

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**İNSAN DİZ EKLEM KIKIRDAK
HASARLANMASINDA (OSTEOARTRİT) APOPTOZUN
ROLÜNÜN DİYABET ve MEKANİK YÜKLENME
ÜZERİNDEN İNCELENMESİ**

Murat TOKUŞ

**BİYOFİZİK TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMANI
Doç. Dr. Figen ÇİÇEK**

ADANA-2022

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**İNSAN DİZ EKLEM KIKIRDAK
HASARLANMASINDA (OSTEOARTRİT) APOPTOZUN
ROLÜNÜN DİYABET ve MEKANİK YÜKLENME
ÜZERİNDEN İNCELENMESİ**

Murat TOKUŞ

**BİYOFİZİK TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMANI
Doç. Dr. Figen ÇİÇEK**

Bu Tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TYL-2019-12467 nolu proje ile desteklenmiştir.

ADANA-2022

KABUL VE ONAY

Biyofizik Anabilim Dalı

Tezli Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan

**“İnsan Diz Eklem Kıkırdak Hasarlanmasında (Osteoartrit) Apoptozun Rolünün
Diyabet ve Mekanik Yüklenme Üzerinden İncelenmesi ”**

adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 04/03/2022

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Işıl ÖCAL
Çukurova Üniversitesi
Başkan

Doç. Dr. Osman Çiloğlu
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Üye

Doç. Dr. Figen ÇİÇEK
Çukurova Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve sayılı
kararı ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Behice DURGUN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI
ETİK BEYANI

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu bildirir, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 04/03/2022

Murat TOKUŞ

Kayıtlı olunan Program : Biyofizik ABD – Tezli Yüksek Lisans
Tezin Konusu : **İnsan Diz Eklem Kıkırdak Hasarlanmasında (Osteoartrit) Apoptozun Rolünün Mekanik Yüklenme ve Diyabet Üzerinden İncelenmesi**
Tezin Türü : Yüksek Lisans Doktora
Danışmanın Adı-Soyadı : Doç. Dr. Figen ÇİÇEK
Danışmanın İletişim Bilgileri: Ç.Ü Tıp Fakültesi Biyofizik ABD
Telefon : 0322 338 60 60 E-Posta: fcicek@cu.edu.tr
Öğrencinin İletişim Bilgileri :
Telefon : 0553 300 23 12 E-Posta:mtokus@cu.edu.tr
Adresi : Ç.Ü Tıp Fakültesi Biyofizik ABD

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde ve tezimin oluşma aşamasında s¼rekli destek olan, deneyim ve bilgilerini hişbir zaman esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Figen IEK'e teřekk¼r¼ bir borç bilirim.

G¼reve başladığım ilk g¼nden beri bana her zaman destek olan ve yardımlarını esirgemeyen emekli b¼l¼m başkanımız Sayın Prof. Dr. İsmail G¼NAY'a ve b¼l¼m başkanımız Sayın Prof. Dr. Işıl ¼CAL hocalarıma; ayrıca her konuda yardımını esirgemeyen sayın Doç. Dr. Aykut PELİT hocama teřekk¼rlerimi sunarım.

Eğitimim sırasında bilgi ve tecr¼belerinden yararlandığım b¼l¼m¼m¼z¼n diğer ¼đretim¼yelerine teřekk¼rlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarım ve molek¼ler analizlerim sırasında yardımcı olan Sayın Dr. ağıl COŞKUN'a, her konuda yardımını esirgemeyen b¼l¼m sekreterimiz Perihan YEŐİL'e teřekk¼r ederim.

Ve sevgili ailem, tezimi yazdığım s¼re boyunca b¼y¼k bir sabır ve hořg¼r¼ ile zamanlarından feragat eden, her zaman yanımda olduklarını hissettiren en b¼y¼k destekçilerim eşim Figen TOKUŞ'a, kızlarım Buse ve Asel TOKUŞ'a sonsuz teřekk¼rler.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	iii
ETİK BEYANI	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1. Diz Osteoartriti.....	3
2.1.1. Tanım	3
2.1.2. Epidemiyoloji.....	4
2.1.3. Patogenezi	4
2.1.4. Risk Faktörleri.....	5
2.2. Kıkırdak Doku.....	7
2.2.1. Kondrositler	7
2.3. Diyabetes mellitus (DM).....	10
2.3.1. Tip 1 Diyabet	11
2.3.2. Tip 2 Diyabet	11
2.4. Dizde Osteoartrit	11
2.5. Apoptozis	12
2.5.1. Apoptozisin Görüldüğü Hücre Çeşitleri.....	12
2.5.2. Apoptozisin Morfolojisi.....	12
2.6. Kaspazlar.....	14
2.6.1. Kaspazların Sınıflandırılması.....	15
2.7. Kalsiyum Kalmodulin Bağımlı Protein Kinaz Ailesi.....	16
2.7.1. CAMKII.....	17

2.8. Bcl-2 Ailesi	18
2.9. Western Blot Yöntemi	19
2.10. Gerçek Zamanlı PCR (Real Time PCR)	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Dokuların Temin Edilmesi.....	21
3.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	21
3.3. Western Blot Analizi.....	21
3.3.1. Proteinlerin Yüklenmesi ve Jelde Yürütülmesi	25
3.3.2. Proteinlerin Transferi ve İlgili Proteinlerin Belirlenmesi	25
3.3.2.1 Bloklama.....	25
3.3.2.2. Birincil-İkincil Antikor	25
3.3.2.3. Görüntüleme	26
3.3.2.4. Birincil ve İkincil Antikorların Membrandan Uzaklaştırılması.....	26
3.4. Hedef Gen Ekspresyonların Belirlenmesi.....	26
3.4.1. RNA İzolasyonu.....	26
3.4.2. cDNA Sentezi	27
3.4.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PCR) Analizi	28
3.5. Kullanılan Kimyasallar	29
3.6. İstatistiksel Analiz	29
4. BULGULAR	30
4.1. Protein Ekspresyonları	30
4.1.1. Kaspaz-3 Protein Ekspresyonu	30
4.1.2. Bcl-2 Protein Ekspresyonu.....	31
4.1.3. CAMKII Protein Ekspresyonu.....	34
4.2. Gruplar Arası CAMK2A Gen Ekspresyon Değişimleri.....	36
5. TARTIŞMA	37
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	41
KAYNAKÇA	42
ÖZGEÇMİŞ	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:		Sayfa No:
Şekil 2.1.	Dizlerde Osteoartrit Oluşum Aşamaları (24).....	3
Şekil 2.2.	Kondrosit Hücrelerinde Yer Alan İyon Kanalları Ve Proteinler (70).....	8
Şekil 2.3.	Kondrositlerde Apoptoz Oluşumu (63).	10
Şekil 2.4.	Apoptozisde Görülen Morfolojik Değişimler (80).	14
Şekil 2.5.	Kaspazlar (91).	15
Şekil 2.6.	Cam-Kinazların Hücre İçi Sinyal Yolakları (96).....	17
Şekil 2.7.	Bcl-2 Ailesinin Üyeleri (100).....	18
Şekil 3.1.	Western Blot Aşamalarının Şematik Gösterimi (105).....	24
Şekil 4.1.	Oa'lı Hastaların Kıkırdak Örneklerindeki Kaspaz-3 Değişimi.....	31
Şekil 4.2.	Oa'lı Hastaların Kıkırdak Örneklerindeki Bcl-2 Değişimi.....	33
Şekil 4.3.	Oa'lı Hastaların Kıkırdak Örneklerindeki Camk1- α Değişimi.....	35
Şekil 4.4.	Gruplara Ait Rölatif Camk2a Gen Ekspresyon Seviyeleri	36

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge No:	Sayfa No:
Çizelge 3.1. Cdna Sentez Reaksiyonu	27
Çizelge 3.2. Cdna Sentezi İçin Uygulanan Sıcaklık Döngü Programı.....	28
Çizelge 3.3. Real Time Pcr Çalışmalarında Kullanılan Hedefe Spesifik Primerler.....	28
Çizelge 3.4. Gerçek Zamanlı Pcr Reaksiyon İçeriği.....	29
Çizelge 3.5. Real Time Pcr Çalışmalarında Uygulanan Sıcaklık Döngü Programı	29



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

OA	: Osteoartrit
DM	: Diyabetes Mellitus
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
ECM	: Ekstraselüler Matris
EM	: Zar Potansiyeli
PS	: Fosfatidil Serin
CAMK	: Kalsiyum/Kalmodulin-Bağımlı Protein Kinazlar
ERK2	: Ekstraselüler Düzenlenen Kinase 2
CDK2	: Siklin Bağımlı Kinaz 2
PVDF	: Poliviniliden Diflorür
VKİ	: Vücut Kitle İndeksi
HK	: Hafif Kilolu
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
MIA	: Monoiodoasetik asit
ECL	: Kemilüminesans

ÖZET

İnsan Diz Eklem Kıkırdak Hasarlanmasında (Osteoartrit) Apoptozun Rolünün Diyabet ve Mekanik Yüklenme Üzerinden İncelenmesi

İnsanlarda en sık görülen ve özellikle yaşlılarda en büyük kronik sakatlık sebebi olan osteoartrit, eklem dokusunun parçalanması ve onarımı arasındaki denge bozulduğunda oluşur. Kondrosit apoptozunun osteoartrit'in (OA) ilerlemesinde merkezi bir rolü olduğu bilinmekle birlikte, mekanizması tam olarak aydınlatılmamıştır. Dolayısıyla bu tez çalışmasının amacı insan eklem kıkırdağında diyabet ve mekanik yüklenme (obezite) nedeniyle oluşan osteoartrit'teki apoptotik sinyal yollarını biyomoleküller aracılığı ile inceleyerek, apoptoz ile osteoartrit arasındaki bağlantıyı kıkırdağa gelen yük miktarı üzerinden tanımlamak olmuştur.

Çalışmada total diz protezi ameliyatlarından eksizyon materyali olan örnekler kullanıldı. OA'lı hastalar Vücut Kitle İndekslerine (VKİ) göre gruplara ayrıldı. Ayrıca çalışmamızda diyabetli (DM) hastaların da örnekleri alınarak, apoptoz için pozitif kontrol grubu oluşturuldu. Ardından diyabetli hastalar da yine VKİ'lerine göre ayrılarak dört farklı araştırma grubu elde edildi: Hafif Kilolu (HK), DM+HK, Obez ve DM+Obez. Çalışmada dokulardan lizatlar hazırlandı ve Bcl-2, kaspaz-3 ve CAMK II protein aktivasyonları western blot yöntemi ile ölçüldü. CAMK II proteinini kodlayan gen ekspresyon seviyelerindeki değişimler ise gerçek zamanlı PCR yöntemi ile belirlendi.

Tez çalışmamızda kaspaz-3 protein ekspresyonunun HK grubuna göre bütün gruplarda arttığı gözlemlendi. Bununla beraber Bcl-2 ve CAMK proteinlerinin de tüm gruplarda arttığı (DM, DM+Obez, Obez), ancak Obez ve DM+Obez gruplarında artışın daha fazla olduğu görüldü.

Bu veriler ışığında, insan diz kıkırdağında gelişen OA'da, metabolik hastalıkların kondrosit apoptozunu arttırdığını gözlemledik. Bununla birlikte Bcl-2 ve CAMKII aktivasyonundaki artış, DM ve obezite gibi hastalıklarda apoptoza karşı olan anabolik süreçlerin, katabolik süreçlere rağmen hala devam ettiğini göstermiştir. Bcl-2 ve CAMKII aktivasyonunun obezitede DM'ye göre daha fazla olması ise, mekanik yüklenme sonucu oluşan OA'da daha aktif bir anabolik sürecin olduğunu işaret etmektedir.

Anahtar Sözcükler: Apoptoz, CAMK, Kondrosit, Obezite, Osteoartrit

ABSTRACT

Determination The Role of Apoptosis on Cartilage Injury (Osteoarthritis) in Human Knee Joint Chondrocytes Through Diabetes and Mechanical Loading

Osteoarthritis (OA), which is the most common cause of chronic disability in humans, especially in the elderly, occurs when the balance between joint disintegration and repair is disrupted. Although apoptosis of chondrocyte is the main factor in the development of osteoarthritis, its mechanism is unknown yet. Therefore, the main aim of the present study was to determine apoptotic signal pathways by biomolecular markers in osteoarthritis caused by diabetes and mechanical loading (obesity) in human articular cartilage and to define the relationship between apoptosis and osteoarthritis through the amount of load on cartilage.

In the present study, samples with excision material from total knee replacement were used. OA patients were divided into groups according to their body mass index (BMI). In addition, samples belong to diabetes (DM) patients were also taken in our study, and a positive control group was formed for apoptosis. Then, patients with diabetes were also separated according to their BMIs and four different groups were constructed as Light Weight (LW), DM+LW, Obese and LW+Obese. In the study, lysates were prepared from tissues, and Bcl-2, caspase-3 and CAMK II protein activations were measured by western blot method. Changes in gene expression levels encoding CAMKII protein were determined by real-time PCR method.

In our thesis study, it was observed that caspase-3 protein expression increased in all groups compared to the LW group. In addition, Bcl-2 and CAMK proteins were also increased in all groups (DM, DM+Obese, Obese), but the increase in the Obese and DM+Obese groups were highest.

In the light of these data, we observed that chondrocyte apoptosis was increased by metabolic diseases in human knee cartilage osteoarthritis. However, the increase in Bcl-2 and CAMKII activation showed that anabolic processes against apoptosis still continue despite catabolic processes in diseases such as DM and obesity. The fact that Bcl-2 and CAMKII activation is higher in obesity than in DM indicates that there is a more active anabolic process in OA caused by mechanical loading.

Keywords: Apoptosis, CAMK, Chondrocytes, Obesity, Osteoarthritis

1. GİRİŞ

Osteoartrit (OA), genellikle ileri yaştaki bireylerde görülen, sinovyal membran, kıkırdakta aşınma, eklem kapsülündeki farklılıklarla ortaya çıkan dejeneratif bir eklem hastalığıdır (1). OA'lı bireylerde eklem normal yapısının bozulması ile birlikte proprioseptif duyu kaybı, kas kuvveti kaybı, krepitasyon, inflamasyon ve sinoviyal sıvıda artış görülür (2).

Osteoartrit, prevalansı ve insidansı insan ömrünün uzamasıyla artmıştır ve dünya nüfusunun %10'unda semptomatik seyretmektedir. Yetişkin bireylerin % 33'ünde osteoartrit bulgusu bulunurken, 65 yaş üzerindeki bireylerin ise %90'ında radyolojik olarak osteoartrit bulgusu bulunur ve yaşlılıktaki ağrı ve özürüllüğün en önemli sebeplerinden biridir (3-5). Özellikle yük taşıyan diz, kalça gibi eklemlerde progresif olarak ortaya çıkar. Kıkırdaktaki yıkım, subkondral skleroz ve osteofit oluşumu ile kendini gösterir.

Diz osteoartrit'inin gelişme riskini artıran faktörlerden bazıları cinsiyet (kadınlarda daha fazla oranlarda görülme olasılığı), yaşlanma, obezite, immobilizasyon, bazı yarış sporları, bazı meslekler, zedelenmiş eklem yük binmeye devam etmesi ve bazı genetik faktörlerdir (6). Diz OA'sının diz eklemi ve etrafındaki dokularda meydana getirdiği değişiklikler, hastalarda ağrı, sertlik, instabilite, eklemde şişlik, eklem hareket açıklığında azalma ve eklem deformasyonu gibi klinik bulgulara ve bunlara bağlı fonksiyon kaybı, azalmış mobilite ve yürüyüş bozuklukları ile yaşam kalitesinde azalma meydana gelir (7-12).

OA'da diz eklemi en sık tutulan eklemlerden birisidir (13). Erkeklerde kadınlara göre daha az görülür (14). İleri yaşlarda radyografik ya da klinik olmayan osteoartrit'in görülme oranlarında artışlar görülür (15). Osteoartrit geriatric bireylerin ortalama %80'ini etkilemektedir. OA, hem sağlık hem de ekonomik açıdan büyük kayıplara neden olan ve yaşlı nüfusu en fazla etkileyen bir hastalık türüdür (16).

Diz OA'sı eklemlerde ağrı ve eklem tutukluluğunun yanında, eklemlerde hareket oranının ve Quadriceps Femoris kas kuvvetinin azalması, fiziksel kusurların ve fonksiyonel özgürlüğünün azalması gibi durumlara sebebiyet vermektedir (17). Bu sebeple hasta tedavisinde varılmak istenen nokta, eklem tutukluğu ve ağrıyı azaltmak, kas kuvveti artırılarak fonksiyonelliği üst düzeye çıkarmak ve günlük yaşam

etkinliklerini arttırma hedeflenmiştir. Bu hedefler ışığında tedavi programlarında farklı tedavi metodları yer tutmaktadır (18,19).

Osteoartrit tedavisinde cerrahi girişim, farmakolojik tedavi ve non-farmakolojik gibi tedavi yöntemleri uygulanmaktadır. Yapılan araştırmalarda non-farmakolojik tedaviler arasında fizyoterapi uygulamaları, diyabetik yaklaşımlar (kilo kontrolü), bireysel eğitim programları ve akupunktur yer almaktadır (20). Bunların dışında:

Egzersiz, bantlama, ortez kullanımı ve manuel terapi diz osteoartrit tedavisinde önemli yeri olan fizyoterapi ve rehabilitasyon uygulamalarında kullanılmaktadır. Ancak hangi tedavi yönteminin daha iyi ve etkili olduğu ve hatta OA oluşumunu moleküler düzeyde engellemek için OA hakkında daha fazla bilgi sahibi olunması ile gerçekleştirilebilir.

Çalışmamızda SBÜ Adana Şehir Eğitim ve Araştırma Hastanesinde gonartroz tanısı konmuş ve total diz protezi ameliyatı olan yaşları 50 ile 70 arasında değişen 40 hastanın diz kıkırdak dokuları kullanıldı. Toplanan örnekler ilk olarak hastaların VKİ'lerine (vücut kitle indeksi) göre ayrıldı. Buna göre birinci grup VKİ 25 ve 26 olan hafif kilolu (HK) hastaların örnekleri ile oluşturuldu. Çalışmadaki ikinci grup ise VKİ'leri 30 ile 35 aralığındaki obez hastaların kıkırdak örneklerinden oluşturuldu. Bu grup çalışmamızda obez olarak isimlendirildi.

Osteoartrit oluşumunda apoptotik süreçlerin belirleyiciliği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Çalışmamızda obezitenin apoptotik etkilerini hücresel düzeyde karşılaştırmak için Tip 2 diyabetli hastaların örnekleri de çalışmaya dâhil edildi. Bu örnekler de kendi içlerinde, hafif kilolu ve diyabet (HK+DM), diyabet ve obez (DM+OB) olarak iki gruba ayrıldı. Böylece obezite ve diyabet hastalıkları üzerinden osteoartrit'te gelişen kıkırdak hasarlanmasında sinyal molekülleri üzerinden apoptoz yolları incelendi.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Diz Osteoartriti

2.1.1. Tanım

Amerikan Romatoloji Derneği Tanı ve Tedavi Kriterleri Komitesi tanımına göre Osteoartrit (OA), kemikte ve kıkırdakta meydana gelen değişiklikler sonucu oluşan, eklemlerde artan ve ağrıya sebep olma ihtimali yüksek olan bir süreç şeklinde tanımlanmıştır(21).

En çok görülen kas iskelet sistemi hastalıklarından birisi olan osteoartrit, sinoviyal eklemlerdeki kıkırdak yapının ilerlemiş derecede dejenerasyonu ile ilişkilidir (22). Dizde genellikle OA'nın meydana geldiği "bölmeler" olarak da bilinen üç temas bölgesi vardır. Bu üç temas bölgesinden Medial tibiofemoral komponenti en iyi tutarken (%75), ikinci sırada patellofemoral komponenti (%50) tutmaktadır. Üçüncü sırada bulunan Lateral tibiofemoral komponent tutulumu ise tek başına çok az görülür (23). Osteoartrit, dizde bulunan üç bileşeni de etkiler.



Şekil 2.1. Dizlerde Osteoartrit oluşum aşamaları (24)

2.1.2. Epidemiyoloji

Yaşlılarda özürülülüğe yol açabilen OA dünyada çok sık rastlanan hastalıklardan birisidir. Hastalığın görülme oranının yaş ilerledikçe arttığı yapılan araştırmalarda kanıtlanmıştır (25). Araştırmalarda OA sıklığının 60 yaş üzerindeki bireylere bakıldığında %11 ile %50 arasında olduğu bulunmuştur (26). 50 yaş üzeri insanlarda semptomatik diz osteoartrit görülme sıklığında, Türkiye'deki duruma bakılacak olunursa, erkeklerde %8, kadınlarda ise %22,5 olarak açıklanmıştır (27). Radyolojik OA prevalansında kadınlarda sadece %34'e karşı %31 gibi hafif bir artış gözlenmektedir (23). Semptomatik diz Osteoartrit prevalansının ise kadınlarda erkeklerden oldukça fazla olduğu görülmektedir (Kadınlarda %22,5, erkeklerde %8).

2.1.3. Patogenezi

Dejeneratif bir eklem hastalığı olan OA'nın görülme sıklığı yaşla birlikte artmaktadır. Çoğunlukla yük taşıyan eklemlerde görülmektedir. Her sinovyal eklemi tutabilen OA genellikle omurgada ellerde, kalçalarda ve dizlerde meydana gelir. Mekanizması günümüzde tam olarak ortaya konulamamıştır. Metabolik, biyokimyasal ve morfolojik olmak üzere osteoartrit'te ortaya çıkan değişimler üç temel grupta toplanır. Kıkırdak yüzeyinde çatlakların gelişmesi ve belirginleşmesi, görülen morfolojik değişimler arasındadır. OA ilerledikçe eklem kıkırdağı ülserleşir, çatlaklar ve eklem yüzeyinin düzensizliği gittikçe artar. (28).

Osteoartrit ilerledikçe kondrositlerin sentezlediği içeriği parçalayan enzimlerin miktarı biyokimyasal olarak artış gösterir. Ekstrasellüler Matriksin (ECM) sertliği ve dayanıklılığı azalır. Kıkırdak ECM'si, su ve makromoleküllerden (glikoprotein, kollajen, non-kollajenöz proteinler, proteoglikan gibi) oluşur. Matriksin içeriğini yıkan enzimlerin artışıyla metabolik farklılıklar ortaya çıkar. Matriks metalloproteazların aktivitesinin artması kıkırdağın ve eklemlerin bozulması sonucu olarak gelişir. Matriksin esnekliği ve dayanıklılığının azalması ve bunun sonucunda eklemlerin zarar görmesi, eklem kıkırdağının yapısal değişiminin sonucu olarak ortaya çıkar (29). Matriks, eklem kıkırdağında kıkırdağa esneklik ve destek sağlar. Proteoglikanlar ve tip-2 kollajen bu matriks içerisinde çok miktarda bulunur. Proteoglikanlar tip-2 kollajenlerde eklemlerin gerilim kuvvetinde rol oynar. Ayrıca yüke ve basınca karşı eklemin dayanıklılığını ve korunmasını sağlar. Bunların dışında kıkırdak yüzeyleri

arasında meydana gelen aşınma ve sürtünmeyi proteoglikanların yapısında bulunan glukozaminlerin sülfatlanmış formu azaltır. ECM'nin yapım ve yıkım arasındaki oranın bozulması sonucunda osteoartrit'in oluşum mekanizmasının olduğu düşünülmektedir (30,31). Bir diğer mekanizma da kollajen yapısı ve matriks içeriği dokularda üretilen reaktif oksijen türevlerinin (ROS) oksidatif stres meydana getirmesiyle bozulmasıdır. Osteoartrit'in başlangıcında ön planda olan kıkırdakta oluşan değişimlerdir. Bu değişimler ise açıklandığı gibi proteoglikanlar ve tip-2 kollojenlerin yıkılması sonucu oluşan değişimlerdir. Kıkırdakta oluşan değişimler içinde bir diğer önemli mekanizmalardan biriside IL-1 ile indüklenen insan kıkırdak hücrelerinden proinflamatuvar medyatörlerin salınmasıdır. Bunun dışında matriks içeriğindeki makromolekülleri parçalayan enzimleri IL-1 aktif hale getirir ve bunun sonucunda bu makromoleküllerin sentezinin aksamasına sebep olur (28,32). Ayrıca OA geriatric toplumda en çok meydana gelen fiziksel yetersizliklerden birisidir. Eklemlerde ağrı ve tutkunluk ilerleyen yaşlarda kendini gösterir. Kemik uçlarının birbirine sürtmeye başlamasının sebebi kemiklerin birbirine yaklaşmasıdır ve bunun sonucunda eklemlerde şişlik, sertlik, ağrı ve tutukluk oluşmaya başlar. Eski zamanlarda yaşlanmaya bağlı olarak dejeneratif eklem hastalığı gibi değerlendirilen osteoartrit günümüzde de, genetik yatkınlık, eklem bütünlüğü, mekanik güçler, hücresel ve biyokimyasal süreçler ile lokal inflamasyon gibi birçok nedene bağlı olan bir hastalık olarak değerlendirilmeye başlanılmıştır (33).

Patogenezini kısaca özetlersek, dejeneratif bir eklem hastalığı olan OA genel olarak yük taşıyan eklemlerde kıkırdak hasarı sonucunda meydana gelir. Bu hastalıkta eklem kıkırdağı giderek kaybolmaya başlar (34-36). Osteoartrit'in oluşum sebebi eklem kıkırdağında meydana gelen biyolojik, mekanik, enzimatik ve moleküler değişimler sonucunda oluşan yapım ve yıkım dengesinin bozulmasıdır. Bu durum kıkırdak dokunun ilerleyici yıkımı ile karakterize olur (37). OA olan bireylerde eklem kıkırdağında çatlaklar, yırtıklar, kırılmalar ve ülserasyon meydana gelebilir.

2.1.4. Risk Faktörleri

Yaş

Yaş ile osteoartrit arasında oldukça kuvvetli bir risk faktörü bulunur. 25 ile 35 yaş arasındaki bireylerde %0,1 risk faktörü oranı görülürken ileri yaşlarda özellikle 65

yaş üzerine çıkıldığında bu oran %40-50 olduğu görülmüştür. 75 yaş üzeri bireylerde ortalamanın %80'leri geçtiği ayrıca Patellofemoral eklem tutulumunun da yaşa bağlı olarak arttığı açıklanmıştır (38).

Cinsiyet

Osteoartrit açısından değerlendirme yapıldığında kadınların erkeklere oranla daha fazla oranda risk altında olduğu görülmüştür. Osteoartrit görülme yaşı erkeklerde 50, kadınlarda ise 40 yaş üzerine çıkıldığında artar. Osteoartrit olma riski kadınların erkeklere oranla yaklaşık 2,6 kat daha fazla olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalarda bunun nedeni tam olarak bilinmemekle beraber hormonlar, genetik yapı ya da diğer sebeplerin etkili olabileceği tahmin edilmektedir. Hiperöstrojenizm durumu menopoz öncesinde kadınlarda, osteoartrit gelişimini arttırabilmektedir. Ayrıca yüksek topuklu ayakkabı giyilmesi de osteoartrit olma risk oranını yükseltmektedir (39).

Obezite

Mekanik kuvvetlerdeki artış eklem harabiyetine yani osteoartrit oluşumuna yol açan birincil faktörlerden biridir. Ayrıca eklem biyomekaniğinde bozulmaya neden olan obezite; postüral duruş, yürüme ve fiziksel aktivite miktarının da değişmesine sebep olur. Obez bireylerde meydana gelen ağırlık, aktarmadaki dengesizlik nedeniyle dizin medial kompartmanında değişikliğe sebep olarak sürecin daha da hızlanmasına neden olmaktadır (40).

Sigara

Yapılan araştırmalarda sigara içen bireylerde içmeyenlere göre kırıldak doku kaybı ve ağrı şiddetinin daha çok olduğu bulunmuştur (41).

Eklem Yapı Bozuklukları

Osteoartrit oluşma riskini arttıran sebepler arasında, bireylerde diz eklemde daha önce geçirilmiş olan ligament, menisektomiler veya diğer eklemlerde önceden meydana gelmiş hasarlar olabilmektedir (42).

Genetik Faktörler

Modern teknikler kullanılarak osteoartrit'te genetik faktörlerin rolü incelenmiştir. Yapılan araştırmalarda özellikle diz eklemine patellofemoral ve tibiofemoral bölümleri genetik faktörlerden oldukça fazla etkilendiği açıklanmıştır (43).

2.2. Kıkırdak Doku

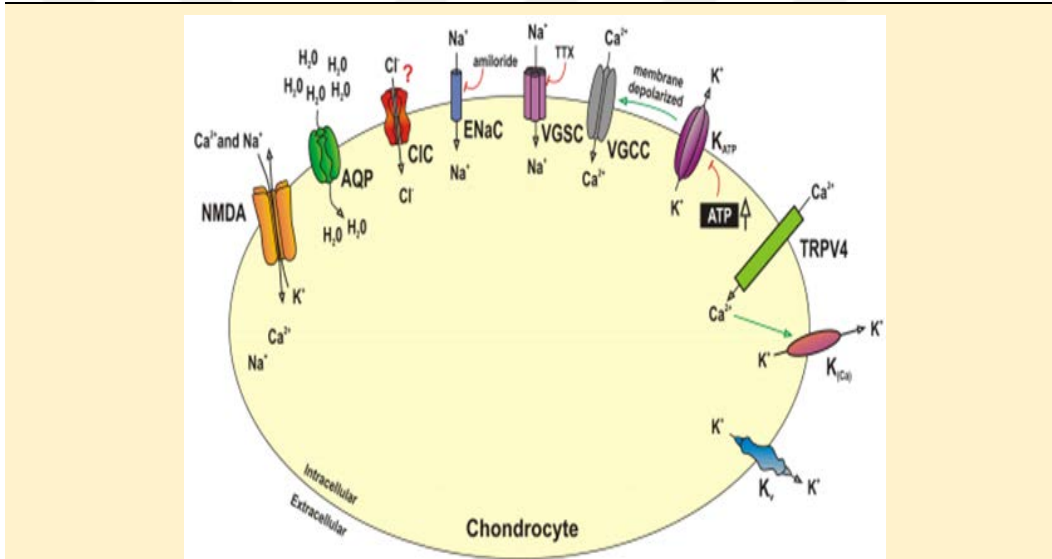
Kıkırdak dokusu vasküler sistemle etkileşmeyen, lenf damarları veya sinir iletimi olmayan ve bağlantılı olduğu dokulara destek ve esneklik sağlayan bir bağ dokusudur. Eklem kıkırdağı, sinoviyal eklemdeki kemik yüzeyini kaplayan bir tür hiyalin kıkırdaktır. Sinoviyal eklemler kemikler arasında bir kavite oluşturur ve böylece sisteme hareket özgürlüğü kazandırır. Sinovyal kavite içerdiği sinovyal sıvı ile kemiklerin birbirleri ile sürtünmesini azaltarak kayganlaştırma görevi görür. Sağlıklı bir kıkırdakta yalnızca kondrosit hücreleri bulunur. Sinovyal sıvı, erişkin eklem kıkırdağında difüzyon aracılığı ile kondrositlere oksijen ve besin maddeleri sağlarken, karbondioksit ve metabolik atık ürünlerini uzaklaştırma görevi de görür. (44). Ayrıca sinovyal sıvı eklem hareketleriyle periyodik olarak kıkırdak yüzeyini yıkar.

2.2.1. Kondrositler

Kondrositler, kıkırdak ekstraselüler matrisi (ECM) oluşturabilmek için proteoglikanlar, kollajen ve kollajen olmayan proteinlerin sentezlenmesi ve salgılanmasını sağlarlar (45,46). Oluşturdukları bu matrise gömülen kondrositler diğer hücelere göre çok farklı bir iyonik ortam içinde bulunurlar (47). Hücrelerin çevrelerini saran proteoglikanlar negatif yüklüdürler ve hücre dışındaki Na^+ gibi pozitif yüklü iyonları çekerler. Bu durum, yüksek osmolariteye ve düşük pH'ya sebep olur (48).

Kondrositler, hasarlanmaya yanıt olarak parçalanmış makromoleküllerin uzaklaştırılması ile bunların sentezinin arttırılması arasında bir denge kurarak kıkırdağı korur (49). Proteoglikanlar, sıkıştırma sırasında kıkırdak sertliği, stabilite ve dayanıklılığa katkıda bulunur. Kıkırdak matrisi ise kondrositleri eklem üzerindeki mekanik strese karşı korur (45,49). Kondrosit metabolik aktivitesi, kıkırdak üzerindeki mekanik stresin ağırlığı ile doğrudan ilişkilidir. Kıkırdak üzerinde yoğun bir yük varken artan aktivite ile maksimum proteoglikan içeriği sağlanır (50).

Eklem kıkırdığının dayanma ve tepki oluşturabilme gücü, basınç ve makaslama kuvvetlerine karşı koyabilmesi açısından hayati öneme sahiptir. Literatürde, dinlenim zar potansiyelinin (E_m) bu metabolitlerin sentezi ve salınımı gibi işlevlerin yapılabilmesinde önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir (51,53). Bu bilgiler, iyon kanallarına yapılacak çeşitli müdahalelerle, hücrelerin ECM üretimlerini etkileyeceği varsayımını öngörmektedir. Bu varsayım, hücelere iyon kanal blokörleri uygulanması ile azalan matris mRNA, proteinler ve sülfatlanmış glukozamin glikan üretimi ile desteklenmiştir (54,55). Kondrosit proliferasyonu da yine lidokain ve verapamil gibi kanal blokörleri varlığında azalırken, apoptozis artmıştır (56). Kondrosit membranında yer alan iyon kanalları Şekil 2.2’ de gösterilmiştir.



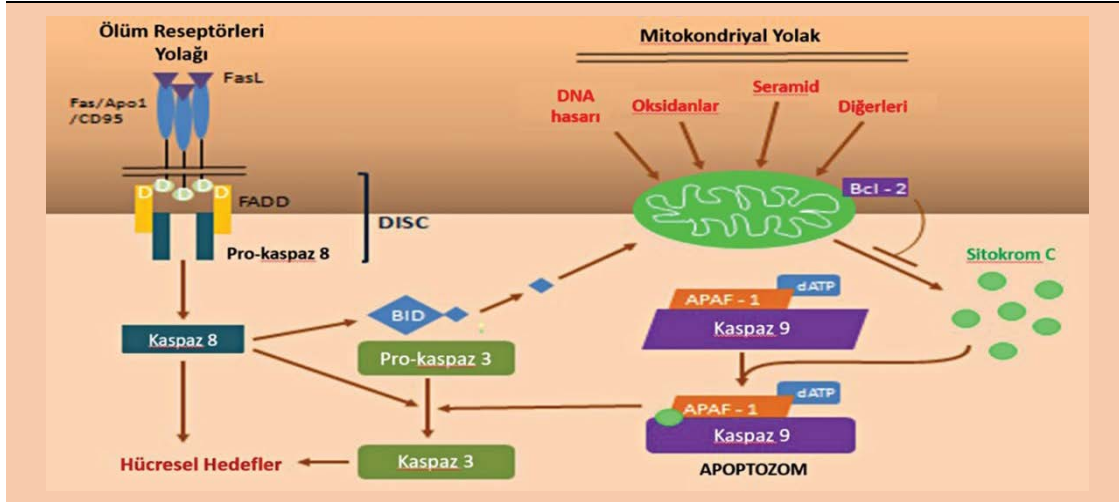
Şekil 2.2. Kondrosit hücrelerinde yer alan iyon kanalları ve proteinler (70)

Osteoartrit, artiküler kıkırdakta ilerleyici dejenerasyon olarak tanımlanmıştır (57). Ayrıca OA eklem dokusunun parçalanması ve onarımı arasındaki denge bozulduğunda oluşur. Fizyolojik koşullar altında, eklem kapsülü içindeki döngüsel mekanik kuvvetler, hücresel metabolizmayı modüle eden ve genel sağlığı koruyan dinamik bir ortam yaratır (54-56).

Kondrositin birincil rolü, makromoleküler sentezi ve temel bileşenlerinin degradasyonunu/parçalanmasını düzenleyerek kıkırdığın canlılığını korumak ve

hyaluronan ve lubricin gibi sürtünmeyi azaltıcı maddeler üretmektir (58,55). Çeşitli ilerleyici kronik hastalıklarda veya yaralanmalar sonucu, kondrosit hasarı ve işlev bozukluğu oluşur (49). Bu durumlarda matriks sentezi ve yıkımı arasındaki dinamik denge değişir ve eklem içindeki düşük sürtünme ortamı ayrıca azalabilir (48). Bu faktörler erken osteoartrit gelişimini ve kıkırdak tabakasının incelmelerini artırabilir. Osteoartrit'in ilerlemesi ile kondrositlerde iyon taşıma sistemlerinin görevlerinde aksamaya hücre dışı ortamdaki bozulmalara cevap verememesi ile sonuçlanır (48). Kondrosit apoptozunun osteoartrit'in ilerlemesinde merkezi bir rolü olduğu gösterilmiştir (83). OA'da interlökin 1B gibi sitokinler aracılığı ile indüklenebilir nitric oksit sentaz (iNOS) aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (59). iNOS, kıkırdak proteoglikan ve tip II kollajen sentezini azaltan ve ayrıca, DNA ve mitokondriyel hasara da neden olarak apoptozu tetikleyen nitrik oksit oluşumunu sağlar (59-61).

NO ve ROS gibi apoptoz indükleyiciler ile hücrede 2 temel apoptoz yolağı active olur: Bunlar ölüm reseptörü aracılı (dışsal) kaspazlar üzerinden ve mitokondri aracılı (içsel) Bcl-2 ailesi üzerinden, kaspaz 3 gibi yürütücü (executor) kaspazların aktivasyonuna yol açan sinyal yolaklarıdır (62). Çalışmamızda OA'de apoptozun rolü, bu iki ana yolaktaki proteinlerden biri olan Bcl-2 ve kaspaz 3 ekspresyonlarının incelenmesi ile gerçekleştirildi. İnsan dizinde gelişen OA'da mekanik yüklenme (obezite) apoptozun indüklenmesini arttıcağı çalışmamızın hipotezi olmuştur. Bu şekilde tez çalışmamızda DM ve obezite üzerinden OA'de apoptoz incelenmiştir. Osteoartrit'in etkilerinin diyabette arttığı gösterilmiştir (63). Bu nedenle DM çalışmamızda bir pozitif kontrol olmuştur. Bu çalışmanın insan örnekleri ile yapılması ve OA'da apoptozun etkisinin farklı hastalıkların birbirlerine göre kıyaslanarak incelenmesi yapılan bir ilk çalışmadır.



Şekil 2.3. Kondrositlerde apoptoz oluşumu (63).

Ca^{2+} konsantrasyonunun hücre içinde regülasyonu diğer hücrelerde olduğu gibi kondrositlerde de pek çok yaşamsal fonksiyonun yerine getirilmesinde önemli rol oynar. Hücrede kalsiyum seviyesindeki artış ile birlikte kalsiyum sensör proteininin calmodulin (CaM) aktivasyonuna ve hedef proteinlerinin Ca^{2+} /calmodulin kompleksi oluşturmasına neden olur (64).

Monoiodoacetic asit (MIA) ile sıçanlarda oluşturulan osteoartrit modelinde kondrositlerde hem bir Ca^{2+} kanalı olan TRPV4'in hem de p-CAMK II'nin ekspresyonunda artış olduğu gösterilmiştir (65). Ancak doğrudan insan kondrositlerinde Ca^{2+} ile regüle olan bu proteinlerin osteoartrit'te farklı hastalıklardaki yanıtları bilinmemektedir. Tüm bu bilgilerin doğrultusunda çalışmamızdaki bir diğer amacımız, insan eklem kırıkdağında gelişen OA'da Ca^{2+} ile regüle olan proteinlerin yanıtlarını da incelemek olmuştur

2.3. Diyabetes mellitus (DM)

Diyabet, genetik ve immüniteye bağlı sebeplerle patolojik olaylar sonucunda pankreastan salgılanan insülin hormonunun üretiminin veya salınımının olmaması yahut miktarının azalmasına ya da etkisinin ortadan kalkmasına bağlı olarak karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasının bozulmasıyla ortaya çıkan kronik bir hastalıktır. Diyabet genellikle hiperglisemi ile karakterizedir. Yetersiz insülin salınımı veya

insüline karşı direnç oluşumu sebebiyle oluşan metabolik değişiklikler, glukagonun artmasıyla oldukça hızlanmışır (66).

Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) verilerine göre; Kronik bir hastalık olan Diabetes Mellitus, organizmanın insülini etkili bir şekilde kullanamaması veya pankreasın yeterli insülini salgılayamaması sonucunda ortaya çıkmıştır (66). Birden çok diyabet tipi bulunmasına rağmen diyabet hastası bireylerin büyük bir kısmını Tip 1 ve Tip 2 diyabet hastası bireyler oluşturur.

2.3.1. Tip 1 Diyabet

Mutlak insülin eksikliğiyle karakterize olan Tip 1 diyabet Pankreas β hücrelerinde görülen harabiyet sonucunda ortaya çıkar. Bunun altta yatan nedeni ise sıklıkla β hücrelerine karşı gelişen otoimmün reaksiyon sonucunda β hücrelerinin harabiyetidir. Çoğunlukla çocuklarda ve genç erişkinlerde görülen kronik bir hastalıktır (66).

2.3.2. Tip 2 Diyabet

Tip 2 diyabet genel populasyonda en sık izlenen diyabet formudur. İnsülin direnci, insülin yetersizliği ve hiperglisemi ile karakterize olan tip 2 diyabet prevalansı obezite sıklığının artmasıyla birlikte artış göstermektedir. İnsülin direnci sonucu oluşan azalan insülin üretimi, insüline karşı duyarsızlık ve olası pankreatik beta-hücre yetmezliği Tip-2 diyabet'in ortaya çıkmasına sebep olan özelliklerindendir (66,67). Çoğunlukla erişkinlerde ve obez bireylerde görülmektedir.

2.4. Dizde Osteoartrit

İleri yaşlarda yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyen osteoartrit, morbidite ve dizabilitenin en önemli nedenlerinden biridir. Osteoartrit'teki yeni kemik oluşumu ve kırıkta kayı gibi değişiklikleri ortadan kaldırarak hastalığı tamamen önleyen veya geri döndüren bir tedavi yöntemi bulunamamıştır (68).

Diz osteoartrit tedavisindeki amaç ağrı ve tutukluğun giderilerek yaşam kalitesinin artırılmasıdır. Ayrıca kas gücünün korunması ve geliştirilmesi, eklem fonksiyonlarının korunması ve iyileştirilmesi, komplikasyonların önlenmesi, sakatlıkların önlenmesi veya düzeltilmesi amaçlanmıştır (68).

Hastalarının çoğunda uygulanan tedaviler, vücut ağırlığını kontrol altına alma ve ağrı kontrolü gibi amaçlar doğrultusunda standart konservatif yaklaşımlar ile tedavi uygulamaları yapılır. Amerikan Romatoloji Birliğinin önerdiği ilaç dışı yöntemlerden biriside fizik tedavi yöntemleridir. Egzersizler, manuel terapi, dizlikler, hasta eğitimi gibi farklı uygulamalar da konservatif tedavi yöntemleri içerisinde bulunur (69).

2.5. Apoptozis

Hücre ölümünün farklı bir morfolojisi olarak ilk defa 1972'de J.F.K. Kerr tarafından apoptozis tanımlanmıştır. Gelişmiş biyolojik sistemlerde apoptozis, hücrelerarası ilişkilerin gereği olarak zara görmüş, virüs ile enfekte olmuş ya da gereksinim duyulmayan hücrelerin kendi kendini yok etmesidir. Bu nedenle apoptozis hücre intiharı olarak da açıklanmaktadır. Yunancada "ağaçtan dökülen yapraklar" anlamına gelen Apoptozis, köken olarak "apo (ayrılan)-ptosis (düşen)" anlamlarını taşır (70).

2.5.1. Apoptozisin Görüldüğü Hücre Çeşitleri

Metamorfoz ve embriyogenez gibi organizmanın gelişim evrelerinde oldukça önemli rolü olan apoptozis, fizyolojik bir işlemdir. Apoptozis tarafından ölen hücrelerin yerine yeni hücreler meydana gelir. Böylece yeniden yapım ve ölüm doku homeostazini sağlamak için dinamik bir dengede devam eder (71,72).

Kurbağaların metamorfozisi esnasında erişkin forma geçişinde kuyruklarının ortadan kaybolması apoptozisle gerçekleşir. Aynı şekilde insan embriyosunun el parmakları arasındaki hücrelerin apoptozisle ölmesi sonucu buradaki perdelerin kaybolduğu tahmin edilmektedir (73).

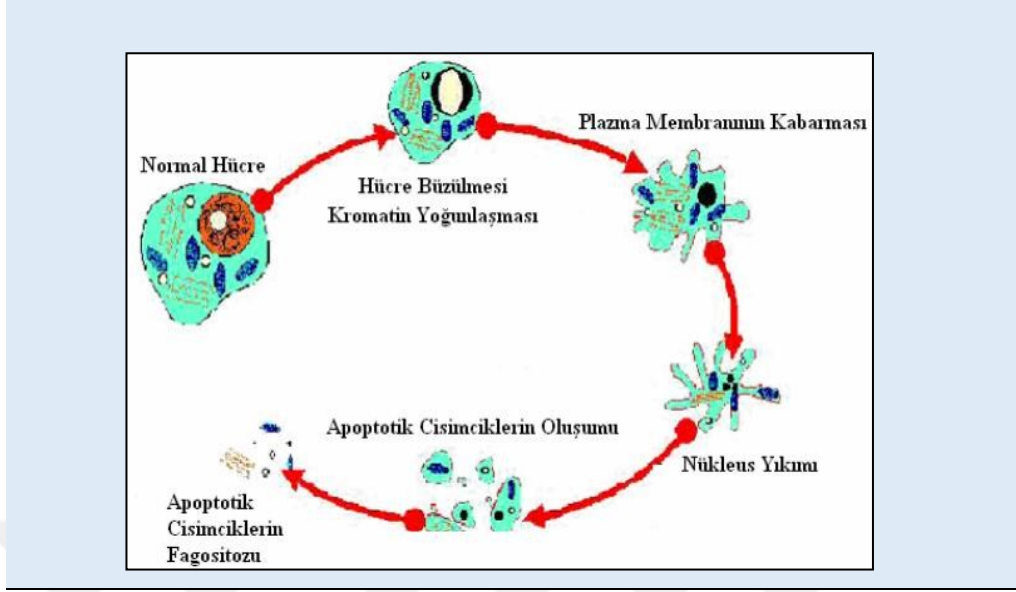
2.5.2. Apoptozisin Morfolojisi

Hücrelerin nükleus, sitoplazma ve plazma zarı gibi organellerinde apoptozise özgü morfolojiler, apoptozis esnasında ve sonrasında oluşan sitolojik ve biyokimyasal değişimler neticesinde meydana gelmektedir (74). Apoptozis morfolojisi; apoptotik cisimcik oluşması ve makrofajlar tarafından apoptotik cisimciklerin fagosite edilmesi, kromatin yoğunlaşması, çekirdeğin parçalara ayrılması ve hücre büzülmesi, olaylarını içermektedir (75).

Plazma zarının aracılık etmesiyle diğere hücreler ve hücrelerin ekstraselüler matris ile oluşan bağlantıları apoptozisin erken döneminde birbirinden ayrılırlar. Bu ayrılmalardan sonra hücreler büzülerek komşu hücrelerle olan fiziksel bağlantılarını kaybederler. Sitoplazmadaki sisternalar vakuol ve vezikülleri oluşturmak için kabarıp ve endoplazmik retikulumda genişleme meydana gelir (76). Kabaran sisternaların hücre zarı ile birleşmesi sonucunda tomurcuklanmalar oluşur. Bunların ayrılması sonucunda çekirdek ve sitoplazma farklı boyutlarda “apoptotik cisimcikler” meydana getirir. Apoptotik cisimcikler makrofajlar veya komşu normal parankimal hücreler tarafından fagosite edilirler (77).

Çekirdek Kromatin yoğunlaşmasını sonra, zar bütünlüğünde hasar oluşturmadan karyoreksis olarak adlandırılan bir olay sonucunda yapıdan ayrılır (78). Kaspazlar tarafından bazı proteinlerin kırılması ile bu morfolojik değişiklikler başlatılabilir. Apoptozisin en önemli özelliklerinden biri DNA'nın (Deoksiriboz nükleik asit) 108-200 baz çifti uzunluğundaki parçalara bölünmesidir. Kaspazlar, aktif olan DNaz (Caspase-aktive DNase, CAD) ve DNA'nı parçalanmasını sağlayan faktör 40 (DNA fragmentation factor, DFF 40) bu parçalanmalardan sorumlu olan proteinlerdir (79).

Plazma zarındaki değişiklikler sonucunda fagositik hücreler tarafından oluşan apoptotik cisimcikler tanınabilmektedir. Meydana gelen bu değişikliklerden en önemlisi fosfatidil serinin (PS) lokallizasyonudur. Plazma zarının iç yüzeyinde normal şartlarda fosfatidil serin bulunur, ancak apoptozisin erken evrelerinde zarın dış yüzeyine lokallize olur. Bu değişim sonucunda makrofajlar ve komşu hücreler, fosfatidil serinin, hücrenin dış yüzeyine çıkmasıyla hücreyi tanır ve apoptotik cisimciklerin fagositozunun gerçekleşmesini sağlar (76).



Şekil 2.4. Apoptozide görülen morfolojik değişimler (80).

2.6. Kaspazlar

Kaspazlar, apoptozda görev alırlar ve Sistein Aspartat Spesifik Proteaz (Cystein Aspartat Specific Protease CASPASE) protein ailesinin mensubudurlar. Aktif bölgelerinde sistein kalıntılarına sahip olan bu proteaz ailesinin üyeleri, substrat proteinlerindeki kısmı genel olarak aspartik asitten sonra gelen bölgesidir (81). Kaspazlar, ilk sentezlendikleri zaman inaktif prokaspaz ya da zimojen halinde bulunurlar. Kaspazların zimojen yapısı (prokaspaz) apoptozun indüklenmesinden sonra kesilerek aktif kaspaz formuna çevrilir. Kaspazlar diğer proteinleri kesime uğrattıkları ve aktif merkezlerinde sistein amino asidi barındırdıkları için sistein proteazlar sınıfında tanımlanırlar (82,83). Memelilerde tanımlanmış olan 14 farklı kaspaz bulunmaktadır (84). Bu kaspazlardan 11 tanesi insanda tanımlanmıştır (85,82).

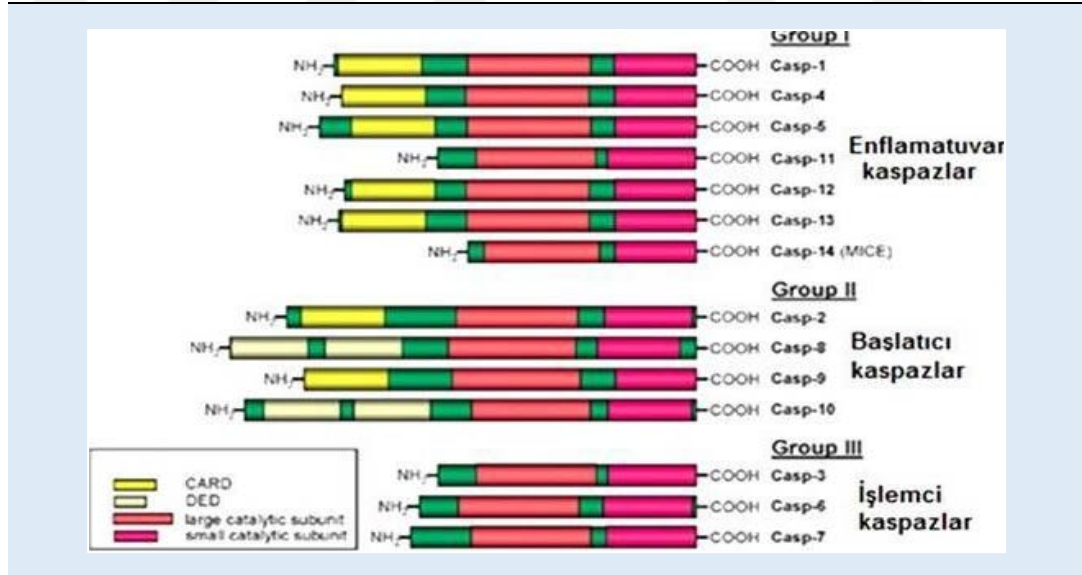
Apoptoz, kaspazların aktivasyonunu kapsayan genellikle enerjiye ihtiyacı olan bir durumdur (86). Kaspazlar, hücrelerin apoptoza uğramasını engelleyen proteinleri yok eden veya inaktifleştiren protein ailesidir. Bir yandan da apoptozu inhibe eden negatif düzenleyicileri de yıkıma uğratarak hücrelerin ölümüne yol açmaktadırlar (87). Apoptoz sinyalleri temelde hücre içi kaspazların aktivasyonunda görevlidir. Kaspazlar, hücrede inaktif proenzim halinde sentezlenirler. Bunlar otoproteolitik parçalanma veya spesifik aspartik asit rezidülerinde diğer kaspazların dahil olmasıyla aktiveleştirilebilirler.

Kaspazların tanımlanan 14 üyesi içerisinde yedisi apoptozda rol oynar (88). Kaspazlar iki ana aileye ayrılmaktadır. Birinci grup Kaspaz-1 ile ilgili enzimleri içerirken, ikinci grup CED-3 ölüm geni olup, *Caenorhabditis elegans* tarafından üretilir (89,82,90).

2.6.1. Kaspazların Sınıflandırılması

Kaspaz ailesinin üyeleri fonksiyonlarına göre üç grupta toplanırlar.

1. Başlatıcı kaspaz ailesi: Kaspaz ailesinden 2, 8, 9 ve 10 bu gruba dâhil edilirler. Bu kaspazlar pro-apoptotik kaspazlar olarak diğer kaspazları aktive ederler. Başlatıcı kaspazlar 110 aminoasitten meydana gelirler. Bunlar transmembran reseptörleri ile etkileşerek aktifleşirler (82,83).
2. Efektör kaspaz ailesi: Kaspaz ailesinden 3, 6 ve 7 bu gruba dâhil edilirler. Çeşitli hücre içi proteinlerin parçalanması bu kaspazların enzimatik reaksiyonlarıyla gerçekleşir (82,83).
3. Sitokinleri aktive eden kaspaz ailesi: Kaspaz 1, 4, 5 ve 13 bu gruptadırlar (82,83).



Şekil 2.5. Kaspazlar (91).

2.7. Kalsiyum Kalmodulin Bağımlı Protein Kinaz Ailesi

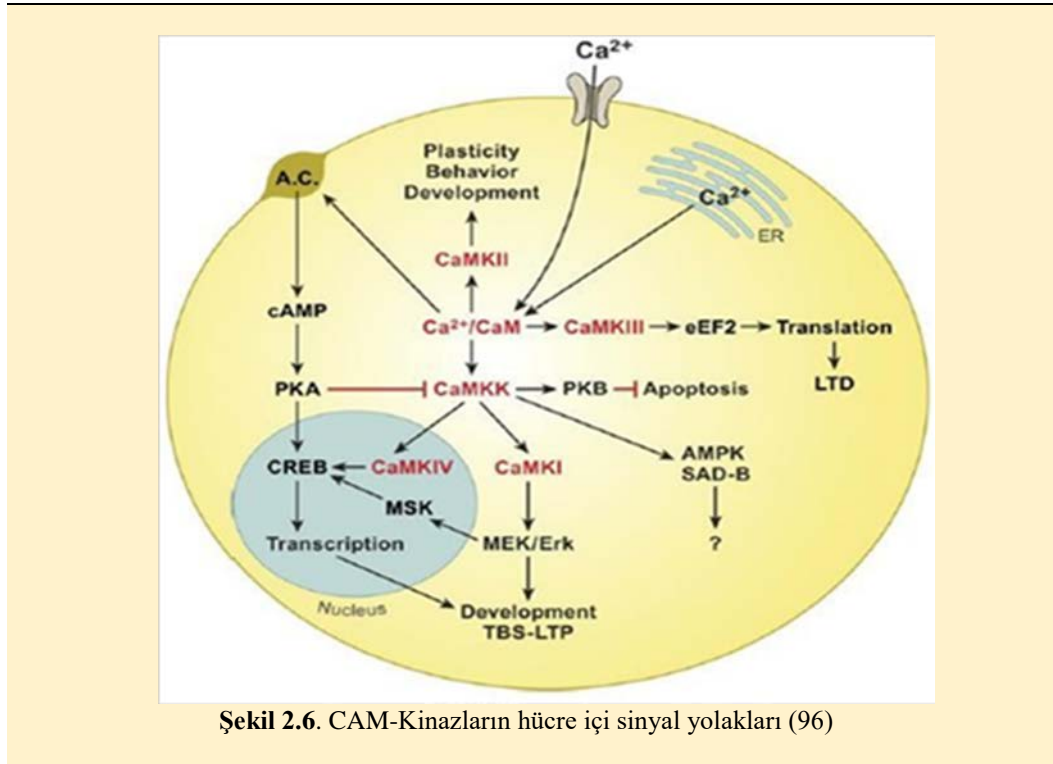
Kalsiyum/Kalmodulin-Bağımlı Protein Kinazlar (CaM-kinaz) en iyi karakterize edilmiş kinazlardandır. CaM-kinazlar, gen transkripsiyonu, hücre canlılığı ve apoptozu, sitoskeletal reorganizasyon, öğrenme ve hafıza gibi çeşitli hücrel süreçleri önemli ölçüde etkileyebilirlik fonksiyonları nedeniyle uygun hücre fonksiyonları için kritik düzeyde önemlidir (92). CaM-kinazlar hücre içerisinde pek çok sinyal yolağında yer alabilirler (Şekil 2.5). ATP'nin gama pozisyonundaki fosfatın, protein substratının içindeki Serin, Treonin veya Tirozinin hidroksil grubuna katalizlenmesini büyük bir enzim kategorisi olan kinazlar gerçekleştirir (93). cAMP-bağımlı protein kinaz (PKA), katalitik domaininin kristal yapısı ilk çözümlenmiş kinazdır. Daha sonra siklin bağımlı kinaz 2 (cdk2) ve ekstraselüler düzenlenen kinase 2'nin (ERK2) X-Ray kristalografik yapısı çözümlenmiştir ve böylece bütün protein kinazların ortak bir yapısal motif paylaştığı gösterilmiştir (94,95)

Kalsiyum/Kalmodulin-Bağımlı Protein Kinaz (CaM-kinaz) ailesi CaMKI, CaMKII, CaMKIII, CaMKIV ve CaMKK olarak 5 kinazdan oluşur. CaMK ailesi Serin/Treonine kinazlar olarak sınıflandırılırlar. Kinazların aktive edilmesi kalsiyum ve kalmodulin kompleksinin bağlanması ile gerçekleştirilir. Fakat bazı aile üyeleri aktivasyon sonrasında tüm aktivitenin gerçekleşebilmesi için ekstra fosforilasyon gerektirirler (92).

CaM-kinazların tüm domain yapısı PKA ile çok benzerdir; iki loblu katalitik domainin ardından regülatör domain gözlemlenir ve bu iki domainin her ikisi de bir otomatik inhibitör domaini içerirler. Otoinhibitör domain ve CaM bağı domain üst üste gelir ve Ca^{2+} /CaM bağlanması ile otoinhibitör domainin fonksiyonu düzenlenir (92).

2.7.1. CAMKII

CaMKII'nin dodekamerik yapısı protein kinazlar arasında eşsiz olarak bulunur ve evrim süresince korunmuştur. Bu durumun çoklu alt gruplu holoenzim yapısının alışlagelmedik özellikler gösterebilmesi için bir anahtar olduğu ileri sürülmüştür (97). Holoenzim yapısı için her küme 6'şar domain içermek üzere kinazın 12 fonksiyonel domaini 2 küme ile bir dişli çarkı görünümünde birbirine bağlanır. Buradaki her alt birim bir otheregülatör, bir katalitik ve bir de yardımcı domain bulundurur. CaMKII yapısında bulunan bu katalitik ve düzenleyici domainlerin CaMKII'nin bazal aktivitesinin Ca^{2+}/CaM yokluğunda nasıl baskılandığına dair önemli rollerinin olduğu düşünülmektedir. Ca^{2+}/CaM kompleksinin holoenzime bağlanması sonucu otheregülatör domain disinhibe edilerek otofosforilasyon başlatılır. Bu sayede enzimin Ca^{2+}/CaM varlığında Ca^{2+}/CaM - bağımsız aktivitesinin oluşması, CaM yakalama veya CaM kapatma gibi kompleks değişiklikleri gerçekleştirmesine olanak sağlanır. Bağımsız aktivitenin oluşması enzim yapısında sarmal olarak bulunan α -heliks yapısının hem Ca^{2+}/CaM bağlanma elementi hem de Thr286 içermesi ve bu yapının fosforlanması ile kinazın Ca^{2+}/CaM bağımsız duruma geçişi ile gerçekleştirilir. Bu durum CaMKII'nin aktivitesi ve otheregülasyonuna bir çeşit moleküler hafıza kazandırır (96,98).

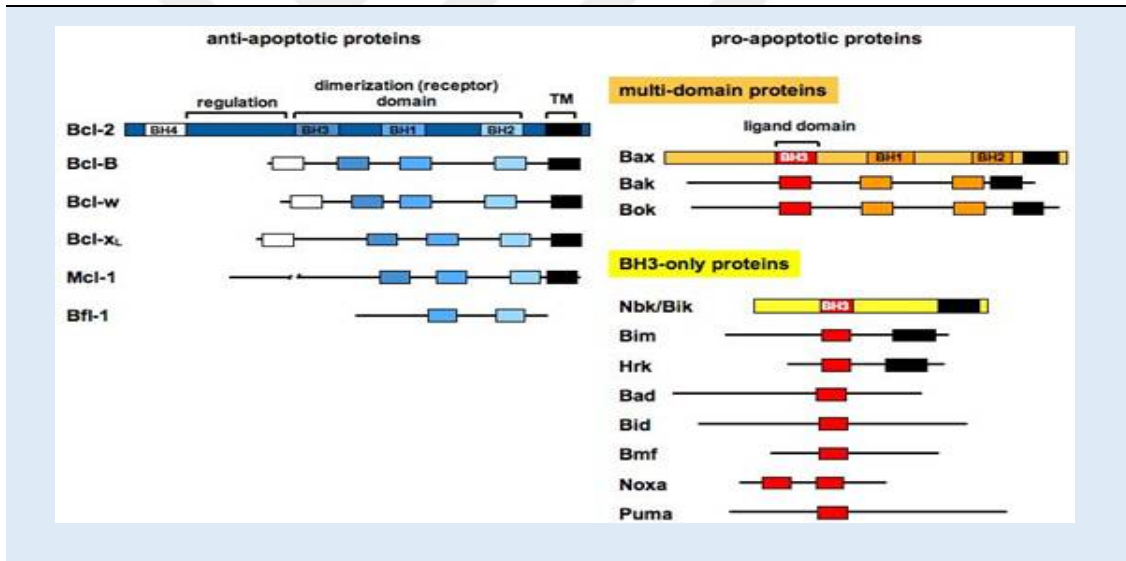


Şekil 2.6. CAM-Kinazların hücre içi sinyal yolları (96)

2.8. Bcl-2 Ailesi

Bcl-2 ailesi genlerinin homodimer ya da heterodimer formu hücrenin apoptozise eğilimiyle ilişkilidir. Antiapoptatik ve proapoptatik üyeler olmak üzere Bcl-2 ailesi birbirine zıt 2 gruptan meydana gelir (99).

Hücrenin apoptozise gitme eğiliminin fazla olması hücrede proapoptotik proteinler fazla oranda bulunması anlamına gelmektedir. Antiapoptotik proteinler ise fazla bulunuyorsa bu hücrenin apoptozise olan eğilimi daha az olmaktadır. Proapoptotik üyeler, AIF'nin ve sitokrom c'nin salınımını artırarak apoptozisi indükler. Proapoptotik üyeler sitozolde bulunurken antiapoptotik üyeler ise endoplazmik retikulumda, çekirdek zarında ve mitokondrinin dış membranında bulunur. Ayrıca por oluşmasını sağlayarak iyon transportunun düzenlenmesini sağlarlar. Antiapoptotik üyeler, sitokrom c ve AIF'in salınımını engelleyerek apoptozisi inhibe ederler (99).



Şekil 2.7. Bcl-2 ailesinin üyeleri (100).

2.9. Western Blot Yöntemi

Elektroforetik olarak birbirinden ayrılmış proteinleri ortaya çıkarmak için hassas immünolojik yöntem olan Western blotlama (immünoblotlama) metodu, 1979'da geliştirilmiştir. Daha sonra Southern ve Northern blotlama tekniklerine benzemesi nedeniyle bu yöntem “Western blotlama” metodu olarak isimlendirilmiştir (101). Karmaşık örneklerden hedef proteinler hakkında özel bilgi elde etmek için antikor bazlı problemleri kullanarak protein tespiti için Western blotlama tekniği yaygın olarak kullanılır. Biyokimya, moleküler biyoloji ve hücre biyolojisi alanlarında çok sayıda uygulama ile kullanılan rutin bir tekniktir (102).

Proteinlerin moleküler ağırlığının bir fonksiyonu olarak SDS-PAGE' de çözüldükten sonra bir adsorban membran üzerine transfer edilmesine western blot yöntemi olarak sağlanır. SDS-PAGE yöntemiyle proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayırımı toplayıcı ve ayırıcı jel olarak iki çeşit agaroz jel kullanımıyla sağlanmaktadır. Toplayıcı jel düşük akrilamid konsantrasyona sahip olup gözenekli jeli oluştururken, ayırıcı jel yüksek poliakrilamid konsantrasyonu ile daha dar gözenekli jel oluşumunu sağlamaktadır. Bu sayede, küçük proteinler büyük proteinlere kıyasla daha kolay ve hızlı ilerleyebilmektedir. Western blotlama tekniğinde en sık kullanılan membranlar Poliviniliden diflorür (PVDF) ve Nitroselüloz kâğıtlardır. Birincil antikorlar western blotlama için genellikle sıçan, tavşan, fare, koyun ve keçi gibi hayvan konaklarından üretilir. Proteini tanımak dışında birincil antikorlar, asetilasyon, fosforilasyon, metilasyon veya glikozilasyon gibi spesifik modifikasyonları geliştirmek için de kullanılabilir (103).

Y-biçimli moleküller olan antikorlar, aynı ağır ve aynı hafif zincirin iki kopyasından meydana gelirler. Bu zincirler disülfid (SS) bağlarıyla bağlanırlar. β -merkaptoetanol gibi indirgeyici ajanlar antikorları tamamen denatüre etmek için gereklidir (102,103).

Proteinlerin büyüklüklerine göre ayırımını sağlamak amacıyla; önce ısı yardımıyla denatüre edilmeleri ve sonra Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) negatif yüklü hale getirilerek lineer bir forma dönüşmeleri sağlanmaktadır. Ardından negatif yükle yüklenen proteinler elektroforez sırasında anoda göç ederken farklı protein bantları halinde odaklanmakta ve kemiluminesans prensibinden yararlanılarak görüntülenmektedir (103).

2.10. Gerçek Zamanlı PCR (Real Time PCR)

Hedef proteinleri kodlayan gen ekspresyon seviyelerindeki değişimler gerçek zamanlı PCR yöntemi ile belirlenir. Gerçek zamanlı PCR, nükleik asit çoğalması sonucuyla eş zamanlı olarak artış gösteren floresan boya ve probların verdiği sinyalin izlenmesine dayalı olarak kısa süre sonunda kantitatif sonuçlar verebilen PCR tekniğidir. Polimeraz zincir reaksiyonu sonuçlarına ulaşmak için harcanan zamanı kısaltmak için gerçek zamanlı PCR yöntemi tercih edilir.

Sistemin genel özelliğine bakıldığında, Gerçek zamanlı PCR tekniği; tek bir reaksiyon sonucunda elde edilen bilgilerin miktarını en üst seviyeye çıkarabilmek üzere geliştirilmiştir. Ayrıca bu sistem, yeni hastalıkların hedeflerini belirleme, gen ekspresyonunun miktarını belirleme ve tek nükleotid polimorfizmlerinin tayini gibi olanaklar sağlamaktadır (104).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma TYL-2019-12467 numaralı “İnsan Diz Eklem Kıkırdak Hasarlanmasında (Osteoartrit) Apoptozun Rolünün Diyabet ve Mekanik Yüklenme Üzerinden İncelenmesi ” başlığı altında Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi birimi tarafından desteklenmiştir. Çalışma için Çukurova Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu’na başvurulmuş ve gerekli olan etik kurul kararı alınmıştır. Ayrıca çalışma için Adana Şehir Hastanesi Ortopedi ve Travmatoloji Kliniğinden de izin alınmıştır.

3.1. Dokuların Temin Edilmesi

Çalışma için Adana Şehir Hastanesi Ortopedi ve Travmatoloji Kliniğinde total diz protezi ve ön çapraz bağ ameliyatlarında (notch plasti) eksizyon materyali olan örnekler alındı. Örnekler alınmadan önce hastalara bilgilendirme yapılarak gönüllü hastalar çalışmaya dâhil edildi.

3.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Oluşturulacak gruplar; VKİ’lerine göre ayrılan osteoartrit’li hastaların dokularından hafif kilolu (HK) kontrol, obez, diyabet ve hafif kilolu (DM+HK) ve diyabetli ve obez (DM+OB) olacak şekilde ayarlandı. Her grup 10 örnekten oluştu. Çalışmada diz kıkırdak dokusundan lizatlar hazırlandı. Kaspaz-3, Bcl-2 ve CAMK II protein analizleri Western Blot yöntemi ile ölçüldü. Ardından jeldeki proteinler PVDF transfer membranına aktarıldı. Bloklama aşamasından sonra uygun antikorlarla inkübasyon yapıp ve ardından ECL çözeltisi içine koyularak luminol ışımaya ile proteinler saptandı.

3.3. Western Blot Analizi

Western blot analizi (immunoblotlama) dört ana kısımdan oluşmaktadır:

1. İşaretlenmek istenen proteine uygun lizis tamponu seçilir ve ilgili proteinlerin hücrelerden salınımını sağlayacak protein lizatı elde edilir. Elde edilen lizatın protein konsantrasyonu belirlendikten sonra lizatlar -20°C’de tutulur.

2. Proteinler denatüre edilip, indirgenerek SDS-PAGE yöntemiyle jel üzerinde birbirlerinden ayrılır. Büyüklüklerine göre ayrılarak bantlar oluşturan protein molekülleri, jelden elektrotransfer tekniği ile bir membrana aktarılır.
3. Elde edilen membrana; bloklama, hedef proteine özgü antikor, bu antikoru tanıyan ve yapısına enzim eklenmiş ikincil bir antikor ile işlem edilir.
4. Söz konusu enzimin substratı ile işlem uygulanması sonucunda oluşan ışımaya (kemiluminesan) aracılığı ile hedef proteinin membran üzerinde görüntüsü elde edilir (Şekil 3.1).

SDS-PAGE yöntemiyle proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayırımı toplayıcı ve ayırıcı jel olmak üzere iki farklı agaroz jel kullanımıyla sağlanmaktadır. Toplayıcı jel düşük akrilamid konsantrasyona sahip olup gözenekli jeli oluştururken, ayırıcı jel yüksek poliakrilamid konsantrasyonu ile daha dar gözenekli jel oluşumunu sağlamaktadır. Bu sayede, küçük proteinler büyük proteinlere kıyasla daha kolay ve hızlı ilerleyebilmektedir. Proteinlerin sadece büyüklüklerine göre ayırımını sağlamak amacıyla; önce ısı ile denatüre edilmeleri ve sonra Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) negatif yüklü hale getirilerek lineer bir forma dönüşmeleri sağlanmaktadır. Negatif yük ile yüklenen proteinler elektroforez sırasında anoda göç ederken farklı protein bantları halinde odaklanmakta ve kemiluminesans prensibinden yararlanılarak görüntülenmektedir (103).

Alınan dokulara örnek tamponu (50 mM TrisHCl, pH 7.9, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 5 µg/mL Aprotinin, 5 µg/mL Leupeptin, 5 µg/mL Pepstatin A) eklenerek homojenize edildi. Hazırlanan SDS-PAGE Jellerine bu örnekler yüklenip elektroforez cihazı ile yürütüldü.

SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforezi) İçin %10' luk 10 ml ayırıcı (Separating) Jel.

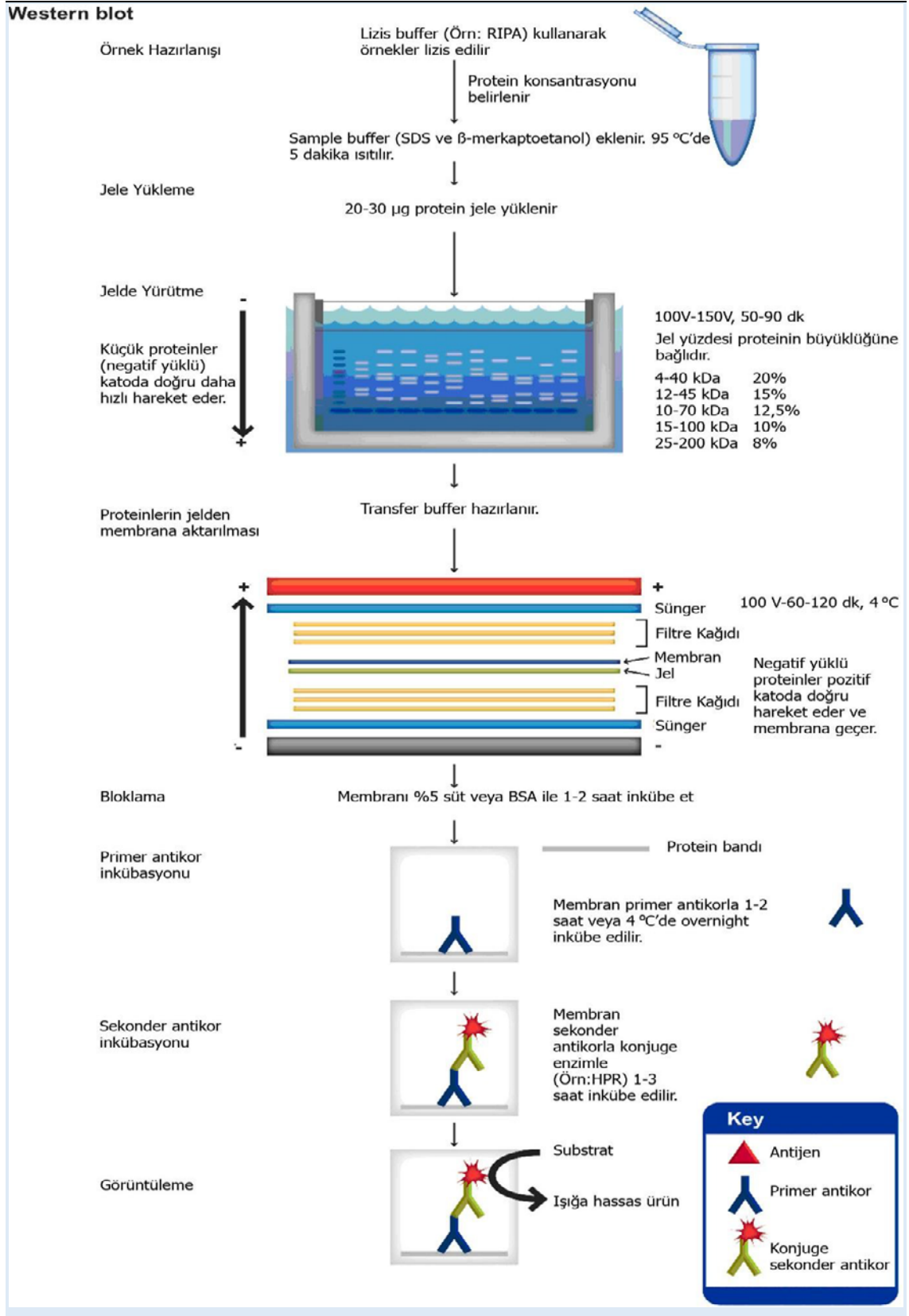
- | | |
|--|---------------------|
| ➤ Acrylamide-bis solüsyonu (Intron, Korea) | 2.50 ml |
| ➤ Separating jel buffer 4X | 2.50 ml |
| ➤ dH ₂ O | 4.90 ml |
| ➤ SDS | (Sigma, USA) 0.1 ml |

- TEMED (Sigma, USA) 0.015 ml
- APS (Sigma, USA) 0.03 ml olacak şekilde hazırlandı.

Kullanılan kimyasallar özellikle belirtilmediği durumda Sigma – (Sigma-Aldrich Co, USA) olarak kullanıldı.

SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforezi) İçin %10' luk 10 ml paketleyici (Stacking) Jel

- Acrylamide-bis solüsyonu (Intron, Korea) 1.25 ml
- Stacking jel buffer 4X 2.50 ml
- dH₂O 6.15 ml
- SDS (Sigma, USA) 0.1 ml
- TEMED (Sigma, USA) 0.015 ml
- APS (Sigma, USA) 0.03 ml olacak şekilde hazırlandı.



Şekil 3.1. Western blot aşamalarının şematik gösterimi (105)

3.3.1. Proteinlerin Yüklmesi ve Jelde Yürütülmesi

Homojenize edilip -20°C de bekletilen örnekler çözüldükten sonra vortekslenir. Yeni hazırlanan eppendof tüplere istenen hacimlerde toplam protein miktarı $20\ \mu\text{g}$ olacak şekilde sample buffer (%25) ve merkaptoethanol (Merck, Germany) (%5) 1X olacak şekilde $0,5\ \text{ml}$ 'lik tüplere pipetlendi. Daha sonra protein denatürasyonu için çözeltiler ısıtıcıda 99°C 'de 4 dakika bekletildi. Bu sırada jel, elektroforez tankına yerleştirildi ve 1X SDS running buffer, doluluk sınırına kadar eklendi. Daha sonra Lader ($10\ \mu\text{l}$) ve örnekler ($20\ \mu\text{l}$) kuyulara pipet yardımıyla belirlenen miktarlarda yüklendi. Protein örnekleri paketleyici jeli geçene kadar $150\ \text{V}$ 'da $40\ \text{mA}$ 'da toplam 2,5-3 saat yürütüldü. Elektroforez işlemi Dikey elektroforez sistemi (Consort EV2310) ile yapıldı.

3.3.2. Proteinlerin Transferi ve İlgili Proteinlerin Belirlenmesi

Elektroforezi tamamlanmış jel elektroforez sisteminden çıkarıldı. Jel elektroforez cihazına sırasıyla sünger (2 adet), filtre kâğıdı (2 adet), jel, PVDF membran, filtre kâğıdı (2 adet), sünger (2 adet) sıralamasına dikkat edilerek transfer için dikey elektroforez cihazına yerleştirildi ve transfer buffer maksimum doluluk sınırına kadar eklendi. Protein örnekleri 180V ve 200mA sabit akımda yaklaşık 1,5-2 saat transfer işlemi gerçekleştirildi.

3.3.2.1 Bloklama

Transfer aşaması bittikten sonra membranlar, 1X TBS-T içerisinde hazırlanan %5'lik süt çözeltisi ile 60 dakika boyunca çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında süt içinde inkübe edildi. 60 dakika süre sonunda, membranlar 1X TBS-T ile 1 defa 10-5-3 dakikalık sürelerle yıkanarak ikinci aşamaya geçildi.

3.3.2.2. Birincil-İkincil Antikor

İlgili birincil antikorlar 1X TBS-T çözeltisi içerisinde 1:1000 olacak şekilde hazırlandı ve membranlar ile 24 saat boyunca $+4^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda, 1X TBS-T ile 1 defa 10-5-3 dakikalık sürelerle yıkama işlemi gerçekleştirildi.

İlgili birincil antikora uygun Anti-Rabbit veya Anti-Mouse ikincil antikorunu 1X TBS-T içerisinde 1:5000 olacak şekilde hazırlandı ve membranlar üzerinde 60 dakika

çalkalayıcıda inkübe edildi. Süre sonunda, 1X TBS-T ile 1 defa 10-5-3 dakikalık sürelerle yıkama yapıldı.

3.3.2.3. Görüntüleme

İnkübasyon periyodunun sonunda TBS-T ile tekrar yıkanan membranlar ECL (Enhanced Chemiluminescence) substratı olan Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz, USA) ile 2 dakika inkübe edildikten sonra görüntüleme hassas X-ışını radyografi filmleri ve X-Ray kaseti yardımıyla karanlık ortamda yapıldı. Image J programında, elde edilen protein bant görüntüleri dansitometrik olarak analiz edildi.

3.3.2.4. Birincil ve İkincil Antikorların Membrandan Uzaklaştırılması

Birincil ve ikincil antikorları membrandan uzaklaştırmak (Stripping) için ilk aşamada strip solüsyonu ile 30 dakika çalkalayıcıda inkübe edildi. Süre sonunda strip solüsyonu döküldü ve 1X TBS-T ile 1 defa 10-5-3 dakikalık sürelerle yıkama yapıldı. 1X TBS-T içerisinde hazırlanan %5'lik süt çözeltisi ile 60 dakika boyunca çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında süt içinde inkübe edildi. 60 dakika sonunda, membranlar 1X TBS-T ile 1 defa 10-5-3 dakikalık sürelerle yıkandı. İlgili birincil antikorlar 1X TBS-T çözeltisi içerisinde 1:1000 olacak şekilde hazırlandı ve membranlar ile 24 saat boyunca +4°C'de inkübasyona bırakıldı.

3.4. Hedef Gen Ekspresyonların Belirlenmesi

3.4.1. RNA İzolasyonu

Bu amaçla öncelikle eksize edilen dokulardan dikkatli bir şekilde kıkırdak dokusu diseke edildi. Sonrasında 50 mg kıkırdak dokusu bir seramik havan içerisinde, sıvı azot yardımı ile toz haline getirildi. RNA izolasyonu ise Nucleozol (140) yardımıyla gerçekleştirildi. İzolasyon süresince kit üreticisinin yönergesinde belirttiği adımlar izlendi. Bu amaçla her birinin içerisinde 500 µl Nucleozol bulunan eppendorf tüpleri içerisinde, toz haline getirilen dokular eklendi. Daha sonrasında tüp içerisine 200 µl RNase içermeyen su eklendi ve 15 dk vorteksleme işlemi sonrası tüpler 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. 12000g de 15 dk santrifüj işlemi sonrası 500 µl supernatant yeni bir eppendorf tüpe alındıktan sonra üzerine 500 µl isopropanol eklendi

ve 10 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. 12000*g de 15 dk santrifüj işlemi sonrası supernatant atıldı ve pellet 2 kez 500 µl % 75 etanol ile 8000*g de 3 dk santrifüj işlemleri tamamlandıktan sonra, pellet üzerine 50 µl RNase içermeyen su eklendi. Vorteksleme işlemi sonrası 3 dk oda sıcaklığında inkübasyon ile birlikte RNA izolasyonu tamamlandı.

Daha sonra fluorometrik olarak RNA konsantrasyonu belirlendi. Bu amaçla Qubit RNA BR analiz kiti (Invitrogen) yardımıyla ve kit üreticisinin yönergeleri takip edilerek Qubit (Invitrogen) cihazı kullanılarak RNA konsantrasyonları belirlendi.

3.4.2. cDNA Sentezi

Bu işlemden sonra (RNA kırılkan yapıda olduğundan) vakit kaybedilmeden uygun RNA miktarı ve cDNA kiti (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)) yardımıyla RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bu amaçla bir buz üzerinde reaksiyon tüpü içerisinde çizelge 3.1'de belirtilen reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra bu reaksiyon karışımı çizelge 3.2'de sıcaklık döngü programına tabi tutuldu. Bu çalışmada sıcaklık döngü programı MiniAmp Plus Thermal Cycler (Applied Biosystems) kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon sonrasında deney gününe kadar cDNA örnekleri -20 °C'de saklandı.

Çizelge 3.1. cDNA sentez reaksiyonu

Reaksiyon İçeriği	Hacim
Kalıp RNA	10 µl
10 X RT Buffer	2 µl
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
10X RT Random Primers	2 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1 µl
dH ₂ O	4,2 µl
Total	20 µl

Çizelge 3.2. cDNA sentezi için uygulanan sıcaklık döngü programı

	1. Adım	2. Adım	3. Adım	4. Adım
Sıcaklık	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Zaman	10 dk	120 dk	5 dk	∞

3.4.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PCR) Analizi

Hedef proteinleri kodlayan gen ekspresyon seviyelerindeki değişimler ise gerçek zamanlı PCR yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla öncelikle hedef gen olan CAMK2A için spesifik primerler, belirli kriterler gözetilerek tasarlandı (106). Elde edilen değerlerin normalizasyonu için ise GAPDH geni kullanıldı (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Real Time PCR çalışmalarında kullanılan hedefe spesifik primerler

Primer ismi	Primer dizisi (5' → 3')
hCAMK2B-F	GAGCCATTCTCACACGATGCT
hCAMK2B-R	TGGTGTTGGTGCTCTCTGAGGA
h-GAPDH-F	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG
h-GAPDH-R	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA

Primerler ve cDNA örnekleri kullanarak, GoTAq qPCR master mix (Promega) yardımıyla gerçek zamanlı PCR deneyleri gerçekleştirildi. Bu amaçla çizelge 3.4'teki reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra çizelge 3.5'de belirtilen sıcaklık programı gerçek zamanlı PCR sistemi (Applied Biosystems 7500) kullanılarak uygulandı.

Çizelge 3.4. Gerçek zamanlı PCR reaksiyon içeriği

Reaksiyon İçeriği	Hacim
cDNA	1,0 µl
GoTaq® qPCR Master Mix (2X)	10 µl
Forward Primer (20X)	0,7 µl
Reverse Primer (20X)	0,7 µl
dH ₂ O	7,6 µl
Total	20 µl

Çizelge 3.5. Real Time PCR çalışmalarında uygulanan sıcaklık döngü programı

	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Polimeraz Aktivasyonu	1	95 °C	2 dk
Denatürasyon	40	95 °C	15 sn
Eşleşme ve Zincir Uzaman	40	60 °C	1 dk

3.5. Kullanılan Kimyasallar

Acrylamide-bis solüsyonu, Separating jel buffer 4X, SDS, TEMED, APS, GoTaq® qPCR Master Mix (2X), Forward Primer (20X), Reverse Primer (20X), Merkaptoethanol, Glisine, TrisHCl, Tween 20, ECL, PMSF, DTT, Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin.

3.6. İstatistiksel Analiz

Veriler, ortalamala \pm SEM olarak gösterildi. Gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar, GraphPad prism (5.0) yazılımı kullanılarak ANOVA testi ile yapıldı. $p < 0.05$ değerleri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Protein Ekspresyonları

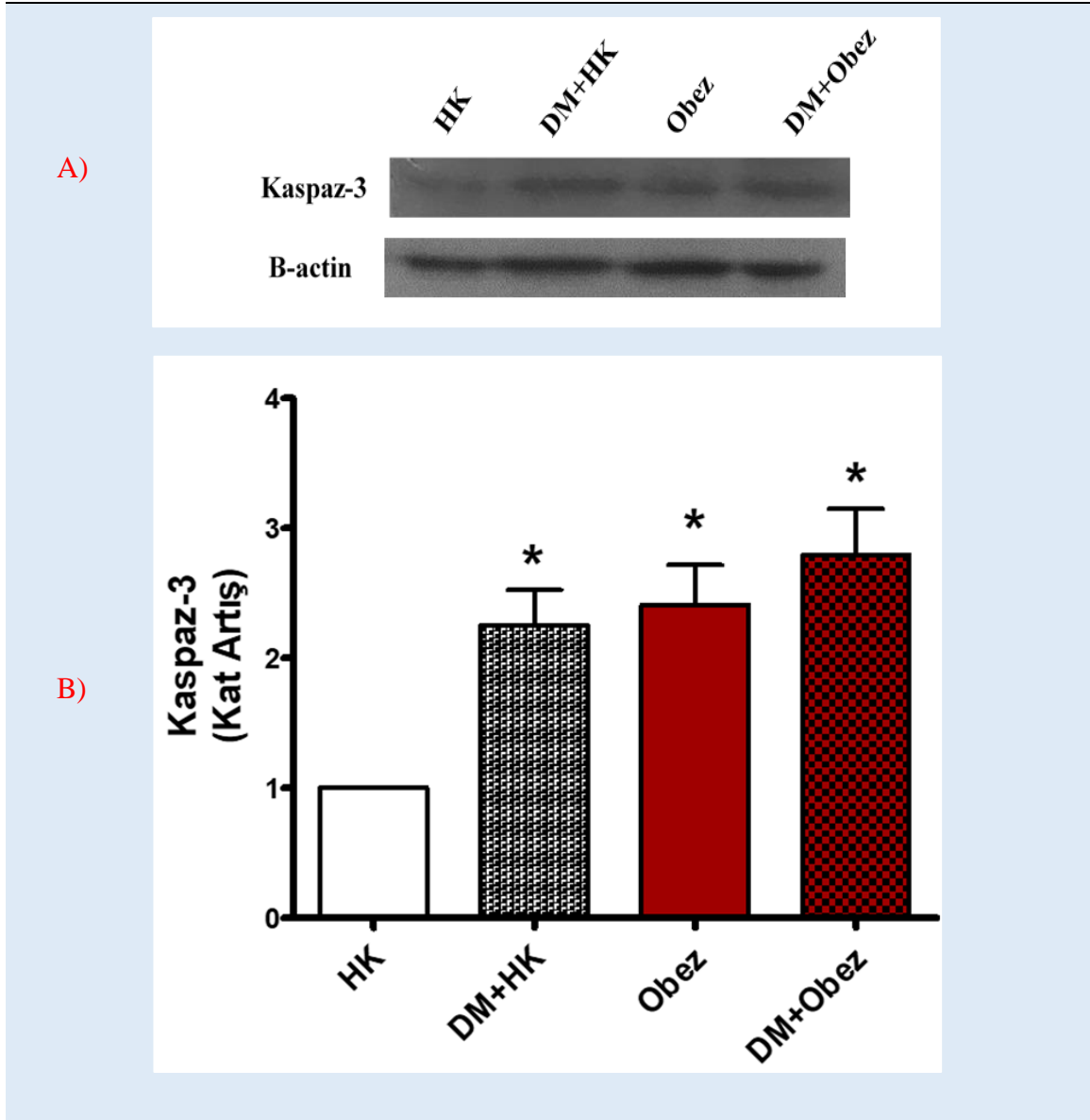
Çalışmamızda SBÜ Adana Şehir Eğitim ve Araştırma Hastanesinde gonartroz tanısı konmuş ve total diz protezi ameliyatı olan yaşları 50 ile 70 arasında değişen 40 hastanın eksize edilmiş diz kıkırdak dokuları kullanıldı. Toplanan örnekler ilk olarak hastaların VKİ'lerine (vücut kitle indeksi) göre ayrıldı. Buna göre birinci grup VKİ 25 ve 26 olan hafif kilolu (HK) hastaların örnekleri ile oluşturuldu. Çalışmadaki ikinci grup ise VKİ'leri 30 ile 35 aralığında olan obez hastaların kıkırdak örneklerinden oluşturuldu. Bu grup çalışmamızda obez olarak isimlendirildi.

Osteoartrit oluşumunda apoptotik süreçlerin belirleyiciliği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Çalışmamızda obezitenin apoptotik etkilerini hücresel düzeyde karşılaştırmak için Tip 2 diyabetli hastaların örnekleri de çalışmaya dâhil edildi. Bu örnekler de kendi içlerinde, diyabet, hafif kilolu (DM+HK) ve diyabet, obez (DM+Obez) olarak iki gruba ayrıldı.

4.1.1. Kaspaz-3 Protein Ekspresyonu

Hastalardan elde edilen örneklerdeki apoptoz süreci ilk olarak bir apoptotik proteini olan kaspaz-3 protein ekspresyonu üzerinden incelendi (şekil 4.1). Şekil 4.1.A'da kaspaz-3 için western blot görüntüleri bulunmaktadır. Şekildeki data, bir görüntü çözümleme programı (ImageJ, USA) ile analiz edilmiştir. Ardından her bir gruba ait kaspaz-3 bantları, kendi B-actin (bir housekeeping protein olan B-actin tüm hücrelerde sabit miktarlarda ekprese edilir) bandına oranlanmış ve kontrol grubumuz olan HK verisine oranlanarak Şekil 4.1.B'deki çubuk grafik oluşturulmuştur. Grafik bu nedenle kat artış olarak ifade edilmiştir.

Verilerimizde diyabetli ve obez olan gruplarda kaspaz-3'ün HK (hafif kilolu) grubuna göre belirgin artışı, bu gruplarda daha aktif bir apoptoz sürecini göstermektedir (Kontrol HK grubuna göre kat artış olarak: DM: $2,25 \pm 0,27$, Obez: $2,4 \pm 0,3$, DM+Obez: $2,79 \pm 0,35$).



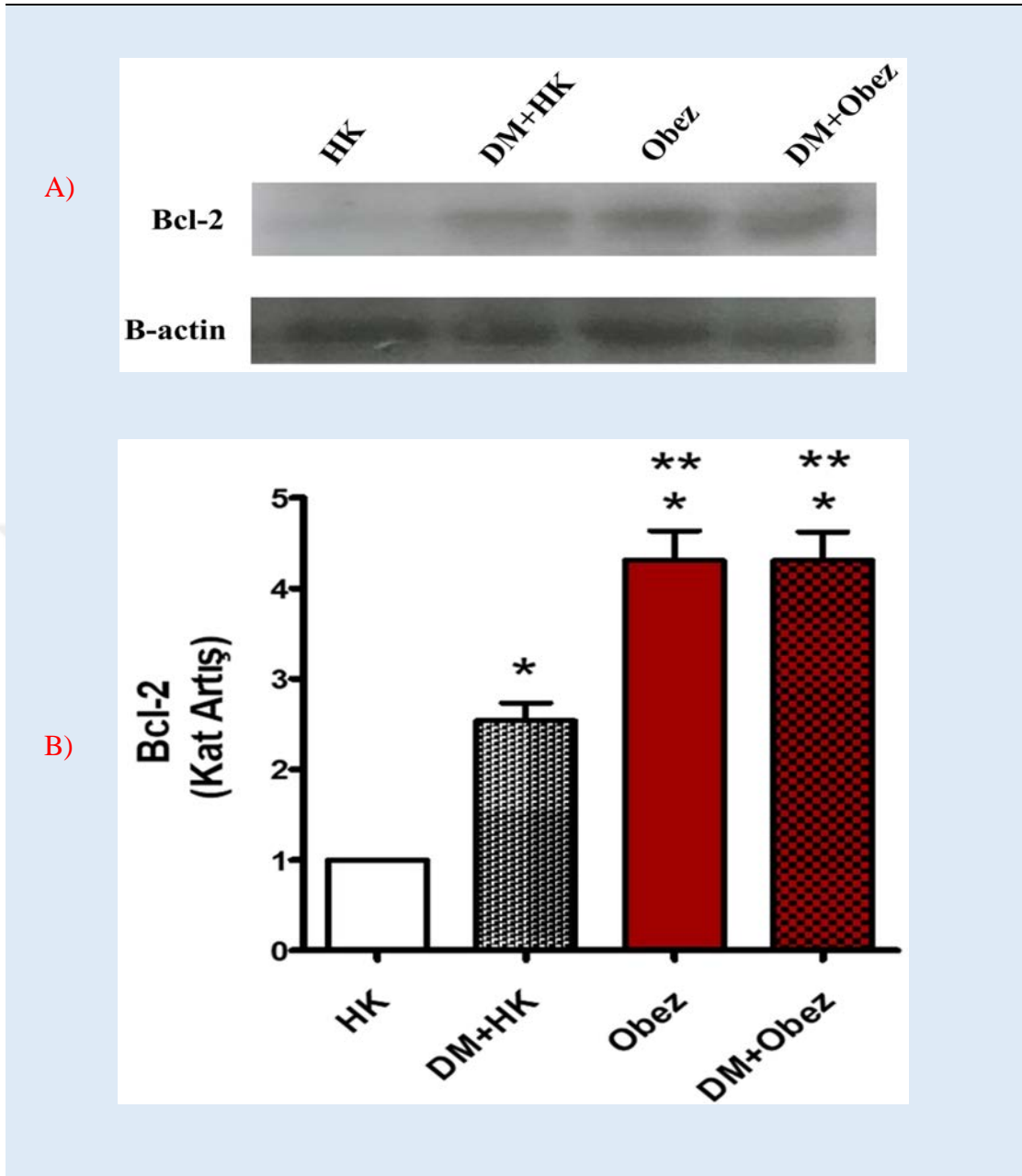
Şekil 4.1. OA'lı hastaların kıkırdak örneklerindeki kaspaz-3 değişimi. A. Kaspaz-3'ün gruplar arasındaki değişimini gösteren Western Blot verisi B. Çubuk grafik, her bir örneğin kaspaz-3 protein bandının B-actin'e normalizasyonu ile elde edilmiştir. Grafikte sonuçlar ortalama \pm SEM, n = 10 örnek/grup. İstatistik karşılaştırma *p < 0.05, HK grubuna göre karşılaştırmayı göstermektedir (one-way ANOVA).

4.1.2. Bcl-2 Protein Ekspresyonu

Kaspaz-3 ekspresyonunda görülen böyle bir farkın anti-apoptotik protein olan Bcl-2 üzerinde de olup olmadığını incelemek için çalışmamızdaki örneklerde Bcl-2 ekspresyonları incelendi. Şekil 4.2'de Bcl-2'nin diyabetteki artışı ile beraber,

obezitedeki artışı her iki grup için çok daha fazla olduğu bulundu (Obez ve DM+Obez grupları). Şekil 4.2.A'da Bcl-2 için western blot görüntüleri bulunmaktadır. Ardından her bir gruba ait Bcl-2 bantları, kendi B-actin bandına oranlanmış ve kontrol grubumuz olan HK verisine oranlanarak Şekil 4.2.B'deki çubuk grafik oluşturulmuştur. Grafik bu nedenle kat artış olarak ifade edilmiştir. Deneylerimizde HK grubuna göre Bcl-2 DM ve obez gruplarında artış göstermiştir. Bu artış, obez grubunda DM grubundan da fazla olmuştur. Ancak hem obez hem de DM olan hastaların örneklerinde, DM obezitenin üstünde ekstra bir farka neden olmamıştır (Kontrol HK grubuna göre kat artış olarak: DM: $2,5 \pm 0,19$, Obez: $4,3 \pm 0,3$, DM+Obez: $4,31 \pm 0,31$).



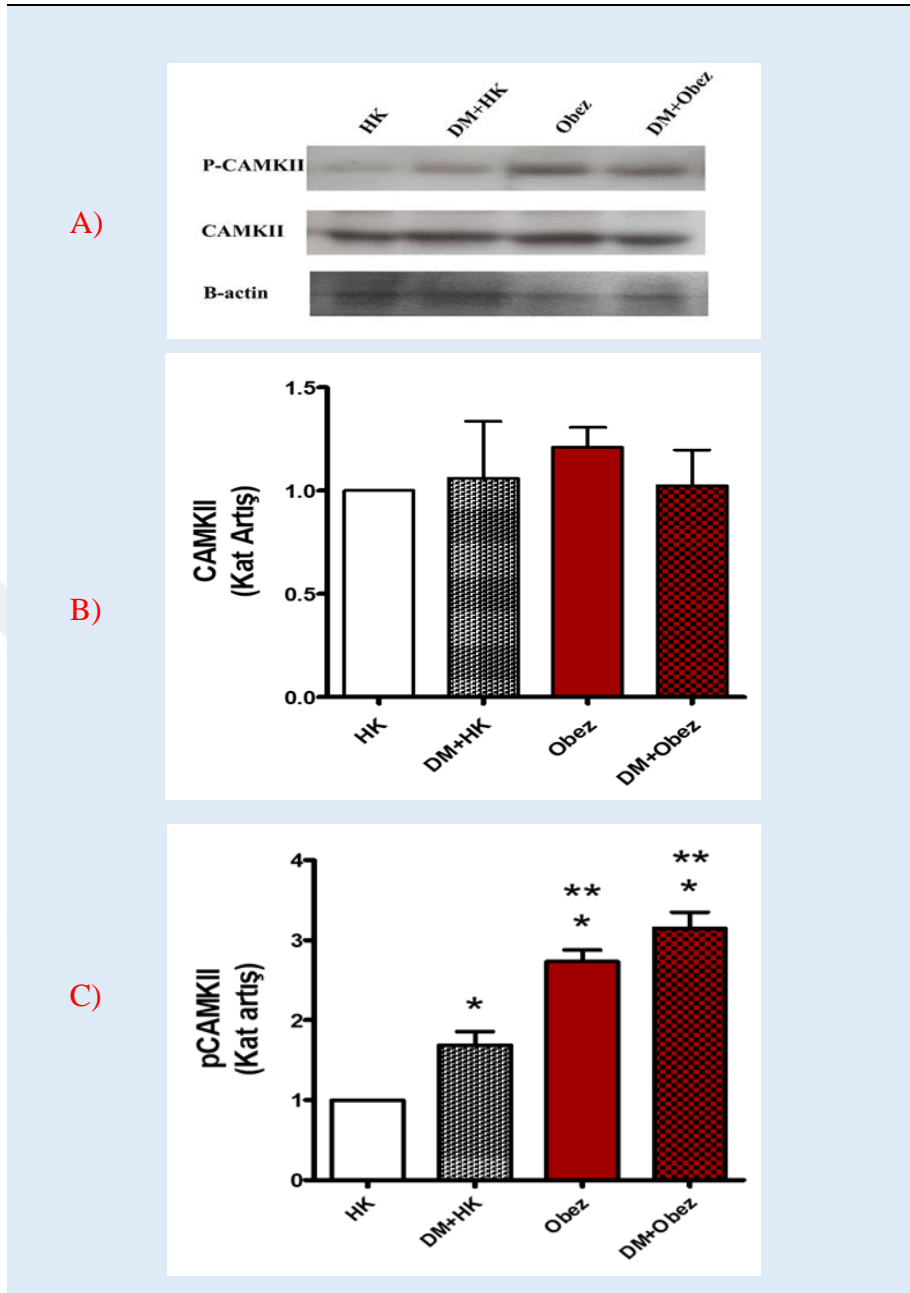


Şekil 4.2. OA'lı hastaların kıkırdak örneklerindeki Bcl-2 değişimi A. Bcl-2'nin gruplar arasındaki değişimini gösteren Western Blot verisi B. Çubuk grafik, her bir örneğin Bcl-2 protein bandının B-actin'e normalizasyonu ile elde edilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm SEM, n =10 örnek/grup. İstatistik karşılaştırma *p < 0.05, HK grubuna göre karşılaştırmayı, ** DM+HK grubuna göre karşılaştırmayı göstermektedir (one-way ANOVA).

4.1.3. CAMKII Protein Ekspresyonu

Vücuttaki kilo artışı ile birlikte gelişen mekanik yük artışı ve DM'nin apoptotik proteinlerle birlikte özellikle hücre içi sinyallerin düzenlenmesinde önemli rolü olan CAMKII üzerinde olası etkisi de, çalışmamızda incelendi (Şekil.4.3). Şekil 4.3.A'da CAMKII'nin fosforile formu olan pCAMKII ve CAMKII'nin toplam formu olan CAMKII bantları görülmektedir. Şekil 4.3.B'de her bir gruba ait pCAMKII bantları, CAMKII bandına oranlanmış ve bu değerler kontrol grubu olan HK verisine bölünerek Şekil 4.2.B'deki çubuk grafik oluşturulmuştur. Grafik HK verisine göre kat artış olarak ifade edilmiştir.

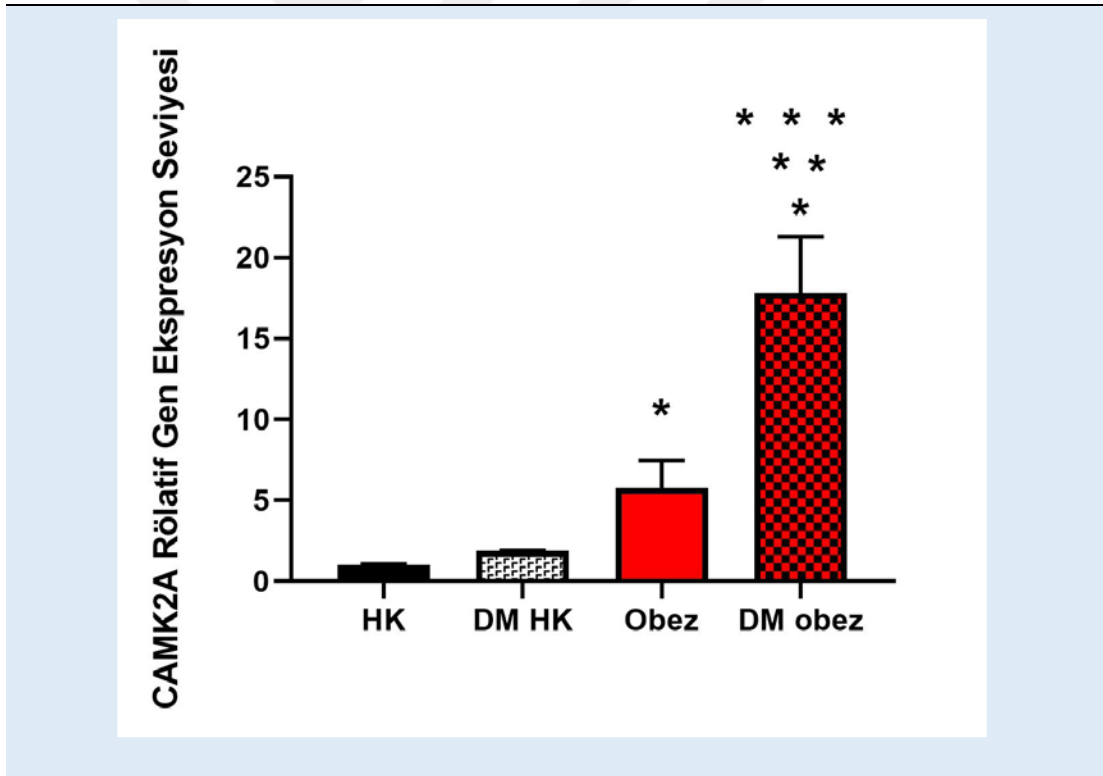
Şekil 4.2.C'deki çubuk grafikte her bir gruba ait CAMKII bantları, kendi B-actin bandına oranlanmış ve bu değerler HK verisine bölünerek, şekildeki çubuk grafik elde edilmiştir. Deneylerimizde toplam CAMKII miktarı gruplar arasında değişmezken, HK grubuna göre pCAMKII DM ve obez gruplarında artış göstermiştir. Bu artış, obez grubunda DM grubundan da fazla olmuştur. Ancak hem obez hem de DM olan hastaların örneklerinde, DM obezitenin üstünde ekstra bir farka neden olmamıştır (Kontrol HK grubuna göre kat artış olarak: DM: $1,68 \pm 0,16$, Obez: $2,73 \pm 0,14$, DM+Obez: $3,14 \pm 0,19$).



Şekil 4.3. OA'li hastaların kıkırdak örneklerindeki CAMKII-pCAMKII değişimi. A. CAMKII-pCAMKII gruplar arasındaki değişimini gösteren Western Blot verisi B. Çubuk grafik, her bir örneğin pCAMKII protein bandının CAMKII 'ye normalizasyonu ile elde edilmiştir. C. Çubuk grafik, her bir örneğin CAMKII protein bandının B-actin'e normalizasyonu ile elde edilmiştir. Grafikte sonuçlar ortalama \pm SEM, n = 10 örnek/grup. İstatistik karşılaştırma *p < 0.05, HK grubuna göre karşılaştırmayı, ** DM HK grubuna göre karşılaştırmayı göstermektedir (one-way ANOVA)

4.2. Gruplar Arası CAMK2A Gen Ekspresyon Değişimleri

Bu tez çalışmasında belirtilen metotlar kullanılarak gruplara ait hedef gen ekspresyon değişimleri belirlendi ve gen seviyeleri ortalama \pm standart hata olarak gösterildi (Şekil 4.4). Obez ve diyabet+obez grubuna ait CAMK2A gen ekspresyon seviyeleri, hafif kilolu (kontrol) grubuna kıyasla sırasıyla $5,79 \pm 1,69$ ve $17,82 \pm 3,45$ olarak tespit edildi. İstatistiksel analizlere göre hem obez hem de diyabet+obez grubuna ait CAMK2A gen ekspresyon seviyeleri, kontrol grubuna göre ($1,0 \pm 0,07$) istatistiksel olarak anlamlı biçimde farklıdır. Ayrıca diyabet+obez grubu ile diyabet+hafif kilolu ($1,88 \pm 0,02$) arasında da istatistiksel anlamlı fark belirlenmiştir. Obez ve diyabet+obez grupları arasında da anlamlı fark tespit edilmiştir. Ancak hafif kilolu kontrol grubu ile diyabet+hafif kilolu grup arasında gen ekspresyonu açısından anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.



Şekil 4.4. Gruplara ait rölatif CAMK2A gen ekspresyon seviyeleri. " * " ; belirtilen grupların hafif kilolu (kontrol) grubuna olan istatistiksel anlamlı farkını; " ** " belirtilen grupların diyabet+hafif kilolu (kontrol) grubuna olan istatistiksel anlamlı farkını; " *** " ise belirtilen grupların obez grubuna olan istatistiksel anlamlı farkını göstermektedir ($p < 0,05$). (HK: Hafif Kilolu; DM+HK: Diyabet + hafif kilolu; DM+Obez: Diyabet + obez)

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasının amacı; osteoartrit'te apoptozun etkilerini mekanik yüklenme (obezite) ve DM gibi fiziksel ve metabolik etkileri birbirinden ayırarak açıklamaya çalışmaktır.

İnsan Kıkırdağında kıkırdak hasarı sonucu olan osteoartrit'in gelişiminde kondrosit apoptozunun rol oynadığı ve apoptozun süreç içinde regüle edildiği gösterilmiştir (107,108). Osteoartrit sonucu kıkırdak doku kaybı ve dolayısıyla kondrosit ölümündeki artış sürecinde ise apoptozun hücrede homeostazı nasıl sağladığının daha iyi anlaşılması gerekmektedir. Literatürde OA ve apoptotik süreçlerin gelişiminde hastalıkların rolünü inceleyen çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Özellikle yaşlanmanın, hareketsizliğin ve yanlış beslenmenin OA ile oluşacak metabolik değişikliklerin gelişmesini artırıcı unsurlar oldukları bilinmektedir (109,110). Ayrıca obezite ile bağlantılı olarak gelişen tip 2 diyabetle OA arasındaki ilişki de yapılan araştırmalarda geniş olarak yer tutmaktadır (111,112).

Yapılan çalışmalarda obezite ile OA gelişimi arasındaki ilişki, biyomekanik olarak eklem uygulanan artmış yük ve makaslama kuvvetleri şeklinde açıklanmaktadır (113).

Mekanik kuvvetlerin uyardığı kondrositler bu durumda çeşitli sinyal mekanizmalarını aktive ederek doku homeostazını korumaya çalışır. Sinyal yollarının aktivasyonunda sitokinler, inflamatuvar aracı moleküller ve nitrik oksit yer alır. Aktive olan bu nitrik oksit gibi reaktif oksijen türleri (ROS) hücre çevresinde oksidatif stres ve devamında matriks yıkımını başlatırlar (114-119). Kondrositlerde ROS aktivasyonunun artışı ile oksidatif stres oluşması, özellikle OA'li hastaların kıkırdak hücrelerinde artan apoptoz aktivitesi ile birlikte artmış mitokondriyal DNA (mtDNA) hasarını tetiklediği gösterilmiştir (110).

Obezite dışında eklem kıkırdağında OA'in gelişmesine sebep olan bir diğer faktör de DM'dir. Ancak DM ile OA arasındaki bağlantı yapılan çalışmalarda yeterince aydınlatılamamıştır. Yine de literatürde, OA ve diyabet arasındaki bağlantıyı açıklamak için yapılan OA'lı hayvan deneylerinde endoplasmik reticulum stress (ERS) seviyelerinin, glukoz transporter 1 (GLUT1) ve regülör faktörü hipoksi-inducible

factor (HIF)-1 α protein ekspresyon seviyelerinin sinoviyal zarda artmış olduğu gösterilmiştir (120).

OA'li hastalarda yapılan çalışmalarda genellikle OA'ya metabolik sendrom hastalıklarının da (diyabet, obezite, hipertansiyon, gibi) eşlik ettiği görülmektedir. Bu nedenle her bir faktörün OA'ya etkisini anlamamız ve aktive olan sinyal yollarını incelememiz zorlaşmaktadır.

Çalışmada yer alan hafif kilolu (HK) ve obez hastaların tümünün kan şekerleri 120 mg/dL'nin altında ölçüldü. Çalışmamızdaki hastaların tümünün tansiyon ölçüm değerlerinin normal sınırlarda olmasına ve hiçbirinin bir inflamatuvar hastalık olan romatoid artrit şikâyetlerinin olmamasına dikkat edildi. Bu şekilde OA'li hastalar arasında oluşturduğumuz HK grubu kontrol grubumuzu oluştururken, obez grubunda DM'li hasta olmaması ile de diyabet hastalığı ile mekanik yüklenmenin etkilerinin birbirinden ayrılması sağlandı.

Çalışmamızda OA'de apoptozun rolü, apoptozda rol oynayan iki ana yolaktaki proteinlerden olan Bcl-2 ve kaspaz 3 ekspresyonlarının incelenmesi ile gerçekleştirildi. Kaspaz-3 ekspresyonundaki artış, hastalık veya obezite gibi sistemik bozukluklarda OA'da apoptoz gelişimini önemli derecede arttırdığını göstermiştir.

Bir apoptotik protein olan kaspaz-3'ün OA'da artışı daha önceki çalışmalarda da gösterilmiştir (110). Ancak bu çalışmada bütün gruplarda (DM+HK, Obez, ve DM+Obez), kontrol HK OA grubuna göre artmış bir kaspaz-3 görmemiz, katabolik süreçlerin hem DM'de hem de obezitede ayrı ayrı artmış ve baskın olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda ayrıca bir anti apoptotik protein olan Bcl-2 protein ekspresyonuna da bakıldı. Yapılan deneylerde Bcl-2 proteininin de tüm gruplarda (DM+HK, Obez ve DM+Obez), kontrol HK OA grubuna göre artmış olduğu gözlemlendi. Hatta DM+Obez ve obez gruplarında, DM+HK grubundan daha fazla Bcl-2 ekspresyonu olduğu görüldü. Bu veri sağlıklı ve OA'lı hastaların kıkırdak dokularındaki mRNA'larının Bcl-2/Bax oranının OA'lı hastalarda azaldığını göstermektedir (155). Bu sonuç in vivo olarak yapılan çeşitli oksidatif stress ajanların doğrudan hücrelerin veya dokuların üzerine eklenmesi ile azalan Bcl-2 aktivasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarla çelişmektedir (121,122).

Hastaların dokularındaki artan Bcl-2 ekspresyonu, anabolik süreçlerin kıkırdak dokuda hala devam edebildiğini göstermesi açısından önem taşımaktadır. Kim ve ark, (2000) çalışmalarında normal kıkırdakta apoptotik kondrositlerin OA'e göre çok daha az olduğunu göstermişlerdir (123). Yine aynı çalışmada OA hasarı olan bölgedeki hücrelerin apoptoz oranının da, bu hasarın olmadığı OAlı bölgeye göre daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Çalışmalarında normal kıkırdakta OA'lı kıkırdağa göre Bcl-2 ekspresyonunun artmış olduğunu, ancak OA'lı hasarlı kısmın da hasarsız kısma göre daha fazla Bcl-2 eksprese ettiğini göstermişlerdir. Başka bir çalışmada OA'lı kıkırdakta Bcl-2 ekspresyonun arttığı, ancak Bax'ın kıkırdağın normal, hasarlı ve hasarsız bölümlerinde değişmediğini göstermişlerdir (124).

Çalışmamızda, DM+Obez ve Obez gruplarında Bcl-2'nin kontrol HK, ve DM gruplarına göre daha fazla bir artış göstermesi, metabolik süreçlerin bu dokuları apoptozdan korumaya çalışması olarak değerlendirilebilir. Apoptotik protein ekspresyonlarına paralel olarak artan Bcl-2 ekspresyonu bir çeşit osteokondropati olan ve sekonder OA'nın gelişmesi ile sonuçlanan Kashin-Beck sendromlu (KBD) hastalarda da gözlenmiştir. Çalışmada KBD eklem kıkırdaklı hastalarda Bax ve Fas gibi apoptotik protein ekspresyonlarına rağmen artan Bcl-2 artışı dokuda apoptoz lehine değişen bir denge durumu olarak yorumlanmıştır (125).

Osteoartrit'li hastaların kondrositlerinde p-CaMKII, CaMKII ve CaMKII mRNA aktivasyonları incelendiğinde DM ve obez gruplarda mRNA sentezinin ve proteininin fosforile formunun protein ekspresyonuna göre artmış olduğu görüldü. Ca^{2+} bir hücre içi haberci olarak hücrede homeostazın korunmasında ve birçok metabolik sürecin devamlılığında rol alan bir iyonudur (126). Ayrıca sitoplazmik Ca^{2+} konsantrasyonundaki değişimler, kıkırdak hasarı oluşumunda ve kondrositlerde apoptoz süreçleri de dâhil olmak üzere, pek çok sinyal yolağının aktivasyonunda işlev görür (127,128). Hücrede artan CAMKII fosforilasyonu ise özellikle hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonun arttığını işaret etmesi nedeniyle ve kondrositte Ca^{2+} ile aktive olan yolakların aktive olduğunu göstermesi açısından önem taşımaktadır. CAMKII fosforilasyonun kondrosit proliferasyonunda ve ECM sentezinde rol aldığı gösterilmiştir (129). Ayrıca literatürde OA'da p-CAMKII'nin artışı gösteren çalışmalar bulunmaktadır (130). Ancak bu çalışmalardan Nalesso G ve ark yaptıkları çalışmada CAMKII inhibisyonunun kıkırdak

hasarını arttırdığını gösterilmiş ve CAMKII'nin kıkırdak homeostazındaki kritik rolüne işaret edilmiştir (130).

Deneilerimizde osteoartrit'li dokular ile osteoartrit ile birlikte ve sistemik hastalıkların olduğu dokular karşılaştırıldığında, sistemik hastalıklarda kaspaz-3'ün daha aktif olduğu görüldü. Ancak apoptotik yolağın aktivasyonuna rağmen, Bcl-2'nin ve CAMKII ekspresyonlarındaki artışın DM ve Obez gruplarda ön plana çıkmasında OA'lı kıkırdakta sistemik hastalıklar sonucunda homeostazın sağlanmasına yönelik daha yoğun bir hücreyel aktivite olduğunu düşündürmektedir. OA'da metabolik hastalıkların bir arada bulunması apoptotik süreçleri artırırken, yapım yıkım oranı düşünüldüğünde, yıkım baskın olmakla beraber, dengenin korunması için daha fazla bir aktivasyona neden olduğunu göstermektedir.

Bcl-2 verimizde obez grubundaki anti apoptotik aktivitenin DM grubundaki örneklerden daha fazla olduğu ayrıca obez grubundaki hastaların aynı zamanda diyabetli olmaları durumu ise, tek başına obez grubunun Bcl-2 aktivitesini değiştirmedigi görüldü. Yine çalışmamızda CAMKII ekspresyonlarını incelediğimizde, sonuçların Bcl-2 verisine benzer şekilde DM'de bir miktar aktivasyon yönünde artış olurken, obezitede DM grubundan daha fazla miktarda bu proteinin aktivasyonunun arttığı gözlemlendi. Gen ekspresyon düzeyinde CAMK2A'nin obez grubunda artması, dokuda apoptoza karşı olan anabolik süreçlerin hala devam ettiğini ve bu anabolik süreçlerin obezitede daha yoğun olduğunu göstermektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, osteoartrit'te apoptoz mekanizması, DM ve mekanik yüklenme (mekanik yüklenme) üzerinden incelendi. Bunun için VKİ'lerine göre ayrılan hastalardan alınan kırık örnekleri kendi içlerinde gruplara ayrılarak OA'da DM ve obezite birbirlerinden ayrı bir şekilde değerlendirildi. Bu şekilde DM gibi, bir metabolizma hastalığı sonucu oluşan hasarlanma ile sadece kırık üzerine gelen yük miktarının artışı ile oluşan hasarlanma apoptoz yolağındaki proteinler üzerinden karşılaştırılarak, OA'da apoptoz anlaşılmasına çalışıldı.

Bir ilk olma özelliği taşıyan çalışmamızda, OA'lı hastalardan alınan kırık dokulardaki apoptoz süreci, hastaların metabolik hastalıklarının ve kırıkta mekanik yük miktarındaki artışın etkisi birbirinden ayrılarak incelendi. Buna göre kaspaz-3'ün ekspresyonundaki artış, katabolik süreçlerin bu iki ayrı tipte hastalık koşulu için de artmış bir apoptotik yanıtı sebep olduğunu göstermiştir. Bununla beraber Bcl-2 ve CAMKII yanıtlarının yine bu hastalıklarda artmış olduğunu görmemiz anabolik süreçlerin hala devam ettiğini ve bu anabolik süreçlerin obezitede daha yoğun olduğunu göstermektedir. Ayrıca hastalıkların bir arada bulunması, yapım yıkım oranında, yıkım baskın olmakla beraber, dengenin korunması için daha fazla bir aktivasyona neden olduğunu göstermektedir.

Tez çalışmamızın bir diğer sonucu da hücre içi sinyal proteinlerinin (Bcl-2 ve CAMKII) obezitenin olmadığı tek başına DM grubunda daha düşük aktivasyon gösterirken, obezite varlığında daha yüksek aktivasyon göstermeleri olmuştur. Bu sonuç, eklemlere gelen yük miktarının OA gelişiminde ve OA'da apoptoz sürecinde DM'den daha belirleyici olduğunu düşündürmektedir. Sonuç olarak insan eklem kırıkta OA'da DM'ye göre obezite kaynaklı mekanik yüklenmede daha yüksek bir metabolik aktive görülmüştür. Ancak bu aktivitenin daha iyi tanımlanması için yeni deneylere ihtiyaç duyulmuştur.

Hücresel düzeyde, metabolizma ve kuvvet yanıtlarının farklılaştığı noktaları daha iyi kavramamız osteoartrit gibi yaşlanan dünya nüfusu için kritik bir hastalığın tedavisinde yeni yaklaşımların oluşmasına katkı sağlayacaktır.

KAYNAKÇA

- 1- **Çimen , A.** Anatomi. Bursa: Uludağ Üniversitesi Basımevi. **1994**.
- 2- **Silva, A., Serrao, P., Driusso, P., & Mattiello, S.** The effects of therapeutic exercise on the balance of women with knee osteoarthritis: a systematic review. *Rev Bras Fisioter* **2012**; 16(1):1–9.
- 3- **Dıraçoğlu, D., R. Aydın, and A. Başkent,** Sağlıklı kişilerde ve diz osteoartritli hastalarda propriosepsiyon duyusunun karşılaştırılması. *Türk Fiz. Tıp Rehab. Derg.* **2005**. 51: p. 90-93
- 4- **Klug S, Weseloh G.** Clinical picture of osteoarthrosis. In: Grifka J, Ogilvie-Harris DJ, editors. *Osteoarthritis*. Berlin Heidelberg: Springer Science & Business Media. **2000**; p. 9-22.
- 5- **Lawrence RC, Helmick CG, Arnett FC, Deyo RA, Felson DT, Giannini EH et al.** Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum.* **1998**; 41(5):778-99.
- 6- **Røgind, H., B. Bibow-Nielsen, B. Jensen, H.C. Møller, H. Frimodt-Møller, and H. Bliddal,** The effects of a physical training program on patients with osteoarthritis of the knees. *Archives of physical medicine and rehabilitation*, **1998**; 79(11): p. 1421-1427
- 7- **Rehabilitasyon, O.A.K., In; Diniz F, Ketenci A, editors,** Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, **2000**; p. 509-29.
- 8- **Tas, S., S. Guneri, A. Baki, T. Yildirim, B. Kaymak, and Z. Erden,** Effects of severity of osteoarthritis on the temporospatial gait parameters in patients with knee osteoarthritis. *Acta Orthop Traumatol Turc*, **2014**; 48(6): p. 635-641.
- 9- **Neogi, T., D. Felson, J. Niu, M. Nevitt, C.E. Lewis, P. Aliabadi, et al.,** Association between radiographic features of knee osteoarthritis and pain: results from two cohort studies. *Bmj*, **2009**; 339: p. b2844.
- 10- **Ornetti, P., et al.,** Gait analysis as a quantifiable outcome measure in hip or knee osteoarthritis: a systematic review. *Joint Bone Spine*, **2010**; 77(5): p. 421-425.
- 11- **Taş, S., A. Baki, Y. Erdoğanoğlu, E. Akbaş, G.İ. Kinikli, Z. Erden, et al.,** Diz osteoartrit şiddetinin yürüyüşün kinematik parametreleri üzerine etkileri. *Türk Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Dergisi/Turkish Journal of Physiotherapy and Rehabilitation*, **2014**; 3(25): p. 1-7.
- 12- **Astephen, J.L., K.J. Deluzio, G.E. Caldwell, and M.J. Dunbar.** Biomechanical changes at the hip, knee, and ankle joints during gait are associated with knee osteoarthritis severity. *Journal of orthopaedic research*, **2008**; 26(3): p. 332-341.
- 13- **Aydoğ, E., Yazar, D., Bal, A., Ekşioğlu , E., & Ünlü, E.** İleri düzeyde varus deformitesi olan bilateral diz osteoartritli hastalarda dinamik postural denge. *Romatizma* **2005**; 20(2):39–44.
- 14- **Silva, A., Serrao, P., Driusso, P., & Mattiello, S.** The effects of therapeutic exercise on the balance of women with knee osteoarthritis: a systematic review. *Rev Bras Fisioter* **2012**; 16(1):1–9.
- 15- **Lane, N.E., Thompson , & J.M.** Management of osteoarthritis in the primary-care setting: an evidence-based approach to treatment. *Am JMed.* **1997**; 103: 25-30.

- 16- **Dinçer , Ü., Çakar , E., & Özdemir , B.** Bilateral diz osteoartritinde kombine fizik tedavi programı ile egzersiz programının bozulmuş denge fonksiyonuna etkisinin karşılaştırılması. *Romatizma*. **2008**; 23(1):9-14.
- 17- **Baert IA, Staes F, Truijen S, Mahmoudian A, Noppe N, Vanderschueren G, Luyten FP, Verschuere SM.** Weak associations between structural changes on MRI and symptoms, function and muscle strength in relation to knee osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. **2014**; 22(9):2013-25.
- 18- **Nelson AE, Allen KD, Golightly YM, Goode AP, Jordan JM.** A systematic review of recommendations and guidelines for the management of osteoarthritis: The chronic osteoarthritis management initiative of the U.S. bone and joint initiative. *Semin Arthritis Rheum*. **2014**; 43(6):701-12.
- 19- **Pendleton , A., Arden , N., Dougados , M., Doherty , M., Bannwarth, B., & Bijlsma, J.** EULAR Recommendations for the management of knee osteoarthritis: report of a task force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). *Ann Rheum Dis* **2000**; 59(12):936-44.
- 20- **Hochberg MC, Altman RD, April KT, Benkhalti M, Guyatt G, McGowan J, Towheed T, Welch V, Wells G, Tugwell P;** American College of Rheumatology. American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. **2012**; 64(4):465-74.
- 21- **Altman R., Bloch , D., Asch, R., Bole, G., Borenstein, D., & Brandt, K.** Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the knee. Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum* **1986**; 29:1039-1049.
- 22- **Sezgin, M., Erdal, M., Altintas, Z., Ankarali, H., Barlas, I. O., Sahin, G.** Lack of association polymorphisms of the IL1RN, IL1A, and IL1B genes with knee osteoarthritis in Turkish patients. *Clinical & Investigative Medicine* **2007**; 30(2): E86-E92.
- 23- **Uysal, FG, B. S.** Diz Osteoartriti. **2009**; 55:1-7. *Türk Fiz Tıp Rehab Derg.*
- 24- <https://www.pthealth.ca/app/uploads/2017/07/Osteoarthritis.jpg>.
- 25- **Tuncer, T., C. H.** Diz osteoartrit tedavisinde kanıt dayalı öneriler: Türkiye romatizma araştırma ve savaş derneği uzlaş raporu. **2012**; 27(1):1-17. *Turk J Rheumatol*.
- 26- **Dennison , E., Cooper , C., Hochberg , M., Silmon , A., & Smolen, A.** Osteoarthritis: epidemiology and classification. *Rheumatology New York Mosby* **2003**; 1981-84.
- 27- **Kacar , C., Gilgil , E., Urhan , S., Arıkan , V., Dundar , U., & Oksuz, M.** The prevalence of symptomatic knee and distal interphalangeal joint osteoarthritis in the urban population of Antalya, Turkey. *Rheumatol Int* **2005**; 25(3):201-4.
- 28- **Cesare Paul E., Steven B.Abramson.** Osteoartrit Patogenezi. İç: Dinçer F, editör. *Kelley Romatol* **2018**; 1493-1513.
- 29- **Babaoğlu Ü. S., Evcik D.** Osteoartrit Etiyopatogenezi, *Galenos Aylık Tıp Derg.* **2006**; 114:13-164.
- 30- **Herman CJ, Allen P, Hunt WC, Prasad A, Brady TJ.** Use of complementary therapies among primary care clinic patients with arthritis. *Prev Chronic Dis*. **2004**; 1(4):A12.

- 31- **Martin JA, Buckwalter JA. Aging.** Articular cartilage chondrocyte senescence and osteoarthritis. *Biogerontology* **2002**; 3: 257-64.
- 32- **Reginster JY, Bruyere O, Neuprez A.** Current role of 15. glucosamine in the treatment of osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*. **2007**; 46(5):731-5.
- 33- **Kalunian, KC., Tugwell P., Greene JM.** Pathogenesis of osteoarthritis. In: UpToDate, Basow, DS (Ed), UpToDate, Waltham, MA. **2010**.
- 34- **Geusens PMM.** Review of Guidelines for testing and treatment of osteoporosis. *Curr Osteopor Rep.***2003**; 1: 59-65
- 35- **Miller PD, Hochberg MC, Wehren LE, Ross PD, Wasnich RD.** How useful are measures of BMD and bone turnover? *Curr Med Res Opin.* **2005**; 21: 545-53
- 36- **Hannon RA, Eastell R.** Biochemical markers of bone turnover and fracture prediction. *J Br Menopause Sec.* **2003**; 9: 10-5.
- 37- **Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, Abramson S, Altman RD, Arden N, et al.** OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part I: Critical appraisal of existing treatment guidelines and systematic review of current research evidence. *Osteoarthritis Cartilage.* **2007**; 15:981-1000.
- 38- **Silverwood, V. B.-B., Silverwood, V., Blagojevic-Bucknall, M., Jinks, K.P.** Current evidence on risk factors for knee osteoarthritis in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage* **2015**; 23 (4), 507-515.
- 39- **Hart, D.J., Doyle, D.V., Spector. T.** Incidence and risk factors for radiographic knee osteoarthritis in middle-aged women. *Arthritis Rheum*, **1999**; 42 (1), 17-24.
- 40- **Salih, S., & Sutton, P.** Obesity, knee osteoarthritis and knee arthroplasty: a review. *BMC Sports Sci Med Rehabil* **2013**; 5(1):25.
- 41- **Amin, S., Niu, J., Guerhazi, A., Grigoryan, M., Hunter, D. Clancy, M.** Cigarette smoking and the risk for cartilage loss and knee pain in men with knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* **2007**; 66(1):18-22.
- 42- **Felson, D.T., Lawrence, R.C., Dieppe, P., Hirsch, R., J.M.** Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Annals of internal medicine*, **2000**; 133 (8), 635-646.
- 43- **Spector, T.D., MacGregor, A.J.** Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis and cartilage*, **2004**; 12, 39-44.
- 44- **Edwards, J. C., Wilkinson, L. S., Jones, H. M., Soothill, P., Henderson, K. J., Worrall, J., and Pitsillides, A. A.** The formation of human synovial joint cavities: a possible role for hyaluronan and CD44 in altered interzone cohesion. *J. Anat.* 185(Pt 2), **1994**; 355–367.
- 45- **Buckwalter, J. A., and Mankin, H. J.** Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr. Course Lect.* **1998**; 47, 477–486.
- 46- **Fassbender, H. G.** Role of chondrocytes in the development of osteoarthritis. *Am. J. Med.* **1987**; 83, 17–24.
- 47- **Mankin, H. J.** The response of articular cartilage to mechanical injury. *J. Bone Joint Surg. Am.* **1982**; 64, 460–466.

- 48- **Urban, J. P. G., Hall, A. C., and Gehl, K. A.** Regulation of matrix synthesis rates by the ionic and osmotic environment of articular chondrocytes. *J. Cell. Physiol.* **1993**; 154, 262–270.
- 49- **Martin, J. A., and Buckwalter, J. A.** The role of chondrocyte-matrix interactions in maintaining and repairing articular cartilage. *Biorheology* **2000**; 37, 129–140.
- 50- **Urban, J. P.** The chondrocyte: a cell under pressure. *Br. J. Rheumatol.* **1994**; 33, 901–908.
- 51- **Breittmayer, J. P., Pelassy, C., and Aussel, C.** Effect of membrane potential on phosphatidylserine synthesis and calcium movements in control and CD3-activated Jurkat T cells. *J. Lipid Mediat. Cell Signal.* **1996**; 13, 151–161.
- 52- **McCarty, M. F.** Endothelial membrane potential regulates production of both nitric oxide and superoxide—a fundamental determinant of vascular health. *Med. Hypotheses.* **1999**; 53, 277–289.
- 53- **Penyige, A., Matko, J., Deak, E., Bodnar, A., and Barabas, G.** Depolarization of the membrane potential by betalactams as a signal to induce autolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**; 290, 1169–1175.
- 54- **Wu, Q. Q., and Chen, Q.** Mechanoregulation of chondrocyte proliferation, maturation, and hypertrophy: ion-channel dependent transduction of matrix deformation signals. *Exp. Cell. Res.* **2000**; 256, 383–391.
- 55- **Mouw, J. K., Imler, S. M., and Levenston, M. E.** Ion-channel regulation of chondrocyte matrix synthesis in 3D culture under static and dynamic compression. *Biomech. Model. Mechanobiol.* **2007**; 6, 33–41.
- 56- **Wohlrab, D., Vocke, M., Klapperstuck, T., and Hein, W.** Effects of potassium and anion channel blockers on the cellular response of human osteoarthritic chondrocytes. *J. Orthop. Sci.* **2004**; 9, 364–371.
- 57- **Lawrence RC, Helmick CG, Arnett FC, Deyo RA, Felson DT, Giannini EH, et al.** Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum.* **1998**; 41(5):778-99.
- 58- **Pritchard S, Guilak F.** Effects of interleukin-1 on calcium signaling and the increase of filamentous actin in isolated and in situ articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*, **2006**; 54: 2164–74.
- 59- **Lepetsos P, Papavassiliou AG.** ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta.* **2016**; 1862(4):576-591.
- 60- **Taskiran D, Stefanovic-Racic M, Georgescu H, Evans CH.** Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. *Biochem Biophys Res Commun* **1994**; 200:142–8.
- 61- **Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M.** Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol* **1995**; 146:75–85.
- 62- **Musumeci G, Castrogiovanni P, Trovato FM, Weinberg AM, Al-Wasiyah MK, Alqahtani MH, Mobasher A.** Biomarkers of Chondrocyte Apoptosis and Autophagy in Osteoarthritis. *Int J Mol Sci.* **2015**; 31;16(9):20560-75. 8.

- 63- **Schett G, Kleyer A, Perricone C, Sahinbegovic E, Iagnocco A, Zwerina J, Lorenzini R, Aschenbrenner F, Berenbaum F, D'Agostino MA, Willeit J, Kiechl S.** Diabetes is an independent predictor for severe osteoarthritis: results from a longitudinal cohort study. *Diabetes Care.* **2013**; 36(2):403-9.
- 64- **Marshall CB, Nishikawa T, Osawa M, Stathopoulos PB, Ikura M.** Calmodulin and STIM proteins: Two major calcium sensors in the cytoplasm and endoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun.* **2015**; 24;460(1):5-21.
- 65- **Hwang HS, Kim HA.** Chondrocyte Apoptosis in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Int J Mol Sci,* **2015**; 16: 26035-26054.
- 66- **Kahn, C. R. Banting Lecture.** Insulin action, diabetogenesis, and the cause of type II diabetes. *Diabetes.* **1994**; 43: 1066-1084.
- 67- **Robertson, R. P. Antagonist.** Diabetes and insulin resistance-philosophy, science, and the multiplier hypothesis. *J Lab Clin Med.* **1995**; 125: 560-564; discussion 565.
- 68- **Çalış FA.** Osteoartrit Tedavisi: Fizik Tedavi Ajanları. *Türkiye Klinikleri Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon:* **2012**; 80-7.
- 69- **Bennell , K., Hinman, R., Metcalf , B., Buchbinder, R., McConnell , J., & McColl, G.** Efficacy of physiotherapy management of knee joint osteoarthritis: a randomised, double blind, placebo controlled trial. *Ann Rheum Dis* **2005**; 64: 906- 912.
- 70- **Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* **1972**; 26(4): 239-57.
- 71- **Elmore S.** Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology;* **2007**; 35:495-516.
- 72- **Apoptozis Ders notları (2003).** www20.uludag.edu.tr/~eulukaya
- 73- **Kaya C, Çalışkan Y, Yönden Z.** Apoptozis. *Mustafa Kemal Üniv.Tıp Derg,* Cilt 3, Sayı 1 ;**2012**.
- 74- **Lawen A.** Apoptosis an introduction. *BioEssays.* **2003**; 25:888-896.
- 75- **Abbro L, Dini L.** Common morphological features of apoptotic cell blebs. *Ital J Zool.* **2003**; 70(4): 297-299.
- 76- **Yıldırım İ.H., Koçak N., Yıldırım S.C.** Programlı Hücre Ölümü; Literatür Bilgilerinin Türkçe Derlemesi. *Dicle Üniv. Vet. Fak. Derg.* **2012**; 2(3):58-66.
- 77- **Hengartner MO.** Apoptosis: corralling the corpses. *Cell.* **2001**;104: 325–328.
- 78- **Robertson JD, Orrenius S, Zhivotosky B.** Review: Nuclear events in apoptosis, *Journal of Structural Biology.* **2000**; 129:346-358.
- 79- **Ziegler U, Groscurth P.** Morphological features of cell death. *News Physiol Sci.* **2004**; 19: 124-8.
- 80- **Baccetti B, Collodel G, Piomboni P.** Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9). *J Submicrosc Cytol Pathol;* **1996**; 28(4):587-96.
- 81- **Shoja, M.H., Reddy, N.D., Nayak, P.G., Srinivasan, K.K., Mallikarjuna R.C.** Glycosmis pentaphylla (Retz.) DC arrests cell cycle and induces apoptosis via caspase 3/7 activation in breast cancer cells. *J Ethnopharmacol,* **2015**; 168:50-60.

- 82- **Hancock, J.T.** Cell Signalling: Second Edition, Oxford University Press,296 p. **2005**.
- 83- **Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M., Tanyolaç, B.** Moleküler Biyoloji, Nobel Yayın Dağıtım, 613 s. **2007**.
- 84- **Lawen, A.** Apoptosis-an introduction, BioEssays, **2003**; 25, 888-896.
- 85- **Hermann, M., Kalden, J.R.** Apoptosis and Autoimmunity, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaG, Weinheim, 387 p. **2003**.
- 86- **Elmore, S.** Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicologic Pathology, **2007**; 35(4): 495-516.
- 87- **Yerlikaya, A. Dokudur H.** Protein yıkımının önemi. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, **2009**; 35: 93-99.
- 88- **Thornberry, N.A., Lazebnik, Y.** Caspases: enemies within. Science, **1998**; 281:1312–1316.
- 89- **Klug, W.S, Cummings, M.R.** Genetik Kavramlar, (Çev. C. Öner), Palme Yayıncılık, 816 s. **2003**.
- 90- **Cooper, G.M., ve Hausman, R.E.** Hücre Moleküler Yaklaşım, (Çev. M. Sakızlı ve N. Atabey), İzmir Tıp Kitabevi, 714 s. **2006**.
- 91- **Oral, Ö., Irmak, S., Ekici, S., & Gözüaçık, D.** Autophagy in urology, 259. **2012**.
- 92- **Swulius MT, Waxham MN.** Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinases. Cell Mol Life Sci. **2008**; 65(17):2637-57.
- 93- **Burnett G, Kennedy Ep.** The enzymatic phosphorylation of proteins. J Biol Chem. **1954**; 211(2):969-80.
- 94- **De Bondt HL, Rosenblatt J, Jancarik J, Jones HD, Morgan DO, Kim SH.** Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. Nature. **1993**; 17;363(6430):595-602.
- 95- **Wayman GA, Lee YS, Tokumitsu H, Silva AJ, Soderling TR.** Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity. Neuron. **2008**; Sep 25;59(6):914-31.
- 96- **Zhang F, Strand A, Robbins D, Cobb MH, Goldsmith EJ.** Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. Nature. **1994**; Feb 24;367(6465):704-11.
- 97- **Rosenberg OS, Deindl S, Sung RJ, Nairn AC, Kuriyan J.** Structure of the autoinhibited kinase domain of CaMKII and SAXS analysis of the holoenzyme. Cell. **2005**; Dec 2;123(5):849-60.
- 98- **Hunter T, Schulman H.** CAMKII structure-an elegant design. Cell. **2005**; 2;123(5):765-7.
- 99- **Coşkun G., Özgür. H.** Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi. Arşiv; **2011**; 20: 145..
- 100- **Simsek F, Turkeri L, Cevik I, Bircan K, Akdas A.** Role of apoptosis in testicular tissue damage caused by varicocele. Arch Esp Urol. **1998**; 51(9):947-50.
- 101- **Towbin Harry H. Western Blotting. In: Delves PJ (Ed).**, Encyclopedia of Immunology, 2 nd ed, London, Academic Press,: **1998**; p 214-280.
- 102- **Najafov A, Hoxhaj G.** Western Blotting Guru, Academic Press, London, **2017**; 2-18.

- 103- **Mahmood, T., Yang, P.** Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences* **2012**; 4(9): 429–434.
- 104- **Roche,** Molecular Biochemicals Light Cycler System.
- 105- **Anonim.,** Protocol Books. [http://docs.abcam.com/pdf/misc/abcam-protocols-book-;](http://docs.abcam.com/pdf/misc/abcam-protocols-book-;_2010.pdf) **2010**.pdf (Erişim tarihi: 04.07.13).
- 106- **Raymaekers M, Smets R, Maes B,** Cartuyvels R. Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. *J Clin Lab Anal.* **2009**; 23(3):145-51.
- 107- **Borrelli J Jr.** Chondrocyte apoptosis and posttraumatic arthrosis. *J Orthop Trauma.* **2006**; 20(10):726-31.
- 108- **Héraud F, Héraud A, Harmand MF.** Apoptosis in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Ann Rheum Dis.* **2000**; 59(12):959-65.
- 109- **Louati K, Vidal C, Berenbaum F, Sellam J.** Association between diabetes mellitus and osteoarthritis: systematic literature review and meta-analysis. **2015**; 2;1(1).
- 110- **Mobasheri A, Rayman MP, Gualillo O, Sellam J, van der Kraan P, Fearon U.** The role of metabolism in the pathogenesis of osteoarthritis. **2017**; 13(5):302-311.
- 111- **Griffin TM, Huebner JL, Kraus VB, Yan Z, Guilak F.** Induction of osteoarthritis and metabolic inflammation by a very high-fat diet in mice: effects of short-term exercise. **2012**; 64(2):443-53.
- 112- **King KB, Rosenthal AK.** The adverse effects of diabetes on osteoarthritis: update on clinical evidence and molecular mechanisms. *Osteoarthritis Cartilage.* **2015**; 23(6):841-50.
- 113- **Issa RI, Griffin TM.** Pathobiology of obesity and osteoarthritis: integrating biomechanics and inflammation. *Pathobiol Aging Age Relat Dis.* **2012**; 9;2(2012).
- 114- **Urban JP.** The chondrocyte: a cell under pressure. *Br J Rheumatol.* **1994**; 33(10):901-8.
- 115- **Darling EM, Athanasiou KA.** Biomechanical strategies for articular cartilage regeneration. *Ann Biomed Eng.* **2003**; 31(9):1114-24.
- 116- **Loeser RF, Carlson CS, Del Carlo M, Cole A.** Detection of nitrotyrosine in aging and osteoarthritic cartilage: Correlation of oxidative damage with the presence of interleukin-1beta and with chondrocyte resistance to insulin-like growth factor 1. *Arthritis Rheum.* **2002**; 46(9):2349-57.
- 117- **Buckwalter JA, Martin JA, Brown TD.** Perspectives on chondrocyte mechanobiology and osteoarthritis. *Biorheology.* **2006**; 43(3,4):603-9.
- 118- **Leong DJ, Hardin JA, Cobelli NJ, Sun HB.** Mechanotransduction and cartilage integrity. *Ann N Y Acad Sci.* **2011**; 1240:32-7.
- 119- **Loeser RF.** Molecular mechanisms of cartilage destruction in osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* **2008**; 8(4):303-6.
- 120- **Li Q, Wen Y, Wang L, Chen B, Chen J, Wang H, Chen L.** Hyperglycemia-induced accumulation of advanced glycosylation end products in fibroblast-like synoviocytes promotes knee osteoarthritis. *Exp Mol Med.* **2021**; 53(11):1735-1747.

- 121- **Karaliotas GI, Mavridis K, Scorilas A, Babis GC.** Quantitative analysis of the mRNA expression levels of BCL2 and BAX genes in human osteoarthritis and normal articular cartilage: An investigation into their differential expression. *Mol Med Rep.* **2015**; 12(3):4514-4521.
- 122- **Günay İ, Baldan İ, Tokus M, Coskun C, Ocal I, Cicek FA.** Pulsed magnetic field maintains vascular homeostasis against H₂O₂-induced oxidative stress. *Gen Physiol Biophys.* **2020**; 39(6):579-586.
- 123- **Kim HA, Lee YJ, Seong SC, Choe KW, Song YW.** Apoptotic chondrocyte death in human osteoarthritis. *J Rheumatol.* **2000**; 27(2):455-62.
- 124- **Iannone F, De Bari C, Scioscia C, Patella V, Lapadula G.** Increased Bcl-2/p53 ratio in human osteoarthritic cartilage: a possible role in regulation of chondrocyte metabolism. *Ann Rheum Dis.* **2005**; 64(2):217-21.
- 125- **Wang SJ, Guo X, Zuo H, Zhang YG, Xu P, Ping ZG, Zhang Z, Geng D.** Chondrocyte apoptosis and expression of Bcl-2, Bax, Fas, and iNOS in articular cartilage in patients with Kashin-Beck disease. *J Rheumatol.* **2006**; 33(3):615-9.
- 126- **Berridge MJ.** The Inositol Trisphosphate/Calcium Signaling Pathway in Health and Disease. *Physiol Rev.* **2016**; 96(4):1261-96.
- 127- **Nguyen C, Lieberherr M, Bordat C, Velard F, Côme D, Lioté F, Ea HK.** Intracellular calcium oscillations in articular chondrocytes induced by basic calcium phosphate crystals lead to cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage.* **2012**; 20(11):1399-408.
- 128- **Pritchard S, Guilak F.** Effects of interleukin-1 on calcium signaling and the increase of filamentous actin in isolated and in situ articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* **2006**; 54(7):2164-74.
- 129- **Liang W, Li Z, Wang Z, Zhou J, Song H, Xu S, Cui W, Wang Q, Chen Z, Liu F, Fan W.** Periodic Mechanical Stress INDUCES Chondrocyte Proliferation and Matrix Synthesis via CaMKII-Mediated Pyk2 Signaling. *Cell Physiol Biochem.* **2017**; 42(1):383-396.
- 130- **Nalesso G, Thorup AS, Eldridge SE, De Palma A, Kaur A, Peddireddi K, Blighe K, Rana S, Stott B, Vincent TL, Thomas BL, Bertrand J, Sherwood J, Fioravanti A, Pitzalis C, Dell'Accio F.** Calcium calmodulin kinase II activity is required for cartilage homeostasis in osteoarthritis. *Sci Rep.* **2021**; 11;11(1):5682.

Url-1 <https://www.pthealth.ca/app/uploads/2017/07/Osteoarthritis.jpg>.

Url-2 [http:// Apoptozis Ders notları, www20.uludag.edu.tr/~eulukaya\(2003\)](http://Apoptozis Ders notları, www20.uludag.edu.tr/~eulukaya(2003)).

Url-3 <http://avesis.cu.edu.tr>

Url-4 <http://acikarsiv.ankara.edu.tr>

Url-5 <http://acikbilim.yok.gov.tr>

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Bingöl’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Elazığ’da tamamladı. 2007 senesinde başladığı Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümünden 2012 senesinde mezun oldu. 2013 yılında başladığı Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Katıhal Fiziği Anabilim Dalı’ndaki Yüksek Lisans eğitiminden 2015 yılında mezun oldu. 2016 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitimine başladı. Orta derecede İngilizce bilmektedir.

