

Araştırma Makalesi

Mersin Üniv Sağlık Bilim Derg 2020;13(1):97-106

doi: 10.26559/mersinsbd.628048

Primer diz osteoartrit hastalarında VEGFA ve HIF1-A gen ekspresyon seviyelerinin araştırılması

Ahu Soyocak¹, Didem Turgut Coşan², Merih Özgen³, Hülyam Kurt²,
Fezan Şahin Mutlu⁴

¹ Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD., Tıp Fakültesi, İstanbul Aydın Üniversitesi, Türkiye

² Tıbbi Biyoloji AD, Tıp Fakültesi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Türkiye

³ Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon AD, Tıp Fakültesi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Türkiye

⁴ Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim AD, Tıp Fakültesi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Türkiye

Öz

Amaç: Osteoartrit (OA); kırık yapıyı ve yıkımı arasındaki dengenin bozulması ile ortaya çıkan, biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler ile karakterize bir hastalıktır. Anjiyogenez ve inflamasyon süreçlerinin OA'ın gelişmesi ve ilerlemesiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Yapılan araştırmalar vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve hipoksi ile indüklenen faktör (HIF) gibi anjiyogenik faktörlerin OA'nın gelişiminde rol oynayabileceğini göstermektedir. Bu çalışmada OA hastalarının periferik mononükleer kan hücrelerinde (PMKH) VEGFA ve HIF1A gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi ve bu genlerin hastalığın evreleri ile olan ilişkisinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. **Yöntem:** Diz osteoartriti tanısı almış 97 hasta ve 41 sağlıklı gönüllünün PMKH'lerinde VEGFA ve HIF1A mRNA ekspresyonları kantitatif real-time PCR (qRT-PCR) ile araştırıldı. Gönüllülerden alınan periferik kan örneklerinden PMKH'leri yoğunluk gradyanlı santrifüjleme ile izole edildi. Elde edilen hücrelerden cDNA sentezi sonrası spesifik primer-prob setleri kullanılarak qRT-PCR ile gen ekspresyon seviyeleri belirlendi. **Bulgular:** Hasta ve kontrol grupları arasında VEGFA ve HIF1A gen ekspresyonları arasında pozitif bir korelasyon ($p < 0.001$) vardı. Bunun yanında, VEGFA ve HIF1A gen ekspresyon seviyelerinin, hasta ve kontrol grubu arasında ($p > 0.05$) ve hastalığın evreleri arasında ($p > 0.05$) istatistiksel olarak fark göstermediği belirlendi. **Sonuç:** Çalışmamızda OA PMKH'lerinde VEGFA ve HIF1A gen ekspresyonlarının birbiriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Çalıştığımız gen ekspresyonları evrelerine göre diz osteoartritin tanısında biyokimyasal marker olarak yeterli olmasa da, yapılacak ileri çalışmalarla potansiyel terapötik hedef olarak hizmet edebileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Osteoartrit, VEGFA, HIF1A, PMKH, Gen Ekspresyonu

Yazının geliş tarihi: 01102019

Yazının kabul tarihi: 13.02.2020

Sorumlu yazar: Ahu Soyocak, İstanbul Aydın Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 34295 İstanbul, Türkiye.

Tel: 0 444 1 428/ 52603

E posta: ahusoyocak@aydin.edu.tr

Investigation of VEGFA and HIF1-A gene expression levels in primary knee osteoarthritis patients

Abstract

Aim: Osteoarthritis (OA); is a disease characterized by biochemical and morphological changes caused by disruption of the balance between cartilage production and destruction. Angiogenesis and inflammation have been shown to be closely related processes to the development and progression of OA. Related research has shown that angiogenic factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and hypoxia-induced factor (HIF) may play a role in the development of OA. The aim of this study was to determine the levels of VEGFA and HIF1A gene expression in peripheral mononuclear blood cells (PBMC) of OA patients and to determine the relationship between these genes and disease grades. **Method:** VEGFA and HIF1A mRNA expression in PBMCs of 97 patients with knee osteoarthritis and 41 healthy volunteers were investigated by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). PBMCs were isolated from the peripheral blood samples from volunteers by density gradient centrifugation. Gene expression levels were determined by qRT-PCR using specific primer-probe sets after cDNA synthesis from the obtained cells. **Results:** There was a positive correlation ($p < 0.001$) between VEGFA and HIF1A gene expressions between patient and control groups. In addition, VEGFA and HIF1A gene expression levels were not statistically different between the patient and control groups ($p > 0.05$) and between the grades of the disease ($p > 0.05$). **Conclusion:** In our study, it was shown that VEGFA and HIF1A gene expressions are correlated in OA PBMCs. Although the gene expression we studied was not sufficient as a biochemical marker in the diagnosis of knee osteoarthritis, it was concluded that it could serve as a potential therapeutic target with further studies.

Keywords: Osteoarthritis, VEGFA, HIF1A, PMKH, Gene Expression

Giriş

Osteoartrit (OA) kıkırdak, kemik ve sinoviyal dokularda çeşitli travmatik, biyomekanik, gelişimsel, metabolik ve genetik faktörlerin etkisiyle meydana gelen kıkırdak yapımı ve yıkımı arasındaki dengenin bozulması ile ortaya çıkan, biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler ile karakterize bir hastalıktır.¹ Non-inflamatuvar bir hastalık olarak bilinmesine rağmen son zamanlarda yapılan çalışmalarda, sinovitin ve düşük derece inflamasyonun OA patofizyolojisinde rol oynadığı gösterilmiştir.^{2,3} Kıkırdak metabolizmasında yer alan enzimlerdeki değişiklikler tek başına OA'daki yıkımı açıklayamamaktadır.⁴ OA ile ilişkili risk faktörleri hastalığın gelişiminde, ilerlemesinde, radyografik ya da semptomatik oluşunda göreceli olarak tutulan eklem ve hastalığın evresine göre değişkenlik göstermektedir.⁵⁻⁸ OA'ın gelişmesi ve ilerlemesinde, anjiyogenez ve inflamasyon yakından ilişkili süreçler olarak gösterilmektedir. İnflamasyon süreci

anjiyogenez uyarabilir ve anjiyogenez de inflamasyonu kolaylaştırabilir. Ayrıca anjiyogenez, kondrosit hipertrofi ve endokondral ossifikasyonu geliştirerek eklemdaki radyolojik değişikliklere katkıda bulunur.^{9,10}

İnflamatuvar mediatörler doğrudan veya dolaylı olarak anjiyogenez uyarabilirler. Makrofaj ve mast hücreleri gibi bu faktörleri üreten inflamasyon hücreleri kronik olarak iltihaplanmış osteoartrit sinoviyumunda bol miktarda bulunur. Makrofajlar tarafından anjiyogenez indükleyebilen bazı genel mekanizmalar vardır. Yeni damarların büyümesi makrofajlardan salgılanan bu faktörlerle direk olarak uyarılabilir.⁹

Sinovit ve tümörlerde meydana gelen anormal anjiyogenezlerin çoğunda makrofajlar bulunabilir. Makrofajlar tarafından üretilen inflamatuvar mediatörlerin çoğu in vivo anjiyogenez indükler. Makrofajlar vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi anjiyogenik

faktörler üretmek için endotel hücreleri ve fibroblastlar gibi diğer hücreleri uyaran faktörleri de salgılayabilir.¹¹⁻¹³

VEGF, ilk defa tümörlerin asit sıvısı akımını arttıran bir permeabilite faktörü olarak bulunmuştur. VEGF ailesi üyeleri endotel hücre büyümesi, vaskülogenez ve anjiyogenezde önemli bir rol oynan aracı moleküllerdir. Bu protein ailesi, endotel hücrelerin çoğalmasına ve göç etmesine neden olarak yeni damarların oluşmasını sağlamaktadır. Anjiyogenik bir faktör olan VEGF, nitrik oksit (NO) salınımını ve NO aracılı vazodilatasyonu uyarmaktadır. VEGF monositler gibi bazı kan hücreleri için güçlü bir kemotaktik ajan olarak rol oynamaktadır. VEGF ailesi VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F ve plasenta büyüme faktörü (PGF) olmak üzere yedi üyeden oluşmaktadır.^{14,15}

VEGF'nin iskelet gelişiminde ve kemik remodelinginde görev almasından dolayı osteoartrit patogenezinde aktif rol oynadığı düşünülmektedir.¹⁶ VEGF aktivitesi, osteoblastların sağ kalımını, kemotaktik göçünü ve aktivitesini doğrudan etkileyerek kemik oluşumunu ve kemik iyileşmesini destekler.¹⁶ VEGF'in kemik gelişimi üzerinde üç önemli etkisi vardır: (a) intramembranöz veya enkondral kemik gelişiminde anjiyogenezin indüksiyonu sağlamak, (b) hipertrofik kırıkda osteoklastik hücrelerin kemotaktik göçünü ve osteoblastik aktivasyonuna neden olmak ve (c) osteoblast ve rejenere kemiğin mineralizasyonunu artırıp farklılaşmayı teşvik ederek osteoprogenitör hücreler üzerine doğrudan etkilemek.¹⁷ Dolayısıyla, pro-anjiyogenik sitokin VEGF, osteoartrit teşhisi için umut verici bir biyolojik belirteç ve terapötik hedef olarak görülmektedir.¹⁶ Hem plazma hem de sinoviyal sıvılardaki yüksek VEGF düzeylerinin diz osteoartritinin radyografik şiddeti ile pozitif korelasyona sahip olduğunu destekleyen kanıtlar vardır.¹⁸ VEGF'nin artmış ekspresyonunun osteoartrit kırıkdağında meydana geldiği ve bunun subkondral kemikten eklem kırıkdağına kadar kan damarlarının büyümesini teşvik ederek osteoartrit ilerlemesine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.¹⁸ Bununla birlikte, bazı çalışmalar VEGF ve osteoartrit arasında anlamlı bir ilişki bulamamıştır.^{18,19}

Hipoksik koşullar anjiyogenez için potansiyel bir uyaran olarak görev yapmaktadır.²⁰ Hipoksi'ye karşı oluşan sinyal iletim yanıtında transkripsiyon faktörü olan hipoksi ile indüklenen faktörler (HIF1, HIF2 ve HIF3) görev almaktadır.¹⁰ Bu transkripsiyon faktörleri hedef genlerin enhancer bölgesinde yer alan hipoksiye cevap elementi (HRE) olarak tanımlanan diziye bağlanarak hedef genlerin ifade edilmelerini sağlamaktadır.^{10,21} Böylece enerji metabolizması, anjiyogenez, eritropoez, hücre proliferasyonu ve apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyonunun düzenlenmesine katkı sağlarlar.²⁰ HIF1'in anjiyogeneze katkısının damar olgunlaşmasında yer alan ilave hedef genleri de işin içine çekerek VEGF indüksiyonundan daha karmaşık bir mekanizma ile gerçekleştirdiği düşünülmektedir.^{21,22} OA'nın ortaya çıkmasına neden olana aşırı mekanik yüklemenin, HIF1A ve HIF2A aracılığı ile kondrositlerde VEGF'nin upregülasyonunu uyardığı düşünülmektedir.²³

OA kırıkdağ dokusunda yapılan araştırmalarda, HIF ve VEGF gen ekspresyonlarının pozitif yönde korele olduğu gösterilmiş, aynı zamanda bu iki faktörün ekspresyonunun hastalığın evreleriyle de pozitif yönde korele olduğu ve böylece diz osteoartriti için biyokimyasal marker ve potansiyel terapötik hedef olarak hizmet edebileceği önerilmiştir.²⁴ Bununla birlikte diz osteoartrit hastalarının periferik mononükleer kan hücrelerinde bu genlerin ekspresyonlarının incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada OA hastalarının periferik mononükleer hücrelerinde VEGFA ve HIF1A gen ekspresyon seviyelerinin ve gen ekspresyon seviyelerinin hastalığın evreleri arasındaki ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem

Çalışma grubu

Çalışmamız Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (Karar no:2018/15). Çalışmaya katılan tüm katılımcılar sözlü ve yazılı olarak bilgilendirildi ve aydınlatma

onam formları alındı. Çalışmaya Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Fiziksel Tıp ve Diz Ağrısı Rehabilitasyonu Anabilim Dalı'na başvuran diz osteoartriti olan 97 hasta ve 41 sağlıklı gönüllü alındı. Amerikan Romatoloji Derneği (ARD) kriterlerine göre tanı konulan primer diz OA hastaları²⁵, Kellgren ve Lawrence skor sistemine göre sınıflandırıldı.²⁶

Periferik mononükleer kan hücre (PMKH) eldesi

Çalışma grubu bireylerinden etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) içeren tüplere venöz kan (8 ml) alındı. Alınan kan örnekleri steril bir tüp içerisinde fosfat tamponlu tuz (phosphate buffer saline, PBS) (L1815 Biochrom, Berlin, Almanya) ile 1:1 oranında seyreltildi. 8 ml seyreltilen kan örneği içerisinde 8 ml ficoll (Bicoll Separation Solution L6113 Biochrom, Berlin, Almanya) bulunan steril bir tüpe pastör pipeti yardımıyla yavaş yavaş eklendi ve 2000 rpm'de 18°C'de 25 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası ara fazda toplanan mononükleer hücreler pipetle toplanarak, steril PBS ile 2500 rpm'de 18°C'de 5 dk iki kez yıkandı. Yıkama sonrası PMKH'ler üzerine 1 ml PBS eklendikten sonra hücreler -80°C de saklandı.

RNA izolasyonu

Mononükleer hücrelerden RNA izolasyonu ticari kit (AM1560, Applied Biosystems, California, USA) ile gerçekleştirildi. Elde edilen RNA'ların saflığı nanodrop spektrofotometre cihazında (Nanodrop™ Thermo Fisher Scientific, Vanta, Finland) belirlendi. RNA miktarları belirlenen örnekler daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -80 °C'de saklandı.

Komplementer DNA (cDNA) hazırlanması

VEGFA ve HIF1A gen ifadesini belirlemek için cDNA sentezi High-Capacity cDNA revers transkripsiyon kiti (Applied Biosystems, California, USA) kullanılarak gerçekleştirildi. Kit prosedürüne göre hazırlanan revers transkripsiyon reaksiyon karışımı, cDNA sentezi için PCR cihazında (Life Technologies sacem, SCM 96G, Türkiye) 10 dk 25 °C'de, 120 dk 37 °C'de, 5 dk 85 °C'de inkübe edildi. Elde edilen cDNA'lar Real Time

PCR aşamasında kullanılmaya kadar -20 °C de saklandı.

Kantitatif real-time RT-PCR (qRT-PCR)

Mononükleer hücrelerde incelenecek hedef gen ifadeleri, elde edilen cDNA'lar aracılığı ile Real Time PCR (Stratagene, Mx3000p, California, USA) cihazında belirlendi. VEGFA ve HIF1A gen ifadesini belirlemek için cDNA (RT reaksiyon ürünü), Primer-Prob (TagMan® Gene Expression Assay (20X)), PCR Master Mix (TagMan® Gen Ekspresyon Master Miks) ve nükleaz içermeyen su karışımı hazırlandı. Reaksiyon karışımı 2 dk 50°C, 10 dk 95°C'de inkübe edildikten sonra, 15 sn 95°C, 60 sn 60°C (40 döngü) koşulunda Real Time PCR cihazında okutuldu. VEGFA (Hs00900055_m1, Applied Biosystems) ve HIF1A (Hs00153153_m1, Applied Biosystems) hedef gen ifadeleri 18S RNA (Hs99999901_s1, Applied Biosystems) housekeeping gen ile normalize edildi. Gen ifadeleri Real-Time PCR cihazından elde edilen Ct değerleri kullanılarak $2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct_{gen} - Ct_{housekeeping\ gen})}$ formülüne göre hesaplandı.²⁷ Real-time PCR da yapılan her okumada cDNA kalıbı içermeyen kontrol grubu da (no template control, NTC) okundu.

İstatistiksel Analiz

Sürekli değişkenler Shapiro Wilk testi kullanılarak değerlendirildi. Sürekli değişkenler ortanca (%25-%75) değer olarak, kategorik değişkenler frekans (yüzde) olarak gösterildi. Gruplar arasındaki sürekli değişkenlerin karşılaştırılması *Mann-Whitney U* veya *Kruskal-Wallis* tek yönlü varyans analizleri kullanılarak *rank testi* ve *posthoc* grup karşılaştırmalarıyla değerlendirildi. Kategorik değişkenlerin gruplar arasında karşılaştırılmasında ki-kare analizi kullanıldı. Değişkenler arasındaki ilişkiyi araştırmak için Spearman korelasyon analizi kullanıldı. p <0.05 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analizler bilgisayar ortamında yapıldı.

Bulgular

Çalışmamızda OA hastalarının periferik mononükleer hücrelerinde VEGFA ve HIF1A gen ekspresyon seviyeleri belirlendi. VEGFA ve HIF1A gen ekspresyon

seviyeleri ile hastalığın evreleri arasındaki ilişki incelendi. Çalışma grubunun hastalık evreleri, cinsiyet, yaş ve BMI değerleri Tablo 1’ de özetlendi. Hasta ve kontrol grubu gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında, VEGFA ve HIF1-A gen ekspresyon seviyeleri açısından istatistiksel bir fark gözlenmedi (Tablo 2). VEGF ve HIF1A gen ekspresyon seviyeleri hastalık evrelerine göre

incelendiğinde, evreler arasında da istatistiksel bir fark görülmedi (Tablo 3). Sağlıklı ve hasta grubunda VEGF ve HIF1A gen ekspresyonları arasında pozitif bir korelasyon olduğu bulundu (Tablo 4). Bu korelasyon evreler açısından değerlendirildiğinde, evre bir hariç, VEGF ve HIF1A gen ekspresyonları arasında pozitif bir korelasyon olduğu görüldü (Tablo 5).

Tablo 1. Çalışma grubunun hastalık evreleri, cinsiyet, yaş ve BMI değerleri

Gruplar	Cinsiyet n (%)		Evreler	Yaş (yıl) Ortanca (%25-%75)	BMI (kg/m ²) Ortanca (%25-%75)
	Kadın	Erkek			
Sağlıklı kontroller (n=41)	34 (%82.9)	7 (%17.1)	Evre 0 (n=41)	31 (24-41.5)	24.61 (21.36-26.84)
Osteoartrit hastaları (n=97)	81 (%83.5)	16 (%16.5)	Evre 1 (n=7)	46 (42-52)	24 (23.10-29.71)
			Evre 2 (n=31)	55 (46-64)	29.71 (26.30-30.08)
			Evre 3 (n=33)	60 (53-66)	29.9 (26.51-32.51)
			Evre 4 (n=26)	68 (63-74.5)	2,9 (26.51-35.71)
P değeri	1.000		p değeri	<0.001	<0.001
			Post Hoc çoklu karşılaştırma	0-2, 0-3, 0-4, 1-4, 2-4	0-2, 0-4, 0-3

Tartışma

Anjiyogenez ve inflamasyon süreçlerinin, OA hastalığının ilerlemesinde ve hastalık kaynaklı ağrı mekanizmasında etkili olabileceği bildirilmektedir. OA patofizyolojisinde anjiyogenez ve inflamasyonun önemli bir rol oynadığını gösteren kanıtlar doku örneklerinde ve kemik hücrelerinde yapılan çalışmalardan sağlanmıştır.

Yapılan bu araştırmada VEGF ve HIF gibi anjiyogenik faktörlerin, diz OA hastalarının PMKH’lerindeki ekspresyonlarının belirlenmesi ve gen ekspresyon seviyelerinin hastalığın evreleri arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Tablo 2. Sağlıklı kontrol ve OA hasta grupları arasında VEGFA ve HIF1-A gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması

Genler	Sağlıklı kontroller (n=41)	Osteoartrit hastaları (n=97)	p değeri
VEGFA	1.39	1.17	p=0.198
Ortanca (%25-%75)	(0.91-2.00)	(0.77-2.01)	
HIF1A	24.79	24.96	p=0.787
Ortanca (%25-%75)	(16.93-42.88)	(15.75-38.77)	

2014 yılında yapılan bir meta-analizde, OA patogenezi ve VEGF ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişki incelenmiştir. Analiz sonuçlarına göre OA patogenezinin yüksek VEGF ekspresyonu ile güçlü bir korelasyona sahip olduğu bulunmuştur.²⁸ Saetan ve ark.ları yaptıkları çalışmada, 20 sağlıklı gönüllü ile 80 primer diz OA hastasının hem plazma hem de sinoviyal sıvısında ELISA yöntemi ile VEGF düzeyini incelemişlerdir. VEGF düzeyinin sinoviyal sıvıda plazmaya göre on kat daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Plazma ve sinoviyal sıvısındaki yüksek VEGF düzeyinin diz OA'sının radyografik şiddeti ile pozitif korelasyona sahip olduğunu göstermişlerdir.¹⁸ Abdel-Magied ve ark.ları²⁹, 30 diz OA hastası ve 30 kontrolde, ELISA yöntemi ile VEGF'nin serum ve sinovyal

sıvıdaki seviyelerini belirlemişlerdir. Hasta ve kontrol grupları arasında serum VEGF seviyelerinde bir fark olmadığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte diz OA hastalarının radyografik şiddet ile serum ve sinoviyal sıvıdaki artan VEGF seviyeleri arasında anlamlı pozitif yönde korelasyon olduğunu gözlemlemişlerdir. Ballara ve ark.ları¹⁹, anjiyogenik sitokin olan VEGF serum seviyesini 44 erken dönem Romatoid Artrit (RA), 13 Psoriatik Artrit, 32 OA hastasında ve 31 sağlıklı kontrolde incelemişler ve serum VEGF konsantrasyonunun kontrol grubuna göre arttığı, bu artışın en fazla erken dönem RA hastalarında olduğunu belirlemişlerdir. Bununla birlikte soluble VEGF'ye aracılık eden sFlt-1 tirozin kinaz reseptörünün serum seviyesini incelediklerinde, kontrol grubuna göre yine erken dönem RA hastalarında anlamlı bir artış belirlemişler, OA'daki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gözlemlemişlerdir.¹⁹ Diz OA hastalarının PMKH örneklerinde yaptığımız çalışmamızda, kontrol grubuna göre VEGF ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

HIF1'in angiogeneze olan katkısının damar olgunlaşmasında yer alan ilave hedef genleri de işin içine çekerek VEGF indüksiyonundan daha karmaşık bir mekanizma ile gerçekleştirdiği düşünülmektedir.^{21,22} OA'nın ortaya çıkmasına neden olan aşırı mekanik yüklemenin, HIF1A ve HIF2A aracılığı ile kondrositlerde VEGF'nin upregülasyonunu uyardığı bildirilmektedir.²³

Tablo 3. Evrelere göre VEGFA ve HIF1A ekspresyon seviyeleri

Genler	Evreler				p değeri
	Evre 1 (n=7)	Evre 2 (n=31)	Evre 3 (n=33)	Evre 4 (n=26)	
VEGFA	1.02	1.15	1.19	1.23	
Ortanca (%25-%75)	(0.67-1.28)	(0.93-1.92)	(0.70-2.63)	(0.76-2.00)	0.606
HIF1A	17.77	28.08	19.72	27.45	
Ortanca (%25-%75)	(16.47-24.45)	(16.35-39.99)	(14.36-44.99)	(12.88-37.44)	0.692

Tablo 4. Sağlıklı kontroller ve osteoartrit hastalarında VEGFA ve HIF1A ekspresyon seviyelerinin korelasyonu

		HIF1A	
		Sağlıklı kontroller (n=41)	Osteoartrit hastaları (n=97)
VEGFA	r	0.864	0.752
	p	<0.001	<0.001

Zhu ve ark.ları³⁰ osteositik fare hücre dizisi MLO-Y4'de yaptıkları çalışmada, hipoksik şartlarda HIF1 α 'nın JAK2/ STAT3 yolunu aktive ederek RANKL ekspresyonunu promote ettiğini ve in vitroda osteosit kaynaklı osteoklastik farklılaşmayı arttırdığını göstermiştir. HIF1 α ve osteositlerin fonksiyonunun kemik remodelingine katkısı olduğu ve terapötik bir hedef olarak kullanılabileceğini önermişlerdir.³⁰ OA'nın hedef dokusu olan eklem kıkırdağı kılcal ağlardan yoksun olduğundan hipoksik bir mikroçevreye sahiptir. Bu dokunun homeostazının düzenlenmesinde rolü olan HIF1 α 'nın diz OA hastalarında genetik polimorfizmlerini inceleyen bir araştırma yapılmıştır. Bu çalışmada 134 diz OA hastası ve 267 sağlıklı kontrolün genotiplenmesi yapılmış, genotipleme sonuçları diz OA gelişme riski açısından değerlendirilmiştir. HIF sinyal yolağında görevli moleküllerin gen-gen etkileşimlerinin bilinmesinin, diz OA gelişme riski yüksek olan bireyleri tanımlada yeni bir tanı destek aracı sağlayabileceği bildirilmiştir.³¹ Yapılan bu araştırmalarda belirtildiği gibi çalışmamızda da HIF1A gen ekspresyonunun diz OA hastalarının PMKH örneklerinde arttığı ancak bu artışın

istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir. OA kıkırdağ dokusunda yapılan bir araştırmada da, HIF2 α ve VEGF'nin mRNA ve protein seviyelerinin önemli derecede ve pozitif yönde korele olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda bu iki faktörün ekspresyonun hastalığın evreleriyle de pozitif yönde korele olduğu ve böylece HIF2 α ve VEGF'nin diz osteoartriti için biyokimyasal marker ve potansiyel terapötik hedef olarak hizmet edebileceği önerilmiştir.²⁴ Başka bir araştırmada hipoksik koşullar altında osteoartrit kondrositlerinde VEGF'nin etkisi incelenmiştir. VEGF üretiminin MAPK sinyal yolağı aracılığı ile HIF1 bağımlı veya bağımsız olarak yapılabildiği gösterilmiştir.³² Temporomandibular eklem osteoartriti (TME-OA) hayvan modelinde, anjiyogenezin VEGF, HIF1 ve Notch sinyal yolağındaki rolünün değerlendirildiği bir çalışmada, hipoksik koşulların TME-OA'da önemli bir oynadığı, anjiyogenezin hızlanması ile de VEGF, HIF1 ve Notch sinyal yolağının terapötik hedef olarak erken evre TME-OA'da kullanılabilceği bildirilmiştir.³³

Çalışma sonuçlarımız OA hastalarının PMKH'lerinde VEGFA ve HIF1A gen ekspresyonlarının pozitif yönde korele olduğunu göstermektedir. Bu korelasyon evreler açısından değerlendirildiğinde, evre 1 hariç, VEGF ve HIF1A gen ekspresyonları arasında pozitif bir korelasyon olduğu gözlenmiştir. Evre 1'de korelasyon görülmemesi, hastalık şiddetinin gen ekspresyonu üzerine etkili olacağını düşündürmüştür. Bunun yanında evre 1 grubundaki hasta sayısının diğer gruplara göre azlığı da istatistiksel sonucu etkilemiş olabilir.

Tablo 5. Evrelere göre VEGFA ve HIF1A ekspresyon seviyelerinin korelasyonu

		HIF1A				
		Evre 0 (n=41)	Evre 1 (n=7)	Evre 2 (n=31)	Evre 3 (n=33)	Evre 4 (n=26)
VEGFA	r	0.864	0.393	0.644	0.833	0.707
	p	<0.001	0.383	<0.001	<0.001	<0.001

OA'da anabolik ve katabolik aktiviteleri düzenleyen hücre uyarı yollarının tam olarak bilinmesi, eklemde kaybolan homeostazın yeniden yapılanması ve tamir mekanizmasının gelişmesi için oldukça değerlidir. Eklem hasarı veya tamiri sırasında çeşitli biyobelirteçler lenfatik dolaşıma ve sistemik dolaşıma salınmaktadır. Bu biyobelirteçlerin belirlenmesi, OA'nın erken dönemde saptanması, hastalığın seyrinin ve tedaviye cevabının izlenmesi için önemlidir. Bu nedenle hastalığın erken dönemlerinde eklemlerdeki değişimleri nicel, güvenilir ve duyarlı biçimde saptayabilecek yeni terapötik hedeflere ve alternatif yöntemlere ihtiyaç vardır. Bu ihtiyaca yönelik yeni terapötik hedef arayışı için yapılan çalışma sonuçlarımız gruplar arasında farklılıklar gözlenmesine rağmen bu farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olmadığını göstermektedir. Ancak PMKH'lerinde VEGFA ve HIF1A gen ekspresyonlarının pozitif yönde korele olması çalışmadan elde edilen değerli bir sonuçtur. Mevcut bulgular, hastalığın evrelerine göre alt örneklem gruplarının artırıldığı ileri çalışmaların sonucunda, hastalığın progresyonu hakkında fikir vermesi açısından, VEGFA ve HIF1A gen ekspresyonlarının değerli olabileceği izleniminin edinilmesine sebep olmuştur.

Yazar katkıları: Ahu Soyocak, hipotez oluşturma, örnek toplama, moleküler analizler, yorumlama, makale yazımı. Didem Turgut Coşan, hipotez oluşturma, moleküler analizler, yorumlama, makale yazımı. Merih Özgen, hipotez oluşturma, örnek toplama, yorumlama, makale yazımı. Hülyam Kurt, moleküler analizler, yorumlama, makale yazımı. Fezan Şahin Mutlu, istatistiksel analiz.

Çıkar çatışması: Yazarların bu çalışmayla ilgili herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Mali destek: Bu araştırma için herhangi bir mali destek alınmamıştır.

Kaynaklar

1. Sharma L, Kapoor D, Issa S. Epidemiology of osteoarthritis: an update. *Current opinion in rheumatology*. 2006;18(2):147-156.
2. Pelletier J, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: Potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*. 2001;44(6):1237-1247.
3. Saxne T, Lindell M, Månsson B, Petersson IF, Heinegård D. Inflammation is a feature of the disease process in early knee joint osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2003;42(7):903.
4. Van der Kraan PM, van den Berg WB. Anabolic and destructive mediators in osteoarthritis. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 2000;3(3):205-211.
5. Dennison E. Osteoarthritis epidemiology and classification. *Rheumatology*. 2003:1781-1792.
6. Tuncer T, Gilgil E. *Osteoartrit epidemiyolojisi ve risk faktörleri, Tanıdan tedaviye osteoartrit. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul*. 2007:9-20.
7. Bodur H. Dünyada ve Türkiye'de Osteoartrite Güncel Bakış; Epidemiyoloji ve Sosyoekonomik Boyut. *Türk Geriatri Dergisi*. 2011;14(Özel Sayı 1):7-14.
8. Patogenezi DCO. Kelley Romatoloji. *Ankara Güneş Kitapevi*. 2006:1493-1513.
9. Bonnet CS, Walsh DA. Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology*. 2005;44(1):7-16.
10. Schutze N. Angiogenesis in osteoarthritis. *Current Rheumatology Reviews*. 2008;4(3):206-209.
11. Lingen MW. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2001;125(1):67-

- 71.
12. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi B-Z. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(2):736-741.
 13. Ben-Av P, Crofford LJ, Wilder RL, Hla T. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: A potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS letters*. 1995;372(1):83-87.
 14. Hoeben ANN, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacological reviews*. 2004;56(4):549-580.
 15. Yazır Y, Gonca S, Filiz S, Dalçık H. Endotel hücreleri için önemli bir protein ailesi; vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), Ailenin üyeleri, yapısı ve sentezi. *Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2004;26:181-184.
 16. Neve A, Cantatore FP, Corrado A, Gaudio A, Ruggieri S, Ribatti D. In vitro and in vivo angiogenic activity of osteoarthritic and osteoporotic osteoblasts is modulated by VEGF and vitamin D3 treatment. *Regulatory peptides*. 2013;184:81-84.
 17. Çebi H, Aksahin E, Yuksel HY, Çelebi L, Aktekin CN, Hapa O, Muratli HH, Bicimoglu A. Plasma vascular endothelial growth factor levels are similar in subjects with and without osteoporosis. *Eklemler Hastalıkları Cerrahisi*. 2010;21(2):91-97.
 18. Saetan N, Honsawek S, Tanavalee A, Yuktanandana P, Meknavin S, Ngarmukos S, Tanpowpong T, Parkpian V. Relationship of plasma and synovial fluid vascular endothelial growth factor with radiographic severity in primary knee osteoarthritis. *International orthopaedics*. 2014;38(5):1099-1104.
 19. Ballara S, Taylor PC, Reusch P, Marmé D, Feldmann M, Maini RN, Paleolog EM. Raised serum vascular endothelial growth factor levels are associated with destructive change in inflammatory arthritis. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*. 2001;44(9):2055-2064.
 20. Qing L, Lei P, Liu H, Xie J, Wang L, Wen T, Hu Y. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α in synovial fluid and articular cartilage is associated with disease severity in knee osteoarthritis. *Experimental and therapeutic medicine*. 2017;13(1):63-68.
 21. Şahin Calapoğlu N. HIF-1: iki ucu keskin bıçak. *Smyrna Tıp Dergisi*. 2016;2:54-58.
 22. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *The FASEB journal*. 2002;16(10):1151-1162.
 23. Hamilton JL, Nagao M, Levine BR, Chen D, Olsen BR, Im H. Targeting VEGF and its receptors for the treatment of osteoarthritis and associated pain. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2016;31(5):911-924.
 24. Jian-Lin Z, Hong-Song F, Hao P, Shuang D, Shen C, Jian-Ping L, Bo Q, Jin-Qing W, Feng L. The relationship between HIF-2 α and VEGF with radiographic severity in the primary osteoarthritic knee. *Yonsei medical journal*. 2016;57(3):735-740.
 25. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*. 1986;29(8):1039-1049.
 26. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteoarthrosis. *Annals of the rheumatic diseases*. 1957;16(4):494.
 27. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nature protocols*. 2008;3(6):1101.

28. Yuan Q, Sun L, Li J-J, An C-H. Elevated VEGF levels contribute to the pathogenesis of osteoarthritis. *BMC musculoskeletal disorders*. 2014;15(1):437.
29. Abdel-Magied RA, AbuOmar HAS, Monir A, Higazi AA, Amal A. Synovial fluid level of vascular endothelial growth factor (VEGF) can predict functional status and radiological severity in patients with knee osteoarthritis (OA). *Int. J. Clin. Rheumatol*. 2019;14(1).
30. Zhu J, Tang Y, Wu Q, Ji Y, Feng Z, Kang F. HIF-1 α facilitates osteocyte-mediated osteoclastogenesis by activating JAK2/STAT3 pathway in vitro. *Journal of cellular physiology*. 2019;234(11):1–11.
31. Fernández-Torres J, Martínez-Nava GA, Zamudio-Cuevas Y, Martínez-Flores K, Gutiérrez-Ruíz MC, Gómez-Quiroz LE, Garrido-Rodríguez D, Muñoz-Valle JF, Oregón-Romero E, Lozada C. Impact of the gene-gene interactions related to the HIF-1 α signaling pathway with the knee osteoarthritis development. *Clinical Rheumatology*. 2019:1–11.
32. Murata M, Yudoh K, Nakamura H, Kato T, Inoue K, Chiba J, Nishioka K, Masuko-Hongo K. Distinct signaling pathways are involved in hypoxia-and IL-1-induced VEGF expression in human articular chondrocytes. *Journal of orthopaedic research*. 2006;24(7):1544–1554.
33. Chen Y, Zhao B, Zhu Y, Zhao H, Ma C. HIF-1-VEGF-Notch mediates angiogenesis in temporomandibular joint osteoarthritis. *American Journal of Translational Research*. 2019;11(5):2969.