T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

KÖPEKLERDE KALÇA DİSPLAZİSİ İLE CHST14 GENİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN TÜM GEN DİZİ ANALİZİ İLE BELİRLENMESİ

ERDAL TOPPARMAK

DANIŞMAN
DOÇ. DR. IRAZ AKIŞ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI

İSTANBUL-2021

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Erdal Topparmak

İTHAF

Dünyaya aynı pencereden baktığım tüm dostlara...

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın tüm aşamalarında büyük bir sabırla emeğini esirgemeyip bana destek olan tanıdığım en hakiki bilim insanlarından sayın **Doç. Dr. Iraz Akış Akad**'a,

Gerçek bir Cumhuriyet beyefendisi olduğunu düşündüğüm **Prof. Dr. Kemal Özdem Öztabak**'a ve değerli hocam **Prof. Dr. Kemal Altunatmaz**'a,

Hayatımın her döneminde tüm zorluklara rağmen beni destekleyen ve çok büyük emek veren canım annem ve ablama,

En içten teşekkürlerimi sunarım…

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: TDK-2018-29696

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ X
ÖZET ..... Xİİİ
ABSTRACT ..... XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ 15
2. GENEL BİLGİLER 17
2.1. İnsan ve Köpeklerde Kalça Displazisi 17
2.2. Gelişimsel Kalça Displazisi için En Uygun Hayvan Modeli olarak Köpek Kalça Displazisi 18
2.3. Gelişimsel Kalça Displazisi – Köpek Kalça Displazisi Etiyoloji ve Patogenezi 20
2.3.1. Köpek Kalça Displazisi Gelişme Süreci 22
2.4. Tanı 23
2.4.1. Fizik Muayene 26
2.4.2. Diyagnostik Görüntüleme 27
2.5. Kalça Displazisinde Potansiyel Moleküler Yolaklar 28
2.6. KKD'nin Genetik Altyapısı ve Kalıtsallığı 30
2.6.1. Tedavide Genetik Temelli Yaklaşımlar 30
2.6.2. SNP ve Genom Boyu İlişki Çalışması (GWAS) Analizleri 31
2.7. Karbonhidrat Sülfotransferaz Genleri 33
2.7.1. Heparan Sülfotransferazlar 33
2.7.2. Galaktoz/N-asetilgalaktozamin/N-asetilglukozamin-6-O-sülfotransferazlar 34
2.7.3. CHST Genleri ve KKD 34
2.8. CHST14 Geni ve Karbonhidrat Sülfotransferaz-14 Enzimi 37
3. GEREÇ VE YÖNTEM 40

3.1. Hayvan Materyali ve DNA Örnekleri 40
3.2. Hasta ve Kontrol Grubu Olgularının Seçilmesi 43
3.3. Kalça Displazi Skoru Hesaplama Kriterleri 43
3.4. Kullanılan Cihazlar 44
3.5. Kullanılan Kimyasal Maddeler 45
3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) 45
3.6.1. Primer Tasarımı 45
3.6.2. Primer Solüsyonunun Hazırlanması 46
3.6.3. dNTP Solüsyonunun Hazırlanması 46
3.6.4. PZR Optimizasyonu 46
3.6.5. PZR Bileşenleri ve Şartları 47
3.7. Agaroz Jel Elektroforezi 47
3.8. DNA Dizileme İşlemleri 48
3.9. DNA Dizi Analizi 49
3.10. İstatistiki Analiz 49
4. BULGULAR 50
4.1. *CHST14* geninde belirlenen tek nükleotid polimorfizmleri 50
4.1.1. *CHST14* geni 7.640.710 pozisyonunda bulunan G/C polimorfizmi 50
4.1.2. *CHST14* geni 7.642.721 pozisyonda bulunan C/T polimorfizmi 52
4.1.3. *CHST14* geni 7.642.918 pozisyonda bulunan C/G polimorfizmi 53
4.1.4. *CHST14* geni 7.643.323 pozisyonda bulunan C/T polimorfizmi 54
5. TARTIŞMA 58
5.1. CHST14 geni 1. ekzonda bulunan polimorfizmler 61
5.2. CHST14 geni 3’ UTR bölgesindeki polimorfizmler 63
5.3. CHST14 ekspresyonundaki değişikliklerin KKD ile ilişkisi 64
5.4. Çalışmanın kısıtları 67
5.5. Gelecekteki Çalışmalar 68
5.6. Sonuç 68
KAYNAKLAR 70
ETİK KURUL KARARI 86
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 88
ÖZGEÇMİŞ 89

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1:Köpek ve İnsanda Demografi, Etiyoloji ve Patolojinin Karşılaştırılması….19
Tablo 2-2:Köpek kalça displazisinde gözlenen intraartiküler ve radyografik değişikliklerin gelişim süreci…..…….22
Tablo 2-3:Köpeklerde CHST Genlerinin Lokasyon, Ürün ve Fonksiyonları..... 35
Tablo 3-1:Vaka ve kontrol gruplarına dahil edilmiş köpeklerin ırk, yaş, cinsiyet ve kalça displazi skor bilgileri. 40
Tablo 3-2:*CHST14* geninin 5 parçada dizilenmesinde kullanılan primerler. 45
Tablo 3-3:PZR Bileşenleri 47
Tablo 4-1:*CHST14* genindeki polimorfizmlerin köpeklerde kalça displazisi ile ilişkisi.56
Tablo 4-2:*CHST14* genindeki polimorfizmlere ait genotip frekansları 57

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: (A) Köpek femur başı, teres ligamenti ve asetabulumun makroskopik kesiti; (B) İnsan femur başı, teres ligamenti ve asetabulumun makroskopik kesiti 20
Şekil 2-2: A - Köpek Kalça Ekleminin Anatomik Yapıları……25
Şekil 2-3: Köpek yan yatırılmış konumdayken uygulanan Ortolani testi..... 26
Şekil 2-4: Distraksiyon indeksinin (DI) hesaplanması 28
Şekil 2-5: Dermatan Sülfat ve Kondroitin Sülfat Biyosentezi..... 38
Şekil 2-6: Dermatan 4-sülfotransferaz aktivitesi. 39
Şekil 4-1: *CHST14* geni 4. bölgede tanımlanan G/C polimorfizmi……51
Şekil 4-2: *CHST14* geni 7.642.721 pozisyonda tanımlanan C<T polimorfizmi……52
Şekil 4-3: *CHST14* geni 4. bölgede tanımlanan G/C polimorfizmi……53
Şekil 4-4: *CHST14* geni 5. bölgede tanımlanan C/T polimorfizmi 54

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

A	:Adenin
ATCS	:Adducted-Thumb Clubfoot Sendromu
C	:Sitozin
C4ST	:Kondroitin-4-sülfotransferaz
C6S	:Kondroitin-6-sülfotransferaz
CHST	:Karbonhidrat sülfotransferaz
COMP	:Kıkırdak oligomerik matriks proteini
D4ST1	:Dermatan-4-sülfotransferaz-1
dATP	:Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	:Deoksisitozin trifosfat
DEH	:Dejeneratif eklem hastalığı
dGTP	:Deoksiguanozin trifosfat
DI	:Distraksiyon İndeksi
DNA	:Deoksiribonükleik asit
dNTP	:Deoksinükleotid trifosfat
DS	:Dermatan Sülfat
dTTP	:Deoksitimidin trifosfat
ECM	:Ekstraselüler matriks
EDS	:Ehlers-Danlos Sendromu
EMBL	:European Molecular Biology Laboratory
FAS	:Femoroasetabular sıkışma
FBN2	:Fibrillin-2
FCI	:Fédération Cynologique Internationale
G	:Guanozin

GAG :Glikozaminoglikan

GKD :Gelişimsel kalça displazisi

GluAs :Glukuronik asit

GST :Galaktoz/N-asetilgalaktozamin/N-asetilglikozamin 6-*O*-sülfotransferaz

GWAS :Genom Boyu İlişki Çalışması

HtrA1 :High-temperature required A1

IdoA :İduronik asit

IGF :İnsülin-benzeri büyüme faktörü

KEL :Kalça eklem laksitesi

KKD :Köpek kaçla displazisi

KS :Kondroitin sülfat

KS/DS-5 Epi :Kondroitin sülfat/dermatan sülfat-5 epimeraz

MAPK :Mitojenle aktive olan protein kinaz

$MgCl_2$:Magnezyum klorür

miRNA :Mikro RNA

NAD :Nikotinamid adenin dinükleotid

NAGal :N-Asetilgalaktozamin

NANOS1 :C_2HC-tip çinko parmak-1

OA :Osteoartrit

PAP :Pankreas ilişkili protein

PAPS :3'-fosfoadenozin-5'-fosfosülfat

PennHIP® :Pensilvanya Üniversitesi Kalça İyileştirme Programı

PZR :Polimeraz zincir reaksiyonu

QTL :Kantitatif karakter lokusları

RBP :RNA bağlayıcı protein

REG3A :Regenerating islet derived gamma-3A

RNA :Ribonükleik Asit

SELL :Selektin

SNP :Tek nükleotid polimorfizmi

T :Timin

TEB :Tris borik asit edityum bromür

TGF-β1 :Tümör growth faktör-beta1

TNF :Tümör Nekroz Faktör

UTR : Çevrilmeyen Bölge

χ^2 :Ki-kare

ÖZET

Topparmak, E. (2020). Köpeklerde Kalça Displazisi ile CHST14 Geni Arasındaki İlişkinin Tüm Gen Dizi Analizi ile Belirlenmesi. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyokimya ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Köpek Kalça Displazisi (KKD), köpek ırklarında oldukça yaygın görülen karmaşık poligenik kalıtsallık özellikler gösteren gelişimsel bir bozukluktur ve kesin tedavisi olmadığı için veteriner hekimliğinde temel amaç damızlık seçimiyle kontrollü üremenin sağlanmasıdır. Bu çalışmada KKD patofizyolojisinde etkili olabilecek CHST14 genindeki SNP'ler ile KKD arasında ilişki analizi yapılması amaçlanmıştır. Bunun için İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi-Cerrahpaşa Cerrahi Kliniği'ne gelen 46 adet kalça displazisi tanısı konmuş köpek ve 16 adet kalça displazisi olmayan köpekten, sırasıyla, vaka ve kontrol grupları oluşturulmuş, izole edilen DNA örneklerinde CHST14 geni beş bölge halinde PZR ile çoğaltılmıştır. DNA dizi analizi sonucunda köpek CHST14 geninde dört adet SNP belirlenmiştir. CHST14 geni 1. ekzonda bir adet C/G transversiyonu ve bir adet T/C transisyonu, 3'-UTR bölgesinde ise bir adet G/C transversiyonu ve bir adet C/T transisyonu tanımlanmıştır. Tespit edilen dört SNP'den üçü veritabanlarında mevcutken, bir tanesi ilk defa bu çalışmada ortaya çıkartılmıştır. 3'-UTR bölgesinde bulunan iki adet SNP'in KKD ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. İlişkili varyasyonların CHST14 ekspresyonunun düzenlenmesinde görevli olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Glikozaminoglikan biyosentezinde görev alan CHST14 enziminin sentez miktarı veya fonksiyonunda ortaya çıkabilecek değişikliklerin, ektraselüler matriksin yapısında bozulmaya yol açarak KKD'ye katkı sağladığı öne sürülebilir. İleride yapılacak daha büyük ölçekli çalışmalarla KKD'ye katkısı olan daha fazla SNP'nin tespit edilmesi, kas-iskelet sisteminde etkili biyokimyasal yolaklarda görev alan farklı proteinleri kodlayan genlerin aday gen potansiyellerinin belirlenmesi veteriner hekimlik açısından önemli olduğu kadar, insanlarda görülen gelişimsel kalça displazisi (GKD)'nin aydınlatılmasına da katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Köpek Kalça Displazisi, SNP, CHST14, tüm gen dizileme, ilişki analizi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: TDK-2018-29696

ABSTRACT

Topparmak, E. (2006). Determination of Association between Canine Hip Dysplasia and CHST14 Gene by Whole Gene Sequencing. Istanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Biochemistry. Doctorate Thesis, Istanbul.

Canine Hip Dysplasia (CHD) is a developmental disorder with complex polygenic hereditary characteristics that is highly prevalent among dog breeds, and due to lack of definitive treatment, main target of veterinary medicine is controlled reproduction with selective breeding. The purpose of this study is analysis of the association between CHD and SNPs in CHST14 gene that may contribute to CHD pathophysiology. In this respect, case and control groups were constructed from 46 dogs with hip dysplasia and 16 dogs with no hip dysplasia, respectively, that were brought to Istanbul University Veterinary Faculty - Cerrahpaşa Department of Surgery. CHST14 gene from isolated DNA samples was amplified in five regions by PCR. DNA sequence analysis revealed four SNPs in CHST14 gene. A C/G transversion and a T/C transition are identified in Exon-1 and a G/C transversion and a C/T transition are identified in 3'-UTR of CHST14 gene. Three of the 4 SNPs can be found in database while one of them is discovered for the first time. Both SNPs in 3'-UTR are associated with CHD. It is concluded that associated variations may take part in regulation of CHST14 expression. Results suggest that possible changes in synthesized amount or function of CHST14 enzyme, taking part in glycosaminoglycan biosynthesis, may contribute to CHD by impairment in extracellular matrix structure. Large-scale prospective studies for identification of more SNPs that contribute to CHD, determination of potential candidate genes encoding various proteins that take part in biochemical pathways effecting musculoskeletal system are important in veterinary medicine as well as contribution to more comprehensive understanding of developmental dysplasia of hip (DDH) in humans.

Key Words: Canine Hip Dysplasia, SNP, CHST14, whole gene sequencing, association analysis.

This study was funded by Scientific Research Projects Coordination Unit of Istanbul University-Cerrahpasa. Project number: TDK-2018-29696

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Köpek kalça displazisi (KKD), tüm dünyada köpeklerde görülen en yaygın gelişimsel ortopedik bozukluklardan biridir [Bartolome ve ark., 2015]. Özellikle büyük ırklarda prevalansı yüksektir, kalça malformasyonuyla birlikte sekonder osteoartrite ve kronik kıkırdak dejenerasyonuna neden olur [Sanches-Molano ve ark., 2015]. Köpeklerde bu süreç, insan gelişimsel kalça displazisi (GKD) ve buna eşlik eden sekonder osteoartrit süreciyle benzerdir. Her iki türde de kalçada femur başı ossifikasyonunda gecikme, kalça ekleminde laksite ve subluksasyon gözlenmektedir [Todhunter ve ark., 2003; Boene-Boonekamp ve ark., 1998].

Multifaktöryel ve poligenik bozukluklar olan KKD ve insan GKD orta düzeyde kalıtsallık gösterir. Bu karmaşık poligenik geçiş örüntüsünün çevresel faktörlerden etkilendiği bilinmektedir [Bartolome ve ark., 2015]. Kesin tedavisi olmamakla birlikte cerrahi müdahaleden fayda sağlanabilmekte, diyet değişiklikleriyle de hastalığın seyri hafifleyebilmektedir [Sanchez-Molano ve ark., 2015]. KKD insidansını azaltmak için fenotipe dayalı ıslah çalışmaları tek başına başarılı olamamıştır. Bu yüzden bunlara ek olarak tanısal genetik yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan biri olan genetik seleksiyon ile prediktif genetik bilgiye dayalı ıslah sonucunda ortaya çıkacak genetik özelliklerin tahmini mümkün olmaktadır. Mikrosatelit belirteçleri kullanılan moleküler genetik çalışmalarla KKD için kantitatif karakter lokusları (QTL) belirlenmiştir [Guo ve ark., 2011; Sanchez-Molano ve ark., 2013; Stock ve Distl., 2010; Todhunter ve ark., 2005; Mateescu ve ark., 2008; Chase ve ark., 2004; 2005].

Köpek genomunun 2005 yılında dizilenmesiyle 2,5 milyondan fazla tek nükleotid polimorfizmi (single nucleotide polymorphism-SNP) karakterize edilmiş, bunun sonucunda SNP genotip mikro-dizileri geliştirilmiştir. Böylece KKD'nin genetik altyapısının açığa çıkarılması için yeni bir çalışma alanı doğmuş, genetik belirteç olarak farklı SNP kombinasyonları tayin edilerek prediktif modeller oluşturulmuştur [Lindblah-Toh ve ark., 2005; Ehret ve ark., 2011; Eleftherohorinou ve ark., 2009; Gudmundsson ve ark., 2007].

Karbonhidrat sülfotransferaz (CHST) genleri büyük çoğunlukla glikozaminoglikan (GAG) biyosentezinde rol alan ve 1-15 arasında numaralandırılan genlerdir. Köpeklerde yapılan çalışmalarda *CHST3* geninin yakınında bulunan bir SNP ile KKD arasında ilişki olduğu bulunmuştur [Bartolome ve ark., 2015]. *CHST3* geninin kodladığı enzim kondroitin sülfat sentezi sırasında sülfatlama sürecinde yer almaktadır.

Köpeklerde 30. kromozomda yer alan karbonhidrat sülfotransferaz - 14 (*CHST14*) geninin kodladığı karbonhidrat sülfotransferaz enzimi, sülfatlanma ile dermatan sülfatın stabilizasyonunu sağlar. *CHST14* mutasyonlarında CHST14 aktivitesi, dolayısıyla epimerizasyon/sülfatlanma dengesi bozulmaktadır [Penc ve ark., 1998; Trowbridge ve Gallo., 2002].

CHST14 geni insanlarda dermatan-4-sülfotransferaz-1 (D4ST1) enzimini kodlamaktadır. Bu gende mutasyon taşıyan insanlarda yapılan transfeksiyon deneyleri ve fibroblast lizatlarından hazırlanan enzim testleri D4ST1 aktivitesinin kaybolduğunu ve hastaların fibroblastlarındaki glikozaminoglikan kompozisyonunun farklı olduğunu göstermiştir. Kollajen fibrillerin temel düzenleyicisi olan dekorin proteoglikanlarındaki dermatan sülfat da tamamen kaybolmakta, fibroblastlarda ise kondroitin sülfat miktarı artmaktadır [Miyake ve ark., 2010]. D4ST1'in dermatan sülfat ve dermatan sülfat proteoglikanlarının sentezinde oynadığı anahtar role bağlı olarak çeşitli proteoglikanların etkileşimleri, dolayısıyla ekstraselüler matriks (ECM) stabilitesi bozulur. Bu etkiler insanlarda klinik olarak ciltte aşırı esneklik, eklem hipermobilitesi ve genel bağ dokusu kırılganlığı ile karakterize Ehlers-Danlos sendromlu hastalarda belirgindir. Dermatan sülfat ciltte, kan damarlarında, akciğerlerde, kalp kapakçıklarında ve tendonlarda bulunur. Yara iyileşmesi ve pıhtılaşmada da fonksiyoneldir. *CHST14* mutasyonu olan hastalarda kanama zamanının uzadığı bildirilmiştir [Dündar ve ark., 2009]. Glikozaminoglikanların doğru sülfatlanması brakiyel yayların, nöral tüpün ve sempatik gangliyonların gelişimi için de önemli görülmektedir [Kosho ve ark., 2010]. Köpeklerdeki *CHST14* geninin ürünü olan CHST enzimi de GAG biyosentezinde rol alarak bu metabolik yollara katkı sağlamaktadır [Todhunter ve Lust, 2003; Friedenberg ve ark., 2011; Todhunter ve ark., 1997; Foels, 2000; Madsen ve ark., 1991].

Çalışmada KKD patofizyolojisinde etkili olabilecek *CHST14* genindeki SNP'ler ile KKD arasında ilişki analizi yapılması amaçlanmıştır. Genetik yatkınlığın çok önemli bir rol oynadığı KKD açısından aday gen olabilecek *CHST14* genindeki polimorfizmlerin kalça displazisiyle ilişkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir. KKD'nin genetik altyapısına dair elde edilecek verilerin köpek yetiştiriciliğinde uygulanacak ıslah çalışmalarında genotipe dayalı seleksiyon aşaması için önemli bir veritabanı oluşturacağı, insanlarda kalça displazisi gelişim sürecinin aydınlatılmasında da destek veri sağlayacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnsan ve Köpeklerde Kalça Displazisi

Kalça displazisi, çok sayıda memeli türünde görülen, köpeklerde ve insanlarda ise sık rastlanan kalıtımsal bir bozukluktur. Hem insan hem de köpeklerde kalçada oluşan instabilite ve gelişen sekonder kalça osteoartriti yaşam kalitesini bozmaktadır [Cachon ve ark., 2010; Clemens ve ark., 2006; Smith, 2001; Todhunter ve ark., 2003].

Köpek kalça displazisi (KKD) kongenital olmayan, karmaşık bir gelişimsel anormalliktir. Koksofemoral eklemde malformasyonla karakterize bir patolojidir; kalça eklem dejenerasyonu, ağrılı osteoartrit ve sakatlıkla sonuçlanabilir [Clemens ve ark., 2006; Smith, 2001; Todhunter ve ark., 2003]. İlk kez 1935 yılında ABD'de tanımlanmıştır. Karışık ve saf ırklarda görülebilen, prevalansı %75'e kadar çıkabilen, özellikle büyük ırklarda yaygın olarak görülen önemli bir sorundur. ABD'de yaklaşık 70 milyon evcil köpeğin yaşamını etkilemektedir. Hospitalize köpek popülasyonunun ise yaklaşık %20'sini KKD teşkil etmektedir. [Breur ve ark., 2001].

İnsanlarda görülen kalça displazisi ise gelişimsel kalça displazisi (GKD) olarak adlandırılır. Prevalansı farklı toplumlarda %5,4 ile %12,8 arasında değişmektedir. Taramaya tabi tutulan yenidoğanların %0,5-%4,2 arasında bir oranı tedavi almaktadır [Boere-Boonekamp ve ark., 1998; Peled ve ark., 2008]. GKD insanlarda kalça ekleminde osteoartrit (OA) prevalansını arttıran en önemli hastalıktır. Altmış yaş üzeri bireylerde kalça ekleminde OA prevalansı %4,4 - %5,3 arasında değişirken, radyografik araştırmalara göre idiyopatik kalça eklem OA vakalarının %20 ila %50'sinde eş zamanlı GKD söz konusudur. KKD de GKD gibi, tedavi edilmediğinde OA'ya neden olur. [Weinstein, 1987; Jacobson ve Sonne-Holm, 2005]. Bu süreç köpeklerde, köpeklerin insanlardan kısa olan yaşam sürelerine uygun şekilde, süratle, köpek 1-2 yaşına gelene kadar OA'ya progrese olmaktadır [Pascual-Garrido ve ark., 2017].

Erkek ve dişi köpeklerde KKD eşit oranda görülürken, insan GKD vakalarının %80'i kadındır. Hastalığın kesin tedavisi söz konusu değildir. Bazı KKD vakalarında, hızlı büyümeyi azaltmak amacıyla kalori, besinsel kalsiyum ve D vitamini kısıtlaması yarar sağlayabilmektedir. Tedavi seçenekleri semptomatik olmanın ötesine geçemez ve ileri evrede kalça replasmanına ihtiyaç duyulmaktadır [Chan ve ark., 1997; Fries ve Remedios, 1995].

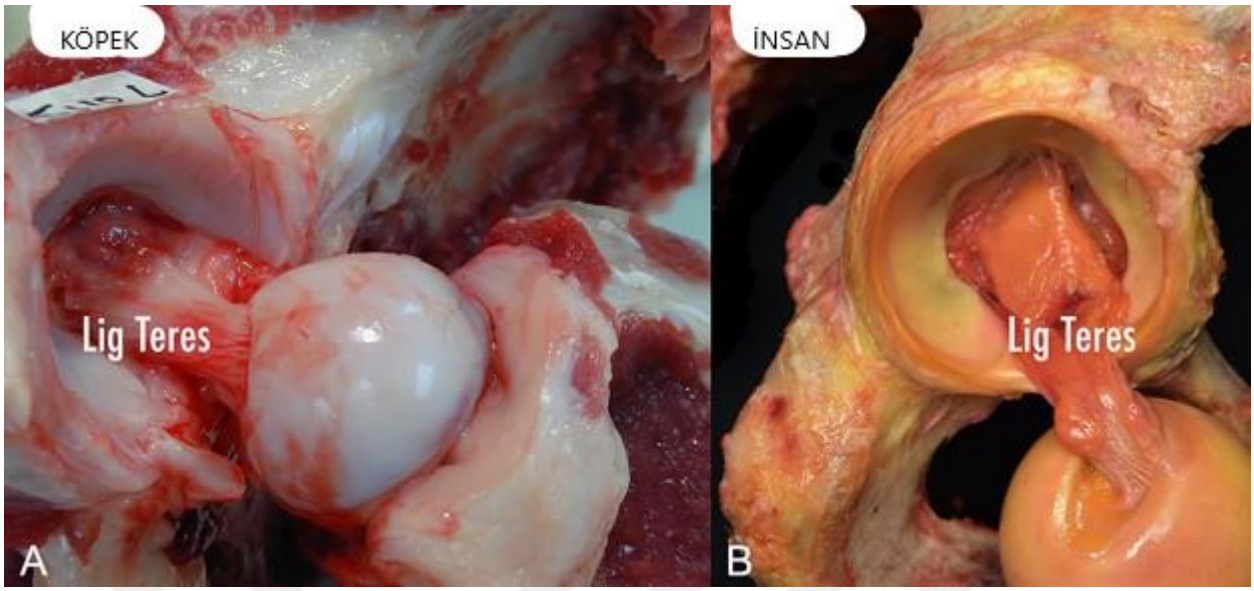
2.2. Gelişimsel Kalça Displazisi için En Uygun Hayvan Modeli olarak Köpek Kalça Displazisi

Hayvan modelleri, eklem hasarının altında yatan mekanizmaların aydınlatılmasında ve yeni tedavilerin geliştirilmesinde dönüşümsel modeller olarak kullanılabilir. Hayvan çalışmaları potansiyel biyokimyasal yolakların ortaya çıkarılmasında da kullanılmaktadır. Kalça displazisi için tavuk, fare, sıçan, tavşan ve köpek gibi çok sayıda pre-klinik hayvan modeli öne sürülmüştür. [Mogil JS, 2009; Walton ve ark., 2017; Bo ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2015; Ford ve ark., 2017; Nowlan ve ark., 2014].

KKD ve GKD klinik açıdan homolog bozukluklardır; her iki türde de kalçada femur başı ossifikasyonunda gecikme, kalça ekleminde laksite ile birlikte artiküler yüzeye fokal olarak aşırı yük binmesi ve kalçada OA ile sonuçlanan subluksasyon söz konusudur [Weinstein SL, 1987; Jacobsen ve Sonne-Holm, 2005; Russell ve ark., 2006; Burton-Wurster ve ark., 1999]. Köpekler GKD için en uygun modellerdir çünkü doğal olarak kalça displazisi geliştirirler. İnsanlara paralel bir progresyon süreci gözlenir ve köpekler geleneksel tedavilere benzer şekilde yanıt verirler. İnsan ve köpek kalça eklem yapıları şekilde sunulmuştur (Şekil 2-1). Ayrıca köpekler insanlardan 5-8 kat hızlı yaşlandığından doğal hastalık sürecinin kısa bir sürede gözlenmesi mümkün olmaktadır. [Skinner ve Mabey, 1987]. Köpek ve insanda hastalığın karakteristikleri Tablo 2-1'de özet halinde verilmiştir.

Tablo 2-1: Köpek ve İnsanda Demografi, Etiyoloji ve Patolojinin Karşılaştırılması. – Pascual-Garrido(2017)'den

Parametre	**Köpek Kalça Displazisi**	**İnsan Kalça Displazisi**
Kalıtsallık	0,1–0,6	Bilinmiyor
İnsidans	Irklar arasında değişir (Labrador: %20, St Bernard: %50)	1/1000 yenidoğan
Kalça Anatomisi	Top-soket	Top-soket
Cinsiyet	Cinsiyet farklılığı yok	%80 kadın
Ambulasyon	Kuadropedal	Bipedal
Prevalans	Irka bağlı olarak maks. %75	%20
Fizyopatoloji	Asetabular kenar hastalığı (aşırı yük)	Asetabular kenar hastalığı (aşırı yük)
Kalça eklem laksitesi	Evet	Evet
Hastalığın ileri OA'ya progresyonu	1 yıl	30 yıl
Risk faktörleri	Spesifik Fenotipler = büyük vücut tipi, hızlı büyüme, obezite	İlk doğan/makat gelişi/oligohidramnioz
İntraartiküler hastalık	Kıkırdak- labrum- lig teres- kapsula	Kıkırdak-labrum- lig teres- kapsula
Moleküler yolak	Ekstraselüler matriks kaybı ve inflamasyon	Ekstraselüler matriks kaybı ve inflamasyon



Şekil 2-1: (A) Köpek femur başı, teres ligamenti ve asetabulumun makroskopik kesiti; (B) İnsan femur başı, teres ligamenti ve asetabulumun makroskopik kesiti. - Pascual-Garrido(2017)'den

Uygulanan köpek kalça replasman prosedürlerinin sayısı hakkında kesin bir bilgi yoktur. İnsanlarda ise dünyada her yıl yaklaşık 250.000 kişiye total kalça replasmanı işlemi uygulanmaktadır; bunların %82'si son evre OA'ya bağlıdır [Jacobs, 2008]. Önümüzdeki 20 yılda ise bu sayının iki katına çıkacağı öngörülmektedir. Kesin tedavi söz konusu olmadığından temel hedef, KKD ve GKD için erken yaşta öngörü sağlayacak prediktif araçların geliştirilerek daha etkili ve düşük maliyetli yaklaşımların oluşturulmasıdır [Kurtz ve ark., 2007].

2.3. Gelişimsel Kalça Displazisi – Köpek Kalça Displazisi Etiyoloji ve Patogenezi

GKD ve KKD multifaktöryel ve poligenik bozukluklardır. Bu poligenik geçiş örüntüsünün çevresel faktörlerden etkilendiği bilinmektedir. Doğrudan sorumlu oldukları kanıtlanmamış olsa da çevresel faktörler hastalık şiddetinde önemli rol almaktadır [Bartolome ve ark., 2015].

İnsanlarda GKD şiddeti, eklem dislokasyonu - subluksasyonu ile birlikte stabil ancak oynak eklem veya subklinik olarak sadece ultrasonik olarak tespit edilebilen asetabular displazinin söz konusu olduğu geniş bir yelpazede kendini gösterebilir. Hasta çocuklara erken tanı konulması önemlidir; neonatal dönem sonrası tanı ne kadar gecikirse tedavinin başarısı o oranda azalır. Monozigot ikizlerde dizigot ikizlere göre hastalık insidansı çok daha yüksektir; aynı durum, kardeş ve ebeveynlerden birinde hastalık olduğunda da geçerlidir (sırasıyla, %4,3-%13 ve %1,6-%2,3

arası değişen oranlarda). İnsanlarda taramaya tabi tutulan yenidoğan ve enfantların %0,5-%4,2 arasında bir oranı tedavi almaktadır. Risk faktörleri arasında aile öyküsü, oligohidramniyoz, kadın cinsiyeti, diğer iskelet anormalliklerinin mevcudiyeti ve hormonal-çevresel faktörler sayılabilir. GKD'de çevresel faktörler arasında makat gelişi öyküsü %11 ila %50 arasındadır ve 19. yüzyıldan beri en önemli faktör olarak görülmüştür. İlişkili olduğu düşünülen diğer faktörler ise post-matürite, üst sosyal sınıf ve önceki hamilelikte düşük olmasıdır. Doğum ayı, mevsimi, annelik yaşı ve doğum ağırlığı ile herhangi bir ilişki saptanmamıştır [Chan ve ark., 1997].

KKD etiyolojisi tam açıklanmamış olsa da, iki geniş kapsamlı etiyoloji kategorisi öne sürülmüştür; periartiküler yumuşak dokularda (ligamentler, kaslar, eklem kapsülü) laksite, endokondral ossifikasyon anormalliği veya bu iki sürecin kombinasyonu; genç köpeklerde kalça instabilitesinin, büyümekte olan femur başı ve asetabulum üzerine binen güçlerde değişikliğe neden olduğu biyomekanik bir sorun olarak da tanımlanabilir. Böylece kemik büyümesi ve yeniden yapılanması etkilenmekte, anormal eklem konformasyonu ve buna sekonder dejeneratif eklem hastalığı gelişebilmektedir [Paatsama, 2000; Ihemelandu ve ark., 1983; Lust ve ark., 1972; Cardinet ve ark., 1983; Riser, 1975].

Hasta köpeklerde gen ekspresyonu çeşitli çevresel faktörlere bağlı değişebilir. Bu faktörler kalça displazisine neden olmaz; ancak, hastalığın semptom ve şiddetini etkiler. Beslenme temel bir çevresel faktördür. Genetik eğilimi olanlarda aşırı beslenme, hızlı büyüme ve kilo artışı kalça displazisinin sıklık ve şiddetini arttırmaktadır. Kaburga ve dorsal vertebraların elle hissedilir olduğu ancak gözle görülmediği ince bir görünüm elde etmek üzere besin alımı düzenlenmelidir [Kealy ve ark., 1993; 1997; 2000]. Genetik eğilimin söz konusu olduğu köpeklerde aşırı kalsiyum ve D vitamininden sakınılmalıdır. Yüksek kalsiyum alımı osteoklastik aktiviteyi azaltarak endokondral ossifikasyonu ve iskeletin yeniden yapılanmasını geciktirir. D vitamini de kalsiyumun emilimini ve renal rezorpsiyonu arttırdığından, fazla kalsiyum alımıyla benzer etki gösterir [Fries ve Remedios, 1995].

KKD gelişimi vücut tipinden de etkilenir. Küçük türlerde çok az ve hafif şiddette görülürken, büyük türlerde prevalansı yüksektir; örneğin, Borzoi için %2 kadar düşük olan oran, Labrador Retriever'da %25-%40, St. Bernard'da %50, Bulldog'da %73,4'e çıkabilmektedir. Derisi gergin, karın bölgesi kaslı, deri, derialtı ve fasya yağ dokusu az olan türlerde prevalans azalır. En yüksek prevalansa sahip olan türler gevşek derili, ağır, başı ve ayakları büyük, yavaş yürüyen, kasları az gelişmiş ve derialtı yağ dokusu oranı %5 ila %10'dan fazla olanlardır [Fries ve Remedios, 1995].

2.3.1. Köpek Kalça Displazisi Gelişme Süreci

İnsanlardan farklı olarak, kalça displazisine genetik eğilimi olan köpek yavruları doğumda normaldirler ve patolojik değişiklikler insana kıyasla çok hızlı gelişir; gelişim süreci tabloda detaylı olarak verilmiştir (Tablo 2-2). En erken 2 haftaya kadar eklem kapsülü ve femur başının ligamentinin gerilme süreci tamamlanmış olur. Femur başı ligamentinde hafif proliferatif, non-süpüratif sinovit, ödem, fibroplazi ve eklem efüzyonu 4. haftada gelişmiş olur. Onikinci haftaya kadar sinoviyal sıvı ve artiküler kıkırdak değişiklikleri oluşur. Makroskopik olarak yüzey kıkırdağında pullanma ve fissürlenme, mikroskopik olarak yüzeyde kondrosit kaybı ve matriksin proteoglikan içeriğinde ve kollajen fibril ağında değişiklikler meydana gelir. [Fries ve Remedios, 1995].

Tablo 2-2: Köpek kalça displazisinde gözlenen intraartiküler ve radyografik değişikliklerin gelişim süreci; değişikliklerin çoğu yaşamın birinci yılında oluşur. - Pascual-Garrido(2017)'den

Radyografik Değişiklikler		Femur Başı Subluksasyonu	Femur Başı Subluksasyonu	Trokanter Majör Mediale Bükülür	Asetabular Kenarda Geri Gidiş Asetabular Konturların Konveksleşmesi	Osteofitler Osteoartrit
İntraartiküler Hasar	Lig.Teres'de Kısmi Yırtık - Hemoraj		Dorsal Femur Başı Malazisi Kapsula Kalınlaşması	Asetabular Kenar Malazisi Kapsula Kalınlaşması Hipertrofik Labrum Lig. Teres Şişkinliği	Kapsula Kalınlaşması Hipertrofik Labrum Femur Başı ve Kenarında Kıkırdak Hastalığı	Kapsula Kalınlaşması Kıkırdak Fibrilasyonu, Malazi, Nekroz, Kırık

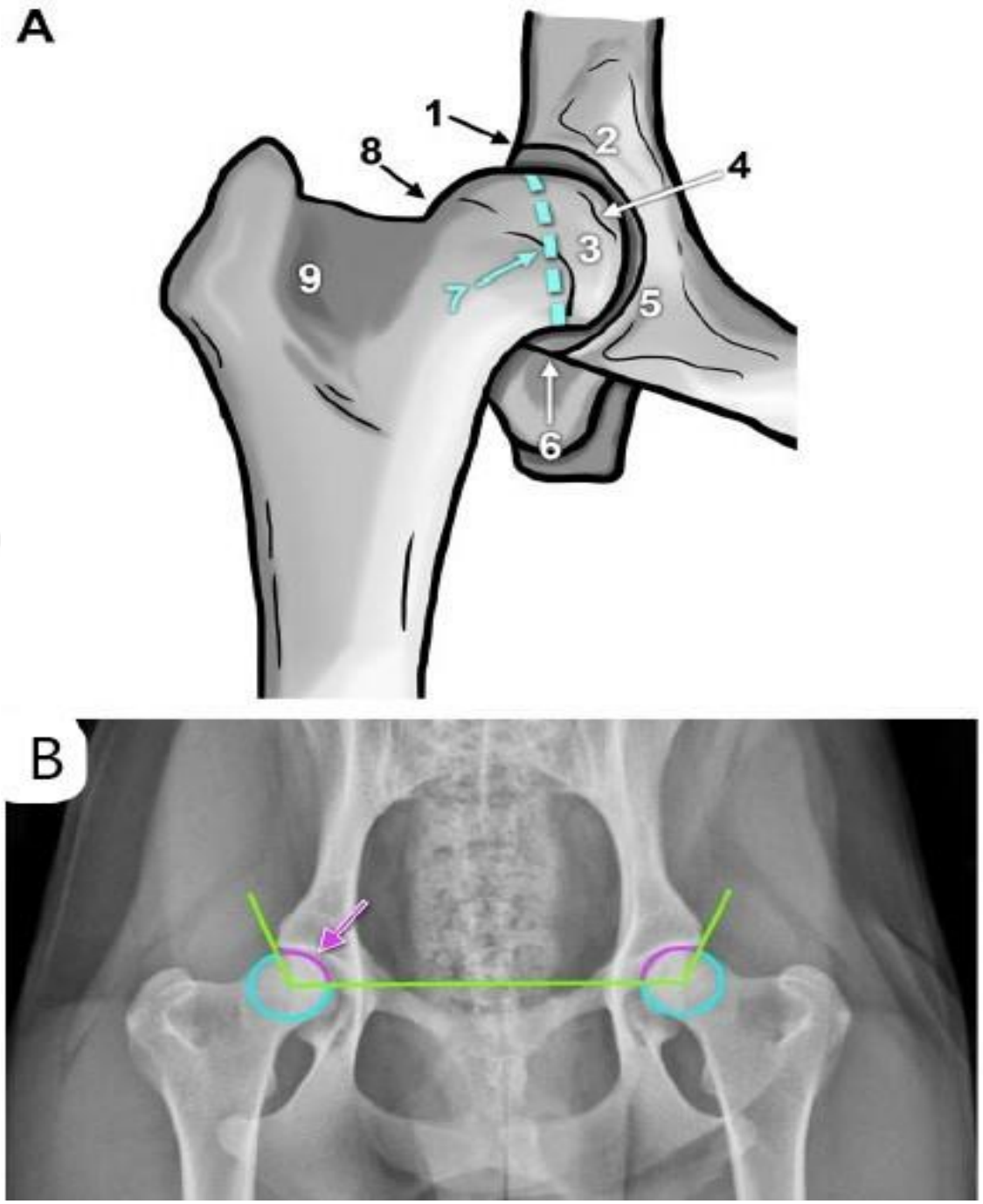
30. gün 2. ay 3. ay 6. ay 8. ay 12. ay

Eklem efüzyonu, eklem kapsülünün ve femur başı ligamentinin progresif uzaması, artan eklem laksitesiyle ilişkilidir. [Alexander, 1992; Hazewinkel, 1994; Lust ve Summers, 1981; Lust ve ark., 1985]. Böylece ekleme yük bindiğinde femur başında subluksasyon meydana gelir ve henüz olgunlaşmamış iskelet sistemine binen yük dengesi değişir. Kompresif yük femur başı medialinde ve asetabulumun dorsal kenarında yoğunlaşarak bu bölgelerin ossifikasyonunu geciktirir. [Alexander, 1992; Hazewinkel, 1994; Fox ve ark., 1987]. Femur başı laterali ve asetabulumun ventromedialine düşen yük azalır, bu bölgelerin ossifikasyonu hızlanır [Brass, 1989] (Şekil 2 – A). Dorsal kenarın yassılaşmasıyla eklem stabilitesi daha da bozulur. Anormal yük dağılımı, dorsal asetabular kenarın subkondral kemiğinde ve femur başında mikrofraktürler meydana getirir. İyileşme sürecine giren kemik sertleşir ve şoku absorbe etme yeteneği azalır. Buna bağlı olarak yüzeydeki kıkırdak daha fazla güce maruz kalır ve gittikçe dejenere olur. [Alexander, 1992; Riser, 1987]. Femur başı mediali ve asetabulum dorsal kenarındaki kıkırdak zamanla yıpranır, subkondral kemik açığa çıkar. Subkondral kemikte zamanla skleroz gelişir, Sharpey lifleri yırtılarak eklem kapsülünün asetabulum ve femur boynuna bağlandığı bölgede osteofitlerin oluşmasına neden olur. Dejeneratif eklem hastalığı ve kemiğin yeniden yapılanma döngüsü böylece devam ederek kıkırdak dejenerasyonu, eklem kapsülünde kalınlaşma, femur başı ligamentinde gerilme veya yırtık, dorsal asetabular kenarda proliferasyon, femur boynunda kalınlaşma ve lokal kasların atrofisiyle karakterize ileri evre KKD gelişir. Bu noktada eklem stabilitesi iyileşebilir veya tam luksasyona gidebilir. KKD'ye genetik eğilimi olan köpeklerin %30'unda omuz, dirsek, vertebral ve mandibular eklemlerde de sinovit ve artiküler kıkırdak dejenerasyonu gözlenmiştir. [Fries ve Remedios, 1995]. Kalça eklemi doğası gereği instabil olduğundan, genel bir bozukluğun kendini en şiddetli olarak gösterdiği eklem olarak da tarif etmek mümkündür [Lust, 1993].

2.4. Tanı

Kalça ekleminin konformasyonu ile ilgili bilgi sahibi olmak için klinik veya diyagnostik görüntüleme testleri kullanılmaktadır. Bu testler sedatize veya anestezi almış hayvanlar üzerine uygulanır ve iki ana kategoride sınıflandırılır: 1) genellikle genç hayvanlar üzerinde uygulanan kalça eklem laksitesinin (KEL) değerlendirilmesi; 2) eklem palpasyonuyla krepitasyon ve hareket kısıtlamasını veya röntgenlerdeki dejeneratif eklem hastalığı (DEH) bulgularına dayanarak klinik ve radyografik osteoartrit bulgularının saptanması [Ginja ve ark., 2010; Fry ve Clark, 1992].

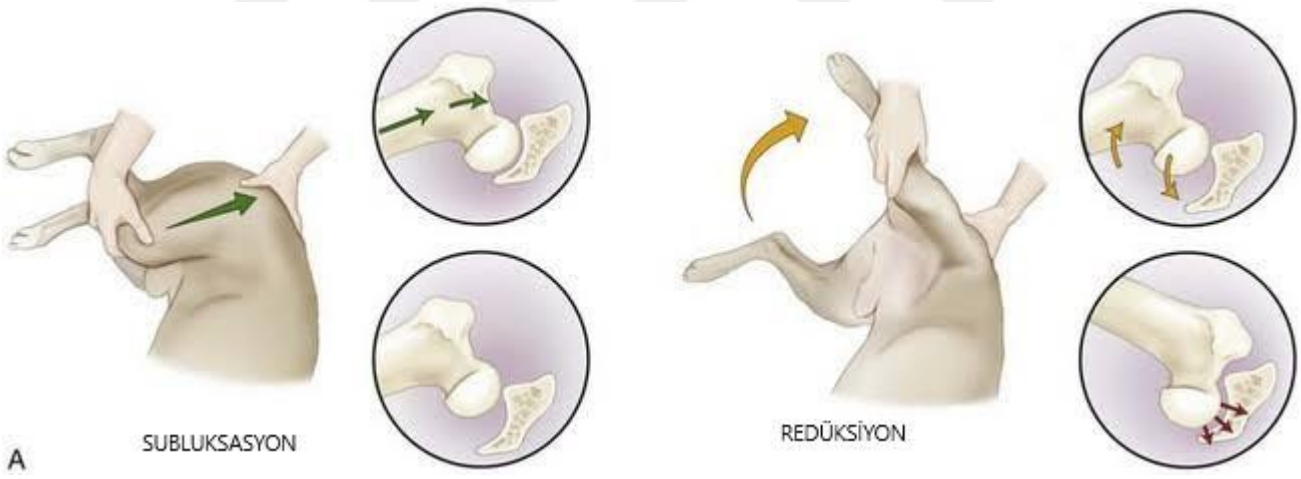
KKD genellikle köpek yaşamının iki döneminde klinik belirti verir: 1) bir yaşından küçük köpeklerde ağrılı ligament yırtılması veya gerilmesi, sinovit ve kıkırdak hasarıyla sonuçlanan kalça instabilitesi ve artiküler alanlara aşırı yük binmesi [Riser, 1975; Alexander, 1992]; 2) yetişkin köpeklerde (12 aydan büyük) ileri evre OA'ya bağlı kronik ağrı. [Ginja ve ark., 2010]. Yürüyüş anormalliği, adım uzunluğu ve yüksekliğinde azalma, tavşan zıplaması, yükselme, merdiven çıkma ve engellerin üzerinden atlama zorluğu KKD ile ilişkili fonksiyon bozukluğunun tipik belirtileridir. [Riser, 1975].



Şekil 2-2: A - Köpek Kalça Ekleminin Anatomik Yapıları: 1) kraniolateral asetabular kenar, 2) kranial asetabular sınır, 3) femur başı, 4) fovea kapitis, 5) asetabular çentik, 6) kaudal asetabular sınır, 7) dorsal asetabular sınır, 8) femur baş-boyun kavşak noktası, 9) trokanterik fossa; B - Kalça displazi skorunun belirlenmesinde kullanılan Norberg açısı (mor çizgi - okla işaretli): arka ayaklar ekstansiyondayken femur başı merkezleriyle asetabular kenar arasındaki uzaklığın açısı olarak ifade edilir. – Schachner ve Lopez(2015)'den

2.4.1. Fizik Muayene

Ortolani testi, genç köpeklerde (4-12 aylık) KEL tanısı için veteriner hekimlikte en sık kullanılan fiziksel manevradır [Chalman ve Butler, 1985; Ginja ve ark., 2008]. Barlow ve Barden testleri gibi 4 aydan önce kullanılan diğer bazı testler mevcut olsa da, klinik güvenirlikleri kesin değildir [Ginja ve ark., 2009; 2010]. Ortolani testi, köpek lateral veya dorsal yan yatar pozisyonda uyanık, sedatize veya anestezi almış halde uygulanabilir [Chalman ve Butler, 1985]. Test iki aşamadan oluşur; ilk önce kalça normal yük alan açıda konumlanmışken bağımsız olan ekstremitenin diz eklemine proksimal güç uygulanır, ve bu sırada ekleme yavaşça abdüksyon yapılır. Anormal laksiteye sahip kalçalarda displastik femur başı dorsal olarak yer değiştirebilir (ilk aşama), ve ekstremitenin abdüksiyonu asetabuluma geri dönmesini sağlar (ikinci aşama). Bu sırada, tipik elle hissedilir ve/veya değişen şiddette bir 'tık' sesi duyulur. Bu ses pozitif Ortolani işareti olarak kabul edilir. [Ginja ve ark., 2010; Chalman ve Butler, 1985]. Testin uygulanışı Şekil 2-3'de verilmiştir. Ortoloni testi 1 yaşın altındaki köpeklere uygulandığında, orta derece veya ciddi KKD gelişimini öngörmede mükemmel hassasiyet göstermiştir [Ginja ve ark., 2008].



Şekil 2-3: Köpek yan yatırılmış konumdayken uygulanan Ortolani testi. – Smith ve ark.(2012)'den

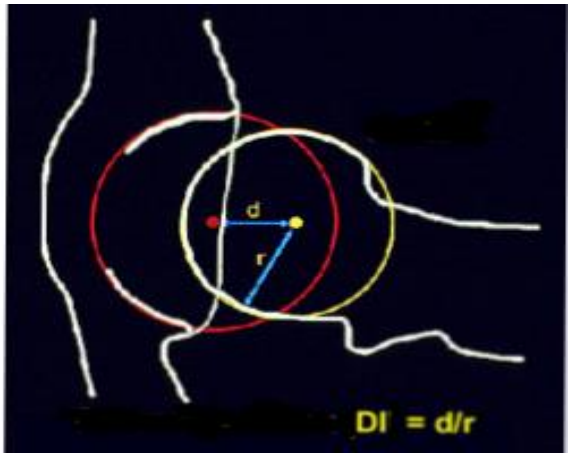
Kalça, femur masaya paralel olacak şekilde konumlandırılır ve femurun uzun ekseni boyunca güçlü bir basınç uygulanır (sol resim, ok işareti). Kalça eklemi laksitesi mevcutsa femur başı sublukse olur (sol resim). Basınç uygulamaya devam ederken ekstremiteye yavaşça abdüksiyon uygulanır (sağ resim, ok işareti), femur başı tekrar eski konumuna getirilirken asetabulumda tipik elle hissedilir ve/veya duyulabilir 'tık' sesi oluşur (sol resim).

2.4.2. Diyagnostik Görüntüleme

KKD'nin 1935 yılında ilk tanımlandığı günden beri kesin tanısı için kullanılan yöntem röntgendir. Radyografik yöntemler pasif KEL'in doğru saptanması için anestezi veya ağır sedasyon altında uygulanır [Ginja ve ark., 2010; 2008; Manley ve ark., 2007; Vezzoni ve ark., 2008]. Arka ayaklar ekstansiyon halindeyken çekilen röntgenin sağladığı en önemli veri Şekil 2-2B'de gösterilen Norberg açısıdır (Şekil 2-2). Norberg açısına dayanarak bir kalça displazi skoru belirlenir. Bu kalça displazi skoru bozukluğun derecesini göstermektedir. [Ginja ve ark., 2015].

İnsanlardan farklı olarak, kalça displazisine genetik eğilimi olan köpek yavruları doğumda normaldirler. İnsan yenidoğanlarda GKD'nin kesin tanısı için ultrasonik görüntüleme kullanılır; ancak, köpeklerde femur başı ossifikasyonu ve asetabular kondro-osseöz değişiklikler ancak 8. haftadan sonra değerlendirilebilir duruma geldiğinden, KKD tanısını doğrulamasında bu yöntem geçerli değildir [Gerscovich, 1997; Ginja ve ark., 2009]. Köpek yavrularına 8-16 hafta arasında dinamik ultrasonografi uygulanarak KEL derecesi tayin edilebilir [O'Brien ve ark., 1997]. Sekiz haftalık köpek yavrularında manyetik rezonans görüntülemeyle saptanan artmış sinoviyal sıvı hacmi, ileriki dönemde ortaya çıkan KEL ve KKD ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, bilgisayarlı tomografi ile KEL ve osseöz asetabulum yapısı değerlendirilebilmektedir [Ginja ve ark. 2009; Farese ve ark., 1998].

Kalça displazisi tanısında kanıta-dayalı en iyi radyografik yöntem PennHIP® (University of Pennsylvania Hip Improvement Program - Pensilvanya Üniversitesi Kalça İyileştirme Programı) olarak kabul edilmekte ve KEL erkenden saptanabilmektedir [Johnston (2018, p.971)]. En erken 16 haftalıkken uygulanabilen bu yöntemde genel anestezi altında kalça eklemlerinin farklı açılardan 3 röntgen görüntüsü alınır; birincisi klasik röntgen görüntüsüdür, 2. görüntü ise femur başının asetabuluma tamamen yerleşebilip yerleşemediğini saptamada kullanılan kompresyon görüntüsüdür. Üçüncüsünde bu metoda özgü distraktör denilen bir alet yerleştirirlerek femur başları asetabulumlardan yukarı doğru kaldırılır. Üçüncü görüntünün değerlendirilmesi sonucunda 'DI=d/r' formülüne göre distraksiyon indeksi (DI) belirlenir (Şekil 2-4) [Greer (2014, p.24)]. DI değeri 0-1.0 arasında değişmektedir; DI $\leq$ 0.3 olan köpeklerde kalça displazisi gelişme riski düşüktür. Distraksiyon görüntüsünde eklem ne kadar gevşek, DI değeri ne kadar yüksekse kalça displazisi ve OA gelişme riski o kadar artar. Yöntemin en önemli dezavantajları ise genel anestezi gerektirmesi, maliyetinin diğer testlere göre yüksek olması ve uygulanma - değerlendirilmesi için özel eğitim almış veteriner hekim veya teknisyenlere ihtiyaç duymasıdır [Greer (2014, p.24); Harari (2000)].



Şekil 2-4: Distraksiyon indeksinin (DI) hesaplanması – Harari (2000)'den

Distraksiyon indeks (DI) değeri 'DI = d/r' formülüyle hesaplanır (d: femur başı ve asetabulumun geometrik merkezleri arasındaki uzaklık, r: femur başının yarıçapı).

2.5. Kalça Displazisinde Potansiyel Moleküler Yolaklar

KKD ve GKD hastalarında eklem dejenerasyonuyla sonuçlanan moleküler yolaklar hakkında bilgiler sınırlıdır; ancak, son yıllardaki bulgular OA gelişimine yol açan eklem biyomekaniğindeki değişikliklere inflamatuvar süreçlerin neden olduğuna işaret etmektedir. KKD ve GKD hastalarında kıkırdak temas basıncı yüksektir. Kıkırdağa bu şekilde aşırı yük binmesi ECM üretimini azaltır. GKD hastalarının kıkırdak örneklerinde kollajen tip-II ve agrekan ekspresyonunun, ileri evre OA ve sağlıklı kontrol grubuna göre az, matriks metalloproteinaz-13 (MMP-13) ekspresyonun ise fazla olduğu bildirilmiştir. Bu bulgu GKD hastalarının artiküler kıkırdağında ECM kaybına yol açan katabolik aktiviteyi düşündürmektedir [Feng ve ark., 2017]. Hashimoto ve ark., ileri evre OA, GKD, femoroasetabular sıkışmanın (FAS) söz konusu olduğu hastaların kıkırdağında metabolik aktiviteyi araştırmış, GKD hastalarının kıkırdağındaki agrekan konsantrasyonu, OA ve FAS hastalarına göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur [Hashimoto ve ark., 2013].

KKD'de kıkırdak matriks dönüşümüne ilişkin bazı belirteç düzeylerinin yükseldiği tespit edilmiştir. Bu da ECM sentezinde progresif kayıp ve artiküler kıkırdakta metabolik aktivite artışını düşündürmektedir. Bu belirteçlerden kıkırdak oligomerik matriks proteini (COMP) ve fibronektin kapsamlı olarak çalışılmıştır. COMP, pre-OA ve OA'lı köpek ve insanların sinoviyal sıvısında belirgin olarak artan bir matriks proteinidir [Bedi ve ark., 2013; Steffey ve ark., 2004]. KKD'ye

özgü olmasa da, bu hasta popülasyonda COMP seviyeleri yüksektir ve köpeklerde OA şiddetini öngörmektedir [Steffey ve ark., 2004; Carlson ve ark., 2002].

Fibronektinler, hücrelerin çevredeki matriksle etkileşimini sağlayan önemli ekstraselüler moleküllerdir. İlk çalışmalar bazı fibronektin izoformlarının osteoartritli kıkırdakta 10 kata kadar yükseldiğini, eklem kıkırdağına özgü fibronektin izoformlarında tespit edilen kayıpların ise kondrosit dediferensiasyonunun çok erken ve hassas bir belirteci olduğunu göstermiştir [Steffey ve ark., 2004].

OA'da kıkırdak ve sinoviyal sıvıda High-temperature required A1 (HtrA1) sentezi artar. HtrA1 kıkırdak dejenerasyonunun erken aşamasında tespit edilmiştir ve primer fonksiyonunun hem periselüler matriks hem de ekstraselüler matriksteki fibronektinlerin ve diğer proteinlerin yıkılması olduğu düşünülmektedir. Periselüler matrikste bozulma kollajen-II'nin Diskoidin Domen Reseptör-2'ye bağlanmasına ve MMP-13 sentezinin uyarılmasına neden olur. MMP-13 en çok matriks degredasyonu ve OA progresyonundaki fonksiyonu açısından araştırılmıştır. GKD'nin fare modeliyle yapılan bir çalışmada MMP-13 sentezinin erken evre kıkırdak dejenerasyonunda yükseldiği tespit edilmiştir [Hernandez ve ark., 2020].

Kemik doku gelişiminde rol alan metabolik yollar, femur başının endokondral ossifikasyonu, eklem kapsülü ve kıkırdağının ekstrasellüler matriksinin oluşumu ve eklem kapsülü ile ligamentlerindeki kollajen fibrillerinin sentezi ile ilişkilidir. İnsanlarda kalça displazisinin gelişimi asporin (küçük lösinden zengin tekrarlı protein ailesinden bir matriks proteini) proteinindeki varyasyonlar, interlökin-B ve TGF-β1 [Kolundzic ve ark., 2011] (her ikisi de kemiğin yeniden yapılanmasında fonksiyoneldir) [Hinke ve ark., 2001; Kwan Tat ve ark., 2004], büyüme farklılaşma faktörü-5 [Todhunter and Lust, 2003], vitamin-D reseptörü ve östrojen reseptörü-1 [Kapoor ve ark., 2007], gebelikle ilişkili plazma proteini A2 [Jia ve ark., 2012] ile ilişkilendirilmiştir.

Glikozaminoglikanlar, eklem kapsulası ve kıkırdağının ekstraselüler matriksinin oluşumunda önemli rol oynamaktadır; karbonhidrat sülfotransferaz (CHST) grubu genler, glikozaminoglikanlar dahil, çok sayıda sülfatlanmış karbonhidratın sentezinde rol alan enzimleri kodlayan 15 farklı geni içerir. Bu genlerin ürünleri hücre adezyonu ve haberleşmenin yanısıra yapısal işlev de gösterirler [Nelson ve ark., 1995].

2.6. KKD'nin Genetik Altyapısı ve Kalıtsallığı

Çevresel faktörler çeşitlilik gösterse de KKD'de doğrudan belirleyici değildir. KKD kalıtsal bir hastalık olarak kabul edilir; neonatal travma gibi durumlar son derece nadir olduğundan ihmal edilebilir düzeydedir. KKD, çok sayıda genin birbirine eklenen küçük etkilerinin birlikte oluşturduğu poligenik bir hastalıktır. Yayınlanan kalıtsallık oranları 0,1 ila 0,6 arasında değişmektedir. Oranlardaki farklılıklar karakter, hesaplama yöntemi ve kullanılan örneklerden kaynaklanmaktadır. Örneğin Portekiz Estrela Dağ köpeklerinde pasif kalça laksitesinde kalıtsallık 0,83'e kadar çıkmaktadır. Genetik kalıtım ile ilgili yapılan çalışmalarda hem dominant hem resesif kalıtımın etkili olduğu ileri sürülmüştür [Ginja ve ark., 2010; Janutta ve ark., 2006; Maki ve ark., 2004; Silvestre ve ark., 2007].

2.6.1. Tedavide Genetik Temelli Yaklaşımlar

İdeal bir medikal ya da cerrahi tedavi yöntemi olmadığından veteriner hekimliğin esas amacı kontrollü üreme ile KKD'nin önlenmesidir. Damızlık seçimi veteriner hekimliğin öncelikli müdahale alanı haline gelmiştir. KKD insidansını azaltmak ve hayvanların yaşam kalitesini artırmak amacıyla farklı ırkların radyolojik bulgularına dayanan çok sayıda seleksiyon programı uygulanmıştır [Ginja ve ark., 2015].

Radyografik fenotiplere dayalı KKD programları 1960'lı yıllarda başlatılmıştır [Swenson ve ark., 1997; Leppanen ve ark., 2000; Leighton, 1997]. Fenotipe dayalı genetik KKD taraması farklı ırklarda ve bölgelerde farklı sonuçlanmıştır. Örneğin, Alman Çoban Köpeği ve Labrador Retriever'dan oluşan bir damızlık kolonide 5 nesil sonra KKD prevalansı, sırasıyla, %55'den %24'e ve %30'dan %10'a düşürülmüştür. İsveç'te yapılan benzer uygulama KKD prevalansını azaltmada bu derece başarılı olamamış, Finlandiya'da benzer bir uygulamaysa tamamen etkisiz kalmıştır. Ayrıca, normal radyografik fenotipe sahip olgular taşıyıcı olabilir ve karakteri yeni nesillere aktararak popülasyon içinde tutabilirler. Bu yüzden bunlara ek olarak tanısal genetik yöntemler geliştirilmiştir [Ginja ve ark., 2009; Hou ve ark., 2013; Swenson ve ark., 1997; Leppanen ve ark., 2000; Leighton ve ark., 1997; Paster ve ark., 2005; Maki ve ark., 2000].

Bunlardan biri olan genetik selekisyon ile prediktif genetik bilgiye dayalı seleksiyon uygulanarak oluşacak genetik özelliklerin tahmini mümkün olmaktadır. Mikrosatelit belirteçlerin kullanıldığı moleküler genetik çalışmalarla KKD için kantitatif karakter lokusları (QTL) belirlenmiştir [Guo ve ark., 2011; Sanchez-Molano ve ark., 2013; Stock and Distl., 2010; Todhunter ve ark., 2005; Mateescu ve ark., 2008; Chase ve ark., 2004; Chase ve ark., 2005].

Genotipe dayalı seleksiyon uygulamaları, fenotipe dayalı geleneksel yöntemlere göre damızlık seçiminin hızlı ve doğru olarak gerçekleştirilmesi, damızlıkların kontrolü, ıslah çalışmalarında zamandan tasarruf gibi birçok avantaja sahiptir. Genotipe dayalı seleksiyon ile hayvanların gelecekte ortaya çıkabilecek klinik semptomlarının erken yaşta tahmini ve her iki cinsiyette birden seleksiyon mümkün hale gelmektedir [Sanchez-Molano ve ark., 2015].

2.6.2. SNP ve Genom Boyu İlişki Çalışması (GWAS) Analizleri

İnsanlarda yapılan ilişki analizleri, ekzom dizilemesi ve vaka-kontrol çalışmalarında GKD ile ilgili çok sayıda lokus / gen varyantı belirlenmiştir [Basit ve ark., 2016; Loder ve Skopelja, 2011]. Feldman ve ark. bir ailenin 4 neslindeki displastik üyelerin hepsinde bir CX3CR1 varyantı tespit etmişlerdir [Feldman ve ark., 2013].

Köpek genomunun 2005 yılında dizilenmesiyle 2,5 milyondan fazla SNP karakterize edilmiş, bunun sonucunda SNP genotip mikro-dizileri geliştirilmiştir. Böylece KKD'nin genetik altyapısının açığa çıkarılması için yeni bir çalışma alanı doğmuş, genetik belirteç olarak farklı SNP kombinasyonları tayin edilerek prediktif modeller oluşturulmuştur. Çeşitli genetik hastalıklara yatkınlığı gösteren bu SNP kombinasyonları uzun süredir insanlar için de kullanılmaktadır [Lindblah-Toh ve ark., 2005; Ehret ve ark., 2011; Eleftherohorinou ve ark., 2009; Gudmundsson ve ark., 2007].

Genlerin KKD'nin fenotipik özellikleriyle ilişkisini optimize etmek için, sırasıyla, KKD eğilimi yüksek ve düşük iki ırk olan Labrador Retriever ve Greyhound arasında bir çaprazlama geliştirilmiştir. Çalışmada KKD ile ilgili QTL içerdiği düşünülen 12 krozom belirlenmiştir [Todhunter ve ark., 2005]. Son yıllarda KKD ile ilişki farklı QTL'ler de belirlenmiştir [Sanchez-Molano ve ark., 2014; Marschall ve Distl, 2007]. QTL bölgesi yüzlerce gen içerebilir ve bu genlerin tanımlanması oldukça zordur [Zhu ve ark., 2009].

Lavrijsen ve ark. (2014), Labrador Retriever ırkı köpeklerde kalça displazisi için pek çok aday gen tanımlamışlardır. Bunlar kondrositlerin hipertrofik farklılaşması ile bazal membran ve kıkırdağının matriks bütünlüğünde rol alan genlerdir. Bu çalışmanın sonuçlarına dayanarak kalça displazisi etiyolojisinde endokondral kemik oluşumuyla birlikte yumuşak doku defektinin de rol aldığı düşünülmektedir [Lavrijsen ve ark., 2014]. Çeşitli köpek ırklarında 22.000'den fazla SNP'nin kullanıldığı bir GWAS (Genome Wide Association Studies –Genom Boyu İlişki Çalışması) çalışmasında, sırasıyla, KKD ve osteoartritle ilişkili 4 ve 2 adet SNP bulunmuştur [Zhou ve ark., 2010], bu SNP'ler CFA1, 8, 20 ve 25'te konumlanmışlardır [Sanchez-Molano ve ark., 2014].

CFA1, 5, 8, 15, 20, 25 ve 32 kromozomlarındaki 31 SNP'nin ise 24 ayrı gende veya genin yakınında konumlandığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar KKD'nin, çok sayıda genin küçük etkisinin birleşmesiyle ortaya çıkmasını sağlayan karmaşık poligenik yapısını doğrulamaktadır.

Köpeklerde 11. kromozomda bulunan *FBN2* (Fibrillin-2) genindeki bir mutasyon Labrador Retriever ve diğer ırklarda KKD ile anlamlı derecede ilişkili bulunmuştur; ancak *FBN2* lokusu KKD genetik karakter varyasyonunun küçük bir parçasını teşkil etmektedir [Friedenberg ve ark., 2011]. KKD'nin diğer fenotipleriyle (ör., pasif kalça laksitesi) ile ilişkili QTL ve/veya SNP'lerle ilgili çalışmalar bu bozukluğun genetik temeline ilişkin ek veri sağlayabilir. Pasif kalça laksitesi KKD için en büyük risk faktörü ve en yüksek kalıtsallığa sahip karakterdir [Ginja ve ark., 2008; Smith ve ark., 1995].

Köpek 11. kromozomdaki SNP BICF2S23432143 (57.517597 Mb) nikotinamid adenin dinükleotide (NAD) ve ~57,6 Mb'de bA113O24.1 olarak tanımlanan ve sekansı IGF (İnsulin-benzeri büyüme faktörü) reseptör bağlayıcı proteine benzer olan gene yakındır. Bu bir potansiyel aday gendir; çünkü IGF1 kondrositler için bir anabolik büyüme faktörüdür. *IGF1* polimorfizmleri Portekiz Su köpeklerinde ve diğer ırklarda büyüklüğün farklı olmasına neden olmaktadır [Sutter ve ark., 2007].

Köpeklerde 11. kromozomda yer alan *FBN2* geninin 30.intronunda bir delesyon tespit edilmiştir. Bu delesyon açısından homozigotluk durumunun kalça displazisi gelişiminde rol oynadığı ileri sürülmektedir. Bu çalışmaya göre, Labrador Retriever ırkı köpeklerde kalça displazisi ilerledikçe, kalça kapsülünden izole edilen *FBN2* mRNA, OA gelişimine uygun şekilde anlamlı düzeyde artış göstermiştir [Ortiz ve ark., 1998]. CFA 17'deki SNP BICF2G630205523'ün de kalça OA ile yüksek düzeyde ilişkili bulunması, en yakın gen olan *REG3A* (regenerating islet derived gamma-3A)'nın da köpek kalça osteoartritinde önemli rol oynadığını göstermiştir. *REG3A* ilk defa akut pankreatit sırasında asinar hücrelerden salınan pankreas-ilişkili protein (PAP) olarak keşfedilmiştir. C-tipi lektin olarak salgılanmaktadır, primer hepatoselüler karsinomlarda sentezinin uyarıldığı bildirilmiştir [Choi ve ark., 2007]. Çok sayıda fonksiyonel çalışmaya göre, *REG3A*'nın hücre tanınması ve adezyonunda ve hücrelerin oksidatif stresle indüklenen apoptozdan korunmasında rol aldığı düşünülmektedir [Ortiz ve ark., 1998]. *REG3A* anti-inflamatuvar özellikler taşımaktadır ve MAPK (Mitojenle aktive protein kinaz) yolağındaki sinyal moleküllerinden biridir. Bu ilişkinin, kondrositlerin hücre hasarına yanıt olarak oluşturdukları, dolayısıyla kalça osteoartritinin progresyonunu etkiledikleri bir mekanizmayı düzenlediği ileri sürülmektedir [Zhou ve ark., 2010].

Sunulan aday genlerde köpek kalça displazisi ve kalça osteoartriti ile ilişkili fonksiyonel mutasyonların tespit edilmesi, köpeklerin, insanlardaki homolog kompleks karakterlerin ve hastalıkların karşılaştırmalı haritalarının oluşturulması için uygun canlılar olduğunu düşündürmektedir [Sutter ve ark., 2007; Awano ve ark., 2009; Parker ve ark., 2009].

2.7. Karbonhidrat Sülfotransferaz Genleri

CHST genleri büyük çoğunlukla GAG biyosentezinde rol alan enzimleri kodlayan ve 1-15 arasında numaralandırılan genlerdir, bu genler Tablo 2-3'te listelenmiştir.

Karbonhidratlar, monosakkarit kompozisyonlarından türeyen yapısal çeşitlilikleri sayesinde zincir dallanmaları, glikozidik bağlar ve kovalan modifikasyonda kullanılabilirler. CHST enzimleri Golgi aygıtında sentezlenen, glikoprotein ve glikolipitlerdeki karbonhidrat gruplarına sülfat transferi yapan sülfotransferaz enzimleridir ve karbonhidrat sülfat esterleri oluştururlar. Bu sülfat esterleri sadece ekstraselüler fonksiyona sahiptir; ekstraselüler matrikse salınırlar veya hücre yüzeyine sunulurlar. Ekstraselüler bileşenler olarak sülfatlanmış karbonhidratlar haberleşme, hücre adezyonu ve ECM bütünlüğünü sağlayan mediyatörlerdir [Nelson ve ark., 1995; Bowman ve Bertozzi, 1999].

İki büyük CHST ailesi vardır: heparan sülfotransferazlar ve galaktoz/N-asetilgalaktozamin/N-asetilglikozamin-6-*O*-sülfotransferazlar (GSTler) [Sworak ve ark., 1999; Hemmerich ve Rosen, 2000]. Sitozolik sülfotransferazlar steroidler, flavonoidler, nörotransmiterler, fenoller gibi küçük substratları modifiye ederlerken, CHST'ler karbonhidrat iskeletlerini modifiye ederek özgün ligandlar oluştururlar ve ekstraselüler sinyal oluşumu ve hücre adezyonunda anahtar rol alırlar. CHST'lerin substratları büyük olduğundan sitozolik sülfotransferazlara göre aktif bölgeleri çok daha büyüktür [Bowman ve Bertozzi, 1999; Falany, 1997].

2.7.1. Heparan Sülfotransferazlar

Heparan sülfat bir glikozaminoglikandır ve ksiloz aracılığıyla proteinlerin serin kalıntısına bağlanır. Heparan sülfat glikozaminoglikanlarının sülfatlanması hücre yüzey proteinlerine çeşitlilik kazandırarak bunların diğer proteinlerle spesifik olarak etkileşmesini sağlar [Rosenberg ve ark., 1997; Chapman ve ark., 2004].

2.7.2. Galaktoz/N-asetilgalaktozamin/N-asetilglukozamin-6-O-sülfotransferazlar

Galaktoz/N-asetilgalaktozamin/N-asetilglukozamin-6-O-sülfotransferaz (GST) enzimleri, galaktozun 6-hidroksil grubunda, yani N-asetilgalaktozaminde veya N-asetilglikozaminde, sülfatlanmayı katalizler [Hemmerich ve Rosen, 2000]. Heparan sülfotransferazlarda olduğu gibi, hücre sinyal yolunda rol alan post-translasyonel protein sülfatlanmasından sorumludurlar. GST'ler ayrıca, hücreler arası yapılaşmayı sağlayan ECM proteinlerinin sülfatlanmasını da sağlar [Bowman ve Bertozzi, 1999; Grunwell ve ark., 2002].

2.7.3. *CHST* Genleri ve KKD

Köpeklerde yapılan çalışmalarda *CHST3* geninin yakınında bulunan bir SNP ile KKD arasında ilişki olduğu bulunmuştur [Bartolome ve ark., 2015]. *CHST3* geninin kodladığı enzim kondroitin sülfat sentezi sırasında sülfatlama sürecinde görev almaktadır. Kondroitin sülfat kıkırdak fonksiyonunda görev alan bir proteinidir, dokuya direnç ve elastisite verir. *CHST3* mutasyonları, kalça dislokasyonu dahil, eklem dislokasyonlarıyla karakterize bir kongenital iskelet gelişim bozukluğu olan spondiloepifizeal displazi ile ilişkilendirilmiştir. Yakın zamanda insanlar üzerinde yapılan bir GWAS çalışmasında *CHST11* geninde yer alan bir SNP'nin kalça osteoartritiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir [Zeggini ve ark., 2012].

Kalça displazisi, kalça ekleminin fazla gevşek olması (hiperlaksite) ve anormal endokondral ossifikasyon ile karakterizedir. Endokondral ossifikasyon kemik dokusunun gelişiminde rol oynayan başlıca metabolik süreçlerden biridir [Todhunter ve Lust, 2003]. Kemik doku gelişiminde rol alan metabolik yollar, femur başının endokondral ossifikasyonu, eklem kapsülü ve kıkırdağının ekstrasellüler matriksinin oluşumu ve eklem kapsülü ile ligamentlerindeki kollajen fibrillerinin sentezi ile ilişkilidir. *CHST14* geninin ürünü olan enzim de GAG biyosentezinde rol alarak bu metabolik yollara katkı sağlamaktadır [Todhunter ve Lust, 2003; Friedenberg ve ark., 2011; Todhunter ve ark., 1997; Foels, 2000; Madsen ve ark., 1991].

Tablo 2-3: Köpeklerde CHST Genlerinin Lokasyon, Ürün ve Fonksiyonları.

Gen	CFA	Gen Ürünü	Ürün Fonksiyonu
CHST1	18	Keratan Sülfotransferaz (EC 2.8.2.21)	Keratan sülfotransferaz aktivitesi: *3'-fosfoadenilil sülfat + keratan = adenozin-3',5'-bifosfat + keratan 6'-sülfat* Keratanın galaktoz ve N-asetilglukozamin kalıntısının 6-pozisyonuna sülfat transferi yaparak GAG sentezine katılır.
CHST2	23	Karbonhidrat Sülfotransferaz -2 (EC 2.8.2.-)	N-asetilglikozamin 6-O-sülfotransferaz aktivitesi: Keratan benzeri yapıların N-asetilglikozamin kalıntısının 6-pozisyonuna sülfat transfer eder. Oluşan SELL ligandları inflamasyon bölgesinde lökositlerin toplanmasını sağlar.**
CHST3	4	Kondroitin-6 Sülfotransferaz (EC 2.8.2.17)	Kondroitin-6 sülfotransferaz aktivitesi: *3'-fosfoadenilil sülfat + kondroitin = adenozin-3',5'-bifosfat + kondroitin-6'-sülfat* Kondroitinin N-asetilgalaktozamin kalıntısını 6-pozisyonundan sülfatlayarak kondroitin-6-sülfatı (C6S) oluşturur. C6S, agrekanı oluşturur; agrekan kıkırdağın en önemli bileşenlerindendir.
CHST4	5	Karbonhidrat Sülfotransferaz -4 (EC 2.8.2.-)	N-asetilglikozamin 6-O-sülfotransferaz aktivitesi: Müsin-ilişkili glikanların N-asetilglukozamin kalıntılarını 6-pozisyonundan sülfatlayarak SELL ligandlarını oluşturur. Oluşan SELL ligandları inflamasyon bölgesinde lökositlerin toplanmasını sağlar.**
*CHST6**	5	Karbonhidrat Sülfotransferaz -6	Sülfotransferaz aktivitesi
CHST7	X	Kondroitin-6 Sülfotransferaz (EC 2.8.2.17)	Kondroitin-6 sülfotransferaz aktivitesi: *3'-fosfoadenilil sülfat + kondroitin = adenozin-3',5'-bifosfat + kondroitin-6'-sülfat* Kondroitinin N-asetilgalaktozamin kalıntısını 6-pozisyonundan sülfat ekler (GAG – kondroitin sülfat biyosentezi).

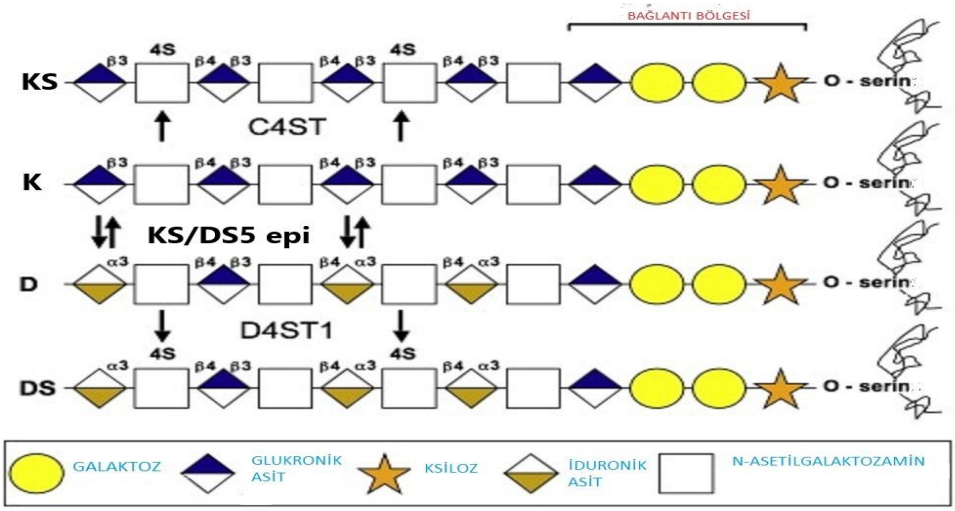
CHST8	1	Karbonhidrat Sülfotransferaz -8 (EC 2.8.2.-)	Sülfotransferaz aktivitesi
CHST9	7	Karbonhidrat Sülfotransferaz -9 (EC 2.8.1.-)	Sülfürtransferaz
CHST10	10	Karbonhidrat Sülfotransferaz-10 (EC 2.8.2.-)	Sülfotransferaz aktivitesi
CHST11	10	Kondroitin-4 Sülfotransferaz (EC 2.8.2.5)	Kondroitin-4 sülfotransferaz aktivitesi: *3'-fosfoadenilil sülfat + kondroitin = adenozin-3',5'-bifosfat + kondroitin-4'-sülfat* Kondroitinin N-asetilgalaktozamin kalıntısını 4-pozisyonundan sülfatlar.
CHST12	6	Kondroitin Sülfotransferaz (EC 2.8.2.5)	Kondroitin-4 sülfotransferaz aktivitesi: *3'-fosfoadenilil sülfat + kondroitin = adenozin-3',5'-bifosfat + kondroitin-4'-sülfat* Kondroitinin N-asetilgalaktozamin kalıntısını 4-pozisyonundan sülfatlar.
CHST13	20	Kondroitin-4 Sülfotransferaz (EC 2.8.2.5)	Kondroitin-4 sülfotransferaz aktivitesi: *3'-fosfoadenilil sülfat + kondroitin = adenozin-3',5'-bifosfat + kondroitin-4'-sülfat* Kondroitinin N-asetilgalaktozamin kalıntısını 4-pozisyonundan sülfatlar.
CHST14	30	Karbonhidrat Sülfotransferaz 14 (CHST 14) (EC 2.8.2.35)	Dermatan-N-asetilgalaktozamin-4-O-sülfotransferaz aktivitesi: *3'-fosfo-5'-adenilil sülfat + [dermatan]-N-asetil-D-galaktozamin = adenozin-3',5'-bifosfat + [dermatan]-4-O-sülfo-N-asetil-D-galaktozamin* Dermatanın N-asetilgalaktozamin kalıntısının 4-pozisyonundan sülfat ekler.
CHST15	28	N-asetilgalaktozamin-4 sülfat-6-O sülfotransferaz (EC 2.8.2.33)	N-asetilgalaktozamin-4-sülfat-6-O sülfotransferaz aktivitesi: 3-*fosfo-5-adenilil sülfat + [dermatan/kondroitin]-4-O-sülfo-N-asetilgalaktozamin = adenozin-3',5' bifosfat + [dermatan/kondroitin]-4,6-di-O-sülfo-N-asetil-D-galaktozamin* Hem kondroitin hem de dermatan sülfatın N-asetilgalaktozamin-4 sülfat kalıntısının 6-pozisyonuna sülfat ekler.

*****Köpeklerde CHST5 geni yoktur.

******Bu enzimin ayrıntılı görevleri insan için sunulmuştur. Enzim Komisyonu köpeklerdeki enzimle ilgili sadece genel sınıflandırma vermiştir.

2.8. *CHST14* Geni ve Karbonhidrat Sülfotransferaz-14 Enzimi

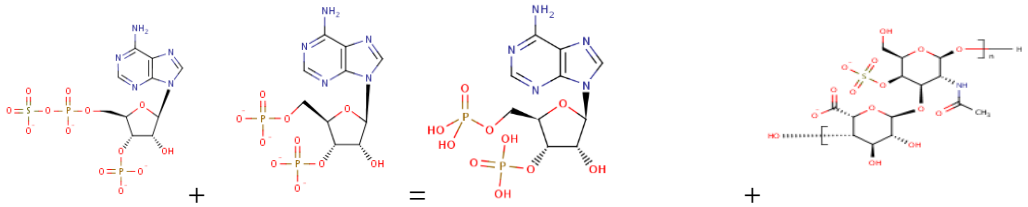
Köpeklerde 30. kromozomda yer alan 2142 baz çiftine sahip *CHST14* geninin 1 ekzonu bulunmaktadır ve 713 aminoasitli karbonhidrat sülfotransferaz-14 (CHST-14) enzimini kodlamaktadır. Bu enzim 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosülfattaki (PAPS) aktif sülfatı, dermatan sülfat yapısındaki N-asetilgalaktozamin (NAGal) kalıntısının 4. karbonuna aktarır. Şekil 2-5'te gösterilmiş olan bu sülfatlanma dermatan sülfatın stabilizasyonunu sağlar. Dermatan sülfat ve kondroitin sülfat uzun ve dallanma yapmayan glikozaminoglikan polimerleridir. Bu GAG polimerlerinin sentezi, kor proteinlerindeki korunmuş bağlanma bölgelerinde yer alan serin kalıntılarına GAG bağlanmasına olanak veren tetrasakkarit bağlayıcılarının oluşturulmasıyla başlar. Kondroitin sülfat ve dermatan sülfat zincirleri dönüşümlü glukuronik asit (GluAs) ve NAGal disakkarit birimlerinden oluşur. Dermatan sülfatta yer alan GluAs, iduronik aside (IdoA) epimerize olur. Bu sentez süreci Şekil 2-4'te verilmiştir. Bundan sonra NAGal'in 4. karbonundaki hidroksil grubuna sülfat eklenmesi komşu GluAs veya IdoA'nın yeniden epimerize olmasını engeller. Bu epimerizasyon ve sülfatlanma reaksiyonları rastgele oluşmaz, çok sıkı bir şekilde düzenlenir. Kondroitin sülfat ve dermatan sülfat zincirlerine yapısal değişkenlik kazandırıp diğer proteinlerle fonksiyonel etkileşimi düzenlerler. *CHST14* mutasyonlarında karbonhidrat sülfotransferaz aktivitesi, dolayısıyla epimerizasyon/sülfatlanma dengesi bozulur. [Penc ve ark., 1998; Trowbridge ve ark., 2002; Maccarana ve ark., 2006; Pacheco ve ark., 2009; Malmstrom, 1984; Evers ve ark., 2001; Hiraoka ve ark., 2000; Mikami ve ark., 2003]. Örneğin, fibroblastlarda GluAs-NAGal dissakkarit birimi IdoA-NAGal şeklinde epimerize olur; ancak, IdoA-NAGal'e 4. karbondan sülfat eklenemez. Böylece IdoA ters-epimerizasyon ile GluAs'ye dönüşür; yeniden kondroitin sülfat oluşur. GAG zincirindeki kondroitin sülfat/dermatan sülfat dengesinin kondroitin sülfat lehine artmasıyla GAG esnekliği azalır [Dündar ve ark., 2009; Miyake ve ark., 2010].



Şekil 2-5: Dermatan Sülfat ve Kondroitin Sülfat Biyosentezi. - Dündar ve ark(2009)'dan

Kondroitin sülfat, dermatan sülfat, ve ayrıca heparan sülfat, kor proteinlerinin bağlanma bölgesindeki serin kalıntısına glikozaminoglikan zincirlerini bağlayan tetrasakkarit köprüsünü içerir. Tetrasakkarit köprüsüne ilk kalıntıyı transfer eden özgün N-asetilgalaktozaminiltransferaz aktivitesiyle GAG zincirinden kondroitin oluşmaya başlar. Ardından kondroitin sülfat zinciri dönüşümlü olarak N-asetilgalaktozamin ve glukuronik asit kalıntıları eklenemesiyle büyür. Bu elongasyon sırasında epimeraz ve sülfotransferaz aktiviteleriyle kondroitin sülfat zinciri modifiye olur; 5-hidroksiepimeraz (kondroitin sülfat/dermatan sülfat-5-epimeraz (KS/DS5 epi)) aktivitesiyle glukuronik asit iduronik aside epimerize olur, ardından CHST14 enzimi, N kalıntısının 4. karbonuna sülfat transfer ederek kondroitin sülfatı dermatan sülfata dönüştürür; böylece, iduronik asidin glukronik aside ters-epimerizasyonu önlenir. (KS/DS5 epi: Kondroitin sülfat/dermatan sülfat-5 epimeraz; D4ST1: Dermatan-4-sülfotransferaz-1; KS: Kondroitin sülfat; DS: Dermatan sülfat; C4ST: Kondroitin-4-sülfotransferaz).

İnsanlardaki CHST-14 enzimi sıklıkla Dermatan-4-sülfotransferaz-1 (D4ST1) olarak da isimlendirilmektedir. *CHST14* geninde mutasyon taşıyan insanlarda yapılan transfeksiyon deneyleri ve fibroblast lizatlarından hazırlanan enzim testleri D4ST1 aktivitesinin (Şekil 2-5) kaybolduğunu ve hastaların fibroblastlarındaki GAG kompozisyonunun farklı olduğunu göstermiştir. Kollajen fibrillerin temel düzenleyicisi olan dekorin proteoglikanlarındaki dermatan sülfat da tamamen kaybolmakta, fibroblastlarda ise kondroitin sülfat miktarı artmaktadır [Miyake ve ark., 2010].



Şekil 2-6: Dermatan 4-sülfotransferaz aktivitesi.

CHST14 mutasyonlarında, D4ST1'in dermatan sülfat ve dermatan sülfat proteoglikanlarının sentezinde oynadığı anahtar role bağlı olarak çeşitli proteoglikanların etkileşimleri, dolayısıyla ECM stabilitesi bozulur. Bu etkiler insanlarda klinik olarak ciltte aşırı esneklik, eklem hipermobilitesi ve genel bağ dokusu kırılganlığı ile karakterize Ehlers-Danlos sendromlu hastalarda belirgindir. Malfait ve ark. (2010) kifoskolyotik tip Ehlers-Danlos sendromu (EDS tipVIB) tanılı iki Türk kardeşin tüm genom SNP taraması ve dizi analizinde *CHST14* geninde çerçeve kayması mutasyonu saptamışlardır [Malfait ve ark., 2010]. Dermatan sülfat ciltte, kan damarlarında, akciğerlerde, kalp kapakçıklarında ve tendonlarda bulunur. Yara iyileşmesi ve pıhtılaşmada da fonksiyoneldir. *CHST14* mutasyonlu hastalarda kanama zamanının da uzadığı bildirilmiştir [Dündar ve ark., 2009].

GKD ile ilişkili insan genetiği çalışmalarında önemli bir ilerleme kaydedilmemiştir. Bu nedenle, insan gen lokuslarıyla ilişkili kalça displazisi verileri kısıtlıdır. Dolayısıyla köpeklerde yapılan benzer çalışmalar insanlardaki GKD genetiğinin anlaşılmasında da fayda sağlayacaktır. Köpek ve insan genetik çalışmalarıyla geliştirilecek prediktif modeller, veteriner hekimlere ve tıp doktorlarına, köpek ve insanda genetik yatkınlık ortaya çıkarıldığı zaman en doğru terapötik yaklaşımı seçebilme olanağı sağlayacaktır; böylece, tedavi bireyselleştirilebilecektir. Seleksiyon süreçleri söz konusu olduğunda yetiştiricilerin, kan örneği alındıktan kısa bir süre sonra prediktif verileri kullanabilmeleri mümkün olacaktır [Sanches-Molano ve ark., 2015].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hayvan Materyali ve DNA Örnekleri

Çalışmada yer alan vaka ve kontrol grupları, sırasıyla, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi-Cerrahpaşa Cerrahi Kliniği'ne gelen 46 adet kalça displazisi tanısı konmuş köpek ve 16 adet kalça displazisi olmayan köpekten oluşmaktadır. Çalışmada İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı DNA Bankası'nda bulunan ve 22/7/2014 tarih ve 2014/68 sayılı Etik Kurul Kararı ile onaylanmış olan geçmiş tarihli bir proje kapsamında izole edilen DNA örnekleri kullanılmıştır. Toplam 62 adet köpeğe ait veriler (ırk, yaş, cinsiyet ve kalça displazi skoru) kayıt altına alınmıştır; bu veriler Tablo 3-1'de verilmiştir. DNA örnekleri çalışmanın laboratuvar aşamasına kadar -80ºC'de saklanmıştır.

Tablo 3-1: Vaka ve kontrol gruplarına dahil edilmiş köpeklerin ırk, yaş, cinsiyet ve kalça displazi skor bilgileri.

Vaka no.	Protokol no.	Irk	Yaş	Cinsiyet	Kalça Displazi Skoru
1	1	Samoed	1 yaş	Erkek	E
2	2	Labrador	6 ay	Erkek	B
3	3	Labrador	5 yaş	Dişi	C
4	5	Kangal	16 ay	Dişi	E
5	6	Alman Çoban Köpeği	6 ay	Erkek	D
6	7	Rottweiler	11 ay	Dişi	E
7	8	Alman Çoban Köpeği	9 ay	Dişi	E
8	9	Labrador	9 ay	Dişi	D
9	10	Labrador	9 ay	Erkek	B
10	12	Melez	1 yaş	Erkek	D
11	14	Kangal	1 yaş	Erkek	D
12	15	Alman Çoban Köpeği	9 ay	Erkek	C

13	16	Seter	4 yaş	Erkek	C
14	17	Alman Çoban Köpeği	2 yaş	Erkek	D
15	18	Bernese Dağ Köpeği	13 ay	Erkek	D
16	19	Rottweiler	1 yaş	Dişi	D
17	20	Dogo Arjantin	5 yaş	Erkek	D
18	22	Seter	18 ay	Dişi	E
19	24	Melez	2 yaş	Dişi	E
20	26	Golden Retriever	8 yaş	Erkek	D
21	27	Rottweiler	7 ay	Erkek	D
22	28	Kangal	9 ay	Erkek	D
23	29	Alman Çoban Köpeği	5 yaş	Dişi	E
24	30	Rottweiler	6 ay	Erkek	E
25	31	Alman Çoban Köpeği	18 ay	Erkek	E,D
26	32	Golden Retriever	12 yaş	Erkek	D
27	33	Kangal	1 yaş	Erkek	C
28	34	Labrador Retriever	10 yaş	Dişi	E
29	35	Pug	3 yaş	Erkek	C
30	36	İngiliz bulldog	1 yaş	Erkek	B
31	38	Seter	4 yaş	Erkek	B
32	39	Labrador Retriever	12 yaş	Dişi	E
33	40	Golden Retriever	1 yaş	Erkek	D
34	41	Labrador	1 yaş	Erkek	D
35	42	Seter	9 yaş	Erkek	E
36	43	Kangal	10 ay	Dişi	D

37	44	Chow-Chow	18 ay	Dişi	E
38	45	Golden Retriever	6 ay	Erkek	E
39	46	Alman Çoban Köpeği	5 yaş	Erkek	C
40	47	Kangal	2 yaş	Dişi	E
41	48	Rotweiler	8 ay	Erkek	C
42	49	Golden Retriever	10 ay	Erkek	D
43	50	Golden Retriever	10 yaş	Dişi	E
44	51	Belçika Çoban Köpeği	5 ay	Erkek	D
45	52	Labrador Retriever	6 yaş	Erkek	E
46	53	Rottweiler	8 yaş	Dişi	E
Kontrol no.	**Protokol no.**	**Irk**	**Yaş**	**Cinsiyet**	**Kalça Displazi Skoru**
K1	K-9	Rottweiler	3 ay	Erkek	A
K2	K-10	Golden Retriever	7 ay	Dişi	A
K3	K-11	Kangal	5 ay	Erkek	A
K4	K-12	Melez	4 yaş	Erkek	A
K5	YK-1	Golden Retriever	7 yaş	Erkek	A
K6	YK-2	Golden Retriever	10 yaş	Dişi	A
K7	YK-3	Alman Çoban Köpeği	4 yaş	Erkek	A
K8	YK-4	Labrador Retriever	3 yaş	Erkek	A
K9	YK-5	Alman Çoban Köpeği	3 yaş	Dişi	A
K10	YK-6	Rottweiler	18 ay	Dişi	A
K11	YK-7	Melez	7 yaş	Erkek	A
K12	YK-8	Labrador	13 yaş	Erkek	A

K13	YK-9	Golden Retriever	5 yaş	Dişi	A
K14	YK-10	İngiliz bulldog	6 yaş	Erkek	A
K15	YK-11	Golden Retriever	7 yaş	Dişi	A
K16	YK-12	Melez	6 ay	Erkek	A

3.2. Hasta ve Kontrol Grubu Olgularının Seçilmesi

Kalça displazisi tanısı; anamnez bilgileri, fiziksel muayene ve radyografi sonuçları doğrultusunda konulmuştur. Köpeklerin ventro-dorsal radyografileri çekilerek sisteme kaydedilmiştir. Kalça displazisi skorları radyografik sonuçlar üzerinden Norberg açısının ölçülmesiyle belirlenmiştir.

3.3. Kalça Displazi Skoru Hesaplama Kriterleri

FCI (Fédération Cynologique Internationale) Skorlama Kriterleri:

A - Kalça displazi bulgusu yok: Femur başı ve asetabulum uygun konumda. Kraniyolateral asetabular kenar keskin ve hafifçe yuvarlak görünümde. Eklem aralığı dar ve eşit mesafede. Norberg açısı yaklaşık 105°. Kusursuz kalça ekleminde kraniyolateral kenar femur başını kaudolateral taraftan daha fazla çevrelemekte.

B - Normale yakın kalça eklemleri: Femur başı ve asetabulum konumu hafifçe uyumsuz ve Norberg açısı yaklaşık 105º, veya femur başı ve asetabulum uygun konumda ve Norberg açısı 105º'den küçük.

C - Hafif kalça displazisi: Femur başı ve asetabulum uyumsuz, Norberg açısı yaklaşık 100° ve/veya kraniyolateral asetabular kenar hafifçe yassılaşmış. Kraniyal, kaudal, veya dorsal asetabular kenarda veya femur başı ve boynunda en fazla hafif düzeyde osteoartrit bulguları.

D - Orta derecede kalça displazisi: Femur başı ve asetabulum arasında subluksasyonla birlikte aşikar uyumsuzluk. Norberg açısı 90º'den büyük. Kraniyolateral rimde yassılaşma ve/veya osteoartrit belirtileri.

E - İleri kalça displazisi: Kalça ekleminde luksasyon veya belirgin subluksasyon gibi belirgin displastik değişiklikler. Norberg açısı 90º'den küçük. Asetabular kenarda yassılaşma, deforme femur başı (mantar şeklinde, yassılaşma) ve diğer overt osteoartrit belirtileri.

3.4. Kullanılan Cihazlar

İ.Ü. Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı bünyesindeki bulunan aşağıdaki cihazlar proje çerçevesinde kullanılmıştır:

Adı	Alım Yılı	Kullanım Amacı
Güç kaynağı	2004	Agaroz jel elektroforez
Thermal cycler	2004	Polimeraz zincir reaksiyonu
UV görüntüleme tablası	2004	PZR ürünlerinin görüntülenmesi
Yatay mini jel elektroforez	2010	Agaroz jel elektroforez
Vorteks karıştırıcı	2011	PZR karışımının hazırlanması
No-frost buzdolabı	2003	PZR'de kullanılacak kimyasalların saklanması
Mini santrifüj	2005	PZR karışımının hazırlanması
Laminar Flow kabini	2007	PZR karışımının hazırlanması
-80ºC buzdolabı	2007	DNA örneklerinin saklanması

3.5. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler aşağıda sunulmuştur:

Agaroz	(Biomax/IB70073)
TEB tampon çözeltisi	(Chembio/B6680.1000)
Etidyum Bromür	(Thermo Scientific/17898)
Yükleme tamponu (6X)	(Thermo Scientific/R0611)
dNTP seti (4x25 µl)	(Bioline/BIO-39025)
Taq DNA polimeraz	(Tampon ve $MgCl_2$) (Thermo Scientific/EP0401)
Primerler	(Macrogen Inc.)

3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Köpek *CHST14* geni 2142 baz çiftinden oluşmaktadır. Tüm gen dizileme işlemi için *CHST14* geninin beş bölge halinde PZR ile çoğaltılması hedeflenmiştir. PZR işleminde kullanılan maddelerin hazırlanışı aşağıda açıklanmıştır.

3.6.1. Primer Tasarımı

CHST14 geninin nükleotid dizisi European Molecular Biology Laboratory (EMBL) veritabanına bağlı olarak çalışan https://www.ensembl.org/index.html sitesinden elde edilmiştir. Primer tasarlanırken PZR primerleri ve dizileme primerleri olmak üzere iki farklı şekilde tasarım yapılmıştır. İlk olarak PZR primerlerinin tüm geni çoğaltması hedeflenirken, dizileme primerleri ile genin tamamının beş parçada dizilenmesi planlanmıştır. Tasarımı yapılan ve optimizasyon aşamasında kullanılan PZR ve dizileme primerleri Tablo 3-2'de verilmiştir.

Tablo 3-2: *CHST14* geninin dizilenmesinde kullanılan primerler.

Primer Adı	**Primer Dizisi**	**Tm**
PZR_Forward	ATGGAGATGAGCCACTGGTCAA	57 °C
PZR_Reverse	AAGCCTTCACAAGGATTCCA	57 °C

Seq_1	ACATCCGGCCACCGT	57 °C
Seq_2	ATCCTGGCCGAGGTGAA	57 °C
Seq_3	ACAGCACTACTTCAAGTTCCT	57 °C
Seq_4	TGCCCCACGGGCCCT	62 °C
Seq_5	ACTGTGCCGTCCACCACTT	61 °C

3.6.2. Primer Solüsyonunun Hazırlanması

Liyofilize halde bulunan primerler öncelikle 100 µl distile suda çözündürülmüştür. Hazırlanan stok solüsyondan 1 µl alınarak, distile su ile primerin sahip olduğu nmol değerine tamamlanmış ve 10 pmol/ml konsantrasyon sağlanmıştır. Kullanılmadan önce mikrosantrifüj ile karıştırılmıştır.

3.6.3. dNTP Solüsyonunun Hazırlanması

PZR reaksiyonunda kullanılacak dNTP karışımını hazırlamak amacıyla her bir nükleotid trifosfat (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) çözeltisinden 10'ar µl, 0,5 ml'lik bir ependorf tüpüne koyulmuş ve üzerine 40 µl distile su eklenmiştir. 100 µM konsantrasyonda hazırlanan dNTP karışımı mikrosantrifüj ile karıştırıldıktan sonra -20ºC'de saklanmıştır.

3.6.4. PZR Optimizasyonu

Rastgele seçilen iki örnek ile PZR optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Buna göre ilk olarak PZR Forward ve PZR Reverse primerleri ile PZR denemesi yapılmıştır. Bu iki primer ile herhangi bir çoğalma gerçekleştirilememiştir. Ardından *CHST14* genindeki daha küçük bölgelerin çoğaltılabilmesi amacıyla, sırası ile Seq_1 - Dizileme, Seq_2 - Dizileme, Seq_3 - Dizileme, Seq_4 - Dizileme ve Seq_5 - Dizileme primeleri kullanılarak PZR denemeleri yapılmıştır.

Seq_1, Seq_3, Seq_4 ve Seq_5 Dizileme primerleri ile yapılan PZR çalışmasında amplikon elde edilmiştir.

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda PZR bileşenleri ve PZR koşulları belirlenmiştir.

3.6.5. PZR Bileşenleri ve Şartları

PZR işlemlerinde kullanılan bileşenlere dair içerik bilgileri Tablo 3-3'te sunulmuştur.

Tablo 3-3: **PZR Bileşenleri**

Malzeme	**Miktar (µl)**
PZR tamponu ve $MgCl_2$	4,5
Forward Primer	1
Reverse Primer	1
dNTP karışımı	0,3
dH_2O	13,2
Hot Start TaqPolimeraz	0,5

95°C'de 60 saniye başlangıç denatürasyonunun ardından 30 siklus boyunca, 95°C'de 20 saniye denatürasyon, primere bağlı ısıda 40 saniye bağlanma, 72°C'de 4 dakika uzama ve son aşamada ise 72°C'de 7 dakika son uzama reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.

3.7. Agaroz Jel Elektroforezi

PZR sonuçlarının kontrolü amacıyla ürünler %2'lik agaroz jel içinde elektroforeze tabi tutulmuştur. %2'lik agaroz jel hazırlanması amacıyla 0,6 g agaroz 30 ml 0,5X TEB tampon çözeltisi içinde kaynatma yöntemiyle çözündürülmüştür. Jel sıvı haldeyken içine 1,5 µl etidyum bromür eklenmiş ve soğumaya bırakılmıştır. 55-60ºC'ye kadar soğutulan jel, tarakların yerleştirildiği tablaya dökülmüştür. Jelin dökülmesi

esnasında hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilmiştir. Jel 15 dakika içinde polimerize olduktan sonra örneklerin yüklenmesine geçilmiştir.

Yükleme işleminde 5 µl PZR ürünü 1 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak jelde bulunan kuyucuklara koyulmuştur. Yatay jel elektroforezinde 40 dakika süreyle 110 V uygulanmıştır. UV ışık altında görüntülenen PZR ürünlerinden başarıyla çoğaltılanlar DNA dizileme işlemi için hizmet alımı kapsamında bir firmaya gönderilmiştir.

3.8. DNA Dizileme İşlemleri

Her bir amplikon Sanger dizilemeye tabi tutulmuştur. Dizileme ABI-3100 sekans cihazında (PE Biosystems, Almanya) gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada PZR primerlerine ek olarak üç adet sekans primeri kullanılmıştır.

Dizileme aşamasında kullanılan primerler:

Forward: 5'- ATGGAGATGAGCCACTGGTCAA -3'

Reverse: 5'- AAGCCTTCACAAGGATTCCA -3'

SeqPrimer 3: 5'- ACAGCACTACTTCAAGTTCCT -3'

SeqPrimer 4: 5'- TGCCCCACGGGCCCT -3'

SeqPrimer 5: 5'- ACTGTGCCGTCCACCACTT -3'

Aşağıdaki aşamalardan oluşan Sanger dizileme işlemlerinde BigDyeTM dizileme kiti kullanılmıştır (BigDyeTM terminator cycle sequencing kit-ThermoFisher Scientific, USA).

Ex-Sap Aşaması: Bu aşamada PZR ürünündeki, ortamda serbest kalan dNTP'ler ve primerler enzimatik yöntemlerle uzaklaştırılmıştır.

BigDye Aşaması: Bu aşamada kimyasal olarak amplikonlara uygun tek yönlü primer (PZR aşamasında Forward ya da Reverse-Primer) ve 4 farklı bazı içeren ve her baz için farklı floresan boya ile işaretli dNTP'ler kullanılmıştır. BigDye aşamasında ilgili kimyasallar ile birlikte PZR işlemi yapılmış, böylece amplikon büyüklüğü kadar çeşitliliğe sahip farklı uzunluklarda ve floresan işaretli amplikonlar oluşturulmuştur.

‘CleanUp’ Aşaması: Sekanslama esnasında kirlilik oluşmaması için primer ve floresan işaretli dNTP'ler reaksiyondan uzaklaştırılmıştır.

Kapiller Jel Elektroforez Aşaması: Sekanslamanın gerçekleştiği bu aşamada BigDye sonrası farklı büyüklüklerdeki amplikonlar kapiller içindeki polimerde elektriksel akım sayesinde yürütülerek uzunluk temelli sıralanmıştır. Sıralanan amplikonların ışımaları lazer yardımı ile alınarak sekans dizisi ortaya çıkarılmıştır.

3.9. DNA Dizi Analizi

CHST14 genine ait elde edilen DNA dizileri MEGA6 bilgisayar programındaki [Tamura ve ark., 2013] Clustal W programı kullanılarak hizalanmıştır. Vaka ve kontrol grubuna dahil örnekler birbirleriyle ve Gen Bankası’ndan elde edilen Canis familiaris *CHST14* genine ait referans sekans (Erişim numarası: NC_066612.3) ile karşılaştırılmıştır. Örnekler, karşılaştırma sonucunda belirlenen SNP'ler dikkate alınarak genotiplendirilmiştir.

3.10. İstatistiki Analiz

Referans sekanstan farklılık gösteren ancak çalışmada yer alan örneklerde monomorfik olan SNP'ler ve minör allel frekansı 0,01'den küçük olan SNP'ler analiz dışında bırakılmıştır. Kalça displazili örnekler ve kontrol grubu, *CHST14* geninde tespit edilen SNP'lerin allel ve genotip frekansları açısından karşılaştırılmıştır. Vakalar ve kontrol grubunda SNP'lere ait allel frekansları, genotip frekansları ve Hardy-Weinberg eşitliğine uyum POPGENE 1.32 programı [Yeh ve ark., 1999] kullanılarak hesaplanmıştır. SNP'ler ile vakalar arasındaki ilişkinin önemi SPSS 20.0 programındaki [IBM, 2011] Pearson çift taraflı χ^2 (ki-kare) testi ile tespit edilmiştir. Olasılık oranları (%95 güven aralığı ile) koşulsuz lojistik regresyon analizi ile belirlenmiştir.

4. BULGULAR

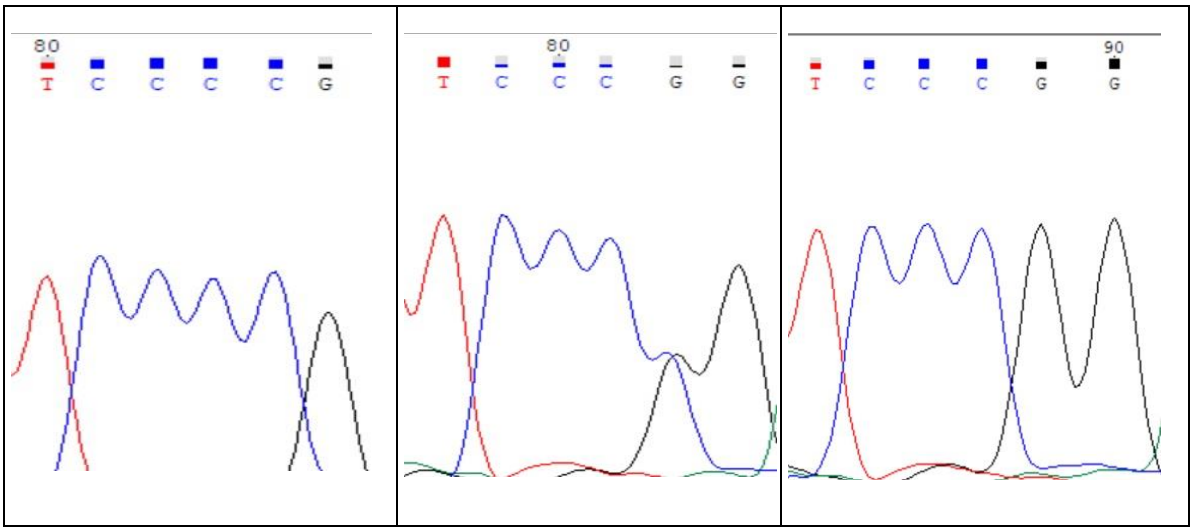
4.1. *CHST14* Geninde Belirlenen Tek Nükleotid Polimorfizmleri

DNA dizi analizi sonucunda köpek *CHST14* geninde dört adet SNP belirlenmiştir. *CHST14* geni 1. ekzonda bir adet C/G transversiyonu ve bir adet T/C transisyonu, 3'-UTR bölgesinde ise bir adet G/C transversiyonu ve bir adet C/T transisyonu tanımlanmıştır. Tespit edilen dört SNP'den üçü veritabanlarında mevcutken, biri ilk defa bu çalışmada belirlenmiştir. Söz konusu polimorfizmlerin genotiplendirilmesi için dizileme sonuçlarına ait kromotogramlar görüntülenerek homozigot ve heterozigot bireyler tespit edilmiştir. Belirlenen dört adet SNP'ye ait minör allel frekansları ve kalça displazisi ile ilişkileri Tablo 4-1'de, genotip frekansları ve genotiplerin kalça displazisi ile ilişkileri ise Tablo 4-2'de sunulmuştur.

4.1.1. *CHST14* Geni 1. Ekzonda 7.640.710 Pozisyonunda Bulunan G/C Polimorfizmi

CHST14 geni 1. ekzonda, 7.640.710 pozisyonunda yer alan G/C polimorfizmi, rs852536290 numarasıyla köpek SNP veritabanına kayıtlı bir transversiyondur. Yanlış anlamlı bir mutasyondur ve karbonhidrat sülfotransferaz 14 enziminin 25. aminoasit kalıntısını kodlayan kodonda bulunmaktadır. CGG kodonunun CCG kodonuna dönüşmesi sonucunda, prolin amino asidi arjinin aminoasidinin yerini almaktadır.

Çalışmada yapılan analizler sonucunda polimorfizme ait GG, GC ve GG olmak üzere üç genotipe rastlanmıştır (Şekil 4-1).



a) b) c)

Şekil 4-1: *CHST14* geni 4. bölgede tanımlanan G/C polimorfizmi
a) CC homozigot b) GC heterozigot c) GG homozigot

Minör allel C allelidir. C allelinin frekansı kontrol ve vaka olmak üzere toplam tüm örneklerde 0,47, kalça displazili vakalarda ise 0,48 olarak hesaplanmıştır. Kontrol ve vaka grupları karşılaştırıldığında C allelinin her iki grupta da G allelinden daha düşük bir frekansa sahip olduğu belirlenmiştir.

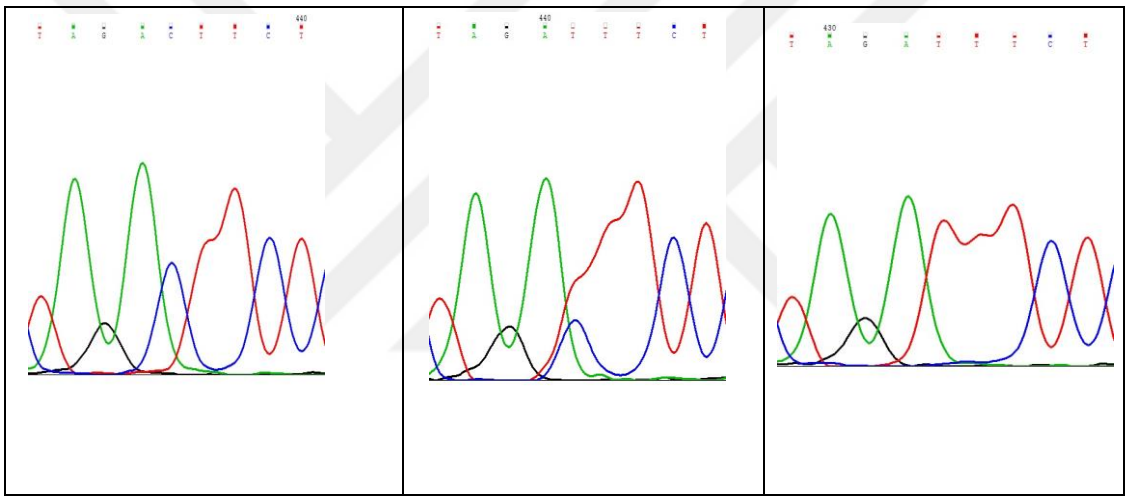
Genotip frekanslarının gruplardaki dağılımına bakıldığında, GG genotipinin vaka ve kontrol gruplarında sırasıyla %40,9 ve %40,0 değerleriyle diğer genotiplere oranla daha yüksek bir frekansa sahip olduğu tespit edilmiştir. Heterozigot bireyler çalışmada analizi yürütülen örneklerin tamamı değerlendirildiğinde %24,1 ile en düşük orana sahiptir.

rs852536290 numaralı SNP ile kalça displazisi arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla kontrol ve vaka gruplarındaki allel ve genotip frekansları karşılaştırılmıştır, ancak yanlış anlamlı bir mutasyon olan G/C transversiyonu ile kalça displazisi arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

4.1.2. *CHST14* Geni 1. Ekzonda 7.642.721 Pozisyonda Bulunan C/T Polimorfizmi

CHST14 geninde tespit edilen ve 30. kromozomda 7.642.721. pozisyonda yer alan C/T polimorfizmi, köpek SNP veritabanında rs852245958 numarasıyla kaydedilmiş olan bir adet transisyondur. Karbonhidrat sülfotransferaz 14 enziminin 695. aminoasit kalıntısını kodlayan kodona dahil olmaktadır. C/T polimorfizmi aminoasit dizisinde değişikliğe yol açmayan sessiz bir mutasyondur. İlgili kodonlar olan GAT ve GAC asparajin aminoasidini kodlamaktadır.

Çalışmaya dahil edilen örneklerde, DNA dizileme yöntemiyle CC homozigot, CT heterozigot ve TT homozigot olmak üzere üç adet genotip belirlenmiştir (Şekil 4-1).



a) b) c)

Şekil 4-2: *CHST14* geni 7.642.721 pozisyonda tanımlanan C<T polimorfizmi a) CC homozigot b) CT heterozigot c) TT homozigot

Minör allel T allelidir ve çalışmadaki tüm örnekler (kontrol ve vaka grupları) dikkate alındığında 0,49 frekansına sahip olduğu belirlenmiştir. T allel frekansı vaka grubunda 0,51 olarak hesaplanmıştır. Vaka grubunda C allel frekansı T allel frekansından yüksek bulunurken, kontrol grubunda T allel frekansının daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

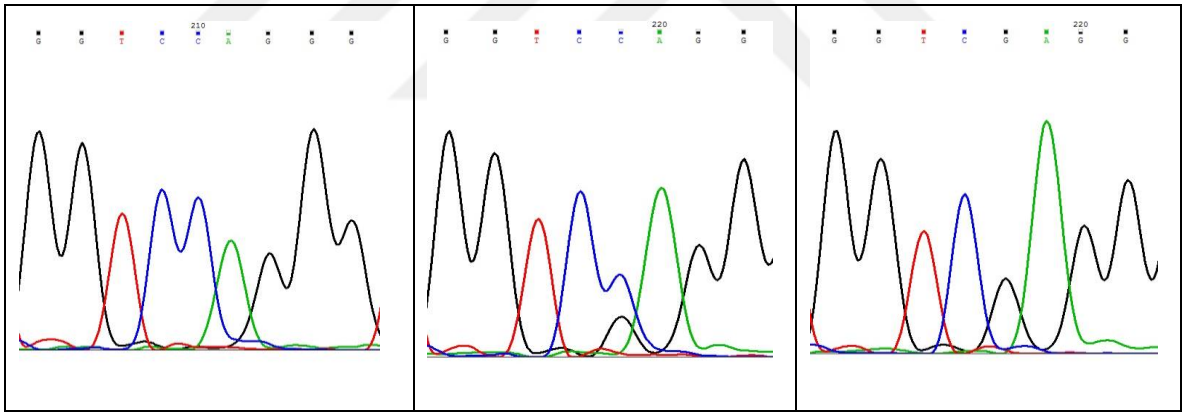
Genotip frekansları açısından değerlendirildiğinde; TT genotip frekansı vaka grubunda en yüksek değere sahipken, CC genotip frekansı kontrol grubunda

diğerlerinden daha yüksek (0,46) bulunmuştur. Her iki grupta da heterozigot bireyler daha az sayıdadır.

Çalışmada, allel frekanslarının ve üç genotipe ait frekansların kontrol ve vaka grupları arasında karşılaştırılması sonucunda rs852245958 numaralı C/T polimorfizmi ile kalça displazisi arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir.

4.1.3. *CHST14* Geni 3'-UTR Bölgesinde 7.642.918 Pozisyonda Bulunan C/G Polimorfizmi

Köpek SNP veritabanında rs851616627 numarasıyla kaydedilmiş olan polimorfizm bir adet C/G transversiyonudur; 30. kromozomda 7.642.918. pozisyonda yer almaktadır. Söz konusu polimorfizm *CHST14* geninin 3'-UTR bölgesinde yer almaktadır ve kodlamaya katılmamaktadır. Çalışmada CC homozigot, GC heterozigot ve GG homozigot olmak üzere üç adet genotip tespit edilmiştir (Şekil 4-2).



a) b) c)

Şekil 4-3: *CHST14* geni 4. bölgede tanımlanan G/C polimorfizmi
a) CC homozigot b) GC heterozigot c) GG homozigot

G alleli her iki grupta da minör allel olarak tespit edilmiştir. Vaka grubunda %48,8 olan G allel frekansı, kontrol grubunda %20 olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubunda GG genotipine rastlanmamıştır. CC genotipinin her iki grupta da heterozigot genotipe göre daha yüksek frekansa sahip olduğu belirlenmiştir.

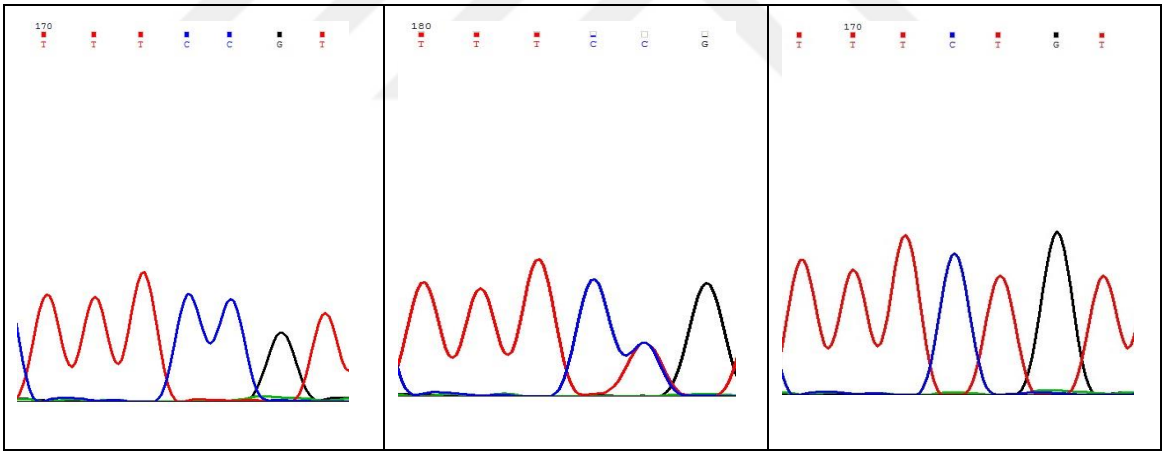
Vaka ve kontrol grupları arasında yapılan karşılaştırma sonucunda G alleliyle kalça displazisi arasında istatistiki olarak önemli bir ilişki olduğu belirlenmiştir (p

<0,05). Köpek *CHST14* geninde bulunan rs851616627 polimorfizmine ait G alleli kalça displazisi açısından risk alleli olarak tespit edilmiştir.

Genotip frekanslarının gruplar arasında karşılaştırılmasıyla GG homozigot genotipi ile kalça displazi arasındaki ilişkinin istatistiki olarak önemli olduğu sonucuna varılmıştır (p <0,05).

4.1.4. *CHST14* Geni 3'-UTR Bölgesinde 7.643.323 Pozisyonda Bulunan C/T Polimorfizmi

Veritabanlarında bulunmayan, ilk defa bu çalışmada belirlenen bir transisyondur; 30. kromozomda 7.643.323. pozisyonda yer almaktadır. *CHST14* geninin 3'-UTR bölgesinde bulunduğundan kodlamada görev almamaktadır. Çalışmaya dahil edilen örneklerde CC homozigot, CT heterozigot ve TT homozigot olmak üzere polimorfizme ait üç adet genotip belirlenmiştir (Şekil 4-3).



a) b) c)

Şekil 4-4: *CHST14* geni 5. bölgede tanımlanan C/T polimorfizmi
a) CC homozigot b) CT heterozigot c) TT homozigot

Çalışmaya dahil edilen tüm örnekler açısından değerlendirildiğinde C allel frekansının total olarak %86,9 ile çok yüksek bir değere sahip olduğu görülmektedir. Bu değer kontrol grubunda %97,6'ya çıkarken, vaka grubunda %81,8 olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubunda TT homozigot bireye rastlanmamıştır. CC homozigot genotip

frekansı her iki grupta da yüksek bulunmuştur (vaka grubunda %75, kontrol grubunda %95,2).

Kalça displazisiyle ilişki analizi sonuçlarına göre, T alleli risk alleli olarak belirlenmiştir ($p<0,05$). TT genotipi ile kalça displazisi arasındaki ilişkinin de istatistiki olarak önemli olduğu gözlemlenmiştir ($p<0,05$).

Tablo 4-1: ***CHST14*** **genindeki polimorfizmlerin köpeklerde kalça displazisi ile ilişkisi**

SNP	**Genom pozisyonu**	**Alleller**	**Minör allel**	**Minör allel frekansı**		**Olasılık oranları (95% güven aralığı)**	χ^2
				Tüm örnekler	**Vakalar**		
rs852536290	30: 7.640.710	G/C	C	0,47	0,48	1,116 (0,421-2,959)	0,49 Ns
rs852245958	30: 7.642.721	T/C	T	0,49	0,51	1,3765 (0,5897-3,2132)	0,548 Ns
rs851616627	30: 7.642.918	C/G	G	0,41	0,49	3,8095 (1,41-10,2924)	7,517*
Yeni SNP	30:7.643.323	C/T	T	0,13	0,18	9,1111 (1,1654-71,2281)	6,245*

Ns:önemsiz , * p<0,05

Tablo 4-2: ***CHST14*** **genindeki polimorfizmlere ait genotip frekansları**

					Genotip Frekansı (%)											
	rs852536290				rs852245958				rs851616627				Yeni SNP			
Grup	GG	GC	CC	χ^2	TT	TC	CC	χ^2	GG	GC	CC	χ^2	CC	CT	TT	χ^2
Vaka	40,9	22,7	36,4	0,274 Ns	35,9	30,8	33,3	0,993 Ns	34,1	29,3	36,6	6,920 *	75,0	13,6	11,4	4,140 Ns
Kontrol	40,0	30,0	30,0		33,3	20,0	46,7		-	40,0	60,0		95,2	4,8	-	

Ns: önemsiz, *p<0,05

5. TARTIŞMA

Köpek Kalça Displazisi gibi kompleks hastalıklar çok sayıda çevresel ve genetik faktörün karşılıklı etkileşimi ile ortaya çıkmaktadır. Genetik araştırmalardaki hızlı teknolojik gelişmeler sonucunda kompleks hastalıkların ortaya çıkışında rol alan farklı lokuslar ortaya konmaktadır. Köpeklerde kalça displazisi üzerine yapılan genotip-fenotip ilişkilendirme çalışmaları hastalığın etiyolojisinin daha iyi anlaşılmasına katkı koymaktadır, bunun yanı sıra tanı amaçlı geliştirilecek genetik testler için de alt yapı sağlamaktadır [Manz ve Tellhelm, 2017]. KKD'nin genetik alt yapısının incelenmesi; patogenezin ortaya konması, tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ve yetiştiricilikte uygulanacak ıslah çalışmaları için önem taşımaktadır.

KKD araştırmalarının diğer önemi hastalığın insanlardaki GKD ile benzerliğinden kaynaklanmaktadır. Köpek hastalıklarının insandakilere benzerliği, insanlardaki homolog bozukluklara neden olan genlerin keşfedilmesinde köpekleri önemli bir tür haline getirmiştir. Bu bozukluklardan olan kalça displazisi ve osteoartritin insan ve köpeklerdeki klinik ekspresyonu ve patogenezindeki benzeşim düzeyi oldukça yüksektir. İki türde de kalça eklem laksitesi ve subluksasyonu ortak fenotipik özelliklerdir [Zhou Z ve ark., 2010]. Köpekler kalça displazisi açısından model tür olarak kabul edildiği gibi; insanlarda gelişen kemik, eklem ve bağ dokusu hastalıklarının patogenezine dair elde edilen veriler de veteriner hekimliği açısından önem taşımaktadır.

KKD, koksofemoral eklem laksitesi, dejenerasyon ve osteoartritle karakterize poligenik ve multifaktöryel bir gelişimsel bozukluktur. Eklemde görülen KKD ile uyumlu değişikliklerin genetik yatkınlığın yanı sıra çevresel ve biyomekanik etkenler sonucunda oluştuğu konusunda fikir birliği söz konusu olsa da, her birinin KKD'ye katkısı belirlenememiştir [Zhou Z ve ark., 2010]. Yüz yıla yakın süredir araştırılmasına rağmen KKD etiyolojisi ve ideal tedavi paradigmaları hala tartışmalıdır. KKD, 1930 yılında New York Veteriner Tıp Birliği toplantısında öne sürüldüğü gibi, tek bir etkene bağlı değildir ve köpek kalça ekleminin morfoloji ve fonksiyonunu farklı yönlerden etkileyen kalıtımsal ve çevresel faktörler dizisinin bir araya gelmesiyle ortaya çıkar [Schachner ve Lopez, 2015].

KKD ile ilgili yayımlanan kalıtsallık oranları 0**,**1 ila 0**,**6 arasında değişmektedir. Oranlardaki farklılıklar karakter, hesaplama yöntemi ve kullanılan örneklerden kaynaklanmaktadır. Örneğin Portekiz Estrela Dağ köpeklerinde pasif kalça laksitesinde kalıtsallık 0**,**83'e kadar çıkmaktadır. Genetik kalıtım ile ilgili yapılan çalışmalarda hem dominant hem resesif kalıtımın etkili olduğu ileri sürülmüştür [Ginja ve ark., 2010; Janutta ve ark., 2006; Maki ve ark., 2004; Silvestre ve ark., 2007].

Lavrijsen ve ark.'nın 2014 yılındaki çalışmasının sonuçlarına dayanarak kalça displazisi etiyolojisinde endokondral kemik oluşumuyla birlikte yumuşak doku defektinin de rol aldığı düşünülmektedir [Lavrijsen ve ark., 2014]. Çeşitli köpek ırklarında 22.000'den fazla SNP'nin kullanıldığı bir GWAS çalışmasında KKD ile 4, osteoartritle ilişkili 2 adet SNP tespit edilmiştir [Zhou ve ark., 2010]; bu SNP'ler CFA1, 8, 20 ve 25'te konumlanmışlardır. CFA1, 5, 8, 15, 20, 25 ve 32 kromozomlarındaki 31 SNP'nin ise 24 ayrı gende veya genin yakınında konumlandığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar KKD'nin, çok sayıda genin küçük etkisinin birleşmesiyle ortaya çıkmasını sağlayan karmaşık poligenik yapısını doğrulamaktadır [Sanchez-Molano ve ark., 2014].

Yapılan çalışmalar sonucunda KKD'yle ilişkili olduğu ileri sürülen bazı genler tespit edilmiştir. Mikkola ve ark. 2019'da 775 Alman Çoban Köpeği üzerinde yaptıkları GWAS çalışmasında kalça eklemi uyumsuzluğu ile ilgili aday genler olarak 9. kromozomda yer alan kemik ve eklem gelişimiyle ilgili *NOG* genini, C_2HC-tip çinko parmak-1 (*NANOS1*) ve 28. kromozomdaki matrik metalloproteinaz-14 (*MMP-14*) genlerini belirlemişlerdir [Mikkola ve ark., 2019]. Köpeklerde 11. kromozomda yer alan *FBN2,* eklemlerdeki ekstrasellüler matriksin elastik yapısında rol almaktadır ve bu gendeki bir delesyon kalça displazisiyle ilişkili bulunmuştur [Boregowda ve ark., 2008]. Fibronektin-1 kıkırdak dokunun ekstrasellüler matriksinin oluşumunda rol alan bir glikoproteindir. Köpeklerde 37. kromozomda yer alan Fibronektin-1 geninin yakınlarında KKD ile ilişkili bir SNP tespit edilmiştir [Pfahler ve Distl, 2012].

Kalça displazisinin genetik patogenezinin araştırılmasında GAG biyosentezinin moleküler yolaklarında rol alan enzimleri kodlayan genlerin incelenmesi aydınlatıcı olacaktır. GAG'lar hücre yüzeyinde ve ekstrasellüler matrikste bulunan proteoglikanların yapısındaki heteropolisakkartlerdir. Sülfatlanmış GAG'ların sentezinde görev alan glikoziltransferazları, sülfotransferazları ve taşıyıcıları kodlayan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanan çeşitli kemik ve bağ doku bozuklukları bulunmaktadır [Paganini ve ark., 2019].

Karbonhidrat sülfotransferaz (CHST) gen ürünü olan enzimler glikozaminoglikan biyosentezinde sülfatlanma reaksiyonlarını katalizler. Ekstraselüler bileşenler olarak sülfatlanmış karbonhidratlar haberleşme, hücre adezyonu ve ECM bütünlüğünü sağlayan mediyatörlerdir [Nelson ve ark., 1995; Bowman ve Bertozzi, 1999]. *CHST* grubu genler üzerinde yapılan çalışmalarda insanlarda *CHST3* genindeki mutasyonlar spondiloepifizeal displaziyle ilişkilendirilmiştir. Larsen sendromu olarak da adlandırılan bu bozuklukta kongenital eklem dislokasyonları görülmektedir [Paganini ve ark., 2019]. Köpeklerde *CHST3* geni yakınında bulunan bir SNP de KKD ile ilişkilendirilmiştir [Bartolome ve ark., 2015]. *CHST3*, eklem kıkırdağının ekstrasellüler matriksinde yer alan kondroitin sülfat sentezinde görev alan bir sülfotransferaz enzimini kodlamaktadır. *CHST3* geninin 3. ekzonunda bulunan ve glisin yerine arjinin kodlanmasına yol açan yanlış anlamlı mutasyon ile KKD arasında ilişki saptanmıştır. Bu mutasyon nedeniyle eklem kıkırdağının oluşumunda yetersizlikler ortaya çıktığı ileri sürülmektedir [Bartolome ve ark., 2015; Tanteles ve ark., 2013]. *CHST11* geninde yer alan bir SNP'nin ise insanlarda kalça osteoartritiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir [Zeggini ve ark., 2012]. Dündar ve ark. insanlarda 15. kromozomda bulunan *CHST14* geninin kodladığı D4ST1 enziminde aktivite kaybı ile karakterize Ehlers-Danlos muskulokontraktural tip-1 sendromunda, gendeki mutasyonlar sonucunda ekstrasellüler matriksdeki kondroitin ve dermatan sülfat dengesinin, dolayısıyla ekstraselüler matriks stabilizasyonun bozulduğunu belirtmişlerdir [Dündar ve ark., 2009]. Köpeklerin insanlardan çok daha hızlı büyüdüğü göz önüne alındığında ekstraselüler matrikste oluşan dengesizliğin de insanlara göre köpeklerde hastalığa daha çabuk katkı sağlayacağı ön görülebilir. İnsanlarda görülen otozomal resessif kalıtımla aktarılan ATCS (Adducted-Thumb Clubfoot Syndrome) de *CHST14* genindeki bir mutasyondan kaynaklanmaktadır [Muzimoto ve ark., 2017].

Bu çalışma, köpeklerde *CHST14* genindeki SNP'lerin belirlenerek KKD ile ilişkilerinin tespitini amaçlayan literatürdeki ilk çalışmadır. *CHST14* geninin; kemik ve bağ doku metabolizmasında önemli olan GAG sentezindeki rolü ve insanlardaki Ehlers-Danlos ve ATCS ile ilişkisi nedeniyle KKD açısından incelenmesi önemli bulunmuştur. Köpek *CHST14* geni dizi analizleri sonucunda dört adet SNP tespit edilmiştir. Tespit edilen SNP'lerden iki tanesinin köpeklerde kalça displazisiyle istatistiki olarak anlamlı derecede ilişkili olduğu belirlenmiştir.

Köpek *CHST14* geni ve ürünü olan CHST14 enzimi üzerine mevcut literatürde bir çalışma bulunmamaktadır. İnsanlardaki homolog gendeki mutasyonların sonuçları ve enzimin görevleri üzerine çok sayıda veri mevcuttur. KKD açısından aday gen olabilecek *CHST14* geni üzerine vaka-kontrol karşılaştırılmasıyla ilişki analizi yapılması ve KKD ile ilişkili polimorfizmlerin tespiti, bu kompleks hastalığın genetik alt yapısı ve etiyolojisinin aydınlatılması açısından önemlidir.

5.1. *CHST14* Geni 1. Ekzonda Bulunan Polimorfizmler

Çalışmamızda tespit edilen dört SNP'den ikisi *CHST* geni 1. ekzonda bulunmaktadır. İlki 30. kromozomda 7.640.710. poziyonda yer alan bir G<C polimorfizmidir. CHST14 enzimin 25. pozisyonunda bulunan aminoasitte değişikliğe yol açan bir yanlış anlamlı mutasyondur. CGG kodonunun CCG kodonuna dönüşmesi sonucunda, prolin amino asidi arjinin aminoasidinin yerini almaktadır.

Arjinin aminoasidi bazik özellikte, pozitif yüklü polar bir aminoasittir. Arjinin genellikle proteinin yüzey kısmında bulunur ve proteinlerin aktif bölgelerinde ya da bağlayıcı kısımlarında daha sık yer almaktadır. Pozitif yükü sonucunda çeşitli anyon ve karboksilat gruplarıyla etkileşime girebilmektedir. Prolin ise çok küçük boyutlu, halkasal yapıya sahip bir amino asittir. Kendine özgün bu yapısı nedeniyle genelde proteinlerin sıkı dönüşler olan kısımlarında yer alır ve yan grubu reaktif değildir. Bu özellikleri nedeniyle arjininin aksine proteinlerde aktif bölge ya da bağlayıcı kısımlarda bulunmaz [Betts ve Russel, 2003].

İnsanlardaki muskulokontraktural tip-1 Ehlers-Danlos sendromuyla ilişkili yeni bir mutasyon daha tespit edilmiştir. İnsan *CHST14* genindeki c.821 G/C polimorfizmi arjinin yerine prolin amino asidinin kodlanmasına yol açmaktadır. Araştırmacılar farklı kimyasal özelliklere sahip amino asitler arasındaki yer değişiminin enzimin fonksiyonu üzerinde olumsuz etkilere sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir [Mendoza-Londono ve ark., 2012].

Bu çalışmada rs852536290 numaralı G/C polimorfizmine ait alleller ile kalça displazisi arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişki gözlemlenmemiştir. Mendozo-Londono ve ark. tarafından bildirilen iki hastaya ait sonuçlar her ikisinin de CC homozigot bireyler olduğunu göstermektedir. Ebeveyn ve Ehlers-Danlos hastalığından etkilenmeyen diğer kardeş ise GC heterozigottur [Mendoza-Londono ve ark., 2012].

Çalışmamızda vakalar arasında CC genotipinin frekansı %36,4, kontrol grubunda ise %30 olarak belirlenmiştir. CC homozigot birey oranı kalça displazili köpeklerde daha fazla olmakla birlikte, vaka ve kontroller arasında yapılan karşılaştırma istatistiki olarak anlamlı bir ilişkiyi ortaya koymamaktadır. Ancak Ehlers-Danlos sendromuna sahip bireyler üzerine yapılan çalışmanın biyoinformatik analizleri de birbiriyle çelişkili sonuçlara işaret etmektedir. İnsan CHST14 enziminde 274. pozisyondaki arjinin/prolin değişiminin Pmut programına göre patolojik etkilere sahip olduğu, PolyPhen programına göre ise bening olduğu bildirilmiştir [Mendoza-Londono ve ark., 2012].

Bu çalışmada elde edilen sonuç birkaç nedenden kaynaklanıyor olabilir. Vaka ve kontrol gruplarındaki örneklerin sayısının arttırılması durumunda gözlemlenecek ilişkinin değişmesi de beklenebilir. Bir diğer çıkarım ise; farklı kimyasal gruplara üye olan iki aminoasit arasındaki değişikliğin, söz konusu amino asidin enzimdeki pozisyonu (köpek CHST14 enziminin 25. pozisyonu) nedeniyle fonksiyonel bir etkiye sahip olamayabilir.

Çalışmamızda CHST14 geni 1. ekzonda tespit edilen diğer SNP 30. kromozomda 7.642.721. pozisyonda yer alan bir C/T polimorfizmidir ve köpek SNP veritabanında rs852245958 numarasıyla kaydedilmiş olan bir transisyondur. Karbonhidrat sülfotransferaz 14 enziminin 695. aminoasit kalıntısını kodlayan kodona dahil olmaktadır. C/T polimorfizmi aminoasit dizisinde değişikliğe yol açmayan sessiz bir mutasyondur. İlgili kodonlar olan GAT ve GAC'nin her ikisi de asparajin aminoasidini kodlamaktadır.

Çalışmamızda kalça displazili köpekler ile kontrol grubu arasında yapılan karşılaştırma sonucunda rs852245958 numaralı SNP ile kalça displazisi arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Söz konusu polimorfizm aminoasit dizisinde bir değişikliğe yol açmadığı için CHST14 enziminin fonksiyonunu etkilememektedir. İnsanlarda cilt ve eklem hipermobilitesiyle karakterize Ehlers-Danlos sendromunun birçok farklı tipi bulunmaktadır. Muskulokontraktural tip-1 ve ATCS üzerine yapılan çalışmalarda *CHST14* genindeki farklı mutasyonların bu sendromlarla ilişkili olduğu yol belirlenmiştir [Malfait ve ark. 2010]. Ehlers-Danlos sendromuna sahip iki Türk ikiz kardeşte *CHST14* geninde homozigot çerçeve kayması mutasyonu tespit edilmiştir; 145. pozisyonda bir adet guanin delesyonuyla ortaya çıkan mutasyon sonucunda D4ST1 enziminin ilgili pozisyonunda olması gereken valin aminoasidi bulunmamaktadır. Aynı mutasyona ATCS'li ikiz kardeşlerde de rastlanmıştır [Dündar

ve ark., 2009]. Hintli bir hastada ise homozigot 20 baz çiftli bir duplikasyona rastlanmıştır [Malfait ve ark. 2010].

Bu çalışmada sessiz bir mutasyona yol açan C/T polimorfizmiyle kalça displazisi arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişki bulunmaması, genin ürünü olan CHST14 enziminde bir işlev kaybının ya da değişikliğinin olmamasıyla açıklanabilir.

5.2. *CHST14* Geni 3'-UTR Bölgesindeki Polimorfizmler

Bu çalışmada belirlenen diğer iki SNP genin kodlama yapmayan 3'-UTR (Untranslated Region-Çevrilmeyen bölge) bölgesinde yer alan SNP'lerdir. Bunlardan biri CanFam3.0 veri tabanında yer almaktadır, diğeri ise ilk defa bu çalışmada tespit edilmiştir. Her iki polimorfizmin istatistiksel açıdan KKD ile anlamlı düzeyde ilişkili olduğu belirlenmiştir. CHST14 enziminin amino asit dizisini değiştirmeyen bu iki SNP'nin KKD ile ilişkisi, 3'-UTR bölgesinin gen ifadelenmesini düzenleyici süreçlerdeki rolleriyle açıklanabilir.

Kodlayıcı dizilerdeki varyantların yorumlanması daha kolay olduğundan, araştırmalarda bunlara öncelik verilmektedir; ancak, kodlayıcı dizilerin tespit edilmesi kompleks hastalıkların haritalandırmasında yeterli olmamıştır. Bu durum kodlama yapmayan dizilerin önemini ortaya koymaktadır. Bilindiği gibi kodlama yapmayan bölgeler proteinlerin amino asit dizisinde değişikliğe yol açmazken, transkripsiyonu etkileyen ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde görev alan mekanizmaları etkilemektedirler [Steri ve ark, 2019].

UTR'ler kodlayıcı dizilerin başlangıç ve bitişini belirleyen mRNA kodlarını içerirler. İnsan GWAS çalışmalarında tespit edilen varyantların %3,7'si UTR'ler içinde yer almaktadır. Bu varyantlar protein ve mikroRNA'lar ile etkileşimlere etki ederek mRNA transkripsyonu, proteinin sekonder yapısı, stabilitesi ve RNA-bağlayıcı proteinlerle (RBP) etkileşimi değiştirir; sonuç olarak, moleküler yolaklar ve hücresel süreçlerde oluşan modifikasyonlar hastalıklarla sonuçlanabilir. UTR'lerdeki genetik varyantların melanom, Alzheimer, multipl myelom, bipolar bozukluk, frajil X-sendromu, meme kanseri gibi pek çok patolojide etkili olduğu öne sürülmüştür [Steri ve ark. 2019].

3'-UTR bölgesi kodlamaya katılan dizinin hemen devamında bulunmaktadır. RNA stabilitesi, mRNA'nın translasyonu ve lokalizasyonu gibi düzenleyici süreçlerde

yer almaktadır. RBP ve miRNA'lar için bağlanma bölgeleri içeren 3'-UTR'nin uzunluğu ve içerdiği dizideki değişiklikler gen ifadelenmesinde değişikliğe yol açabilmektedir [Steri ve ark., 2018].

miRNA'ların tanıyıp bağlandığı miRNA düzenleyici elemanlar çoğunlukla hedef mRNA'nın 3'-UTR bölgesinde yer almaktadırlar [Felekkis ve ark., 2010]. 3'-UTR bölgesindeki fonksiyonel varyantlar mevcut bağlanma noktalarını ortadan kaldırabileceği gibi yeni bağlanma noktaları da şekillendirebilirler [Chen ve Rajewski, 2006; Jin ve Lee, 2013]. Bunun sonucunda mRNA'nın sekonder yapısında değişiklik ortaya çıkabilecektir. Yapılan bir çalışmada 3'-UTR bölgesinde intronlara oranla mRNA ekspresyon düzeylerindeki değişikliklerle ilişkili daha fazla sayıda SNP tespit edilmiştir [Lu ve Clark, 2012].

RBP bağlanma bölgelerinde ortaya çıkan değişiklikler de mRNA stabilitesi üzerine etkilidir. RBP'lerin bağlanma bölgeleri etkilendiğinde ilgili proteinin ekspresyonu azalmaktadır. *TNF* mRNA'nın 3'-UTR bölgesindeki insersiyonların [Zdenek ve Di Marco, 1998], *PPP1R3* geni 3'-UTR bölgesindeki varyasyonların [Xia ve ark., 2014] ve *TS* geni 3'-UTR bölgesindeki in/del polimorfizminin [Pullmann ve ark., 2006] ekspresyonu etkilediği bildirilmiştir.

Bu çalışmada kalça displazisi ile ilişkili olduğu belirlenen iki adet SNP'nin etkileri 3'-UTR bölgesinde bulunan farklı düzenleyici mekanizmalarda ortaya çıkan değişikliklerle bağlantılı olabilir. Güncel mevcut çalışmalar, kompleks hastalıklar için olası predispoze faktörler olarak 3'-UTR'deki genetik çeşitliliğin ortaya konmasının önemine işaret etmektedir. Kalça displazisi gibi kompleks, poligenik ve çevresel faktörler tarafından belirlenen bir sendromda *CHST14* geninin ifadelenmesi sırasında mRNA düzenlenmesinin etkili olduğu ileri sürülebilir. Bu etkinin hangi mekanizmayla ortaya çıktığını aydınlatabilmek için ise polimorfizm-ekspresyon ilişkisini ortaya koyacak çalışmalar ve dizilerin görevlerini tahmine dayalı biyoinformatik analizler yapılması önerilebilir.

5.3. *CHST14* Ekspresyonundaki Değişikliklerin KKD ile İlişkisi

Bu çalışmada KKD ile ilişkili olan iki adet SNP tespit edilmiştir. Söz konusu SNP'ler genin 3'-UTR bölgesinde yer aldıklarından CHST14 enziminin ekspresyonunda değişikliğe neden olarak KKD patogenezinde etkili olabilirler. Mevcut

literatürde köpek *CHST14* geni ve ürünü ile biyokimyasal süreçlerdeki rolünü açıklayan mekanizmalara dair veri bulunmamaktadır. İnsanlardaki homolog *CHST14* geni ve ürünü D4ST1 enzimi üzerine ise çok sayıda araştırma yürütülmüştür. Kemik, eklem, kıkırdak ve bağ doku üzerine etkileri ortaya konmuştur. Köpek ve insan arasındaki benzerliklerden yola çıkarak köpek *CHST14* ekspresyonunun eklemler üzerindeki etkileri yorumlanabilir ve KKD ile ilişkisi üzerinde fikir yürütülebilir.

Köpeklerde bu gen tarafından kodlanan enzim CHST14 olarak adlandırılmaktadır. İnsanlarda bu genin ürünü olan D4ST1 enzimi, kondroitin sülfat / dermatan sülfat dengesini sağlayarak ekstraselüler matriksin stabilitesini ve esnekliğini sağlamaktadır. C*HST14* geninin kodladığı karbonhidrat sülfotransferaz 14 enzimi GAG biyosentezinde görev almaktadır. Bu enzim 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosülfattaki aktif sülfatı, dermatan sülfat yapısındaki N-asetilgalaktozamin kalıntısının 4. karbonuna aktararak dermatan sülfatın stabilizasyonunu sağlamaktadır. Dermatan sülfat, kondroitin sülfat ile birlikte uzun ve dallanma yapmayan GAG polimerlerindendir ve iki polimer arasındaki denge ekstrasellüler matriksin stabilitesi, yani eklem ve kıkırdakların sağlığı açısından önem taşımaktadır. [Penc ve ark., 1998; Trowbridge ve ark., 2002; Maccarana ve ark., 2006; Pacheco ve ark., 2009; Malmstrom, 1984; Evers ve ark., 2001; Hiraoka ve ark., 2000; Mikami ve ark., 2003].

İnsanlarda *CHST14* gen ürünü olan D4ST1 enzimi, tekrarlı iduronik asit-α1,3-N-asetilgalaktozamin disakkarit dizilerinde N-asetilgalaktozaminin 4-O sülfatlanma reaksiyonunu katalizleyerek dermatan sülfat oluşturur. Dündar ve ark., akraba evliliği yapmış 4 ailenin doğuştan ATCS tanısı almış çocuklarıyla yaptıkları çalışma sonucunda, *CHST14* genindeki fonksiyon-kaybı mutasyonlarının Ehlers-Danlos – muskulokontraktürel tip olarak adlandırılan sendroma yol açtığını öne sürmüşlerdir. Bu hastaların fibroblastlarında sülfatlanmış dermatan azalmış olduğundan dermatan/kondroitin sülfat dengesi bozulmaktadır. Sonuçta dermatan sülfatın yerini, büyük oranda, kondroitin sülfat almaktadır. Kondroitin sülfatın dermatan sülfata spesifik fonksiyonları yerine getirememesi muskulokontraktürel tip Ehlers Danlos sendromuna yol açmaktadır [Tomoki Kosho, 2015; Dündar ve ark., 2009]. D4ST1'in dermatan sülfat ve dermatan sülfat proteoglikanlarının sentezinde oynadığı anahtar role bağlı olarak çeşitli proteoglikanların etkileşimleri, dolayısıyla ekstraselüler matriksin stabilitesi bozulur [Dündar ve ark., 2009].

İnsan *CHST14* genindeki mutasyonlarla ilişkili olan muskulokontraktürel tip Ehlers-Danlos sendromunda ve ATCS'de eklem hipermobilitesi önemli bulgulardan biridir. Hastalarda tekrarlayan çıkıklar ile karşılaşılmaktadır [Byers ve Murray, 2014]. Köpeklerde kalça displazisinde de kalça ekleminde laksite ve subluksasyon temel semptomlar arasındadır. Çalışmamızda KKD ile ilişkili olduğu tespit edilen SNP'lerin *CHST14* ekspresyonunu değiştirerek, enzimin yetersiz sentezine yol açtığı ileri sürülebilir. Buna bağlı olarak ekstarsellüler matriksin stabilitesinin sağlanamaması sonucunda kalça eklemini etkileyen displazinin ortaya çıkışında rol aldığını düşünülebilir.

Proteoglikanlar iskelet-kas sisteminin embriyonal dönemden itibaren gelişiminde rol almaktadır. Proteoglikan biyosentezi; çekirdek protein sentezi, GAG sentezi, GAG sülfatlanması ve proteoglikan sekresyonu olarak özetlenebilecek ve çok sayıda enzim ve taşıyıcı proteinin görev aldığı kompleks bir süreçtir [Paganini ve ark., 2019]. Çalışmadaki ilişkili SNP'lerden yola çıkarak, CHST14 enziminin katalizlediği sülfatlanma reaksiyonlarındaki yetersizliklerin KKD patogenezinde etkili olduğu öne sürülebilir. Dermatan sülfat sentezinde N-Asetilgalaktozamin sülfatlanmasının eksikliği GAG zincirinin esnekliğini azaltmaktadır ve kollajen fibrillerin düzenlenmesinde değişikliğe yol açmaktadır [Paganini ve ark., 2019].

GAG biyosentezinde görev alan *CHST* genlerinden *CHST3* geninin KKD için bir aday gen olabileceği ileri sürülmüştür; 775 adet Labrador Retriever ırkı köpekte kalça displazisi için genetik tahmin modeli oluşturmak amacıyla GWAS ve aday gen çalışması yürütülmüştür. KKD'yle ilişkili olarak *CHST3* geninin 5'-UTR bölgesinde tespit edilen bir SNP, ATG başlangıç kodonunun 14 baz çifti yukarısında yer almaktadır; yani, bu genin transkripsiyonunun düzenlenmesinden sorumlu olabilir. *CHST3* geninin kodladığı CHST3 enzimi, tıpkı köpeklerde *CHST14* geninin kodladığı CHST14 enzimi gibi GAG biyosentezinde sülfatlanma sürecinde görev alır ve kondroitin sülfatın sentezini katalizler. Kondroitin sülfat, kıkırdak dokusuna direnç ve elastisite sağlayan bir ekstraselüler matriks bileşenidir. *CHST3* genindeki mutasyonlar insanlarda, kalça dislokasyonu da dahil olmak üzere çeşitli eklem dislokasyonlarıyla karakterize bir kongenital iskelet gelişim bozukluğu olan spondiloepifizyal displazi ile ilişkilendirilmiştir [Bartolome ve ark., 2015].

Mevcut araştırma bulguları GAG biyosentezinde rol alan sülfatlanmadan sorumlu enzimlerin KKD etiyolojisindeki rolüne işaret etmektedir. *CHST* genlerinin KKD açısından aday genler olabileceği çalışmamızın sonuçlarıyla da desteklenmektedir. CHST14 enziminin görevini ve çalışmamızda tespit edilen *CHST14* geni 3'-UTR bölgesindeki KKD ile ilişkili SNP'leri göz önünde bulundurduğumuzda; bu polimorfizmlerin KKD etiyolojisi için önerilen periartiküler yumuşak dokularda (ligamentler, kaslar, eklem kapsülü) laksite kategorisi [Lavrijsen, 2014] üzerinden KKD gelişimini etkilemiş olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada tespit edilen SNP'lerden ikisi *CHST14* geninin düzenleyici bölgesinde yer almaktadır ve KKD ile anlamlı düzeyde ilişkili bulunmuştur; bu ilişkinin gen ekspresyonunun düzenlenmesindeki değişimlere bağlı olduğu öne sürülebilir. Bu SNP'lerin etkisiyle CHST14 enziminin sentez miktarı veya fonksiyonunda ortaya çıkabilecek değişiklikler ekstraselüler matriksin yapısında bozulmaya yol açabilir, dolayısıyla KKD'ye katkı sağladığı ileri sürülebilir.

5.4. Çalışmanın Kısıtları

Çalışmamızın vaka ve kontrol gruplarına dahil edilen köpeklerin çok çeşitli ırklardan olması en önemli kısıt noktasını teşkil etmektedir. *CHST14* geninin tamamındaki SNP'lerin incelenmiş olması açısından özgün olan çalışmamızda, her iki gruba da dahil edilenlerin genel çoğunluğu KKD'nin sık görüldüğü büyük ırklardan oluşsa da, genin tamamının tek ırk üzerinden incelenmemiş olması, ırklar arasındaki genetik farklılıkların sonuçlara etkisinin ekarte edilmesini olanaksız kılmaktadır.

KKD üzerine yürütülen genetik çalışmaların amaçları arasında; hastalığın etiyolojisini tanımlayabilmenin ve tedavi olanaklarını arttırmanın yanı sıra ıslah çalışamalarında kullanılabilecek genetik tahmin modelleri ortaya koymak da önemlidir. Güncel çalışmalar; geliştirilen genetik testlerin farklı ırklarda geçerlilik sağlayamadığına işaret etmektedir. Hatta farklı ülkelerde yetiştirilen aynı ırka ait popülasyonlarda bile genetik test sonuçlarında farklılıklar bildirilmiştir. İspanya'daki bir Labrador Retriever popülasyonundaki bulgulardan yola çıkarak geliştirilen 7 SNP'yi baz alan test (Dysgen test), Danimarka'daki Labrador Retriever popülasyonunda denenmiştir ve test sonuçlarıyla kalça skorları uyumlu bulunmamıştır [Bruun ve ark., 2020]. Distl ve ark. (2013) tarafından geliştirilen test 17 polimorfizme dayanarak

genetik predispozisyonu belirlemektedir [Distl ve ark., 2013]. Alman Çoban Köpekleri üzerinden geliştirilmesine rağmen aynı ırka ait 1000 köpek üzerinde 3 yıllık takip ile yapılan çalışmada testin geçerliliği kabul görmemiştir [Manz ve ark., 2017]. ABD'deki ve Hollanda'daki iki farklı Labrador Retriver popülasyonu üzerinde yürütülen çalışmalar da *FBN2* genindeki bir delesyonun KKD ile ilişkisi açısından farklı bulgular sunmuştur [Friedenberg ve ark., 2011; Lavrijsen ve ark., 2014].

5.5. Gelecekteki Çalışmalar

KKD'nin oldukça karmaşık poligenik bir hastalık olduğu bilinmektedir ve çok sayıda genin aditif etkilerinin bir araya gelmesiyle oluştuğu düşünülmektedir. Bunlardan bazıları doğrudan, bazıları da diğer genleri etkileyerek hastalığın oluşumuna dolaylı yoldan katkı sağlarlar [Mikkola ve Holopainen, 2019]. Literatürdeki pek çok çalışmanın da gösterdiği gibi KKD gibi karmaşık ve poligenik bozukluklarda anlamlı ilişkilerin tespit edilebilmesi için büyük örneklem sayılarına ihtiyaç duyulmaktadır [Sánchez-Molano ve ark., 2014; Mikkola ve Holopainen, 2019]. Bu nedenle ileride büyük vaka grupları üzerinde yapılacak çalışmaların küçük etkili SNP'leri tespit etmede yararlı olması beklenmektedir. Vaka sayılarının arttırılmasının yanı sıra ırk özelinde çalışmalar yapılması önem taşımaktadır. Ülkemizin yerli ırklarından olan ve büyük ırklar olarak KKD açısından predispoze olan Kangal, Akbaş, Aksaray Malaklısı gibi ırklarda genetik çalışmaların yürütülmesi hastalığın etiyolojisinin anlaşılmasına ve Türkiye'deki ıslah çalışmalarına katkı sağlayacaktır. Gelecekteki çalışmalar kapsamında genotip-fenotip ilişkileri dışında, genomdaki varyasyonların gen ekspresyonları üzerine etkilerinin belirlenmesi için kantitatif analizler ve gen ürünlerindeki yapısal ve fonksiyonel sonuçların belirlenmesi için biyoinformatik analizlerin birlikte yürütülmesi önerilebilir.

5.6. Sonuç

Poligenik ve çevresel faktörlerin etkisi altında ortaya çıkan, multifaktöriyel bir hastalık olan KKD'nin etiyolojisi, patogenezi ve genetik alt yapısının anlaşılması hem tedavi hem de profilaksi için büyük önem taşımaktadır. Kemik ve bağ doku hastalıklarına yol açan genetik hatalar arasında GAG biyosentezinde görev alan enzim

ve taşıyıcı proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar öne çıkmaktadır. Çalışmamızda, dermatan sülfat/kondroitin sülfat dengesinin sağlanmasındaki asli rolü nedeniyle karbonhidrat sülfotransferaz 14 enzimini kodlayan *CHST14* geni tüm gen dizileme yöntemiyle analiz edilmiştir. KKD vakaları ve kontrol grubuna ait dizi sonuçlarının karşılaştırılmasıyla, *CHST14* geni 3'-UTR bölgesinde bulunan iki adet SNP'in KKD ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. İlişkili varyasyonların *CHST14* ekspresyonunun düzenlenmesinde görevli olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Köpek CHST14 geni ile KKD ilişkisine dair literatürdeki ilk çalışma olması nedeniyle, araştırma bulgularının hastalığın gelişimini aydınlatılmasına katkı koyacağı düşünülmektedir.

İleride yapılacak daha büyük ölçekli çalışmalarla KKD'ye katkısı olan daha fazla SNP'nin tespit edilmesi, kas-iskelet sisteminde etkili biyokimyasal yolaklarda görev alan farklı proteinleri kodlayan genlerin aday gen potansiyellerinin belirlenmesi veteriner hekimlik açısından önemli olduğu kadar, insanlarda görülen GKD'nin aydınlatılmasına da katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

Alexander, J.W. (1992). The pathogenesis of canine hip dysplasia. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, **22***, 503-511.

Awano, T., Johnson, G.S., Wade, C.M., Katz, M.L., Johnson, G.C. ve ark. (2009). Genome-wide association analysis reveals a SOD1 mutation in canine degenerative myelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **106***, 2794–2799.

Bartolome, N., Segarra, S., Artieda, M., Francino, O., Sanchez, E., Szczypiorska, M. ve ark. (2015). A Genetic Predictive Model for Canine Hip Dysplasia: Integration of Genome Wide Association Study (GWAS) and Candidate Gene Approaches. *PLoS ONE, **10(4)***, e0122558, Erişim: 8 Temmuz 2018, doi: 10.137/journal.pone.0122558

Basit, S., Hannan, M.A., Khoshhal, K.I. (2016). Developmental dysplasia of the hip: usefulness of next generation genomic tools for characterizing the underlying genes-a mini review. *Clinical Genetics, **90***, 16– 20.

Bedi, A., Lynch, E.B., Sibilsky Enselman E.R. ve ark. (2013). Elevation in circulating biomarkers of cartilage damage and inflammation in athletes with femoro-acetabular impingement. *American Journal of Sports Medicine, **41***, 2585–2590.

Beynen, A. (2019). Diet and canine hip dysplasia, *Dier-en-Arts, **Nr 5***, 122-123 (based on article in Dutch).

Bo, N., Peng, W., Xinghong, P. ve ark. (2012). Early cartilage degeneration in a rat experimental model of developmental dysplasia of the hip. *Connect Tissue Research, **53***, 513– 520.

Boere-Boonekamp, M.M., Verkerk, P.H. (1998). Screening for developmental dysplasia of the hip. *Seminars in Neonatalogy, **3***, 49-59.

Boregowda, R., Emmanuel, P., White, J. ve ark. (2008). Bone and soft connective tissue alterations result from loss of fibrillin-2 expression. *Matrix Biology, **27***, 661-666.

Bowman, K., Bertozzi, C. (1999). Carbohydrate sulfotransferases: mediators of extracellular communication. *Chemistry & Biology, **6 (1)***, R9–R22.

Brass, W. (1989). Hip dysplasia in dogs. *Journal of Small Animal Practice, **30***, 166-170.

Breur, G., Lust, G., Todhunter, R. (2001). *Genetics of hip dysplasia and other orthopedic diseases.* Wallingford, Oxon, UK: CAB International, 267-298.

Bruun, C.S., Bank, A., Ström, A., Proschowsky, H.F., Fredholm, M. (2020). Validation of DNA test for Hip Dysplasia Failed in Labrador Retrievers. *Animal Genetics*, ***51***, 617-619.

Burton-Wurster, N., Farese, J.P., Todhunter, R.J., Lust, G. (1999). Site-specific variation in femoral head cartilage composition in dogs at high and low risk for development of osteoarthritis: insights into cartilage degeneration. *Osteoarthritis Cartilage, **7***, 486-497.

Byers, P.H., Murray, M.L. (2014). Ehlers-Danlos syndrome: a showcase of conditions that lead to understanding matrix biology. *Matrix Biology, **33***, 10-5.

Cachon, T., Genevois, J.P., Remy, D., Carozzo, C., Viguier, E., Maitre, P. ve ark. (2010). Risk of simultaneous phenotypic expression of hip and elbow dysplasia in dogs: a study of 1411 radiographic examinations sent for official scoring. *Veterinary and Comparative Orthopedics & Traumatolgy, **23***, 28-30.

Cardinet, G.H., Guffy, M.M., Wallace, L.J., Laben, R.C. (1983). Canine hip dysplasia in German shepherd dog – greyhound crossbreeds. *Journal of American Veterinary Medical Association, **182***, 393-395.

Carlson, C.S., Guilak, F., Vail, T.P. ve ark. (2002). Synovial fluid biomarker levels predict articular cartilage damage following complete medial meniscectomy in the canine knee. *Journal of Orthopedics Research, **20***, 92–100.

Chalman, J.A., Butler, H.C. (1985). Coxofemoral joint laxity and the Ortolani sign. *Journal of American Animal Hospital Association, **6(21)***, 671–676.

Chan, A., McCaul, K.A., Cundy, P.J, Haan, E.A, Byron-Scott R. (1997). Perinatal risk factors for developmental dysplasia of the hip. *Archives of Disease in Childhood Fetal & Neonatal Ed*ition, ***76 (2)***, F94-F100.

Chapman, E., Michael, D., Sarah, R., Wong, C. (2004). Sulfotransferases: Structure, Mechanism, Biological Activity, Inhibition, and Synthetic Utility. *Angewandte Chemie International Edition*, ***43(27)***, 3526–3548.

Chase, K., Lawler, D.F., Adler, F.R., Ostrandor, E.A., Lark, K.G. (2005). Bilaterally asymmetric effects of quantitative trait loci (QTLs): QTLs that effect laxity in the right versus left coxofemoral (hip) joints of the dog (Canis familiaris). *American Journal of Medical Genetics Association*, ***135(3)***, 334-335.

Chen, K., Rajewsky, N. (2006). Natural selection on human microRNA binding sites inferred from SNP data. *Nature Genetics*, ***38(12)***, 1452-1456.

Choi, B., Suh, Y., Kim, W.H., Christa, L., Park, J. ve ark. (2007). Downregulation of regenerating islet-derived 3 alpha (REG3A) in primary human gastric adenocarcinomas. *Experimental & Molecular Medicine, **39***, 796–804.

Clements, D.N., Carter, S.D., Innes, J.F., Ollier, W.E. ve ark. (2006). Genetic basis of secondary osteoarthritis in dogs with joint dysplasia. *American Journal of Veterinary Research, **67***, 909-918.

Distl, O., Marschall, Y., Stock, K.F. (2013, 28 Mayıs). Analysis for the genetic disposition for hip dysplasia in Canidae. *EP 2123777 B1 European Patent Office Bulletin 2013/52*, p. 672.

Dündar, M., Müller, T., Zhang, Q. ve ark. (2009). Loss of dermatan-4-sulfotransferase 1 function results in adducted thumb-clubfoot syndrome. *American Journal of Human Genetics*, ***85(6),*** 873-882.

Ehret, G.B., Munroe, P.B., Rice, K.M., Bochud, M., Johnson, A.D., Chasman, D.I. ve ark. (2011). Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature, **478 (7367)***, 103-109.

Eleftherohorinou, H., Wright, V., Hoggart, C., Hartikainen, A.L., Jarvelin, M.R., Balding, D. ve ark. (2009). Pathway analysis of GWAS provides new insights into genetic susceptibility to 3 inflammatory diseases. *PLoS ONE, **4(11)***, e8068, Erişim: 10 Eylül 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0008068 PMID: 19956648

Evers, M.R., Xia, G., Kang, H.G., Schachner, M., Baenziger, J.U. (2001). Molecular cloning and characterization of a dermatan-specific N-acetylgalactosamine 4-O-sulfotransferase. *Journal of Biological Chemistry*, ***276***, 36344–36353.

Falany, C.N. (1997). Enzymology of human cytosolic sulfotransferases. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, ***11(4),*** 206–16.

Farese, J.P., Todhunter, R.J., Lust, G., Williams, A.J., Dykes, N.L. (1998). Dorsolateral subluxation of hip joints in dogs measured in a weight-bearing position with radiography and computed tomography. *Veterinary Surgery*, ***27(5)***, 393–405.

Feldman, G.J., Parvizi, J., Levenstien, M. ve ark. (2013). Developmental dysplasia of the hip: linkage mapping and whole exome sequencing identify a shared variant in CX3CR1 in all affected members of a large multi-generation family. *Journal of Bone & Mineral Research*, ***28***, 2540– 2549.

Felekkis, K., Touvana, E., Stefanou, C., Deltas, C. (2010). microRNAs: a newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease. *Hippokratia*, ***14(4)***, 236–40.

Feng, W.J., Wang, H., Shen, C. ve ark. (2017). Severe cartilage degeneration in patients with developmental dysplasia of the hip. *International Union of Biochemistry & Molecular Biology Life*, ***69***, 179–187.

Foels, W.S. (2000). *Secondary center of ossification differs in developmental dysplasia of the hip (abstract).* Proceedings of the 46th Annual Meeting, Orthopedic Research Society. Erişim: 17.12.2018, Orthopedic Research Proceedings: www.ors.org.

Ford, C.A., Nowlan, N.C., Thomopoulos, S. ve ark. (2017). Effects of imbalanced muscle loading on hip joint development and maturation. *Journal of Orthopedic Research*, ***35***, 1128– 1136.

Fox, S.M., Burns, J., Burt, J. (1987). The dysplastic hip: a crippling problem in dogs. *Veterinary Medicine*, ***82***, 684-693.

Friedenberg, S.G., Zhu, L., Zhang, Z. ve ark. (2011). Evaluation of a fibrilline 2 gene haplotype associated with hip dysplasia and incipient osteoarthritis in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, ***72(4)***, 530–540.

Fries, C.L., Remedios, A.M. (1995). The pathogenesis and diagnosis of canine hip dysplasia: a review. *Canadian Veterinary Journal, **36(8)***, 494-502.

Fry, T.R., Clark, D.M. (1992). Canine hip dysplasia: clinical signs and physical diagnosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, **3(22)***, 551–558.

Gerscovich, E.O. (1997). A radiologist's guide to the imaging in the diagnosis and treatment of developmental dysplasia of the hip. I. General considerations, physical examination as applied to real-time sonography and radiography. *Skeletal Radiology, **26(7),*** 386–397.

Ginja, M., Gaspar, A.R., Ginja, C. Emerging insights into the genetic basis of canine hip dysplasia. (2015). *Veterinary Medicine (Auckland), **6***, 193-202.

Ginja, M.M., Ferreira, A.J., Jesus, S.S. ve ark. (2009). Comparison of clinical, radiographic, computed tomographic and magnetic resonance imaging methods for early prediction of canine hip dysplasia. *Veterinary Radiology Ultrasound, **50(2)***, 135-143.

Ginja, M.M., Gonzalo-Orden, J.M., Melo-Pinto, P. ve ark. (2008). Early hip laxity examination in predicting moderate and severe hip dysplasia in Estrela mountain dog. *Journal of Small Animal Practice, **49 (12)***, 641–646.

Ginja, M.M., Silvestre, A.M., Colaco, J. ve ark. (2009). Hip Dysplasia in Estrela mountain dogs – prevalence and genetic trends 1991–2005. *Veterinary Journal, **182 (2)***, 275–282.

Ginja, M.M., Silvestre, A.M., Ferreira, A.J. ve ark. (2008). Passive hip laxity in Estrela mountain dog – distraction index, heritability and breeding values. *Acta Veterinaria Hungarica, **56(3)***, 303–312.

Ginja, M.M., Silvestre, A.M., Gonzalo-Orden, J.M., Ferreira, A.J. (2010). Diagnosis, genetic control and preventive management of canine hip dysplasia: a review. *Veterinary Journal, **184(3)***, 269–276.

Ginja, M.M., Silvestre, A.M., Gonzalo- Orden, J.M. ve ark. (2010). Diagnosis, genetic control and preventive management of canine hip dysplasia: a review. *Veterinary Journal, **184***, 269– 276.

Gkiatas, I., Boptsi, A., Tserga, D., Gelalis, I., Kosmas, D., Pakos, E. (2019). Developmental dysplasia of the hip: a systematic literature review of the genes related with its occurrence. *European Federation of National Association of Orthopedics & Traumatology Open Review*, ***4(10)***, *595-601*.

Greer, M.A. (2014). PennHIP. *Canine Reproduction and Neonatology*. Wyoming: CRC Press. p. 24. ISBN 9781498728508

Grunwell, J.R., Rath, V.L, Rasmussen, J., Cabrilo, Z., Bertozzi, C.R. (2002). Characterization and Mutagenesis of Gal/GlcNAc-6-O-sulfotransferases. *Biochemistry*, ***41(52)***, 15590–15600.

Gudmundsson, J., Sulem, P., Manolescu, A., Amundadottir, L.T., Gudbjartsson, D., Helgason, A. ve ark. (2007). Genome-wide association study identifies a second prostate cancer susceptibility variant at 8q24. *Natural Genetics*, ***39(5)***, 631-637.

Guo, G., Zhou, Z., Wang, Y., Zhao, K., Zhu, I., Lust, G. ve ark. (2010). Canine hip dysplasia is predictable by genotyping. *Osteoarthritis and Cartilage*, ***19(2011)***, 420-429.

Harari, J. (2000). *Small Animal Surgery Secrets*. Hanely & Belfus, INC. ISBN 1-56053-355-2.

Hashimoto, S., Rai, M.F., Gill, C.S. ve ark. (2013). Molecular characterization of articular cartilage from young adults with femoro-acetabular impingement. *Journal of Bone & Joint Surgery (American)*, ***95***, 1457–1464.

Willis, J.M., Simpson, K.W. (1994). *The Waltham Book of Clinical Nutrition of the Dog and Cat.* Frome, England: Butler and Tanner; 395-423.

Hemmerich, S., Rosen, S.D. (2000). Carbohydrate sulfotransferases in lymphocyte homing. *Glycobiology*, ***10(9)***, 849–56.

Hernandez, P.A., Wells, J., Usheva, E. ve ark. (2020). Early-Onset Osteoarthritis originates at the chondrocyte level in Hip Dysplasia. *International Journal of Scientific Reports*, ***10(1)***, 627.

Hinke, V., Seck, T., Clanget, C., Scheidt-Nave, C., Ziegleri R. ve ark. (2001). Association of transforming growth factor-beta1 (TGFbeta1) T29->C gene polymorphism with bone mineral density (BMD), changes in BMD, and serum

concentrations of TGF-beta1 in a population-based sample of postmenopausal German women. *Calcified Tissue International, **69***, 315-320.

Hiraoka, N., Nakagawa, H., Ong, E., Akama, T.O., Fukuda, M.N., Fukuda, M. (2000). Molecular cloning and expression of two distinct human chondroitin 4-O-sulfotransferases that belong to the HNK-1 sulfotransferase gene family. *Journal of Biological Chemistry,* **275**, 20188–20196.

Hou, Y., Wang, Y., Lu, X. ve ark. (2013). Monitoring Hip and Elbow Dysplasia achieved modest genetic improvement of 74 dog breeds over 40 years in USA. *PLoS One, **8(10),*** e76390, Erişim: 25 Aralık 2018, https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24124555.

IBM Corp. Released 2011. *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0.* Armonk, NY: IBM Corp.

Ihemelandu, E.C., Cardinet 3rd, G.H., Guffy, M.M., Wallace, L.J. (1983). Canine hip dysplasia: Differences in pectineal muscles of healthy and dysplastic German shepherd dogs when two months old. *American Journal of Veterinary Research, **44***, 411-416.

Andersson, G. (2008). *The Burden of Musculoskeletal Diseases in the United States.* Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons; p. 247.

Jacobsen, S., Sonne-Holm, S. Hip dysplasia: a significant risk factor for the development of hip osteoarthritis. (2005). A cross-sectional survey. *Rheumatology (Oxford), **44***, 211-218.

Janutta, V., Hamann, H., Distil, O. (2006). Complex segregation analysis of canine hip dysplasia in German shepherd dogs. *Journal of Heredity, **97(1)***, 13-20.

Jia, J., Li, L.Y., Zhao, Q., Zhang, L., Ru, J. ve ark. (2012). Association of a single nucleotide polymorphism in pregnancy-associated plasma protein-A2 with developmental dysplasia of the hip: A case-control study. *Osteoarthritis Cartilage, **20***, 60-63.

Jin, Y., Lee, C.G. (2013). Single Nucleotide Polymorphisms Associated with MicroRNA Regulation. *Biomolecules, **3(2)***, 287-302.

Johnston, S.A., Tobias, K.M. (Ed.). (2018). *Veterinary Surgery: Small Animal*. ISBN 978-0-323-32049-8. OCLC 1030809494

Kapoor, B., Dunlop, C., Wynn-Jones, C., Fryer, A.A., Strange, R.C., Maffulli N. (2007). Vitamin D and estrogen receptor polymorphisms in development of dysplasia of the hip and primary protrusio acetabuli-a preliminary study. *Journal of Negative Results in BioMedicine*, ***6***, 7, Erişim: 1 Ağustos 2018, doi:10.1186/1477-5751-6-7.

Kealy, R.D., Lawler, D.F., Ballam, J.M., Lust, G., Biery, D.N. ve ark. (2000). Evaluation of the effect of limited food consumption on radiographic evidence of osteoarthritis in dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association, **217***, 1678–1680.

Kealy, R.D., Lawler, D.F., Ballam, J.M., Lust, G., Smith, G.K. ve ark. (1997). Five-year longitudinal study on limited food consumption and development of osteoarthritis in coxofemoral joints of dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association, **210***, 222–225.

Kealy, R.D., Lawler, D.F., Monti, K.L., Biery, D., Helms, R.W. ve ark. (1993). Effects of dietary electrolyte balance on subluxation of the femoral head in growing dogs. *American Journal of Veterinary Research*, **54**, 555–562.

Tamura, K., Glen, S., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution, **30(12)***, 2725-2729.

Kolundzic, R., Trkulja, V., Mikolaucic, M., Kolundzic, M.J., Pavelic, S.K., Pavelic, K. (2011). Association of interleukin-6 and transforming growth factor-β1 gene polymorphism with developmental hip dysplasia and severe adult hip osteoarthritis: A preliminary study. *Cytokine, **54(2)***, 125-128.

Kosho, T., Miyake, N., Hatamochi, A., Takahashi, J., Kato, H., Miyahara ve ark. (2010). A new Ehlers-Danlos syndrome with craniofacial characteristics, multiple congenital contractures, progressive joint and skin laxity and multisystem fragility-related manifestations. *American Journal of Medical Genetics, **152A***, 1333-1346.

Kurtz, S., Ong, K., Lau, E., Mowat, F., Halpern, M. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. (2007). *Journal of Bone & Joint Surgery (American), **89***, 780-785.

Kwan-Tat, S., Padrines, M., Theoleyre, S., Heymann, D., Fortun, Y. (2004). IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: Interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Review, **15(1)***, 49-60.

Lavrijsen, I.C., Leegwater, P.A.J., Martin, A.J., Harris, S.J., Tryfonidou, M.A. ve ark. (2014). Genome Wide Analysis Indicates Genes for Basement Membrane and Cartilage Matrix Proteins as Candidates for Hip Dysplasia in Labrador Retrievers. *PLoS ONE, **9(1)***, e87735, Erişim: 19 Haziran 2017, doi:10.1371/journal.pone.0087735

Leighton, E.A. (1997). Genetics of canine hip dysplasia. *Journal of American Veterinary Medicine Association, **210(10)***, 1474–1479.

Leppänen, M., Mäki, K., Juga, J., Saloniemi, H. (2000). Factors affecting hip dysplasia in German shepherd dogs in Finland: efficacy of the current improvement program. *Journal of Small Animal Practice, **41(1)***, 19–23.

Lindblad-Toh, K., Wade, C.M., Mikkelsen, T.S., Karlsson, E.K., Jaffe, D.B., Kamal, M. ve ark. (2005). Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature, **438 (7069)***, 803-819.

Loder R.T., Skopelja, E.N. (2011). The epidemiology and demographics of hip dysplasia. *ISRN Orthopedics*, Erişim: 28 Eylül 2017, https://doi.org/10.5402/2011/238607

Lu, J., Clark, A.G. (2012). Impact of microRNA regulation on variation in human gene expression. *Genome Research, **22(7)***, 1243–54.

Lust, G., Rendano, V.T., Summers, B.A. (1985). Canine hip dysplasia: concepts and diagnosis. *Journal of American Veterinary Medicine Association, **187,*** 638-640.

Lust, G., Summers, B.A. (1981). Early, asymptomatic stage of degenerative joint disease in canine hip joints. *American Journal of Veterinary Research, **42***, 1849-1855.

Slatter, D. (1993). *Textbook of Small Animal Surgery, 2nd edition, vol 2.* Philadelphia: WB Saunders; 1938-1944.

Maccarana, M., Olander, B., Malmström, J., Tiedemann, K., Aebersold, R., Lindahl, U. ve ark. (2006). *Journal of Biological Chemistry*, ***281(17)***, 11560-8.

Madsen, J.S., Reiman, N.I., Svalastoga, E. (1991). Delayed ossification of the femoral head in dogs with hip dysplasia. *Journal of Small Animal Practice, **32***, 351-354

Maki, K., Janss, L.L., Groen, A.F., Liinamo, A.E., Ojala, M. (2004). An indication of major genes affecting hip and elbow dysplasia in four Finnish dog populations. *Heredity, **92(5)***, 402-8.

Mäki, K., Liinamo, A.E., Ojala, M. (2000). Estimates of genetic parameters for hip and elbow dysplasia in Finnish Rottweilers. *Journal of Animal Sciences, **78(5)***, 1141–1148.

Malfait, F., Syx, D., Vlummens, P., Symoens, S., Nampoothiri, S., Hermanns-Le, T. ve ark. (2010). Musculocontractural Ehlers-Danlos Syndrome (former EDS type VIB) and adducted thumb clubfoot syndrome (ATCS) represent a single clinical entity caused by mutations in the dermatan-4-sulfotransferase 1 encoding *CHST14* gene. *Human Mutation, **Vol 31, 11***, 1233-1239.

Malmström, A. (1984). Biosynthesis of dermatan sulfate. II. Substrate specificity of the C-5 uronosyl epimerase. *Journal of Biological Chemistry, **259(1)***, 161-165.

Manley, P.A., Adams, W.M., Danielson, K.C., Dueland, R.T., Linn, K.A. (2007). Long-term outcome of juvenile pubic symphysiodesis and triple pelvic osteotomy in dogs with hip dysplasia. *Journal of American Veterinary Medicine Association, **230(2)***, 206–210.

Manz, E., Tellhelm, B., Krawczak, M. (2017). Prospective evaluation of a patented DNA test for canine hip dysplasia (CHD). *PLoS ONE, **12(8)***, e0182093, Erişim: 6 Mayıs 2018, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182093.

Marschall, Y., Distl, O. (2007). Mapping quantitative trait loci for canine hip dysplasia in German Shepherd dogs. *Mammalian Genome, **18(12)***, 861–870.

Mateescu, R.G., Burton-Wurster, N.I., Tsai, K., Phavaphutanon, J., Zhang, Z., Murphy, K.E. ve ark. (2008). Identification of quantitative trait loci for osteoarthritis of hip

joints in dogs. *American Journal of Veterinary Research, **69(10)***, 1294-1300.

Mendoza-Londono, R., Chitayat, D., Kahr, W.H.A., Hinek, A., Blaser, S., Dupuis, L. ve ark. (2012). Extracellular matrix and platelet function in patients with musculocontractural Ehlers–Danlos syndrome caused by mutations in the CHST14 gene. *American Journal of Medical Genetics, **Part A 158A***, 1344–1354.

Mikami, T., Mizumoto, S., Kago, N., Kitagawa, H., Sugahara, K. (2003). Specificities of three distinct human chondroitin/dermatan N-acetylgalactosamine 4-O-sulfotransferases demonstrated using partially desulfated dermatan sulfate as an acceptor: Implication of differential roles in dermatan sulfate biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry, **278***, 36115–36127.

Miyake, N., Kosho, T., Mizumoto, S., Furuichi, T., Hatamochi, A., Nagashima, Y. ve ark. (2010). Loss-of-function mutations of CHST14 in a new type of Ehlers-Danlos syndrome. *Human Mutation, **31***, 966-974.

Mizumoto, S., Kosho, T., Yamada, S., Sugahara, K. (2017). Pathophysiological Significance of Dermatan Sulfate Proteoglycans Revealed by Human Genetic Disorders. *Pharmaceuticals (Basel), **10(2)***, 34, Erişim: 10 Kasım 2017, doi: 10.3390/ph10020034. PMID: 28346368; PMCID: PMC5490391.

Mogil, J.S. (2009). Animal models of pain: progress and challenges. *Nature Review of Neuroscience, **10***, 283– 294.

Nelson, R.M., Venot, A., Bevilacqua, M.P., Linhardt, R.J., Stamenkovic, I. (1995). Carbohydrate-Protein Interactions in Vascular Biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology, **11(1)***, 601–631.

Nowlan, N.C., Chandaria, V., Sharpe, J. (2014). Immobilized chicks as a model system for early- onset developmental dysplasia of the hip. *Journal of Orthopedic Research, **32***, 777– 785.

O'Brien, R.T., Dueland, R.T., Adams, W.C., Meinen, J. (1997). Dynamic ultrasonographic measurement of passive coxofemoral joint laxity in puppies. *Journal of American Animal Hospital Association, **33(3)***, 275–281.

Ortiz, E.M., Dusetti, N.J., Vasseur, S., Malka, D., Bodeker, H. ve ark. (1998). The pancreatitis-associated protein is induced by free radicals in AR4-2J cells and confers cell resistance to apoptosis. *Gastroenterology, **114***, 808–816.

Morgan, J.P., Wind, A., Davidson, A.P. (2003). *Hereditary Bone and Joint Diseases in the Dog-Osteochondroses, hip dysplasia, elbow dysplasia*. Hannover: Schlütersche; 263-266.

Pacheco, B., Malmstrom, A., Maccarana, M. (2009). Two dermatan sulfate epimerases form iduronic acid domains in dermatan sulfate. *Journal of Biological Chemistry, **284***, 9788–9795.

Parker, H.G., VonHoldt, B.M., Quignon, P., Margulies, E.H., Shao, S. ve ark. (2009). An Expressed Fgf4 Retrogene Is Associated with Breed-Defining Chondrodysplasia in Domestic Dogs. *Science, **325***, 995–998.

Pascual-Garrido, C., Guilak, F., Rai, M.F., Harris, M.D., Lopez, M.J., Todhunter, R.J. ve ark. (2017). Canine hip dysplasia: A natural animal model for human developmental dysplasia of the hip. *Journal of Orthopedic Research, **36(7)***, 1807-1817.

Paster, E.R., LaFond, E., Biery, D.N. ve ark. (2005). Estimates of prevalence of hip dysplasia in Golden Retrievers and Rottweilers and the influence of bias on published prevalence figures. *Journal of American Veterinary Medicine Association, **226(3)***, 387–392.

Peled, E., Eidelman, M., Katzman, A., Bialik, V. (2008). Neonatal incidence of hip dysplasia: Ten years of experience. *Clinical Orthopedics and Related Research,* **466**, 771-775.

Penc, S.F., Pomahac, B., Winkler, T., Dorschner, R.A., Eriksson, E., Herndon, M. ve ark. (1998). Dermatan sulfate released after injury is a potent promoter of fibroblast growth factor-2 function. *Journal of Biological Chemistry, **273***, 28116-28121.

Pfahler, S., Distl, O. (2012). Identification of Quantitative Trait Loci (QTL) for Canine Hip Dysplasia and Canine Elbow Dysplasia in Bernese Mountain Dogs. *PLoS ONE, **7(11)***, e49782, Erişim: 5 Ekim 2017.

Pullmann, R. Jr., Abdelmohsen, K., Lal, A., Martindale, J.L., Ladner, R.D., Gorospe,

M. (2006). Differential stability of thymidylate synthase 3′-untranslated region polymorphic variants regulated by AUF1. *Journal of Biological Chemistry*, ***281(33)***, 23456–24463.

Riser, W.H. (1987). A half century of canine hip dysplasia. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)*, ***2***, 87-91.

Riser, W.H. (1975). The dog as a model for the study of hip dysplasia. Growth, form, and development of the normal and dysplastic hip joint. *Veterinary Pathology*, ***12***, 234– 334.

Rosenberg, R.D., Shworak, N.W., Liu, J., Schwartz, J.J., Zhang, L. (1997). Heparan sulfate proteoglycans of the cardiovascular system. Specific structures emerge but how is synthesis regulated? *Journal of Clinical Investigation*, ***99(9)***, 2062–70.

Russell, M.E., Shivanna, K.H., Grosland, N.M., Pedersen, D.R. (2006). Cartilage contact pressure elevations in dysplastic hips: a chronic overload model. *Journal of Orthopedic Surgery Research*, ***1***, 6, Erişim: 31 Kasım 2018, doi: 10.1186/1749-799X-1-6

Sanchez-Molano, E., Pong-Wong, R., Clements, D.N., Blott, S.C., Wiener, P., Woolliams, J.A. (2015). Genomic prediction of traits related to canine hip dysplasia. *Frontiers in Genetics*, ***6***, 97, Erişim: 15 Aralık 2017, doi: 10.3389/fgene.2015.00097.

Sánchez-Molano, E., Woolliams, J.A., Pong-Wong, R. ve ark. (2014). Quantitative trait loci mapping for canine hip dysplasia and its related traits in UK Labrador Retrievers. *BMC Genomics*, ***15***, 833.

Schachner, E.R., Lopez, M.J. (2015). Diagnosis, prevention, and management of canine hip dysplasia: a review. *Veterinary Medicine (Auckland)*, ***6***, 181-192.

Shi, D., Dai, J., Ikegawa, S., Jiang, Q. (2012). Genetic study on developmental dysplasia of the hip. *European Journal of Clinical Investigation*, ***42***, 1121–1125.

Shi, D., Dai, J., Zhu, P. ve ark. (2011). Association of the D repeat polymorphism in the ASPN gene with developmental dysplasia of the hip: a case-control study in Han Chinese. *Arthritis Research & Therapy*, **13**, R27.

Shworak, N.W., Liu, J., Petros, L.M., Zhang, L., Kobayashi, M., Copeland, N.G. ve ark. (1999). Multiple iso-forms of heparan sulfate D-glucosaminyl-3-O-sulfotransferase.

Isolation, characterization, and expression of human cDNAs and identification of distinct genomic loci. *Journal of Biological Chemistry*, ***274(8)***, 5170–84.

Silvestre, A.M., Ginja, M.M., Ferreira, A.J., Colaco, J. (2007). Comparison of estimates of hip dysplasia genetic parameters in Estrela-Mountain Dog using linear and threshold models. *Journal of Animal Sciences*, ***85(8)***, 1880-1884.

Skinner, H.B., Mabey, M.F. (1987). Soft-tissue response to total hip surface replacement. *Journal of Biomedical Materials Research*, ***21***, 569–584.

Smith, G.K., Mayhew, P.D., Kapatkin, A.S., McKelvie, P.J., Shofer, F.S., Gregor, T.P. (2001). Evaluation of risk factors for degenerative joint disease associated with hip dysplasia in German shepherd dogs, golden retrievers, labrador retrievers, and rottweilers. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, ***219***, 1719-1724

Smith, G.K., Popovitch, C.A., Gregor, T.P., Shofer, F.S. (1995). Evaluation of risk factors for degenerative joint disease associated with hip dysplasia in dogs. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, ***206(5)***, 642–647.

Smith, K.G., Karbe, G.T., Agnello, K.A., McDonald-Lynch, M.B. (2012). Pathogenesis, diagnosis and control of canine hip dysplasia. *Veterinary Surgery: Small Animal*; chapter 59, Erişim: 21 Haziran 2019, https://veteriankey.com/pathogenesis-diagnosis-and-control-of-canine-hip-dysplasia.

Steffey, M.A., Miura, N., Todhunter, R.J. ve ark. (2004). The potential and limitations of cartilage-specific (V+C)(-) fibronectin and cartilage oligomeric matrix protein as osteoarthritis biomarkers in canine synovial fluid. *Osteoarthritis Cartilage*, ***12***, 818–825.

Steri, M., Idda, M.L., Whalen, M.B., Orru, V. (2018). *Wiley Interdiscip Rev RNA*, ***9(4)***, e1474, Erişim: 1 Kasım 2018, doi:10.1002/wrna.1474.

Stock, K.F., Dist, O. (2013). Simulation study on the effects of excluding offspring information for genetic evaluation versus using genomic markers for selection in dog breeding. *Journal of Animal Breed Genetics*, ***131(2)***, 134-145.

Sutter, N.B., Bustamante, C.D., Chase, K., Gray, M.M., Zhao, K. ve ark. (2007). A Single IGF1 Allele Is a Major Determinant of Small Size in Dogs. *Science*, ***316***, 112–115.

Swenson, L., Audell, L., Hedhammar, A. (1997). Prevalence and inheritance of and selection for hip dysplasia in seven breeds of dogs in Sweden and benefit: cost analysis of a screening and control program. *Journal of American Veterinary Medical Association, **210(2)***, 207–214.

Tanteles, G.A., Dixit, A., Dhar, S., Suri, M. (2013). Two Somali half-siblings with CHST3-related chondrodysplasia illustrating the phenotypic spectrum and intrafamilial variability. *American Journal of Medical Genetics, **Part A 161A***, 2588–2593.

Todhunter, R.J., Grohn, Y.T., Bliss, S.P., Wilfand, A., Williams, A.J., Vernier-Singer M. ve ark. (2003). Evaluation of multiple radiographic predictors of cartilage lesions in the hip joints of eight-month-old dogs. *American Journal of Veterinary Research, **64***, 1472-1478.

Slatter, D.H. (Ed). (2003). Canine hip dysplasia pathogenesis. *Textbook of small animal surgery*. Philedelphia: WB Saunders Co. 2009-2019.

Todhunter, R.J., Mateescu, R., Lust, G. ve ark. (2005). Quantitative trait loci for hip dysplasia in a cross-breed canine pedigree. *Mammalian Genome, **16(9)***, 720–730.

Todhunter, R.J., Zachos, T.A., Gilbert, R.O., Erb, H.N., Williams, A.J. ve ark. (1997). Onset of epiphyseal mineralization and growth plate closure in radiographically normal and dysplastic Labrador Retrievers. *Journal of American Veterinary Medicine Association, **210***, 1458-1462.

Trowbridge, J.M., Gallo, R.L. (2002). Dermatan sulfate: New functions from an old glycosaminoglycan. *Glycobiology, **12***, 117R–125R.

Vezzoni, A., Dravelli, G., Vezzoni, L. ve ark. (2008). Comparison of conservative management and juvenile pubic symphysiodesis in the early treatment of canine hip dysplasia. *Veterinary and Complementary Orthopedics & Traumatology, **3(21)***, 267–279.

Walton, B., Innes, J., Lascelles, B.D. ve ark. (2017). Validated outcomes measures for canine osteoarthritis. *Veterinary Surgery, **46***, 341-342.

Weinstein, S.L. (1987). Natural history of congenital hip dislocation (CDH) and hip dysplasia. *Clinical Orthopedics Related Research, **225***, 62-76.

Xia, Z., Donehower, L.A., Cooper T.A., Neilson J.R., Wheeler, D.A., Wagner, E.J. ve ark. (2014). Dynamic analyses of alternative polyadenylation from RNA-seq reveal a 3'-UTR landscape across seven tumor types. *Nature Communications*, ***5***, 5274, Erişim: 27 Aralık 2018, doi: 10.1038/ncomms6274.

Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T., Ye Z.H., Mao, J.X. (1999). *POPGENE, version 1.32: the user friendly software for population genetic analysis.* Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada.

Zdenek, H., Di Marco, S., Radzioch, D. (1998). Characterization of the RNA binding proteins forming complexes with a novel putative regulatory region in the 3′-UTR of TNF-α mRNA, *Nucleic Acids Research*, ***Volume 26(11)***, 2803–2812.

Zeggini, E., Panoutsopoulou, K., Southam, L., Rayner, N.W., Day-Williams AG, Lopes, M.C. ve ark. (2012). Identification of new susceptibility loci for osteoarthritis (arcOGEN): a genome-wide association study. *Lancet*, ***380(9844)***, 815-823.

Zhang, X., Meng, Q., Ma, R. ve ark. (2015). Early acetabular cartilage degeneration in a rabbit model of developmental dysplasia of the hip. *International Journal of Clinical & Experimental Medicine*, ***8***, 14505– 14512.

Zhou, Z., Sheng, X., Zhang, Z., Zhao, K., Zhu, L., Guo, G. ve ark. (2010). Differential Genetic Regulation of Canine Hip Dysplasia and Osteoarthritis. *PLoS ONE*, ***5(10)***, e13219, Erişim: 5 Haziran 2018, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013219.

Zhu, L., Zhang, Z., Friedenberg, S. ve ark. (2009). The long (and winding) road to gene discovery for canine hip dysplasia. *Veterinary Journal*, ***181(2)***, 97–110.

ETİK KURUL KARARI

Tarih ve Sayı: 05/12/2017-454693

* B E N U A 2 8 6 2 *

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

Sayı :35980450-050.99-
Konu :Doç. Dr. Iraz AKIŞ AKAD'a ait çalışmanın Etik Kurul Onayı almayı gerektirmediği Hk.

Sayın Doç. Dr. Iraz AKIŞ AKAD

İlgi :30.10.2017 tarihli proje başvurunuz.

Sorumluluğunu üstlendiğiniz **"Köpeklerde Kalça Displazisi ile CHST14 geni arasındaki ilişkinin tüm gen dizi analizi ile belirlenmesi"** başlıklı projeniz; incelenmiş olup, Orman ve Su İşleri Bakanlığının 15.02.2014 tarih ve 28914 sayılı Resmi Gazete'de yayınlanarak yürürlüğe giren "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik hükümlerince, araştırmanızda kullanılacak materyal dikkate alındığında, çalışmanızın Etik Kurul Onayı almayı gerektirmediğine karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

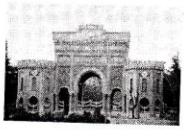
e-İmzalı
Prof. Dr. Fatma Alev KAYMAZ
Başkan

Doğrulamak İçin:http://194.27.128.66/envision.Sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BENUA2862
Ayrıntılı bilgi için irtibat : Canan SÖNMEZTÜRK
İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı İ.Ü. Veteriner Fakültesi Dekanlı nolu oda Avcılar/İSTANBUL
Tel : (212) 473 7070 Faks : 2124400377
e-posta : hadyek@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : www.istanbul.edu.tr

K - Q TSE-ISO-EN 9000

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 2014/ 68

22/07/2014

Sayın: Prof.Dr. Kemal ALTUNATMAZ
İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Karar No: 68
Başvuru Tarihi: 14.07.2014

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen **Prof.Dr. Kemal ALTUNATMAZ'a** ait **"Köpeklerde Kalça Displazisi ile İlişkili Polimorfizmlerin Belirlenmesi"** isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul İlkelerine uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	**Türü**	**Köpek**
	Cinsiyeti	**Erkek/Dişi**
	Sayısı	**50**
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi	**Ekim 2014/ Ekim 2016**	

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İÜ HADYEK Başkanı

Prof.Dr. Mehmet YALTIRIK
İÜ HADYEK Başkan Yrd.

Prof.Dr. Pınar YAMANTÜRK ÇELİK
Üye

Prof. Dr. Ufuk ÇAKATAY
Üye

Doç.Dr. Alper OKYAR
Üye

Yard.Doç.Dr. Altan ARMUTAK
Üye

Uzm.Vet.Hek. Fatma TEKELİ
Üye

Mak.Yük.Müh.Dr. Burak OLGUN
Üye

Av. Selma DEMİR
Üye

İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı İ.Ü.Veteriner Fakültesi Dekanlık katı A 221 nolu oda Avcılar –İSTANBUL TEL : (0 212) 4737070/ 17031 E mail : hadyek@istanbul.edu.tr

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KÖPEKLERDE KALÇA DİSPLAZİSİ İLE CHST14 GENİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN TÜM GEN DİZİ ANALİZİ İLE BELİRLENMESİ

ORIJINALLIK RAPORU

%4	%3	%1	%2
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
2	Submitted to Fatih University Öğrenci Ödevi	%1
3	acikerisim.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	targid.org İnternet Kaynağı	<%1
5	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
6	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
7	www.mehmetdinler.com İnternet Kaynağı	<%1
8	www.scribd.com İnternet Kaynağı	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	ERDAL	**Soyadı**	TOPPARMAK
Doğ.Yeri	İSTANBUL	**Doğ.Tar.**	29.05.1979
Uyruğu	T.C.	**TC Kim No**	28675954916
Email	ingilizcemedikalceviri@gmail.com	**Tel**	05357762066

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya	2014
Lisans	İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji	2006
Lise	Özel Bilgi Lisesi	1997

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.	Tıbbi Çevirmen	Amerikan Hastanesi	2007 – (devam)
2.	Serbest Çevirmen	İngilizce Medikal Çeviri	1999 – (devam)
3.	Konferans Tercümanı	İngilizce Medikal Çeviri	2004 – (devam)

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	98.75/100	TOEFL: 100/120
Arapça	------	İyi	-----	----	-----

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	70	72	67
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
TRADOS	Çok iyi
FrameMaker	Çok iyi
Office Uygulamaları	Çok iyi

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri:

1) Sevda Tanrikulu-Küçük, Hikmet Koçak, Yildiz Öner-İyidoğan, Muhammed Seyithanoğlu, Erdal Topparmak & Tuba Kayan-Tapan (2015) Serum fetuin-A and arginase-1 in human obesity model: Is there any interaction between inflammatory status and arginine metabolism?, Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 75:4, 301-307, DOI: 10.3109/00365513.2015.1010177

2) Erdal Topparmak, Sevda Tanrikulu-Küçük, Hikmet Koçak ve Yildiz Öner-İyidoğan (2019). Serum chymase levels in obese individuals: The relationship with inflammation and hypertension. Turkish Journal of Biochemistry, 20180152, eISSN 1303-829X, ISSN 0250-4685,DOI: https://doi.org/10.1515/tjb-2018-0152.

Sertifikalar:

American Translator Association (ATA Associate Member)

ALTA Certificate of Proficiency in Translation

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Amatör rock vokalisti, voleybolculuk.