

MikroRNA'lar ve Osteoartrit

**¹Ahu Soyocak, ²Merih Özgen, ¹Hülyam Kurt, ¹Didem Turgut Coşan,
¹İrfan Değirmenci, ¹Hasan Veysi Güneş**

¹Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir

²Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı,
Eskişehir

*email: asoyocak@gmail.com

ÖZET: Osteoartrit (OA) yaygın olarak görülen önemli bir eklem hastalığıdır ve klinik olarak tedavisi tam olarak mümkün değildir. Eklem kıkırdağındaki doku homeostazının bozulması sonucu ortaya çıkan OA'nın moleküler patofizyolojisinde biyokimyasal, metabolik ve genetik faktörlerin rol oynadığı düşünülmekte ancak etki mekanizması halen tam olarak bilinmemektedir. Kıkırdak homeostazını kontrol eden ekstrasellüler düzenleyicilerin ve intrasellüler sinyal mekanizmalarının anlaşılması OA için yeni terapötik hedeflerin tanımlanmasına katkı sağlayacaktır. Son zamanlarda, küçük kodlamayan RNA'ların bir sınıfı olan mikroRNA (miRNA)'ların gelişim, homeostaz ve bağışıklık fonksiyonlarında önemli rol oynadığı ve miRNA'ların kanserden inflamasyona kadar çoğu hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir. mRNA yıkılması veya translasyon baskılanması ile gen ekspresyonunu düzenleyen miRNA'ların, çeşitli hastalıklardaki rollerinin öğrenilmesi onların yeni bir biyobelirteç olarak değerlendirilmesine yol açmaktadır. miRNA'ların ekspresyonlarının hücre kaderinin belirlenmesindeki önemli rolü dışında, özel immün cevabı ve inflamatuvar uyarıyı da düzenledikleri belirlenmiştir. Eklem kıkırdağında miRNA ekspresyonlarının araştırılması OA gibi hastalıklarda hedeflerin tanımlanmasına imkan sağlayabilecektir. Eklem hasarı veya tamiri sırasında çeşitli biyobelirteçler menisküs ve ligamentler, eklem kıkırdağı, kemik doku, osteofitler ve sinoviyal zardan salınarak sinoviyal sıvı havuzuna ve buradan da lenfatik dolaşıma ve sistemik dolaşıma katılmaktadır. Bu biyobelirteçlerin serum, idrar veya kanda belirlenmesi, OA'nın erken dönemde saptanması, hastalığın seyrinin ve tedaviye cevabının izlenmesi için önemlidir. Bu nedenlerle yapılan çalışmalarda, OA mekanizmasının anlaşılmasına katkı sağlamak için yeni bir terapötik hedef olan miRNA'ların OA patofizyolojisindeki rollerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Bu derlemede post-transkripsiyonal düzenlemede görevli miRNA'ların, OA'nın moleküler mekanizmasındaki rolleri incelenmektedir. Özet olarak, miRNA'ların tanı ve tedavide önemli potansiyele sahip olabileceği ve OA'nın tedavi edilmesi için yeni bir yol sağlayabileceği önerilmektedir.

ANAHTAR KELİMELELER: Osteoartrit, mikroRNA

MicroRNAs AND OSTEOARTHRITIS

ABSTRACT: Osteoarthritis (OA) is most common musculoskeletal disorder and its full treatment is not possible clinically. The pathogenesis of OA involves the degradation of tissue homeostasis in articular cartilage, but many of the underlying biochemical, metabolic and genetic factors remain largely unknown. Understanding the extracellular regulators and the intracellular signaling mechanisms controlling the cartilage homeostasis will contribute to the identification of new therapeutic targets for OA. Recently, it is shown that microRNAs (miRNAs), which are a subgroup of small non-coding RNAs, play an important role in terms of development, homeostasis and immunity functions; and that miRNAs are connected to several diseases from cancer to inflammation. miRNAs regulating gene expression with mRNA degradation or suppression of translation have roles in various diseases causes them to be evaluated as a new biomarker. It was found out that miRNAs regulate specific immune response and inflammatory stimuli, in addition to their important role in determination of a cell's fate. Investigation of miRNA expression in the articular cartilage can make the identification of targets in diseases such as OA possible. During

joint's damage and repair, various biomarkers from meniscus and ligaments, articular cartilage, bone tissue, osteophytes and synovial membrane are secreted into the synovial fluid pool and are passed from there to lymphatic and systemic circulations. Identification of these biomarkers in serum, urine or blood is important for early detection of OA and for monitoring the course of the disease and its response to treatment. For these reasons, it was aimed to determine miRNAs' role, in the pathophysiology of OA as a new therapeutic target in order to contribute to the understanding of OA's mechanism of action in the studies carried out. In this review, the current evidence of the role of miRNAs in charge of post-transcriptional regulation, which is playing in molecular mechanisms underlying development and progression of OA, has been summarized. In summary, it is proposed that miRNAs have an important potential in terms of diagnosis and treatment of OA and that they can provide a new way for treatment of OA.

KEYWORDS: Osteoarthritis, microRNA

1. Giriş

Osteoartrit

Osteoartrit (OA) kırıkdağ, kemik ve sinoviyal dokularda çeşitli travmatik, biyomekanik, gelişimsel, metabolik ve genetik faktörlerin etkisiyle meydana gelen kırıkdağ yapımı ve yıkımı arasındaki dengenin bozulması ile ortaya çıkan, biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler ile karakterize bir eklem hastalığıdır (1). İnsan vücudunun en büyük eklemi olan diz eklemi OA'nın sıklıkla görüldüğü eklemlerdendir. OA için yaygın olarak tutulan eklem, etiyojolojiye ve spesifik özelliklere göre değişik sınıflamalar kullanılır (2, 3). OA, geleneksel olarak primer (idiopatik) ve sekonder olarak iki tipe ayrılır. Eklem dejenerasyonunun nedeni bilinmiyorsa buna primer OA denir ve OA'nın en sık görülen formudur. Altta yatan etkenin belli olduğu durumlar ise sekonder OA olarak isimlendirilir. Primer OA 40 yaşından önce nadir görülür. Travma, infeksiyon, avasküler nekroz, hemofili gibi nedenlere bağlı sekonder OA ise daha çok genç erişkinlerde görülür (2). OA ile ilişkili risk faktörleri hastalığın gelişiminde, ilerlemesinde, radyografik ya da semptomatik oluşunda göreceli olarak tutulan eklem ve hastalığın evresine göre değişkenlik göstermektedir. Genel olarak risk faktörleri sistemik ve lokal olmak üzere iki kısımda incelenebilir. İleri yaş, kadın cinsiyeti, kalıtsal ve etnik özellikler, kemik mineral yoğunluğunda artış gibi sistemik faktörler eklem kırıkdağını zedelenmeye yatkın hale getirir. Obezite, sportif ve mesleki aktiviteler, eklem zedelenmesi, eklem yapısal özellikleri, eklem laksitesi ve kas gücünde azalma veya artma gibi lokal faktörler de mekanik etkilerinden dolayı eklem dejenerasyonuna doğrudan katkıda bulunurlar

(4-7). OA'da belirtiler genellikle yavaş ve sinsi seyirli başlar ve etkilenen eklem lokalizedir. OA'nın başlıca klinik özellikleri ağrı, eklem tutukluğu, eklem şişliği, krepitasyon, deformite ve sublüksasyon, lokal hassasiyet ve hareketle ağrı, hareket kısıtlanması ve fonksiyon kaybı olarak sıralanabilir (8-12). Direkt radyografi çok hassas olmamasına karşın diz OA tanısında en faydalı görüntüleme yöntemidir. OA'da sık görülen radyolojik bulgular, eklem aralığında asimetrik daralma, subkondral kemikte skleroz, subkondral kistler ve eklem kenarlarındaki osteofitlerdir. Deformiteler, sublüksasyon ve eklem fareleri daha çok ileri vakalarda görülür (12). OA için özgül bir tanısal test yoktur. Primer OA'da eritrosit sedimentasyon hızı, c-reaktif protein, rutin kan sayımları ve biyokimyasal analizler normaldir. Romatoid faktör ve antinükleer antikor negatiftir. Sinoviyal sıvıda hafif inflamasyona ait nonspesifik özellikler görülür. Bunlar; hacimde artış, viskozitede azalma, hafif pleositoz ve proteinde hafif artıştır (13). Eklem sıvısında kalsiyum pirofosfat dihidrat veya hidroksiapatit kristalleri saptanabilir (12, 14).

Osteoartrit patogenezi

OA eklemi oluşturan kırıkdağ, subkondral kemik, sinoviyal doku, eklem kapsülü, ligamentler ve kaslar gibi eklem tüm elemanlarını etkilemesine rağmen, primer değişiklikler eklem kırıkdağının kaybını, subkondral kemiğin yeniden şekillenmesini ve kemik çoğalması sonucu oluşan osteofitlerin gelişimini içermektedir (7). OA yaşlanan kırıkdağdan farklı bir süreç olarak kabul edilmekte, tüm eklem dinamik, biyomekanik ve hücresel işlevlerini olumsuz yönde etkileyen bir patoloji olarak

düşünülmektedir. Bu nedenle, patolojik sürecin merkezinde eklem kıkırdağı, subkondral kemik ve sinoviyal doku bulunmaktadır (15).

Eklem kıkırdağı

Normal eklem kıkırdağı fonksiyonu gereği yarı-katı yapı gerektiren eklem aralıklarında şekil oluşturmak, esneklik, dayanıklılık ve yüke uyum sağlamak üzere bulunan çok özel bir dokudur (12). Kıkırdak, %65-80'i su, %20-35'i katı olan bir hücre dışı matriks ve bu matriks içine dağılmış olan kondrositlerden meydana gelir (12, 16). Kondrositler, hem yapım hem de yıkımdan sorumlu hücreler olarak kıkırdak homeostazını sağlar, değişen kimyasal ve mekanik şartlara göre perisellüler matriksin yapımı, idamesi, yıkımı ve gerekirse yeniden şekillenmesini gerçekleştirir (12). Hücre dışı matriks başlıca kollajen lifler ve proteoglikanlardan olmak üzere nonkollajenöz asidik glikoproteinler, lipidler ve kalsiyum tuzlarından meydana gelir (16). Matriks içeriğinin yarısından fazlasını en çok tip II kollajen lif oluşturur. Kollajen liflerin arası glikozaminoglikan zinciri içeren bir protein olan proteoglikanlarla doludur. Kıkırdakta en çok bulunan proteoglikan agrekan proteindir (12, 16, 17). Başlıca glikozaminoglikanlar ise hiyaluronik asit, kondroidin sülfat, keratan sülfat ve dermatan sülfat olarak sıralanabilir (16). Kıkırdağın su içeriği, kollajen ağ ve negatif yüklü proteoglikan zincirlerinin oluşturduğu basınçla dengede tutulur. Bu nedenle kıkırdağın esnekliği yani hidrolik permeabilite, kıkırdağın su ve proteoglikan içeriği ile doğru orantılıdır (12, 17). Kıkırdağın fonksiyonel özelliklerini belirleyen bu biyokimyasal temel göz önüne alındığında su kapsamı, proteoglikanlar ve kollajen fibriller arasında hem fizyolojik koşullarda hem eklem üzerine yük bindiğinde son derece karmaşık etkileşimler gerçekleşir (12, 17). Kıkırdakta hücre dışı matriks elemanları ve büyüme faktörleri gibi çeşitli kimyasal ailelere ait makromoleküller de bulunur. Bu moleküller hem kıkırdağın yapısını oluşturmakta hem de hücre işlevlerinin düzenlenmesinde rol almaktadırlar. Normal kıkırdağın fonksiyonel özellikleri, kıkırdağın ana hücresi olan kondrositler ile matriks ve diğer matriks molekülleri arasındaki ilişki OA patogenezinin daha iyi anlaşılması açısından önem taşır (12, 13, 16, 17).

OA gelişim sürecinde morfolojik olarak eklem kıkırdağı yüzeyinde düzensizleşme, yüzeyel çatlaklarda belirginleşme, proteoglikan dağılımında değişim görülür. OA ilerledikçe bu çatlaklar derinleşir, yüzeyin düzensizliği artar, eklem kıkırdağı ülserleşir ve altta yatan kemik açığa çıkar (7, 18). Kemik proliferasyonunun sonucu eklem kenarlarında ve kıkırdak tabanında osteofit adı verilen çıkıntılar oluşur ve bunların üstü yeni oluşan, düzensiz yapıdaki hyalin ve fibröz kıkırdak ile kaplanır. Osteofitler kısmen OA'daki ağrı ve eklem hareketindeki kısıtlılıktan sorumludur (7, 12)

OA'da zaman içerisinde eklem kıkırdağının kaybına biyokimyasal ve metabolik değişimler de eşlik eder (7, 12). OA'nın ilk evresinde kondrositlerde geçici bir çoğalma yanıtı, hücre dışı matriks sentezinde artış, sitokin ve proteinaz enzim aktivitelerinde artış gözlenir. Eklem dokusu tarafından üretilen en önemli sitokin ve aracılığı interlökin-1beta (IL-1 β) ve tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) iken; proteinazlar, matriks metalloproteinaz (MMP)'lar (kollojenaz, jelatinaz, stromelizin, matrilisin ve disintegrin-metalloproteinaz ailesi (ADAM)), aspartik proteinazlar, sistein proteinazlar ve serin proteinazlardır. Kondrositlerde gözlenen bu aktivite artışı erken dönemde ortaya çıkan "doku onarımı yanıtı" olarak kabul edilir (13, 19, 20).

İkinci evrede kondrositler, doku hasarı ile osmolarite ve yük yoğunluğundaki değişikliği farkedip hızla hücrel yanıtı uyaran araçılar salgırlar (7, 21). Matriks makromoleküllerinin sentezinde ve kondrositlerin çoğalmasında anabolik ve mitojenik faktörlerin önemli rolü vardır. Kondrositler birtakım mekanik ve kimyasal streslere yanıt olarak serbest bir radikal olan nitrik oksit (NO) üretirler. NO hızla yayılır ve matriks makromoleküllerinin yıkılmasına yol açan IL-1'in salınımını uyarır (7, 13). IL-1 matriks bileşenlerinin sentezini azaltır, yıkıcı enzimlerin yapımını artırır ve kondrosit çoğalmasını baskılar. Kondrosit aktiviteleri üzerinde TNF- α 'nın da etkisi vardır (13, 22, 23). Sitokinlerin yanı sıra, yine kondrosit ve sinoviyositlerden salınan bazı büyüme faktörleri proteolitik enzimlerin inhibisyonu, proteoglikan ve kollajen sentezinin uyarılması ve hasar gören kıkırdak dokusunun onarımında ve korunmasında görev yaparlar. Bu evrede tamir yanıtı proteazların katabolik

etkisine karşı koyabilir ve bazen dokunun tamirini sağlayabilir. Tamir yanıtı yıllarca sürebilir; bazen hastalığın gidişini geçici de olsa durdurabilir (7, 13, 19-21).

Stabilizasyon veya tamir girişiminin başarısız olması hastalığın üçüncü evresinin oluşumuna yol açar. İlerleyici bir kıkırdak kaybı, kondrositik anabolik ve çoğalma yanıtlarında azalma söz konusu olur. Bu azalma fonksiyonel ve stabilize bir matriks tarafından korunulmayan kondrositlerin mekanik hasarından ve ölümünden kaynaklanabileceği gibi, kondrositlerin anabolik sitokinlere cevabındaki azalmadan da kaynaklanabilir (7, 24, 25).

OA'nın ileri döneminde özellikle tip 2 kollajen ve agrekan sentezindeki azalma kıkırdağın gergin yapısını bozar ve kıkırdak dejenerasyonunu dönüştürmeyen bir evreye sokar (26).

OA'nın derecesiyle orantılı olarak eklem kıkırdağının proteoglikan içeriği azalır, proteoglikanların glikozaminoglikanlar ile birleşmesi azalır. Hastalık ilerledikçe proteoglikan konsantrasyonu normal konsantrasyonun yarısının altına iner ve glikozaminoglikan zincirleri kısalır (16). Kollajenaz, kollajen liflerinde inceltme yapar, kollajen ağını gevşetir ve matrikste şişmeye neden olur. Bu değişiklikler kıkırdağın kompresyon ve mekanik streslere daha dirençsiz hale gelmesine ve ilerleyici bir kıkırdak kaybına yol açar (25).

OA'daki kıkırdak yıkımında dokuda yüksek oranda bulunan matriks metalloproteinazlar (MMP) önemli rol oynamaktadır. OA'da bu aileden kollajenaz (MMP-1, MMP-8 ve MMP-13), sitromelisin (MMP-3, MMP-10) ve jelatinaz enzimlerinin (MMP-2, MMP-9) yüksek olduğu görülmektedir (12, 25). OA'da kollajenaz, sitromelisin ve jelatinaz kondrositler tarafından proenzim olarak salgılanmakta ve IL-1 ve TNF tarafından bu sekresyon artırılmaktadır (25). Kollajenaz doğal kollajenin, stromelisin proteoglikanların yıkımından sorumlu iken jelatinaz denatüre kollajenin yıkımından sorumludur (24, 25). MMP'ler, tip 9 ve 11 kollajenler ve diğer moleküllerin degradasyonunu sağlayarak tip 2 kollajen lif ağını destabilize ederler (7, 24, 25).

Eklem kıkırdağında yıkımın başlamasından sorumlu gerçek kollajenaz olarak MMP-13 saptanmıştır (13). MMP-13, tip 2 kollajeni spesifik parçaladığı için önemlidir ve OA'nın başlangıç döneminde sentezi artmaktadır (24, 25). Fizyolojik koşullarda enzimlerin yıkıcı etkileri doku metalloproteinaz inhibitörü (TIMP) adı verilen moleküllerle baskı altında tutulur. Bu inhibitörler transforming büyüme faktörü-beta (TGF- β) kontrolü altında sentezlenirler. Bu inhibitör moleküller, enzim-inhibitör kompleksleri oluşturarak MMP'leri etkisiz hale getirirler (25). Eğer aktif enzimlere göre sentezleri daha azsa artmış matriks yıkımı gözlenir. OA kıkırdağı TIMP açısından fakirdir. Normal kıkırdakta TIMP 1 ve 2 bulunmaktayken OA kıkırdağında sadece TIMP 1 saptanmıştır (7, 13, 25).

Subkondral kemik doku

Subkondral kemik viskoelastiktir, kıkırdak dokuya göre daha iyi şok emicidir. Ani aşırı yüklenmelerde kıkırdak dokuyu koruyucu davranarak yük dağılımında görev alır ve kıkırdaktan çok daha fazla oranlarda yükü karşılar (13, 27).

OA'da eklem aşırı yüklenme ile subkondral kemik yoğunluğunda ve sertliğinde artış olur, ancak eklem yük dağıtım kapasitesi azalır. Subkondral kemik yoğunluğundaki artışın erken dönemde geliştiği ve sonrasında tüm kalınlık boyunca kıkırdak kaybına kadar ilerlediği gösterilmiştir (13). OA ilerledikçe ağırlık taşıyan eklemlerdeki mekanik stress, subkondral kemik tabakası ve kıkırdakta mikrofraktürlerin gelişimine katkıda bulunabilir. Mikrofraktürler iyileşirken kemik sertliğinde artış meydana gelir. Kıkırdak hasarı arttıkça subkondral skleroz ve sertlik ilerler. Subkondral kemik, ortaya çıkan bu tekrarlayıcı uyarılara yeniden yapılanma ve sertleşmiş kemik dokusu ile cevap verir. Ancak bu yeni kemiğin şok emici özelliği azalmıştır. Çalışmalar, subkondral kemik kalınlığı ile OA şiddeti arasında yakın ilişki olduğunu göstermiştir (13, 18, 27).

Sinoviyal doku

Sinoviyal doku, sinoviyal zar ve sinoviyal sıvıdan oluşur. Sinoviyal zar eklem kapsülünün arka iç yüzeyi boyunca yayılan, eklem kıkırdağını örtmeyen, damardan zengin bir bağ dokudur (28). Sinoviyal zar normalde

bir veya iki hücre kalınlığındadır (17). Bu hücreler sinoviyositler olarak bilinir ve plazmanın ultrafiltrasyonu ile sinoviyal sıvı oluşmasından sorumludurlar. Sinoviyal tabakada bulunan bu hücreler, makrofaj benzeri etki gösterir ve hyaluronik asit, proteoglikan, kollajen tip I-III, TIMP, latent proteinaz ve kollajenaz sentezler. Sinoviyal doku vasküler beslenmesi iyi olduğu için yüksek yenilenme kapasitesine sahiptir. Sinoviyal sıvı, plazmanın sinoviyal aralığa geçen bir filtratıdır. Sinoviyal sıvı miktarı 2-4 ml arasındadır. Renksiz, berrak, viskozitesi yüksek bir sıvıdır. (18, 28, 29). Viskosite hyaluronik asit içeriğine bağlıdır. Sinoviyal sıvı eklemde difüzyon yoluyla eklemi çevreleyen lenfatik ve kapillerlere atılırken normal döngü sürecine uğrar. Sinoviyal sıvı eklem çevresindeki kıkırdağa besin desteği sağlar ve eklem binen yüke bağlı olarak eklem kayganlaştırıcı veya şok absorbe edici olarak görev yapar. Sinoviyal sıvı bariyer dışlama olarak adlandırılan yüksek molekül ağırlıklı hyaluronat moleküllerinin kesişmesine bağlı olarak inflamatuvar hücre (örneğin, nötrofil) ve moleküler debrisin eklem içinde hareket etmesini sınırlar (18, 29).

OA noninflamatuvar bir hastalık olarak bilinmesine rağmen son zamanlarda yapılan çalışmalarda, sinovitin ve düşük derece inflamasyonun OA patofizyolojisinde rol oynadığı gösterilmiştir (2, 12, 30). Kıkırdak yıkımı sonucu kıkırdaktan parçalanmış makromoleküller ile OA'da sinoviyal inflamasyon başlar. Kollajen, proteoglikan ve diğer matriks parçaları sinoviyal sıvıya geçer ve sinoviyal makrofajlar tarafından fagosite edilir. Bunlar antijen gibi hareket ederek IL-1 β ve TNF- α gibi sitokinlerin salınımına yol açar (7, 13). Artan sitokin sentezi kıkırdak yıkımını artırır ve bu parçalanma ürünleri inflamasyonun daha da artmasına neden olur. Sinoviyal inflamasyon, sinoviyositler ve kondrositler tarafından yapılan biyokimyasal faktörler, prostanooidler, sitokinler ve reaktif oksijen türleri tarafından kontrol edilmektedir (31).

Osteoartritte terapötik hedefler

Eklem hasarı veya tamiri sırasında çeşitli biyobelirteçler menisküs ve ligamentler, eklem kıkırdağı, kemik doku, osteofitler ve sinoviyal zardan salınarak sinoviyal sıvı

havuzuna ve buradan da lenfatik dolaşıma ve sistemik dolaşıma katılırlar (32). Bu biyobelirteçlerin serum, idrar veya kanda 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.

MikroRNA

MikroRNA (miRNA) yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda tek iplikçikli RNA molekülüdür ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynar (33-35). miRNA'nın etkileri ilk 1993'te Lee ve çalışma arkadaşları tarafından Victor Ambros laboratuvarında *C. elegans* solucanında keşfedilmiş ve varlıkları çeşitli bitki ve hayvanlarda gösterilmiştir (36). Her geçen gün sayısı artan miRNA'lara ait bilgiler miRBase isimli merkezi bir veri tabanında toplanmaktadır (37). Haziran 2014 tarihi itibarıyla bu veri tabanına giriş yapılan miRNA sayısı 28.645'e ulaşmıştır (38).

mRNA parçalanması veya translasyon inhibisyonu ile gen ekspresyonunu düzenleyen, küçük kodlamayan RNA'ların bir sınıfı olan mikroRNA (miRNA)'ların keşfiyle normal gelişim süreci ve hastalıklardaki rollerinin araştırılması onları yeni bir biyobelirteç sınıfı yapmaktadır (35, 39, 40). miRNA'ların gelişim, homeostaz ve bağışıklık fonksiyonlarında önemli bir rol oynadığı, hücre çoğalmasını ve apoptozu düzenlediği gösterilmiştir (39-42). miRNA'ların kanserden inflamasyona kadar çoğu hastalıkla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte birçok miRNA'nın dizileri, temel ekspresyon bilgileri ve fonksiyonları hakkında yapılan araştırmalar gün geçtikçe artmaktadır (39, 40, 43).

miRNA'lar diğer genler gibi DNA üzerinden transkribe edilir ve proteine dönüştürülmeden küçük RNA molekülleri halinde gen düzenlenmesinde görev alır (44). miRNA'lar post-transkripsiyonel olarak gen ekspresyonunu kontrol eden moleküllerdir. mRNA'ların 3' çevirime uğramayan bölgeleriyle (UTR- untranslated region) baz eşleşmesi yaparak onların yıkımını sağlar

veya translasyona uğramalarını engellerler (43-45).

MikroRNA biyogenezi

MikroRNA'lar miRNA genlerinden RNA Polimeraz II tarafından transkribe edilir. Oluşturulan transkript 'cap' ve 'poli(A)' kuyruğuna sahiptir. Bu oluşan ilk transkript primer-miRNA (pri-miRNA) olarak isimlendirilir. pri-miRNA'lar saç tokası şeklindedir. Bu yapıda olgun miRNA dizisi ilmeğin yakınındaki sap kısmında bulunur (35, 46, 47).

pri-miRNA iki adımlı bir süreçten geçerek olgun ve işlevsel miRNA haline gelir. İlk adım çekirdekte gerçekleşir ve pri-miRNA 'mikroişlemci kompleks' adlı bir protein kompleksi tarafından kesilir. Mikroişlemci komplekste Drosha adlı bir nükleaz ve DiGeorge critical region 8 (DGCR8) adlı çift iplikçikli RNA bağlayıcı protein bulunur (44, 48, 49). Drosha enzimi pri-miRNA'nın sap-ilmek yapısını tanıyarak sap kısmında belli bir noktadan kesim yapar (43, 45, 48-50). 160 kD'luk bir nükleaz ribonükleaz III endonükleaz olan Drosha, yaklaşık 200 nükleotit büyüklüğündeki pri-miRNA'yı keserek 70-80 nükleotitlik sap-ilmek şekilli, öncül (prekürsör)-miRNA'yı ortaya çıkarır. Drosha'nın tanımadaki bu özgülüğü, yardımcı proteinlerle sağladığı düşünülmektedir (44, 45, 48). Pre-miRNA'lar nükleustan sitoplazmaya Exportin-5 (XPO5) isimli taşıyıcı protein ile taşınır. XPO5, Ran-GTP ve pre-miRNA ile heterotrimerik yapı oluşturur (51). Bu yapı pre-miRNA'nın yapısını stabilize ederek hücre zarında bulunan porlardan sitoplazmaya taşınmasını sağlar. Sitoplazmada Ran-GTP'nin Ran-GDP'ye hidrolize olmasıyla pre-miRNA serbest kalır (52).

İkinci adım sitoplazmada gerçekleşir ve pre-miRNA 200 kD'luk sitoplazmik ribonükleaz III enzimi Dicer ve çift zincirli RNA bağlanma proteini olan transaktivasyon cevabı oluşturan RNA bağlanma proteini (TRBP-Transactivation-responsive RNA-binding protein) tarafından ilmek kısmından kesilerek çift dal RNA dubleks (miRNA:miRNA*) oluşturulur. Bu dubleks yapıda hem olgun miRNA dalı hem de onun tamamlayıcı dalı (miRNA*) birlikte bulunur. Tamamlayıcı dal uzaklaştırılarak yaklaşık 22 nükleotitlik

uzunluğunda tek zincirli olgun miRNA oluşur (44-46, 48, 50, 53).

Olgun miRNA'lar işlevlerini gerçekleştirmek için başka proteinlere de ihtiyaç duyar. Bu proteinlerle birlikte 'RNA ile tetiklenen sessizleştirici kompleks' (RNA-induced silencing complex; RISC)'i oluştururlar. Bu yapıda en iyi tanımlanmış proteinler Argonat (Argonate; Ago) ailesi proteinleridir (43-46, 54). Olgun miRNA bu yapıya katılırken tek zincir hale geçer. Argonat protein ailesinin üyeleri Dicer'a benzeyen PAZ bölgesiyle tek zincir RNA'nın 3' ucuna bağlanır. Yapılan çalışmalar Argonat proteinlerinin hedef mRNA'yı kesen endonükleazlar olduğunu göstermektedir (45, 46, 48, 54).

RISC kompleksi miRNA'ların sahip oldukları 6-8 nükleotitlik tohum dizisiyle hedef mRNA'nın 3' UTR bölgesine yönelir ve etkilerini hedefledikleri mRNA'nın 3' UTR bölgesindeki baz eşleşmesine göre gösterir. 3' UTR bölgesinde yüksek oranda baz eşleşmesi varsa mRNA yıkılır. Memelilerde olduğu gibi baz eşleşmesi azsa mRNA'nın translayonu baskılanır (33, 45, 46).

miRNA'lar hedef mRNA üzerinde genellikle 3' UTR bölgesine bağlanarak gen ifadesini baskılar. Bununla birlikte 5' UTR bölgesini veya açık okuma çerçevesini (ORF-open reading frame) hedef aldıkları durumlarda da gen ifadesi baskılanır (44, 46, 55).

Osteoartrite ilişkili mikroRNA'lar

miRNA'ların hastalıkların mekanizmalarında önemli bir role sahip olduğu ileri sürülmekle birlikte halen ilgili mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Kıkırdak ve kondrositlerdeki patoloji sonucu ortaya çıkan OA ile miRNA ilişkilerinin açıklanmasını sağlayan çalışmalar her geçen gün artarak devam etmektedir. Bu süreçte miRNA biyogenezinde rol olan moleküllerin araştırılması önemli bir basamağı oluşturmaktadır. miRNA biyogenezinde temel bir role sahip Dicer enziminin normal iskelet gelişiminin esas elemanlarından olduğu gösterilmiştir (56). Kobayashi ve arkadaşları miRNA'ların kıkırdak fonksiyonunda önemli olduğunu göstermiştir. Çalışmada Dicer-null farelerde Dicer-deficient kondrositler nedeniyle iskelet gelişiminde defektler ve premature ölümler gözlenmiştir. Dicer miRNA sentezinde kritik

bir role sahip olduğundan bu bulgular kondrositlerin biyolojik rolünde miRNA'ların etkisinin önemini dolaylı olarak göstermektedir (56).

miRNA'ların OA patogenezindeki rolünün açığa çıkarılması için normal ve OA eklem dokularında miRNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırıldığı araştırmalar yapılmıştır. Bu araştırmalardan birinde, OA'lı 33 hasta ve 10 sağlık bireyin kıkırdak dokusunda, 365 miRNA'nın durumu incelenmiş ve çalışma sonucunda bu miRNA'ların 16'sının farklı eksprese olduğu bunlardan miRNA-483, miRNA-22, miRNA-377, miRNA-103, miRNA-16, miRNA-223, miRNA-30b, miRNA-23b ve miRNA-509'un ekspresyon düzeylerinin arttığı ve miRNA-29a, miRNA-140, miRNA-25, miRNA-337, miRNA-26a, miRNA-210, miRNA-373'ün ekspresyon düzeylerinin azaldığı vurgulanmış, bazılarının ise obezite ve inflamasyonla ilgisi olduğu ileri sürülmüştür (57). Başka bir araştırmada OA ile normal kıkırdak ve kemik arasında 157 miRNA ekspresyonu araştırılmıştır. Kıkırdak dokuda normale göre 17 miRNA'nın ve kemik dokuda normale göre 30 miRNA'nın 4 kattan fazla eksprese olduğu belirlenmiştir (58). Ayrıca bu çalışmada izole insan kondrositlerinde miRNA-9, miRNA-98 ve miRNA-146'nın aşırı ekspresyonunun TNF- α üretimini indükleyen IL-1 β 'yi azalttığını bildirmişlerdir (58).

Diğer bir araştırmada primer kondrosit kültüründe 723 miRNA analiz edilmiş ve 7'sinin istatistiksel olarak önemli derecede farklı eksprese olduğu belirlenmiştir. Bu 7 miRNA'dan 1'i (miRNA-483) OA kondrositlerinde artarken, 6'sı (miRNA-149, miRNA-582, miRNA-1227, miRNA-634, miRNA-576 ve miRNA-641) normal kondrositlerde artmış olarak bulunmuş, bu miRNA'ların TGF- β , Wnt, Erb and mTOR uyarı yolları aracılığıyla eklem kıkırdağında görev aldıkları öngörülmüştür (59). Beyer ve arkadaşları yaptıkları araştırmada kalça ve diz OA'sı olan 816 hastanın serum örneklerinde mikroarray yöntemiyle miRNA taraması yapmışlar, sonuçta hasta grubunda let-7e, miRNA-454 ve miRNA-885-5p'nin diz ve kalça OA'sı ile ilgili biyobelirteç olabileceklerini önermişlerdir (60).

Çalışmalarda miRNA-140'ın hem uzun hem de yassı kemik gelişimi sırasında fare

embriyolarının kıkırdak dokularında sentezlendiği kıkırdak spesifik bir miRNA olduğu bildirilmiştir (61). Mikroarray analizi kullanılan başka bir araştırmada normal insan kıkırdak dokusunda miRNA-140'ın ekspresyonu gösterilmiş ve OA'nın ileri evrelerinde ekspresyonun önemli derecede azaldığı bildirilmiştir. Bu çalışmada normal insan kondrositleri IL-1 β ile muamele edilerek miRNA-140'ın ekspresyonunun baskılandığı ve miRNA-140'ın IL-1 β indüklü Disintegrin-metalloproteinaz trombospondin motif 5 (ADAMTS5) ekspresyonunu azaltabildiği gösterilmiştir (62). Aynı araştırma grubu in vivo fare çalışmasında miRNA-140'ın OA patogenezinde kritik bir rol oynadığını göstermişlerdir. miRNA-140 (-/-) farelerin eklem kıkırdağı liflenmesi ve proteoglikan kaybı gibi yaşla ilişkili OA benzeri değişimler gösterdiği bildirmiştir. miRNA-140'ın in vivo da aşırı ekspresyonunun OA'daki dejenerasyonu inhibe ettiği de gösterilmiştir. Sonuçta çalışmada miRNA-140'ın ADAMTS5 ekspresyonunu düzenleyerek OA patogenezinde direkt bir hedef olduğu açığa çıkarılmıştır. (63). Başka bir araştırma grubu da miRNA-140 ekspresyonunun OA sürecinde azaldığını göstermiştir. Bu grup çalışmalarında OA kıkırdağında MMP-13 ve İnsülin benzeri büyüme faktör bağlayıcı protein 5 (IGFBP-5) ekspresyonlarına odaklanmış, MMP-13 ve IGFBP-5'nin 3'-UTR dizilerinde fonksiyonel bağlanma alanlarını öngörmüşlerdir. miRNA-140 ve miRNA-27a'nın MMP-13 ve IGFBP-5'nin 3'-UTR'lerine bağlanma potansiyeline sahip olduğu ve bu miRNA'ların normal kondrositlerde eksprese olduğu, OA kondrositlerinde ise ekspresyonlarının azaldığı gösterilmiştir (64).

miRNA-27b'nin insan OA kondrositlerinde MMP-13 ekspresyonunu düzenlediği bildirilmiştir. miRNA ekspresyon profili IL-1 β ile uyarılan ve uyarılmayan kondrositlerden elde edilen RNA'lar kullanılarak araştırılmıştır. miRNA-27b'nin IL-1 β ile uyarılan kondrositlerde azaldığı bulunmuştur. Bu çalışma MMP-13'ün ekspresyon artışının, miRNA-27b'nin azalışı ile korelasyonunu ve miRNA-27b'nin MMP-13'ün direkt hedefi olduğunu göstermiştir (65).

OA'da miRNA ekspresyonlarına yaşlanma gibi risk faktörleri aracılık edebilir. Birçok

çalışmada, ya dolaşımdaki miRNA'lar ya da periferik kan hücrelerinde eksprese olan miRNA'lar insanlarda farklı yaşlar arasında incelenmiştir. OA ile ilgili bazı miRNA'larda dahil, spesifik miRNA'ların yaşla farklı ekspresyon gösterdiği sonucuna varılmıştır (66-68). Değerlendirmeler sonucunda, miRNA-21 ekspresyon seviyesinin arttığı ve bu artışın inflamasyon belirteci c-reaktif protein ve TGF uyarısıyla uyumlu olduğu (68), miRNA-221 ekspresyonunun yaşla azaldığı ve OA'yı içine alan uyarı yolağı fosfoinozitol 3 kinaz (PI3K)'nın artışına aracılık ettiği (67), miRNA-146a ekspresyonunun ise yaşa bağlı olarak arttığı vurgulanmıştır (69). Bu miRNA'ların, yaşın önemli bir risk faktörü olduğu ve spesifik bir markerın bulunmasının zor olduğu OA'nın teşhisinde kullanılabileceği bildirilmiştir.

miRNA'ların ekspresyonlarının özel immün cevabı ve inflamatuvar uyarıyı da düzenledikleri belirlenmiştir. miRNA'lar hematopoezde belirli bir role sahiptir ve böylece bu sürecin bozulması inflamatuvar hastalıkların patogeneğinde önemli olabilmektedir. miRNA-146 ve miRNA-155; IL-1 ve TNF- α gibi pro-inflamatuvar uyarıcılar tarafından indüklenen miRNA'lardır (70). miRNA-146a/b immün fonksiyonların düzenlenmesinde tanımlanan ilk miRNA'lardır. Normal olmayan miRNA-146 ekspresyonu OA, romatoid artrit ve sedef hastalığı gibi çeşitli inflamatuvar hastalıklarda gösterilmiştir. İmmün hücrelerin gelişimi ve doğuştan gelen bağışıklık kadar kazanılmış bağışıklığa olan cevabı da kapsayan immün fonksiyonlarda miRNA-155'in etkisi in vivo ve in vitro çalışmalarda gösterilmiştir (39). Eklem kıkırdağında miRNA ekspresyonlarının araştırılması OA gibi hastalıklarda hedeflerin tanımlanması için imkan sağlayabilir (71).

miRNA-146a ve miRNA-155'in ekspresyon mekanizmalarını içeren çalışmalar pro-inflamatuvar transkripsiyon faktörü NF- κ B'nin merkezi bir rolü olduğunu göstermektedir (72, 73). Bununla birlikte miRNA-155 seviyesinin düzenlenmesinde mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) uyarısının önemli bir role sahip olduğu ve c-Jun N-terminal kinaz (JNK)'ın bu ekspresyonu düzenlediği düşünülmektedir (74).

Yamasaki ve arkadaşları histopatolojik evreleme de kullanılan Mankin skoruna göre düşük evre OA hastalarının kıkırdak dokusunda miRNA-146a'nın aşırı derecede eksprese olduğunu bu ekspresyonun IL- β uyarımı ile indüklendiğini bildirmişlerdir. Çalışmada 9'u kalça ve 6'sı diz olmak üzere 15 OA hastasından alınan kıkırdak dokusunda miRNA-146a ekspresyonu real-time PCR ve immunohistokimyasal olarak incelenmiştir. Normal insan dokusundan kültüre edilerek elde edilen kondrosit hücrelerinde ortamdaki IL- β varlığında miRNA-146a ve MMP-13'ün eksprese olduğu bulunmuştur (75).

Periferik mononükleer kan hücrelerinde (PMKH) miRNA'ların belirlenebilmesi OA gibi hastalıklarda biyobelirteç olarak kullanılabilmesi için önemlidir. Hastalığın ilerlemesi ile bağlantılı proteinaz ve pro-inflamatuvar sitokinleri üreten dolaşımdaki PMKH'ler OA hastalarının sinoviyumunda birikebilmektedir. Yapılan çalışmada PMKH'lerde normal kontrole karşı OA grubunda miRNA-146a, miRNA-155, miRNA-181a ve miRNA-223'ün fazla ekspresyonun OA patogeneziyle ilgili olabileceği bildirilmiştir (69).

miRNA'lar periferik kanda RNAaz aktivitesinden korunduğu için fizyolojik ve patolojik süreçte iyi bir biyobelirteç olarak kullanılacakları bildirilmiştir (76-78). OA kıkırdağında miRNA ekspresyonlarının düzensizliği yapılan araştırmalarda gösterilmiş olmasına rağmen OA hastalarında değişen sirküle miRNA seviyeleri hakkında kısıtlı bilgi bulunmaktadır. miRNA'ların inflamasyon ve OA ilerlemesini azaltabileceği ya da kıkırdakta anabolik işleve sahip olabileceği tespit edilmiştir. Bu miRNA'ların enjektabl formunun eklemdeki OA'nın lokal tedavisi için geliştirilebileceği düşünülmektedir. Böylece miRNA'ya dayalı tedavinin potansiyel zararlı yan etkiler olmadan tedavi sürecine başka bir yaklaşım sunabileceği öngörülmektedir (40, 79)

2. Sonuç

miRNA'lar ve çoklu hedef genleri arasındaki karmaşık etkileşimler gen düzenlenmesinde ve patofizyolojik yolların kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır. miRNA gibi yeni düzenleyicileri içeren gen ağı ve moleküler mekanizmalar üzerine yapılan

araştırmalar yaygın bir eklem hastalığı olan OA patogenezindeki yolların aydınlatılmasına katkı sağlamaktadır. Bu araştırmalarda eklem doku hücrelerinde gen ekspresyon ağı ile ilgili elde edilen bulgular OA için umut verici yeni terapötik hedefler sunmaktadır. İlerleyen zamanlarda bu terapötik hedeflerin klinik olarak OA tanı ve

tedavisine katkı sağlayabilmesi ümit edilmektedir.

KAYNAKLAR

- Sharma, L., Kapoor, D., and Issa, S. (2006). Epidemiology of osteoarthritis: an update. *Current opinion in rheumatology* 18:147-156.
- Pelletier, J.P., Martel-Pelletier, J., and Abramson, S.B. (2001). Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis & Rheumatism* 44:1237-1247.
- Loeser, R.F., Erickson, E.A., and Long, D.L. (2008). Mitogen-activated protein kinases as therapeutic targets in osteoarthritis. *Current opinion in rheumatology* 20:581.
- Dennison, E., and Cooper, C. (2003). Osteoarthritis: epidemiology and classification. In *Rheumatology*. M. Hochberg, A. Silman, J. Smolen, M. Weinblatt, and M. Weisman, editors. Edinburgh: Mosby.
- Tuncer, T., and Gilgil, E. (2007). Osteoartrit epidemiyolojisi ve risk faktörleri. In *Tanıdan Tedaviye Osteoartrit*. M. Sarıdoğan, editor. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri. 9-20.
- Bodur, H. (2011). Dünyada ve Türkiye'de osteoartrite güncel bakış; epidemiyoloji ve sosyoekonomik boyut. *Türk J Geriatr* 14:7-14.
- Harris, E.D., Budd, R.C., Firestein, G.S., Genovese, M.C., Segent, J.S., Ruddy, S., and Sledge, C.B. (2006). Osteoartrit patogenezi. In *Kelley Romatoloji*. F. Dinçer, editor. İstanbul: Güneş Kitabevi. 1493-1513.
- Kirazlı, Y. (1999). Osteoartrit. Gümüşiş G, Doğanavşargil E (Ed) : Klinik Romatoloji, Deniz Matbaası, İstanbul.531-547.
- Oğuz, H. (1992). Osteoartroz. Romatizmal Ağrılar. Atlas tıp Kitabevi, Konya 349-367.
- Ergin, S. (2007). Osteoartritte klinik bulgular ve fonksiyonel değerlendirme. In *Tanıdan Tedaviye Osteoartrit*. M. Sarıdoğan, editor: Nobel Tıp Kitapevleri 73-80.
- Eskiyurt, N. (2000). Osteoartrozda Klinik Bulgular. In *Osteoartroz, Modern tıp seminerleri dizisi*. Y. Gökçe-Kutsal, editor: Güneş Kitabevi. 53-59.
- Atay, M.B. (2011). Osteoartrit In *Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon*. M. Beyazova, and Y.G. Kutsal, editors. Ankara: Güneş Kitabevi. 2537-2562.
- Evcik, D., and Babaoğlu, Ü. (2007). Osteoartrit etyopatogenezi. In *Tanıdan Tedaviye Osteoartrit*. M. Sarıdoğan, editor. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri. 51-71.
- Doğanavşargil, E., and Gümüşiş, G. (2003). *Klinik Romatoloji*
- Lohmander, L.S. (2000). What can we do about osteoarthritis? *Arthritis Res* 2:95-100.
- Sarpel, T. (2007). Eklem kırırdağı ve osteoartrit. In *Tanıdan Tedaviye Osteoartrit*. M. Sarıdoğan, editor. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi. 29-34.
- Harris, E.D., Budd, R.C., Firestein, G.S., Genovese, M.C., Segent, J.S., Ruddy, S., and Sledge, C.B. (2006). Kemik, eklemler, bağ dokusunun yapı ve fonksiyonu. In *Kelley Romatoloji*. S.R. Goldring, and M.B. Goldring, editors. İstanbul: Güneş Kitabevi. 1-34.
- Kuru, Ö. (2000). Kırırdağ Biyokimyası ve Osteoartrit Patogenezi. In *Osteoartrit*. Y. Karaaslan, editor. Ankara: MD Yayıncılık. 10-27.
- Goldring, M.B. (2000). The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism* 43:1916-1926.
- Taskiran, D. (2007). Biochemical markers in cartilage injury and repair. *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica* 41:6-12.
- Harris, E.D., Budd, R.C., Firestein, G.S., Genovese, M.C., Segent, J.S., Ruddy, S., and Sledge, C.B. (2006). Kondrositler. In *Kelley Romatoloji*. G. Yavuzer, and P. Başaran, editors. İstanbul: Güneş Tıp Kitabevi. 203-234.

22. Van der Kraan, P.M., and van den Berg, W.B. (2000). Anabolic and destructive mediators in osteoarthritis. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 3:205-211.
23. Westacott, C.I., and Sharif, M. (1996). Cytokines in osteoarthritis: mediators or markers of joint destruction? In *Seminars in arthritis and rheumatism*: Elsevier. 254-272.
24. Wolheim, F. (2003). Osteoarthritis and related disorders: pathogenesis of osteoarthritis. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman M (eds). *Rheumatology*. 3rd ed. Edinburgh: Mosby.1801-1816.
25. Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., and Pelletier, J. (2005). Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: Kopman WJ, Moreland LW (eds). *Arthritis and allied conditions. A textbook of Rheumatology*. 15th ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2199-2226.
26. Goldring, M.B. (2000). Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines. *Current rheumatology reports* 2:459-465.
27. Hough, A. (2005). Pathology of osteoarthritis In *Arthritis and allied conditions. A textbook of Rheumatology*. W. Kopman, and L. Moreland, editors. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins. 2169-2197.
28. Doral, M.N., Dönmez, G., Atay, Ö.A., Bozkurt, M., Leblebicioğlu, G., Üzümcügil, A., and Aydoğ, T. (2007). Dejeneratif eklem hastalıkları. *Totbid Dergisi* 6:56-65.
29. Apraş, Ş., and Çobankara, V. (2000). Osteoartritin Laboratuvar Bulguları. In *Osteoartrit*. Y. Karaaslan, editor. Ankara: MD Yayıncılık. 114-118.
30. Saxne, T., Lindell, M., Mansson, B., Petersson, I., and Heinegard, D. (2003). Inflammation is a feature of the disease process in early knee joint osteoarthritis. *Rheumatology* 42:903-905.
31. Henrotin, Y., Bruckner, P., and Pujol, J.-P. (2003). The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage* 11:747-755.
32. Özgül, A. (2002). Büyüme faktörlerinin osteoartritteki rolü ve kırıldak tamiri. *Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon ostreoartrit özel sayısı* 2:148-157.
33. Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics* 12:99-110.
34. Ha, M., and Kim, V.N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15:509-524.
35. Saydam, F., Değirmenci, İ., and Güneş, H.V. (2011). MikroRNA'lar ve kanser. *Dicle Tıp Dergisi* 38.
36. Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *cell* 75:843-854.
37. Griffiths-Jones, S., Saini, H.K., van Dongen, S., and Enright, A.J. (2008). miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic acids research* 36:D154-D158.
38. <http://www.mirbase.org/>.
39. Sonkoly, E., and Pivarcsi, A. (2009). microRNAs in inflammation. *International reviews of immunology* 28:535-561.
40. Nakasa, T., Nagata, Y., Yamasaki, K., and Ochi, M. (2011). A mini-review: microRNA in arthritis. *Physiological Genomics* 43:566-570.
41. He, L., He, X., Lowe, S.W., and Hannon, G.J. (2007). microRNAs join the p53 network—another piece in the tumour-suppression puzzle. *Nature Reviews Cancer* 7:819-822.
42. Callis, T.E., Chen, J.-F., and Wang, D.-Z. (2007). MicroRNAs in skeletal and cardiac muscle development. *DNA and cell biology* 26:219-225.
43. O'Connell, R.M., Rao, D.S., Chaudhuri, A.A., and Baltimore, D. (2010). Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nature Reviews Immunology* 10:111-122.
44. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews Genetics* 9:102-114.
45. Yates, L.A., Norbury, C.J., and Gilbert, R.J. (2013). The long and short of microRNA. *Cell* 153:516-519.
46. Carthew, R.W., and Sontheimer, E.J. (2009). Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136:642-655.
47. Kim, V.N., Han, J., and Siomi, M.C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature reviews Molecular cell biology* 10:126-139.
48. Lee, Y., Han, J., Yeom, K.-H., Jin, H., and Kim, V. (2006). Drosha in primary microRNA processing. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 51-57.

49. Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., and Kim, S. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *nature* 425:415-419.
50. Melo, S.A., and Kalluri, R. (2012). Molecular pathways: microRNAs as cancer therapeutics. *Clinical Cancer Research* 18:4234-4239.
51. Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development* 17:3011-3016.
52. Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., and Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303:95-98.
53. Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., and Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436:740-744.
54. Meister, G. (2013). Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nature Reviews Genetics* 14:447-459.
55. Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *cell* 120:15-20.
56. Kobayashi, T., Lu, J., Cobb, B.S., Rodda, S.J., McMahon, A.P., Schipani, E., Merckenschlager, M., and Kronenberg, H.M. (2008). Dicer-dependent pathways regulate chondrocyte proliferation and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:1949-1954.
57. Iliopoulos, D., Malizos, K.N., Oikonomou, P., and Tsezou, A. (2008). Integrative microRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks. *PLoS One* 3:e3740.
58. Jones, S., Watkins, G., Le Good, N., Roberts, S., Murphy, C., Brockbank, S., Needham, M., Read, S., and Newham, P. (2009). The identification of differentially expressed microRNA in osteoarthritic tissue that modulate the production of TNF- α and MMP13. *Osteoarthritis and cartilage* 17:464-472.
59. Díaz-Prado, S., Cicione, C., Muiños-López, E., Hermida-Gómez, T., Oreiro, N., Fernández-López, C., and Blanco, F.J. (2012). Characterization of microRNA expression profiles in normal and osteoarthritic human chondrocytes. *BMC musculoskeletal disorders* 13:144.
60. Beyer, C., Zampetaki, A., Lin, N.-Y., Kleyer, A., Perricone, C., Iagnocco, A., Distler, A., Langley, S.R., Gelse, K., and Sesselmann, S. (2014). Signature of circulating microRNAs in osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases:annrheumdis-2013-204698*.
61. Tuddenham, L., Wheeler, G., Ntounia-Fousara, S., Waters, J., Hajihosseini, M.K., Clark, I., and Dalmay, T. (2006). The cartilage specific microRNA-140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells. *FEBS letters* 580:4214-4217.
62. Miyaki, S., Nakasa, T., Otsuki, S., Grogan, S.P., Higashiyama, R., Inoue, A., Kato, Y., Sato, T., Lotz, M.K., and Asahara, H. (2009). MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates interleukin-1 responses. *Arthritis & Rheumatism* 60:2723-2730.
63. Miyaki, S., Sato, T., Inoue, A., Otsuki, S., Ito, Y., Yokoyama, S., Kato, Y., Takemoto, F., Nakasa, T., and Yamashita, S. (2010). MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis. *Genes & development* 24:1173-1185.
64. Tardif, G., Hum, D., Pelletier, J.-P., Duval, N., and Martel-Pelletier, J. (2009). Regulation of the IGFBP-5 and MMP-13 genes by the microRNAs miR-140 and miR-27a in human osteoarthritic chondrocytes. *BMC musculoskeletal disorders* 10:148.
65. Akhtar, N., Rasheed, Z., Ramamurthy, S., Anbazhagan, A.N., Voss, F.R., and Haqqi, T.M. (2010). MicroRNA-27b regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in human osteoarthritis chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism* 62:1361-1371.
66. ElSharawy, A., Keller, A., Flachsbarth, F., Wendschlag, A., Jacobs, G., Kefer, N., Brefort, T., Leidinger, P., Backes, C., and Meese, E. (2012). Genome-wide miRNA signatures of human longevity. *Aging cell* 11:607-616.
67. Hooten, N.N., Abdelmohsen, K., Gorospe, M., Ejiogu, N., Zonderman, A.B., and Evans, M.K. (2010). microRNA expression patterns reveal differential expression of target genes with age. *PLoS one* 5:e10724.
68. Olivieri, F., Spazzafumo, L., Santini, G., Lazzarini, R., Albertini, M.C., Rippon, M.R., Galeazzi, R., Abbatecola, A.M., Marcheselli, F., and Monti, D. (2012). Age-related differences in the expression of circulating microRNAs: miR-21 as a new circulating

- marker of inflammaging. *Mechanisms of ageing and development* 133:675-685.
69. Okuhara, A., Nakasa, T., Shibuya, H., Niimoto, T., Adachi, N., Deie, M., and Ochi, M. (2012). Changes in microRNA expression in peripheral mononuclear cells according to the progression of osteoarthritis. *Modern rheumatology* 22:446-457.
 70. Sheedy, F., and O'Neill, L. (2008). Adding fuel to fire: microRNAs as a new class of mediators of inflammation. *Annals of the Rheumatic Diseases* 67:iii50-iii55.
 71. Dunn, W., DuRaine, G., and Reddi, A.H. (2009). Profiling microRNA expression in bovine articular cartilage and implications for mechanotransduction. *Arthritis & Rheumatism* 60:2333-2339.
 72. Taganov, K.D., Boldin, M.P., Chang, K.-J., and Baltimore, D. (2006). NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:12481-12486.
 73. Ceppi, M., Pereira, P.M., Dunand-Sauthier, I., Barras, E., Reith, W., Santos, M.A., and Pierre, P. (2009). MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:2735-2740.
 74. O'Connell, R.M., Taganov, K.D., Boldin, M.P., Cheng, G., and Baltimore, D. (2007). MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:1604-1609.
 75. Yamasaki, K., Nakasa, T., Miyaki, S., Ishikawa, M., Deie, M., Adachi, N., Yasunaga, Y., Asahara, H., and Ochi, M. (2009). Expression of microRNA-146a in osteoarthritis cartilage. *Arthritis & Rheumatism* 60:1035-1041.
 76. Mitchell, P.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S.K., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Brian, K.C., and Allen, A. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:10513-10518.
 77. Wang, G.-K., Zhu, J.-Q., Zhang, J.-T., Li, Q., Li, Y., He, J., Qin, Y.-W., and Jing, Q. (2010). Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *European heart journal* 31:659-666.
 78. Wang, K., Zhang, S., Marzolf, B., Troisch, P., Brightman, A., Hu, Z., Hood, L.E., and Galas, D.J. (2009). Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:4402-4407.
 79. Miyaki, S., and Asahara, H. (2012). Macro view of microRNA function in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 8:543-552.