





UROTENSİN II'NİN İNSAN OSTEOLAST HÜCRELERİNDE ENFLAMASYONLA İLİŞKİLİ ROLÜ

The Role of Urotensin II Associated with Inflammation in Human Osteoblast Cells

Hamza Malik OKUYAN¹ 

Menderes Yusuf TERZİ² 

Gülay GÜLBOL DURAN³ 

Aydiner KALACI⁴ 

¹Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Sakarya
^{2,3,4}Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Hatay

Geliş Tarihi / Received: 02.12.2020

Kabul Tarihi / Accepted: 02.01.2021

Yayın Tarihi / Published: 25.03.2021

ÖZ

Osteoartrit (OA), kemik, kırık ve sinoviyal dokuda katabolik değişikliklere neden olan yaygın bir eklem hastalığıdır. OA'nın güncel tedavisi, hastalığı tamamen iyileştirmek için yeterli değildir. Eklem kondrositlerinin yanı sıra, kemik hücrelerindeki OA ile ilişkili mekanizmaların anlaşılması bu hastalığın önlenmesi ve tedavisine katkı sağlayacaktır. Urotensin II (UTS2), nörohormon benzeri aktiviteye sahip polipeptid bir moleküldür ve kardiyovasküler, pulmoner, renal ve merkezi sinir sisteminde eksprese edildiği bilinmektedir. Pek çok sistem üzerinde patofizyolojik etkileri olan UTS2'nin, OA'daki moleküler mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada, insan osteoblast hücreleri kullanılarak UTS2'nin OA patogenezi içinde enflamasyonla ve apoptozis ile ilişkili rolünün incelenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada, insan osteoblast hücreleri, tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) ve UTS2'ye maruz bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda hücrelerden RNA izole edildi ve kantitatif ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu analizleri yapıldı. TNF- α maruziyeti, interlökin 6 ve nükleer faktör kapp B gen ekspresyon seviyelerinde anlamlı düzeyde bir artışa neden olmuştur. UTS2 maruziyeti, kendi gen ekspresyon seviyesini azaltmıştır. TNF-a ve UTS2 maruziyetleri, Kaspaz-3 gen ekspresyonu üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa neden olmamıştır. Çalışmamızda, bulgularımız; insan osteoblast hücrelerinde UTS2'nin eksprese edildiğini ve UTS2'nin hücre kültür ortamına eklenmesi bu genin kendi ekspresyon seviyeleri üzerinde etkili olabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: IL-6, Osteoartrit, Osteoblast, TNF- α , Urotensin II

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a common joint disease that causes catabolic changes in bone, cartilage and synovial tissue. The current treatment of OA is not sufficient to completely cure the disease. Understanding of OA-related mechanisms in bone cells as well as in joint chondrocytes will contribute to the prevention and treatment of this disease. Urotensin II (UTS2) is a polypeptide molecule with neurohormone-like activity and is known to be expressed in the cardiovascular, pulmonary, renal, and central nervous system. The molecular mechanism of UTS2, which has pathophysiological effects on many systems, in OA is not fully known. In this study, it has been aimed to investigate the role of UTS2 associated with inflammation and apoptosis in OA pathogenesis by using human osteoblast cells. In this study, human osteoblast cells were exposed to tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and UTS2. At the end of the incubation period, RNA was isolated from the cells and quantitative real-time polymerase chain reaction analyses were performed. TNF- α treatment has caused a significant increase in interleukin 6 and nuclear factor kappa B gene expression levels. UTS2 treatment has reduced its own gene expression level. TNF- α and UTS2 treatments have not caused a statistically significant difference in Caspase-3 gene expression. In our study, our findings show that UTS2 is expressed in human osteoblast cells and the addition of UTS2 into the cell culture medium can affect its own expression levels.

Keywords: IL-6, Osteoarthritis, Osteoblast, TNF- α , Urotensin II

GİRİŞ

Osteoartrit (OA) kemik ve kıkırdakta belirgin katabolik değişikliklere neden olan yaygın bir eklem hastalığıdır. OA, bireylerde eklem ağrılarında ve yaşam kalitesinde azalmaya yol açmaktadır. Bununla birlikte, OA'nın güncel tedavisi hastalığı tamamıyla iyileştirmek için yeterli değildir. Her ne kadar eklem kıkırdağındaki ekstraselüler matriks yıkımı OA'nın belirgin bulgusu olsa da subkondral kemikteki anormal değişimler OA'nın ilerlemesi ile yakından ilişkilidir (M. B. Goldring ve S. R. Goldring, 2010). Ayrıca, deneysel çalışmalarda, kondrositler ve osteoblastlar arasında biyolojik bir iletişim olduğu ve bu hücre gruplarının birbirlerini etkileyebileceği gösterilmiştir (Mohan vd., 2011). Örneğin, *in vivo* fare deneylerinde, subkondral osteoblastlarda spesifik bir genin aşırı ekspresyonu OA gelişim sürecinde kıkırdak doku üzerinde koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Valverde-Franco vd., 2012). Özellikle, subkondral kemikteki anormallikler eklem kıkırdağındaki yıkımı tetiklerken, subkondral kemikteki anormalliklerin iyileştirilmesi kıkırdak dejenerasyonunu azaltabilmektedir. Ayrıca, bazı çalışmalar subkondral kemiği hedeflemenin OA tedavisinde potansiyel terapötik hedeflerin geliştirilmesi için etkin bir yaklaşım olabileceğini rapor etmektedir (M. B. Goldring ve S. R. Goldring, 2010; Menetrey, Unno-Veith, Madry, ve Van Breuseghem, 2010; Yu vd., 2016). Eklem kondrositlerinin yanı sıra kemik hücrelerindeki OA ile ilişkili mekanizmaların anlaşılması bu hastalığın önlenmesi ve tedavisine katkı sağlayacaktır. Bu nedenle, çalışmamızda bildiğimiz kadarıyla ilk defa Urotensin II (UTS2)'nin rolünü incelemek için OA modeli olarak tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) ile uyarılan insan osteoblast hücreleri kullanılmıştır.

UTS2, nörohormon benzeri aktiviteye sahip polipeptid bir moleküldür ve temelde kardiyovasküler, pulmoner, renal ve merkezi sinir sisteminde eksprese edildiği bilinmektedir (Ames vd., 1999; Berlind, 1972; Pearson vd., 1980). UTS2 aynı zamanda G protein bağlı bir reseptör [GRP14, UT] olarak bilinen kendi reseptörüne bağlanarak canlı sistemlerde aktivitesini gösterir (Ames vd., 1999; Davenport ve Maguire, 2000). Önceki çalışmalarda, UTS2 genellikle en güçlü vazokonstriktör olarak tanımlansa da, daha sonra yapılan çalışmalarda, UTS2'nin proliferasyon, fibrozis ve enflamasyon gibi süreçlerde birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Sun ve Liu, 2019). Özellikle, daha önce yapılan çalışmalar, UTS2'nin enflamasyon ile ilişkili süreçlerin gelişiminde kritik bir oyuncu olduğunu ortaya koymuştur (Tomiya, Nakamachi, Uchiyama, Matsuda, ve Konno, 2015; Ugan, Cadirci, Halici, Toktay, ve Cinar, 2018; Yang vd., 2016). Bazı çalışmalarda, UTS2'nin diyabet, diyabetik nefropati ve sistemik skleroz ile ilişkili olabileceği de rapor edilmektedir (Okumus vd., 2012; Pehlivan vd.,

2012). Daha önemli olarak, yapılan bir çalışmada, OA'lı hastaların sinoviyal sıvılarında UTS2 seviyelerinin yüksek olduğu bulunmuştur (Gogebakan vd., 2014). Bu çalışmadan elde edilen bulgular UTS2'nin OA ile ilişkili patolojilerde rol alabileceğini göstermektedir. İnsan vücudunun farklı bölgelerinde eksprese edilen ve pek çok sistem üzerinde patofizyolojik etkileri olan UTS2'nin OA'daki moleküler mekanizması tam olarak bilinmemektedir (Sun ve Liu, 2019).

Yukarıda belirtildiği gibi, OA tüm dünyada milyonlarca insanın yaşam kalitesini olumsuz etkileyen önemli bir halk sağlığı sorunudur. Bu nedenle, OA'nın tedavisinde kullanılabilecek moleküler hedeflerin belirlenmesi ve moleküler patogenezin anlaşılması hastalığın etkin tedavisi için önemli bir konudur. Bu çalışmada, insan osteoblast hücreleri kullanılarak UTS2'nin OA patogenezindeki enflamasyonla ilişkili rolünün incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Osteoblast Hücre Kültürü Deneyleri

Deneylerde kullanılacak olan SV40 büyük T antijeni ile transfekte edilmiş insan kemik osteoblast hücre hattı (hFOB1.19) American Type Culture Collection (ATCC) firmasından daha önceki çalışmalar kapsamında temin edilmiştir. Bu hücre hattı; 175 cm²'lik hücre kültür kaplarında %10 fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum: FBS) ve 0,3 mg/ml G418 içeren DMEM/F-12 (Dulbecco's modified Eagle's medium/F12) vasatları içerisinde ve 34 °C de nemlendirilmiş atmosferde (%95 nem) ve %5 CO₂'li ortamda kültüre edildi. Kültür vasatı en az haftada üç kez değiştirildi.

MTT Testi

Çalışmamızda UTS2'nin değişen konsantrasyonlarının (0, 25, 50, 100, 250 ve 500 ng/ml) hFOB1.19 hücrelerinin canlılığı ve sitotoksitesi üzerindeki etkisini değerlendirmek için kantitatif ve kolorimetrik bir yöntem olarak bilinen 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, M2128) testini kullandık (Denizot ve Lang, 1986). Bu yöntemde mitokondriyal reduktaz enzimi canlı hücrelere absorbe olan MTT bileşiğini formazan kristallerine dönüştürür. Burada tanımlanan reaksiyon aktif mitokondriyal hücrelerde gerçekleştiğinden bu yöntem hücre canlılığının göstergesi olarak kabul edilmektedir. Yukarıda belirtilen konsantrasyonlardaki UTS2'nin inkübasyon süresi sonunda hücrelere 0,5 mg/ml MTT eklendi ve ardından hücreler 4 saat 37°C'de CO₂ inkübatöründe bekletildi. Bu sürenin sonunda süpernatant uzaklaştırıldı ve ortama çözücü olarak DMSO eklendi ve UV spektrofotomere 550 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.

TNF- α ve UTS2 maruziyetleri

6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekilen hFOB1.19 hücreleri, kültür kabının tabanını %70-80 kapladıktan sonra hücreler FBS içermeyen serumsuz vasat (SF; 0,3 mg/ml G418, DMEM/F12) içerisinde 24 saat inkübe edildi. Osteoblast hücreleri sadece SF, SF vasat içerisinde hazırlanmış TNF- α (5 ng/ml), SF vasat içerisinde hazırlanmış UTS2 (150 ng/ml) ve SF vasat içerisinde hazırlanmış TNF- α + UTS2 ile 24 saat maruziyet sürelerinde inkübe edildi. Böylelikle, hFOB1.19 hücrelerinden osteoklastojenik faktörlerin salınımı stimüle edilmiş olacaktır.

Kantitatif Ters Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

Stimüle edilmiş hücreler hücre kültür kaplarından tripsin ile muamele edilerek kaldırıldı ve total RNA izolasyon kiti kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Daha sonra, elde edilen total RNA'nın 2 μ g'ı cDNA sentez kiti kullanılarak revers transkripsiyon işlemiyle cDNA'ya dönüştürüldü ve UTS2, interlökin-6 (IL-6), kaspaz-3 (CASP-3), nükleer faktör kappa B (NF- κ B) ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) geninin ekspresyon seviyeleri 'gerçek zamanlı' PCR yöntemiyle Rotor-Gene 600 qRT-PCR cihazı (Corbett Research, Australia) kullanılarak ölçüldü. Aşağıdaki PCR koşulları reaksiyonlarda kullanıldı: 10 dakika boyunca 95 °C'de başlatma adımı, daha sonra 40 amplifikasyon döngü; 15 saniye boyunca 95 °C'de ikinci adım ve 1 dakika boyunca 60 °C'de üçüncü adım. Çalışmada kullanılan primerler Qiagen firmasından satın alınmıştır (Tablo 1). Daha önce belirtildiği gibi, gen ekspresyon analizleri sonucu elde edilen verilerin analizi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak hesaplandı (Livak ve Schmittgen, 2001).

Tablo 1: qRT-PCR Primer Listesi

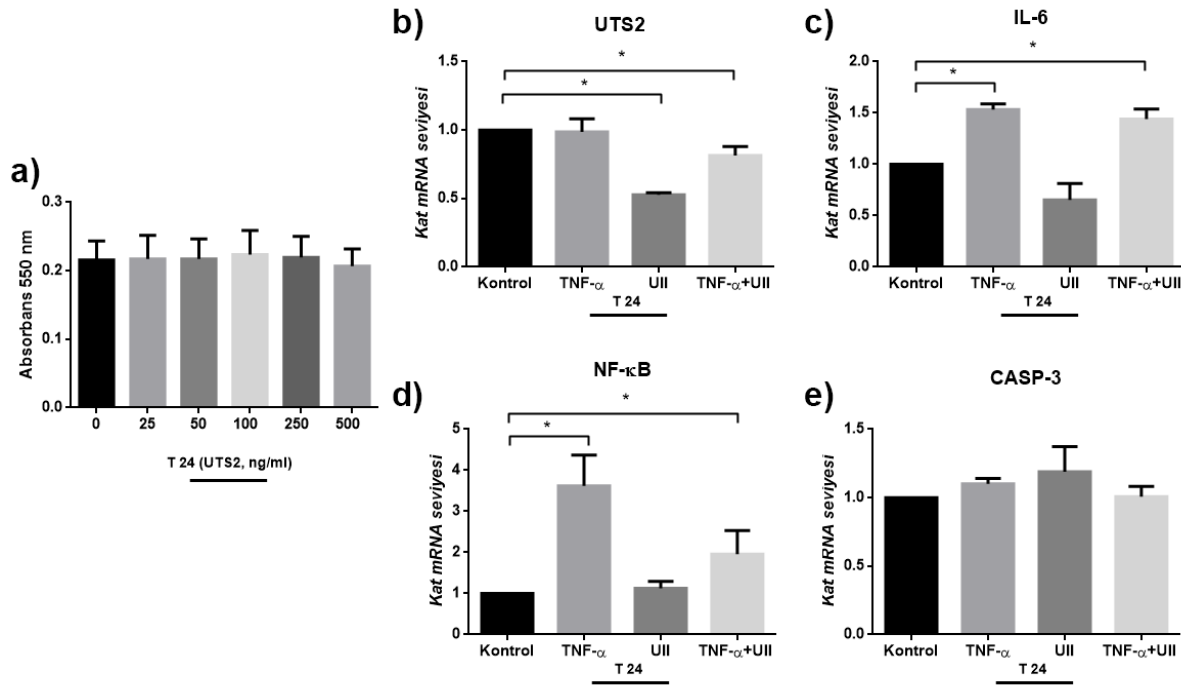
Gen	NCBI RefSeq	Katalog No
UTS2	NM_006786	PPH02516A
IL-6	NM_000600	PPH00560C
CASP-3	NM_004346	PPH00107C
NF- κ B	NM_001165412	PPH00204F
GAPDH	NM_002046	PPH00150F

İstatistiksel Analiz

Öncelikle, elde edilen verilerin normal dağılımlı olup olmadıkları test edildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda *Kruskal Wallis* testi yapıldı. Anlamlılık görüldüğünde, gruplar arası ikili karşılaştırmalarda *Mann-Whitney U* testi kullanıldı. 0.05'ten küçük *P* değerleri anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma veya standart hata ile ifade edildi. İstatistiki analizler için 'SPSS' bilgisayar programı kullanıldı. Grafiklerin oluşturulmasında ise Graphpad prism programı kullanıldı.

BULGULAR

Yaptığımız uygulamalar sonucunda elde edilen verilere göre, uyguladığımız UTS2 dozlarının kontrole göre hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir farklılık oluşturmadığı belirlenmiştir ($P>0.05$) (Şekil 1a). İnsan osteoblast hücrelerinde TNF- α ve UTS2'nin, UTS2, IL-6, CASP-3 ve NF- κ B mRNA ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisini test etmek için hücreler 5 ng/ml TNF- α ve 150 ng/ml UTS2 ile inkübe edildi. Elde ettiğimiz bulgulara göre, insan osteoblast hücrelerinde UTS2'nin ekspresyonunun varlığı belirlenmiştir. Ayrıca, uyguladığımız doz ve süreye bağlı olarak hFOB1.19 hücrelerinde sadece UTS2 ve TNF- α ile UTS2 birlikte uygulanmasının UTS2 gen ekspresyon seviyesini, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azalttığı belirlendi ($P<0.05$) (Şekil 1b).



Şekil 1: TNF-A Ve UTS2'nin Osteoblast Hücrelerindeki Etkisi. a) UTS2'nin Değişen Konsantrasyonlarının (0-500 ng/ml) 24 Saat İnkübasyon Süresinin Sonunda İnsan Osteoblast Hücrelerinde Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi. b-e) TNF-A Ve UTS2'nin İnsan Osteoblast Hücrelerindeki UTS2, IL-6, NF- κ B ve CASP-3 Gen Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkisi. Veriler Ortalama \pm Standart Hata Olarak Verilmiştir. *: $p<0.05$.

Bununla birlikte, sadece TNF- α maruziyetinin uyguladığımız süreye bağlı olarak IL-6 gen ekspresyon seviyelerinde anlamlı düzeyde bir artışa neden olmuştur ($P<0.05$) (Şekil 1c). Sadece UTS2 uyguladığımız gruptaki IL-6 gen ekspresyon seviyelerinde kontrole göre anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir ($P>0.05$) (Şekil 1c). Tüm gruplarda NF- κ B gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında, TNF- α uygulamasının NF- κ B mRNA seviyelerini arttırdığı gözlemlenmiştir ($P<0.05$) (Şekil 1d). Ayrıca, TNF- α uygulamasına ek olarak ortama UTS2 eklenmesinin NF- κ B gen ekspresyon seviyelerini bir miktar azaltmıştır ancak, bu değişiklik

istatistiksel olarak anlamlı değildir ($P>0.05$) (Şekil 1d). Ayrıca, TNF- α ve UTS2 uygulamasının CASP-3 mRNA ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisini değerlendirdiğimizde, yapılan bu maruziyetlerin CASP-3 gen ifadesi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa neden olmadığı belirlenmiştir ($P>0.05$) (Şekil 1e).

TARTIŞMA

Artan kanıtlar OA gelişiminde subkondral kemiğin anahtar rol oynadığını ve terapötik olarak eklem bu bölgesinin hedeflenebileceğini göstermektedir (M. B. Goldring ve S. R. Goldring, 2010; Menetrey, Unno-Veith, Madry, ve Van Breuseghem, 2010; Mohan vd., 2011; Valverde-Franco vd., 2012). Bununla birlikte, OA'nın tedavisinde ve önlenmesinde kullanılabilecek yeni terapötik yaklaşımların geliştirilebilmesi için altta yatan moleküler mekanizmanın daha iyi anlaşılması gerekmektedir. UTS2 ve reseptörü insan vücudunda kardiyovasküler, pulmoner, renal, immün ve merkezi sinir sistemi gibi pek çok yerde eksprese edildiği bilinmektedir (Pearson vd., 1980; Sun ve Liu, 2019). Yapılan çalışmalar UTS2 ve enflamatuvar süreçler arasındaki etkileşime vurgu yapmaktadır (Sun ve Liu, 2019). Aterosklerotik koroner arterlerin ve aortun enflamatuvar bölgelerinde UTS2 ve reseptörünün artan ekspresyonları rapor edilmiştir (Hassan, Douglas, Ohlstein, ve Giaid, 2005). Ayrıca, monosit, lenfosit ve makrofaj gibi insan periferik kan mononükleer hücrelerinde UTS2 ve reseptörünün eksprese edildiği gösterilmiştir (Segain vd., 2007). Dahası, enflamatuvar NF- κ B sinyal yolağının aktivasyonunda UTS2/UT sisteminin rol aldığı bilinmektedir (Liu, Liang, Ye, Tu, ve Zhu, 2015). Bu çalışmalar UTS2'nin enflamasyonla ilişkili süreçlerde kritik bir işleve sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, OA ile ilişkili olarak kemiğin homeostazının sürdürülmesinde NF- κ B sinyalizasyonunun etkin bir şekilde rol aldığı bilinmektedir. Ancak, UTS2/UT sinyalizasyonunun osteoblast hücrelerindeki NF- κ B aracılı moleküler mekanizması henüz aydınlatılamamıştır. Mevcut çalışmamız UTS2'nin osteoblast hücrelerindeki moleküler mekanizması ile ilgili önemli bilgiler sağlamaktadır.

Bulgularımız UTS2'nin insan osteoblast hücrelerinde eksprese edildiğini ve UTS2'nin kültür ortamına dışarıdan hazır olarak verilmesi UTS2'nin gen ekspresyon seviyelerini azaltabildiğini göstermektedir. UTS2 ve reseptörünün ekspresyonları otokrin ve parakrin mekanizmalarla düzenlendiği daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (Sun ve Liu, 2019). Çalışmamızda elde edilen bulgular, parakrin negatif geri besleme mekanizmaları ile UTS2 seviyelerinin azaltılabileceğini düşündürmektedir.

Kemik dokuda IL-6'nın temel kaynağını osteoblast ve stromal hücreler oluşturur. Bununla birlikte, IL-6'nın temel aktivitesi kemik rezorpsiyonu ve osteoklastogenez üzerinedir

(Holt, Davie, ve Marshall, 1996; Kotake vd., 1996). Eklemdeki IL-6 aracılı bozulmuş homeostazis ve anormal katabolik aktivite sonuçta OA gelişimine katkı sağlar. Ayrıca, yapılan çalışmalarda kemik erimesi ile ilişkili TNF- α ve IL-1 β gibi sitokinlere yanıt olarak osteoblast hücrelerinde IL-6 sentezinin arttığı gösterilmiştir (Ishimi vd., 1990). *Ishimi ve arkadaşları* MCT3E-1 fare osteoblastik hücrelerini 100 ng/ml TNF- α ile uyardıklarında, IL-6 mRNA ekspresyon seviyelerinin zamana bağlı olarak 3. saatte maksimum seviyeye çıktığını 24. saatte normale döndüğünü gözlemlediler (Ishimi vd., 1990). Çalışmamızda benzer şekilde, farklı bir hücre hattı olarak insan osteoblast hücrelerini 5 ng/ml TNF- α ile uyardığımızda 24. saatte IL-6 mRNA ekspresyon seviyelerinde herhangi bir değişiklik gözlemedik. Bu durum uyguladığımız dozun düşüklüğünden kaynaklanıyor olabilir ya da IL-6 ekspresyon seviyeleri daha kısa sürelerde yükselmiş ve normale dönmüş olmasından kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca, bu durumun diğer bir sebebi, IL-6 gen ekspresyon mekanizmasının farklı hücre tiplerindeki olası farklılığıdır. Yapılan çalışmalarda, UTS2'nin lökosit hücrelerinde TNF- α ve IL-1 β gibi sitokinlerin mRNA ekspresyon seviyesini arttırdığı gözlemlenmiştir (Tomiya, Nakamachi, Uchiyama, Matsuda, ve Konno, 2015). Çalışmamızda, UTS2'nin dolaylı olarak NF- κ B aracılı osteoklastik aktivite üzerindeki etkisini test etmek için insan osteoblast hücrelerini 150 ng/ml UTS2'ye 24 saat süreyle maruz bıraktık. Uyguladığımız doz ve sürede IL-6 ve NF- κ B ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir farklılık gözlemedik. Bu sonuçlar osteoblast hücrelerinde UTS2'nin uyguladığımız doz ve sürelerde NF- κ B aracılı aktivitesi olmayabileceğini düşündürmektedir.

Ayrıca, çalışmamızda TNF- α ve UTS2'nin osteoblast hücrelerindeki apoptozis üzerindeki etkisini test ettik. Uyguladığımız doz ve sürelerde TNF- α ve UTS2'nin apoptotik bir gen olan CASP-3 üzerinde anlamlı bir farklılığa neden olmadığı gözlemlenmiştir. *Bin ve arkadaşları* yaptıkları çalışmalarında TNF- α 'nın değişen konsantrasyonlarının (1, 10, 20 ve 40 ng/ml) osteoblast hücrelerindeki apoptozis üzerine etkisini incelediler. Onların sonuçları, en düşük doz 1 ng/ml'nin, osteoblast apoptozisi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını, diğer daha yüksek dozların ise apoptozisi indüklediğini gösterdi (Bin vd., 2015). Bu çalışmadan farklı olarak, bizim çalışmamızda ise 5 ng/ml TNF- α uygulamasının apoptotik gen CASP-3 üzerinde herhangi bir etkiye neden olmadığı gözlemlenmiştir. Bu bulgular TNF- α 'nın düşük dozlarının osteoblastlarda apoptozisi indükleyemeyeceğini düşündürmektedir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, bulgularımız insan osteoblast hücrelerinde UTS2'nin eksprese edildiğini ve UTS2'nin hücre kültür ortamına eklenmesi bu genin ekspresyon seviyeleri üzerinde etkili

olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, kemik ve kırıkta hücrelerinde UTS2'nin NF- κ B aracılı moleküler mekanizmasını farklı doz ve sürelerde inceleyen ileri çalışmalar, OA patogenezinde UTS2'nin rolünün daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

Teşekkür

Bu çalışma Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeler Birimi tarafından desteklenmiştir (18.M.089).

KAYNAKLAR

- Ames, R. S., Sarau, H. M., Chambers, J. K., Willette, R. N., Aiyar, N. V., Romanic, A. M., ... Douglas, S.A. (1999). Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature*, 401(6750), 282-286. doi: 10.1038/45809.
- Berlind, A. (1972). Teleost caudal neurosecretory system: release of urotensin II from isolated urophyses. *Gen Comp Endocrinol*, 18(3), 557-560. doi: 10.1016/0016-6480(72)90036-6.
- Bin, G., Cui Fang, W., Bo, Z., Jing, W., Jin, J., Xiaoyi, T., ... Yayi, X. (2015). Fluid shear stress inhibits TNF-alpha-induced osteoblast apoptosis via ERK5 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 466(1), 117-123. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.08.117
- Davenport, A. P., Maguire, J. J. (2000). Urotensin II: fish neuropeptide catches orphan receptor. *Trends Pharmacol Sci*, 21(3), 80-82.
- Denizot, F., Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*, 89(2), 271-277. doi: 10.1016/0022-1759(86)90368-6
- Gogebakan, B., Uruc, V., Ozden, R., Duman, I. G., Yagiz, A. E., Okuyan, H. M., ... Kalaci, A. (2014). Urotensin II (U-II), a novel cyclic peptide, possibly associated with the pathophysiology of osteoarthritis. *Peptides*, 54, 159-161. doi: 10.1016/j.peptides.2014.01.010
- Goldring, M. B., Goldring, S. R. (2010). Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci*, 1192, 230-237. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05240.x
- Hassan, G. S., Douglas, S. A., Ohlstein, E. H., Giaid, A. (2005). Expression of urotensin-II in human coronary atherosclerosis. *Peptides*, 26(12), 2464-2472. doi: 10.1016/j.peptides.2005.05.028
- Holt, I., Davie, M. W., Marshall, M. J. (1996). Osteoclasts are not the major source of interleukin-6 in mouse parietal bones. *Bone*, 18(3), 221-226. doi: 10.1016/8756-3282(95)00482-3
- Ishimi, Y., Miyaura, C., Jin, C. H., Akatsu, T., Abe, E., Nakamura, Y., ... Hirano, T. (1990). IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol*, 145(10), 3297-3303.
- Kotake, S., Sato, K., Kim, K. J., Takahashi, N., Udagawa, N., Nakamura, I., ... Kashiwazaki, S. (1996). Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation. *J Bone Miner Res*, 11(1), 88-95. doi: 10.1002/jbmr.5650110113
- Liu, L. M., Liang, D. Y., Ye, C. G., Tu, W. J., Zhu, T. (2015). The U11/UT system mediates upregulation of proinflammatory cytokines through p38 MAPK and NF-kappaB pathways in LPS-stimulated Kupffer cells. *PLoS One*, 10(3), e0121383. doi: 10.1371/journal.pone.0121383
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262

- Menetrey, J., Unno-Veith, F., Madry, H., Van Breuseghem, I. (2010). *Epidemiology and imaging of the subchondral bone in articular cartilage repair. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 18(4), 463-471. doi: 10.1007/s00167-010-1053-0
- Mohan, G., Perilli, E., Kuliwaba, J. S., Humphries, J. M., Parkinson, I. H., Fazzalari, N. L. (2011). *Application of in vivo micro-computed tomography in the temporal characterisation of subchondral bone architecture in a rat model of low-dose monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. Arthritis Res Ther*, 13(6), R210. doi: 10.1186/ar3543
- Okumus, S., Igci, Y. Z., Taskin, T., Oztuzcu, S., Gurler, B., Eslik, Z., ...Demiryurek, A.T. (2012). *Association between Thr21Met and Ser89Asn polymorphisms of the urotensin-II (UTS2) gene, diabetes mellitus, and diabetic retinopathy. Curr Eye Res*, 37(10), 921-929. doi: 10.3109/02713683.2012.688181
- Pearson, D., Shively, J. E., Clark, B. R., Geschwind, H., Barkley, M., Nishioka, R. S., Bern, H.A. (1980). *Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes. Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(8), 5021-5024.
- Pehlivan, Y., Gogebakan, B., Oztuzcu, S., Ozgen, M., Cetin, G. Y., Bayraktar, R., ...Onat, A.M.(2012). *Association between Thr21Met and Ser89Asn polymorphisms of the urotensin II gene and systemic sclerosis. J Rheumatol*, 39(1), 106-111. doi: 10.3899/jrheum.110509
- Segain, J. P., Rolli-Derkinderen, M., Gervois, N., Raingeard de la Bletiere, D., Loirand, G., Pacaud, P. (2007). *Urotensin II is a new chemotactic factor for UT receptor-expressing monocytes. J Immunol*, 179(2), 901-909. doi: 10.4049/jimmunol.179.2.901
- Sun, S. L., Liu, L. M. (2019). *Urotensin II: an inflammatory cytokine. J Endocrinol*. doi: 10.1530/JOE-18-0505
- Tomiyama, S., Nakamachi, T., Uchiyama, M., Matsuda, K.,Konno, N. (2015). *Urotensin II upregulates migration and cytokine gene expression in leukocytes of the African clawed frog, Xenopus laevis. Gen Comp Endocrinol*, 216, 54-63. doi: 10.1016/j.ygcen.2015.04.009
- Ugan, R. A., Cadirci, E., Halici, Z., Toktay, E., Cinar, I. (2018). *The role of urotensin-II and its receptors in sepsis-induced lung injury under diabetic conditions. Eur J Pharmacol*, 818, 457-469. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.11.011
- Valverde-Franco, G., Pelletier, J. P., Fahmi, H., Hum, D., Matsuo, K., Lussier, B., ... Martel-Pelletier, J. (2012). *In vivo bone-specific EphB4 overexpression in mice protects both subchondral bone and cartilage during osteoarthritis. Arthritis Rheum*, 64(11), 3614-3625. doi: 10.1002/art.34638
- Yang, Y., Zhang, J., Chen, X., Wu, T., Xu, X., Cao, G., ...Li, Y. (2016). *U1I/GPR14 is involved in NF-kappaB-mediated colonic inflammation in vivo and in vitro. Oncol Rep*, 36(5), 2800-2806. doi: 10.3892/or.2016.5069
- Yu, D., Xu, J., Liu, F., Wang, X., Mao, Y., Zhu, Z. (2016). *Subchondral bone changes and the impacts on joint pain and articular cartilage degeneration in osteoarthritis. Clin Exp Rheumatol*, 34(5), 929-934.