohum dizisiyle (İng. seed sequence) hedef mRNA'nın 3' UTR bölgesine yönelir ve etkilerini hedefledikleri mRNA'nın 3' UTR bölgesindeki baz eşleşmesine göre gösterir. 3' UTR bölgesinde yüksek oranda baz eşleşmesi varsa mRNA yıkılır. Memelilerde olduğu gibi baz eşleşmesi azsa mRNA'nın translayonu baskılanır (Carthew & Sontheimer, 2009; Huntzinger & Izaurralde, 2011; Yates et al., 2013).

miRNA'lar hedef mRNA üzerinde genellikle 3' UTR bölgesine bağlanarak gen ifadesini baskılar. Bununla birlikte 5' UTR bölgesini veya açık okuma çerçevesini (ORF-open reading frame) hedef aldıkları durumlarda da gen ifadesi baskılanır (Carthew & Sontheimer, 2009; Filipowicz et al., 2008; Lewis, Burge, & Bartel, 2005) (**Şekil 2.2**).



**Şekil 2.2** miRNA biyogenezi (Melo & Kalluri, 2012)

### 2.3 – miRNA ve Osteoartrit

miRNA'ların hastalıkların mekanizmalarında önemli bir role sahip olduğu ileri sürülmekle birlikte halen ilgili mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Kıkırdak ve kondrositlerdeki patoloji sonucu ortaya çıkan OA ile miRNA ilişkilerinin açıklanmasını sağlayan çalışmalar her geçen gün artarak devam etmektedir. Bu süreçte miRNA biyogenezinde rol olan moleküllerin araştırılması önemli bir basamağı oluşturmaktadır. miRNA biyogenezinde temel bir role sahip Dicer enziminin normal iskelet gelişiminin esas elemanlarından olduğu gösterilmiştir (Kobayashi et al., 2008). Kobayashi ve arkadaşları miRNA'ların kıkırdak fonksiyonunda önemli olduğunu göstermiştir. Çalışmada Dicer-null farelerde Dicer-deficient kondrositler nedeniyle iskelet gelişiminde defektler ve premature ölümler gözlenmiştir. Dicer miRNA sentezinde kritik bir role sahip olduğundan bu bulgular kondrositlerin biyolojik rolünde miRNA'ların etkisinin önemini dolaylı olarak göstermektedir (Kobayashi et al., 2008).

miRNA'ların OA patogenezindeki rolünün açığa çıkarılması için normal ve OA eklem dokularında miRNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırıldığı araştırmalar yapılmıştır. Bu araştırmalardan birinde, OA'lı 33 hasta ve 10 sağlık bireyin kıkırdak dokusunda, 365 miRNA'nın durumu incelenmiş ve

çalışma sonucunda bu miRNA'ların 16'sinin farklı eksprese olduğu bunlardan miRNA-483, miRNA-22, miRNA-377, miRNA-103, miRNA-16, miRNA-223, miRNA-30b, miRNA-23b ve miRNA-509'un ekspresyon düzeylerinin arttığı ve miRNA-29a, miRNA-140, miRNA-25, miRNA-337, miRNA-26a, miRNA-210, miRNA-373'ün ekspresyon düzeylerinin azaldığı vurgulanmış, bazılarının ise obezite ve inflamasyonla ilgisi olduğu ileri sürülmüştür (Iliopoulos et al., 2008). Başka bir araştırmada OA ile normal kıkırdak ve kemik arasında 157 miRNA ekspresyonu araştırılmıştır. Kıkırdak dokuda normale göre 17 miRNA'nın ve kemik dokuda normale göre 30 miRNA'nın 4 kattan fazla eksprese olduğu belirlenmiştir (Jones et al., 2009). Ayrıca bu çalışmada izole insan kondrositlerinde miRNA-9, miRNA-98 ve miRNA-146'nın aşırı ekspresyonunun TNF- $\alpha$  üretimini indükleyen IL-1 $\beta$ 'yi azalttığını bildirmişlerdir (Jones et al., 2009).

Diğer bir araştırmada primer kondrosit kültüründe 723 miRNA analiz edilmiş ve 7'sinin istatistiksel olarak önemli derecede farklı eksprese olduğu belirlenmiştir. Bu 7 miRNA'dan 1'i (miRNA-483) OA kondrositlerinde artarken, 6'sı (miRNA-149, miRNA-582, miRNA-1227, miRNA-634, miRNA-576 ve miRNA-641) normal kondrositlerde artmış olarak bulunmuş, bu miRNA'ların TGF-beta, Wnt, Erb and mTOR uyarı yolları aracılığıyla eklem kıkırdağında görev aldıkları öngörülmüştür (Díaz-Prado et al., 2012). Beyer ve arkadaşları yaptıkları araştırmada kalça ve diz OA'sı olan 816 hastanın serum örneklerinde mikroarray yöntemiyle miRNA taraması yapmışlar, sonuçta hasta grubunda let-7e, miRNA-454 ve miRNA-885-5p'nin diz ve kalça OA'sı ile ilgili biyobelirteç olabileceklerini önermişlerdir (Beyer et al., 2014).

Çalışmalarda miRNA-140'ın hem uzun hem de yassı kemik gelişimi sırasında fare embriyolarının kıkırdak dokularında sentezlendiği kıkırdak spesifik bir miRNA olduğu bildirilmiştir (Tuddenham et al., 2006) Mikroarray analizi kullanılan başka bir araştırmada normal insan kıkırdak dokusunda miRNA-140'ın ekspresyonu gösterilmiş ve OA'nın ileri evrelerinde ekspresyonun önemli derecede azaldığı bildirilmiştir. Bu çalışmada normal insan kondrositleri IL-1 $\beta$  ile muamele edilerek miRNA-140'ın ekspresyonunun baskılandığı ve miRNA-140'ın IL-1 $\beta$  indüklü ADAMTS5 (Disintegrin-metalloproteinaz trombospondin motif 5) ekspresyonunu azaltabildiği gösterilmiştir (Miyaki et al., 2009). Aynı araştırma grubu in vivo fare çalışmasında miRNA-140'ın OA patogenezinde kritik bir rol oynadığını göstermişlerdir. miRNA-140 (-/-) farelerin eklem kıkırdağı liflenmesi ve proteoglikan kaybı gibi yaşla ilişkili OA benzeri değişimler gösterdiği bildirmiştir. miRNA-140'ın in vivo da aşırı ekspresyonunun OA'daki dejenerasyonu inhibe ettiği de gösterilmiştir. Sonuçta çalışmada miRNA-140'ın ADAMTS5 ekspresyonunu düzenleyerek OA patogenezinde direkt bir hedef olduğu açığa çıkarılmıştır. (Miyaki et al., 2010) Başka bir araştırma grubu da miRNA-140 ekspresyonunun OA sürecinde azaldığını göstermiştir. Bu grup çalışmalarında OA kıkırdağında MMP-13 ve IGFBP-5 (İnsülin benzeri büyüme faktör bağlayıcı protein 5) ekspresyonlarına odaklanmış, MMP-13 ve IGFBP-5'nin 3'-UTR dizilerinde



fonksiyonel bağlanma alanlarını öngörmüşlerdir. miRNA-140 ve miRNA-27a'nın MMP-13 ve IGFBP-5'nin 3'-UTR'lerine bağlanma potansiyeline sahip olduğu ve bu miRNA'ların normal kondrositlerde eksprese olduğu, OA kondrositlerinde ise ekspresyonlarının azaldığı gösterilmiştir (Tardif, Hum, Pelletier, Duval, & Martel-Pelletier, 2009).

miRNA-27b'nin insan OA kondrositlerinde MMP-13 ekspresyonunu düzenlediği bildirilmiştir. miRNA ekspresyon profili IL-1 $\beta$  ile uyarılan ve uyarılmayan kondrositlerden elde edilen RNA'lar kullanılarak araştırılmıştır. miRNA-27b'nin IL-1 $\beta$  ile uyarılan kondrositlerde azaldığı bulunmuştur. Bu çalışma MMP-13'ün ekspresyon artışının, miRNA-27b'nin azalışı ile korelasyonunu ve miRNA-27b'nin MMP-13'ün direkt hedefi olduğunu göstermiştir (Akhtar et al., 2010).

OA'da miRNA ekspresyonlarına yaşlanma gibi risk faktörleri aracılık edebilir. Birçok çalışmada, ya dolaşımdaki miRNA'lar ya da periferik kan hücrelerinde eksprese olan miRNA'lar insanlarda farklı yaşlar arasında incelenmiştir. OA ile ilgili bazı miRNA'larda dahil, spesifik miRNA'ların yaşla farklı ekspresyon gösterdiği sonucuna varılmıştır (ElSharawy et al., 2012; Hooten et al., 2010; Olivieri et al., 2012) Değerlendirmeler sonucunda, miRNA-21 ekspresyon seviyesinin arttığı ve bu artışın inflamasyon belirteci c-reaktif protein ve TGF uyarısıyla uyumlu olduğu (Olivieri et al., 2012), miRNA-221 ekspresyonunun yaşla azaldığı ve OA'yı içine alan uyarı yolağı PI3K (Fosfoinozitol 3 kinaz)'nın artışına aracılık ettiği (Hooten et al., 2010), miRNA-146a ekspresyonunun ise yaşa bağlı olarak arttığı vurgulanmıştır (Okuhara et al., 2012). Bu miRNA'ların, yaşın önemli bir risk faktörü olduğu ve spesifik bir markerın bulunmasının zor olduğu OA'nın teşhisinde kullanılabileceği bildirilmiştir.

miRNA'ların ekspresyonlarının özel immün cevabı ve inflamatuvar uyarıyı da düzenledikleri belirlenmiştir. miRNA'lar hematopoezde belirli bir role sahiptir ve böylece bu sürecin bozulması inflamatuvar hastalıkların patogeneğinde önemli olabilmektedir. miRNA-146 ve miRNA-155; IL-1 ve TNF- $\alpha$  gibi pro-inflamatuvar uyarıcılar tarafından indüklenen miRNA'lardır (Sheedy & O'Neill, 2008). miRNA-146a/b immün fonksiyonların düzenlenmesinde tanımlanan ilk miRNA'lardır. Normal olmayan miRNA-146 ekspresyonu OA, romatoid artrit ve sedef hastalığı gibi çeşitli inflamatuvar hastalıklarda gösterilmiştir. İmmün hücrelerin gelişimi ve doğuştan gelen bağışıklık kadar kazanılmış bağışıklığa olan cevabı da kapsayan immün fonksiyonlarda miRNA-155'in etkisi in vivo ve in vitro çalışmalarda gösterilmiştir (Sonkoly & Pivarcsi, 2009). Eklem kıkırdağında miRNA ekspresyonlarının araştırılması OA gibi hastalıklarda hedeflerin tanımlanması için imkan sağlayabilir (Dunn et al., 2009).

miRNA-146a ve miRNA-155'in ekspresyon mekanizmalarını içeren çalışmalar pro-inflamatuvar transkripsiyon faktörü NF- $\kappa$ B'nin merkezi bir rolü olduğunu göstermektedir (Ceppi et al., 2009; Taganov et al., 2006). Bununla birlikte miRNA-155 seviyesinin düzenlenmesinde MAPK uyarısının

önemli bir role sahip olduğu ve JNK'nın bu ekspresyonu düzenlediği düşünülmektedir (O'Connell et al., 2007). Yapılan araştırmalarda, bu bağlantıyı destekleyen deneysel kanıtlar az olduğundan bu uyarı yolağında miRNA-146a ve miRNA-155 nin NF- $\kappa$ B ve JNK ile olan ilişkisinin anlaşılması için daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Yamasaki ve arkadaşları histopatolojik evreleme de kullanılan Mankin skoruna göre düşük evre OA hastalarının kıkırdak dokusunda miRNA-146a'nın aşırı derecede ekprese olduğunu bu ekspresyonun IL- $\beta$  uyarımı ile indüklendiğini bildirmişlerdir. Çalışmada 9'u kalça ve 6'sı diz olmak üzere 15 OA hastasından alınan kıkırdak dokusunda miRNA-146a ekspresyonu real-time pcr ve immunohistokimyasal olarak incelenmiştir. Normal insan dokusundan kültüre edilerek elde edilen kondrosit hücrelerinde ortamdaki IL- $\beta$  varlığında miRNA-146a ve MMP-13'ün ekprese olduğu bulunmuştur (Yamasaki et al., 2009).

Periferal mononükleer kan hücrelerinde (PMKH) miRNA'ların belirlenebilmesi OA gibi hastalıklarda biyobelirteç olarak kullanılabilmesi için önemlidir. Hastalığın ilerlemesi ile bağlantılı proteinaz ve pro-inflamatuar sitokinleri üreten dolaşımdaki PMKH'ler OA hastalarının sinoviyumunda birikebilmektedir. Yapılan çalışmada PMKH'lerde normal kontrole karşı OA grubunda miRNA-146a, miRNA-155, miRNA-181a ve miRNA-223'ün fazla ekspresyonun OA patogeneziyle ilgili olabileceği bildirilmiştir (Okuhara et al., 2012).

miRNA'lar periferal kanda RNAaz aktivitesinden korunduğu için fizyolojik ve patolojik süreçte iyi bir biyobelirteç olarak kullanılacakları bildirilmiştir (Mitchell et al., 2008; G.-K. Wang et al., 2010; K. Wang et al., 2009). OA kıkırdağında miRNA ekspresyonlarının düzensizliği yapılan araştırmalarda gösterilmiş olmasına rağmen OA hastalarında değişen sirküle miRNA seviyeleri hakkında kısıtlı bilgi bulunmaktadır. miRNA'ların inflamasyon ve OA ilerlemesini azaltabileceği ya da kıkırdakta anabolik işleve sahip olabileceği tespit edilmiştir. Bu miRNA'ların enjektabl formunun eklemlerdeki OA'nın lokal tedavisi için geliştirilebileceği düşünülmektedir. Böylece miRNA'ya dayalı tedavinin potansiyel zararlı yan etkiler olmadan tedavi sürecine başka bir yaklaşım sunabileceği öngörülmektedir (Miyaki & Asahara, 2012; Nakasa et al., 2011)

İleride yapılacak çalışmalarla OA gelişimini düzenleyen farklı miRNA'ların aranması mümkün olacak, OA patogenezi ve hastalığın ilerlemesinde önemli olduğu şu an için bilinen miRNA'ların hedeflerinin daha iyi tanımlanması yapılabilecektir.

## 3 - GEREÇ VE YÖNTEMLER

### 3.1 – Gereç

#### 3.1.1 - Çalışma grubu

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunun 08.02.2011 tarih ve 36 sayılı kurul onayı ile Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim Araştırma ve Uygulama Hastanesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı Polikliniğine diz ağrısı şikayeti ile başvuran, Amerikan Romatoloji Derneği (ARD) kriterlerine (**Bakınız, Tablo 2.1**) (Altman et al., 1986) göre primer diz osteoartrit (OA) tanısı alan 100 hasta ve 50 sağlıklı birey çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya katılan her birey çalışmanın içeriği, amacı ve uygulanışı konusunda bilgilendirildi ve yazılı onayları alındı. Çalışmaya alınma ve çalışmadan dışlanma kriterleri **Tablo 3.1**'de özetlendi.

**Tablo 3.1** Çalışmaya alınma ve çalışmadan dışlanma kriterleri

<b>Çalışmaya alınma kriterleri</b>
40-80 yaş arası olma
ARD kriterlerine göre primer (idiopatik) diz OA tanısı konması
Diz OA dışında diz ağrısı yapabilecek farklı bir patolojinin olmaması
Dizi etkileyebilecek bel veya kalçaya ait bir patolojinin olmaması
<b>Çalışmadan dışlanma kriterleri</b>
Sekonder osteoartrit tanısı konması
Geçirilmiş diz cerrahisi
Son 6 ay içinde diz travması ve intraartiküler enjeksiyon uygulanması
Son 6 ay içinde dize yönelik fizik tedavi uygulanmış olması
Semptomatik kalça ve ayak-ayak bileği hastalığı olması
Genel sağlık durumunun kötü olması (kalp yetmezliği, KOAH vb)
Kooperasyon bozukluğu olması

Çalışmaya dahil edilen bireylerin yaşı, cinsiyeti, kullandığı ilaçlar belirlendi. Ayrıntılı sistemik ve fizik muayeneleri yapıldı. Bireylerin kilosu ve boyu ölçülerek vücut kitle indeksleri (VKİ) hesaplandı ve laboratuvar tetkikleri (tam kan sayımı, sedimantasyon, c-reaktif protein, kreatinin, alanin aminotransferaz, alkalin fosfataz, kalsiyum, fosfor) değerlendirildi.

Çalışmaya alınan hastaların diz OA evrelemesi Kellgren Lawrence osteoartrit indeksine (Kellgren & Lawrence, 1957) göre yapıldı (**Bakınız, Tablo 2.4**). Ayakta anteroposterior olarak çekilen mukayeseli konvansiyonel diz grafikleri değerlendirildi.

### **3.1.2- Kullanılan cihazlar**

- Buz makinesi (Hoshizaki FM120DE)
- Buzdolabı (Arçelik (+4°C,-20°C) 5080NF)
- Çeker ocak
- Dağıtıcı pipet (Xstream Eppendorf)
- Derin dondurucu (Bosch (-20°C) GSD30N12NE)
- Derin dondurucu (New Brunswick Scientific (-80°C) U410)
- Hassas terazi (Precisa 125A)
- Manyetik karıştırıcı (Hotplate Stir Isolab)
- Mikroplaka okuyucu (ELISA cihazı) (Labsystems Multiskan EX)
- Otomatik pipet seti (5000,1000,200,100,10 µl) (Biohit Proline Plus)
- PCR cihazı (Sacem SCM 96G)
- pH metre (WTW Inolab ph720)
- Real-time PCR (qRT-PCR)( Mx3000p Stratagene)
- Sıcak su banyosu (Nüve BM402)
- Soğutmalı mikrosantrifüj (Sigma 1-14K)
- Soğutmalı santrifüj (Gyrozen 1580MGR)
- Spektrofotometre (Nanodrop™ Thermo Fisher Scientific)
- Vorteks (IKA MS 3)

### **3.1.3- Kullanılan malzemeler ve kimyasallar**

- Absolü alkol (100% ACS ayar) (O3665EG Surgipath)
- Asit fenol:kloroform (AM9720 Ambion)
- cDNA sentez kiti (4368814, Applied Biosystems)
- Distile su (dH2O)
- EDTA'lı tüp (10 ml)
- Eldiven (Non-steril)
- Eldiven (Steril)
- Enjektör (10 ml)
- Ficoll (L6113 Biochrom)
- JNK primer-prob (Hs00177083\_m1, Applied Biosystems)

- Kontrol miRNA-U44 (RNU44 001094, Applied Biosystems)
- Kontrol RNA 18S (Hs99999901\_s1 Applied Biosystems)
- Mikropipet ucu (1  $\mu$ l)
- Mikropipet ucu (10  $\mu$ l)
- Mikropipet ucu (100  $\mu$ l)
- Mikropipet ucu (1000  $\mu$ l)
- Mikropipet ucu (5000  $\mu$ l)
- mikroRNA cDNA sentez kiti (4366596, Applied Biosystems)
- miRNA-146a primer-prob (hsa-miR-146s 000468 Applied Biosystems)
- miRNA-155 primer-prob (hsa-miR-155 002623 Applied Biosystems)
- NF- $\kappa$ B ELISA kiti (40096, Active Motif)
- Nüklear ekstrakt kiti (40010, Active Motif)
- Nükleaz free su (L0015 Biochrom)
- Parafilm
- Pastör pipeti
- Polipropilen kapaklı tüp (0,2 ml)
- Polipropilen kapaklı tüp (1,5 ml)
- Polipropilen optik kapaklı tüp (0,2 ml)
- Real-time PCR master miks (4369016 Applied Biosystems)
- RNA izolasyon kiti (AM1560 Applied Biosystems)
- Steril PBS (L1815 Biochrom)
- Vidalı kapaklı santrifüj tüpü (15 ml)
- Vidalı kapaklı santrifüj tüpü (50 ml)

## **3.2 – Yöntem**

### **3.2.1- Periferik mononükleer kan hücre (PMKH) eldesi**

Çalışma grubu bireylerinden EDTA'lı tüplere 8 ml venöz kan alındı. Alınan bu kan steril bir tüp içerisinde fosfat tamponlu tuz (phosphate buffer saline, PBS) (L1815 Biochrom, Berlin, Almanya) ile 1:1 oranında seyreltildi. 8 ml seyreltilen kan örneği içerisinde 8 ml ficoll (Biocoll Separation Solution L6113 Biochrom, Berlin, Almanya) bulunan steril bir tüpe pastör pipeti ile yavaş yavaş eklendi ve 2000 rpm'de 18°C'de 25 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası ara fazda toplanan mononükleer hücreler pipetle toplanarak, 2 ml PBS içeren yeni bir santrifüj tüpüne kondu ve 2500 rpm'de 18°C'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası santrifüj tüpünün dibinde 0,5 ml pellet kalacak şekilde dipte toplanan hücreler kaldırılmadan üst kısımdaki sıvı atıldı. Üzerine 2 ml PBS eklenen hücreler tekrar 2500 rpm'de 18°C'de 5 dk santrifüj edildi. Yine santrifüj sonrası hücreler santrifüj tüpünün dibinde 0,5 ml hacim içinde kalacak şekilde üst kısımdaki sıvı atıldı. Tüpe dışarıdan hafifçe vurularak hücre pelleti kaldırıldı. Homojen hale gelen karışım yeni bir vial aktarıldı ve üzerine 1 ml PBS eklendikten sonra hücreler -80°C de saklandı.

### **3.2.2- Gen ifadelerinin belirlenmesi**

#### **3.2.2.1- RNA izolasyonu**

Mononükleer hücrelerden RNA izolasyonu kit (mirVana™ miRNA Isolation Kit, AM1560, Applied Biosystems, California, USA) kullanılarak yapıldı. Buna göre; derin dondurucuda (-80°C) PBS içerisinde saklanan mononükleer hücreler 2500 rpm'de 4°C'de 5 dk santrifüj edildi, santrifüj sonrasında vialin dibinde toplanan hücreler 0,2 ml hacim içinde bırakılarak üst sıvı kısım atıldı. Hücre pelleti üzerine 600 µl lizis/bağlama solüsyonu (lysis/binding solution) eklendi ve pipetleme yapılarak karıştırıldı. Karışıma 60 µl miRNA homojenat ilavesi (miRNA homogenate additive) eklenerek, vial 10 dk buz üzerinde bekletildi. Bekleme süresinden sonra 600 µl asit-fenol:kloroform karışımı eklenerek vial 30-60 sn vortekslendi ve 10000 g'de 18°C 5 dk santrifüj edildi. Bu aşamada santrifüj sonrasında ara faz kompakt değilse santrifüj tekrar edildi. Daha sonra tüpün üst sıvı fazında olan hücre lizatı yeni bir vial aktarılarak üzerine 750 µl oda sıcaklığındaki %100'lük etanol eklenerek hafifçe pipetlendi. Hazırlanan filtreli vial hücre lizatı en fazla 700 µl olacak şekilde yüklenerek, lizatı içeren filtreli vial 15 sn 18°C 10000 g'de santrifüj edilerek lizatın filtreden geçmesi sağlandı. Santrifüj sonrası filtreden vial geçen sıvı atıldı, kalan lizat aynı işlemlerden geçirildi. Tüm lizat filtreden geçtikten sonra 700 µl miRNA yıkama solüsyonu 1 (wash solution 1) filtre içine eklendi ve 10 sn 18°C 10000 g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası vial geçen sıvı tekrar boşaltıldı, filtre aynı vial yerleştirildi. Filtreli vialin üzerine 500 µl yıkama solüsyonu 2/3 (wash solution 2/3) eklendi ve 10 sn 18°C 10000 g'de

santrifüj edildi. Santrifüj sonrası vialle geçen sıvı yine boşaltıldı ve filtre aynı vialle yerleştirilerek bu basamak bir kere daha tekrar edildi. Santrifüj sonrası vialle geçen sıvı boşaltıldıktan sonra filtre aynı vialle yerleştirilerek üzerine bir şey eklenmeden içerisindeki tüm sıvıdan kurtulmak için 1 dk 18°C 10000 g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası filtre yeni bir toplama vialine geçirildi ve filtrenin merkezine önceden 95 °C'ye ısıtılmış 100 µl ayırıştırma çözeltisi (elution solution) ilave edilerek 30 sn 18°C 10000 g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında elde edilen RNA'ların saflığı nanodrop spektrofotometre cihazında (Nanodrop™ Thermo Fisher Scientific, Vanta, Finland) belirlendi. Absorbans 260 ve 280 nm'de yapılan ölçüm oranı (A260/280) ~1,8-2 arasında olan RNA'lar saf olarak kabul edildi. RNA miktarları belirlenen örnekler daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -80 °C'de saklandı.

### 3.2.2.2- Komplementer DNA (cDNA) hazırlanması

Real time PCR ile gen ifadeleri belirlenirken tüm örneklerden eşit miktarda RNA (200 ng) kullanılarak komplementer DNA (cDNA) sentezleri gerçekleştirildi.

#### miRNA ifadesinin belirlenmesi için cDNA hazırlığı;

Mononükleer hücrelerden izole edilen RNA'lardan miRNA-146a ve miRNA-155 gen ifadelerini belirlemek için, TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kiti (Applied Biosystems, California, USA) kullanılarak cDNA sentez edildi. Nanodropta RNA miktarları belirlenen örnekler örnek başına 200 ng RNA içerecek şekilde hesaplanarak nükleaz free su (L0015 Biochrom, Berlin, Almanya) ile 10 µl hacime tamamlandı. Bu örnekler **Tablo 3.2**'de gösterilen uygun primerler ve **Tablo 3.3**'de gösterilen kit bileşenleri reaksiyon başına gerekli miktarlarda ilave edildi. Hazırlanan reaksiyon karışımı cDNA sentezi için PCR cihazında (Sacem Hayat Teknolojileri, SCM 96G, Türkiye) **Tablo 3.4**'de verilen koşullarda inkübe edildi. Elde edilen cDNA'lar Real Time PCR aşamasında kullanılmaya kadar -20 °C de saklandı.

**Tablo 3.2** Kullanılan primer-prob setleri

Gen	Kod
miRNA-146a	hsa-miR-146a 000468 (Applied Biosystems, California, USA)
miRNA-155	hsa-miR-155 002623 (Applied Biosystems, California, USA)
miRNA-U44	RNU44 001094 (Applied Biosystems, California, USA)
JNK	Hs00177083_m1 (Applied Biosystems, California, USA)
18S RNA	Hs99999901_s1 (Applied Biosystems, California, USA)

**Tablo 3.3** cDNA sentezi için reaksiyon başına gerekli kit bileşenleri

<b>Reaksiyon Bileşenleri</b>	<b>Miktar</b>
RNA + Nükleaz Free Su	10 µl
100 mM dNTP	0,15 µl
MultiScribe™ Revers Transkriptaz, 50 U/µl	1 µl
10X Revers Transkripsiyon Tamponu	1,50 µl
RNaz İnhibitör, 20 U/µl	0,19 µl
Primer (miRNA-146a, miRNA-155, miRNA-U44)	3 µl
<b>Toplam Hacim</b>	<b>15,84 µl</b>

**Tablo 3.4** cDNA sentezi için gerekli PCR koşulları

<b>İnkübasyon Süresi</b>	<b>Sıcaklık</b>
30 dk	16 °C
30 dk	42 °C
5 dk	85 °C
∞	4 °C

*Jun-N-terminal Kinaz (JNK) ifadesinin belirlenmesi için cDNA hazırlığı:*

JNK gen ifadesini belirlemek için ise cDNA sentezi High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti (Applied Biosystems, California, USA) kullanılarak gerçekleştirildi. Nanodropta RNA miktarları belirlenen örnekler örnek başına 200 ng RNA içerecek şekilde hesaplanarak nükleaz free su ile 10 µl hacime tamamlandı. Bu örnekler **Tablo 3.5**'de gösterilen kit bileşenleri reaksiyon başına gerekli miktarlarda ilave edildi. Hazırlanan reaksiyon karışımı cDNA sentezi için PCR cihazında **Tablo 3.6**'da verilen koşullarda inkübe edildi. Elde edilen cDNA'lar Real Time PCR aşamasında kullanılmaya kadar -20 °C de saklandı.

**Tablo 3.5** cDNA sentezi için reaksiyon başına gerekli kit bileşenleri

<b>Reaksiyon Bileşenleri</b>	<b>Miktar</b>
RNA + Nükleaz Free Su	10 µl
25X dNTP (100mM)	0,8 µl
10X RT Random Primer	2 µl
MultiScribe™ Revers Transkriptaz, 50 U/µl	1 µl
10X RT Tamponu	2 µl
RNaz İnhibitör, 20 U/µl	0,19 µl
Nükleaz Free Su	4,01 µl
<b>Toplam Hacim</b>	<b>20 µl</b>



**Tablo 3.6** cDNA sentezi için gerekli PCR koşulları

İnkübasyon Süresi	Sıcaklık
10 dk	25 °C
120 dk	37 °C
5 dk	85 °C
∞	4 °C

### 3.2.2.3- Real-Time PCR (qRT-PCR)

Mononükleer hücrelerde incelenecek hedef gen ifadeleri elde edilen cDNA'lar aracılığı ile Real Time PCR (Stratagene, Mx3000p, California, USA) cihazında belirlendi.

miRNA gen ifadelerini belirlemek için; **Tablo 3.7**'de verilen reaksiyon bileşenleri, her bir örnek için 3'er adet olmak üzere, optik kapaklı PCR tüplerinde hazırlandı. **Tablo 3.2**'de verilen miRNA-146a, miRNA-155 ve miRNA-U44 için uygun olan proplar kullanılarak, örnekler **Tablo 3.8**'de verilen PCR koşullarında Real Time PCR cihazında okundu.

**Tablo 3.7** Real-time PCR için reaksiyon başına gerekli kit bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
cDNA (RT reaksiyon ürünü)	1,33 µl
Prob (TagMan® Small RNA Assay (20X))	1 µl
PCR Master Mix (TagMan® Gen Ekspresyon Master Mix)	10 µl
Nükleaz Free Su	7,67 µl
<b>Toplam</b>	<b>20 µl</b>

**Tablo 3.8** Real-time PCR koşulları

	Enzim Aktivasyonu	PCR	
		Döngü (40 döngü)	
		Denatürasyon	Bağlanma/Uzama
<b>Sıcaklık</b>	95 °C	95 C	60 °C
<b>Zaman</b>	10 dk	15 sn	60 sn

JNK gen ifadesini belirlemek için ise **Tablo 3.9**'da verilen reaksiyon bileşenleri, her bir örnek için 2'şer adet olmak üzere, optik kapaklı PCR tüplerinde hazırlandı. **Tablo 3.2**'de verilen JNK ve 18S RNA için uygun olan primer-proplar kullanılarak, örnekler **Tablo 3.10**'da verilen PCR koşullarında Real Time PCR cihazında okundu.

**Tablo 3.9** Real-time PCR için reaksiyon başına gerekli kit bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
cDNA (RT reaksiyon ürünü)	4 µl
Primer-Prob (TagMan® Gene Expression Assay (20X))	1 µl
PCR Master Mix (TagMan® Gen Ekspresyon Master Miks)	10 µl
Nükleaz Free Su	5 µl
<b>Toplam</b>	<b>20 µl</b>

**Tablo 3.10** Real-time PCR koşulları

	Enzim Aktivasyonu		PCR	
			Döngü (40 döngü)	
			Denatürasyon	Bağlanma/Uzama
Sıcaklık	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
Zaman	2 dk	10 dk	15 sn	60 sn

Hedef gen ifadeleri miRNA-U44 ve 18S RNA housekeeping genler ile normalize edildi. Gen ifadeleri Real-Time PCR cihazından elde edilen Ct değerleri kullanılarak  $2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct_{gen} - Ct_{housekeeping\ gen})}$  formülüne göre hesaplandı (Schmittgen TD & Livak KJ., 2008). Real-time PCR da yapılan her okumada cDNA kalıbı içermeyen kontrol grubu da (no template control, NTC) okundu. Kullanılan primer-prob bilgileri **Tablo 3.2**'de verilmiştir.

### **3.2.3- Nüklear faktör kappa B (NF-κB) aktivitesinin belirlenmesi**

#### **3.2.3.1- Nüklear ekstrakt hazırlanması**

Çalışma grubundan elde edilen mononüklear hücrelerden, Nüklear Faktör Kappa B (NF-κB) aktivitesini belirlemek üzere, nüklear ekstrakt kiti (Active Motif, California, USA) kullanılarak hücrelerin çekirdek içeriği elde edildi. Kit protokolüne göre kit içeriğindeki tampon çözeltiler hazırlandı (**Tablo 3.11**). Derin dondurucuda (-80°C) PBS içerisinde saklanan mononüklear hücreler 2500 rpm'de 4 °C'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası vialin dibinde kalan hücre pelleti kaldırılmadan üst sıvı kısım atıldı. Hücre pelletine 1,5 ml buz gibi soğuk olan PBS/Fosfataz İnhibitör karışımı yavaşça pipetlenerek eklendi. Hücre süspansiyonu 2500 rpm'de 4 °C'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve pellet buz üzerinde muhafaza edildi. Pellet üzerine 1 ml 1X hipotonik tampon pipetleme yapılarak ilave edildi ve 15 dk buz üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 25 µl deterjan eklendi ve yüksek hızda 10 sn vortekslendi. Daha sonra süspansiyon 12000 g'de 4 °C'de 1 dk santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Nüklear kısmı içeren pelletin üzerine 50 µl lizis tampon pipetleme yapılarak eklendi ve yüksek hızda 10 sn vortekslendi. Vialler buz dolu kabın içersinde, 150 rpm hızdaki çalkalayıcı üzerinde 30

dk süreyle bekletildi. Daha sonra yüksek hızda 30 sn vortekslenildi ve 12000 g'de 4 °C'de 10 dk santrifüj edildi. Nükleer kısmı içeren süpernatant yeni bir vialle aktarılarak kullanılabildi kadar -80 °C'de saklandı.

**Tablo 3.11** Nükleer ekstrakt kit içeriğinin hazırlanışı

Reaktifler	Bileşenler	96 kuyucuk için
PBS/Fosfataz İnhibitörleri	10X PBS	1,6 ml
	Distile Su	13,6 ml
	Fosfataz İnhibitörleri	0,8 ml
	Toplam	16 ml
1X Hipotonik Tampon (1X Hypotonic Buffer)	10X Hipotonik Tampon	100 µl
	Distile Su	0,9 µl
	Toplam	1 ml
Tam lizis tamponu (Complete Lysis Buffer)	10 mM Dithiothreitol (DTT)	10 µl
	Lizis Tamponu AM1	89 µl
	Proteaz İnhibitör Koktely	1 µl
	Toplam	100 µl

### 3.2.3.2- Nükleer faktör kappa B aktivitesinin belirlenmesi

Hazırlanan nükleer ekstraktlarda TransAM™ NF-κB kiti (Active Motif, California, USA) kullanılarak, kit protokolüne göre nükleer faktör kappa B (NF-κB) aktivitesi belirlendi (**Tablo 3.12**).

**Tablo 3.12** Kit protokolünde belirtilen reaktiflerin hazırlanışı

Reaktifler	Bileşenler	96 kuyucuk için
Tam lizis tamponu (Complete lysis buffer)	Dithiothreitol (DTT)	10,8 µl
	Proteaz inhibitör koktely	21,6 µl
	Lizis tamponu AM2	2,128 ml
	Toplam	2,16 ml
Tam bağlama tamponu (Complete binding buffer)	DTT	6,5 µl
	Herring sperm DNA	32,4 µl
	Lizis tamponu AM2	3,2 ml
	Toplam	3,24 ml
1X Yıkama tamponu (1X Wash buffer)	Distile su	194,4 ml
	10X Yıkama tamponu AM2	21,6 ml
	Toplam	216 ml
1X Antikor bağlama tamponu (1X Antibody binding buffer)	Distile su	19,44 ml
	10X Antikor bağlama tamponu AM2	2,16 ml
	Toplam	21,6 ml
Geliştirme solüsyon (Developing solution)	Toplam	10,8 ml
Durdurma solüsyonu (Stop solution)	Toplam	10,8 ml

Kit içerisinde bulunan oligonükleotid kaplı 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 30 µl bağlama tamponu eklendi. Kör olarak kullanılacak kuyucuklara nükleer ekstraktın içerisinde bulunduğu lizis tampondan 20 µl ve diğer kuyucuklara da ölçümü yapılacak örneklerden 20 µl ilave edildi (**Tablo 3.13**).

**Tablo 3.13** Kuyucuklara örneklerin yüklenmesi

<b>Reaktifler</b>	<b>Kör</b>	<b>Pozitif Kontrol</b>	<b>Örnek</b>
Tam bağlama tamponu	30 µl	30 µl	30 µl
Tam lizis tamponu	20 µl	-	-
Tam lizis tamponu içinde örnekler	-	20 µl	20 µl
<b>Toplam</b>	50 µl	50 µl	50 µl

Daha sonra plakanın üzeri yapışkan bant ile kapatılarak 100 rpm hızda oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar 3 kere 200 µl yıkama tamponu ile yıkandı. Yıkanan plakanın tüm kuyucuklarına antikör bağlama tamponu ile (1:1000) seyreltilen NF-κB (p65) antiköründen 100 µl eklendi ve plakanın üzeri tekrar kapatılarak oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar 200 µl yıkama tamponu ile 3 kere yıkandı. Sonra her bir kuyucuğa antikör bağlama tamponu ile (1:1000) seyreltilen HRP (Horseradish peroksidaz) bağlı antikörden 100 µl eklendi ve yine plakanın üzeri kapatılarak oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar 4 kere 200 µl yıkama tamponu ile yıkandı. Bütün kuyucuklara 100 µl geliştirme solüsyonu eklendi ve plaka ışıktan korunarak 30 sn-5 dk arasında oda sıcaklığında inkübe edildi. Kuyucukların renginin maviden koyu maviye dönüşmesi gözlemlendi ve sonrasında 100 µl durdurma solüsyonu ilave edilerek mavi rengin sarıya dönüşmesi sağlandı. Plaka 5 dk içinde 450 nm de ELISA (Labsystems Multiskan EX, Vanta, Finland) cihazında ölçüldü.

### **3.2.4- İstatistiksel Analiz**

Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Normal dağılım göstermeyen değişkenlerin gruplar arasındaki karşılaştırmaları grup sayısına bağlı olarak Mann-Whitney U testi ya da Kruskal-Wallis testi ile yapıldı. Kategorik değişkenlerin gruplara göre karşılaştırılmasında ki-kare analizlerinden yararlanıldı. Veriler ortalama ve standart sapma ile ortanca değer (25'inci ve 75'inci yüzdelik değerler) olarak ifade edildi. Değişkenler arasındaki ilişkiler Spearman korelasyon analizi ile değerlendirildi. miRNA-146a, miRNA-155 ve JNK gen ekspresyonları ile NF-κB protein aktivitesinin tanısal değerinin doğrulunun değerlendirilmesi ROC analizi ile gerçekleştirildi. Analizler IBM SPSS Statistics 21 ile MedCalc 13.3.3.0 paket programlarında yapıldı. p<0.05 değeri istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

## 4- BULGULAR

Çalışmamızda inflamatuvar süreçle ilgili olduğu düşünülen miRNA-146a, miRNA-155 ve Jun-N-terminal kinaz (JNK) ekspresyon seviyeleri ile transkripsiyon faktörü nüklear faktör kappa B (NF-κB) aktivitesinin osteoartrit sürecindeki etkisi araştırıldı. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim Araştırma ve Uygulama Hastanesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı Polikliniğine diz ağrısı şikayeti ile başvuran, dışlanma ve çalışmaya alınma kriterlerine uyan (**Bakınız, Tablo 3.1**), primer diz osteoartrit (OA) tanısı alan 40-80 yaş arası 100 hasta ve kontrol grubu olarak da 50 sağlıklı birey çalışmaya dahil edildi.

Çalışmaya alınan bireylerin gruplara ve evrelere göre demografik özelliklerinin dağılımları **Tablo 4.1** ve **4.2**'de özetlendi.

Çalışmada, kontrol grubuna göre hasta grubunda, yaş hem kadın hem erkeklerde, vücut kitle indeksi (VKİ) ise sadece kadınlarda istatistiksel olarak önemli bulundu ( $p=0,001$ ) (**Tablo 4.1**).

**Tablo 4.1** Çalışmaya alınan bireylerin demografik özellikleri

		<b>Kontrol Grubu (n=50)</b>	<b>Hasta Grubu (n=100)</b>	<b>p değeri</b>
<b>Cinsiyet (%)</b>	<b>Kadın</b>	42 (% 84)	84 (% 84)	1,000
	<b>Erkek</b>	8 (% 16)	16 (% 16)	1,000
<b>Yaş (yıl) (Ort±SS)</b>	<b>Kadın</b>	35±12	60±10	<b>0,001</b>
	<b>Erkek</b>	38±12	63±13	<b>0,001</b>
<b>VKİ (kg/m<sup>2</sup>) (Ort±SS)</b>	<b>Kadın</b>	24,32±4,74	30,05±4,89	<b>0,001</b>
	<b>Erkek</b>	25,54±2,6	28,29±3,76	0,120

Çalışma grubu evrelere göre incelendiğinde, evreler arasında yaş ve vücut kitle indeksi (VKİ) açısından istatistiksel olarak fark belirlendi ( $p=0,001$ ) (**Tablo 4.2**).

**Tablo 4.2** Çalışmaya alınan bireylerin evrelere göre demografik özellikleri

Gruplar	Evreler		Yaş (yıl)	VKİ (kg/m <sup>2</sup> )
			Ort±SS	Ort±SS
<b>Kontrol Grubu</b>	<b>Evre 0</b> <b>n=50</b>	Kadın (n=42)	35±12	24,32±4,74
		Erkek (n=8)	38±12	25,54±2,60
<b>Hasta Grubu</b>	<b>Evre 1</b> <b>n=7</b>	Kadın (n=5)	47±5	27,00±4,98
		Erkek (n=2)	56±20	23,50±0,54
	<b>Evre 2</b> <b>n=32</b>	Kadın (n=26)	55±10	29,14±4,23
		Erkek (n=6)	58±14	28,47±1,47
	<b>Evre 3</b> <b>n=34</b>	Kadın (n=31)	60±8	30,75±4,93
		Erkek (n=3)	67±14	27,86±2,67
	<b>Evre 4</b> <b>n=27</b>	Kadın (n=22)	67±8	30,82±5,37
		Erkek (n=5)	70±9	30,24±5,51
<b>p değeri</b>			<b>0,001</b>	<b>0,001</b>

Çalışma grubuna ait rutin biyokimyasal analiz sonuçları grup, cinsiyet ve evrelere göre **Tablo 4.3.1**, **Tablo 4.3.2**, **Tablo 4.4.1** ve **Tablo 4.4.2**'de verildi. Bu değerler incelendiğinde bazı parametrelerde istatistiksel olarak farklar belirlendi. Ancak analiz sonuçlarının değerleri hastanemiz laboratuvarının referans aralığı içinde normal olarak kabul edilen değerler arasında bulunduğundan bu farklar dikkate alınmadı.

**Tablo 4.3.1** Çalışma grubunda incelenen biyokimyasal parametreler

Biyokimyasal Parametreler		Kontrol Grubu (n=50)		Hasta Grubu (n=100)		p değeri
<b>Hemoglobin</b> (g/dl)	Ort±SS	Kadın n=42	12,78±1,33	Kadın n=84	12,81±1,32	0,897
	Ortanca		12,95 (12,05-13,7)		12,95 (12,1-13,68)	
	Ort±SS	Erkek n=8	16±1,1	Erkek n=16	13,3±2,5	<b>0,004</b>
	Ortanca		15,7 (15,1-17,3)		14 (12,2-15,1)	
<b>Lökosit</b> (10 <sup>3</sup> /μl)	Ort±SS	Kadın n=42	7,05±1,82	Kadın n=84	7,06±1,54	0,553
	Ortanca		6,7 (5,5-8,1)		7,1 (5,7-8,4)	
	Ort±SS	Erkek n=8	7,5±1	Erkek n=16	6,9±1,5	0,214
	Ortanca		7,2 (6,7-8,5)		6,4 (5,8-8,7)	
<b>Platelet</b> (10 <sup>3</sup> /μl)	Ort±SS	Kadın n=42	268±50	Kadın n=42	251±57	0,110
	Ortanca		256 (236-308)		251 (214-283)	
	Ort±SS	Erkek n=8	262±44	Erkek n=8	250±63	0,928
	Ortanca		258 (233-279)		255 (204-302)	
<b>Eritrosit Sedimentasyon Hızı</b> (mm/hr)	Ort±SS	Kadın n=42	13±7	Kadın n=84	22±13	<b>0,001</b>
	Ortanca		12 (8-20)		20 (11-31)	
	Ort±SS	Erkek n=8	4±2	Erkek n=16	18±16	<b>0,001</b>
	Ortanca		4 (2-5)		10 (8-20)	

Referans Aralıkları: Hemoglobin (g/dl) (13,6-17,2); Lökosit (10<sup>3</sup>/μl) (4,3-10,3); Platelet (10<sup>3</sup>/μl) (156-373); Eritrosit Sedimentasyon Hızı (mm/hr) (kadın; 0-20,erkek;0-10).

**Tablo 4.3.2** Çalışma grubunda incelenen biyokimyasal parametreler

Biyokimyasal Parametreler		Kontrol Grubu (n=50)		Hasta Grubu (n=100)		p değeri
<b>c-reaktif protein</b> <b>(mg/dl)</b>	Ort±SS	Kadın	0,649±1,032	Kadın	0,745±1,243	0,030
	Ortanca	n=42	0,319 (0,319-0,604)	n=84	0,341 (0,341-0,744)	
	Ort±SS	Erkek	0,369±0,102	Erkek	0,507±0,388	0,093
	Ortanca	n=8	0,319 (0,319-0,407)	n=16	0,341 (0,341-0,639)	
<b>Kreatinin</b> <b>(mg/dl)</b>	Ort±SS	Kadın	0,71±0,11	Kadın	0,8±0,23	0,056
	Ortanca	n=42	0,7 (0,63-0,77)	n=42	0,74 (0,66-0,93)	
	Ort±SS	Erkek	1±0,17	Erkek	1,03±0,44	0,320
	Ortanca	n=8	0,96 (0,89-1,19)	n=8	0,9 (0,85-0,98)	
<b>Kalsiyum</b> <b>(mg/dl)</b>	Ort±SS	Kadın	9,6±0,4	Kadın	9,5±0,4	0,207
	Ortanca	n=42	9,6 (9,3-9,9)	n=84	9,5 (9,2-9,8)	
	Ort±SS	Erkek	10,1±0,3	Erkek	9,3±0,2	<b>0,001</b>
	Ortanca	n=8	10,1 (9,9-10,4)	n=16	9,2 (9,1-9,5)	
<b>Alanin aminotransferaz</b> <b>(U/L)</b>	Ort±SS	Kadın	16±8	Kadın	18±9	0,081
	Ortanca	n=42	14 (11-19)	n=84	17 (12-22)	
	Ort±SS	Erkek	26±6	Erkek	19±11	<b>0,016</b>
	Ortanca	n=8	25 (22-31)	n=16	15 (12-24)	
<b>Alkalen fosfataz</b> <b>(U/L)</b>	Ort±SS	Kadın	160±35	Kadın	218±61	0,001
	Ortanca	n=42	159 (136-177)	n=84	213 (184-240)	
	Ort±SS	Erkek	191±40	Erkek	187±46	0,834
	Ortanca	n=8	182 (157-220)	n=16	184 (146-224)	
<b>Fosfor</b> <b>(mg/dl)</b>	Ort±SS	Kadın	3,67±0,49	Kadın	3,56±0,49	0,112
	Ortanca	n=42	3,69 (3,41-4,02)	n=84	3,5 (3,24-3,83)	
	Ort±SS	Erkek	3,43±0,49	Erkek	3,36±0,48	0,697
	Ortanca	n=8	3,52 (3,06-3,82)	n=16	3,46 (3,25-3,59)	

Referans Aralıkları: c-reaktif protein (mg/dl) (0-0,8); Kreatinin (mg/dl) (0,5-1,2); Kalsiyum (mg/dl) (8,6-10,2); Alanin aminotransferaz (U/L) (0-41 kadın<33); Alkalen fosfataz (U/L) (0-270 kadın<240); Fosfor (mg/dl) (2,7-4,5).



**Tablo 4.4.1** Çalışma grubunda evrelere göre incelenen biyokimyasal parametreler

		Kontrol Grubu	Hasta Grubu				p değeri
		Evre 0 n=50	Evre 1 n=7	Evre 2 n=32	Evre 3 n=34	Evre 4 n=27	
<b>Hemoglobin (g/dl)</b>	Ort±SS	13,3±1,8	12,9±0,7	13,2±1,7	13,1±1,6	12,3±1,5	0,079
	Ortanca	13,4 (12,2-14)	12,8 (12,5-13,1)	13,3 (12,2-14,3)	13,5 (12,6-14)	12,4 (11,6-13,2)	
<b>Lökosit (10<sup>3</sup>/μl)</b>	Ort±SS	7,1±1,7	6,8±2	6,7±1,3	7,2±1,5	7,3±1,7	0,414
	Ortanca	6,7 (5,8-8,1)	5,9 (4,8-9)	6,4 (5,6-8,1)	7,3 (6,1-8,3)	7,3 (5,8-9)	
<b>Platelet (10<sup>3</sup>/μl)</b>	Ort±SS	267±49	246±80	243±51	256±45	255±73	0,315
	Ortanca	257 (236-303)	275 (169-295)	239 (206-278)	261 (240-282)	251 (206-308)	
<b>Eritrosit Sedimentasyon Hızı (mm/hr)</b>	Ort±SS	12±8	16±6	17±12	22±13	26±16	<b>0,001</b>
	Ortanca	9 (5-19)	13 (10-21)	14 (8-22)	21 (11-33)	25 (9-38)	

Referans Aralıkları: Hemoglobin (g/dl) (13,6-17,2); Lökosit (10<sup>3</sup>/μl) (4,3-10,3); Platelet (10<sup>3</sup>/μl) (156-373); Eritrosit Sedimentasyon Hızı (mm/hr) (kadın; 0-20,erkek;0-10).

**Tablo 4.4.2** Çalışma grubunda evrelere göre incelenen biyokimyasal parametreler

		Kontrol Grubu	Hasta Grubu				p değeri
		Evre 0 n=50	Evre 1 n=7	Evre 2 n=32	Evre 3 n=34	Evre 4 n=27	
<b>c-reaktif protein (mg/dl)</b>	Ort±SS	0,604±0,951	0,504±0,39	0,783±1,451	0,795±1,354	0,559±0,355	<b>0,030</b>
	Ortanca	0,319 (0,319-0,581)	0,341 (0,308-0,439)	0,341 (0,341-0,702)	0,448 (0,341-0,756)	0,341 (0,34-0,707)	
<b>Kreatinin (mg/dl)</b>	Ort±SS	0,76±0,16	0,76±0,15	0,77±0,24	0,85±0,35	0,91±0,25	<b>0,019</b>
	Ortanca	0,73 (0,64-0,82)	0,74 (0,62-0,86)	0,71 (0,63-0,87)	0,8 (0,67-0,95)	0,85 (0,77-0,99)	
<b>Kalsiyum (mg/dl)</b>	Ort±SS	9,7±0,4	9,3±0,4	9,4±0,4	9,7±0,4	9,4±0,4	<b>0,001</b>
	Ortanca	9,7 (9,3-10)	9,2 (9-9,7)	9,3 (9,1-9,7)	9,7 (9,4-9,9)	9,5 (9,2-9,6)	
<b>Alanin aminotransferaz (U/L)</b>	Ort±SS	18±8	23±14	19±10	18±4	17±11	0,162
	Ortanca	16 (12-22)	18 (11-36)	17 (12-22)	18 (15-21)	12 (11-22)	
<b>Alkalen fosfataz (U/L)</b>	Ort±SS	165±37	187±50	200±51	220±45	226±83	<b>0,001</b>
	Ortanca	161 (139-185)	168 (151-212)	195 (161-221)	214 (202-237)	219 (184-245)	
<b>Fosfor (mg/dl)</b>	Ort±SS	3,63±0,49	3,6±0,45	3,38±0,49	3,56±0,42	3,63±0,56	0,231
	Ortanca	3,67 (3,35-4)	3,5 (3,09-4,12)	3,5 (3,02-3,74)	3,5 (3,35-3,86)	3,51 (3,26-4,21)	

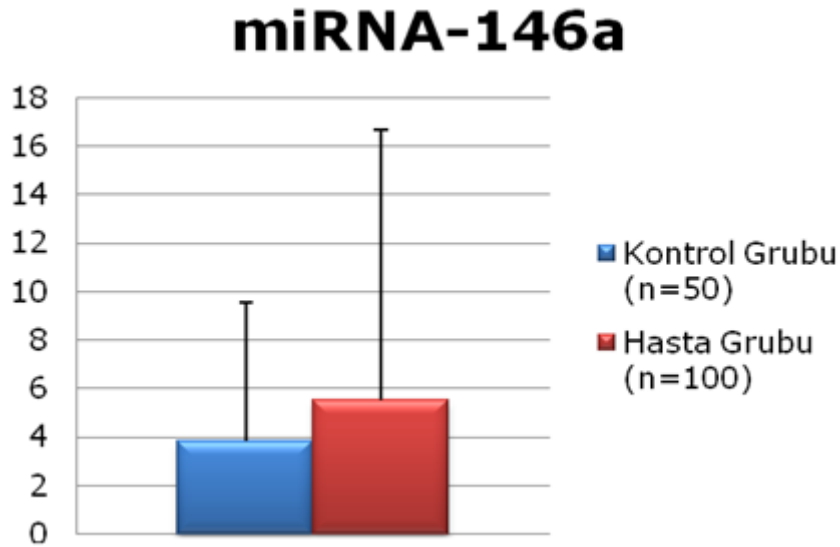
Referans Aralıkları: c-reaktif protein (mg/dl) (0-0,8); Kreatinin (mg/dl) (0,5-1,2); Kalsiyum (mg/dl) (8,6-10,2); Alanin aminotransferaz (U/L) (0-41 kadın<33); Alkalen fosfataz (U/L) (0-270 kadın<240); Fosfor (mg/dl) (2,7-4,5).

#### 4.1- miRNA-146a gen ekspresyonu

Osteoartrit hasta grubunda miRNA-146a gen ekspresyonunun kontrol grubuna göre arttığı, ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ( $p=0,303$ ) bulundu (**Tablo 4.5, Grafik 4.1**).

**Tablo 4.5** Kontrol ve hasta grubunda miRNA-146a gen ekspresyonu

Gruplar	miRNA-146a		p değeri
Kontrol Grubu (n=50)	Ort±SS	3,82±5,76	0,303
	Ortanca	2,11 (1,24-3,70)	
Hasta Grubu (n=100)	Ort±SS	5,52±11,16	
	Ortanca	2,46 (1,49-4,25)	

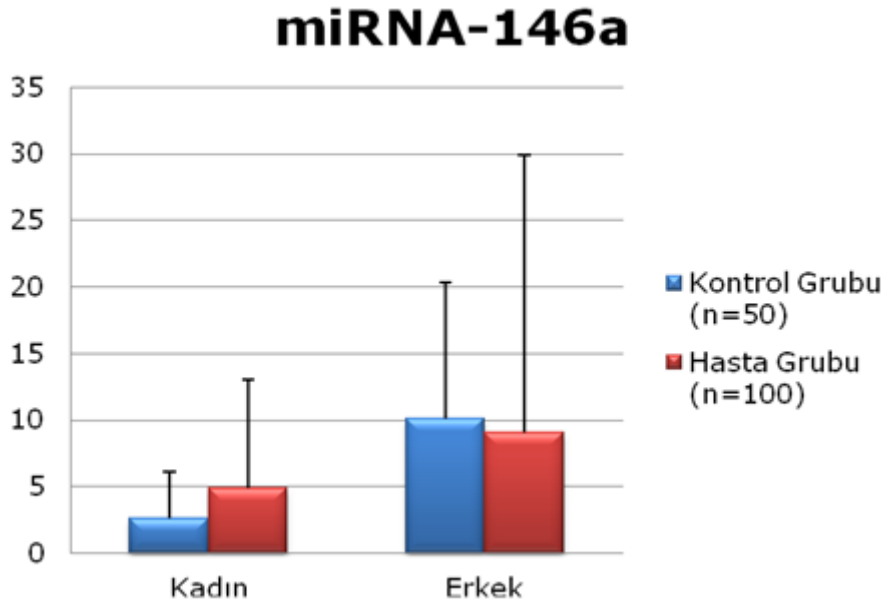


**Grafik 4.1** Kontrol ve hasta grubunda miRNA-146a gen ekspresyonu

Bununla birlikte kontrol ve hasta grubu cinsiyete göre incelendiğinde, miRNA-146a ekspresyonunun kadınlarda kontrole göre önemli düzeyde arttığı ( $p=0,036$ ), erkeklerde ise kontrole göre önemli düzeyde azaldığı ( $p=0,011$ ) gözlemlendi (**Tablo 4.6, Grafik 4.2**).

**Tablo 4.6** Cinsiyete göre kontrol ve hasta grubunda miRNA-146a gen ekspresyonu

Gruplar		miRNA-146a	
		Kadın	Erkek
Kontrol Grubu (n=50) Kadın (n=42) Erkek (n=8)	Ort±SS	2,62±3,52	10,12±10,26
	Ortanca	1,9 (1,2-2,88)	5,91 (3,84-13,58)
Hasta Grubu (n=100) Kadın (n=84) Erkek (n=16)	Ort±SS	4,85±8,19	9,07±20,85
	Ortanca	2,39 (1,48-4,25)	2,51 (1,7-4,51)
<b>p değeri</b>		<b>0,036</b>	<b>0,011</b>

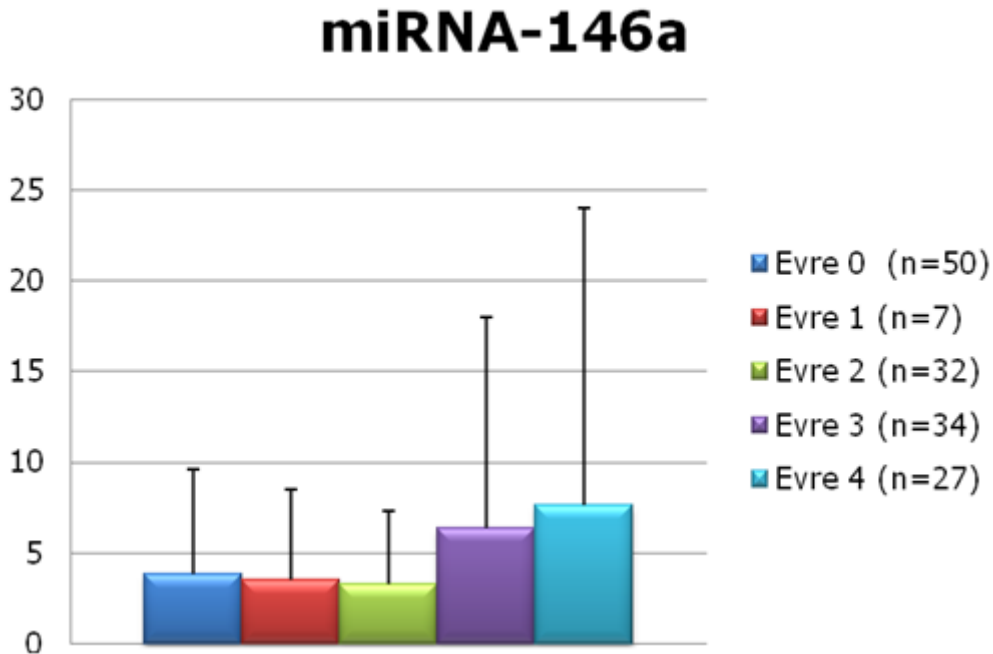


**Grafik 4.2** Kontrol ve hasta grubunda cinsiyete göre miRNA-146a gen ekspresyonu

miRNA-146a ekspresyonu osteoartrit evreleri açısından karşılaştırıldığında ise ileri evrelerde artış görülmekle birlikte bu artışın istatistiksel olarak önemli olmadığı ( $p=0,450$ ) bulundu (**Tablo 4.7**, **Grafik 4.3**).

**Tablo 4.7** Evrelere göre kontrol ve hasta grubunda miRNA-146a gen ekspresyonu

Gruplar	Evreler	miRNA-146a		p değeri
Kontrol Grubu	Evre 0 (n=50)	Ort±SS	3,82±5,76	0,450
		Ortanca	2,11 (1,24-3,7)	
Hasta Grubu	Evre 1 (n=7)	Ort±SS	3,52±2,29	
		Ortanca	2,73 (2,11-4,23)	
	Evre 2 (n=32)	Ort±SS	3,3±4	
		Ortanca	2,02 (1,33-3,19)	
	Evre 3 (n=34)	Ort±SS	6,34±11,67	
		Ortanca	2,71 (1,53-3,82)	
	Evre 4 (n=27)	Ort±SS	7,66±16,37	
		Ortanca	2,66 (1,51-6,5)	



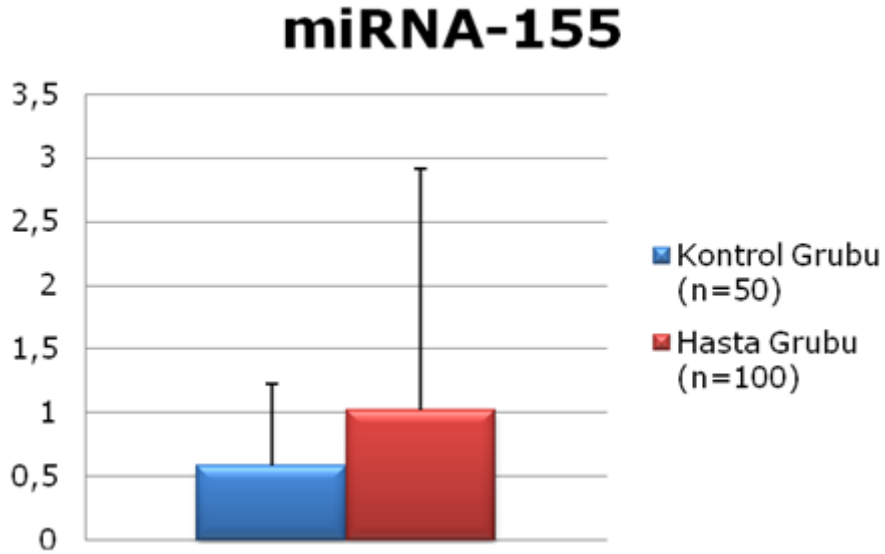
**Grafik 4.3** Evrelere göre kontrol ve hasta grubunda miRNA-146a gen ekspresyonu

## 4.2- miRNA-155 gen ekspresyonu

Osteoartrit hasta grubunda miRNA-155 gen ekspresyonunun kontrol grubuna göre önemli düzeyde arttığı ( $p=0,039$ ) bulundu (**Tablo 4.8**, **Grafik 4.4**).

**Tablo 4.8** Kontrol ve hasta grubunda miRNA-155 gen ekspresyonu

Gruplar	miRNA-155		p değeri
<b>Kontrol Grubu (n=50)</b>	Ort±SS	0,58±0,65	<b>0,039</b>
	Ortanca	0,34 (0,20-0,65)	
<b>Hasta Grubu (n=100)</b>	Ort±SS	1,02±1,9	
	Ortanca	0,44 (0,25-1,02)	

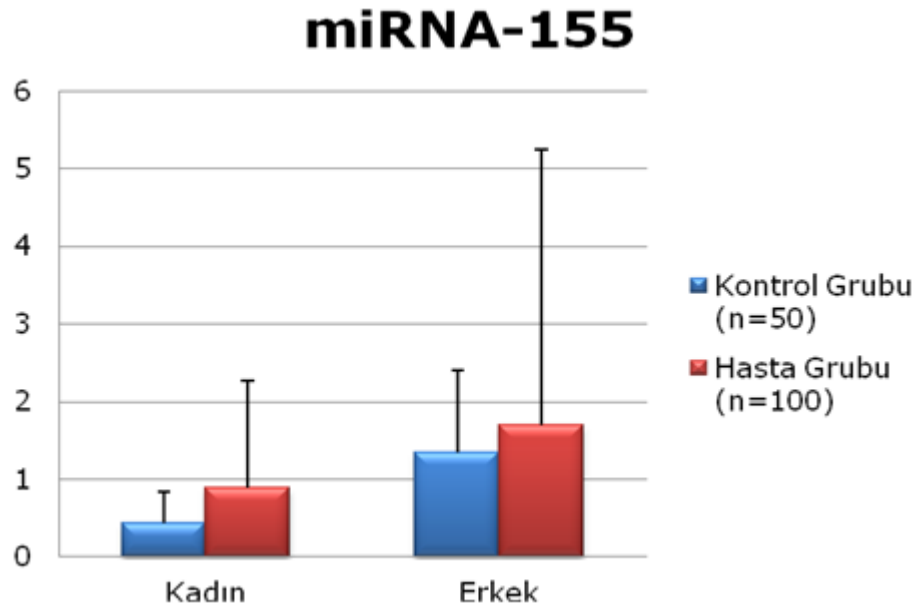


**Grafik 4.4** Kontrol ve hasta grubunda miRNA-155 gen ekspresyonu

miRNA-155 ekspresyonu kontrol ve hasta grubunda cinsiyete göre incelendiğinde, kadınlarda önemli düzeyde arttığı (p=0,005) gözlemlendi (**Tablo 4.9, Grafik 4.5**).

**Tablo 4.9** Cinsiyete göre kontrol ve hasta grubunda miRNA-155 gen ekspresyonu

Gruplar		miRNA-155	
		Kadın	Erkek
Kontrol Grubu (n=50) Kadın (n=42) Erkek (n=8)	Ort±SS	0,43±0,41	1,35±1,05
	Ortanca	0,32 (0,19-0,47)	0,9 (0,71-2,15)
Hasta Grubu (n=100) Kadın (n=84) Erkek (n=16)	Ort±SS	0,89±1,38	1,7±3,55
	Ortanca	0,44 (0,24-1)	0,48 (0,39-1,03)
p değeri		<b>0,005</b>	0,172

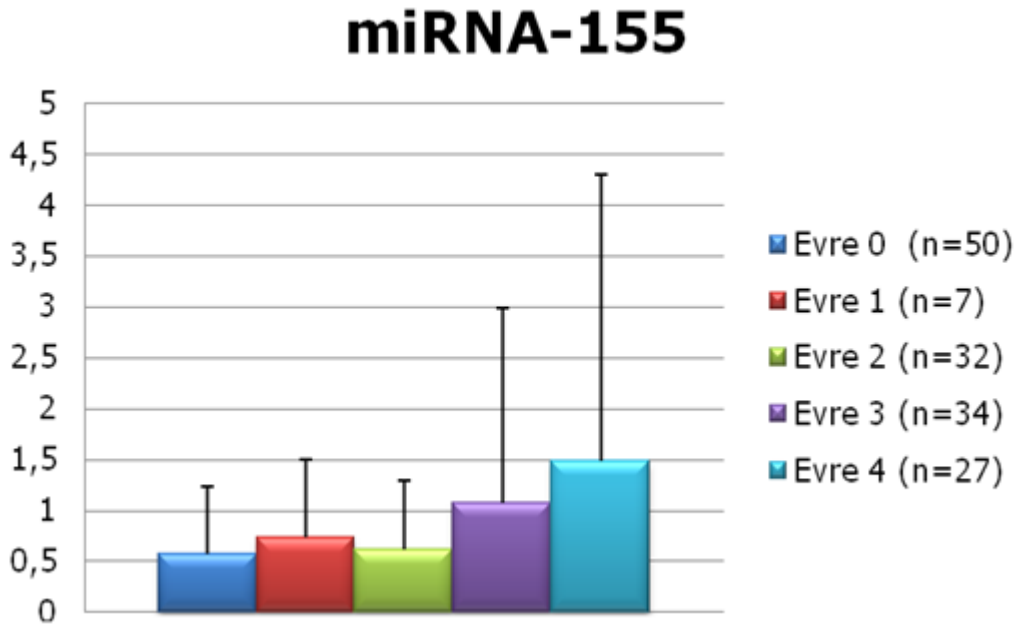


**Grafik 4.5** Cinsiyete göre kontrol ve hasta grubunda miRNA-155 gen ekspresyonu

miRNA-155 ekspresyonu osteoartrit evreleri açısından karşılaştırıldığında ileri evrelerde artış görülmekle birlikte evreler arasında gen ekspresyonunun fark göstermediği (p=0,166) bulundu (**Tablo 4.10**, **Grafik 4.6**).

**Tablo 4.10** Evrelere göre kontrol ve hasta grubunda miRNA-155 gen ekspresyonu

Gruplar	Evreler	miRNA-155		p değeri
Kontrol Grubu	Evre 0 (n=50)	Ort±SS	0,58±0,65	0,166
		Ortanca	0,34 (0,2-0,65)	
Hasta Grubu	Evre 1 (n=7)	Ort±SS	0,73±0,77	
		Ortanca	0,53 (0,37-0,55)	
	Evre 2 (n=32)	Ort±SS	0,62±0,67	
		Ortanca	0,38 (0,24-0,8)	
	Evre 3 (n=34)	Ort±SS	1,08±1,91	
		Ortanca	0,45 (0,3-0,8)	
	Evre 4 (n=27)	Ort±SS	1,48±2,82	
		Ortanca	0,48 (0,25-1,45)	



**Grafik 4.6** Evrelere göre kontrol ve hasta grubunda miRNA-155 gen ekspresyonu

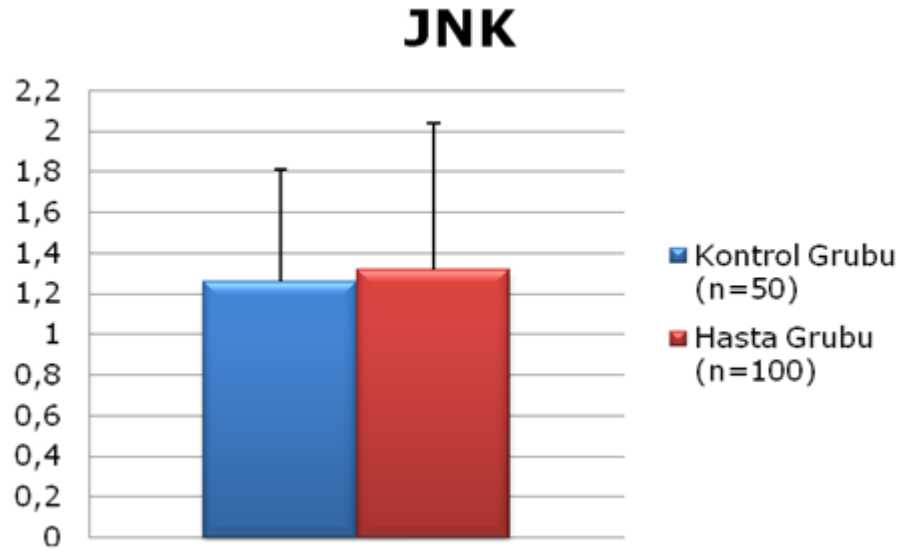


### 4.3- Jun-N-terminal Kinaz (JNK) gen ekspresyonu

Osteoartrit hasta grubunda JNK gen ekspresyonunun kontrol grubuna göre arttığı, ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ( $p=0,809$ ) bulundu (**Tablo 4.11**, **Grafik 4.7**).

**Tablo 4.11** Kontrol ve hasta grubunda JNK gen ekspresyonu

Gruplar	JNK		p değeri
<b>Kontrol Grubu (n=50)</b>	Ort±SS	1,26±0,55	0,809
	Ortanca	1,24 (0,83-1,48)	
<b>Hasta Grubu (n=100)</b>	Ort±SS	1,32±0,72	
	Ortanca	1,09 (0,82-1,57)	

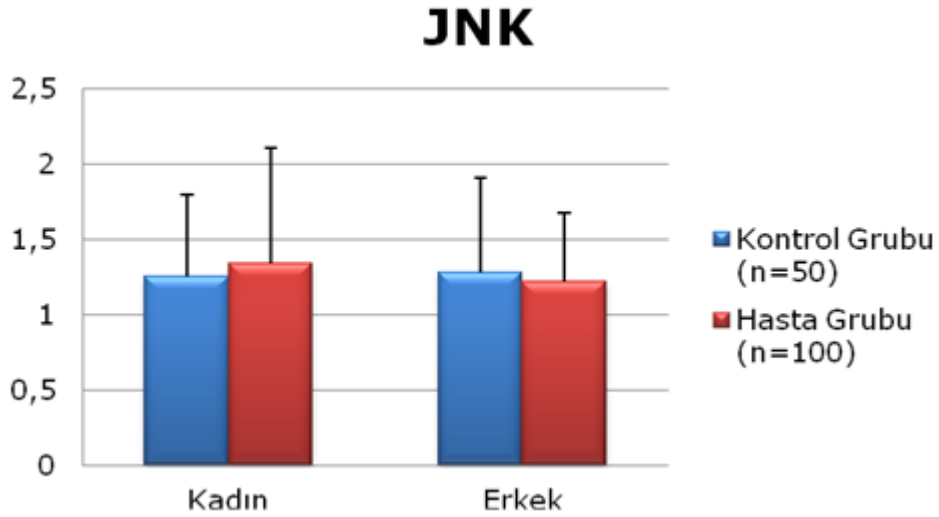


**Grafik 4.7** Kontrol ve hasta grubunda JNK gen ekspresyonu

JNK ekspresyonu kontrol ve hasta grubunda cinsiyete göre incelendiğinde, kadınlarda kontrole göre arttığı, erkeklerde ise kontrole göre azaldığı her iki durumunda istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ( $p=0,686$ ;  $p=0,834$ ) gözlemlendi (**Tablo 4.12**, **Grafik 4.8**).

**Tablo 4.12** Cinsiyete göre kontrol ve hasta grubunda JNK gen ekspresyonu

Gruplar		JNK	
		Kadın	Erkek
<b>Kontrol Grubu (n=50)</b> Kadın (n=42) Erkek (n=8)	Ort±SS	1,25±0,55	1,28±0,63
	Ortanca	1,24 (0,87-1,41)	1,08 (0,72-1,85)
<b>Hasta Grubu (n=100)</b> Kadın (n=84) Erkek (n=16)	Ort±SS	1,34±0,77	1,22±0,46
	Ortanca	1,05 (0,82-1,59)	1,17 (0,81-1,52)
<b>p değeri</b>		0,686	0,834

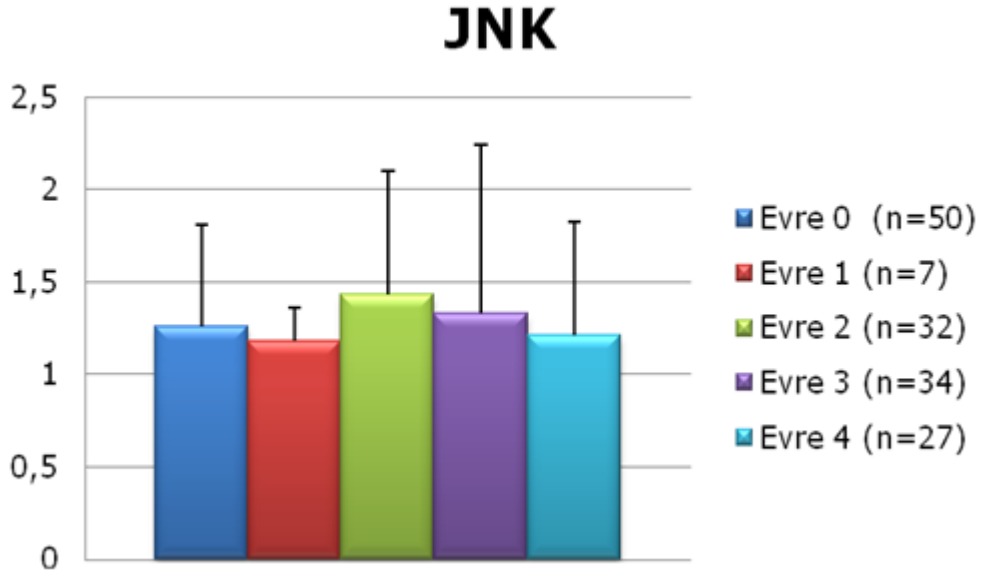


**Grafik 4.8** Cinsiyete göre kontrol ve hasta grubunda JNK gen ekspresyonu

JNK ekspresyonu osteoartrit evreleri açısından karşılaştırıldığında evreler arasında gen ekspresyonunun fark göstermediği (p=0,531) bulundu (**Tablo 4.13, Grafik 4.9**).

**Tablo 4.13** Evrelere göre kontrol ve hasta grubunda JNK gen ekspresyonu

Gruplar	Evreler	JNK		p değeri
Kontrol Grubu	Evre 0 (n=50)	Ort±SS	1,26±0,55	0,531
		Ortanca	1,24 (0,83-1,48)	
Hasta Grubu	Evre 1 (n=7)	Ort±SS	1,18±0,18	
		Ortanca	1,18 (0,98-1,4)	
	Evre 2 (n=32)	Ort±SS	1,43±0,67	
		Ortanca	1,28 (0,84-1,77)	
	Evre 3 (n=34)	Ort±SS	1,33±0,91	
		Ortanca	1,03 (0,77-1,34)	
Evre 4 (n=27)	Ort±SS	1,21±0,62		
	Ortanca	0,95 (0,76-1,56)		



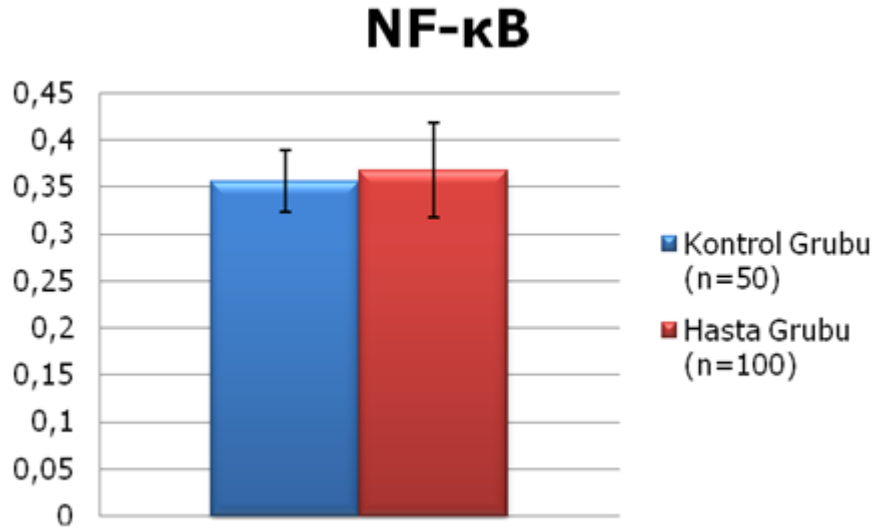
**Grafik 4.9** Evrelere göre kontrol ve hasta grubunda JNK gen ekspresyonu

#### 4.4- Nükleer faktör kappa B (NF-κB) aktivitesi

Osteoartrit hasta ve kontrol grubunda NF-κB aktivitesi incelendiğinde, kontrol grubuna göre bir artış olduğu ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ( $p=0,405$ ) bulundu (**Tablo 4.14**, **Grafik 4.10**).

**Tablo 4.14** Kontrol ve hasta grubunda NF-κB düzeyi

Gruplar	NF-κB		p değeri
Kontrol Grubu (n=50)	Ort±SS	0,356±0,033	0,405
	Ortanca	0,356 (0,329-0,374)	
Hasta Grubu (n=100)	Ort±SS	0,368±0,05	
	Ortanca	0,355 (0,333-0,393)	

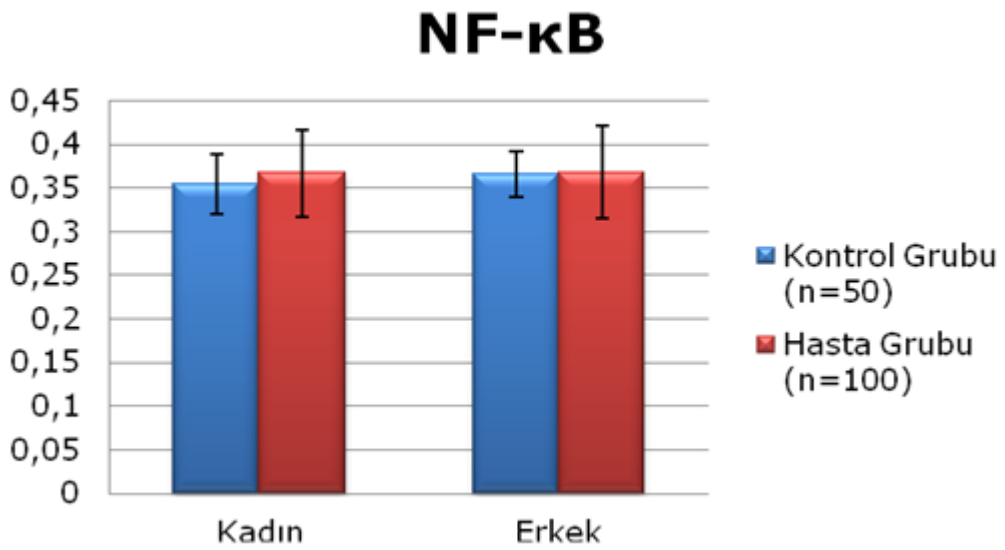


**Grafik 4.10** Kontrol ve hasta grubunda NF-κB aktivitesi

NF-κB aktivitesinin cinsiyete göre kontrol ve hasta gruplarında da artış gösterdiği, bu artışın da istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ( $p=0,260$ ;  $p=0,610$ ) gözlemlendi (**Tablo 4.15**, **Grafik 4.11**).

**Tablo 4.15** Cinsiyete göre kontrol ve hasta grubunda NF-κB aktivitesi

Gruplar		NF-κB	
		Kadın	Erkek
Kontrol Grubu (n=50) Kadın (n=42) Erkek (n=8)	Ort±SS	0,354±0,034	0,366±0,026
	Ortanca	0,353 (0,329-0,374)	0,365 (0,349-0,392)
Hasta Grubu (n=100) Kadın (n=84) Erkek (n=16)	Ort±SS	0,367±0,05	0,368±0,053
	Ortanca	0,355 (0,333-0,393)	0,352 (0,336-0,399)
p değeri		0,260	0,610

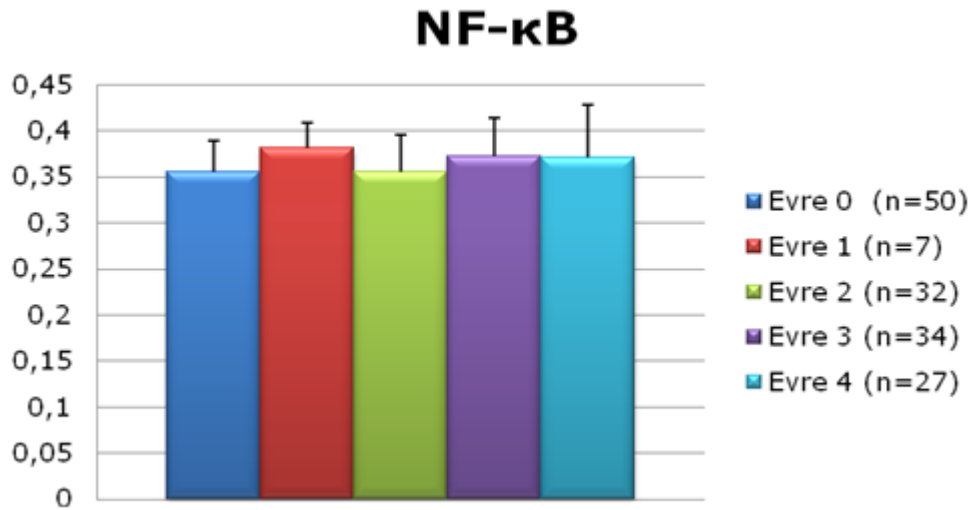


**Grafik 4.11** Cinsiyete göre kontrol ve hasta grubunda NF-κB aktivitesi

NF-κB aktivitesi osteoartrit evreleri açısından karşılaştırıldığında evreler arasında fark göstermediği (p=0,229) bulundu (**Tablo 4.16, Grafik 4.12**).

**Tablo 4.16** Evrelere göre kontrol ve hasta grubunda NF-κB aktivitesi

Gruplar	Evreler	NF-κB		p değeri
Kontrol Grubu	Evre 0 (n=50)	Ort±SS	0,356±0,033	0,229
		Ortanca	0,356 (0,329-0,374)	
Hasta Grubu	Evre 1 (n=7)	Ort±SS	0,381±0,028	
		Ortanca	0,391 (0,355-0,406)	
	Evre 2 (n=32)	Ort±SS	0,355±0,041	
		Ortanca	0,348 (0,322-0,376)	
	Evre 3 (n=34)	Ort±SS	0,373±0,055	
		Ortanca	0,365 (0,334-0,402)	
	Evre 4 (n=27)	Ort±SS	0,371±0,057	
		Ortanca	0,349 (0,335-0,401)	



**Grafik 4.12** Evrelere göre kontrol ve hasta grubunda NF-κB aktivitesi

#### 4.5- miRNA-146a, miRNA-155, NF-κB ve JNK korelasyon analizi

Çalışmada miRNA-146a, miRNA-155 ve JNK gen ekspresyonları ile NF-κB protein aktivitesinin yaş ve vücut kitle indeksi (VKİ) arasındaki korelasyonu incelendi (**Tablo 4.17**).

miRNA-146a ve miRNA-155 ekspresyonlarının hasta grubunda yaş ile pozitif yönde korele olduğu bulundu ( $p=0,036$ ;  $p=0,044$ ). Kontrol ve hasta grubu arasında VKİ yönünden anlamlı bir korelasyon gözlenmedi ( $p>0,05$ ).

**Tablo 4.17** Çalışma grubunda belirlenen korelasyon analizi

		Yaş		VKİ	
		Kontrol Grubu n=50	Hasta Grubu n=100	Kontrol Grubu n=50	Hasta Grubu n=100
miRNA-146a	r	0,098	0,210	0,239	0,040
	p	0,499	<b>0,036*</b>	0,095	0,693
miRNA-155	r	0,067	0,202	0,164	0,057
	p	0,646	<b>0,044*</b>	0,255	0,573
JNK	r	-0,180	-0,115	-0,024	-0,082
	p	0,211	0,253	0,867	0,420
NF-κB	r	0,093	-0,079	-0,044	0,042
	p	0,521	0,435	0,762	0,678

Korelasyon değerlendirmeleri grup içinde de gerçekleştirildi. Kontrol ve hasta grubunda miRNA-146a ve miRNA-155 ekspresyonlarının pozitif yönde ve istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon gösterdikleri bulundu ( $p=0,001$ ) (**Tablo 4.18**, **Tablo 4.19**).

**Tablo 4.18** Kontrol grubunda belirlenen korelasyon analizi

Kontrol Grubu n=50		miRNA-146a	miRNA-155	JNK	NF-κB
miRNA-146a	r		0,803	-0,028	0,086
	p		<b>0,000**</b>	0,850	0,554
miRNA-155	r	0,803		-0,036	0,178
	p	<b>0,000**</b>		0,805	0,217
JNK	r	-0,028	-0,036		-0,181
	p	0,850	0,805		0,208
NF-κB	r	0,086	0,178	-0,181	
	p	0,554	0,217	0,208	

**Tablo 4.19** Hasta grubunda belirlenen korelasyon analizi

Hasta Grubu n=100		miRNA-146a	miRNA-155	JNK	NF-κB
miRNA-146a	r		0,870	-0,044	0,075
	p		<b>0,000**</b>	0,662	0,457
miRNA-155	r	0,870		-0,175	0,052
	p	<b>0,000**</b>		0,082	0,610
JNK	r	-0,044	-0,175		0,054
	p	0,662	0,082		0,597
NF-κB	r	0,075	0,052	0,054	
	p	0,457	0,610	0,597	



miRNA-146a, miRNA-155 ve JNK gen ekspresyonları ile NF- $\kappa$ B protein aktivitesinin evrelerle yaş arasında herhangi bir korelasyon gösterip göstermediği incelendi. Buna göre, evre 3’de yaş ile miRNA-146a arasında pozitif yönde bir korelasyon ( $p=0,035$ ) bulunurken, evre 4’te JNK ekspresyonu ile yaş arasında negatif yönlü bir ilişki gözlemlendi ( $p=0,018$ ) (**Tablo 4.20**).

**Tablo 4.20** Evrelerde yaş ile ekspresyon ve protein aktivitesi arasındaki korelasyon

		Yaş				
		Evre 0 n=50	Evre 1 n=7	Evre 2 n=32	Evre 3 n=34	Evre 4 n=27
<b>miRNA-146a</b>	r	0,098	0,505	0,028	0,363	0,194
	p	0,499	0,248	0,878	<b>0,035*</b>	0,332
<b>miRNA-155</b>	r	0,067	0,162	0,053	0,309	0,199
	p	0,646	0,728	0,773	0,075	0,320
<b>JNK</b>	r	-0,180	-0,118	0,054	0,073	-0,451
	p	0,211	0,801	0,771	0,681	<b>0,018*</b>
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	r	0,093	-0,144	0,052	0,010	-0,238
	p	0,521	0,758	0,776	0,953	0,232

miRNA-146a, miRNA-155 ve JNK gen ekspresyonları ile NF- $\kappa$ B protein aktivitesinin evrelerle vücut kitle indeksi (VKİ) arasında herhangi bir korelasyon göstermediği bulundu (**Tablo 4.21**).

**Tablo 4.21** Evrelerde VKİ ile ekspresyon ve protein aktivitesi arasındaki korelasyon

		VKİ				
		Evre 0 n=50	Evre 1 n=7	Evre 2 n=32	Evre 3 n=34	Evre 4 n=27
<b>miRNA-146a</b>	r	0,239	0,286	-0,001	0,009	0,072
	p	0,095	0,535	0,997	0,961	0,721
<b>miRNA-155</b>	r	0,164	-0,036	0,021	-0,027	0,201
	p	0,255	0,939	0,910	0,880	0,315
<b>JNK</b>	r	-0,024	-0,144	-0,016	-0,090	-0,058
	p	0,867	0,758	0,933	0,612	0,775
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	r	-0,044	0,357	0,086	0,020	0,084
	p	0,762	0,432	0,639	0,908	0,676

miRNA-146a, miRNA-155 ve JNK gen ekspresyonları ile NF-κB protein aktivitesinin evrelere göre korelasyonu incelendi.

Buna göre tüm evrelerde miRNA-146a ve miRNA-155 ekspresyonları arasında pozitif yönde bir korelasyon bulundu (**Tablo 4.22, 4.23, 4.24, 4.25** ve **4.26**). Buna ilaveten de miRNA-146a ekspresyonu ile NF-κB aktivasyonu arasında evre (2)'de negatif yönde ( $p=0,017$ ), evre (3)'de pozitif yönde ( $p=0,026$ ) bir korelasyon gözlemlendi (**Tablo 4.24** ve **4.25**).

**Tablo 4.22** Evre (0) ile ekspresyon ve protein aktivitesi arasındaki korelasyon

Evre 0 n=50		miRNA-146a	miRNA-155	JNK	NF-κB
miRNA-146a	r		0,803	-0,028	0,086
	p		<b>0,000**</b>	0,850	0,554
miRNA-155	r	0,803		-0,036	0,178
	p	<b>0,000**</b>		0,805	0,217
JNK	r	-0,028	-0,036		-0,181
	p	0,850	0,805		0,208
NF-κB	r	0,086	0,178	-0,181	
	p	0,554	0,217	0,208	

**Tablo 4.23** Evre (1) ile ekspresyon ve protein aktivitesi arasındaki korelasyon

Evre 1 n=7		miRNA-146a	miRNA-155	JNK	NF-κB
miRNA-146a	r		0,786	0,523	-0,143
	p		<b>0,036*</b>	0,229	0,760
miRNA-155	r	0,786		0,523	-0,286
	p	<b>0,036*</b>		0,229	0,535
JNK	r	0,523	0,523		0,432
	p	0,229	0,229		0,333
NF-κB	r	-0,143	-0,286	0,432	
	p	0,760	0,535	0,333	

**Tablo 4.24** Evre (2) ile ekspresyon ve protein aktivitesi arasındaki korelasyon

Evre 2 n=32		miRNA-146a	miRNA-155	JNK	NF-κB
miRNA-146a	r		0,853	-0,058	-0,417
	p		<b>0,000**</b>	0,754	<b>0,017*</b>
miRNA-155	r	0,853		-0,121	-0,297
	p	<b>0,000**</b>		0,510	0,099
JNK	r	-0,058	-0,121		0,083
	p	0,754	0,510		0,652
NF-κB	r	-0,417	-0,297	0,083	
	p	<b>0,017*</b>	0,099	0,652	

**Tablo 4.25** Evre (3) ile ekspresyon ve protein aktivitesi arasındaki korelasyon

Evre 3 n=34		miRNA-146a	miRNA-155	JNK	NF-κB
miRNA-146a	r		0,780	0,182	0,382
	p		<b>0,000**</b>	0,302	<b>0,026*</b>
miRNA-155	r	0,780		-0,137	0,187
	p	<b>0,000**</b>		0,440	0,289
JNK	r	0,182	-0,137		0,024
	p	0,302	0,440		0,893
NF-κB	r	0,382	0,187	0,024	
	p	<b>0,026*</b>	0,289	0,893	

**Tablo 4.26** Evre (4) ile ekspresyon ve protein aktivitesi arasındaki korelasyon

Evre 4 n=27		miRNA-146a	miRNA-155	JNK	NF-κB
miRNA-146a	r		0,929	-0,247	0,194
	p		<b>0,000**</b>	0,214	0,331
miRNA-155	r	0,929		-0,336	0,170
	p	<b>0,000**</b>		0,087	0,395
JNK	r	-0,247	-0,336		0,099
	p	0,214	0,087		0,624
NF-κB	r	0,194	0,170	0,099	
	p	0,331	0,395	0,624	

#### 4.6- miRNA-146a, miRNA-155, NF-κB ve JNK'nın ROC analiziyle tanısal değerinin belirlenmesi

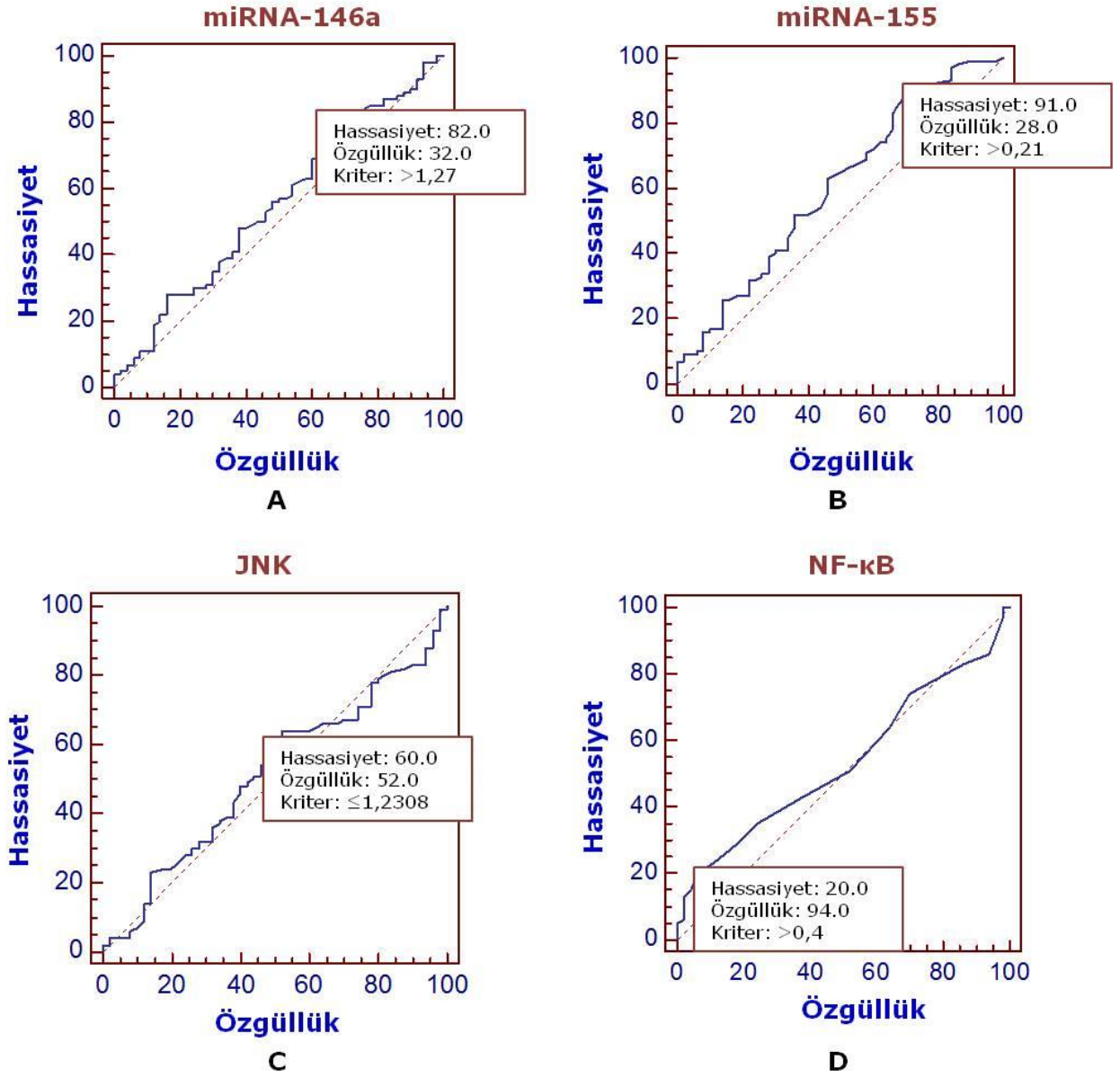
Çalışmamızda elde edilen miRNA-146a, miRNA-155 ve JNK gen ekspresyonları ile NF-κB protein aktivitesinin hasta ve kontrol grubu arasında tanısal bir değeri olup olmadığı ROC eğri (Alıcı İşlem Karakteristik Eğrisi-Receiver Operating Characteristic Curve) analizi ile incelendi. Ölçümlerin istatistik sonuçları **Tablo 4.27**'de, hassasiyet ve özgüllük değerleri **Grafik 4.13, 4.14, 4.15** ve **4.16**'da gösterilmiştir. Yapılan ölçümlerin tek tek ve kombinasyonlarının tanısal değerleri analiz edilmiştir. Özellikle miRNA-146a (hassasiyet 82.0) ve miRNA-155 (hassasiyet 91.0) gen ekspresyonunda hassasiyet önemli şekilde yüksek olmasına rağmen özgüllüğün düşük olması bu verilerin tek başlarına hastalık tanısında kullanılabilme olasılığını azaltmıştır (**Grafik 4.13**). Buna karşılık 4 parametre (miRNA-146a, miRNA-155 ve JNK gen ekspresyonları ile NF-κB aktivitesi) birlikte değerlendirildiğinde en yüksek hassasiyete (81.0) ve özgüllüğe (40.0) ulaşıldığı görüldü (**Grafik 4.16**).

**Tablo 4.27** miRNA-146a, miRNA-155 ve JNK gen ekspresyonları ile NF-κB protein aktivitesinin ROC analizi.

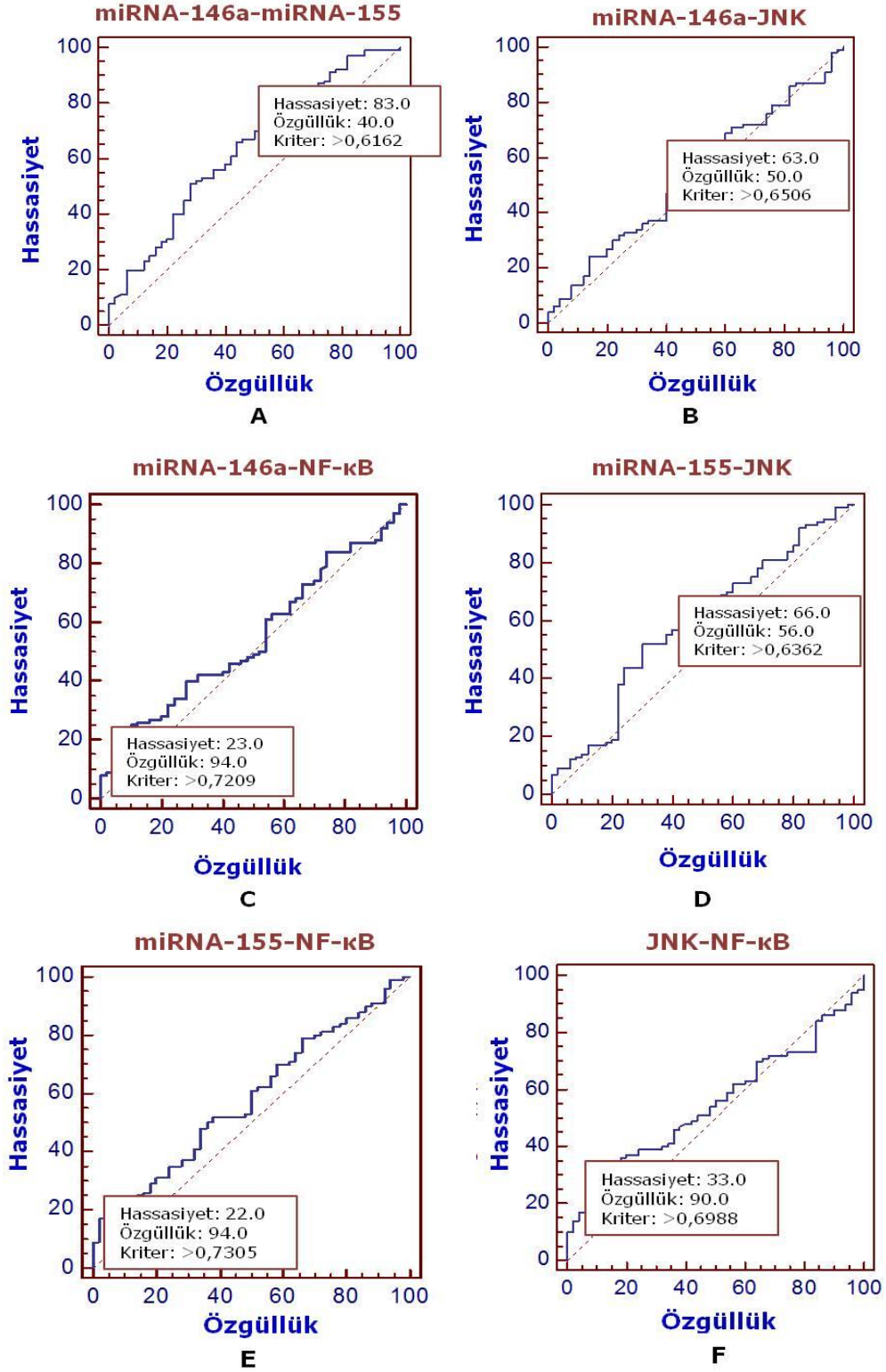
Ölçümler	ROC eğrisi	Standart Hata	p değeri	% 95 Güven Aralığı
1	0,552	0,0503	0,3037	0,468 - 0,633
2	0,604	0,0504	0,0397	0,521 - 0,682
3	0,512	0,0495	0,8069	0,429 - 0,594
4	0,536	0,0477	0,4463	0,453 - 0,618
1-2	0,640	0,0485	0,0039	0,558 - 0,717
1-3	0,536	0,0496	0,4651	0,453 - 0,618
1-4	0,552	0,0485	0,2888	0,468 - 0,633
2-3	0,594	0,0498	0,0603	0,510 - 0,673
2-4	0,581	0,0484	0,0957	0,497 - 0,661
3-4	0,557	0,0469	0,2269	0,473 - 0,638
1-2-3	0,645	0,0479	0,0025	0,563 - 0,721
1-2-4	0,617	0,0476	0,0144	0,534 - 0,695
2-3-4	0,588	0,0477	0,0647	0,505 - 0,668
1-3-4	0,562	0,0474	0,1921	0,479 - 0,643
1-2-3-4	0,630	0,0470	0,0057	0,547 - 0,707

Ölçümler: miRNA-146a (1); miRNA-155 (2); JNK (3); NF-κB (4) ile gösterilmiştir.

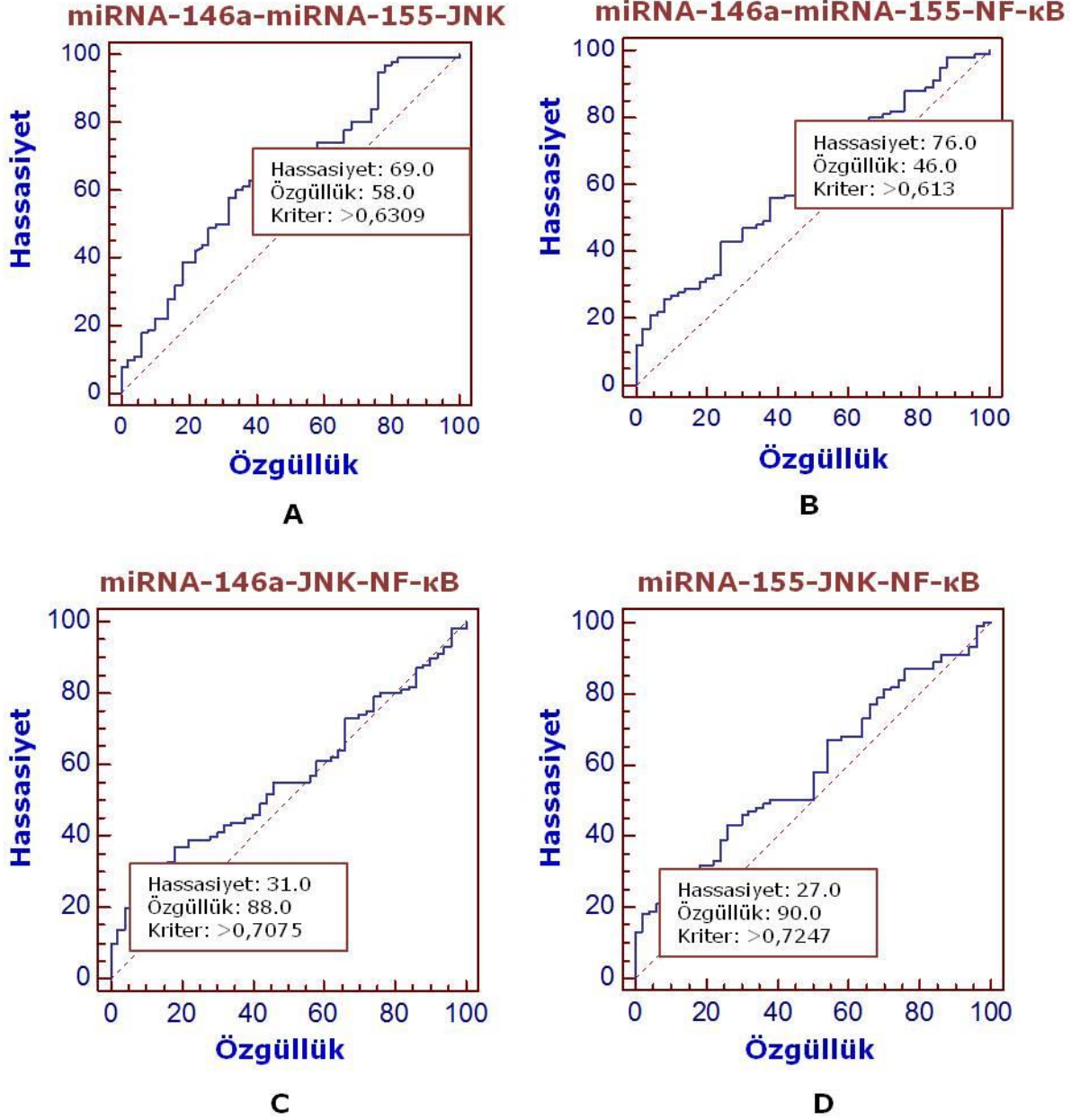
**Grafik 4.13** miRNA-146a (A), miRNA-155 (B) ve JNK (C) gen ekspresyonları ile NF- $\kappa$ B (D) protein aktivitesinin ROC analizi sonuçları, hassasiyet ve özgülük değerleri



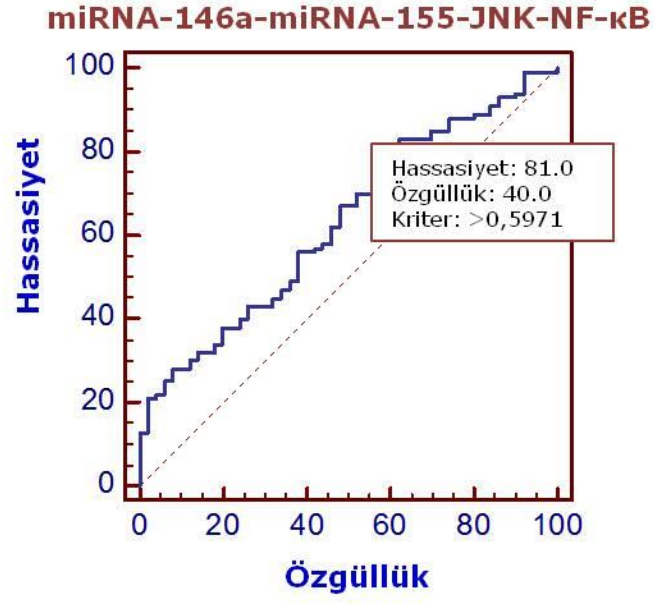
**Grafik 4.14** miRNA-146a, miRNA-155 ve JNK gen ekspresyonları ile NF- $\kappa$ B protein aktivitesinin ikili kombinasyonlarının ROC analizi sonuçları, hassasiyet ve özgüllük değerleri



**Grafik 4.15** miRNA-146a, miRNA-155 ve JNK gen ekspresyonları ile NF- $\kappa$ B protein aktivitesinin üçlü kombinasyonlarının ROC analizi sonuçları, hassasiyet ve özgüllük değerleri



**Grafik 4.16** miRNA-146a, miRNA-155 ve JNK gen ekspresyonları ile NF- $\kappa$ B protein aktivitesinin kombinasyonun ROC analizi sonuçları, hassasiyet ve özgülük değerleri





## 5- TARTIŞMA

Osteoartrit (OA) yaşla birlikte sıklığı artan, ağrı ve sakatlıklara neden olarak bireyin yaşam kalitesini önemli ölçüde bozabilen dejeneratif bir eklem hastalığıdır (Tuncer & Gilgil, 2007).

İlerleyen yaşla birlikte vücutta kıkırdağı etkileyen birçok biyolojik değişiklik ortaya çıkmaktadır (Tuncer & Gilgil, 2007). Bunların sonucunda da eklemler daha kolay zedelenebilir hale gelmektedir. Felson ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 63 yaş üzeri bireylerin diz eklemleri radyolojik olarak incelenmiş ve 70 yaş altında OA sıklığının % 27 olduğu, 80 üzerinde ise sıklığın % 44'e çıktığı belirlenmiştir (Felson et al., 1987). Bizim çalışmamızda da OA için bir risk faktörü olan yaşın hasta grubunda hem kadın hem de erkeklerde önemli olduğu belirlendi.

OA görülme sıklığı kadınlarda erkeklere göre daha fazladır ve kadınlarda daha çok eklemi tutma eğilimindedir. Kadınlarda 50 yaştan önce OA görülme sıklığı erkeklere göre daha azken, 50 yaşından sonra kadınların belirgin olarak daha fazla etkilendiği bildirilmiştir (Atay, 2011; Tuncer & Gilgil, 2007). Kadınlarda sıklığın artmış olmasının genetik yapıya ya da hormonal nedenlere bağlı olabileceği öne sürülmüştür (Atay, 2011; Tuncer & Gilgil, 2007). Benzer şekilde bizimde araştırmaya dahil ettiğimiz, hastaneye müracaat eden hasta grubunun büyük çoğunluğu kadınlardan oluşmakta olup, çalışmamızda kadınların oranı % 84 olarak belirlendi.

Obezite diz OA'sının hem oluşumu hem de seyri açısından önemli bir risk faktörüdür (Atay, 2011; Dennison & Cooper, 2003; Harris et al., 2006c). Diz OA riskinin, vücut kitle indeksi (VKİ) <25 bireylere göre, VKİ  $\geq$ 30 olan bireylerde yaklaşık sekiz kat fazla olduğu gösterilmiştir (Coggon et al., 2000). Kadınlarda VKİ'ndeki 2 birimlik azalmanın (yaklaşık 5 kg) semptomatik diz OA gelişmesi prevalansını yaklaşık % 50 azalttığı gösterilmiştir (Felson et al., 1992). Ayrıca obezite radyolojik bulguların ilerlemesi için de bir risk faktörüdür (Harris et al., 2006c). Obezite ve OA ilişkisinin kalça, el ve generalize OA'da diz OA'sındaki kadar belirgin olmaması obezitenin bir risk faktörü olarak sistemik etkilerinden çok mekanik etkilerinin daha ağır bastığını göstermektedir (Atay, 2011; Tuncer & Gilgil, 2007). Benzer şekilde çalışmamızda da VKİ'nin kontrol ve hasta grubu arasında anlamlı bir fark gösterdiği belirlendi.

OA temel olarak kıkırdak yıkımı ve subkondral kemikteki değişikliklerle karakterize olmakla birlikte tüm eklem ve eklem çevresi dokuların etkilendiği bir organ hastalığı olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle OA sadece kıkırdak metabolizmasında yer alan enzimlerde meydana gelen değişikliklerle açıklanamamaktadır (Van der Kraan & van den Berg, 2000). Bu aktiviteleri düzenleyen hücre uyarı yollarının tam olarak bilinmesiyle eklemdeki kaybolan homeostazının yeniden yapılanması ve belki tamir mekanizmasının gelişmesi mümkün

olabilecektir. Ayrıca son zamanlarda birçok hücresel mekanizmada etkisi belirlenen mikroRNA (miRNA)'ların gelişim, homeostaz ve bağışıklık fonksiyonlarında önemli rol oynadığı bilinmektedir (Iliopoulos et al., 2008; Luo et al., 2010). Bu ilişkiden yola çıkarak planladığımız araştırmamızın sonuçlarına göre sağlıklı bireylere göre OA hasta grubunda miRNA-146a, miRNA-155 ve JNK ekspresyonlarının ve NF-κB aktivitesinin arttığı belirlendi, fakat artışlardan sadece miRNA-155 ekspresyonunun artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

miRNA'ların kanserden inflamasyona kadar çoğu hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Sonkoly & Pivarcsi, 2009). miRNA'ların ekspresyonlarının hücre kaderinin belirlenmesindeki önemli rolü dışında, özel immün cevabı ve inflamatuvar uyarıyı da düzenledikleri belirlenmiştir (Sheedy & O'Neill, 2008). miRNA'lardan miRNA-146 ve miRNA-155'in; IL1 ve TNF-α gibi pro-inflamatuvar uyarıcılar tarafından indüklendiği bilinmektedir (Sheedy & O'Neill, 2008). miRNA'ların OA patogenezindeki rolünün açığa çıkarılması için normal ve OA eklem dokularında miRNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırıldığı araştırmalar yapılmıştır. Bu araştırmalardan birinde, OA'lı 33 hasta ve 10 sağlıklı bireyin kıkırdak dokusunda 365 miRNA'nın durumu incelenmiştir. Araştırmanın sonucunda miRNA-483, miRNA-22, miRNA-377, miRNA-103, miRNA-16, miRNA-223, miRNA-30b, miRNA-23b ve miRNA-509'un ekspresyon düzeylerinin arttığı ve miRNA-29a, miRNA-140, miRNA-25, miRNA-337, miRNA-26a, miRNA-210, miRNA-373'ün ekspresyon düzeylerinin ise azaldığı vurgulanmış, bazılarının obezite ve inflamasyonla ilgisi olduğunu ileri sürülmüştür (Iliopoulos et al., 2008). Başka bir araştırmada OA ile normal kıkırdak ve kemik doku arasında 157 miRNA ekspresyonu araştırılmıştır. Kıkırdak dokuda normale göre 17 miRNA'nın ve kemik dokuda normale göre 30 miRNA'nın 4 kattan fazla eksprese olduğu belirlenmiştir (Jones et al., 2009).

Diğer bir araştırmada da primer kondrosit kültüründe 723 miRNA analiz edilmiş ve 7'sinin istatistiksel olarak önemli derecede farklı eksprese olduğu belirlenmiştir. Bunlardan miRNA-483'ün OA kondrositlerinde, miRNA-149, miRNA-582, miRNA-1227, miRNA-634, miRNA-576 ve miRNA-641'in normal kondrositlerde artmış olduğu vurgulanmıştır (Díaz-Prado et al., 2012) Diğer bir araştırmada kalça ve diz OA'sı olan 816 hastanın serum örneklerinde mikroarray yöntemiyle miRNA taraması yapılmıştır. Sonuçta çalıştıkları hasta grubunda let-7e, miRNA-454 ve miRNA-885-5p'nin diz ve kalça OA'sı ile ilgili biyobelirteç olabileceğini önermişlerdir (Beyer et al., 2014). Yapılan bazı araştırmalarda miRNA-140 ekspresyonunun azalmasının OA patogenezinde kritik bir rol oynadığı ileri sürülmüştür (Miyaki et al., 2009; Miyaki et al., 2010; Tardif et al., 2009; Tuddenham et al., 2006).

OA'da miRNA ekspresyonlarına yaşlanma gibi risk faktörlerinin aracılık edebileceği düşünülmüştür. Bu amaçla yapılan çalışmalarda, insanlarda farklı yaşlar arasında dolaşımdaki miRNA'lar ile periferik kan hücrelerinde

eksprese olan miRNA'lar incelenmiştir. Analizler, OA ile ilgili bazı miRNA'ların ekspresyonlarının yaşa bağımlı olarak artış ya da azalış gösterdiği vurgulanmıştır (ElSharawy et al., 2012; Hooten et al., 2010; Okuhara et al., 2012; Olivieri et al., 2012). Değerlendirmeler sonucunda, miRNA-21 ekspresyon seviyesinin arttığı ve bu artışın inflamasyon belirteci c-reaktif protein ve TGF uyarısıyla uyumlu olduğu (Olivieri et al., 2012), miRNA-221 ekspresyonunun yaşla azaldığı ve OA'yı içine alan uyarı yolağının PI3K'nin artışına aracılık ettiği (Hooten et al., 2010), miRNA-146a ekspresyonunun ise yaşa bağımlı olarak arttığı vurgulanmıştır (Okuhara et al., 2012). Bizim çalışmamızda da miRNA-146a ve miRNA-155 ekspresyonlarındaki artışın yaş artışıyla ilişkili olduğu belirlendi.

miRNA'ların ekspresyonlarının özel immün cevabı ve inflamatuvar uyarıyı da düzenledikleri belirlenmiştir. miRNA'lar hematopoezde belirli bir role sahiptir ve böylece bu sürecin bozulması inflamatuvar hastalıkların patogeneğinde önemli olabilmektedir. miRNA-146 ve miRNA-155; IL-1 ve TNF- $\alpha$  gibi pro-inflamatuvar aracılardan tarafından uyarılır (Sheedy & O'Neill, 2008). miRNA-146a immün fonksiyonların düzenlenmesinde tanımlanan ilk miRNA'lardandır. Normal olmayan miRNA-146 ekspresyonu osteoartrit, romatoid artrit ve sedef hastalığı gibi çeşitli inflamatuvar hastalıklarda gösterilmiştir. İmmün hücrelerin gelişimi ve doğuştan gelen bağışıklık kadar kazanılmış bağışıklığın düzenlenmesinde de miRNA-155'in etkili olduğu in vivo ve in vitro çalışmalarda gösterilmiştir (Sonkoly & Pivarcsi, 2009). miRNA-155 seviyelerinin düzenlenmesinde MAPK uyarısı önemli bir role sahiptir. JNK'nin, miRNA-155 ekspresyonunu düzenlediği yolunda bilgiler mevcuttur (O'Connell et al., 2007). Çalışmamızda OA hastalarının periferik mononükleer kan hücrelerinde, birbirleri ile etkileşim içinde olduğunu ve OA evrelerinde önemli olabileceğini düşündüğümüz NF- $\kappa$ B, JNK, miRNA-146a ve miRNA-155 ekspresyonlarını birlikte araştırdık. Böylece hem OA mekanizmasının anlaşılmasına katkı sağlamak hem de osteoartritin erken evreleri için yeni bir terapötik hedef olabilecek miRNA'ları ortaya koymayı planladık. 32 sağlıklı birey ve 41 OA hastasında yaptığımız ön çalışmada miRNA-146a ve miRNA-155 ekspresyonlarını sağlıklı bireylere göre ileri derece anlamlı bir fark gösterdiğini bulduk (Soyocak et al., 2014). Bu ön çalışmamıza benzer olarak Okuhara ve arkadaşları 36 sağlıklı birey ve 36 OA hastasında yaptıkları araştırmada miRNA-146a, miRNA-155, miRNA-181a ve miRNA-223 ekspresyonlarının periferik mononükleer kan hücrelerinde sağlıklı bireylere göre hasta grubunda daha fazla olduğunu bildirmişlerdir (Okuhara et al., 2012). Bununla birlikte çalışma grubunu genişlettiğimiz bu çalışmada sağlıklı bireylere oranla OA'lı hastalarda miRNA-146a ekspresyonundaki artışın önemsiz, miRNA-155 ekspresyonundaki artışın önemli düzeyde olduğunu belirledik.

Çalışmalarda miRNA ekspresyon seviyeleri ile OA hastalığının gelişim evreleri arasındaki ilişki de incelenmiştir (Okuhara et al., 2012; Yamasaki et al., 2009). Yamasaki ve arkadaşları, Mankin skoruna göre histopatolojik olarak evrelendirdikleri, 9'u kalça ve 6'sı diz olmak üzere 15 OA hastasının

kıkırdak dokusunda miRNA-146a ekspresyon seviyelerini belirlemişlerdir. Buna göre miRNA-146a ekspresyon seviyelerinin erken evre OA hastaların kıkırdağında aşırı derecede ekprese olduğunu bildirmişlerdir. Okuhara ve arkadaşları, yaptıkları araştırmada Kellgren-Lawrence (K-L) evreleme sistemine göre hastalığı evre 2 seviyesinde olan, 40 ve 67 yaşında iki OA'lı hastada miRNA-146a ekspresyonunun artmış olduğunu bildirmişlerdir. Yine aynı araştırmada miRNA-146a ekspresyonu fazla olan bu iki hasta ile birlikte, miRNA-155 ekspresyonu fazla iki hasta ve miRNA-181a ekspresyonu fazla 1 hasta evrelere göre incelendiklerinde ekspresyondaki bu artışın evre 2 ve evre 3'te olduğunu vurgulamışlardır (Okuhara et al., 2012). Bizde yaptığımız bu çalışmada K-L evreleme sistemine göre sınıflandırdığımız OA hastalarının periferik mononükleer kan hücrelerinde, miRNA-146a ve miRNA-155 ekspresyonlarının ilerleyen evrelerde (evre 3 ve evre 4) arttığını gözlemledik.

Hücreyel birçok olayda önemli roller oynayan JNK, hücre gelişimi, büyümesi, apoptoz ve immün cevaptan sorumludur (Bogoyevitch et al., 2010; Davis, 2000). JNK uyarı iletiminin bozulması nörodejenerasyon, doğum kusurları, kanser, iskemi/reperfüzyon hasarı ve kronik inflamasyon gibi birçok hastalığın gelişimine katkı sağlamaktadır (Johnson & Nakamura, 2007). JNK, c-Jun'u fosforlayarak transkripsiyon faktörlerini aktive eden AP-1 (Aktivatör protein-1)'i aktive etmede merkezi bir rol oynar (Weston & Davis, 2002). JNK, MMP üretimini düzenler ve TNF- $\alpha$  ve IL-1b gibi pro-inflamatuar sitokinlere cevap olarak aktive olur (Bogoyevitch et al., 2010; Han et al., 2001; Harris et al., 2006d; Loeser et al., 2008). Bu kinazlar özellikle NF- $\kappa$ B olmak üzere çeşitli transkripsiyon faktörlerini aktive eder (Roach, 2008). AP-1, kollajenaz genini düzenlediğinden, JNK artritte terapötik bir hedef olarak görülmektedir. Sinoviyositlerde JNK aktivasyonunun artmış olduğu gösterilmiştir (Han et al., 1999). Seçici bir JNK inhibitörünün adjuvan artritte görülen radyolojik hasarı ve hastalık şiddetini azalttığı bildirilmiştir (Han et al., 1999; Han et al., 2001; Harris et al., 2006e). Yapılan çalışmalarda normal insan kıkırdağına göre OA'lı kıkırdakta aktif JNK düzeyinin daha fazla olduğu gösterilmiştir (Clancy et al., 2001; Fan et al., 2007; Loeser et al., 2008). Çalışmamızda JNK gen ekspresyon düzeylerinin OA'da önemsizde olsa artış gösterdiği bulundu. Bu artışın kıkırdak dejenerasyonuna bağlı olarak OA hücrelerinde indüklenen apoptoz ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

NF- $\kappa$ B, inflammatuar sitokinlerle birlikte çeşitli hücre dışı matriks yıkım proteinlerinin ekspresyonlarını artırır (Roach, 2008). NF- $\kappa$ B'nin OA'lı hasta kondrositlerinde, anormal gen ürünlerinin uyarılması ve normal kondrosit gen ürünleri üretimini baskılanmasında etkili olduğu ileri sürülmüştür (Roach, 2008). Yapılan literatür araştırmasında OA'lı hastaların mononükleer hücrelerinde NF- $\kappa$ B gen ekspresyonlarının incelendiği araştırmaya rastlanmamıştır. Artrit sinoviyumunda NF- $\kappa$ B proteinleri p50 ve p65'in makrofajlarda, sinoviyal örtü hücrelerinde ve vasküler endotelde bol miktarda bulunması NF- $\kappa$ B'nin artrit için patolojik olabileceğini düşündürmektedir. İn vivo ve in vitro çalışmalar artritte NF- $\kappa$ B'nin hedef

alınması düşüncesini destekler niteliktedir. Çalışmamızda OA'lı hastalardan elde edilen mononükleer hücrelerde NF-κB aktivitesinin istatistiksel olarak önemli olmasa da arttığını gözlemledik.

Murata ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, romatoid artrit ve osteoartrit hastalarının plazma ve sinoviyal sıvılarında, miRNA-16, miRNA-132, miRNA-146a, miRNA-155 ve miRNA-223'ün biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağını araştırmışlardır (Murata et al., 2010). Çalışmada bu miRNA'ların tanısal değerleri ROC analizi ile incelenmiş ve plazmada miRNA-132'in romatoid artrit ve osteoartrit hastalarına göre sağlıklı bireylerde anlamlı olarak fazla olduğu bunun da hastalıkların tanısında kullanılabileceği bildirilmiştir. Biz de yaptığımız araştırmada incelediğimiz parametreleri ROC analizi ile değerlendirdiğimizde parametrelerin tek tek hassasiyet ve özgüllüğünün az olduğu ancak 4 parametrenin birlikte biyobelirteç olarak kullanılmasının değerli olabileceğini belirledik.

Gelecekte yapılacak çalışmalarla OA gelişimini düzenleyen farklı miRNA'ların incelenmesi OA patogenezi ve hastalığın ilerlemesinde önemli olacaktır. Bütün bu bulgulara ilave olarak ROC analizi ile hassasiyet ve özgüllüğü incelediğimizde araştırdığımız bu 4 parametrenin (miRNA-146a, miRNA-155 ve JNK gen ekspresyonu ile NF-κB aktivitesi) birlikte değerlendirilmesinin potansiyel tanı biyobelirteci olabileceği kanımız da yapılacak çeşitli araştırmalarla desteklenmelidir.

## 6- SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaygın bir eklem hastalığı olan osteoartrit dünyada en sık görülen ve fiziksel bozukluğa yol açan ciddi bir eklem sorunudur. Bu nedenle osteoartrit patogenezinin moleküler mekanizmasının bilinmesi hastalığın tanı ve tedavisinde önemli bir yere sahiptir. Bu amaçla; osteoartrit hastalarında miRNA-146a, miRNA-155 ve JNK ekspresyon seviyeleri ve NF-κB aktivitesi belirlenmiştir.

Bu çalışmanın sonucunda;

1. Osteoartritli hastalarda (kadın ve erkek) miRNA-146a gen ekspresyonunun sağlıklı bireylere göre önemsizde olsa arttığı,
2. Osteoartritli kadın hastalarda miRNA-146a gen ekspresyonunun sağlıklı kadınlara göre önemli düzeyde arttığı,
3. Osteoartritli hastalarda miRNA-146a gen ekspresyonunun hastalık evrelerine göre önemli bir fark göstermediği,
4. Osteoartritli hastalarda (kadın ve erkek) miRNA-155 gen ekspresyonunun sağlıklı bireylere göre önemli düzeyde arttığı,
5. Osteoartritli kadın hastalarda miRNA-155 gen ekspresyonunun sağlıklı kadınlara göre önemli düzeyde arttığı,
6. Osteoartritli hastalarda miRNA-155 gen ekspresyonunun hastalık evrelerine göre önemli bir fark göstermediği,
7. Osteoartritli hastalarda (kadın ve erkek) JNK gen ekspresyonunun sağlıklı bireylere göre önemsizde olsa arttığı,
8. Osteoartritli hastalarda JNK gen ekspresyonunun cinsiyete göre önemli bir fark göstermediği,
9. Osteoartritli hastalarda JNK gen ekspresyonunun evrelere göre önemli bir fark göstermediği,
10. Osteoartritli hastalarda (kadın ve erkek) NF-κB aktivitesinin sağlıklı bireylere göre önemsizde olsa arttığı,
11. Osteoartritli hastalarda NF-κB aktivitesinin cinsiyete göre önemli bir fark göstermediği,
12. Osteoartritli hastalarda NF-κB aktivitesinin evrelere göre önemli bir fark göstermediği,

13. miRNA-146a, miRNA-155 ve JNK gen ekspresyonları ile NF- $\kappa$ B aktivitesi osteoartrit hastalarının evrelerine göre incelendiğinde tüm evrelerde miRNA-146a ve miRNA-155 ekspresyonları arasında pozitif bir korelasyon,

14. miRNA-146a ekspresyonu ile NF- $\kappa$ B aktivitesi arasında evre 2 hastalarında negatif, evre 3 hastalarında pozitif bir korelasyon belirlendi.

Bütün bu bulgulara ilave olarak özellikle miRNA-146a (hassasiyet 82.0) ve miRNA-155 (hassasiyet 91.0) gen ekspresyonunun ROC analizi ile belirlenen hassasiyeti hastalarda önemli derecede yüksek olmasına rağmen özgüllüğün düşük olması bu verilerin tek başlarına hastalık tanısında kullanılabilirliğini düşürmesine rağmen incelenen 4 parametrenin (miRNA-146a, miRNA-155 ve JNK gen ekspresyonları ile NF- $\kappa$ B aktivitesi) birlikte değerlendirilmesinde en yüksek hassasiyete (81.0) ve özgüllüğe (40.0) ulaşıldığı, dolayısıyla bu 4 parametrenin birlikte kullanılmasının OA erken tanısı için bir biyobelirteç olabileceği kanısına varıldı. Bu kanının kuvvetlenmesi ilave araştırmalarla desteklenmelidir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akçavuş, S., Karagöz, A., Aybay, C., Çelik, C., & Yücel, M. (2001). Diz Osteoartritli Hastalarda Ağrı, Hastalık Şiddeti, Radyografik Bulgular ve Disabilite İlişkisi. *16*(2).
- Akhtar, N., Rasheed, Z., Ramamurthy, S., Anbazhagan, A. N., Voss, F. R., & Haqqi, T. M. (2010). MicroRNA-27b regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in human osteoarthritis chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism*, *62*(5), 1361-1371.
- Altman, R., Asch, E., Bloch, D., Bole, G., Borenstein, D., Brandt, K., . . . Hochberg, M. (1986). Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis & Rheumatism*, *29*(8), 1039-1049.
- Apraş, Ş., & Çobankara, V. (2000). Osteoartritin Laboratuvar Bulguları. In Y. Karaaslan (Ed.), *Osteoartrit* (pp. 114-118). Ankara: MD Yayıncılık.
- Atay, M. B. (2011). Osteoartrit In M. Beyazova & Y. G. Kutsal (Eds.), *Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon* (pp. 2537-2562). Ankara: Güneş Kitabevi.
- Aupperle, K. R., Yamanishi, Y., Bennett, B. L., Mercurio, F., Boyle, D. L., & Firestein, G. S. (2001). Expression and regulation of inducible IκB kinase (IKK-i) in human fibroblast-like synoviocytes. *Cellular immunology*, *214*(1), 54-59.
- Baldwin Jr, A. S. (1996). The NF-κB and IκB proteins: new discoveries and insights. *Annual review of immunology*, *14*(1), 649-681.
- Barter, M. J., & Young, D. A. (2013). Epigenetic mechanisms and non-coding RNAs in osteoarthritis. *Current rheumatology reports*, *15*(9), 1-9.
- Beyer, C., Zampetaki, A., Lin, N.-Y., Kleyer, A., Perricone, C., Iagnocco, A., . . . Sesselmann, S. (2014). Signature of circulating microRNAs in osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, annrheumdis-2013-204698.
- Bodur, H. (2011). Dünyada ve Türkiye'de osteoartrite güncel bakış; epidemiyoloji ve sosyoekonomik boyut. *Turk J Geriatr*, *14*, 7-14.
- Bogoyevitch, M. A., Ngoei, K. R., Zhao, T. T., Yeap, Y. Y., & Ng, D. C. (2010). c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, *1804*(3), 463-475.
- Callis, T. E., Chen, J.-F., & Wang, D.-Z. (2007). MicroRNAs in skeletal and cardiac muscle development. *DNA and cell biology*, *26*(4), 219-225.
- Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, *136*(4), 642-655.



## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Ceppi, M., Pereira, P. M., Dunand-Sauthier, I., Barras, E., Reith, W., Santos, M. A., & Pierre, P. (2009). MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(8), 2735-2740.
- Chen, F., Castranova, V., Shi, X., & Demers, L. M. (1999). New insights into the role of nuclear factor- $\kappa$ B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clinical chemistry*, 45(1), 7-17.
- Chendrimada, T. P., Gregory, R. I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., & Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 436(7051), 740-744.
- Clancy, R., Rediske, J., Koehne, C., Stoyanovsky, D., Amin, A., Attur, M., . . . Abramson, S. (2001). Activation of stress-activated protein kinase in osteoarthritic cartilage: evidence for nitric oxide dependence. *Osteoarthritis and Cartilage*, 9(4), 294-299.
- Coggon, D., Croft, P., Kellingray, S., Barrett, D., McLaren, M., & Cooper, C. (2000). Occupational physical activities and osteoarthritis of the knee. *Arthritis & Rheumatism*, 43(7), 1443-1449.
- Cooper, G., & Hausman, R. (2006a). Hücre Sinyal İletimi. In N. Atabey & M. Sakızlı (Eds.), *Hücre: Moleküler Yaklaşım* (3. baskı ed., pp. 541-590). İzmir: İzmir Tıp Kitapevi.
- Cooper, G., & Hausman, R. (2006b). Nükleus. In N. Atabey & M. Sakızlı (Eds.), *Hücre: Moleküler Yaklaşım* (3. baskı ed., pp. 323-354). İzmir: İzmir Tıp Kitapevi.
- Davis, R. J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases *Inflammatory Processes*: (pp. 13-21): Springer.
- Dennison, E., & Cooper, C. (2003). Osteoarthritis: epidemiology and classification. . In M. Hochberg, A. Silman, J. Smolen, M. Weinblatt & M. Weisman (Eds.), *Rheumatology*. Edinburgh: Mosby. (Reprinted from: 3rd ed.).
- Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., . . . Knowles, D. G. (2012). The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome research*, 22(9), 1775-1789.
- Díaz-Prado, S., Cicione, C., Muiños-López, E., Hermida-Gómez, T., Oreiro, N., Fernández-López, C., & Blanco, F. J. (2012). Characterization of microRNA expression profiles in normal and osteoarthritic human chondrocytes. *BMC musculoskeletal disorders*, 13(1), 144.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Djebali, S., Davis, C. A., Merkel, A., Dobin, A., Lassmann, T., Mortazavi, A., . . . Schlesinger, F. (2012). Landscape of transcription in human cells. *Nature*, 489(7414), 101-108.
- Doğanavşargil, E., & Gümüşdiş, G. (2003). *Klinik Romatoloji* ( 1. Baskı ed.).
- Doral, M. N., Dönmez, G., Atay, Ö. A., Bozkurt, M., Leblebicioğlu, G., Üzümcügil, A., & Aydoğ, T. (2007). Dejeneratif eklem hastalıkları. *Totbid Dergisi*, 6, 56-65.
- Dunn, W., DuRaine, G., & Reddi, A. H. (2009). Profiling microRNA expression in bovine articular cartilage and implications for mechanotransduction. *Arthritis & Rheumatism*, 60(8), 2333-2339.
- ElSharawy, A., Keller, A., Flachsbar, F., Wendschlag, A., Jacobs, G., Kefer, N., . . . Meese, E. (2012). Genome-wide miRNA signatures of human longevity. *Aging cell*, 11(4), 607-616.
- Ergin, S. (2007). Osteoartritde klinik bulgular ve fonksiyonel değerlendirme. In M. Saridoğan (Ed.), *Tanıdan Tedaviye Osteoartrit* (pp. 73-80): Nobel Tıp Kitabevleri
- Eskiyurt, N. (2000). Osteoartrozda Klinik Bulgular. In Y. Gökçe-Kutsal (Ed.), *Osteoartroz, Modern tıp seminerleri dizisi* (pp. 53-59): Güneş Kitabevi.
- Evcik, D., & Babaoğlu, Ü. (2007). Osteoartrit etyopatogenezi. In M. Saridoğan (Ed.), *Tanıdan Tedaviye Osteoartrit* (pp. 51-71). İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri.
- Fan, Z., Söder, S., Oehler, S., Fundel, K., & Aigner, T. (2007). Activation of interleukin-1 signaling cascades in normal and osteoarthritic articular cartilage. *The American journal of pathology*, 171(3), 938-946.
- Felson, D. T., Naimark, A., Anderson, J., Kazis, L., Castelli, W., & Meenan, R. F. (1987). The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis & Rheumatism*, 30(8), 914-918.
- Felson, D. T., Zhang, Y., Anthony, J. M., Naimark, A., & Anderson, J. J. (1992). Weight loss reduces the risk for symptomatic knee osteoarthritis in womenThe Framingham Study. *Annals of internal medicine*, 116(7), 535-539.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., & Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews Genetics*, 9(2), 102-114.
- Firestein, G. S., & Manning, A. M. (1999). Signal transduction and transcription factors in rheumatic disease. *Arthritis & Rheumatism*, 42(4), 609-621.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Goldring, M. B. (2000a). Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines. *Current rheumatology reports*, 2(6), 459-465.
- Goldring, M. B. (2000b). The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 43(9), 1916-1926.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H. K., van Dongen, S., & Enright, A. J. (2008). miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic acids research*, 36(suppl 1), D154-D158.
- Güneş, H. V. (2013). Hücre Uyarı Sistemleri *Moleküler Hücre Biyolojisi* (3. baskı ed., pp. 241-279). İstanbul: İstanbul Tıp Kitapevi.
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(8), 509-524.
- Han, Z., Boyle, D. L., Aupperle, K. R., Bennett, B., Manning, A. M., & Firestein, G. S. (1999). Jun N-terminal kinase in rheumatoid arthritis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 291(1), 124-130.
- Han, Z., Boyle, D. L., Chang, L., Bennett, B., Karin, M., Yang, L., . . . Firestein, G. S. (2001). c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *Journal of Clinical Investigation*, 108(1), 73-81.
- Handel, M. L., Mcmorrow, L. B., & Gravallesse, E. M. (1995). Nuclear factor- $\kappa$ B in rheumatoid synovium. Localization of P50 and P65. *Arthritis & Rheumatism*, 38(12), 1762-1770.
- Hannan, M., Felson, D., Anderson, J., & Naimark, A. (1993). Habitual physical activity is not associated with knee osteoarthritis: the Framingham Study. *The Journal of rheumatology*, 20(4), 704-709.
- Harris, E. D., Budd, R. C., Firestein, G. S., Genovese, M. C., Segent, J. S., Ruddy, S., & Sledge, C. B. (2006a). Kemik, eklemler, bağ dokusunun yapı ve fonksiyonu. In S. R. Goldring & M. B. Goldring (Eds.), *Kelley Romatoloji* (pp. 1-34). İstanbul: Güneş Kitapevi.
- Harris, E. D., Budd, R. C., Firestein, G. S., Genovese, M. C., Segent, J. S., Ruddy, S., & Sledge, C. B. (2006b). Kondrositler. In G. Yavuzer & P. Başaran (Eds.), *Kelley Romatoloji* (pp. 203-234). İstanbul: Güneş Tıp Kitapevi.
- Harris, E. D., Budd, R. C., Firestein, G. S., Genovese, M. C., Segent, J. S., Ruddy, S., & Sledge, C. B. (2006c). Osteoartrit patogenezi. In F. Dınçer (Ed.), *Kelley Romatoloji* (6 ed., pp. 1493-1513). İstanbul: Güneş Kitapevi.
- Harris, E. D., Budd, R. C., Firestein, G. S., Genovese, M. C., Segent, J. S., Ruddy, S., & Sledge, C. B. (2006d). Romatizmal Hastalıklarda Sinyal Transdüksiyonu. In M. Bilgilişoy Filiz & E. Gilgi (Eds.), *Kelley Romatoloji* (6 ed., pp. 295-300). İstanbul: Güneş Tıp Kitapevi.

## **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

- Harris, E. D., Budd, R. C., Firestein, G. S., Genovese, M. C., Segent, J. S., Ruddy, S., & Sledge, C. B. (2006e). Romatoid Artritte Yeni Gelişen Tedaviler. In T. Tuncer (Ed.), *Kelley Romatoloji* (6 ed., pp. 951-960). İstanbul: Güneş Tıp Kitapevi.
- He, L., He, X., Lowe, S. W., & Hannon, G. J. (2007). microRNAs join the p53 network—another piece in the tumour-suppression puzzle. *Nature Reviews Cancer*, 7(11), 819-822.
- Henrotin, Y., Bruckner, P., & Pujol, J.-P. (2003). The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*, 11(10), 747-755.
- Hooper, M., Holderbaum, D., & Moskowitz, R. (2005). Clinical and laboratory findings in osteoarthritis. In W. Kopman & L. Moreland (Eds.), *Arthritis and allied conditions. A textbook of Rheumatology* (pp. 2227-2255.). Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins. (Reprinted from: 15th ed. ).
- Hooten, N. N., Abdelmohsen, K., Gorospe, M., Ejiogu, N., Zonderman, A. B., & Evans, M. K. (2010). microRNA expression patterns reveal differential expression of target genes with age. *PLoS One*, 5(5), e10724.
- Hough, A. (2005). Pathology of osteoarthritis In W. Kopman & L. Moreland (Eds.), *Arthritis and allied conditions. A textbook of Rheumatology* (pp. 2169-2197). Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins. (Reprinted from: 15th ed.).
- Huntzinger, E., & Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics*, 12(2), 99-110.
- Iliopoulos, D., Malizos, K. N., Oikonomou, P., & Tsezou, A. (2008). Integrative microRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks. *PLoS One*, 3(11), e3740.
- Johnson, G. L., & Nakamura, K. (2007). The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1773(8), 1341-1348.
- Jones, S., Watkins, G., Le Good, N., Roberts, S., Murphy, C., Brockbank, S., . . . Newham, P. (2009). The identification of differentially expressed microRNA in osteoarthritic tissue that modulate the production of TNF- $\alpha$  and MMP13. *Osteoarthritis and Cartilage*, 17(4), 464-472.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Kaçar, C., Gilgil, E., Urhan, S., Arıkan, V., Dündar, Ü., Öksüz, M., . . . Bütün, B. (2005). The prevalence of symptomatic knee and distal interphalangeal joint osteoarthritis in the urban population of Antalya, Turkey. *Rheumatology international*, 25(3), 201-204.
- Kellgren, J., & Lawrence, J. (1957). Radiological assessment of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 16(4), 494-502.
- Kim, V. N., Han, J., & Siomi, M. C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(2), 126-139.
- Kirazlı, Y. (1999). Osteoartrit. Gümüşdiş G, Doğanavşargil E (Ed) : Klinik Romatoloji, Deniz Matbaası, İstanbul. 531-547.
- Kobayashi, T., Lu, J., Cobb, B. S., Rodda, S. J., McMahan, A. P., Schipani, E., . . . Kronenberg, H. M. (2008). Dicer-dependent pathways regulate chondrocyte proliferation and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(6), 1949-1954.
- Kujala, U. M., Kettunen, J., Paananen, H., Aalto, T., Battié, M. C., Impivaara, O., . . . Sarna, S. (1995). Knee osteoarthritis in former runners, soccer players, weight lifters, and shooters. *Arthritis & Rheumatism*, 38(4), 539-546.
- Kuru, Ö. (2000). Kıkırdak Biyokimyası ve Osteoartrit Patogenezi. In Y. Karaaslan (Ed.), *Osteoartrit* (pp. 10-27). Ankara: MD Yayıncılık.
- Lanyon, P., Muir, K., Doherty, S., & Doherty, M. (2000). Assessment of a genetic contribution to osteoarthritis of the hip: sibling study. *Bmj*, 321(7270), 1179-1183.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843-854.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., . . . Kim, S. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), 415-419.
- Lee, Y., Han, J., Yeom, K.-H., Jin, H., & Kim, V. (2006). *Drosha* in primary microRNA processing. Paper presented at the Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology.
- Lewis, B. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120(1), 15-20.
- Liacini, A., Sylvester, J., Li, W. Q., & Zafarullah, M. (2002). Inhibition of interleukin-1-stimulated MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF-κB) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes. *Matrix Biology*, 21(3), 251-262.

## **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

- Loeser, R. F., Erickson, E. A., & Long, D. L. (2008). Mitogen-activated protein kinases as therapeutic targets in osteoarthritis. *Current opinion in rheumatology*, 20(5), 581.
- Lohmander, L. S. (2000). What can we do about osteoarthritis? *Arthritis Res*, 2(2), 95-100. doi: 10.1186/ar74
- Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., & Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 303(5654), 95-98.
- Luo, X., Tsai, L., Shen, N., & Yu, D. (2010). Evidence for microRNA-mediated regulation in rheumatic diseases. *Annals of the rheumatic diseases*, 69(Suppl 1), i30-i36.
- Maetzel, A., Mäkelä, M., Hawker, G., & Bombardier, C. (1997). Osteoarthritis of the hip and knee and mechanical occupational exposure--a systematic overview of the evidence. *The Journal of rheumatology*, 24(8), 1599-1607.
- Marcu, K. B., Otero, M., Olivotto, E., Borzi, R. M., & Goldring, M. B. (2010). NF-κB signaling: multiple angles to target OA. *Current drug targets*, 11(5), 599.
- Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., & Pelletier, J. (2005). Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: Kopman WJ, Moreland LW (eds). *Arthritis and allied conditions. A textbook of Rheumatology*. 15th ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, . 2199-2226.
- Meister, G. (2013). Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nature Reviews Genetics*, 14(7), 447-459.
- Melo, S. A., & Kalluri, R. (2012). Molecular pathways: microRNAs as cancer therapeutics. *Clinical cancer research*, 18(16), 4234-4239.
- Meulenbelt, I., Bijkerk, C., De Wildt, S., Miedema, H., Breedveld, F., Pols, H., . . . Slagboom, P. (1999). Haplotype analysis of three polymorphisms of the COL2A1 gene and associations with generalised radiological osteoarthritis. *Annals of human genetics*, 63(05), 393-400.
- miRBase. from <http://www.mirbase.org/>
- Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova-Agadjanyan, E. L., . . . Allen, A. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(30), 10513-10518.
- Miyaki, S., & Asahara, H. (2012). Macro view of microRNA function in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 8(9), 543-552.

## **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

- Miyaki, S., Nakasa, T., Otsuki, S., Grogan, S. P., Higashiyama, R., Inoue, A., . . . Asahara, H. (2009). MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates interleukin-1 responses. *Arthritis & Rheumatism*, 60(9), 2723-2730.
- Miyaki, S., Sato, T., Inoue, A., Otsuki, S., Ito, Y., Yokoyama, S., . . . Yamashita, S. (2010). MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis. *Genes & development*, 24(11), 1173-1185.
- Murata, K., Yoshitomi, H., Tanida, S., Ishikawa, M., Nishitani, K., Ito, H., & Nakamura, T. (2010). Research article Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis.
- Nakasa, T., Nagata, Y., Yamasaki, K., & Ochi, M. (2011). A mini-review: microRNA in arthritis. *Physiological Genomics*, 43(10), 566-570.
- Neame, R., Muir, K., Doherty, S., & Doherty, M. (2004). Genetic risk of knee osteoarthritis: a sibling study. *Annals of the rheumatic diseases*, 63(9), 1022-1027.
- O'Connell, R. M., Rao, D. S., Chaudhuri, A. A., & Baltimore, D. (2010). Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 10(2), 111-122.
- O'Connell, R. M., Taganov, K. D., Boldin, M. P., Cheng, G., & Baltimore, D. (2007). MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(5), 1604-1609.
- Oğuz, H. (1992a). Diz Ağrıları içinde Romatizmal Ağrılar. Atlas tıp Kitabevi, Konya 275-318.
- Oğuz, H. (1992b). Osteoartroz. Romatizmal Ağrılar. Atlas tıp Kitabevi, Konya 349-367.
- Okuhara, A., Nakasa, T., Shibuya, H., Niimoto, T., Adachi, N., Deie, M., & Ochi, M. (2012). Changes in microRNA expression in peripheral mononuclear cells according to the progression of osteoarthritis. *Modern rheumatology*, 22(3), 446-457.
- Olivieri, F., Spazzafumo, L., Santini, G., Lazzarini, R., Albertini, M. C., Rippo, M. R., . . . Monti, D. (2012). Age-related differences in the expression of circulating microRNAs: miR-21 as a new circulating marker of inflammaging. *Mechanisms of ageing and development*, 133(11), 675-685.
- Özgül, A. (2002). Büyüme faktörlerinin osteoartritteki rolü ve kıkırdak tamiri. *Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon ostreoartrit özel sayısı*, 2(3), 148-157.

## **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

- Pelletier, J. P., Martel-Pelletier, J., & Abramson, S. B. (2001). Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis & Rheumatism*, 44(6), 1237-1247.
- Perkins, N. D. (2007). Integrating cell-signalling pathways with NF- $\kappa$ B and IKK function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(1), 49-62.
- Roach, H. I. (2008). Potential directions for drug development for osteoarthritis.
- Rogers, L. Q., Macera, C. A., Hootman, J. M., Ainsworth, B. E., & Blair, S. N. (2002). The association between joint stress from physical activity and self-reported osteoarthritis: an analysis of the Cooper Clinic data. *Osteoarthritis and Cartilage*, 10(8), 617-622.
- Roman-Blas, J., & Jimenez, S. (2006). NF- $\kappa$ B as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(9), 839-848.
- Samancı, N., Kaçar, C., Sayın, M., & Tuncer, T. (2003). Primer Diz Osteoartritinde Metabolik, Endokrin ve Sosyo-Kültürel Risk Faktörleri ve Radyolojik Bulgularla İlişkisi. *Romatizma*, 18(2).
- Sarpel, T. (2007). Eklem kıkırdağı ve osteoartrit. In M. Sarıdoğan (Ed.), *Tanıdan Tedaviye Osteoartrit* (pp. 29-34). İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi.
- Saxne, T., Lindell, M., Mansson, B., Petersson, I., & Heinegard, D. (2003). Inflammation is a feature of the disease process in early knee joint osteoarthritis. *Rheumatology*, 42(7), 903-905.
- Sen, R., & Baltimore, D. (1986). Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell*, 47(6), 921-928.
- Sharma, L., Kapoor, D., & Issa, S. (2006). Epidemiology of osteoarthritis:
- Sheedy, F., & O'Neill, L. (2008). Adding fuel to fire: microRNAs as a new class of mediators of inflammation. *Annals of the rheumatic diseases*, 67(Suppl 3), iii50-iii55.
- Sonkoly, E., & Pivarcsi, A. (2009). microRNAs in inflammation. *International reviews of immunology*, 28(6), 535-561.
- Soyocak A, Kurt H, Özgen M, Turgut Coşan D, Değirmenci İ, Çolak E, Güneş HV. "The First Assessment Results of miRNA-146a and miRNA-155 Expression Levels in Patients with Osteoarthritis" Journal of Biotechnology, Volume 185 Supplement, p86, September 2014, European Biotechnology Congress 2014, Grand Hotel Tiziano e dei Congressi, Lecce, Italy, 15-18 May 2014.



## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Spector, T. D., Cicuttini, F., Baker, J., Loughlin, J., & Hart, D. (1996). Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *Bmj*, *312*(7036), 940-943.
- Spector, T. D., Harris, P. A., Hart, D. J., Cicuttini, F. M., Nandra, D., Etherington, J., . . . Doyle, D. V. (1996). Risk of osteoarthritis associated with long-term weight-bearing sports: a radiologic survey of the hips and knees in female ex-athletes and population controls. *Arthritis & Rheumatism*, *39*(6), 988-995.
- Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K.-J., & Baltimore, D. (2006). NF- $\kappa$ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(33), 12481-12486.
- Tak, P. P., & Firestein, G. S. (2001). NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Investigation*, *107*(1), 7-11.
- Tardif, G., Hum, D., Pelletier, J.-P., Duval, N., & Martel-Pelletier, J. (2009). Regulation of the IGFBP-5 and MMP-13 genes by the microRNAs miR-140 and miR-27a in human osteoarthritic chondrocytes. *BMC musculoskeletal disorders*, *10*(1), 148.
- Taskiran, D. (2007). Biochemical markers in cartilage injury and repair. *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica*, *41*, 6-12.
- Tobias, E. S., Connor, M., & Ferguson-Smith, M. (2014). *Tibbi Genetiğin Esasları* (6. baskı ed.). İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi.
- Tuddenham, L., Wheeler, G., Ntounia-Fousara, S., Waters, J., Hajihosseini, M. K., Clark, I., & Dalmay, T. (2006). The cartilage specific microRNA-140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells. *FEBS letters*, *580*(17), 4214-4217.
- Tuncer, T., & Gilgil, E. (2007). Osteoartrit epidemiyolojisi ve risk faktörleri. In M. Saridoğan (Ed.), *Tanıdan Tedaviye Osteoartrit* (pp. 9-20). İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri.
- Uitterlinden, A. G., Burger, H., Van Duijn, C. M., Huang, Q., Hofman, A., Birkenhäger, J. C., . . . Pols, H. A. (2000). Adjacent genes, for COL2A1 and the vitamin D receptor, are associated with separate features of radiographic osteoarthritis of the knee. *Arthritis & Rheumatism*, *43*(7), 1456-1464.
- Van der Kraan, P. M., & van den Berg, W. B. (2000). Anabolic and destructive mediators in osteoarthritis. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, *3*(3), 205-211.
- Wang, G.-K., Zhu, J.-Q., Zhang, J.-T., Li, Q., Li, Y., He, J., . . . Jing, Q. (2010). Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *European heart journal*, *31*(6), 659-666.

## **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

- Wang, K., Zhang, S., Marzolf, B., Troisch, P., Brightman, A., Hu, Z., . . . Galas, D. J. (2009). Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(11), 4402-4407.
- Westacott, C. I., & Sharif, M. (1996). *Cytokines in osteoarthritis: mediators or markers of joint destruction?* Paper presented at the Seminars in arthritis and rheumatism.
- Weston, C. R., & Davis, R. J. (2002). The JNK signal transduction pathway. *Current opinion in genetics & development*, 12(1), 14-21.
- Wieland, H. A., Michaelis, M., Kirschbaum, B. J., & Rudolphi, K. A. (2005). Osteoarthritis - an untreatable disease? *Nat Rev Drug Discov*, 4(4), 331-344. doi: 10.1038/nrd1693
- Wolheim, F. (2003). Osteoarthritis and related disorders: pathogenesis of osteoarthritis. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblat ME, Weisman M (eds). *Rheumatology*. 3rd ed. Edinburgh: Mosby. 1801-1816.
- Yamasaki, K., Nakasa, T., Miyaki, S., Ishikawa, M., Deie, M., Adachi, N., . . . Ochi, M. (2009). Expression of microRNA-146a in osteoarthritis cartilage. *Arthritis & Rheumatism*, 60(4), 1035-1041.
- Yamazaki, S., Muta, T., & Takeshige, K. (2001). A novel I $\kappa$ B protein, I $\kappa$ B- $\zeta$ , induced by proinflammatory stimuli, negatively regulates nuclear factor- $\kappa$ B in the nuclei. *Journal of Biological Chemistry*, 276(29), 27657-27662.
- Yates, L. A., Norbury, C. J., & Gilbert, R. J. (2013). The long and short of microRNA. *Cell*, 153(3), 516-519.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., & Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development*, 17(24), 3011-3016.
- Zhu, Z.-H., Jin, X.-z., Zhang, W., Chen, M., Ye, D.-Q., Zhai, Y., . . . Ding, C. (2014). Associations between vitamin D receptor gene polymorphisms and osteoarthritis: an updated meta-analysis. *Rheumatology*, ket418.

## Özgeçmiş

### Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Ahu SOYOCAK  
Doğum tarihi ve yeri : 04.01.1982/ÇORUM  
Uyruğu : T.C.  
Medeni durumu : Bekar  
İletişim adresleri : ESOGÜ Tıbbi Biyoloji AD 26480  
Eskişehir – asoyocak@gmail.com

### Eğitim Durumu

İlköğretim : Çorum Albayrak İlkokulu  
Orta öğretim : Çorum Bahçelievler Ortaokulu  
Lise : Çorum Atatürk Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı)  
Lisans : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi,  
Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü  
Yüksek Lisans : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi,  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü,  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı  
Doktora : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi,  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü,  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

**Yabancı Dil** : İngilizce

### Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı

**(ÜDS) Sonucu** : 70.00 (Mart-2007)

### Yüksek Lisans Tez Başlığı ve Tez Danışmanı :

#### Yüksek Lisans Tez Başlığı:

'Resveratrol Ve Tannik Asidin, İnsan Meme Kanseri (MCF-7) Hücre Diziğinde Apoptoz Ve Telomeraz Enzim Aktivitesine Etkileri'  
Ocak-2008.

#### Tez Danışmanı :

Prof. Dr. Ayşe BAŞARAN, ESOGÜ Tıbbi Biyoloji AD. Öğretim Üyesi.

## **Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar:**

1. Türkiye Biyologlar Derneği Üyeliği
2. Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) Araştırmacı Bilgi Sistemi (Arbis) Üyeliği
3. MOKAD (Moleküler Kanser Araştırma Derneği) Üyeliği
4. European Association for Cancer Research (EACR) Üyeliği
5. American Association for Cancer Research (AACR) Üyeliği
6. Hücre Ölümü Araştırma Derneği Üyeliği

## **Yayınlar:**

### **A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:**

- A1.** Turgut Coşan D, Saydam F, Özbayer C, Doğaner F, **Soyocak A**, Güneş HV, Değirmenci I, Kurt H, Üstüner MC, Bal C. "Impact of tannic acid on blood pressure, oxidative stress and urinary parameters in LNNA-induced hypertensive rats" *Cytotechnology*. DOI: 10.1007/S10616-013-9661-4, 2013.
- A2.** **Soyocak A**, Turgut Cosan D, Basaran A, Gunes HV, Degirmenci I, Sahin Mutlu F. "Induction of apoptosis in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells by tannic acid and resveratrol" *African Journal of Biotechnology*. 12(12), 1431-1437, 2013.
- A3.** Ozgen M, Turgut Cosan D, Doganer F, **Soyocak A**, Armagan O, Gunes HV, Degirmenci I, Ogutler Ozkara G, Sahin Mutlu F. "Relationship between plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) gene polymorphisms and osteoporosis in Turkish women" *Clinics*, 67(11):1299-1302, 2012.
- A4.** Sakrak T, Köse AA, Kivanç O, Ozer MC, Coşan DT, **Soyocak A**, Karabağlı Y, Cetin C. "The effects of combined application of autogenous fibroblast cell culture and full-tissue skin graft (FTSG) on wound healing and contraction in full-thickness tissue defects" *Burns*, 38(2):225-31, 2012.
- A5.** Cosan DT, **Soyocak A**, Basaran A, Degirmenci I, Gunes HV, Sahin FM.: "Effects of various agents on DNA fragmentation and telomerase enzyme activities in adenocarcinoma cell lines" *Molecular Biology Reports*, 38(4):2463-9, 2011.

**A6.** Cosan DT, Bayram B, **Soyocak A**, Basaran A, Gunes HV, Degirmenci I, Musmul A. "Role of Phenolic Compounds in Nitric Oxide Synthase Activity in Colon and Breast Adenocarcinoma" *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 25(5):577-580, 2010.

**A7.** Cosan D, **Soyocak A**, Basaran A, Degirmenci I, Gunes HV. "The effects of resveratrol and tannic acid on apoptosis in colon adenocarcinoma cell line" *Saudi Medical Journal*, 30(2):191-195, 2009.

**B. Uluslararası ve Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler :**

**B1. Soyocak A**, Kurt H, Özgen M, Turgut Coşan D, Değirmenci İ, Çolak E, Güneş HV. "The First Assessment Results of miRNA-146a and miRNA-155 Expression Levels in Patients with Osteoarthritis" *Journal of Biotechnology*, Volume 185 Supplement, p86, September 2014, European Biotechnology Congress 2014, Grand Hotel Tiziano e dei Congressi, Lecce, Italy, 15-18 May 2014.

**B2.** Turgut Coşan D, Doğaner F, Özgen M, **Soyocak A**, Armağan O, Güneş HV, Değirmenci I, Kuzgun S, Şahin Mutlu F. "The association between VKORC1 Gene 9041 G/A Polymorphism and Fracture in Postmenopausal Osteoporosis" *Journal of Biotechnology*, Volume 185 Supplement, p86-87, September 2014, European Biotechnology Congress 2014, Grand Hotel Tiziano e dei Congressi, Lecce, Italy, 15-18 May 2014.

**B3.** Doğaner F, Turgut Coşan D, Özbayer C, Saydam F, **Soyocak A**, Değirmenci İ, Güneş HV, Kurt H, Üstüner MC, Bal C. "The Effects of Tannic Acid on Heart Tissue and Blood in Experimental Hypertension" 4<sup>th</sup> International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress Focus on: Calcium Signaling and TRP Channels Congress, Abstract Book, p:61, Isparta, Turkey, 26-29 June 2012.

- B4.** Özbayer C, Turgut Coşan D, Saydam F, **Soyocak A**, Doğaner F, Değirmenci İ, Güneş HV, Kurt H, Üstüner MC, Bal C. "The Effect of Tannic Acid on Liver Damage Mediated by Chronic Nitric Oxide Inhibition" 4<sup>th</sup> International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress Focus on: Calcium Signaling and TRP Channels Congress, Abstract Book, p:41, Isparta, Turkey, 26-29 June 2012.
- B5.** Turgut Cosan D, **Soyocak A**, Basaran A, Degirmenci I, Gunes HV, Bal C. "Apoptotic Activity of Quercetin and Tamoxifen in CaCo-2 Cells" IV. International Congress of Molecular Medicine From Cell to Beside. Abstract Book, p68, Yeditepe University, June 27-30, 2011, Istanbul, Türkiye.\* Çalışmanın özeti aynı zamanda 'In Vivo International Journal of Experimental and Clinical Pathophysiology and Drug Research Volume 25, Number 3, p521-522, May-June 2011'de yayınlanmıştır. \*Ayrıca bu poster kongre komitesi tarafından ödüle layık görülmüştür.
- B6.** Tekedereli I, Turgut Cosan D, **Soyocak A**, Dalby K, Ozpolat B. "Doxorubicin and Tamoxifen induce autophagy as a survival pathway through Calmodulin-dependent protein Kinase III (CAMK-III) in primary ER(-) and ER(+), drug resistant and metastatic breast cancer cells" *Multidisciplinary Approaches in Cell Death Research From Yeast to Man*, Abstract Book, p28, (Oral Presentation), Silence Beach Resort, Kemer, Antalya, Turkey, 28 – 31 May 2010.
- B7.** Cosan D, **Soyocak A**, Tekedereli I, Gacar G, Karaoz K, Ozpolat B. "Doxorubicin-induced autophagy functions as a pro-survival pathway in breast cancer cells" 101st Annual Meeting, American Association for Cancer Research (AACR), Abstract Book, p 1240, Vol 51, Walter E Washington Convention Center, Washington DC, USA, April 17-21, 2010.
- B8.** Cosan D, **Soyocak A**, Kucukarabaci B, Basaran A, Degirmenci I, Gunes HV. "Role of Phenolic Compounds on NOS Enzyme Activity in Colon Adenocarcinoma" *Joint 4th Eortc Pathobiology Group Annual Meeting & 1st, International Multidisciplinary Cancer Research Congress*, Abstract Book, p 27, Antalya, Türkiye, May 21-24, 2009.

- B9.** Cosan D, Kucukarabaci B, **Soyocak A**, Basaran A, Gunes HV, Degirmenci I, Musmul A. "Is The NOS Enzyme Activity Correlated with Phenolic Compounds in Breast Adenocarcinoma?" *Joint 4th Eortc Pathobiology Group Annual Meeting & 1st, International Multidisciplinary Cancer Research Congress*. Abstract Book, p 27, Antalya, Türkiye, May 21-24, 2009.
- B10.** **Soyocak A**, Basaran A, Cosan D, Gunes HV, Degirmenci I. "Inhibition of Telomerase Activity by Tannic Acid in MCF-7 Cell Line" 2nd International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels. Abstract Book, p 49 Isparta, Türkiye, June 25-28, 2008.
- B11.** Cosan D, Basaran A, **Soyocak A**, Degirmenci I, Gunes HV. "Effects of Resveratrol on Telomerase Activity in CaCo-2 Cell Line" 2nd International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels. Abstract Book, p 49 Isparta, Türkiye, June 25-28, 2008.
- C. Yazılan uluslararası kitaplar veya kitaplarda bölümler:**
- C1.** Turgut Cosan D, **Soyocak A**: Chapter 5 "Inhibiting Telomerase Activity and Inducing Apoptosis in Cancer Cells by Several Natural Food Compounds" In Tech-Book " Reviews on Selected Topics of Telomere Biology " pp. 123-148, 2012.
- C2.** Turgut Cosan D, **Soyocak A**: Chapter 8 "Induction of Apoptosis By Polyphenolic Compounds In Cancer Cells" Springer Book "Natural compounds and Apoptosis" pp. 185-214, 2012.
- D. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :**
- D1.** **Soyocak A**, Turgut Cosan D, Basaran A, Degirmenci I, Gunes HV, Mutlu Sahin F, Colak E. "The Association Between Apoptotic Bak Protein and Quercetin in Breast And Colon Cancer Cell Lines" *FABAD J Pharm Sci*, 34: 77-83, 2009.
- D2.** **Soyocak A**, Turgut Coşan D, Başaran A Güneş, HV, Değirmenci İ. "Evaluation of Bax protein in breast cancer cells treated with tannic acid". "Tannik asit uygulanan meme kanseri hücrelerinde Bax proteinin değerlendirilmesi" *Dicle Tıp Dergisi-Dicle Medical Journal*, 38(1), 1-6, 2011.

**E. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında**

**basılan bildiriler:**

- E1.** **Soyocak A**, , Kurt H, Özdemir Z, Saydam F, Çalış İU, Kolaç U, Turgut Coşan D, Değirmenci İ, Şahin Mutlu F, Güneş HV. "Ödem İnhibisyonunda Tannik Asidin Önemi" 22. *Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı)*, Kongre Bildiri Özetleri Kitabı, sf 692, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, 23-27 Haziran 2014.
- E2.** Çalış İU, Turgut Coşan D, Saydam F, Kolaç U, **Soyocak A**, Özdemir Z, Kurt H, Güneş HV, Şahin Mutlu F, Değirmenci İ. "Oksidatif Hasara Çin Tuzu Ve Tannik Asitin Etkisi" 22. *Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı)*, Kongre Bildiri Özetleri Kitabı, sf 742, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, 23-27 Haziran 2014.
- E3.** **Soyocak A**, Kurt H, Özdemir Z, Saydam F, Çalış İU, Kolaç U, Turgut Coşan D, Değirmenci İ, Şahin Mutlu F, Güneş HV. "Formalin indüklü pençe ödeminde tannik asidin miyeloperoksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi" *XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi*, Kongre Bildiri Özetleri Kitabı, sf 292-293, Pine Bay Otel, Kuşadası, Aydın, 27-30 Ekim 2013.
- E4.** Çalış İU, Turgut Coşan D, Saydam F, Kolaç U, **Soyocak A**, Özdemir Z, Kurt H, Güneş HV, Şahin Mutlu F, Değirmenci İ. "Monosodyum glutamat kan glukozu ve tannik asit" *XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi*, Kongre Bildiri Özetleri Kitabı, sf 344, Pine Bay Otel, Kuşadası, Aydın, 27-30 Ekim 2013.
- E5.** **Soyocak A**, Turgut Coşan D, Doğaner F, Özbayer C, Saydam F, Değirmenci İ, Güneş HV, Kurt H, Üstüner MC, Bal C. "Doğal bir bileşen olan tannik asit hipertansiyonda etkili midir?" *XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi*, Kongre Bildiri Özetleri Kitabı, sf 130, Porto Bello Hotel, Antalya, 27-30 Ekim 2011. ve Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi 31(6), S130, 2011.



- E6.** Saydam F, Turgut Coşan D, **Soyocak A**, Doğaner F, Özbayer C, Güneş HV, Değirmenci İ, Üstüner MC, Kurt H, Bal C. "N (omega)-nitro-L-arjinin uygulanan sıçanlarda tannik asitin sistolik kan basıncı, böbrek dokusundaki oksidatif stres ve bazı idrar parametreleri üzerine etkisi" XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Kongre Bildiri Özetleri Kitabı, sf 130, Porto Bello Hotel, Antalya, 27-30 Ekim 2011. ve Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi 31(6), S130, 2011.
- E7.** **Soyocak A**, Coşan D, Başaran A, Güneş HV, Değirmenci İ, Çolak E. "MCF-7 kersetin ve BAK proteini" XI. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Kongre Bildiri Özetleri Kitabı, sf 88, Bodrum, Muğla 28-31 Ekim 2009.
- E8.** Başaran A, **Soyocak A**, Coşan D, Güneş HV, Değirmenci İ, Mutlu FŞ. "MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Dizisinde Telomeraz Enzim Aktivitesine Resveratrolün Etkisi" *II. Multidisipliner Kanseri Araştırma Sempozyumu (Uluslararası Katılımlı)*, Kongre Bildiri Özetleri Kitabı, sf 23, Grand Yazıcı Otel Uludağ/Bursa, 24-27 Şubat 2008.
- E9.** Coşan D, **Soyocak A**, Başaran A, Değirmenci İ, Güneş HV, Mutlu FŞ. "Kersetinin CaCo-2 İnsan Kolon Kanseri Hücre Dizisinde Bak Proteinine Etkisi" *II. Multidisipliner Kanseri Araştırma Sempozyumu (Uluslararası Katılımlı)*, Kongre Bildiri Özetleri Kitabı, sf 22, Grand Yazıcı Otel Uludağ/Bursa, 24-27 Şubat 2008.

## **Bilimsel Etkinlikler**

Burslar :

Proje Bursiyeri 'İnsan meme kanseri hücrelerinin invazyon ve metastazında voltaj kapılı potasyum kanallarının (Kv1.3 ve Kv10.1) rolü' Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TUBİTAK) Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı (1001).

## Ödüller :

1. En İyi Poster Ödülü, "Turgut Cosan D, **Soyocak A**, Basaran A, Degirmenci I, Gunes HV Bal C. Apoptotic Activity of Quercetin and Tamoxifen in CaCo-2 Cells" adlı çalışmaya '4th International Congress of Molecular Medicine From Cell to Beside, Yeditepe University, June 27-30, 2011, Istanbul, Turkey' kongresinde verilmiştir.

## Projeler :

1. 'Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) Gen Polimorfizmlerinin Osteoporoz ile İlişkinin Belirlenmesi' Aksaray Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu Projesi, Proje Çalışanı.  
Başlama Tarihi: 17.03.2014      Proje no: 2014-018  
Bitiş Tarihi: 17.03.2016      Bütçe: 7.987,00-TL
2. 'Osteoporozda Vitamin K Epoksit Redüktaz Kompleks Subunit-1 (VKROC1) Polimorfiziminin Araştırılması' Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu Projesi, Proje Çalışanı.  
Başlama Tarihi: 14.08.2012      Proje no: 201211D08  
Bitiş Tarihi: 14.08.2013      Bütçe: 14.537,00-TL
3. 'Osteoartritli Hastalarda Jun-N-Terminal Kinaz (JNK), Nükleer Faktör Kapa B (NF-κB), miRNA-146a ve miRNA-155 İlişkinin Araştırılması' Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu Projesi, Proje Çalışanı.  
Başlama Tarihi: 12.08.2011      Proje no: 201111027  
Bitiş Tarihi: 12.08.2014      Bütçe: 86.154,00-TL
4. 'İnsan meme kanser hücrelerinin invazyon ve metastazında voltaj kapılı potasyum kanallarının (Kv1.3 ve Kv10.1) rolü' Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TUBİTAK) Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı (1001), Bursiyer.  
Başlama Tarihi: 01.05.2011      Proje no: 110S476  
Bitiş Tarihi: 01.09.2014      Bütçe: 299.860-TL

5. 'Resveratrol ve Tannik Asidin, İnsan Meme Kanseri (MCF-7) ve İnsan Kolon Adenokarsinoma (Caco-2) Hücre Dizilerinde Apoptoz ve Telomeraz Enzim Aktivitesine Etkileri' Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu Projesi, Proje Çalışanı.  
Başlama Tarihi: 2007 Proje no: 200711014  
Bitiş Tarihi: 2008 Bütçe: 148.095,17 TL

#### Uluslararası Kongre Katılımları :

2. European Biotechnology Congress 2014, May 15-18 2014, Lecce, Italy.
3. ISEH Society for Hematology and Stem Cells 42nd Annual Scientific Meeting, August 22-25 2013, Vienna, Austria.
4. 4th International Congress of Molecular Medicine From Cell to Beside. Yeditepe University, June 27-30, 2011, Istanbul, Turkey.
5. 16th International Biomedical Science and Technology Symposium. Istanbul University Beyazıt Campus, September 28-October 2, 2010, Istanbul, Turkey.
6. 101st Annual Meeting, American Association for Cancer Research (AACR). Walter E Washington Convention Center, April 17-21, 2010 Washington DC, USA.
7. Joint 4th EORTC Pathobiology Group Annual Meeting & 1st International Multidisciplinary Cancer Research Congress. Queen's Park Resort Hotel, May 21-24, 2009, Antalya, Türkiye.
8. 2nd International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels. Süleyman Demirel University, June 25-28, 2008, Isparta, Turkey.

#### Ulusal Kongre ve Sempozyum Katılımları :

1. İyon Kanalları ve Kanseri Sempozyumu, 29 Mayıs 2014, İstanbul, Türkiye.
2. XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27-30 Ekim 2013, Pine Bay Otel, Kuşadası, Aydın, Türkiye.

3. IV. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi, 13-16 Aralık 2012, Mete Cengiz Kongre Kültür Merkezi, Uludağ Üniversitesi, Bursa, Türkiye.
4. XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27-30 Ekim 2011, Porto Bello Hotel, Antalya, Türkiye.
5. II. Kök Hücre Kursu ve VI. Kök Hücre Sempozyumu, 24-25 Haziran 2011, Ankara Üniversitesi, Ankara, Türkiye.
6. XI. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 28-31 Ekim 2009, Diamond of Bodrum Hotel, Bodrum, Muğla, Türkiye.
7. Programlı Hücre lm Sempozyumu, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Prof. Dr. Cem'i Demiroğlu Oditoryumu, 9 Nisan 2008, İstanbul, Türkiye.
8. II. Multidisipliner Kanser Araştırma Sempozyumu (Uluslararası Katılımlı), 24-27 şubat 2008, Grand Yazıcı Otel, Uludağ, Bursa, Türkiye.
9. X. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 6-9 Eylül 2007, Otium Zeynep Otel, Antalya, Türkiye.

Kurs ve alıştay Katılımları :

1. Eppendorf New Brunswick Semineri, 22 Mayıs 2014, Anemon Otel, Eskişehir, Türkiye.
2. Başarılı Sunum Yapma Teknikleri, 25-26 Mart 2013, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, Türkiye.
3. II. Hücre lm Araştırma Teknikleri Teorik Kursu, 01-02 Kasım 2012, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, Türkiye.
4. I. Hücre lm Araştırma Teknikleri Teorik Kursu, 24-24 Kasım 2011, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir, Türkiye.
5. Moleküler Biyolojide Yeni Teknolojiler Kursu, XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 26 Ekim 2011, Porto Bello Hotel, Antalya, Türkiye.
6. II. Kök Hücre Kursu ve VI. Kök Hücre Sempozyumu, 24-25 Haziran 2011, Ankara Üniversitesi, Ankara, Türkiye.
7. RNA Tabanlı Moleküler Yöntemler Uygulamalı Eğitim Kursu, 4-5 Haziran 2011, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.

8. DNA Tabanlı Moleküler Yöntemler Uygulamalı Eğitim Kursu, 2-3 Haziran 2011, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.
9. AÜBİBAM Leica Course on: Advanced Confocal&EM/CLEM techniques, 25-26 May 2011, Eskisehir, Türkiye.
10. Çalıştay 'Advances in Immunology and Cancer Biology Workshop' April 15-17, 2011, Boğaziçi University, Istanbul, Türkiye.
11. Oksidatif Stres, DNA Hasarı, DNA Onarımı, Hastalıklarla İlişkisi, Teorik Kurs 15-18 Haziran 2010, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kampüsü, İnciraltı, İzmir, Türkiye.
12. Kış Okulu 'Winter School on Frontiers in Nanomedicine and Nanobiotechnology' January 10-13, 2010, Bilkent University, Ankara, Turkey.
13. ESOGÜ Tıp Fakültesi Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi (TICAM) "IV. Deneysel Hayvan Çalışmaları Temel Eğitim Günleri" teorik ve pratik uygulama kursu, 24-25 Ekim 2005, Eskişehir, Türkiye.

Sertifikalar :

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Deneysel Hayvanları Kullanım Sertifikası, 2007.