

**TÜBİTAK**

2008-335  
✓

**TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU**  
THE SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

**Temel Bilimler Araştırma Grubu**  
Basic Sciences Research Grant Group

96027

**Proje No: 104T496**

**Farklı Ajanların Dinamik-Statik Kuvvetlerin Stimulasyonu  
Altında Osteoartrit Tedavisine Yönelik Etkilerinin Hücre  
Kültüründe İncelenmesi**

Y. Doç. Dr. Ayşen Tezcaner  
Y. Doç. Dr. Dilek Keskin  
Y. Doç. Dr. Senih Gürses  
Ayşegül Kavas  
Parisa Sharafi

ŞUBAT 2008  
ANKARA

## Önsöz

Bu projede literatürde daha önce araştırılmamış olan raloksifen, kemik morfojenik protein 9 ve pluronik F68'in osteoartrit hücreler üzerindeki etkileri incelenmiştir. Yapılan araştırma ile osteoartrit tedavisi için yeni yaklaşımlar geliştirilmesi amaçlanmıştır. Ajanların tedavi etkinlikleri hücre kültür şartlarında temel bilim araştırmaları yaklaşımıyla incelenmiştir. Ajanların tek başına ve çoklu kombinasyonlarda biyoetkinlikleri, oluşturulan üç boyutlu in vitro osteoartrit modelinde incelenmiştir.

Proje kapsamında yapılan deneyler temelde ODTÜ Mühendislik Bilimleri Bölümü laboratuvarlarında ve kısmen ODTÜ Merkez Laboratuvarında hizmet alımı karşılığında yapılmıştır. Projenin bir kısmı Mühendislik Bilimleri Bölümü'nün araştırma görevlilerinden Ayşegül Kavas'ın yüksek lisans tezi olarak savunulmuş ve başarılı bulunmuştur. Projenin tamamı TUBITAK-TBAG tarafından desteklenmiştir.

## İçindekiler

	Sayfa
<b>Özet</b> .....	: 8
<b>Abstract</b> .....	: 9
<b>Giriş</b> .....	: 10
<b>Genel Bilgiler</b> .....	: 12
1. Osteoartrit.....	: 12
2. Tıpta Uygulanan Tedaviler.....	: 12
3. Yeni OA Tedavi Stratejileri Geliştirilmesi Üzerine Araştırmalar.....	: 14
3.1. Doku Mühendisliği Yaklaşımı.....	: 15
3.2. OA Tedavi Potansiyali Olan Ajanlar.....	: 16
3.2.1. Kemik Morfojenik Proteinler (KMP).....	: 16
3.2.2. Raloksifen (Ral).....	: 18
3.2.3. Sörfaktantlar.....	: 18
<b>Gereç ve Yöntem</b> .....	: 19
<b>Gereçler</b> .....	: 19
<b>Yöntemler</b> .....	: 19
1. Primer Kıkırdak Hücre Kültürü.....	: 19
2. Üç Boyutlu İn Vitro Osteoartrit Modelinin Oluşturulması.....	: 20
3. Raloksifen (Ral), Sürfaktan (PLF-68) ve Kemik Morfojenik Protein 9'un (KMP 9) Osteoartrit Tedavi Etkinliklerinin İncelenmesi .....	: 21
3.1. Ral, PLF68 ve KMP9'un En Etkin Dozlarının Belirlenmesi.....	: 21
3.1.1. Uygulanan Tedavi Yöntemlerinin Agaroz-Kondrosit Disklerdeki Su Tutma Özelliğine Etkilerinin İncelenmesi.....	: 22
3.1.2. Uygulanan Tedavi Yöntemlerinin Agaroz-Kondrosit Disklerdeki Hücre Sayısına Etkilerinin İncelenmesi.....	: 22
3.1.3. Uygulanan Tedavi Yöntemlerinin Hücrelerin Glikozaminoglikan Sentezine Etkilerinin İncelenmesi.....	: 23
3.1.4. Uygulanan Tedavi Yöntemlerinin Hücrelerin Kolajen Proteini İçeriğine Etkilerinin İncelenmesi.....	: 23
3.1.5. Uygulanan Tedavi Yöntemlerinin Agaroz-Kondrosit Disklerdeki Etkilerinin Histolojik İncelenmesi .....	: 24
3.1.6. Uygulanan Tedavi Yöntemlerinin Agaroz-Kondrosit Disklerin Mekanik	

## İçindekiler

	Sayfa
Özet.....	: 8
Abstract.....	: 9
Giriş.....	: 10
Genel Bilgiler.....	: 12
1. Osteoartrit.....	: 12
2. Tıpta Uygulanan Tedaviler.....	: 12
3. Yeni OA Tedavi Stratejileri Geliştirilmesi Üzerine Araştırmalar.....	: 14
3.1. Doku Mühendisliği Yaklaşımı.....	: 15
3.2. OA Tedavi Potansiyeli Olan Ajanlar.....	: 16
3.2.1. Kemik Morfojenik Proteinler (KMP).....	: 16
3.2.2. Raloksifen (Ral).....	: 18
3.2.3. Sörfaktantlar.....	: 18
Gereç ve Yöntem.....	: 19
Gereçler.....	: 19
Yöntemler.....	: 19
1. Primer Kıkırdak Hücre Kültürü.....	: 19
2. Üç Boyutlu İn Vitro Osteoartrit Modelinin Oluşturulması.....	: 20
3. Raloksifen (Ral), Sürfaktan (PLF-68) ve Kemik Morfojenik Protein 9'un (KMP 9) Osteoartrit Tedavi Etkinliklerinin İncelenmesi .....	: 21
3.1. Ral, PLF68 ve KMP9'un En Etkin Dozlarının Belirlenmesi.....	: 21
3.1.1. Uygulanan Tedavi Yöntemlerinin Agaroz-Kondrosit Disklerdeki Su Tutma Özelliğine Etkilerinin İncelenmesi.....	: 22
3.1.2. Uygulanan Tedavi Yöntemlerinin Agaroz-Kondrosit Disklerdeki Hücre Sayısına Etkilerinin İncelenmesi.....	: 22
3.1.3. Uygulanan Tedavi Yöntemlerinin Hücrelerin Glikozaminoglikan Sentezine Etkilerinin İncelenmesi.....	: 23
3.1.4. Uygulanan Tedavi Yöntemlerinin Hücrelerin Kolajen Proteini İçeriğine Etkilerinin İncelenmesi.....	: 23
3.1.5. Uygulanan Tedavi Yöntemlerinin Agaroz-Kondrosit Disklerdeki Etkilerinin Histolojik İncelenmesi .....	: 24
3.1.6. Uygulanan Tedavi Yöntemlerinin Agaroz-Kondrosit Disklerin Mekanik	

Özelliklerine Etkilerinin İncelenmesi.....	: 24
3.2. Ral, PLF68 ve KMP9'un İkili ve Üçlü Kombinasyonlarının Osteoartirik Hücreler Üzerinde Etkilerinin İncelenmesi.....	: 24
3.3. İstatistiksel Analizler.....	: 26
<b>Bulgular ve Sonuç</b> .....	: 27
1. Primer Eklem Kıkırdak Hücre Kültürü.....	: 27
2. Kondrosit-Agaroz Disklerinin Hazırlanması ve İn Vitro Osteoartirit Modeli Oluşturulması.....	: 28
3. Farklı Doz KMP9, Ral ve PLF68'in Osteoartirit Tedavisinde Etkinliklerinin İncelenmesi.....	: 29
3.1. Agaroz-Kondrosit Disklerin Fiziksel Özellikleri.....	: 29
3.2. Agaroz İçinde Gömülü Canlı Kıkırdak Hücre Sayıları.....	: 31
3.3. Ral, KMP9 ve PLF68 Uygulamasının Kondrositler Tarafından Salgılanan Glikosaminoglikan (GAG) Miktarına Etkisinin İncelenmesi...	: 33
3.4. Ral, KMP9 ve PLF68 Uygulamasının Kondrositler Tarafından Sentezlenen Kollajen Miktarına Etkisinin İncelenmesi.....	: 35
3.5. Histolojik İncelemeler.....	: 37
3.6. Agaroz-Kondrosit Disklerinin Mekanik Özelliklerinin Karşılaştırılması..	: 41
4. Ral, KMP9, ve PLF68 Kombinasyonlarının Osteoartirik Hücreler Üzerinde Etkilerinin İncelenmesi.....	: 44
4.1. Agaroz-Kondrosit Disklerin Fiziksel Özellikleri.....	: 44
4.2. Agaroz İçinde Gömülü Canlı Kıkırdak Hücre Sayıları.....	
4.3. Ral, KMP9 ve Ral Kombinasyon Uygulamasının sGAG Sentezi Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi.....	: 47
4.4. Ral, KMP9 ve Ral Kombinasyonların Kollajen Sentezi Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi.....	: 48
4.5. Histolojik İncelemeler.....	: 50
4.6. Ral, KMP9 ve PLF68 Kombinasyon Uygulamalarının Agaroz-Kondrosit Disklerinin Mekanik Özellikleri Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi .....	: 53
<b>Kaynaklar</b> .....	: 55
<b>Öneriler</b> .....	: 70
<b>Özet Bilgi Formu</b> .....	: 71

depolanan ve sentezlenen toplam GAG miktarlarının karşılaştırılması. (Gruplararası istatistiksel farklılık düzeyleri: *, #, ж, □, ▢: $p \leq 0.05$ .....	: 34
<b>Şekil 10.</b> 27 günlük inkübasyon sonunda Ral, KMP9, and PLF 68 uygulanmış osteoartiritik hücrelerin ve sağlıklı ve negatif kontrol gruplarda agaroz disklerine depolanan ve sentezlenen toplam GAG miktarlarının disk başına normalize edilerek karşılaştırılması. (Gruplararası istatistiksel farklılık düzeyleri: ▢, &: $p \leq 0.1$ and ^, *, ж, #, □, \$: $p \leq 0.05$ ).....	: 35
<b>Şekil 11.</b> 27 günlük inkübasyon sonunda Ral, KMP9, and PLF 68 uygulanmış osteoartiritik hücrelerin ve sağlıklı ve negatif kontrol gruplarının kollajen miktarlarının karşılaştırılması. (Gruplararası istatistiksel farklılık düzeyleri: □: $p \leq 0.05$ ). .....	: 36
<b>Şekil 12.</b> 27 günlük inkübasyon sonunda Ral, KMP9, and PLF 68 uygulanmış osteoartiritik hücrelerin ve sağlıklı ve negatif kontrol grup disklerin ıslak ağırlığında kollajen oranlarının karşılaştırılması. (Gruplararası istatistiksel farklılık düzeyleri: □: $p \leq 0.05$ ).....	: 36
<b>Şekil 13.</b> 27 günlük in vitro inkübasyon sonunda kondrosit- agaroz disklerin kesitlerinde safranin O ile yapılna GAG incelemeleri. ....	: 38
<b>Şekil 14.</b> 27 günlük in vitro inkübasyon sonunda kondrosit- agaroz disk kesitlerinde kollajen boyamaları.....	: 40
<b>Şekil 15.</b> 27 günlük in vitro kültürasyon sonunda agaroz-kondrosit diskin % 10 luk deformasyonu sonucunda elde edilen basılmaya tanımlı sınırsız gerilme gevşeme (stress-relaxation) grafiği.....	: 42
<b>Şekil 16.</b> Agaroz-kondrosit disklerinin 27 günlük in vitro inkübasyondan sonra % 10'luk deformasyon sonucunda elde edilen en yüksek dayanma kuvvet değerleri (Gruplararası istatistiksel farklılık düzeyleri: *: $p \leq 0.002$ ; ▢, ж, □, #, ^, Ψ: $p \leq 0.05$ ; &: $p \leq 0.02$ ; \$: $p \leq 0.003$ , n=3).....	: 43
<b>Şekil 17.</b> Ral, KMP9 ve PLF68 uygulanmış, ve kontrol grupların agregat dayanımlarının karşılaştırılması (Gruplararası istatistiksel farklılık düzeyleri: *, ж: $p \leq 0.05$ , □, ^: $p \leq 0.02$ , \$: $p \leq 0.1$ ). ....	: 43
<b>Şekil 18.</b> Hidrostatik veya statik kuvvetler altında değişik Ral, KMP9 ve PLF68 kombinasyonları uygulanmış kondrosit-agaroz disklerin ıslak ağırlıkların 27 gün sonunda kontrol gruplarıyla karşılaştırılması.....	: 45
<b>Şekil 19.</b> Ral, KMP9 ve PLF68 kombinasyonlarının osteoartiritik hücre çoğalmasında etkileri.....	: 47

<b>Şekil 20.</b> Ral, KMP9, ve PLF68 kombinasyon uygulamasının osteoartirik hücrelerin sGAG sentezleri üzerindeki etkisinin karşılaştırılması.....	: 48
<b>Şekil 21.</b> Ral, KMP9 ve PLF68 kombinasyon uygulamalarının agaroz disklerin kollajen miktarları üzerindeki etkileri (Gruplararası istatistiksel farklılık düzeyleri: *, \$, ^: $p \leq 0.05$ ). .....	: 49
<b>Şekil 22.</b> 10 günlük kombinasyon uygulaması sonunfa kondrosit- agaroz disk kesitlerinde sGAG boyamaları. ....	: 51
<b>Şekil 23.</b> 10 günlük kombinasyon uygulaması sonunda kondrosit- agaroz disk kesitlerinde kollajen boyamaları. ....	: 52
<b>Şekil 24.</b> Agaroz-kondrosit disklerinin 10 günlük kombinasyon uygulamaları sonunda % 10'luk deformasyon sonucunda elde edilen en yüksek dayanma kuvvet değerleri (Gruplararası istatistiksel farklılık düzeyleri: *: $p \leq 0.05$ ). ....	: 54
<b>Şekil 25.</b> Ral, KMP9 ve PLF68 kombinasyon uygulanmış, ve kontrol grupların aggregat dayanımlarının karşılaştırılması (Gruplararası istatistiksel farklılık düzeyleri: *, $\square$ , $\psi$ : $p \leq 0.05$ ). ....	: 54



## Özet

Osteoartrit (OA) eklem kıkırdağının ilerleyen bozunması olarak tanımlanmaktadır. Kesin bir tedavisi bulunmayan bu hastalık için sadece semptomları azaltmaya yönelik ilaçların kullanılmaktadır. Bu çalışmada klinikte osteoartrit tedavisinde kullanılmayan ve daha önce araştırılmamış Kemik Morfojenik Protein-9 (KMP-9), Raloksifen (Ral) ve Pluronik F-68 (PLF-68)'in tedavi potansiyelleri üç boyutlu *in vitro* OA modelinde incelenmesi amaçlanmıştır.

### *in vitro* OA modeli

OA *in vitro* modelinin oluşumu için rat eklem kıkırdak hücreleri agaroz diskler içerisinde gömülerek 48 saat süreyle Aza-C varlığında bekletilmiştir. Aza-C uzaklaştırıldıktan sonra, kondrositlere dinamik basınç altında 10 gün farklı dozlarda KMP-9, Ral ve PLF-68'in ve uygulanmıştır. Doz etkisi disklerdeki hücre sayısı ile hücreler tarafından sentezlenen glikozaminoglikan ve kollajen miktarları incelenmiştir. Ayrıca OA'lı dokudaki iyileşmenin fiziksel bir göstergesi olarak disklerin uygulamalar sonrası mekanik özellikleri sağlıklı ve kontrol grubuyla karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir. Kullanılan ajanların en etkin dozları belirlenmiş ve bunlarla oluşturulan ikili ve üçlü kombinasyonların osteoartritik hücreler üzerindeki etkileri aynı şartlarda ve yöntemlerle incelenmiştir. Ayrıca etkin üç dozun kombinasyonunun etkisi statik basınç altında da çalışılmıştır.

Pozitif ve negatif kontrollerle karşılaştırıldığında, KMP-9'un osteoartritik kondrositler üzerinde olumsuz etkisi olduğu bulunmuştur. Ayrıca Ral'in OA tedavisinde umut vadettiğini gösteren, özellikle 5  $\mu$ M'lık dozda matriks sentezi ve mekanik özellikler bakımından olumlu sonuçlar bulunmuştur. PLF-68 uygulanan disklerde ise özellikle hücre sayısı, kolajen sentezi ve mekanik özellikler yönünden olumlu etkiler gözlenmiş ve OA'in tedavisi için potansiyeli olduğu görüşü desteklenmiştir. Kombinasyon uygulamaları sonuçları ise tekli uygulamalarla uyumlu olarak en olumlu matriks sentezi ve fonksiyonel iyileşme belirtilerini üçlü uygulama (KMP-Ral-PLF-68) ve Ral-PLF-68 ikili uygulamalarda göstermiştir. Kombine uygulamalarda elde edilen sonuçların potansiyel etkisi olduğu düşünülen iki ajanın tek başın uygulanmasından daha başarılı olduğu düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Osteoartrit, Kemik Morfojenik Protein-9, Raloksifen, Pluronik F-68, agaroz

## Abstract

Osteoarthritis (OA) is a disease characterized by the progressive degradation of articular cartilage. Current strategies for the disease are mainly towards relieving symptoms. This study was aimed to investigate the therapeutic potentials of Bone Morphogenetic Protein-9 (BMP-9), Raloxifene (Ral) and Pluronic F-68 (PLF-68) with a three-dimensional *in vitro* OA model.

Rat articular chondrocytes were embedded in agarose and incubated with Aza-C for 48 hours for OA development. After its removal, chondrocytes were treated with different doses of BMP-9, Ral and PLF-68 for 10 days under dynamic hydrostatic mechanical pressure. The best dose was evaluated by measuring cell number, glycosaminoglycan and collagen amount, and mechanical properties of the discs in comparison to positive and negative control groups. The combinatory effect of the agents on osteoarthritic cells was also evaluated with the same methods.

In comparison to positive and negative control groups, it was found that BMP-9 had negative effect on osteoarthritic chondrocytes. On the other hand, Ral showed positive results in terms of matrix synthesis and mechanical properties especially for 5  $\mu$ M dose suggesting promise for treatment of OA. The potential of PLF-68 for treatment of OA was also supported by this study considering its positive effects on cell number, collagen synthesis and mechanical properties. The best results in terms of increased matrix deposition and improved mechanical properties were obtained for KMP-Ral-PLF-68 and Ral-PLF-68 treated groups. From the combinatory treatment results it can be concluded that using two or three agents together instead of using agents alone has more potential in treatment of osteoarthritis. Yet, further investigations are also suggested for conclusive results on this agent.

**Keywords:** Osteoarthritis, Bone Morphogenetic Protein-9, Raloxifene, Pluronic F-68, agarose

## Giriş

Osteoartirit başta travma olmak üzere, genetik, beslenme, yaşlılık v.b gibi çeşitli faktörlere bağlı gelişen dejeneratif bir eklem kıkırdağı hastalığıdır. Hastalığın kesin bir tedavisi yoktur, ancak klinikte çoğunlukla eklem hasarını veya yan etkilerinin gelişimini yavaşlatacak yöntemler uygulanmaktadır.

OA tedavisine yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesine yönelik dünyada ve ülkemizde klinik ve temel bilim alanlarında birçok araştırma yapılmaktadır. Kıkırdağın doğal hücre dışı matriksinde bulunan kondroitin sülfat, glukosamin veya vücutta bulunan adinopektin, kemik morfojenik proteinler (2, 7) gibi biyomoleküllerin etkinlikleri son yıllarda araştırılanlar arasındadır. Bu projede üç farklı ajanın (kemik morfojenik protein 9, raloksifen, ve Pluronik F68) osteoartirit tedavi etkinlikleri tek başına ve farklı kombinasyonlarında araştırılması hedeflenmiştir. Proje kapsamında ajanların osteoartiritik hücreler üzerindeki tedavi etkinlikleri oluşturulan in vitro osteoartirit modelinde incelenmiştir. Bu modelde kıkırdak doğal ortamını taklit edilmesi amacıyla hücreler agaroz içinde hapsedilmiş ve günlük hidrostatik basınca maruz bırakılmıştır. Kullanılan ajanların osteoartiritik hücrelerinin çoğalma, matriks sentezleme (sGAG ve kollajen), şişme (agaroz disk ıslak ağırlık ve boyutları), ve mekanik özellikler üzerindeki etkileri sağlıklı ve kontrol (azasitidin maruz kalmış ve ajan eklenmemiş) gruplar ile karşılaştırılmalı olarak yapılmıştır. Klinik olarak bulguları ancak ileri aşamalarında gözlenebilen bu hastalığın in vitro koşullarda değerlendirilmesi ile ilgili sorunlar yaşanmış ancak sonuçlar mümkün olduğunca istatistiksel değerlendirilerek yorumlanmıştır. Bununla birlikte özellikle projenin başında planlanan hücre kaynağının uygulmadaki zorluklar nedeniyle değiştirilmesi, analiz edilen malzemelerin minimum ölçülebilen değerlerinin yüksek olması, gruplar arasında canlıların doğasında bulunan yüksek varyasyonların olması nedeniyle özellikle kantitatif sonuçların sadece etkinliği çok belirgin doz-gruplarda istatistiksel karşılaştırılabilecek düzeyde anlamlı sonuçlar verdiği görülmüştür. Ne var ki uygulanan kısa süreli tedavide bulunan bu sonuçların uzun süreçte daha başarılı ve kesin sonuçlar vereceği düşünülmektedir.

Elde edilen sonuçlar osteoporoz ilacı olarak kullanılan Ral ve vücutta toksik etkisi olmayan PLF 68'in belirli dozlarda tek veya birlikte kullanımının OA tedavisinde olumlu sonuçlar verebilecek ajanlar olduğunu göstermiştir. Bu ajanlarla klinik uygulamaya çok kolay

geçebilecek yeni tedavi strateji(leri) geliştirilebileceği düşünülmektedir. Ayrıca bu araştırma ile Ral'in OA üzerinde tedavi etkisi yazılı kaynakla ilk defa belgelenmiştir. Ancak bu ajanların etkin dozlarının uzun süreçteki etkileri, uygulama sıklığı v.b. sonuçlarının özellikle in vivo değerlendirilmesi gerekli görülmektedir.

Böylece, bu tedavi yönteminin ülkemizde geliştirilmesi ülke ekonomisine oldukça yararlı olacak ve hastalar için bir umut doğuracaktır.

Yazarlar bu çalışmada

rekabetçilerinin arasından

kuşak hastalığı eklemlerde

ve Richter, 2006. Nesic ve

Ayrıca genetik faktörler

ayrı değişimlere neden olur

1988 OLIVERIA, 1999

buğulu kadar olmasında

yavaşlamak yönünde

eklem ağrısının azaltılması

yeteneğinin azaltılması

değer amaçlı vardır. OA

veriler ile tedaviyi ilac

ajantlar oluşturulmuş

enjekte edilen yapılmıştır. Karanlık

diğer kullanımı eklenmiştir

1. Tıp Uygulanması

1.1. Tıp Uygulanması

1.1.1. Tıp Uygulanması

1.1.1.1. Tıp Uygulanması

1.1.1.1.1. Tıp Uygulanması

1.1.1.1.1.1. Tıp Uygulanması

1.1.1.1.1.1.1. Tıp Uygulanması

1.1.1.1.1.1.1.1. Tıp Uygulanması

1.1.1.1.1.1.1.1.1. Tıp Uygulanması

1.1.1.1.1.1.1.1.1.1. Tıp Uygulanması

1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1. Tıp Uygulanması

1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1. Tıp Uygulanması

1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1. Tıp Uygulanması

## Genel Bilgiler

### 1. Osteoartirit

Osteoartirit (OA) dünyada çoğunlukla ve daha şiddetli olarak yaşlı insanları etkileyen dejeneratif bir kıkırdak hastalığıdır. Eklem kıkırdağında anabolik ve katabolik reaksiyonlarının arasındaki dengesizliğe bağlı gelişen dejenerasyon veya yapısal ve işlevsel kayıp hastalıklı eklemlerde kronik ağrılara ve kullanım sıkıntılarına neden olmaktadır (Lorenz ve Richter, 2006, Nesic ve ark, 2006). OA gelişme nedenlerinin başında travma gelmektedir. Ayrıca genetik faktörler, yaşlanma, ve yanlış beslenme eklem kıkırdağında eklem kıkırdağında aynı değişimlere neden olan faktörler arasında sayılmaktadır (SWOBODA, 2001, FELSON, 1988, OLIVERIA, 1999, KARLSON, 2003). Osteoartriti önleyen herhangi bir ilaç tedavisi bugüne kadar olmamasına rağmen, eklem hasarını veya yan etkilerinin gelişimini yavaşlatacak yöntemler denenmektedir. Bununla ilgili olarak yapılan semptomatik tedavilerle eklem ağrısının azaltılması, eklem hareket açıklığının iyileştirilmesi ve fonksiyonel yetersizliğin azaltılması amaçlanmaktadır. OA tedavisinde kullanılan ilaçlar, ilaç-dışı tedaviye destek amaçlı verilir. OA tedavisinin temel ögesi ilaç-dışı tedavidir. Ağrı dindirmek için verilen ilaç tedavisi, ilaç-dışı tedaviyle kombine edildiği zaman daha etkilidir. Ayrıca topikal ajanlar osteoartritli eklem ve çevresine direkt olarak uygulanabilir. Eğer gerekirse kortizon enjeksiyonu yapılabilir. Kortizon inflamasyonu kontrol altına alan güçlü bir ajandır; ancak sık olarak kullanımı eklemdeki yıpranmayı, bozulmayı artırabildiği için kullanımını kısıtlıdır.

### 2. Tıpta Uygulanan Tedaviler

OA genellikle, klinik ve radyolojik bulguların belirginleştiği ileri aşamalarda teşhis edilen bir hastalıktır. Ne var ki bu aşamada cerrahi uygulama içermeyen teröpatik yaklaşımlar çok azdır. Klinik tedavisi ağrının kontrolü ve eklem fonksiyonelinin, dolayısıyla hastanın sağlıkla ilgili yaşam kalitesinin artırılmasına odaklıdır.

Tıpta kalça veya diz OA'ı için önerilen yaklaşım ilaç tedavileri ile cerrahi uygulamaları kapsar. Ağrı kontrolü için uygulanan ilaç tedavileri buz masajı, egzersiz, eklem ve kilo azaltılması gibi farmakolojik olmayan yöntemlerle birleştirildiğinde daha etkin olmaktadır. Kısa süreli farmakolojik terapiler bazı ajanların (opioidlerin, glukozamin sülfat,

kondroitin sülfat, hialuronik asit, asetaminofen, seçici olan veya olmayan NSAID (streoid olmayan antienflamatuar ilaçlar) gibi) eklem içerisine enjeksiyonunu içermektedir. Bunlardan kondroitin sülfat ve hialuronik asitin in vitro ve in vivo araştırmalar ve klinik (kısa süreli) uygulamalarıyla hastalığın etkilerini değiştiren ajanlar olduğu bulunmuştur (GLASS, 2006).

Eklem içerisine hialuronan enjeksiyon aralığının etkisini gözlemek amacıyla yapılan bir araştırmada çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Sonuç olarak, canlı ile yapılan deneylerle Brandt ve ark. (2000) her ne kadar kısa dönemde eklem içi hialuronan terapisi güvenilir görölse de, bu uygulamanın uzun süreçte hasarlı ekleme aşırı yüklenme ile artiküler kıkırdakta proteoglikanların kaybına sebep olacağını önermişlerdir. Bunun sonucu olarak yapısal hasarda artışa neden olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Başka bir araştırmada yine eklem içerisine hialuronan enjeksiyonunun diz OA'ı tedavisine etkisini incelenmiş ve sonuçlar bu tedavinin etkisini açıklamada kesin bir nitelik taşımaya yetersiz bulunmuştur. Bütün araştırmaların aynı sonuca ulaştığı ve bu terapi yönteminin uzun süreçte istenilen etkinin tam tersi etkiyi yarattığı belirtilmiştir (BRANDT, 2000).

Klinik denemeler çoğunlukla hastalık semptomlarının azaltılmasında kullanılan glukozaminin tedavi etkinliğinin orta düzeyde olduğunu, ancak kondroitin sülfatın daha geniş tedavi etkisinin bulunduğunu göstermiştir. (LEEB, 2000, MCALINSON, 2000, RICHY, 2003). Bunlara ek olarak Homandberg ve arkadaşları yakın tarihli bir araştırmada (2006) glukozamin ve kondroitin sülfat karışımının sinerjik etki gösterdiğini ve fibronektin parçalarına bağlı kıkırdak hasarlarını her iki ajanın tek başına uygulanmasından daha etkin geri çevirdiğini göstermiştir.

Obesite de OA gelişmesine neden olan risk faktörlerinden biri olarak görölmektedir (OLIVERIA, 1999, KARLSON, 2003). Adipositler tarafından salgılanan bir hormon olan adiponektinin OA'e karşı koruyucu rolü de başka bir grubun yakın tarihli araştırmasında gösterilmiş ve bu konuda çelişki oluşturmuştur (CHEN, 2006). Bu çalışmada adiponektinin primer kondrosit fonksiyonuna etkileri incelenmiş ve hormonun IL-1  $\beta$ -tarafından indüklenen MMP13'ü down regüle ettiği bulunmuştur. Bu sonuçlarla araştırmacılar bu azalmadaki moleküler mekanizmanın anlaşılması için daha fazla çalışmanın gerekli olduğuna karar vermişlerdir. Daha önceki raporlarda OA hastalarında sinoviyal sıvıdaki ortalama adiponektin düzeylerinin RA hastalarından daha az olduğu belirtilmiştir. Ayrıca adiponektin düzeyleri ile hastalığın şiddeti arasında ters orantı olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte obesite,

eklemlerde aşırı yüklenmeye neden olmasından dolayı OA için bir risk faktörü olarak görülmelidir.

OA'daki dejeneratif değişimler eklem mekaniğini değiştirebilmektedir. Farmakolojik olan ve olmayan terapilere rağmen şiddetli ağrısı ve fonksiyon azlığı devam eden hastalarda ameliyat uygun görülmektedir. Günümüzde bu eklem operasyonları eklem füzyonu olduğu durumlarda; doğal yapının çıkarılıp eklem protezi konulması; basınç azaltıcı ameliyatlar, örneğin kas uzatılması gibi uygulamaları içermektedir. Eklem kaynaştırılması, fonksiyonel olmakla beraber hasta için rahatsız edici bir düşüncedir ve ilgili diğer eklemlerde OA gelişmesine sebep olabilmektedir. Eklem replasmanı ise, kısa ve orta dönemde mükemmel rahatlama ve eklem fonksiyonlarında artış sağlarken uzun dönemde çok aktif hastalarda zayıf sonuçlar vermekte ve protezin yenilenmesiyle de normal durumdakinden daha kısa süreli etkinlik göstermektedir (KUETTNER, 1991). Diğer bir cerrahi yaklaşım da subkondral bölgeye girilerek kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerin hasarlı bölgeye verilmesidir. Ne var ki bu uygulamalarda eklem kıkırdak yerine fibrokıkırdak oluşumu ile sonuçlanmıştır. (SUH, 1997, O'DRISCOL, 1998).

### **3. Yeni OA Tedavi Stratejileri Geliştirilmesi Üzerine Araştırmalar**

Dünyada osteoartrit tedavisi maliyeti ve hastaların yaşam kaliteleri üzerindeki etkisi çok büyüktür. Günümüzde osteoartrit hastalığının toplumda yaygınlığının artması ve bununla birlikte operasyon içermeyen kalıcı bir tedavi yönteminin olmaması yeni tedavi yöntemleri geliştirilmesine doğru odaklanan araştırmalarda artışa neden olmuştur. Bunlar, erişkin kıkırdak ağrısının kendi kendine iyileşme yetersizliği nedeniyle hastalığın etkilerini değiştiren ajanların kullanılması, doku mühendisliği yöntemi ile rejenerasyonun sağlanması v.b. yaklaşımları içermektedir (LEEB, 2000, MCALINSON, 2000, RICHY, 2003, ROBERT, 2003, MIZUTA, 2004, NA, 2006, MOUW, 2005).

Yapılan araştırmalar çoğunlukla in vitro ve in vivo modeller üzerinde yapılmaktadır. Deneysel modeller (örnek: in vitro ve in vivo hayvan modelleri) OA hastalığının gelişme ve ilerleme mekanizmalarını incelenmesi ve glukosamin, kondroitin sülfat, adiponektin gibi törapatik ve engelleyici potansiyel ajanlarının etkinliklerinin test edilmeleri için kullanılmaktadır. Deneysel in vitro kıkırdak hastalık modelleri başında kıkırdak eksplantler (PISCOYA, 2005, HOMANDBERG, 2006), iki veya üç boyutlu taşıyıcılarda büyütülen

kondrositler, (izole edilmiş osteoartritik hücreler veya osteoartritik yapılmış kırıkta hücreleri), ve taşıyıcısız büyütülen kondrositler (örnek: pellet, kokültür veya tek katmanlı olarak büyütülmeleri) gelmektedir. In vivo modeller ise deney hayvanlarında ameliyat ile (ROOS, 1995, HØEGH-ANDERSEN, 2004, EL HAJAJI, 2004) veya kırıkta içine kollajen, fibronektin fragmanları, papain gibi ajanlarının enjeksiyonlarıyla oluşturulmaktadır (HOMANDBERG, 1993, HOMANDBERG, 2001).

### 3.1. Doku Mühendisliği Yaklaşımı

Farklı hücre ve biyomalzeme temelli doku mühendisliği stratejileri de (rejenerasyon için hücre ve büyüme faktörleri salımı gibi) hasarlı kırıkta onarmak amacıyla incelenmektedir (ROBERT, 2003, MIZUTA, 2004, NA, 2006, MOUW, 2005). Yetişkinlerin aksine çocuklarda kırıkta yaralanmaları yüksek kök hücre konsantrasyonları nedeniyle kendi kendine iyileşme özelliği gösterirler. Yetişkinlerdeki bu eksikliğin temel diğer nedenleri de farklılaşmış kondrositlerin mitotik aktivitelerinin olmaması ve diffüzyonla eklem bölgesine besin sağlanmasının minimum olmasıdır.

Bu nedenlerle hücre temelli doku mühendisliği kullanılarak kırıkta rejenerasyonu gelecek vadeden bir stratejidir. İlk klinik uygulama otolog hücrelerin in vitro çoğaltıldıktan sonra implantasyonunu içermektedir. Fonksiyonel kırıkta doku mühendisliği amacıyla çoğunlukla hidrojel yapıdaki üç boyutlu polimer taşıyıcılar (gözenekli destekler, enjekte edilebilir veya boncuk şeklinde sistemler) hem kırıkta hem de osteokondral hasarlarda kullanılmak üzere tasarlanmıştır (WAKITANI, 2002, SHERWOOD, 2002, TAMAI, 2005, LI, 2006, OLIVERIA, 2006). Bunların arasında agaroz, fibrin, kollajen, hiyaluronan, aljinat, aljinat-jelatin karışımları ve poliglikolik asit bulunmaktadır (MAUCK, 2000, DEMARTAU, 2004, MOUW, 2005, SOLCHAGA, 2005, NA, 2006, SCHAGEMANN, 2006, EYRICH, 2007, LEE, 2007, CHEN, 2007).

OA'tik diz eklemlerindeki kırıkta hasarlarının rejenerasyonu otolog kök hücre transplantasyonu ile iyileştirilmiştir. Bu çalışmada 24 hastanın göğüs kemiğinden alınan iliklerden mezenkimal kök hücreler izole edilmiş ve kullanılmıştır (WAKINATI, 2002).

Otolog mezenkimal kök hücreler kollajen jeller içerisine gömülmüş ve eklem kırıktaındaki hasarlı bölgeye transplante edilmiştir. 42 hafta sonunda kırıkta benzeri doku oluşumu gözlenmiştir. Atroskopik ve histolojik değerlendirmelerde hücreli grupların hücresiz



kontrollerden daha iyi sonuç verdiği bulunmuştur. Bu araştırmalar mezenkimal kök hücrelerin kırıkta onarımında alternatif hücre kaynağı olabileceğini göstermektedir (MURPHY, 2003, MIZUTA, 2004). Doku mühendisliği yöntemleriyle hazırlanmış allojenik kondrositler ticari formlarda satılmakta ve klinikte yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yapılar yalnız kırıkta hasarları tedavisinde graft malzeme olarak kalmayıp aynı zamanda kırıkta gelişimi ve hastalık mekanizmalarının incelenmesinde kontrollü araştırmalara model olarak da hizmet etmektedir.

### **3.2. OA Tedavi Potansiyali Olan Ajanlar**

#### **3.2.1. Kemik Morfojenik Proteinler (KMP)**

Kemik Morfojenik Proteinler TGF- $\beta$  süper ailesine ait çok fonksiyonlu moleküllerdir. İlk olarak demineralize kemikte fark edilen ve buradan elde edilen KMP'ler büyüme ve farklılaşma faktörleridirler (MAJUMDAR, 2001).

KMP'lerin aktivitesi ilk olarak 1960'larda (URIST, 1965) tanımlanmıştır. Ancak kemik indüksiyonundan sorumlu proteinler KMP-3 (osteogenin) saflaştırılmasından ve diziliminin çözülmesi ile KMP-2 ve 4 proteinlerinin 1980 sonlarında klonlanması sürecine kadar belirsiz kalmıştır (WOZNEY, 1988, LUYTEN, 1989, WOZNEY, 1992). Bugüne kadar KMP ailesinden 20 farklı protein tanımlanmıştır. Bunların embriyogenezde kırıkta ve kemik gelişiminin ve bunun yanı sıra yetişkin iskelet sisteminde bu dokuların onarımının ve yeniden modellenmesinin kontrolünde anahtar moleküller olduğu gösterilmiştir (MAJUMDAR, 2001). KMP 2, 4, 7, 9 ve 13 'ün matriks sentezinde ve kırıkta fenotipinin sürekliliğinde pozitif etkileri bazı araştırmacılar tarafından da gösterilmiştir (LUYTEN, 1994, FLECHTENMACHER, 1996, ERLACHER, 1996, SAILOR, 1996, WEISSER, 2001, HILLS, 2005, YEH, 2007).

Kırıkta iyileşme yönünden sınırlı bir kapasiteye sahiptir. Kırıkta transplantasyonu bu amaç için uygun bir törapatik yaklaşımdır. Ancak bu yöntemle onarım süreci daha önce belirtildiği gibi çok uzun olabilmektedir. KMP-7'nin osteoindüktif kapasitesinin dışında, kırıkta büyümesi, olgunlaşması ve matriks sentezindeki (agrekân, kolajen tip II) uyarıcı etkisi sığır ve insan kondrosit kültürlerinde dökümente edilmiştir (NISHIDA, 2000, CHUBINSKAYA, 2003, NISHIDA, 2004).

Hidaka ve ark. (2003) KMP-7'nin adenovirus aracılığıyla gen transferi sonucunda aşırı ekspresyonu ile in vitro artan matriks sentezi ve kıkırdak benzeri doku oluşumuna neden olduğunu göstermişlerdir. KMP-7'nin, deneysel kıkırdak hasarı modellerinde hiyalin benzeri onarım dokusu görünümünde artışa neden olduğu da gösterilmiştir. Böylece hücre temelli kıkırdak onarımında rehabilitasyon uzatılabilmiş ve bunun sonucu olarak hasta üretkenliği ve yaşam kalitesi artırılabilmiştir (HIDAKA, 2003). Yakın tarihli bir araştırmada Stöve ve ark. KMP-7'nin aljinat boncuklarında gömülmüş insan kaynaklı OA kondrositleri anabolik uyarıcı etkisini artan proteoglikan üretimi ve agrekan ekspresyonu ile göstermişlerdir (STÖVE, 2006).

KMP'lerin kondrojeneze etkilerini incelemeyi hedef alan bir çalışmada enflamasyon öncesi (proinflammatory) sitokin interlükin-1'in etkisi kondrojenik farklılaşmış hücrelerde ve IL-1  $\beta$  ile KMP etkileşiminde araştırılmıştır. KMP 2 ve 9'un tip II kollajen mRNA'sının ekspresyonunu indüklediği ve kondrosit kültüründe agrekan ile kıkırdak oligomerik matriks proteinlerinin ekspresyonunu arttırdığı bulunmuştur. Bu her iki büyüme faktörünün de hücrelerdeki kondrojenik farklılaşmayı indüklediğini de önermektedir. Bunun yanı sıra KMP'lerin interlükin-1'in kondrojenezi baskılayıcı etkisini kısmen engellediği de bulunmuştur. Bu nedenlerle KMP'lerin kondrojenizde önemli bir rol oynadığı ve kıkırdak onarımında teröpatik ajan olarak büyük potansiyele sahip oldukları sonuçları çıkarılabilmektedir (MAJUMDAR, 2001).

Bunlara ilaveten, KMP-9'un ergen ve yetişkin sığır kıkırdak metabolizmasında etkileri in vitro şartlarda çalışılmıştır. Bu araştırmada KMP-9'un etkisi daha önceden incelenmiş olan iki kemik morfojenetik proteinle (KMP2 ve 13-CDMP-2) karşılaştırılmıştır. KMP-9'un ergen kıkırdakta proteoglikan ve kollajen sentezinde artış sağlayacak yönde uyarıcı etkisinin olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte KMP-2'nin bu etkiyi sadece proteoglikan sentezinde yaptığı sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak araştırmacılar KMP-9 uygulanmasının ergen eksplantlarda proteoglikan yıkım hızında anlamlı azalmaya neden olduğu, ancak bu üç KMP'nin de yetişkin kıkırdak eksplantlarında ölçülebilir düzeyde anabolik etkilerinin olmadığı belirtilmiştir (HILLS, 2005).

### 3.2.2. Raloksifen (Ral)

Seçici östrojen modülatörler (SERM) OA tedavisine yönelik teröpatik ajanlar olarak araştırılmaktadır. Raloksifen (Ral), yeni bir SERM ajanı olarak menapoza bağlı osteoporozda tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Bu ajanın klinik kullanımı diğer faydalı etkilerini de ortaya çıkarmıştır. OA'li kadın hastalarda 12 ay boyunca klinik olarak Ral uygulanması sonucunda bu ajanın OA karşıtı etkisinin mümkün olduğu belirtilmiştir (DANILUK, 2005, BADURSKI, 2005). Ayrıca, yakın zamanda yapılmış bir araştırmada Ral'ın makrofaj ve düz kas hücre kültürlerinde MMP-9 aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (BELLOSTA, 2007). Bu 2. jenerasyon SERM ajanın artrite bağlı kıkırdak yıkımının tedavisinde büyük potansiyele sahip olabileceği düşünülmektedir.

### 3.2.3. Sörfaktantlar

Klinik araştırmalarda travmaya bağlı eklem yaralanmalarının sıklıkla erken ağrı ve OA gibi kronik hastalık seyri gösterdiği belirtilmektedir. Kronik hastalıklar mekanik travma sırasında eklem kıkırdakta oluşan hücre ölümleriyle başlatılabilir. Nekroz sonucu hücre ölümünün temel özelliği şişme ve sonucunda hücre yırtılmasıdır. Bu da hücrelerin hasarlı hücre zarının iki tarafındaki iyon dengesinin hücre tarafından korunamaması nedeniyle oluşmaktadır. Bir kopolimer (polioksietilen ve polipropilen) olan Pluronik F-68'in (PLF68) mekanik tavyayla zarar görmüş olan kıkırdak hücrelerinde hasarlı zarın bütünlüğünü geri kazandırabileceği gösterilmiştir (PHILLIPS, 2004). Başka bir araştırmada şiddetli travma sonrasında hasarlı kıkırdağa PLF68'in uygulanmasıyla hücrelerin yalnızca % 7'sinde nekroz olduğu gösterilmiştir (RUNDELL, 2005). Bu iyonik olmayan sürfaktan ampifilik özelliği nedeniyle plazma membranının yapısına girerek yama görevi görmekte ve böylece hasarlı kısımlardan hücre içi malzemelerin dışarı çıkmasını engellemektedir. Böylece, PLF 68 hücre içerisi ve dışarısındaki (zarın iki tarafındaki) iyon konsantrasyonlarının korunmasını sağlamaktadır (MASKARINEC ET AL., 2002).

### 3.2.2. Raloksifen (Ral)

Seçici östrojen modölatörler (SERM) OA tedavisine yönelik teröpatik ajanlar olarak araştırılmaktadır. Raloksifen (Ral), yeni bir SERM ajanı olarak menapoza bağı osteoporozda tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Bu ajanın klinik kullanımı diğer faydalı etkilerini de ortaya çıkarmıştır. OA'li kadın hastalarda 12 ay boyunca klinik olarak Ral uygulanması sonucunda bu ajanın OA karşıtı etkisinin mümkün olduğu belirtilmiştir (DANILUK, 2005, BADURSKI, 2005). Ayrıca, yakın zamanda yapılmış bir araştırmada Ral'ın makrofaj ve düz kas hücre kültürlerinde MMP-9 aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (BELLOSTA, 2007). Bu 2. jenerasyon SERM ajanının artrite bağı kıkırdak yıkımının tedavisinde büyük potansiyele sahip olabileceği düşünölmektedir.

### 3.2.3. Sörfaktantlar

Klinik araştırmalarda travmaya bağı eklem yaralanmalarının sıklıkla erken ağrı ve OA gibi kronik hastalık seyri gösterdiği belirtilmektedir. Kronik hastalıklar mekanik travma sırasında eklem kıkırdakta oluşan hücre ölümleriyle başlatılabilir. Nekroz sonucu hücre ölümlünün temel özelliği şişme ve sonucunda hücre yırtılmasıdır. Bu da hücrelerin hasarlı hücre zarının iki tarafındaki iyon dengesinin hücre tarafından korunamaması nedeniyle oluşmaktadır. Bir kopolimer (polioksietilen ve polipropilen) olan Pluronik F-68'in (PLF68) mekanik tavyayla zarar görmüş olan kıkırdak hücrelerinde hasarlı zarın bütönlüğünü geri kazandırabileceği gösterilmiştir (PHILLIPS, 2004). Başka bir araştırmada şiddetli travma sonrasında hasarlı kıkırdağa PLF68'in uygulanmasıyla hücrelerin yalnızca % 7'sinde nekroz oluştuğu gösterilmiştir (RUNDELL, 2005). Bu iyonik olmayan sürfaktan ampifilik özelliği nedeniyle plazma membranının yapısına girerek yama görevi görmekte ve böylece hasarlı kısımlardan hücre içi malzemelerin dışarı çıkmasını engellemektedir. Böylece, PLF 68 hücre içeri ve dışarısındaki (zarın iki tarafındaki) iyon konsantrasyonlarının korunmasını sağlamaktadır (MASKARINEC ET AL., 2002).

## Gereç ve Yöntem

### Gereçler

Dulbecco Modified Eagle HamF12 (DMEM/HAM'S F-12) ve DMEM (yüksek ve düşük şekerli), vasatları tripsin (% 0.25), kollejenaz tip II, fetal sığır serumu (FCS), essansiyel amino acidler, streptomycin, sodyum purivat solusyonu, tripsin-EDTA and sığır serum albumini (pH 7.0) PAA Laboratorları GmbH (Avusturya) firmasından alınmıştır. L-askorbik asit (% 99), glisin, ve 1,9 dimetil metilene mavisi (DMMB) Aldrich (Almanya) firmasının ürünleridir. Agaroz tip VII, tripan mavisi (% 0.4), insan transforme büyüme faktörür- $\beta$ 1, L-prolin, bicinoninik asid solusyonu, bakır sülfat pentahidrat, etilenediaminetetraasetik asid disodyum tuz dihidrat (EDTA) (% 99) ve deksamethazon (% 97), insulin-transferrin-sodyum selenit (ITS) sıvı vasat katkısı, kondroitin sülfat (sığır gırtlak kökenli Tip A), papain, raloksifen, ve 5-azasitidin (Aza-C) and Pluronik F68 Sigma Kimyasal firmasından (ABD) alınmıştır. L-sistin, iki sulu sodium(II) hidrojen fosfat ve potasyum (II) hidrojen fosfat, safranin T (Sirius red) ve Alizarin red S boyları, kalsiyum karbonat Fluka Kimyasal GmbH (İsviçre) firmasından temin edilmiştir. Sodyum klorür Riedel-de Haën (Germany) firmasından satın alınmıştır. Dimetil sülfoksit (DMSO) AppliChem GmbH firmasının ürünüdür (Almanya). Metilthiazoyldifenil-tetrazolyum (MTT) bromür GERBU Biokimyasal GmbH firmasından satın alınmıştır (Almanya). % 96'lık alkol Ryssen (Fransa) firmasının bir ürünüdür. Hank's tuz solusyonu (10X) and setilpiridinyum klorür Biochrom KG (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Kemik morfojenik protein 9 Abnova şirketinden (Tayvan) satın alınmıştır.

### Yöntemler

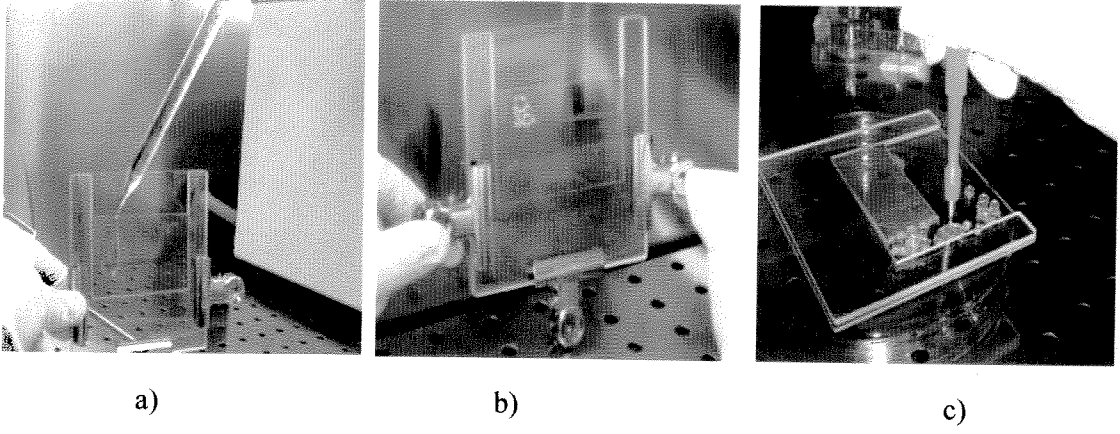
#### 1. Primer Kıkırdak Hücre Kültürü

Termine edilmiş 6-10 günlük sıçan yavrularının (n=10) eklem kıkırdaklarından kıkırdak hücreleri enzimatik yöntemle izole edilmiştir. Öncelikle femur ve diz eklem bölgelerindeki yumuşak dokular aseptik şartlar altında temizlenmiş ve kıkırdak dokusu parçalar halinde çıkartılmıştır. Kıkırdak parçaları % 70'lik alkolde 5 dakika inkübe edilerek % 0.1'lik tripsin/gr doku ile yarım saat çalkalamalı su banyosunda (37 °C' de) karıştırılmış ve daha sonra 10 saat 100 ünite/ml kollejenaz tip II ile inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda 100  $\mu$ m gözenek boyutlu naylon filtreden geçirilip 1400 devirde çevirilmiş ve kıkırdak hücreleri pellet olarak elde edilmiştir. Hücreler, % 10'luk fetal kalf serum (FCS), 10 ünite

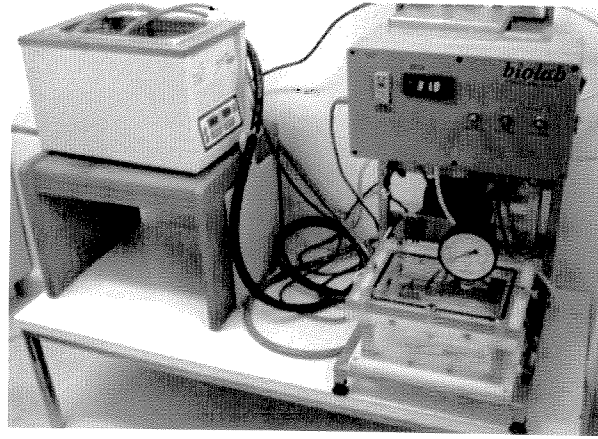
antibiyotik/ML, % 1 nonessansiyel amino asit ve 50 µg/ml askorbik asit içeren DMEM-Ham's F12 vasat içinde karbondioksit etüvünde kültive edilmiştir (SALVA, 2005). Büyüme vasatı üç günde bir yenilenmiştir. Kıkırdak hücreleri % 1 lik tripsin-EDTA ile 1:3 oranında pasajlanmıştır. Bütün deneylerde 4. pasaj kıkırdak hücreleri kullanılmıştır.

## 2. Üç Boyutlu İn Vitro Osteoartrit Modelinin Oluşturulması

Kıkırdak hücre süspansiyonu ( $4 \times 10^6$ /ml) % 4'lük düşük sıcaklık jelleşmeye sahip agaroz tip VII (Sigma) ile 1:1 oranında homojen olarak karıştırıldıktan sonra steril elektroforez camları arasında (3 mm cam aralayıcı kullanılarak) dökülmüş ve yarım saat laminer güvenlik kabininde jelleşmeye bırakılmıştır (Şekil 1 a ve b) (BUSCHMANN, 1995). Deri biyopsi kalemi ile 5 mm çapı ve 3 mm yüksekliğinde parçalar kesilerek kıkırdak hücreli agaroz diskler elde edilmiştir (Şekil 1c). Agaroz içine hapsedilen kıkırdak hücrelerine kıkırdağın doğal ortamını taklit etmek üzere bu amaca yönelik özel yaptırılmış olan bir sistemle 10 gün boyunca günlük yarım saat hidrostatik basınç (0.2 MPa, 0.1 Hz frekansı, 32 °C'de) uygulanmıştır (Şekil 2). Bu aşamada hücreler % 5 FCS, % 1 non essansiyel amino asit, 80 µg/ml askorbik asit, prolin, 10 ng/ml TGFβ1, deksametazon, sodyum purivat, % 1 insülin-transferrin-selenium kompleksi içeren DMEM-Ham's F12 vasatı içine kültive edilerek çoğaltılmış ve yeniden farklılaşmaya bırakılmıştır. Bu süreç sırasında disklerin besiyeri 3 gün aralıklarla değiştirilmiş ve diskler paslanmaz çelik ağ üzerinde yerleştirilerek jelin içine daha etkin besin difüzyonu sağlanmıştır. İnkübasyonun 11. gününde, vasata 48 saat süreyle azositidin (Aza-C) eklenmiş ve inkübasyon sonunda Azo C içeren vasat uzaklaştırılarak in vitro OA modeli oluşturulmuştur (HO, 2006). İn vitro OA modeli oluşturulma aşamasında agaroz-kondrosit disklere hidrostatik basınç uygulanmıştır.



**Şekil 1.** Üç boyutlu agaroz-kondrosit disklerin hazırlanma aşamaları, a) hücre ve çözülmüş agaroz karışımının 3 mm kalınlığında elektroforez camları arasındaki boşluğa dökülmesi, b) jelin soğuması için steril koşullarda bekletilmesi, c) steril deri biyopsi kalemi ile jelden disklerin kesilmesi.



**Şekil 2.** Agaroz-kondrosit disklere in vitro basınç uygulamak üzere özel hazırlanmış basınç odası.

### **3. Raloksifen (Ral), Sürfaktan (PLF-68) ve Kemik Morfojenik Protein 9'un (KMP 9) Osteoartrit Tedavi Etkinliklerinin İncelenmesi**

#### **3.1. Ral, PLF68 ve KMP9'un En Etkin Dozlarının Belirlenmesi**

Raloksifen, Pluronik F-68 ve KMP9 'un farklı dozlarının agaroz içinde oluşturulan hasarlı kıkırdaksı doku üzerinde tedaviye yönelik etkileri incelenmiştir. Aza-C'nin 48 saat

sonunda ortamdan uzaklaştırılmasından sonra Tablo 1’de verilen dozlar kıkırdaksı yapılara verilmiştir. 3 günde bir yapılan vasat değişikliklerinde ajanlar yeniden eklenmiş ve hücreler 10 gün Tablo 1’de belirtilen dozlar varlığında kültive edilmiştir. Pozitif grup olarak Aza-C uygulanmamış kıkırdak hücreli agaroz diskler ve negatif grup olarak Aza-C uygulanmış ama tedavi ajanı uygulanmamış kıkırdak hücreli agaroz diskler kullanılmıştır. Tüm deneyler agaroz disklerin günlük yarım saat hidrostatik basınç uygulanarak yapılmıştır. Kullanılan tüm dozlar agaroz-kondrosit disklerin sağlıklı ve kontrol gruplarının ıslak ağırlık, boyutları ve mekanik özellikleri, hücrelerin matris salgılamaları (sGAG ve kollajen), hücre sayıları ile karşılaştırılmış ve en etkin doz belirlenmiştir.

**Tablo 1.** Tedavi potansiyelini incelemek üzere kullanılan dozlar

Teröpatik Ajan	Doz		
Raloksifen ( $\mu\text{M}$ )	1	5	10
KMP 9 (ng/ml)	5	10	50
Pluronic F-68 (mg/ml)	8		12

### 3.1.1. Uygulanan Tedavi Yöntemlerinin Agaroz-Kondrosit Disklerdeki Su Tutma Özelliğine Etkilerinin İncelenmesi

Toplam 27 günlük in vitro inkübasyon sonrasında agaroz-kondrosit disklerin sulu ağırlıkları ölçülmüştür. Daha sonra diskler sıvı azot içerisinde hızla dondurulmuş ve 6 saat boyunca liyofilize edilmiştir (ODTÜ Merkez Laboratuvarı). Kurutulmuş disklerin ağırlıkları tekrar ölçülmüş ve diğer analizler (GAG ve kollajen) yapılmaya kadar saklanmıştır.

### 3.1.2. Uygulanan Tedavi Yöntemlerinin Agaroz-Kondrosit Disklerdeki Hücre Sayısına Etkilerinin İncelenmesi

Agaroz-Kondrosit disklerdeki hücre sayıları MTT testi ile analiz edilmiştir. Bu yöntemle hücre sayılarını hesaplamak için öncelikle belirli miktarlarda kondrosit içeren diskler kullanılarak kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. İn vitro uygulamalar sonrasında hücre



sayılarının ölçülmesi için disklerin olduğu kuyucuklara DMEM düşük glukoz vasat içerisinde MTT (5mg/ml) eklenmiştir. Diskler 4 saat, 37 °C' de ve % 5 karbondioksit ortamında karanlıkta bekletilmiştir. MTT ortamdan uzaklaştırılıp kuyucuklar fosfat tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Son olarak, DMSO eklenerek 10 dakika orbital çalkalayıcı üzerinde bekletilerek hücre içerisindeki formazan kristallerinin çözülmesi sağlanmıştır. Kuyucukların 550 nm dalga boyundaki ışık tutulum değerleri mikropılaka okuyucu spektrofotometre (BioTek, USA) ile ölçülmüştür .

### **3.1.3. Uygulanan Tedavi Yöntemlerinin Hücrelerin Glikozaminoglikan Sentezine Etkilerinin İncelenmesi**

Agaroz-Kondrosit Disklerdeki ve disklerin 10 günlük tedavi süresince bulunduğu vasata salgılanan sülfatlı glikozaminoglikan (sGAG) miktarları Dimetilmetilen mavisi (DMMB) testi (Glisin/NaCl içerisinde 16 µg DMMB/ml, pH 3, çözeltisi) ile belirlenmiştir (Farndalle ve ark., 1986). Kalibrasyon eğrisi farklı miktarlarda kondroitin sülfatın (0-5 µg) 10 mM EDTA içeren fosfat tampon çözeltisi (pH 6.5) içerisinde çözülerek spektrofotometrik ölçülmesi ile hazırlanmıştır. Toplam sGAG miktarlarının tayini için toplanan vasat ve diskler papain (Tip III, 125 µg/ml, 2mM dithiothreitol içeren) ile 60 °C' de 20 saat parçalanmıştır. Agaroz jelleri tamamen eritmek için diskler 70 °C' de 10 dakika daha bekletildikten sonra karıştırıcı ile karıştırılmış ve 12000 devirde, 10 °C' de, 5 dakika çevirilerek santrifuj edilmiştir. Supernatantın 50 µl'si 1.25 ml DMMB boya çözeltisi ile 24 kuyucuklu plaka içerisinde karıştırılmış ve 525 nm dalga boyundaki ışık tutulum değerleri ölçülmüştür. Ölçüm sonuçları kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem kullanılarak diskler ve vasatlar için ayrı ayrı sGAG miktarlarına dönüştürülmüştür.

### **3.1.4. Uygulanan Tedavi Yöntemlerinin Hücrelerin Kolajen Proteini İçeriğine Etkilerinin İncelenmesi**

Hücrelerin kolajen sentezlerindeki değişimleri gözlemlemek üzere Sirius kırmızısı ile protein bağlanma testi yapılmıştır. Bu testte özetle, papainle parçalanmış disklerden 200 µl örnekler alınarak 37 °C' de 48 saat kurutulmuştur. Daha sonra 1 saat oda sıcaklığında boya eklenerek orbital çalkalayıcı üzerinde bekletilmiştir. Boya alındıktan sonra örnekler 0.1 N NaOH ile 30 dakika bekletilerek ayrıştırılmış ve 550 nm dalga boyunda ışık tutma yüzdeleri ölçülmüştür. Ticari kolajenin (Sığır trake kıkırdağı kaynaklı) standart olarak kullanılması ile

elde edilen kalibrasyon eğrisi kolajen ve kolajen/sulu ağırlık hesaplamalarında kullanılmıştır (NA, 2006).

### **3.1.5. Uygulanan Tedavi Yöntemlerinin Agaroz-Kondrosit Disklerdeki Etkilerinin Histolojik İncelenmesi**

Histolojik incelemeler için agaroz diskler sıvı azotla dondurulmuş ve kryostat ile 10 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Superfrost tip mikroskop camı üzerine yerleştirilen kesitler % 100 alkolle sabitlenmiş ve GAG dağılımının gözlenmesi için Safranin O ile boyanmıştır. Kollajen dağılımının belirlenmesi için ise kesitler % 4 formaldehit çözeltisi içerisinde 10 dakika bekletilerek sabitlenmiş ve Sirius kırmızısı ile boyanmıştır. Kesitlerin histolojik değerlendirilmesi için mikroskoba bağlı fotoğraf makinası ile görüntüler alınmıştır.

### **3.1.6. Uygulanan Tedavi Yöntemlerinin Agaroz-Kondrosit Disklerin Mekanik Özelliklerine Etkilerinin İncelenmesi**

Disklerin mekanik özellikleri 10 N'luk yük hücresi kullanılarak Nexygen Yazılım programı içeren bilgisayara bağlı Lloyd LS500 Malzeme Test Cihazı (Lloyd, İngiltere) ile yapılmıştır. Testlerden önce disklerin serbest yükseklikleri ve çapları dijital kumpas ile ölçülmüştür. Disklerin kurumasını önlemek için mekanik testler fosfat tampon çözeltisi içerisinde yapılmıştır. Disklere basma hızı 3 mm/ml olacak şekilde, başlangıç kalınlığının % 10'una kadar basılmaya tanımlı sınırsız gerilme gevşeme (stress-relaxation) testi uygulanmıştır. Test, diskler denge kuvvetine gelinceye kadar yaklaşık 600 saniye sürdürülmüştür. Dengedeki sıkışma elastik (Young's) modülü, (denge agregat modülü) denge gerilim değerinin uzama miktarına bölünmesi ile hesaplanmıştır.

### **3.2. Ral, PLF68 ve KMP9'un Değişik Kombinasyonlarının Osteoartirik Hücreler Üzerinde Etkilerinin İncelenmesi**

Yukarıda ikinci bölümde belirtildiği gibi azasitidin ile in vitro OA modeli oluşturulmuştur. Tüm ajanların belirlenen en etkin dozları kullanılarak (Ral: 5 µM, PLF68: 12 mg/ml, KMP9: 5 ng/ml). Hidrostatik basınç altında Tablo 2'de verilen farklı kombinasyonlar 10 gün süreyle agaroz-kondrosit disklere uygulanmıştır. 10 günlük ilaç uygulaması sonunda agaroz disklerin ıslak ağırlıkları, boyutları, ve mekanik özellikleri ile hücrelerin sGAG ve

kollajen sentezleme miktarları yukarıda belirtilen yöntemlerle incelenmiştir (Bölümler 3.1.1-3.1.6).

**Tablo 2.** Ral, PLF68 ve KMP9 kombinasyon grupları

RAL-PLF68
RAL-KMP9
PLF68-KMP9
RAL- KMP9-PLF68

Ayrıca hastalığın ilerleyip eklem immobilizasyonu olduğu durumda üçlü kombinasyon grubunun etkisinin incelenmesi için 10 günlük tedavi sürecinde agaroz-kondrosit diskler statik kuvvet altında tutulmuştur (Şekil 3). Şekil 3’de görüldüğü gibi agaroz diskler 6 kuyucuklu hücre kablolarında paslanmaz çelik ağı üzerine konulmuş ve daha sonra üstlerine teflon ağırlıklar ( $3.61 \pm 0.098$  g) konulmuştur. Kullanılan teflon ağırlıklar agaroz disklerde % 10’luk deformasyondan daha fazla olmayacak ağırlık (etkin doz belirleme aşamasında yapılan basılmaya tanımlı sınırsız gerilme gevşeme (stress-relaxation) testinde elde edilen grafiklerden belirlenmiştir). Kontrol grup olarak sağlıklı ve aza-C eklenmiş ve 10 gün statik kuvvetler altında bekletilmiş agaroz diskler kullanılmıştır. 10 günlük tedavi sonucunda agaroz diskler agaroz disklerin ıslak ağırlıkları, boyutları, ve mekanik özellikleri, hücrelerin sGAG ve kollajen sentezleme miktarları yukarıda belirtilen yöntemlerle incelenmiştir (Bölümler 3.1.1-3.1.6).



**Şekil 3.** Agaroz-kondrosit disklere statik basınç uygulanması için kullanılan düzenek

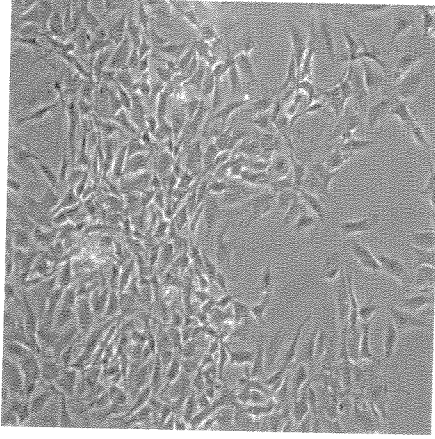
### 3.3. İstatistiksel Analizler

Tedavi sonrası gruplar arası ve kontrollerle olan farklılıklar bağımsız değişkenler (GAG miktarı, disklerin ağırlık ve boyut değişimleri, kollajen miktarları, hücre sayıları, denge agregat modulleri, maksimum stres v.b) arasında tek yönlü ANOVA testi ile ve test sonrası Tukey-ikili karşılaştırma testi ile SPSS programı ile  $p \leq 0.05$  anlamlılık düzeyinde değerlendirilmiştir. Bazı özel durumlarda  $p \leq 0.1$  düzeyindeki istatistiksel sonuçlarda anlamlı olarak belirtilmiştir.

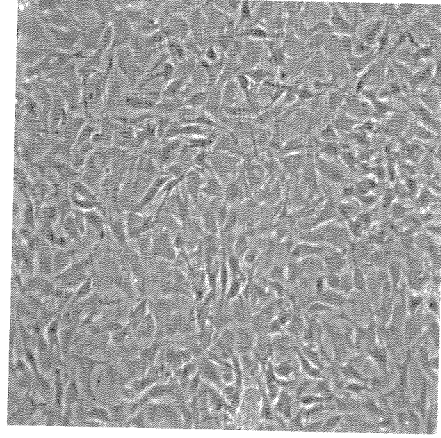
## Bulgular ve Sonuç

### 1. Primer Eklem Kıkırdak Hücre Kültürü

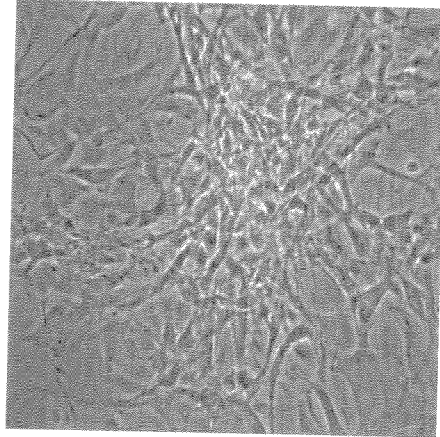
Eklem kıkırdak hücreleri ratlardan enzimatik yöntemle izole edilmiş ve tüm hücre kültür deneylerinde 4. pasaja kadar hücreler kullanılmıştır (Şekil 4).



a)



b)



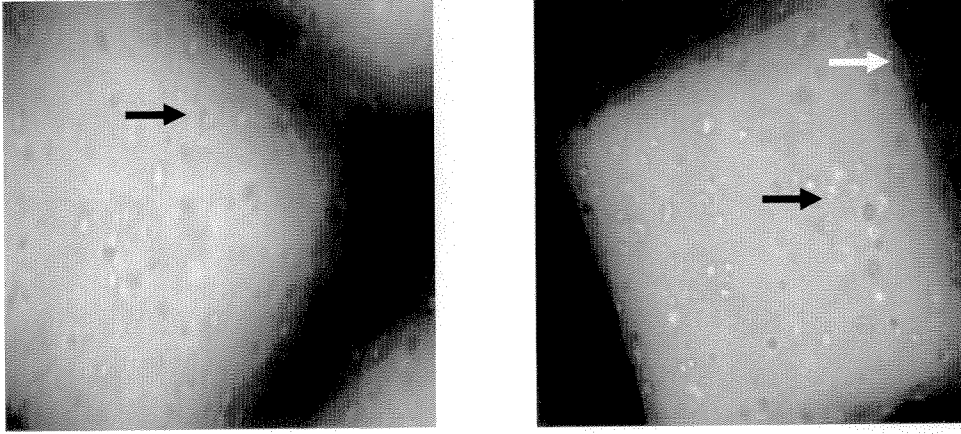
c)

**Şekil 4.** Sıçan yavrularından izole edilen a) primer, b) 1. pasaj, c) 4. pasajdaki eklem kıkırdak hücrelerinin faz kontrast mikrografileri, 20X büyütme.

Primer sıçan eklem kıkırdak hücreleri poligonal hücre morfolojisine sahiptir (Şekil 4a). Hücrelerin pasaj sayısı arttıkça hücre morfolojisi fibroblastik olmuş ve hücrelerin boyutları büyümüştür (Şekil 4 b ve c). Pasajlama ile farklılaşmış özelliklerinden uzaklaşan (dedifferentiation) kıkırdak hücrelerinin üç boyutlu agaroz disklerin içine hapsedilerek ve farklılaşma faktörleri eklenerek (TGFβ1, deksametazon, insulin-transferin-selenit, askorbik asit ve sodyum pürivat) tekrar geri farklılaşmaları sağlanmıştır. Bu süreçte hücelere uygulanan günlük mekanik stimülasyonunda sonuçta olumlu etkisi olduğu düşünülmektedir.

## **2. Kondrosit-Agaroz Disklerinin Hazırlanması ve İn Vitro Osteoartrit Modeli Oluşturulması**

Kondrosit-Agaroz disklerinin hazırlanması, hem çok sayıda agaroz diske ihtiyaç olmasından hem de mekanik testlerde disklerin bazılarında oluşan bombeli üst yüzeylerin hata payını yükselteceği öngörüsünden dolayı diskler önceki ara raporunda belirtilen yöntemden farklı bir yöntemle hazırlanmıştır. Yeni yöntemde agaroz-hücre karışımı elektroforez camlar arasına dökülmüş (her iki yüzeyin düzgünlüğü sağlanmış) ve jelleşmeden sonra deri biyopsi kalemiyle kesilerek diskler elde edilmiştir (Şekil 1b). Kıkırdak hücreleri agaroz diskleri içinde homojen olarak dağılmıştır. Üç boyutlu taşıyıcı içinde buldukları için kıkırdak hücreleri yuvarlak morfolojiye sahiptir (Şekil 5 a). Hücrelerin vücut dışında büyütülmesinde farklılaşmış özelliklerinde uzaklaşmamalarının sağlanmasında mikroçevresel faktörlerinin (hücre dışı matriksi, taşıyıcının formatı, büyüme faktörleri, vitaminler gibi biyokimyasal çevre, vb) önemi büyüktür. Kıkırdak hücreleri % 2'lik agaroz içinde genelde homojen bir şekilde dağıldığı ve bazı bölgelerde hücre grupları olarak gözlenmiştir (Şekil 5). Kıkırdak hücrelerinin agaroz diski içinde yoğunluğunun 12 günlük inkübasyon sürecinde arttığı gözlenmiştir (Şekil 5b).



**Şekil 5.** Agaroz-kondrosit hücrelerinin a) Sıfıncı günde, b) 12 günlük in vitro kültürasyon sonunda faz kontrast (20X büyütme). Siyah ok kondrosit hücre gruplarını, beyaz ok agaroz-kondrosit disklerinin altına yerleştirilen ağ taşıyıcısını (mesh) göstermektedir.

İn vitro osteoartrit (OA) modelinin oluşturulması için AzaC uygulanmasından önce hücreler 10 gün boyunca biyokimyasal faktörler ve mekanik kuvvetler ile farklılaştırılarak kıkırdaksı doku oluşturulmaya başlanmıştır. 10 günlük kültürasyon sonunda kondrosit-agaroz diskler 48 saat AzaC uygulanmıştır. AzaC ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra Tablo 1’de verilen dozlarda kemik morfojenik protein 9 (KMP9), raloksifen (Ral) ve pluronik F-68 (PLF-68) hücre vasatlarına eklenmiştir.

### **3. Farklı Doz KMP9, Ral ve PLF68’in Osteoartrit Tedavisinde Etkinliklerinin İncelenmesi**

#### **3.1. Agaroz-Kondrosit Disklerin Fiziksel Özellikleri**

Agaroz-kondrosit diskleri sıfıncı günde 5 mm çapında ve 3 mm yüksekliğindedir. 27 günlük kültürasyon sonunda disklerin boyutlarında gruplararası istatistiksel bir farklılık ( $P < 0.05$ ) bulunmamıştır (Tablo 2).

Agaroz-kondrosit disklerinin ıslak ağırlıkları karşılaştırıldığında gruparası belirgin farklılıklar gözlenmiştir (Şekil 6). 27 gün sonunda negatif kontrol grubunun ıslak ağırlığı sağlıklı kontrol grubundan istatistiksel olarak yüksek olduğu ( $0.0516 \pm 0.0041$  versus  $0.0447 \pm 0.0026$ ,  $p < 0.05$ ) görülmüştür. Elde edilen sonuç literatürde yapılmış çalışmalar ile uyumludur. Yapılan çalışmalar OA kıkırdağında artan metaloproteaz miktar ve aktivitesine ile doğru

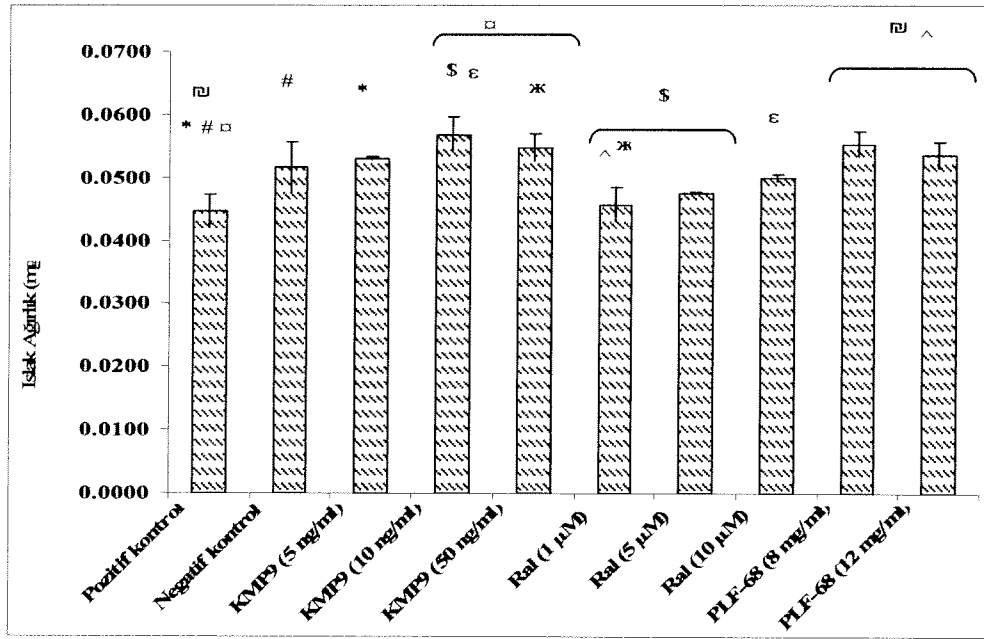
orantılı olarak parçalanmış ve denatüre kollajen miktarının arttığını göstermiştir (BLANK, 1997, GEBHARD, 2003). Kollajen ağının yıkılmasının dokunun şişmesine (su miktarında % 9'luk artış) ve proteoglikanlarında azalmasına neden olduğu düşünülmektedir (MANKIN ve THRASHER, 1975, BONASSAR, 1995, ACKERMANN ve STEINMEYER, 2005). Aza-C uygulanan agaroz-kondrosit disklerin ıslak ağırlıklarında sağlıklı kontrol grubuna göre gözlenen artış Aza-C ile osteoartiritik değişimler olarak yorumlanmıştır. Şekil 6'da görüldüğü gibi sağlıklı kontrol grubu ve Ral uygulanmış gruplarının ıslak ağırlıklarında istatistiksel bir farklılık gözlenmemiştir. Ral uygulanmış gruplarda görülen pozitif sonuç ilacın Bellosta ve grubunun (2007) makrofaj ve düz kas hücrelerinde gösterdikleri metaloproteaz enzimine gösterdiği inhibasyon ile paralellikte olabileceği düşünülmektedir. Ral grubunda gözlenen pozitif etki KMP9 veya PLF68 gruplarında gözlenmemiştir.

Kondrosit hücreleri agaroz diskleri 27 gün kültürasyon sonunda daha opak olduğu ve agaroz disklerinin çoğunlukla dış çeperlerinde beyaz depozisyonlar gözlenmiştir. Gözlenen beyaz depozisyonlar hücrelerin disk içerisine salgıladıkları hücre dışı matriks olarak yorumlanmıştır (Şekil 7).

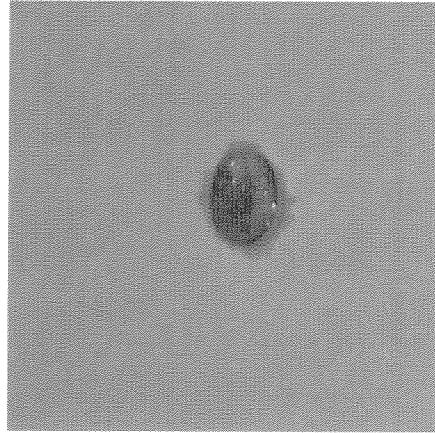
**Tablo 3.** Farklı Ral, KMP9 ve PLF68 uygulamaları sonunda kondrosit-agaroz disklerin boyutları

Gruplar	Yükseklik (mm)	Çap(mm)
Sağlıklı kontrol grup	2.78 ± 0.10	4.86 ± 0.04
Negatif kontrol grup	3.04 ± 0.20	4.55 ± 0.58
KMP9 (5 ng/ml)	3.04 ± 0.21	4.83 ± 0.12
KMP9 (10 ng/ml)	2.85 ± 0.02	4.78 ± 0.07
KMP9 (50 ng/ml)	2.88 ± 0.06	4.83 ± 0.03
Ral-1 µM	2.90 ± 0.06	4.60 ± 0.64
Ral-5 µM	3.02 ± 0.24	4.83 ± 0.17
Ral-10 µM	2.90 ± 0.16	4.64 ± 0.38
PLF-68 (8 mg/ml)	2.91 ± 0.10	4.99 ± 0.12
PLF-68 (12 mg/ml)	2.77 ± 0.03	5.07 ± 0.06





**Şekil 6.** Farklı doz Ral, KMP9 ve PLF68 uygulanmış kondrosit-agaroz disklerin ıslak ağırlıklarının 27 gün sonunda kontrol gruplarıyla karşılaştırılması. (Gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar: #, α, ρ, ^, ж:  $p \leq 0.05$ , \*:  $p \leq 0.01$ , ε:  $p \leq 0.1$ )

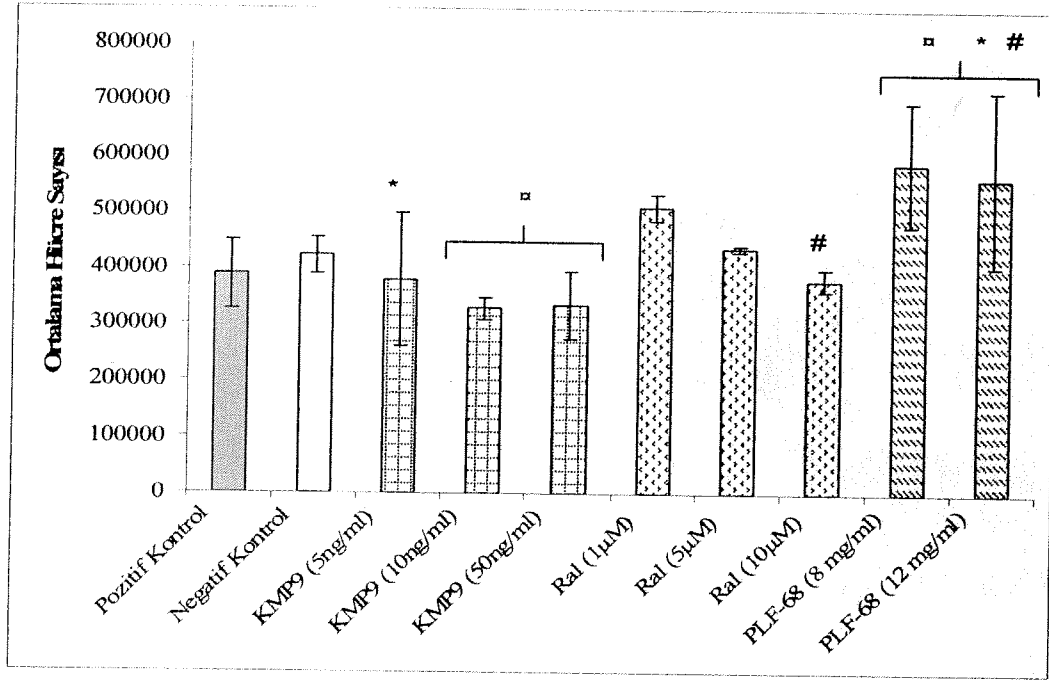


**Şekil 7.** 27 günlük in vitro kültür sonunda kondrosit-agaroz disk görüntüsü. Disk çeperinde gözlenen depozisyonlar şeffaf görünümündedir.

### 3.2. Agaroz İçinde Gömülü Canlı Kıkırdak Hücre Sayıları

Agaroz disk hazırlama aşamasında  $4 \times 10^6$  hücre 1:1 oranında % 4'lük agaroz ile karıştırılmıştır. Sıfırıncı günde disk başına 200 000 hücre olarak bulunmuştur. 27 gün inkübasyon sonunda bütün gruplarda kondrosit hücrelerinin çoğaldığı gözlenmiştir (Şekil 8).

Sağlıklı ve negatif kontrol gruplar arasında hücre sayısı ( $386\,990 \pm 62\,109$  ve  $421\,240 \pm 33\,757$ ) için istatistiksel olarak farklılık bulunmamıştır (Şekil 8). PLF68 uygulanmış agaroz disklerinin hücre sayısı ( $587\,490 \pm 109\,601$ , 8 mg/ml and  $561\,657 \pm 157\,824$ , 12 mg/ml) negatif kontrol gruba göre sayısal olarak yüksektir ( $421\,240 \pm 33\,757$ ). Bu gruplardaki hücre sayısında gözlenen artışın sürfaktan özelliğindeki PLF68 moleküllerin fosfolipid yapısına benzerliklerine bağlı olarak hasar gören kondrositlerin hücre zarlarına girerek yama oluşturması ve böylece hasarlı hücrenin patlamasını engellemesiyle olduğu düşünülmektedir. Gözlenen bu pozitif etki literatürde travma modellerinde gösterilmiş, ancak kimyasal ajana bağlı dejenerasyonundaki etkisi de kıkırdak hücrelerinden farklı hücreler üzerinde çalışılmıştır (LEE 1999, HELLUNG-RANSEL, 2000, MARKS, 2001, PHILLIPS, 2004, RUNDELL, 2005). Ayrıca, PLF68 uygulanmış disklerde hücre sayısı KMP9 (10 ve 50 ng/ml) uygulanmış disklerden istatistiksel anlamlı olarak yüksek görülmüştür ( $p < 0.05$ ).

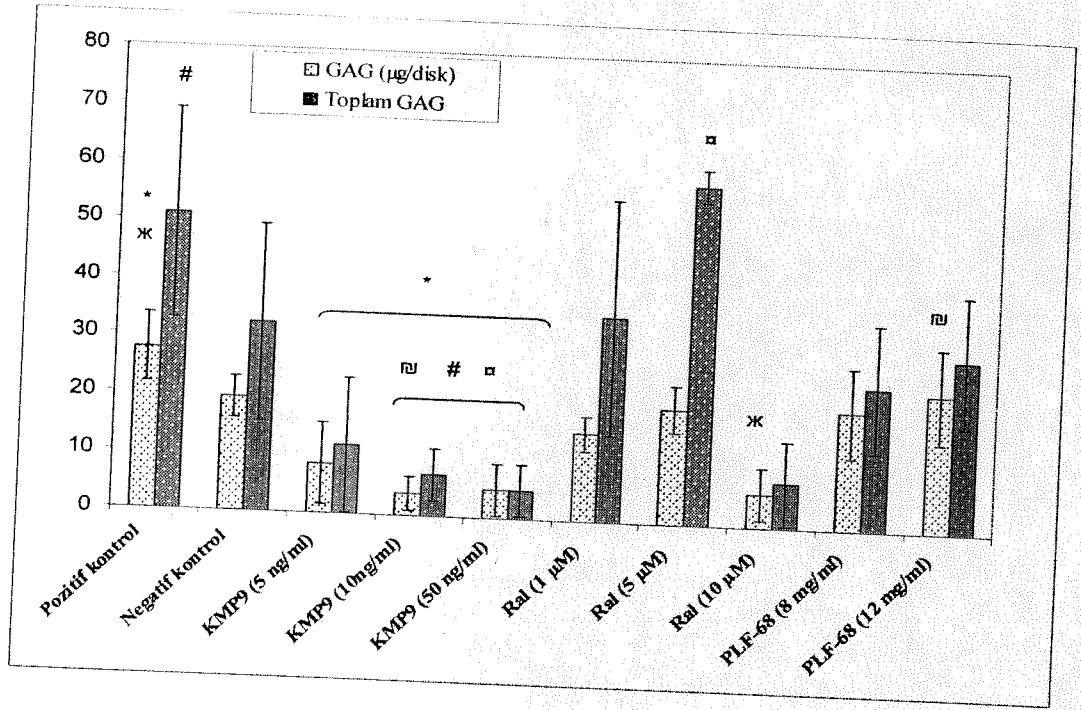


**Şekil 8.** RAL, KMP9, and RLF 68 uygulanmış ve kontrol grupların 27 gün sonunda canlı kondrosit hücre sayıları (Gruplararası istatistiksel farklılık düzeyleri: \*:  $p \leq 0.1$ , □:  $p \leq 0.05$ ).

### 3.3. Ral, KMP9 ve PLF68 Uygulamasının Kondrositler Tarafından Salgılanan Glikosaminoglikan (GAG) Miktarına Etkisinin İncelenmesi

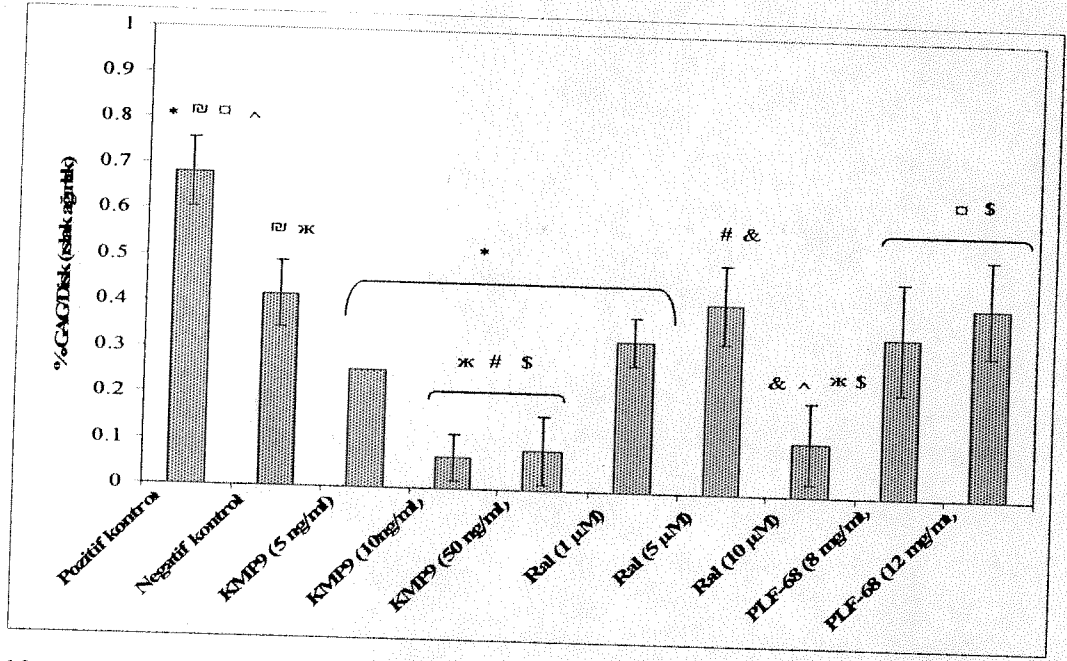
GAG miktarları kolorimetrik bir yöntem olan DMMB yöntemiyle incelenmiştir. Hücrelerin salgıladıkları toplam GAG miktarı hücre vasatına salgılanan ve agaroz disk içinde toplanan GAG miktarlarının toplamı alınarak hesaplanmıştır (Şekil 9). Ral (5 µM) uygulanmış grup tarafından sentezlenen toplam GAG miktarı bütün gruplar arasında en yüksek olarak bulunmuştur. İkinci yüksek toplam GAG miktarı sağlıklı kontrol grubundadır. Ayrıca, bu iki grubun sentezledikleri GAG'ın büyük bir kısmını vasat içine saldıkları gözlenmiştir. Sentezlenen hücre dışı matriks komponentlerin zamana bağlı olarak vasata salgılanması literatür ile uyumludur (MAUCK, 2006). Disk başına GAG miktarları karşılaştırıldığında gruplararası aynı eğilim olduğu görülmüştür (Şekil 9). Sadece, toplam GAG miktarın aksine, disk başına GAG miktarının en yüksek sağlıklı kontrol grubunda olduğu bulunmuştur. Bu aşamada sonuçlar raloksifenin OA tedavi etkinliği olabileceğini düşündürmektedir.

Literatürde sağlıklı kondrosit hücrelerinin GAG sentezi üzerinde olumlu etkileri gösterilmiştir (BLUNK, 2003, HILLS, 2005). Blunk ve arkadaşları KMP9'un KMP2, 12, 13'ün aksine düşük dozlarda (1, 10 and 100 ng/ml) kondrositlerin sentezledikleri GAG miktarını arttırdığı göstermiştir. Bu çalışmada, KMP9 osteoartritlik kondrosit hücrelerinin GAG sentezinde negatif etkisi olduğu görülmüştür. GAG miktarı gözönüne alındığında KMP9'un OA'ya yönelik tedavi etkinliği olmadığı düşünülmektedir.



**Şekil 9.** 27 günlük inkübasyon sonunda Ral, KMP9, and PLF 68 uygulanmış osteoartritlik hücrelerin ve sağlıklı ve negatif kontrol gruplarda agaroz disklerine depolanan ve sentezlenen toplam GAG miktarlarının karşılaştırılması. (Gruplararası istatistiksel farklılık düzeyleri: \*, #, ж, □, ▢:  $p \leq 0.05$ )

Sentezlenen GAG miktarları literatürdeki birçok çalışmayla karşılaştırılabilir olması için disklerin ıslak ağırlıkları ile normalize edilmiştir (Şekil 10). Bu normalizasyon ile disk boyutlarından kaynaklanacak deneysel hata payı da azaltılmaktadır. Sağlıklı kontrol grubunun GAG/ıslak ağırlık sonuçlarının istatistiksel olarak negatif kontrol grubundan düşük olduğu görülmüştür. Bu da AzaC ile agaroz içine gömülmüş kondrositlerde osteoartritlik değişimler olduğu sonucunu desteklemektedir. Islak ağırlığına göre GAG yüzdeleri karşılaştırıldığında öne çıkan en önemli sonuç Ral (5µM) uygulanan kondrosit hücrelerinin GAG oranlarının sağlıklı kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı olmadığıdır. Bu sonuç, Ral (5 µM) uygulamasının kırıkta hasarlarını geri çevirme etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Raloksifen grubunun doz -iyileşme ilişkisi bir çan eğrisine sahiptir. Raloksifen dozu 5µM'den 10 µM çıkartıldığında GAG yüzdesinin azaldığını ve negatif etkisi olduğu görülmüştür. PLF 68 uygulanmış grup ve negatif grup arasında ise GAG oranlarında farklılık olmamıştır. Ayrıca, GAG oranları sağlıklı kontrol grup seviyelerine çıkmadığı için PLF 68'in osteoartritlik kırıkta hücrelerinin GAG sentezinde olumlu bir etkisi olmadığı sonucunu düşündürmüştür.

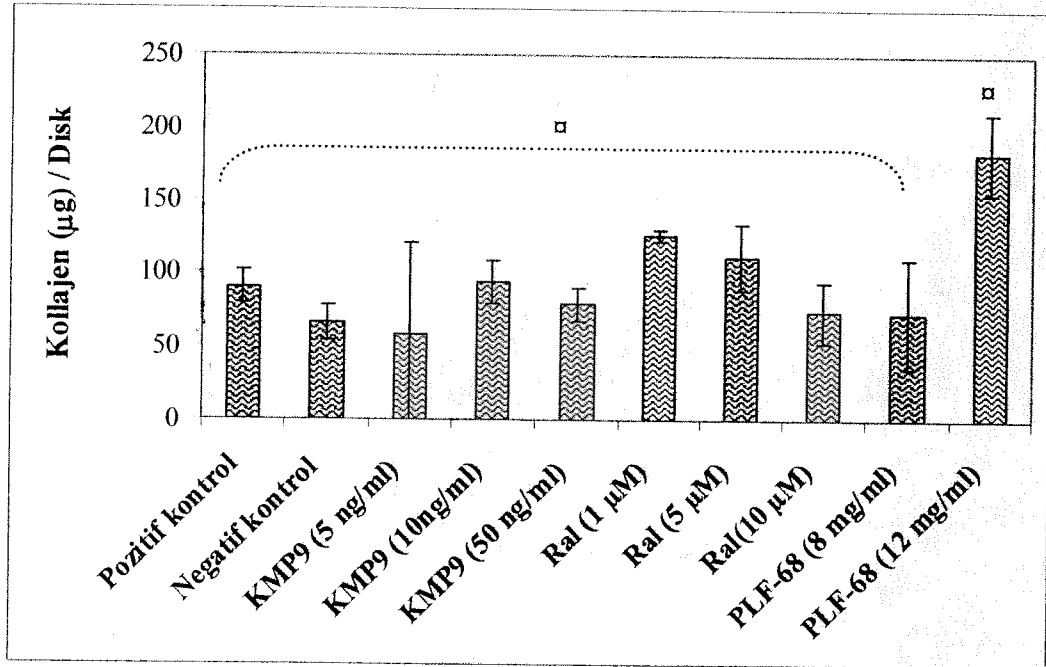


**Şekil 10.** 27 günlük inkübasyon sonunda Ral, KMP9, and PLF 68 uygulanmış osteoartritlik hücrelerin ve sağlıklı ve negatif kontrol gruplarda agaroz disklerine depolanan ve sentezlenen toplam GAG miktarlarının disk başına normalize edilerek karşılaştırılması. (Gruplararası istatistiksel farklılık düzeyleri: &, &:  $p \leq 0.1$  and ^, \*, #, \$:  $p \leq 0.05$ ).

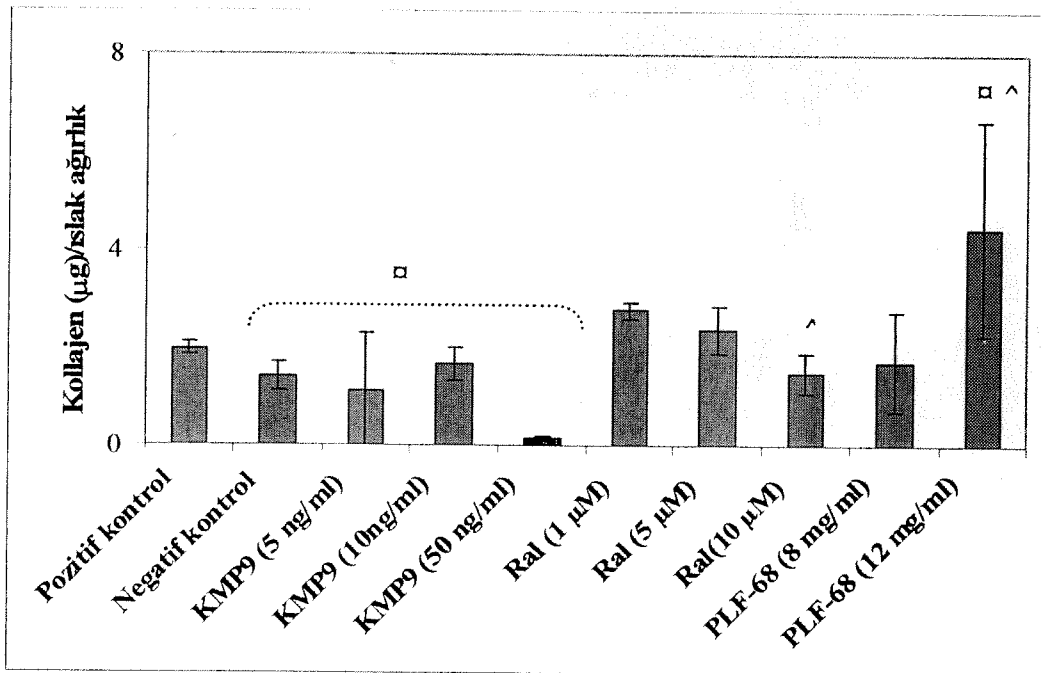
### 3.4. Ral, KMP9 ve PLF68 Uygulamasının Kondrositler Tarafından Sentezlenen Kollajen Miktarına Etkisinin İncelenmesi

Kollajen kondrosit hücreleri tarafından sentezlenen kıkırdak dokusunun mekanik özelliklerini ekileyen hücre dışı matriksin önemli bileşenlerinden birisidir. Literatürde osteoartritlik kıkırdak hücrelerinin kollajen sentezinin normal şartlara göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Proje deneylerinde Şekil 11’de görüldüğü gibi sağlık kontrol grubunun disk başına kollajen miktarı sayısal olarak negatif kontrol grubundan yüksektir ( $90.26 \pm 11.16$  ve  $65.91 \pm 11.94$ ). Ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Stöve ve arkadaşları KMP9’un sağlıklı kıkırdak hücrelerinin kollajen sentezini azalttığını göstermiştir. Bu grubun sonuçlarının aksine bu çalışmada 10 ng/ml KMP9 ile osteoartritlik hücrelerin kollajen sentezinin arttırdığı görülmüştür. Osteoartrit hücrelerine 12 mg/ml PLF68 uygulandığında hücre sayıları ile uyumlu disk başına kollajen miktarının sağlıklı kontrol grubundan istatistiksel olarak yüksek olduğu bulunmuştur. Disk başına kollajen miktarı ıslak disk ağırlığı ile normalize edildiğinde sağlıklı kontrol grubunda yüksektir (%  $0.443 \pm 0.219$ ’e karşılık %  $0.197 \pm 0.013$ ) (Şekil 12). Ancak artmış olan ıslak disk ağırlığında kollajen oranı

istatistiksel farklılık olarak gözlenmemiştir. Uygulanan Ral dozu arttıkça ıslak disk ağırlığında kollajen oranının azaldığı gözlenmiştir.



Şekil 11. 27 günlük inkübasyon sonunda Ral, KMP9, and PLF 68 uygulanmış osteoartrititik hücrelerin ve sağlıklı ve negatif kontrol gruplarının kollajen miktarlarının karşılaştırılması. (Gruplararası istatistiksel farklılık düzeyleri: □:  $p \leq 0.05$ ).

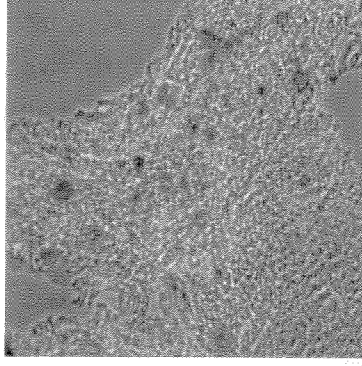


Şekil 12. 27 günlük inkübasyon sonunda Ral, KMP9, and PLF 68 uygulanmış osteoartrititik hücrelerin ve sağlıklı ve negatif kontrol grup disklerin ıslak ağırlığında kollajen oranlarının karşılaştırılması. (Gruplararası istatistiksel farklılık düzeyleri: □:  $p \leq 0.05$ ).

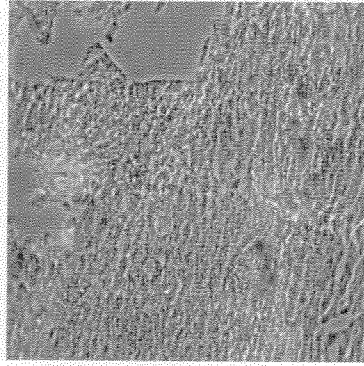
### 3.5. Histolojik İncelemeler

Agaroz-kondrosit disklerinden donmuş olarak alınan 10 µm'lik kesitlerde GAG ve kollajen boyamaları yapılmıştır. Tüm grupların kesitlerinde kondrosit hücrelerin yuvarlak morfolojiye sahip olduğu görülmüştür. Kesitlerde safranin O ile yapılan boyamalarda kırmızı olan bölgeler GAG varlığını göstermektedir (Şekil 13). Tüm gruplarda hücre çeperinde GAG varlığı gösterilmiştir. Agaroz içine belirgin GAG salgılanması sağlıklı kontrol grubu, 5 µM Ral ve 5 ng/ml KMP9 grupları için görülmüştür (Şekil 13a, d ve f). Matriks GAG boyamalarının hücre gruplarının yoğun olduğu bölgelerde olduğu gözlenmiştir. Hiç törapatik ajan uygulaması yapılmamış negatif kontrol grubunda sadece hücre çeperi ve belirgin olmayan matriks boyaması bulunmuştur. Islak disk ağırlıklarında GAG oran sonuçları ile tutarlı olarak 5 µM Ral uygulanmış grubunda en yoğun hücre çeperi ve matriks boyaması gözlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda bu Ral dozunun osteoartritli kıkırdak hücrelerinin GAG sentezi üzerinde pozitif etkisi olduğu sonucuna varılabilir.

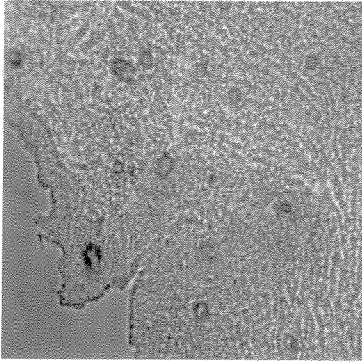
5 ng/ml KMP9 grubunda GAG miktar sonuçları ile aynı paralellikte olarak en yoğun boyamalar elde edilmiştir (Şekil 13f-h). Daha yüksek KMP9 gruplarının GAG boyamalarının negatif kontrol grubu ile benzer olduğu gözlenmiştir. Diğer taraftan, sağlıklı kontrol grubuna göre hücre sayısındaki belirgin farklılığına rağmen PLF68, GAG boyamalarında etkin sonuçlar göstermemiştir (Şekil 13i ve j). PLF 68 uygulanan gruplarda yoğun hücre çeperi ve belirgin olmayan matriks boyaması bulunmuştur.



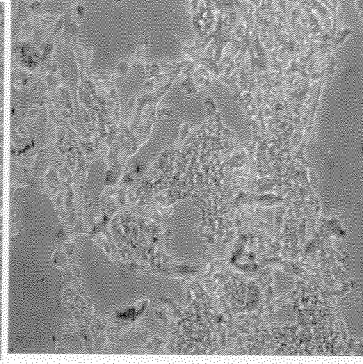
a) pozitif kontrol



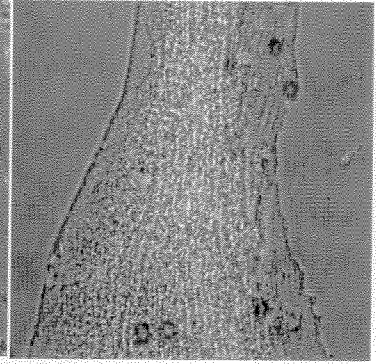
b) negatif kontrol



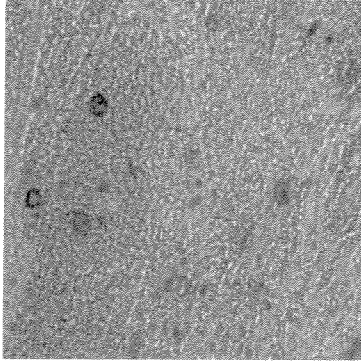
c) 1 µM Ral



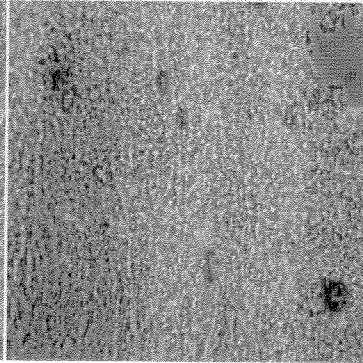
d) 5 µM Ral



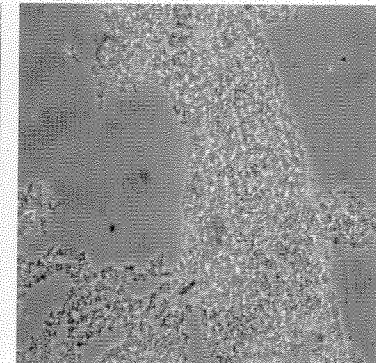
e) 10 µM Ral



f) 5 ng/ml KMP9



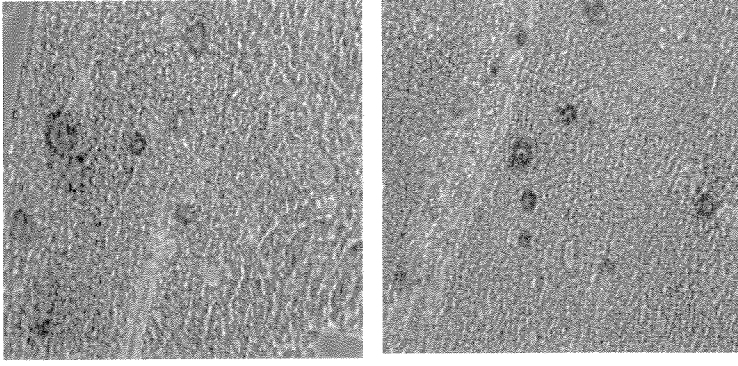
g) 10 ng/ml KMP9



h) 50 ng/ml KMP9

**Şekil 13.** 27 günlük in vitro inkübasyon sonunda kondrosit- agaroz disklerin kesitlerinde safranin O ile yapılan GAG incelemeleri.



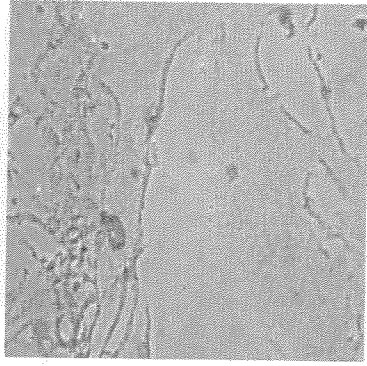


i) 8 mg/ml PLF 68

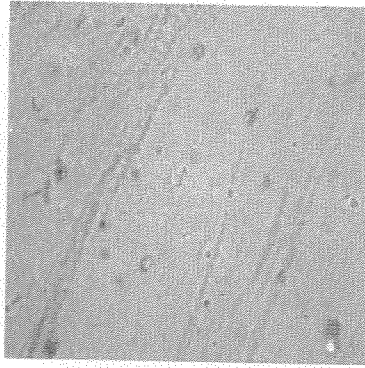
j) 8 mg/ml PLF 68

**Şekil 13 (devamı).** 27 günlük in vitro inkübasyon sonunda kondrosit- agaroz disklerin kesitlerinde safranin O ile yapılan GAG incelemeleri.

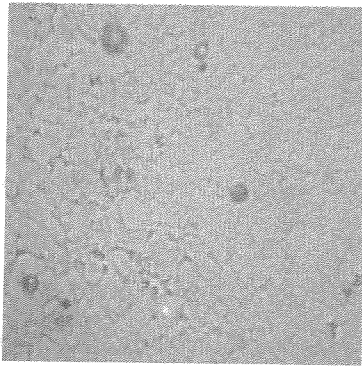
Histolojik kesitlerde yapılan total kollajen boymalarında sadece 5  $\mu$ M Ral uygulanmış grupta hem hücre çeperi hem matriks boyaması elde edilmiştir (Şekil 14). Ayrıca bu grup için kollajen boyama yoğunluğunun diğer bütün gruplardan daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Diğer raloksifen dozlarında ve 5 ng/ml KMP'de ise matriksin kollajen için az miktarda boyandığı görülmüştür. Kondrosit hücrelerinin sentezledikleri GAG ve kollajen yönünden değerlendirildiğinde raloksifenin OA tedavi potansiyeli olduğu sonucuna varılmaktadır.



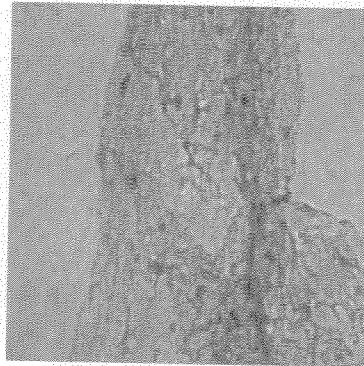
a) pozitif kontrol



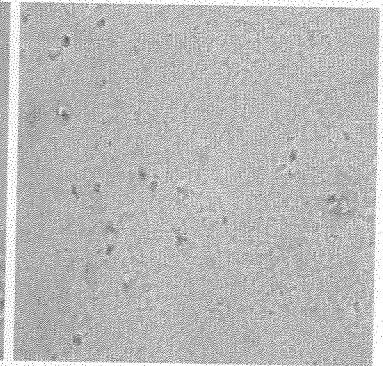
b) negatif kontrol



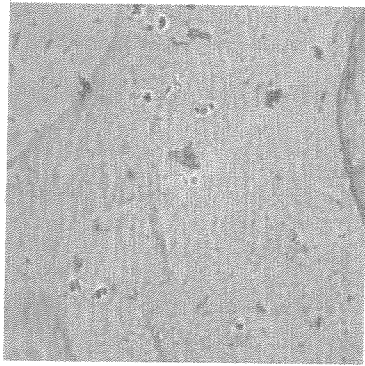
c) 1 µM Ral



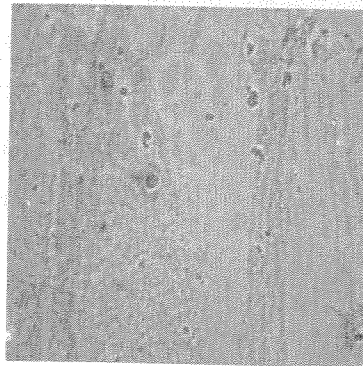
d) 5 µM Ral



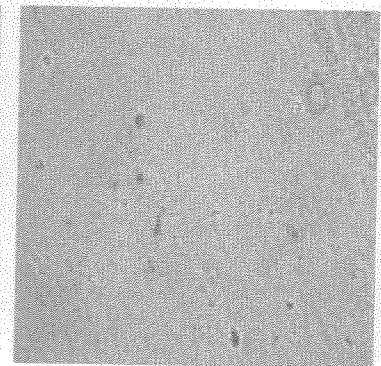
e) 10 µM Ral



f) 5ng/ml KMP9

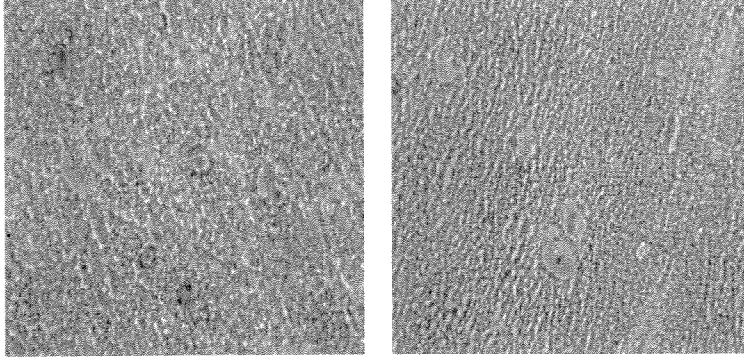


g) 10 ng/ml KMP9



h) 50 ng/ml KMP9

**Şekil 14.** 27 günlük in vitro inkübasyon sonunda kondrosit- agaroz disk kesitlerinde kollajen boyamaları.



i) 8 mg/ml PLF-68

j) 12 mg/ml PLF-68

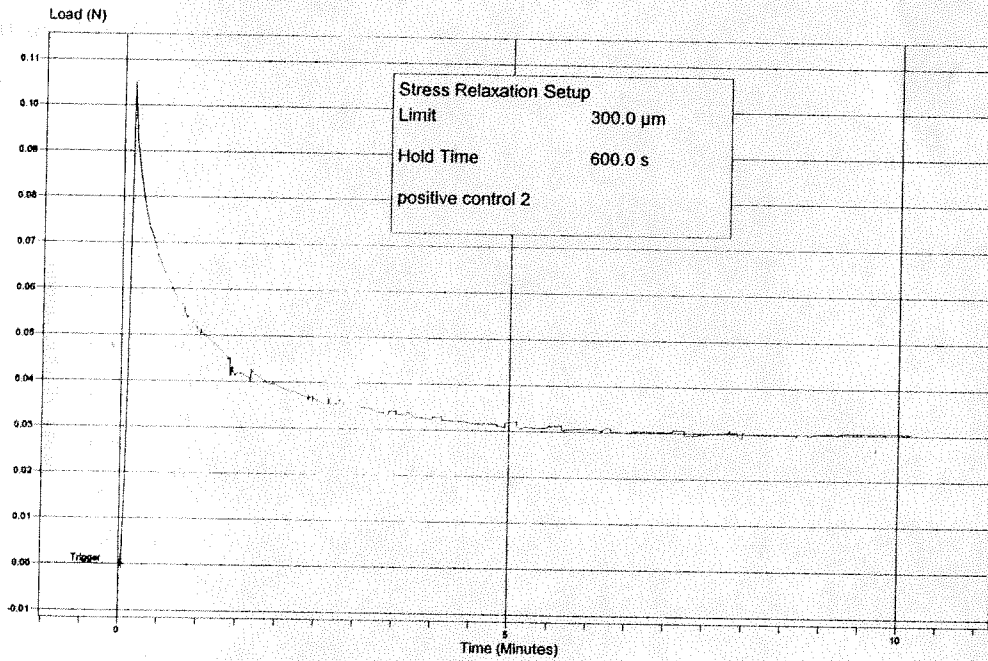
**Şekil 14 (devamı).** 27 günlük in vitro inkübasyon sonunda kondrosit- agaroz disk kesitlerinde kollajen boyamaları.

### 3.6. Agaroz-Kondrosit Disklerinin Mekanik Özelliklerinin Karşılaştırılması

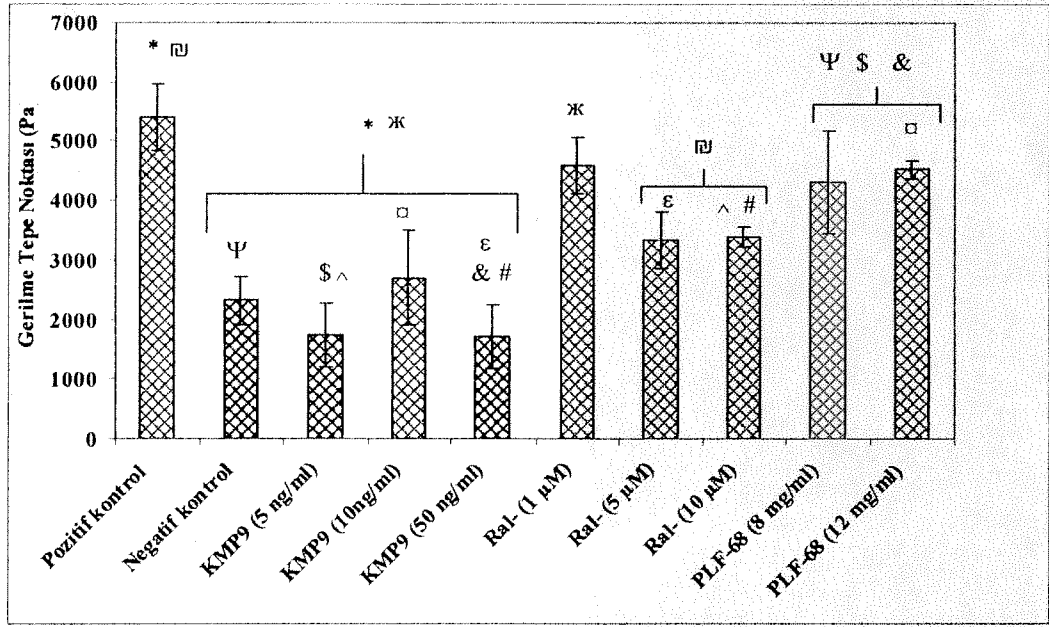
Osteoartritin'in en belirgin işareti kıkırdak dokusunda gözlenen mekanik dayanım zayıflığıdır. Bu nedenle agaroz kondrosit disklerin 27 günlük in vitro inkübasyon sonunda mekanik özellikleri gerilme rahatlama (stress relaxation) testi ile incelenmiş ve bu testten elde edilen garfığın tipik bir örneği Şekil 15'de gösterilmiştir. Tüm grupların mekanik testlerinde görülen bu davranış, literatürdeki benzer araştırmaların aynı testteki sonuçları ile örtüşmektedir. Bu sonuç disklerin 27 gün sonunda viskoelastik özelliklerini koruduklarını belirtmektedir. Disklere % 10 luk deformasyon (uzama) uygulandığında elde edilen en yüksek dayanma kuvvet değerleri disklerin alanları ile normalize edilmiş ve gerilme tepe noktası değerleri hesaplanmıştır. Bu değerler örneklerin boyuttan bağımsız olarak malzeme ve içeriğe bağlı olan mekanik kuvvetini göstermektedir (Şekil 16). Tepe noktası gerilme değerlerinin bu noktadaki uzama ile oranı alınarakda disklerin agregat elastik (Young's) modülleri elde edilmiştir (Şekil 17). Negatif kontrol grubun en yüksek gerilme ve agregat modülü değerlerinin sağlıklı kontrol grubundan istatistiksel olarak düşük olduğu bulunmuştur. Bu sonuç negatif grup disklerin gözlenen morfolojik osteoartiritik değişimlerle de beklendiği üzere mekanik dayanıklılığının azaldığını (Şekiller 8-12). Ayrıca, bütün KMP9 doz grupları ve iki yüksek doz Ral grupta mekanik özelliklerin sağlıklı kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı olduğu bulunmuştur. Elde edilen mekanik dayanımdaki azalmanın disklerin ıslak ağırlık artışı (Şekil 6) ve sentezlenen GAG miktarlarıyla tutarlı olduğu görülmüştür (Şekiller 9 ve 10). GAG kıkırdağın basma dayanımı sağlayan önemli hücre dışı matriks komponentleridir.

Hücre dışı matrikste bulunan proteoglikanlar arasında bulunan elektrostatik etkileşimler kıkırdak dokusunun basma kuvvetlerine dayanımını sağlamaktadır (Buschmann ve ark., 1995). Ayrıca mekanik testler sonrasında KMP9 doz gruplarının tüm gruplar arasında en düşük kuvvete sahip oldukları bulunmuştur.

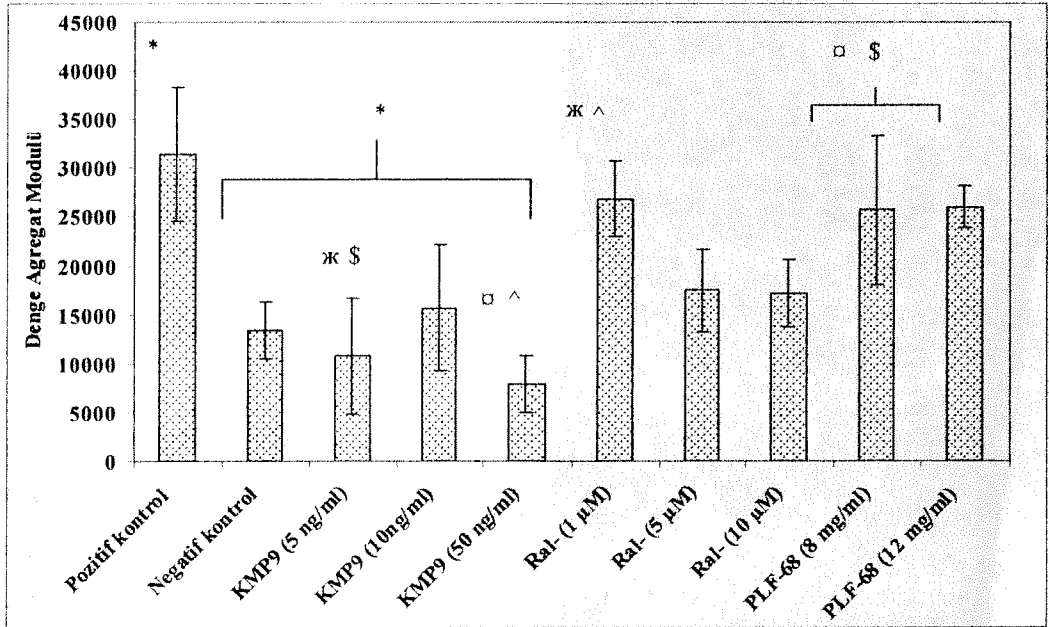
En düşük Ral grubu ile PLF68 dozlarının mekanik özelliklerinin sağlıklı kontrol grubundan istatistiksel farklı olmadığı ve negatif kontrol grubundan istatistiksel olarak yüksek olduğu bulunmuştur. Mekanik testler sonucunda beklenilmeyen sonuç olarak en yüksek GAG oranına ve en düşük ıslak ağırlığa sahip Ral (5  $\mu$ M) grubunun kuvvet değerinin sağlıklı kontrol ve Ral (1  $\mu$ M) gruplarından düşük olmasıdır. Bunun nedeninin deneyler sırasında yanlışlıkla bu gruptan örnek kaybedilmesi ve bu nedenle istatistiksel karşılaştırmalarda bu grubun az görünmesi olduğu düşünülmektedir.



**Şekil 15.** 27 günlük in vitro kültürasyonu sonunda agaroz-kondrosit diskin % 10 luk deformasyonu sonucunda elde edilen gerilme rahatlatma grafiği.



Şekil 16. Agaroz-kondrosit disklerinin 27 günlük in vitro inkübasyondan sonra % 10'luk deformasyon sonucunda elde edilen en yüksek dayanma kuvvet değerleri (Gruplararası istatistiksel farklılık düzeyleri: \*:  $p \leq 0.002$ ; □, ж, ε, #:  $p \leq 0.05$ ; &:  $p \leq 0.02$ ; \$:  $p \leq 0.003$ ,  $n=3$ ).



Şekil 17. Ral, KMP9 ve PLF68 uygulanmış, ve kontrol grupların agregat dayanımlarının karşılaştırılması (Gruplararası istatistiksel farklılık düzeyleri: \*, ж:  $p \leq 0.05$ , □, ^:  $p \leq 0.02$ , \$:  $p \leq 0.1$ ).

#### 4. Ral, KMP9, ve PLF68 Kombinasyonlarının Osteoartiritik Hücreler Üzerinde Etkilerinin İncelenmesi

##### 4.1. Agaroz-Kondrosit Disklerin Fiziksel Özellikleri

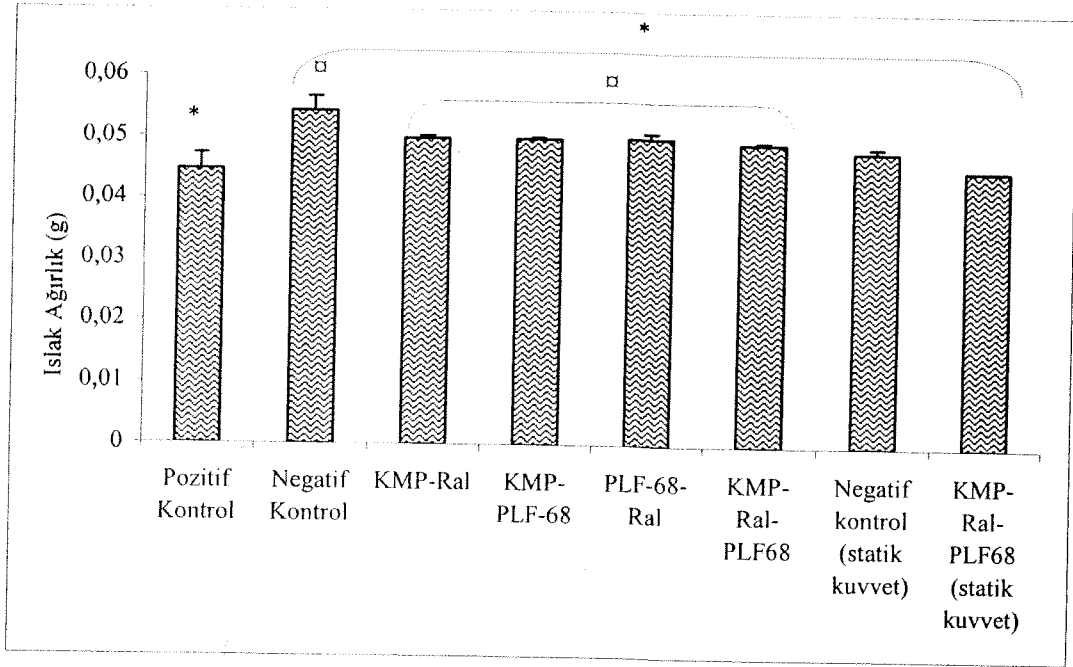
Ajanların kombinasyon uygulamaları sonrasında elde edilen agaroz disklerin yükseklik ve çap değerleri karşılaştırıldığında yapıldığında gruplararası istatistiksel anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Tablo 4). Bu sonuç tekli uygulamalarla paralellik göstermektedir.

**Tablo 4.** Ral, KMP9 ve PLF68 kombinasyon uygulamaları sonunda kondrosit-agaroz disklerin boyutları.

Gruplar	Yükseklik (mm)	Çap (mm)
Negatif Kontrol	3.04 ± 0.20	4.55 ± 0.58
Pozitif Kontrol	2.78 ± 0.10	4.86 ± 0.04
KMP-Ral	2.90 ± 0.06	4.77 ± 0.10
KMP-PLF-68	2.78 ± 0.04	4.84 ± 0.08
PLF-68-Ral	2.90 ± 0.08	4.82 ± 0.06
KMP-RAL-PLF68	2.87 ± 0.09	4.72 ± 0.13
Negatif (statik kuvvet altında)	2.82 ± 0.13	4.91 ± 0.09
KMP-Ral-PLF68 (statik kuvvet altında)	2.54 ± 0.23	4.89 ± 0.12

Hastalık durumunda matriks yıkımına sebep olan metaloproteaz aktivitelerinin yükseldiği ve bunun sonucunda kollajen yıkımı olduğu gözlenmiştir. Parçalanmış kollajen moleküllerinin artışı ile dokunun şişmesinin orantılı olduğu literatürde gösterilmiştir (BANK, 1997, GEBHARD, 2003). Tüm grupların ıslak ağırlıkları (negatif kontrol grup dahil) pozitif kontrol grubun ıslak ağırlığından daha yüksek olduğu gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ) (Şekil 18). Diğer yandan, hidrostatik basınç altında uygulanmış kombinasyon gruplarının ıslak ağırlıkları negatif kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ( $p < 0.05$ ). Benzer şekilde matrix yıkımı nedebiyle dokudaki su artışının yaklaşık % 9 olduğu da *in vivo* araştırmalarda gösterilmiştir (MANKİN ve THRASHER, 1975, BONASSAR, 1995). Kombinasyonların değerleri, sağlıklı grubun ıslak ağırlığının değerine düşmediği halde negatif kontrol grubun

ıslak ağırlığından istatistiksel olarak daha düşük olması tedavi etkinliklerinin olduklarının düşündürmektedir. Hidrostatik basınç altında uygulanan değişik kombinasyon grupları arasında ise ıslak ağırlıklar yönünden istatistiksel anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Statik kuvvet altında üçlü kombinasyon grubunun ıslak ağırlığının ( $0.0452 \pm 0.0002$  g) negatif kontrol grubununkinden ( $0.0481 \pm 0.0008$  g) sayısal olarak farklı olduğu gözlenmiştir. Bu durumda üçlü kombinasyonun statik kuvvetler varlığında da tedavi etkinliği olduğu düşünülmektedir. Statik ve hidrostatik basınç altında oluşturulan negatif kontrol gruplar ( $0.0481 \pm 0.0008$  ve  $0.0543 \pm 0.0023$  g) ve üçlü kombinasyon grupları ( $0.0452 \pm 0.0002$  g) kendi içlerinde karşılaştırıldığında, statik kuvvetler altında olan disklerin ıslak ağırlıkların sayısal olarak hidrostatik basınç uygulanan disklere göre daha düşük olduğu görülmüştür. Islak ağırlıklardaki bu farklılığın statik kuvvet altında olan disklerin üstlerine konulan sabit ağırlıktan dolayı fazla şişmemelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.



**Şekil 18.** Hidrostatik veya statik kuvvetler altında değişik Ral, KMP9 ve PLF68 kombinasyonlar uygulanmış kondrosit-agaroz disklerin ıslak ağırlıklarının 27 gün sonunda kontrol gruplarıyla karşılaştırılması (Gruplararası istatistiksel farklılık düzeyleri: \*, □;  $p \leq 0.05$ ).

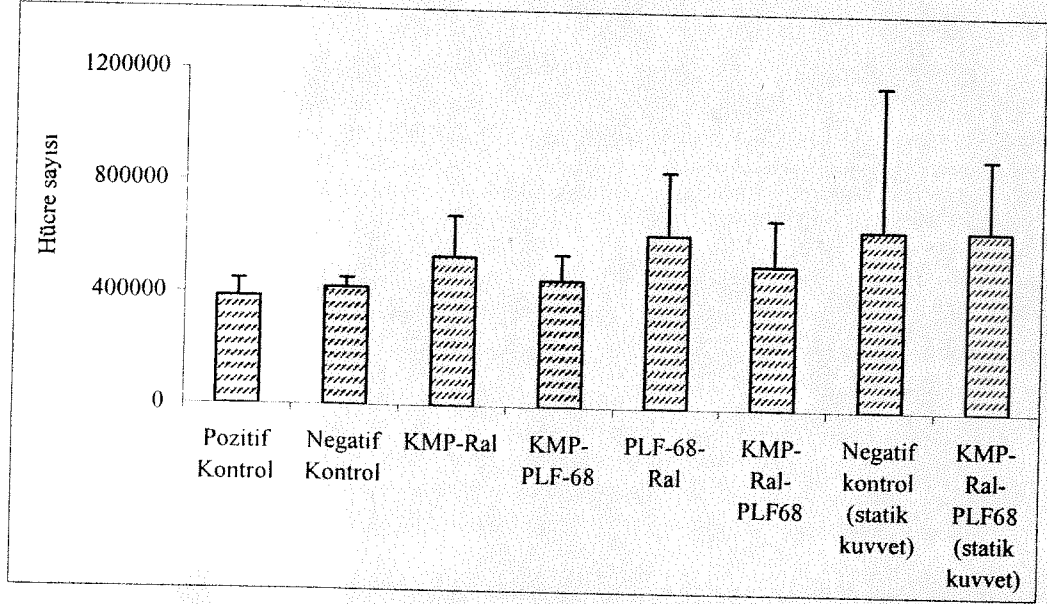
#### 4.2. Agaroza İçinde Gömülü Canlı Kıkırdak Hücre Sayıları

Hidrostatik basınç altında ikili veya üçlü kombinasyon uygulanmış agaroz diskler arasında sayısal olarak en yüksek hücreye PLF68-Ral grubunun sahip olduğu bulunmuştur

(619 363 ± 227 218) (Şekil 19). PLF68 (12 mg/ml) ve Ral (5 µM) tek olarak osteoartiritik hücrelere eklendiğinde elde edilen hücre sayıları sırasıyla 561 657 ± 157 824 ve 434 990 ± 33 757' dir. Hücre sayısının ajanlar birarada olarak uygulandıklarında tek olarak uygulanmalarına oranla miktarsal olarak daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu da ikili olarak Ral ve PLF68'in uygulanmasının pozitif etki oluşturduğunu düşündürmektedir. Bu etkinin PLF68'in tek olarak osteoartiritik hücreler üzerinde hücre sayısı artışına etkisi (Şekil 8) ile paralel olarak ikili kombinasyonda da gözlendiği düşünülmektedir. Bu sonuç PLF68'in hücre zarlarına girip yama görevi yaparak osteoartiritik hücrelerinin canlılıklarını koruması ve/veya bir deterjan olan PLF68'in Ral'in biyoetkinliğini artırıcı-koruyucu etkisi olarak tartışılabilir. Elde edilen bilgiler literatür ile uyumludur. PLF68 ile yapılan çalışmalarda noniyonik deterjan olan PLF68'in travmadan sonra ekleme veya eksplantlara uygulandığında nekroza bağlı hücre ölümlerinde azalttığı gözlenmiştir (PHILLIPS, 2004; RUNDELL, 2005). PLF68 zarar görmüş hücre zarlarında yama görevi yaparak iyileşme sürecinde katkıda bulunduğu düşünülmektedir. İkili kombinasyon gruplarının hücre sayıları arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık gözlenmemekle beraber KMP 'li ikili kombinasyon gruplarında PLF68-Ral grubuna göre hücre sayıları daha düşüktür. Bu sonuçla PLF68'in hücre ölümünü erteleyişi daha belirgin düşünülebilmektedir. Ayrıca, KMP9'un literatürde gösterilmiş olan sağlıklı hücreler üzerindeki pozitif etkisi osteoartiritik hücreler üzerine eklendiğinde gözlenmemiştir (GEBHARD, 2003; TALLHEDEN, 2004).

Statik basınç altında bulunan negatif kontrol grubun hücre sayısı aynı şartlarda üçlü ajan kombinasyon uygulanmış gruba göre istatistiksel olarak farklı gözlenmemiştir. Uygulanan statik kuvvet agaroz disklerinde gömülü olan osteoartiritik hücrelerinin çoğalmasında herhangi bir olumsuz etki yaratmamıştır. Statik kuvvet altında bulunan grupların hücre sayıları ile diğer gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



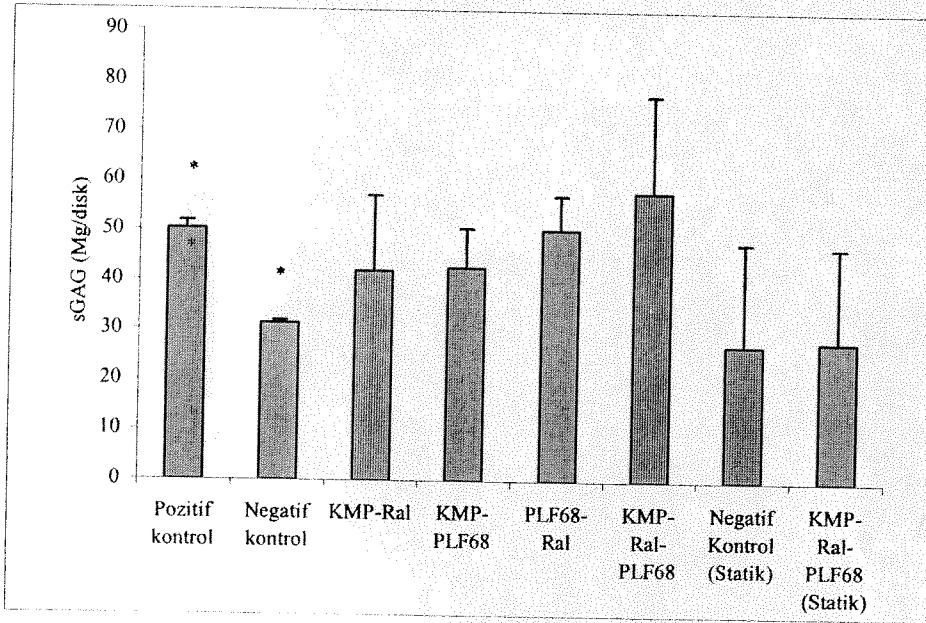


Şekil 19. Ral, KMP9 ve PLF68 kombinasyonlarının osteoartiritik hücre çoğalması yönünden karşılaştırılması.

#### 4.3. Ral, KMP9 ve Ral Kombinasyon Uygulamasının sGAG Sentezi Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

Hücreler tarafından diskler içine salgılanan sGAG miktarında sadece pozitif ve negatif gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ) (Şekil 20). Uygulanan tüm kombinasyonların sGAG miktarlarının negatif kontrol grubundan ( $31.31 \pm 0.57 \mu\text{g/disk}$ ) yüksek olduğu gözlenmiştir. İkili kombinasyonlar arasında KMP içeren grupların sGAG miktarı PLF68-Ral miktarından düşüktür. Bu da KMP9'un etkin doz belirlenme aşamasındaki çalışmalarımızda osteoartiritik hücrelerin KMP9'a cevap vermediği ve matriks sentezinin iyileşmediğini gözlemlenmiştir (Şekil 9). Ancak KMP9'un sağlıklı eklem kıkırdak hücrelerin anabolik aktivitelerini (matriks sentezi) artırdığı ve kıkırdak yönünde farklılaşmasının korunmasını sağladığı gösterilmiştir (MAJUMDAR, 2001; HILLS, 2005). Literatürde osteoartiritik hücrelerinde bazı farklılaşma veya büyüme faktörlerinin beklenen etkide bulunmadıkları gösterilmiştir (DORE, 1994, CHUBINSKAYA, 2007). Ancak KMP9 PLF68 veya Ral ile birarada uygulanması negatif kontrole göre osteoartiritik hücrelerin daha fazla sGAG sentezlemesini sağlamıştır. En yüksek sGAG miktarı Ral-KMP9-PLF68 grubunda ( $57.78 \pm 19.46 \mu\text{g/disk}$ ) gözlenmiştir. Statik kuvvet altında bulunan osteoartiritik hücrelerin sentezlediği sGAG miktarı, hidrostatik basınç uygulanmış osteoartiritik ve sağlıklı kıkırdak hücrelerinininkine göre daha düşük düzeyde salgılanmıştır. Elde edilen bu sonuç literatürle

uyumludur (MURATA, 2003, MİYATA, 2004, SHARMA, 2007) . Ayrıca yakın tarihli bir çalışmada IGF-1 ve OP-1 büyüme faktörlerinin osteoartritik hücreler üzerindeki kombine etkileri araştırılmıştır (CHUBINSKAYA, 2007). Burada bulunan sonuçlarla uyumlu olarak kombine uygulamaların tek başına uygulamalara göre daha etkin sonuç verdiği matriks sentezi ile gösterilmiştir.

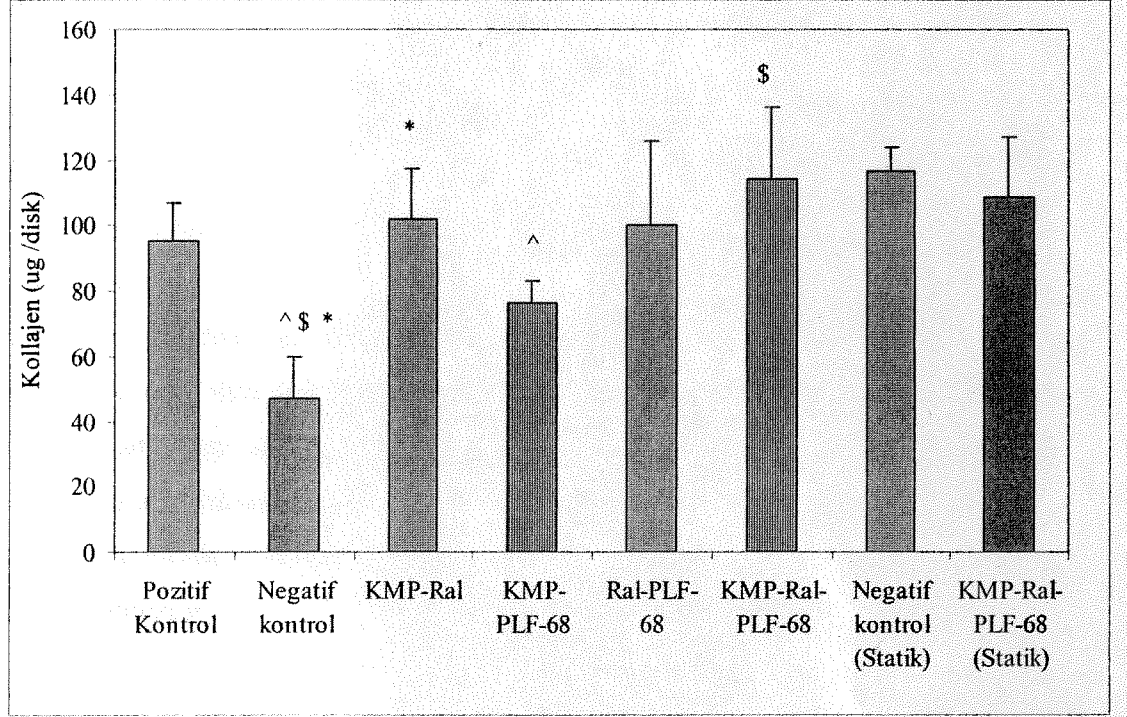


Şekil 20. Ral, KMP9, ve PLF68 kombinasyon uygulamasının osteoartritik hücrelerin sGAG sentezleri üzerindeki etkisinin karşılaştırılması

#### 4.4. Ral, KMP9 ve Ral Kombinasyonların Kollajen Sentezi Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

Kombine uygulamalar sonrasında negatif kontrol grubunun sentezlenen kollajen miktarı ( $46.84 \pm 13.02 \mu\text{g/disk}$ ) pozitif kontrol grubun kollajen miktarından ( $95.53 \pm 11.16 \mu\text{g/disk}$ ) az olduğu bulunmuştur ( $p= 0.124$ ) (Şekil 21). Ayrıca, negatif grubun kollajen miktarının Ral-PLF68 ( $p= 0.047$ ), Ral-KMP9 ( $p=0.026$ ), Ral-KMP9-PLF68 ( $p=0.018$ ) uygulanmış grupların kollajen miktarlarından istatistiksel anlamlı olarak az olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlarla ikili ve üçlü kombinasyonların osteoartritik hücrelerin kollajen sentezlerini arttırdığı bulunmuştur. Ayrıca, osteoartritik hücrelerin statik kuvvetler varlığında hidrostatik kuvvetlere göre daha fazla kollajen salgıladıkları gözlenmiştir. Kollajen sentezlemesinin

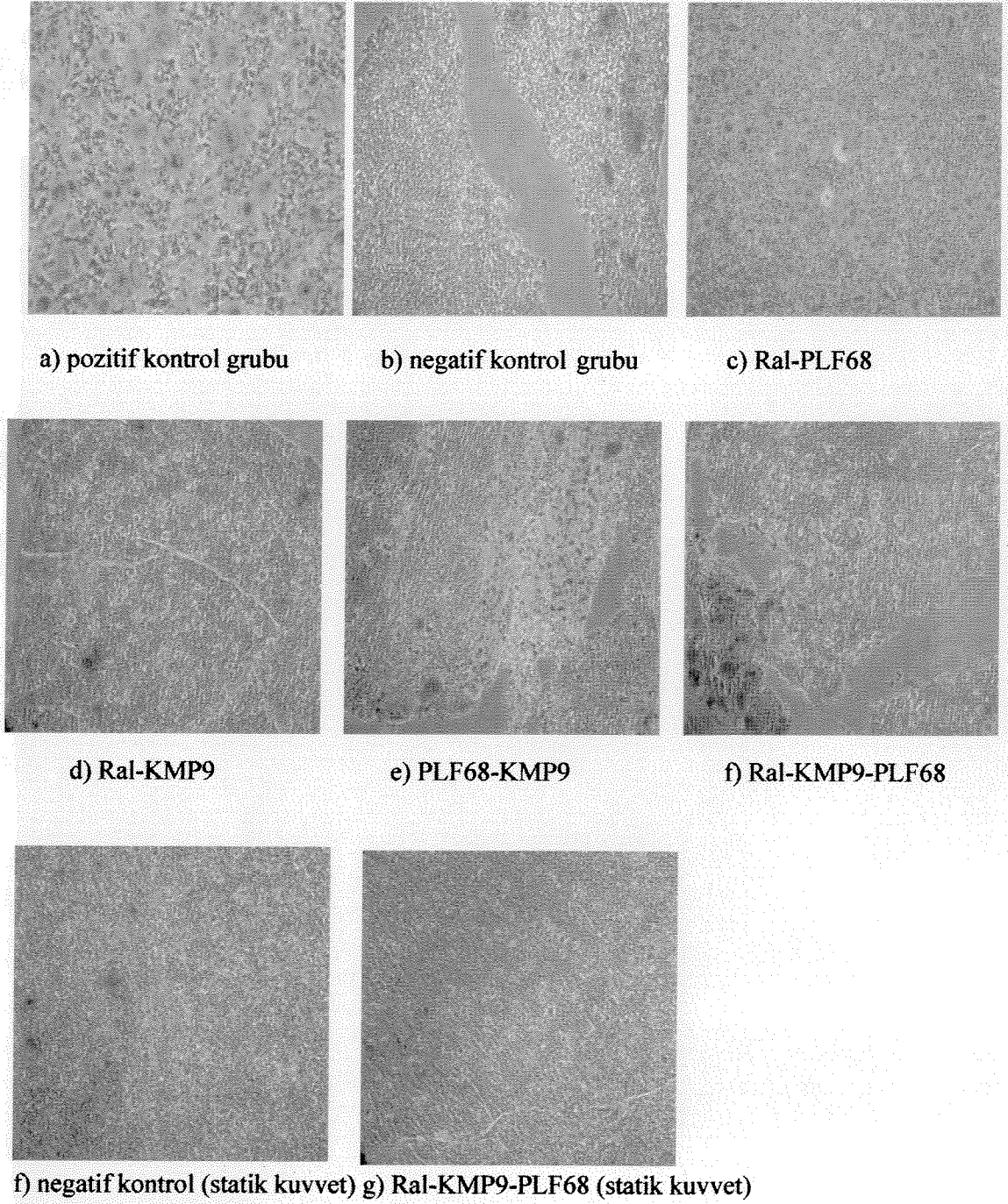
artması hücrelerin statik kuvvetlere daha fazla dayanmayı sağlamak amaçlı olabileceği düşünülmektedir.



**Şekil 21.** Ral, KMP9 ve PLF68 kombinasyon uygulamalarının agaroz disklerin kollajen miktarları üzerindeki etkileri (Gruplararası istatistiksel farklılık düzeyleri: \*, \$, ^:  $p \leq 0.05$ ).

#### 4.5. Histolojik İncelemeler

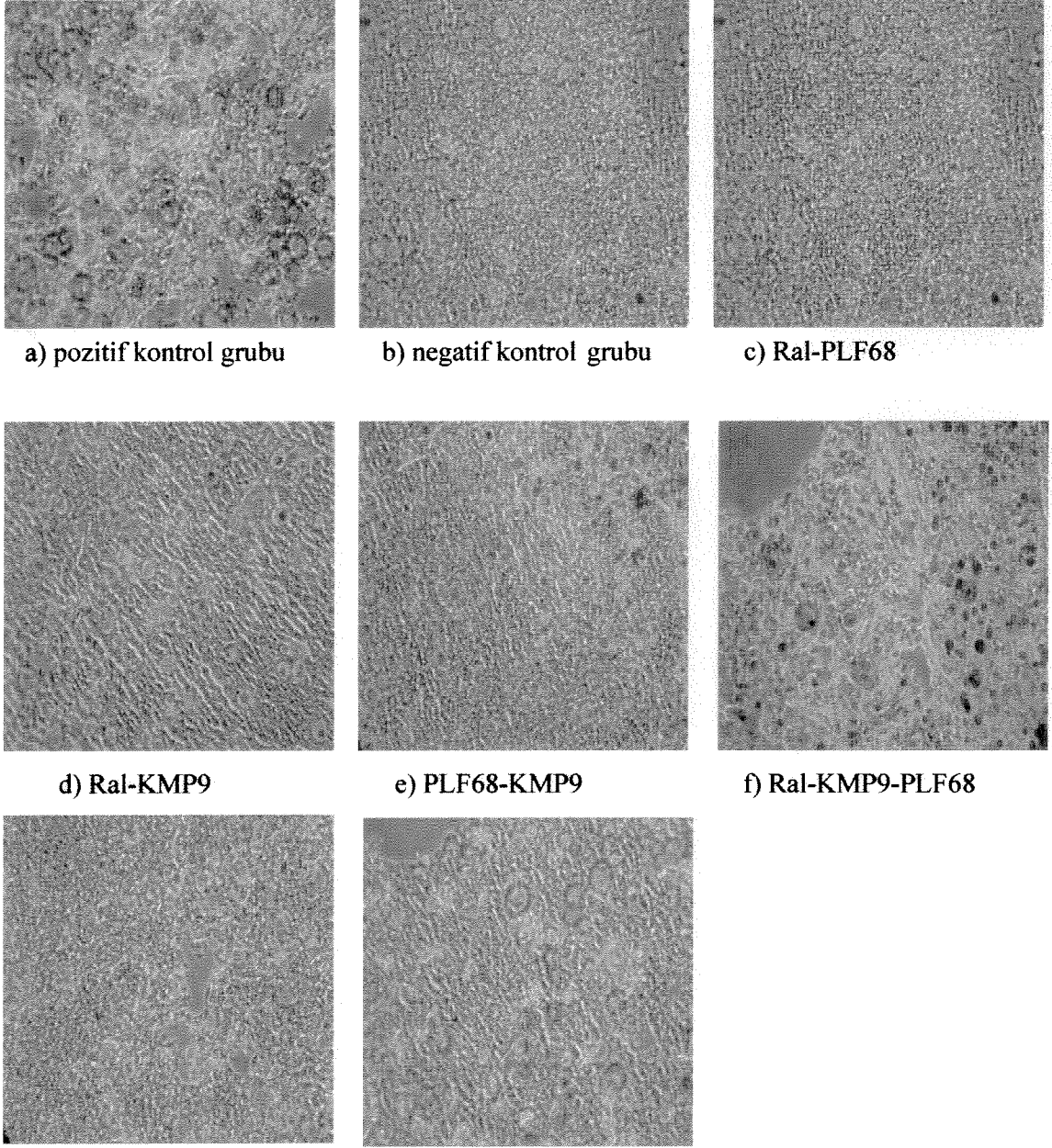
Agaroz disklerden alınan kesitler sGAG ve kollajen miktarları ve dağılımlarının incelenmesi için safranin A ve sirius kırmızısı ile boyanmış ve görüntülenmiştir. Kesitlerde (Şekil 22) görülen kırmızı bölgeler hücreler tarafından agaroz diskinin içine salgılanmış glikosaminoglikanları göstermektedir. En yoğun hücreçeperi (pericellular) ve matrikiçi sGAG beklendiği gibi pozitif kontrol grubunda görüntülenmiştir. Miktersal sGAG tayin sonuçlarımızla uyumlu olarak negatif kontrol grubunda sadece hücreçeperi sGAG boyaması olduğu ve miktersal olarak az olduğu gözlenmiştir. Ral-KMP9-PLF68 uygulanmış osteoartritik hücrelerinin agaroz kesitlerinde sGAG boyamalarında bölgesel yoğunluklar görülmüştür. Ancak tüm kombinasyon uygulamalarında gözlenen yoğun boyamalarla kombine uygulamaların osteoartritik hücrelerin sGAG sentezlemesini arttırdığı sonucuna varılmaktadır. Statik basınç altında ise negatif kontrol ve üçlü kombinasyon uygulanmış osteoartritik hücrelerinin sGAG sentezinin hidrostatik basınç altındaki eş gruplarından daha az olduğu görülmüştür.



**Şekil 22.** 10 günlük kombinasyon uygulaması sonunfa kondrosit- agaroz disk kesitlerinde sGAG boyamaları.

Şekil 23'de bulunan kesitlerde kırmızı bölgeler hücreler tarafından salgılanmış kollajeni göstermektedir. Pozitif grubunda sağlıklı kıkırdak hücreçeperlerinde bulunan boyanma Ral-KMP9-PLF68 uygulanmış grup haricinde tüm gruplara göre daha belirgin ve yoğundur.

Hiçbir grupta sGAG boyamasında görüntülenen matrikiçi kollajen görülmemiştir. Statik kuvvetler altında Ral-KMP9-PLF68 uygulanmış grubun kollajen dağılımı miktarsal olarak daha az olsa da diğer gruplara göre daha belirgindir. Bu da üçlü kombinasyon uygulamasının kollajen sentezi üzerinde olumlu etkisi olduğu sonucunu desteklemektedir.



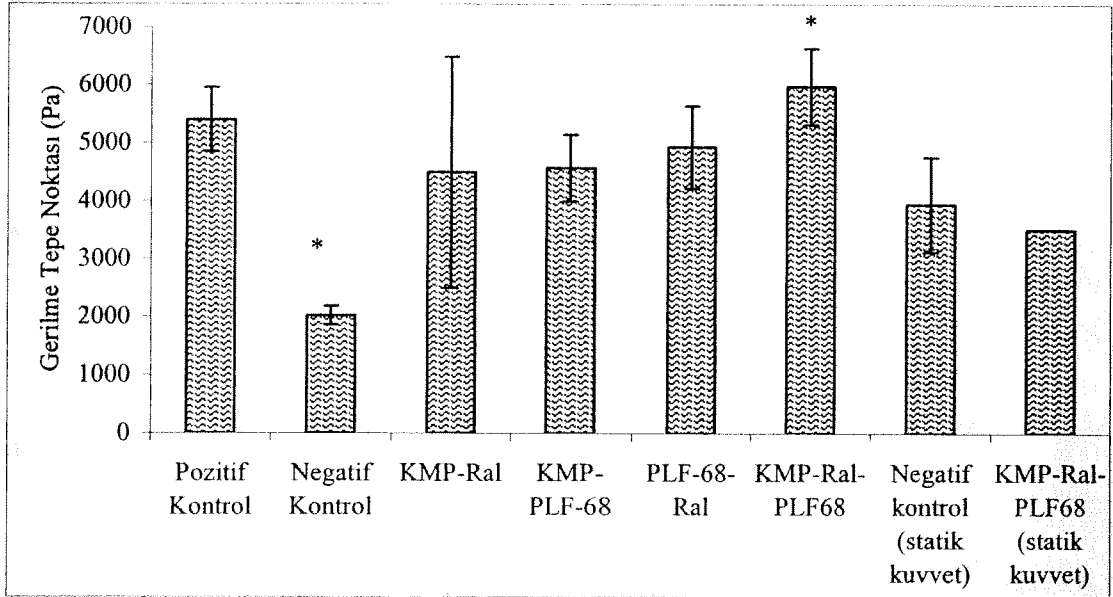
f) negatif kontrol (statik kuvvet)      g) Ral-KMP9-PLF68 (statik kuvvet)

**Şekil 23.** 10 günlük kombinasyon uygulaması sonunda kondrosit- agaroz disk kesitlerinde kollajen boyamaları.

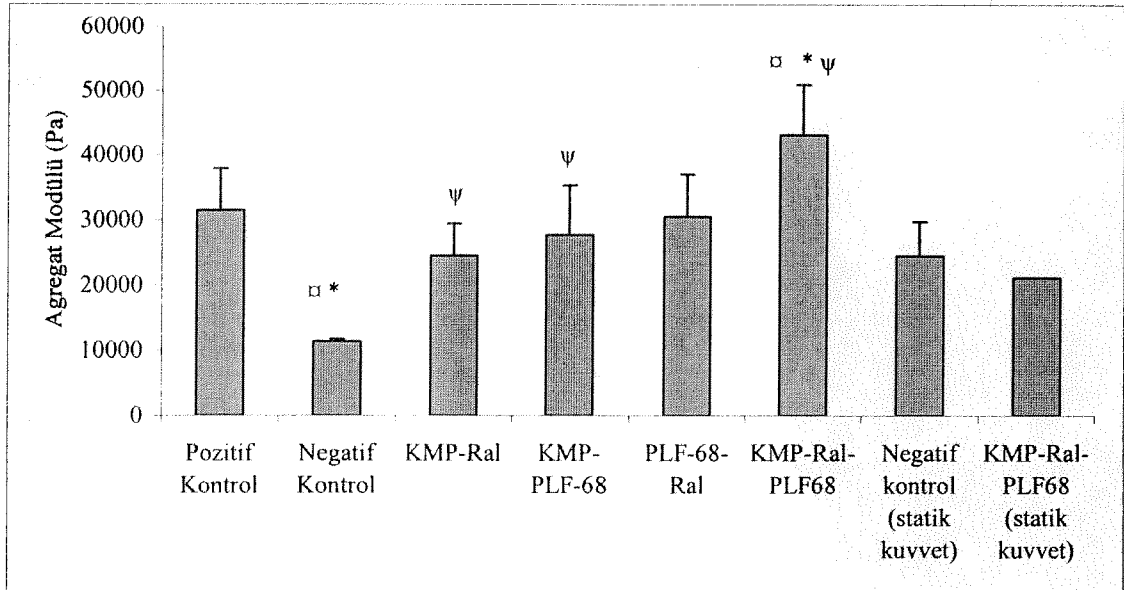
#### 4.6. Ral, KMP9 ve PLF68 Kombinasyon Uygulamalarının Agaroz-Kondrosit Disklerinin Mekanik Özellikleri Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

Eklem kıkırdağının biyomekanik özellikleri dokunun fonksiyonelliğinde önemli bir parametredir. Kıkırdak dokusunda bulunan hücre yoğunluğu vücuttaki birçok dokuya göre çok azdır. Kondrositler kıkırdak dokusunun matriksini sentezlemektedirler. Matriksin kompozisyonu, komponentlerin organizasyonu mekanik özellikleri belirleyen parametrelerdir. Ral, KMP9 ve PLF68 kombinasyonlarının osteoartrit tedavisi etkinliklerinin belirlenmesi için agaroz disklerinin mekanik özellikleri de incelenmiştir. Disklere % 10 luk deformasyon (uzama) uygulanmış ve elde edilen en yüksek dayanma kuvvet değerleri disklerin alanları ile normalize edilerek gerilme tepe noktası değerleri hesaplanmıştır. (Şekil 24). Tepe noktası gerilme değerlerinin bu noktadaki uzama ile oranı alınarak da disklerin agregat elastik (Young's) modülleri elde edilmiştir (Şekil 25).

Negatif kontrol grubu tüm gruplar arasında en düşük gerilme ve agregat modülüne sahiptir ve pozitif kontrol grubundan düşük olduğu bulunmuştur ( $p=0.104$ ). Osteoartrit hücrelerine hidrostatik basınç altında Ral, KMP9 ve PLF68 sörfaktant üçlü kombinasyon uygulandığında tepe noktası gerilme noktası ( $p= 0.022$ ) ve agregat elastik modüllerinin ( $p= 0.005$ ) bu gruptan istatistiksel yüksek olduğu görülmüştür. İkili kombinasyon grupların tepe noktası gerilme değerleri ve agregat modüllerinin sayısal olarak negatif kontrol grubundan yüksek oldukları (Şekiller 24 ve 25) gözlenmiştir. Negatif kontrol grubuna göre hesaplanan mekanik parametreler de uygulamaların mekanik özelliklerde iyileşme sağladığını göstermektedir. İkili kombinasyon grupların arasında sayısal ve istatistiksel anlamlı bir farklılık da bulunmamıştır. Ancak hidrostatik basınç altında KMP-Ral ve KMP-PLF68 uygulanmış gruplarının elastik agregat modüllerinin üçlü kombinasyon uygulanmış grubuna göre düşük olduğu bulunmuştur (sırasıyla  $p=0.020$  ve  $p=0.104$ ). Bu sonuçlar da KMP'nin tek başına uygulanmasında osteoartrit hücrelerin matriks sentezini azaltıcı etkisi ile uyumludur.



**Şekil 24.** Agaroz-kondrosit disklerinin 10 günlük kombinasyon uygulamaları sonunda % 10'luk deformasyon sonucunda elde edilen en yüksek dayanma kuvvet değerleri (Gruplararası istatistiksel farklılık düzeyleri: \*:  $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 25.** Ral, KMP9 ve PLF68 kombinasyon uygulanmış, ve kontrol grupların agregat dayanımlarının karşılaştırılması (Gruplararası istatistiksel farklılık düzeyleri: \*,  $\square$ ,  $\psi$ :  $p \leq 0.05$ ).



## Kaynaklar

- ACKERMANN B., Steinmeyer J., Collagen biosynthesis of mechanically loaded articular cartilage explants, *Osteoarthritis and Cartilage*, 13, 906-14, (2005).
- AKAGI M., Kanata S., Mori S., Itabe H., Possible involvement of the oxidized low density lipoprotein like/lectin like oxidized low density lipoprotein receptor-1 system in pathogenesis and progression of human osteoarthritis, *Osteoarthritis and Cartilage*, 15(3), 281-90, (2007).
- AKESSON K., New approaches to pharmacological treatment of osteoporosis, *Bulletin of the World Health Organization*, 81, 657-64, (2003).
- ALLEN M.R., Iwata K., Sato M., Burr D.B., Raloxifene enhances vertebral mechanical properties independent of bone density, *Bone*, 39, 1130-35, (2006).
- American College of Rheumatology Subcommittee on Osteoarthritis Guidelines, Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee: 2000 update, *Arthritis & Rheumatism*, 43(9), 1905-1915, (2000).
- APPLEYARD R.C., Burkhardt D., Ghosh P., Read R., Cake M., Swain M.V., Topographical analysis of the structural, biochemical and dynamic biomechanical properties of cartilage in an ovine model of osteoarthritis, *Osteoarthritis Cartilage*, 11(1), 65-77, (2003).
- ARNER E.C., Aggrecanase-mediated cartilage degradation, *Curr Opin Pharmacol*, 2, 322-29, (2002).
- BADURSKI J.E., Daniluk S., Dobrenko A., Nowak N.A., Jeziernicka E.Z., Holiczer W., A significant improvement of womac and lequesne indexes after treatment with raloxifene in women with osteoarthritis, *Osteoarthritis and Cartilage*, 13, Suppl 1, S82, (2005).
- BANK R.A., Krikken M., Beekman B., Stoop R., Maroudas A., Lafeber F.P., te Koppele J.M., A simplified measurement of degraded collagen in tissues: application in healthy, fibrillated and osteoarthritic cartilage, *Matrix Biol*, 16(5), 233-43, (1997).
- BARRETT-CONOR E., Raloxifene: risks and benefits, *Ann NY Acad Sci*, 949, 295-303, (2001).
- BELLOSTA S., Baetta R., Canavesi R., Comparato C., Granata A., Monetti M., Cairoli F., Eberini .I, Puglisi L., Corsini A., Raloxifene inhibits matrix metalloproteinases expression and activity in macrophages and smooth muscle cells, *Pharmacol Res*, (in press), (2007).

- BLANCO F.J., Ochs H., Schwaz H., Lotz M., Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide, *Am J Pathol*, 146, 75-85, (1995).
- BLUNK T., Appel S.B., Croft C., Courter D.L., Chieh J.J., Goeferich A., Khurana J.S., Gooch K.J., Bone morphogenetic protein 9: A potent modulator of cartilage development in vitro, *Growth Factors*, 23(2), 71-7, (2003).
- BLUTEAU G., Conrozier T., Mathieu P., Vignon E., Herbage D., Mallein-Gerin F., Matrix metalloproteases-1, -3, -13 and aggrecanase-1 and -2 are differentially expressed in human articular chondrocytes in experimental osteoarthritis, *Biochim Biophys Acta*, 1526(2), 147-58, (2001).
- BOBACZ K., Erlacher L., Smolen J., Graninger W.B., Chondrocyte number and proteoglycan synthesis in the aging and osteoarthritic human articular cartilage, *Ann Rheum Dis*, 63, 1618-22, (2004).
- BONASSAR L.J., Frank E.H., Murray J.C., Pagui C.G., Moore V.L., Lark M.W., Changes in cartilage composition and physical properties due to streptomycin degradation, *Arthritis Rheum*, 38, 173-83, (1995).
- BRANDT K.D., Animal models of osteoarthritis, *Biorheology*, 39(1-2), 221-35, (2002).
- BRANDT K., Doherty M., Lohmander L.S., *Osteoarthritis*, Oxford University Press, Oxford, (2003). Pp: 411-16.
- BRANDT K.D., Smith G.N. Jr., Simon L.S., Intraarticular injection of hyaluronan as treatment for knee osteoarthritis: what is the evidence?, *Arthritis Rheum*, 43(6), 1192-203, (2000).
- BROCKLEHURST R., Bayliss M.T., Maroudas A., Caoysh H.I., Freeman M.A.R., Revel P.A., The composition of normal and osteoarthritic articular cartilage from human knee joints. With special reference to unicompartmental replacement and osteotomy of the knee, *J Bone Joint Surg Am*, 66, 95-106, (1984).
- BUSHMANN M.D., Gluzband Y.A., Grodzinsky A.J., Hunziker E.B., Mechanical compression modulates matrix biosynthesis in chondrocyte/agarose culture, *J. Cell Sci.*, 108, 1497-1506, (1995).
- CHEN T.H., Chen L., Hsieh M.S., Chang C.P., Chou D.T., Tsai S.H., Evidence for a protective role for adinopectin in osteoarthritis, *Biochim Biophys Acta*, 1762, 711-18, (2006).

- CHEN Y.L., Lee H.P., Chan H.Y., Sung L.Y., Chen H.C., Hu Y.C., Composite chondroitin-6-sulfate/dermatan sulfate/chitosan scaffolds for cartilage tissue engineering, *Biomaterials*, 28, 2294-2305, (2007).
- CHRISTGAU S., Tanko L.B., Cloos P.A.C., Mouritzen U., Christiansen C., Delaisse J.M., Hoegh-Andersen P., Suppression of elevated cartilage turnover in postmenopausal women and in ovariectomized rats by estrogen and a selective estrogen-receptor modulator (SERM) Menopause, *J North Am Menopause Soc*, 11(5), 508-18, (2004).
- CHUBINSKAYA S., Kuettner K.E., Regulation of osteogenic proteins by chondrocytes, *Int J Biochem Cell Biol*, 35, 1323-40, (2003).
- CHUBINSKAYA S., Hakimiyani A., Pacione C., Ynake A., Rappoport L., Aigner T, et al. Synergistic effect of IGF-1 and OP-1 on matrix formation by normal and OA chondrocytes cultured in alginate beads. *Osteoarthritis and Cartilage*, 15:,421-30; (2007)..
- CORTIAL D., Gouttenoire J., Rousseau C.F., Ronziere M.C., Piccardi N., Msika P., Herbage D., Mallein-Gerin F., Activation of IL-1 of bovine chondrocytes in culture within a 3D collagen-based scaffold. An in vitro model to address the effect of compounds with therapeutic potential in osteoarthritis, *Osteoarthritis and Cartilage*, 14, 631-640, (2006).
- DANILUK S., Badurski J.E., Dobrenko A., Jeziernicka E.Z., Nowak N.A., Buslowska J., Holiczer W., The inhibition of cartilage degradation markers excretion after treatment with raloxifene in women with knee osteoarthritis, *Osteoarthritis and Cartilage*, Suppl 1, S43, (2005).
- DE CROOS J.N.A., Dhaliwal S.S., Grynblas M.D., Pilliar R.M., Kandel R.A., Cyclic compressive mechanical stimulation induces sequential catabolic and anabolic gene changes in chondrocytes resulting in increased extracellular matrix accumulation, *Matrix Biol*, 25, 323-31, (2006).
- DE FREITAS P.S., Wirz D., Stolz M., Göpfert B., Friederich N.F., Daniels A.U., Pulsatile dynamic stiffness of cartilage-like materials and use of agarose gels to validate mechanical methods and models, *Biomed Mater Res Part B*, 78B, 347-57, (2006).
- D'ELIA H.F., Christgau S., Mattsson L., Saxne T., Ohlsson C., Nordborg E., Carlsten H., Hormone replacement therapy, calcium and vitamin D<sub>3</sub> versus calcium and vitamin D<sub>3</sub> alone decreases markers of cartilage and bone metabolism in rheumatoid arthritis: a randomized controlled, *Trial Arthritis Res*, 6, R457-68, (2004).

- DÉMARTEAU O., Wendt D., Braccini A., Jakob M., Schäfer D., Heberer M., Martin I., Dynamic compression of cartilage constructs engineered from expanded human articular chondrocytes, *Biochem Biophys Res Commun*, 310(2), 580-88, (2003).
- DODGE G.R., Jimenez S.A., Glucosamine sulfate modulates the levels of aggrecan and matrix metalloproteinase-3 synthesized by cultured human osteoarthritis articular chondrocytes, *Osteoarthritis and Cartilage*, 11, 424-32, (2003).
- DOZIN B., Malpeli M., Camardella L., Cancedda R., Pietrangelo A., Response of young, aged and osteoarthritic human articular chondrocytes to inflammatory cytokines; molecular and cellular aspects, *Matrix Biol*, 21, 449-59, (2002).
- EL HAJJAJI H., Williams J.M., Devogelaer J.P., Lenz M.E., Thonar E.J., Manicourt D.H., Treatment with calcitonin prevents the net loss of collagen, hyaluronan and proteoglycan aggregates from cartilage in the early stages of canine experimental osteoarthritis, *Osteoarthritis Cartilage*, 12(11), 904-11, (2004).
- ERLACHER L., Ng C., Ullrich R., Krieger S., Luyten F., Presence of cartilage derived morphogenetic proteins in articular cartilage and enhancement of matrix replacement in vitro, *Arthrit Rheum*, 4(2), 263-73, (1998).
- EYRICH D., Brandl F., Appel B., Wiese H., Maier G., Wenzel M., Staudenmaier R., Goepferich A., Blunk T., Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering, *Biomaterials*, 1, 55-65, (2007).
- FARNDALE R.W., Buttle D.J., Barrett A.J., Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue, *Biochim Biophys Acta*, 883(2), 173-7, (1986).
- FELSON D.T., Zhang Y., An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention, *Arthritis & Rheumatism*, 41, 1343-1355, (1998).
- FLECHTENMACHER J., Huch K., Thonar E.J., Mollenhauer J.A., Davies S.R., Schmid T.M., Puhl W., Sampath T.K., Aydelotte M.B., Kuettner K.E., Recombinant human osteogenic protein 1 is a potent stimulator of the synthesis of cartilage proteoglycans and collagens by human articular chondrocytes, *Arthritis Rheum.*, 39(11), 1896-904, (1996).

- FORSYTH C.B., Pulai J., Loeser R.F., Fibronectin fragments and blocking antibodies to  $\alpha 2\beta 1$  and  $\alpha 5\beta 1$  integrins increase collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) productions by human articular chondrocytes, *Arthritis Rheum*, 46, 2368-76, (2002).
- GANNON F.H., Sokoloff L., Histomorphometry of the aging human patella: histologic criteria and controls, *Osteoarthritis and Cartilage*, 7, 173-81, (1999).
- GAY S., Kuchen S., Gay R.E., Neidhart M., Cartilage destruction in rheumatoid arthritis, *Ann Rheum Dis*, 61(Suppl 2), ii87, (2002).
- GEBHARD P.M., Gehrsitz A., Bau B., Soder S., Eger W., Aigner T., Quantification of expression levels of cellular differentiation markers does not support a shift in the cellular phenotype of osteoarthritic chondrocytes, *J Orthop Res*, 21, 96-101, (2003).
- GLASS G.G., Osteoarthritis, *Dis Mon*, 52, 343-62, (2006).
- GORDON N.F., Arthritis: Your Complete Exercise Guide, Human Kinetics Publishers, Champaign, IL, (1993). Pp: 100-20.
- HALL A.C., Horwitz E.R., Wilkins R.J., The cellular physiology of articular cartilage, *Exp Physiol*, 81, 535-45, (1996).
- HASHIMOTO S., Takahashi K., Amiel D., Coutts R.D., Lotz M., Chondrocyte apoptosis and nitric acid production during experimentally induced osteoarthritis, *Arthritis Rheum*, 41, 1266-74, (1998).
- HELLUNG-LARSEN P., Assaad F., Pankratova S., Saietz B.L., Skovgaard L.T., Effects of pluronic F-68 on tetrahymena cells: protection against chemical and physical stress and prolongation of survival under toxic conditions, *J Biotechnol*, 76, 185-95, (2000).
- HIDAKA C., Goodrich L.R., Chen C.T., Warren R.F., Crystal R.G., Nixon A.J., Acceleration of cartilage repair by genetically modified chondrocytes over expressing bone morphogenetic protein-7, *J Orthop Res*, 21(4), 573-83, (2003).
- HILLS B.A., Crawford R.W., Phil D., Normal and prosthetic synovial joints are lubricated by surface-active phospholipids, *J Arthroplasty*, 18(4), 499-505, (2003).
- HILLS R.L., Belanger L.M., Morris E.A., Bone morphogenetic protein 9 is a potent anabolic factor for juvenile bovine cartilage, but not adult cartilage, *J Orthop Res*, 23, 611-17, (2005).

HO M.L., Chang J.K., Wu S.C., Chung Y.H., Chen C.H., Hung S.H., Wang G.J., A novel terminal differentiation model of human articular chondrocytes in three dimensional cultures mimicking chondrocyte changes in osteoarthritis, *Cell Biol Int*, 30(3), 288-294, (2006).

HØEGH-ANDERSEN P., Tankó L.B., Andersen T.L., Lundberg C.V., Mo J.A., Heegaard A.M., Delaissé J.M., Christgau S., Ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoarthritis: validation and application, *Arthritis Res Ther*, 6, R169-R180, (2004).

HOEMANN C.D., Sun J., Légaré A., McKee M.D., Buschmann M.D., Tissue engineering of cartilage using an injectable and adhesive chitosan-based cell-delivery vehicle, *Osteoarthritis and Cartilage*, 13(4), 318-329, (2005).

HOMANDBERG G.A., Guo D., Ray C.L.S., Ding L.B.S., Mixtures of glucosamine and chondroitin sulfate reverse fibronectin fragment mediated damage to cartilage more effectively than either agent alone, *Osteoarthritis and Cartilage*, 14, 793-806, (2006).

HOMANDBERG G.A., Hui F., Wen C., Fibronectin fragment mediated cartilage chondrolysis: Suppression by antioxidants, *Biochim Biophys Acta*, 1317, 134-42, (1996).

HOMANDBERG G.A., Kang Y., Zhang J., Cole A.A., Williams J. M., A single injection of fibronectin into the rabbit knee joints enhances catabolism in the articular cartilage followed by reparative responses but also induces systematic effects in the noninjected joints, *Osteoarthritis and Cartilage*, 9, 673-83, (2001).

HOMANDBERG G.A., Meyers R., Williams J., Intraarticular injection of fibronectin fragments causes severe depletion of cartilage proteoglycans in vivo, *J Rheumatol*, 20, 1378-82, (1993).

HUSER C.A., Peacock M., Davies M.E., Inhibition of caspase-9 reduces chondrocyte apoptosis and proteoglycan loss following mechanical trauma, *Osteoarthritis and Cartilage*, 14, 1002-10, (2006).

HYTTINEN M.M., Toyras J., Lapveteläinen T., Lindblom J., Prockop D.J., Li S.W., Arita M., Jurvelin J.S., Helminen H.J., Inactivation of one allele of the type II collagen gene alters the collagen network in murine articular cartilage and makes cartilage softer, *Ann Rheum Dis*, 60, 262-68, (2001).

IKENOU T., Trindade M.C.D., Lee M.S., Lin E.Y., Schurman D.J., Goodman S.B., Smith R.L., Mechanoregulation of human articular chondrocyte aggrecan and type II collagen expression by intermittent hydrostatic pressure in vitro, *J Orthop Res*, 21, 110-16, (2003).

- KARLSON E.W., Mandl L.A., Aweh G.N., Sangha O., Liang M.H., Grodstein F., Total hip replacement due to osteoarthritis: the importance of age, obesity, and other modifiable risk factors, *Am J Med*, 114(2), 158-9, (2003).
- KIM H.A., Lee Y.J., Seong S.C., Choe K.W., Song Y.W., Apoptotic chondrocyte death in human osteoarthritis, *J Rheumatol*, 27, 455-62, (2000).
- KORHONEN R.K., Laasanen M.S., Töyras J., Lappalainen R., Helminen H.J., Jurvelin J.S., Fibril reinforced poroelastic model predicts specifically mechanical behavior of normal, proteoglycan depleted and collagen degraded articular cartilage, *J Biomech*, 9, 1373-79, (2003).
- Osteoarthritic disorders: workshop, Monterey, California, April 1994, ed: Kuettner K.E., Goldberg, V.M., *The Academy, Rosemont, IL*, (1995).
- Articular Cartilage and Osteoarthritis, ed: Kuettner, K.E., Schleyerbach, R., Peyron, J.G., Hascall, V.C., *Raven Press, New York*, (1992).
- LAFEBER F.P., van der Kraan P.M., Huber-Bruning O., van den Berg W.B., Bijlsma J.W., Osteoarthritic human cartilage is more sensitive to transforming growth factor beta than is normal cartilage, *Br J Rheum*, 32, 281-6, (1993).
- LEE C.S.D., Gleghorn J.P., Choi N.W., Cabodi M., Stroock A.D., Bonassar L.J., Integration of layered chondrocyte-seeded alginate hydrogel scaffolds, *Biomaterials*, 28, 2987-93, (2007).
- LEE R.C., Hannig J., Matthews K.L., Myerov A., Chen C.T., Pharmaceutical therapies for sealing of permeabilized cell membranes in electrical injuries, *Ann N Y Acad Sci*, 888, 266-73, (1999).
- LEEB B.F., Schweitzer H., Montag K., Smolen J.S., A metaanalysis of chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis, *J Rheumatol*, 27, 205-11, (2000).
- LEROUX M.A., Cheung H.S., Bau J.L., Wang J.Y., Howel D.S., Setton L.A., Altered mechanics and histomorphometry of canine tibial cartilage following joint immobilization, *Osteoarthritis and Cartilage*, 9, 633-40, (2001).
- LI X., Jin L., Balian G., Laurencin C.T., Anderson D.G., Demineralized bone matrix gelatin as scaffold for osteochondral tissue engineering, *Biomaterials*, 27(11), 2426-33, (2006).

LORENZ H., Richter W., Osteoarthritis: Cellular and molecular changes in degenerating cartilage, *Prog Histochem Cytochem*, 40, 135-63, (2006).

LORENZ H., Wenz W., Ivancic M., Steck E., Richter W., Early and stable upregulation of collagen type II, collagen type I and YKL40 expression levels in cartilage during early experimental osteoarthritis occurs independent of joint location and histological grading, *Arthritis Res Ther*, 7(1), R156-65, (2005).

LUFKIN E.G., Whitaker M.D., Nickelsen T., Argueta R., Caplan R.H., Knickerbocker R.K., Treatment of established postmenopausal osteoporosis with raloxifene: a randomized trial, *J Bone Miner Res*, 13, 1747-54, (1998).

LUYTEN F., Chen P., Paralkar V., Reddi H., Recombinant bone morphogenetic protein-4, transforming growth factor-beta 1, and activin A enhance the cartilage phenotype of articular chondrocytes in vitro, *Exp Cell Res*, 210(2), 224-29, (1994).

LUYTEN F.P., Cunningham N.S., Ma S., Muthukumaran N., Hammonds R.G., Nevins W.B., Woods W.L., Reddi A H., Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation, *J Biol Chem*, 264(23), 13377-80, (1989).

LÜBKE C., Ringe J., Krenn V., Fernah G., Pelz S., Kreusch-Brinker R., Sittinger M., Psulitschke M., Growth characterization of neo porcine cartilage pellets and their use in an interactive culture model, *Osteoarthritis and Cartilage*, 13, 478-87, (2005).

MAJUMDAR M.K., Wang E., Morris E.A., BMP-2 and BMP-9 promote chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcome the inhibitory effect of IL-1, *J Cellular Physiol*, 189, 275-84, (2001).

MANKIN H.J., Dorfman Scheck M., Sakovich L., Degenerative joint disease of the canine hip: experimental production by multiple papain and prednisone injections, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 86, 115-20, (1972).

MANKIN H.J., Thrasher A.Z., Water content and binding in normal and osteoarthritic human cartilage, *J Bone Joint Surg*, 57-A, 76-80, (1975).

MARKS J.D., Pan C.Y., Bushell T., Cromie W., Lee R.C., Amphiphilic, tri-block copolymers provide potent membrane-targeted neuroprotection, *FASEB J*, 15(6), 1107-9, (2001).

MARTEL-PELLETIER J., Pathophysiology of osteoarthritis, *Osteoarthr. Cartil.*, 12 (Suppl. A), S31-33, (2004).



- MASKARINEC S.A., Hannig J., Lee R.C., Lee K.Y., Direct observation of poloxamer 188 insertion into lipid monolayers, *Biophys J.*, 82(3),1453-9, (2002).
- MAUCK R.L., Nicoll S.B., Seyhan S.L., Ateshian G.A., Hung C.T., Synergistic action of growth factors and dynamic loading for articular cartilage tissue engineering, *Tissue Eng.*, 9(4), 597-611, (2003).
- MAUCK R.L., Soltz M.A., Wang C.C.B., Wong D.D., Chao P.H.G.C., Valhmu W.B., Hung C.T., Ateshian G.A., Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels, *Trans ASME*, 122, 252-60, (2000).
- MAUCK R.L., Wang C.C.B., Oswald E.S., Ateshian G.A., Hung C.T., The role of cell seeding density and nutrient supply for articular cartilage tissue engineering with deformational loading, *Osteoarthritis and Cartilage*, 11, 879-90, (2003).
- McALINDON T.E., LaValley M.P., Gulin J.P., Felson D.T., Glucosamine and chondroitin for treatment of osteoarthritis: a systematic quality assessment and metanalysis, *JAMA*; 283, 1469-75, (2000).
- MIZUNO S., Tateishi T., Ushida T., Glowacki J., Hydrostatic pressure enhances matrix synthesis and accumulation by bovine chondrocytes in three- dimensional culture, *J Cellular Physiol*, 193, 319-27, (2002).
- MIZUTA H., Kudo S., Nakamura E., Otsuka Y., Takagi K., Hiraki Y., Active proliferation of mesenchymal stem cells prior to chondrogenic repair response in full thickness defects of articular cartilage, *Osteoarthritis and Cartilage*, 12, 586-96, (2004).
- MOODY H.R., Brown C P , Bowden J.C., Crawford R.W., McElwain D.L.S., Oleyede A. O., In vitro degradation of articular cartilage: does trypsin treatment produce consistent results, *J Anat.*, 209, 259-67, (2006).
- OLIVIERO G., et al.
- MOUW J.K., Case N.D., Guldberg R.E., Plaas A.H.K., Levenston M.E., Variations in matrix composition and GAG fine structure among scaffolds for cartilage tissue engineering, *Osteoarthritis and Cartilage*, 13, 828-36, (2005).
- MURPHY J.M., Fink D.J., Hunziker E.B., Barry F.P., Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis, *Arthrit & Rheum*, 48(12), 3464-74, (2003).

- MURREL G.A., Jang D., Williams R.J., Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage, *Biochim Biophys Res Commun*, 206, 15-21, (1995).
- NA K., Park J.H., Sun B.K., Woo D.G., Chung H.M., Park K.H., Delivery of dexamethasone, ascorbate, and growth factor (TGF $\beta$ 3) in thermoreversible hydrogel constructs embedded with rabbit chondrocytes, *Biomaterials*, 27(35), 5951-57, (2006).
- National Institute of Health Sciences, 2006, <http://www.nihs.go.jp/dbcb/Bio-Topic/protein.pdf>. Last access date: September 2007.
- NESIC D., Whiteside R., Brittberg M., Wendt D., Martin I., Mainil-Varlet P., Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease, *Adv Drug Del*, 58, 300-22, (2006).
- NIEMINEN H.J., Töyräs J., Rieppo J., Nieminen M.T., Hirvonen J., Korhonen R., Jurvelin J.S., Real-time ultrasound analysis of articular cartilage degradation in vitro, *Ultrasound Med Biol.*, 4, 519-25, (2002).
- NILSSON O., Falk J., Ritzen E.M., Baron J., Savendahl L., Raloxifene acts as an estrogen agonist on the growth plate, *Endocrinology*, 144(4), 1481-85, (2003).
- NISHIDA Y., Knudson C.B., Knudson W., Osteogenic Protein-1 inhibits matrix depletion in a hyaluronan hexasaccharide-induced model of osteoarthritis, *Osteoarthritis and Cartilage*, 12, 374-82, (2004).
- NISHIDA Y., Knudson C.B., Kuettner K.E., Knudson W., Osteogenic protein-1 promotes the synthesis and retention of extracellular matrix within bovine articular cartilage and chondrocyte cultures, *Osteoarthritis and Cartilage*, 8(2), 127-36, (2000).
- O'DRISCOLL S.W., Articular cartilage regeneration using periosteum, *Clin Orthop Relat Res*, 367 (Suppl), S186-203, (1999).
- OLIVEIRA J.M., Rodrigues M.T., Silva S.S., Malafaya P.B., Gomes M.E., Viegas C.A., Dias I.R., Azevedo J.T., Mano J.F., Reis R.L., Novel hydroxyapatite/chitosan bilayered scaffold for osteochondral tissue-engineering applications: Scaffold design and its performance when seeded with goat bone marrow stromal cells, *Biomaterials*, 27, 6123-6137, (2006).
- OLIVERIA S.A., Felson D.T., Cirillo P.A., Reed J.L., Walker A.M., Body weight, body mass index, and incident symptomatic osteoarthritis of the hand, hip, and knee, *Epidemiology*, 10(2), 161-66, (1999).

- OSPELT C., Neidhart M., Gay R.E., Gay S., Synovial activation in rheumatoid arthritis, *Front Biosci*, 9, 2323-34, (2004).
- OZGOCMEN S., Kaya H., Fadillioglu E., Yılmaz Z., Effects of calcitonin, risedronate and raloxifene on erythrocyte antioxidant enzyme activity, lipid peroxidation, and nitric oxide in postmenopausal osteoporosis, *Arch Med Res*, 38, 196-205, (2007).
- PATWARI P., Cook M.N., Micco M.A., Blake S.M., James I.E., Kumar S., Cole A.A., Lark M.W., Proteoglycan degradation after injurious compression of bovine and human articular cartilage in vitro: interaction with exogenous cytokines, *Arthritis Rheum*, 48, 1292-1301, (2003).
- PHILLIPS D.M., Haut R.C., The use of a non-ionic surfactant (P188) to save chondrocytes from necrosis following impact loading of chondral explants, *J Orthop Res*, 22(5), 1135-1142, (2004).
- PISCOYA J.L., Fermor B., Kraus V.B., Stabler T.V., Gullak F., The influence of mechanical compression on the induction of osteoarthritis related biomarkers in articular cartilage explants, *Osteoarthritis and Cartilage*, 13, 1092-99, (2005).
- PRESTWOOD K.M., Guinness M., Mauchmore D.B., Lu Y., Wong M., Raisz L.G., A comparison of the effects of raloxifene and estrogen on bone in postmenopausal women, *J Clin Endocrinol Metab*, 85, 2197-202, (2000).
- QUINN T.M., Grodzinsky A.J., Byschmann M.D., Kim Y.J., Hunziker E.B., Mechanical compression alters proteoglycan deposition and matrix deformation around individual cells in cartilage explants, *J Cell Sci*, 111, 573-583, (1998).
- REID I.R., Eastell R., Fogelman I., Adachi J.D., Rosen A., Netelenbos C., Watts N.B., Seeman E., Ciaccia A.V., Draper M.W., A comparison of the effects of raloxifene and conjugated equine estrogen on bone and lipids in healthy postmenopausal women, *Arch Intern Med*, 164, 871-79, (2004).
- RICHETTE P., Dumontier M.F., Tahiri K., Widerak M., Torre A., Benallaoua M., Rannou F., Corvol M.T., Savouret J.F., Oestrogens inhibit interleukin 1 $\beta$ -mediated nitric oxide synthase expression in articular chondrocytes through nuclear factor-kappa B impairment, *Ann Rheum Dis*, 66(3), 345-50, (2007).
- RICHY F., Bruyere O., Elthgen O., Cucherat M., Henrotin Y., Reginster J.Y., Structural and symptomatic efficacy of glucosamine and chondroitin in knee osteoarthritis: a comprehensive meta-analysis, *Arch Intern Med*, 163(13), 1514-22, (2003).

RIEPPÖ J., Töyräs J., Nieminen M.T., Kovanen V., Hyttinen M.M., Korhonen R.K., Jurvelin J.S., Helminen H.J., Structure-function relationships in enzymatically modified articular cartilage, *Cells Tissues Organs*, 175(3), 121-32, (2003).

ROBERT L.M., Steven B.N., Sara S., Gerard A.A., Clark T.H., Synergistic Action of Growth Factors and Dynamic Loading for Articular Cartilage Tissue Engineering, *Tissue Eng*, 9(4), 597-611, (2003).

ROGERS A., Clowes C.A., Eastell P.R., Different effects of raloxifene and estrogen on interleukin  $\beta$ 1 and interleukin-1 receptor antagonist production using in vitro and ex vivo studies, *Bone*, 40, 105-10, (2007).

ROOS H., Adalberth T., Dahlberg L., Lohmander L.S., Osteoarthritis of the knee after injury to the anterior cruciate ligament or meniscus: the influence of time and age, *Osteoarthr Cartil*, 3, 261-67, (1995).

RUNDELL S.A., Baars D.C., Phillips D.M., Haut R.C., The limitation of acute necrosis in retro-patellar cartilage after a severe blunt impact to the in vivo rabbit patello-femoral joint, *J Orthop Res*, 23(6), 1363-1369, (2005).

SAILOR L.Z., Hewick R.M., Morris E.A., Recombinant human bone morphogenetic protein-2 maintains the articular chondrocyte phenotype in long-term culture, *J Orthop Res*, 14(6), 937-45, (1996).

SALVA C., Piganet A., Humbert L., Berenbaum F., Thiron S., Immature murine articular chondrocytes in primary culture: a new tool for investigating cartilage, *Osteoarthritis and Cartilage*, 13, 243-249, (2005).

SCHECK M., Sakovich L., Degenerative joint disease of the canine hip: experimental production by multiple papain and prednisone injections, *Clin Orthop Relat Res*, 86, 115-20, (1972).

SEEMAYER C.A., Neidhart M., Jüngel A., Gay R.E., Gay S., Synovial fibroblasts in joint destruction of rheumatoid arthritis, *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 2(3), 359-65, (2005).

SHAGEMANN J.C., Mrosek E.H., Landers E.H., Kurz H., Erggelet C., Morphology and function of ovine articular cartilage chondrocytes in 3-D hydrogel culture, *Cells Tissues Organs*, 182, 89-97, (2006).

- SHARMA G, Saxena RK, Mishra P., Differential effects of cyclic and static pressure on biochemical and morphological properties of chondrocytes from articular cartilage, *Clin Biomech*, 22(2), 248-55, (2007).
- SHERWOOD J.L., Riley S.L., Palazzolo R., Brown S.C., Monkhouse D.C., Cotes M., Griffith L.G., Landeen L.K., Ratcliffe A., A three-dimensional osteochondral composite scaffold for articular cartilage repair, *Biomaterials*, 23, 4739-51, (2002).
- SHUI C., Scutt A., Mild heat shock induces proliferation, alkaline phosphatase activity, and mineralization in human bone marrow stromal cells and Mg-63 cells in vitro, *J Bone Mineral Res*, 16(4), 731-41, (2001).
- SOLCHAGA L.A., Temenoff J.S., Gao J., Mikos A.G., Caplan A.I., Goldberg V.M., Repair of osteochondral defects with hyaluronan- and polyester-based scaffolds, *Osteoarthritis and Cartilage*, 13, 297-309, (2006).
- STANFORD C.M., Jacobson P.A., Eanes E.D., Lemabke L.A., Midura R.J., Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblast cell line (UMR 106-01 BSP), *J Biol Chem*, 270(16), 9420-8, (1995).
- STANTON H., Ung L., Fosang A.J., The 45 kDa collagen-binding fragment of fibronectin induces matrix metalloproteinase-13 synthesis by chondrocytes and aggrecan degradation by aggrecanases, *Biochem J*, 364(Pt 1), 181-90, (2002).
- STÖVE J., Schneider-Wald B., Scharf H.P., Schwarz M.L., Bone morphogenetic protein 7 (bmp-7) stimulates proteoglycan synthesis in human osteoarthritic chondrocytes in vitro, *Biomed Pharmacother*, 60, 639-43, (2006).
- STUDER R., Jaffurs D., Stefanovic-Racic M., Robbins P.D., Evans C.H., Nitric oxide in osteoarthritis, *Osteoarthritis and Cartilage*, 7, 377-79, (1999).
- SUH J.K., Aoren A., Muzzonigro T.S., Disilvestro M., Fu F.H., Injury and repair and articular cartilage: scientific issues, *Operative Techniques in Orthopaedics*, 7, 270-78, (1997).
- SWOBODA B., Epidemiological arthrosis research, *Orthopade*, 11, 834-40, (2001).
- TAGUCHI T., Sawabe Y., Kobayashi H., Moriyoshi Y., Kataoka K., Tanaka J., Preparation and characterization of osteochondral scaffold, *Materials Science and Engineering: C*, 24(6-8), 881-885, (2004).

TALLHEDEN T., Bengtsson C., Bransting C., Sjogren-Jansson E., Carlsson L., Peterson M., Brittberg M., Lindahl A., Proliferation and differentiation potential of chondrocytes from osteoarthritic patients, *Arthritis Res Ther*, 7, 560-68, (2005).

TALLHEDEN T., Karlsson C., Brunner A., van der Lee J., Hagg R., Tommashi R., Lindahl A., Gene expression during redifferentiation of human articular chondrocytes, *Osteoarthritis and Cartilage*, 12, 525-35, (2004).

TAMAI N., Myoui A., Hirao M., Kaito T., Ochi T., Tanaka J., Takaoka K., Yoshikawa H., A new biotechnology for articular cartilage repair: subchondral implantation of a composite of interconnected porous hydroxyapatite, synthetic polymer (PLA-PEG), and bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2), *Osteoarthritis and Cartilage*, 13, 405-17, (2005).

TCHETINA R., Ono M., Squires G., Poole A.R., Increased type II collagen degradation and very early focal cartilage degeneration is associated with upregulation of chondrocyte differentiation related genes in early human articular lesions, *J Rheumatol*, 32(5), 876-86, (2005).

TOYODA T., Seedhom B.B., Yao J.Q., Kirkham J., Brookes S., Bonass W.A., Hydrostatic pressure modulates proteoglycan metabolism in chondrocytes seeded in agarose, *Arth Rheumat*, 48(10), 2865-72, (2003).

TRINDADE M.C.D., Shida J.I., Takashi I., Lee M.S., Lin E.Y., Yaszay B., Yerby S., Smith R.L., Intermittent hydrostatic pressure inhibits matrix metalloproteinase and pro-inflammatory mediator release from human osteoarthritic chondrocytes in vitro, *Osteoarthritis and Cartilage*, 12, 729-35, (2004).

URIST M.R., Bone formation by autoinduction, *Science*, 50, 893-99, (1965).

VANWANSEELE B., Lucchinetti E., Stussi E., The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concepts and future directions, *Osteoarthritis and Cartilage*, 10, 408-19, (2002).

VOGEL V.G., Costantino J.P., Wickerham D.L., Cronin W.M., Cecchini R.S., Atkins J.N., Bevers T.B., Fehrenbacher L., Pajon E.R. Jr., Wade J.L. 3rd, Robidoux A., Margolese R.G., James J., Lippman S.M., Runowicz C.D., Ganz P.A., Reis S.E., McCaskill-Stevens W., Ford L.G., Jordan V.C., Wolmark N., Effects of tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes, *JAMA*, 295(23), 2727-41, (2006).

TALLHEDEN T., Bengtsson C., Bransting C., Sjogren-Jansson E., Carlsson L., Peterson M., Brittberg M., Lindahl A., Proliferation and differentiation potential of chondrocytes from osteoarthritic patients, *Arthritis Res Ther*, 7, 560-68, (2005).

TALLHEDEN T., Karlsson C., Brunner A., van der Lee J., Hagg R., Tommashi R., Lindahl A., Gene expression during redifferentiation of human articular chondrocytes, *Osteoarthritis and Cartilage*, 12, 525-35, (2004).

TAMAI N., Myoui A., Hirao M., Kaito T., Ochi T., Tanaka J., Takaoka K., Yoshikawa H., A new biotechnology for articular cartilage repair: subchondral implantation of a composite of interconnected porous hydroxyapatite, synthetic polymer (PLA-PEG), and bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2), *Osteoarthritis and Cartilage*, 13, 405-17, (2005).

TCHETINA R., Ono M., Squires G., Poole A.R., Increased type II collagen degradation and very early focal cartilage degeneration is associated with upregulation of chondrocyte differentiation related genes in early human articular lesions, *J Rheumatol*, 32(5), 876-86, (2005).

TOYODA T., Seedhom B.B., Yao J.Q., Kirkham J., Brookes S., Bonass W.A., Hydrostatic pressure modulates proteoglycan metabolism in chondrocytes seeded in agarose, *Arth Rheumat*, 48(10), 2865-72, (2003).

TRINDADE M.C.D., Shida J.I., Takashi I., Lee M.S., Lin E.Y., Yaszay B., Yerby S., Smith R.L., Intermittent hydrostatic pressure inhibits matrix metalloproteinase and pro-inflammatory mediator release from human osteoarthritic chondrocytes in vitro, *Osteoarthritis and Cartilage*, 12, 729-35, (2004).

URIST M.R., Bone formation by autoinduction, *Science*, 50, 893-99, (1965).

VANWANSEELE B., Lucchinetti E., Stussi E., The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concepts and future directions, *Osteoarthritis and Cartilage*, 10, 408-19, (2002).

VOGEL V.G., Costantino J.P., Wickerham D.L., Cronin W.M., Cecchini R.S., Atkins J.N., Bevers T.B., Fehrenbacher L., Pajon E.R. Jr., Wade J.L. 3rd, Robidoux A., Margolese R.G., James J., Lippman S.M., Runowicz C.D., Ganz P.A., Reis S.E., McCaskill-Stevens W., Ford L.G., Jordan V.C., Wolmark N., Effects of tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes, *JAMA*, 295(23), 2727-41, (2006).

WAKITANI S., Imoto K., Yamamoto T., Saito M., Murata N., Yoneda M., Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees, *Osteoarthritis and Cartilage*, 10, 199-206, (2002).

WEISSER J., Rahfoth B., Timmermann A., Aigner T., Brauer R., Vonder Mark K., Role of growth factors in rabbit articular cartilage repair by chondrocytes in agarose, *Osteoarthritis and Cartilage*, 9 (Suppl 1), S48-54, (2001).

WONG M., Siegrist M., Goodwin K., Cyclic tensile strain and cyclic hydrostatic pressure differentially regulate expression of hypertrophic markers in primary chondrocytes, *Bone*, 33, 685-93, (2003).

WOZNEY J.M., Rosen V., Celeste A.J., Mitscock L.M., Whitters M.J., Kriz R.W., Hewick R.M., Wang E.A., Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities, *Science*, 242(4885), 1528-34, (1988).

WOZNEY J.M., The bone morphogenetic protein family and osteogenesis, *Mol Reprod Dev*, 32(2), 160-67, (1992).

YANG I.H., Kim Y.H., Sun H.J., Kim S.J., Lee J.W., Comparison of phenotypic characterization between alginate and pellet culture systems as chondrogenic differentiation models for human mesenchymal stem cells, *Yonsei Med J*, 45(5), 891-900, (2004).

YEH T.T., Wu S.S., Lee C.H., Wen Z.H., Lee H.S., Yang Z., Nimni M.E., Han B., The short term therapeutic effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on collagenase-induced lumbar facet joint osteoarthritis in rats, *Osteoarthritis and Cartilage*, (in press), (2007).



## Öneriler

Kemik morfojenik protein-9, raloksifen ve pluronik F-68 ajanlarının osteoartiritik hücreler üzerine etkileri yapılan araştırmalar sonucunda bu konuda ileride yapılacak çalışmalara aşağıdaki öneriler getirilmektedir:

1. In vitro ve in vivo çalışmalarla tekli ve kombinasyon uygulamaların daha uzun süreçteki etkilerinin incelenmesi
2. Tedavinin ilk başında Pluronik F68, daha sonra Ral ve belli süreç sonrasında KMP9 uygulaması şeklinde aşamalı yapılmasının etkilerinin in vitro ve in vivo araştırılması.
3. Klinik uygulamalara geçilebilmesi için insan kaynaklı osteoartiritik hücrelerde bu ajanlarının etkilerinin incelenmesi

**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

<b>Proje No:</b> 104T496
<b>Proje Başlığı:</b> Farklı Ajanların Dinamik-Statik Kuvvetlerin Stimulasyonu Altında Osteoartrit Tedavisine Yönelik Etkilerinin Hücre Kültüründe İncelenmesi
<b>Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar:</b> Y.Doç. Dr. Ayşen Tezcaner, Y.Doç. Dr. Dilek Keskin, Y. Doç. Dr Senih Gürses, Ayşegül Kavas, Parisa Sharafi
<b>Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:</b> ODTÜ Mühendislik Bilimleri Bölümü
<b>Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:</b>
<b>Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:</b> 01.06.2005-31.12.2007
<b>Öz (en çok 70 kelime):</b> Bu projede kemik morfojenik protein 9 (KMP9), raloksifen (Ral), ve pluronik F68'in (PLF68) tekli ve çoklu kombinasyonlarının osteoartrit tedavisinde etkinlikleri azasitidin ile oluşturulan in vitro osteoartrit modelinde incelenmiştir. Ajanların biyoetkinlikleri osteoartritik hücrelerin çoğalma, matriks sentezleme, ve mekanik özelliklerine etkilerinin hücre kültür şartlarında araştırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. 5 ng/ml KMP9, 5 µM Ral, ve 12 mg/ml PLF68 en etkin dozlar olarak belirlenmiştir. En etkin dozun kullanıldığı üçlü kombinasyon ikili gruplara göre hidrostatik ve statik basınç altında daha olumlu sonuçlar vermiştir.
<b>Anahtar Kelimeler:</b> osteoartrit, kemik morfojenik protein 9, raloksifen, pluronik F68, in vitro model
<b>Projeden Yapılan Yayınlar:</b> İlk makale Osteoarthritis and Cartilage dergisine yollanma aşamasındadır. 2. makale de hazırlanmaktadır.