



Diz Osteoartrit Hastalarının Periferik Kan ve Kıkırdak Doku Örneklerinde Proinflamatuvar Sitokinlerin Etkilerinin Araştırılması

Investigation of the Proinflammatory Cytokines' Effects in Peripheral Blood and Cartilage Tissue Samples of Knee Osteoarthritis Patients

Sezen ATASOY^{1,2}

¹T.C. Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Yazışma Adresi
Correspondence Address

Sezen ATASOY
T.C. Bezmialem Vakıf Üniversitesi,
Eczacılık Fakültesi Biyokimya
Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye
E-posta: sezenatasoy@gmail.com

Geliş tarihi \ Received : 02.07.2019
Kabul tarihi \ Accepted : 19.09.2019
Elektronik yayın tarihi : 27.04.2020
Online published

Bu makaleye yapılacak atıf:
Cite this article as:
Atasoy S. Diz osteoartrit hastalarının periferik kan ve kıkırdak doku örneklerinde proinflamatuvar sitokinlerin etkilerinin araştırılması. Akd Tıp D 2020;3:373-81.

Sezen ATASOY
ORCID ID: 0000-0001-5063-5053

ÖZ

Amaç: Osteoartrit (OA) ağrı ve fonksiyon kısıtlılığıyla sonuçlanan dejeneratif bir eklem hastalığıdır. Metabolizmada düzenleyici moleküller olmaları ve OA patofizyolojisindeki rolleri nedeniyle sitokinler; tanı ve tedavi için araştırılan önemli faktörlerdendir. Bu çalışmanın amacı; IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-18 ve TNF- α proinflamatuvar sitokinlerinin OA ile ilişkisini göstermek ve kıkırdak dokusunda harabiyete neden olan bozulmuş katabolik aktivitelerini saptamaktır. Ayrıca bu moleküllerin kan ve kıkırdak dokularında kıyaslanarak tanı ve tedavi süreçleri için olası biyomarker adaylarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Hasta ve kontrol grubu olmak üzere ikiye ayrılan toplam 30 olgudan alınan periferik kan ve kıkırdak doku örneklerinde ilgili sitokinlerin protein düzeylerinin belirlenmesinde Western blot, gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesinde ise kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemleri uygulanmıştır. Ayrıca olguların C-reaktif protein (CRP) düzeyleri ve Kellgren-Lawrence (K-L) skorlamaları da sorgulanmıştır.

Bulgular: Protein düzeyleri için dokuda IL-6, kanda ise IL-1 β ve IL-17 istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (sırasıyla $p<0,0308$, $p<0,0475$ ve $p<0,0012$). Gen ekspresyon seviyelerinde ise dokuda incelenen genler için istatistiksel anlamlılık tespit edilememesine rağmen, kanda IL17 ve IL18 ifadesinin istatistiksel olarak yükseldiği belirlenmiştir (sırasıyla $p<0,0055$ ve $p<0,0166$). CRP düzeyleri ve K-L skorları kıyaslandığında ise istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon görülmüştür ($r=0,5354$, $p<0,0150$).

Sonuç: IL-17'nin hedef molekül olarak yararlı bir biyomarker olduğu çalışmada gösterilmiştir. Ayrıca IL-17 seviyelerindeki yükselişin kıkırdak katabolizmasını etkileyerek, çalışmada anlamlı bulunan IL-1 β ve IL-6'yı da tetiklediği düşünülmektedir. Sonuç olarak değerlendirilen sitokinlerin OA patofizyolojisindeki önemli medyatörleri temsil ettiği görülmüştür. Hastalığın tanısı, prognozu ve gelecekteki terapötik müdahaleleri için biyomarker seçilmesinde yardımcı olabilecek moleküller gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Osteoartrit, İnflamasyon, Sitokinler, Moleküler Tıp

ABSTRACT

Objective: Osteoarthritis (OA) is a degenerative joint disease that results in pain and dysfunction. Cytokines, which are regulatory molecules in the metabolism with roles in the pathophysiology of OA, are important factors investigated regarding diagnosis and treatment. The aim of this study was to demonstrate the association between IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-18 and TNF- α proinflammatory cytokines and OA, and to identify the imbalanced catabolic activity in cartilage tissue. We also aimed to determine possible biomarker candidates for diagnosis and treatment processes by comparing cytokines in serum and cartilage.

DOI: 10.17954/amj.2020.2176

Material and Methods: Western blotting was performed to determine protein levels, and quantitative real-time polymerase chain reaction was performed to determine the gene expression levels of cytokines in the blood and tissue samples taken from patient and control groups for a total of 30 cases. The C-reactive protein (CRP) levels and Kellgren-Lawrence (K-L) scoring of patients were also investigated.

Results: As regards protein levels, the level of IL-6 in tissue, and of IL-1 β and IL-17 in blood were found to be statistically significant ($p < 0.0308$, $p < 0.0475$ and $p < 0.0012$, respectively). Although gene expression levels were not statistically significant in tissue, IL17 and IL18 expression was found to be statistically increased in blood ($p < 0.0055$ and $p < 0.0166$, respectively). Comparing CRP levels and K-L scores showed a statistically positive correlation ($r = 0.5354$, $p < 0.0150$).

Conclusion: IL-17 was found to be a useful biomarker for targeting. Further, it is thought that the increase in IL-17 levels affects the cartilage catabolism and triggers the IL-1 β and IL-6 levels, also found to be significant in our study. We observed that the evaluated cytokines represented important mediators in the pathophysiology of OA. Molecules that could help the selection of biomarkers to aid in the diagnosis and prognosis and guide future therapeutic interventions have therefore been found.

Key Words: Osteoarthritis, Inflammation, Cytokines, Molecular Medicine

GİRİŞ

Osteoartrit (OA) ağrı ve fonksiyon kısıtlılığı ile sonuçlanan kronik, yaşa bağlı, dejeneratif bir eklem hastalığıdır (1). Patogenezinde kompleman proteinler ve sistemik inflamatuvar medyatörlerin etkileştiği; obezite, travma, genetik faktörler, laksite ve diyabet gibi birçok faktörün etkilediği inflamatuvar ve biyomekanik bir organ hastalığı olarak kabul edilmesine rağmen, etiyojisi hâlâ tam olarak aydınlatılmamıştır (2). Yapılan araştırmalar yaşlanan nüfus, hareket azlığı ve obezite prevalansının gittikçe artması sebebiyle OA görülme sıklığının 2020’de iki katına çıkarak önemli bir halk sağlığı sorunu olacağını göstermektedir (3). Radyografik ve semptomatik belirtileri olan hastalarda tedavi genellikle palyatif olmakla birlikte, yüksek derecede fonksiyon kaybı ve ağrısı olan hastalarda cerrahi yöntemler uygulanmaktadır. Kıkırdak onarıcı ajanlar geliştirmek için uygun hedef belirleme konusunda araştırmalar hâlâ devam etse de, hasarlı bölgelerin yeniden onarılmasını sağlayan bir tedavi henüz mevcut değildir. Erken dönem OA’da önleyici yaklaşımlar oluşturulması için radyolojik bulgulardan önce hastalığa özgü biyokimyasal ve görüntüleme belirteçlerinin tanımlanması araştırmaların odak noktasıdır (3, 4).

Sitokinler, kemokinler, adipokinler ve büyüme faktörleri gibi medyatörler kıkırdak metabolizmasında önemli rol oynayan düzenleyicilerdir. Homeostazda bu moleküller sıkı bir şekilde denetlenir ve kıkırdağın fizyolojik yapısı, anabolizmanın aktivasyonu ve katabolizmanın inhibisyonu ile korunur (5). Sitokinler; doğal ve kazanılmış immünitede görev alan; enfeksiyon, inflamasyon ve travma yanıtlarını düzenleyen küçük glikoprotein yapıda moleküllerdir. Bir grup sitokinler patolojik sonuçlara (proinflamatuvar sitokinler; tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α), İnterlökin (IL)-1, IL-6, IL-8 vb.) yol açarken, diğer grup sitokinler (anti-inflamatuvar sitokinler; transforme edici büyüme faktör beta, IL-4, IL-10 vb.) inflamasyonu azaltarak iyileşmeyi başlatırlar (6, 7). Proinflamatuvar sitokinler, kollajen sentezini baskılayarak ekstrasellüler matriksin (ESM) yıkımına

sebeplenen matriks metalloproteinazların (MMP) sentezini artırır ve kıkırdak metabolizmasını olumsuz yönde etkiler (8). OA’da yüksek sitokin seviyeleri anabolik ve katabolik mekanizmalarda dengesizliğe sebep olarak çeşitli biyokimyasal yolların aktivasyonu ile ESM’nin parçalanmasına ve progresif kıkırdak kaybına neden olur (9). Sinoviyal membranda artmış proinflamatuvar sitokin aktivitesi ile eklemlerdeki lokal kronik inflamasyonunun direkt ve indirekt etkilerle kıkırdak degredasyonu ve hiperaraljezide önemli rol oynadığı düşünülmektedir (10).

OA’da mekanik stres ve beraberinde ESM’nin yıkımı; nükleer faktör-kappa B yolağının aktifleşmesine ve katabolik proinflamatuvar sitokinler ile hasarın artmasına neden olur (11). Son dönemde yapılan araştırmalar, sitokinlerin eklem hastalıkları patofizyolojisindeki rollerine ek olarak, tedavide de kıkırdak onarımını etkileyebilecek önemli faktörler olduğunu göstermiştir (12). Ancak sitokinlerin biyomarker olarak değerlendirilmesi, hasarlı eklem dokusundaki rollerinin anlaşılması ve tedavi açısından özgün moleküller olabileceğinin gösterilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Katabolik süreçlerde rol oynayan bu moleküllerin farklı dokularda oluşturdukları cevaplar ve sinyal mekanizmalarındaki rollerinin araştırılması ile elde edilen veriler OA patogenezinin ve yeni tedavi stratejilerinin belirlenmesini sağlayacaktır. Yapılacak araştırmalar, ilişkili sitokinlerin belirlenmesi ile hastalığın ilerlemesini yavaşlatıcı veya doğal onarım mekanizmalarını destekleyici potansiyel hedefleri ortaya çıkaracaktır. Bu kapsamda yapılan çalışmanın amacı; proinflamatuvar sitokinlerin hasara uğramış eklem dokularındaki aktivitelerini değerlendirmek ve OA hastalarında bozulmuş katabolik aktivitenin inflamasyon açısından göz önünde bulundurulması gerektiğini göstermektir. Bu amaçla primer diz OA hastalarında IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-18 ve TNF- α ’nın gen ve protein ekspresyon seviyeleri incelenerek, farklı dokular arasında hastalıkla ilişkili faktörler araştırılmış ve tanı-tedavi süreçlerinin desteklenmesi için olası biyomarker adayları değerlendirilmiştir.

dirilmesi yapılmıştır. Çalışma sonuçlarında inflamasyonun OA ile olan ilişkisinin altı çizilmiş ve dikkat edilebilecek faktörlerden birinin sitokinler olabileceği gösterilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEMLER

Örneklerin Toplanması ve Hazırlanması

Çalışma Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 71306642-050.01.04 sayılı karar ile onaylanmış ve Helsinki Deklarasyonu etik standartlarına uygun olarak planlanmıştır. Tüm katılımcılardan bilgilendirilmiş olur alınmıştır. Çalışmada Ortopedi ve Travmatoloji Polikliniği'ne başvuran toplam 30 olgu kullanılmıştır. Olgular hasta ve kontrol grubu olmak üzere iki gruba ayrılmıştır; I. Grup - Hasta grubu; Amerikan Romatoloji Derneği tanı kriterlerine göre primer diz OA tanısı konulmuş, aktif enfeksiyonu olmayan 20 olgu, II. Grup - Kontrol grubu; OA bulgusu ve aktif enfeksiyonu olmayan, amputasyon ameliyatı olan 10 olgu. I. grubun radyolojik değerlendirilmesi için Kellgren-Lawrence (K-L) skalası kullanılmıştır ve skorlama 0-4 arasında yapılmıştır. Evre 0; Normal, Evre 1; Şüpheli, Evre 2; Hafif, Evre 3; Orta dereceli ve Evre 4; Şiddetli OA olarak değerlendirilmiştir (13).

I. gruba dahil edilen olguların yaşları, cinsiyetleri, C-reaktif protein (CRP) düzeyleri, radyolojik evreleri sorgulanmış ve II. grup oluşturulurken CRP değerlerinin düşük olmasıyla beraber yaş ortalamasının I. gruba yakın olmasına dikkat edilmiştir. I. gruptaki olguların hasarlı kıkırdak dokusu örnekleri total diz replasmanı, II. gruptaki olguların sağlıklı kıkırdak dokusu örnekleri ise amputasyon ameliyatları sırasında alınmıştır. Olguların periferik kan örnekleri ise ameliyat öncesi sodyum heparinli tüp kullanılarak alınmıştır. Ameliyat esnasında dokular 1-1,5 cm² olacak şekilde kesildikten sonra fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkanmış, hemen sonra sıvı azotta dondurulmuş ve sonraki çalışmalara kadar -80°C'de saklanmıştır.

Lenfosit İzolasyonu

Olgulardan alınan periferik kan örnekleri bekletilmeden 1:1 olacak şekilde PBS ile karıştırılmıştır. Yeni bir santrifüj tüpüne 5 mL histopaque (Sigma-Aldrich, Almanya) eklendikten sonra üzerine yavaşça PBS-periferik kan karışımından eklenmiştir ve 800 x g'de 30 dk. santrifüj edilmiştir. Lenfositleri içeren faz dikkatlice alınıp temiz bir tüpe aktarılmış ve PBS ile yıkanıp santrifüjlendikten sonra tüpün dibine çöken lenfositler toplanarak -80°C'de saklanmıştır.

Protein İzolasyonu ve Western Blot

Toz haline getirilen kıkırdak dokusu örnekleri ve periferik kandan izole edilmiş lenfositlerin üzerine RIPA lizis tamponu (Santa Cruz, ABD) eklendikten sonra 5 kere 2 dk. vortekslenmiş, -80°C'de gece boyu bekletildikten sonra lizatlar 12000 x g 4°C'de 10 dk. santrifüj edilmiştir

(Hermle Z 326K, Almanya). Çözünen proteini içeren üst faz toplanıp yeni tüpe aktarılmış ve protein konsantrasyonu ölçülmüştür (Qubit Protein Assay Kit, Qubit 2.0 Fluorometer, Invitrogen, ABD). Her örnekten alınan 20 µg protein, β-merkaptotanol içeren 2x Laemmlı örnek tamponu (Bio-Rad Laboratories, ABD) ile karıştırılmış ve 95°C'de 2 dk. bekletilmiştir. Hazırlanan protein örnekleri %4-20 Mini-PROTEAN TGX Precast Protein Gels (Bio-Rad Laboratories, ABD) ve protein ladder olarak GangNam-STAIN Prestained (iNtRON Biotechnology, Güney Kore) kullanılarak dikey elektroforezde yürütülmüş, Trans-Blot Turbo (Bio-Rad Laboratories, ABD) transfer sisteminde 15V, 7 dk. süreyle polivinilidin diflorür membrana blotlanmıştır. Blotlama sonrası membranlar %5 yağsız süt tozu ve %0,1 Tween 20 içeren Tris tampon tuzu (TBSMT) ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. %5 TBSMT içerisinde hazırlanan primer antikorlar (IL-1β Rabbit mAb #12703, β-Aktin Rabbit mAb #4970, IL-6 Rabbit mAb #12153, TNF-α Rabbit mAb #6945, Cell Signaling Technology, ABD, Anti-IL17 antibody ab79056, Anti-IL18 antibody ab191152, Abcam, ABD) ve sekonder antikorlar (Anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody #7074, Abcam, ABD) oda sıcaklığında 1 saat hafif sallanarak inkübe edilmiş, sonrasında 1xTBSMT ile 5 kere 5 dk. yıkanmıştır. Membranların görüntülenmesi WesternBright ECL HRP (Advansta, ABD) substrat kiti kullanılarak, kemilüminesans görüntüleme sistemiyle (Vilber FUSION FX, Fransa) gerçekleştirilmiştir. Deney sonucunda elde edilen bant görselleri dansitometrik olarak analiz edilmiş ve her bir hastanın ilgili protein ekspresyon düzeyleri beta aktin ekspresyon düzeylerine göre normalize edilerek protein seviyelerindeki değişim belirlenmiştir.

RNA İzolasyonu ve Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

Total RNA izolasyonu Invitrogen RNAqueous (Thermo Fisher Scientific, ABD) kiti kullanılarak, üretici protokolüne uygun olarak yapılmıştır. İzole edilen RNA'ların miktar tayini spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (Multiskan GO, Thermo Scientific, ABD). Sonuçlar; A₂₆₀ miktarı, A₂₆₀/A₂₈₀ ve A₂₆₀/A₂₃₀ ise saflığı verecek şekilde değerlendirilmiştir. A₂₆₀/A₂₈₀ oranı 1,8-2,0 ve A₂₆₀/A₂₃₀ oranı 2,0-2,2 arasında olan RNA'lar çalışmaya dahil edilmiştir. İzole edilen RNA'lardan High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Roche Life Science, Almanya) yardımıyla başlangıç RNA miktarı 100-200 ng olacak şekilde cDNA sentezlenmiştir. İncelenecek genlerin anlatım düzeylerindeki değişiklikler SensiFAST SYBR No-ROX kiti (Bioline Reagents Ltd, İngiltere) ile gerçekleştirilmiştir. Gen anlatımlarındaki değişimleri inceleyebilmek için *IL1B*, *IL6*, *IL17*, *IL18*, *TNF* genleri ve housekeeping olarak *ACTB* geni için primerler hazırlanmıştır (Tablo I). Her gen her bir örnek için duplika

çalışılmıştır. Gen anlatımlarını değerlendirilmesinde her gen için ışmanın başladığı Threshold Cycle (Ct) değerine ve duplike örneklerin kendi aralarındaki standart sapmalarına bakılmış ve bu verilere bağlı olarak analiz için $\Delta\Delta Ct$ metodu uygulanmıştır (14).

İstatistiksel Analiz

Western blot ile incelenen bantlar ImageJ (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, ABD, <http://imagej.nih.gov/ij/>) programında normalize edilmiştir (15). İlgili genlerin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri $2^{-[(Ct_{HedefGen} - Ct_{Housekeeping Gen}) - (Ct_{HedefGen} - Ct_{Housekeeping Gen})_{Kontrol}]}$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Analizlerin istatistiksel yaklaşımlarında; grupların arasındaki farklılıklar parametrik test olan Student's t-testi, değişkenler arasındaki ilişki Spearman Korelasyon testi kullanılarak, % 95 güven aralığında GraphPad Prism 8.00 (GraphPad Software, ABD) programı ile yapılmıştır. Anlamlılık sınırı olarak $p < 0,05$ belirlenmiştir.

BULGULAR

Çalışma, yaşları 52 ile 77 arasında değişen (ortalama $66,0 \pm 7,9$), %85'i kadın ($n=17$) ve %15'i erkek ($n=3$), toplam 20 primer diz OA hastası, kontrol grubu olarak ise yaşları 49 ile 68 arasında değişen (ortalama $60,5 \pm 5,8$), %40'ı kadın ($n=4$) ve %60'ı erkek ($n=6$) toplam 10 transformatör amputasyon olgusu ile yapılmıştır. Operasyon öncesi hastaların %65'i ($n=13$) konservatif tedaviyi (Non-steroid anti-inflamatuvar ilaçlar + Analjezik + Fizik tedavi) en az 3 ay denemiş ve yanıt alamamıştır. Ayrıca operasyondan önce hastaların hiçbirine intraartiküler kortikosteroid enjeksiyon uygulaması yapılmamıştır. I. grubun K-L radyolojik skorları ≥ 2 ve CRP değerleri $< 0,01-0,91$ arasındadır (Tablo II). II. grubunun CRP değerlerinin $\leq 0,5$ olmasına dikkat edilmiş (Tablo III). CRP değerlendirmesinde refe-

rans değerinin $\leq 0,5$ olması negatif olarak kabul edilmiştir. I. grubun %60'ında CRP değerleri yüksek olarak bulunmuş, K-L skorlarına bakıldığında ise %15'inin 4. evre, %55'inin 3. evre ve %30'unun 2. evre olduğu görülmüştür. CRP düzeyleri ve K-L skorları değerlendirildiğinde ise istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon görülmüştür ($r=0,5354$, $p < 0,0150$).

I. ve II. grubun periferik kan ve kırık doku örneklerinde IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-18 ve TNF- α protein ekspresyon düzeyleri arasındaki farklılık Western blot yöntemi ile belirlenmiştir (Şekil 1A,B). I. grup ile II. grup karşılaştırıldığında; TNF- α ve IL18 protein seviyeleri arasında kırık doku veya periferik kan örneklerinde istatistiksel bir anlamlılık bulunamamıştır. Kırık doku dokusunda sadece IL-6 istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,0308$), ancak periferik kan örnekleri değerlendirildiğinde aynı anlamlılık tespit edilememiştir ($p > 0,05$) (Şekil 2). Periferik kan örneklerinde protein seviyeleri incelendiğinde ise IL-1 β ve IL-17 istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (sırasıyla $p < 0,0475$ ve $p < 0,0012$) (Şekil 3A,B).

I. ve II. grubun periferik kan ve kırık doku örnekleri gen ekspresyon düzeyleri açısından *IL1B*, *IL6*, *IL17*, *IL18*, *TNF* genlerine özgü primerler ile incelenmiştir. Periferik kan örneklerinde *IL17* ve *IL18* ifadesinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artmış olduğu belirlenmiştir (sırasıyla $p < 0,0055$ ve $p < 0,0166$) (Şekil 4A,B). Kırık doku örneklerinde ise incelenen genler için istatistiksel anlamlılık tespit edilememiştir.

TARTIŞMA

Toplumda artrit, özellikle OA'ya yakalanma riski yaşla beraber ciddi bir şekilde yükselmektedir ve orta-ileri yaş gruplarında kronik hale gelmektedir. Aynı zamanda yapı-

Tablo I: İncelenen proinflamatuvar sitokin genleri için PCR amplifikasyonunda kullanılan primer baz dizileri.

Gen	Baz Dizisi 5'-3'	Amplikon büyüklüğü (bp)
IL1B	f 5'-AAG CTG AGG AAG ATG CTG-3' r 5'-ATC TAC ACT CTC CAG CTG-3'	390
IL6	f 5'-TCT CCA CAA GCG CCT TCG-3' r 5'-CTC AGG GCT GAG ATG CCG-3'	193
IL17	f 5'-CTC ATT GGT GTC ACT GCT ACT G-3' r 5'-CCT GGA TTT CGT GGG ATT GTG-3'	78
IL18	f 5'-TTG CTG AGC CCT TTG CTC-3' r 5'-GCT TTA GCA GCC AGA GTT GG-3'	102
TNFA	f 5'-CCT GCC CCA ATC CCT TTA TT-3' r 5'-CCC TAA GCC CCC AAT TCT CT-3'	81
ACTB	f 5'-CAT GTA CGT TGC TAT CCA GGC-3' r 5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT-3'	250

qRT-PCR: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, **bp:** Baz çifti, **f:** Forward, **r:** Reverse, **IL:** İnterlökin, **TNFA:** tümör nekroz faktörü alfa, **ACTB:** beta aktin.

lan epidemiyolojik çalışmalar diz OA insidansı ve şiddeti göz önüne alındığında cinsiyetler arasında da farklılıklar olduğunu göstermiştir. Diz OA'ları erkeklere oranla kadınlarda daha fazla görülmektedir (16). Diz anatomisi, travma hikayesi, hormonal farklılıklar ve obezitenin kadınlarda daha yüksek olması sebepleriyle yaklaşık 3 kadından 2'si artrit tanısı almaktadır (17, 18). Bu çalışmada da hasta-

ların çoğunluğu orta-ileri yaş grubundan ve kadınlardan oluşmaktadır. I. gruptaki erkek/kadın dağılımları incelendiğinde 1:5,6 oranı görülmektedir. Eşit olmayan dağılımın sonuçlar üzerindeki etkisi olası gözükse de, cinsiyet ve OA ilişkisinin belirlenebilmesi için klinik gözlemlerin (günlük faaliyetler, fiziksel kısıtlılıkların belirlenmesi ve ağrının tanımlanması) ayrıntılı bir şekilde yapılması gerekmektedir.

Tablo II: I. grubun ($n=20$) demografik bilgileri ile laboratuvar ve radyolojik bulguları.

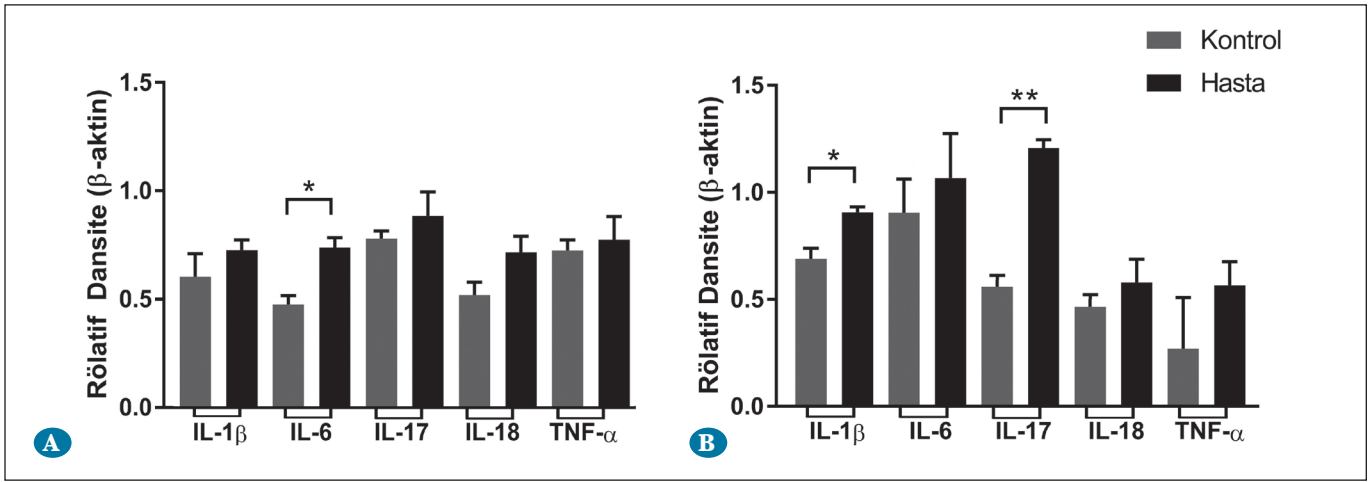
Olgu No	Yaş/Cinsiyet	CRP düzeyi	Radyolojik evresi (K-L skoru)	Tanı ve operasyon tarihi arasında geçen süre (gün)
H1	77/K	0,88	4	32
H2	77/K	0,75	3	157
H3	72/E	0,73	3	218
H4	77/K	<0,01	2	225
H5	62/K	0,91	3	153
H6	53/K	0,63	2	102
H7	69/K	0,64	3	124
H8	68/E	0,3	3	28
H9	76/K	<0,01	3	14
H10	69/K	0,58	3	70
H11	69/K	0,09	3	98
H12	53/K	0,83	4	48
H13	64/K	<0,01	2	246
H14	73/K	0,36	2	138
H15	71/K	0,26	3	215
H16	53/K	0,17	2	194
H17	61/K	0,62	4	8
H18	60/K	0,57	2	131
H19	64/K	0,87	3	90
H20	52/E	0,72	3	273

K: Kadın, **E:** Erkek, **CRP:** C-reaktif protein, **K-L:** Kellgren-Lawrence

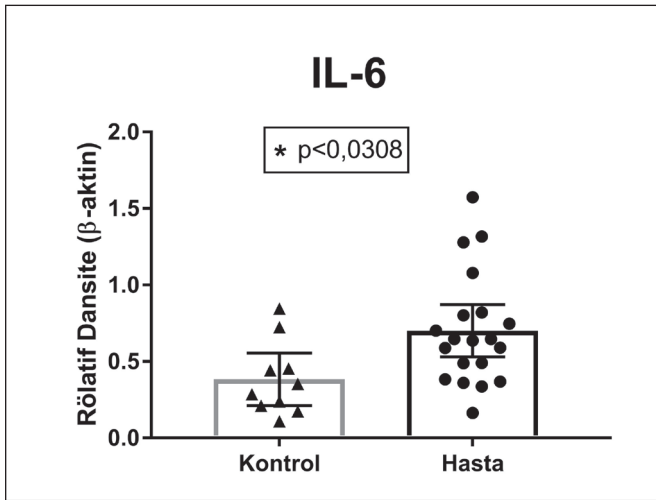
Tablo III: II. grubun ($n=10$) demografik bilgileri, laboratuvar bulguları ve amputasyon endikasyonları.

Olgu No	Yaş/Cinsiyet	CRP düzeyi	Ampütasyon Nedenleri
O1	68/K	<0,01	Transfemoral Ampütasyon (Periferik Arter Hastalığı) Vasküler
O2	49/K	<0,01	Transfemoral Ampütasyon (Periferik Arter Hastalığı (Tip 2 DM))
O3	67/K	0,42	Transfemoral Ampütasyon (Periferik Arter Hastalığı (Tip 2 DM))
O4	66/E	<0,01	Transfemoral Ampütasyon (Periferik Arter Hastalığı(Tip 2 DM))
O5	64/E	0,52	Transfemoral Ampütasyon (Travma – Motorlu Taşıt Kazası)
O6	58/E	0,31	Transfemoral Ampütasyon (Periferik Arter Hastalığı (Tip 2 DM))
O7	60/E	0,18	Transfemoral Ampütasyon (Periferik Arter Hastalığı (Tip 2 DM))
O8	57/E	<0,01	Transfemoral Ampütasyon (Periferik Arter Hastalığı (Tip 2 DM))
O9	62/K	0,34	Transfemoral Ampütasyon (Periferik Arter Hastalığı) Vasküler
O10	54/E	0,21	Transfemoral Ampütasyon (Periferik Arter Hastalığı (Tip 2 DM))

K: Kadın, **E:** Erkek, **CRP:** C-reaktif protein, **DM:** Diabetes Mellitus



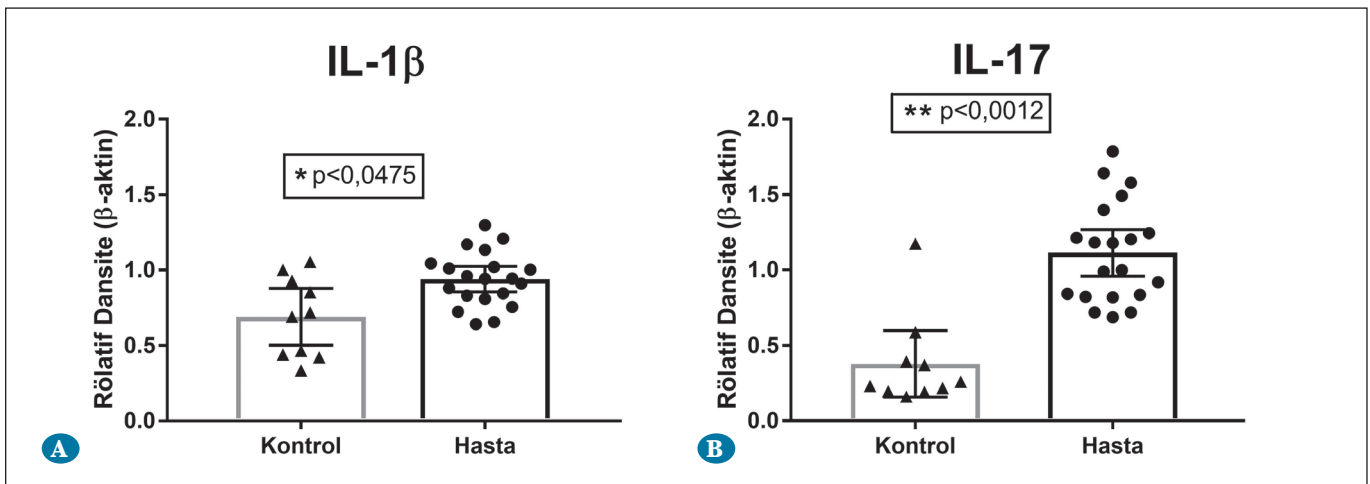
Şekil 1: Western blot analizi sonrası doku (A) ve periferik kan (B) örneklerinde proinflamatuvar sitokin protein seviyelerinin karşılaştırılması. Veriler ortalama \pm standart sapma (SD) olarak sunulmuştur, * $p<0,05$; ** $p<0,01$.



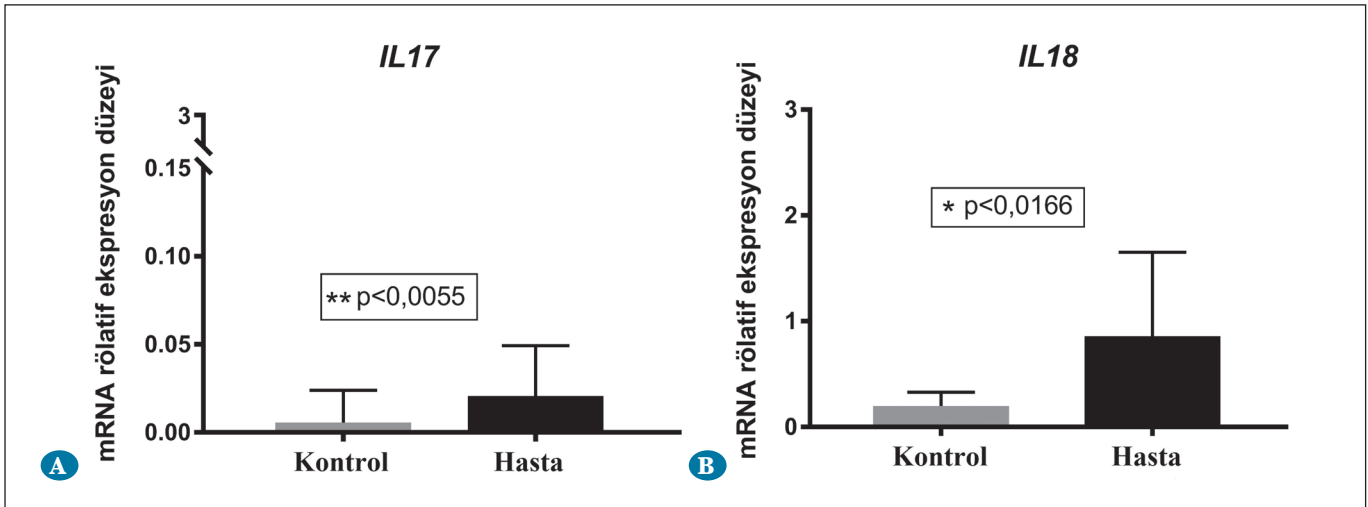
Şekil 2: Çalışma gruplarının kıkırdak dokularındaki interlökin 6 (IL-6) protein seviyelerinin Western blot analizi sonrası karşılaştırılması. Veriler ortalama \pm standart sapma (SD) olarak sunulmuştur, * $p<0,05$.

Cinsiyetin immün yanıtı etkilemesinin etiyojisi tam olarak bilinmese de; kadınlarda aşırı diz ekstansiyonu ile oluşan yüklenmenin kadınlardaki OA prevalansını artırdığı düşünülmektedir (19).

OA etiopatogenezinde sitokinler efektör ve düzenleyici moleküller olmalarının yanı sıra, fizyolojik ve metabolik süreçlerde de geniş etkiler gösterirler (20). IL-1β, TNF-α ve IL-6 ile beraber IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, lösemi inhibe edici faktör ve kemokinlerin de OA için önemli olduğu düşünülmektedir (8). Sitokinler ve diğer medyatörler sadece inflamatuvar sinoviyal dokudan değil, lenf düğümleri, dalak ve karaciğer gibi sistemik sitokin düzeyini etkileyen yerlerden de eksprese edilmektedir. OA hastalığı lokal sinoviyal inflamasyon olarak düşünülse de, çeşitli araştırmalar hem kan hem de sinoviyal sıvılarda IL-6 ve CRP seviyelerinin hastalığın şiddeti ile pozitif korele olarak yükseldiğini göstermiştir (21-23). Bu çalışmada da benzer şekilde radyo-



Şekil 3: Çalışma gruplarının periferik kan örneklerindeki interlökin 1 beta (IL-1β, A) ve interlökin 17 (IL-17, B) protein seviyelerinin Western blot analizi sonrası karşılaştırılması. Veriler ortalama \pm standart sapma (SD) olarak sunulmuştur, * $p<0,05$; ** $p<0,01$.



Şekil 4: Çalışma gruplarının periferik kan örneklerindeki interlökin 17 (IL17, **A**) ve interlökin 18 (IL18, **B**) gen ekspresyonlarının analiz sonrası karşılaştırılması. Veriler ortalama \pm standart sapma (SD) olarak sunulmuştur, * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

lojik skorlama sistemi ile değerlendirilen hastalarda hastalığın şiddetiyle beraber CRP seviyelerinin yükseldiği görülmüştür. Bu bulgu, OA tanılı hastaların ilerleyen dönemlerinde sistemik inflamasyonun rol oynadığını göstermektedir. Dolayısıyla, periferik kan hastalığın sistemik etkilerinin değerlendirilmesi için uygun bir kaynak sağlarken, eklem dokularının incelenmesi ise lokal biyokimyasal değişiklikler hakkında önemli bilgiler vermektedir.

Periferik kan hastalık teşhisinde özellikle biyomarker olarak ideal numunedir. Bunun en büyük nedeni; tüm dokular ve organlarla etkileşime girebilmesi, kolayca analiz için hazırlanabilmesi ve kısmen girişimsel olmayan bir şekilde elde edilebilmesidir (24). Eklem kıkırdığı avasküler olmasına rağmen, sinoviyal pannus oldukça vaskülerdir ve birçok sitokini salgılayarak kıkırdak hasarına neden olur (25). Çalışmada da bu özellikler dikkate alındığında; OA tanılı hastaların periferik kanlarında IL1 β ve IL-17'nin protein düzeylerindeki artış önemlidir. Bu düzeyler kontrol grubuna göre sırasıyla 1,3 ve 2,2 kat yüksek bulunmuştur. Aynı zamanda periferik kanda *IL17* ve *IL18* genleri upregüle olarak bulunmuştur. En önemli bulgumuz ise IL-17'nin hem gen ekspresyonu hem de protein düzeylerinin periferik kanda birlikte anlamlı farklılık göstermiş olmasıdır.

IL-17'nin patolojik seviyeleri, aşırı inflamasyona ve doku hasarına yol açar (26). IL-17, kondrosit ve sinoviyal fibroblastlardan çeşitli proinflamatuvar sitokinlerin üretimini ve salınımını uyararak katabolizmayı aktifleştirir (27). OA'da yüksek IL-17 seviyeleri, metabolik sendrom yokluğunda azalmış kemik tutulumu ve artmış inflamatuvar fenotipi ile ilişkilendirilmiştir (28), aynı zamanda artan kıkırdak defektleri ile karakterize olduğu gösterilmiştir (29-31). Chen ve ark. OA tanılı hastaların serum ve sinoviyal sıvılarından IL-17 seviyelerinin hastaların radyolojik bulgularıyla anlamlı olarak arttığını göstermiştir (29). Benzer şekilde bir

meta-analiz çalışması da dolaşımdaki IL-17 seviyelerinin OA dahil inflamatuvar artritlerde yükseldiğini göstermiştir (32). In-vivo araştırmalar tavşan diz eklemine içine IL-17 enjekte edilmesiyle OA'nın indüklenildiği gösterilmiştir (33). Bu çalışmada da kontrol grubu ile kıyaslandığında hasta grubunun periferik kan örneklerinde IL-17 protein seviyesi 2,2 kat, gen ekspresyon seviyesi ise 4 kat artmış olarak bulunmuştur. IL-17'nin hastalığın tedavisinde hedef molekül şeklinde değerlendirilebilecek yararlı bir biyomarker olduğu çalışma ile gösterilmiştir. Ayrıca IL-17 protein ve gen ekspresyon seviyelerinin yükselmesinin kıkırdığı katabolik olarak etkileyen diğer medyatörleri (IL-1 β ve IL-6) de tetikleyebileceğini düşündürmektedir.

Çalışmada IL-17 ile beraber periferik kan örneklerinde anlamlı derecede yüksek olarak artış gösteren IL-1 β 'nin katabolik bir faktör olarak kondrositlerin aktivitesini bozduğu gösterilmiştir. Birçok araştırma IL-1 β 'nin kondrositlerdeki ESM bileşenlerinin sentezini engelleyerek, tip 2 kollajen (Col2A1) ve agrekan (ACAN) gibi temel yapısal proteinlerin sentezini etkilediğini ve proinflamatuvar sitokinlerin üretimini artırarak kondrositlerde apoptozu tetiklediğini göstermiştir (34-36). Bu bulgular eklem kıkırdığı ve matriksinin homeostazın korunmasında IL-1 β 'nin önemli rolü olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda çalışmada periferik kan örneklerinde IL-1 β protein seviyesinin yüksek bulunması ve kıkırdak dokusundaki IL-6 protein seviyelerinin artmış olarak gözlenmesi, kandaki IL-1 β seviyelerinin subkondral kemik tabakasında IL-6 düzeylerini etkilediğini düşündürmektedir. IL-1 β , IL-6'nın üretilmesini doğrudan uyarıcı bir sitokindir (37). IL-6 normal koşullarda düşük miktarlarda kondrositlerde üretilmektedir (38). IL-6'nın kıkırdak üzerindeki etkileri diğer sitokinlerle benzerdir, ayrıca osteoklast farklılaşması ve kemik resorpsiyonu başlatıcı etken olduğu için önemli bir sitokindir (39-41). İnflamas-

yon oluşum süreci birbirini tetikleyen moleküllerden oluştuğu için, IL-6'nın kırıkdağ dokusundaki artışı IL-1β'nin aktifleşmesi ile açıklanabilir. Bununla beraber OA'da sinoviyal IL-6'nın yüksek seviyeleri sistemik CRP düzeyleri ile bağdaştırılmış (21), benzer şekilde bu çalışmada da kırıkdağ dokusunda yüksek IL-6 protein düzeyleri ile beraber artmış sistemik CRP seviyeleri görülmüştür. Çalışmanın sonucunda CRP düzeyleri ile birlikte IL-17, IL-1β ve IL-6 proinflatuvar sitokin ekspresyonlarının artışının hastalığın gelişmesinde ve ilerlemesinde önemli etkenlerden olabileceği görülmüştür.

SONUÇ

Son yıllarda OA patogenezini değiştirebilecek olan araştırmalara ilgi artmıştır. Kırıkdağın dejenerasyonuna neden olan moleküllerin belirlenmesi, etki eden faktörlerin araş-

tırılması ve sonucunda hastalığı önleyici yaklaşımlar oluşturulması önem teşkil etmektedir. Hastalıktan sorumlu olan etkenler daha iyi anlaşıldıkça, rejeneratif tıp ve doku mühendisliği ile eklem kırıkdağı harabiyetleri için yeni tanı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi olasıdır. Bu çalışma ile hastalığın tanısı, prognozu ve gelecekteki terapötik müdahaleleri için biyomarker seçilmesinde yardımcı olabilecek aday sitokinlerin değerlendirilmesi yapılmış ve ciddi sosyoekonomik kayıplara neden olan OA'nın tanı-tedavi sürecinde kolaylık sağlayabilecek moleküller gösterilmiştir. OA tanılı hastaların incelediğimiz örneklerinde sinovyumunun biyokimyasal olarak zarar görmesi sonucu sitokinlerin aktivitesinin yükseldiği ortaya konulmuştur. Bulgularımız bu sitokinlerin OA patofizyolojisinde yer alan önemli katabolik medyatörler arasında olduğunu göstermiştir.

KAYNAKLAR

- Glyn-Jones S, Palmer AJ, Agricola R, Price AJ, Vincent TL, Weinans H, Carr AJ. Osteoarthritis. *Lancet* 2015; 386(9991):376-87.
- Mobasher A, Batt M. An update on the pathophysiology of osteoarthritis. *Ann Phys Rehabil Med* 2016; 59(5-6):333-9.
- Hosnijeh FS, Runhaar J, van Meurs JB, Bierma-Zeinstra SM. Biomarkers for osteoarthritis: Can they be used for risk assessment? A systematic review. *Maturitas* 2015; 82(1):36-49.
- Ishijima M, Kaneko H, Kaneko K. The evolving role of biomarkers for osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2014; 6(4):144-53.
- Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: Structure, composition, and function. *Sports Health* 2009; 1(6):461-8.
- Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000; 118(2):503-8.
- Mabey T, Honsawek S. Cytokines as biochemical markers for knee osteoarthritis. *World J Orthop* 2015; 6(1):95-105.
- Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2011; 7(1):33-42.
- Tsuchida AI, Beekhuizen M, Hart MC, Radstake TR, Dhert WJ, Saris DB, van Osch GJ, Creemers LB. Cytokine profiles in the joint depend on pathology, but are different between synovial fluid, cartilage tissue and cultured chondrocytes. *Arthritis Res Ther* 2014; 16(5):441.
- Orita S, Koshi T, Mitsuka T, Miyagi M, Inoue G, Arai G, Ishikawa T, Hanaoka E, Yamashita K, Yamashita M, Eguchi Y, Toyone T, Takahashi K, Ohtori S. Associations between proinflammatory cytokines in the synovial fluid and radiographic grading and pain-related scores in 47 consecutive patients with osteoarthritis of the knee. *BMC Musculoskelet Disord* 2011; 12:144.
- Rigoglou S, Papavassiliou AG. The NF-kappaB signalling pathway in osteoarthritis. *Int J Biochem Cell Biol* 2013; 45(11):2580-4.
- Sactan N, Honsawek S, Tanavalee A, Tantavisut S, Yuktanandana P, Parkpian V. Association of plasma and synovial fluid interferon-gamma inducible protein-10 with radiographic severity in knee osteoarthritis. *Clin Biochem* 2011; 44(14-15):1218-22.
- Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteo-arthrosis. *Ann Rheum Dis* 1957; 16(4):494-502.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25(4):402-8.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012; 9(7):671-5.
- Hame SL, Alexander RA. Knee osteoarthritis in women. *Curr Rev Musculoskelet Med* 2013; 6(2):182-7.
- Jafarzadeh SR, Felson DT. Updated estimates suggest a much higher prevalence of arthritis in United States Adults Than Previous Ones. *Arthritis Rheumatol* 2018; 70(2):185-92.
- Murphy L, Schwartz TA, Helmick CG, Renner JB, Tudor G, Koch G, Dragomir A, Kalsbeek WD, Luta G, Jordan JM. Lifetime risk of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2008; 59(9):1207-13.

19. Kaufman KR, Hughes C, Morrey BF, Morrey M, An KN. Gait characteristics of patients with knee osteoarthritis. *J Biomech* 2001; 34(7):907-15.
20. Rahmati M, Mobasheri A, Mozafari M. Inflammatory mediators in osteoarthritis: A critical review of the state-of-the-art, current prospects, and future challenges. *Bone* 2016; 85:81-90.
21. Pearle AD, Scanzello CR, George S, Mandl LA, DiCarlo EF, Peterson M, Sculco TP, Crow MK. Elevated high-sensitivity C-reactive protein levels are associated with local inflammatory findings in patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2007; 15(5):516-23.
22. Sturmer T, Brenner H, Koenig W, Gunther KP. Severity and extent of osteoarthritis and low grade systemic inflammation as assessed by high sensitivity C reactive protein. *Ann Rheum Dis* 2004; 63(2):200-5.
23. Uson J, Balsa A, Pascual-Salcedo D, Cabezas JA, Gonzalez-Tarrio JM, Martin-Mola E, Fontan G. Soluble interleukin 6 (IL-6) receptor and IL-6 levels in serum and synovial fluid of patients with different arthropathies. *J Rheumatol* 1997; 24(11):2069-75.
24. Mohr S, Liew CC. The peripheral-blood transcriptome: New insights into disease and risk assessment. *Trends Mol Med* 2007; 13(10):422-32.
25. Ling SM, Patel DD, Garner P, Zhan M, Vaduganathan M, Muller D, Taub D, Bathon JM, Hochberg M, Abernethy DR, Metter EJ, Ferrucci L. Serum protein signatures detect early radiographic osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2009; 17(1):43-8.
26. Gu C, Wu L, Li X. IL-17 family: Cytokines, receptors and signaling. *Cytokine* 2013; 64(2):477-85.
27. Shahrara S, Pickens SR, Mandelin AM, 2nd, Karpus WJ, Huang Q, Kolls JK, Pope RM. IL-17-mediated monocyte migration occurs partially through CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 induction. *J Immunol* 2010; 184(8):4479-87.
28. Snelling SJ, Bas S, Puskas GJ, Dakin SG, Suva D, Finckh A, Gabay C, Hoffmeyer P, Carr AJ, Lubbeke A. Presence of IL-17 in synovial fluid identifies a potential inflammatory osteoarthritic phenotype. *PLoS One* 2017; 12(4):e0175109.
29. Chen B, Deng Y, Tan Y, Qin J, Chen LB. Association between severity of knee osteoarthritis and serum and synovial fluid interleukin 17 concentrations. *J Int Med Res* 2014; 42(1):138-44.
30. Tanaka K, Itoh S, Shimizu N. Structure and regulation of expression of corticotropin-releasing hormone (CRH) gene and processing of CRH-precursor. *Nihon Rinsho* 1989; 47(10):2146-51.
31. Wang K, Xu J, Cai J, Zheng S, Yang X, Ding C. Serum levels of resistin and interleukin-17 are associated with increased cartilage defects and bone marrow lesions in patients with knee osteoarthritis. *Mod Rheumatol* 2017; 27(2):339-44.
32. Zhang X, Yuan Y, Pan Z, Ma Y, Wu M, Yang J, Han R, Chen M, Hu X, Liu R, Sam NB, Xu S, Pan F. Elevated circulating IL-17 level is associated with inflammatory arthritis and disease activity: A meta-analysis. *Clin Chim Acta* 2019; 496:76-83.
33. Wang Z, Zheng C, Zhong Y, He J, Cao X, Xia H, Ba H, Li P, Wu S, Peng C. Interleukin-17 can induce osteoarthritis in rabbit knee joints similar to Hulth's Method. *Biomed Res Int* 2017; 2017:2091325.
34. Cheng W, Wu D, Zuo Q, Wang Z, Fan W. Ginsenoside Rb1 prevents interleukin-1 beta induced inflammation and apoptosis in human articular chondrocytes. *Int Orthop* 2013; 37(10):2065-70.
35. Yang B, Kang X, Xing Y, Dou C, Kang F, Li J, Quan Y, Dong S. Effect of microRNA-145 on IL-1beta-induced cartilage degradation in human chondrocytes. *FEBS Lett* 2014; 588(14):2344-52.
36. Qiu B, Gong M, He QT, Zhou PH. Controlled Release of Interleukin-1 Receptor Antagonist from Hyaluronic Acid-Chitosan Microspheres Attenuates Interleukin-1beta-Induced Inflammation and Apoptosis in Chondrocytes. *Biomed Res Int* 2016; 2016:6290957.
37. Bender S, Haubeck HD, Van de Leur E, Dufhues G, Schiel X, Lauwerijns J, Greiling H, Heinrich PC. Interleukin-1 beta induces synthesis and secretion of interleukin-6 in human chondrocytes. *FEBS Lett* 1990; 263(2):321-4.
38. Wojdasiewicz P, Poniatowski LA, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm* 2014; 2014:561459.
39. Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: Interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15(1):49-60.
40. Chenoufi HL, Diamant M, Rieneck K, Lund B, Stein GS, Lian JB. Increased mRNA expression and protein secretion of interleukin-6 in primary human osteoblasts differentiated in vitro from rheumatoid and osteoarthritic bone. *J Cell Biochem* 2001; 81(4):666-78.
41. Poree B, Kypriotou M, Chadjichristos C, Beauchef G, Renard E, Legendre F, Melin M, Gueret S, Hartmann DJ, Mallein-Gerin F, Pujol JP, Boumediene K, Galera P. Interleukin-6 (IL-6) and/or soluble IL-6 receptor down-regulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes requires a decrease of Sp1.Sp3 ratio and of the binding activity of both factors to the COL2A1 promoter. *J Biol Chem* 2008; 283(8):4850-65.