

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**KALÇA OSTEOARTRİTİ ETYOLOJİSİNDE KIKIRDAKTAKİ
AGREKANAZ ENZİMLERİNİN VE ADAMTS GENLERİNİN
ROLÜ VAR MI?**

**UZMANLIK TEZİ
TACETTİN AYANOĞLU**

**TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. HAKAN ATALAR**

**ANKARA
AĞUSTOS 2016**

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**KALÇA OSTEOARTRİTİ ETYOLOJİSİNDE KIKIRDAKTAKİ
AGREKANAZ ENZİMLERİNİN VE ADAMTS GENLERİNİN
ROLÜ VAR MI?**

**UZMANLIK TEZİ
TACETTİN AYANOĞLU**

**TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. HAKAN ATALAR**

**ANKARA
AĞUSTOS 2016**

TEŞEKKÜR

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Ana Bilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalıştığım süre içinde bilgi ve becerilerimin her geçen gün artmasında ve bu mesleğin inceliklerini öğrenmemde kendi tecrübeleri ve bilgilerini bana aktararak destek olan, tez danışmanım **Doç. Dr. Hakan Atalar** başta olmak üzere değerli hocalarım **Prof. Dr. Şahap Atik, Prof. Dr. Selçuk Bölükbaşı, Prof. Dr. Ertuğrul Şener, Prof. Dr. Sacit Turanlı, Prof. Dr. Ulunay Kanatlı, Prof. Dr. Hamza Özer, Prof. Dr. Alpaslan Şenköylü, Prof. Dr. Hakan Selek, Prof. Dr. Akif Muhtar Öztürk, Doç. Dr. Erdinç Esen, Doç. Dr. Turgay Çavuşoğlu ve Öğr. Gör. Dr. Baybars Ataoğlu**'na,

Gerek beş yıllık asistanlık eğitim hayatım boyunca, gerekse uzmanlık tezimi hazırlarken ihtiyaç duyduğum her an, değerli zamanını benim için ayıran ve çalışmalarımda desteğini her zaman arkamda hissettiğim, etik ve bilimsel açıdan örnek aldığım sayın hocalarım **Prof. Dr. Sacit Turanlı, Prof. Dr. Ulunay Kanatlı ve Doç. Dr. Erdinç Esen**'e,

Beş yıllık asistanlık eğitimim boyunca bilgi ve desteğini paylaşarak motivasyonumu yüksek tutan **Öğr. Gör. Dr. Baybars Ataoğlu**'na,

Eğitimim süresince geceli gündüzlü sürekli birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum, başta Fatih İlker Can, **Mehmet Selçuk Şenol, İsmail Daldal, Toygun Kağan Eren ve Ahmet Yiğit Kaptan** olmak üzere tüm değerli uzman olmuş ve olacak araştırma görevlisi arkadaşlarıma; poliklinik, servis ve ameliyathane hemşire, personel ve sekreterlerine,

Tüm yaşamım boyunca yetişmemi sağlayan ve sonsuz desteklerini esirgemeyen babam **İsmail Ayanoğlu**, annem **Nihal Ayanoğlu** ve yardımını asla eksik etmeyen kardeşim **Hacer Ayanoğlu**'na,

Zorlu uzmanlık eğitimim boyunca bana her zaman destek olan ve daima sevgi, özveri ve anlayışla yanımda yer alan sevgili eşim **Aysun Töngemen Ayanoğlu**'na varlığı için teşekkürü bir borç bilirim.

Dr. Tacettin AYANOĞLU / ANKARA – 2016

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİLLER.....	iii
TABLolar.....	iv
KABUL VE ONAY SAYFASI.....	v
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1 Tarihçe.....	5
2.2 İnsidans.....	6
2.3 Etiyoloji.....	7
2.4 Kalça Eklemi Anatomisi.....	10
2.5 Osteoartrit Patolojisi.....	20
2.6 Osteortritte Kalıtsal Yatkınlık	25
2.7 Osteoartrit Sınıflandırması	28
2.8 Fizik Muayene	30
2.9 ADAMTS Genleri	32
3. HASTALAR VE YÖNTEM.....	38
3.1Mataryal	38
3.2 Metod.....	39
4. BULGULAR.....	46
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ.....	59
7. KAYNAKLAR	60
8. ÖZET.....	82
9. SUMMARY.....	84

ŞEKİLLER

Şekil 1. Koksayı oluşturan kemik yapılar

Şekil 2. Asetabulumdaki anatomik yapılar

Şekil 3. Kalça eklem kapsülünün anterior ve posteriordan görünümü

Şekil 4. Kalçanın dorsal grup kasları

Şekil 5. Uyluk kasları

Şekil 6. Femur proksimal uç vasküler anatomisi

Şekil 7. Kan alma, santrifüj ve serum ayırıştırma işlemleri.

Şekil 8. RNA İzolasyonu, cDna sentezi ve RT-PCR

Şekil 9. β - aktin sonuçları

Şekil 10. Agrekan molekülünün ve klivaj bölümlerinin gösterimi

TABLÖLAR

Tablo 1. Kan örneklelerinde çalışılan ELISA sonuçları

Tablo 2. Kan örneklelerinde çalışılan ELISA sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi

Tablo 3. Kan örneklelerinde çalışılan RT-PCR sonuçları

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Programı çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 05/08/2016

BAŞKAN

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
..... Üniversitesi

ÜYE
İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi

ÜYE
İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi

ÜYE
İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi

ÜYE
İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi

1.GİRİŞ

Osteoartrit(OA) en sık görülen dejeneratif eklem hastalığı olup sıklığı yaşla birlikte artan, eklem kıkırdağında erozyon, eklem kenarlarında osteofit, subkondral skleroz, sinoviyal membran ve eklem kapsülünde biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerle karakterize dejeneratif bir eklem hastalığıdır. Dejeneratif artrit, osteoartroz ve hipertrofik artrit gibi adlar da verilen bu hastalıkta eklem kıkırdağının giderek kaybı söz konusudur. Bir veya birkaç eklemdede gelişebilmektedir. Her sinoviyal eklemdede görülebilmekte olup en sık olarak diz ve kalça ekleminde görülmektedir. 65 yaş üzeri erişkin popülasyonun yaklaşık %40'ında semptomatik diz ve kalça osteoartriti bulunmaktadır.

Osteoartrit kesin etyolojisi ve patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır. Genetik, metabolik, biyokimyasal ve biyomekanik faktörlerin yıkım zincirini başlattığı ve kartilaj hasarına neden olarak osteoartrit'e neden olabileceği bilinmektedir. Toplumdaki sıklığı, ortalama yaşam süresinin uzaması ve obezitenin insidansının artması gibi nedenlerle giderek artmaktadır. Gelişmiş ülkelerde osteoartrit fiziksel özürlülüğün önemli nedenlerindendir, sağlık harcamalarının artmasına ve hayat kalitesinin düşmesine neden olmaktadır.

ADAMTS'ler kanserden romatizmaya, inflamasyondan yara iyileşmesine, gelişim biyolojisi ve apoptoza kadar birçok biyolojik süreçte önemli roller aldığı için birçok araştırmacının ilgi odağındadır (1). Son yıllarda kanser ve metastazda aldığı roller nedeniyle bu ilgi daha da artmaktadır. Kartilaj hasarında ise ADAMTS-agrekanazlar, matriks metalloproteazlar (MMP) ile birlikte baş

aktörlerdendir. Romatizmal hastalıkları ilgilendiren en önemli kısım hangi ADAMTS'in esas enzim olduğu ve kartilaj erozyonundaki mekanizmasıdır (2,3,4,5).

Osteoartrit, eklem kıkırdağı ve subkondral kemikte yıkım ve tamir olayları arasındaki normal dengenin bozulması sonucu gelişen progresif bir hastalıktır. Etyolojisinde genetik, inflamatuvar, metabolik ve travmatik faktörler suçlanmasına karşın tam olarak kanıtlanamamıştır. Kıkırdağın en önemli 2 ana bileşeni tip-2 kollajen fibrilleri ve agrekan proteoglikanıdır. Osteoartritte göze çarpan önemli bulgulardan biri agrekan parçalanması sonucu oluşan kartilaj erozyonudur. Bu yüzden agrekanı parçalayan enzimlerin keşfi yeni tedavi rejimlerinin geliştirilmesine fırsat verebilir. 1997 yılında Kuno ve arkadaşları (6), hücre dışı matriks ve kartilaj erozyonu ile ilişkili olan ADAMTS (trombospondin motifli disintegrin ve metalloproteazlar) genlerini keşfetti. Torteralla ve arkadaşları (7), ADAMTS4 genini, agrekanı parçalayan ilk agrekanaz enzimi olarak rapor ettiler. 2005 yılında yayınlanan 2 ayrı makale (2,3) ile farelerde ADAMTS5'in kartilaj erozyonundan sorumlu ana agrekanaz olduğu bulundu. Osteoartritli hastalar üzerinde yapılan iki çalışmada ADAMTS4-5 ön plana çıkmıştır. Ancak 19 adet ADAMTS genlerinden hangisinin insanda etkili olan esas agrekanaz olduğu hala netleşmemiştir (8,9). 2013 yılında yapılan bir çalışmada erken evre osteoartrit hastalarında ADAMTS4 enziminin yüksekliğinin ADAMTS5 enzim yüksekliğine göre daha anlamlı olduğunu gösteren çalışmalar yayınlanmıştır (10). Son yıllarda ADAMT4 ve ADAMTS5 dışında ADAMTS9 öne çıkan agrekanaz enzimlerindendir.

1997 yılında ADAMTS'lerin keşfinden bugüne Pubmed'te konuyla ilgili 239 makale yayınlanmış, Bunlardan 141 tanesi insan çalışmalarıdır. Osteoartrit patogenezinin sorumlu agrekanazların araştırıldığı 3 yayın bulunmaktadır (8,9,10). 3 çalışmada osteoartriti olan hastalar üzerinde yapılmıştır. Literatürde hem hayvan çalışmaları hem de klinik insan çalışmaları olmasına rağmen hangi agrekanazların öne çıktığını gösteren prospektif, kontrollü çalışma yoktur. Farklı evrelerde osteoartrit gelişen hastalardan alınan örneklerde enzim analizi yapılmış ancak osteoartrit bulunmayan hastalarla olanları karşılaştıran çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasındaki amacımız, cerrahi tedavi gerektirecek, son evre osteoartrit gelişen hastaların kıkırdaklarındaki protein ile agrekanaz enzim ölçümü ve kan örneklerindeki DNA polimorfizm ve RNA gen ekspresyonu analiz sonuçlarını kontrol grubu ile karşılaştırarak patogenezdaki rollerini göstermektir. Araştırma kapsamında, 15 tane kalça eklemünde osteoartrit gelişen, cerrahi tedavi gerektiren ve total kalça protezi uygulanan hastalar ile 15 tane femur boyun kırığı gelişen, osteoartrit bulguları olmayan ve parsiyel kalça protezi uygulanan hastaların ameliyat sırasında alınan ve rezeke edildikten sonra çöpe atılan materyallerinden doku örnekleri alınacaktır. Rezeksiyon materyallerinden kıkırdak örnekleri alındıktan sonra soğuk zincir kurallarına uygun olarak nakledip -80°C'de saklanarak ELISA yöntemi ile ADAMTS gen analizi, kan örneklerinde PCR ile DNA'da polimorfizm ölçümü yapılacaktır.

Bu projedeki amacımız, cerrahi tedavi gerektirecek, son evre osteoartrit gelişen hastaların kıkırdaklarındaki protein ile agrekanaz enzim ölçümü ve kan örneklerindeki DNA polimorfizm ve RNA gen ekspresyonu analiz sonuçlarını

kontrol grubu ile karşılaştırarak patogenezdaki rollerini göstermektir. Araştırma kapsamında, 15 tane kalça eklemünde osteoartrit gelişen, cerrahi tedavi gerektiren ve total kalça protezi uygulanan hasta ile 15 tane femur boyun kırığı gelişen, osteoartrit bulguları olmayan ve parsiyel kalça protezi uygulanan hastaların ameliyat sırasında alınan ve rezeke edildikten sonra çöpe atılan materyallerden doku örnekleri alınacaktır. Rezeksiyon materyallerinden kırıkta örnekleri alındıktan sonra soğuk zincir kurallarına uygun olarak nakledip -80°C’de saklanarak serumda ELISA yöntemi ile agrekanaz enzim ölçümü, kan örneklerinde PCR ile DNA’da polimorfizm ölçümü yapılacaktır.

Bu hastalığın patofizyolojisinde rol oynayan bu preteolitik enzimlerin rollerinin tam olarak açıklığa kavuşturulması tedaviye yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır. Enzim veya proteoliz sonucu oluşan ürünlerin tespiti erken tanı imkanı sağlayabilir. Patogenezdaki rolü ispatlanacak enzimlerin inhibitörlerinin geliştirilmesi sonucunda cerrahi tedaviye gereksinimin azalmasına ve yeni ilaç gelişimi ile medikal tedavi olanağı sağlayacağından etyolojisinin aydınlatılması hedeflenmektedir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Tarihçe

Osteoartrit ismi Yunanca osteo yani “kemiksel, kemikle ilgili, kemikten”, arthro yani “eklem” ve itis yani “enflamasyon” (iltihap) sözcüklerinden türemiştir.

Eklem kıkırdağının yüzeyel tabakalarında ortaya çıkan lokalize fibrilasyon ve ayrılmalar osteoartritin gözle görülebilen en erken belirtisidir. Hastalık ilerledikçe eklem yüzeyinin daha büyük bölümü düzensizleşir, fibrilasyon derinleşerek subkondral kemiğe ulaşır. Kıkırdaktaki çatlak ve yarıklar derinleştikçe fibrilasyona uğramış kıkırdağın yüzeydeki uçları yırtılır ve eklem boşluğunda serbestçe dolaşan parçaların kopmasına ve kıkırdak kalınlığının azalmasına yol açar. Bu sırada ortaya çıkan enzimatik matriks yıkımı kıkırdağın hacmini iyice azaltır sonunda kıkırdağın giderek kaybolması kemiğin açıkta kalmasına neden olur.

Osteoartritteki kıkırdak yıkımında mekanik faktörlerin yanı sıra enzimatik süreç de önemli rol oynamaktadır. Osteoartrit patofizyolojisinde majör rol oynayan enzimler metalloproteazlar, serin proteazlar, tiol proteazlar ve agreganazlardır. Eklem kıkırdağındaki anabolik ve katabolik süreç arasındaki dinamik dengede sitokinler ve büyüme faktörleri gibi çeşitli ekstrasellüler messenger proteinler de rol oynamaktadır. Son çalışmalar interlekin-1 ve tümör nekroz faktör alfanın kıkırdak bozulması sürecini en fazla etkileyen sitokinler olduğunu göstermiştir.

Metalloproteinazlar ilk olarak 1962 yılında Jerome Gross ve Charles Lapiere tarafından tanımlanmıştır. Enzimatik aktivite ile kollojenin üçlü heliks yapısında bozulma oluşturdıklarını göstermişlerdir (11). 1968 yılında insan deri dokusundan elde edilmiş (12) ve bir zimojen olarak sentezlenebildiği tanımlanmıştır (13). Sistein eklentisi ise 1990 yılında tanımlanmıştır (14).

Serin proteazlar ise 1993 yılında tanımlanmış olup proteindeki peptit bağlarını serin aminoasitinin nükleofilik aktivite oluşturduğu alandan kopararak osteoartrit oluşumunda rol alırlar (15).

İlk olarak 1997 yılında Kuno ve ark. tarafından kolon kanserinde, inflamasyonla ilişkili olarak tanımlanmış olan ADAMTS proteinazların, günümüzde birçok fizyolojik ve patolojik süreçlerde yer aldığı bilinmektedir (1,6). Bazı ADAMTS'ler (1, 4, 5, 8, 9, 15, 16 ve 18) kırıkdağın ana bileşeni olan agrekan proteoglikanını enzimatik kesme özelliğine sahiptir (1). Agrekanı kesip parçaladıkları için bu grup agrekanazlar olarak adlandırılır (16). İlk kez 1999 yılında ADAMTS4, agrekanaz-1 olarak isimlendirilmiştir (7). Daha sonraları ADAMTS5, agrekanaz-2 olarak sınıflandırılmıştır.

2.2 İnsidans

Dünya Sağlık Örgütü'nün tahminlerine göre 65 yaş üstü erişkinlerin kabaca %25'inde osteoartrite bağlı ağrı ve fonksiyon kaybı vardır. OA hemen her yaş grubunu etkilemekle beraber, prevalans erkeklerde 50, kadınlarda 40 yaşın üzerinde dramatik olarak artar (17). Toplumda yaşlı bireylerin sayısının giderek artması nedeniyle özellikle büyük eklem OA'sı olmak üzere OA önemli bir halk

sağlığı problemi haline gelmiştir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 30 yaş ve üstünde, semptomatik OA yüzdesi kalçada yaklaşık 6 ve dizde 3'dür. 1995'den 2005'e dek semptomatik OA oranı ABD'de 21 milyondan 27 milyona yükselmiştir. Bu yükseliş muhtemelen popülasyonun yaşlanmasını ve obezite epidemisini yansıtmaktadır (18). Ülkemizde hastalık yükü çalışmalarında OA ön sıralarda (yedinci sırada ve toplam hastalık yükü içinde %2.9) yer almaktadır (19). Kas iskelet sistemi yakınmaları ile polikliniğimize başvuran 65 yaş üstü hastaların tanısal dağılımının değerlendirildiği retrospektif bir çalışmada dejeneratif hastalıklar en sık rastlanan tanı olarak izlenmiştir (20).

2.3 Etiyoloji

OA etiyolojisi multifaktöriyeldir ve gelişiminde sistemik ve lokal faktörlerin etkileşimi rol oynar. Hastalığın gelişimi, progresyonu, radyografik ya da semptomatik oluşunda risk faktörlerinin göreceli önemi, ekleme ve hastalığın evresine göre değişir. Osteofit oluşumu ve eklem aralığı daralması gibi bazı radyolojik özelliklerin gelişmesinde risk faktörlerinin farklı etkileri olduğuna dair de bazı kanıtlar vardır.

1. Yaş: Osteoartrit ile güçlü ilişkisi bulunan bir risk faktörüdür ve OA insidansı yaşla birlikte artmaktadır (21). Çok sayıda epidemiyolojik çalışmada ileri yaştan OA için önemli bir risk faktörü olduğu ortaya konmuştur (22, 23, 24). Yaşın ilerlemesiyle vücutta kıkırdağı etkileyen birçok biyolojik değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Eklem kıkırdağında yaşla beraber oluşan yapısal değişiklikler arasında artiküler yüzeyde yıpranma ve sertliğinde kayıp vardır. Bu yaşa bağlı doku değişiklikleri muhtemelen

kondrositlerin dokuyu tamir ve koruma yeteneklerindeki azalmaya bağlıdır, çünkü kondrositlerin yaştan ilerlemesiyle mitotik ve sentetik aktiviteleri, anabolik büyüme hormonlarına yanıtları azalmaktadır (23). Ayrıca yaşla birlikte eklemlerin çevresindeki ligamanların laksitesi artmakta, kas gücü ve propriyosepsiyon da azalmaktadır. Bu da eklemleri daha kolay zedelenebilir hale getirmektedir (25).

2. Cinsiyet: Genel olarak kadınların erkeklere göre daha fazla OA riski taşıdığı bilinmektedir (22,26). 50 yaş civarlarının altında OA prevalansı kadınlar ve erkeklerde benzerken, 50 yaş üstünde kadınlarda daha sık, ağır ve generalize olarak görülmektedir (27). Kadınlarda semptomatik hastalık oranları, erkeklere kıyasla anlamlı olarak yüksek oranda görülmektedir (21,24). Kadınlarda kalça OA gelişme riski de, poliartiküler OA'nın bir parçası olarak daha yüksektir ve kalça OA kadınlarda erkeklere göre daha ciddi seyreder ve daha hızlı progresyon göstermektedir (28,29).
3. Obezite: Obezite, OA'da önemli bir değiştirilebilir risk faktörüdür. Özellikle diz OA için yüksek vücut kitle indeksi önemli bir risk faktörüdür (30,31). Vücut kitle indeksinin, diz osteoartritinin uzun dönem progresyonunda çok etkili olduğu gösterilmiştir (32). Bununla birlikte obezite ile kalça osteoartriti arasındaki ilişki, diz osteoartriti kadar güçlü bulunamamıştır (33). OA ile obezite arasındaki ilişkinin mekanizması halen açık değildir. Obezitede mekanik yüklenme artışının OA'ya neden olan temel mekanizma olarak düşünülmektedir.

4. Mesleki zorlanmalar: Ekleme tekrarlayıcı ve aşırı yüklenme OA gelişme riskini arttırır. Kısaç kavrama gerektiren tekrarlanan görevler özellikle DIP ekleminde olmakla birlikte, el OA riskini arttırmaktadır (34, 35). Uzun süreli ve tekrarlayıcı dizin bükülü olmasını gerektiren mesleklerde radyografik diz OA'ının daha sık görülmektedir. Özellikle patellofemoral OA olmakla beraber diz OA patogenezinde biyomekanik faktörlerin önemli rolü vardır. Ağır yük taşımali işler, merdiven inip çıkma da mekanik etkiyle, diz OA gelişme (36) ve kalça OA (37) gelişme riskini arttırmaktadır.
5. Spor aktiviteleri: Sporsal aktivite ile aşırı kullanıma ve buna bağılı olarak eklem hasarı oluşması arasında ilişki vardır. Bazı yapılan çalışmalar sonucunda genç erişkinlerde, yüksek yoğunlukta eklemi zorlayan sporların ileride OA gelişme riskini arttırdığı düşünülmektedir (38). Bu tip sporları yapan profesyonel atletlerde major bir travma olmadan OA gelişmesine neden olabileceğı belirtilmektedir (39,40). Bununla birlikte sağlıklı uzun mesafe koşucularında, diz ve kalça OA riskini arttırmadığı görülmüştür. Ve uzun mesafe koşusunun eklem dejenerasyonundan koruyucu olabileceğı düşünülmektedir (41). Günlük fiziksel aktivitelerin ve ılımlı dinlenmeli spor aktivitelerinin, kalça ve diz OA riskini arttırmadığı görülmektedir (42,43). Sedanter yaşayanlara göre düzenli egzersiz yapanlarda kalça ve diz OA riskini azaltabileceğı gösterilmiştir (44).
6. Eklemdeki bozukluklar ve daha önceki hasarlar: Kalça ekleminde epifiz kayması ve Perthes hastalığının OA için predispozisyon oluşturduğu bilinmektedir. Ligaman ya da menisküslerde daha önceden oluşmuş

hasarların ve geçirilmiş menisektomi operasyonlarının diz OA'ini riskini arttırdığı gösterilmiştir. Büyük travmalar ya da küçük tekrarlayan travmalar eklemdede dejenerasyona yol açmaktadırlar.

7.Kas güçsüzlüğü: Kasların güçsüzlüğü OA'nın bir sonucu olarak görülür (45). Ama bazı çalışmalarda kuadriceps kas güçsüzlüğünün radyografik OA gelişme riskini arttırdığı gösterilmiştir (46). Bu bulgu eklem çevresi kasların güçsüzlüğünün OA'nın risk faktörlerinden biri olduğunu göstermektedir.

8.Fiziksel egzersiz azlığı

9.Propriosepsiyon bozukluğu: Gonartrozu olan bazı hastalarda propriosepsiyon duyusunda bozulma olduğu bildirilmiştir. Bu genel bir propriosepsiyon bozukluğu olmayıp, eklem içi veya çevresindeki mekanoreseptörlerdeki bir hasar dolayısıyladır. Charcot eklemi bunun klasik bir örneğidir.

10.Genetik faktörler: Genetik faktörlerin OA'deki rolü ikiz çalışmaları ve modern moleküler teknikler kullanılarak incelenmiştir. Genetik faktörler OA'in bazı alt gruplarında daha etkili olurlar (47,48). Özellikle dizin tibiofemoral ve patellofemoral kompartmanları genetik faktörlerden daha fazla etkilenmektedir.

2.4 Kalça Eklemi Anatomisi

Kalça eklemi femur proksimal ucu ve os coxae arasında yerleşen top-yuva şeklinde bir eklemdir. Os coxae, ilium, iskium ve pubis adı verilen üç adet kemiğin birleşiminden meydana gelir (49).

Os Pelvis:

Sakrum ile sag ve sol os coxae'ların olusturdugu halkaya 'cingulum pelvicum' adı verilir. Her iki tarafın os coxae'si, ön-orta kısımda symphysis pubica aracılığı ile birlesir. Arka tarafta ise araya os sakrum girerek saglam bir kusak olusturur. Pelvisin kemik iskeletini, her iki innominate kemik, arkada sakrum, önde de symphysis pubis aracılığı ile birbiriyle eklem yaparak olustururlar. Os coxae aslında os ilii, os ischii ve os pubis adı verilen üç ayrı kemikten olusmaktadır (Sekil 1).

Os İlium:

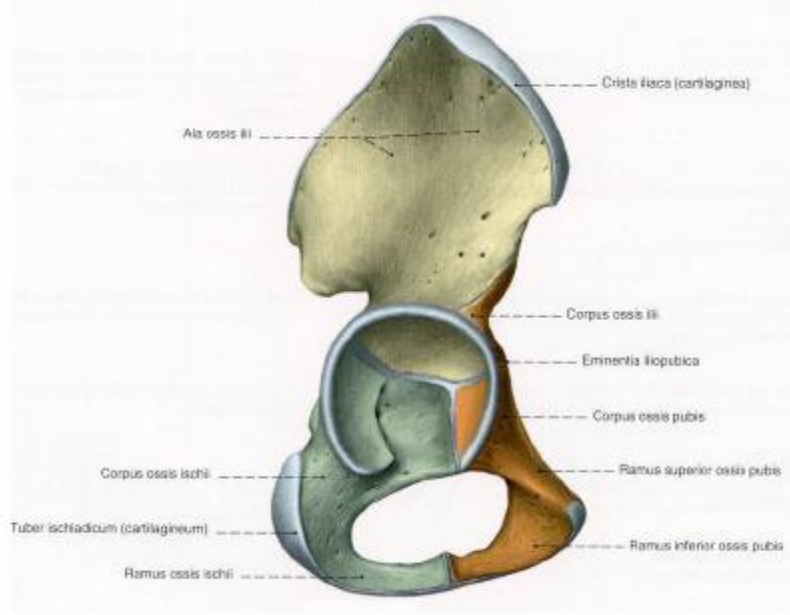
Kalça kemiginin en genis parçasıdır ve asetabulumun 2/5'ini olusturur. Corpus ossis ilii ve ala ossis ilii olmak üzere iki parçadan olusmustur. Corpus ossis ilii asetabulumun yapısına katılır ve burada diger iki kemik ile birlesir. Ala ossis ilii kemigin kanat seklinde genis ve ince olan kısmıdır. Bu kısım pelvis boslugunu yanlardan sınırlar. İliumun serbest üst kısmına crista iliaca denir.

Os İschium:

Corpus ve ramus diye iki parçaya ayrılır. Corpus asetabulumun yapısına katılır ve asetabulumun 2/5 ini olusturur. Ramus ossis ischii daha ince ve yassı kısmıdır.

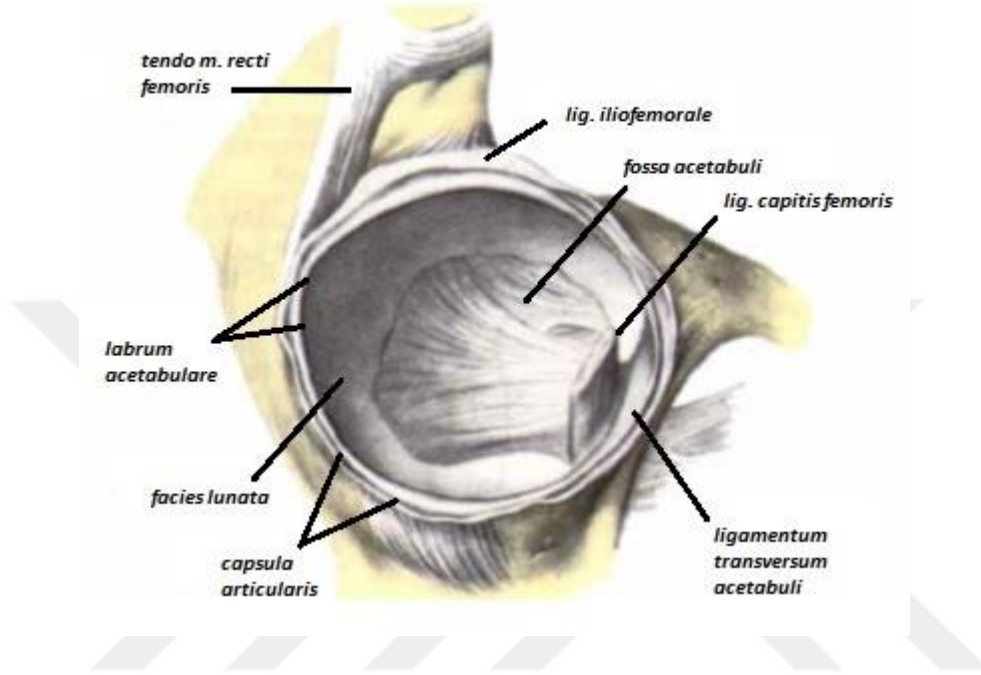
Os Pubis:

Corpus, ramus süperior ve inferior olmak üzere üç kısımdan olusur. Corpus ossis pubis asetabulumun 1/5'ini olusturur. Ramus süperior ve inferior kolları birlesirler ve symphysis pubis adı verilen eklem aracılığı ile karsı taraf kemigin aynı yüzü ile eklem yapar.



Şekil 1. Koksayı oluşturan kemik yapılar

Os coxae’da femur başını kapsayan kemik bölüme “asetabulum” adı verilir. (Şekil 2) Asetabulumun iç kenarında açıklığı aşağıya bakan yarımay şeklinde kıkırdak bir yüzey vardır. Asıl eklem yüzünü oluşturan bu alana “*facies lunata*” denir. Geri kalan kemik çukur asetabulumun fossa’sını oluşturur. Asetabulumun dış kenarında ise 5-6 mm kalınlığında fibröz kıkırdaktan oluşmuş bir halka bulunur. Temel görevi asetabulumu derinleştirmek olan bu yapıya “*labrum*” adı verilir. Bu yapı sayesinde femur üst eklem yüzünün yarısına yakını asetabulum içine alınır, aynı zamanda eklemin yerinden çıkmasını engelleyen negatif bir basınç oluşturulur (49).

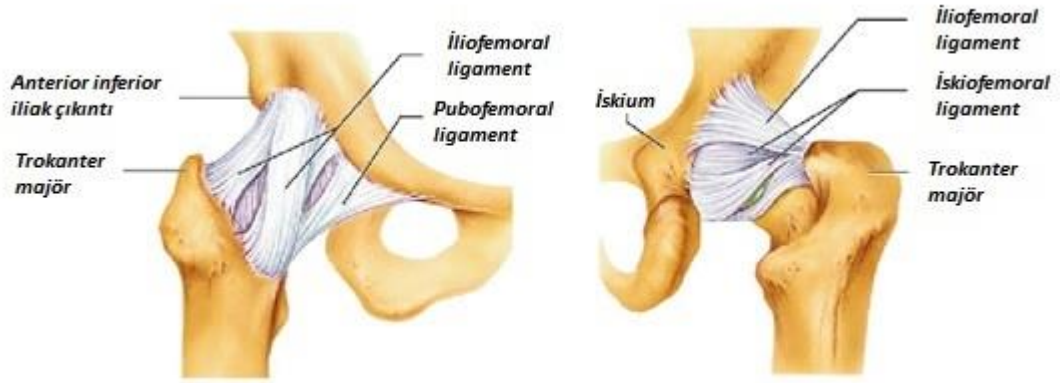


Şekil 2: Asetabulumdaki anatomik yapılar

Kalça eklem kapsülü asetabulumun kemik kenarına yapışır. Labrum ve transvers ligaman kapsül içinde kalan yapılardır. Asetabulumdan uzanan eklem kapsülü önde ve arkada femur boynuna tutunur. Ön tarafta intertrokanterik çizgiye; arka tarafta ise intertrokanterik çıkıntının 1,5 cm iç kısmına yapışır (49).

Kalça ekleminde eklem kapsülünü güçlendiren üç adet bağ bulunur. Bunlardan ilki; ön tarafta bulunan, tuberculum iliacum'dan başlayıp yelpaze şeklinde linea intertrocanterica'ya yapışan “*iliofemoral ligament*” dir. “Bertin bağı” olarak da bilinen bu bağ vücudun en güçlü bağı olup temelde görevi femurun posteriora fazla ilerlemesini önlemektir. “*Pubofemoral ligament*” olarak bilinen iç yan bağ, ramus superior ossis pubis ve crista obturatoria'dan başlayarak

aşağıya, dışa ve arkaya demetler vererek küçük trokanter önündeki çukura yapışır. Uyluğun fazla ekstansiyonu ve abduksiyonunu sınırlamakla görevlidir. Üçüncü bağ, “*iskiofemoral ligament*” adı verilen arka bağıdır. Tuber ischiadicum’dan başlar, spiral şeklinde bükülerek femur üst ucunun ön tarafına çıkar ve iliofemoral bağın üst demetleriyle birleşerek linea intertrocanterica’da sonlanır. Bu bağ da femurun aşırı arkaya gitmesine engel olduğu gibi aynı zamanda iç rotasyonu da sınırlar (49).



Şekil 3: Kalça eklem kapsülünün anterior ve posteriordan görünümü

Kalça çevresinde femur ve asetabulum ilişkisinin devamını sağlayan kas örtüsü bulunur.

A) Kalçanın Dorsal Grup Kasları (Şekil 4):

1-M.Gluteus Maksimus: Vücudun en büyük ve en kalın kasıdır. Bu bölgedeki en yüzeysel kas olup yağ kitlesi ile birlikte buranın kabarıklılığını verir. Bu kas uyluğun en kuvvetli ekstansörüdür. Ayrıca uyluga dış rotasyon yaptırır. Üst lifleri

abduksiyona, alt lifleri adduksiyona yardım eder. Traktus iliotibialis vasıtasıyla diz ekleminin ekstansiyon pozisyonunda kalmasını sağlar. Uyluk sabit iken gövdeye ekstansiyon yaptırır. Siniri N.Gluteus inferior'dur.

2-M.Gluteus Medius: Yelpaze şeklinde kalın bir kas olup M. Gluteus maximusun altında bulunur. Uyluga abduksiyon ve iç rotasyon yaptırır. Uyluk tespit edildiği zaman, en kuvvetli çalışır. Bu hareket yürüme sırasında, pelvisin yerden teması kesilmiş ekstremité tarafına düşmesini önler. M.Gluteus medius felcinde ördekvari yürüyüş denilen durum ortaya çıkar. Hasta vücudunu felçli tarafa eğerek yürür (Trendelenburg testi). Siniri N. Gluteus superior'dur.

3- M.Gluteus Minimus: M.Gluteus mediusun derininde bulunan ve ondan daha küçük olan yelpaze şeklinde bir kastır. Görevi uyluga abduksiyon ve iç rotasyon yaptırmaktır. Siniri N. Gluteus superior'dur.

4-M.Tensor Fasciae Lata: Uyluga fleksiyon abduksiyon yaptırır. Sonlandığı tractus iliotibialis, diz ekleminin transvers ekseninin önünden geçmesi nedeniyle, M.Gluteus maximus ile diz ekleminin ekstansiyon pozisyonunda kalmasını sağlar. Siniri N. Gluteus superior'dur.

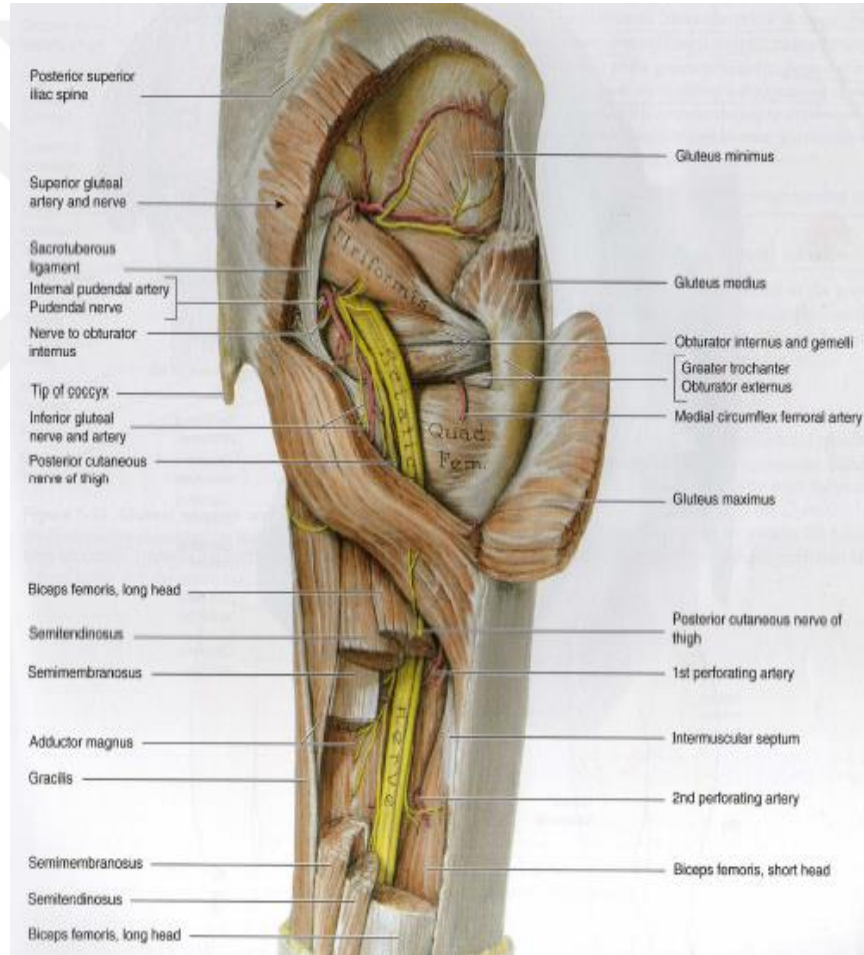
5-Uyluk Dış Rotator Kasları:

a) M.Piriformis: Uyluga dış rotasyon ve abduksiyon yaptırır. Siniri birinci ve ikinci sakral spinal sinirlerin ön dallarıdır.

b) M.Obturator internus: Uyluga dış rotasyon ve abduksiyon yaptırır. Siniri sakral pleksus ve N.quadratus femoris'dir.

c) M.Gemellus Superior: Uyluga dış rotasyon yaptırır. N.obturatorius internus tarafından innerve edilir.

- d) **M.Gemellus inferior**: Uyluga dıs rotasyon yaptırır. N quadratus femoris tarafından innerve edilir.
- e) **M.Quadratus femoris**: Uyluga dıs rotasyon ve adduksiyon yaptırır. Siniri plexus sacralis'in dalı olan N.quadratus femoris'dir.
- f) **M.Obturator eksternus**: Uyluga dıs rotasyon ve adduksiyon yaptırır. N.obturatorius tarafından innerve edilir.



Şekil 4: Kalçanın dorsal grup kasları

B)Uyluk Kasları:

Uylugu saran fascia lata'nın iç yüzünde linea aspera'ya uzanan üç fasial bölme bulunur. Uyluk bu fasial bölmeler vasıtasıyla içerisinde kas, damar ve sinirlerin

bulunduğu üç kompartmana ayrılır. Bunlar anterior, medial ve posterior kompartmanlar olarak isimlendirilir. (Şekil 5)

a)Uylugun Anterior Fasial Kompartmanında Bulunan Kaslar:

1) **M.Sartorius:** İnce uzun serit şeklinde bir kas olup vücudun en uzun kasıdır.

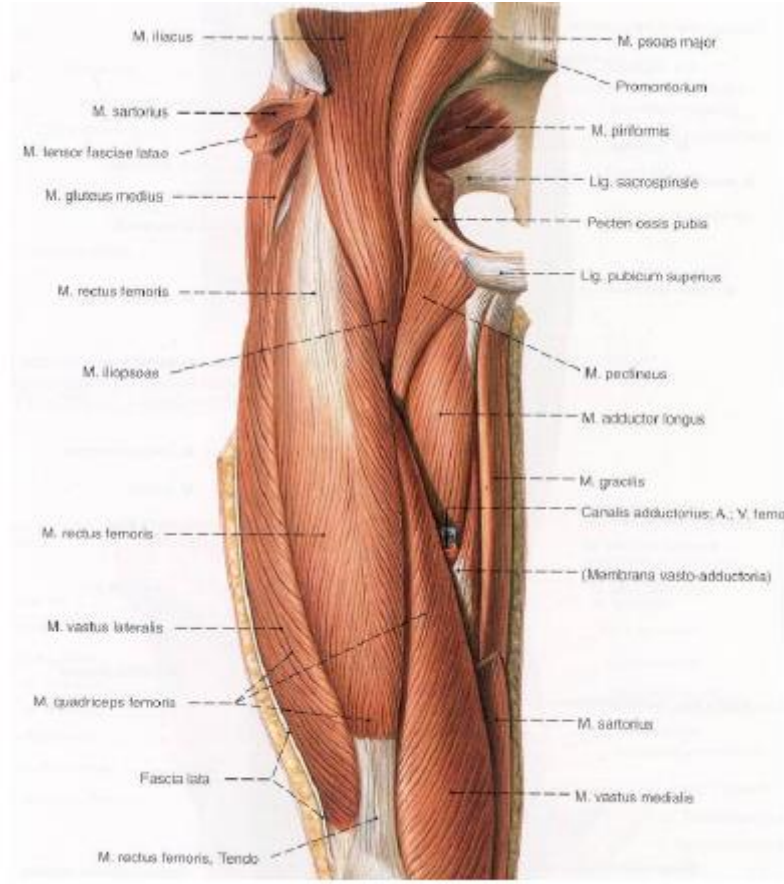
Kalça ve dize fleksiyon, uyluga abduksiyon ve dış rotasyon hareketlerini yaptırır. Siniri N.femoralis'dir.

2) **M.Quadriceps femoris:** Bu kas m.rectus femoris, m.vastus medialis, m.vastus lateralis, m.vastus intermedius isimli dört kasın birleşmesinden oluşmuştur. Diz ekleminin en kuvvetli ekstansör kasıdır. M.Rektus femoris kalça ekleminin fleksiyonuna yardım eder. Siniri N.femoralis'dir.

3) **M.Pectineus:** Uyluga fleksiyon ve adduksiyon yaptırır. N.femoralis tarafından innerve olur.

4) **M. İliacus:** Yelpaze şeklinde bir kas olup, karın boşluğunda fossa iliaca'dan başlar. M.Psoas major ile birleşerek m.iliopsoas'ı oluşturur ve trokanter minöre yapışarak sonlanır. M.iliopsoas uyluga veya uyluk sabit iken gövdeye fleksiyon yaptırır. Ayrıca uyluga dış rotasyon yaptırır. Uylugun en güçlü fleksörüdür. M.iliculus n.femoralis tarafından innerve edilir.

5) **M.Psoas Major:** Son torakal ve tüm lomber vertebraların transvers çıkıntılarından köklerinden, gövdelerinden ve aralarındaki disklerden başlayıp, distalde m.iliculus ile birleşerek m.iliopsoas'ı oluşturur. M.Psoas major plexus lumbalis'ten gelen dallar tarafından innerve olur.



Şekil 5: Uyluk kasları

b)Uylugun Medial Fasial Kompartmanında Bulunan Kaslar:

1-M. Adduktor Longus: Uyluga adduksiyon ve fleksiyon yaptırır. Uyluk fleksiyonda iken dış rotasyon yaptırır. N.Obturatorius tarafından innerve olur.

2- M. Adduktor Brevis: Uyluga adduksiyon ve birazda dış rotasyon yaptırır.

Siniri N.Obturatorius'tur

3- M. Adduktor Magnus: Adduktor bölümü uyluga adduksiyon ve dış rotasyon, hamstring bölümü ise ekstansiyon yaptırır. Adduktor bölümü

N.Obturatorius tarafından, hamstring bölümü ise N.ischiadicus'un n.tibialis dalı tarafından inerve olmaktadır.

4-M. Gracilis: Uyluga adduksiyon, bacaga fleksiyon ve fleksiyon pozisyonundaki bacaga iç rotasyon yaptırır. N.Obturatorius tarafından inerve olmaktadır.

5-M. Obturatorius Eksternus:

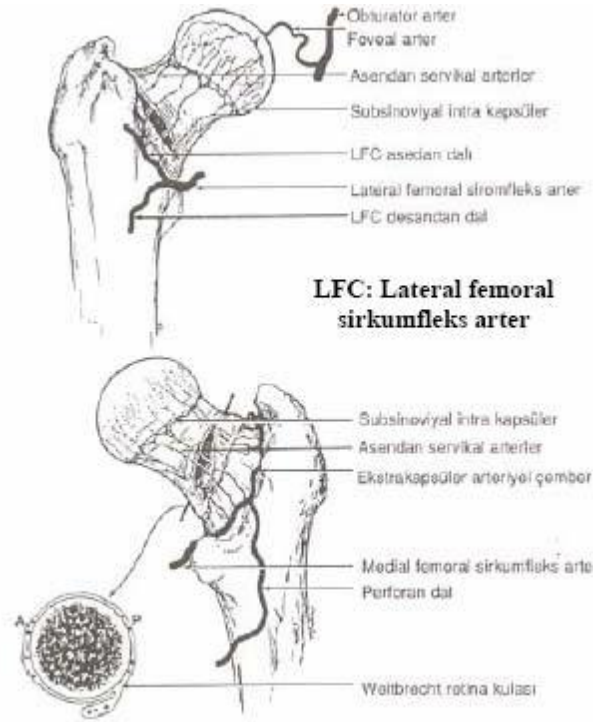
c)Uylugun Posterior Fasial Kompartmanında Bulunan Kaslar:

1-M.Biceps Femoris: Uylugun arka ve dış tarafında bulunur. Caput longum ve brevis olarak iki adet başı vardır. Kalçaya ekstansiyon yaptırırken, dize fleksiyon ve bacaga dış rotasyon yaptırır. Caput longum N.Tibialisten, caput brevis N.Peroneus (fibularis) communis'ten inerve olur.

2-M.Semitendinosus: Kalçaya ekstansiyon yaptırırken, dize fleksiyon bacaga iç rotasyon yaptırır. N.Tibialis tarafından inerve edilir.

3-M.Semimembranosus: Bu kas da semitendinosus gibi kalçaya ekstansiyon yaptırırken, dize fleksiyon bacaga iç rotasyon yaptırır. N.Tibialis tarafından inerve edilir.

Femur başının arteriyel beslenmesi, temel olarak femur boynu etrafında bulunan ekstrakapsüler arteriyel halkadan çıkan asendan dallar ile sağlanır. Bu ekstrakapsüler halka lateral ve medial femoral sirkümfleks arterler tarafından anastomoz ile oluşturulur. Başın küçük bir bölümünün beslenmesini ise ligamentum teres arteri sağlar (49). (Şekil 6)



Şekil 6: Femur proksimal uç vasküler anatomisi

2.5 Osteoartrit Patolojisi

Osteoartrit; eklemdaki sinoviyal membran, kıkırdak, subkondral kemik, ligament ve periartiküler yapıların hepsini etkiler. Farklı etyolojiler sonucu biyomekanik-biyokimyasal olaylar gibi lokal faktörlerin kombinasyonu sonucu oluşan, bu faktörlerin morfolojik ve klinik sonuçlarının oluşturduğu bir hastalıktır (50). Osteoartritte kıkırdak ve kemik metabolizmasının değiştiğini ve yıkım-onarım arasındaki dengenin yıkım yönüne kaydığını görülmektedir (51). Sitokinler, mekanik travma ve genetik yapının; kıkırdakta OA'ya özgü değişiklikler ile sonuçlanan yıkım zincirini başlattığı bilinmektedir.

Geleneksel olarak OA'nın dejeneratif ve non-inflamatuvar bir durum olduğu görüşü hakimdir. İnflamasyonun klinik bulguları genellikle belirgin değildir, fakat OA klinik gidişi sırasında orta derecede sinoviyal şişlik, duyarlılık ve eklem efüzyonu, inflamasyonun varlığını gösterir. Ancak bu klinik primer bir patoloji olmadığı ve doku hasarına sekonder geliştiği düşünölmektedir (52).

Yapısal değişiklikler

Erken OA'da, eklem kıkırdağının yüzeyi düzensizleşir ve yüzeyel çatlaklar oluşur. Hastalık ilerledikçe eklem kıkırdağında kopmalar oluşur ve subkondral kemik açığa çıkar. Yeni kemik yapımıyla marjinal osteofitler oluşur ve bunların üzerleri yeni oluşan, düzensiz yapıdaki hiyalin kıkırdak ve fibrokartilaj ile kaplanır (50).

Biyokimyasal değişiklikler

Osteoartritte, ilk olarak eklem kıkırdağının su içeriğinde belirgin şekilde artma olur. Bu da dokunun şişmesine ve biyomekanik özelliklerin değişmesine neden olur. Bu durum agrekan moleküllerinin yarattığı osmotik basınca karşı kollojen ağının zayıfladığını ve direnç gösterme yeteneğini kaybettiğini göstermektedir. Başlangıçta proteoglikan konsantrasyonu artarken, hastalık ilerledikçe ekstraselüler matrikste tip I kollajen konsantrasyonu artar, proteoglikan konsantrasyonu azalır (53). Keratan sülfat konsantrasyonu azalır, kondroitin -4- sülfat/ kondroitin -6- sülfat oranı artar. Bu daha immatür kıkırdağı yansıtan bir durumdur (54). Proteoglikan kaybı ilerledikçe başlangıçta artmış olan su içeriğinde azalır, normalin altına düşer. Ardından kıkırdak fibrilasyonu ve laserasyonuna neden olan kollojen yıkımı olur.

Osteoartritte, eklem kıkırdağındaki ana kollojen normal eklem kıkırdağındaki gibi tip II kollojendir. OA'da kollojen liflerinin boyu normale göre kısalır, lif çapı azalır ve sıkı örgü yapıları gevşer. Bu durum kıkırdağın mekanik streslere daha dirençsiz hale gelmesine neden olur.

Hemokromatozis, Wilson hastalığı, okronotik artropati, gut artriti ve kalsiyum pirofosfat dihidrat (CPPD) kristal depo hastalığı gibi hastalıklarda, direkt veya indirekt olarak kondrosit hasarı oluşur ve dokunun sertliği artarak OA gelişir.

Metabolik Değişiklikler

Kıkırdak yıkımında proteoglikan sentezi ve yıkımı arasındaki dengesizlik önemlidir. Ayrıca erken OA'da artmış proteoglikan sentezi içerik ve glikoaminoglikanların dağılımı gibi özellikleri açısından normal kondrositler tarafından sentezlenene göre farklılıklar gösterir. Ekstrasellüler matriksi yıkan enzimler proteinazlardır ve aktiviteleri proteinaz inhibitörleri ile kontrol edilmektedir. Osteoartritte proteinaz ve inhibitörleri arasındaki denge bozulmuştur. OA'lı eklemden kondrositler tarafından üretilen matriks parçalayıcı enzimlerin sentez ve sekresyon miktarlarında belirgin artış vardır. Bu proteinazlar ve inhibitörleri şu şekilde sınıflandırılabilir (55).

Proteinazlar; metalloproteinazlar, aspartik proteinazlar, sistein proteinazlar ve serin proteinazlar başlıca 4 gruba ayrılırlar. Metalloproteinazlar (MMP) ise salgılanan tip ve membrana sabit tip MMP olmak üzere ikiye ayrılırlar. ADAM, ADAMTS, Tip 1 ve Tip 2 transmembran MMP'ler; membrana sabit tip MMP grubundandır.

Proteinaz inhibitörleri de, proteinaz aktivitelerini kontrol ederler. Sistein proteinaz inhibitörleri, Serin proteaz inhibitörleri, TIMP (Metalloproteinazların Doku İnhibitörleri) ve A2-makroglobulin olarak ayrılırlar. Serin proteaz inhibitörleri plazminojen aktivatör inhibitörleridir (PAI-1, PAI-2). TIMP, MMP'lerin aktivitelerini baskılar. A2-makroglobulin ise tüm proteinazları inhibe edebilir (56).

OA'nın erken kıkırdak dejenerasyonu, proteoglikan ve kollajen yıkımına neden olan Matriks Metalloproteinazlar (MMP) ailesinin aktivitesi sonucu oluşmaktadır. Kollajenazlar, kollajenin üçlü sarmal yapısını bozarak diğer proteazlar tarafından yıkıma hazır hale getirirler. Agreganazlar ise diğer MMP'lerle beraber aggreganları yıkıma uğratırlar. Kollajen, kollajenazlar (MMP-1, MMP-8 ve MMP-13) tarafından parçalanmakta ve ortaya çıkan fragmanlar MMP-2 (jelatinaz A), MMP-9 (jelatinaz B), MMP-3 (stromelizin 1) ve Katepsin B gibi enzimler tarafından parçalanmaya hazır hale gelmektedir. OA'da kollajen yıkımından özellikle MMP-13'ün (kollajenaz 3) sorumlu olduğu görülmektedir. Çünkü tercihen tip II kollajeni yıkmaktadır. OA'da MMP-13 ekspresyonunun büyük ölçüde arttığı gösterilmiş (57,58). MMP'ler diğer kıkırdak ekstrasellüler matriks moleküllerini de yıkıma uğratabilirler. MMP'ye bağlı doku yıkımı ile kollajen lifleri inceler, sıkı kollajen ağı gevşer ve kıkırdak matriks şişer.

Enzimler arasındaki dengenin sağlanmasında özellikle TIMP ve plasminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) olmak üzere iki enzim inhibitörü rol almaktadır. TIMP ve PAI-1; transforme eden büyüme faktörü (TGF-B) kontrolü altında sentezlenir (59). OA'da MMP sentez ve sekresyonu artmıştır, TIMP düzeyi

azalmıştır ve kıkırdak yıkımından MMP'in TIMP'den daha fazla üretilmesinin sorumlu olduğunu düşünülmektedir (60). Normal kıkırdakta TIMP 1 ve 2 bulunurken, OA kıkırdağında ise sadece TIMP 1 saptanmıştır (61). Doku (tPA) ve ürokinaz (uPA) plazminojen aktivatörleri, plazminojeni plazmine çeviren serin proteazlardır. OA'lı eklemlerde seviyelerinin artması ve IL-1 tarafından stimüle edilmeleri patogeneizde rol aldıklarını desteklemektedir. Plazminin, MMP'leri aktive ederek kıkırdak proteoglikanlarını yıkma potansiyeli de vardır. Plazminojen aktivatör inhibitörü (PAI) seviyeleri de OA kıkırdakta azalmaktadır (62).

Erken OA'da tamir çabaları sonucu anabolik süreçler de artar. Bu durum OA'nın yavaş ilerlemesini açıklamaktadır. Erken OA'da artmış proteoglikan sentezi; içerik ve glikoaminoglikanların dağılımı gibi özellikleri açısından normal kondrositler tarafından sentezlenene göre farklılıklar gösterir (55). Sonuçta hastalık ilerledikçe; hücre sayısı azalır, kondrositlerin tamir süreci yıkımı karşılayamaz, proteoglikan sentezi azalır ve sonuçta kıkırdak ekstrasellüler matriksi dejenere olur (64).

Biyomekanik değişiklikler:

OA'daki ekstrasellüler matriks yapısındaki değişikliklerle elastikiyetin kaybı sonucu kondrositlere daha fazla mekanik yük biner, hidrolik geçirgenliğin artar ve bunun sonucu kompresyon sırasında intertisyel sıvı kaybı olur. Eklemin normal likid film lubrikasyonu bozulur ve yüklenme dinamikleri değişir. Osteofitlerin; kan damarlarının dejenere olan kıkırdağın bazal tabakasına penetrasyonu veya

subkondral kemikte oluşan stres kırıklarının anormal iyileşmesi sonucu oluşabilecekleri öne sürölmüştür (50).

2.6 Osteoartritın Kalıtımsal Yatkınlık

OA kalıtımsal açıdan, ilk olarak 1941 yılında Stecher tarafından parmaklarda Heberden nodülleri bulunan ailelerde çalışılmıştır. OA'lı olguların kardeşlerinde, parmaklarındaki Heberden nodüllerinin toplumdakine göre üç kat daha fazla göröldüğünü belirlenmiştir (64). Ardından 1944 yılında Stecher ve arkadaşları, bu lezyonların tekli otozomal dominant genle kalıtımsal olarak aktarıldığını göstermişlerdir (65). 1952 yılında Kellgren ve Moore tarafından da kalıtımsal osteoartritın en yaygın şekli olan primer jeneralize osteoartriti olgu olarak tanımlanmıştır (66). 1963 yılında Kellgren ve arkadaşları tarafından İngiltere'de yapılan epidemiyolojik çalışmada, birinci derece akrabaların radyografik olarak osteoartritın taşıma olasılığının iki kat fazla olduğu gösterilmiştir (67). Kalça osteoartritinin prevelansını araştırmak için çeşitli çalışmalarda, total eklem replasmanı yapılmış hastanın kardeşinin, kontrole göre 2-3 kat daha fazla osteoartrite yakalanma riski taşıdığı belirtilmiştir (68). Lanyon ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğerk çalışmada ise bu riskin 4,7 kat olduğu tespit edilmiştir (69).

Birçok çalışmada, primer jeneralize OA'lı bireyler genetik açıdan incelenmiştir. Heberden ve Bouchard nodülleri ile karakterize primer jeneralize nodal osteoartritın genetik komponentinin yüksek olduğu görünmektedir. Bu form OA; HLA-A1, B8 haplotipleri ve alfa-1 antitripsin izoformları ile ilişkili bulunmuştur (70). Bununla birlikte bazı çalışmalarda ise bu ilişki bulanamamıştır

(71). Ailelerdeki kümelenme, akraba olan bireylerin aynı OA'ya yatkınlık yapan DNA allellerini taşıması ile veya benzer çevresel etkileri paylaşımları ile açıklanabilir.

2.6.1.Osteoartrit kalıtımında genom taramaları ve aday genler

Genom taramaları:

Diz osteoartritli ve sağlıklı bayanlarda yapılan genom taramalarında LRCH1 geninin ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Kromozom 13 üzerindeki LRCH1 polimorfizminin, diz OA'lılarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha sık olduğunu tesbit etmişlerdir (72). Bazı araştırmacılar tarafından, kromozom 11 üzerinde bayanlarda kalça OA riskiyle ilişkili bir lokus tanımlanmıştır (73). Bu bölgenin daha detaylı haritalaması ile 11q bölgesindeki iki bölge öne sürülmüştür (74). El osteoartritinde, 296 soy üzerinde yapılan genom taramalarında eldeki radyografik osteoartrit ile ilişkili lokus tanımlanmaya çalışılmıştır (75). Kromozom 1, 7, 9, 13 ve 19. Kromozomda 8 potansiyel bağlantı bölgesi tesbit edilmiştir. El osteoartritinde en kuvvetli bağlantı 1. Kromozomun kısa kolunda tesbit edilmiştir (76). Osteoartrite genetik yatkınlıkta; 4. kromozom, 16. kromozom (77) ve 2. kromozom (78) da incelenen diğer alanlardandır.

Aday genler:

OA'daki genetik anormalliklerin; kıkırdak veya kemik metabolizmasında bir değişikliğe ya da yapısal bir defekte (örneğin kollejen) neden olabileceği düşünülmektedir. OA'e yatkınlık yaratan genlerin araştırılmasında özellikle ekstrasellüler matriksteki diğer yapısal proteinler ve tip II kollajeni kodlayan

genler, vitamin D ve östrojen reseptör geni, kemik ve kartilaj büyüme faktörlerini kodlayan genler üzerinde durulmaktadır (79). Diz ve multi eklem OA'sı ile COL2A, VDR reseptör ve östrojen reseptör alfa genleri arasında ilişki açısından oldukça tutarlı kanıtlar elde edilmiştir (80).

Yapılan çok sayıda çalışmada; yaygın OA ile 12. kromozomdaki COL2A1 geninde mutasyonlar arasında bir bağlantı gösterilmiştir (81). Bir hayvan çalışmasında, farelere mutant insan COL2A1 geninin yerleştirilmesi ile; vertebral disklerde erken dejenerasyon ve osteoartritik değişikliklere neden olması, OA'da rolü olduğunu göstermektedir (82). COL2A1 genini farklı mutasyonları kalçayı etkileyen prematüre OA, osteonekrozis ve Legg-Calvé-Perthes hastalığı gibi çeşitli klinik sendromlarla ilişkilidir (83). COL2, COL9 veya COL11 genlerini etkileyen mutasyonların kondrodizplazi ve OA'nın hızlanması ile sonuçlanması; bu genlerin kritik ve yapısal fonksiyonlarının olduğunu gösterir (84). Kalça OA'ne sahip bayan hastaları ile tip IX kollajen geni COL9A1'nin bağlantılı olduğu tespit edilmiştir (85).

Primer jeneralize osteoartrit genetik yapısı heterojen olduğu ve COL2A1 dışında genlerdeki mutasyonların da sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle minör kollajen tipleri ve hücre dışı matriks proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar rolü daha fazla araştırılması gerekmektedir. OA'da son zamanlarda ekstrasellüler matriks proteini olan asporin geni polimorfizmleri üzerinde durulmaktadır (86).

D vitamini reseptörü ve östrojen reseptör için genlerin spesifik polimorfizmlerin de, osteoartrite yatkınlık yaptığı ile ilgili çeşitli çalışmalar vardır

(87). Bununla birlikte iyi tasarlanmış bir vaka kontrol çalışmasında, bu polimorfizmler ile OA arasında herhangi ilişki gözlenmemiştir (88). Sınırlı sayıda veride, IL-1B (-511T alleli) ve IL1RN (variable number of terminal repeats [VNTR] 2 allel) genlerin polimorfizmlerin radyografik kalça osteoartrit ile ilişkili olduğunu belirtilmektedir (89).

AACT, ADAM12, BMP2, CALM1 (kalmodulin 1), CILP (kıkırdak intermediate tabaka proteini), COX2, CRTL1 (kıkırdak link proteini 1) , ESR1, FRZB, LRCH 1, OPG (osteoprotegerin), TNA (tetranektin), TNFAIP6 ve ADAMTS genleri; osteoartrit ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (90).

Micro RNA'lar ise; gen ekspresyonunda önemli rol oynayan küçük kodlanmayan RNA'lardır. Son zamanlarda microRNA'ların da OA üzerinde etkili olabileceği söylenmiştir (91) .

2.7 Osteoartritte Sınıflandırma

Osteoartritin sınıflandırılmasında; tutulan ekleme ve etyolojiye göre olmak üzere iki ana sistem kullanılmaktadır. OA ayrıca spesifik özelliklerine göre de sınıflandırılabilmektedir (2). Osteoartrit etyolojiye göre, radyolojik ve patolojik tanısı sonucunda primer (idiopatik) ve sekonder OA olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Bununla birlikte primer ve sekonder OA ayrımını yapmak her zaman kolay olmamaktadır (2).

A. Tutulan ekleme göre sınıflandırma

Monoartiküler, Oligoartiküler veya Poliartiküler (yaygın) tutulumlar

Eklemler içinde tutulum gösteren ana bölgeler:

Kalça (superior, medial, konsantrik),

Diz (medial, lateral, patellofemoral),

El (İnterfalangial eklemler, başparmak karpometakarpal eklemler),

Vertebra (apofizer eklemler, intervertebral disk hastalığı),

Diğerleri

B. Etiyolojiye göre sınıflandırma

1. Primer (İdyopatik) OA

2. Sekonder OA

a. Metabolik nedenlere bağlı

1. Okronozis

2. Akromegali

3. Hemakromatozis

4. Kristal depo hastalığı

b. Anatomik nedenlere bağlı

1. Femoral epifiz kayması

2. Epifiziyal displaziler

3. Blount hastalığı

4. Legg-Calve-Perthes hastalığı

5. Kalçanın konjenital dislokasyonu

6. Bacak boyu eşitsizliği

7. Hipermobilité sendromları

c. Travmatik nedenlere bağlı

1. Major eklem travması
2. Eklem fraktürü veya osteonekroz
3. Eklem operasyonu
4. Kronik hasar (iş ve uğraşıya bağlı artropatileri)
 - d. İnflamatuvar nedenlere bağlı
 1. İnflamatuvar artritler
 2. Septik artrit

C. Spesifik özelliklerine göre

- a. İnflamatuvar OA
- b. Eroziv OA
- c. Atrofik veya destrüktif OA
- d. Kondrokalsinozis ile birlikte olan OA
- e. Diğerleri

2.8 Fizik Muayene

Kalça muayenesi her zaman olduğu gibi iyi bir öykü alınması ile başlar. Daha sonra inspeksiyon, kemik ve yumuşak dokuların palpasyonu, hareket açıklığı, nörolojik muayene (kas gücü ve duyu muayenesi) ve özel testler şeklinde devam eder. Bu yazıda özel testler üzerinde duruldu. Kalça şikayetlerinin bel ve diz patolojilerinin de bir yansıması olabileceği unutulmamalıdır.

Kalça Eklemi Hareketleri

Fleksiyon: 110-120 derece (dizler fleksiyonda iken), ekstansiyon: 0-15 derece, abduksiyon: 30-50 derece, adduksiyon: 30 derece, iç rotasyon: 30-40 derece, dış rotasyon: 40-60 derece.

Alt ekstremitelerde uzunluk farkı gerçek ya da zahiri (fonksiyonel) olabilir. Gerçek bacak boyu farkında bacak boyunu değiştiren kalıcı bir bozukluk vardır. Zahiri bacak boyu farkı ise pozisyona bağlı kompensatuar bir durumdur.

Zahiri bacak boyu farkını tespit etmek için sırtüstü yatan kişide umblikustan medial malleola kadar olan mesafe karşılaştırılır. Gerçek bacak boyu farkını ölçmek için kemik çıkıntılar arasındaki mesafe ölçülür. Her iki bacakta spina iliaka anterior superior ile medial malleol arasındaki mesafe ölçülerek karşılaştırılır. Gerçek bacak boyu farkı varsa femurda mı tibiada mı boy farkı olduğunu anlamak için ayak tabanları aynı hizada olacak şekilde kalça ve dizler fleksiyona getirilir. Bir diz diğerinden yukarda kalıyorsa tibialar eşit değildir. Bir diz diğerinden öne gidiyorsa boy farkı femurdadır.

Thomas testi: Kalça fleksiyon kontraktürü olup olmadığını gösterir. Hasta sırtüstü yatarken bir kalçasını fleksiyona getirmesi, dizini göğsüne değdirmesi, bu esnada diğer bacağının sedyeye temas eder durumunu koruması söylenir. Eğer kalça fleksiyon kontraktürü varsa bacak aşağıda düz duramaz, kalça ve dizden fleksiyona gelir (92).

Trendelenburg belirtisi: Kalça abduktorlarının kalçayı stabilize edebilme gücüne bakılır. Hastadan tek ayak üstünde durması istenir. Normalde pelvis yere paralel tutulabilir. Ancak kalça abduktörleri zayıfsa hasta bunu telafi etmek için

gövdesini yere basan kalçaya doğru eğerek ağırlık merkezinin yerini değiştirmek zorunda kalır. Kalça abduktörleri yürüyüş sırasında pelvisin hareketlerine bakılarak dinamik olarak da değerlendirilebilir (92).

Ober testi: İliotibial bant (tensor fasya lata) kontraktürü olup olmadığını anlamak için yapılır. Yan yatan hastanın yukarıdaki bacağı diz altından kavranır. Diz ekstansiyonda ya da 90 derece fleksiyonda olabilir. Kalça önce fleksiyona, daha sonra abduksiyon ve ekstansiyona getirilir ve daha sonra bacak yavaşça aşağı indirilir. İliotibial bant kontraktürü varsa bacak abduksiyonunu koruyarak yere düşmez (93).

2.9. ADAMTS Genleri

ADAMTS enzimlerinin ileride çoğu hastalığın bilinmeyen kısımlarının anlaşılmasına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. İlk olarak 1997 yılında Kuno ve arkadaşları tarafından kolon adenokarsinomunda bulunan ADAMTS proteazların, günümüzde birçok fizyolojik ve patolojik süreçte yer aldığı bilinmektedir (1). ADAMTS proteazlar, özellikle OA ve romatoid artrit gibi hastalıklarda kıkırdak ekstrasellüler matriks parçalanmasından sorumlu proteolitik enzimler olarak bilinmekle beraber; angiogenez, bağ dokusunun remodellingi, koagülasyon ve ovulasyon gibi birçok durumda görev üstlenen bir proteaz ailesidir. ADAMTS enzimlerinin; tümör gelişimi ve metastazı, artrit ve daha birçok patolojik olayda etkin rollerinin olduğu bilinmektedir (94).

Osteoartrit gibi hastalıkların tedavisinde ilaç geliştirme çalışmalarında kullanılmaları nedeniyle bu genlere ve gen ürünlerine ilgi artmıştır. ADAMTS

düzeyleri ve aktiviteleri; gen ekspresyon kontrolü, mRNA'nın bağlanması, TIMP tarafından protein yapımı ve inhibisyonu gibi birçok basamakta kontrol edilmektedir. Son zamanlarda insan kıkırdığında ADAMTS ailesinin birçok üyesinin konnektif doku hemostazında ve patolojisinde rol oynadığı gösterilmektedir (95).

ADAMTS'ler çinko bağımlı matriks enzimleridir. Matriks metalloproteaz (MMP) ve ADAM (a disintegrin and metalloproteinase)'lar diğer çinko bağımlı proteazlardır. ADAMTS'ler kollojen, versican ve agrekan gibi hücre dışı matriksinin yapısal proteinlerini parçalayarak etkilerini gösterirler (96). Proteinlerin aminoasit sırası, yapısı ve gelişimi açısından ADAM proteinazlarına benzerler. Ama bunlardan farklı olarak ADAMTS'ler trombospodin tip 1 dizisi tekrarını (Thrombospodin type 1 Sequence Repeat: TSR) içermektedirler ve ADAM proteazları gibi epidermal büyüme faktörü bölgesi ve transmembran modülü içermezler. ADAMTS proteinazların, sinyal sekans, pro-domain, katalitik domain, disintegrin-like domain, sistinden zengin bölge, spacer adı verilen bağlantı bölgesini ve Thrombospodin type 1 Sequence Repeat (TSR) bölgelerinden oluşan kompleks bir yapısı vardır (94).

Propeptid kısım, enzimi inaktif halde tutan kısımdır (95). Propeptid sayesinde enzim substrat ile etkileşim içine giremez. Furin gibi enzimler, propeptid bölgesini kesilip uzaklaştırılmasından sorumludur. Bu aktifleşme süreci, zimojen aktivasyonu olarak bilinmektedir (97). Bundan dolayı ADAMTS proteinazların zimojen formlarının intraselüler olarak parçalandığı ve sonrasında ise matür halde sekrete edildiklerine inanılır.

ADAMTS'ların içerdği trombospondin-1 tekrarları; fibronektin, kollojen ve laminin gibi ekstrasellüler matriks proteinlerine bağlanarak, ekstrasellüler matriksle etkileşimden ve anti-anjiyogenezisten sorumludur (98).

ADAMTS genleri ilk tanımlandığında 1'den 20'ye kadar numaralandırılmıştır. Fakat daha sonra ADAMTS11 olarak tanımlanan tipin ADAMTS5 olduğu anlaşılmıştır. Bu nedenle ADAMTS11 mevcut değildir. Böylelikle 19 farklı insan ADAMTS gen ürünü ortaya çıkmıştır (94). ADAMTS proteazları aldıkları görevlere göre değişik şekilde sınıflandırılmaktadır.

İlk defa 1999 yılında Tortorella ve arkadaşları tarafından ADAMTS4, agrekanaz-1 olarak isimlendirilmiştir (7). Agrekanazlar, ADAMTS 4 ve 5 artritte kıkırdak yıkımında rol alan önemli enzimlerdir. ADAMTS4 uzun kemiklerin yapısında ve turn-overında görevlidir (99). Bununla birlikte, ADAMTS4 knockout farelerde hiçbir iskelet anormalitesi gözlenmemiştir (95). Fareler üzerinde yapılan benzer çalışmalarda ADAMTS5 knockout farelerin, osteoartritte karşı direnç kazandıkları gösterilmiştir. Bu iki çalışmadan sonra ADAMTS5 (agrekanaz-2) farelerde kıkırdak dokusundaki majör agrekanaz olarak tanımlanmıştır (2,3,100). Aggrekanazlardan ADAMTS5'in yapısal olduğu, ancak IL-1 ve TNF'nin ADAMTS4'ü indüklediği anlaşılmaktadır (101).

Ayrıca bu grubun bazı üyeleri anjiogenezi de düzenler. ADAMTS1 ve ADAMTS8 anti anjiogenik ajanlar olarak bilinirler. ADAMTS1 ve ADAMTS8 endotelde FGF-2, VEGF inhibe ederek anjiogenezi engellerler. Bu yüzden bu iki proteaz tümör supresyonunda hedef proteinazlardır. Benzer şekilde ADAMTS gen

alesinin diğ er üyelerinde de anjiyogenez inhibisyonu üzerine potansiyel bir etki mevcuttur (102).

ADAMTS1'in VEGF ile etkileşimi gösterilmiştir fakat bu etki GF'  parçalayarak olmaz, bu da gösterir ki inhibitor etki VEGF'  hücredeki reseptöründen ayırarak gerçekleşir (103). ADAMTS1 null farelerde primer olarak ürogenital sistem, normal büyüme, organ morfolojisi ve fonksiyonu, kadın fertilitesi gibi çeşitli sistemlerde gelişimsel anormalliklere neden olduğu gösterilmiştir (104). ADAMTS1 ovulasyon gibi süreçlerde görev almakla birlikte kalp krizinde güçlü bir şekilde ekspresse edilen bir proteazdır (105). 2009 yılında hipoksinin, HIF-1 (hipoksi indüklenebilir faktör) yoluyla ADAMTS1'i indüklediği ilk kez gösterilmiştir. Bu verilerle ADAMTS1'in akut hipoksi-indüklenebilir gen olduğu düşünülmektedir (106).

ADAMTS9 ve ADAMTS20 GON-ADAMTS proteazlar olarak adlandırılırlar (1, 130, 107). GON embriyonik gelişimde gonad distal tip hücrelerinde ekspresse edilen bir metalloproteazdır. ADAMTS9 ve ADAMTS20 gonadların gelişmesinde hücre migrasyonundan sorumludurlar (108,109).

Prokollojen N-propeptidazlar: ADAMTS-2, -3 ve -14:

ADAMTS-2, -3 ve -14 prokollojen kesim enzimleri olarak bilinmektedir. N bölgesini kestiği için bu adı alır. Prokollojenin kollojen haline dönüşümünü sağlarlar. Genetik analizlerde ADAMTS2 gen mutasyonunları tip VIIC Ehlers-Danlos sendromuna yol açar (110). ADAMTS2'nin derinin yapı ve formasyonunun düzenlenmesinde ve sperm maturasyonunda önemli görevleri

vardır (111). ADAMTS3 ise deride ADAMTS2'den çok daha az, kıkırdak dokuda ise ADAMTS2'nin 5 katı kadar fazla bulunmuştur (112).

Von Willebrand faktör-kesen proteaz: ADAMTS13

ADAMTS13 büyük multimerik vWF (Von Willebrand faktör) prekürsörlerini parçalayıp ve koagülasyonu oluşturabilmesi için vWF'ün optimal büyüklükte olmasını sağlar. Böylece pıhtılaşma için gerekli olan, dah küçük boyutlu vWF meydana gelir (113). ADAMTS13 ile ilgili olan mutasyonlar herediter (114) ya da ADAMTS13'e karşı otoantikörlerin olduğu sporadik (115) olarak trombotik trombositopenik purpura hastalığına yol açar (95).

COMP-ADAMTS proteazlar: ADAMTS-7 ve -12

ADAMTS-7 ve -12; COMP (kıkırdak oligometrik matriks protein)'u parçalar. COMP, kartilajın yapısal bütünlüğünden ve diğer matriks proteinleri ile etkileşimden sorumlu bir ekstrasellüler matriks glikoproteinidir. Agresif artrit hastalarında COMP düzeyleri yüksek bulunmuştur (116).

Diğer ADAMTS Proteinleri: ADAMTS-6, -10, -16 , -17, -18 ve -19

Bu gruba ait üyelerin fonksiyonu tam olarak tanımlanmamıştır. ADAMTS10 geni tam mutasyonları Weill-Marchesani Sendromunun resesif formunda tespit edilmiştir. Bu sendrom; kısa boy, brakidaktili, eklem sertliği, gözde lens anormallileri ve bazen de kalp defektleri ile karakterizedir. ADAMTS10'un göz, deri ve kalbin gelişiminde kritik roller üstlendiği düşünülmektedir (95).

ADAMTS16'nın palmar fasia denilen dokunun fibrotik bir hastalığı olan ve kollojen birikimi ile karakterize Dupuytren hastalığında fazla eksprese edildiği

görülmüştür (117). Joe ve arkadaşları ADAMTS16'nın kan basıncı regülasyonunda yeni bir gen olduğunu bildirmişlerdir (118). Yapılan bir çalışmada ADAMTS16'nın özefagial skuamöz hücreli karsinomada potansiyel bir gen olduğu bulunmuştur (119).

ADAMTS18 proteazının çeşitli kanserlerle sıkı bir ilişki içerisinde olduğu bilinmektedir (120). Endotel hücrelerinin ADAMTS18 salgıladıkları, ADAMTS18 C-terminal fragmentinin in vivo kanama zamanını düzenleyerek karotid arter trombüs oluşumunu önlediği gösterilmiştir (121).

3. HASTALAR VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji kliniğinde 15 tane kalça ekleminde osteoartrit gelişen, cerrahi tedavi gerektiren ve total kalça protezi uygulanan hastalar ile 15 tane femur boyun kırığı gelişen, osteoartrit bulguları olmayan ve parsiyel kalça protezi uygulanan hastaların ameliyat sırasında alınan ve rezeke edildikten sonra çöpe atılan materyallerden doku örnekleri alınmıştır. Rezeksiyon materyallerinden kan ve kırıkta örnekleri alındıktan sonra soğuk zincir kurallarına uygun olarak Turgut Özal Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Laboratuvarına nakledip -80°C’de saklanarak ELISA yöntemi ile ADAMTS gen analizi, kan örneklerinde PCR ile DNA’da polimorfizm ölçümü yapılmıştır.

Gelişimsel kalça displazisi sekeli, avasküler nekroz sekeli, travma sekeli, perthes sekeli, steroid kullanım öyküsü olan ve sigara içen hastalar çalışma dışı bırakılmıştır. Primer kalça dejeneratif artrit olan 60-80 yaş arası hastalar çalışma grubuna dahil edilmiştir. Kontrol grubunda ise kalça ekleminde dejeneratif değişiklikleri olan hastalar çalışma dışı bırakılmıştır.

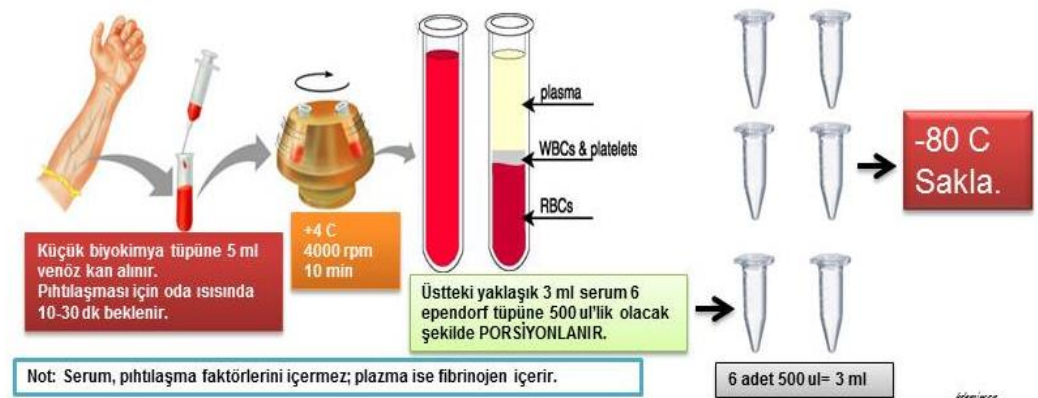
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı alınarak yapılmıştır.

Çalışmamız, TÜBİTAK 3001 programı ile desteklenerek gerçekleştirilmiştir.

3.2 Metod

Kan alma, serum ayrıştırma ve ELİSA testi

Ayrıca her iki gruptan rutin biyokimya (SERUM ELISA) tetkikleri için BD Vacutainer (Ref:367896 Lot:3266203) marka kırmızı kapaklı tüpe yaklaşık 5-6 ml, hemogram ve genetik testler için BD Vacutainer (Ref:368857 Lot:300361) EDTA içeren mor kapaklı tüplere 3 ml kan alınmıştır. Rutin biyokimya, hormon ve tam kan testleri aynı gün içinde Turgut Özal Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarındaki otoanalizörlerde çalışılmıştır. Genetik testler için alınan EDTA' lı tüpler çalışma yapılincaya kadar -80°C saklanmıştır.

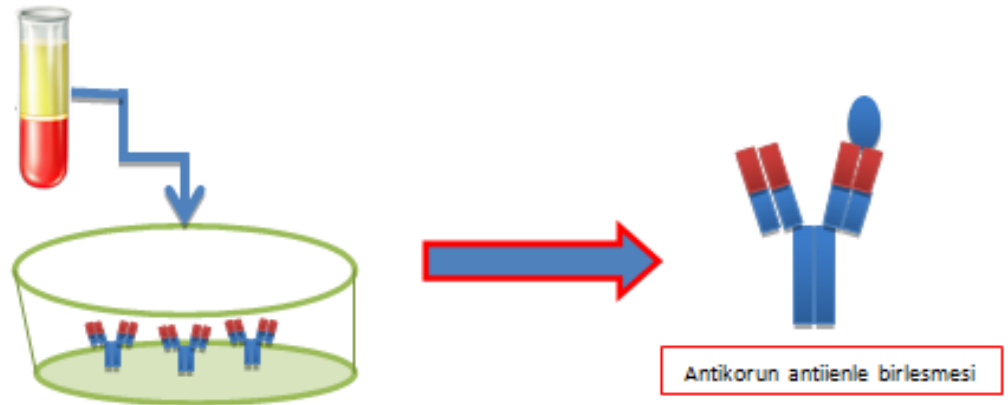


Şekil 7. Kan alma, santrifüj ve serum ayrıştırma işlemleri.

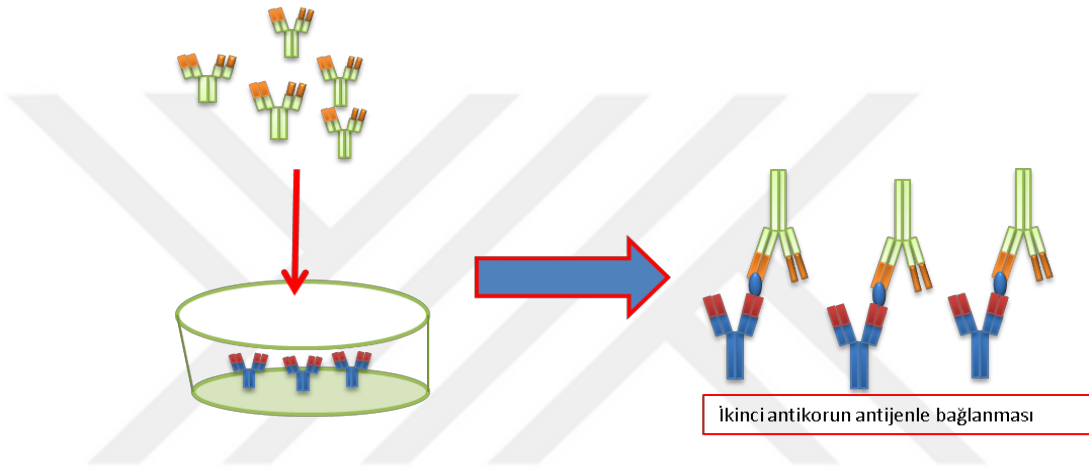
ELISA Çalışma Aşamaları: Serum Ayırımı

Örnekler -80°C den çıkartılarak çalışmaya başlamadan önce oda ısısına gelmesi beklenildi. Çalışma için gerekli solüsyonların hazırlanması işlemi ticari firmanın vermiş olduğu kit prospektüsünde belirtildiği gibi yapıldı. Genel hatları ile ELISA yöntemi şu şekilde açıklanabilir:

1. Daha önceden bakacak olduğumuz proteine (örnek; ADAMTS) karşı antikorla kaplanmış mikrotatlara (Hazır kit) serum /plazma örnekleri test protokolünde söylendiği kadar eklenir. Serum/plazmada bulunan bakmak istediğimiz (Örneğin: ADAMTS9) antijeni, daha önceden hazırlanmış ve mikrotplate fıkse edilmiş ADAMTS'e karşı oluşturulan monoklonal antikorlara bağlanması için 37°C de 2 saat inkübasyona bırakılır.

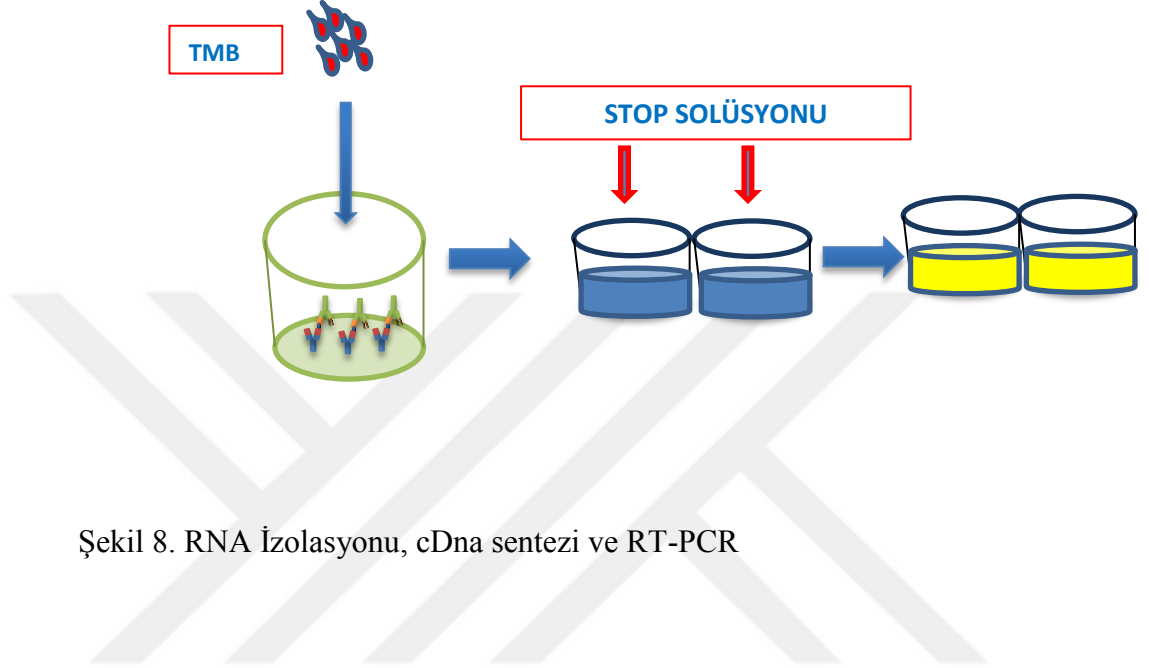


2. İnkübasyon sonrasında mikropate içindeki sıvı dökülür ve tamamen kurumasına izin vermeden hemen HRP (horseradish peroxidase) ile işaretlenmiş olan ikinci antikor (Detection antibody) kit prospektüsünde söylendiği şekilde eklenir. İkinci antikorun antijene bağlanması için 60 dakika 37° de etüvde inkübasyona bırakılır.



3. Non-spesiifik bağlanmaları önlemek için ELISA yıkayıcı ile prospektüsde söylendiği gibi yıkanır.
4. Tetramethylbenzidine (TMB) substrat solüsyonu prospektüste söylendiği kadar eklenir, karanlıkta 37°'de 20-30 dakika inkübe edilir. Örnekte bulunan ADAMTS miktarına orantılı bir şekilde HRP enzim substratını kullanarak mavi renk oluşturur.
5. Son olarak stop solüsyonu reaksiyonu durdurmak için eklenir ve daha önce oluşmuş olan mavi renk sarı renge dönüşür.
6. Oluşmuş olan sarı renk 450 nm dalga boyunda okutularak absorbans değerleri alınır. Örneklerle birlikte daha önceden hazırlanmış olan

standartlara karşılık gelen absorbans değerlerinden örnekteki ADAMTS9 miktarı çizilen standart grafiği kullanılarak hesaplanır.



Şekil 8. RNA İzolasyonu, cDna sentezi ve RT-PCR

Total RNA, ticari olarak satılan TRIzol maddesi kullanılarak izole edilmiş, cDNA sentezi SuperScript first strand sentezi yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. RNA ekstraksiyonunun ardından NCBI gen Bankasından yararlanarak hazırlanan uygun primerler kullanılarak kantitatif RT-PCR yapılmıştır. Internal control olarak beta aktin kullanılmıştır.

Kıkırdaktan DNA İzolasyon Protokolü

Örneklerden yaklaşık 5 gram doku parçası alınıp üzerine 1ml tripsin EDTA eklenerek 37° C inkübatörde 30 dk. inkübe edildi. Santrifüj edilip süpernatant kısmı atıldı. 1ml HBSS içerisine 1 ul olan kollejenaz ve kollejenezin

kofaktörü olan 1 M CaCl₂ dokunun üzerine eklenerek 37°C inkübatörde 18 saat inkübasyon yapıldı. 1000 g de 15 dk. Santrifüj yapıldı.

Bir kısım parçalanmayan ama yumuşayan dokuların parçalanmasını sağlamak amacıyla bisturi ve homejenizatörden yardım alındı.

30 örneğin her biri için lysing buffer(%95)+pi (%5) olacak şekilde 600 ul eklendi. Buffer ile etkileşime girmesi için 10 dk. bekletildi. Sonrasında 1400 rpm de 15 dk. santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda süpernatantı alındı. Pelleti atıldı.

İzole edilen proteinlerin ölçümü yapıldı.

Kandan Serum ve RNA Eldesi

Hastaneden labaratuvara taze olarak gelen kanın 200 ul si RNA izalosyonu için ayrıldı ve üzerine 1000 ul trizol eklenerek iyice çalkalandı ve -80 C° ye kaldırıldı. Tüpün içerisinde kalan kan santrifüj edilerek serum kısmı ayrı bir tüpe alınarak elisa çalışması için ayrıldı.

Kandan RNA eldesi

-80 C° ye kaldırılan örnekler dolaptan çıkartılarak erimesi beklendi. Her birisinin üzerine 200 ul kloroform kondu. Tüpteki solüsyonların karıştırılması sağlandı. Oda sıcaklığında 5 dk. inkübasyona bırakıldı.

121x100 g de 4 C° de 10 dk. santrifüj yapıldı.

Tek tek santrifüjden alınan tüplerin şeffaf (süpernatant) kısımları başka bir tüpe aktarıldı. Aktarılan kısmın üzerine 2-propanol 500 ul koyuldu. Tersyüz ettikten sonra 10 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

1200 g 4 C° de 10 dk. santrifüj yapıldı. Süpernatant ile pellet kısmı birbirinden ayrılarak pellet üzerine 1000 ul %75 lik etenol eklendi.

1200 g 4 C° de tekrar 5 dk. santrifüj yapıldı. Pelletten alkol uzaklaştırıldı. Kuruduktan sonra 45ul DEPC su koyularak nano dropta ölçüm yapıldı.

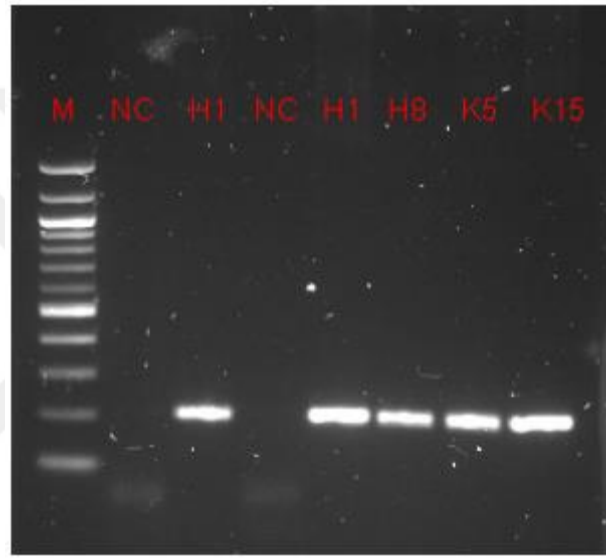
RNA dan cDNA eldesi

RNA nın nükleik asit konsatrasyonları nano dropta ölçüldükten sonra RNA su ile dilüe edildi. Thermo reverted first strand ile cDNA sentez kiti ile cDNA sentezi RNA ve nukleaz free su toplamda 11 ul olacak şekilde dilüe edildi. Üzerlerine 1 ul primer eklenerek toplam hacmin 12 ul olması sağlandı. 65 C° de 5 dk inkübe edildi.

5X reaction buffer	4µl
Ribolock RNAase inhibitör	1µl
10 mM dNTP mix	2µl
Reverted M-Mulvrt (200 u/µl)	1µl
RNA-su-primer	12µl
Total	20µl

Tablo1: cDNA sentez kiti

Her örnek 20 µl olacak şekilde hazırlandı. Yavaşça karıştırıldıktan sonra 42 C° de 60 dk. , 70 C° de 5 dk. inkübe edildi. cDNA sentezinin gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrolü için agoroz jel elektrofarezinde kullanılacak 4 örnek ile PZR sentezi yapıldı.



Resim 9: β - aktin sonuçları

cDNA üretimi kontrol edildikten sonra Real Time PZR a başlandı.

4. BULGULAR

01-09-2014 tarihinde başlanılan çalışma, yaşları 60-77 arasında değişen (ortalama $67\pm7,8$), 30 bayan hasta üzerinde yürütülmüştür. 18 aylık süreçte çalışma ve kontrol grupları için planlanan kan ve kıkırdak dokuları uygun şekilde toplandı.

ELISA Sonuçları:

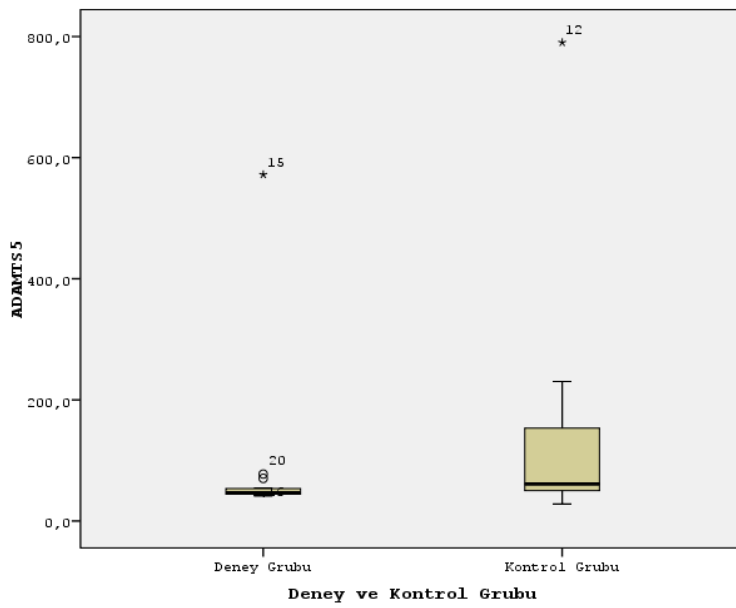
	ADAMTS-1 (ng/ml) CAT NO: E1155Hu	ADAMTS-4 (ng/ml) CAT NO: E1977Hu	ADAMTS-5 (ng/ml) CAT NO: E3557Hu	ADAMTS-8 (ng/ml) CAT NO: E3481Hu	ADAMTS-9 (ng/ml) CAT NO: E3558Hu	ADAMTS-15 (ng/ml) CAT NO: E3486Hu
K1	12,34	433,7	90,1	227,474	171,0	83,93
K2	7,58	310,9	63,5	186,254	113,8	70,12
K3	5,41	175,9	44,6	122,06	87,4	27,27
K4	24,68	966,4	222,1	557,793	336,8	217,93
K5	7,52	288,1	54,3	143,218	82,1	32,12
K6	10,52	146,4	27,9	71,844	53,8	14,98
K7	21,92	938,1	153,3	463,403	254,4	170,31
K8	5,99	217,0	48,2	136,219	86,2	55,93
K9	9,72	317,6	73,6	214,891	135,8	86,98
K10	6,80	211,4	52,2	140,098	90,7	61,17
K11	6,43	238,1	50,3	140,682	89,2	48,79
K12	29,95	1897,6	790,2	799,341	81,7	41,46
K13	29,37	1112,0	230,4	718,692	486,5	314,89
K14	9,76	220,9	58,8	55,578	399,0	202,12
Ç1	30,05	1848,1	572,0	799,341	479,7	342,12
Ç2	13,81	413,1	70,4	186,881	142,0	76,70
Ç3	6,49	252,6	46,3	123,956	80,5	37,74
Ç4	6,86	218,1	48,0	139,32	62,5	37,55
Ç5	6,81	227,6	44,4	140,487	79,2	38,31
Ç6	9,27	331,4	77,5	188,557	118,1	69,93
Ç7	9,26	217,0	46,9	133,324	78,5	36,03
Ç8	6,66	165,9	44,5	139,126	84,4	40,89
Ç9	5,40	223,7	41,7	139,32	86,2	38,79
Ç20	6,61	187,6	43,1	147,336	73,2	53,08
Ç11	6,90	282,0	53,6	178,362	97,4	50,79
Ç12	7,00	254,8	44,7	123,766	79,8	29,08
Ç13	6,56	265,9	51,7	146,943	79,7	33,74
Ç14	5,79	210,9	43,8	124,336	70,8	17,27

Tablo 1. Kan örneklerinde çalışılan ELISA sonuçları

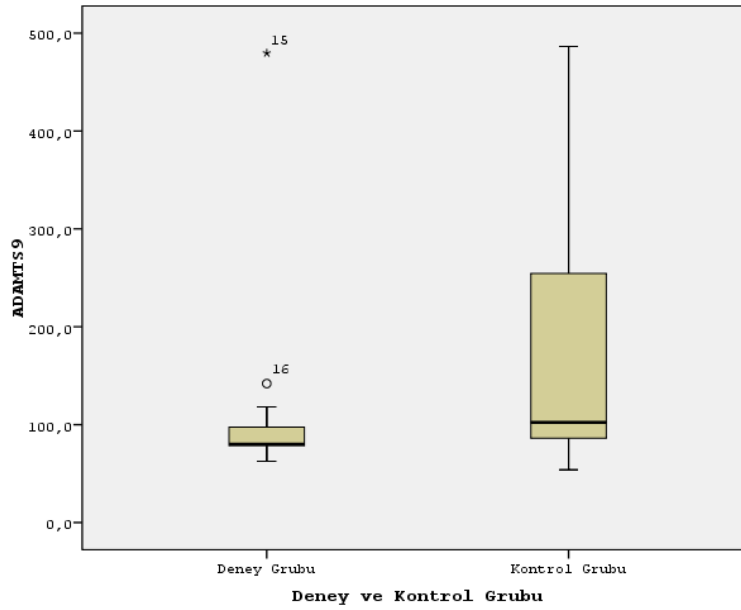
	ADAMTS 1	ADAMTS 4	ADAMTS 5	ADAMTS 8	ADAMTS 9	ADAMTS 15
Mann-Whitney U	65,000	77,500	52,000	79,500	51,500	63,000
Wilcoxon W	170,000	182,500	157,000	184,000	156,500	168,000
Sig.	0,129	0,352	0,35	0,395	0,33	0,108

Tablo 2. Kan örneklerinde çalışılan ELISA sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi

Mann-Whitney U testine göre, ADAMTS5 (p:0,035) ve ADAMTS9 (p:0,033) genleri açısından, çalışma ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.



- ADAMTS5 değişkenine göre deney grubunun verileri kontrol grubunun verilerine göre daha homojen olmakla beraber düşük değerlerde toplanmıştır ve deney kontrol grubunda 3 değer aykırı değer iken kontrol grubunda 1 değer aykırılık göstermiştir.



- ADAMTS9 değişkenine göre deney grubunun verileri kontrol grubunun verilerine göre daha homojen olmakla beraber düşük değerlerde toplanmış ve deney grubunda 2 değer aykırı değer iken kontrol grubunda aykırı değer bulunmamaktadır.

Real Time-PCR Sonuçları:

Kıyıdaki dokusundan RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapıldı. Ekspresyon sonuçları delta Ct methodu ile istatistiksel olarak değerlendirildi. RT-

PCR analizi ile elde edilen sonuçlar, one-simple T-test kullanılarak ortalama katlanma değışiklikleri açısından değeriendirildi.

	One-Simple Test					
	t	df	Sig.	Ortalama Fark	%95 Farkın Güvenli Aralığı	
TS1	-2,832	12	,015	-,6147709	-1,087714	-,141828
TS4	-2,558	12	,025	-,5233444	-,969111	-,077578
TS5	-5,210	11	,000	-,6130609	-,872044	-,354078
TS8	,770	12	,456	2,2995500	-4,209422	8,808522
TS9	,723	13	,482	,3537088	-,703109	1,410527
TS15	-,272	14	,790	-,1005711	-,893848	,692706

Tablo 3: Kan örneklerinde çalışılan RT-PCR sonuçları

One Simple Test'e göre, ADAMTS-1 (p:0,015), ADAMTS-4 (p:0,025) ve ADAMTS-5 (p:0,000) genleri açısından, çalışma ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

5. TARTIŞMA

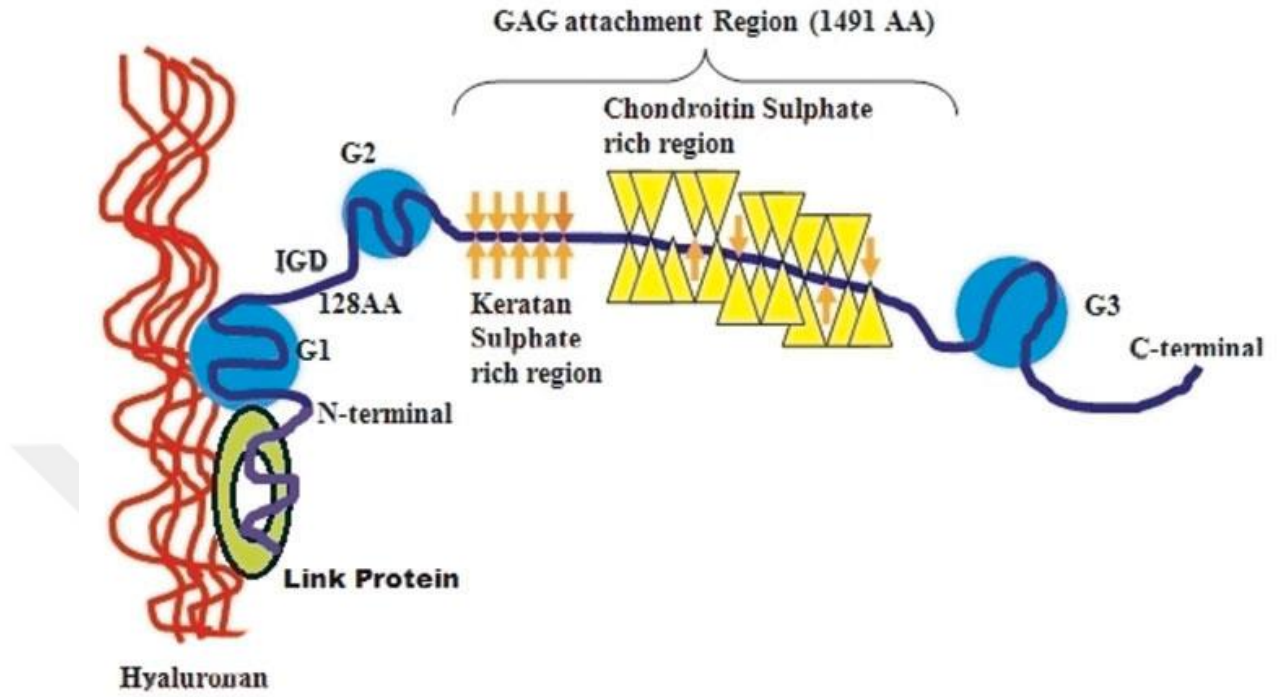
Osteoartrit, eklemdaki birçok dokuyu etkileyerek eklem kıkırdığının ilerleyici yıkımı ile karakterize bir hastalıktır. Genellikle yaşlı popülasyonda görülüyor olup kıkırdak hasarı, subkondral kemik remodelizasyonu, eklem aralığında azalma, sinoviyal inflamasyon ve osteofit formasyonu ile karakterizedir. Avasküler nekroz, travma, gelişimsel kalça displazisi, hemofili, romatoid artrit gibi altta yatan hastalıklara bağlı gelişen tipine sekonder osteoartrit; altta yatan bir neden bulunamayan ve genetik faktörlerin suçlandığı tipine ise primer osteoartrit denilmektedir. Bu çalışmada çalışma grubu için, sekonder nedenler hasta hikayesi ve radyografilerden yararlanılarak ekarte edilmiş, primer osteoartriti olan hastalar seçilmiştir. Kontrol grubu için femur boyun kırığı olan ve makroskopik ve radyolojik dejenerasyon bulgusu olmayan hastalar seçilmiştir.

Osteoartrit etyolojisi hala tam olarak anlaşılamamıştır. Mekanik, biyokimyasal ve enzimatik faktörlerin hepsinin birlikte bu hastalığı tetiklediği düşünülmektedir. Bu faktörlerin hastalığın gelişimindeki rollerinin iyi anlaşılması, hastalığın önlenmesi ve tedavi modalitelerinin geliştirilmesi için önem arz etmektedir. Tüm bu faktörlerin hepsinin ortak sonucu, kondrosit kaybı ve kıkırdak yapımı-yıkımı arasındaki dengenin bozulmasıdır (9).

Patogeneizde genel kabul edilen görüş; aktive olan sinoviyal dokular ve eklemlle ilişkili yağ yastıkçığından üretilen inflamatuvar mediyatörlerin osteoartrit patogenezinden sorumlu olduğu yönündedir. Patogenezin başlangıcı multifaktöriyeldir. Kıkırdak bozulması kontrol edilemeyen ekstraselüler matriks

tahribatı sonucu oluşmaktadır. Bu suçlanan mekanizmalardan ve inflamatuvar mediyatörlerden başlıcaları ise metalloproteinaz-13 (MMP-13), hipoksi ile indüklenebilen faktör-2 (HIF-2), dengesiz otofaji, interlökin-1 (IL-1), transforming growth faktör-beta (TGF- β) ve agrekanaz-1 ve -2 (ADAMTS4-ADAMTS5)'dir. (122).

Kıkırdak doku, kondrositler ve ekstraselüler matriks elemanlarından oluşmaktadır. Ekstraselüler matriksin başlıca komponentleri; *tip II kollojen* ve dokuya kompresif direnç kazandıran bir proteoglikan olan *agrekanlardır*. Agrekan, omurga kısmında 210-250 kDa büyüklüğünde protein içeren bir glikoproteindir. N-terminal ucunda iki adet (G1-G2), C-terminal ucunda da bir adet (G3) globuler yapıya sahiptir. G2 ve G3 yapıları, 1491 aminoasitten oluşan bir glikoaminoglikan zinciri (GAG) ile ayrılmıştır. G1 ve G2 yapılarını ise yaklaşık 150 aminoasit büyüklüğündeki bir interglobular yapı (IGD) bağlamaktadır (Resim 1). Agrekanlar, kollojenler arasındaki büyük boşlukları hyalüran ve link proteinleri ile birlikte büyük kompleksler oluşturarak doldururlar. Agrekan molekülü içindeki glukozaminoglikanlar yüksek negatif yük yoğunluğu oluşturarak su tutar ve yüksek osmotik basınç oluşturur (123). Böylece kompresif güçlere dayanıklı kıkırdak formasyonu oluştururlar (124). Agrekan molekülünün yapısının, bölümlerinin ve parçalanığı kısımlarının(klivaj) anlaşılması, geliştirilecek inhibitör moleküller ve ilaç çalışmaları için önemlidir (Resim 10).



Resim 10. Agrekan molekülünün ve klivaj bölümlerinin gösterimi (9).

Agrekan molekülü, osteoartritlik kıkırdak dokusunda agrekanaz sahası denilen spesifik bir bölümden (interglobuler yapı içindeki Glu 373 - Ala 374), metalloproteinazların ADAMTS ailesine ait bazı üyeleri ile parçalanır (125,126). Agrekanazların etki ettiği özellikle G2-G3 arasında yer alan, başka klivajlarda vardır; Glu1480–Gly1481, Glu1667–Gly1668, Glu1771–Ala1772, ve Glu1871–Leu1872 (127).

ADAMTS ailesinin bilinen 19 üyesinin herbirinin farklı bir hayati işlemde rolü olduğu hatta bazılarının birden çok sistemde görev aldıkları bilinmektedir. Gelişim, anjiogenezis, koagülasyon, artırt gelişimi bunlardan bazılarıdır (1427,128,129). ADAMTS ailesinin kıkırdak bozulmasında rolü olduğu suçlanan üyeleri ise ADAMTS 1, 4, 5, 8, 9 ve 15'dir (130). Ancak ADAMTS proteazların

osteoartrit patogenezindeki tek başına aldıkları roller ve hangi ADAMTS üyesinin başlıca sorumlu olduğu tam olarak aydınlatılamamıştır. Osteoartrit tedavisinde bu izoformların olası rollerine terapötik hedef oldukları için ilgi giderek artmaktadır.

2002 yılında Malfait ve arkadaşlarının yaptıkları bir hayvan çalışmasında ADAMTS4 ve ADAMTS5 enzimlerinin agrekanaz enzim aktivitesinin olduğunu, kıkırdak dokusunda bu genlere ait mRNA ve protein örneklerini ve eklem sıvında ise agrekan yıkım ürünlerini göstererek kanıtlamışlardır (131). Yine hayvan modellerinde, ex vivo ortamda yapılan çalışmalarda ADAMTS-4 ve ADAMTS-5 genlerinin silinmesinin, proteoglikan yıkımından koruduğu ve hayvanlarda osteoartrit şiddetini azalttığı gösterilmiştir. 2005 yılında Glasson ve arkadaşlarının yaptıkları bir hayvan çalışmasında, öncelikle genetik olarak modifiye edilmiş farelerin ADAMTS5 (agrekanaz-2)'inin katalitik kısmı silinmiş ve cerrahi olarak dizlerinde instabilite oluşturulmuştur. Kontrol grubuna göre anlamlı olarak kıkırdak bozulmasının şiddetinin azaldığı görülmüştür (2,130). Bu çalışma osteoartritik hayvan modelleri üzerinde bir gen silinmesinin kıkırdak bozulmasının seyrini gösteren ilk çalışmadır. Little ve arkadaşları ise ADAMTS-1'in devre dışı bırakılmasının hayvanları deneysel artritten kurtarmadığını göstermişlerdir (132). Gendron ve arkadaşları, insan rekombinant ADAMTS'lerinin enzimatik aktivitesini ölçmüşler ve ADAMTS-5'in ADAMTS-4'ten daha aktif olduğunu bulmuşlardır (133). 2007 yılında Majumdar ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, ADAMTS-4 ve ADAMTS-5 genlerinin beraber silindiği ve cerrahi olarak instabilite geliştirilen hayvanlarda daha az osteoartrit geliştiğini ve bu hayvanların fenotipik olarak genetiği değiştirilmemiş

hayvanlardan farklı olmadıklarını göstermişler (134). 2007 yılında İlic ve arkadaşlarının yaptıkları bir hayvan çalışmasında ise, fareler dört gruba ayrılmış, gruplar; hem ADAMTS-4 hem de ADAMTS-5'i silinen, sadece ADAMTS-4'ü silinen, sadece ADAMTS-5'i silinen ve genetiği değiştirilmemiş normal farelerden oluşturulmuştur. Kıkırdak kaybı ve agrekan yıkım ürünleri incelendiğinde hem ADAMTS-4 hem de ADAMTS-5'i silinen grubun agrekan kaybının daha az olduğunu göstermişlerdir (135). Tüm bu çalışmalar, hem ADAMTS-4'ün hem de ADAMTS-5'in sitokinle uyarılan normal kıkırdakta ve bozulmanın devam ettiği osteoartritik kıkırdakta agrekan kaybının önemli bir mediatörü olduğunu bize göstermektedir. Ancak günümüzde hangi agrekanazın, kıkırdak bozulmasında esas rolü oynadığı tam olarak aydınlatılamamıştır (9). 2009 yılında Botter ve arkadaşlarının yaptıkları bir hayvan çalışmasında ise ADAMTS5'in kıkırdak harabiyetinin yanında subkondral kemik değişikliklerine de yol açtıklarını göstermişlerdir (136).

2007 yılında yapılan bir insan çalışmasında, ADAMTS1-4-5 genleri diz osteoartriti olan ve olmayan kıkırdak örneklerinde RT-PCR ve Western Blot ile araştırılmıştır. ADAMTS-4 ve ADAMTS-5'in insan osteoartritindeki kıkırdak bozulmasında rol aldıkları, ADAMTS1'in ise rolü olmadığı gösterilmiştir (128). 2013 yılında romatologların yaptıkları bir çalışmada, 144 hasta hafif-orta-ağır şeklinde üç gruba ayrılmış ve sinoviyal sıvı örneklerinde ELİSA ve Western Blot yöntemleri ile ADAMTS-4 ve -5 seviyeleri ve yıkım ürünleri ile ilişkileri incelenmiştir. ADAMTS-4'ün özellikle hastalığın erken evresinde yüksek oranda

bulunduğunu ve ADAMTS-5'e göre yıkım ürünleri ile daha korele olduğunu belirtmişlerdir (10).

Bizim çalışmamız hem kalça kıkırdakları üzerinde olması hem de osteoartritle ilişkisi olduğu suçlanan tüm ADAMTS genlerini içeriyor olması nedeniyle literatürdeki diğer insan çalışmalarından farklılık göstermektedir. Ayrıca bildiğimiz kadarıyla literatürdeki prospektif,kontrollü tek insan çalışmasıdır. Bizde çalışmamızda, osteoartrit gelişen grupta ve kontrol grubunda ADAMTS-1,-4,-5,-8,-9 ve -15 genlerini analiz ettik. Kan örneklerinde yapılan ELİSA testleri sonucunda ADAMTS-5 ve ADAMTS-9'da kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmuştur. RT-PCR çalışması sonucunda ise ADAMTS-1, ADAMTS-4 ve ADAMTS-5 kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Her iki sonuç birlikte değerlendirildiğinde özellikle ADAMTS-5'in kalça osteoartriti etyolojisinden sorumlu ana gen ve enzim olduğunu düşünüyoruz.

Orta-ağır evre osteoartrit tedavisinde, non-steroid-anti-inflamatuar ilaçlar ve steroidler ağrı kontrolü ve inflamasyonun baskılanmasında etkilidir ancak kıkırdağın korunmasında rolü yoktur. Hastalık ilerlerse proteazlar kıkırdağa saldırır ve kıkırdak bozulmasına yol açarlar, ekstraselüler matriks geri dönüşümsüz kaybolur ve kronik instabilite gelişir. Artritteki kıkırdak bozulmasını önlemek için proteazların kıkırdaktaki potansiyel hedeflerine yönelik terapötik çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmanın amaçlarından birisi de, kıkırdaktaki agrekanları hedef alan ADAMTS genlerinin belirlenmesi ile daha sonraki

aşamalarda yapılacak terapötik çalışmalar ile hastalığın ilerlemesini durduracak/geciktirecek ajanlar geliştirilmesine olanak sağlamaktır.

Osteoartrit gibi hastalıklarda ekstraselüler matriksteki makromoleküllerin yapılarının yıkımı yapımını aşarsa kıkırdak matriks miktarında azalma ile sonuçlanır, kıkırdağın kısmi veya tam kat erozyonuna neden olur. Eklem kıkırdağından agrekan yıkımı ile agrekan katabolizması ürünlerinin sinoviyal sıvıya salınması osteoartrit patofizyolojisinin erken evrelerinde görülmektedir (123,137). Agrekanaz enzim aktivitesinin belirlenmesinde enzime spesifik yıkım ürünlerinin analizi kullanılabilir. Bu yıkım ürünleri ARGSV and NITEGE adındaki neoepitoplardır (138). Ayrıca, bu enzimlerin sentezi IL-1 α , IL-1 β , onkostatin M (OSM), tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), retinoik asit ve diğer sitokinler tarafından ayarlanabilmektedir. Yapılan in vitro çalışmalarda, ADAMTS -4 ve -5'in sentezinin baskılanması ile insan kıkırdağındaki agrekan bozulması/katabolizması ciddi derecede azaldığı gösterilmiştir (8).

Agrekanaz aktivitesinin düzenlemesi direk olarak fizyolojik veya farmakolojik inhibitörler tarafından yapılabilmektedir. Normal insan vücudunda, agrekan katabolizması endojen inhibitörler yardımıyla sıkı kontrol altında tutulmaktadır. Ancak osteoartritte, bu kontrol katabolizma lehine bozulmuştur. TIMP-3 (Tissue inhibitor of metalloproteinases-3), en önemli endojen agrekanaz inhibitörü olarak belirlenmiştir (139,140). Diğer TIMP tiplerinin (TIMP-1/-2) ise agrekanazlar üzerinde sınırlı etkisi olmasına rağmen diğer MMP'lar üzerinde baskın olan inhibitörler olduğu gösterilmiştir (141). TIMP-3 benzersiz özelliklere

sahip bir MMP inhibitörüdür. Ekstraselüler matriks içinde, hem heparan sülfat hem de kondritin sülfat ile etkileşimi kolaylaştıran, arjinin ve lizin gibi aminoasitlerden zengin olan N-terminal ucuna sıkıca bağlanır. Ayrıca doz bağımlı olarak, IL-1 ve retinoik asit gibi agrekanaz indükleyicilerin etkisini de azaltır (142). In vivo ortamda yapılan hayvan çalışmalarında TIMP-3 devre dışı bırakılmış farelerde, hafif kıkırdak bozulması ile artmış agrekan kaybı ve artmış NITEGE neoepitop üretimi tespit edilmiştir (143,144). ADAMTS-4 ve -5 için başka inhibitör mediatörlerde tanımlanmıştır (145,146). Tüm bu laboratuvar ve hayvan çalışmalarından sonra ticari olarak temin edilebilen inhibitör bileşikler üretilmeye başlanmıştır (147,148). TIMP-3'lerden başka çinko kenetleyen inhibitörler (GM6001-ilomastat), non-selektif metalloproteinaz inhibitörleri oldukları için kas iskelet sisteminde artralji, myalji, eklem sertliği ve tendinit gibi yan etkilere yol açarlar. Buna benzer yan etkilerden kurtulmak için *anti-ADAMTS5 monoklonal antikorlar* üzerine yoğunlaşmıştır (149). ADAMTS5, proteinaz ve yardımcı içeren kısımlar nedeniyle bipartit organizasyona sahiptir. Santamaria ve arkadaşları 2015 yılında faj görüntüleme çalışmaları sonucunda anti-ADAMTS5 monoklonal antikorlar izole etmişlerdir (150). Yine 2016 yılında Miller ve arkadaşları, karşılaştırılmalı hayvan çalışmasında anti-ADAMTS-5 antikoru uygulanan grupta kıkırdak dejenerasyonu ve osteofit oluşumunun azaldığını, subkondral sklerozun etkilenmediğini gözlemlemişlerdir (151). Shiraishi ve arkadaşları da yine ADAMTS-4 ve ADAMTS-5'in agrekanaz aktivitesi için spesifik olan (273-53), bu enzimleri moleküler ve hücresel düzeyde,

kısmi/neredeyse tamamen inhibe eden insan rekombinant antikorunu bulmuşlardır (129).

Agrekanazların osteoartritteki agrekan bozulması üzerine etkilerini belirlenmesi ilaç geliştirilmesinin önünü açmıştır (152, 153). Agrekan katabolizmasını bloke edecek küçük agrekanaz inhibitörlerinin dizayn edilmesi farmasötik endüstrinin ilgisi çekmektedir (154,155,156) Bu çalışma sonucunda, osteoartrit gelişiminden asıl sorumlu gen olduğunu düşündüğümüz ADAMTS-5'in inhibisyonun maksimum etki ve minimum yan etki elde edilmesi için yeterli ve gerekli olacağını düşünüyoruz. Ancak, ADAMTS-5 birden çok dokuda exprese edildiği için inhibisyonundan kaynaklanacak potansiyel yan etkileri henüz bilinmemektedir. İnhibitörler ile geliştirilecek yeni ilaçların etki ve güvenilirliğini belirlenmesi için prelinik ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır. Diğer organlardaki fonksiyonlarının belirlenmesi ile ilaç çalışmalarının hız kazanacağını düşünüyoruz.

6.SONUÇLAR

Bu çalışmaya başlarken amacımız, cerrahi tedavi gerektirecek, son evre osteoartrit gelişen hastalarının, kan ve kıkırdak örneklerinde, yapılan laboratuvar çalışmaları ile analiz ederek, sonuçlarını kontrol grubu ile karşılaştırarak patogeneizde ADAMTS genlerinin rollü olup olmadığını araştırmaktı.

İkincil amacımız ise, ADAMTS genlerinden hangisinin/hangilerinin osteoartrit patogenezinden sorumlu esas gen/genler olduğunu bulmaktı.

Daha önce yapılan hayvan ve insan çalışmalarında, osteoartrit patogenezinde suçlanan 6 gen (ADAMTS-1,-4,-5,-8,-9,-15) kalça osteoartriti olan ve osteoartriti olmayan hasta gruplarında incelendi. Kan örneklerinden ELİSA ve RT-PCR çalışmaları ile gen analizi ve DNA polimorfizmi değerlendirildi. ELISA ile ADAMTS-5 ve ADAMTS-9; RT-PCR ile ise ADAMTS-1, ADAMTS-4 ve ADAMTS-5 genlerinde istatistiksel olarak fark bulundu.

Her iki sonuç değerlendirildiğinde;

1. ADAMTS genlerinin osteoartrit gelişiminde rolü olduğunu,
2. ADAMTS-5'in kalça osteoartriti gelişiminde esas soumlu olan ADAMTS geni olduğunu sonuçlarına vardık.

Hayvan çalışmalarında ortaya konulan ADAMTS-5 inhibitörlerinin, preklinik/klinik çalışmaları ile yan etkilerinin tam olarak belirlenmesinden sonra osteoartrit tedavisi için iyi bir farmakolojik seçenek oluşturacağını düşünüyoruz.

7.KAYNAKLAR

1. Apte SS. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms. *J Biol Chem.* 2009;284(46):31493-7.
2. Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma HL, Flannery CR, Peluso D, Kanki K, Yang Z, Majumdar MK, Morris EA. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature.* 2005; 434(7033):644-8.
3. Stanton H, Rogerson FM, East CJ, Golub SB, Lawlor KE, Meeker CT, Little CB, Last K, Farmer PJ, Campbell IK, Fourie AM, Fosang AJ. ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature.* 2005;434(7033):648-52.
4. Rogerson FM, Chung YM, Deutscher ME, Last K, Fosang AJ. Cytokine-induced increases in ADAMTS-4 mRNA expression do not lead to increased aggrecanase activity in ADAMTS-5-deficient mice. *Arthritis Rheum.* 2010;62(11):3365-73
5. Fosang AJ, Rogerson FM. Identifying the human aggrecanase. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18(9):1109-16.
6. Kuno K, Kanada N, Nakashima E, Fujiki F, Ichimura F, Matsushima K. Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. *J Biol Chem.* 2010;272(1);556-62.

7. Tortorella, Burn TC, Pratta MA, Abbaszade I, Hollis JM, Liu R. Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins. *Science*, 2010;284:1664-6.
8. Song RH, Tortorella MD, Malfait AM, Alston JT, Yang Z, Arner EC, Griggs DW. Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both ADAMTS-4 and ADAMTS-5. *Arthritis Rheum*. 2007;56(2):575-85.
9. Verma P, Dalal K. ADAMTS-4 and ADAMTS-5: key enzymes in osteoarthritis. *J Cell Biochem* 2011;112(12):3507-14.
10. Zhang E, Yan X, Zhang M, Chang X, Bai Z, He Y, Yuan Z. Aggrecanases in the human synovial fluid at different stages of osteoarthritis. *Clin Rheumatol*. 2010;32(6):797-803.
11. Gross J, Lapiere C. Collagenolytic activity in amphibian tissues: A tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1962;48(6):1014-22
12. Eisen A, Jeffrey J, Gross J. Human skin collagenase. Isolation and mechanism of attack on the collagen molecule. *Biochim Biophys Acta*. 1968;151(3): 637–45.
13. Harper E, Bloch K, Gross J. The zymogen of tadpole collagenase. *Biochemistry*. 1971; (16): 3035–41.
14. Van Wart H, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family". *Proc Natl Acad Sci USA* 87 1990; 87(14): 5578–82.
15. Rawlings ND, Barrett AJ. Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal* 1993;290: 205-18.

16. Fosang AJ, Little CB. Drug insight: aggrecanases as therapeutic targets for osteoarthritis. *Nat Clin Pract* 2008;4: 420-7.
17. Bredveld FC. Osteoarthritis- the impact of a serious disease. *Rheumatology (Oxford)* 2004;43 (Suppl.1):i4-8.
18. Zhang Y, Jordan JM. Epidemiology of osteoarthritis. *Rheum Dis Clin N Am* 2008; 34: 515-29.
19. Türkiye Hastalık Yüğü Çalışması. Ünüvar N, Mollahaliloğlu S, Yardım N (Eds). TC Sağlık Bakanlığı, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Hıfzıssıhha Mektebi Müdürlüğü. Aydoğdu Ofset Matbaacılık San. ve Tic. Ltd. Şti Matbaası, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 701, HM Yayın No: SB-HM-2007/11, Ankara 2007, pp 1-71.
20. Seçkin Ü, Borman P, Bodur H. Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon polikliniğine başvuran yaşlıların tanısı dağılı mı. *Turkish Journal of Geriatrics* 1999;2(2):57-60.
21. Oliveria SA, Felson DT, Reed JI, Cirillo PA, Walker AM. Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization. *Arthritis and rheumatism*. 1995;38(8):1134-41.
22. Lawrence JS, Bremner JM, Bier F. Osteo-arthritis. Prevalence in the population and relationship between symptoms and x-ray changes. *Annals of the rheumatic diseases*. 1966;25(1):1-24.
23. Martin JA, Buckwalter JA. Aging, articular cartilage chondrocyte senescence and osteoarthritis. *Biogerontology*. 2002;3(5):257-64.

24. Felson DT, Naimark A, Anderson J, Kazis L, Castelli W, Meenan RF. The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis and rheumatism*. 1987;30(8):914-8.
25. Pai YC, Rymer WZ, Chang RW, Sharma L. Effect of age and osteoarthritis on knee proprioception. *Arthritis and rheumatism*. 1997;40(12):2260-5
26. Nevitt MC, Felson DT. Sex hormones and the risk of osteoarthritis in women: epidemiological evidence. *Annals of the rheumatic diseases*. 1996;55(9):673-6.
27. Wluka AE, Cicuttini FM, Spector TD. Menopause, oestrogens and arthritis. *Maturitas*. 2000;35(3):183-99.
28. Maillefert JF, Gueguen A, Monreal M, Nguyen M, Berdah L, Lequesne M, et al. Sex differences in hip osteoarthritis: results of a longitudinal study in 508 patients. *Annals of the rheumatic diseases*. 2003;62(10):931-4.
29. Ledingham J, Dawson S, Preston B, Milligan G, Doherty M. Radiographic progression of hospital referred osteoarthritis of the hip. *Annals of the rheumatic diseases*. 1993;52(4):263-7.
30. Zhang Y, Jordan JM. Epidemiology of osteoarthritis. *Clinics in geriatric medicine*. 2010;26(3):355-69.
31. Oliveria SA, Felson DT, Cirillo PA, Reed JI, Walker AM. Body weight, body mass index, and incident symptomatic osteoarthritis of the hand, hip, and knee. *Epidemiology*. 1999;10(2):161-6.
32. Chapple CM, Nicholson H, Baxter GD, Abbott JH. Patient characteristics that predict progression of knee osteoarthritis: a systematic review of prognostic studies. *Arthritis care & research*. 2011;63(8):1115-25.

33. Tepper S, Hochberg MC. Factors associated with hip osteoarthritis: data from the First National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES-I). *American journal of epidemiology*. 1993;137(10):1081-8.
34. Lawrence JS. Rheumatism in cotton operatives. *British journal of industrial medicine*. 1961;18:270-6.
35. Hadler NM, Gillings DB, Imbus HR, Levitin PM, Makuc D, Utsinger PD, et al. Hand structure and function in an industrial setting. *Arthritis and rheumatism*. 1978;21(2):210-20.
36. Amin S, Goggins J, Niu J, Guermazi A, Grigoryan M, Hunter DJ, et al. Occupation-related squatting, kneeling, and heavy lifting and the knee joint: a magnetic resonance imaging-based study in men. *The Journal of rheumatology*. 2008;35(8):1645-9.
37. Croft P, Cooper C, Wickham C, Coggon D. Osteoarthritis of the hip and occupational activity. *Scandinavian journal of work, environment & health*. 1992;18(1):59-63.
38. Saxon L, Finch C, Bass S. Sports participation, sports injuries and osteoarthritis: implications for prevention. *Sports Med*. 1999;28(2):123-35.
39. Spector TD, Harris PA, Hart DJ, Cicuttini FM, Nandra D, Etherington J, et al. Risk of osteoarthritis associated with long-term weight-bearing sports: a radiologic survey of the hips and knees in female ex-athletes and population controls. *Arthritis and rheumatism*. 1996;39(6):988-95.

40. Vingard E, Alfredsson L, Goldie I, Hogstedt C. Sports and osteoarthritis of the hip. An epidemiologic study. *The American journal of sports medicine*. 1993;21(2):195-200. Eub 1993/03/01.
41. Cymet TC, Sinkov V. Does long-distance running cause osteoarthritis? *The Journal of the American Osteopathic Association*. 2006;106(6):342-5.
42. Hannan MT, Felson DT, Anderson JJ, Naimark A. Habitual physical activity is not associated with knee osteoarthritis: the Framingham Study. *The Journal of rheumatology*. 93;20(4):704-9.
43. Buckwalter JA, Lane NE. Athletics and osteoarthritis. *The American journal of sports medicine*. 1997;25(6):873-81.
44. Rogers LQ, Macera CA, Hootman JM, Ainsworth BE, Blairi SN. The association between joint stress from physical activity and self-reported osteoarthritis: an analysis of the Cooper Clinic data. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2002;10(8):617-22.
45. Slemenda C, Brandt KD, Heilman DK, Mazzuca S, Braunstein EM, Katz BP, et al. Quadriceps weakness and osteoarthritis of the knee. *Annals of internal medicine*. 1997;127(2):97-104.
46. Slemenda C, Heilman DK, Brandt KD, Katz BP, Mazzuca SA, Braunstein EM, et al. Reduced quadriceps strength relative to body weight: a risk factor for knee osteoarthritis in women? *Arthritis and rheumatism*. 1998;41(11):1951-9.
47. Hirsch R, Lethbridge-Cejku M, Hanson R, Scott WW, Jr., Reichle R, Plato CC, et al. Familial aggregation of osteoarthritis: data from the Baltimore Longitudinal Study on Aging. *Arthritis and rheumatism*. 1998;41(7):1227-32.

48. Reginato AM, Olsen BR. The role of structural genes in the pathogenesis of osteoarthritic disorders. *Arthritis research*. 2002;4(6):337-45.
49. Moore L. Keith Clinically Oriented Anatomy, Chapter 4, p. 396 – 403.
50. Di Cesare PE, Abramson SB. Osteoartrit Patogenezi. *Kelley Romatoloji*, (Çev: Dinçer F), Yedinci Baskı, Cilt II, Güneş Kitabevi, Ankara, 2006; 1493-513,
51. Lohmander LS. Articular cartilage and osteoarthrosis. The role of molecular markers to monitor breakdown, repair and disease. *Journal of anatomy*. 1994;184 (Pt 3):477-92.
52. Wollheim FA, Lohmander LS. Osteoartritin Patogenezi ve Patolojisi. *Romatoloji*. Ed: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH. (Çev: Erdem R), Dördüncü Basım, Rotatıp Kitabevi, Ankara, 2011; 1711-28,
53. Inerot S, Heinegard D, Audell L, Olsson SE. Articular-cartilage proteoglycans in aging and osteoarthritis. *The Biochemical journal*. 1978;169(1):143-56.
54. Bollet AJ, Nance JL. Biochemical Findings in Normal and Osteoarthritic Articular Cartilage. II. Chondroitin Sulfate Concentration and Chain Length, Water, and Ash Content. *The Journal of clinical investigation*. 1966;45(7):1170-7.
55. Teshima R, Treadwell BV, Trahan CA, Mankin HJ. Comparative rates of proteoglycan synthesis and size of proteoglycans in normal and osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis and rheumatism*. 1983;26(10):1225-30.
56. Dean DD, Azzo W, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Woessner JF, Jr. Levels of metalloproteases and tissue inhibitor of metalloproteases in human osteoarthritic cartilage. *The Journal of rheumatology*. 1987;14 :43-4.

57. Morales TI, Kuettner KE. The properties of the neutral proteinase released by primary chondrocyte cultures and its action on proteoglycan aggregate. *Biochimica et biophysica acta*. 1982;705(1):92-101.
58. Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis and rheumatism*. 2001;44(3):585-94.
59. Martel-Pelletier J. Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 1998;6(6):374-6.
60. Martel-Pelletier J TG, Fernandes JC & Pelletier JP. Metalloproteases and their modulation as treatment in osteoarthritis. In Tsokos GC (ed.). *Molecular rheumatology*. 2000; 499-514
61. Thonar MA MK, Manicourt DH, Kuettner KE. Structure and function of normal human adult cartilage. Reginster YJ, Pelletier JP, Pelletier JM, Henrotin Y. (Eds). *Osteoarthritis Clinical and Experimental* 1999; 1-19.
62. Martel-Pelletier J, Faure MP, McCollum R, Mineau F, Cloutier JM, Pelletier JP. Plasmin, plasminogen activators and inhibitor in human osteoarthritic cartilage. *The Journal of rheumatology*. 1991;18(12):1863-71.
63. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1971;53(3):523-37.

64. Tang BL. ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2001;33(1):33-44.
65. Stecher RM, Hersh AH. Heberden's Nodes: The Mechanism of Inheritance in Hypertrophic Arthritis of the Fingers. *The Journal of clinical investigation*. 1944;23(5):699-704.
66. Kellgren JH, Moore R. Generalized osteoarthritis and Heberden's nodes. *British medical journal*. 1952;1(4751):181-7.
67. Kellgren JH, Lawrence JS, Bier F. Genetic Factors in Generalized Osteo-Arthrosis. *Annals of the rheumatic diseases*. 1963;22:237-55.
68. Ingvarsson T, Stefansson SE, Hallgrimsdottir IB, Frigge ML, Jonsson H, Jr., Gulcher J, et al. The inheritance of hip osteoarthritis in Iceland. *Arthritis and rheumatism*. 2000;43(12):2785-92.
69. Lanyon P, Muir K, Doherty S, Doherty M. Assessment of a genetic contribution to osteoarthritis of the hip: sibling study. *BMJ*. 2000;321(7270):1179-83.
70. Patrick M, Manhire A, Ward AM, Doherty M. HLA-A, B antigens and alpha 1-antitrypsin phenotypes in nodal generalised osteoarthritis and erosive osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 1989;48(6):470-5.
71. Benavides G, Cervantes A, Silva B, Katona G, Lardizabal J. HLA and Heberden's nodes in Mexican Mestizos. *Clinical rheumatology*. 1985;4(1):97-8..
72. Spector TD, Reneland RH, Mah S, Valdes AM, Hart DJ, Kammerer S, et al. Association between a variation in LRCH1 and knee osteoarthritis: a genome-

wide single-nucleotide polymorphism association study using DNA pooling. *Arthritis and rheumatism*. 2006;54(2):524-32.

73. Chapman K, Mustafa Z, Irven C, Carr AJ, Clipsham K, Smith A, et al. Osteoarthritis-susceptibility locus on chromosome 11q, detected by linkage. *American journal of human genetics*. 1999;65(1):167-74.

74. Chapman K, Mustafa Z, Dowling B, Southam L, Carr A, Loughlin J. Finer linkage mapping of primary hip osteoarthritis susceptibility on chromosome 11q in a cohort of affected female sibling pairs. *Arthritis and rheumatism*. 2002;46(7):1780-3.

75. Demissie S, Cupples LA, Myers R, Aliabadi P, Levy D, Felson DT. Genome scan for quantity of hand osteoarthritis: the Framingham Study. *Arthritis and rheumatism*. 2002;46(4):946-52.

76. Hunter DJ, Demissie S, Cupples LA, Aliabadi P, Felson DT. A genome scan for joint-specific hand osteoarthritis susceptibility: The Framingham Study. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(8):2489-96.

77. Forster T, Chapman K, Marcelline L, Mustafa Z, Southam L, Loughlin J. Finer linkage mapping of primary osteoarthritis susceptibility loci on chromosomes 4 and 16 in families with affected women. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(1):98-102..

78. Livshits G, Kato BS, Zhai G, Hart DJ, Hunter D, MacGregor AJ, et al. Genomewide linkage scan of hand osteoarthritis in female twin pairs showing replication of quantitative trait loci on chromosomes 2 and 19. *Annals of the rheumatic diseases*. 2007;66(5):623-7..

79. Loughlin J. Genetic epidemiology of primary osteoarthritis. Current opinion in rheumatology. 2001;13(2):111-6.
80. Keen RW, Hart DJ, Lanchbury JS, Spector TD. Association of early osteoarthritis of the knee with a Taq I polymorphism of the vitamin D receptor gene. Arthritis and rheumatism. 1997;40(8):1444-9..
81. Uitterlinden AG, Burger H, van Duijn CM, Huang Q, Hofman A, Birkenhager JC, et al. Adjacent genes, for COL2A1 and the vitamin D receptor, are associated with separate features of radiographic osteoarthritis of the knee. Arthritis and rheumatism. 2000;43(7):1456-64.
82. Sahlman J, Pitkanen MT, Prockop DJ, Arita M, Li SW, Helminen HJ, et al. A human COL2A1 gene with an Arg519Cys mutation causes osteochondrodysplasia in transgenic mice. Arthritis and rheumatism. 2004;50(10):3153-60.
83. Su P, Li R, Liu S, Zhou Y, Wang X, Patil N, et al. Age at onset-dependent presentations of premature hip osteoarthritis, avascular necrosis of the femoral head, or Legg-Calve-Perthes disease in a single family, consequent upon a p.Gly1170Ser mutation of COL2A1. Arthritis and rheumatism. 2008;58(6):1701-6.
84. Price JS, Till SH, Bickerstaff DR, Bayliss MT, Hollander AP. Degradation of cartilage type II collagen precedes the onset of osteoarthritis following anterior cruciate ligament rupture. Arthritis and rheumatism. 1999;42(11):2390-8.
85. Mustafa Z, Chapman K, Irven C, Carr AJ, Clipsham K, Chitnavis J, et al. Linkage analysis of candidate genes as susceptibility loci for osteoarthritis-

suggestive linkage of COL9A1 to female hip osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2000;39(3):299-306.

86.Kizawa H, Kou I, Iida A, Sudo A, Miyamoto Y, Fukuda A, et al. An aspartic acid repeat polymorphism in asporin inhibits chondrogenesis and increases susceptibility to osteoarthritis. *Nature genetics*. 2005;37(2):138-44.

87.Loughlin J, Sinsheimer JS, Mustafa Z, Carr AJ, Clipsham K, Bloomfield VA, et al. Association analysis of the vitamin D receptor gene, the type I collagen gene COL1A1, and the estrogen receptor gene in idiopathic osteoarthritis. *The Journal of rheumatology*. 2000;27(3):779-84.

88.Loughlin J, Sinsheimer JS, Mustafa Z, Carr AJ, Clipsham K, Bloomfield VA, et al. Association analysis of the vitamin D receptor gene, the type I collagen gene COL1A1, and the estrogen receptor gene in idiopathic osteoarthritis. *The Journal of rheumatology*. 2000;27(3):779-84.

89.Meulenbelt I, Seymour AB, Nieuwland M, Huizinga TW, van Duijn CM, Slagboom PE. Association of the interleukin-1 gene cluster with radiographic signs of osteoarthritis of the hip. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(4):1179-86.

90. Valdes AM, Van Oene M, Hart DJ, Surdulescu GL, Loughlin J, Doherty M, et al. Reproducible genetic associations between candidate genes and clinical knee osteoarthritis in men and women. *Arthritis and rheumatism*. 2006;54(2):533-9.

91. Le LT, Swingler TE, Clark IM. The role of microRNAs in osteoarthritis and chondrogenesis. *Arthritis and rheumatism*. 2013;8:5-15.

92. . Peeler, J.E. Anderson. Reliability of the Thomas test for assessing range of motion about the hip. *Physical Therapy in Sport*. 2007;8:14-21.

93. Presswood L, Cronin J, Keogh J, Whatman C. Gluteus Medius: Applied Anatomy, Dysfunction, Assessment, and Progressive Strengthening. *Strength and Conditioning Journal*. 2008; 30 (5): 41-53
94. Nicholson AC, Malik SB, Logsdon JM, Jr., Van Meir EG. Functional evolution of ADAMTS genes: evidence from analyses of phylogeny and gene organization. *BMC evolutionary biology*. 2005;5:11.
95. Jones GC, Riley GP. ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2005;7(4):160-9.
96. Tortorella MD, Malfait F, Barve RA, Shieh HS, Malfait AM. A review of the ADAMTS family, pharmaceutical targets of the future. *Current pharmaceutical design*. 2009;15(20):2359-74.
97. Somerville RP, Oblander SA, Apte SS. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome biology*. 2003;4(6):216.
98. Lee YJ, Koch M, Karl D, Torres-Collado AX, Fernando NT, Rothrock C, et al. Variable inhibition of thrombospondin 1 against liver and lung metastases through differential activation of metalloproteinase ADAMTS1. *Cancer research*. 2010;70(3):948-56.
99. Mort JS, Flannery CR, Makkerh J, Krupa JC, Lee ER. Use of anti-neoepitope antibodies for the analysis of degradative events in cartilage and the molecular basis for neoepitope specificity. *Biochemical Society symposium*. 2003(70):107-14.

100. Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito BA, Blanchet T, Ma HL, et al. Characterization of and osteoarthritis susceptibility in ADAMTS-4-knockout mice. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(8):2547-58.
101. Tortorella MD, Malfait AM, Deccico C, Arner E. The role of ADAM-TS4 (aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (aggrecanase-2) in a model of cartilage degradation. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2001;9(6):539-52.
102. Demircan K, Hirohata S, Nishida K, Hatipoglu OF, Oohashi T, Yonezawa T, et al. ADAMTS-9 is synergistically induced by interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha in OUMS-27 chondrosarcoma cells and in human chondrocytes. *Arthritis and rheumatism*. 2005;52(5):1451-60.
103. Antoniadou L, MacGregor AJ, Matson M, Spector TD. A cotwin control study of the relationship between hip osteoarthritis and bone mineral density. *Arthritis and rheumatism*. 2000;43(7):1450-5.
104. Ercilla MG, Brancos MA, Breyse Y, Alonso G, Vives J, Castillo R, et al. HLA antigens in Forestier's disease, ankylosing spondylitis, and polyarthrosis of the hands. *The Journal of rheumatology Supplement*. 1977;3:89-93.
105. Nakamura K, Hirohata S, Murakami T, Miyoshi T, Demircan K, Oohashi T, et al. Dynamic induction of ADAMTS1 gene in the early phase of acute myocardial infarction. *Journal of biochemistry*. 2004;136(4):439-46.
106. Hatipoglu OF, Hirohata S, Cilek MZ, Ogawa H, Miyoshi T, Obika M, et al. ADAMTS1 is a unique hypoxic early response gene expressed by endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(24):16325-33.

107. Llamazares M, Cal S, Quesada V, Lopez-Otin C. Identification and characterization of ADAMTS-20 defines a novel subfamily of metalloproteinases-disintegrins with multiple thrombospondin-1 repeats and a unique GON domain. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(15):13382-9.
108. Blelloch R, Anna-Arriola SS, Gao D, Li Y, Hodgkin J, Kimble J. The gon-1 gene is required for gonadal morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology*. 1999;216(1):382-93.
109. Blelloch R, Kimble J. Control of organ shape by a secreted metalloprotease in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1999;399(6736):586-90.
110. Colige A, Sieron AL, Li SW, Schwarze U, Petty E, Wertelecki W, et al. Human Ehlers-Danlos syndrome type VII C and bovine dermatosparaxis are caused by mutations in the procollagen I N-proteinase gene. *American journal of human genetics*. 1999;65(2):308-17.
111. Li SW, Arita M, Fertala A, Bao Y, Kopen GC, Langsjö TK, et al. Transgenic mice with inactive alleles for procollagen N-proteinase (ADAMTS-2) develop fragile skin and male sterility. *The Biochemical journal*. 2001;355(Pt 2):271-8.
112. Fernandes RJ, Hirohata S, Engle JM, Colige A, Cohn DH, Eyre DR, et al. Procollagen II amino propeptide processing by ADAMTS-3. Insights on dermatosparaxis. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(34):31502-9.
113. Zheng X, Chung D, Takayama TK, Majerus EM, Sadler JE, Fujikawa K. Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(44):41059-63.

114. Levy GG, Nichols WC, Lian EC, Foroud T, McClintick JN, McGee BM. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature*. 2001;413(6855):488-94.
115. Scheiflinger F, Knobl P, Trattner B, Plaimauer B, Mohr G, Dockal M. Nonneutralizing IgM and IgG antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2003;102(9):3241-3.
116. Liu CJ. The role of ADAMTS-7 and ADAMTS-12 in the pathogenesis of arthritis. *Nature clinical practice Rheumatology*. 2009;5(1):38-45.
117. Johnston P, Larson D, Clark IM, Chojnowski AJ. Metalloproteinase gene expression correlates with clinical outcome in Dupuytren's disease. *The Journal of hand surgery*. 2008;33(7):1160-7.
118. Joe B, Saad Y, Dhindaw S, Lee NH, Frank BC, Achinike OH, et al. Positional identification of variants of Adamts16 linked to inherited hypertension. *Human molecular genetics*. 2009;18(15):2825-38.
119. Sakamoto N, Oue N, Noguchi T, Sentani K, Anami K, Sanada Y, et al. Serial analysis of gene expression of esophageal squamous cell carcinoma: ADAMTS16 is upregulated in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer science*. 2010;101(4):1038-44.
120. Li Z, Zhang W, Shao Y, Zhang C, Wu Q, Yang H, et al. High-resolution melting analysis of ADAMTS18 methylation levels in gastric, colorectal and pancreatic cancers. *Med Oncol*. 2010;27(3):998-1004.

121. Li Z, Nardi MA, Li YS, Zhang W, Pan R, Dang S, et al. C-terminal ADAMTS-18 fragment induces oxidative platelet fragmentation, dissolves platelet aggregates, and protects against carotid artery occlusion and cerebral stroke. *Blood*. 2009;113(24):6051-60.
122. van den Berg WB. Osteoarthritis year 2010 in review: pathomechanisms. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2011; 19:338-41.
123. Caterson B, Flannery CR, Hughes CE, et al: Mechanisms involved in cartilage proteoglycan catabolism. *Matrix Biol* 2000; 19: 333- 44.
124. Arner EC: Aggrecanase-mediated cartilage degradation. *Curr Opin Pharmacol* 2002; 2: 322-9.
125. Sandy, J. D., Flannery, C. R., Neame, P. J. & Lohmander, L. S. The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence for the involvement in osteoarthritis of a novel proteinase which cleaves the Glu373-Ala374 bond of the interglobular domain. *J. Clin. Invest.* 1992; 89:1512–6.
126. Kuno, K. et al. ADAMTS-1 cleaves a cartilage proteoglycan, aggrecan. *FEBS Lett.* 2000;478:241–5.
127. Tortorella MD, Pratta M, Liu RQ, Austin J, Ross OH, Abbaszade I, Burn T, Arner E. 2000a. Sites of aggrecan cleavage by recombinant human aggrecanase-1 (ADAMTS-4). *J Biol Chem* 2000;275:18566–73.
128. Ruo-Hua Song, Micky D. Tortorella, Anne-Marie Malfait, James T. Alston, Zhiyong Yang, Elizabeth C. Arner, David W. Griggs. Aggrecan Degradation in Human Articular Cartilage Explants Is Mediated by Both ADAMTS-4 and ADAMTS-5. *Arthritis Rheum.* 2007;56:575-85.

129. Kuno K, Bannai K, Hakozaiki M, Matsushima K, Hirose K. The carboxylterminal half region of ADAMTS-1 suppresses both tumorigenicity and experimental tumor metastatic potential. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;319:1327–33.
130. Sonya S. Glasson, Roger Askew, Barbara Sheppard, Brenda Carito, Tracey Blanchet, Hak-Ling Ma, Carl R. Flannery, Diane Peluso, Kim Kanki, Zhiyong Yang, Manas K. Majumdar, Elisabeth A. Morris. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. 2005;434: 644-8.
131. Malfait AM, Liu RQ, Ijiri K, et al: Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage. *J Biol Chem* 2002; 277: 22201–8.
132. Little CB, Mittaz L, Belluoccio D, Rogerson FM, Campbell IK, Meeker CT, Bateman JF, Pritchard MA, Fosang AJ. ADAMTS-1-knockout mice do not exhibit abnormalities in aggrecan turnover in vitro or in vivo. *Arthritis Rheum.* 2005; 52:1461-72.
133. Gendron C, Kashiwagi M, Lim NH, Enghild JJ, Thøgersen IB, Hughes C, Caterson B, Nagase H. Proteolytic activities of human ADAMTS-5: Comparative studies with ADAMTS-4. *J Biol Chem.* 2007; 282:18294-306.
134. Majumdar MK, Askew R, Schelling S, et al: Double-knockout of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in mice results in physiologically normal animals and prevents the progression of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56:3670-4.

135. Ilic MZ, East CJ, Rogerson FM, et al: Distinguishing aggrecan loss from aggrecan proteolysis in ADAMTS-4 and ADAMTS-5 single and double deficient mice. *J Biol Chem* 2007; 282: 37420–8.
136. Botter SM, Glasson SS, Hopkin B, Clockaerts S, Weinans H, van Leeuwen JP, van Osch GJ. ADAMTS5 $-/-$ mice have less subchondral bone changes after induction of osteoarthritis through surgical instability: implications for a link between cartilage and subchondral bone changes. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2009;17:636-45.
137. Bondeson J, Wainwright S, Hughes C, et al: The regulation of the ADAMTS4 and ADAMTS5 aggrecanases in osteoarthritis: a review. *Clin Exp Rheumatol* 2008;26:139-45.
138. Chockalingam PS, Zeng W, Morris EA, et al: Release of hyaluronan and hyaladherins (aggrecan G1 domain and link proteins) from articular cartilage exposed to ADAMTS-4 (aggrecanase 1) or ADAMTS-5 (aggrecanase 2). *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2839–48.
139. Kashiwagi M, Tortorella M, Nagase H, et al: TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and aggrecanase 2 (ADAM-TS5). *J Biol Chem* 2001; 276: 12501 – 4.
140. Wayne GJ, Deng SJ, Amour A, et al: TIMP-3 inhibition of ADAMTS-4 (Aggrecanase-1) is modulated by interactions between aggrecan and the C-terminal domain of ADAMTS-4. *J Biol Chem* 2007; 282: 20991 – 8.

141. Hashimoto G, Aoki T, Nakamura H, et al: Inhibition of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1,2, 3 and 4). FEBS Lett 2001; 494: 192-195.
142. Gendron C, Kashiwagi M, Hughes C, et al: TIMP-3 inhibits aggrecanase-mediated glycosaminoglycan release from cartilage explants stimulated by catabolic factors. FEBS Lett 2003; 555: 431-6.
143. Sahebjam S, Khokha R, Mort JS: Increased collagen and aggrecan degradation with age in the joints of Timp3^{-/-} mice. Arthritis Rheum 2007;56: 905-9.
144. Mahmoodi M, Sahebjam S, Smookler D, et al: Lack of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 results in an enhanced inflammatory response in antigen-induced arthritis. Am J Pathol 2005; 166: 1733-40.
145. Curtis CL, Rees SG, Little CB, et al: Pathologic indicators of degradation and inflammation in human osteoarthritic cartilage are abrogated by exposure to n-3 fatty acids. Arthritis Rheum 2002; 46: 1544-53.
146. Hashimoto G, Shimoda M, Okada Y: ADAMTS4 (aggrecanase-1) interaction with the C-terminal domain of fibronectin inhibits proteolysis of aggrecan. J Biol Chem 2004; 279:32483-91.
147. Bursavich MG, Gilbert AM, Lombardi S, et al: Synthesis and evaluation of aryl thioxothiazolidinone inhibitors of ADAMTS-5 (Aggrecanase-2). Bioorg Med Chem Lett 2007;17: 1185-8.

148. Bursavich MG, Gilbert AM, Lombardi S, et al: 5'-Phenyl-3'H-spiro[indoline-3,2' -[1,3,4] thiadiazol]-2-one inhibitors of ADAMTS-5 (aggrecanase-2). *Bioorg Med Chem Lett* 2007; 17: 5630-3.
149. Apte SS. Anti-ADAMTS5 monoclonal antibodies: implications for aggrecanase inhibition in osteoarthritis. *Biochem. J.* 20016;473:1-4.
150. Santamaria S, Yamamoto K, Botkjaer K, Tape C, Dyson MR, McCafferty J, Murphy G, Nagase H. Antibody-based exosite inhibitors of ADAMTS-5 (aggrecanase-2). *Biochem. J.* 2015;471:394-401.
151. Miller RE, Tran PB, Ishihara S, Larkin J, Malfait AM. Therapeutic effects of an anti-ADAMTS-5 antibody on joint damage and mechanical allodynia in a murine model of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2016; 24: 299-306.
152. Fushimi K, Troeberg L, Nakamura H, et al: Functional differences of the catalytic and noncatalytic domains in human ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in aggrecanolytic activity. *J Biol Chem* 2008; 283: 6706-16.
153. Burrage PS, Brinckerhoff CE: Molecular targets in osteoarthritis: metalloproteinases and their inhibitors. *Curr Drug Targets* 2007; 8: 293-303.
154. Cherney RJ, Mo R, Meyer DT, et al: Potent and selective aggrecanase inhibitors containing cyclic P1 substituents. *Bioorg Med Chem Lett* 2003; 13: 1297-1300.
155. Gilbert AM, Bursavich MG, Lombardi S, et al: 5- ((1H-Pyrazol-4-yl)methylene)-2-thioxothiazolidin-4-one inhibitors of ADAMTS-5. *Bioorg Med Chem Lett* 2007; 17: 1189-92.

156. Wittwer AJ, Hills RL, Keith RH, et al: Substrate dependent inhibition kinetics of an active sitedirected inhibitor of ADAMTS-4 (Aggrecanase 1). Biochemistry 2007; 46: 6393-401.



8. ÖZET

Osteoartrit en sık görülen eklem dejeneratif ekle hastalığı olup sıklığı yaşla birlikte artan, eklem kıkırdağında erozyon, eklem kenarlarında osteofit, subkondral skleroz, sinoviyal membran ve eklem kapsülünde biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerle karakterize dejeneratif bir eklem hastalığıdır.

Osteoartrit etyolojisinde genetik, inflamatuvar, metabolik ve travmatik faktörler suçlanmasına karşın tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. 1997 yılında Agrekanazların keşfi ve ADAMTS genlerinin agrekanı parçalayan enzimler olarak tespit edilmesinden beri osteoartritle etyolojisindeki rolleri gerek hayvan çalışmaları gerekse insan çalışmaları ile kanıtlanmaya çalışılmıştır. Osteoartritte; ADAMTS1, 4, 5, 8, 9 ve 15 genleri suçlanmış ancak literatürde ADAMTS 4 ve 5'in en aktif Agrekanazlar olduğunu gösteren yayınlar vardır. Son yıllarda ADAMT4, ADAMTS5 dışında ADAMTS9 öne çıkan agrekanaz enzimlerindendir. Literatürde hem hayvan çalışmaları hem de klinik insan çalışmaları olmasına rağmen hangi agrekanazların öne çıktığını gösteren prospektif, kontrollü çalışma yoktur. Farklı evrelerde osteoartrit gelişen hastalardan alınan örneklerde enzim analizi yapılmış ancak osteoartrit bulunmayan hastalarla olanları karşılaştıran çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmadaki amacımız, cerrahi tedavi gerektirecek, son evre osteoartrit gelişen hastaların kıkırdaklarındaki protein ile agrekanaz enzim ölçümü ve kan örneklerindeki DNA polimorfizm ve RNA gen ekspresyonu analiz sonuçlarını kontrol grubu ile karşılaştırarak patogenezdaki rollerini göstermektir. Araştırma kapsamında, 15 tane kalça eklemünde osteoartrit gelişen, cerrahi tedavi gerektiren

ve total kalça protezi uygulanan hasta ile 15 tane femur boyun kırığı gelişen, osteoartrit bulguları olmayan ve parsiyel kalça protezi uygulanan hastaların ameliyat sırasında alınan ve rezeke edildikten sonra çöpe atılan materyallerden doku örnekleri alınmıştır. Rezeksiyon materyallerinden kırıldak örnekleri alındıktan sonra soğuk zincir kurallarına uygun olarak nakledip -80°C’de saklanarak Western blot yöntemi ile kırıldaktan protein analizi, serumda ELISA yöntemi ile agrekanaz enzim ölçümü, kan örneklerinde PCR ile DNA’da polimorfizm ölçümü yapılmıştır.

Sonuç olarak; ADAMTS genlerinin osteoartrit gelişiminde rolü olduğu ve ADAMTS-5’in kalça osteoartriti gelişiminde esas soumlu olan ADAMTS geni olduğu sonuçlarına vardık. Bu hastalığın patofizyolojisinde rol oynayan bu preteolitik enzimlerin rollerinin tam olarak açıklığa kavuşturulması tedaviye yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır. Enzim veya proteoliz sonucu oluşan ürünlerin tespiti erken tanı imkanı sağlayabilir. Patogenezdaki rolü ispatlanacak enzimlerin inhibitörlerinin geliştirilmesi sonucunda cerrahi tedaviye gereksinimin azalmasına ve yeni ilaç gelişimi ile medikal tedavi olanağı sağlayacağından etyolojisinin aydınlatılması hedeflenmektedir.

ANAHTAR KELİMELEER: Osteoartrit, ADAMTS genleri, agrekanaz, kırıldak.

9. SUMMARY

Osteoarthritis is a degenerative joint disease which frequency increasing with age characterized by erosion of the articular cartilage, osteophytes at the edges of the joint, subchondral sclerosis, biochemical and morphological changes in the synovial membrane and joint capsule. Osteoarthritis is the most common degenerative joint disease.

In 1991, John Sandy reported enzyme cutting site first time in the interglobular domain of aggrecan. But this enzyme did not discovered at that time. These newly identified enzymes play an important function in the turnover of extracellular matrix proteins in various tissues and their dysregulation has been implicated in diseases such as cancer, arthritis, diabetes and atherosclerosis. 19 members of ADAMTS have been cloned, including ADAMTS1 to ADAMTS20 and 6 ADAMTS enzymes called group of aggrecanases (ADAMTS1, 4, 5, 8, 9, 15) with activity against aggrecan. Except ADAMTS4 and ADAMTS5, ADAMTS9 is a another aggrecanase may be new candidate for this question's answer. In both animal and human studies in the literature, although there are no prospective, controlled study, which indicating come forward in aggrecanase. The specimens taken from patients with different stages of osteoarthritis of the enzyme were analyzed, but those studies that compared with patients without osteoarthritis is not available.

The aim of this project; will require surgical treatment, patients with end-stage osteoarthritis is their role in the pathogenesis show that testing enzyme aggrecanase with the protein in cartilage, and blood sample with the protein and

RNA in gene expression analysis, DNA polymorphism results by comparing with the control group. Within this study, tissue samples will be taken resected during surgery after received and trashed materials of 15 patients developing osteoarthritis in the hip joint, 15 patients requiring surgery and who underwent total hip arthroplasty femoral neck fractured, without signs of osteoarthritis and patients who underwent partial hip replacement. After cartilage samples were taken from resection materials, will be transferred according to the rules of cold chain and will be stored at -80 ° C and will be tested the Western blot analysis of protein from cartilage and will be tested the aggrecanase enzymes in serum with ELISA and will be tested the polymorphisms in DNA by PCR in blood samples.

As a result; we have to concludes that ADAMTS genes play a role in the development of hip osteoarthritis and ADAMTS-5 gene primarily responsible for the development of the hip osteoarthritis. Clarifyng the exact role of proteolytic enzymes which involved iin the patophysiology of this disease will allow development of new treatment strategies. Proteolysis enzyme or detection of resulting products can arrange early diagnosis. To prove its role in the pathogenesis of the development of inhibitors of enzymes as a result of a reduction in the need for surgical treatment and medical treatment will provide an opportunity to clarify the etiologic aims

KEYWORDS: Osteoarthritis, ADAMTS genes, aggrecanase, cartilage.