

**T.C. FATİH ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KAFEİK ASİT FENETİL ESTER (CAPE), ROYAL JELLY VE
KURKUMİN'İN *ADAMTS/Agrekanaz* GEN EKSPRESYONU VE KIKIRDAK
HÜCRE DIŞI MATRİKSİNİN YENİDEN YAPILANMASINA ETKİSİ**

SÜMEYYA AKYOL

**TEZ DANIŞMANI
PROF.DR. M. RAMAZAN YİŐİTOĐLU**

Mayıs 2012

**T.C. FATİH ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KAFEİK ASİT FENETİL ESTER (CAPE), ROYAL JELLY VE
KURKUMİN'İN *ADAMTS/Agrekanaz* GEN EKSPRESYONU VE KIKIRDAK
HÜCRE DIŞI MATRİKSİNİN YENİDEN YAPILANMASINA ETKİSİ**

SÜMEYYA AKYOL

**TEZ DANIŞMANI
PROF.DR. M. RAMAZAN YİĞİTOĞLU**

Mayıs 2012


Fatih Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir

(Proje No: P53011101_Y)

ONAYLAMA SAYFASI

Enstitüsü : **Sağlık Bilimleri**
Anabilim Dalı : **Tıbbi Biyokimya**
Tez Konusu : **Kondrositlerde ADAMTS genleri**
Tez Danışmanı : **Prof. Dr. M Ramazan YİĞİTOĞLU**
Tez Tarihi : **Mayıs 2012**

Bu tezin şekil ve içerik açısından Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tez Yazım Klavuzunda belirtilen kurallara uygun formatta yazıldığını onaylıyorum.


Prof. Dr. M. Ramazan YİĞİTOĞLU
Anabilim Dalı Başkanı

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı 53011002 numaralı öğrencisi Sümeyya AKYOL tarafından hazırlanan bu tezin Yüksek Lisans Tezinde bulunması gereken yeterliliğe, kapsama ve niteliğe sahip olduğunu onaylıyorum.


Prof. Dr. M. Ramazan YİĞİTOĞLU
Tez Danışmanı

Tez Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. M. Ramazan YİĞİTOĞLU


.....

Prof. Dr. Ferah ARMUTCU


.....

Doç. Dr. Hüseyin ÖZYURT


.....

Bu tezin Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tez Yazım Kılavuzunda belirtilen kurallara uygun formatta yazıldığını onaylıyorum.

Prof. Dr. Atilla İLHAN
Müdür



ÖNSÖZ

Bu tezin teorik temellerinin oluşturulması, ön hazırlıkların ve deneylerin gerçekleştirilmesi, verilerin toplanıp istatistiğinin yapılarak yorumlanması ve yazılması aşamalarında bana yardımcı olan başta tez danışmanım Prof.Dr. M. Ramazan Yiğitoğlu olmak üzere Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof.Dr. Ferah Armutçu ve Yrd.Doç.Dr. Hüsamettin Erdamar ile Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr. Kadir Demircan'a tüm yardımlarından dolayı, ayrıca Tıbbi Genetik Anabilim Dalının bütün imkanları ile laboratuvarını istifademe sunan anabilim dalı başkanı Doç.Dr. Esra Gündüz'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Teknikleri öğrenmem konusunda sürekli ve sabırlı bir şekilde gayret sarfeden Tıbbi Genetik Anabilim Dalı öğretim görevlisi Dr. Muradiye Acar ile lisansüstü öğrencisi Zahide Ünal'a ve bütün Genetik laboratuvarı çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim. Tez çalışmalarım boyunca benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve fedakarlık gösteren kıymetli anne ve babama, biricik kızlarıma ve değerli eşime çok teşekkür ederim. 25 Mayıs 2012

Sümeyya Akyol

İÇİNDEKİLER

Sayfa

| | |
|---|----|
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 5 |
| 2.1. Kondrosit hücrelerinin genel özellikleri ve histolojisi | 5 |
| 2.2. Eklem kıkırdığının yapısı | 6 |
| 2.3. Kıkırdak dokusunun beslenmesi | 6 |
| 2.4. Osteoartrit (OA) | 7 |
| 2.4.1. Osteoartritin klinik tezahürü ve tanısı | 7 |
| 2.4.2. Osteoartritin etyolojisi | 7 |
| 2.4.3. Osteoartritin tedavisi | 8 |
| 2.4.4. Osteoartritin alternatif tıp uygulamaları ile tedavisi | 9 |
| 2.5. Osteoartrit tedavisinde potansiyel etkinliği bilinen bitkisel ürünler ve bileşikler | 10 |
| 2.5.1. Kafeik asit fenetil ester (CAPE) | 10 |
| 2.5.2. Royal jelly (RJ) | 12 |
| 2.5.3. Kurkuma longa (CL) (Turmerik, Kurkumin) | 15 |
| 2.5.3.1. Kurkuma longanın yapısal analizi | 16 |
| 2.5.3.2. Kurkuminin moleküler hedefleri | 16 |
| 2.5.3.3. Kurkuminin antienflamatuar etkisi | 18 |
| 2.6. Ekstrasellüler proteoglikanlar: yapı ve fonksiyon farklılıkları | 19 |
| 2.7. A Distintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin motifs (ADAMTS) genleri ve ürünleri | 20 |
| 2.7.1. Proteazların ADAMTS ailesi | 21 |
| 2.7.2. ADAMTS proteazların domain yapısı | 21 |
| 2.7.3. ADAMTS proteazların regülasyonu | 23 |
| 2.7.4. Proteoglikanların ADAMTS tarafından parçalanması ile ilişkili görülen hastalık, gelişim ve doku yeniden şekillenme durumları | 23 |
| 2.7.5. Agrekanazlar | 25 |
| 2.7.6. Agrekanaz inhibitörleri | 26 |
| 2.7.7. Kıkırdak yıkımında agrekanoliz | 27 |
| 2.7.8. ADAMTS-7 ve -12 | 27 |
| 2.7.9. Kıkırdak oligomerik matriks proteini (Chondroitin oligomeric matrix protein-COMP) | 27 |
| 2.7.10. Granülün epitelin perkürsör (GEP) | 28 |
| 2.7.11. ADAMTS-9 | 28 |
| 3. MATERYAL VE METOD | 28 |
| 3.1. Hücre kültürü protokolü | 28 |
| 3.1.1. Hücre ekim işlemleri | 29 |
| 3.1.2. Stok hücrelerin ekimi | 29 |
| 3.1.3. Harvest işlemi | 30 |
| 3.1.4. Medyum değişimi | 30 |
| 3.2. Deneylede kullanılan inhibitör maddelerin hazırlanışı | 31 |
| 3.3. Hücre kültür sisteminde IL-1 α ve inhibitörlerin uygulanması | 31 |
| 3.4. TRIZOL ile hücre kültüründen RNA izolasyonu | 32 |
| 3.5. cDNA protokolü | 32 |
| 3.6. Primerlerin hazırlanması | 33 |
| 3.7. Gradyent PCR | 33 |
| 3.8. Normal PCR | 34 |
| 3.8.1. β -aktin için izlenen PCR programı (204 bp) | 34 |
| 3.8.2. ADAMTS-1 için izlenen PCR programı (72 bp) | 35 |
| 3.8.3. ADAMTS-5 için izlenen PCR programı (182 bp) | 35 |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.8.4. | ADAMTS-9 için izlenen PCR programı (67 bp) | 35 |
| 3.9. | Agaroz jel elektroforezi | 35 |
| 3.10. | Jel ekstraksiyonu | 35 |
| 3.11. | Real-time PCR | 36 |
| 3.11.1. | Real-time PCR için standartların hazırlanması | 36 |
| 3.11.2. | SYBR Green hazırlanması | 37 |
| 3.11.3. | Real-time PCR koşulları ve çalıştırılması | 37 |
| 3.12. | Deneylerde kullanılan cihazlar | 38 |
| 3.13. | İstatistiksel analizleri | 38 |
| 4. | SONUÇLAR | 39 |
| 4.1. | OUMS-17 hücre kültürü | 39 |
| 4.2. | Agaroz jel elektroforezi | 39 |
| 4.2.1. | β -aktin gradyent PCR elektroforez sonucu | 39 |
| 4.2.2. | ADAMTS-1 gradyent PCR elektroforez sonucu | 40 |
| 4.2.3. | ADAMTS-5 gradyent PCR elektroforez sonucu | 40 |
| 4.2.4. | ADAMTS-9 gradyent PCR elektroforez sonucu | 41 |
| 4.3. | Real-time PCR deneylerinin ortam koşulları ve melting eğri sonuçları | 42 |
| 4.3.1. | β -aktin için deney bilgisi, ortam şartları ve melting eğrisi sonuçları | 42 |
| 4.3.2. | ADAMTS-1 için deney bilgisi, ortam şartları ve melting eğrisi sonuçları | 43 |
| 4.3.3. | ADAMTS-5 için deney bilgisi, ortam şartları ve melting eğrisi sonuçları | 44 |
| 4.3.4. | ADAMTS-9 için deney bilgisi, ortam şartları ve melting eğrisi sonuçları | 45 |
| 4.4. | OUMS-27 hücrelerinde ADAMTS genlerinin ekspresyonu | 45 |
| 4.4.1. | OUMS-27 hücrelerinde ADAMTS-1 geninin ekspresyonu | 46 |
| 4.4.2. | OUMS-27 hücrelerinde ADAMTS-5 geninin ekspresyonu | 47 |
| 4.4.3. | OUMS-27 hücrelerinde ADAMTS-9 geninin ekspresyonu | 50 |
| 5. | TARTIŞMA | 53 |
| 6. | YORUM | 62 |
| 7. | KAYNAKLAR | 63 |

KISALTMALAR

| Kısaltma | Açık yazılışı |
|----------------|--|
| 10H2DA | 10-hidroksi-trans-2-desenoik asit |
| ADAMTS | A Distintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motif |
| AP-1 | Aktivatör protein-1 |
| BAY | (E)-3-(4-Methylphenylsülfonil)-2-propenenitrile |
| CAPE | Kafeik asit fenetil ester |
| cDNA | Komplementer DNA |
| CFU-F | Koloni-oluşturan birim-fibroblast |
| CL | Kurkuma longa |
| COMP | Chondroitin oligomeric matrix protein Kıkırdak oligomerik matriks proteini |
| COX | Siklooksijenaz |
| CXC | Bir kemokin |
| DMSO | Dimetilsülfoksit |
| ECM | Hücre dışı matriksin (Ekstrasellüler matriks) |
| EDTA | Etilendiamin tetraasetik asit |
| EMSA | Elektroforetik mobilite kaydırma ölçümü |
| FBS | Fetal bovine serum |
| GAGs | Glikozaminoglikanlar |
| GC-MS | Gaz kromatografi-kütle spektroskopisi |
| GEP | Granülin epitelin prekürsör |
| IFN- γ | İnterferon-gama |
| IL | İnterlökin |
| iNOS | İndüklenebilir nitrik oksit sentaz |
| LO | Lipooksijenaz |
| LPS | Lipopolisakkarit |
| LT | Lökotrien |
| MMP | Matriks metallo proteinaz |
| MSC | Mezanşimal kök hücre /kemik iliği stromal hücresi |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide |
| NF- κ B | Nükleer faktör-kappa B |
| NO | Nitrik oksit |
| NSAIDs | Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar |
| OA | Osteoartrit |
| PBS | Fosfat tampon solüsyonu |
| PDL | Periodontal ligament |
| PGE2 | Prostaglandin E2 |
| PMA | Forbol 12-miristat 13-asetat |
| PMNL | Polimorfonükleer lökositler |
| RA | Romatoid artrit |
| RASFs | Romatoid artrit sinovial fibroblastları |
| RJ | Royal jelly |
| siRNA | Küçük değiştirici (interfering) RNA |
| SLE | Sistemik lupus eritematosus |
| SLRPs | Küçük lösinden zengin tekrarlar içeren proteoglikanlar |
| TAE | Tris / Asetik Asit / EDTA |
| TIMPs | Metalloproteazların doku inhibitörleri |
| TNF | Tümör nekrozis faktör |
| TNP | 2,4,6-trinitrophenyl |
| TPA | 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate |

TABLO LİSTESİ

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| Tablo 1. ADAMTS ailesi ile ilgili bilgilerin özeti | 24 |
| Tablo 2. Real-time PCR reaksiyonunda kullanılan primer çiftleri ve sırası | 37 |

ŞEKİL LİSTESİ

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| Şekil 1. Kafeik asit fenetil esterin moleküler yapısı | 10 |
| Şekil 2. Royal jellynin aktif etken madde içeriklerinden birisi olan 10-hidroksi-trans-2-desenoik asit (10H2DA) | 12 |
| Şekil 3. Kurkuma longa'nın aktif bileşenlerinden olan kurkumin'in moleküler yapısı | 15 |
| Şekil 4. ADAMTS proteazların örnek bir domain yapısı | 21 |
| Şekil 5. ADAMTS-4, -5, -7 ve -12'nin şematik olarak gösterimi | 22 |
| Şekil 6. IL-1 α ile indüklenen OUMS-27 hücrelerinde ADAMTS-1 genlerinin ekspresyonu | 46 |
| Şekil 7.1. IL-1 α ile indüklenen OUMS-27 hücrelerinde ADAMTS-5 genlerinin ekspresyonu -1 | 47 |
| Şekil 7.2. IL-1 α ile indüklenen OUMS-27 hücrelerinde ADAMTS-5 genlerinin ekspresyonu -2 | 48 |
| Şekil 7.3. IL-1 α ile indüklenen OUMS-27 hücrelerinde ADAMTS-5 genlerinin ekspresyonu -3 | 49 |
| Şekil 8.1. IL-1 α ile indüklenen OUMS-27 hücrelerinde ADAMTS-9 genlerinin ekspresyonu -1 | 50 |
| Şekil 8.2. IL-1 α ile indüklenen OUMS-27 hücrelerinde ADAMTS-9 genlerinin ekspresyonu -2 | 51 |
| Şekil 8.3. IL-1 α ile indüklenen OUMS-27 hücrelerinde ADAMTS-9 genlerinin ekspresyonu -3 | 52 |
| Şekil 9. IL-1 α verildikten sonra meydana gelmesi muhtemel olan olaylar ve bunların mekanizmaları | 61 |

RESİM LİSTESİ

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| Resim 1. OUMS-27 hücrelerinin petri tabağında iken çekilen görüntüsü | 39 |
| Resim 2. β -aktin'in gradyent PCR sonucunda elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü | 40 |
| Resim 3. ADAMTS-1'in gradyent PCR sonucunda elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü | 40 |
| Resim 4. ADAMTS-5'in gradyent PCR sonucunda elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü | 41 |
| Resim 5. ADAMTS-9'un gradyent PCR sonucunda elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü | 41 |

Enstitüsü : Sağlık Bilimleri
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyokimya
Tez Danışmanı : Prof. Dr. M. Ramazan YİĞİTOĞLU
Tez Tarihi : Mayıs 2012

ÖZET

KAFEİK ASİT FENETİL ESTER (CAPE), ROYAL JELLY VE KURKUMİN'İN ADAMTS/Agrekanaz GEN EKSPRESYONU VE KIKIRDAK HÜCRE DIŞI MATRİKSİNİN YENİDEN YAPILANMASINA ETKİSİ

Sümeyya AKYOL

ADAMTS (A Distintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motif) genleri insan vücudunda birçok dokuda yer alarak çeşitli fizyolojik ve patolojik fonksiyonlara katılmaktadırlar. ADAMTS proteinazlar ilk olarak 1997 yılında kaşektik kolon kanserinde enflamasyonla ilişki olarak farelerde tanımlanmıştır.

Bu gen ailesinin üyelerinin kan ve doku hastalıkları, kanser, osteoartrit (OA), Alzheimer, Weill-Marchesani Sendromu (ADAMTS10), trombotik trombositopenik purpura (ADAMTS13), Ehler-Danlos Sendromu tip 7C (ADAMTS2) gibi birçok hastalıktaki rolleri keşfedilmiştir. Normal gelişimde, anjiyogenezde, koagülasyonda, artrit progresyonunda ve daha birçok mekanizmada da etkin rollerinin olduğu bilinmektedir. Son yıllarda ADAMTS proteinazların, hücre proliferasyonunda, apoptoziste, ve buna bağlı olarak kanser hücrelerinin ekstraselüler matriksle (ECM) etkileşiminde fonksiyonları keşfedildi. Ayrıca osteoartrit başta olmak üzere birçok eklem rahatsızlığında bu gen ürünlerinin rolü olduğu iddia edilmektedir.

Kafeik asit fenetil ester (CAPE), royal jelly (RJ) ve kurkumin uzun yıllardır alternatif tıp sahasında bazı hastalıklarda kullanılmaktadır. Birçok araştırmada bu bileşiklerin uygun dozlarda hazırlanmış preparatlarının osteoartritte bazı semptomların iyileştirilmesinde kullanıldığına dair veriler vardır. Bu çalışmada eğer varsa bu tür etkilerinin moleküler dayanakları ortaya çıkartılmaya çalışıldı. Bu amaçla bu çalışmada, OUMS-27 kondrosarkom hücre serisi kültürü kullanılarak Real-time PCR yöntemi ile agrekanaz ADAMTS genlerinden ADAMTS-1, -5 ve -9 genlerinin ekspresyon analizi yapıldı. Bununla bağlantılı olarak CAPE, royal jelly ve kurkumin bileşiklerinin kıkırdak patofizyolojisinde koruyucu rolünün olup olmadığı, daha önceden etkinliği kısmen gösterilmiş BAY 11-7085 molekülü ile karşılaştırılarak, gen düzeyinde araştırıldı.

Çalışmanın sonunda elde edilen verilere göre çalışılan 3 adet agrekanaz özellikli enzimin geninin interlökin-1 α (IL-1 α) verilmesi ile indüksiyonu gerçekleşti. Çalışılan ADAMTS genlerinin ekspresyonunda değişen oranlarda artışlar meydana geldi. ADAMTS/ β -AKTİN oranı göz önüne alındığında, IL-1 α verildikten sonra ADAMTS-1 gen ekspresyonunda 2 katlık bir artış gözlemlendi. ADAMTS-5 gen ekspresyonunda IL-1 α verildikten sonra sırasıyla 1.6 kat, 1.3 kat ve 2.7 katlık bir artış gerçekleşti. Aynı deney şartları ADAMTS-9 için sağlandığında IL-1 α verilmesi üzerine ADAMTS-9 gen ekspresyonunda 2.5 kat, 2.9 kat ve 4.2 katlık artış tespit edildi. Nükleer faktör- κ B (NF- κ B) inhibisyonu yapma potansiyeli olan kullandığımız maddeler farklı oranlarda gen ekspresyonundaki bu artışları engelledi. ADAMTS-1 ve -5 genlerinin ekspresyonunu en başarılı şekilde azaltan madde kurkumin olarak bulundu. Bunu sırasıyla CAPE, RJ (özellikle -5 tipinde) ve BAY 11-7085 molekülleri takip etti. ADAMTS-9 geninin ekspresyonu incelendiğinde verilen maddelerin ilk iki gendeki kadar başarılı olamadığı görüldü. Burada ekspresyonu inhibe edici madde olarak en başarılı BAY 11-7085 bulundu, bunu kurkumin ve CAPE izledi.

OA patogenezinde önemli bir yer tutan NF- κ B yolağının bu yolla inhibe edilme potansiyelinin olması bu maddelerin alternatif olarak kullanılabilir aday moleküller olabileceğini göstermektedir. Etkinin daha net bir şekilde gösterilebilmesi için normal insan kondrosit hücreleri de dahil olmak üzere farklı hücre serilerinde yapılacak daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler:

Kafeik asit fenetil ester, Kurkumin, Royal jelly, Trombospondin Motifli Disintegrin ve Metalloproteinaz (ADAMTS), Agrekanaz, Kondrosit, Osteoartrit, Kondrosarkom, Gen ekspresyonu, Kıkırdak

University : **Fatih University**
Institute : **Institute of Health Sciences**
Department : **Medical Biochemistry**
Supervisor : **Prof. Dr. M. Ramazan YİĞİTOĞLU**
Degree Awarded and Date : **May 2012**

ABSTRACT

THE EFFECTS OF CAFFEIC ACID PHENETHYL ESTER (CAPE), ROYAL JELLY, AND CURCUMIN ON GENE EXPRESSION OF *ADAMTS/Aggrecanase* AND REGENERATION OF EXTRACELLULAR MATRIX OF CARTILAGE

Sümeyya AKYOL

ADAMTS (A Distintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motif) genes are found in several tissues of the body and they participate a number of physiological and pathological functions. They were first characterized in colon carcinoma related with inflammation of rats in 1997.

These gene family members have been found to have roles in several diseases such as blood and connective tissue diseases, cancer, osteoarthritis (OA), Alzheimer, Weill-Marchesani Syndrom (ADAMTS-10), thrombocytopenic purpura (ADAMTS-13), and Ehler Danlos syndrom type 7C. It is known that these genes have highly important roles in normal development, angiogenesis, coagulation, arthritis progression, and several other processes and physiological mechanisms. In recent years, ADAMTS proteases have been found to play roles in cellular proliferation, apoptosis, and the interaction between cancer cell and the ECM. Indeed, it has been proposed that the by-products of these genes have roles in OA and several other joint diseases.

Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), royal jelly (RJ) and curcumin have been used for the treatment of several diseases as alternative medicine remedies. There is considerable data from the researches that these compounds can be used to decrease the symptoms of OA. In this experimental cell study, if any, the molecular bases of the effects of these compounds in OA were aimed to be illuminated. In this study, the gene expression analysis for ADAMTS-1, ADAMTS-5, and ADAMTS-9 were carried out by using Real-time PCR method in OUMS-27 chondrosarcoma cells. In order to see their activities, the protective effects of CAPE, RJ, and curcumin in cartilage pathophysiology were tested in this

experiment model by comparing them with BAY 11-7085 which is known to have partial protective effect.

According to the results, the enzyme gene that has aggrecanase activity was found to be induced upon interleukin-1 α (IL-1 α) application. The expression of ADAMTS genes were increased in various rates. In terms of ADAMTS/ β -ACTIN ratio, ADAMTS-1 gene expression was increased by two-fold after IL-1 α induction. ADAMTS-5 gene expression was found to be increased by 1.6, 1.3, and 2.7 times, respectively following IL-1 α induction. Similarly, ADAMTS-9 gene expression was found to be elevated by 2.5, 2.9, and 4.2 times, respectively. The used compounds that have nuclear factor-kappa B (NF- κ B) inhibition potential prevented the elevation of gene expression in different ratios. The most successful inhibitor compound for ADAMTS-1 and -5 was curcumin, followed by the other inhibitors, CAPE, RJ, and BAY 11-7085. However, used compounds were not successful regarding the inhibition of gene expression of ADAMTS-9 compared to other genes. The most successful inhibitor molecule was BAY 11-7085 followed by curcumin and CAPE.

The findings that these molecules can inhibit the NF- κ B cascade which is very important in OA pathogenesis were interpreted to have an important role as alternative agents. Further studies dealing with other cells such as normal human chondrocyte cells are needed to demonstrate the detailed protective effects of these compounds.

Key words:

Caffeic acid phenethyl ester, Curcumin, Royal jelly, A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motif (ADAMTS), Aggrecanase, Chondrocyte, Osteoarthritis, Chondrosarcoma, Gene expression, Cartilage

1. GİRİŞ

Eklem kıkırdağı çok özel bir doku olup bu dokuda bulunan yegâne hücre tipi olan kondrositler hücre dışı matriksin (Ekstrasellüler matriks, ECM) sentezi, bakımı ve yıkılmasından sorumludur. Yerine getirdiği birbirinden oldukça farklı olan bu görevleri ile birlikte bu fonksiyonlarıyla kıyaslandığında kıkırdak içinde oldukça az kondrosit hücresi vardır. Kıkırdak dokusu kan damarı içermemesi ve sinir innervasyonu taşınamaması nedeniyle kendi kendini tamir etme konusunda oldukça zayıftır. Baskın olarak ECM'den oluşan kıkırdak dokusu, bu matriksin kendine has özellikleri nedeniyle fonksiyonel ve biyofiziksel görevlerini büyük bir kolaylıkla yerine getirebilir (1).

Dejeneratif ve romatizmal eklem hastalıklarının en önemli özelliği, eklem kıkırdağında ciddi oranda bozucu ve yıkıcı değişiklikler yapmasıdır. Bu değişiklikleri durdurmak veya en azından sınırlandırmak amacıyla yapılan tedaviler çok iyi bir hasta uyumunu gerektirmektedir. Her ne kadar dejeneratif ve romatizmal hastalıkların altında yatan mekanizmalar açık olsa ve kıkırdak osteoartritte (OA) romatoid artrit ile karşılaştırıldığında daha önemli bir rol oynasa da kondrosit biyolojisini, davranışını ve biyoaktivitesini regüle eden sinyaller ortaktır. Sitokinler, adipokinler, enflamasyon mediyatörleri ve matriks fragmanları kıkırdakta ve/veya sinovial eklemden her iki hastalık sınıfı durumunda da bulunur (2). Bu aracı moleküller her iki durumda da kondrosit fizyolojisini etkilerler. Moleküller ve biyomekanik sinyallerle birlikte eğer eklem binen yük artarsa bunlar eklem dejenerasyonunu hızlandırır.

Her ne kadar OA'de tüm eklem ve subkondral kemik dokusu rol alsın ve diğer kemik değişiklikleri ve hastalık süreçleri açısından karşılaştırıldığında kıkırdak dokusunun daha az rol aldığı iddia edilse de, bu hastalıktaki araştırmalar genellikle kıkırdak biyolojisi üzerine yoğunlaşmıştır. Buna karşılık kondrositlerin romatizmal hastalıklarda pasif bir rolü üstlendiğine inanılmaktadır. Bu durumda kondrositler araştırma açısından sinoviyal sıvıdan ve enflamasyon hücrelerinden daha az dikkat çekmektedir.

Dejeneratif ve romatizmal hastalıklarda kıkırdak biyolojisi ile ilgili ortaya çıkan birçok sorunun yanında en temel olanı hastalık sürecinde kıkırdağın bilinmeyen rolüne ait olandır: Kondrositler kıkırdak patolojisini bizzat yöneten

hücreler mi? Yoksa eklemde başka bir yerde başlayan hastalık sürecine iştirak eden bir hücreler topluluğu mu? (3) Şayet kıkırdak diğer patolojik sorumlulara pasif olarak cevap veren bir yapı ise hasara uğramış kıkırdağı tamir etmek, eğer altta yatan hastalık süreci halen tespit edilmemiş ise hastalar açısından büyük bir önem kazanmaktadır. Diğer taraftan açığa çıkan başka bir soru da şayet kıkırdak değişiklikleri hastalığa katkı sağlıyorsa hangileri tedavinin hedeflenmesinde önemli bir yer tutmaktadır? Hasar yapıcı proteazların veya enflamasyon mediatörlerinin indüksiyonu gibi spesifik moleküler olaylara odaklanmak mı geçerli bir stratejidir veya bütün hücrel fenotipi modifiye etmeye yönelik işlemler mi iyi bir stratejidir? Bunun cevabı dejeneratif ve romatizmal hastalıklar için farklı farklı olmalı, hatta daha da ilerisi her bir artrit tipinin alt gruplarında ve hastalarda bile farklı olmalıdır. Bununla beraber bu cevaplar eklem hastalıklarında önleme, tedavi etme ve doku hasarını geri döndürmek için yeni bazı yaklaşımlara yol açacaktır.

Agrekanaz ve kollajenaz inhibitörlerinin dejeneratif ve romatizmal eklem hastalıklarında kıkırdak erozyonuna karşı iyi birer koruyucu olabileceği iddia edilmektedir. Yetişkinlerin eklem kıkırdağında en fazla bulunan kollajen sınıfı, fibriler tip II kollajendir. Bu kollajen $\alpha 1$ (II) zincirlerinden oluşan bir homotrimer olup kollajen IX ve XI ile bir araya gelip ekstrasellüler olarak heterofibrilleri oluşturur. Tip II kollajen ağı kıkırdağın şeklini vermekte, gerilme gücü kazandırmakta ve agrekanın şişme basıncına dayanıklılık katan bir ağ yapısı sağlamaktadır. Negatif yüklü glikozaminoglikan yan zincirlerinin, geniş bir hidrodinamik dayanak ve yüksek ozmotik şişme basıncı oluşturmak için pozitif iyonları ve dolayısıyla suyu kendisine çekmesi nedeniyle agrekan şişer. Fonksiyonel kıkırdakta agrekanın şişme basıncı kollajen sarmalının içindeki basınç ile dengelenmiştir. Her bir matriks bileşeninde meydana gelecek proteoliz bu dengeyi bozar ve kıkırdağa bu baskıcı güçlerin dağıtılması kabiliyeti kazandırır. Hangi proteazın kıkırdak yıkımında anahtar rol oynadığını anlamak ve bunların fonksiyon ve regülasyonlarının kodlarını çözmek, onlarca yıldır yapılan çalışmalara rağmen tamamlanamamıştır.

Günümüz bilgilerinin ışığında matriks metalloproteazlardan MMP-13 (kollajenaz 3)'ün ana kıkırdak kollajenazı olduğu bilinmesine ve disintegrin ve trombospondin motifli metalloproteazlardan olan A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motif (ADAMTS)-4 ve -5'in insan kıkırdağında ana agrekanaz

olduğunun bilinmesine rağmen bu enzimlerin zimojen (inaktif) formlarından nasıl olup da aktif hale geçtikleri ve bunların aktivitelerinin *in vivo* olarak nasıl yönetildiği tam olarak bilinmemektedir. Bunun yanında kollajenazlar ve agrekanazların kırıkta erozyonunun başlayıp ilerlemesinden sorumlu olup olmadıkları da bilinmemektedir. Buna paralel olarak en önemli cevaplanması gereken sorulardan diğer birisi de en elverişli kırıkta koruyucu tedavinin kollajenaz inhibitörleri mi yoksa agrekanaz inhibitörleri mi olduğudur.

Geleneksel olarak kullanılan ajanlarla ve *in vitro* şartlarda kırıkta yıkımını araştırmakta kullanılan modellerle bu soruların cevabını bulmak adeta imkansızdır. Kültür ortamında yapılan çalışmalarda ilk zamanlarda katabolik ajanlarla muamele edilen kırıkta örneklerinin ortam içine agrekan fragmentlerini serbestleştirdiği, buna karşılık kollajen serbestleştirmedeğini gösterdi. Daha sonraki aşamalarda ise oldukça fazla miktarda agrekanın dokudan ayrışmasından sonra kollajenazlar kollajen II'yi parçalar ve daha sonra da kollajen fragmentlerinin medyum içine serbestleşmesine yol açar. Değişik türlerde kırıkta dokularında interlökin (IL)-1, tümör nekrozis faktör (TNF)- α , onkostatın M ve retinoik asit gibi katabolik ajanlarla muamele edilerek yapılan deneylerde erken agrekanolizin yukarıda bahsedilen etkisinden sonra geç kollajen yıkımının gerçekleştiği görülmüştür. Böylece kırıkta parçalanmasını hızlandıran kanıtlanmış metodlar bize kısa sürede agrekan salınımını bağımsız bir şekilde stimüle etmeye ve bunu test etmeye izin verirken buna paralel olarak kollajen yıkımını stimüle edip bunu test etmeye imkân vermez. Bu sebeple deneylerde kollajenaz inhibitörlerine kıyasla agrekanaz inhibitörlerinin kırıkta koruyucu etkisini araştırmak daha zordur.

Henüz mekanizmasında bazı karanlık noktalar olsa da günümüze kadar yapılan çalışmalarla hem OA hem de romatizmal eklem hastalıklarının patofizyolojisinde ciddi bir mesafe kaydedildiği söylenebilir. Bu gelişmelere paralel olarak gerek farmakolojik gerekse alternatif tıp yöntemleriyle eklem kırıkta dokusu ve sinovial sıvıda meydana gelen değişiklikleri en düşük düzeye indirip semptomları giderebilmek amacı ile birçok araştırma yapılmaktadır. Enflamasyon kaskadının ara elemanlarına ait yeterince bilgi elde edilebildiği için herhangi bir aşamada bu kaskadın kırılarak eklem hasarı kontrol altına alınabilecektir.

Bu çalışmanın ana hedefi OA patogenezinde söz sahibi olan nükleer faktör-kappa B (NF- κ B) sinyal yolağının daha önceden etkinliği gösterilmiş bazı

moleküllerle inhibe edilip eklem kıkırdağında hasara neden olan mekanizmaların durdurulmasıdır. Kondrosit hücrelerinden kıkırdak içine ve eklem sıvısına salgılandığı bilinen proteolitik bazı enzimlerin aktivitelerinin transkripsiyon, translasyon veya protein aşamasında inhibe edilmesi bizi hedefe ulaştıracak bir tedavi metodu olacaktır. Bu amaçla kondrosit hücrelerinde eksprese olduğu bilinen ADAMTS ailesine ait -1, -5 ve -9 tiplerinin IL-1 α gibi önemli bir sitokin ile indüklenmesi sonucunda aşırı sentez ettirilmesi, daha sonra verilecek olan kafeik asit fenetil ester (CAPE), royal jelly (RJ) ve kurkumin'in bu artışı ne kadar azaltacağı, etkinliği daha önce gösterilmiş BAY 11-7085 maddesi ile kıyaslanarak test edilecektir. Bu modeldeki sitokin indüksiyonu, normal OA patogenezi simüle etmek için şu anda en yaygın olarak kullanılan modellerden birisidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kondrosit hücrelerinin genel özellikleri ve histolojisi (4)

Kondrositler (Yunanca *chondros*: kıkırdak + *kyotos*: hücre) kıkırdakta bulunan tek hücre çeşididir. Bu hücreler kıkırdaksı matriksi üretilen salgıların ve dokunun mevcut sağlığını ve kompozisyonunu devam ettirmesini sağlarlar. Bu matrikste en çok bulunan yapılar kollajen (Tip II) ve proteoglikanlardır (agrekkan). Kondroblastlar her ne kadar olgunlaşmamış kondrosit hücresi olarak kabul edilse de bu kelimenin kullanılması teknik olarak her zaman doğru olmayabilir. Çünkü kondrositlerin bu progenitör hücreleri (mezanşimal kök hücreleri) aynı zamanda osteoblastlara da dönüşebilirler (5). Kıkırdak içinde kondrositlerin organizasyonu kıkırdağın tipine ve dokunun nerede bulunduğuyla bağlıdır. Örneğin eklem kıkırdağı ile solunum borusunda bulunan kıkırdaktaki kondrosit organizasyonu birbirinden hayli farklıdır.

Kondrosit hücrelerinin farklılaşması (differentiation) en az farklılaşmış olandan en çok farklılaşmış olana doğru şu şekilde gerçekleşir:

1. Koloni-oluşturan birim-fibroblast (CFU-F)
2. Mezanşimal kök hücre /kemik iliği stromal hücresi (MSC)
3. Kondrosit
4. Hipertrofik kondrosit

Kemik veya kıkırdakta mezanşimal kök hücreler (mezoderm kökenli) farklılaşmamıştır ve değişik tipte üretici hücrelere doğru farklılaşabilirler ki bunlar osteokondrogenik (osteogenik, kondrogenik, osteoprogenitor) hücreler olarak adlandırılır (6). Farklılaşmamış mezanşimal kök hücreler zamanla özelliklerini kaybederler, çoğalırlar ve kondrifikasyon merkezinde kondrogenik hücrelerin yoğun agregatı ile birlikte bir arada dururlar. Bu kondrogenik hücreler daha sonra kondroblastlara dönüşerek kıkırdak ECM'ni sentez ederler. ECM'de bulunan temel maddeler proteoglikanlar, glikozaminoglikanlar ve liflerdir. Böylece kondroblastlar kendi kendilerini küçük bir alana hapsederler, yeni üretilmiş matriks olan ve hücre dışı su ihtiva eden lakuna ile temasları kalmaz. Bu durumdaki kondroblastlara kondrosit adı verilir ki bu genellikle inaktif bir evrede olmakla beraber duruma göre matriks sentezleyebilir veya sentezlenmiş olan matriksi parçalayabilir. Dolayısıyla kıkırdağın büyük çoğunluğu kondroblastlar tarafından sentez edilmektedir. Bunlar

gençlerle karşılaştırıldığında ileri yaşlarda daha inaktif bir pozisyon alırlar. Kondrositler endokondral kemikleşme sırasında hipertrofik hale gelerek son bir farklılaşma geçirirler. Bu son aşama hücrelerde büyük bir fenotipik değişim beraberinde getirir (7, 8).

2.2. Eklem kıkırdağının yapısı (9)

Eklem kıkırdağı, hyalin kıkırdağın özel bir türüdür. Kemiğin kıkırdaklaşmış son kısmına sınır olan kayganımsı, yırtılmaya dayanıklı, üzerine baskı oluşturulduğunda çok az sürtünme gösteren kısmıdır. Etrafında perikondrium yoktur ve kısmi olarak damarlanmıştır. Eklem kıkırdağı, kondrosit ve kollajen liflerinin düzenlenmesine bağlı olarak birkaç bölgeye ayrılır. Bu kıkırdak tabakaları büyük eklemlerde çok rahat bir şekilde birbirinden ayırt edilebilir.

a) Yüzeysel (tangential) tabaka: Kondrositler daha küçük yapılı olup yüzeye paralel olmak üzere yassılaştırmış halde bulunurlar. Bu tabakanın matriksinin kollajen lifleri çok sağlamdır ve kıkırdağın yüzeyine paralel seyrederek. Derinin kollajen liflerine benzer olarak buradaki kollajen liflerin genel yerleşimi eklem yüzeyindeki baskı güçlerinin ve gerginliğin durumu ile belirlenir.

b) Geçiş zonu: Kondrositler hafifçe büyük ve yuvarlak olup tek tek ve nizami olarak dağılmışlardır. Bu zonun matriksinden kollajen lifleri oblik bir seyirle geçerler.

c) Dairesel zon: Kondrosit çapı iyice büyümüştür, radyal bir sütun teşkil ederler. Kollajen lifleri kondrosit kolonlarının yerleşimine göre dizayn olurlar.

d) Kalsifiye olmuş kıkırdak tabakası: Kemik korteksinin hemen altında bulunurlar. Kalsifiye olmuş kıkırdak tabakasının matriksi H&E boyası ile matriksin diğer tabakalarından daha koyu boyanır.

2.3. Kıkırdak dokusunun beslenmesi (10)

Eklem kıkırdağının beslenmesi için ana kaynak eklem boşluğunu dolduran sinovial sıvıdır. Buna ek olarak az miktarda besin, kemiğe yakın yerleşimli kalsifiye kıkırdak boyunca seyreden kan damarları yoluyla gelir. Besin maddelerinin kondrositlere geçişinde bir problem olursa, kalın kıkırdakların derin kısımlarındaki hücreler atrofiye uğrarlar. Su içeriği azalarak matriks içinde küçük kaviteler oluşmaya başlar ki bu da kıkırdağın kalsifiye olmasına yol açar. Kondrositler zamanla ölürek kıkırdak dokusu kemik dokusu haline dönüşür.

2.4. Osteoartrit (OA)

Yavaş ilerleyici eklem kıkırdak dejenerasyonu olarak bilinen OA, eklem ana hastalığıdır. İstatistiksel verilere göre Amerika toplumunda bireylerin yaklaşık olarak %15'i bu hastalıktan muzdariptir (11). Eklem yüzeylerine yapılan kalıcı ve anormal aşırı yük sonucu gelişebilir. İlk başta kıkırdağın eklem yüzeyinden kondrositler ve proteoglikanların kaybı ile seyreder, daha sonra kıkırdakta yarıma, kırılma, aşınma ve alttaki kemik dokusuna doğru ilerleme sonucu alttaki kemik dokusu ortaya çıkar (sinovial boşluğa bakan yerde kıkırdak olması gerekirken kemik dokusu görünür) (3).

Perikondriumun kondrogenik aktivitesi yetişkinlikten önceki aktif büyüme dönemi ile sınırlıdır. Her ne kadar kondrositler hayat boyunca matriks bileşenlerini üretme kabiliyetine sahipse de eklem kıkırdağında meydana gelen akut hasarlardan sonra tamir ihtiyacından dolayı bu üretim devam etmeyebilir. Aktif büyüme döneminden sonra şayet bu kıkırdak dokuları hasarlanırsa, hasarlanan bölge bağ dokusu veya fibröz kıkırdak ile doldurulur. Bu "tamir dokusu" nun ECM'i, gerçek kıkırdak dokusu matriksi ile zayıf bir şekilde bütünleşebilir.

2.4.1. Osteoartritin klinik tezahürü ve tanısı (12)

OA eklem kıkırdağının ilerleyici kaybı ile karakterize, ağrı, deformite ve etkilenen eklemden fonksiyon kısıtlanması ile giden bir hastalıktır. Bu durumu ifade etmek için kullanılan diğer ifade dejeneratif eklem hastalığıdır. 65-74 yaşlarına ulaşmış hemen her ferdin ellerinde OA'in radyografik bulguları görülmektedir. Bunların sadece %11.2 si ellerinde OA semptomları göstermektedir (13).

OA çok sık görülen bir disfonksiyon ve sakatlık sebebidir. OA için risk faktörleri yaş, kadın cinsiyeti, genetik yatkınlık, şişmanlık ve eklem yaralanmasıdır (özellikle travma ve enflamasyon). Konjenital veya gelişimsel eklem bozuklukları ile metabolik ve endokrin hastalıklar da OA'in ikincil sebepleri arasında sayılabilir (14).

2.4.2. Osteoartritin etyolojisi

Etyoloji henüz tam olarak bilinmemektedir (15). Mekanik, biyokimyasal ve genetik faktörlerin rol aldığı düşünülmektedir. Eklem kıkırdağı temel olarak ECM'den yapılmış olup buradaki kondrositler hacmin %1-2'sini teşkil ederler. ECM'in ana bileşeni su, kollajen ve proteoglikanlardır. Son iki bileşeni kondrositler sentezler. Teorilerden birisi, IL-1 ve TNF- α gibi sitokinlerin artması ile kondrositler, ECM'i parçalayacak enzimler salgırlar. Buna eşzamanlı olarak bu parçalanmayı

engelleme kapasitesine sahip bileşiklerde de bir azalma görülür. Kıkırdak yıkım ürünlerinin, daha ileri enflamasyonu tetikleyerek kıkırdak yıkım döngüsü oluşturdukları düşünülmektedir. Eklem mimarisindeki osteofit (kemik) oluşumu ve diğer değişiklikler sürecin sonunu teşkil etmektedir. Hayvanlarda oluşturulan sekonder artrit modellerinde, enflamasyonun OA gelişim ve ilerlemesinde daha önemli bir yere sahip olduğu görülmüştür (16).

OA'ın tipik semptomları eklemden ve etrafında başlayan ağrı ve kısıtlama ile birlikte azalmış eklem hareketleri şeklinde özetlenebilir. Hastalığın başlangıcında ağrı tipik olarak orta düzeydedir ama etkilenen eklem kullanıldığında ağrı artar (17).

OA'den etkilenen eklemler; dizler, kalça eklemleri, servikal ve lomber omurgalar, ayağın ilk metatarsaofalangeal eklemleri ile elin distal interfalangeal, proksimal interfalangeal ve karpometakarpal eklemleridir.

Hastaların fiziki muayenelerinde eklem hassasiyetinde artış ve kemiksel bir büyüme tespit edilmektedir. Eklem etrafındaki kaslarda spazma bağlı olarak hareket kısıtlaması görülür. Buna ek olarak orta düzeyde bir enflamasyonun göstergesi olarak eklem etrafında sıcaklık ve şişlik görülebilir. Eğer çok şiddetli bir enflamasyon varsa OA'den ziyade diğer bozukluklar olan septik artrit, gut ve psödogut düşünülür. Laboratuvar testleri (18, 19) sadece diğer hastalıkları ekarte etmekte ve ilaç tedavisinin potansiyel yan etkilerini monitorize etmek amacıyla yapılır. Sağlıklı yaşlı bireylerde düşük titrede romatoid faktör ve orta düzeyde eritrosit sedimentasyon hızı tespit edilebilir. Dolayısıyla bu testler OA'yi ekarte ettirmez ancak hikâye ve fiziksel muayene ile şüphelenilen diğer bozuklukların varlığını desteklemek için istenebilir.

2.4.3. Osteoartritin tedavisi

OA'ın tedavisinde temel olarak üç ana uygulama bulunmaktadır:

1. *Farmakolojik olmayan girişimler:* Bunlar arasında egzersiz, kilo verme, buz masajı, diz OA'inde eklem destekleme, lateral olarak yerleştirilmiş taban astarı, akupunktur, elektriksel stimülasyon tedavisi ve hasta eğitimi sayılabilir.

2. *Farmakolojik tedavi:* Birçok OA'li hastada farmakolojik olmayan girişimler ağrıyı yok etmeye yeterli gelmez ve fonksiyonel durumu ilerletmeye destek olmaz. Bu bakımdan; acetaminofen, oral nonsteroid antiinflatuar ilaçlar (NSAIDs: ibuprofen, meloxicam, aspirin, diclofenac, sulindac, naproxen, indomethacin, piroxicam, ketoprofen), topikal NSAIDs, topikal capsaicin, glukozamin (20), kondroitin sülfat

(21), S-adenozilmetiyonin (proteoglikan sentezini arttırdığı gösterilmiştir (22)), opiatlar, eklem içi glukokortikoid enjeksiyonu ve dizlere eklem içi hyaluronik asit enjeksiyonu gibi farmakolojik ajanları ve uygulamaları kullanılmaktadır.

3. *Cerrahi tedavi:* Artroskopik debritman, osteotomi, total kalça replasmanı/artroplasti ve diz replasmanı. Kıkırdak dokusu transplantasyon için çok iyi bir dokudur. Çünkü kondrosit metabolizması rölatif olarak daha yavaştır, kıkırdağın antijenik gücü zayıftır ve immun sistemin antikor ve hücrelerinin kıkırdağın matriksine doğru difüze olması oldukça zordur.

2.4.4. Osteoartrit in alternatif tıp uygulamaları ile tedavisi

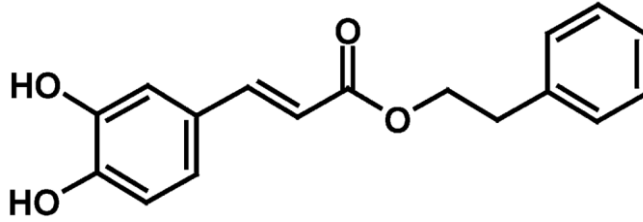
OA'in tedavisine yönelik kullanılan alternatif ve tıbbi bitkisel ürünlerin konu olarak ele alınıp detaylıca incelendiği ilk derleme makalelerinden birisi 1999 yılında yayınlanmış olup bu çalışmada niasinamid, glukozamin sülfat, kondroitin sülfat, E vitamini, bor, D vitamini, C vitamini, Mangan, S-adenozil metiyonin ve avokado/soya fasulyesi ekstraktının bu hastalıktaki etkinliği araştırılmıştır (23). Avokado/soya fasulyesi ve fitodolor (bir bitki karışımı) OA'de çok eskiden beri kullanılan iki karışımdır (24). Son yılların en popüler konularından birisi olan doğal antioksidan ve antienflamatuvar ürünlerin değişik hastalık gruplarında uygulanması OA için de geçerliliğini korumaktadır. Farmakolojik tedavilerin etkin olmakla birlikte uzun vadede bazı yan etkileri de beraberinde getirmesi, bu hastalıktan muzdarip kişilerin, haklarında bilimsel çalışma ve alt yapının da giderek artmakta olduğu bu tip alternatif tedavi yöntemlerine yönelmesine neden olmuştur. Kriterleri tutan 16 farklı araştırmanın verilerinin tarandığı bir derleme makalesinde OA ve romatoid artritte E vitamini, C vitamini, A vitamini (veya bu üçünün kombine hali) gibi vitaminlerin yanı sıra yeşil çay gibi antioksidan özellikli maddeler, omega-3 yağ asitleri, zencefil ve kurkumin gibi bazı antienflamatuvar özellikli bitkiler incelenmiştir (25). Ardışık iki derleme makalesinde hem OA hem de romatoid artritte ısırgan otu, zencefil, kedi pençesi, avokado/soya fasulyesi, kuşburnu ve tohumu, kurkumin, karakafes, arnika, söğüt kabuğu ve diğer bir kısım karışımların tedavi amacıyla nasıl kullanıldığı etki mekanizmaları da dahil olmak üzere detaylı bir şekilde incelenmiştir (26, 27). Çam ağacı ekstresi, glukozamin ve kondroitin sülfat tabii ürünlerinin incelendiği bir başka çalışmada doz uygulamalarının farklı olduğu ve standardize edilmesi gerektiği, klinik ve deneysel verilerin henüz istenilen

seviyede olmadığı, bitkisel karışım içeriklerinin çalışma sonuçları hakkında yorum yapmayı kısmen engellediği şeklinde yorumlar yapılmıştır (28).

2.5. OA tedavisinde potansiyel etkinliği bilinen tıbbi bitkisel ürünler ve bileşikler

2.5.1.Kafeik asit fenetil ester (CAPE)

CAPE (Şekil 1), antiinflamatuvar, immunomodulator, antiproliferatif ve antioksidan özellikleri ile bilinen bir bileşiktir. Propolisin fenolik bir bileşenidir. Etanol, dimetil sülfoksit ve etil asetat gibi çözücülerde iyi çözünmektedir. Dokulara hızlı bir şekilde dağılıp yine hızlı bir şekilde elimine edilmektedir. Lipid peroksidasyonunu önlemesinin yanında lipooksijenaz aktivitesini inhibe ettiği de gösterilmiştir (29). Antiinflamatuvar etkisini NF-κB'yi spesifik olarak inhibe etme özelliği üzerinden gerçekleştirdiği ifade edilmektedir. Antioksidan özelliği nedeni ile birçok deneysel hastalıkta faydası görülmüş, son olarak kemoterapi ve radyoterapi ile oluşan toksisiteyi yok ettiği ve azalttığı iddia edilmiştir (30). *In vitro* uygulamaların yanında birçok *in vivo* uygulama yapılmış olup çeşitli hastalık modellerinde kullanılmıştır (31-33).



Şekil 1. Kafeik asit fenetil esterinin moleküler yapısı.

Tavşanlarda oluşturulan deneysel OA modelinde CAPE'nin kıkırdak üzerine olan etkinliği araştırılmıştır (34). Çalışmada tek taraflı ön çapraz bağları kesilen deney hayvanlarının eklemlerine 4 hafta sonra 150 µg/kg % 0.5'lik etanolde çözülmüş CAPE günlük olarak iki hafta boyunca verilmiş, daha sonra hayvanlar feda edilerek kıkırdak dokuları çıkarılıp incelenmiştir. Yapılan histolojik H&E boyama kesitlerinde deney kontrol grubunda kıkırdak dokusunda ciddi hasar meydana gelirken CAPE verilen grupta bu hasarın büyük oranda engellendiği bulunmuştur. Aynı şekilde araştırmacılar safranin O boyaması ile hazırladıkları preparatlarda kıkırdaktaki matriks proteoglikan içeriğinin CAPE verilen grupta korunduğunu tespit ederken sinovial sıvıda yaptıkları testlerde enflamasyon belirteçlerinin her iki grupta birbirine benzer olduğunu tespit etmişlerdir. Her iki grupta da orta düzeyde

enflamatuar reaksiyon ve sinovial aralıkta hafifçe kalınlaşma tespit etmişlerdir. Buradan hareketle CAPE'nin OA'in ilerlemesinin durdurulmasında yeni ve alternatif bir yaklaşım olabileceğini, spesifik mekanizmanın bilinmemekle birlikte NF- κ B yolağının bu etkiden sorumlu olabileceğini iddia etmişlerdir.

CAPE'nin ilginç bazı farmakolojik etkiler gösterdiği bulunmuştur. Bunlardan bir tanesi de J744 makrofajlarında siklooksijenaz 1 ve 2 aktivitelerini tamamen inhibe etmesi (35) ve sıçanlarda ayak ödemi azaltmasıdır (36). Cardile ve arkadaşları, cerrahi ile insandan alınmış kıkırdak kültüründe ve bu kültürdeki dokudan izole edilen kondrosit hücre kültüründe IL-1 β uygulayarak kontrol grubunda nitrit düzeyleri ve glikozaminoglikan (GAGs) düzeylerini ölçmüş, daha sonra CAPE uygulayarak deneyleri tekrar etmişlerdir (37). IL uygulanması kıkırdak dokusunda hem nitrik oksit (NO) hem de GAGs düzeylerinde artış yapmış, CAPE diğer bilinen antiinflamatuvar ajanlarla (indometazin) kıyaslandığında daha etkin bir şekilde NO düzeylerini kontrol düzeyine yakın bir düzeyde tutmuştur. Kondrosit hücrelerinde IL uygulanması NO miktarını arttırmış, CAPE yine kontrol hücrelerinde olduğu gibi NO miktarını azaltmıştır. IL, kontrol grubu hücrelerde GAGs miktarında azalma yapmış, CAPE yine kullanılan her iki konsantrasyon grubunda da GAGs miktarını tekrar kontrol grubu değerlerine getirmiştir. Buradan hareketle araştırmacılar genelde propolis ekstraktının, özde de CAPE'nin serbest radikalleri yok edici etkisi ile kıkırdağı klasik antiinflamatuvar ajanlara kıyasla daha mükemmel bir şekilde koruduğunu, dolayısıyla bu kullanıma uygun potansiyel bir bileşik olduğunu iddia etmişlerdir.

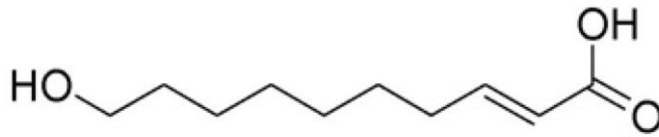
CAPE ve bundan elde edilen 6 adet amid analogu ile yapılan bir çalışmada elde edilen bütün bileşiklerin insan polimorfonükleer lökositlerinde (PMNL) lökotrien (LT) biyosentezini potent bir şekilde inhibe ettikleri bulunmuştur (38). 5-lipooksijenaz (5-LO), araşidonik asiti önemli bir enflamasyon mediatörü olan LT'lere dönüştürmektedir. Bu deneyde araştırmacılar periferik kandan elde ettikleri PMNL'lerde, bunları 5-LO ile stimüle ettikten sonra araşidonik asit serbestleşmesine, antioksidan kapasiteye ve diğer bazı parametrelere bakmışlardır. CAPE 10 μ M konsantrasyonda 5-LO aktivitesini inhibe etmemiş ve LT biyosentezine etki etmemiştir. Halbuki CAPE IC₅₀ 0.13 μ M konsantrasyonda klinik olarak etkinliği ispatlanmış olan 5-LO inhibitörü zileuton'dan daha etkin bir şekilde 5-LO aktivitesini ve dolayısıyla LT biyosentezini inhibe etmiştir. CAPE'nin ve amid

analoglarının bu konsantrasyonda aynı zamanda etkin bir antioksidan gibi etki gösterdiğini de bulmuşlardır.

2.5.2. Royal jelly (RJ)

Arının ürettiği ürünler kabaca bal, propolis ve royal jelly (RJ) şeklinde üç gruba ayrıldığında bunların hepsini belli fonksiyonel özellikler gösterdiği, bunların arasında özellikle antibakteriyel, antioksidan, antitumor, antiinflamatuvar, antiviral etkilerinin bilim adamlarının dikkatini çektiği bilinmektedir (39). Bu ürünlerde ortak olarak veya toplu olarak; kuersetin, kaemferol, galangin, fisetin, pinosembirin, naringin, hesperidin, apigenin, acacetin, krisin, luteolin, CAPE flavonoidlerinin bulunduğu tespit edilmiştir (40).

RJ, işçi arıların (*Apis mellifera*) mandibular ve hipofaringeal tükürük bezlerinden sekrete edilen ve daha sonra kraliçe arının tek besini haline gelen, yağ (%3-6), vitamin, şeker (%15), su (%50-60) ve proteinlerden (%18) oluşan kompleks bir karışımdır (41, 42). Alternatif tıp sahasında yaygın olarak kullanılmaktadır. RJ'nin 24-metilenkolesterol, 10-hidroksidekanoik asit, 10-hidroksi-trans-2-desenoik asit (10H2DA) (Şekil 2) ve trans-2-desenoik asit gibi içerikleri östrojenik etki göstermektedir (43). RJ'nin bugüne kadar etkinliği en çok araştırılan ve bu konuda sayısız delile ulaşılan en önemli etken maddesinin 10-hidroksi-2-desenoik asit olduğu bulunmuştur. Farelerde osteoblastları ve kollajen üretimini stimüle etmesinin yanında (44) overiektomi yapılan ratlarda östrojen fonksiyonlarını yerine getirmektedir. Guinea piglerin delinmiş kulak zarında iyileşmeyi sağladığı bulunmuştur. İçinde bulunan proteinlerden birisinin *in vitro* koşullarda karaciğer hücre proliferasyonunu ve albümin üretimini arttırdığı tespit edilmiştir.



Şekil 2. Royal jellynin aktif etken madde içeriklerinden birisi olan 10-hidroksi-trans-2-desenoik asit (10H2DA)

RJ immunitiyi değiştirmek ve enfeksiyon hastalıklarını baskılamak için kullanılmaktadır. Farelerde antikör üretimini stimüle ettiği bulunmuştur (45). RJ'de bulunan bir peptid, farelerde alerjik cevabı stimüle etmek için T hücrelerden salgılanan IL-4'ü baskılamaktadır (46). RJ verilen kişilerde kan lipid düzeylerinde ciddi azalmalar gözlenmiş ama bu deneyler geniş popülasyonlarda yapılmadığından

etkinliği tam olarak ispat edilememiştir. RJ'nin içinde bulunan ve Melbrosia adı verilen bir çiçek poleninın kadınlarda menapozal semptomları azalttığı gözlemlenmiştir. Dolayısıyla zayıf bir östrojenik aktivitesi vardır. İnsan östrojen reseptörlerinden α ve β alt tipine 17 β -östradiol ile yarışarak bağlanır. İnsan meme kanser hücreleri olan MCF-7 hücreleri RJ ile muamele edildiğinde hücrelerin proliferasyonunu arttırdığı, aynı anda tamoksifen verildiğinde ise bu etkinin perdeleniği bulunmuştur (47). Bu faydalı etkilerinin yanında hipersensitiviteyi ve astımı alevlendirme gibi bazı istenmeyen etkileri de vardır. Bununla ilgili ağız yoluyla RJ alındıktan sonra rapor edilmiş bazı anafaksi vakaları vardır (48).

Yeni Zelenda beyaz ve siyah farelerinde oluşturulan ve insan sistemik lupus eritematosus (SLE) hastalığına benzeyen modelde RJ'nin etkisinin olup olmadığının araştırıldığı bir çalışmada, RJ'nin hastalığın başlangıcını geciktirdiği, yaşam sürelerini uzattığı, hastalığın renal semptomlarının ortaya çıkışında anlamlı bir gecikme olduğu, serum IL-10 düzeylerinde ciddi bir azalma olduğu, ssDNA, dsDNA ve eritrositlere karşı gelişen otoantikör düzeylerinin oldukça düşük kaldığı ve son olarak dalak otoreaktif B hücrelerinde azalma olduğu tespit edilmiştir (49). Streptozotosin ile diyabet oluşturulan sıçanlarda RJ'nin insülin benzeri herhangi bir etki göstermediği ancak pamuk pellet metodu ile ölçüldüğünde granülasyon dokusu oluşumunda eksüdasyon ve kollajen formasyonunu azaltarak antienflamatuar etki gösterdiği, bu yolla da diyabetik yara iyileşmesini hızlandırdığı tespit edilmiştir (50). Araştırmacılar atopik dermatit benzeri lezyonları olan farelerde RJ kullanmışlar, bunun lezyon içinde indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonunu arttırdığını, bu etkisi nedeni ile bu tip deri lezyonlarının gelişimini engellediğini bulmuşlardır. Bu etkisini TNP spesifik interferon-gama (IFN- γ) üretimini down-regüle ederek ve iNOS ekspresyonunu up-regüle ederek gösterdiği iddia edilmiştir (51).

Periodontal hastalık olarak bilinen bakteriyel bir biyofilmin uyardığı kronik enflamatuar hastalıkta periodontal ligament (PDL) başta olmak üzere bütün periodontal yapılar hasarlanmaktadır (52). Bunların içinde PDL ortamının homeostazını sağlaması ve periodontal dokuların tamir ve yenilenmesinin yanında enflamasyonu önleme bakımından önemli fonksiyonlar üstlenmektedir. Araştırmacılar topikal veya diyet yolu ile RJ uygulanmasının periodontal dokuyu periodontal hastalıktan koruyacağını öngörerek bir çalışma planlamışlar, *in vitro* koşullarda fare PDL hücrelerinin kültürünü yapmışlar, burada osteoponin, osteokalsin ve osteriks

mRNA düzeylerini, hücrelerden salgılanan enflamatuvar sitokin olan IL-6 düzeyini, CXC kemokin ligandını ve mineralizasyonu ölçüşlerdir (53). RJ, lipopolisakkarit ile indüklenen IL-6 ve CXC kemokin ligandı üretim ve salgılanmasını azaltmıştır. Periodontal dokulara lökosit birikimini sağlayan adezyon molekülü CD54 ekspresyonunu baskılamıştır. RJ ayrıca MPDL22 hücrelerinin mineralizasyonunu arttırmıştır.

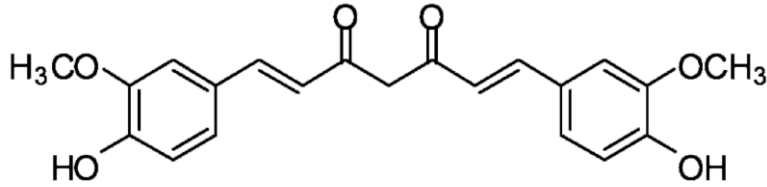
TNF- α , IL-1 ve IL-6 gibi proenflamatuvar sitokinler immün ve enflamatuvar cevapların regülasyonu dâhil birçok fizyolojik süreçte rol almaktadır. Bu sitokinler herhangi bir sebeple aşırı eksprese edilip üretildiğinde aynı zamanda birçok hastalığın patogeneğinde de rol almaktadırlar. Örneğin romatoid artrit (RA)'te sinovial membranda TNF- α , IL-1 ve IL-6'nın bolca üretildiği bulunmuştur. Dolayısıyla bu sitokinler enflamatuvar ve otoimmün hastalıklarda iyi birer tedavi hedefi haline gelmişlerdir (54).

RJ'nin içeriği incelendiğinde hem düşük hem de yüksek molekül ağırlıklı maddelerden oluştuğu bulunmuş, bunlardan yüksek molekül ağırlıklı olan birisine MRJP3 adı verilerek antienflamatuvar özellikleri araştırılmıştır. Genel olarak RJ'nin ciddi bir antienflamatuvar özelliği olduğu, lipopolisakkarit (LPS) ve IFN- γ ile indüklenen makrofajlardan yukarıda adı geçen sitokinlerin sentez ve salgılanmasını inhibe edilmesinden anlaşılmıştır. Yine LPS/IFN- γ ile indüklenen peritoneal makrofajlarda n diğer bir enflamatuvar mediatör olan prostaglandin E2'nin üretiminin %63 oranda azaldığı bulunmuştur.

RA'de sinovial fibroblastların (RASFs) matriks metalloproteinazları üreterek eklem hasarına neden olduğu bilinmektedir. RJ'nin alkalide çözünen fraksiyonundan MMPs'ı inhibe eden bir faktör saflaştırıldı ve 10H2DA olduğu tespit edildi. Daha sonra bunun hangi yol üzerinden MMPs aktivitelerini azalttığı araştırıldı. Moleküler çalışmalar (real-time PCR ve ELISA ile protein düzeyleri, elektroforetik mobilite kaydırma ölçümü (EMSA) ile aktivatör protein 1'in (AP-1) ve NF- κ B'nin DNA'ya bağlanma aktivitesi ve son olarak kinaz ölçümü ile p38, ERK ve JNK'nin protein kinaz aktivitesi) 10H2DA-aracılı supresyonun, p38 kinaz ve c-jun-N-terminal kinaz-AP-1 sinyal yolu üzerinden gerçekleştiğini gösterdi. Bunun yanında 10H2DA'nin ekstrasellüler sinyal regüle edici kinaz aktivitesi, NF- κ B'nin DNA'ya bağlanma aktivitesi ve I κ B α yıkımı üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı bulundu (55).

2.5.3. Kurkuma longa (CL) (Turmerik, Kurkumin)

Acılı hint baharatı içine katılan bir baharat çeşididir. Milattan önce 600 yıllarına kadar turmerikin tedavi, baharat ve tatlandırıcı olarak kullanıldığına dair bulgular vardır. Marko Polo Çin'e olan ziyareti sırasında yazdığı günlüklerinde 13. yüzyılda turmerikten bahsetmektedir. CL bitkisi Curcuma botanik grubunun bir üyesi olup bu tip bitkiler ginger ailesinden gelmektedir (Zingiberaceae). Tropikal Asya'nın güneydoğusu ve güneyinde bol miktarda ekilip dikilmektedir. CL bitkisinin sap ve kökü (toprağın altındaki kök) çıkarıldıktan ve kesildikten sonra öğütülüp bildiğimiz temel turmerik haline dönüştürülmektedir (56). Turmerikin aktif kısmı kurkumin (Şekil 3) olup baharatın %2-5'lik kısmını oluşturmaktadır (diferulometan, C₂₁H₂₀O₆, MW: 368.37 g/mol).



Şekil 3. Kurkuma longa'nın aktif bileşenlerinden olan kurkumin'in moleküler yapısı.

Geleneksel Hint tıbbında kurkumin başta değişik solunum sistemi rahatsızlıklarında (astım, bronşial hiperaktivite ve allerji) olmak üzere karaciğer hastalıklarında, anorekside, romatizmada, diyabet yaralarında, nezlede, öksürük ve sinüzitte kullanılmaktadır (57). Çin tıbbında ise daha çok karın ağrısı ile ilgili durumlarda kullanılır. Uzun yıllardır çok iyi tedavi edici etkilerinin olduğu bunlardan özellikle antioksidan (58), antiinflamatuvar (59), antikarsinojenik, antimikrobiyal, karaciğer koruyucu, hipoglisemik, antiartritik, trombosupressif, miyokard enfarktüsüne karşı kalbi koruyucu etkilerinin dikkat çekici olduğu bulunmuştur. Turmerikten yapılan ev yapımı merhem, yara ve enflamasyonun tedavisinde sıklıkla başvurulan çarelerden birisidir. Sindirim sistemi bozukluklarında safra akımının hızlandırılması, mide sekresyonlarının inhibe edilmesi, indometazin gibi bazı ilaçların yan etkilerinin kaldırılması, artritte ağrı giderici olarak, kardiyovasküler hastalıklarda genel destekleyici olarak ve kanserde semptomların azaltılması amacıyla kullanılmaktadır. Bitkinin kökü iki ana sınıf madde ihtiva eder: fenolik kurkuminoidler ve hidrofobik esansiyel yağlar (60). Farmakolojik olarak aktif olan kurkumin dimetil sülfoksit (DMSO), etanol, metanol veya aseton gibi organik

çözücülerde gayet iyi çözünürken aköz çözücülerde zayıf çözünmektedir. Sarı renkli bir pigment olup hardal, et suyu ve diğer yiyeceklerde kullanılmaktadır. Kurkuminin siklooksijenaz (COX)-2, prostaglandinler ve lökotrienlerin inhibisyonu üzerinden antienflamatuar etki gösterdiği bilinmektedir (61). Klinik deneyler henüz CL'nın OA'te etkinliğini göstermemiş olmakla birlikte bazı ön klinik araştırma verileri RA'de bazı semptomları iyileştirdiğini göstermiştir (62). Turmerikte bulunan ana kurkuminoidler demetoksikurkumin (kurkumin II), bisdemetoksikurkumin (kurkumin III) ve en son tanımlanan siklokurkumindir. Ticari preparatlarda kurkumin I %77, kurkumin II %17 ve kurkumin III yaklaşık %3 oranlarında bulunmaktadır. İlk defa 1815 yılında izole edilmiş olup kristalize formu 1870 yılında elde edilmiştir. Geleneksel olarak CL yemeklerde, kozmetik sanayisinde ve tıpta kullanılmaktadır. Peynir, tereyağı ve diğer besin maddelerinde renklendirici ajan olarak kullanılmaktadır.

2.5.3.1. Kurkuma longanın yapısal analizi

GC-MS metodu ile yapılan çalışmada her ne kadar taze ve kuru CL köklerinin içeriğinde az çok farklılıklar olsa da içeriğinde bol miktarda esansiyel yağlar bulunduğu tespit edilmiştir (63). Kurkumin 183 °C'de erimektedir. Spektrofotometrik olarak metanoldaki ekstraktı 430 nm'de maksimum pik vermektedir. Toluen ve asetonitril içinde radyasyona maruz bırakıldığında singlet oksijen oluşturmaktadır. Düşük süperoksit konsantrasyonlarında kurkumin etkili bir şekilde süperoksit dismutasyonunu gerçekleştirmete, bu arada herhangi bir kimyasal değişime uğramamaktadır. Fakat yüksek konsantrasyondaki süperoksit ortamlarında süperoksit aktivitesini inhibe etmektedir. Ohara ve arkadaşları kurkuminin bu serbest radikal süpürücü etkisini araştırmışlar, kurkuminin intramoleküler H bağları ile oluşan enol yapısının radikal süpürücü etkisini kuvvetle arttırdığını bulmuşlardır (64).

2.5.3.2. Kurkuminin moleküler hedefleri

Hem kimyasal hem de genetik modellerde kurkuminin faydaları görülmüştür. Bugüne kadar yapılan çalışmalar kurkuminin birçok moleküler hedef kullandığı, bu yollarla birçok biyokimyasal ve moleküler kaskadı etkilediği bilinmektedir. Moleküler hedefleri; transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri ve bunların reseptörleri, sitokinler, enzimler ve hücre proliferasyonunu ve apoptozisi kontrol eden genlerdir (65). Lipid zarlarını rahat bir şekilde geçebildiği için enzimlere

bağlanıp aktivitelerini inhibe edebilir, büyüme faktör reseptörlerine, metallere, albümin ve diğer moleküllere rahatlıkla bağlanabilir. Bazı çalışmalarda transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu inhibe ettiği (66), birçok kinazın aktivitesini down-regüle ettiği (67), büyüme ve metastaz hızlandırıcı genlerin ekspresyonunu inhibe ettiği (68-70), apoptozis, hücre invazyonu ve adezyonu gibi yollarda görev alan çoklu gen/yolakların ekspresyonunu inhibe ettiği (71) ve tümör büyümesini kontrol eden birçok enzimin aktivitesini regüle ettiği (72) gösterilmiştir. Kurkumin transkripsiyon faktörü olan NF- κ B ve NF- κ B ile regülen edilen gen ürünleri olan COX-2, siklin D1, adezyon molekülleri, MMPs, indüklenebilir NOS, Bcl-2, Bcl-XL ve TNF'yi module etmektedir (73). Bir tümör baskılayıcısı ve transkripsiyon faktörü olan p53 geni hücrelerin sinyal iletimi, DNA hasarına hücresel cevap, genomik stabilite, hücre siklusu kontrolü ve apoptozis başta olmak üzere birçok hücresel süreçte kritik rol oynar. Kurkumin değişik yollardan p53 upregulasyonunu da sağlamaktadır (74).

Bunların dışında, kurkumin ile yapılan prelinik çalışmalar bunun potent bir kemopreventif ajan olduğunu, *in vitro* olarak tümör hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiğini, hayvanlarda antitümör aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (75). Günlük diyetle alınan CL'nın 1.5 mg/gün dozda kullanılmasının (bu doz 50 mg/gün kurkumine denk gelmektedir) insanda herhangi bir yan etki oluşturmadığı bulunmuştur. Klinik çalışmalar kurkuminin 12 g/gün dozuna kadar rahat bir şekilde tolere edildiğini göstermiştir (76). Yine klinik çalışmalarda başta antiinflamatuvar ve antiromatizmal aktivite, kanserin deri lezyonlarında palyatif tedavi edici, sağlıklı bireylerin kan kolesterol ve lipid peroksid düzeylerini düşürücü, safra taş oluşumunu engelleyici, psöriazisin şiddetini azaltıcı, irritabl kolon sendromunun semptomlarını azaltıcı, böbrek transplantasyonundan sonra fonksiyonları erkenden düzeltici, tropikal pankreatitte klinik düzelmeyi hızlandırıcı, yaşlılarda bilişsel fonksiyonları düzeltici ve adenomatöz polipoziste polip sayılarının azaltıcı olmak üzere birçok etkisinin olduğu bulunmuştur (65).

Kurkuminin bilimsel klinik deneylere dâhil olması uzun zaman almıştır. Faz I ve II klinik çalışmalar son 20 yılda yoğunlaşmıştır. Son zamanlarda güvenli doz profili, veriliş yolu, organ spesifikliğı ve biyoyararlanımı dâhil olmak üzere bu biyoaktif bileşiğın insanlardaki etkilerinin analiz edilebilmesi için klinik çalışmalara ihtiyaç vardır. Çalışmalardan bir tanesinde kurkumin lipozomal taşıma sistemi içine

hapsedilerek intravenöz şekilde uygulanmıştır (77). Diğer bir yol da kurkumini fosfolipid veziküllere veya lipid nanosferlere sokarak intravenöz olarak uygulayıp bunların doku makrofajlarına kadar güvenli bir şekilde ulaşmasını sağlamak ve net bir etki elde etmektir.

2.5.3.3. Kurkuminin antienflamatuar etkisi

Kurkumin ile ilgili yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu bu bileşiğin akut ve kronik enflamasyondaki baskılayıcı etkisini araştırmaya yöneliktir. *In vitro* çalışmalar kurkuminin fare fibroblast hücrelerinin forbol 12-miristat 13-asetat (PMA) ile indüklenmiş enflamasyonunda siklooksijenaz ve lipooksijenaz aktivitelerini, NIH3T3 hücrelerinde ksantin oksidaz aktivitelerini, RAW264.7 makrofajlarında nitrik oksit üretimini, aktive edilmiş sıçan periton makrofajlarında reaktif oksijen türü gelişimini inhibe ettiğini göstermiştir (78, 79). Kurkumin ayrıca LPS veya PMA ile stimüle edilmiş periferik kan monositleri ve alveolar makrofajların proenflamasyon monosit/makrofaj kaynaklı sitokinler olan IL-8, monosit enflamasyon protein-1, monosit kemotaktik protein-1, IL-1 β ve TNF- α üretimini inhibe etmektedir (80). Son zamanlarda yapılan bir çalışma insan beyin membranlarında bulunan G proteinlerin hidrojen peroksit, homosistein ve metabolik prooksidan ajanlarla oksidatif stimülasyonu kurkumin tarafından çok ciddi bir şekilde baskılandığını gösterdi (81). Bunun yanında sıçan karaciğer mikrozomlarında ve beyin homojenatlarında lipid peroksidasyonunu inhibe etmiştir. Kurkuminin *in vitro* antienflamatuar etkilerinin yanında *in vivo* antienflamatuar etkileri de ispatlanmıştır. Bu amaçla yapılan deneylerde; kurkuminin fenilbutazon gibi antienflamatuar etkinliği kanıtlanmış bir ajanla karşılaştırılabilecek düzeyde bu özellikleri taşıdığı, siklofosfamid ile oluşturulan akut akciğer hasarında enflamasyonu durdurduğu, yine siklofosfamid ile muamele edilen ratlar deneyden 7 gün önce başlamak üzere kurkumin ile beslendiğinde bu ajanın oluşturacağı akciğer hasarını antioksidan etkisi ile yavaşlattığı, son olarak kurkuminin topikal aplikasyonunun farede TPA ve arasıdonik asit ile indüklenen epidermal enflamasyonu (kulak ödemi) önlediği bulunmuştur (82, 83).

Kurkuminin yeni türevler elde edilme dışında en çok kullanıldığı çalışmalar redoks aktivitesi ile ilgili olan çalışmalardır. Duruma bağlı olmak üzere kurkuminin prooksidan ve antioksidan olarak biyolojik sınıflandırılması bunun bir serbest radikal yok edici, bir indirgeyici ve Cu ile Fe iyonlarının bulunduğu durumda DNA hasarını

azaltıcı ajan olarak bilinmesine neden olmuştur. Kurkuminin günlük dozları günde 1-3 defa olmak üzere 500-1000 mg olarak belirlenmiştir.

Apoptozis genetik olarak planlanmış hücre ölümü demektir. Patojenik enfeksiyonlar veya diğer tamir edilemeyecek düzeydeki hücre hasarlarına cevaben veya doku yeniden modellemesi sırasında ve normal morfogenezde hücre intiharını ifade eden bir terimdir. Apoptozisin anormal regülasyonu enflamasyon, nöron hastalığı, otoimmün hastalıklar ve kanser gibi birçok insan hastalığında görülmektedir. RA'li hastalardan elde edilen sinovial fibroblastlarda CL'nın antiproliferatif bir etki gösterdiği bulunmuştur. MTT ölçümlerinde sinovial fibroblastların kurkumine maruz bırakılması durumunda büyümenin baskılandığı ve apoptozisin indüklendiği bulunmuştur (84).

CL'nın H2 fraksiyonu polar fraksiyon olup etil asetat, n-butanol ve etanolün ardışık partisionundan elde edildiğinden buradan elde edilen maddeler daha çok polisakkaritlerdir. Bu kısmın birçok farmakolojik aktivitesi vardır. Bu fraksiyonun özellikle insan periferik kan mononükleer hücrelerinde immunomodulator etkinliği gösterilmiştir. Bu bağlamda polisakkaritten zengin bu kısmın ELISA ölçümleri ile ve protein array ölçümleri ile TGF- β , TNF- α , GM-CSF, IL-1 α , IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13 gibi sitokinlerin üretimini modüle ettiği gösterilmiştir (85).

2.6. Ekstrasellüler proteoglikanlar: yapı ve fonksiyon farklılıkları (86)

Her ne kadar proteoglikanlar primer sekans benzerliği bölgeleri baz alınarak alt gruplara ayrılrsa da proteoglikan kor proteinleri yapıca ve fonksiyonca bağımsız olup farklılık arz etmektedir. Proteoglikanların birbirine benzeyen tek özelliği, kor proteinine sıkıca bağlı bulunan bir veya birden fazla glikozaminoglikan zincirlerinin varlığıdır. Bu kriter ile birçok ve farklı filogenetik alt gruplarından gelen moleküller proteoglikanlar olarak isimlendirilirler. Örneğin α -2 (IX) zincirinde %70 ihtimalle bulunan tek bir kondroitin sülfat glikozaminoglikan kısmı nedeniyle tip IX kollajeni kısmi proteoglikan olarak kabul edilirken, musin domainindeki kondroitin sülfat zincir kısmı ile ADAMTS-7 de bir proteoglikan olarak kabul edilmektedir. Glikozaminoglikanlar, üzerinde negatif olarak yüklü sülfat ve karboksilat üniteleri taşıyan tekrarlayan disakkarit ünitelerinden oluşan lineer karbohidrat zincirleridir. Zincirler, her bir zincir tipine ait olmak üzere çoklu disakkarit kombinasyonları ile kondroitin sülfat, dermatan sülfat, keratan sülfat, heparan sülfat veya heparin olabilir. Bazı proteoglikanlar tek kor proteinine bağlı iki veya hatta üç farklı zincir tipi

taşıyabilir. Örneğin agrekan, kondroitin ve keratan sülfat zincirlerinden oluşur. Hücre yüzeyi HA reseptörü olan CD44 kondroitin ve/veya heparan sülfat taşır. Perlekan kondroitin, heparan ve keratan sülfat zincirleri taşır. ADAMTS aktivitesi direkt olarak glikozaminoglikanların varlığı veya yokluğundan etkilenmektedir. Örneğin tam olarak glikozillenmiş agrekan ile deglikozile agrekan, ADAMTS-4 ve -5'e substrat olma açısından karşılaştırıldığında deglikozile olanın daha zayıf bir substrat olduğu görülecektir. Proteoglikanlarda bulunan iki aile şunlardır:

a) Proteoglikanların lektinan ailesi: Agrekan, versikan, nörokan ve brevikan.

b) Proteoglikanların SLRP ailesi: Dekorin, biglikan, fibromodulin, lumikan, keratokan, PRELP, osteoadherin, kondroadherin, epiglikan ve osteoglisin.

2.7. A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin motifs (ADAMTS) genleri ve ürünleri

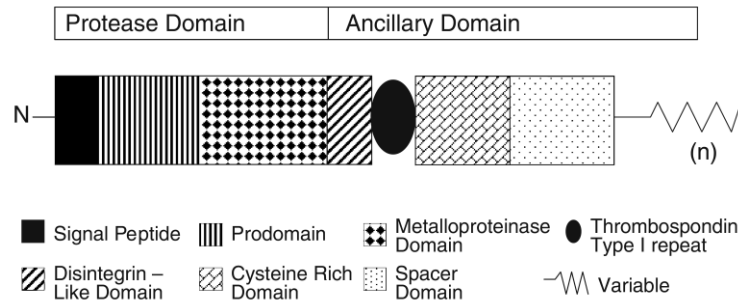
Bütün dokulardaki hücreler bir ECM tarafından çevrelenmiştir. Hücrelere yapısal bir desteğin yanısıra ECM, hücrelerin şekil, yaşam, farklılaşma, hareket, çoğalma ve ölüm dâhil bütün aktivitelerini ve davranışlarını regüle edici aktif bir role sahiptir. Bu hücreler aktivite ve davranışlar, örneğin yüklü glikozaminoglikan zincirlerine sahip proteoglikanlar, kollajen, elastin, laminin ve fibronektin gibi fibril ve ağ kurucu moleküller dâhil olmak üzere özelleşmiş bazı ECM proteinleri ve glikoproteinleri tarafından yönetilmekte ve yönlendirilmektedir. Morfogenez, ovulasyon, doğum ve yara iyileşmesi gibi birçok fizyolojik süreçler çok sıkı bir şekilde ECM'nin yıkılması ile kontrol edilmektedir. Oysa diğer bazı durumlarda yine aynı matriksin yıkılması patolojilere yol açar. Proteoglikanlar ECM'in anahtar bileşikleri ve onlarca yıldır bunlar iyice tanımlanmış ve tarif edilmiştir. Buna karşılık ADAMTS protein ailesi son yıllarda bulunmuştur (86, 87). Bundan sonra ADAMTS-5 ve ADAMTS-13 dâhil olmak üzere birkaç ADAMTS enziminin sırasıyla artrit ve kan pıhtılaşma hastalıklarında önemli rol üstlendiklerinin bulunması bilim dünyasında çok büyük bir ses getirdi. Proteoglikanların ADAMTS enzimlerince proteolizi, kanser ve metastaz dâhil olmak üzere birçok hastalıkta üzerinde en çok çalışılan konular haline geldi. Proteoglikanlar hemen hemen bütün ökaryotların ECM'inde bulunur ve dokuların hem fiziksel hem de biyomoleküler özelliklerini etkileyecek şekilde değişen derecelerde fonksiyon gösterirler. Proteoglikanların çoğu hücreler ve matriks arasında moleküler köprüler oluşturacak

şekilde etkileşim yerleri ile birlikte modüler domain yapıları içerirler. Diğer proteoglikanlar kollajen fibril yapımı kontrolü ile hücre dışı mimariyi etkilerler. Büyüme faktörlerine bağlanan ekstrasellüler proteoglikanlar ile hücre yüzeyi sinyal iletimi için koreseptörler olarak aktivite gösterirler. Proteoglikanların ADAMTS enzimleri ile proteolizi; hücre-matriks iletişiminin ve fibriler ağ yapısının bozulması veya biyomekanik özelliklerin değişmesini netice vereceğinden genel olarak bozucu etkiler doğurur. Diğer durumlarda proteoglikanların ADAMTS enzimleri ile proteolizi normal bazı fizyolojik süreçlerin gerçekleşmesi için gerekir. Proteoglikanlar arasında çok fazla farklılık olduğu için bu genel bilgilerde proteoglikanlardan sadece lektikanlar (agrekan, versikan, brevikan ve nörokan) ile küçük lösinden zengin tekrarlar içeren proteoglikanlar (SLRPs) bahsedilecektir.

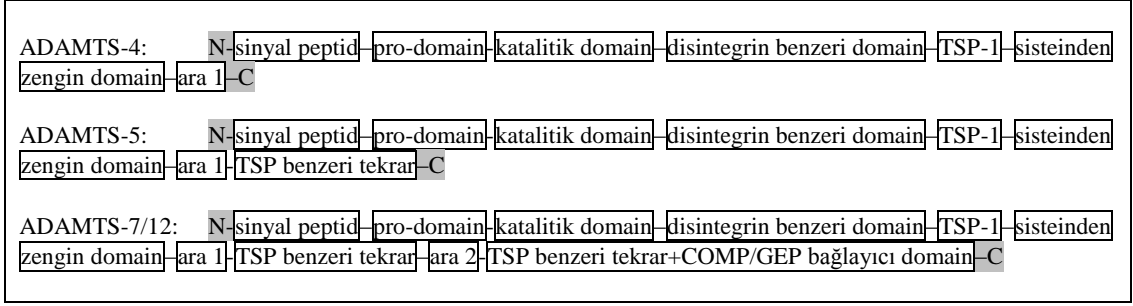
2.7.1. Proteazların ADAMTS ailesi

ADAMTS ailesi, metalloendopeptidazların metzincin süper ailesine dahildir ve içinde geniş bir substrat grubuna karşı geniş bir katalitik aktivite gösteren şimdilik tanımlanan 19 üyesi mevcut olan enzimleri içermektedir. ADAMTS enzimleri hücreler tarafından sekrete edilen proteazlardır, dolayısıyla hücre dışında da bu enzimlerin substratı bulunmaktadır. Bununla birlikte henüz bulunmamış daha başka substratların olması da muhtemeldir.

2.7.2. ADAMTS proteazların domain yapısı (88-90)



Şekil 4. ADAMTS proteazların örnek bir domain yapısı. En başta bir sinyal peptid sekansı vardır. Bu değişen uzunluktaki prodomain ve katalitik metalloproteinaz domain ile takip edilir. Bu proteaz domain kısmı bütün ADAMTS üyeleri arasında hayli korunmuştur. ADAMTS-13 bunun istisnasıdır, bu ADAMTS tipinde pek yaygın olmayan kısa bir prodomain bulunur. Yedek (kuyruk) domain; disintegrin benzeri domain, trombospondin tip I tekrarları, sisteinden zengin domain ve bir ara domainden oluşmaktadır. Proteinin kalan kısmı farklı aile üyelerine göre farklılık arz etmektedir. Değişken bölümler bir kısım trombospondin tip I tekrarlar ve diğer domainlerden oluşur (Şekil J Mol Med 2010; 88:1203-1211 makalesinden alınarak adapte edilmiştir).



Şekil 5. ADAMTS-4, -5, -7 ve -12'nin şematik olarak gösterimi (Protein & Cell 2010; 1:33-47 makalesinden adapte edilmiştir).

ADAMTS proteazların domain yapısı Şekil 4'te gösterilmiştir. Ailenin bütün üyelerinde korunmuş bir şekildir. ADAMTS proteazlar proproteinler olarak sentez edilmiş olup transgolgi içinde bir furin proprotein konvertaz enzimi ile bu prodomain yapısının uzaklaştırılması ile aktif hale gelir (zimojen aktivasyonu). ADAMTS proteazların katalitik (metalloproteinaz) domaini 3 adet histidin kalıntısı ile koordine edilen bir katalitik çinkodan oluşmaktadır. Bu aktif bölge motifi hayli korunmuş bir metionin kalıntısı takip etmektedir ki bu kalıp ADAM ve MMP ailelerinde de gözlenir. Katalitik bölge daha küçük bir disintegrin benzeri bölge ile takip edilir. Bu bölge yılan zehirindeki disintegrinlerle % 25-45 benzerlik gösterir fakat integrinlerle etkileşmez. Bunu takiben trombospondin tip 1 benzeri tekrarların (TSR) olduğu bölge gelir. Bu sekanslar matriks proteaz aileleri arasında ADAMTS proteazlara özel sekanslardır ve trombospondin 1 ve 2 içinde bulunan tip 1 tekrarlara benzer. Bu domainin bir önemli fonksiyonu ECM'e ve heparin gibi glikozaminoglikanlara bağlanmasıdır. Sisteinden zengin hayli korunmuş bir bölge TSR bölgesini takip eder ve 10 adet sistein kalıntısı ihtiva eder. ADAMTS-1'in kristalize yapısı bu sistein kalıntılarının proteazların aktif bölgesine karşı istif edildiğini göstermiştir. Bu bölge daha sonra uzunlukları ve sekansı değişebilen ancak genellikle N-terminal sona doğru birkaç hidrofobik kalıntı içeren ara bölge ile takip edilir. ADAMTS-4 hariç bütün ADAMTS proteazlarda ara bölgeyi takiben 1-14 arasında TSR bulunur.

ADAMTS proteazların ECM'e bağlanma kabiliyeti, ADAMTS ailesini ADAM ve MMP ailelerinden ayıran önemli bir özelliktir. Proteazlar ECM'de bulunan heparin ve agrekan da dâhil sülfatlı glikozaminoglikanlara bağlanırlar. ADAMTS proteazların hem katalitik hem de katalitik olmayan bölgeleri tam proteolitik aktivite ve substrat bağlanma kabiliyeti gösterirler. Bu özellik olgun

ADAMTS proteazların ara bölgedeki posttranslasyonel işlemleri esnasında (C terminal budanması) kazanılır ve MMP'ler tarafından kontrol edilir.

Sıçanlara ait ADAMTS-1 domain kesme çalışmaları ve insan ADAMTS-4'ün C-terminali işlenmiş formları ile yapılan çalışmalar TSP tip 1 motifleri ve C terminal domaindeki sisteinden zengin ve ara bölgelerin ECM bağlanmasında vazgeçilmez olduğunu ortaya koymuştur. Bu bölgenin budanması ECM bağlanmasında bir azalma ve kayıp ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca trombospondin motifleri ile birlikte ara bölge ve sisteinden zengin bölgeler substrat tanınması ve proteazlarca parçalanmasında önemlidir. Sisteinden zengin alanlar ve ara alanların çıkarılması ADAMTS-4'ün heparine olan afinitesini azaltırken agrekanı parçalama kabiliyetini de azaltır.

2.7.3. ADAMTS proteazların regülasyonu (91, 92)

ADAMTS proteazların regülasyonu henüz tam olarak anlaşılmamış bir alandır. Bilinen regülatör bir özellik, ADAMTS aktivitesinin metalloproteazların doku inhibitörleri (TIMPs) tarafından regüle edildiğidir. TIMPs-1, -2, -3 ve -4 MMP'ların endojen inhibitörleridir. Bununla beraber TIMP-3'ün ADAMTS-4 ve -5'in spesifik önemli bir inhibitörü olduğu bulunmuştur. TIMP-2 ve TIMP-3 ADAMTS-1 agrekanaz aktivitesini inhibe etmektedir. TIMP moleküllerinin ADAMTS-4'ün agrekanı parçalama kabiliyeti üzerine olan inhibe edici etkisini araştırmak üzere bunlar beraber inkübasyona bırakılmıştır. IC50 değerlerinden anlaşıldığı kadarıyla TIMP-3'ün TIMP-1 ve -2'ye oranla 50 kat daha aktif olduğu ve TIMP-4'e göre de 250 kat daha aktif olduğu gözlemlendiğinden ADAMTS-4'ün inhibisyonunun TIMP-3'e spesifik olduğu çıkarımı yapılmıştır. Bu inhibisyonun mekanizması tam olarak anlaşılamamış olsa da TIMP-3'ün N-terminal domaini ADAMTS-4 ve -5'in agrekanaz aktivitesini inhibe etmesi TIMP-3'ün N-terminal bölgesinin ADAMTS ile etkileştiğini göstermektedir. Son çalışmalar ADAMTS-4 ve -5'in C terminal domaininin bu etkileşimi arttırdığını göstermiştir. TIMP-3'ün bağlanması aktif bölgenin agrekana uygun yapısını değiştirerek ADAMTS ve agrekan arasındaki etkileşimi önlemektedir.

2.7.4. Proteoglikanların ADAMTS tarafından parçalanması ile ilişkili görülen hastalık, gelişim ve doku yeniden şekillenme durumları

ADAMTS birçok proteoglikan sindirimine iştirak etmektedir. Bunlar;

- a) Bazı hastalıklarda kıkırdak ve tendonlardaki proteoglikanların sindirimi
- b) Gliomada brevikanın sindirimi

c) Vasküler hastalık, anjiogenez, ovulasyon ve doku morfogenezinde versikanın sindirimi

ADAMTS ailesinin üyeleri birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir (Tablo 1) (93). ADAMTS-13 koagülasyon bozuklukları ve trombotik trombositopenik purpurada rol alır. Kollajen sentezinin genetik olarak bozulması ile karakterize olan Ehler Danlos sendromu tip 7C'de ADAMTS-2 geninde mutasyon vardır. ADAMTS-1'in anjiyo inhibitör özellikleri vardır ve ürogenital sistemin fonksiyon ve gelişmesi için esansiyeldir. ADAMTS-1 aynı zamanda versikanın parçalanması sonucunda ortaya çıkan ateroskleroz ile ilişkilendirilmiştir. ADAMTS-1 genindeki mutasyonlar ile koroner arter hastalığı riskinin artışı arasında ilişki bulunmuştur. Diğer ADAMTS'lardan -4, -7 ve -8'in aterosklerotik plak oluşumu ve aterosklerotik hastalık ile ilişkili bulunmuştur.

Tablo 1. ADAMTS ailesi ile ilgili bilgilerin özeti (Protein & Cell 2010; 1:33-47 makalesinden adapte edilmiştir).

| ADAMTS | Diğer adı | Bilinen substrat(lar)ı | Hastalıklardaki rolü |
|--------|-----------------------|--|--|
| 1 | METH-1 | Agrekan, versikan | Antianjiyogenik, renal interstisyel fibrozis, kemik yeniden modellenmesi, over follikülogenezi, ürogenital gelişim, tümör büyümesi/ yeniden şekillenmesi |
| 2 | PCINP | Kollajen I, II, III N-propeptidleri | Ehler-Danlos sendrom tip 7C, sığır dermatopraksis |
| 3 | KIAA0366 | Prokollajen II N-propeptidleri | |
| 4 | Agrekanaz-1 | Agrekan, brevikan, COMP, dekorin, fibromodulin, versikan | Artrit, ateroskleroz |
| 5 | Agrekanaz-1, ADAMTS-1 | Agrekan, $\alpha 2M$ | Artrit |
| 6 | | Bilinmemektedir | Bilinmemektedir |
| 7 | ADAMTS-7B | COMP, $\alpha 2M$ | Artrit |
| 8 | METH-2 | Agrekan | Antianjiyogenez, beyin kanserleri, ateroskleroz |
| 9 | KIAA1312 | Agrekan, versikan | Artrit |
| 10 | | Bilinmemektedir | Bilinmemektedir |
| 12 | | Agrekan, COMP, $\alpha 2M$ | Artrit |
| 13 | vWFCP | Von Willebrand faktör | Trombotik trombositopenik purpura |
| 14 | | Prokollajen I ve II N-propeptidi | |
| 15 | | Agrekan | |
| 16 | | Agrekan | |
| 17 | | Bilinmemektedir | Bilinmemektedir |
| 18 | | | Antitromboz/inme |
| 19 | | Agrekan | |
| 20 | | Bilinmemektedir | Bilinmemektedir |

2.7.5. Agrekanazlar

Bir proteoglikan olan agrekan kıkırdağın en esaslı bileşenlerinden birisi olup kollajeni yıkım ve sindirimden korumaktadır. Hyaluronan ve bağlayıcı proteinlerle etkileşim sayesinde ECM kollajen ağını dolduran büyük agregatları oluştururlar. Agrekan molekülü, sulu ortamda tip II kollajen iskeletine karşı şişerek cevap veren birçok glikozaminoglikan yan zincirleri ihtiva eder. Bunlar kıkırdağa, yük bindiği durumlarda eklemdeki baskı yapan kuvvetlere karşı dayanma kabiliyeti kazandırır. Agrekanın sindirimi artrit patogenezinde altta yatan olayların en önemli olanlarından birisidir (94, 95). ADAMTS-1, -4, -5, -8 ve -15, ADAMTS'ın alt grupları olup hepsi agrekanı sindirme özelliğine sahiptir. ADAMTS-9, -16 ve -18 de alt dahil olmadığı halde *in vitro* olarak agrekanı parçalayabilir. Bununla beraber ADAMTS-1, -8, -9, -15 ve -16'nın agrekanaz ekspresyonu ve/veya sindirim aktivitesi oldukça düşük olduğu için ADAMTS-4 ve -5 iki ana fonksiyonel agrekanaz olarak tanımlanmıştır (96). Bütün özellikleri ile en iyi çalışılmış agrekanaz olan ADAMTS-4 C-terminal ara bölge üzerinden ECM proteini fibronektine bağlanır. Uzunluğu tam olan ADAMTS-4'ün C-terminalinin proteolitik olarak işlem görmesi sonucu enzimin ECM-fibronektine bağlı olan kısmını koparır ve işlem görmüş izoformların (60 kDa ve 50 kDa) ayrılmasını sağlar. Bunun dışında 74 kDa'luk tam-uzunlukta ADAMTS-4 agrekanı Glu 1480-Gly1481 kısmından koparırken işlem görmüş izoformlar Glu373-ALA374 kısmından koparır. ADAMTS-4'ün agrekanaz aktivitesi spesifik olarak agrekanın GAG zincirine bağlanmasına bağlıdır.

ADAMTS-4 ve -5 tarafından agrekanın parçalanması Glu373-Ala374 bağı üzerinden gerçekleşir. Bunun dışında 4 yerden daha zinciri kesebilir. Çalışmalarda bu 4 yerden kesimin Glu373-Ala374 pozisyonundan kesim işleminden çok daha etkili olduğunu göstermiştir. Bununla beraber Glu373-Ala374 kısmından parçalanma osteoartrit ve enflamatuvar artrit patogenezinde daha önemli bir yer tutar çünkü bu bağdaki entegrasyonun bozulması bütün bir agrekan molekülünün kaybı ile sonuçlanır ki bu da kıkırdağın bütünlüğü ve fonksiyonu açısından çok önemlidir (97). ADAMTS-4 ve -5'in katalizi sonucu agrekandan oluşan parçalar IL-1 ve TNF- α ile muamele edilen sıgır eklem kıkırdak eksplantlarında bulunmuştur (98). IL-1 ya da retinoik asit ile muamele sonucunda da bu tür parçaların varlığı tespit edilmiştir. Bu parçalar normal eklem kıkırdağında da gerçekte bulunmakla birlikte yaş ile arttığına dair kanıtlar vardır. Hasarlı kıkırdakta, tıpkı ADAMTS-4 ve -5'e maruz

bırakılmış kıkırdak dokusunda olduğu gibi çok miktarda benzer parçalanma ürünlerinin bulunduğu gösterilmiştir (99).

ADAMTS-4'ün *in vitro* olarak agrekanı çok etkin bir şekilde parçaladığı gösterilmekle birlikte ADAMTS-4-null farelerin agrekan kaybına karşı korunamadığı gösterilmiştir. Aynı durum ADAMTS-1-null fare için de geçerlidir. Ancak ADAMTS-5'i susturulmuş (knock-out) farelerin sinovitis ve eklem hasarından korunabilmesi, en azından farelerde meydana gelen artritteki kıkırdak hasarının primer belirleyicisinin ADAMTS-5 olduğu kanaatine yol açmıştır (100). Bu veri daha sonraki gözlemlerde, örneğin farelerde IL-1 α 'nın ADAMTS-5 ekspresyonunu çok kuvvetli bir şekilde stimüle ettiği ama ADAMTS-4'ü etkilemediği, destek bulmuştur (101).

Her ne kadar ADAMTS-5 sıçan modellerinde artrit gelişiminde ana rolü üstlense de insan dokuları ile yapılan çalışmalarda tam tersi bir sonuca ulaşılmıştır. Bunda da ADAMTS-4'ün esas rol aldığı savunulmaktadır. Örneğin insan ADAMTS-5 ile ilgili genetik varyasyonlar OA'e yatkınlığı etkilememektedir (102). Daha ileri bazı çalışmalarda insan kondrositlerinde veya kıkırdak eksplantlarında onkostatın M ve hem IL-1 β hem de TNF- α ile muamele edildiğinde ADAMTS-4 düzeyinde belirgin indüksiyonlar olurken ADAMTS-5 çok daha az upregüle olmaktadır (103). İnsan doku eksplantları IL-1 α ile muamele edildiğinde hem ADAMTS-4 hem de ADAMTS-5 insan hastalığında etkin bulunmuştur. Her iki ADAMTS türü insan OA'li kıkırdığında hayli eksprese edilmektedir ve her iki molekül de hem normal hem de OA'li kıkırdaktaki agrekan kaybına katkıda bulunmaktadır (103).

ADAMTS-5 aktivitesini kontrol eden diğer endojen bir faktör de sindekan-4'tür. Bu, transmembran heparan sülfat proteoglikanlarının sindekan ailesine ait bir moleküldür. Sindekanlar birçok ECM molekülleri, büyüme faktörleri ve sitokinler ile etkileştiği bilinen moleküllerdir. Sindekan-4'ün ADAMTS-5'i direkt protein-protein etkileşimleri ile ve MAPK sinyal sisteminin modülasyonu üzerinden MMP-3 sentezini regüle ederek gerçekleştirdiği iddia edilmektedir (104).

2.7.6. Agrekanaz inhibitörleri

Agrekanazların artrit patogenezi yönetmedeki rolleri anlaşıldıktan sonra hastalık ilerlemesini durdurmak için bazı tedavi stratejileri üzerinde durulmaya başlanmıştır. Klinik olarak ADAMTS-4 ve -5'in inhibitörlerini geliştirmek mantıklı olduğundan siRNA kullanılarak bu genleri baskılamak agrekan katabolizmasının

azalmasına yol açacaktır (103). Ayrıca bu iki genin delesyonu hayvan modellerinde OA'ye karşı önemli bir korunma sağlayacaktır (100).

2.7.7. Kıkırdak yıkımında agrekanoliz

Öteden beri agrekanolizin patolojik kıkırdak erozyonunda başlatıcı olay olduğu düşünülürdü. Bunun esas sebebi hastalığın radyolojik ve klinik semptomları henüz görünür hale gelmeden çok önce agrekanolizinin metakromatik boyama kaybı ile tespit edilen histolojik kanıtıdır. Kıkırdak erozyonu henüz meydana gelmeden önce metakromatik boyamada meydana gelen bu karakteristik kayıp deneysel modellerde, klinik örneklerde ve türler arasında tekrarlanabilir bir özelliktir. Agrekanolizi önlemek kıkırdak erozyonunu önlemede izlenebilecek en önemli stratejidir. Bununla ilgili ilk delillerin bulunduğu çalışmada seçici bir agrekanaz inhibitörü, kültürü yapılan kıkırdak dokularında IL-1 ile oluşturulan agrekanolizi engellerken aynı inhibitör aynı zamanda kollajen yıkımını da inhibe etmiştir (105). Kollajenaz aktivitesi üzerine olan bu muhtemel nonspesifik inhibe edici etkinin yok edilmesi için araştırmacılar agrekan baskılandıktan sonraki 6. günde kültürlerine inhibitör eklemişler ve inhibitörün kollajen yıkımını önlemediğini bulmuşlardır. Bu sonuçlar agrekanın kollajeni, muhtemelen kondroitin sülfat zincirleri tarafından oluşturulan direkt yapısal blokaj yoluyla kollajenaz etkisinden koruduğu fikrini desteklemiştir (106).

2.7.8. ADAMTS-7 ve -12

ADAMTS-7 ve -12, ADAMTS ailesinin yeni bulunmuş iki üyesidir. Birbirine benzer eşsiz özellikleri ile kendi alt gruplarını oluştururlar. Her ikisi de artrit patogeneğinde rol almaktadır ve bunların her ikisinin de artritli (özellikle OA) kıkırdakta ve sinovial sıvıda daha fazla eksprese olduğu bulunmuştur (107). Kültürü yapılmış insan kıkırdak eksplantlarında yapılan Real-time PCR analizleri TNF ve IL-1 β 'nin ADAMTS-7 ve -12 ekspresyonunu kuvvetle indüklediği gösterilmiştir (108).

2.7.9. Kıkırdak oligomerik matris proteini (Cartilage oligomeric matrix protein-COMP)

Artrit ECM proteinlerinin proteolitik yıkımı ile karakterize olduğu için bütün dikkatler agrekan ve kollajen II gibi spesifik ECM bileşenlerinin yıkımının altında yatan mekanizmaları aydınlatmaya çevrilmiştir. 524 kDa ağırlığında disülfid bağlı multi-domain glikoprotein olan COMP, kıkırdak ECM'sinde bulunan bir bileşendir. İnsan COMP gen mutasyonları psödoakondroplazi ve multipl epifizyal displazi gibi

kısa ekstremiteli cüceliğin otozomal dominant formlarının gelişimi ile ilişkili bulunmuştur (109). COMP'un fonksiyonu tam olarak anlaşılammıştır ancak integrin reseptörü vasıtası ile kondrosit bağlanmasına aracılık ettiği düşünülmektedir. Aynı zamanda kollajen tip II ve IX, agrekan ve fibronektin gibi matriks komponentleriyle spesifik bazı etkileşimler yoluyla kıkırdak ECM'ni stabilize etme fonksiyonunu gördüğü savunulmaktadır (110). COMP'un yıkılmasının artrit patogenezinde kilit bir rol oynadığı savunulmaktadır. Primer osteoartritli ve romatoid artritli, post-travmatik diz yaralanmaları bulunan hastaların serum, kıkırdak ve sinovial sıvılarında COMP parçaları tespit edilmiştir. Bazı çalışmalarda bunların ayrıca teşhise yardımcı bazı araçlar olarak kullanılabilceği gösterilmiştir (111).

2.7.10. Granülin epitelin prekürsör (GEP)

GEP, 80 kDa ağırlığında $7_{1/2}$ sisteinden zengin motif içeren ve sekrete edilen glikoprotein yapılı bir büyüme faktörüdür. COMP bu glikoproteinle ilişkili olup kondrositlerde çokça eksprese olmakta, OA ve RA hastalarının sinoviumunda da upregüle edilmektedir. Bazı veriler GEP'in spesifik olarak ADAMTS-7 ve -12 tarafından COMP yıkımını inhibe ettiğini göstermiştir.

2.7.11. ADAMTS-9

ADAMTS-4 ve -5 gibi ADAMTS-9 da agrekan sindirici etkisi olduğu bilinen, kondrosarkom hücreleri ve insan kondrositlerinde hem TNF- α , hem de IL-1 β ile aktive edilebilen bir enzimdir (112). ADAMTS-9 promotelinin klonlanması ile aktive olmuş T hücrelerinin (NFAT) nükleer faktörleri için varsayımsal bağlanma bölgeleri olduğu sonucuna varılmıştır. Bunlar ADAMTS-4 ve -5'te de vardır (113). NFAT aktivasyonunu inhibe eden bir peptid olan 11R-VIVIT, ADAMTS-9'un IL-1 β ile indüksiyonunu durdurmaktadır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Hücre kültürü protokolü

Hücre medyumu hazırlanışı: Deneyleerde OUMS-27 kondrosarkom hücreleri kullanıldı. Bu hücreler Dr. T. Kunisada'nın (Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry, Okayama, Japan) (114) nazik bir hediyesi olarak laboratuvarımıza kazandırılmıştır. Bu hücrelerin kültürünün yapılabilmesi için ticari DMEM/High glucose medyumu kullanıldı. 500 ml DMEM/High glucose medyumu

(HY-SH30243.01)'na eklenen diğer bileşenler: 50 mL FBS (Wisent- 080110 veya HY- CH30160.02), 5 mL penisilin /streptomysin (HY-SV30010), 4 mL L-Glutamin (Wisent-609-065-ZL), 0.5 mL Plasmocin (ant-mpt, Invivogen). Çalışmaya başlamadan yarım saat önce kabinin UV ışığı açılarak kabin sterilize edildi. Kabin, çalışma öncesinde % 70'lik alkol ile temizlendi. Önce ateş yakıldı, daha sonra havalandırma açıldı. Her çalışma bitiminde çöp kovası boşaltılarak tıbbi atığa atıldı.

3.1.1. Hücre ekim işlemleri

Her bir deneyde aşağıdaki işlemler sırasıyla esas alınarak hücre kültürü yapıldı:

1. Flasktaki medyumun hepsi boşaltılıp hücrelere bakılır.
2. 1XPBS ile (10 mL) yıkanır (10 defa ileri geri yapılarak çalkalanır).
3. 1.5 mL Tripsin-EDTA (HY-SV30031.01) damla damla eklenir, 2 ila 5 dk arasında hücreler kalkıncaya kadar 37 °C'de inkübe edilir (Flaskın dibine vurularak hücrelerin kalkmasına yardımcı olunabilir.)
4. Önceden hazırlanmış 8.5 mL medyum eklenir. Pipetaj yapılarak tüm sıvı alınır ve falkon tüpe aktarılır.
5. 1100 rpm'de 3 dk 25 °C'de santrifüj yapılır.
6. Hücrelere zarar vermeden süpernatant atılır.
7. Kültür tabaklarının (well) içine 8 mL medyum konulur. Kaç tane kültür tabağına ekim yapılacaksa ona göre hücrelerin üzerine medyum eklenir (1 tabak için 2 mL olacak şekilde).
8. Pipetaj yapılarak hücreler çözülür ve 8 mL medyum bulunan tabakların içerisine 2 mL hücre eklenir, karıştırılır ve 37 °C'de % 5 CO₂ etüve konulur (Tabak başına yaklaşık 100-150 bin hücre).

3.1.2. Stok hücrelerin ekimi

Deneylerde stok hücrelerin ekimi aşağıdaki sıra ile ve kurallara göre yapıldı:

1. Isıtıcı 37 °C'ye ayarlanır.
2. Stok hücreler alınarak 37 °C'deki ısıtıcıda 2 dakika bekletilir.
3. Cryovial tüplerin etrafı alkol ile temizlenip, kapak o şekilde açılır.
4. 9 mL medyum konulmuş kültür tabaklarına hücreler ekilir.
5. Ekilen hücreler inkübatöre konulur.

Stok solüsyonu: % 8 DMSO olacak şekilde fetal bovine serum (FBS) ile hazırlanır. 1 tabak için 1 mL stok solüsyonuna ihtiyaç vardır (Örneğin 20 tabak için 20 mL

FBS'nin içine 1.6 mL DMSO eklenir). Stok solüsyonu her seferinde taze olarak hazırlanır. Kullanılincaya kadar +4 °C'de veya buzda saklanır. Hücrelerin üzerine stok solüsyonu ilave edildikten sonra dondurma tüplerine (cryo-vial) hemen aktarılır, hemen aktarılmayacağı durumlarda hücreler buzda bekletilir.

3.1.3. Harvest işlemi

Hücre kültürü tamamlandıktan sonra hücrelerin harvest edilmesi işlemine geçildi. Harvest işlemi aşağıdaki sıra ve kurallara göre yapıldı:

1. Tabaklardaki medyum boşaltılır.
2. Tabak 5 mL 1XPBS ile yıkanır.
3. 1.5 mL tripsin-EDTA eklenip, etüve konulur, hücrelerin kalkması sağlanır. Hücrelerin erken kalkmasında Tripsin-EDTA'nın vücut sıcaklığına kadar ısıtılması önemlidir.
4. 8.5 mL medyum eklenir, pipetaj yapılarak falkon tüpe aktarılır (istenilirse 2-4 tabak aynı falkonda toplanabilir.)
5. 1100 rpm'de 25 °C'de 6 dk santrifüj yapılır.
6. Süpernatant atılır ve medyum eklenir, tekrar santrifüj edilir.
7. Medyumun tamamı hücrelere zarar vermeden dikkatlice çekilir.
8. 1 mL stok solüsyonu eklenerek yavaşça pipetaj yapılır ve dondurma tüpüne aktarılır. 15 dk buzda ve yarım saat -20 °C'de bekledikten sonra -80 °C'de saklanır.

3.1.4. Medyum değişimi

İnhibitör maddeler ilave edilerek deney devam ederken değer hücrelerin harvest yapılmasına karar verilmez ve kültüre devam edilirse, medyum değişimi için aşağıdaki işlemler uygulandı:

1. Dolaptan çıkarılan medyum 37 °C'de ısıtılır.
2. Tabaktaki medyum boşaltılır.
3. 10 mL medyum eklenir ve etüve konulur.
4. 2-3 günde bir medyum değiştirilir.

Flask çeşidine göre Harvest-Stok solüsyon miktarları;

| Flask (ml) | PBS | Tripsin-EDTA | 1. Santrifüj için Medyum | 2. Santrifüj için Medyum | FBS (8% DMSO) |
|------------|-------|--------------|--------------------------|--------------------------|---------------|
| 25 | 10 mL | 1.5 mL | 8.5 mL | 5 mL | 2 mL |
| 75 | 10 mL | 2 mL | 10 mL | 10 mL | 4-5 mL |
| 175 | 10 mL | 3 mL | 15 mL | 10 mL | 6-8 mL |
| 500 | 10 mL | 15 mL | 85 mL | 20 mL (her falkon için) | 14 mL |

3.2. Deneylerde kullanılan inhibitör maddelerin hazırlanışı

a) Royal jelly (arı sütü, lyophilized powder, Afye, Deva Destek Hiz., Ankara): 2.5 gr RJ alındı. 10 mL PBS'te çözüldü. Gece boyu +4 °C'de hafifçe sallandı. Ertesi gün 12.000xg'de 10 dk. santrifüjlendi. Süpernatanı alınıp deneylerde kullanıldı. Kısa süre için +4 °C'de saklandı. Stok solüsyonu -80 °C'de bekletildi. Bundan 10 µL alınıp, 2 mL'lik hücre kültür ortamına konuldu. Nihai konsantrasyon 12.5 µg/mL'dir.

b) CAPE (Sigma Chem Co., St.Louis, MO): MW: 284 gr/mol. 2.84 mg tartılıp 1 mL DMSO içinde çözüldü. Elde edilen 10 mM stok solüsyonu -20 °C'de saklandı. Bu stoktan 2 µL alınarak 2 mL medyuma eklendi. Nihai konsantrasyon 10 µmol/L'dir.

c) Kurkumin (curcuma longanın aktif bileşeni, curcumin): MW: 368 gr/mol (Sigma Chem Co., St.Louis, MO). 3.68 mg tartılıp 1 mL DMSO' da çözüldü. Elde edilen 10 mM stok solüsyonu -20 °C'de saklandı. Bu stoktan 2 µL alınarak 2 mL medyuma eklendi. Nihai konsantrasyon 10 µmol/L'dir.

d) BAY 11-7085 (Sigma Co., St.Louis, MO, MW: 249 gr/mol): 2.49 mg tartılıp 1 mL DMSO'da çözüldü. Elde edilen 10 mM stok solüsyonu -20 °C'de saklandı. Bu stoktan 2 µL alınarak 2 mL medyuma eklendi. Nihai konsantrasyon 10 µmol/L'dir.

3.3 Hücre kültür sisteminde IL-1α ve inhibitörlerin uygulanması

İlk olarak hazırlanan CAPE, BAY, Royal Jelly ve Kurkumin aşağıdaki konsantrasyonlara uygun olarak tabaklara 2µL olacak şekilde paylaştırıldı. Bir saat bekledikten sonra CAPE, BAY, Royal Jelly ve Kurkumin 30mm'lik tabakların herbirine 2µL olacak şekilde IL-1α (R&D Systems, Minneapolis) ilave edildi (nihai konsantrasyon: 10 ng/mL). 6 saat bekledikten sonra Trizolle RNA ekstraksiyonu yapıldı.

| | 1. tabak (well) | 2. tabak | 3. tabak |
|--------------------------------|--|--|--|
| Kontrol | 2 mL medyum | 2 mL medyum | 2 mL medyum |
| IL-1α | 2 mL medyum + 2 μ L IL-1 α | 2 mL medyum + 2 μ L IL-1 α | 2 mL medyum + 2 μ L IL-1 α |
| CAPE | 2 mL medyum + 2 μ L IL-1 α ve 2 μ L CAPE | 2 mL medyum + 2 μ L IL-1 α ve 2 μ L CAPE | 2 mL medyum + 2 μ L IL-1 α ve 2 μ L CAPE |
| RJ | 2 mL medyum + 2 μ L IL-1 α ve 10 μ L RJ | 2 mL medyum + 2 μ L IL-1 α ve 10 μ L RJ | 2 mL medyum + 2 μ L IL-1 α ve 10 μ L RJ |
| KURKUMİN | 2 mL medyum + 2 μ L IL-1 α ve 2 μ L Kurkumin | 2 mL medyum + 2 μ L IL-1 α ve 2 μ L Kurkumin | 2 mL medyum + 2 μ L IL-1 α ve 2 μ L Kurkumin |
| BAY | 2 mL medyum + 2 μ L IL-1 α ve 2 μ L BAY | 2 mL medyum + 2 μ L IL-1 α ve 2 μ L BAY | 2 mL medyum + 2 μ L IL-1 α ve 2 μ L BAY |

3.4. TRIZOL (Invitrogen) ile hücre kültüründen RNA izolasyonu

Deneylerde hücre kültüründen RNA izolasyonu yapılırken aşağıdaki sırayla kurallar uygulandı:

1. Medyum boşaltılır.
2. 1XPBS'le (2 mL) iki kez yıkanır.
3. Her bir tabağa 1 mL TRIZOL ilave edilir. Pipet ucuyla iyice kazınır.
4. 2 mL'lik endorff tüplere alınır.
5. 200 μ L kloroform eklenir ve renk değişene kadar 2-3 dk sallanır.
6. 12.000xg'de 15 dk +4 °C'de santrifüj yapılır.
7. Üstteki şeffaf kısım (süpernatant) yeni endorff tüpe aktarılır.
8. 500 μ L 2-propanol eklenir. Sallanarak karıştırılır ve oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilir.
9. 12.000xg'de 10 dk +4 °C'de santrifüj yapılır.
10. Süpernatant RNA'ya zarar vermeden dikkatlice atılır. % 75'lik etanolden 1000 μ L eklenir. Hafifçe sallanır.
11. 7500 xg'de 5 dk +4 °C'de santrifüj yapılır.
12. Süpernatant atılır ve alkolün uzaklaşması için 10-15 dk oda sıcaklığında kapakları açık olarak bekletilir.
13. 100-200 μ L PCR-grade DEPC su eklenerek RNA pipetejla çözülür.
14. RNA bir sonraki deney için hazır haldedir ve kullanılabilir.

3.5. cDNA protokolü (Fermentas, Thermo Sci.)

mRNA'dan cDNA elde edebilmek için aşağıdaki sıra ile deneylere devam edildi.

1. Tüm RNA'lar sabit bir sayıya eşitlenir (0.5-1-2 μ L).

2. Hesaplama şu şekilde yapılır;

Örneğin;

RNA değeri X= 274.2 ng/μL

274.2/1000= 0.274 μg/μL

1/0.274= 3.65 μL

Bu hacimde RNA alınıp deneye devam edilir. Kullanılacak malzeme ve solüsyonlar çözüldükten sonra dışarıda bekletilmez, buzun içine koyulur. Özellikle RNA ve primerler çabuk bozulabileceğinden buzda bekletilir.

3. Örnek sayısı kadar 0.5 mL'lik eppendorf çıkartılır.

4. Konulacak RNA miktarı örneğin, 2 μL ise 11 μL'ye tamamlanacak şekilde 9 μL dH₂O eklenir.

5. Her bir örnek için hesaplanan miktarda RNA sırasıyla eppendorf tüplere konulur.

6. Her bir tüpe ayrı ayrı 1 μL oligo(dT)₁₈ primer konulur.

7. Ayrı bir temiz eppendorf içinde aşağıdaki oranlarda miks hazırlanır:

Bir örnek için hazırlanacak miktarlar (Daha çok örnek varsa örnek sayısıyla çarpılır):

| Sıra | Eklenecekler | Miktar |
|------|---|--------|
| 1 | 5X Reaksiyon tamponu | 4 μL |
| 2 | Ribolock™ RNase inhibitör (20 U/μL) | 1 μL |
| 3 | 10mM DNTP Miks | 2 μL |
| 4 | RevertAid™ M-MuLV reverse transcripitase (200 U/μL) | 1 μL |
| | TOPLAM | 8 μL |

8. Hazırlanan miks örnek tüplerinin üzerine 8 μL olacak şekilde dağıtılır. Son durumda toplam hacmi 20 μL olan reaksiyon ortamı oluşur (12 μL önceden + 8 μL son eklenenler)

9. 42 °C'de 60 dk inkübasyona bırakılır. Sonra 70 °C'de 5 dk bekletilir.

10. Elde edilen cDNA 1 hafta bekleme süresi için -20 °C'de, daha uzun süre bekleyecekse -70 °C'de saklanır.

3.6. Primerlerin hazırlanması

Liyofilize durumdaki primerlere (ALPHA DNA) kullanma talimatında belirtilen miktarda 1XTE (Tris-EDTA) eklenerek 100 pmol/mL'lik stok çözeltiler hazırlanır. PCR işleminde kullanılmak üzere stoktan 20 μL alınarak 80 μL 1×TE tamponu eklenir.

3.7. Gradyent PCR

Deneyler boyunca kullanılacak olan gradyent PCR işlemi için belirlenen master miks solüsyonu şu şekilde belirlendi:

| Solüsyon | Miktar | Toplam hazırlanan |
|---|---------|-------------------|
| Taq PCR Master Mix (Tampon+Mg ²⁺ +dNTP'lar+Taq polimeraz) (QIAGEN, Cat No: 201445) | 12.5 µL | x7= 87.5 µL |
| PCR grade distile su (nuclease-free) | 9.5 µL | x7= 66.5 µL |
| Primer (reverse) | 0.5 µL | x7= 3.5 µL |
| Primer (forward) | 0.5 µL | x7= 3.5 µL |
| cDNA | 2 µL | |

(56-64 °C'de 30 sn. işlem yapılır)

Gradyent PCR yapmak üzere β-aktin, ADAMTS-1, ADAMTS-5 ve ADAMTS-9 için belirlenen program koşulları şu şekildedir:

| | | | |
|-----------------|----------|-------|----------|
| Ön denatürasyon | 95 °C | 5 dk | 36 Döngü |
| Denatürasyon | 95 °C | 30 sn | |
| Primer bağlanma | 56-64 °C | 30 sn | |
| Uzama | 72 °C | 1 dk | |
| Son Uzama | 72 °C | 5 dk | |

3.8. Normal PCR

Deneyler boyunca kullanılacak olan normal PCR işlemi için belirlenen master miks solüsyonu şu şekilde belirlendi:

| Solüsyon | Miktar |
|-------------------------------------|---------|
| Taq PCR Master Mix (QIAGEN) | 12.5 µL |
| PCR grade distile su(nuclease-free) | 9.5 µL |
| Primer (reverse) | 0.5 µL |
| Primer (forward) | 0.5 µL |
| cDNA | 2 µL |

3.8.1. β-aktin için izlenen PCR programı (204 bp)

| | | | |
|-----------------|-------|-------|----------|
| Ön denatürasyon | 95 °C | 5 dk | 36 Döngü |
| Denatürasyon | 95 °C | 30 sn | |
| Primer bağlanma | 57 °C | 30 sn | |
| Uzama | 72 °C | 1 dk | |
| Son Uzama | 72 °C | 5 dk | |

3.8.2. ADAMTS-1 için izlenen PCR programı (72 bp)

| | | | |
|-----------------|-------|-------|----------|
| Ön denatürasyon | 95 °C | 5 dk | |
| Denatürasyon | 95 °C | 30 sn | 36 Döngü |
| Primer bağlanma | 61 °C | 30 sn | |
| Uzama | 72 °C | 1 dk | |
| Son Uzama | 72 °C | 5 dk | |

3.8.3. ADAMTS-5 için izlenen PCR programı (182 bp):

| | | | |
|-----------------|-------|-------|----------|
| Ön denatürasyon | 95 °C | 5 dk | |
| Denatürasyon | 95 °C | 30 sn | 36 Döngü |
| Primer bağlanma | 57 °C | 30 sn | |
| Uzama | 72 °C | 1 dk | |
| Son Uzama | 72 °C | 5 dk | |

3.8.4. ADAMTS-9 için izlenen PCR programı (67 bp)

| | | | |
|-----------------|-------|-------|----------|
| Ön denatürasyon | 95 °C | 5 dk | |
| Denatürasyon | 95 °C | 30 sn | 36 Döngü |
| Primer bağlanma | 57 °C | 30 sn | |
| Uzama | 72 °C | 1 dk | |
| Son Uzama | 72 °C | 5 dk | |

3.9. Agaroz jel elektroforezi

Araştırdığımız gen bölgelerinin PCR ürünlerinin amplifiye olup olmadığını kontrol etmek için % 3'lük agaroz jelde PCR ürünleri yürütüldü. 100 mL 1XTAE (Tris/ Asetik Asit / EDTA) tamponunun içine 3 gr agaroz (Invitrogen kat no: 16500-100 g) konulur. Mikrodalga fırında agaroz iyice eriyinceye kadar tutulur. 2.5 µL etidyum bromür ilave edildikten sonra jel kalıba dökülerek 30 dk donmaya bırakılır. PCR ürünlerinden 5 µL alınarak 1 µL 6XLoading dye ile karıştırılıp kuyucuklara yüklenir. Jel, 110 V'de 15 dk yürütüldükten sonra UV transiliminatörde görüntülenir.

3.10. Jel ekstraksiyonu (QIAGEN, QIAquick Gel Extraction Kit)

Aşağıdaki aşamalar sırasıyla uygulandı:

1. Jel ekstraksiyonu yapılacak PCR ürünleri yeni hazırlanmış taze kalın taraklı jele 20 µL yüklenir.
2. Dimerlerin uzaklaşması için mümkün olan en uzun süre yürütülür.
3. Karanlık odada bantlara bakılır, hangisinin alınacağına karar verilir.

4. DNA bantları ince uçlu bir bistüri yardımıyla kesilir ya da bant kesici (extractor) yardımıyla dikkatlice alınır.
5. Kesilen jel parçası tartılıp ependorf tüpe aktarılır. Örneğin;
1 Jel 40 mg = 40 µL hesabına göre kaç kuyucuk kesildi ise 2 ya da 3 oranda 2x40, 3x40 düşünülür.
6. 40xörnek sayısı kadar QG tamponu eklenir (QIAGEN). Çözünmezse QG tamponu 6 kat eklenir.
7. +50 °C de 10 dk inkübasyona bırakılır.
8. Jel parçaları tamamen eriyene kadar 2-3 dakikada bir vortex yapılır.
9. Jel parçaları eridikten sonra tamponun rengi sarı olmalı, eğer turuncu ya da mor renk oluşursa renk sarı olana kadar 10 µL 3M sodyum asetat eklenir.
10. Süpernatant mor kapaklı spin kolona aktarılır ve 13.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilir.
11. Alttaki toplama tüpü boşaltılıp tekrar takılır.
12. İçindeki alkolün tamamen uzaklaşması için boş olarak tekrar santrifüj yapılır.
13. Spin kolon yeni ependorf tüpe oturtulur. Toplama tüpleri atılır.
14. 30 µL EB Buffer (QIAGEN) eklenir. 4 dk oda sıcaklığında bekletilir.
15. 13,000 rpm'de 1 dk santrifüjlenir. DNA bir sonraki deney için kullanıma hazır hale gelmiştir. Elution Buffer blank yapıp spektrofotometrede okutulur.

3.11. Real-time PCR

3.11.1. Real-time PCR için standartların hazırlanması

β-actin, ADAMTS-1, ADAMTS-5 ve ADAMTS-9 için gradyent PCR yapıldıktan sonra, çalıştıkları sıcaklıklarda normal PCR yapılır. Daha sonra %3'lük agoroz jelde yürütülür. Jelden DNA ekstrakte edilerek protokole göre miktarları spektrofotometrede okunur. Elde edilen DNA miktarı önce 100 pg olacak şekilde PCR-grade su (nuclease-free) ile seyreltilir. Diğer standartlar da bir önceki standarttan 10 kat seyreltilerek hazırlanır.

Örneğin; 4 ng DNA= 4000 pg → 40 x seyreltilir→100 pg

100 pg 10'ar kat seyreltilerek sırası ile şu konsantrasyonlarda DNA elde edilir: 100 pg → 10 pg → 1 pg → 0.1 pg → 0.01 pg → 0.001 pg → 0.0001 pg

Tablo 2. Real-time PCR reaksiyonunda kullanılan primer çiftleri ve sırası.

| Çalışılan gen | | Primer çiftlerinin baz sırası (5'3') | Ürün uzunluğu (bp) |
|---------------|---------|---|--------------------|
| β-aktin (115) | Forward | TTCCTGGGCATGGAGTCCT | 19 |
| | Reverse | AGGAGGAGCAATGATCTTGATC | 22 |
| ADAMTS-1 | Forward | GGACAGGTGCAAGCTCATCTG | 21 |
| | Reverse | TCTACAACCTTGGGCTGCAA | 21 |
| ADAMTS-5 | Forward | TATGACAAGTGCGGAGTATG | 20 |
| | Reverse | TTCAGGGCTAAATAGGCAGT | 20 |
| ADAMTS-9 | Forward | GTTGCAACCCTGCGAGTAT | 19 |
| | Reverse | TTCCACAGGTCAGTACTGAGCA | 20 |

3.11.2. SYBR Green (QIAGEN, QuantiTect) hazırlanması

Real-time PCR’da kullanılacak olan SYBR Green ışığa duyarlı olduğundan miks karanlık bir ortamda hazırlandı. Filtreli pipet ucu kullanıldı ve buzda çalışıldı. Örnekler için miks hazırlanırken (örnek sayısı + negatif kontrol + 1) adet olacak şekilde hazırlandı.

| Solusyon | Miktar |
|--------------------------------------|---------|
| Primer (forward) | 0.5 µL |
| Primer (reverse) | 0.5 µL |
| cDNA | 2.5 µL |
| Syber Green Master mix | 12.5 µL |
| PCR grade distile su (nuclease-free) | 9 µL |
| TOPLAM | 25 µL |

3.11.3. Real-time PCR koşulları ve çalıştırılması

Real-time PCR için aşağıdaki kurallar belirlenerek uygulandı:

1. Hold basamağında 95 °C’de 15 dakika seçilir.
2. Cycle basamağında primerlerimizin ve DNA bölgemizin optimizasyonuna göre denaturation (94 °C, 15"), annealing (55 °C, 30") ve extention (72 °C, 30") değerleri belirlenir.
3. Melting basamağında genellikle 72-95 °C arası sıcaklık seçilir ama amplifiye olan bölge kısa ise 65-95 °C olarak sıcaklık ayarlanır.
4. Döngü sayısı 35-45 arası bir değer seçilir.
5. OK tuşuna basılır.

Üç ayrı tabakta yapılan hücre kültüründen elde edilen bütün RNA’ların reverse transkripsiyonu ile üretilen cDNA’dan bu aşamada ADAMTS-1, -5 ve -9’un primerleri ve Taq polimeraz kullanılarak PCR amplifikasyonu yapıldı ve bunlar rakamsal olarak ifade edildi. Sonuçlar aynı aşamaların uygulandığı houskeeping gen

olan β -aktin ile normalize edildikten sonra gerçek rakamsal değerlere ulaşıldı. Hesaplama da kullanılabacak formül ADAMTS-1, -5 veya -9 / β -aktin olup kontrol grubunun değeri 1 olarak kabul edildikten sonra sonuçlar kontrol değerine bölünerek nihai rakamlara ulaşıldı. Sonuçlar kısmında verilecek olan bar grafiklerdeki değerler elde edilen bu son değerlerdir.

3.12. Dene ylerde kullanılan cihazlar:

Sanyo CO₂ Incubator (MCO-18AIC, Japan), Biosafety cabinet Class II, Hettich Rotina 380R santrifüj (Germany), Leica DM IL LED DFC 295 invert mikroskop (Germany), Memmert Benmari WNB-14 (Germany), Nüve Bench Top santrifüj (Turkey), Himac Microcentrifuge CT 15RE (Japan), Nüve Steamart Katı ve sıvı otoklav (OT23B, OT40I)(Turkey), Nve etv FN 400 (Turkey), Shimadzu AUW220D Hassas terazi (Japan), Herolab UV transluminator (Germany), VWR International Vortex (Germany), Sanyo -80 deepfreezer (MDF-U7386S, U5386S)(Japan), Scotsman AF80 Buz makinesi (IL, USA), VWR Galaxy Ministar spin arttırıcı (Korea), Thermo Scientific OWL EASYCAST™ B2 Jel elektroforez sistemi (USA), Techne TC-3000X PCR cihazı (normal PCR)(USA), Techne TC-5000 PCR cihazı (Gradient PCR)(USA), Shimadzu UV-Pharmaspec 1700 spektrofotometre (Japan), Shimadzu Biotech Biospec-nano spektrofotometre (Japan), Qiagen Rotor-Gene Q RT-PCR cihazı (Germany), Thermo Scientific Barnstead Easypure II ultra saf su cihazı (USA), Techne Dri-Block DB-2D heatblock (UK), Heidolph Promax 1020 shaker (Germany), Consort EV265 elektroforez g kaynağı (Belgium), Cleaver Scientific MSCHOICE elektroforez tankı, Mikrodalga fırını SAMSUNG MV71E (Korea), VWR advanced VMS-C7 manyetik karıştırıcı (Korea)

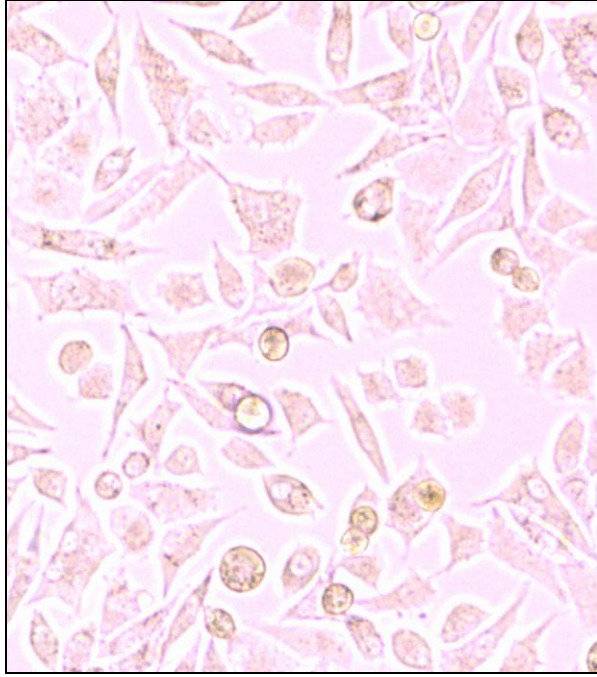
3.13. İstatistiksel analizler

ADAMTS genlerinin ekspresyonlarına ait veriler, sonuçlar kısmında grafik olarak yer aldı. Grafiklerdeki veriler bar ve bar çubukları şeklinde ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi. Gruplarda yer alan deney sayısının az olması nedeniyle istatistiksel analizlerde nonparametrik test kullanıldı. Değişkenler arası ilişki Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi. Tüm verilerin istatistiksel analizi SPSS 16.0 programı kullanılarak yapıldı.

4. SONUÇLAR

4.1. OUMS-27 hücre kültürü

OUMS-27 hücrelerinin kültürü başarılı bir şekilde yapıldı. Hücre pasajları düzenli olarak yapıldı ve yeniden ekim gerçekleştirildi. Deneyler süresince hücrelerde herhangi bir kontaminasyon görülmedi (Resim 1).



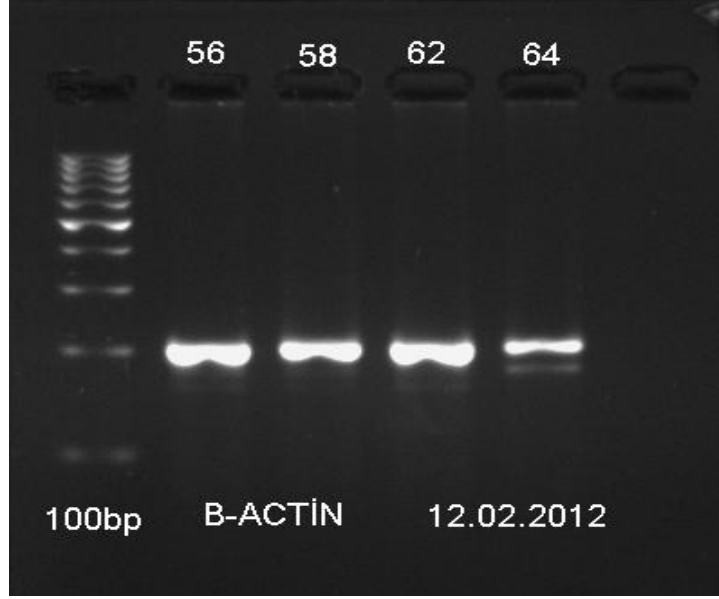
Resim 1. OUMS-27 hücrelerinin petri tabağında iken çekilen görüntüsü. Klasik poligonal kondrosit hücreleri.

4.2. Agaroz jel elektroforezi

Real-time PCR deneylerine başlamadan önce, takip edilecek koşulların optimize edilebilmesi amacı ile bir dizi ön hazırlık deneyi yapıldı. Bu deneyler kapsamında, klasik PCR ile yürütülen ADAMTS-1, -5 ve -9 genleri'nin cDNA'dan uygun primerler kullanılarak elde edilen ürünlerinin agaroz jelde yapılan standart bir yürütme sonucunda UV altında çekilen resimler aşağıda görülmektedir.

4.2.1. β -aktin gradyent PCR elektroforez sonucu

β -aktin bantları, standart DNA yürütmesi ile karşılaştırıldığında 204 bp uzunluğunu karşılayacak şekilde elde edildi. Optimize sıcaklığın 56-64 °C arasında herhangi bir sıcaklık olduğuna karar verildi.



Resim 2. β -aktin'in gradyent PCR sonucunda elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.

4.2.2. ADAMTS-1 gradyent PCR elektroforez sonucu

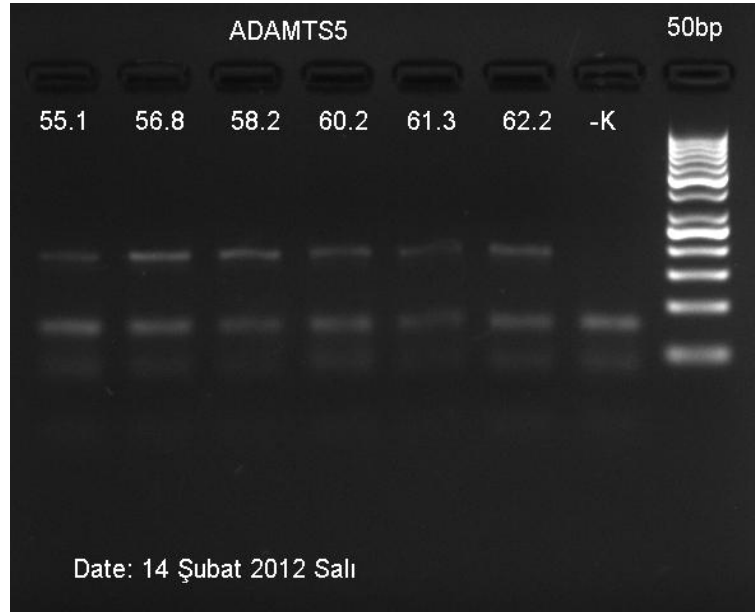
ADAMTS-1 bantları, standart DNA yürütmesi ile karşılaştırıldığında 72 bp uzunluğunu karşılayacak şekilde elde edildi. Optimize sıcaklığın 61 °C olduğuna karar verildi.



Resim 3. ADAMTS-1'in gradyent PCR sonucunda elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.

4.2.3. ADAMTS-5 gradyent PCR elektroforez sonucu

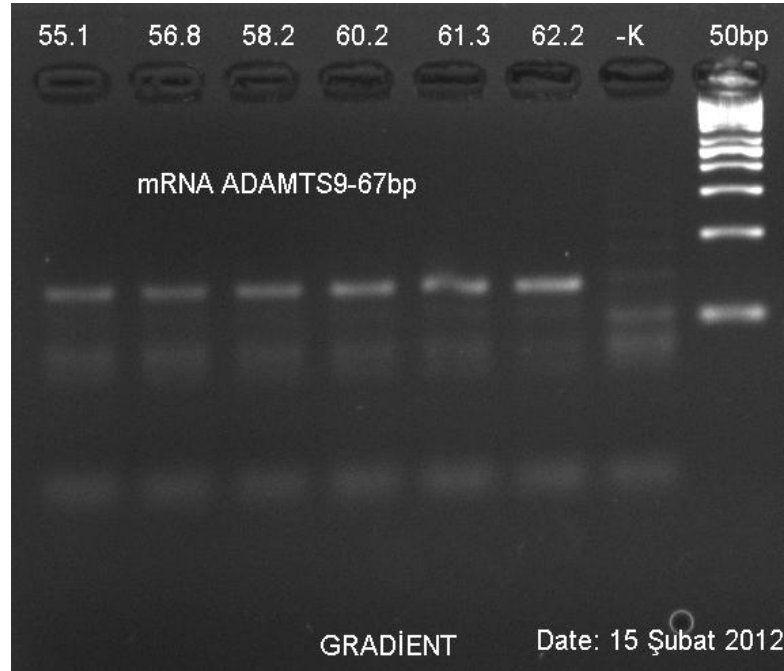
ADAMTS-5 bantları, standart DNA yürütmesi ile karşılaştırıldığında 182 bp uzunluğunu karşılayacak şekilde elde edildi. Optimize sıcaklığın 57 °C olduğuna karar verildi.



Resim 4. ADAMTS-5'in gradyent PCR sonucunda elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.

4.2.4. ADAMTS-9 gradyent PCR elektroforez sonucu

ADAMTS-9 bantları, standart DNA yürütmesi ile karşılaştırıldığında 67 bp uzunluğunu karşılayacak şekilde elde edildi. Optimize sıcaklığın 57 °C olduğuna karar verildi.

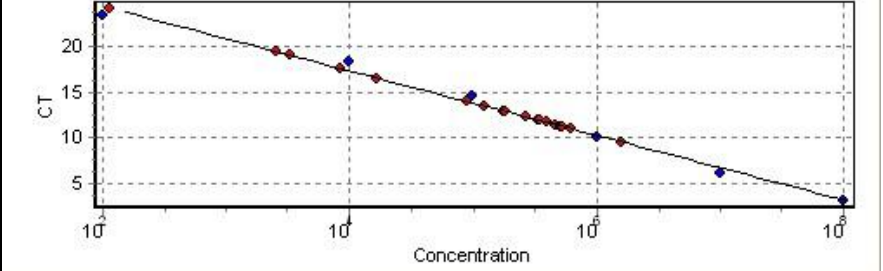


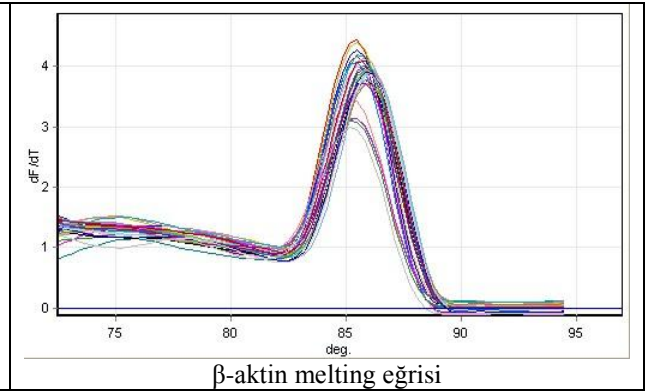
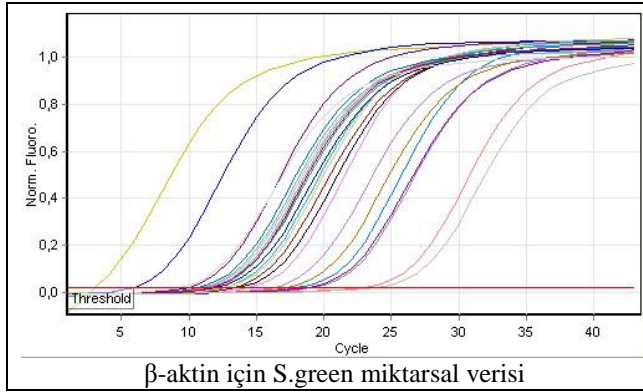
Resim 5. ADAMTS-9'un gradyent PCR sonucunda elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.

4.3. Real-time PCR deneylerinin ortam koşulları ve melting eğri sonuçları

4.3.1. β -aktin için deney bilgisi, ortam şartları ve melting eğrisi sonuçları

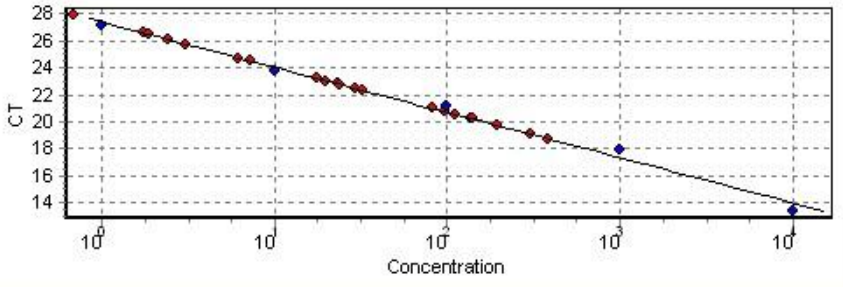
Real-time PCR cihazından β -aktin için standart eğrisi, DNA miktar verisi ve melting eğrisi aşağıdaki gibi elde edilmiştir.

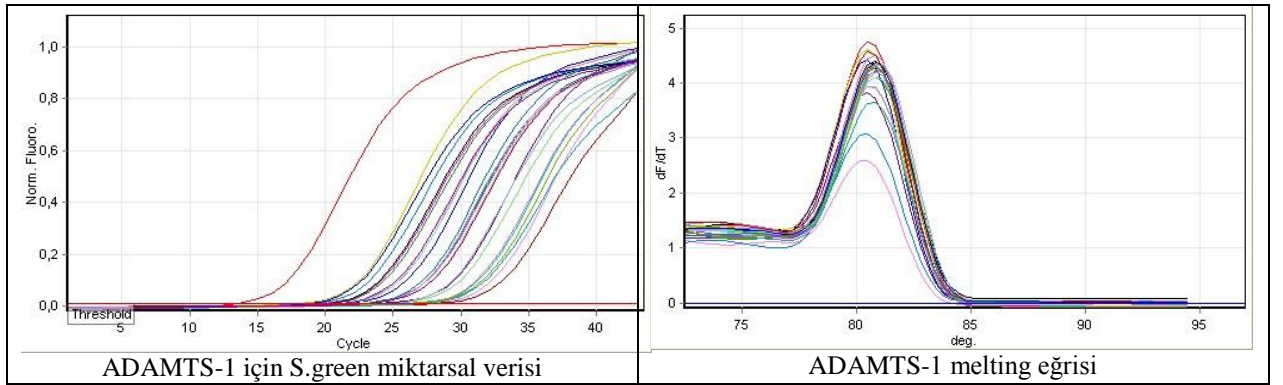
| | |
|-------------------------|---|
| Run Name | 14.05.2012 β -ACTIN 6h CAPE, CURC, RJ, IL, BAY |
| Run Start | 14.05.2012 11:08:30 |
| Run Finish | 14.05.2012 13:08:36 |
| Operator | β -ACTIN 55°C 38X |
| Notes | 14.05.2012 β -ACTIN 6h CAPE, CURC, RJ, IL, BAY |
| Run On Software Version | Rotor-Gene 2.0.2.4 |
| Run Signature | The Run Signature is valid. |
| Gain Green | 10 |
| Digital filter | Light |
| Temp. Threshold | 0°C |
| Standart eğrisi |  |



4.3.2. ADAMTS-1 için deney bilgisi, ortam şartları ve melting eğrisi sonuçları

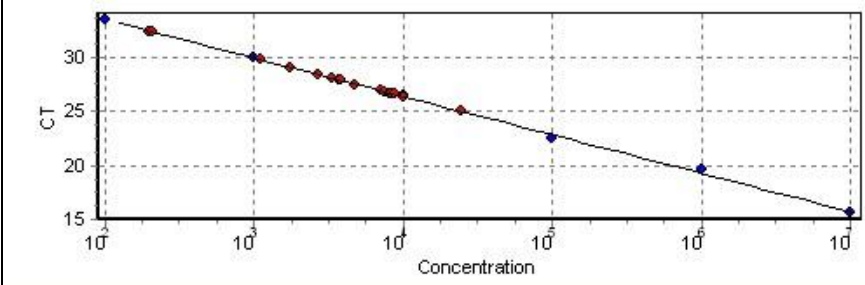
Real-time PCR cihazından ADAMTS-1 için standart eğrisi, DNA miktar verisi ve melting eğrisi aşağıdaki gibi elde edilmiştir.

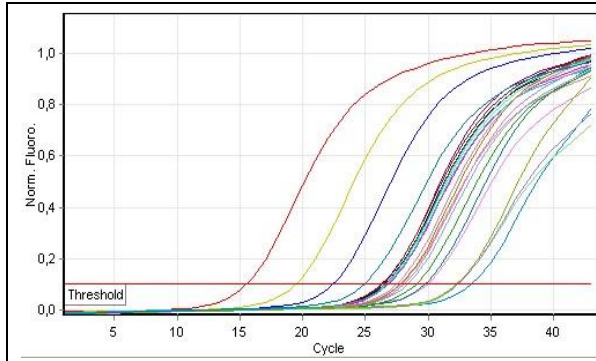
| | |
|-------------------------|---|
| Run Name | 14.05.2012 ADAMTS-1 6h CAPE, CURC, RJ, IL, BAY |
| Run Start | 14.05.2012 13:30:50 |
| Run Finish | 14.05.2012 15:26:59 |
| Operator | ADAMTS-1 59°C 38X |
| Notes | 14.05.2012 ADAMTS-1 6h CAPE, CURC, RJ, IL, BAY |
| Run On Software Version | Rotor-Gene 2.0.2.4 |
| Run Signature | The Run Signature is valid. |
| Gain Green | 10 |
| Digital filter | Light |
| Temp. Threshold | 0°C |
| Standart eğrisi |  |



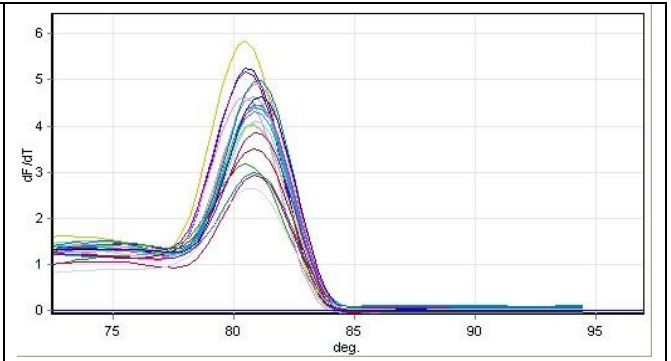
4.3.3. ADAMTS-5 için deney bilgisi, ortam şartları ve melting eğrisi sonuçları

Real-time PCR cihazından ADAMTS-5 için standart eğrisi, DNA miktarı verisi ve melting eğrisi aşağıdaki gibi elde edilmiştir.

| | |
|-------------------------|---|
| Run Name | 26.04.2012 ADAMTS-5 6h CAPE, CURC, RJ, IL, BAY |
| Run Start | 26.04.2012 11:22:31 |
| Run Finish | 26.04.2012 13:22:05 |
| Operator | ADAMTS-5 59°C 38X |
| Notes | 26.04.2012 ADAMTS-5 6h CAPE, CURC, RJ, IL, BAY |
| Run On Software Version | Rotor-Gene 2.0.2.4 |
| Run Signature | The Run Signature is valid. |
| Gain Green | 10 |
| Digital filter | Light |
| Temp. Threshold | 0°C |
| Standart eğrisi |  |



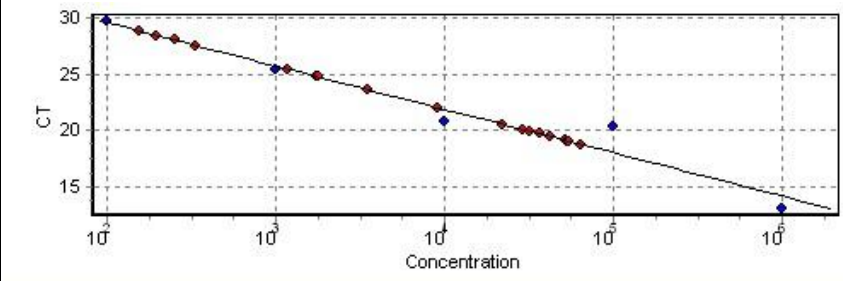
ADAMTS-5 için S.green miktarı verisi

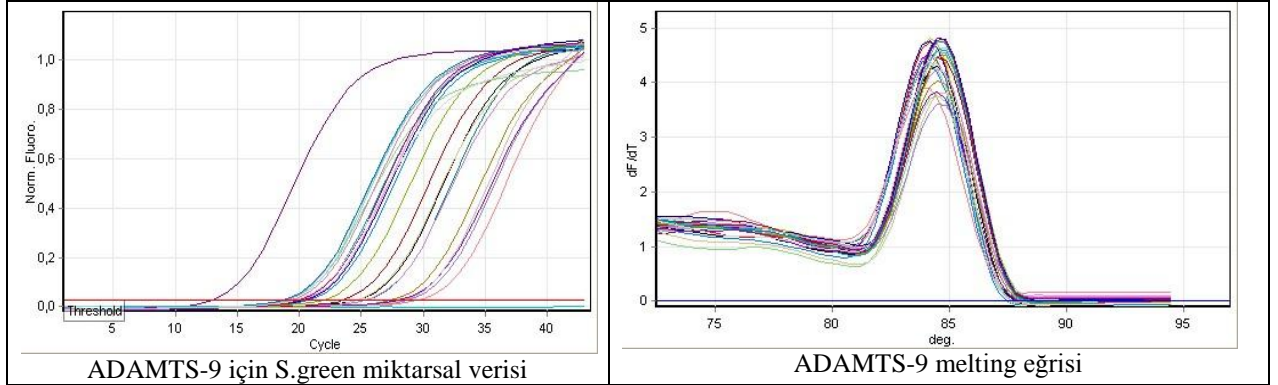


ADAMTS-5 melting eğrisi

4.3.4. ADAMTS-9 için deney bilgisi, ortam şartları ve melting eğrisi sonuçları

Real-time PCR cihazından ADAMTS-9 için standart eğrisi, DNA miktar verisi ve melting eğrisi aşağıdaki gibi elde edilmiştir.

| | |
|-------------------------|---|
| Run Name | 2012-05-11 ADAMTS-9 6h CAPE, CURC, RJ, IL, BAY |
| Run Start | 11.05.2012 14:35:49 |
| Run Finish | 11.05.2012 16:35:23 |
| Operator | ADAMTS-9 59°C 38X |
| Notes | 11.05.2012 ADAMTS-9 6h CAPE, CURC, RJ, IL,BAY |
| Run On Software Version | Rotor-Gene 2.0.2.4 |
| Run Signature | The Run Signature is valid. |
| Gain Green | 10 |
| Digital filter | Light |
| Temp. Threshold | 0°C |
| Standart eğrisi |  |

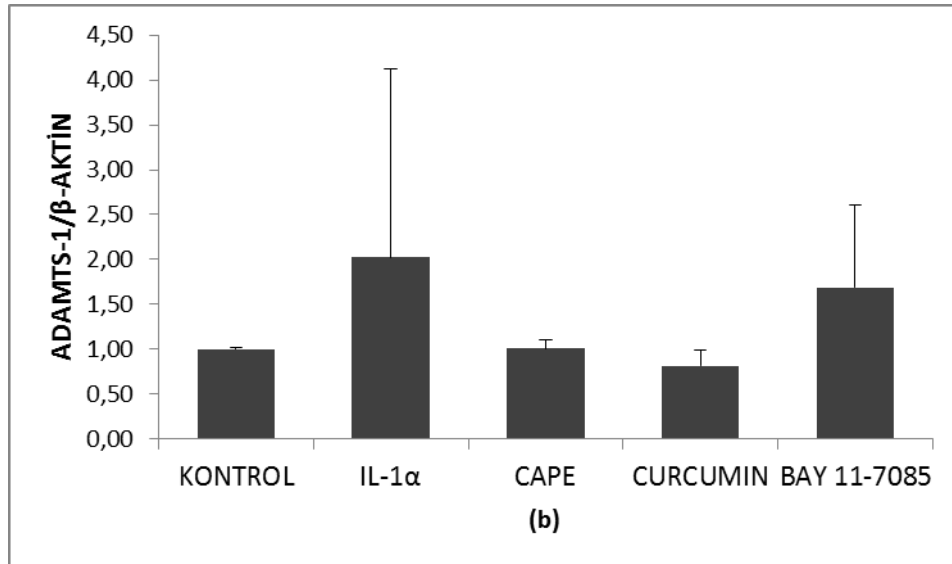
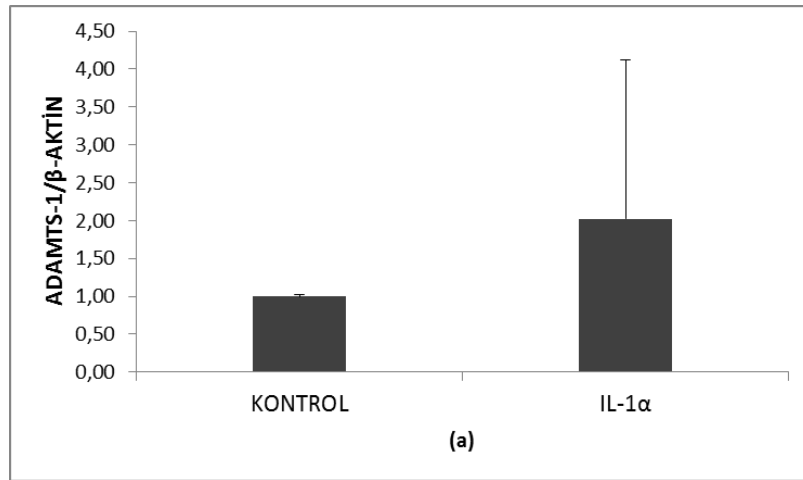


4.4. OUMS-27 hücrelerinde ADAMTS genlerinin ekspresyonu

Şekillerde verilen ADAMTS-1/ β -AKTİN oranı, ng/ μ L olarak elde edilen PCR sonu DNA konsantrasyonu önce β -aktin PCR sonu DNA konsantrasyonu sonucuna bölünerek elde edildi. Deneye göre en az üç kuyucuk olmak üzere elde edilen bu değerlerin ortalaması alındı. Kontrol hücrelerinden elde edilen ortalama değer 1 olarak kabul edildi ve inhibitör olarak kullanılan bütün madde deneylerinin sonuçları kontrol değerine bölünerek yeni değerler elde edildi. Grafikte Y eksenini olarak verilen oran bu şekilde elde edilen nihai orandır.

4.4.1. OUMS-27 hücrelerinde ADAMTS-1 geninin ekspresyonu

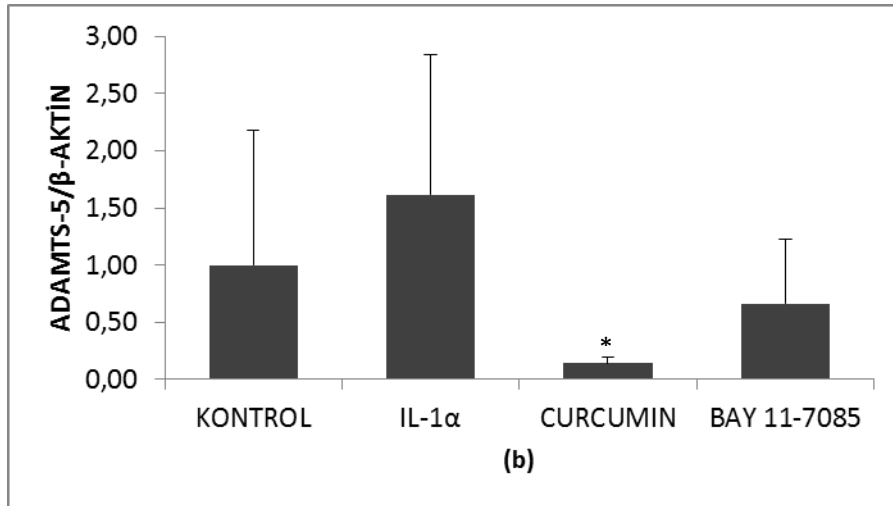
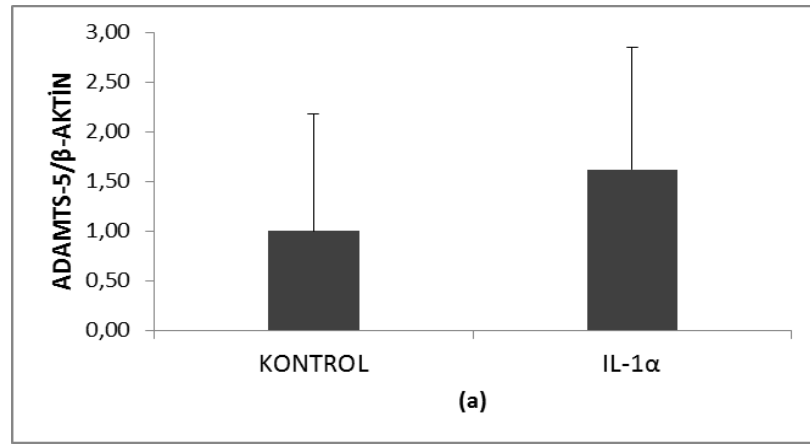
IL-1 α ile muamele edilen OUMS-27 hücreleri ile hiçbir şey verilmeyen kontrol OUMS-27 hücreleri karşılaştırıldığında, IL-1 α 'in ADAMTS-1 geninin ekspresyonunu yaklaşık %100 oranında arttırdığı tespit edildi. CAPE ve kurkumin, IL-1 α ile indüklenen ADAMTS-1 ekspresyonunu yaklaşık olarak kontrol hücrelerinin değerine kadar düşürürken BAY 11-7085'in etkisi ilk iki bileşik kadar belirgin değildi. Ortalamalar arasında farklılıklar olsa da gruptaki deney sayısının az olması nedeni ile sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.



Şekil 6. IL-1 α ile indüklenen OUMS-27 hücrelerinde ADAMTS-1 genlerinin ekspresyonu. (a) IL-1 α verildikten sonra hücrelerdeki ADAMTS-1 geninin ekspresyonundaki artış, hiçbir şey verilmeyen kontrol grubu hücrelerindeki ADAMTS-1 gen ekspresyonu ile karşılaştırılmıştır. (b) IL-1 α ile indüklenen OUMS-27 hücrelerinde ADAMTS-1 genlerinin ekspresyonu ve gen ekspresyonunu azaltma potansiyeline sahip CAPE, kurkumin ve BAY 11-7085 bileşiklerinin ADAMTS-1/β-AKTİN oranına etkisi.

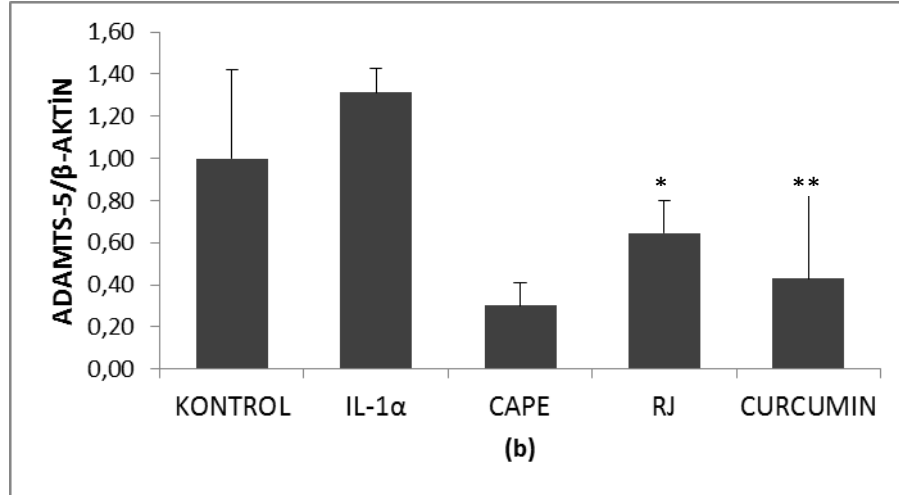
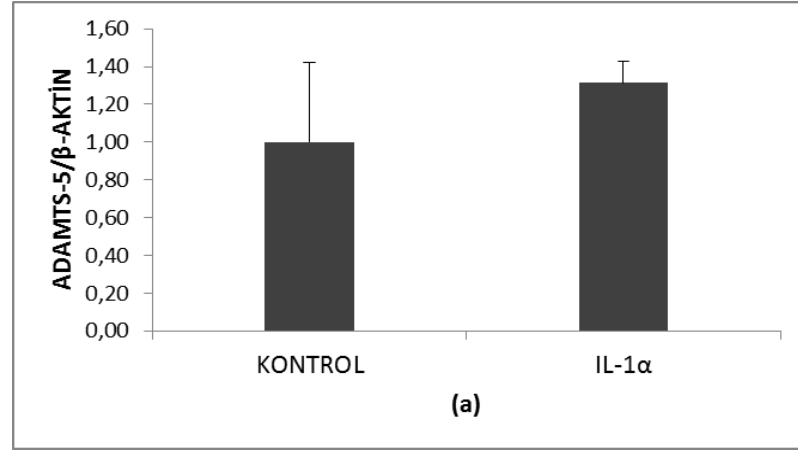
4.4.2. OUMS-27 hücrelerinde ADAMTS-5 geninin ekspresyonu

IL-1 α ile muamele edilen OUMS-27 hücreleri ile hiçbir şey verilmeyen kontrol OUMS-27 hücreleri karşılaştırıldığında, IL-1 α 'in ADAMTS-5 geninin ekspresyonunu yaklaşık %60 oranında arttırdığı tespit edildi. Kurkumin ve BAY 11-7085'in, IL-1 α ile indüklenen ADAMTS-5 ekspresyonunu kontrol hücrelerinin değerinden daha aşağı düzeylere indirdiği gözlemlendi. Ortalamalar arasında farklılıklar olsa da gruplardaki deney sayısının az olması nedeni ile kurkumin hariç (p=0.05, IL-1 α grubu ile karşılaştırıldığında) sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.



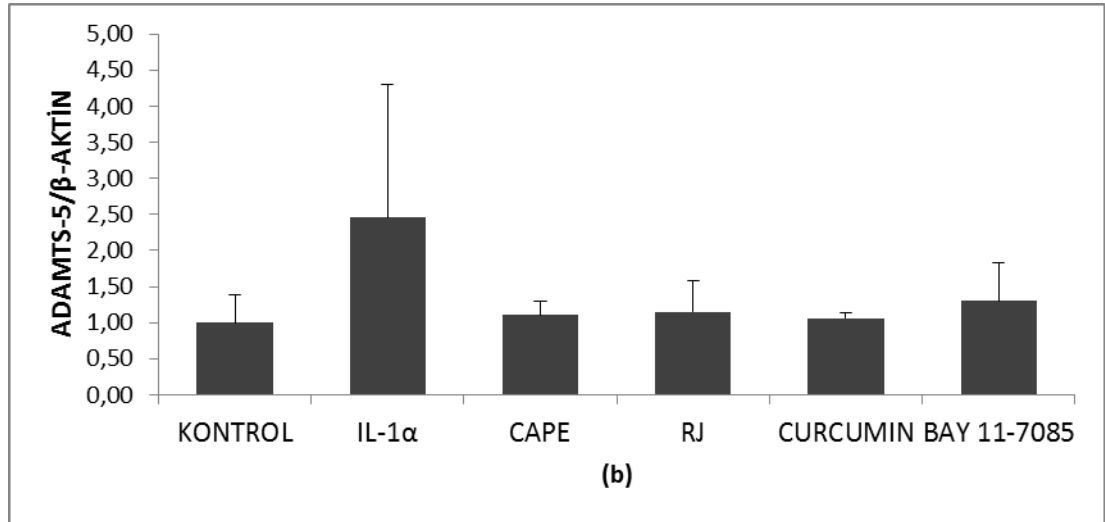
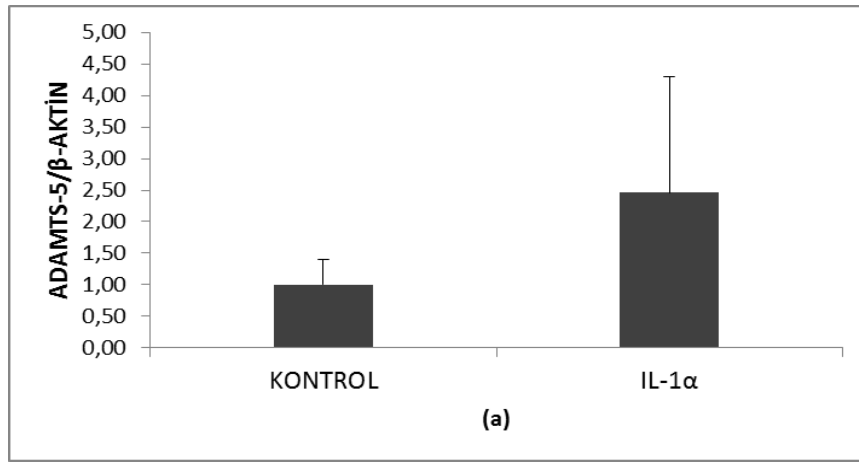
Şekil 7.1. IL-1 α ile indüklenen OUMS-27 hücrelerinde ADAMTS-5 genlerinin ekspresyonu -1. (a) IL-1 α verildikten sonra hücrelerdeki ADAMTS-5 geninin ekspresyonundaki artış, hiçbir şey verilmeyen kontrol grubu hücrelerindeki ADAMTS-5 gen ekspresyonu ile karşılaştırılmıştır. (b) IL-1 α ile indüklenen OUMS-27 hücrelerinde ADAMTS-5 genlerinin ekspresyonu ve gen ekspresyonunu azaltma potansiyeline sahip kurkumin ve BAY 11-7085 bileşiklerinin ADAMTS-5/β-AKTİN oranına etkisi. *p=0.05 (IL-1 α grubu ile karşılaştırıldığında)

İkinci olarak yapılan deneyde IL-1 α ile muamele edilen OUMS-27 hücreleri ile hiçbir şey verilmeyen kontrol OUMS-27 hücreleri karşılaştırıldığında, IL-1 α 'in ADAMTS-5 geninin ekspresyonunu yaklaşık %30 oranında arttırdığı tespit edildi. Bu artış, gruptaki n sayısının az olması nedeni ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. CAPE, RJ ve kurkumin'in, IL-1 α ile indüklenen ADAMTS-5 ekspresyonunu kontrol hücrelerinin değerinden daha aşağı düzeylere indirdiği gözlemlendi. Bunlardan RJ ve kurkuminin etkisi istatistiksel olarak anlamlı idi (sırasıyla p=0.025 ve p=0.050, IL-1 α grubu ile karşılaştırıldığında). CAPE ile muamele edilen hücrelerde ekspresyondaki azalma diğer gruplara göre daha belirgin olduğu halde, n=2 olması nedeni ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.



Şekil 7.2. IL-1 α ile indüklenen OUMS-27 hücrelerinde ADAMTS-5 genlerinin ekspresyonu -2. (a) IL-1 α verildikten sonra hücrelerdeki ADAMTS-5 geninin ekspresyonundaki artış, hiçbir şey verilmeyen kontrol grubu hücrelerindeki ADAMTS-5 gen ekspresyonu ile karşılaştırılmıştır. (b) IL-1 α ile indüklenen OUMS-27 hücrelerinde ADAMTS-5 genlerinin ekspresyonu ve gen ekspresyonunu azaltma potansiyeline sahip CAPE, kurkumin ve RJ bileşiklerinin ADAMTS-5/β-AKTİN oranına etkisi. *p=0.025, **p=0.050 (IL-1 α grubu ile karşılaştırıldığında).

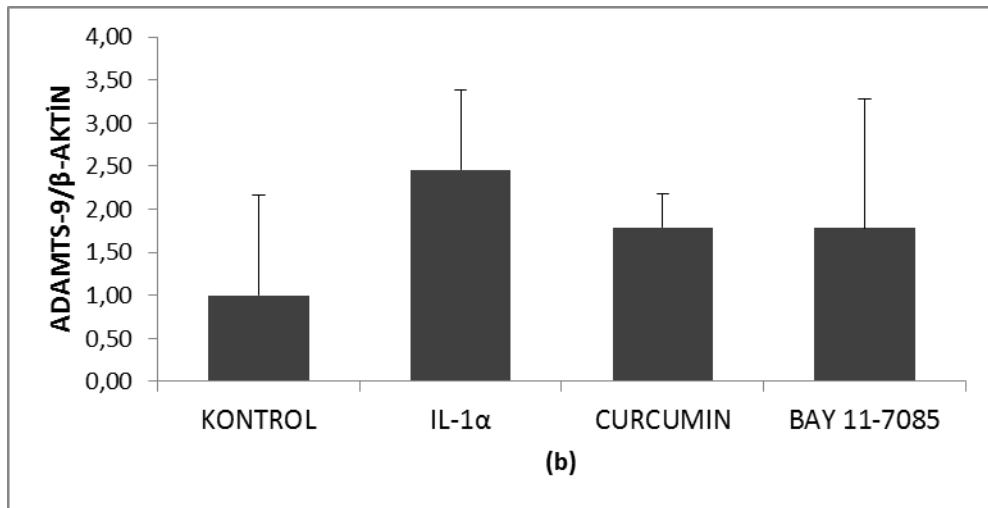
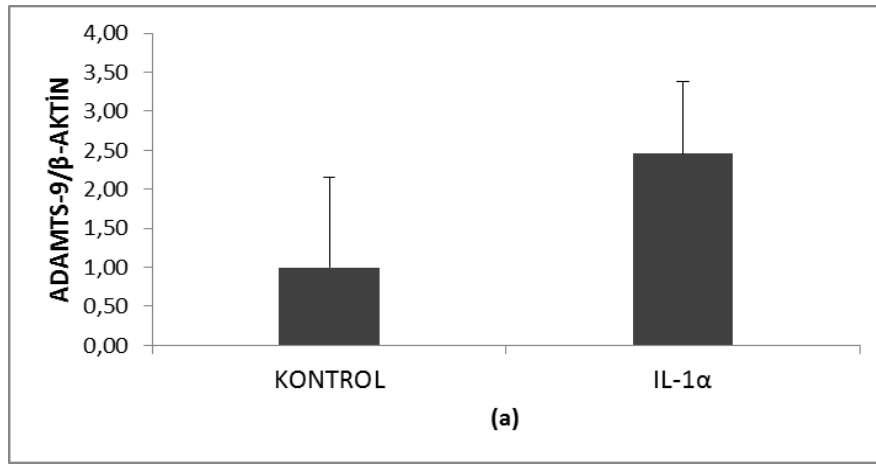
En son yapılan üçüncü deneyde IL-1 α ile muamele edilen OUMS-27 hücreleri ile hiçbir şey verilmeyen kontrol OUMS-27 hücreleri karşılaştırıldığında, IL-1 α 'in ADAMTS-5 geninin ekspresyonunu ilk iki denemeye kıyasla çok daha etkin bir şekilde (yaklaşık % 140 oranında) arttırdığı tespit edildi. CAPE, RJ, kurkumin ve BAY 11-7085'in, IL-1 α ile indüklenen ADAMTS-5 ekspresyonunu kontrol hücrelerinin değerine yakın değerlere indirdiği tespit edildi. Ortalamalar arasında farklılıklar olsa da gruplardaki deney sayısının az olması ve özellikle IL-1 α grubunun standart sapmasının fazla olması nedeni ile sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.



Şekil 7.3. IL-1 α ile indüklenen OUMS-27 hücrelerinde ADAMTS-5 genlerinin ekspresyonu -3. (a) IL-1 α verildikten sonra hücrelerdeki ADAMTS-5 geninin ekspresyonundaki artış, hiçbir şey verilmeyen kontrol grubu hücrelerindeki ADAMTS-5 gen ekspresyonu ile karşılaştırılmıştır. (b) IL-1 α ile indüklenen OUMS-27 hücrelerinde ADAMTS-5 genlerinin ekspresyonu ve gen ekspresyonunu azaltma potansiyeline sahip CAPE, kurkumin, RJ ve BAY 11-7085 bileşiklerinin ADAMTS-5/β-AKTİN oranına etkisi.

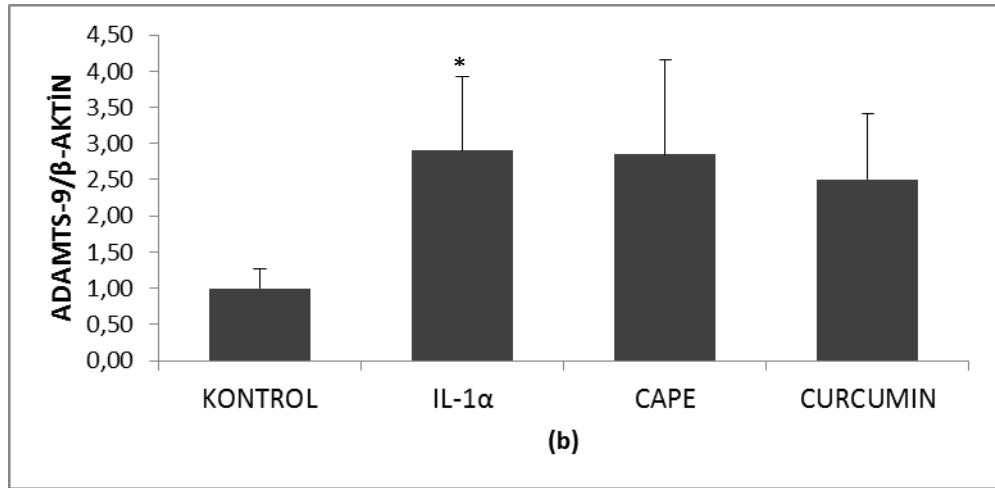
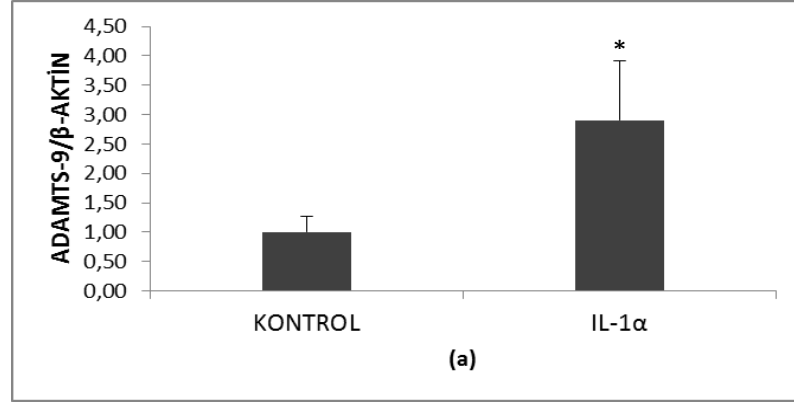
4.4.3. OUMS-27 hücrelerinde ADAMTS-9 geninin ekspresyonu

IL-1 α ile muamele edilen OUMS-27 hücreleri ile hiçbir şey verilmeyen kontrol OUMS-27 hücreleri karşılaştırıldığında, IL-1 α 'nın ADAMTS-9 geninin ekspresyonunu yaklaşık % 140 oranında arttırdığı tespit edildi. Gruplardaki deney sayısının az olması nedeni ile bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. Kurkumin ve BAY 11-7085'in, IL-1 α ile indüklenen ADAMTS-9 ekspresyonunu kontrol hücrelerinin değerine yakın değerlere indirdiği gözlemlendi. Bu düşüşler istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.



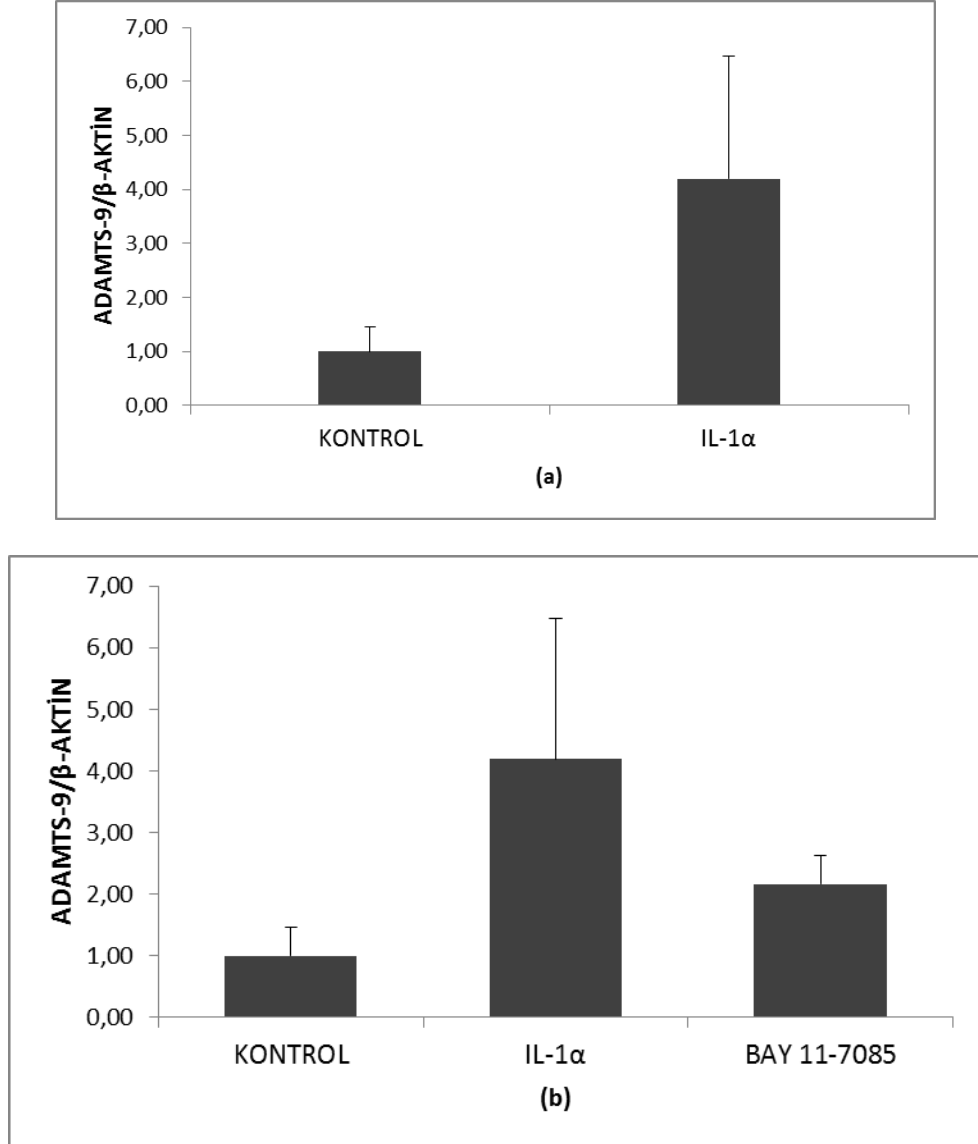
Şekil 8.1. IL-1 α ile indüklenen OUMS-27 hücrelerinde ADAMTS-9 genlerinin ekspresyonu -1. (a) IL-1 α verildikten sonra hücrelerdeki ADAMTS-9 geninin ekspresyonundaki artış, hiçbir şey verilmeyen kontrol grubu hücrelerindeki ADAMTS-9 gen ekspresyonu ile karşılaştırılmıştır. (b) IL-1 α ile indüklenen OUMS-27 hücrelerinde ADAMTS-9 genlerinin ekspresyonu ve gen ekspresyonunu azaltma potansiyeline sahip kurkumin ve BAY 11-7085 bileşiklerinin ADAMTS-9/β-AKTİN oranına etkisi.

İkinci deneyde IL-1 α ile muamele edilen OUMS-27 hücreleri ile hiçbir şey verilmeyen kontrol OUMS-27 hücreleri karşılaştırıldığında, IL-1 α 'in ADAMTS-9 geninin ekspresyonunu ilk denemeye kıyasla çok daha etkin bir şekilde (yaklaşık % 190 oranında) arttırdığı tespit edildi (Kontrol grubu ile kıyaslandığında p=0.024). Bu denemede ekspresyonda biraz azalma gözlenirse de CAPE ve kurkumin'in, IL-1 α ile indüklenen ADAMTS-9 ekspresyonunu çok fazla değiştirmedikleri gözlemlendi.



Şekil 8.2. IL-1 α ile indüklenen OUMS-27 hücrelerinde ADAMTS-9 genlerinin ekspresyonu -2. (a) IL-1 α verildikten sonra hücrelerdeki ADAMTS-9 geninin ekspresyonundaki artış, hiçbir şey verilmeyen kontrol grubu hücrelerindeki ADAMTS-9 gen ekspresyonu ile karşılaştırılmıştır. (b) IL-1 α ile indüklenen OUMS-27 hücrelerinde ADAMTS-9 genlerinin ekspresyonu ve gen ekspresyonunu azaltma potansiyeline sahip CAPE ve kurkumin bileşiklerinin ADAMTS-9/β-AKTİN oranına etkisi. *p=0.024 (kontrol grubu ile kıyaslandığında)

Üçüncü deneyde IL-1 α ile muamele edilen OUMS-27 hücreleri ile hiçbir şey verilmeyen kontrol OUMS-27 hücreleri karşılaştırıldığında, IL-1 α 'in ADAMTS-9 geninin ekspresyonunu ilk iki denemeye kıyasla çok daha etkin bir şekilde (yaklaşık % 300) oranında arttırdığı tespit edildi (p=0.083). BAY 11-7080'in, IL-1 α ile indüklenen ADAMTS-9 ekspresyonunu yarı yarıya azalttığı ancak kontrol hücrelerinin ekspresyon düzeyine indirmediği gözlemlendi.



Şekil 8.3. IL-1 α ile indüklenen OUMS-27 hücrelerinde ADAMTS-9 genlerinin ekspresyonu -3. (a) IL-1 α verildikten sonra hücrelerdeki ADAMTS-9 geninin ekspresyonundaki artış, hiçbir şey verilmeyen kontrol grubu hücrelerindeki ADAMT-9 gen ekspresyonu ile karşılaştırılmıştır. (b) IL-1 α ile indüklenen OUMS-27 hücrelerinde ADAMTS-9 genlerinin ekspresyonu ve gen ekspresyonunu azaltma potansiyeline sahip BAY 11-7085 bileşiğinin ADAMTS-9/β-AKTİN oranına etkisi.

5. TARTIŞMA

OA'in tıbbi tedavisi hakkında Amerikan Romatoloji Cemiyeti tarafından 2000 yılında bazı tavsiyeler yayınlanmıştır (116). Bu raporun içinde ağrı kontrolü, hayat kalitesinin yükseltilmesi, tedavilerin yan etkilerinden kaçınılması dâhil olmak üzere birçok konu tartışılmış ancak farmakolojik olmayan tıbbi bitkisel ürünlerle tedaviye ait herhangi bir atıfta bulunulmamıştır. Tıbbi bitkisel ürünler birkaç nedenle bütün dünyada çok yaygın olarak kullanılmaktadır: geleneksel tedavilerden tatmin olmamak, alternatif tedavilere olan yaygın inanç, geleneksel tedavilerin muhtemel yan etkileri, kişinin kendi sağlığına kendi yöntemleri ve düşüncesine göre sahip çıkması. Bu ürünlerin tedavi ile ilgili masraflarının sağlık sigorta sistemleri tarafından karşılanmaması veya sayılı ülkede karşılanması, bu tip tedavi girişimlerinin önündeki en büyük engellerden birisidir. Buna rağmen, tıbbi bitkisel ürünlerin etkinliği NSAIDs ve analjeziklerin etkilerinden daha geniş bir yelpazeye sahiptir ve bu konuda klinik verilerde bir şüphe bulunmamaktadır. Tam etki mekanizmaları kesin olarak bilinmese de bu bitkisel ürünlerin siklooksijenaz, lipooksijenaz, sitokin salgılanması, elastaz ve hyaluronidaz inhibisyonu, antioksidan aktivite ve daha başka yollar üzerinden etki gösterdiği iddia edilmiştir (117). Bazı hekimler geleneksel tedavinin dışına çıkmayıp alternatif tedavi metodları, özellikle de tıbbi bitkisel ürünler konusunda kuşkucu bir tavır ortaya koysa da orta yaşın üzerindeki OA hastalığı olan yetişkinlerde tamamlayıcı tıp kullanma oranı %45 civarındadır. Bunların yaklaşık %17'sini reçete edilmeyen tıbbi bitkisel ürünler ve diğer bazı bileşikler oluşturmaktadır (118). Yapılan randomize klinik bir çalışmada, alternatif tedaviler için hasta başına harcanan para bir yılda 1127 dolar, geleneksel tedaviler için ise 1148 dolar olarak hesaplanmıştır (119). Bu miktar alternatif tedavilere azımsanmayacak düzeyde bir yöneliş olduğunu göstermektedir.

Bu tezde bilinen 19 adet ADAMTS geninden sadece ADAMTS-1, -5 ve -9'un çalışılmasının sebebi, Tablo 1'de de görüldüğü gibi bu genin ürünü olan proteinlerin proteaz aktivitesi ile agrekanı parçalayabilme kabiliyetidir. Bunların dışında agrekan molekülünü parçalayabilecek diğer bazı ADAMTS enzimleri olsa da, ADAMTS türlerinden agrekanaz aktivitesi en çok araştırılan ve hakkında en iyi veriler elde edilen ADAMTS genleri 1, 5 ve 9 tipleridir. Çalışmada elde edilen veriler grafik haline getirildiğinde dikkat çekici en önemli sonuç, çalışılan 3 adet agrekanaz

özelliikli enzimnin geninin IL-1 α verilmesi ile indüksiyon gerçekteştir. Şekil 6, 7.1, 7.2, 7.3, 8.1, 8.2 ve 8.3'te (a) olarak verilen ilk grafiklerde IL-1 α ile indüklenen OUMS-27 hücrelerinde çalışılan ADAMTS genlerinin ekspresyonunda değişen oranlarda artışlar meydana gelmiştir. ADAMTS/ β -AKTİN oranı göz önüne alındığında, IL-1 α verildikten sonra ADAMTS-1 gen ekspresyonunda 2 katlık bir artış gözlenmiştir. Üç farklı zamanda üç farklı deney sonucu olarak elde edilen verilere göre ADAMTS-5 gen ekspresyonunda IL-1 α verildikten sonra sırasıyla 1.6 kat, 1.3 kat ve 2.7 katlık bir artış gerçekteştir. Aynı deney şartları ADAMTS-9 için sağlandığında IL-1 α verilmesi üzerine üç farklı deneyde ADAMTS-9 gen ekspresyonunda 2.5 kat, 2.9 kat ve 4.2 katlık artış tespit edilmiştir. Yapılan analizlerde bu artışlardan bazılarının istatistiksel olarak anlamsız çıkması, yapılan deneme sayısının (n) az olmasıdır. Bu ekspresyon artışını geri çevirmek amacıyla kullandığımız NF- κ B inhibisyonu yapan maddeler farklı oranlarda gen ekspresyonundaki bu artışları engelledi. ADAMTS-1 geninin ekspresyonunu en başarılı şekilde tekrar kontrol grubu düzeylerine döndüren madde kurkumin olarak bulundu. Bunu sırasıyla CAPE ve BAY 11-7085 molekülleri takip etti. ADAMTS-5 geninin ekspresyonunda da IL-1 α indüksiyonunu en başarılı şekilde geri döndüren molekülün kurkumin olduğu tespit edildi. Bunu sırasıyla CAPE, RJ ve BAY 11-7085 maddesi takip etti. ADAMTS-9 geninin ekspresyonu incelendiğinde verilen maddelerin ilk iki gen ekspresyonunda olduğu kadar başarılı olamadığı görüldü. Burada ekspresyonu inhibe edici en başarılı madde BAY 11-7085 olarak tespit edildi. Bunu kurkumin ve CAPE izledi. ADAMTS ekspresyonundaki belirgin azalmalara rağmen bazı deneylerde ortalamaların farkının istatistiksel olarak anlamsız çıkmasının nedeni deneme sayısının (n) az olmasıdır.

Agrakanaz aktivitesi olan altı adet ADAMTS'tan (ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9, -15) hangisi/hangilerinin insan kıkırdağında bulunan agrekanın yıkımından primer sorumlu olduğu hep merak konusu olmuştur. İmmortalize kondrosit hücrelerinde yapılan bir çalışmada agrekanazlardan ADAMTS-1, -5, -9 ve -15'in eksprese olduğu ve enflamasyon sitokinleri ile upregüle edilebildiği gösterildi (120). Aynı çalışmada RNA interferansı yapılarak ADAMTS-5 ekspresyonunun miktarı azaltıldığında matriksin daha çok korunduğu gözlemlendi. Sonuç olarak kıkırdak matriksi ile ilgili doku mühendisliği çalışmalarında agrekanaz ekspresyonunun seçici olarak azaltılmasının daha iyi sonuç verebileceğini ve ADAMTS-5'in artrit hastalığının

tedavisinde önemli bir hedef olabileceğini iddia etmişlerdir. Demircan ve arkadaşları OUMS-27 kondrosarkom hücrelerinde ve insan kondrositlerinde agrekanazlardan ADAMTS-1, ADAMTS-4, ADAMTS-5, ADAMTS-8, ADAMTS-9, ADAMTS-15'in IL-1 β ve TNF- α indüksiyonuna nasıl cevap verdiklerini, en çok hangi agrekanazın ekspresyonunun arttığını araştırdılar (112). İndüksiyondan sonra total RNA ve ardından reverse transkriptaz ile cDNA elde edilmiş, kantitatif Real-time PCR ve Northern blotting yöntemi ile örnekler analiz edilmiştir. IL-1 β 'nin ADAMTS-4, ADAMTS-5 ve ADAMTS-9'un mRNA düzeylerini arttırdığını, buna karşılık ADAMTS-1 mRNA düzeylerini azalttığını ve ADAMTS-8'in mRNA düzeylerinde bir değişiklik oluşturmadığını bulmuşlardır. Stimulasyon üzerine kondrositlerdeki ADAMTS-9 mRNA'sının üretimi fibroblastlardan daha yüksek bulunmuştur. IL-1 β ve TNF- α 'nın birlikte indüksiyon amaçlı olarak kullanılması ADAMTS-9 mRNA'sının ekspresyonu bakımından sinerjistik bir etki oluşturmuştur. Bunlarla bağlantılı olarak protein üretiminin de OUMS-27 hücrelerinde arttığı bulunmuştur. MAPK inhibitörlerinden SB203580 ve PD98059, OUMS-27 hücrelerinde ADAMTS-9 upregülasyonunu azaltmıştır. Bütün bu bulgulardan hareketle araştırmacılar ADAMTS-9 gibi hem agrekan hem de kırkırdaktaki diğer moleküller üzerinde yıkıcı özellikleri bulunan agrekanazın, artrit patolojisinde bir rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bizim deney düzeneğimiz de son olarak yapılan protein analizi hariç olmak üzere yukarıdaki çalışmaya çok benzemektedir. Çalışmamızda hücreleri uyarmak amacıyla proenflamatuvar sitokin molekülü olarak IL-1 α kullandık. ADAMTS-1, -5 ve -9'un ekspresyonu, bu indüksiyon üzerine artmış, kullandığımız potansiyel inhibitör maddeler de değişen oranlarda bu artışı durdurucu veya yavaşlatıcı etki göstermiştir.

Çalışmamızın orijinal yönlerinden birisi, deneylerimizde OUMS-27 hücrelerinin sitokin olarak IL-1 α ile indüklenmesidir. Bizim çalışmamıza benzer daha önceden yapılmış araştırmalarda IL-1 α kullanılsa da (121) daha çok IL-1 β kullanılmıştır (112, 113, 122). Sonuçlarımız diğer çalışmaların sonuçlarıyla kıyaslandığında, IL-1 α 'nın da IL-1 β gibi gen ekspresyonunu yeterli düzeyde arttırdığı söylenebilir. IL-1 α 'nın indüksiyon amaçlı olarak kullanıldığı bir çalışmada kondrositlerde ADAMTS-4 mRNA'sının ekspresyonu ve protein miktarı artmış, aynı zamanda bu sitokin tarafından stimüle edilen agrekanaz aktivitesi HA2700 isimli inhibitör maddenin veya siRNA'nın kullanılması ile azaltılmıştır (123). Literatürde

TNF- α 'nın hücreleri stimüle etmek için kullanıldığı çalışmalar da vardır. Hatipoğlu ve arkadaşları çalışmalarında COS-7 hücrelerini TNF- α ile stimüle ettiklerinde ADAMTS-1 mRNA'sının ekspresyonunun hızla arttığını, artışın stimülasyonun başladığı andan ancak 6 saat sonra olduğunu, bu pik artış döneminden sonra ekspresyonda azalma olduğunu tespit etti (124). 3'-UTR ADAMTS-1 mRNA'sının birçok adenin ve üridinden zengin element içermesi bu 3'UTR kısmının gen stabilitesini regüle edebileceği ihtimalini ortaya koymuştur.

ADAMTS-9'un gen ekspresyonunun hangi yollar üzerinden regüle edildiğini bulmak üzere, insan ADAMTS-9'un 3kb'lık promotör kısmının klonlanarak özelliklerinin tanımlandığı bir çalışmada, sekans analizi sonucuna göre aktive T hücrelerinin nükleer faktörü için bir bağlanma noktasının varlığı bulundu. Bu noktanın hem ADAMTS-4 hem de ADAMTS-5 promotörlerinde sık görülen bir nokta olduğu belirlendi (113).

Son yapılan çalışmalarda ADAMTS-5'in fare kıkırdığında bulunan majör agrekanaz olduğunun bulunması büyük bir sürpriz olarak karşılanmıştır. Bir çalışmada ADAMTS-5'in aktivasyonunun proteazlarla etkileşim yoluyla ve MMP-3'ün MAPK-bağlantılı sentezinin regüle edilmesi yolu ile sindekan-4 tarafından kontrol edildiği gösterilerek OA'de kıkırdak yıkımının ADAMTS-5'i kontrol eden sindekan-4'ün inhibisyonu ile tedavide başarı sağlanacağı iddia edildi (104). Bu konu son yapılan bir derleme makalesinde de etraflıca ele alınmıştır (125). Daha önceleri ADAMS-4'ün de agrekanaz aktivitesi gösterdiğini ispatlamaya yönelik çalışmalar vardı. ADAMTS-5'ten yoksun fareler deneysel artrit modellerinde kıkırdak yıkımından korunurken aynı şey ADAMTS-4'ten yoksun fareler için söylenememektedir (126). Nitekim IL- α ile indüklenen kondrosarkom hücrelerinde ADAMTS-5 ciddi anlamda aktive olmuş ve ilk defa kullandığımız CAPE, kurkumin ve RJ maddeleri ile baskılanmıştır.

CAPE'nin OA'te meydana gelen kıkırdak yıkımının engellenmesinde koruyucu bir rolünün olup olmadığı konusunda sınırlı sayıda araştırma vardır. Deneysel OA modelinin oluşturuldu bir çalışmada tavşanların eklem içi sıvılarına 150 μ g/kg CAPE enjeksiyonu yapılarak *in vivo* koruyucu etkisi araştırılmış, CAPE'nin hem kıkırdak bozunmasını azalttığı, hem de matriks proteoglikanlarının kaybını önlediği histolojik ve biyokimyasal olarak gösterilmiştir (34). LT inhibisyonunun astma, ateroskleroz ve RA gibi enflamasyonla seyreden hastalıklarda

koruyucu etkisinin olacağı tezinden hareketle araştışıcılar CAPE'nin bu prostaglandin yolağına etkisini araştışmışlar, CAPE'nin 5-LO aktivitesi üzerinden LT sentezini ve ayrıca araşıdonik asit serbestleşmesini engelleyerek enflamasyon aracılarını kontrol altına aldığını, dolayısıyla artrit semptomlarının önlenmesinde rolü olabileceğini iddia etmişlerdir (38). Bir alışmada CAPE'nin makrofaj (NR833) ve kolon epitel hücrelerindeki (SW620) *in vitro* sitokin üretimi, NF-κB ve apoptosis etkilerinin yanında peptidoglikan-polisakkarit ile oluşturulmuş kolitte, bunu engelleyici etkisi araştırılmıştır (127). CAPE 30 µg/mL konsantrasyonda makrofajlardan NF-κB ve TNF-α üretimini inhibe etmiş, kolon epitel hücrelerinde de benzer etkiler göstermiş, kolon hasarını kaba bir inceleme ile farkedilecek düzeyde azaltmış, kolon sitokin düzeylerini azaltmıştır.

RJ'nin dejeneratif romatizmal hastalıklarda kullanılabileceği iddiası ilk olarak bundan 55 yıl önce ortaya atılmıştır (128). Bu tarihten sonra uzun süre konu hakkında herhangi bir hücrenel, deneysel veya klinik çalışma yapılmamıştır. İlk alışma RAFSs hücrelerinde RJ'nin aktif bileşenlerinden birisi olan 10H2DA'nın MMP'ler üzerine etki ederek eklem hasarını önleyip önleyemeyeceği konusu üzerine yapılmıştır (55). Çalışmanın sonucunda 10H2DA'nın p38 kinaz ve c-jun-N-terminal kinaz-AP-1 sinyal yolağının baskılanması üzerinden MMP'lerin etkinliğini azalttığı, dolayısıyla RJ'nin RA eklem hasarının önlenmesinde fonksiyonunu olabileceği iddia edilmiştir. Bir diğer çalışmada RJ'nin sitokin düzeyinde antienflamatuvar etkisi araştırılmış, RJ'nin aktive olmuş makrofajlardan proenflamatuvar sitokinlerin üretimini inhibe ederek antienflamatuvar etki gösterdiği bulunmuştur (129). RJ'nin enflamasyonla ilgili çok az sayıda araştışmada koruyucu olarak kullanıldığı anlaşılmaktadır. Bu bakımdan çalışmamız, RJ'nin OA patogenezinin aydınlatılması ve tedavide bir rolünün olup olmayacağının belirlenmesi konularında yapılmış ilk araştırma özelliği taşımaktadır. Çalışmamızda RJ'nin IL-1α ile indüklenmiş OUMS-27 kondrosarkom hücrelerinde ADAMTS-5 ekspresyonunu azalttığı, agrekanaz aktivitesindeki kısmi azalmaya bağlı olarak kıkırdak yıkımını kısmen önleyebileceği gösterilmiştir.

CL bitkisinin köklerinde iki ana madde grubu olup bunlardan kurkuminoidler iyi çalışılmış madde grubudur fakat esansiyel yapılar henüz çok iyi çalışılmamıştır. Araştışıcılar turmerik esansiyel yağlarını hayvan RA modellerinde denemişler, streptokok hücre duvarı ile indüklenen artiritte dişi ratlarda eklem şişliğini % 90-100

oranında azalttığını bulmuşlardır. Bu sonuçlara Real-time PCR yapıldıktan sonra ulaşılmıştır. RNA eklemlerin özel bir yerinden alınan kıkırdaktan izole edilmiştir. Eşit miktarda 3 adet artritli olmayan eklemden, 3 adet artritli ve tedavi grubu eklemlerinden alınarak bunlar karıştırılmış, tek bir numune gibi işlem görmüş ve mRNA ekspresyonu bu yolla araştırılmıştır. Bu uygulamada ekstraktlar maksimum etkiyi elde etmek için intraperitoneal olarak verilmiştir. Bu artrit engelleyici etkinin morbidite ve mortalite oranında ciddi bir azalma ile birlikte olduğu bulunmuştur. Uygulanan dozun 20 katı oral olarak verildiğinde bu turmerik esansiyel yağlarının toksik olmadığı fakat eklemleri % 20 civarında koruduğu bulunmuştur (130).

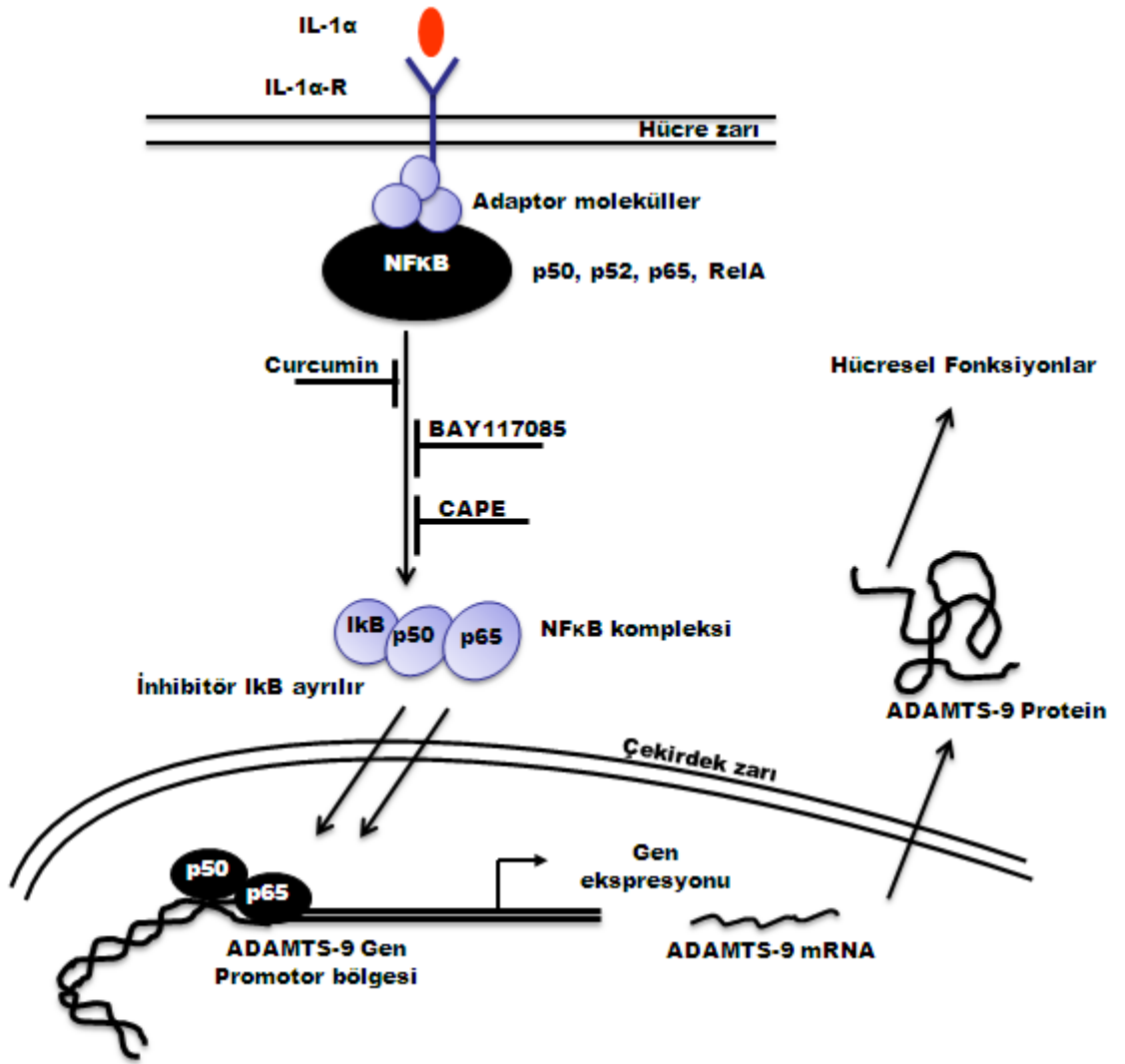
Kurkumin, enflamasyon esnasında lenfositlerin fonksiyonel olarak etkilenmeleri ve buna bağlı olarak yürüyen diğer olaylara karşı arzulanan immun cevabın koordine-regüle edilmesinde hedef bir molekül olabilir (131). Araştırmacılar, kurkuminin artrit önleyici etkisinin moleküler mekanizmalarının tam bilinmemesi nedeni ile kurkuminin çok iyi tanımlanmış ekstraktlarını kullanarak RA hayvan modeli kullanarak araştırma yapmışlardır (132). Bu amaçla önce HPLC ile ticari turmerikin kompozisyonu belirlenmiş, Streptokok hücre duvarı ile oluşturulan bir artrit modelinde ratlara elde edilen bu ekstrakt intraperitoneal olarak verilmiş eklem şişliğini önleme ve eklemdaki hasarı önleme etkinliği klinik, histolojik ve kemik mineral dansitesi ölçüm yöntemleri ile tespit edilmiştir. Etki mekanizmasını da ortaya çıkarmak için turmerikin eklem transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, eklem gen ekspresyonunun mikroarray analizi ve gen ekspresyonundaki değişimlerin fizyolojik etkilerinin doğrulamaları araştırmacılar tarafından yapıldı. Yapılan moleküler testler: RNA izolasyonu, eklem gen ekspresyonunun mikroarray analizi, Real-time PCR, histoloji, kemik mineral dansitesi, artritli eklemden NF- κ B'nin aktivasyonu, sitokin ve kemokin üretimleri, artritli eklemden PGE2 üretimi şeklinde sıralanmıştır. Çalışmanın sonunda elde edilen veriler, esansiyel yağlardan arındırılmış kurkumin ekstraktının doza bağımlı bir şekilde eklem enflamasyonunu ve kıkırdak etrafındaki eklem hasarını azalttığını göstermiştir. *In vivo* uygulama NF- κ B'nin lokal aktivasyonunu ve ardışık olarak meydana gelen ve eklem enflamasyonu ile hasarı yöneten NF- κ B ile regüle edilen genlerin ekspresyonunu (kemokinler, COX-2 ve RANKL) önlemiştir. Bu bulgulara ek olarak ve uyumlu olarak enflamatuar hücre invazyonu, eklemden prostaglandin E2 düzeyi ve kıkırdak etrafındaki osteoklast formasyonu da turmerik ekstrakt muamelesi ile azaltılmıştır (132).

Bir derleme makalesinde yazarlar kurkuminin eklem dokularındaki biyolojik etkilerini, etkinin tipini esas olarak şu şekilde özetlemişlerdir: Hücre canlılığı: Sinovial sıvı yapışkan hücrelerinin canlılığını azaltır, zamana bağlı bir şekilde IL-1 β ile indüklenen kaspaz-3 aktivasyonunu antagonize eder. Antioksidan etkiler: *İn vitro* olarak reaktif oksijen ve azot bileşiklerini yok eder, sığır ve insan kondrositleri ile insan kıkırdak eksplantlarında IL-1 β ile indüklenen NO üretimini inhibe eder, sığır kondrosit hücrelerinde IL-1 β ile indüklenen süperoksit dismutaz aktivitesini inhibe eder. Antienflamatuvar etkiler: Kondrositlerde NF- κ B'nin bağımlı gen transkripsiyonunu inhibe eder, IL-1 β ile muamele edilen sığır kondrositlerinde COX-2 gen ekspresyonunu inhibe eder, sığır ve insan kondrositlerinde IL-6 ve IL-8 gen ekspresyonunu inhibe eder, insan kondrositleri ve kıkırdak eksplantları tarafından IL-6, IL-8 ve PGE2 üretimini inhibe eder. Antikatabolik etkileri: Köpek ve insan OA'li kıkırdak eksplantlarından IL-1 β indüksiyonu ile salgılanan glikozaminoglikanların salgılanmasını inhibe eder, insan kıkırdak eksplantlarındaki kondrositlerde MMP-3 sentezini azaltır, insan kondrositleri tarafından NF- κ B'nin aktivasyonunun ve nükleer translokasyonunun inhibisyonu yoluyla IL-1 β ve OSM ile indüklenen MMP-1, MMP-3, MMP-9 ve MMP-13 gen ekspresyonunu baskılar. Anabolik etkiler: İnsan kondrositleri tarafından agrekan üretimine etkisi yoktur, sığır kondrositlerinde proteoglikan mRNA ekspresyonunu azaltır, insan kondrositlerinde IL-1 β ile indüklenen tip II kollajen ve β 1-integrin gen ekspresyonunun inhibisyonunu kaldırır (133).

Araştırmacılar bir çalışmalarında sekiz adet atın metakarpofalangeal ve metatarsofalangeal eklemlerinden elde ettikleri normal eklem kıkırdağında OA'de görülene benzer bir enflamasyon olayını taklit etmek için bir eksplant modeli geliştirdiler. Başlangıçta proenflamatuvar sitokin IL-1 β 'dan artan konsantrasyonlarda vererek kıkırdak hasarını stimüle ettiler. Diğer bir deney düzeneğinde de IL-1 β ile birlikte 10 ng/mL ve 25 ng/mL olmak üzere iki ayrı konsantrasyonda kurkumin verdiler. Deneyin başlangıcından 5 gün sonra eksplantlardan salgılanan glikozaminoglikanların yüzdesi dimetilmetilen mavisi ile kolorimetrik olarak ölçüldü. Kurkumin IL-1 β ile stimüle edilen GAG salgılanmasını anlamlı ölçüde azalttı (134).

Kurkumin ile ilgili olarak yukarıda verilen bilgilerle bizim OUMS-27 kondrosit hücrelerinde yaptığımız deneylerden elde ettiğimiz veriler örtüşmektedir.

Kurkumin Şekil 9’da detayları ile verilen NF- κ B yolağını etkin bir şekilde inhibe ederek daha sonradan OA’li kıkırdakta proteoliz yapacak ADAMTS genlerinin ekspresyonunu başlangıç aşamasında inhibe ederek kıkırdak dokusunu ilerleyici hasarlardan korumaktadır. Şekilde sadece ADAMTS-9 mekanizması tahmini olarak şematize edilmiştir. Ancak ADAMTS-1 ve ADAMTS-5’in agrekanaz aktivitesi ile gösterdiği davranış şekli buna tam bir uyum göstermektedir. Kurkumin her üç ADAMTS molekülünde de benzer bir etkinlik göstermiştir. BAY 11-7085’in NF- κ B inhibisyonu üzerinden ADAMTS genlerinin ekspresyonunu azalttığı daha önceki çalışmalarda gösterildiğinden (henüz yayımlanmamış veri, 2012) bu çalışmada bir kıyas amacı ile kullanılmıştır. Bu kıyaslamaya göre kurkumin daha etkin bir şekilde IL-1 α ile indüklenen ADAMTS geni ekspresyonunu azaltmaktadır. Antienflamatuvar, antioksidan ve antiproliferatif özellikleri olan CAPE de değişen oranlarda ADAMTS ekspresyonunda azalmalara yol açmıştır. RJ’nin de bir kısım etkisi tespit edilmiş olup diğer maddelerle kıyaslandığında daha az etkin olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 9. IL-1α verildikten sonra meydana gelmesi muhtemel olan olaylar ve bunların ADAMTS-9 için öngörülen mekanizmaları. Bu sitokin hücre zarındaki reseptörüne bağlandıktan sonra adaptör moleküller NF-κB'ye bağlanmaktadır. Herhangi bir inhibitörün olmadığı ortamlarda NF-κB'nin kompleksinde bulunan inhibitör özellikli IκB ayrılır. p50 ve p65 alt birimleri ortak hareket ederek ADAMTS-9 geninin promotör bölgesine bağlanır, bu da gen ekspresyonunun artışı ile sonuçlanır. Sentez edilen ADAMTS-9 mRNA'sı hücre çekirdek zarından dışarı çıkarak ribozomlarda translasyona uğrar, sentez edilen olgun ADAMTS-9 proteini hücresel fonksiyonlar gösterir. Dışarıya salgılanması ile birlikte agrekanaz aktivitesi gösteren bu enzim, proteolitik etkisi ile agrekanazı parçalayarak hem kıkırdak dokusu hem de sinovial sıvıda hasarlar oluşturur. Kurkumin, BAY ve CAPE gibi NF-κB inhibe edici moleküller, NF-κB yolğunun sonraki aşamalarını engelleyerek kaskadın ilerleyen aşamalarında ADAMTS-9 proteinin sentezini kontrol altına alır.

6. YORUM

- I. OUMS-27 kondrosarkom hücreleri ile yapılan bu deneyde IL-1 α ile ADAMTS-1, -5 ve -9'un ekspresyonları başarılı bir şekilde indüklendiği ilk kez gösterildi.
- II. Bu artışlar, uygun primerlerin kullanılması ile konvansiyonel PCR ile ön çalışmaları ve uygun koşulları belirlendikten sonra Real-time PCR ile gösterildi.
- III. Daha önce yapılan çalışmalarda NF- κ B inhibisyonu yaparak birçok hastalıkta etkilerinin olduğu gösterilmiş kurkumin, CAPE ve RJ maddelerinin özellikle ADAMTS-5 başta olmak üzere ADAMTS-1 ve ADAMTS-9 genlerinin ekspresyonunu azalttığı ilk kez tespit edildi.
- IV. Tüm destek dokularında olduğu gibi kıkırdak dokusunda da bulunan yapısal agrekan molekülünü parçalayarak eklemde hasar oluşturma potansiyeli bulunan agrekanaz aktiviteli bu ADAMTS proteinleri, ekspresyon aşamasında kurkumin başta olmak üzere diğer inhibe edici maddelerle azaltıldı. Çalışmamızdan elde edilen veriler, kullandığımız bu ajanların değişen oranlarda etkinliği olduğunu gösterdi.
- V. OA patogenezinde önemli bir yer tutan NF- κ B yolağının kurkumin, CAPE ve RJ ile inhibe edilme potansiyelinin olması bu maddelerin alternatif olarak kullanılabilir aday moleküller olabileceğini göstermektedir.
- VI. Bu konuda yapılmış araştırmaların çok sınırlı sayıda olması, konu hakkında daha fazla yorum yapabilme ihtimalimizi azaltmaktadır.
- VII. Çalışmanın başında ileri sürdüğümüz hipotezin tam olarak ispatlanabilmesi için normal insan kondrosit hücreleri de dâhil olmak üzere farklı hücre serilerinde yapılacak daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu bağlamda şu anda laboratuvarımızda IL-1 α ile indüklenen kondrosit hücrelerinde ADAMTS-1, -5 ve -9'un protein analizleri devam etmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Fosang AJ, Beier F. Emerging Frontiers in cartilage and chondrocyte biology. *Best Pract Res Clin Rheum.* 2011;25(6):751-66.
2. Ivashkiv LB. Cytokine expression and cell activation in inflammatory arthritis. *Adv Immunol.* 1996;63:337-76.
3. Goldring MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2000;43(9):1916-26.
4. Stockwell RA. Chondrocytes. *J Anat.* 1975;119(Apr):395-6.
5. Marion NW, Mao JJ. Mesenchymal stem cells and tissue engineering. *Method Enzymol.* 2006;420:339-61.
6. Alhadlaq A, Mao JJ. Mesenchymal stem cells: Isolation and therapeutics. *Stem Cells Dev.* 2004;13(4):436-48.
7. Dominici M, Hofmann TJ, Horwitz EM. Bone marrow mesenchymal cells: biological properties and clinical applications. *J Biol Reg Homeos Ag.* 2001;15(1):28-37.
8. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: Nature, biology, and potential applications. *Stem Cells.* 2001;19(3):180-92.
9. Simkin PA. A biography of the chondrocyte. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(8):1064-8.
10. Stockwell RA. Morphometry of Cytoplasmic Components of Mammalian Articular Chondrocytes and Corneal Keratocytes - Species and Zonal Variations of Mitochondria in Relation to Nutrition. *J Anat.* 1991;175:251-61.
11. Frech TM, Clegg DO. The utility of nutraceuticals in the treatment of osteoarthritis. *Current rheumatology reports.* 2007;9(1):25-30.
12. Glass GG. Osteoarthritis. *Dm-Dis Mon.* 2006;52(9):343-62.
13. 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.
14. Sinkov V, Cymet T. Osteoarthritis: Understanding the pathophysiology, genetics, and treatments. *J Natl Med Assoc.* 2003;95(6):475-82.
15. Pitsillides AA, Beier F. Cartilage biology in osteoarthritis-lessons from developmental biology. *Nat Rev Rheumatol.* 2011;7(11):654-63.
16. Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Fahmi H. New insights into prostaglandin biology. *J Rheumatol.* 2004;31(1):14-6.
17. Neogi T, Niu JB, Arendt-Nielsen L, Scholz J, Frey-Law L, Woolf C, et al. Pressure Pain Threshold and Knee Pain in Osteoarthritis: The Multicenter Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum.* 2011;63(10):S636-S.
18. Kraus VB. Osteoarthritis year 2010 in review: biochemical markers. *Osteoarthr Cartilage.* 2011;19(4):346-53.
19. Kraus VB. Biomarkers in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2005;17(5):641-6.
20. Vlad SC, LaValley MP, McAlindon TE, Felson DT. Glucosamine for pain in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2007;56(7):2267-77.
21. Felson DT. Chondroitin for pain in osteoarthritis. *Ann Intern Med.* 2007;146(8):611-2.
22. Soeken KL, Lee WL, Bausell RB, Agelli M, Berman BM. Safety and efficacy of S-adenosylmethionine (SAME) for osteoarthritis - A meta-analysis. *J Fam Practice.* 2002;51(5):425-30.
23. Gaby AR. Natural treatments for osteoarthritis. *Altern Med Rev.* 1999;4(5):330-41.
24. Long L, Soeken K, Ernst E. Herbal medicines for the treatment of osteoarthritis: a systematic review. *Rheumatology.* 2001;40(7):779-93.
25. Rosenbaum CC, O'Mathuna DP, Chavez M, Shields K. Antioxidants and Antiinflammatory Dietary Supplements for Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis. *Altern Ther Health M.* 2010;16(2):32-40.

26. Cameron M, Gagnier JJ, Little CV, Parsons TJ, Blumle A, Chrubasik S. Evidence of Effectiveness of Herbal Medicinal Products in the Treatment of Arthritis Part 1: Osteoarthritis. *Phytother Res.* 2009;23(11):1497-515.
27. Cameron M, Gagnier JJ, Little CV, Parsons TJ, Blumle A, Chrubasik S. Evidence of Effectiveness of Herbal Medicinal Products in the Treatment of Arthritis Part 2: Rheumatoid Arthritis. *Phytother Res.* 2009;23(12):1647-62.
28. Fouladbakhsh J. Complementary and Alternative Modalities to Relieve Osteoarthritis Symptoms A review of the evidence on several therapies often used for osteoarthritis management (Reprinted from American Journal of Nursing, vol 112, pg S44-S51, 2012). *Orthop Nurs.* 2012;31(2):115-21.
29. Sudina GF, Mirzoeva OK, Pushkareva MA, Korshunova GA, Sumbatyan NV, Varfolomeev SD. Caffeic Acid Phenethyl Ester as a Lipoxigenase Inhibitor with Antioxidant Properties. *Febs Lett.* 1993;329(1-2):21-4.
30. Akyol S, Ginis Z, Armutcu F, Ozturk G, Ramazan Yigitoglu M, Akyol O. The potential usage of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) against chemotherapy-induced and radiotherapy-induced toxicity. *Cell biochemistry and function.* 2012. Epub 2012/03/21.
31. Cagli K, Bagci C, Gulec M, Cengiz B, Akyol O, Sari I, et al. In vivo effects of caffeic acid phenethyl ester on myocardial ischemia-reperfusion injury and apoptotic changes in rats. *Ann Clin Lab Sci.* 2005;35(4):440-8.
32. Koltuksuz U, Ozen S, Uz E, Aydinç M, Karaman A, Gultek A, et al. Caffeic acid phenethyl ester prevents intestinal reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg.* 1999;34(10):1458-62.
33. Irmak MK, Koltuksuz U, Kutlu NO, Yagmurca M, Ozyurt H, Karaman A, et al. The effect of caffeic acid phenethyl ester on ischemia-reperfusion injury in comparison with alpha-tocopherol in rat kidneys. *Urol Res.* 2001;29(3):190-3.
34. Elmali N, Avan I, Turkoz Y, Mizrak B, Germen B, Bora A. Effect of caffeic acid phenethyl ester on cartilage in experimental osteoarthritis. *Rheumatol Int.* 2002;22(6):222-6.
35. Rossi A, Ligresti A, Longo R, Russo A, Borrelli F, Sautebin L. The inhibitory effect of propolis and caffeic acid phenethyl ester on cyclooxygenase activity in J774 macrophages. *Phytomedicine.* 2002;9(6):530-5.
36. Borrelli F, Maffia P, Pinto L, Ianaro A, Russo A, Capasso F, et al. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia.* 2002;73:S53-S63.
37. Cardile V, Panico A, Gentile B, Borrelli F, Russo A. Effect of propolis on human cartilage and chondrocytes. *Life Sci.* 2003;73(8):1027-35.
38. Boudreau LH, Maillet J, LeBlanc LM, Jean-Francois J, Touaibia M, Flamand N, et al. Caffeic acid phenethyl ester and its amide analogue are potent inhibitors of leukotriene biosynthesis in human polymorphonuclear leukocytes. *Plos One.* 2012;7(2):e31833.
39. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernandez-Lopez J, Perez-Alvarez JA. Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly. *J Food Sci.* 2008;73(9):R117-R24.
40. Fiorani M, Accorsi A, Blasa M, Diamantini G, Piatti E. Flavonoids from Italian multifloral honeys reduce the extracellular ferricyanide in human red blood cells. *J Agr Food Chem.* 2006;54(21):8328-34.
41. Cherniack EP. Bugs as Drugs, Part 1: Insects. The "New" Alternative Medicine for the 21st Century? *Altern Med Rev.* 2010;15(2):124-35.
42. Nagai T, Nagashima T, Myoda T, Inoue R. Preparation and functional properties of extracts from bee bread. *Nahrung.* 2004;48(3):226-9.
43. Suzuki KM, Isohama Y, Maruyama H, Yamada Y, Narita Y, Ohta S, et al. Estrogenic activities of fatty acids and a sterol isolated from royal jelly. *Evid-Based Compl Alt.* 2008;5(3):295-302.
44. Miyata T. Pharmacological basis of traditional medicines and health supplements as curatives. *J Pharmacol Sci.* 2007;103(2):127-31.

45. Sver L, Orsolich N, Tadic Z, Njari B, Valpotic I, Basic I. A royal jelly as a new potential immunomodulator in rats and mice. *Comp Immunol Microb.* 1996;19(1):31-8.
46. Okamoto I, Taniguchi Y, Kunikata T, Kohno K, Iwaki K, Ikeda M, et al. Major royal jelly protein 3 modulates immune responses in vitro and in vivo. *Life Sci.* 2003;73(16):2029-45.
47. Miyata T. Novel Approach to Curatives of Mibyou (Presymptomatic Diseases). *Yakugaku Zasshi.* 2011;131(9):1289-98.
48. Takahama H, Shimazu T. Food-induced anaphylaxis caused by ingestion of royal jelly. *J Dermatol.* 2006;33(6):424-6.
49. Mannoor MK, Shimabukuro I, Tsukamotoa M, Watanabe H, Yamaguchi K, Sato Y. Honeybee royal jelly inhibits autoimmunity in SLE-prone NZB x NZW F1 mice. *Lupus.* 2009;18(1):44-52.
50. Fujii A, Kobayashi S, Kuboyama N, Furukawa Y, Kaneko Y, Ishihama S, et al. Augmentation of Wound-Healing by Royal Jelly (Rj) in Streptozotocin-Diabetic Rats. *Jpn J Pharmacol.* 1990;53(3):331-7.
51. Taniguchi Y, Kohno K, Inoue S, Koya-Miyata S, Okamoto I, Arai N, et al. Oral administration of royal jelly inhibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *International immunopharmacology.* 2003;3(9):1313-24.
52. Socransky SS, Smith C, Haffajee AD. Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2002;29(3):260-8.
53. Yanagita M, Kojima Y, Mori K, Yamada S, Murakami S. Osteoinductive and anti-inflammatory effect of royal jelly on periodontal ligament cells. *Biomed Res-Tokyo.* 2011;32(4):285-91.
54. Guerne PA, Zuraw BL, Vaughan JH, Carson DA, Lotz M. Synovium as a Source of Interleukin 6 In vitro - Contribution to Local and Systemic Manifestations of Arthritis. *J Clin Invest.* 1989;83(2):585-92.
55. Yang XY, Yang DS, Wei Z, Wang JM, Li CY, Ye H, et al. 10-Hydroxy-2-decenoic acid from Royal jelly: A potential medicine for RA. *J Ethnopharmacol.* 2010;128(2):314-21.
56. Pari L, Tewas D, Eckel J. Role of curcumin in health and disease. *Archives of physiology and biochemistry.* 2008;114(2):127-49.
57. Araujo CAC, Leon LL. Biological activities of *Curcuma longa* L. *Mem I Oswaldo Cruz.* 2001;96(5):723-8.
58. Sreejayan, Rao MNA. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J Pharm Pharmacol.* 1997;49(1):105-7.
59. Brouet I, Ohshima H. Curcumin, an Antitumor Promoter and Antiinflammatory Agent, Inhibits Induction of Nitric-Oxide Synthase in Activated Macrophages. *Biochem Bioph Res Co.* 1995;206(2):533-40.
60. Lantz RC, Chen GJ, Solyom AM, Jolad SD, Timmermann BN. The effect of turmeric extracts on inflammatory mediator production. *Phytomedicine.* 2005;12(6-7):445-52.
61. Gregory PJ, Sperry M, Wilson AF. Dietary supplements for osteoarthritis. *Am Fam Physician.* 2008;77(2):177-84.
62. Deodhar SD, Sethi R, Srimal RC. Preliminary-Study on Anti-Rheumatic Activity of Curcumin (Diferuloyl Methane). *Indian J Med Res.* 1980;71(Apr):632-4.
63. Singh G, Kapoor IPS, Singh P, de Heluani CS, de Lampasona MP, Catalan CAN. Comparative study of chemical composition and antioxidant activity of fresh and dry rhizomes of turmeric (*Curcuma longa* Linn.). *Food Chem Toxicol.* 2010;48(4):1026-31.
64. Ohara K, Mizukami W, Tokunaga A, Nagaoka S, Uno H, Mukai K. Kinetic study of the mechanism of free-radical scavenging action in curcumin: Effects of solvent and pH. *B Chem Soc Jpn.* 2005;78(4):615-21.
65. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": From kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol.* 2008;75(4):787-809.
66. Shishodia S, Singh T, Chaturvedi MM. Modulation of transcription factors by curcumin. *Adv Exp Med Biol.* 2007;595:127-48.

67. Aoki H, Takada Y, Kondo S, Sawaya R, Aggarwal BB, Kondo Y. Evidence that curcumin suppresses the growth of malignant gliomas in vitro and in vivo through induction of autophagy: Role of Akt and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Mol Pharmacol.* 2007;72(1):29-39.
68. Mitra A, Chakrabarti J, Banerji A, Chatterjee A, Das BR. Curcumin, a potential inhibitor of MMP-2 in human laryngeal squamous carcinoma cells HEp2. *J Environ Pathol Tox.* 2006;25(4):679-89.
69. Cho JW, Lee KS, Kim CW. Curcumin attenuates the expression of IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha as well as cyclin E in TNF-alpha-treated HaCaT cells; NF-kappa B and MAPKs as potential upstream targets. *Int J Mol Med.* 2007;19(3):469-74.
70. Aggarwal S, Ichikawa H, Takada Y, Sandur SK, Shishodia S, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of I kappa B alpha kinase and Akt activation. *Mol Pharmacol.* 2006;69(1):195-206.
71. Li M, Zhang Z, Hill DL, Wang H, Zhang RW. Curcumin, a dietary component, has anticancer, chemosensitization, and radiosensitization effects by down-regulating the MDM2 oncogene through the PI3K/mTOR/ETS2 pathway. *Cancer Res.* 2007;67(5):1988-96.
72. McNally SJ, Harrison EM, Ross JA, Garden OJ, Wigmore SJ. Curcumin induces heme oxygenase 1 through generation of reactive oxygen species, p38 activation and phosphatase inhibition. *Int J Mol Med.* 2007;19(1):165-72.
73. Shishodia S, Sethi G, Aggarwal BB. Curcumin: Getting back to the roots. *Natural Products and Molecular Therapy.* 2005;1056:206-17.
74. Park MJ, Kim EH, Park IC, Lee HC, Woo SH, Lee JY, et al. Curcumin inhibits cell cycle progression of immortalized human umbilical vein endothelial (ECV304) cells by up-regulating cyclin-dependent kinase inhibitor, p21(WAF1/CIP1), p27(KIP1) and p53. *Int J Oncol.* 2002;21(2):379-83.
75. Mahmoud NN, Carothers AM, Grunberger D, Bilinski RT, Churchill MR, Martucci C, et al. Plant phenolics decrease intestinal tumors in an animal model of familial adenomatous polyposis. *Carcinogenesis.* 2000;21(5):921-7.
76. Lao CD, Demierre MF, Sondok VK. Targeting events in melanoma carcinogenesis for the prevention of melanoma. *Expert Rev Anticanc.* 2006;6(11):1559-68.
77. Gupta NK, Dixit VK. Development and evaluation of vesicular system for curcumin delivery. *Arch Dermatol Res.* 2011;303(2):89-101.
78. Huang TS, Lee SC, Lin JK. Suppression of C-Jun Ap-1 Activation by an Inhibitor of Tumor Promotion in Mouse Fibroblast Cells. *P Natl Acad Sci USA.* 1991;88(12):5292-6.
79. Lin JK, Shih CA. Inhibitory Effect of Curcumin on Xanthine Dehydrogenase/Oxidase Induced by Phorbol-12-Myristate-13-Acetate in Nih3t3 Cells. *Carcinogenesis.* 1994;15(8):1717-21.
80. Abe Y, Hashimoto S, Horie T. Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *Pharmacol Res.* 1999;39(1):41-7.
81. Jefremov V, Zilmer M, Zilmer K, Bogdanovic N, Karelson E. Antioxidative effects of plant polyphenols - From protection of G protein signaling to prevention of age-related pathologies. *Ann Ny Acad Sci.* 2007;1095:449-57.
82. Venkatesan N, Chandrakasan G. Modulation of Cyclophosphamide-Induced Early Lung Injury by Curcumin, an Antiinflammatory Antioxidant. *Mol Cell Biochem.* 1995;142(1):79-87.
83. Huang MT, Lysz T, Ferraro T, Abidi TF, Laskin JD, Conney AH. Inhibitory Effects of Curcumin on Invitro Lipoygenase and Cyclooxygenase Activities in Mouse Epidermis. *Cancer Res.* 1991;51(3):813-9.
84. Park C, Moon DO, Choi IW, Choi BT, Nam TJ, Rhu CH, et al. Curcumin induces apoptosis and inhibits prostaglandin E-2 production in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis. *Int J Mol Med.* 2007;20(3):365-72.

85. Yue GGL, Chan BCL, Hon PM, Kennelly EJ, Yeung SK, Cassileth BR, et al. Immunostimulatory activities of polysaccharide extract isolated from *Curcuma longa*. *Int J Biol Macromol*. 2010;47(3):342-7.
86. Stanton H, Melrose J, Little CB, Fosang AJ. Proteoglycan degradation by the ADAMTS family of proteinases. *BBA-Mol Basis Dis*. 2011;1812(12):1616-29.
87. Kuno K, Kanada N, Nakashima E, Fujiki F, Ichimura F, Matsushima K. Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. *J Biol Chem*. 1997;272(1):556-62.
88. Salter RC, Ashlin TG, Kwan APL, Ramji DP. ADAMTS proteases: key roles in atherosclerosis? *J Mol Med*. 2010;88(12):1203-11.
89. Porter S, Clark IM, Kevorkian L, Edwards DR. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J*. 2005;386:15-27.
90. Jones GC, Riley GP. ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(4):160-9.
91. Hashimoto G, Aoki T, Nakamura H, Tanzawa K, Okada Y. Inhibition of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, 2, 3 and 4). *Febs Lett*. 2001;494(3):192-5.
92. Kashiwagi M, Tortorella M, Nagase H, Brew K. TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and aggrecanase 2 (ADAM-TS5). *J Biol Chem*. 2001;276(16):12501-4.
93. Lin EA, Liu CJ. The role of ADAMTSs in arthritis. *Protein & cell*. 2010;1(1):33-47.
94. Bondeson J, Wainwright S, Hughes C, Caterson B. The regulation of the ADAMTS4 and ADAMTS5 aggrecanases in osteoarthritis: a review. *Clin Exp Rheumatol*. 2008;26(1):139-45.
95. Bondeson J, Wainwright SD, Hughes C, Caterson B. The Regulation of the Adamts4 and Adamts5 Aggrecanases in Osteoarthritis. *Osteoarthr Cartilage*. 2010;18:S215-S6.
96. Fosang AJ, Little CB. Drug insight: aggrecanases as therapeutic targets for osteoarthritis. *Nat Clin Pract Rheum*. 2008;4(8):420-7.
97. Little CB, Meeker CT, Golub SB, Lawlor KE, Farmer PJ, Smith SM, et al. Blocking aggrecanase cleavage in the aggrecan interglobular domain abrogates cartilage erosion and promotes cartilage repair. *J Clin Invest*. 2007;117(6):1627-36.
98. Tortorella MD, Malfait AM, Deccico C, Arner E. The role of ADAM-TS4 (aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (aggrecanase-2) in a model of cartilage degradation. *Osteoarthr Cartilage*. 2001;9(6):539-52.
99. Chockalingam PS, Zeng W, Morris EA, Flannery CR. Release of hyaluronan and hyaladherins (aggrecan G1 domain and link proteins) from articular cartilage exposed to ADAMTS-4 (aggrecanase 1) or ADAMTS-5 (aggrecanase 2). *Arthritis Rheum*. 2004;50(9):2839-48.
100. Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma HL, et al. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature*. 2005;434(7033):644-8.
101. Stanton H, Rogerson FM, East CJ, Golub SB, Lawlor KE, Meeker CT, et al. ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature*. 2005;434(7033):648-52.
102. Rodriguez-Lopez J, Mustafa Z, Pombo-Suarez M, Malizos KN, Rego I, Blanco FJ, et al. Genetic variation including nonsynonymous polymorphisms of a major aggrecanase, ADAMTS-5, in susceptibility to osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2008;58(2):435-41.
103. Song RH, Tortorella MD, Malfait AM, Alston JT, Yang ZY, Arner EC, et al. Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both ADAMTS-4 and ADAMTS-5. *Arthritis Rheum*. 2007;56(2):575-85.
104. Echtermeyer F, Bertrand J, Dreier R, Meinecke I, Neugebauer K, Fuerst M, et al. Syndecan-4 regulates ADAMTS-5 activation and cartilage breakdown in osteoarthritis. *Nature medicine*. 2009;15(9):1072-6.

105. Pratta MA, Yao WQ, Decicco C, Tortorella MD, Liu RQ, Copeland RA, et al. Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage. *J Biol Chem.* 2003;278(46):45539-45.
106. Hedlund H, Hedbom E, Heinegard D, Mengarelli-Widholm S, Reinholt FP, Svensson O. Association of the aggrecan keratan sulfate-rich region with collagen in bovine articular cartilage. *J Biol Chem.* 1999;274(9):5777-81.
107. Liu CJ. The role of ADAMTS-7 and ADAMTS-12 in the pathogenesis of arthritis. *Nat Clin Pract Rheum.* 2009;5(1):38-45.
108. Luan Y, Kong L, Howell DR, Ilalov K, Fajardo M, Bai XH, et al. Inhibition of ADAMTS-7 and ADAMTS-12 degradation of cartilage oligomeric matrix protein by alpha-2-macroglobulin. *Osteoarthr Cartilage.* 2008;16(11):1413-20.
109. Briggs MD, Mortier GR, Cole WG, King LM, Golik SS, Bonaventure J, et al. Diverse mutations in the gene for cartilage oligomeric matrix protein in the pseudoachondroplasia multiple epiphyseal dysplasia disease spectrum. *Am J Hum Genet.* 1998;62(2):311-9.
110. Chan I, Liu L, Hamada T, Sethuraman G, McGrath JA. The molecular basis of lipoid proteinosis: mutations in extracellular matrix protein 1. *Exp Dermatol.* 2007;16(11):881-90.
111. Neidhart M, Hauser N, Paulsson M, Dicesare PE, Michel BA, Hauselmann HJ. Small fragments of cartilage oligomeric matrix protein in synovial fluid and serum as markers for cartilage degradation. *Brit J Rheumatol.* 1997;36(11):1151-60.
112. Demircan K, Hirohata S, Nishida K, Hatipoglu OF, Oohashi T, Yonezawa T, et al. ADAMTS-9 is synergistically induced by interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha in OUMS-27 chondrosarcoma cells and in human chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2005;52(5):1451-60.
113. Yaykasli KO, Oohashi T, Hirohata S, Hatipoglu OF, Inagawa K, Demircan K, et al. ADAMTS9 activation by interleukin 1 beta via NFATc1 in OUMS-27 chondrosarcoma cells and in human chondrocytes. *Mol Cell Biochem.* 2009;323(1-2):69-79.
114. Kunisada T, Miyazaki M, Mihara K, Gao C, Kawai A, Inoue H, et al. A new human chondrosarcoma cell line (OUMS-27) that maintains chondrocytic differentiation. *Int J Cancer.* 1998;77(6):854-9.
115. Ballester A, Velasco A, Tobena R, Alemany S. Cot kinase activates tumor necrosis factor-alpha gene expression in a cyclosporin A-resistant manner. *J Biol Chem.* 1998;273(23):14099-106.
116. Altman RD, Hochberg MC, Moskowitz RW, Schnitzer TJ, Rheumatology AC. Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee - 2000 update. *Arthritis Rheum.* 2000;43(9):1905-15.
117. Chrubasik JE, Roufogalis BD, Chrubasik S. Evidence of effectiveness of herbal antiinflammatory drugs in the treatment of painful osteoarthritis and chronic low back pain. *Phytother Res.* 2007;21(7):675-83.
118. Setty AR, Sigal LH. Herbal medications commonly used in the practice of rheumatology: Mechanisms of action, efficacy, and side effects. *Semin Arthritis Rheu.* 2005;34(6):773-84.
119. Ramsey SD, Spencer AC, Topolski TD, Belza B, Patrick DL. Use of alternative therapies by older adults with osteoarthritis. *Arthrit Rheum-Arthr.* 2001;45(3):222-7.
120. Coughlan TC, Crawford A, Goldring MB, Hatton PV, Barker MD. Lentiviral shRNA knock-down of ADAMTS-5 and-9 restores matrix deposition in 3D chondrocyte culture. *J Tissue Eng Regen M.* 2010;4(8):611-8.
121. Rogerson FM, Chung YM, Deutscher ME, Last K, Fosang AJ. Cytokine-Induced Increases in ADAMTS-4 Messenger RNA Expression Do Not Lead to Increased Aggrecanase Activity in ADAMTS-5-Deficient Mice. *Arthritis Rheum.* 2010;62(11):3365-73.
122. Ng YH, Zhu H, Pallen CJ, Leung PCK, MacCalman CD. Differential effects of interleukin-1 beta and transforming growth factor-beta 1 on the expression of the

inflammation-associated protein, ADAMTS-1, in human decidual stromal cells in vitro. *Hum Reprod.* 2006;21(8):1990-9.

123. Yatabe T, Mochizuki S, Takizawa M, Chijiwa M, Okada A, Kimura T, et al. Hyaluronan inhibits expression of ADAMTS4 (aggrecanase-1) in human osteoarthritic chondrocytes. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(6):1051-8.

124. Hatipoglu OF, Hirohata S, Yaykasli KO, Cilek MZ, Demircan K, Shinohata R, et al. The 3'-Untranslated Region of the Adamts1 Regulates Its Expression. *Iubmb Life.* 2009;61(3):367-.

125. van den Berg WB. Osteoarthritis year 2010 in review: pathomechanisms. *Osteoarthr Cartilage.* 2011;19(4):338-41.

126. Fosang AJ, Rogerson FM, East CJ, Stanton H. ADAMTS-5: The story so far. *Eur Cells Mater.* 2008;15:11-26.

127. Fitzpatrick LR, Wang J, Le T. Caffeic acid phenethyl ester, an inhibitor of nuclear factor-kappa B, attenuates bacterial peptidoglycan polysaccharide-induced colitis in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;299(3):915-20.

128. Galan Marco F. [Royal jelly as a coadjuvant in the therapy of degenerative rheumatism]. La jalea real como medicacion coadyuvante en el tratamiento de los reumatismos degenerativos. *Medicina Espanola.* 1957;37(219):524-31.

129. Kohno K, Okamoto I, Sano O, Arai N, Iwaki K, Ikeda M, et al. Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages. *Biosci Biotech Bioch.* 2004;68(1):138-45.

130. Funk JL, Frye JB, Oyarzo JN, Zhang HP, Timmermann BN. Anti-Arthritic Effects and Toxicity of the Essential Oils of Turmeric (*Curcuma longa* L.). *J Agr Food Chem.* 2010;58(2):842-9.

131. Srivastava RM, Singh S, Dubey SK, Misra K, Khar A. Immunomodulatory and therapeutic activity of curcumin. *International immunopharmacology.* 2011;11(3):331-41.

132. Funk JL, Frye JB, Oyarzo JN, Kuscuoglu N, Wilson J, McCaffrey G, et al. Efficacy and mechanism of action of turmeric supplements in the treatment of experimental arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54(11):3452-64.

133. Henrotin Y, Clutterbuck AL, Allaway D, Ludwig EM, Harris P, Mathy-Hartert M, et al. Biological actions of curcumin on articular chondrocytes. *Osteoarthr Cartilage.* 2010;18(2):141-9.

134. Clutterbuck AL, Mobasheri A, Shakibaei M, Allaway D, Harris P. Interleukin-1 beta-Induced Extracellular Matrix Degradation and Glycosaminoglycan Release Is Inhibited by Curcumin in an Explant Model of Cartilage Inflammation. *Natural Compounds and Their Role in Apoptotic Cell Signaling Pathways.* 2009;1171:428-35.