



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK
LİSANS
TEZİ**

**PRİMER SJÖGREN SENDROMLU HASTALARDA
MATRİKS METALLOPROTEİNAZ 13 (MMP-13)
DÜZEYLERİNİN HASTALIK
AKTİVİTESİ İLE İLİŞKİSİ**

BURCU ESER

BİYOKİMYA (TIP) ANABİLİM DALI

TEMMUZ 2017



**PRİMER SJÖGREN SENDROMLU HASTALARDA MATRİKS
METALLOPROTEİNAZ 13 (MMP-13) DÜZEYLERİNİN HASTALIK
AKTİVİTESİ İLE İLİŞKİSİ**

Burcu ESER

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOKİMYA (TIP) ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2017

Burcu ESER tarafından hazırlanan “PRİMER SJÖGREN SENDROMLU HASTALARDA MATRİKS METALLOPROTEİNAZ 13 (MMP-13) DÜZEYLERİNİN HASTALIK AKTİVİTESİ İLE İLİŞKİSİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ /~~OY~~ ~~ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~

Başkan : Prof. Dr. Yeşim ÖZKAN

Biyokimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~

Üye : Doç. Dr. Funda KOSOVA

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Celal Bayar Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~

TezSavunmaTarihi: 14/07/2017

Jüri üyeleri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Burcu ESER

14.07.2017

PRİMER SJÖGREN SENDROMLU HASTALARDA MATRİKS
METALLOPROTEİNAZ-13 (MMP-13) DÜZEYLERİNİN HASTALIK AKTİVİTESİ
İLE İLİŞKİSİ
(Yüksek Lisans Tezi)

Burcu ESER

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Temmuz 2017

ÖZET

Matriks metalloproteinazlar (MMP), genel olarak ekstrasellüler matriksin tüm protein bileşenlerini parçalayabilen, birincil matriks bozucu proteazlardır. Romatolojik hastalıklar kas, iskelet sistemi, eklemler ve dolaylı olarak da iç organları ve bütün vücudu etkileyebilen bir hastalık grubudur. Bunlar genel olarak sistemik, otoimmün, kronik seyirli inflamatuvar bir hastalıktır. Primer Sjögren Sendromu (pSS), Romatoid Artrit (RA) ve Psöriatik Artrit (PsA) hastalıklarının patofizyolojilerinde kollejenazlar ve jelatinazlar geçerli bir öneme sahiptirler. Yapılan birçok çalışma da farklı MMP türlerinin bu hastalıkların patogenezinde ki rolleri açıklanmaya çalışılmıştır. Biz çalışmamızda, daha önce yapılan çalışmalardan edindiğimiz bilgiler ışığında MMP-13 ve MMP-9'u ele aldık. Çalışmaya Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Romatoloji Bilim Dalı Polikliniği'nde takipli hastalardan gönüllü olarak katılmayı kabul eden pSS'li 20, RA'li 20, PsA'li 19 ve 15 sağlıklı kişide kontrol grubu olarak alınmıştır. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar neticesinde; kontrol ile PsA gruplarının MMP-13 seviyeleri ve kontrol ile pSS gruplarının MMP-9 seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu (sırası ile $p=0,026$, $p=0,040$). pSS'de MMP-13 ve MMP-9 seviyeleri arasında 0,01 düzeyinde anlamlı, negatif korelasyon, RA'de sedimantasyon ve MMP-9 seviyeleri arasında 0,01 düzeyinde anlamlı, negatif korelasyon ve PsA'de ise MMP-13 ve MMP-9 seviyeleri arasında 0,05 düzeyinde anlamlı, pozitif korelasyon bulundu. ELİZA ile ölçümü yapılan MMP-13 ve MMP-9 düzeyleri ayrıca HPLC yöntemi ile de çalışıldı. Ölçümlerden elde ettiğimiz kromatogramlar incelendiğinde MMP-13 ve MMP-9 ayrımı yapılamadı ancak MMP düzeylerinin total olarak ölçülebileceğini düşünmekteyiz. pSS, RA, PsA ve hatta birçok hastalıkta MMP-13, MMP-9 ve diğer MMP türleri etkin bir role sahiptir. MMP'lar kompleks moleküllerdir ve hastalıkların patogenezinde bir biyobelirteç veya terapötik hedef olarak gösterilmesi mümkündür. Fakat bu amaca yönelik daha fazla çalışma yapılmalıdır. MMP düzey ölçümlerinin daha kolay, yaygın ve etkin olabilmesi için analiz yöntemlerini geliştirmeye ihtiyaç vardır. Bu çalışmanın ilerideki metod geliştirme çalışmalarına ışık tutacağını düşünüyoruz.

BilimKodu : 1010.1

AnahtarKelimeler : Primer Sjögren Sendromu, romatolojik hastalıklar, matriks metalloproteinazlar, HPLC

SayfaAdedi : 82

Danışman : Doç. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL

RELATION of MATRIX METALLOPROTEINASE 13 (MMP-13) LEVELS with
DISEASE ACTIVITY in PATIENTS with PRIMER SJOGREN's SYNDROME

(M. Sc. Thesis)

Burcu ESER

GAZI UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

July 2017

ABSTRACT

Matrix metalloproteinases (MMP) are generally primary matrix disruptive proteases which are capable to dismantle all protein components of extracellular matrix. Rheumatic diseases can affect musculoskeletal system and joints, and also viscera and all body parts, accordingly. These are systemic, autoimmune and chronic inflammatory diseases. In pathophysiologies of Primer Sjögren's Syndrome (pSS), Rheumatoid arthritis (RA) and Psoriatic Arthritis (PsA) diseases, collagenases and gelatinases have a valid importance. In many studies, roles of different MMP types in pathogenesis of those diseases have been tried to be clarified. In our study, we decided to deal with MMP-13 and MMP-9, according to the information we obtained from previous studies. Voluntary participants from Gazi University Medical Faculty Rheumatology Department Polyclinic, 20 patients with pSS, 20 patients with RA, 19 patients with PsA, and 15 healthy people as control group, were included to the study. According to our results, there was a statistically significant difference in MMP-13 levels between control group and PsA group and in MMP-9 levels between control group and pSS group ($p=0,026$, $p=0,040$, respectively). In pSS, between MMP-13 and MMP-9 levels, significant, negative correlation with 0,01 level; in RA, between sedimentation and MMP9 levels, significant, negative correlation with 0,01 level; and in PsA, between MMP-13 and MMP-9 levels, significant, positive correlation with 0,05 level were found. MMP-13 and MMP-9 levels measured by ELISA were also studied by HPLC method. Considering chromatograms we obtained from measurements, MMP-13 and MMP-9 could not be distinguished, but we think that total MMP level can be measured. MMP-13, MMP-9 and other MMP types have active roles in pSS, RA, PsA and many other diseases. MMPs are complex molecules and it is possible that they can be considered to be used as biomarkers or therapeutic targets in pathogenesis of diseases. However, more studies are needed according to this purpose. In order to make MMP level measurements more easy, widespread and effective, development of analysis methods is required. We believe that our study will shed light on further method development studies.

ScienceCode : 1010.1

KeyWords : Primer Sjögren Syndrome, rheumatologic diseases, matrix metalloproteinases, HPLC

PageNumber : 82

Advisor : Assoc. Prof. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimine başladığım günden bu zamana gerek eğitim, gerek çalışma hayatımda yaşamın her alanında derin bilgisi, deneyimi ve desteğini benden esirgemeyen, sabır ve hoşgörüsü ile her zaman yol gösteren, kendisini örnek edindiğim, sevgi ve saygı duyduğum çok değerli hocam, tez danışmanım Doç. Dr. Aylin Sepici Dinçel'e

Eğitimim boyunca değerli bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan, yardım ve desteklerini esirgemeyen tüm Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Tezime ait hasta grubu örneklerinin toplanmasındaki katkılarından dolayı Arş. Gör. Uzm. Dr. Duygu Tecer'e (Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon (Romatoloji) Anabilim Dalı)

Tez aşamasında çalışmanın istatistiksel değerlendirmesinde destek ve bilgileri ile bana büyük katkısı olan, değerli zamanını ayıran sevgili Arş. Gör. Dr. Ahmet Yalçinkaya'ya,

Yüksek lisans eğitimimde ve tez çalışması boyunca destek ve yardımlarını esirgemeyen ailem ve sevgili kardeşim Sadık Eser'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca, yolumun kesiştiği, beraber çalışma fırsatı bulduğum değerli hocalarım ve arkadaşlarıma,

En içten duygularımla teşekkür ederim.

Burcu ESER

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Ekstraselüler Matriks	5
2.2. Matriks Metalloproteinazlar	6
2.2.1. Tanım.....	6
2.2.2. Tarihsel gelişim	7
2.2.3. Moleküler yapı.....	8
2.2.4. Regülasyon, aktivasyon	12
2.2.5. Sınıflandırma	15
2.2.6. Substratları.....	19
2.2.7. İnhibitörleri.....	20
2.2.8. Analiz yöntemleri	20
2.2.9. Hastalıklarla ilişkileri	21
2.3. MMP-13	24
2.4. MMP-9	27
2.5. Romatolojik Hastalıklar	28
2.5.1. Primer Sjögren Sendromu	29

Sayfa

2.5.2. Romatoid artrit.....	31
2.5.3. Psöriatik artrit	33
2.6. ELİZA	35
2.7. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC).....	37
2.7.1. Kromatografi	37
2.7.2. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC)	38
2.7.3. HPLC'nin uygulanışı.....	38
2.7.4. HPLC sistemine genel bakış	39
2.7.5. HPLC çalışmalarında ki genel avantajlar	39
2.7.6. HPLC'nin kullanım alanları	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM	41
3.1. Çalışmaya Alınacak Hastaların Belirlenmesi.....	41
3.1.1. Primer Sjögren Sendromu grubu hasta seçim kriterleri.....	41
3.1.2. Psöriatik Artrit grubu hasta seçim kriterleri	41
3.1.3. Romatoid Artrit grubu hasta seçim kriterleri.....	41
3.2. Numune Alım, Hazırlama ve Saklanması	42
3.3. Ölçümler.....	42
3.3.1. Kullanılan alet, gereç ve cihazlar	42
3.3.2. MMP-13 ölçümü.....	42
3.3.2. MMP-9 ölçümü.....	44
3.4. HPLC ile Analiz	46
3.5. İstatistiksel Analiz	46
4. BULGULAR	49
4.1. Kontrol ve Hasta Gruplarına Ait Tanımlayıcı Bulgular.....	49
4.2. Kontrol ve Hasta Gruplarına Ait Laboratuvar Sonuçları ile İlgili Bulgular	50
4.3. HPLC Ölçümleri İle Elde Edilen Bulgular	56

Sayfa

5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	67
KAYNAKLAR	69
EKLER.....	75
EK-1. Yerel Etik Kurul Onay Formu.....	76
EK-2. Araştırma Anket Formu	78
ÖZGEÇMİŞ	79



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. MMP türlerine ait sınıflandırma.....	18
Çizelge 2.2. MMP türlerine göre substratlarının listesi.....	19
Çizelge 4.1. Tüm grupların yaşa göre genel tanımlayıcı istatistikleri.....	49
Çizelge 4.2. Tüm grupların MMP-13 sonuçlarına göre genel tanımlayıcı istatistikleri	50
Çizelge 4.3. Tüm grupların MMP-9 sonuçlarına göre genel tanımlayıcı istatistikleri	51
Çizelge 4.4. Tüm grupların sedimantasyon sonuçlarına göre genel tanımlayıcı istatistikleri	51
Çizelge 4.5. Tüm grupların CRP sonuçlarına göre genel tanımlayıcı istatistikleri	52
Çizelge 4.6. MMP-13 ve MMP-9 değerleri için Kontrol grubu ile PsA grubu arasında yapılan değerlendirme.....	52
Çizelge 4.7. MMP-13 ve MMP-9 değerleri için Kontrol grubu ile RA grubu arasında yapılan değerlendirme	53
Çizelge 4.8. MMP-13 ve MMP-9 değerleri için Kontrol grubu ile pSS grubu arasında yapılan değerlendirme.....	53
Çizelge 4.9. MMP-13, MMP-9, sedimantasyon ve CRP değerleri için PsA grubu ile RA grubu arasında yapılan değerlendirme	53
Çizelge 4.10. MMP-13, MMP-9, sedimantasyon ve CRP değerleri için PsA grubu ile pSS grubu arasında yapılan değerlendirme	54
Çizelge 4.11. MMP-13, MMP-9, sedimantasyon ve CRP değerleri için RA grubu ile pSS grubu arasında yapılan değerlendirme	54
Çizelge 4.12. Kontrol grubu içerisinde MMP-13 ve MMP-9 korelasyon değerleri.....	54
Çizelge 4.13. PsA grubu içerisinde MMP-13, MMP-9, sedimantasyon ve CRP korelasyon değerleri	55
Çizelge 4.14. RA grubu içerisinde MMP-13, MMP-9, sedimantasyon ve CRP korelasyon değerleri	55
Çizelge 4.2. pSS grubu içerisinde MMP-13, MMP-9, sedimantasyon ve CRP korelasyon değerleri	56
Çizelge 4.16. Elde edile değerlerin toplu olarak gösterimi	56

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. MMP genel yapısının 3 boyutlu görüntüsü	8
Şekil 2.2. MMP genel domain yapısı	9
Şekil 2.3. Domain yapılarına göre MMP alt grupları	12
Şekil 2.4. MMP enzim aktivitesinin düzenlenmesi	14
Şekil 2.5. MMP süperaillesine ait sınıflandırma	16
Şekil 3.1. MMP-13 standartlarının dilüsyonu.....	43
Şekil 3.2. MMP-9 standartlarının dilüsyonu	45

SİMGE VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış olan bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar	Açıklamalar
AP	Alkalenfosfataz
APMA	Aminofenilmerkürük asetat
BCIP/NBT	5-brom 4-klor 3-fosfat indolil/Nitro mavi tetrazolium
bFGF	Bazik fibroblast büyüme faktörü
Ca⁺⁺	Kalsiyum
CASPAR	Psöriatik Artrit Sınıflama Kriterleri
CAT	Katalitik domain
CCP	Siklik sitrülünat peptid
CNS	Merkezi sinir sistemi
CRP	C reaktif protein
Cys	Sistein
DLE	Diskoid Lupus Eritematozus
DMARD	Hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaç
ECM	Ekstrasellüler matriks
EGF	Epidermal büyüme faktörü
ELİZA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
FDA	ABD Gıda ve İlaç İdaresi
GC	Gaz kromatografisi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HRP	Horseradishperoksidaz
İL	İnterlökin
kDa	Kilodalton
LP	Liken Planus
M10	Metzincin süperailesi

Kısaltmalar**Açıklamalar**

MAPK	Mitojenle aktive protein kinaz
MBP	Miyelin temel proteini
MCP	Metakarpofalangeal
MMP	Matrix Metalloproteinazlar
MPI	Sentetik MMP inhibitörlerini
MT-MMP	Membran tip matriks metalloproteinaz
MTP	Metatarsofalangeal
NF-KB	Nükleer faktör-kappa B
NIH ABD	Ulusal Sağlık Enstitüsü
NMR	Nükleer manyetik rezonans
NSAİİ	Non-Steroid Anti-İnflamatuvar İlaçlar
OA	Osteoartrit
PDA	Photo-diod Array dedektör
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PGE2	Prostaglandin E2
PIP	Proksimal interfalangeal
PsA	Psoriatik artrit
pSS	Primer Sjögren sendromu
RA	Romatoid artrit
RF	Romatoid faktör
SS	Sjögren Sendromu
TFPI2	Doku faktörü yolağı inhibitörü- 2
TGF-β	Dönüştürücü büyüme faktörü- beta
TIMP	Matriks metalloproteinaz doku inhibitörleri
TLC	İnce tabaka kromatografisi
TMB	Tetrametilbenzidin
TNF-α	Tümör nekroz faktörü-alfa
UC	Ülseratif kolit
uPA	Ürokinaz-tip plazminojen aktivatörü

Kısaltmalar**Açıklamalar****VGEF**

Vasküler endotelyal büyüme faktörü

Zn⁺²

Çinko iyonu



1. GİRİŞ

Hücre ve dokulara sadece yapısal destek sağlamakla kalmayıp aynı zamanda hücre proliferasyonu, farklılaşma, migrasyon, yapışma ve doku morfogenezisi gibi pek çok biyolojik aktivitede rol alan ekstraselüler matriks (ECM); sentez, parçalanma ve yeniden yapılanma süreçlerindeki hücre regülasyonu, dönüşümü gibi etkilerini Matriks Metalloproteinazlar aracılığı ile gerçekleştirir.

Matriks Metalloproteinazlar (MMP), toplu olarak ekstraselüler matriksin tüm protein bileşenlerini parçalayabilen, birincil matriks bozucu proteazlardır [1]. MMP'lar, çinko ve kalsiyum bağımlı endopeptidazların bir ailesi olup, katalitik bölgede bir Zn^{+2} iyonunu bağlayan üç histidin kalıntısı ile karakterizedir [1]. Günümüzde X-ışını kristalografisi ve nükleer manyetik rezonans (NMR) çalışmaları birçok MMP'ın yapısını belirlemeyi mümkün hale getirmiştir [2]. MMP'ları substrat tanıma ve bölme mekanizmasına göre de altı kategoriye ayırabiliriz. Kollajenazlar, stromelisinler, matrilisinler, jelatinazlar, membrana bağlı MMP'lar ve grup belirtimi olmayan MMP'lar.

Matriks metalloproteinazlar hem hücre-hücre hem de hücre-hücre dışı matriks etkileşimlerinin düzenlenmesinde anahtar oyuncular olarak kabul edilmektedir. Hücre ve dokulara sadece yapısal destek sağlamakla kalmayıp aynı zamanda hücre proliferasyonu, farklılaşma, migrasyon, yapışma ve doku morfogenezisi gibi pek çok biyolojik aktivitede rol alırlar. Geniş faaliyet yelpazesi ve ifade alanlarından dolayı, hastalıkların tedavisinde terapötik hedef veya teşhisleri kolaylaştırmada biyolojik belirteç hedefi olarak potansiyelinin aydınlatılması, farklı hücresel konumlardaki ve farklı hastalık aşamalarındaki rollerinin dikkatle analiz edilmesi önem arz etmektedir [3].

Matriks metalloproteinazlar, ekstraselüler matriksin stabilitesi için önemlidir. Kıkırdak ve eklem ekstraselüler matriksinin ana bileşeni olan kollajenin yıkım mediyatörü özellikle kollajenazlardır [4]. Kollajenazlar, üçlü sarmal yapıdaki fibriler kollajenlerin bozunmasını katalize eder. Dört tip kollajenaz vardır; kollajenaz-1 (MMP-1, interstisyel kollajenaz), kollajenaz-2 (MMP-8, nötrofil kollajenaz), kollajenaz-3 (MMP-13) ve kollajenaz-4 (MMP-18, *Xenopus collagenase*) olarak adlandırılır.

MMP ailesinin diğ er önemli bir alt grubunu oluşturan Jelatinazlar ise, MMP-2 (Jelatinaz A) ve MMP-9 (Jelatinaz B) olmak üzere 2 tip üyeye sahiptir. Domain yapılarında diğ er MMP'lerden farklı olarak Fibronektin tip II benzeri 3 tekrar bölgesi içerirler.

Romatolojik hastalıklar kas, iskelet sistemi, eklemler ve dolaylı olarak da iç organları ve bütün vücudu etkileyebilen bir hastalık grubudur. Romatizmal hastalıkların sebebi geçmişten beri çok net anlaşılamamıştır. Genetik yatkınlıklar, çevresel faktörler, enfeksiyonlar v.b gibi sebeplerle bağışıklık sisteminde meydana gelen değışikliklerin tetiklemesiyle ortaya çıkmaktadırlar. Romatizmal hastalıklar nüfusun büyük bir bölümünü etkilemektedir.

Romatizmal hastalıklar genel anlamda eklem, bağı dokusu ve kasların dışında, birçok organ ve sistemi tutabilen hastalıkları da bünyesinde barındırır. Bu nedenle, kapsamı oldukça geniştir ve yaklaşık 200 kadar hastalığı içerir. Bu çalışmada biz Primer Sjögren Sendromu, Romatoid Artrit ve Psoriatik Artrit hastalıklarını örnek olarak ele aldık.

Sjögren Sendromu (SS) gözyaşı ve tükrük bezleri başta olmak üzere, tüm ekzokrin bezlerin inflamasyonu ile karakterize, yavaş seyirli, kronik, sistemik, otoimmün bir hastalıktır. Temelde bir otoimmün ekzokrinopati olan bu hastalığın başlıca belirtileri olarak ağız ve göz kuruluğu (sikka semptomları) sayılmaktadır. Bununla birlikte hastalık pek çok organ ve sistemi de etkileyebilmektedir. Bu anlamda hem organa özgü, hem de sistemik özellikleri birlikte bulundurabilen bir hastalıktır. Sjögren sendromu primer yâda sekonder olarak sınıflandırılabilir. Altta yatan başka bir hastalık yoksa primer SS, başka bir hastalık ile birlikte ise ( rneğın romatoid artrit) sekonder SS olarak adlandırılır [5]. Primer Sjögren sendromu (pSS), erken ve aşamalı lakrimal ve tükrük disfonksiyonu ile karakterizedir [6].

Romatoid artrit (RA), en sık rastlanan sistemik otoimmün, simetrik olarak eklemlerde artrite yol açan ve birçok eklemi aynı anda tutabilen kronik seyirli inflamatuvar bir hastalıktır. Romatoid artrit, en yaygın inflamatuvar artritlerden biridir. Etkilenen hastalar kronik eklem ağırsı, sakatlık ve ciddi mortalite oranları ile muzdariptir. Aynı zamanda birçok organ ve sistemi de tutabildiğinden eklem dışı bulgular ve sistemik semptomlar da görülebilmektedir [6].

Psoriatik artrit (PsA), psöriazis (sedef) denilen deri hastalığı ile beraber gelişen ve psöriazis hastalığı bulunanların yaklaşık %20'sinde görülen eklem iltihabı ile seyreden bir hastalıktır. Hastalık birçok eklemi ve/veya omurgayı tutabilir ve belirtiler kişiden kişiye değişkenlik gösterebilir. Psöriatik artrit, tuttuğu eklemlerde hasara neden olur. PsA, romatoid faktörün (RF) keşfi ile romatoid artritтен ayrıt edilmiştir. RA'li hastaların %85'i RF pozitif iken PsA'li hastalar genellikle RF için seronegatifdir [6].

Romatizmal hastalıklar nüfusun büyük bir bölümünü etkilemektedir. Sjögren sendromu görülme sıklığı yaklaşık %0,1 ile %0,6 arasında iken RA genel olarak %1-2 olup, Psöriatik artrit'in görülme sıklığını ise yaklaşık %0,04 - 0,1 arasında değişmektedir. Bu hastalıklar genel olarak sistemik, otoimmün, kronik seyirli inflamatuvar hastalıklardır. Hastalıkların etyopatogenezi tam olarak açıklanamamış olmakla beraber genetik ve çevresel faktörlerin etkisiyle ve ardından otoimmünitenin aktifleşmesiyle kronik seyirli inflamatuvar bir hastalık halini almaktadır.

MMP'ların keşfedildikleri zamandan beri ECM fizyolojisi üzerindeki rolleri ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. ECM fizyolojisi üzerindeki rolleri inflamasyonda aktif bir rol üstlenen sitokinler ile olan etkileşimleri sebebiyle daha önemli hale gelmiştir. Sitokinler ile olan etkileşimleri neticesinde immünite, inflamasyon ve doğal olarak hastalıkların seyrinde etkili ve aktif bir rol üstlendikleri anlaşılmıştır.

pSS, RA ve PsA hastalıklarında patofizyolojileri açısından kollejenazlar ve jelatinazlar geçerli bir öneme sahiptirler. Yapılan birçok çalışma da farklı MMP türlerinin bu hastalıkların patogenezinde ki rolleri açıklanmaya çalışılmıştır. Biz çalışmamızda daha önce yapılan çalışmalardan edindiğimiz bilgiler ışığında MMP-13 ve MMP-9'u ele aldık.

Geniş faaliyet yelpazesi ve ifade alanlarına sahip olan MMP ailesi birçok hastalığın patofizyolojisinde etkin bir role sahiptir. MMP'ların üstlendikleri roller kadar yapıları da kompleksdir. Böyle kompleks bir yapıya sahip olan bir biyomolekülün analizi de çok kolay olmamaktadır. Ölçüm için farklı analiz yöntemleri kullanılmaktadır. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanı ELİZA yöntemidir. Fakat bilindiği üzere bu yöntemin de hassasiyet ve özgüllük ile ilgili bazı dezavantajları vardır.

Bu çalışmamızda; pSS, RA ve PsA hastalıklarının patofizyolojileri ile MMP-13 ve MMP-9 seviyeleri arasındaki ilişkinin incelenmesinin yanında MMP düzeyleri ELİZA yöntemi dışında HPLC yöntemini ile de ölçüldü. Yapılan literatür taramalarında MMP'lerin HPLC'de ölçümüne dair referans bir metot bulunmamaktadır. Bu çalışmanın ilerideki metot geliştirme çalışmalarına ışık tutacağını düşünüyoruz.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ekstraselüler Matriks

Ekstraselüler matriks (ECM) canlı organizmada hücreler arasındaki boşlukları dolduran ve bu hücreleri birbirine bağlayan kompleks bir yapıdır. İçinde bulunduğu ya da temas halinde olduğu hücreler tarafından salgılanır. Yapısında kollajen, fibronektin, laminin, elastin, glikoproteinler gibi çeşitli proteinler ve proteoglikanlar bulunur [7, 8].

Genel olarak görevleri:

1. Hücreler arasındaki boşlukları doldurarak hücreleri birbirine bağlar.
2. Doku ve hücreler için destek görevi görür.
3. Hücrelerin şekil, yapı ve hareketinde rol alır.
4. Hücre gelişim ve farklılaşmasını sağlar.
5. Hücreler arası madde alışverişi ve sinyal iletiminde rol oynar.
6. Hücre yaşamının devamlılığında görev alır.
7. Hücrelerin göçü ve birbirleri ile olan ilişkilerini düzenler.
8. Hücrelerin gelişiminde, çoğalmasında, canlılığının devamında görev alan hormon vb biyomoleküller için depo görevi görür.

Hücreler tarafından salgılanan bu ECM yine bu hücreler tarafından sentezlenen proteazlar tarafından yeniden yapılanma ve yıkıma uğrarlar. Bu biyomoleküller:

- 1- Serin Proteazlar
- 2- Matriks Metalloproteinazlar

Hücre ve dokulara sadece yapısal destek sağlamakla kalmayıp aynı zamanda hücre proliferasyonu, farklılaşma, migrasyon, yapışma ve doku morfogenezisi gibi pek çok biyolojik aktivitede rol alan ECM sentez, parçalanma ve yeniden yapılanma süreçlerindeki hücre regülasyonu, dönüşümü gibi etkilerini Matrix Metalloproteinazlar aracılığı ile gerçekleştirir [7- 10].

2.2. Matriks Metalloproteinazlar

2.2.1. Tanım

Matriks Metalloproteinazlar, toplu olarak ECM'nin tüm protein bileşenlerini parçalayabilen, birincil matriks bozucu proteinazlardır [1]. Matris metalloproteinaz (MMP) ailesinin üyelerinin, çok çeşitli biyolojik makromoleküllerin hidrolizini katalize ettiği bilinmektedir [7]. MMP'lar, çinko ve kalsiyum bağımlı endopeptidazların bir ailesi olup, katalitik bölgede bir Zn^{+2} iyonunu bağlayan üç histidin kalıntısı ile karakterizedir [1]. Matriks metalloproteinazlar veya matriksinler metzincin süper ailesine aittir. MMP'lar çinko ve kalsiyuma bağlı enzimlerdir ve neredeyse tüm hücre dışı matriks bileşenlerini parçalayabilirler [11]. Bunlar ayrıca bunlarla sınırlı olmayan çeşitli hücre dışı substratları da parçalamaktadır. MMP'lar, aktif bölgede çinko bağlayıcı histidin kalıntısı (HexxHxxGxxH) ile karakterize edilirler. MMP'ların, kollajenler, fibronektin, lamininler ve proteoglikanlar dahil olmak üzere hücre dışı matriks proteinlerinin lokalize hidrolizini katalize ettiği ve böylece bağ dokusunun bütünlüğünü değiştirdiği düşünülmektedir [12]. Bu proteinazlar, embriyogenez, normal doku yenilemesi, yara iyileşmesi ve anjiyogenez ve aterom, artrit, kanser ve doku ülserasyonu gibi birçok biyolojik süreçte merkezi bir rol oynamaktadır [13]. Matriks metalloproteinazlar hem hücre-hücre hem de hücre-hücre dışı matris etkileşimlerinin düzenlenmesinde anahtar oyuncular olarak kabul edilmektedir. Matriks yapısını, büyüme faktörü bulunabilirliğini ve hücre yüzeyi sinyalleme sistemlerinin işlevini modifiye ederek hücrel farklılaşma, proliferasyon ve apoptoz üzerine etkileri vardır. Yaralanma, artrit, kanser ve kardiyovasküler hastalık gibi hastalıkların ilerlemesine morfogenez, yara iyileşmesi, doku onarımı ve yeniden modellemede merkezi rol oynarlar. Çok farklı dokularda tespit edilmiş olması ve geniş faaliyet yelpazesinden dolayı hastalıklarda terapötik ilaç hedefi olarak potansiyelinin aydınlatılması veya doku onarım sürecindeki önemli özellikleri, farklı hücrel konumlardaki ve farklı hastalık aşamalarındaki rollerinin dikkatle analiz edilmesi gerekmektedir [3]. MMP'lar, çoğunlukla enfeksiyonel reaksiyonlarla ilişkili birçok fizyolojik ve patolojik sürece dahil olduğuna inanılan proteolitik enzimlerdir. MMP sentezi ve fonksiyonları, transkripsiyonal aktivasyon, transkripsiyon sonrası işleme ve aktivite kontrolünün, metalloproteinazların doku inhibitörleri olarak bilinen endojen inhibitör ailesi tarafından düzenlenmesiyle kontrol edilir [11]. MMP'lar, ECM bileşenlerinin yanı sıra bir takım büyüme faktörleri, reseptörler,

kemokinler, Fas ligandı, diğer proteinazlar, integrinler ve hücre-hücre adhezyon molekülleri gibi ECM dışı bileşenlerin de yıkımından sorumludurlar [14, 75].

2.2.2. Tarihsel gelişim

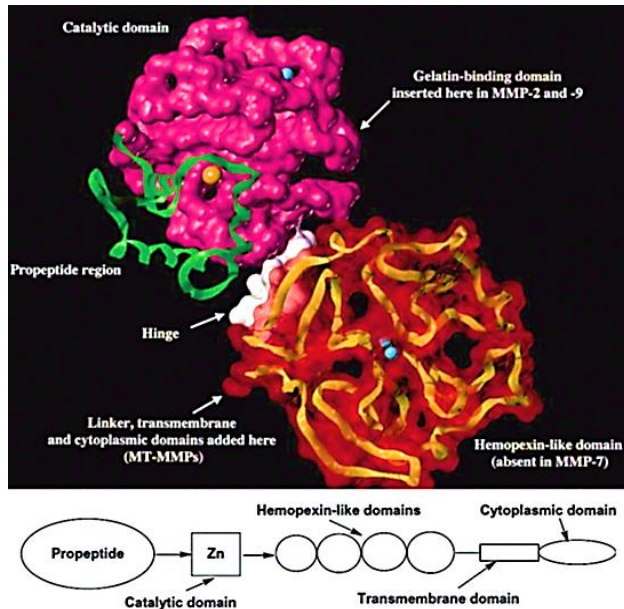
Matriks metalloproteinazlar'dan ilk defa depolimerize edici enzimler olarak anjiyogeneze ve tümör büyümesinde oynadığı roller nedeniyle 1949 da bahsedilmiştir [16]. Ardından uzun bir aradan sonra 1962'de Jerome Gross ve Charles Lapiere tarafından ilk defa omurgalılarda gösterilerek tanımlanmıştır. Kurbağa yavrusunun kuyruğunun parçaları sulandırılmış kollajen jeller içeren kültür ortamına alındığında doğal kollajen fibrillerine saldıran bir kollajenolitik enzim elde edilmiş [17]. Kültür ortamında kuyruk doku parçalarından salgılanan enzimin nötr pH değerinde ve 27 °C'de kollajen üzerinde etkili olan gerçek bir kollajenaz olduğu gösterilmiştir [18]. Kültür ortamında ki bu kuyruk dokusu üçlü sarmal kollajen bozunumunu sağlayan interstisyel kollajenaz olarak bilinen bir enzim tarafından parçalanmıştır. Bu enzim insanda ilk defa 1968'de proMMP (MMP zymogen olarak da adlandırılır) aktif olmayan formda insan cildinden izole edilmiştir [2]. Kısa sürede bu çalışmalar çok çeşitli dokularda benzer bir aktiviteyi göstermek için genişletildi [17]. Bu enzim ECM'i hızla yeniden şekillendirmektedir, bu nedenle apoptoz, hücre farklılaşması ve büyümeyi tetikler [74]. Bu keşif, birçok araştırmacıyı insan dokularına bakmaya teşvik etmiş, çünkü kollajenin bozulması yara iyileşmesi, doku rejenerasyonu ve artrit, kanser, ateroskleroz, anevrizma ve doku ülseri gibi hastalıklarda önemlidir.

İnsan genomunun tüm dizilimin tanımlanmasından sonra 28 farklı genin tüm insan MMP'lerini kodladığı saptanmıştır [2]. Daha sonra meyve sinekleri (*Drosophila melanogaster*), nematodlar (*Caenorhabditis elegans*) [3] gibi hem omurgasızlarda, hem de bitkilerde bulunmuştur [2]. Sonraki yıllarda patolojik doku yıkımını içeren hastalıkların birçoğunun MMP anormal üretim veya aktivasyonu ya da doğal matriks metalloproteinaz doku inhibitörlerinin (TIMP) eksikliği ile ilişkili olduğu gösterilerek kabul edilmiştir. Bu algılamalar, ilaç endüstrisinin, 1990'ların sonunda kanser ve artrit gibi hastalıklar için potansiyel tedavi aracı olarak klinik araştırmalara giren sentetik MMP inhibitörlerini (MPI'lar) geliştirmesine yol açmıştır. MPI'ların etkinliğini klinik deneylerde ispatlamadıkları için bu bir hayal kırıklığı olmuş ancak bundan çıkan sonuç, MMP'ların biyolojik rollerinin başlangıçta öngörülenden çok daha karmaşık olmasıydı. MMP, doku yeniden biçimlendirme sırasında ekstrasellüler matriks bozulmasındaki anahtar rolüne ilaveten, hücre sinyal

efektörlerinin biyoaktivitesini kontrol etmek için ECM'in ve hücre ile ilişkili moleküllerin spesifik klivajı ile perisellüler ortamı düzenler [1, 7]. Bununla birlikte, birçok biyokimyasal olayda rol oynayan bu metalloproteinazlara olan ilgi yıllar boyunca azalmamış ve ailenin çeşitli üyeleri üzerinde yapılan kapsamlı yapısal ve işlevsel analizler, onların etki mekanizmalarını daha iyi anlamak ve tasarım için daha akılcı yaklaşımlar sağlamak için temel oluşturmuştur [7].

2.2.3. Moleküler yapı

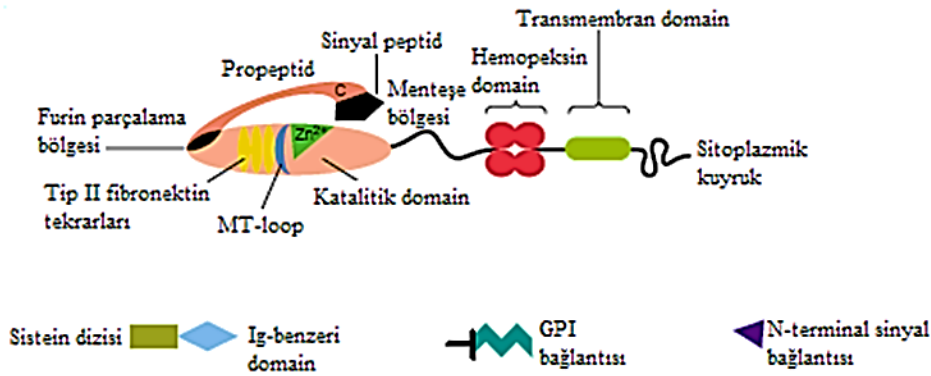
MMP'lar, çinko ve kalsiyum bağımlı endopeptidazların bir ailesi olup, katalitik bölgede bir Zn^{+2} iyonunu bağlayan üç histidin kalıntısı ile karakterizedir [1]. MMP genel yapısının 3 boyutlu görüntüsü [19] şekil 2.1'de gösterilmiştir. Tüm MMP'ların fibroblast kollajenaz (collagenase-1) veya MMP-1 ile katalitik alan dizi benzerliği aile üyeliği için bir kriterdir. MEROPS veritabanı (<http://www.merops.sanger.ac.uk>) Metallopeptidazlardan MMP'ları ya da matriksinleri metzincin de denen M10 alt familyasına ait olarak sınıflandırır [3]. Birçok grup çalışması ile kollajenazın üçlü sarmalı C terminal uçtan dörtte biri kadar mesafede ki bir noktasından kestiği ve faaliyetlerinin metal bağımlı olduğunu göstermiştir [18].



Şekil 2.1. MMP genel yapısının 3 boyutlu görüntüsü [19]

MMP'lar M10 çinko metalloproteinaz ailesine aittir. Tüm MMP'lar katalitik alanlarında karakteristik çinko bağlama motifi HExxHxxGxxH'ye sahiptir. Bütün MMP'lar benzer alan

organizasyonlarına sahiptir. Genel olarak MMP'lar, bir sinyal peptit bölgesi ve bunu takip eden N-terminal prodomain (propeptit), katalitik (CAT) domain alanı olmak üzere üç ana bölgeden oluşur. Tüm MMP'larda olmasa da linker (menteşe) bölgesi ve C-terminal hemopeksin benzeri (HPX), Furin benzeri enzim tanıma bölgesi, Fibronektin tip II benzeri 3 tekrar bölgesi gibi yapısal alanlar içerirler. Membran tipi (MT) MMP'lar ise bunları hücre zarına bağlayan ek bir transmembran (TM) alanı içerir. TM alanını küçük bir sitoplazmik "kuyruk" takip eder [7]. MMP'ların genel domain yapısı şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. MMP genel domain yapısı [14]

MMP'ların yapısı incelendiğinde bu proteinlerin birkaç farklı bölgeden oluştuğu görülür:

1. Predomain (Sinyal peptit)
2. Prodomain (Propeptit)
3. Katalitik domain
4. Mentşe bölgesi (Prolinden zengin bölge, linker)
5. Hemopeksin benzeri bölge
6. Furin benzeri enzim tanıma bölgesi
7. Fibronektin tip II benzeri 3 tekrar bölgesi
8. Transmembran bölge

1. Predomain: Genel domain yapısında ilk bölge predomain alanıdır. N-terminal sinyal dizisi veya "Pre" alan da denir [20]. (Bu kısım enzimi salgılama için işaretler ve ardından salgılanma sırasında yapıdan uzaklaştırılır.) Latent enzimde bulunmayan sinyal peptid dizesidir. 80-90 aminoasit içeren aminoterminal propeptiddir [8]. Sinyal peptit içeren bu kısım endoplazmik retikulumdan ilk sentezlenen proteindir [21].

2. Prodomain: Predomain bölgeden sonra gelir. Propeptit bölge de denir. Tüm MMP'lar enzim aktivasyonu sırasında çıkarılıncaya kadar enzim gecikmesini sağlayan propeptid alanına sahiptir. Enzimin kalıcı formda kalmasından sorumlu olup enzimin aktive olmasının ardından ortamdan uzaklaştırılırlar. Yüksek derecede korunmuş PRCGVDPV dizesi içerir [20]. Prodomain yapısında bulunan sistein rezidülerinin enzimin latent formunun korunmasında rol aldığına inanılır. Prodomainin çıkarılması inaktif proenzimin aktif forma dönüşmesini sağlar [8]. Bunu katalitik çinko bağlayan bölge ile etkileşerek enzimin inaktif formda kalmasını sağlayarak yapar [21]. Yaklaşık 66-120 aminoasitlik bir kısımdır [7].

3. Katalitik domain: Propeptit bölgenin ayrılması ile yapısındaki çinko iyonları sayesinde enzim aktivitesini sağlayan bölgedir [21]. Katalitik bölge histidin rezidüleri içerir ve fonksiyonel stabilitenin korunmasında rolü olan bölgedir [8]. Yaklaşık 160 aminoasitlik bir kısımdır. Katalitik domain ek olarak 2- 3 Ca^{++} iyonu içerir. Bu bölge stabilite ve enzimatik etkinliğin oluşması için gereklidir [16]. Katalitik Bölge 180 aminoasitten oluşmaktadır. İçerdiği histidin rezidüleri çinko (Zn^{+2}) iyonu için 3 ayrı bağlanma bölgesini oluşturmaktadır. İnaktif MMP'larda bulunan propeptid bölgesindeki sistein rezidüsü ise çinko iyonu için dördüncü bir bağlanma bölgesidir. Katalitik bölge 3 alfa heliksinden ve bükülmüş 5 iplikli beta tabakadan oluşmuştur [22]. Katalitik bölge aynı zamanda çinko-bağlayıcı bölüm ve korunmuş metiyonin aminoasiti içerir. Bu bölge, MMP'ların stabilitesini ve enzimatik aktivitesini korumak için katalitik çinko atomuna ek olarak yapısal çinko atomu ve 1 ya da 3 tane kalsiyum atomu içerir [23].

Bu bölgelerin yanında bazı MMP'larda bulunmayan bölgelerde vardır:

4. Prolinden zengin bölge (Menteşe) : Katalitik bölge ve Hemopeksin benzeri bölge arasında yer alır. Yaklaşık 5-10 aminoasitlik bir bölgedir. Mentşe bölgesi, farklı MMPlar arasında uzunluk ve kompozisyonda değişiklik gösterebilir. Substrat özgüllüğünün tanımlanmasında bir rol oynadığı düşünülmektedir [20].

5. Hemopeksin benzeri bölge: Yaklaşık 210 aminoasitlik bir alana sahiptir [7]. (Hemopeksin: Kandaki serbest hem ve methemi bağlayarak böbrekten demir atılımını önleyen biyomolekül. Hemoliz takibinde kullanılır. Glikoprotein yapıdadır.) Hem bağlayan moleküllere dizin benzerliği nedeniyle hemopeksin benzeri bölge olarak adlandırılmıştır. Bu bölge N ve C terminal uçları bağlayan disülfid bağı içerir ve katalitik bölgeye prolinden

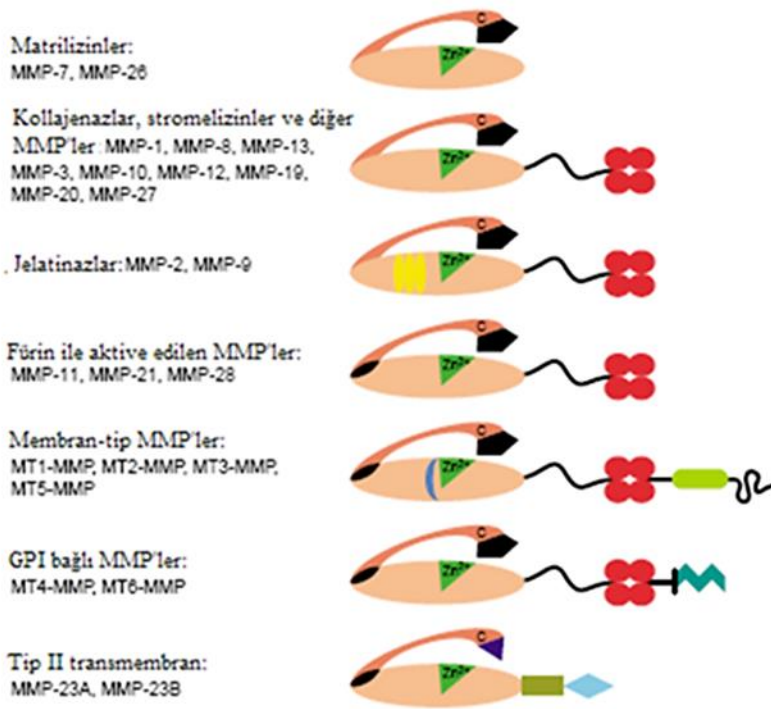
zengin bir bölge sayesinde bağlanır. Bu bölgenin fonksiyonu net olarak bilinmemekle birlikte substrat spesifitesini sağlama ya da plazminojen aktivatör ürokinaz sistemine analog olma özelliği ile hücre yüzey reseptör alanını tanıma fonksiyonu gösterdiği ileri sürülmektedir. Substrata bağlanma ve TIMP ile etkileşime girmede fonksiyonel rolü vardır [8, 20]. C-terminal hemopeksin benzeri alan, sözde dört katlı simetriye sahip bir β -pervane yapısına sahiptir ve hem substrat bağlama hem de metalloproteinazların doku önleyicileri (TIMP) ile etkileşime girer [1].

6. Furin benzeri enzim tanıma bölgesi: Propeptid ile katalitik domain arasında yer alır. Yaklaşık 10 aminoasitlik bir alandır. MMP-11, -21, -23, -28 ve MT-MMP'lar bu sekansa sahiptir [8, 18]. Bu bölge proenzimlerin intrasellüler aktivasyonundan sorumludur [24]. Bunlardan MMP-11, -21, -28 Furin ile aktive edilirler [10].

7. Fibronektin tip II benzeri 3 tekrar bölgesi: Katalitik bölge üzerinde yer alır. Denatüre edilmiş tip IV ve V kolajenleri, elastin ve tip I kollajeni bağladığı ve dolayısıyla substrat özgüllüğüne katkıda bulunduğu gösterilmiştir [1, 21]. Gelatinaz A ve B'de (MMP-2 ve -9) bulunurlar [8].

8. Transmembran bölge: MT-MMP'lar böyle bir bölge içermektedirler. MT-MMP'lar hücre yüzeyine bu transmembran bölge ile veya glikozilfosfatidil inozitol kancası ile bağlanırlar [22]. MT-MMP'lar, hücre zarına tutunma yöntemlerine dayanarak, TM-tipi ve glikosilfosfatidil-inozitol (GPI) tipi olmak üzere iki gruba ayrılabilir. MT1-MMP (MMP-14), MT2-MMP (MMP-15), MT3-MMP (MMP-16) ve MT5-MMP (MMP-24) tip 1 transmembran protein grubundadırlar. Kısa bir sitoplazmik kuyruğa sahiptir. Bu, hücre içi trafiğin ve bu proteazların aktivitesinin düzenlenmesinde yer alır. MT4-MMP (MMP-17) ve MT6-MMP (MMP-25) ise bir GPI aracılı mekanizma ile hücre yüzeyine bağlıdır. TM alanının yapısı tam olarak çözümlenmemesine rağmen, deneysel bir model oluşturulmuştur. TM alanı MT-MMP'ların TIMP'lerle etkileşimde rol alırlar [7].

Farklı domain yapıları MMP'lara farklı özellikler kazandırmıştır. Domain yapılarına göre MMP alt grupları şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Domain yapılarına göre MMP alt grupları [14]

2.2.4. Regülasyon, aktivasyon

MMP'ların işlevlerini yerine getirebilmeleri için proteolitik kırılma ile aktif forma dönüşmeleri gerekmektedir. MMP'ların proteolitik aktiviteleri 3 basamakta düzenlenir. Bunlar transkripsiyon, pro-enzimin aktivasyonu ve enzim aktivitesinin inhibisyonudur.

Transkripsiyonel düzenleme

Matriks Metalloproteinazların ekspresyon düzeyleri sağlıklı yetişkinlerde genel olarak düşüktür. Bu durum farklı fizyolojik ve patolojik durumlara göre değişiklik gösterir. MMP gen ekspresyonu TNF- α , TGF- β , İL-6 İL-1 gibi inflamatuvar sitokinlerle, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi birçok büyüme faktörü ve hormonlar ile uyarılabilir. Dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β), heparin, kortikosteroidler, retinoidler, prostoglandin E₂ (PGE₂) ve diğer eikozanoidler ise MMP gen transkripsiyonunu baskılar. Örneğin TGF- β MMP-2 ve MMP-9'un üretimini uyarırken MMP-1 ve MMP-3'ün üretimini baskılamaktadır [16, 25]. Çeşitli kültürlerde gösterilen kanıtlara göre c-fos ve c-jun metalloproteinaz gen ekspresyonunun önemli regülatörleridir [8].

Proenzimin Aktivasyonu Aşamasında Düzenleme: (proenzim aktivasyonu)

MMP'lar sentez edildikten sonra inaktif proenzim (zimojen) olarak salıverilirler. Latent zimojenlerin uyarılması hücre içinde olabileceği gibi MT-MMP'lar aracılığıyla hücre yüzeyinde, proteazlar veya daha önceden etkinleşmiş MMP'lar yoluyla hücreler arası boşlukta gerçekleşebilir [16]. Aktivasyon propeptid alanının proteolitik olarak uzaklaştırılmasını gerektirir. ProMMP aktivasyonu için ekstraselüler, intraselüler ve periselüler aktivasyon olmak üzere üç yol vardır [10]. Propeptid içeren inaktif MMP'lar otokataliz yoluyla, doku veya plazma proteinazları ile, oportunistik bakteriyel proteinazlar ile, ürokinaz plazminojen aktivatör/plazmin sistemi yoluyla veya diğer MMP'lar ile aktifleşebilirler [21]. MMP enzim aktivitesinin düzenlenmesi şekil 2.4'te gösterilmiştir.

Aktivasyon, sistein ve Zn^{+2} arasındaki etkileşimin bozulmasını gerektirir ve bu durum "sistein anahtarı" olarak anılır [1]. Sistein rezidüsü içerdiği sülfidril grubuyla proMMP'ların aktifleşmesini engellemek için katalitik bölgedeki çinko ile bağlanır. Propeptid bölgesinde bulunan sistein rezidüsü MMP'larının inaktif kalmasında kritik rol oynamaktadır [26]. Sistein anahtarı mekanizmasının tetiklenmesi ile bu etkileşimin kesilmesi enzimin aktivasyonu ile sonuçlanır [23]. Propeptiddeki "sistein anahtarı" motifi PRCGXPD şeklindedir ve MMP-23 hariç tüm MMP'lar bu motifi barındırır. Sistein anahtar dizisi, substrat bağlama yerinde bulunur, ancak bu segmentin yönlendirilmesi peptid substratın zıt yönündedir. Sisteinin SH grubu katalitik çinko iyonu ile etkileşime girer. Aktivasyon üzerine, Cys- Zn^{+2} etkileşimi bozulur ve bir su molekülünün çinko atomuna bağlanmasına izin verilir. MMP'ların propeptid alanları aynı zamanda sentez sırasında proenzimleri katlamakta önemli bir rol oynayabilir [3].

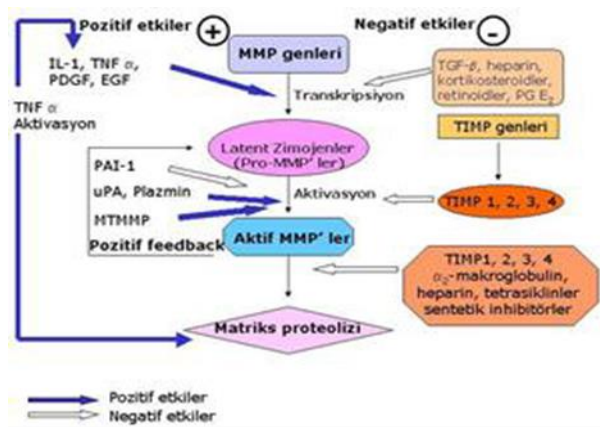
MMP'ların temel fizyolojik aktivatörü plazmindir. Çeşitli hücrelerde (endotel hücresi, monosit-makrofaj, düz kas hücresi) eksprese edilen ürokinaz-tip plazminojen aktivatörü (uPA)'nın aktif formunun plazminojeni plazmine dönüştürdüğü ve oluşan plazminin pro-MMP'ları aktive ettiği kabul edilmektedir [25]. uPA ekspresyonunun steroid hormonlar, hücrel onkojenler, sitokin ve büyüme faktörleri aracılığıyla düzenlendiği gösterilmiştir [27].

MMP'lar zimojen olarak sentezlenir, burada propeptid bölgesinde bulunan korunmuş bir sistein kalıntısı molekülün aktif merkezini kaplar ve aktivitesini engeller. Bu aktif bölgenin

serbest bırakılması, genellikle ek proteolitik enzimler içeren karmaşık bir süreçtir. Dolayısıyla, kendi alanlarında bir protein öncü dönüştürücü sekans içeren ve furin benzeri peptidazlarla aktive olan MMP türleri de vardır [28].

MMP aktivasyonu genellikle kompleks bir proteinaz kaskadının bir sonucudur. MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9 ve MMP-10 da dahil olmak üzere bazı MMP'ların propeptid bölgeleri invitro ortamlarda uPA-plazmin sistemi ve tripsin gibi serin proteinazlar tarafından parçalanabildiği gösterilmiştir. Aktive olan bu MMP'ların bazıları daha sonra diğer proMMP'ları aktif hale getirebilir, örneğin, MMP-3, proMMP-1 ve proMMP-9'u aktive edebilir. MT1-MMP, proMMP-13'ü aktive edebilir ve bu aktif MMP-13, daha sonra MMP-9'u aktive etmeye devam edebilir [1].

Bazı salgılanan MMP'lar için aktivasyon ise bir TIMP'ne bağlı yolakda membran tipi MMP'lar ile proteolitik bölünmeyi takiben hücre yüzeyinde gerçekleşir. Diğer MMP'lar için aktivasyon, plazmin, kallikrein ve triptaz gibi doku proteinazları tarafından başlatılan bir aktivasyon kaskadındaki hücre dışı ortamda oluşur. Bu süreç, proMMP aktivatörleri olarak işlev gören aktive edilmiş MMP'lar tarafından gerçekleştirilir. Membran tip ve salgılanan birkaç MMP, furin ve ilgili hücre içi serin protein öncü dönüştürücü proteinazlar tarafından, hücre yüzeyinde aktive edilir [29].



Şekil 2.4. MMP enzim aktivitesinin düzenlenmesi [25]

MMP Enzim Aktivitesinin inhibisyonu: (aktivite inhibisyonu)

MMP aktivitesinin kontrolünde spesifik doku inhibitörleri olan TIMP'leri anahtar rol oynarlar. Bundan başka α_2 -makroglobulin, heparin, tetrasiklinler ve sentetik inhibitörler de

aktif MMP inhibitörleri arasında yer alırlar [27]. TIMP'leri bağ dokusunun düzenlenmesinde rol alan temel proteinlerdir. Pek çok vücut dokusu ve sıvılarında bulunurlar. MMP'lara geri dönüşümsüz ve non-kovalent biçimde bağlanarak latent enzim formunun aktivasyonunu ve katalitik aktivitenin sürdürülmesini de inhibe ederler [25].

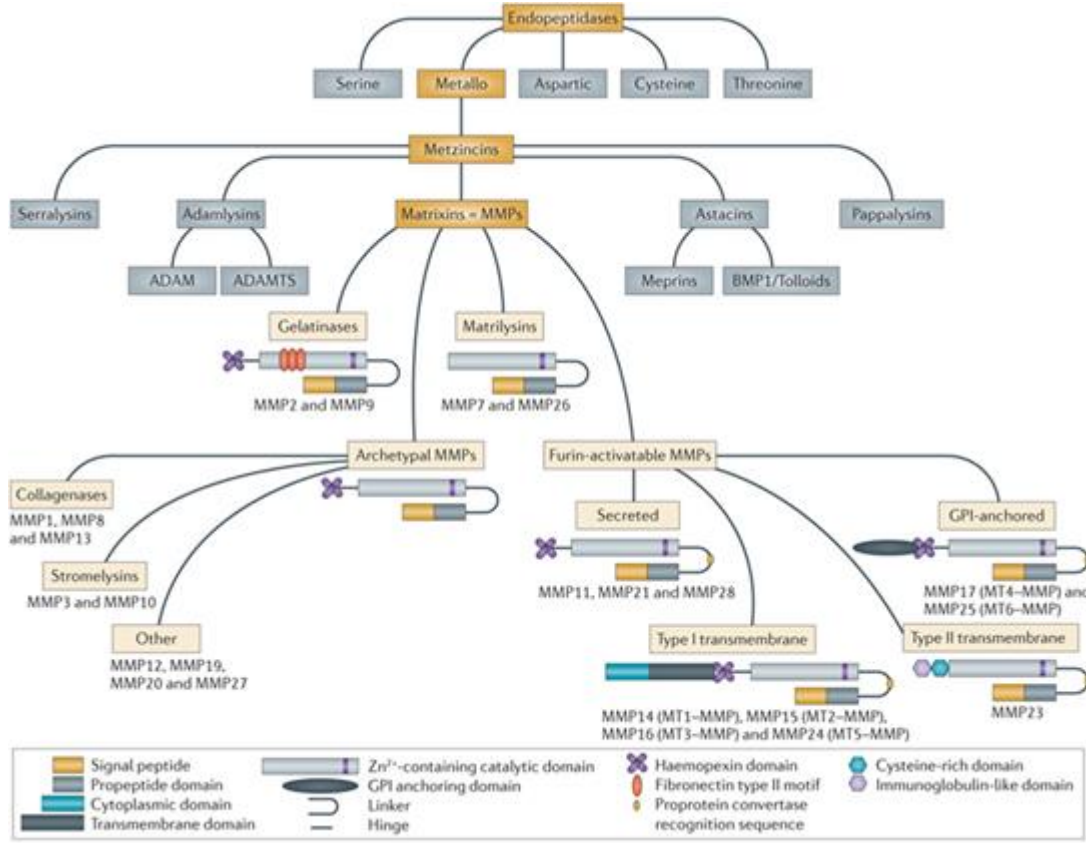
İnsanlarda ifade şekilleri ve MMP özgüllükleri bakımından farklı olan dört çeşit TIMP vardır. Buna ek olarak, TIMP'lere yapısal benzerlik gösteren ve MMP inhibitörleri olarak işlev görmelerini sağlayan alanlar içeren bazı moleküller de inhibisyonda rol almaktadırlar. Bunlar, prokollajen C proteinaz arttırıcı protein (PCPE), Tip IV kollajenin NC1 domaini, geri kazanım indükleyici sistein açısından zengin protein olan kazal motifleri (RECK) ve doku faktörü yolağı inhibitörü-2 (TFPI2) olarak sayılabilir [28].

TIMP'ler genel olarak etkinleşmiş MMP'ların katalitik bölgelerine bağlanarak substratına bağlanmalarını önlerler [16].

TIMP'leri, MMP'lar ile koordineli olarak eksprese edilmektedirler. TIMP, aktive olmuş enzimi inhibe etmektedir. Otoaktivasyonu inhibe etmemektedir. Bu durum MMP'ların, TIMP ile inaktive olana kadar etki göstermesini sağlamaktadır. Bu şekilde ekstrasellüler matriks yıkımı kontrol altında tutulmaktadır [22].

2.2.5. Sınıflandırma

ECM bileşenleri proteinazlar tarafından parçalanırlar. Proteinazlar, katalitik mekanizmaya göre aspartik proteinazlar, sistein proteinazlar, serin proteinazlar ve metaloproteinazlar olmak üzere dört başlıkta sınıflandırılabilirler [10]. MMP süperailisine ait sınıflandırma şekil 2.5'te gösterilmektedir.



Şekil 2.5. MMP süperailesine ait sınıflandırma [15]

Metalloproteinazların farklı kişiler tarafından keşfi oldukça karışık bir adlandırma sistemine neden olmuş ve bu nedenle MMP ailesinin üyelerinin herbiri birden fazla isimle adlandırılmıştır. Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği spesifik enzim numaraları ve basit isimler vermeyi önermiştir [8]. İnsan genom ve biyoinformatik dizilim çalışmaları MMP'ların bu yeni sınıflandırılmasına olanak sağlamıştır. Proteazları kodlayan genler tarafından kodlanan 23 MMP vardır. Buna ek olarak MMP-16, MMP-19, MMP-21, MMP-23 ve MMP-28'in beş tane daha ek kısa izoformu ve katalitik olarak inaktif MMP-1 benzeri MMP vardır [7].

MMP'ler için farklı özellikleri ele alınarak farklı sınıflandırmalar yapılmıştır.

MMP'ler için, substrat tercihlerine göre olan sınıflandırmalar ilk keşfinden beri yaygın olarak kullanılmıştır. Kollajenazlar, jelatinazlar, stromelisinler ve matrilisinler bu dört en önemli grubu oluşturmaktadır [7].

MMP katalitik alanlarının yüksek sekans benzerliği ile ele alındığında bugüne kadar en az 25 farklı omurgalı MMP karakterize edilmiştir. MMP-23 için iki özdeş form içeren, iki ayrı gen tarafından kodlanan, yani MMP23A ve MMP23B de dahil olmak üzere, insanlarda 24 farklı MMP bulunur [30].

MMP'lar, substrat özgüllüğü, primer yapı ve hücrel lokalizasyona göre en az beş ana gruba ayrılabilir. Bunları kollajenazlar, jelatinazlar, stromelisinler, matrilisinler ve MT-MMP'lar şeklinde sayabiliriz. Bununla birlikte, makrofaj elastaz (MMP-12), stromelisin-3 (MMP-11), MMP-19, enamelisin (MMP-20), CA-MMP (MMP-23) ve epilis (MMP- 28) bu kategorilerin hiçbirine uymamaktadır. Buna ek olarak, kollajenolitik aktivite gösteren ve membrana bağlı olan MT1-MMP (MMP-14) ise birden fazla gruba dahil edilebilir [31].

MMP'ları substrat tanıma ve bölme mekanizmasına göre de altı kategoriye ayrırabiliriz. Kollajenazlar, stromelisinler, matrilisinler, jelatinazlar, membrana bağlı MMP'lar ve grup belirtimi olmayan MMP'lar. X-ışını kristalografisi ve nükleer manyetik rezonans (NMR) çalışmaları birçok MMP'ın yapısını belirlemeyi mümkün hale getirmiştir [2].

Başka bir çalışmada 24 insan ve 23 fare geni tarafından kodlandığı belirtilen MMP'lar, kollajenazlar, stromelisinler, jelatinazlar ve membran tipi MMP'lar (MT-MMP) olmak üzere domain yapılarına göre dört ana başlıkta sınıflandırılmıştır [32].

İnsan MMP ailesi domain yapıları tarafından sağlanan biyokimyasal özelliklere ve bunların substrat özgüllüğüne dayanarak iki ana alt gruba ayrılır. Bunlar salgılanan tip MMP'lar ve membrana bağlanmış MMP'lar. MMP-4, 5 ve 6, bilinen diğer MMP'lar ile (yani MMP2 ve 3) özdeş oldukları için listeden çıkarılmıştır. MMP18 ve 22 de eksiktir. Çünkü bunlar *Xenopus* kollajenaz-4 ve tavuk MMP'ı olarak tanımlanmışlardır [10].

MMP ailesinin üyeleri, başlangıçta, tercih edilen substrat özgüllükleri, örneğin kollajenazlar, jelatinazlar, stromelisinler ve matrilisinler gibi sınırlı bilgiye dayanan tanımlayıcı isimlerle tanımlandı. Fakat zaman içinde yapılan çalışmalar ve yeni keşfedilen MMP'lar ile substrat özgüllüğü türüne dayalı adların yetersiz olduğu ortaya konuldu. Eski çalışmalarda gösterilmiş olan bazı MMP'lar (MMP4, MMP5 ve MMP6) listeden çıkarıldı, çünkü daha ileri çalışmalar, bu gen ürünlerinin mevcut olmadığını veya daha önceden açıklanan üyelerle aynı olduğunu gösterdi. MMP'ların nasıl gruplandırılması gerektiği konusunda fikir birliği

çok olmasa da bu alanda çalışan farklı uzmanlar, genel olarak bunları yapısal benzerlikleri, substrat özgüllüğü veya doku ekspresyonuna göre sınıflandırır [33]. MMP türlerine ait sınıflandırma çizelde 2.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. MMP türlerine ait sınıflandırma [2, 19, 30]

	MMP no	Sınıfı	Proteaz ismi	EC no	Kromozom lokasyonu	MA latent	MA aktif
1	MMP-1	Kollajenazlar	Kollojenaz-1 (intersitisyel kollojenaz)	EC3.4.24.7	11q22-q23	55	45
2	MMP-2	Jelatinazlar	Jelatinaz A (72 kDa jelatinaz)	EC3.4.24.24	16q13	72	66
3	MMP-3	Stromelisinler	Stromelisin-1	EC3.4.24.17	11q23	57	45
4	MMP-7	Matrilisinler	Matrilisin-1 (PUMP-1)	EC3.4.24.23	11q21-q22	28	19
5	MMP-8	Kollajenazlar	Kollojenaz-2 (nötrofil kollojenaz)	EC3.4.24.34	11q21-q22	75	58
6	MMP-9	Jelatinazlar	Jelatinaz-B (92 kDa jelatinaz)	EC3.4.24.35	20q11.2-q13.1	92	86
7	MMP-10	Stromelisinler	Stromelizin-2	EC3.4.2.22	11q22.3-q23	57	44
8	MMP-11	Stromelisinler	Stromelizin-3	-	22q11.2	51	44
9	MMP-12	Diğer enzimler	Metalloelastaz (makrofaj elastaz)	EC3.4.24.65	11q22.2-q22.3	54	45/22
10	MMP-13	Kollajenazlar	Kollojenaz-3	13 EC 3.4.24.B4 (Önceden BRENDA tarafından verilmiş olan numara)	11q22.3	60	48
11	MMP-14	MT-MMP	MT-1MMP	- EC 3.4.24.80	14q11-q12	66	56
12	MMP-15	MT-MMP	MT-2MMP	-	16q12.2-q21	72	60
13	MMP-16	MT-MMP	MT-3MMP	-	8q21	64	52
14	MMP-17	MT-MMP	MT-4MMP	-	12q24	57	53
15	MMP-18	Kollajenazlar	Kollojenaz-4 (Xenopus collagenase)	-	-	55	42
16	MMP-19	Diğer enzimler	RASI 1	-	12q14	54	45
17	MMP-20	Diğer enzimler	enamelisin	-	11q22.3	54	22
18	MMP-21	Diğer enzimler	1.kromozomda tanımlı MMP (XMMP (xenopus))	-	1p36.3	70	53
19	MMP-22 (27)	Diğer enzimler	1.kromozomda tanımlı MMP (CMMP (chicken))	-	1p36.3	52	43
20	MMP-23	Diğer enzimler	İnsan over cDNA’ında (CA-MMP)	-	-		
21	MMP-24	MT-MMP	MT-5MMP	-	20q11.2	63	45
22	MMP-25	MT-MMP	MT-6MMP (lökolin)	-	16p13.3		56
23	MMP-26	Matrilisinler	Matrilizin-2 (endometaz)	-	11p15	28	
24	MMP-28	Diğer enzimler	Epilisin	-	17q11.2	59 (55)	
25	MMP-29		İsmlendirilmemiş				

2.2.6. Substratları

MMP'lar birçok ekstrasellüler matriks komponentlerini yıkıma uğratabilmektedirler. Bazen bu matriks komponentleri MMP türlerine göre değişiklik gösterebilir. MMP türlerine göre substratlarının listesi çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. MMP türlerine göre substratlarının listesi [2, 19, 30]

MMP no	Sınıfı	Proteaz ismi	Substratlar
MMP-1	Kollajenazlar	Kollojenaz-1 (intersitisyel kollojenaz)	Kollajen (I-III, VII, VIII ve X), jelatin, agrekan, L-selektin, IL-1 β , proteoglikanlar, entaktin, ovostatin, MMP-2, MMP-9
MMP-2	Jelatinazlar	Jelatinaz A (72 kDa jelatinaz)	Jelatin, kollajen IV-VI, X, elastin, fibronektin
MMP-3	Stromelisinler	Stromelisin-1	Kollajen (III-V ve IX), jelatin, agrekan, perlekan, dekorin, laminin, elastin, kazein, osteonektin, ovostatin, entaktin, plazminojen, MBP, IL-1 β , MMP-2/TIMP-2, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-13
MMP-7	Matrilisinler	Matrilisin-1 (PUMP-1)	Kollajen (IV, X), jelatin, agrekan, dekorin, fibronektin, laminin, elastin, kazein, transferrin, plazminojen, MBP, β 4-integrin, MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-9/TIMP-1
MMP-8	Kollajenazlar	Kollojenaz-2 (nötrofil kollojenaz)	Kollajen (I-III, V, VII, VIII ve X), jelatin, agrekan, fibronektin
MMP-9	Jelatinazlar	Jelatinaz-B (92 kDa jelatinaz)	Kollajen (IV, V, VII, X ve XIV), jelatin, entaktin, agrekan, elastin, fibronektin, osteonektin, plazminojen, MBP, IL-1 β
MMP-10	Stromelisinler	Stromelizin-2	Kollajen (III-V), jelatin, kazein, agrekan, elastin, MMP-1, MMP-8
MMP-11	Stromelisinler	Stromelizin-3	Bilinmiyor (kazein)
MMP-12	Diğer enzimler	Metalloelastaz (makrofaj elastaz)	Kollajen IV, jelatin, elastin, kazein, fibronektin, vitronektin, laminin, entaktin, MBP, fibrinojen, fibrin, plazminojen
MMP-13	Kollajenazlar	Kollojenaz-3	Kollajen (I-IV, IX, X ve XIV), jelatin, plazminojen, agrekan, perlekan, fibronektin, osteonektin, MMP-9
MMP-14	MT-MMP	MT-1MMP	Kollajen (I-III), jelatin, kazein, fibronektin, laminin, vitronektin, entaktin, proteoglikanlar, MMP-2, MMP-13
MMP-15	MT-MMP	MT-2MMP	Fibronektin, entaktin, laminin, agrekan, perlekan; MMP-2
MMP-16	MT-MMP	MT-3MMP	Kollajen III, jelatin, kazein, fibronektin, MMP-2
MMP-17	MT-MMP	MT-4MMP	-
MMP-18	Kollajenazlar	Kollojenaz-4 (Xenopus collagenase)	Tip 1 kollajen
MMP-19	Diğer enzimler	RASI 1	Tip 1 kollajen
MMP-20	Diğer enzimler	enamelisin	Amelojenin, agrekan, COMP
MMP-21	Diğer enzimler	1.kromozomda tanımlı MMP (XMMP (xenopus))	-
MMP-22 (27)	Diğer enzimler	1.kromozomda tanımlı MMP (CMMP (chicken))	-
MMP-23	Diğer enzimler	İnsan over cDNA"sında (CA-MMP)	-
MMP-24	MT-MMP	MT-5MMP	Fibronektin, kollajen tip 1 ya da laminin yok
MMP-25	MT-MMP	MT-6MMP (lökolin)	Projelatinaz A
MMP-26	Matrilisinler	Matrilizin-2 (endometaz)	Kollajen IV, fibronektin, fibrinojen, jelatin, α (1)-proteinaz inhibitör
MMP-28	Diğer enzimler	Epilisin	-
MMP-29		İsimlendirilmemiş	-

2.2.7. İnhibitörleri

ECM'de MMP'ları inhibe eden faktörlerin başında genel proteinaz inhibitörü olarak bilinen ve yüksek molekül ağırlığı nedeni ile dokulara girmesi zor olan α_2 -makroglobulin gelir. Bir diğer inhibitör ise antikollajenaz aktiviteye sahip olan serum C-reaktif proteindir. Bunların yanında MMP'a spesifik bazı doku inhibitörleri (TIMP) tanımlanmıştır. İn vivo koşullarda yapılan çalışmalarda MMP aktivasyonunun regülasyonunda TIMP'lerinin önemli rol oynadığı gösterilmiştir. TIMP aktivitesi için yapının bütünlüğünün bozulmamış olması gereklidir. Yapının bozulması ile aktivitesi ortadan kalkar [8].

TIMP'leri dokudaki MMP'ların majör endojen regülatörüdür. Bu proteinlerin moleküler ağırlıkları yaklaşık 21-30 kDa aralığındadır. MMP'lara irreversibl ve non-kovalent biçimde bağlanarak latent olarak salgılanan enzimin aktivasyonunu ve bu katalitik aktivitenin sürdürülmesini inhibe ederler. MMP-TIMP oluşumları substrat bölünme bağlanma bölgelerini bloke ederek etkisini gösterirler. Böylece TIMP'leri MMP enzim aktivitesini ve MMP/TIMP dengesini sıkı kontrol altında tutarlar. İnsanlarda TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 ve TIMP-4 olmak üzere tanımlanmış homolog 4 tip TIMP bulunmaktadır. TIMP'leri de MMP'lar gibi vasküler düz kas hücreleri, endotel hücreleri, kan hücreleri, bağ dokusu hücreleri ve makrofajlar tarafından sentez edilirler. TIMP'leri arasında MMP aktivitesini inhibe etme yönünden benzerlik olmasına rağmen matriksteki lokalizasyonları ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi yönünden farklar vardır. Ayrıca değişik MMP türlerine göre de özgülük gösterirler. Örneğin; Jelatinaz A (MMP-2) tercihen TIMP-2 ile Jelatinaz B (MMP-9) ise TIMP-1 ile inhibe edilirler [2, 27].

2.2.8. Analiz yöntemleri

MMP moleküler yapısı oldukça komplekstir. Moleküler yapısını ve katıldığı proteolitik süreçleri ayrıntılı olarak incelemek için gen düzeyinde çalışmalar, invitro hücre kültürü çalışmaları, transgenik fare modelleri ve proteomik profillemeye teknikleri de dahil olmak üzere geniş bir yaklaşım gereklidir. Degradasyon, genomik ve proteomik teknikler kullanarak bir organizmada bulunan tüm proteazların, inhibitörlerin ve proteaz substratlarının karakterizasyonu MMP substrat tanımlaması için iyi bilinen bir yöntemdir [7].

MMP'ların kalitatif, kantitatif ölçümleri ve bu ölçümlerin takipleri önemlidir. Analiz için birçok yöntem kullanılabilir. Elektroforez, PCR, RT-PCR, İn situ Hibridizasyon, Zimografi, Western Blot, ELİSA, immünohistokimyasal yöntemler, x ışını kristalografisi, NMR spektrofotometresi, kromatografik yöntemler gibi [17]. Biz bu çalışmada ELİSA ve kromatografik yöntemlerden HPLC yi kullandık.

2.2.9. Hastalıklarla ilişkileri

İnflamasyon ve immün yanıtta MMP

MMP'ların anti-ve proenflamatuar yollarda düzenleyici enzimler olarak rol aldığı birçok çalışmada gösterilmiştir. MMP'lar mitojenle aktive protein kinaz (MAPK) sinyal iletim yolu ve Nükleer faktör-kappa B (NF-KB) aktivasyonu gibi immün yanıt reaksiyonlarında rol oynamaktadır [19].

Anjiyogenezde MMP

Anjiyogenez, mevcut olan küçük damarlardan yeni kan damarlarının olduğu karmaşık bir süreçtir. Bu süreç endotel hücreleri, bu damarlarda bulunan perisit denen perivasküler hücreler, düz kas hücreleri, ECM ve anjiyojenik sitokinler/büyüme faktörleri arasındaki çoklu etkileşimleri içerir. MMP'lar, sadece endotel hücrelerinin ayrışmasına ve yeni dokulara geçmesine izin vererek, aynı zamanda, ECM bağlı proanjiyojenik faktörleri bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) salgılamak, bazal membranı ve diğer ECM bileşenlerini parçalayarak sürece katkıda bulunurlar [19].

Cilt ve mukozal lezyonlarda MMP

MMP'ların rolü, Liken Planus (LP), Diskoid Lupus Eritematozus (DLE), Psoriasis, Pemfigus ve Pemfigoid gibi mukozal yüzeyleri de içine alabilen bir dizi cilt rahatsızlıklarında araştırılmıştır. Çeşitli çalışmalar, MMP'ların inflamatuvar yanıtta aracılık ettiğini ve dermal yıkımı sağladığını göstermiştir [19].

Embriyogenez ve Üremede MMP

Üremede yer alan; ovulasyon, implantasyon, gestasyon, parturisyon, laktasyon ve involusyonu içeren pekçok süreç TIMP ve MMP aktivitesine gereksinim gösterir [8].

Merkezi Sinir Sistemi ve MMP

Günümüzde MMP'ların çok sayıda çözünür molekülleri ve hücre yüzeyi reseptörlerini de hedef aldığı bilinmektedir. Bunların arasında, birçoğu kan beyin bariyeri fonksiyonu, hücre sağkalımı ve/veya sinaptik stabilitede rol oynayan belirli hücre-hücre adezyon molekülleri de bulunmaktadır. MMP'lar ayrıca merkezi sinir sistemi hücreleri (CNS) üzerinde etkili olan çeşitli trofik faktörler ile de etkileşim içindedir. Böylece, bu enzimlerin beyin gelişiminde ve hastalıkta kritik rol oynadığı kolayca düşünülebilir [1].

Kanser ve Matriks Metalloproteinazlar

MMP ekspresyonu ve aktivitesi, hemen hemen her insan kanserinde artar ve bu durum ilerlemiş tümör evresi, artmış yayılım, metastaz ve kısalmış sağ kalım ile korele olur. MMP'ların hem tümör hücreleri tarafından, hem de çevreleyen stromal hücreler tarafından erken ekspresyonu, birincil tümörün oluşturulması için uygun bir mikro ortam sağlamaktadır. MMP'lar ECM'i yeniden şekillendirmeye ve ECM'in ve/veya membrana bağlı büyüme faktörlerini serbest bırakmaya yardımcı olur [19].

MMP'ların fazla ekspresyonu genellikle daha agresif tümör davranışı ve zayıf bir prognoz ile korelasyon gösterir. Çeşitli çalışmalarda bazı MMP'ların, tümör invazyonu, metastaz ve anjiyogenez sırasında anahtar agonistler gibi davrandığı gösterilmiştir [20]. Örneğin, özellikle MMP-2 ve MMP-9 gibi MMP'ların çeşitli tümörlerde aşırı eksprese edildiği gösterilmiştir ve bu aşırı ekspresyon, tümör saldırganlığı, evre ve prognoz ile doğrudan ilişkilidir [7].

Ekstraselüler matriksin MMP'lar tarafından parçalanması sadece metastazı kolaylaştırmakla kalmaz, aynı zamanda ekstraselüler matrikste bulunan ve hücre dışı matriks bozulması sırasında serbest bırakılan büyüme faktörlerinin etkileşimini arttırarak tümör büyümesini de arttırır. MMP ekspresyonu, çoğu normal dokuda düşük veya saptanamamış olmasına rağmen malign tümörlerin çoğunda önemli ölçüde artmaktadır [34].

Akciğer ve MMP

MMP'lar akciğer organogenezisinde kritik rol oynamaktadır. Akciğerlerin iltihaplı hastalıklarında ortaya çıkan MMP'ların aktivasyonu ile ilgili çalışmalar artmıştır. MMP ailesinin tüm üyeleri akciğer dokusunda bulunmasa da, çoğunun bu hastalıkların akut ve kronik evreleri boyunca miktarlarının arttığı gözlenmiştir. Ayrıca, akciğerdeki potansiyel MMP hedefleri genel olarak hücre dışı matristeki tüm yapısal proteinleri, hücre adezyon moleküllerini, büyüme faktörleri, sitokinleri ve kemokinleri içerir. Bununla birlikte, *in vivo* ortamlarda bu substratların modüle edilmesinde ki MMP'ların rolü hala tam olarak açıklanamamıştır. MMP'ları inhibisyonu, çeşitli inflamatuvar akciğer koşullarında terapötik bir seçenek olarak önerilirken, bunları mantıklı olarak terapötik hedef olarak görmeden önce bu kompleks enzimlerin biyolojisinin tam olarak anlaşılmasına yönelik çalışmaların artması gerekmektedir [33].

Artrit ve MMP

ECM bileşenlerinin proteinazlar tarafından aşırı derecede bozunması birçok patolojik koşulda doku yıkımına neden olur. Romatoid artrit ve osteoartritte, yeterli endojen inhibitör olmadığında ECM'i parçalayan proteinazlar yükselir. Bu proteinazlar ve inhibitörler arasındaki bir dengesizlik durumunda eklem kıkırdığı ve kemiğin tahrip edilmesi durumu söz konusudur. İşte MMP'ların burada merkezi bir rol oynadığı düşünülmektedir [10].

Sinovyal eklemleri içeren kıkırdak, tendon ve kemiğin geri döndürülemez tahribatı hem romatoid artrit (RA) hem de osteoartritin (OA) temel özelliklerinden biridir. Kıkırdak proteoglikan ve tip II kollajenden meydana gelirken tendon ve kemik esas olarak tip I kollajenden oluşur. RA, çok sayıda eklemden hasar oluşturan otoimmün bir hastalıktır. Bunun aksine, OA genellikle az görülen kronik aşırı kullanımdan veya yaralanmadan kaynaklanan az sayıda eklemden hasar oluşturur. Her iki hastalıkta da, interleukin-1 beta (İL-1 β) ve tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) gibi inflamatuvar sitokinler, hücre dışı matriksin tüm bileşenlerini bozabilen enzimler olan matriks metalloproteinazların üretimini uyarır. Kollajenazlar, MMP-1 ve MMP-13, RA ve OA'da baskın roller oynamaktadır. Çünkü bunlar kollajen yıkımı sürecinde hız sınırlayıcıdır. MMP-1 öncelikli olarak sinovyal eklem hücreleri tarafından üretilirken MMP-13 kıkırdakta bulunan kondrositler tarafından üretilir. MMP-13, kollajene ilaveten, agrega proteoglikan molekülünü de parçalayarak matriks

yıkımında ikili bir rol üstlenir. Artritte MMP-2, MMP-3 ve MMP-9 gibi diğer MMP'ların ekspresyonu da artar ve bu enzimler eklemlerin kollajen olmayan matriks bileşenlerini de indirgemektedir [35]. Yapılan çalışmalarda insan OA kıkırdağında MMP-1, MMP-3, MMP-9 ve MMP-13 gibi bazı MMP'lar için haberci RNA (mRNA) tespit edilmiştir [36].

Artritlik eklemlerin kıkırdağı ve kemikte ortaya çıkan yıkıcı olaylardaki matriks metalloproteinazların rolü uzun zamandır araştırılmakta ve potansiyel terapötik maddeler olarak proteinaz inhibitörlerinin geliştirilmesine yönelik girişimler yapılmıştır. Artritlik hastalığı olan hastalardan elde edilen dokularda MMP'ların aşırı ekspresyonu ile ilgili önemli kanıtlar elde edilmiştir [30].

2.3. MMP-13

Matriks metalloproteinazlar, ekstraselüler matriksin stabilitesi için önemlidir. Hem doku homeostazı hem de ECM ortamının restorasyonu ve patolojik durumlarda kritik rolleri vardır. Kıkırdak ve eklem ekstraselüler matriksinin ana bileşeni olan kollajenin yıkım mediyatörü özellikle kollajenazlardır [4].

Kollajenazlar, üçlü sarmal yapıdaki fibriler kollajenlerin bozunmasını katalize eder. Kollajenazların fizyolojik rolü, yara iyileşmesi süreci de dahil olmak üzere ECM'in kollajenaz bileşeninin yeniden şekillendirilmesi olarak tanımlanmıştır. Kollajenazların ayrıca fibrotik organlarda baskın olan kollajenlerin, fibrozun çözülmesinden ve normal ECM ortamının düzenlenmesinden sorumlu olan ana proteazlar olduğuna inanılmaktadır [7].

Üç tip kollajenaz vardır; Kollajenaz 1 (MMP-1, interstisyel kollajenaz), kollajenaz 2 (MMP-8, nötrofil kollajenaz) ve kollajenaz 3 (MMP-13) olarak adlandırılır. Bunlara daha sonra keşfedilmiş olan kollajenaz 4 (MMP-18, *Xenopus* collagenase) eklenmiştir. Bu MMP'lar, fibriler kollajenler I, II ve III'ün üçlü sarmal bölgesini kolayca parçalamaktadır [20]. Bunların domain yapıları propeptid, katalitik ve hemopeksin alanlarından oluşur. Fibriler kollajen tip I, II ve III'ü karakteristik 3/4 ve 1/4 oranlarında fragmanlarına ayırmada önemli bir rol oynarlar. Bunun yanında diğer ECM moleküllerine ve çözünür proteinlere karşı aktiviteleri de vardır [3].

MMP-13 (kollajenaz-3) tanımlanmış olan MMP'ların kollajenaz alt ailesinin üçüncü üyesidir ve diğer kollajenazlar MMP-1 (interstisyel kollajenaz) ve MMP-8 (nötrofil kollajenaz) ile karşılaştırıldığında belirgin özelliklere sahiptir. MMP-13 ilk olarak cDNA çalışmaları neticesinde göğüs kanserinden klonlandı. Floresans in situ hibridizasyon teknikleri ile de MMP-13 gen kromozom (11q22-23) haritası çıkarıldı [37, 38]. Kollajenaz-3, 60 ve 48 kDa olan latent ve aktif formlara sahiptir [20].

MMP-13 (kollajenaz-3), diğer kollajenaz MMP-1 ve MMP-8'e kıyasla farklı özelliklere sahiptir. MMP-13, jelatin, fibronektin, interlökin-8 ve pro-tümör nekroz faktörü- α gibi çeşitli doğal ve sentetik substratları parçalama kabiliyetine sahiptir. MMP-13, kıkırdığın ve kemik ekstraselüler matriksin ana bileşenini oluşturan kollajenleri ayıran birincil enzimdir. Diğer MMP'larda olduğu gibi, MMP-13'te bir sinyal alanı, bir propeptid alanı, bir katalitik alan ve bir C-terminal hemopeksin benzeri alan bulunur. MMP-13 katalitik alanının yapısını analiz etmek için X-ışını kristal yapısı analizi ve çok boyutlu heteronükleer manyetik rezonans teknikleri kullanılmıştır [39].

MMP-13, MMP aktivasyon kaskadında merkezi bir konuma sahiptir. MMP-13 aktif olmayan bir proenzim olarak üretilir ve N-terminal propeptitin bölünmesiyle aktivasyon çeşitli bileşiklerle gerçekleştirilebilir. Aktivasyon otoproteolitik olabilir, birkaç MMP ile katalize edilebilir veya aminofenilmerkürük asetat (APMA, in vitro proMMP-13'ü etkinleştirmek için kullanılır) tarafından katalize edilebilir. MMP-13, matriks metaloproteinazların doku inhibitörleri tarafından inhibe edilir [37].

Kollajen, bağ dokusunun stabilize edilmesi ve insan vücudunun yapısal bütünlüğünün korunması için hayati önem taşımaktadır. Kollajen doğal bozulması, embriyogenezis ve kemik remodelingi gibi fizyolojik süreçler için kritik önem taşır. Öte yandan, kollajen üçlü sarmal yapısının hidrolizi (kolajenoliz), tümör hücresi yayılımı (metastaz), artrit, glomerülonefrit, periodontal hastalık ve doku ülseri gibi çeşitli patolojilere neden olabilir. Kıkırdak ekstraselüler matriksin temel bileşenleri tip II kollajen ve aggregandır. Yapılan çalışmalarda Matriks metalloproteinaz 13 (MMP-13), osteoartrit (OA) sırasında kıkırdakta kollajen parçalanmasından sorumlu proteinaz olarak ilişkilendirilmiştir [40].

MMP-13 eklem kıkırdığında tercihen kolajen tip II'nin üçlü sarmalını hedef alır ve proteolize uğratar. Ardından salınan monomer fragmanları daha sonra jelatinaz MMP-2 ve

MMP-9 tarafından bozunur. MMP-13'ün inhibitörlerinden olan TIMP'lerin arasında TIMP-3, en etkili inhibitör olarak bildirilmiştir ve MMP-2 ve MMP-9'u da inhibe edebilir [41].

Kıkırdak oluşumunda ve eklem hastalıklarında kondrositler ve sinoviyal hücrelerdeki MMP13 aktivitesi kritik görünmektedir. Literatürde MMP13, tümör invazyonu ve metastazı, akciğer hastalıkları ve periodontal hastalıklar ile ve hatta Crohn hastalığı ve ülseratif kolit (UC) gibi bağırsak hastalıkları ile de ilişkilendirilmiştir [42].

Romatolojik hastalıklardan romatoid artrit ve osteoartrit'de sinovyal membranlarda, kıkırdığında, tendonda ve kemikteki matriks metalloproteinazların ifadesi iyi belgelenmiştir. MMP'lar genellikle doku tahribatıyla ilişkilidir. Her iki hastalıkta da, iltihaplanma mediatörleri, hücre dışı matriksin birçok bileşenini indirgeyen MMP üretimini uyarır. Kollajenazlar, MMP-1 ve MMP-13, sinovyal fibroblastlar ve makrofajlar ve kondrositler tarafından üretilir ve RA ve OA'de önemli roller oynarlar. MMP-13, matriks tahribatında çift rolü olan agregan proteoglikan molekülünü de indirgemektedir. MMP-2, -3, -9, -10 ve MMP-19 gibi MMP'lar artritte yükselir, ve MMP-13 ile birlikte bu enzimler eklemlerin kollajen olmayan matriks bileşenlerini de indirgemektedir. Ayrıca MMP-1, -2, -3, -9, -12, -13 ve MMP-14 gibi MMP'lar patolojik koşullardaki osteoklastik rezorpsiyonda da rol oynamaktadır. Kemik matriksinin kollajen olmayan proteinlerinin bir kısmını parçalayıp ECM bölünmesinin ötesinde rol oynar [3]. RA ve OA ile yapılan başka bir çalışmada bu hastalıkları temel özelliği olan sinovyal eklemleri içeren kıkırdak, tendon ve kemiğin geri döndürülemez tahribatından bahsedilmiştir. Her iki hastalıkta da, interlökin-1 beta (IL-1 β) ve tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) gibi inflamatuvar sitokinler, hücre dışı matriksin tüm bileşenlerini bozabilen enzimler olan matriks metalloproteinazların üretimini uyarır [35].

Yapılan bir biyokimyasal çalışmada, kollajenazların fibriler kollajeni parçalaması ile ilgili moleküler mekanizmasına açıklık getirmeye çalışılmıştır. MMP1'in, tip I kollajenin $\alpha 2$ (I) zinciri ile etkileşerek üçlü helezoni yapıyı çözdüğü ve üç α zincirini art arda parçaladığı gözlemlenmiştir. MMP13'ün ise, tip II kollajenin α zincirlerini Gly-Leu, Gly-Gln bağlarının iki bölgesinde kestiği gözlemlenmiştir [10].

MMP'lardan bazıları, travmatik sinovyal membran örneklerinin neredeyse tamamında görülmektedir. Bir çalışmada alınan tüm RA sinovyal doku örneklerinde MMP-1, MMP-9

ve MMP-14 gibi bazı MMP mRNA'ları tespit edilmiştir. Aslında MMP-1 ve MMP-9'un İL1, TNF α , interferon γ , transforme edici büyüme faktörü α ve epidermal büyüme faktörü gibi sitokinler tarafından indükte olduğu bilinmektedir. Yine bu çalışmada MMP-13'e herhangi bir travma örneğinde rastlanmamış ancak hemen hemen tüm RA sinovyal doku örneklerinde bulunmuştur. Bu durum, RA'de, OA'de görüldüğünden daha yüksek derecede görülen MMP-13 enzim proteininin ve MMP-13 ekspresyonunun iltihaplanma derecesi ile korele olduğunu göstermektedir [43].

2.4. MMP-9

MMP ailesinin önemli bir alt grubunu oluşturan Jelatinazlar, MMP-2 (Jelatinaz A) ve MMP-9 (Jelatinaz B) olmak üzere 2 tip üyeye sahiptir. Domain yapılarında diğer MMP'lerden farklı olarak Fibronektin tip II benzeri 3 tekrar bölgesi içerirler. Jelatinazların substratları arasında kollajen (IV, V, VII, X ve XIV), jelatin, entaktin, agrekan, elastin, fibronektin, osteonektin, plazminojen, MBP, IL-1 β öncüllerini sayabiliriz. MMP-2 (Jelatinaz A) 72 kDa, MMP-9 (Jelatinaz B) ise 92 kDa molekül ağırlığındadır.

MMP-9, MMP ailesinin en büyük üyesidir. Domain yapısında Predomain, Prodomain, Katalitik domain, Menteşe bölgesi, Hemopeksin benzeri bölge, Fibronektin tip II benzeri 3 tekrar bölgelerini içermektedir. Fibronektin benzeri bölüm kollajen ve jelatinlere bağlanmayı kolaylaştırır [23]. Yapılan çalışmalarda 92 kDa'luk bir molekül olarak salgılandığı, önce 87 kDa olan bir inaktif maddeye ve sonra aktif form olan 82 kDa veya 83 kDa'uk bir moleküle dönüştürüldüğü gösterilmiştir. MMP-9, aktivasyonunu takiben, denatüre kollajen ve jelatin, tip IV ve V kollajen ve elastin de dahil olmak üzere pek çok ekstraselüler matriks bileşenlerini yıkabilir [23, 44].

Jelatinazların (MMP-2 ve MMP-9) inflamatuvar süreçlerde ve tümör progresyonunda rol oynadığına yönelik çalışmalar yapılırken biryandan da, jelatinazların kansere karşı koruyucu rolleri olduğu bulunmuştur [7].

MMP'lerden bazıları, travmatik sinovyal membran örneklerinin neredeyse tamamında görülmektedir. Bir çalışmada alınan tüm RA sinovyal doku örneklerinde MMP-1, MMP-9 ve MMP-14 gibi bazı MMP mRNA'ları tespit edilmiştir. Aslında MMP-1 ve MMP-9'un İL1, TNF α , interferon γ , transforme edici büyüme faktörü α ve epidermal büyüme faktörü gibi

sitokinler tarafından indükte olduğu bilinmektedir [43]. Yine RA sinovyal sıvı örnekleri ile yapılan başka bir çalışmada yüksek seviyelerde MMP-1, -2, -3, -8, -9 ve TIMP-1'e rastlanmıştır. Bu durum MMP'ların tamamen etkinleştirildikten sonra, RA'de kıkırdak yıkımına katkıda bulunabilecek düzeyde bir MMP/TIMP dengesizliğini işaret etmektedir. Hastalığın erken evrelerinde MMP-8 ve MMP-9 seviyeleri düşükken RA'in ilerlemesiyle miktarlarda artış olduğu da gözlenmiştir [45].

Alenius ve ark.larının yaptıkları bir çalışmada serum MMP-9 düzeyleri, PsA, RA ve kontrol grubu ile karşılaştırılmış ve anlamlı bir farklılık bulunmamışken [66] başka bir çalışmada ise bu düzeyler PsA, PsO ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur [4]. Başka bir çalışmada ise PsA'li hastaların 3 haftalık infliksimab monoterapisinden sonraki klinik ve laboratuvar bulguları başlangıca göre değerlendirilmiş, sonuçta hastalığın klinik semptomlarında iyileşmeyle birlikte serum E-selektin, TNF- α , MMP-2 ve MMP-9 düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir [71, 72].

2.5. Romatolojik Hastalıklar

Romatolojik hastalıklar kas, iskelet sistemi, eklemler ve dolaylı olarak da iç organları ve bütün vücudu etkileyebilen bir hastalık grubudur. Bu terim tek bir hastalıktan ziyade bir hastalık grubunu nitelemektedir. MS. 1. yüzyılda "Rheuma" kelimesi yangılı akıcı bir sıvıyı tanımlamak için kullanılmıştır.

Romatizmal hastalıkların sebebi geçmişten beri çok net anlaşılamamıştır. Genetik yatkınlıklar, çevresel faktörler, enfeksiyonlar v.b. gibi sebeplerle bağışıklık sisteminde meydana gelen değişikliklerin tetiklemesiyle ortaya çıkmaktadırlar.

Genel belirtileri artrit (eklem iltihabı), eklem sertliği, eklem ve kemiklerde şişme, eklemlerde hareket kaybı ve hareket kısıtlılığı, kalça ağrısı, kas ağrısı, halsizlik, ateş gibi belirtiler verir.

Romatizmal hastalıklar nüfusun büyük bir bölümünü etkilemektedir. Sağlık bakım masraflarının artmasına, iş gücü kaybına, sakatlığa ve hatta erken ölümlere sebebiyet vermektedir. Bu nedenle, bu hastalıklar için yapılan teşhis ve tedaviye yönelik araştırmalar aynı zamanda halk sağlığı alanında önemli gelişmelere de yardım edebilir. Öte yandan

romatizmal hastalık etiyolojisinin zamanla daha iyi bir şekilde anlaşılması ile birçok romatizmal hastalık için nispeten asemptomatik bir hastalık gelişim dönemi olduğu ve bu hastalıkların ilerideki riskini tahmin etmek için kullanılabilen biyolojik belirteçlerin anlamlı olabileceği yönünde elde edilen bilgiler göz önüne alındığında romatizmal hastalıkların önlenebilir hastalık listesine dahil olabileceği umut edilebilmektedir [46].

Romatizmal hastalıkların büyük bir çoğunluğu sistemik bulgularla seyreder. Sistemik romatizmal hastalıkların teşhis ve tedavisinin yönlendirilmesinde klinik bulgular esastır. Ancak pek çok laboratuvar testleri ve görüntüleme yöntemleri, klinik bulgularla birleştirilerek, gerek teşhis ve tedavinin planlanmasında ve gerekse de hastaların organ tutulumları açısından değerlendirmelerinde sıklıkla kullanılabilir. Romatizmal hastalıklarda laboratuvar testleri içinde ilk sırada rutin incelemeler gelir [47]. Bunlar genel olarak: Tam Kan Sayımı, Biyokimyasal İncelemeler, Mikrobiyolojik İncelemeler, Sinovyal Sıvı Analizleri, Akut Faz Proteinleri, Otoantikorlar, Kompleman Sistemi, İmmün Kompleksler, Kriyoglobulinler, HLA Antijenleri, Görüntüleme Yöntemleri, İnvazif Görüntüleme Yöntemleri, Sinovyal Biyopsi şeklinde sıralanabilir.

Romatizmal hastalıklar genel anlamda eklem, bağ dokusu ve kasların dışında, birçok organ ve sistemi tutabilen hastalıkları da bünyesinde barındırır. Bu nedenle, kapsamı oldukça geniştir ve yaklaşık 200 kadar hastalığı içerir.

Bu çalışmada biz Primer Sjögren Sendromu, Romatoid Artrit ve Psoriatik Artrit hastalıklarını örnek olarak ele aldık.

2.5.1. Primer Sjögren Sendromu

Sjögren Sendromu (SS) gözyaşı ve tükürük bezleri başta olmak üzere, tüm ekzokrin bezlerin inflamasyonu ile karakterize, yavaş seyirli, kronik, sistemik, otoimmün bir hastalıktır. Temelde bir otoimmün ekzokrinopati olan bu hastalığın başlıca belirtileri olarak ağız ve göz kuruluğu (sikka semptomları) sayılmaktadır. Bununla birlikte hastalık pek çok organ ve sistemi de etkileyebilmektedir. Bu anlamda hem organa özgü, hem de sistemik özellikleri birlikte bulundurabilen bir hastalıktır. Sjögren sendromu primer yâda sekonder olarak adlandırılır. Altta yatan başka bir hastalık yoksa primer SS; başka bir hastalık ile birlikte ise

(başlıca romatoid artrit veya SLE) sekonder SS olarak adlandırılır [5]. Primer Sjögren sendromu (pSS), erken ve aşamalı lakrimal ve tükürük disfonksiyonu ile karakterizedir [6].

Epidemiyoloji

Sjögren sendromu çok yaygındır ve görülme sıklığı kesin bilinmemekle beraber yaklaşık %0,1 ile %0,6 arasındadır. Bu hastaların %50 kadarı primer Sjögren vakalarıdır. SS tüm yaşlarda ortaya çıkabilmekle birlikte 40-50 yaşlarındaki kadınlarda daha sık görülmektedir. Kadınlarda erkeklere göre daha fazla görülmektedir. SS'li hastaların yaklaşık % 90'ı kadındır. Türkiye’de Primer SS prevalansı, Avrupa kriterlerine göre %1,56 Avrupa-Amerika kriterlerine göre ise %0,72 olarak bulunmuştur [5, 6].

Etyopatogenez

Sjögren sendromunun etyopatogenezini tam olarak bilinmemesine rağmen çalışmalar genetik ve hormonal özellikler, virüsler üzerine yoğunlaşmıştır. Genetik yatkınlığı olan bireylerde eklenen çevresel faktörlerin etkisiyle otoimmüniteyi tetiklediği düşünülmektedir [48, 49].

Klinik Bulgular

Hastalık genellikle sinsi başlar ve yavaş seyirlidir. Hastalığın temel klinik semptomları göz ve ağız kuruluğu olmakla birlikte, diğer organ tutulumlarına ait sistemik bulgular da eşlik edebilir. SS'deki en büyük göz problemi keratokonjonktivit sikka olup, kseroftalmiye neden olur. Başlıca oral belirti, tükürük bezi üretiminin azalması, ağız kuruluğu ve diş çürüğüne yol açmasıdır. Ekstraglandüler bulguları arasında artralji, tiroidit, renal tutulum (renal tübüler asidoza neden olur), periferik nöropati, kutanöz vaskülit ve lenfoma bulunur. pSS'de lenfoma riski yaklaşık %5'tir. Semptomların multisistemik olması ve hastalığa özgü olmaması tanıyı güçleştirmektedir. En önemli patolojik bulgu ekzokrin bezlerin lenfositlerle infiltrasyonudur [5, 6].

Tedavi

SS için herhangi bir tedavi mevcut değildir ve SS'in çeşitli semptomlarına yönelik tek bir tedavi modalitesi de yoktur. Bununla birlikte, bir takım ilaçlar semptomların hafifletilmesini sağlar ve SS'in birçok sistemik komplikasyonlarını önlemeye yardımcı olur. Göz ve oral

salgı disfonksiyonunu ayrı ayrı değerlendirerek tedavi etmek gerekir. Diğer kas iskelet sistemi yakınmaları için Non-Steroid anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ), antimalaryal ilaçlar verilebilir. Romatologların, pSS veya sSS'li hastaların bakımında diğer uzmanlarla terapötik işbirlikleri geliştirmeli ve sürdürmeleri önerilmektedir [5,6].

2.5.2. Romatoid artrit

Romatoid artrit (RA), en sık rastlanan sistemik otoimmün, simetrik olarak eklemlerde artrit yol açan ve birçok eklemi aynı anda tutabilen kronik seyirli inflamatuvar bir hastalıktır.

Romatoid artrit, en yaygın inflammatuvar artritlerden biridir. Etkilenen hastalar kronik eklem ağrısı, sakatlık ve ciddi mortalite oranları ile muzdariptir. Öncelikle küçük eklemleri (el eklemleri, el bileği ve ayak eklemleri) ve dirsek eklemlerini etkiler, ancak daha büyük ve ağırlık taşıyıcı olan appendiküler eklemlerin etkilendiği de gözlemlenebilir. Aynı zamanda birçok organ ve sistemi de tutabildiğinden eklem dışı bulgular ve sistemik semptomlar da görülebilir. RA değişken şiddette heterojen bir hastalıktır [6].

Romatoid artrit, günümüzde önemli bir sağlık yükü oluşturmaktadır. 1987'de tanımlanan kriterler sayesinde diğer artrit hastalıklardan ayırt edilebilir hale gelmiştir. Bu kriterler, otoantikorun varlığı, romatoid faktör, röntgen üzerinde görünen eklem erozyonu, sertlik, şişme ve eklemlerin simetrik olarak etkilenmesi olarak sıralanmıştır [50].

Eklem tutulumu, şekil bozukluğu yaparak zaman içinde önemli sakatlıklara yol açabilmektedir. Klinik seyri, hastadan hastaya büyük değişiklikler gösterir. Bazı hastalarda az sayıda, hafif seyirli ve kısa süreli eklem tutulumları görülürken, bazı hastalarda ise, tedaviye etkin yanıt alınmayıp kısa sürede sakatlıklar ve önemli organ hasarları gelişebilmektedir [51].

RA eklem deformitelerine sebep olması yanında önemli iş gücü kaybına ve sakatlıklara da neden olmaktadır. Hastalık sadece kas ve iskelet sisteminde kısıtlı kalmamaktadır. Akciğerler, kalp-damar sistemi, bağışıklık sistemi, sinir sistemi gibi hayati önemi bulunan sistemleri de etkileyerek, hastaların yaşam sürelerini ve yaşam kalitelerini kısıtlamaktadır [52].

Romatoid artritli kişilerin eklem kıkırdağı üç yolla proteinazlar tarafından yıkıma uğratılır. Bunlar: (1) eklem kıkırdağı yüzeylerinin sinoviyal sıvıdaki proteinazlar tarafından yıkıma uğratılması, (2) eklem kıkırdağı ile doğrudan temas yoluyla proteolitik sinoviyum sıvısı ya da pannus dokusu ya da her ikisi tarafından yıkıma uğratılması ve (3) kondrositlerden üretilmiş proteinazlar tarafından gerçekleşen intrinsik tahribat olarak sayılabilir [10].

Epidemiyolojisi:

Romatoid artrit dünyada yaygın olarak görülür. Görülme sıklığı etnik gruplarda farklılık göstermesine rağmen genel olarak %1-2 olup, bu oran 70 yaşlarındaki kadınlarda %5'e kadar yükselir [53]. Kadınlarda erkeklerden 2,5 kat daha fazla görülmektedir [6]. En çok 35 – 60 yaşlarında başlamaktadır [51].

Etiyopatogenez:

Hastalığın etyolojisi henüz tam olarak bilinmemektedir. Genetik ve çevresel faktörlerin etkisi açıkça görülmektedir [6]. Hastalık aynı aile içinde birden çok kişide görülebilmektedir [50].

Klinik Bulgular:

Romatoid artrit başlama şekli hastadan hastaya farklılıklar gösterir.

En yaygın görülen başlangıç şekli sinsice başlayan ve birkaç hafta hatta daha uzun bir süreye yayılan yorgunluk, hafif ateş ve eklem ağrısı ve küçük distal eklemleri içeren şişlik ve simetrik eklem tutulması şeklindedir [6]. Eklem ağrısı dışında hastaların önemli bir yakınması da uyku veya uzun süren bir istirahat sonrası, eklemler ve eklemlerin çevrelerinde oluşan ve sabah tutukluğu olarak tanımlanan sertlik hissidir. Bu tutulum sebebiyle hastalar giderek günlük işlerini yapmada zorlandıklarını ve eklem fonksiyonlarının azaldığından şikâyet ederler [51]. Fiziksel bulgular açısından eklem merkezli şişlik, deformiteler ve ağrılı veya azalmış eklem hareketi en belirgin noktalardır. Çoğu vakada romatoid artrit, tedavi edilmezse eklem hasarına ve engelliliğe neden olabilen kronik ilerleyici bir hastalık olarak şekillenir. RA'de birincil hedef organ sinovyal membrandır. Artan sellülarite, artmış vaskülerite ve immün inflamatuvar hücrelerle infüzyon gibi değişiklikler gözlemlenir. Bunun

neticesinde kıkırdak ve kemik tahribiyle sonuçlanan inflamasyon eklem deformitelerine ve özürlülüğe yol açar [6].

Romatoid artrit tanısını destekleyen laboratuvar testleri, yüksek eritrosit sedimentasyon hızı ve C-reaktif protein, pozitif romatoid faktör, pozitif anti-siklik sitrulinat peptid (CCP) antikoru sayabiliriz. Radyografiler de periartiküler osteoporoz, eklem boşluğu daralması, erozyon ve deformiteler gözlenebilir. Manyetik rezonans görüntüleme ve ultrason hastalığın erken evrelerinde daha duyarlı olabilir [6]. Elde edilen laboratuvar bulguları romatoid artrite özgü değildir. Genel olarak klinik belirti ve bulgulara göre konulan tanıyı desteklemede veya hastalığın gidişini değerlendirmede kullanılırlar [51].

Tedavi:

Romatoid artrit hastalığa yönelik etkin bir tedavi biçimi yoktur. Ağrıyı dindirmek, eklemlerdeki ve diğer bölgelerdeki inflamasyonu baskılamak, eklem hasarını durdurmak veya yavaşlatmak, diğer komplikasyonları önlemek ve hastaların günlük aktivitelerini sürdürmesini sağlamaya yönelik tedaviler uygulanmaktadır [51, 53]. RA oluşum mekanizmaları sebebiyle mevcut tedavilere dirençlidir. Hastalarda gözle görülür bir iyileşme sağlanmış olsa bile tedavi kesildiğinde hastalığın tekrar etme olasılığı yüksektir. Ayrıca RA'de erken teşhis, geri dönüşümsüz eklem hasarının meydana gelmeden önce tespit ve tedavi edilmesi açısından önemlidir. RA'da hastalık aktivitesi düzeyi, tedaviye olan ihtiyacı da büyük ölçüde belirler. DMARD'lar hastalık aktivitesinin kontrolünde merkezi bir etkidir. Tedavide kalıcı eklem yaralanmalarını önlemek ve optimum hastalık kontrolü için DMARD kombinasyon rejimleri kullanılır [6].

2.5.3. Psöriatik artrit

Psöriatik artrit (PsA), psöriazis (sedef, PsO) denilen deri hastalığı ile beraber gelişen ve psöriazis hastalığı bulunanların yaklaşık %20'sinde görülen eklem iltihabı ile seyreden bir hastalıktır. Hastalık birçok eklemi ve/veya omurgayı tutabilir ve belirtiler kişiden kişiye değişkenlik gösterebilir. Psöriatik artrit, tuttuğu eklemlerde hasara neden olur. Bu nedenle erken tanı ve etkin bir tedavi önemlidir. PsA, romatoid faktörün (RF) keşfi ile romatoid artritтен ayırt edilmiştir. RA'li hastaların %85'i RF pozitif iken PsA'li hastalar genellikle RF için seronegatifdir [6]. Hastalık üzerinde çalışan bilim insanlarından oluşan uluslararası bir

grup CASPAR PsA sınıflama kriterlerini geliştirdiler. Bu kriterler PsA sınıflandırması için %99 spesifik ve %92 duyarlılık derecesine sahiptir [6].

Psoriatik artritte matriks metalloproteinazlar, dermal kan damarlarının anjiyogenezini ve immün sistem hücrelerin infiltrasyonunu tetikleyerek epidermiste iltihaplı lezyonların oluşmasında rol aldığı düşünülmektedir. Aynı zamanda bazı matriks metalloproteinazların da hastalığın döküntülü döneminde eksprese olduğu ve bu ekspresyon derecesinin klinik skorla korele olduğu gözlenmiştir[4].

Epidemiyolojisi:

Psöriatik artiritin görülme sıklığını belirleyen çalışmalar çok azdır ve bunlara göre de bu oran %0,04 - 0,1 arasında değişmektedir. Hastalığın başlama yaşı genel olarak 30-55 arasındır [54]. Psoriatik artrit, psöriazis (sedef) hastalarının yaklaşık %26'sında görülür ve nüfusta %0,3 ile %1 prevalansa neden olur [6]. PsA'de erkek/kadın oranı farklı çalışmalarda büyük değişiklikler gösterse de ortalama 1:1 olarak kabul edilmiştir [4].

Etyopatogenezi:

Hastalığın etyopatogenezi tam olarak açıklanamamıştır. Hastalığın gelişimde genetik faktörlerin etkin bir rolü olduğu düşünülmektedir. Bunun yanında immünolojik, çevresel faktörlerin de etkisiyle deri ve/veya bağırsakta başlayan inflamatuvar olaylarla hastalığın tetiklendiği düşünülmektedir [4, 6].

Klinik Bulgular:

Psöriazis'e eşlik eden eklem tutulumları vardır. Vücudun herhangi bir eklemine tutabilir. Sadece tek eklemi tutabildiği gibi birden çok eklemi de etkileyebilir. Omurgayı tutabilir. El-ayak parmakları gibi küçük eklemlerin yanı sıra diz, ayak bileği gibi büyük eklemleri de tutabilir. El ve ayak eklem tutulumunda 'daktilit' denilen duruma neden olabilir. Tırnaklarda çukurluk, kabalaşma veya tırnağın yatağından ayrılması gibi değişiklikler görülebilir. Psöriatik artrit, omurgayı tuttuğunda, spondilit denilen sırt veya boyun ağrısına, eğilirken zorlanmaya neden olur. Psöriatik artrit, tendon ve bağların kemikler üzerine tutunduğu noktalarda hassasiyet ile kendini gösteren 'Entezit' olarak adlandırılan duruma neden olabilir. Entezit, psöriatik artiritin karakteristik özelliklerinden biridir.

Spinal tutulumun sıklığı da zamanla artmaktadır. Psöriatik artritin asimetrik oluşu hastalığın genel özelliğidir [54].

Tedavi:

Hastalığa yönelik etkin bir tedavi biçimi yoktur. Tedavide disiplinler arası etkileşim önemlidir. Farmakolojik veya farmakolojik olmayan uygulamalar, rehabilitasyon ve rekonstrüktif cerrahi girişimlerden faydalanılabilmektedir. Birçok PsA'lı hastalar, özellikle periferik eklem tutlumu bulunanlar, selektif olmayan siklooksijenaz inhibitörlerinden yarar görürler. Psöriatik artritle hastaların %20-30'unda fonksiyonlarda kısıtlama, şekil bozukluğu ve eklemlerde destrüksiyon gelişir. Kötü prognoz kriterleri bulunan hastalarda erken dönemde DMARD kullanımı çok yararlı olmaktadır [54].

2.6. ELİZA

ELİZA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) antijen-antikor etkileşimine dayanan bir analiz yöntemidir. Bu yöntemde bilinen bir antijen varlığında numune içerisindeki özgül antikor veya bilinen bir antikor varlığında numune içerisinde ki özgül antijen saptanabilir. Ayrıca numune içerisindeki özgül antijen veya antikorların miktarları kantitatif olarak ölçülebilir.

Bunun için genel olarak 96 kuyucuklu plateler kullanılmaktadır. Bilinen antijen yada antikor bu kuyucukların yüzeyine bağlıdır. Bu kuyucuklara numuneler eklenir ve inkübasyona bırakılır. Bu aşama numunemizdeki aradığımız antijen ya da antikorun bu kuyucukların yüzeyine sabitlenmiş olan bilinen antijen yada antikora bağlanmasını sağlamak içindir. İnkübasyondan sonra kuyucuklar yıkama işlemine tabii tutulur. Bu işlem istenmeyen veya bağlanmamış olan bütün molekülleri ortamdan temizlemek için yapılır. Bu aşamada kullanılan ELİZA türüne göre Biotin ile işaretlenmiş antikorlar eklenebilir ortama. Ardından işaretli konjugat ortama eklenir ve inkübasyona bırakılır. Biotin ile işaretleme yapılmışsa konjugata Streptavidin proteini tutturulur. Bu konjugatın işaretlenmesi genelde enzimler ile yapılır ve alkalenfosfataz (AP) veya horseradishperoksidaz (HRP) gibi enzimler kullanılır. Bunların dışında pek yaygın olmasada β -Galaktosidaz, asetilkolinesteraz, katalaz gibi enzimlerde kullanılmıştır. İnkübasyon ve yıkamanın ardından substrat eklenir. Bu substratın işaretlemede kullanılan enzim ile uyumlu olması gerekmektedir. Alkalenfosfataz

(AP) için BCIP/NBT (5-bromo-4chloro-3-fosfat indolyl/Nitro mavi tetrazolium), horseradishperoksidaz (HRP) için TMB (tetramethylbenzidine) kullanılır. İnkübasyonun ardından reaksiyonu durdurmak için stop solüsyonları kullanılır. Kuyucuklarda oluşan renk değişimleri spektrofotometrede belirli dalga boylarında okutulur.

Çalışmak istediğimiz biyomolekülün özelliklerine ve ortamdaki miktarlarına göre uygulama alanı bulan çeşitli ELİZA türleri vardır. Direkt, indirekt, kompetatif, ve sandwich gibi ELİZA türleri vardır.

Direk ELİZA: Bu yöntemde kuyucuklara bağlanmış herhangi bir antijen ya da antikor yoktur. Ortama direkt numune eklenir ve analiz etmek istediğimiz antijen veya antikoru kuyucuklara tutunması beklenir. Ardından enzimle işaretli konjugat eklenir, inkübasyona bırakılır. Daha sonra enzime spesifik substrat eklenir ve renk değişimi gözlenir. İnkübasyondan sonra stop solüsyonu ile reaksiyon durdurularak renk değişimi spektrofotometrede belirli dalga boylarında okutulur. Oluşan rengin absorbans şiddeti konsantrasyon ile doğru orantılıdır.

İndirek ELİZA: direkt ELİZA'dan farkı kuyucukların hedeflediğimiz antijen veya antikora özgül antijen veya antikorla kaplı olmasıdır. Çalışma protokolü direkt ELİZA gibi uygulanır.

Kompetatif ELİZA: Bu yöntemde de kuyucuklar özgül antijen veya antikor ile kaplıdır. Kuyucuklara aradığımız antijen ya da antikoru içeren numune eklenir. Hemen ardından enzimle işaretli antijen veya antikor da ortama eklenir. Bu aşamada numune ve işaretli konjugat kuyucuklarda tutunmuş olan antijen/antikora bağlanmak için birbirleri ile yarışır. Daha sonra enzime spesifik substrat ile inkübasyon ve ardından stop solüsyonu ile reaksiyon durdurulur. Oluşan renk değişimleri spektrofotometrede belirli dalga boylarında okutulur. Oluşan rengin absorbans şiddeti konsantrasyon ile ters orantılıdır.

Sandwich ELİZA: Kuyucuklar analiz etmek istediğimiz antijene özgül yakalama antikorları ile kaplanmıştır. Kuyucuklara numuneler eklenir ve inkübasyona bırakılır. Yakalama antikoru numunemiz içerisindeki hedeflediğimiz antijenleri tutması sağlanır. Ardından enzim işaretli konjugat ile inkübasyon ve sonrasında yine bu enzime spesifik substrat ortama eklenir. İnkübasyon sonrasında stop solüsyonu ile reaksiyon durdurularak renk değişimi spektrofotometrede belirli dalga boylarında okutulur. Oluşan rengin absorbans şiddeti

konsantrasyon ile doğru orantılıdır. Diğer ELİZA tekniklerine göre daha duyarlıdır ve daha yaygın olarak kullanılır [55, 56].

2.7. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

2.7.1. Kromatografi

Bir karışımdaki bileşikleri birbirinden ayırmak ve maddeleri saflaştırmak için kullanılan bir tekniktir. Kromatografinin ana amacı hedeflenmiş numunenin ayrımı ve miktarının ölçümüdür. Kromatografi çeşitli maddelerin, hareketli bir faz yardımıyla, sabit bir faz üzerinde, değişik hızlarla hareket etmeleri veya sürüklenmeleri esasına dayanır.

Kromatografinin farklı sınıflandırma şekilleri mevcuttur: Kromatografide moleküllerin adsorpsiyon, dağılma ve değiştirme kuvvetleri rol oynar. Bu kuvvetlere göre de farklı kromatografik yöntemler farklı gruplarda toplanırlar.

Ayrılma Mekanizmalarına Göre

- Adsorpsiyon kromatografisi
- Partisyon kromatografisi
- İyon değiştirme kromatografisi
- Jel filtrasyon (Moleküler eleme) kromatografisi
- İyon çifti kromatografisi
- Afinite kromatografisi

Uygulama Biçimine Göre

Düzlemsel kromatografi

- Kağıt kromatografisi
- İnce tabaka kromatografisi (TLC)

Kolon kromatografisi

- Gaz kromatografisi (GC)
- Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)

Faz Tiplerine Göre

Sıvı kromatografisi

- Sıvı-Katı kromatografisi
- Sıvı-Sıvı kromatografisi

Gaz kromatografisi

- Gaz-Katı kromatografisi
- Gaz-Sıvı kromatografisi

İlk modern cihaz 1965 yılında Yale Üniversitesi, Csaba Horvath tarafından geliştirildi. Horvath geliştirmiş olduğu cihaza bugün de evrensel olarak kullanılan “yüksek performanslı sıvı kromatografisi” adını vermiştir.

Tıbbi Laboratuvarlardan ilaç sanayisine; gıdadan veterinerlik, ziraate; kimyadan çeşitli sanayi dallarına kadar çok geniş bir yelpazede kullanım alanı bulan kromatografi; ölçüm, ayırıştırma ve saflaştırma gibi değişik amaçlar için kullanılmaktadır. Böyle değişik alanlarda ve çeşitli kullanım yöntemleri olan kromatografinin en önemli, etkin ve yaygın olanı ise Likit Kromatografi ve HPLC cihazıdır.

2.7.2. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC)

En yaygın olarak kullanılan analitik tekniklerden bir tanesidir.

HPLC; Kimyasal ayırma, saflaştırma ve nitel ve nicel olarak tayin etme amacıyla en çok kullanılan cihazdır. Karışımdaki bileşenlerin ayrılması için sıvı hareketli faz kullanılır. Bileşenler ilk olarak çözgüde çözünürleştirilirler ve daha sonra yüksek basınç altında kromatografi kolonundan geçmeye zorlanırlar.

2.7.3. HPLC'nin uygulanışı

1. adım: *Biyomolekülün uygun çözücüde çözünmesi*

2. adım: *Ayrım*: Bileşenlerin ayrımı kolonda gerçekleşir. Çözünen karışım kolona enjekte edilir. Kolon boyunca sıvının (metanol ve su karışımı gibi) hareket etmesi için bir basınç uygulanır. Bu sıvı karışımına hareketli faz denir. Hareketli faz, sabit faz boyunca ilerleyerek, enjekte edilen numuneyi taşımakla görevlidir. Farklı bileşenler, kolonda farklı hızlarda ilerlerler. Böylece bileşenler çıkışa farklı zamanlarda ulaşır.

3. Adım: *Bileşenlerin miktarlarının tayin edilmesi*: Bileşenler ayrıldıktan sonra miktarlarının tayini için detektörlerden faydalanılır. Işığın madde tarafından absorblanması, madde

miktarı ile orantılıdır diyebiliriz. Örneğin madde miktarını 2 katına çıkarırsak, madde 2 kat daha fazla ışığı absorblayacak demektir. Dedektör ışığın yoğunluğunu ölçmekle görevlidir. Işık gelişindeki azalma dedektörde bir cevap oluşturur ve buna da pik denir.

4. Adım: *Bileşenlerin nicel olarak tayini*

2.7.4. HPLC sistemine genel bakış

Genel olarak 8 kısımdan oluşur:

- Mobil faz (çözücü) şişeleri
- Degasser
- Pompa
- Enjektör
- Kolon fırını
- Kolon
- Dedektör
- Kaydedici

Bu kısımlardan bazıları çalışılacak bileşene ve cihaz marka, modeline göre değişiklik gösterebilir.

2.7.5. HPLC çalışmalarında ki genel avantajlar

- Doğruluk
- Yüksek hassasiyet (ppm - ppb)
- Küçük enjeksiyon hacimi (1- 100 µl)
- Geniş uygulama sahası
- Zor olmayan analiz koşulları
- Çok iyi tekrarlanabilirlik

2.7.6. HPLC'nin kullanım alanları

HPLC'nin çok geniş bir kullanım alanı vardır.

- İlaç analizleri
- Biyokimyasal analizler
- Gıda analizleri
- Adli tıp, toksikoloji
- Klinik tıp
- Gıda ve çevre kirleticileri
- Endüstriyel analizler [57, 58]

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmaya Alınacak Hastaların Belirlenmesi

Çalışmaya Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Romatoloji Bilim Dalı Polikliniği'nde takipli hastalardan gönüllü olarak katılmayı kabul eden Primer Sjögren Sendromu teşhisli 20, Psöriatik Artrit teşhisli 19 ve Romatoid Artrit teşhisli 20 hasta alınmıştır. Ayrıca herhangi bir romatolojik veya kronik hastalığı olmayan 15 sağlıklı kişide sağlıklı kontrol grubu olarak çalışmaya dâhil edilmiştir. Katılımcıların yaş aralığı 25 -60 yaş olarak belirlenmiştir. Hastaların rutin kontrollerinde verdikleri kanlardan kalan serum örnekleri çalışmada kullanılmıştır. Katılımcıların demografik bilgileri ve laboratuvar sonuçları medikal dosyalarından elde edilmiştir.

3.1.1. Primer Sjögren Sendromu grubu hasta seçim kriterleri

Amerika Romatoloji Derneği 2012 Sjögren Sınıflama kriterlerine göre Primer Sjögren sendromu tanısı almış, 25 ile 60 yaş aralığında olan hastalar dâhil edilmiştir. Başka bir romatolojik hastalığın eşlik etmesi veya herhangi bir kronik hastalığın olması ve yaş aralığının dışında olması araştırma dışı kalma kriterleri olarak belirlenmiştir.

3.1.2. Psöriatik Artrit grubu hasta seçim kriterleri

Psöriatik Artrit Sınıflama Kriterleri (CASPAR) göre Psöriatik Artrit tanısı almış, 25 ile 60 yaş aralığında olan hastalar dâhil edilmiştir. Başka bir romatolojik hastalığın eşlik etmesi veya herhangi bir kronik hastalığın olması ve yaş aralığının dışında olması araştırma dışı kalma kriterleri olarak belirlenmiştir.

3.1.3. Romatoid Artrit grubu hasta seçim kriterleri

Amerika Romatoloji Derneği 2010 Romatoid Artrit Sınıflama Kriterlerine göre Romatoid Artrit tanısı almış, 25 ile 60 yaş aralığında olan hastalar dâhil edilmiştir. Başka bir romatolojik hastalığın eşlik etmesi veya herhangi bir kronik hastalığın olması ve yaş aralığının dışında olması araştırma dışı kalma kriterleri olarak belirlenmiştir.

3.2. Numune Alım, Hazırlama ve Saklanması

Katılımcıların rutin kontrolleri sırasında vermiş oldukları kanların arta kalan bölümleri kullanıldı. Bu kanlar 3500 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek serum örnekleri ependorf tüplerine ayrılmıştır. Ayrılan numuneler çalışma gününe kadar -80°C’de buzdolabında saklanmıştır.

3.3. Ölçümler

3.3.1. Kullanılan alet, gereç ve cihazlar

Kullanılan cihazlar: Biotek marka Synergy H1 Çok Modlu Mikroplak okuyucu, Heidolph marka Vortex, Hermle marka Santrifüj, Nüve marka SL-350 Orbital Çalkayıcı, Çeşitli hacimlerde ayarlanabilir çok kanallı ve tek kanallı otomatik pipetler.

3.3.2. MMP-13 ölçümü

Serum MMP-13 düzeyi Sigma-Aldrich marka Human MMP-13 ELISA Kit (Lot Number 0302C0175) kullanılarak ölçülmüştür.

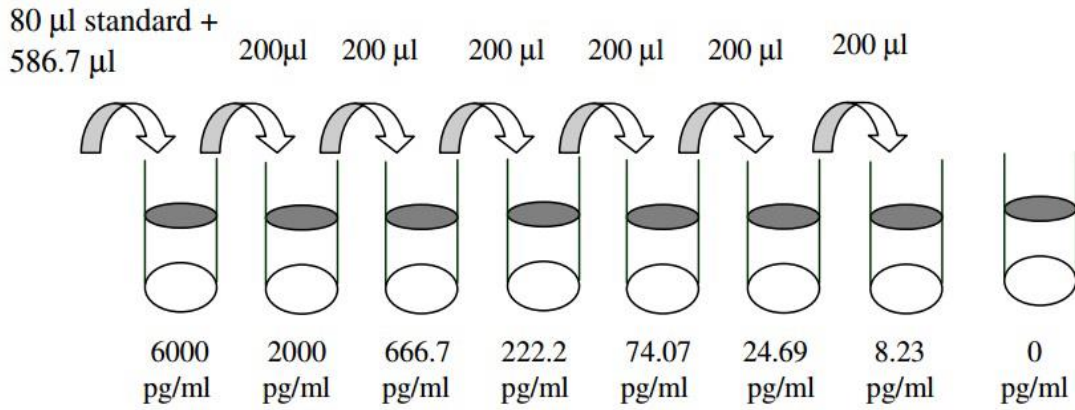
Kit içeriği ve reaktifler:

1. İnsan MMP-13 Antikor kaplı ELIZA Plate (RAB0364A)
2. Yıkama tamponu 20x (RABWASH4)
3. Liyofilize İnsan MMP-13 Protein Standartı - RAB0364
4. Biotinlenmiş İnsan MMP-13 Tespit Antikoru- RAB0364F-
5. HRP-Streptavidin - RABHRP5
6. ELIZA Kolorimetrik TMB Reaktifi (HRP Substrate) - RABTMB3
7. ELIZA Reaksiyon Durdurma Solüsyonu – RABSTOP3
8. ELIZA 5x Örnek Sulandırma Tamponu – RABELADE

Çalışma adımları:

- Örnek Sulandırma Tamponu 5 kat distile su ile sulandırıldı.

- Yıkama Tamponu 20 kat distile su ile sulandırıldı.
- Biotinlenmiş Tespit Antikoru içeren vialin içine önce 100 uL sulandırma tamponu eklenir. Daha sonra bu stok çözelti 80 kat sulandırma tamponu ile sulandırılır.
- HRP-Streptavidin için konsantre reaktiften 700 kat sulandırma yapılır. Bunun için HRP-Streptavidin içeren vialden 20 ul alınır ve 14 mL'ye sulandırma tamponu ile tamamlanır.
- Liyofilize İnsan MMP-13 Protein Standartı içeren vial 400 uL sulandırma tamponu eklenir. Böylece 50 ng/mL konsantrasyondaki stok protein standartımız hazırlanır. Başka temiz bir vial 80 uL bu standarttan pipetlenir. Üzerine 586,7 uL sulandırma tamponu eklenerek 6000 pg/mL'lik protein standartı hazırlanır. Daha sonra bundan seri dilüsyon ile kalibrasyon eğrisinde kullanmak için diğer standartlar hazırlanır. Şekil 3.1'de standartların dilüsyonları ile ilgili görsel verilmiştir.



Şekil 3.1. MMP-13 standartlarının dilüsyonu

Protein standartları ve tüm reaktifler hazırlandıktan sonra pipetleme aşamasına geçildi.

Çalışmanın adımları:

- 100 uL hazırlanmış olan protein standartları ve numuneler kuyucuklara pipetlenir. Üstü kapatılarak 2,5 saat oda ısısında orbital çalkalayıcıda inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyonun ardından 300 uL yıkama tamponu ile yıkama yapılır. Bu işlem 4 kez tekrarlanır.
- Hazırlanmış olduğumuz Biotinlenmiş tespit antikoru solüsyonundan 100 uL her kuyucuğa pipetlenir. Üstü kapatılarak 1 saat oda ısısında orbital çalkalayıcıda inkübasyona bırakılır.
- Yıkama işlemi tekrarlanır.

- Hazırlanmış olduğumuz HRP-Streptavidin solüsyonundan 100 uL her kuyucuğa pipetlenir. Üstü kapatılarak 45 dakika oda ısısında orbital çalkalayıcıda inkübasyona bırakılır.
- Yıkama işlemi tekrarlanır
- Kullanıma hazır olan Kolorimetrik TMB Reaktifinden 100 uL her kuyucuğa pipetlenir. Üstü kapatılarak 30 dakika oda ısısında orbital çalkalayıcıda inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyonun ardından 50 uL reaksiyon durdurma solüsyonundan her kuyucuğa pipetlenir.
- 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılır.

3.3.2. MMP-9 ölçümü

Serum MMP-9 düzeyi Sigma-Aldrich marka Human MMP-9 ELISA Kit (Lot Number 0920D0173) kullanılarak ölçülmüştür.

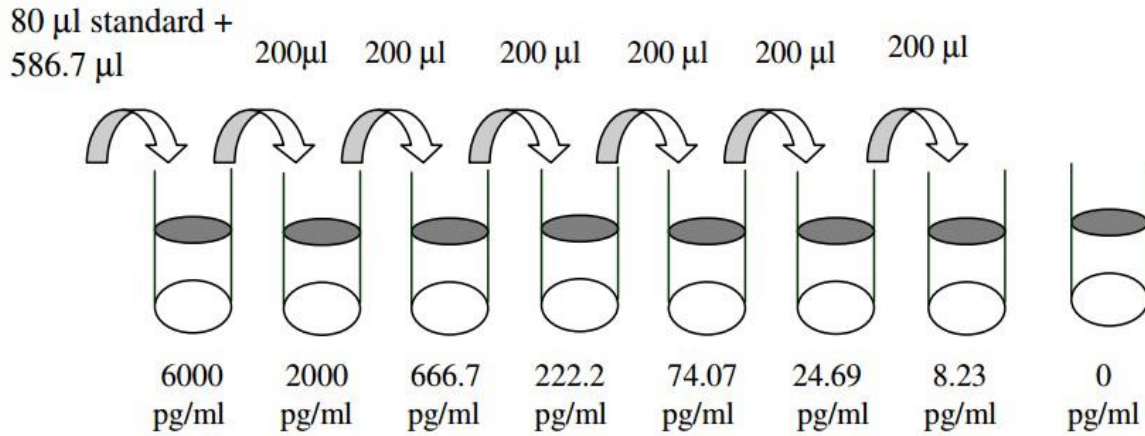
Kit içeriği ve reaktifler:

1. İnsan MMP-9 Antikor kaplı ELIZA Plate (RAB0372A)
2. Yıkama tamponu 20x (RABWASH4)
3. Liyofilize İnsan MMP-9 Protein Standartı - RAB0372-
4. Biotinlenmiş İnsan MMP-9 Tespit Antikoru- RAB0372D-
5. HRP-Streptavidin - RABHRP5
6. ELIZA Kolorimetrik TMB Reaktifi (HRP Substrate) - RABTMB3
7. ELIZA Reaksiyon Durdurma Solüsyonu - RABSTOP3
8. ELIZA 5x Örnek Sulandırma Tamponu – RABELADE

Çalışma adımları:

- Örnek Sulandırma Tamponu 5 kat distile su ile sulandırıldı.
- Yıkama Tamponu 20 kat distile su ile sulandırıldı.
- Biotinlenmiş Tespit Antikoru içeren vialin içine önce 100 uL sulandırma tamponu eklenir. Daha sonra bu stok çözelti 100 kat sulandırma tamponu ile sulandırılır.

- HRP-Streptavidin için konsantre reaktiften 400 kat sulandırma yapılır. Bunun için HRP-Streptavidin içeren vialden 30 uL alınır ve 12 mL'ye sulandırma tamponu ile tamamlanır.
- Liyofilize İnsan MMP9 Protein Standartı içeren vialde 400 uL sulandırma tamponu eklenir. Böylece 50 ng/mL konsantrasyondaki stok protein standartımız hazırlanır. Başka temiz bir vialde 80 uL bu standarttan pipetlenir. Üzerine 586,7 uL sulandırma tamponu eklenerek 6000 pg/mL'lik protein standartı hazırlanır. Daha sonra bundan seri dilüsyon ile kalibrasyon eğrisinde kullanmak için diğer standartlar hazırlanır. Şekil 3.2'de standartların sulandırmaları ile ilgili görsel verilmiştir.



Şekil 3.2. MMP-9 standartlarının dilüsyonu

Protein standartları ve tüm reaktifler hazırlandıktan sonra pipetleme aşamasına geçildi. Çalışmanın adımları:

- 100 uL hazırlanmış olan protein standartları ve numuneler kuyucuklara pipetlenir. Üstü kapatılarak 2,5 saat oda ısısında orbital çalkalayıcıda inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyonun ardından 300 uL yıkama tamponu ile yıkama yapılır. Bu işlem 4 kez tekrarlanır.
- Hazırlanmış olduğumuz Biotinlenmiş Tespit Antikoru solüsyonundan 100 ul her kuyucuğa pipetlenir. Üstü kapatılarak 1 saat oda ısısında orbital çalkalayıcıda inkübasyona bırakılır.
- Yıkama işlemi tekrarlanır.

- Hazırlamış olduğumuz HRP-Streptavidin solüsyonundan 100 uL her kuyucuğa pipetlenir. Üstü kapatılarak 45 dakika oda ısısında orbital çalkalayıcıda inkübasyona bırakılır.
- Yıkama işlemi tekrarlanır.
- Kullanıma hazır olan Kolorimetrik TMB Reaktifinden 100 uL her kuyucuğa pipetlenir. Üstü kapatılarak 30 dakika oda ısısında orbital çalkalayıcıda inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyonun ardından 50 uL reaksiyon durdurma solüsyonundan her kuyucuğa pipetlenir.
- 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılır.

3.4. HPLC ile Analiz

Analiz için CBM-20A Sistem Kontrol Ünitesi, DGU-20A On-line Degaz Ünitesi, LC-20AT Pompa, SIL-20AC Oto Örnekleyici, CTO-20A Kolon Fırını, SPD-M20A Photo-diode Array (PDA) dedektör modüllerinden oluşan Shimadzu marka HPLC sistemi kullanıldı.

Kullanılan kimyasal maddeler HPLC grade idi.

Çalışmada İntersil ODS3 5*4,6*150 mm analitik kolon kullanıldı. İzokratik modda çalışıldı. Mobil faz olarak %60 Asetonitril, %40 Distile su ve %0,01 Trifloroasetik asit karışımı kullanıldı. MMP standartları metanolde dilüe edilerek kullanıldı.

Örnek serumlar ise %40'lık perklorik asit ile ekstrakte edilerek cihaza 10 uL enjekte edildi. Akış hızı 0,9 mL/dakika olarak uygulandı. PDA dedektör ile yapılan dalga boyu taramasında en yüksek pikin 205 nm ye ait olduğu gözlemlendi.

3.5. İstatistiksel Analiz

Çalışmadan elde edilen verilerin değerlendirilmesi ve tabloların oluşturulması amacıyla SPSS version 15,0 programı kullanılmıştır. Çalışma grupları ve ölçülen laboratuvar sonuçları analize tabii tutuldu.

Hasta ve kontrol gruplarındaki parametrelerin tanımlayıcı istatistikleri, ortalama değerleri, değer aralıkları ve standart sapmaları hesaplandı ve standart sapmalar $\pm$ şeklinde ifade edildi. Gruplara ait verilerin normal dağılıma uyup uymadıkları Kolmogorov Smirnov testi ile değerlendirilmiştir. Normal dağılıma uygun olmayan sayısal verilerin gruplar arası karşılaştırmalarında Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

Değişkenler arasında ilişki olup olmadığı Spearman Korelasyon analizi ile incelendi. Sonuçların p değeri $<0,05$ olduğu takdirde istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.





4. BULGULAR

4.1. Kontrol ve Hasta Gruplarına Ait Tanımlayıcı Bulgular

Çalışmaya Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Romatoloji Bilim Dalı Polikliniği'nde takipli hastalardan gönüllü olarak katılmayı kabul eden Primer Sjögren Sendromu teşhisli 20, Romatoid Artrit teşhisli 20 ve Psöriatik Artrit teşhisli 19 hasta alınmıştır. Ayrıca herhangi bir romatolojik veya kronik hastalığı olmayan 15 sağlıklı kişide sağlıklı kontrol grubu olarak çalışmaya dâhil edilmiştir. Katılımcıların yaş aralığı 25 -60 yaş olarak belirlenmiştir. Hastaların rutin kontrollerinde verdikleri kanlardan kalan serum örnekleri çalışmada kullanılmıştır. Katılımcıların demografik bilgileri ve laboratuvar sonuçları medikal dosyalarından elde edilmiştir.

Gönüllü katılımcılarımız Primer Sjögren Sendromu grubunda 2 erkek 18 kadın, Romatoid Artrit grubunda 2 erkek 18 kadın, Psöriatik Artrit grubunda 7 erkek 11 kadın hastadan oluşmuştur.

Rutin kontrolleri için polikliniğe gelen hastalardan gönüllü ve çalışmaya dahil olma kriterlerini karşılayan katılımcılar rastgele seçilmiştir. Yaşın gruplar arası dağılımını göstermek için normallik testi Kolmogorov-Smirnov testi yapıldı. Hastalık grupları ile katılımcıların yaşları arasında yapılan istatistiksel değerlendirmede yaşların gruplar arasında normal dağıldığını gözlemledik. p değerleri ve genel tanımlayıcı istatistikleri çizelge 4.1'de gösterildi.

Çizelge 4.1. Tüm grupların yaşa göre genel tanımlayıcı istatistikleri

Gruplar	Yaş (yıl)					
	Numune sayısı	Ortalama $\pm$ Std.sapma	Medyan	Minumum	Maximum	(Kolmogorov-Smirnov) p değeri
Primer Sjögren Sendromu	20	48,45 $\pm$ 10,59	47,50	31	65	0,200
Romatoid Artrit	19	56,00 $\pm$ 10,98	56,00	27	73	0,200
Psöriatik Artrit	19	38,74 $\pm$ 11,25	38,74	22	56	0,160
Kontrol	15	47,87 $\pm$ 5,48	46,00	41	58	0,200

4.2. Kontrol ve Hasta Gruplarına Ait Laboratuvar Sonuçları ile İlgili Bulgular

Hastaların rutin kontrollerinde verdikleri kanlardan kalan serum örnekleri toplanarak çalışma gününe kadar -80°C 'de saklanmıştır. Çalışmalardan elde ettiğimiz gruplara ait MMP-13 (pg/mL), MMP-9 (pg/mL), sedimentasyon (mm/saat) ve CRP (mg/dL) sonuçları istatistiksel analize tabi tutulmuştur.

MMP-13 sonuçlarının gruplar arası dağılımını göstermek için normallik testi Kolmogorov-Smirnov testi yapıldı. Hastalık grupları ile MMP-13 sonuçları arasında yapılan istatistiksel değerlendirmede MMP-13 sonuçlarının gruplar arasında normal dağılmadığını gözlemledik. Tüm grupların MMP-13 sonuçlarına göre genel tanımlayıcı istatistikleri ve p değerleri çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Tüm grupların MMP-13 sonuçlarına göre genel tanımlayıcı istatistikleri

Gruplar	MMP-13 (pg/mL)					
	Numune sayısı	Ortalama $\pm$ std. sapma	Medyan	Minumum	Maximum	(Kolmogorov-Smirnov) p değeri
Primer Sjögren Sendromu	20	12,99 $\pm$ 18,03	6,78	4,59	67,86	<0,001
Romatoid Artrit	19	14,12 $\pm$ 16,45	8,79	4,68	76,25	<0,001
Psöriatik Artrit	19	9,78 $\pm$ 10,45	6,05	5,08	49,86	<0,001
Kontrol	15	12,30 $\pm$ 14,38	7,02	5,97	61,89	<0,001

MMP-9 sonuçlarının gruplar arası dağılımını göstermek için normallik testi Kolmogorov-Smirnov testi yapıldı. Hastalık grupları ile MMP-9 sonuçları arasında yapılan istatistiksel değerlendirmede MMP-9 sonuçlarının gruplar arasında genel olarak normal dağıldığını gözlemledik. Tüm grupların MMP-9 sonuçlarına göre genel tanımlayıcı istatistikleri ve p değerleri çizelge 4.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Tüm grupların MMP-9 sonuçlarına göre genel tanımlayıcı istatistikleri

Gruplar	MMP-9 (pg/mL)					
	Numune sayısı	Ortalama $\pm$ std.sapma	Medyan	Minumum	Maximum	(Kolmogorov-Smirnov) p değeri
Primer Sjögren Sendromu	20	7303,60 $\pm$ 538,36	7162,50	6440	8908	0,005
Romatoid Artrit	20	7433,10 $\pm$ 560,85	7434,00	6418	8980	0,068
Psöriatik Artrit	19	7639,68 $\pm$ 764,30	7900,00	6548	8888	0,174
Kontrol	15	7890,53 $\pm$ 1046,44	7813,00	5938	9493	0,200

Sedimentasyon sonuçlarının gruplar arası dağılımını göstermek için normallik testi Kolmogorov-Smirnov testi yapıldı. Hastalık grupları ile sedimentasyon sonuçları arasında yapılan istatistiksel değerlendirmede sedimentasyon sonuçlarının gruplar arasında genel olarak normal dağılmadığını gözlemledik. Tüm grupların sedimentasyon sonuçlarına göre genel tanımlayıcı istatistikleri ve p değerleri çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Tüm grupların sedimentasyon sonuçlarına göre genel tanımlayıcı istatistikleri

Gruplar	Sedimentasyon (mm/saat)					
	Numune sayısı	Ortalama $\pm$ std. sapma	Medyan	Minumum	Maximum	(Kolmogorov-Smirnov) p değeri
Primer Sjögren Sendromu	20	22,39 $\pm$ 19,57	12,50	6	66	0,007
Romatoid Artrit	20	24,42 $\pm$ 15,37	22,00	9	65	<0,001
Psöriatik Artrit	19	20,47 $\pm$ 11,96	21,00	3	42	0,200

CRP sonuçlarının gruplar arası dağılımını göstermek için normallik testi Kolmogorov-Smirnov testi yapıldı. Hastalık grupları ile CRP sonuçları arasında yapılan istatistiksel değerlendirmede CRP sonuçlarının gruplar arasında normal dağılmadığını gözlemledik. Tüm grupların CRP sonuçlarına göre genel tanımlayıcı istatistikleri ve p değerleri çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. Tüm grupların CRP sonuçlarına göre genel tanımlayıcı istatistikleri

Gruplar	CRP (mg/dL)					
	Numune sayısı	Ortalama $\pm$ std. sapma	Medyan	Minumum	Maximum	(Kolmogorov-Smirnov) p değeri
Primer Sjögren Sendromu	20	5,63 $\pm$ 4,34	3,82	2	17	0,021
Romatoid Artrit	20	12,70 $\pm$ 14,32	6,67	1	58	0,001
Psöriatik Artrit	19	10,62 $\pm$ 7,90	9,61	1	31	0,044

Gruplar arasındaki değerlerin analizini yapmak için Mann-Whitney U Testi kullanıldı.

Mann-Whitney U Testi'ne göre MMP-9 sonuçları için Kontrol grubu ile Psöriatik Artrit grubu arasında yapılan değerlendirmede istatistiksel olarak anlamlılık bulunmaz iken MMP-13 değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulundu. MMP-13 ve MMP-9 değerleri açısından Kontrol grubu ile PsA grubu arasında yapılan değerlendirme çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. MMP-13 ve MMP-9 değerleri için Kontrol grubu ile PsA grubu arasında yapılan değerlendirme

Kontrol grubu ile Psöriatik Artrit grubu karşılaştırılması	p değeri
MMP-13	0,026
MMP-9	0,425

Mann-Whitney U Testi'ne göre MMP-13 ve MMP-9 sonuçları için Kontrol grubu ile Romatoid Artrit grubu arasında yapılan değerlendirmede istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı. MMP-13 ve MMP-9 değerleri açısından Kontrol grubu ile RA grubu arasında yapılan değerlendirme çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. MMP-13 ve MMP-9 değerleri için Kontrol grubu ile RA grubu arasında yapılan değerlendirme

Kontrol grubu ile Romatoid Artrit grubu karşılaştırılması	p değeri
MMP-13	0,894
MMP-9	0,067

Mann-Whitney U Testi'ne göre MMP-13 sonuçları için Kontrol grubu ile Primer Sjögren Sendromu grubu arasında yapılan değerlendirmede istatistiksel olarak anlamlılık bulunmaz iken MMP-9 değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulundu. MMP-13 ve MMP-9 değerleri açısından kontrol grubu ile pSS grubu arasında yapılan değerlendirme çizelge 4.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. MMP-13 ve MMP-9 değerleri için Kontrol grubu ile pSS grubu arasında yapılan değerlendirme

Kontrol grubu ile Primer Sjögren Sendromu grubu karşılaştırılması	p değeri
MMP-13	0,278
MMP-9	0,040

Mann-Whitney U Testi'ne göre MMP-13, MMP-9, sedimentasyon, CRP sonuçları için Psöriatik Artrit grubu ile Romatoid Artrit grubu arasında yapılan değerlendirmede istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı. MMP-13, MMP-9, sedimentasyon ve CRP değerleri açısından PsA grubu ile RA grubu arasında yapılan değerlendirme çizelge 4.9'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. MMP-13, MMP-9, sedimentasyon ve CRP değerleri için PsA grubu ile RA grubu arasında yapılan değerlendirme

Psöriatik Artrit grubu ile Romatoid Artrit grubu karşılaştırılması	p değeri
MMP-13	0,232
MMP-9	0,286
Sedimentasyon	0,578
CRP	0,672

Mann-Whitney U Testi'ne göre MMP-13, MMP-9, sedimentasyon sonuçları için Psöriatik Artrit grubu ile Primer Sjögren Sendromu grubu arasında yapılan değerlendirmede istatistiksel olarak anlamlılık bulunmaz iken CRP değerleri istatistiksel olarak anlamlı

bulundu. MMP-13, MMP-9, sedimentasyon ve CRP değerleri açısından PsA grubu ile pSS grubu arasında yapılan değerlendirme çizelge 4.10'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.10. MMP-13, MMP-9, sedimentasyon ve CRP değerleri için PsA grubu ile pSS grubu arasında yapılan değerlendirme

Psöriatik Artrit grubu ile Primer Sjögren Sendromu grubu karşılaştırılması	p değeri
MMP-13	0,704
MMP-9	0,087
Sedimentasyon	0,423
CRP	0,012

Mann-Whitney U Testi'ne göre MMP-13, MMP-9, sedimentasyon, CRP sonuçları için Romatoid Artrit grubu ile Primer Sjögren Sendromu grubu arasında yapılan değerlendirmede istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı. MMP-13, MMP-9, sedimentasyon ve CRP değerleri açısından RA grubu ile pSS grubu arasında yapılan değerlendirme çizelge 4.11'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.11. MMP-13, MMP-9, sedimentasyon ve CRP değerleri için RA grubu ile pSS grubu arasında yapılan değerlendirme

Romatoid Artrit grubu ile Primer Sjögren Sendromu grubu karşılaştırılması	p değeri
MMP-13	0,279
MMP-9	0,273
Sedimentasyon	0,070
CRP	0,066

Hastalık grupları bazında sonuçlar arasındaki nonparametrik korelasyon değerlendirmesi için Spearman Testi kullanıldı.

Spearman Korelasyon Testi'ne göre Kontrol grubu içerisinde MMP-9 ve MMP-13 değerleri arasındaki ilişki istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. Kontrol grubu içerisinde MMP-13 ve MMP-9 korelasyon değerleri çizelge 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Kontrol grubu içerisinde MMP-13 ve MMP-9 korelasyon değerleri

Kontrol grubu	MMP-9 (p değeri)	MMP-13 (p değeri)
MMP-9	-	0,770
MMP-13	0,770	-

Spearman Korelasyon Testi ile Psöriatik Artrit grubu içerisinde MMP-9, MMP-13, sedimentasyon ve CRP değerleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. MMP-13 ile MMP-9 arasındaki korelasyon 0,05 düzeyinde anlamlıdır. Sedimentasyon ile CRP arasındaki korelasyon 0,01 düzeyinde anlamlıdır. Diğer veriler arasındaki ilişki istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. PsA grubu içerisinde MMP-13, MMP-9, sedimentasyon ve CRP korelasyon değerleri çizelge 4.13’de verilmiştir.

Çizelge 4.13. PsA grubu içerisinde MMP-13, MMP-9, sedimentasyon ve CRP korelasyon değerleri

Psöriatik Artrit	MMP-9 p değeri	MMP-13 p değeri	Sedimentasyon p değeri	CRP p değeri
MMP-9	-	0,038	0,142	0,566
MMP-13	0,038	-	0,992	0,753
Sedimentasyon	0,142	0,993	-	0,002
CRP	0,566	0,753	0,002	-

Spearman Korelasyon Testi’ne göre Romatoid Artrit grubu içerisinde MMP-9, MMP-13, sedimentasyon ve CRP değerleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Sedimentasyon ile MMP-9 arasında negatif korelasyon bulunmuş ve bu korelasyon 0,01 düzeyinde anlamlıdır. Diğer veriler arasındaki ilişki istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. RA grubu içerisinde MMP-13, MMP-9, sedimentasyon ve CRP korelasyon değerleri çizelge 4.14’te verilmiştir.

Çizelge 4.14.RA grubu içerisinde MMP-13, MMP-9, sedimentasyon ve CRP korelasyon değerleri

Romatoid Artrit	MMP-9 p değeri	MMP-13 p değeri	Sedimentasyon p değeri	CRP p değeri
MMP-9	-	0,858	-0,010	0,681
MMP-13	0,858	-	0,825	0,606
Sedimentasyon	- 0,010	0,825	-	0,430
CRP	0,681	0,606	0,430	-

Spearman Korelasyon Testi’ne göre Primer Sjögren Sendromu grubu içerisinde MMP-9, MMP-13, sedimentasyon ve CRP değerleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. MMP-13 ile MMP9 arasında negatif korelasyon bulunmuş ve bu korelasyon 0,01 düzeyinde anlamlıdır. Diğer veriler arasındaki ilişki istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. pSS grubu içerisinde MMP-13, MMP-9, sedimentasyon ve CRP korelasyon değerleri çizelge 4.15’te verilmiştir.

Çizelge 4.15. pSS grubu içerisinde MMP-13, MMP-9, sedimentasyon ve CRP korelasyon değerleri

Primer Sjögren Sendromu	MMP-9 p değeri	MMP-13 p değeri	Sedimentasyon p değeri	CRP p değeri
MMP-9	-	-0,009	0,740	0,708
MMP-13	-0,009	-	0,440	0,598
Sedimentasyon	0,740	0,440	-	0,119
CRP	0,708	0,598	0,119	-

Çalışma sonucunda elde ettiğimiz değerlere ilişkin sonuçlar toplu olarak çizelge 4.16’de gösterilmektedir.

Çizelge 4.16. Elde edile değerlerin toplu olarak gösterimi

		MMP-13 (pg/mL)	MMP-9 (pg/mL)	Sedimentasyon (mm/saat)	CRP (mg/dL)
Gruplar	<i>n</i>	Ortalama ± std. sapma			
Primer Sjögren Sendromu (pSS)	20	12,99 ± 18,03	7303,60 ± 538,36	22,39 ± 19,57	5,63 ± 4,34
Romatoid Artrit (RA)	19	14,12 ± 16,45	7433,10 ± 560,85	24,42 ± 15,37	12,70 ± 14,32
Psöriatik Artrit (PsA)	19	9,78 ± 10,45	7639,68 ± 764,30	20,47 ± 11,96	10,62 ± 7,90
Kontrol	15	12,30 ± 14,38	7890,53 ± 1046,44	-	-

Kontrol grubu ile PsA grubu arasında MMP-13 seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p=0,026$). PsA grubunda MMP-13 düzeyi anlamlı olarak azalmıştır.

Kontrol grubu ile pSS grubu arasında MMP-9 seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p=0,040$). pSS grubunda MMP-9 düzeyi anlamlı olarak azalmıştır.

4.3. HPLC Ölçümleri İle Elde Edilen Bulgular

HPLC ile serum MMP düzeylerinin ölçümü için Shimadzu marka HPLC sistemi kullanıldı.

Analiz için HPLC grade saflıkta kimyasal maddeler kullanıldı.

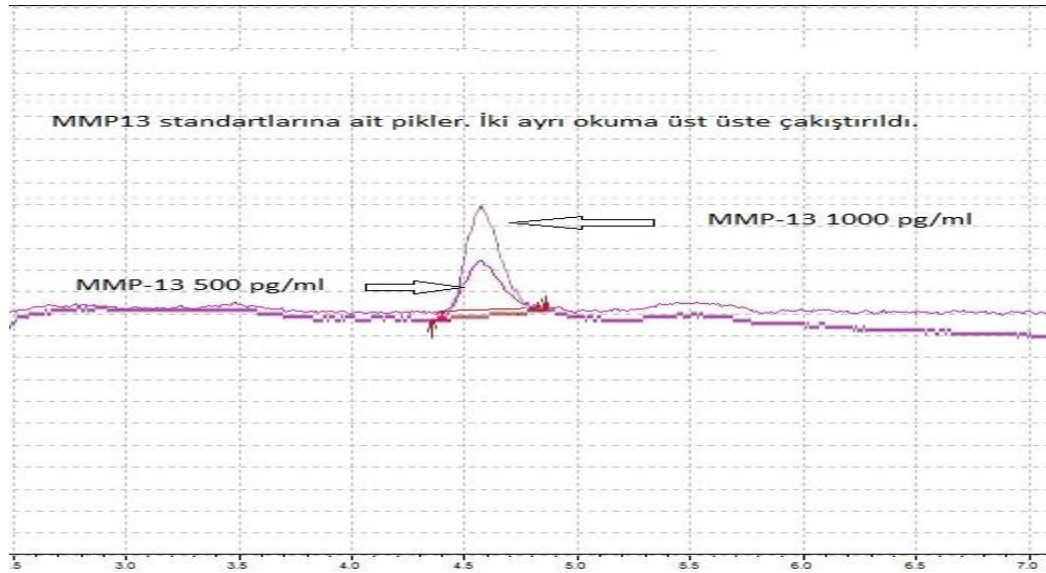
Çalışmada İntersil ODS3 5*4,6*150 mm analitik kolon kullanıldı. İzokratik modda çalışıldı. Mobil faz olarak %60 Asetonitril, %40 Distile su ve %0,01 Trifloroasetik asit karışımı kullanıldı.

MMP standartları metanol ile çözülerek cihaza enjekte edildi.

Örnek serumlar %40'lık perklorik asit ile ekstrakte edilerek cihaza 10 ul enjekte edildi. Akış hızı 0,9 mL/dakika olarak uygulandı. PDA dedektör ile yapılan dalga boyu taramasında en yüksek pikin 205 nm ye ait olduğu gözlemlendi.

Yapılan literatür taramalarında MMP'lerin HPLC'de ölçümüne dair referans bir metot bulunmamaktadır. Yapılan bu ölçümler ilerideki metot geliştirme çalışmaları için bir ön çalışma olabilecektir.

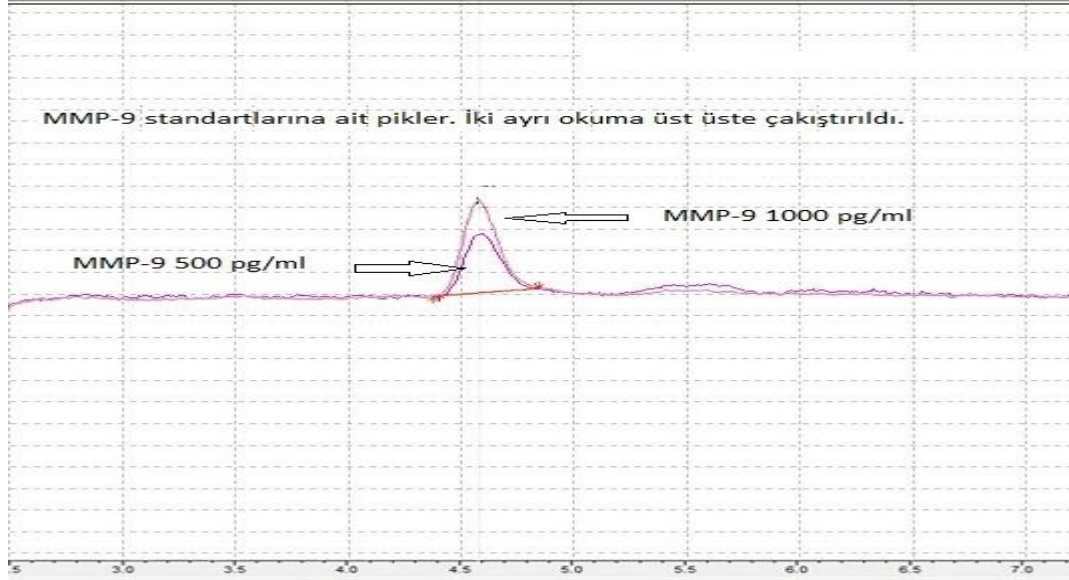
MMP-13 standartı metanol ile çözülerek 1000 ve 500 pg/mL'ye seyreltildi. Standartların cihaza enjeksiyonundan sonra elde edilen kromatogramlar üst üste çakıştırılarak piklerin uyumluluğu gösterildi. Aynı zamanda konsantrasyonlar arasındaki fark ile uyumlu kromatogramlar elde ettik. Bu kromatogramlar şekil 4.1'da gösterilmiştir.



Şekil 4.1. MMP-13 standartının farklı konsantrasyonlardaki değerlerini gösteren kromatogram

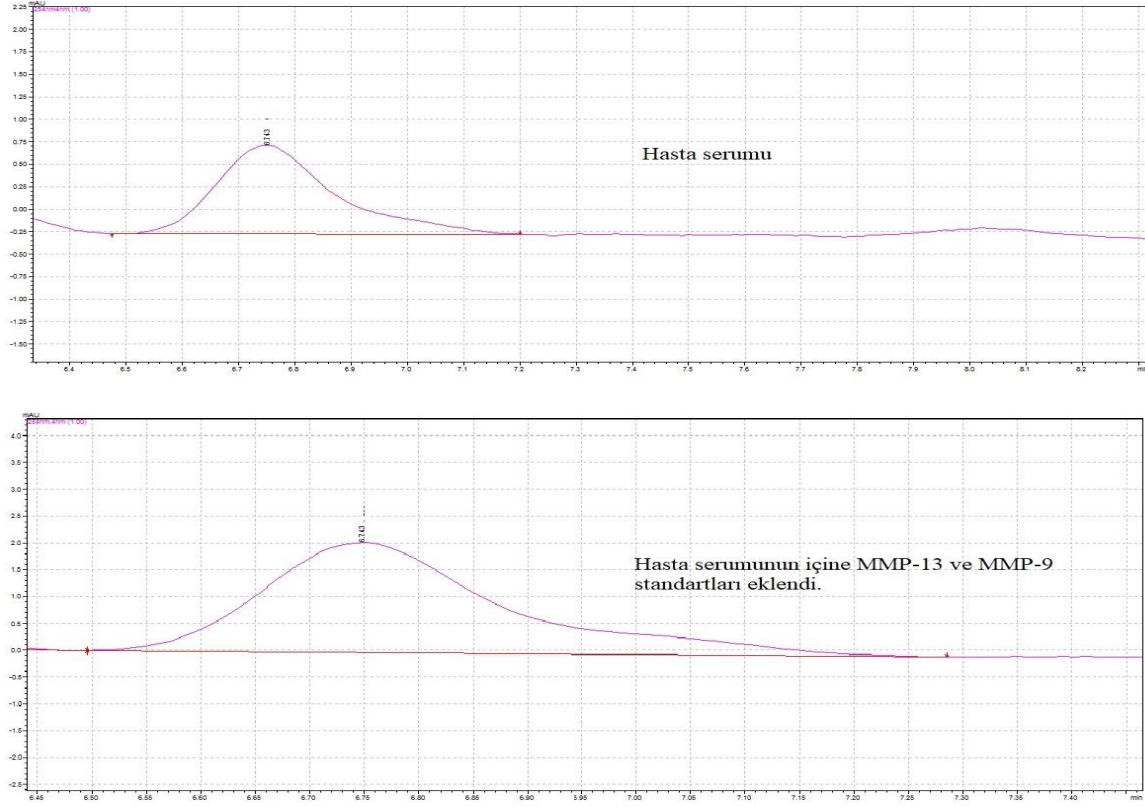
MMP-9 standartı metanol ile çözülerek 1000 ve 500 pg/mL'ye seyreltildi. Standartların cihaza enjeksiyonundan sonra elde edilen kromatogramlar üst üste çakıştırılarak piklerin

uyumluluğu gösterildi. Aynı zamanda konsantrasyonlar arasındaki fark ile uyumlu kromatogramlar elde ettik. Bu kromatogramlar şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. MMP-9 standartının farklı konsantrasyonlardaki değerlerini gösteren kromatogram

MMP standartları ile yaptığımız çalışmalar sonucunda elde ettiğimiz pikleri esas alarak hasta serum örnekleri çalışıldı. Bunun yanı sıra aynı hasta serumu içerisine MMP-13 ve MMP-9 standartlarını ekleyerek çalıştık. Hasta numunesinden yapılan çalışmada MMP piki görüldüğü halde MMP-13 veya MMP-9 ayrımı yapılamamıştır. Bu kromatogramlar şekil 4.3’te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Hasta serumu ve MMP-13 ve MMP-9 standartları eklenerek yapılan ölçümlere ait kromatogramlar

Elde edilen kromatogramları incelediğimizde MMP-13 ve MMP-9 standartları ile yapılan ölçümlerde çalışmalar arasında piklerin alıkonma zamanlarında bir fark gözlenmemiştir. Bu durum elde edilen piklerin total MMP'ye ait olduğunu düşünmemizi sağlamıştır. Ardından MMP-13 ve MMP-9 standartlarının birlikte hasta serumuna eklenerek yapıldığı çalışmada elde ettiğimiz pikler de bu sonucu doğrular niteliktedir. Hasta numunesi ile yaptığımız çalışma sonucunda elde ettiğimiz kromatogramlar ile ELİZA sonucu karşılaştırıldığında benzer yüksek MMP düzeyi saptanmıştır.



5. TARTIŞMA

Romatolojik hastalıklar kas, iskelet sistemi, eklemler ve dolaylı olarak da iç organları ve bütün vücudu etkileyebilen bir hastalık grubudur. Romatizmal hastalıkların sebebi geçmişten beri çok net anlaşılamamıştır. Genetik yatkınlıklar, çevresel faktörler ve enfeksiyonlar gibi nedenlerle bağışıklık sisteminde meydana gelen değişikliklerin tetiklemesiyle ortaya çıkmaktadırlar. Romatizmal hastalık etiyolojisinin zamanla daha iyi bir şekilde anlaşılması ile birçok romatizmal hastalık için nispeten asemptomatik bir hastalık gelişim dönemi olduğu ve bu hastalıkların ilerideki riskini tahmin etmek için kullanılabilen biyolojik belirteçlerin anlamlı olabileceği yönünde elde edilen bilgiler göz önüne alındığında romatolojik hastalıkların önlenabilir hastalık listesine dahil olabileceği umut edilebilmektedir [46].

Birçok hastalıkta olduğu gibi romatizmal hastalıkların tanısında da iyi bir anamnez ve fizik muayeneden sonra laboratuvar incelemeleri gelir. Doğrudan tanıya götüren bir laboratuvar testi nadirdir. İyi bir anamnez ve fizik muayene ile tanı koyma sürecinin neredeyse %70 kadarı katedilebilir. Laboratuvar incelemelerinin yeri, bu süreç sonrası, ayırıcı tanıda yardımcı olmaktır. Romatizmal hastalıklara yönelik kesin sonuç verebilecek test serisi önerilememektedir [59].

Biyolojik belirteçler birkaç şekilde tanımlanabilir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından önerilen basit bir tanım; 'Hastalığın riskini veya varlığını değerlendirmek için kullanılan herhangi bir ölçülebilir tanı göstergesi' şeklindedir. Bununla birlikte, ABD Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH), bir biyolojik belirteci 'normal biyolojik, fizyolojik, patolojik süreçlerin veya terapötik müdahaleye karşı farmakolojik tepkilerin göstergesi olarak değerlendirilebilen ve nesnel olarak ölçülebilen bir özellik' şeklinde daha kapsamlı bir tanımlamayı önermiştir [60].

Günümüzde toplum, yapılan çalışmalar sayesinde, oto-inflamatuvar, otoimmün veya doku hasar mekanizmalarının neden olduğu kronik romatizmal bir hastalığın patogenezindeki en erken safhalara müdahale etme kabiliyeti, hastalık belirtilerini ve sonuçlarını önleme, yaşam kalitesini artırma, komorbidite ve maliyetleri sınırlama potansiyeline sahiptir. Hastalıkların daha erken tanımlanması için sınıflandırma ve tanı ölçütlerinin değiştirilmesi ve erken teşhis ve tedavi ile birlikte kullanılan çok etkili hedef tedavilerin ortaya çıkması, her zaman

hastalıkların tedavisi veya önlenmesiyle sonuçlanmasa da bazen başarılı bir şekilde ilaçsız remisyon durumlarını sağlamıştır. Örneğin romatoid artrit (RA), etkilenen çok az insan uzun süre ilaçsız remisyonunda başarılı olabilir. Bu hastalıkları çok erken tanımlama ve tarama yeteneği, hastalığın tam olarak ortaya çıkmasını önlemek için başarılı bir müdahale şansı verebilir [61].

Romatoid artrit ve psöriatik artrit (PsA) gibi romatizmal hastalıklar, çoğunlukla geri dönüşümsüz eklem hasarına yol açan kronik bir artrit formuyla karakterize edilen sistemik inflamatuvar durumlardır. Eklem yaralanmalarını azaltmak veya önlemek için erken tedavi gereklidir. Bununla birlikte, erken teşhis zordur ve hâlihazırda hangi hastanın ilerleyici, erozif hastalık geliştireceğini veya klinik özelliklerine göre belirli bir tedaviden fayda sağlayabileceklerini tahmin etmek mümkün değildir. Bu nedenle, biyolojik belirteçlerin RA ve PsA gibi romatolojik hastalıklarda erken tanı konabilmesine yardımcı ve prognozu tahmin etmede kullanılabilir olması gerekmektedir [60].

Romatizmal hastalıklar nüfusun büyük bir bölümünü etkilemektedir. Sjögren sendromu görülme sıklığı yaklaşık %0,1 ile %0,6 arasında iken RA genel olarak %1-2 olup, PsA'in görülme sıklığını ise yaklaşık %0,04–0,1 arasında değiştirmektedir. Hastalıkların etyopatogenezi tam olarak açıklanamamış olmakla beraber genetik ve çevresel faktörlerin etkisiyle ve ardından otoimmüitenin aktifleşmesiyle kronik seyirli inflamatuvar hastalık halini almaktadır. Matriks metalloproteinazların (MMP) keşfedildikleri zamandan beri hücre dışı matriks (ECM) fizyolojisi üzerindeki rolleri ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. ECM fizyolojisi üzerindeki rolleri inflamasyonda aktif bir rol üstlenen sitokinler ile olan etkileşimleri sebebiyle daha önemli hale gelmiştir. Sitokinler ile olan etkileşimleri neticesinde immünite, inflamasyon ve doğal olarak hastalıkların seyrinde etkili ve aktif bir rol üstlendikleri anlaşılmıştır.

Metalloproteinazlar inflamatuvar yanıt sırasındaki etkin rollerini inflamasyonun başlatılması ve devam etmesi üzerindeki moleküler etkileri sayesinde sürdürmektedir. Proteolitik aktivite, pro ve anti-inflamatuvar kaskadların yanı sıra doku yeniden biçimlendirme sürecini de düzenlemektedir. Kemokinlerin, sitokinlerin ve bunların reseptörleri ile olan etkileşim bu kritik sinyalleri aktive edebilir, etkisiz hale getirebilir veya çift taraflı etkiler gösterebilir. Ayrıca, sitokin ve metalloproteinaz dengesinin birinin diğerini etkileyebileceği ve bu nedenle birbirlerine bağlı oldukları görülmektedir. Bu, MMP'ların matriks/kartilajı bozma

yeteneğiyle birlikte, perisellüler enzimlerin inflamatuvar süreçlerdeki karmaşık rolünü de vurgular [41].

Matriks metalloproteinazlar hem hücre-hücre hem de hücre-hücre dışı matriks etkileşimlerinin düzenlenmesinde anahtar oyuncular olarak kabul edilmektedir. Hücre ve dokulara sadece yapısal destek sağlamakla kalmayıp aynı zamanda hücre proliferasyonu, farklılaşma, migrasyon, yapışma ve doku morfogenezisi gibi pek çok biyolojik aktivitede rol alan ECM sentez, parçalanma ve yeniden yapılanma süreçlerindeki hücre regülasyonu, dönüşümü gibi etkilerini MMP'lar aracılığı ile gerçekleştirir. Geniş faaliyet yelpazesi ve ifade alanlarından dolayı, hastalıkların tedavisinde terapötik hedef veya teşhisleri kolaylaştırmada biyolojik belirteç hedefi olarak potansiyelinin aydınlatılması, farklı hücresel konumlardaki ve farklı hastalık aşamalarındaki rollerinin dikkatle analiz edilmesi önem taşımaktadır [3].

Matriks metalloproteinazlar, embriyo implantasyonundan doku nekrozuna kadar, bazal zar da dahil olmak üzere, hücre dışı matriksin yeniden modellenmesini içeren hemen hemen her biyolojik süreçte doğrudan etkilenmektedir. Bunun bir sonucu olarak, MMP'ların değişmiş ekspresyonu ve aktivite seviyeleri, çeşitli patofizyolojik olaylar dizisinde de rol oynamaktadır. Bu nedenle, MMP'ların yapısını, fizyolojisini, substrat ve inhibitörlerini belirlemek veya tasarlamak için çaba harcanmaktadır [7].

Primer Sjögren Sendromu, RA ve PsA'de kollejenazlar ve jelatinazlar hastalıkların patofizyolojileri açısından geçerli bir öneme sahiptirler. Yapılan birçok çalışma da farklı MMP türlerinin bu hastalıkların patogenezinde ki rolleri açıklanmaya çalışılmıştır. Biz çalışmamızda, daha önce yapılan çalışmalardan edindiğimiz bilgiler ışığında MMP-13 ve MMP-9'u ele aldık.

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Romatoloji Bilim Dalı Polikliniği'nde takipli hastalardan gönüllü olarak katılmayı kabul eden pSS, RA ve PsA teşhisli hastaları çalışmamıza dahil ettik. Alınan serum örneklerinden ELİZA yöntemi ile MMP-13 ve MMP-9 seviyelerini ölçtük. Elde ettiğimiz verileri istatistiksel olarak değerlendirdik.

Romatolojik hastalıklar ve bunlarla ilişkili MMP seviyelerine yönelik yapılan çok sayıda çalışma vardır. Fakat bu çalışmaların çoğunda sınırları net olarak belli olan sonuçlar elde

edilememiş ve genel olarak hastalık ile MMP türü arasında bir ilişkinin varlığı şeklinde yorumlar ve öneriler getirilmiştir. Bizim çalışmamızda da kontrol grubu, pSS, RA ve PsA grupları ile MMP-13 ve MMP-9 seviyeleri arasında bir ilişki bulunmaktadır.

MMP seviyelerinin yanı sıra hastalıkların aktivitesi ile ilgili olarak sedimantasyon ve C-reaktif protein (CRP) düzeyleri de çalışıldı. Hastalıklardan pSS grubu ile PsA grubu arasında CRP seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p=0,012$).

Elde ettiğimiz verileri grupların kendi içinde de istatistiksel olarak değerlendirdiğimizde pSS hastalarında MMP-13 ve MMP-9 seviyeleri arasında negatif korelasyon bulundu ve bu korelasyon 0,01 düzeyinde anlamlıdır. RA hastalarında ise sedimantasyon ile MMP-9 arasında negatif korelasyon bulundu ve bu korelasyon 0,01 düzeyinde anlamlıdır. Son olarak PsA grubunda MMP-13 ile MMP-9 arasında korelasyon bulundu ve bu 0,05 düzeyinde anlamlıdır.

Romatoid artrit ve PsA, hem eklem işlevselliğini engelleyen kıkırdağın parçalanmasını içeren hem de kronik inflamatuvar romatizmal hastalıklardır. Kıkırdağın ECM bileşenlerinin parçalanmasından sorumlu altta yatan molekülerin fizyolojileri genel olarak hala belirsizdir, ancak kondrositler veya inflamatuvar hücreler tarafından salınan proteolitik enzimlerin rolünden bahsedilmektedir. Giannelli ve ark.'nın yaptığı bir çalışmanın sonuçlarına göre, RA ve PsA'li hastalarda MMP-2'nin sadece gizli formda, MMP-9'un latent ve aktif formda bulunduğu tespit edilmiştir. Her iki jelatinazın da sinoviyal sıvıda serumdan daha yüksek miktarlarda olduğu tespit edilmiştir [62].

Matriks metalloproteinazlar, agreganlar ve bunların oluşturduğu parçalanma ürünleri, kıkırdağın hasarlı bölgelerinde lokalizedir. Yapılan çalışmalarda osteoartrit (OA) veya RA'li kişilerin sinovyal sıvılarında ve kıkırdakta farklı MMP türleri tespit edilmiştir. OA ve RA kıkırdağında MMP-13 ekspresyonu ve bu enzimin tip II kollajeni daha etkin bir şekilde parçalayabilme kabiliyeti, bu enzim için kıkırdağın parçalanmasında büyük bir rol oynadığını düşündürmektedir. Farelerde yapılan bir çalışmada kıkırdakta yapısal olarak aktif MMP-13'ün doğum sonrası aşırı ekspresyonunun, diz eklemlerinde OA benzeri değişiklikler meydana getirdiği ve MMP-13 kodlayan genin susturulmasının kıkırdağı uyarılmış OA'e karşı koruduğu belirtilmiştir [63, 73]. Bizim çalışmamızda da MMP-13 düzeyleri için kontrol grubu ile PsA grubu arasında anlamlı bir fark bulundu ($p=0,026$)

Konttinen ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada ise, artiküler sert dokuların üstündeki pannus dokusu saldırgan bir fenotipe sahiptir ve kollajenaz-3 (MMP-13) ile bunun endojen indükleyicileri ve aktivatörlerini içermektedir. Yapılan çalışma ile kollajenaz-3'ün nihai varlığı ve pannus-kıkırdak bileşkesinde ki regülasyonu analiz edilmiştir. Pannus-sert doku bileşkesindeki pannositlerde kollajenaz-3 mRNA (in situ hibridizasyon ile) ve enzim proteini (immünofloresan boyama ile) bulunmuştur. Ayrıca prokollajenaz-3 aktivatörleri de pannus-sert doku kavşağında bulunmuştur [64].

Otso Lindy ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada ise MMP-13, sinovyal astar, stroma ve vasküler endotel hücrelerindeki fibroblast ve makrofaj benzeri mononükleer hücrelerde tespit edilmiştir. Sinovyal stromada bu hücrelerdeki MMP-13'ün genel ifadesi RA ve OA, hasta numuneleriyle karşılaştırıldığında yüksek bulunmuştur [65].

Romatoid artritli hastalarda, kıkırdığın ve hücre dışı matriksin bozunması, etkilenen kısımlarda tahrip ve fonksiyon kaybına neden olur. PsA genellikle RA'e göre daha az yıkıcı bir hastalıktır, ancak zaman zaman bazı eklemlerde görülen hasar RA'de olduğu gibi agresif olabilir. 2001'de Alenius GM ve ark.'nın yaptığı bir çalışma, PsA hastalarından, RA hastalarından ve sağlıklı kontrollerden alınan sinovyal sıvı ve serumdaki MMP-9 düzeylerini karşılaştırılmıştır. Sinovyal sıvıda ki MMP9 konsantrasyonları, PsA ve RA'li hastalarda kontrollere kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Serumdaki MMP-9 seviyeleri ise tüm gruplarda benzer bulunmuştur [66].

Birçok çalışma ile artritli hastalarda eklem yıkımında MMP'ların rolü araştırılmıştır. Kollajenazlar (MMP-1 ve MMP-13), RA ve OA'de kollajen parçalanmasında önemli bir rol oynamaktadır; aynı zamanda jelatinazlar da (MMP-2 ve MMP-9) eklemlerde nonkollajen matriks bileşenlerini parçalayarak artritte rol oynayabilir. Bununla birlikte, MMP'lar artrit anjiyogenezinde de rol oynayabilir. RA, hastalığın patogenezinde önemli olduğu görülen aşırı anjiyogenez ile karakterizedir. Kim ve ark.'nın yaptığı çalışmanın sonuçları dolaylı olarak RA ve OA anjiyogenezinde MMP-9 ve MMP-13'ün MMP-2 ve MMP-1'den daha önemli rol oynayabileceğini düşündürmektedir [67].

Hulkkonen ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada, genetik olarak kesin tanı almış pSS'lu hastalarda MMP-9'un serum düzeyleri, olası pSS olan hastalardan daha yüksek olduğu gösterilmiştir [68]. Brejchova ve ark.'nın yapmış oldukları bir çalışmada ise pSS tanısı

konan iki hastadan alınan erimiş kornea numunelerindeki geniş MMP serilerinin analizinde artmış MMP ekspresyonu ve artmış MMP aktivitesi gözlenmiştir [69]. Uemura ve ark.'nın ise yaptığı çalışmada pSS'lu hastaların tükürüklerindeki MMP-9 seviyesinin anlamlı olarak arttığı gözlemlenmiştir [70]. Bizim çalışmamızda da MMP-9 düzeyleri, kontrol grubu ile pSS grubu arasında yapılan istatistiksel değerlendirmede anlamlı düzeyde farklıydı ($p=0,040$). Fakat bu fark, bu çalışmaların aksine azalma yönündeydi.

Geniş faaliyet yelpazesi ve ifade alanlarına sahip olan MMP ailesi birçok hastalığın patofizyolojisinde etkin bir role sahiptir. MMP'ların üstlendikleri roller kadar yapıları da kompleksdir. Böyle kompleks bir yapıya sahip olan bir biyomolekülün analizi de çok kolay olmamaktadır. Ölçüm için farklı analiz yöntemleri kullanılmaktadır. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanı ELİZA yöntemidir. Fakat bilindiği üzere bu yöntemin de hassasiyet ve özgüllük ile ilgili bazı dezavantajları vardır. Çalışmamızda pSS, RA ve PsA hasta gruplarında MMP-13 ve MMP-9 düzeyleri ELİZA yöntemi ile çalışılarak sonuçlar istatistiksel değerlendirmeye tabi tutuldu. Bunun yanında HPLC cihazı ile de çalışma yapıldı.

Yapılan literatür taramalarında MMP'ların HPLC'de ölçümüne dair referans bir metot bulunmamaktadır. MMP-13 ve MMP-9 standartlarının farklı konsantrasyonlardaki ölçümlerinden elde ettiğimiz kromatogramların konsantrasyonlar ile doğrusal bir korelasyona sahip olduğunu gözlemledik. Tüm bu çalışmalar sonucunda elde edilen kromatogramları incelediğimizde MMP-13 ve MMP-9 standartları ve hasta serumu ile yapılan ölçümlerde piklerin alıkonma zamanlarında bir fark gözlenmezken pik alanlarının değiştiği gözlemlendi. Bu durum elde edilen piklerin total MMP'a ait olduğunu düşünmemizi sağlamıştır.

Sonuç olarak; pSS, RA, PsA ve hatta birçok hastalıkta MMP-13, MMP-9 ve diğer MMP türleri etkin bir role sahiptir. MMP'lar kompleks moleküllerdir ve hastalıkların patogeneğinde bir biyobelirteç veya terapötik hedef olarak gösterilmesi mümkündür. Fakat bu amaca yönelik daha fazla çalışma yapılmalıdır. MMP düzey ölçümlerinin daha kolay, yaygın ve etkin olabilmesi için analiz yöntemlerini geliştirmeye ihtiyaç vardır. Bu çalışmanın ilerideki metot çalışmalarına ışık tutacağını düşünüyoruz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda Primer Sjögren Sendromlu (pSS) hastalarda matriks metalloproteinaz-13 (MMP-13) düzeylerinin hastalık aktivitesi ile ilişkisini açıklamaya yönelik araştırmalar yaptık. pSS ile karşılaştırmak amacıyla pozitif kontrol olarak Romatoid Artrit (RA) ve Psöriatik Artrit (PsA) hastalıklarını, negatif kontrol olarak da sağlıklı kontrol gruplarını seçtik. Çalışmaya MMP-9 düzeyleri de dahil edildi.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar neticesinde; kontrol grubu ile PsA grubu arasında MMP-13 seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p=0,026$).

Ayrıca kontrol grubu ile pSS grubu arasında ise MMP-9 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p=0,040$) fakat bu durum literatürdeki pSS ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile uyumluluk göstermemektedir.

Metalloproteinaz düzeylerinin yanı sıra hastalıkların aktivitesi ile ilgili bilgi edinmek için akut faz reaktan parametrelerinden C-reaktif protein (CRP) düzeyleri ve sedimentasyon düzeyleri çalışıldı. Hastalıklardan pSS grubu ile PsA grubu arasında CRP seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu.

Çalışma gruplarının kendi içinde yapılan istatistiksel analizi sonucunda; pSS hastalığında MMP-13 ve MMP-9 seviyeleri arasında negatif korelasyon bulundu ve bu korelasyon 0,01 düzeyinde anlamlıdır.

RA hasta grubunda ise sedimentasyon ile MMP-9 arasında negatif korelasyon bulundu ve bu korelasyon 0,01 düzeyinde anlamlıdır.

Son olarak PsA hasta grubunda ise MMP-13 ile MMP-9 arasında pozitif korelasyon bulundu ve bu 0,05 düzeyinde anlamlıdır.

Bu çalışmamızda; pSS, RA ve PsA hastalıklarının patofizyolojileri ile MMP-13 ve MMP-9 seviyeleri arasındaki ilişkinin incelenmesinin yanında MMP düzeyleri ELİZA yöntemi dışında HPLC yöntemi ile de çalışıldı. Ölçümlerden elde ettiğimiz kromatogramları incelediğimizde MMP-13 ve MMP-9 ayrımı yapamamak da total MMP'ın ölçülebileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak; pSS, RA, PsA ve hatta birçok hastalıkta MMP-13, MMP-9 ve diğer MMP türleri etkin bir role sahiptir. MMP'lar kompleks moleküllerdir ve hastalıkların patogeneğinde bir biyobelirteç veya terapötik hedef olarak gösterilmesi mümkündür. Fakat bu amaca yönelik daha fazla çalışma yapılmalıdır. MMP düzey ölçümlerinin daha kolay, yaygın ve etkin olabilmesi için analiz yöntemlerini geliştirmeye ihtiyaç vardır. Bu çalışmanın ilerideki metod geliştirme çalışmalarına ışık tutacağını düşünüyoruz.



KAYNAKLAR

1. Conant, K., Gottschall, P.E. (2005). *Matrix metalloproteinases in the central nervous systems*. London: Imperial College Press.
2. Zitka, O., Kukacka, J., Krizkova, S., Huska, D., Adam, V., Masarik, M., Prusa, R. and Kizek, R. (2010). Matrix metalloproteinases. *Current Medicinal Chemistry*, 17, 3751-3768.
3. Murphy, G., Nagase, H. (2008). Progress in matrix metalloproteinase research. *Molecular Aspects of Medicine*, 29, 290–308.
4. Nas. K. (2015). *Psoriatik artritli hastalarda matriks metalloproteinazların sitokin ve kemokinler ile ilişkisi*. Doktora tezi, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıklar (İmmünoloji) Anabilim Dalı, Diyarbakır.
5. Şahin, M. (2014). *Sjögren Sendromu. Romatoloji kitabı*. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıklar (Romatoloji) Anabilim Dalı, Ankara.
6. Klippel, J.H., Stone, J.H., Crofford, L.J. and White, P.H. (2008). *Primer on the rheumatic diseases* (Thirteenth Edition). USA: Springer Science+Business Media, LLC
7. Sagi, I., Gaffney, J.P. (2015). *Matrix metalloproteinase biology*. New Jersey: Wiley-Blackwell.
8. Aksun, S.A., Özmen, D. and Bayındır, O. (2001). Metalloproteinazlar, inhibitörleri ve ilişkili fizyolojik ve patolojik durumlar. *Türkiye Klinikleri Journal Medicine Science*, 21(4),332-42
9. Mecham, R.P. (2011). *The extracellular matrix: an overview*. London, New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
10. Okada, Y. (2016). *Kelley and firestein's textbook of rheumatology* (Tenth Edition). Philadelphia: Elsevier. Chapter 8:106-125.
11. Lagente, V., Boichot, E. (2008). *Matrix metalloproteinases in tissue remodelling and inflammation*. Berlin: Birkhäuser Verlag AG.
12. Schwab, M. (2011). *Encyclopedia of cancer* (Third Edition). New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg .
13. Visse, R., Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation Research*, 92(8), 827-39.
14. Keleş, D. (2009). *Kolorektal kanser hastalarında kazein zimografi ve in situ kazein zimografi yöntemi ile matriks metalloproteinaz-7 aktivitesinin ve lokalizasyonunun belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir.

15. Vandenbroucke, R.E., Libert, C. (2014). Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition?. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(12), 904–927.
16. Şen, F. (2012). *Matriks metalloproteinaz-3 (MMP-3) ve matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) gen polimorfizminin akut miyokard infarktüsüne olası etkileri*. Uzmanlık Tezi, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Mersin.
17. Clark, I.M. (2001). *Matrix metalloproteinase protocols*. New Jersey: Humana Press.
18. Parks, W.C., Mecham, R.P. (1998). *Matrix metalloproteinases*. USA: Academic Press.
19. Kapoor, C., Vaidya, S., Wadhwani, V., Hitesh, Kaur, G. and Pathak, A. (2016) Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs). *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 12(1), 28-35.
20. Clendeninn, N.J., Appelt, K. (2001). *Matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy*. New Jersey: Humana Press Inc.
21. Öncel, M. (2012). Matriks metalloproteinazlar ve kanser. *European Journal of Basic Medical Sciences*, 2(3), 91-100.
22. Öztürk, Ö.G. (2013). Matriks metalloproteinaz enzim ailesi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 22(2), 209-220.
23. Güzel, S. (2008). *Akut miyokard infarktüsünde serum matriks metalloproteinaz9 düzeyleri*. Uzmanlık Tezi, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya, İstanbul.
24. Rundhaug, J.E. (2005). Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9(2):267-85.
25. Dinç, M. (2012). *Ailesel Akdeniz Ateş’li hastalarda serum matriks metalloproteinazlarının önemi*. Tıpta Uzmanlık Tezi. GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi İç Hastalıkları Servis Şefliği, İstanbul.
26. Stamenkovic, I. (2003). Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *Journal of Pathology*, 200, 448–464.
27. Reel, B. (2006). Matriks metalloproteinaz enzimleri ve Ateroskleroz. *Türkiye Klinikleri Journal Medicine Science*, 26, 527-537.
28. Clark, I.M. (2010). *Matrix metalloproteinase protocols* (Second Edition). London: Humana Press Inc.
29. Overall, C.M. (2002). Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity. *Molecular Biotechnology*, 22(1), 51-86.
30. Löffek, S., Schilling, O. and Franzke, C.W. (2011). Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *European Respiratory Journal*, 38, 191-208.

31. Murphy, G., Knäuper, V., Atkinson, S., Butler, G., English, W., Hutton, M., Stracke, J. and Clark, I. (2002). Matrix metalloproteinases in arthritic disease. *Arthritis Research*, 4 (suppl 3), S39-S49.
32. Rivera, S., Khrestchatisky, M., Kaczmarek, L., Rosenberg, G.A. and Jaworski, D.M. (2010). Metzincin Proteases and their Inhibitors, Foes or Friends in Nervous System Physiology?. *Neurosci*, 30(46), 15337–15357.
33. Greenlee, K.J., Werb, Z. and Kheradmand, F. (2007). Matrix Metalloproteinases in Lung: Multiple, Multifarious, and Multifaceted. *Physiol Rev*, 87(1), 69-98.
34. Hidalgo, M., Eckhardt, S.G. (2001). Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(3), 178-93.
35. Burrage, P.S., Mix, K.S. and Brinckerhoff, C.E. (2006). Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Frontiers in Bioscience*, 1(11), 529-43.
36. Tetlow, L.C., Adlam, D.J., and Woolley, D.E. (2001). Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis & Rheumatism*, 44(3), 585-594.
37. Leeman, M.F., Curran, S. and Murray, G.I. (2002). The structure, regulation, and function of human matrix metalloproteinase-13. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 37(3), 149-66.
38. Knäuper, V., López-Otin, C., Smith, B., Knight, G. and Murphy, G. (1996). Biochemical characterization of human collagenase-3. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(3), 1544-50.
39. Zhang, X., Wang, J., Liu, M., Wang, S., Zhang, H. and Zhao, Y. (2016). Cloning, expression, purification, and characterization of the catalytic domain of sika deer MMP-13. *Protein Expression and Purification*, 127, 16-21.
40. Lauer-Fields, J.L., Minond, D., Chase, P.S., Baillargeon, P.E., Saldanha, S.A., Stawikowska, R., Hodder, P. and Fields, G.B. (2009). High throughput screening of potentially selective MMP-13 exosite inhibitors utilizing a triple-helical FRET substrate. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(3), 990-1005.
41. Mohammed, F.F., Smookler, D.S., Khokha, R. (2003). Metalloproteinases, inflammation, and rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 62(Suppl 2), 43–47.
42. Vandenbroucke, R. E., Dejonckheere, E., Van Hauwermeiren, F., Lodens, S., De Rycke, R., Van Wonterghem, E., and Libert, C. (2013). Matrix metalloproteinase 13 modulates intestinal epithelial barrier integrity in inflammatory diseases by activating TNF. *European Molecular Biology Organization (EMBO) Molecular Medicine*, 5(7), 1000-1016.
43. Konttinen, Y.T., Ainola, M., Valleala, H., Ma, J., Ida, H., Mandelin, J., Kinne, R.W., Santavirta, S., Sorsa, T., López-Otín, C. and Takagi, M. (1999). Analysis of 16 different matrix metalloproteinases (MMP-1 to MMP-20) in the synovial membrane:

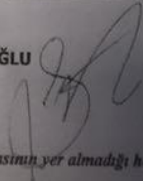
- different profiles in trauma and rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 58(11), 691-7.
44. Fernandez-Patron, C., Zouki, C., Whittall, R.M., Chan, J.S., Davidge, S.T. and Filep, J. (2002). Methods for Analysis of Matrix Metalloproteinase Regulation of Neutrophil-Endothelial Cell Adhesion. *Biological Proceed Online*, 28(4),38-48.
 45. Yoshihara, Y., Nakamura, H., Obata, K., Yamada, H., Hayakawa, T., Fujikawa, K. and Okada, Y. (2000). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 59(6), 455–461.
 46. Finckh, A., & Deane, K. D. (2014). Prevention of rheumatic diseases: strategies, caveats, and future directions. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 40(4), 771-785.
 47. Turgay, M. (2014). *Romatolojik hastalıkların tanısında kullanılan laboratuvar testleri. Romatoloji kitabı*. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıklar (Romatoloji) Anabilim Dalı, Ankara.
 48. Nikolov, N.I., Illei, G.G. (2009). Pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Current Opinion in Rheumatology*, 21(5), 465–470.
 49. Ramos-Casals, M., Font, J. (2005). Primary Sjogren's syndrome: current and emergent aetiopathogenic concepts. *Rheumatology*, 44,1354–1367.
 50. Holmdahl, R. (2006). *The hereditary basis of rheumatic diseases*. Switzerland: Birkhäuser Verlag.
 51. Hamuryudan, V. (2003). *Romatoid artrit*. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi sürekli tıp eğitimi etkinlikleri. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Romatizmal Hastalıklar Sempozyumunda sunuldu, İstanbul.
 52. Yaşar Bilge, N.Ş., Kılıç, S., Bilge, U. and Bilgin, M. (2016). Romatoid artrit hastalarında hastalık aktivitesi ile alerjik hastalık sıklığı ilişkisinin değerlendirilmesi. *Ankara Medical Journal*, 16(4),332-8.
 53. Kınıklı, G. (2014). *Romatoid artrit. Romatoloji kitabı*. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıklar (Romatoloji) Anabilim Dalı, Ankara.
 54. Kınıklı, G. (2014). *Psöriyatik artrit. Romatoloji kitabı*. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıklar (Romatoloji) Anabilim Dalı, Ankara.
 55. Crowther, J.R. (2000). *The ELISA guidebook*. New Jersey: Humana Press Inc.
 56. IDEXX Laboratories. (2013). *ELISA technical guide*. USA: IDEXX Laboratories.
 57. Aguilar, M.I. (2004). *HPLC of peptides and proteins methods and protocols*. New Jersey: Humana Press Inc.
 58. Snyder, L.R., Kirkland, J.J. and Glajch, J.L. (2012). *Practical HPLC method development* (Second Edition). Canada: John Wiley & Sons, Inc.

59. Özdoğan, H. (2003). Romatizmal hastalıklarda laboratuvar. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi sürekli tıp eğitimi etkinlikleri. *Romatolojik Hastalıklar Sempozyum Dizisi* 34, 51-54.
60. Verheul, M.K., Fearonb, U., Trouwa, L.A. and Veale, D.J. (2015). Biomarkers for rheumatoid and psoriatic arthritis. *Clinical Immunology*, 161, 2–10.
61. Bykerk, V.P., Costenbader, K.H. and Deane, K. (2014). Preclinical rheumatic disease. *Preclinical Rheumatic Disease*, 40 xv–xviii.
62. Giannelli, G., Erriquez, R., Iannone, F., Marinosci, F., Lapadula, G. and Antonaci, S. (2004). MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 levels in patients with rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 22, 335-338.
63. Goldring, M.B., Culley, K.L., Wondimu, E. and Otero, M. (2014). *Kelley and firestein's textbook of rheumatology*, Philadelphia: Elsevier.
64. Konttinen, Y.T., Salo, T., Hanemaaijer, R., Valleala, H., Sorsa, T., Sutinen, M., Ceponis, A., Xu, J.W., Santavirta, S., Teronen, O. and López-Otín, C. (1999). Collagenase-3 (MMP-13) and its activators in rheumatoid arthritis: localization in the pannus-hard tissue junction and inhibition by alendronate. *Matrix Biology*, 18(4), 401-12.
65. Lindy, O., Konttinen, Y.T., Sorsa, T., Ding, Y., Santavirta, S., Ceponis, A. and López-Otín, C. (1997). Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3) in human rheumatoid synovium. *Arthritis & Rheumatism*, 40(8),1391-9.
66. Alenius, G.M., Jonsson, S., Wållberg Jonsson, S., Ny, A. and Rantapää Dahlqvist, S. (2001). Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in patients with psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. *Clinical Experiment Rheumatol*, 19(6), 760.
67. Kim, K. S., Choi, H. M., Lee, Y. A., Choi, I. A., Lee, S. H., Hong, S. J., and Yoo, M. C. (2011). Expression levels and association of gelatinases MMP-2 and MMP-9 and collagenases MMP-1 and MMP-13 with VEGF in synovial fluid of patients with arthritis. *Rheumatology International*, 31(4), 543-547.
68. Hulkkonen, J., Pertovaara, M., Anttonen, J., Pasternack, A., Hurme, M., Pöllänen, P. and Lehtimäki, T. (2004). Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) gene polymorphism and MMP-9 plasma levels in primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology*, 43,1476–1479.
69. Brejchova, K., Liskova, P., Hrdlickova, E., Filipec, M. and Jirsova, K. (2009). Matrix metalloproteinases in recurrent corneal melting associated with primary Sjörge'n's syndrome. *Molecular Vision*, 15, 2364-2372.
70. Uemura, T., Suzuki, T., Saiki, R., Dohmae, N., Ito, S., Takahashi, H. and Igarashi, K. (2017). Activation of MMP-9 activity by acrolein in saliva from patients with primary Sjögren's syndrome and its mechanism. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 88, 84-91.

71. Mastroianni, A., Minutilli, E., Mussi, A., Bordinon, V., Trento, E., D'Agosto, G., Cordiali-Fei, P. and Berardesca, E.W. (2005). Cytokine profiles during infliximab monotherapy in psoriatic arthritis. *British Journal of Dermatology*, Sep,153(3),531-6.
72. Cordiali-Fei, P., Trento¹, E., D'Agosto¹, G., Bordinon, V., Mussi, A., Ardigò, M., Mastroianni, A., Vento, A., Solivetti, F., Berardesca, E. and Ensoli, F. (2006). Decreased levels of metalloproteinase-9 and angiogenic factors in skin lesions of patients with psoriatic arthritis after therapy with anti-TNF- α . *Journal of Autoimmune Diseases*, 3, 5.
73. Wang, M., Sampson, E.R., Jin, H., Li, J., Ke, QH., Im, HJ. and Chen, D. (2013). MMP13 is a critical target gene during the progression of osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*, Jan 8,15(1),R5.
74. Shi, Y.B., Li, Q., Damjanovski, S., Amano, T. and Ishizuya-Oka, A. (1998). Regulation of Apoptosis During Development: Input From the Extracellular Matrix (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 2 (3), 273-282.
75. Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A. and Chakraborti, T. (2003). Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Molecular and Cellular Biochemistry*, Nov,253(1-2),269-85.



EK-1. Yerel Etik Kurul Onay Formu

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU					
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		PRİMER SİĞREN SENDROMLU HASTALARDA MATRİKS METALLOPROTEİNAZ 9 (MMP-9), MATRİKS METALLOPROTEİNAZ 13 (MMP-13), TRİPTOFAN VE KİNÜRENİN DÜZEYLERİ VE HASTALIK AKTİVİTESİ İLE İLİŞKİSİ			
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU					
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	T.C SAĞLIK BAKANLIĞI ZEKAI TAHİR BURAK KADIN SAĞLIĞI EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU (2011-KAEK-19)			
	AÇIK ADRESİ:	T.C. Sağlık Bakanlığı Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Talatpaşa Bulvarı Samanpazarı/ANKARA			
	TELEFON	0 312 306 56 85			
	FAKS	0 312 312 50 69			
	E-POSTA	etik_kurul@yahoo.com.tr			
BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Aylin Sepici Dinçel Dr. Duygu Tecer			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyokimya			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
FAZ 4		☐			
Gözlemsel ilaç çalışması		☐			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		☐			
In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		☐			
İlaç dışı klinik araştırma		☐			
Diger ise belirtiniz: Kontrol Çalışması					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLAR ARASI ☐	
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Doç. Dr. Sema ZERGEROĞLU İmza: 					
Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.					

EK-1. (devam) Yerel Etik Kurul Onay Formu

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	PRİMER SİĞREN SENDROMLU HASTALARDA MATRİKS METALLOPROTEİNAZ 9 (MMP-9), MATRİKS METALLOPROTEİNAZ 13 (MMP-13), TRİPTOFAN VE KİNÜRENİN DÜZEYLERİ VE HASTALIK AKTİVİTESİ İLE İLİŞKİSİ		
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU			

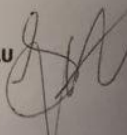
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama
	SİGORTA	☐	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒	
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER:	☐	

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 51 /2017	Tarih: 31.3.2017	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.
-----------------	--------------------	------------------	--

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU			
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu Son Versiyonu		
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Doç. Dr. Sema ZERGEROĞLU		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım		İmza
Av. Murat CANGÜL	Hukuk	Serbest Avukat	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Eyüp HORASANLI	Anesteziyoloji	Keçiören EAH	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Fırat HARDALAÇ	Biomedikal	Gazi Üni. Müh. Fak. Elek. Elektronik	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yük. Müh. Fatih DULKAN	Metallurji Müh.	Sanayi Bakanlığı	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Beyza Doğanay Erdoğan	Biyostatistik	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Uzm. Dr. Ece GÜL İBRİŞİM	Biyokimya	Zekai Tahir Burak EAH	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Ömer ERDEVE	Neonatoloji	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. H. Zafer GÜNEY	Farmakoloji	Gazi Üni. Tıp Fak	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Tarkan KARAKAN	Gastroenteroloji	Gazi Üni. Tıp Fak	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Elif Gül YAPAR EYİ	Kadın Doğum Hast.	Zekai Tahir Burak EAH	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Sema ZERGEROĞLU	Patoloji	Zekai Tahir Burak EAH	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: **Doç. Dr. Sema ZERGEROĞLU**
İmza: 

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

EK-2. Araştırma Anket Formu

ARAŞTIRMA ANKET FORMU	
İsim, soyisim:	
TC:	
Tarih:	
Yaş:	
Cinsiyet:	
Mevcut tedavi:	
Focus skoru:	
RF:	
Anti-CCP:	
ANA:	
Anti-SSA:	
Anti-SSB:	
Eritrosit sedimentasyon hızı:	
C-reaktif protein:	
ESSDAI	
ESSPRI	
MMP-9	
MMP-13	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ESER, Burcu
 Uyuğu : TC
 Doğum tarihi ve yeri : 22.07.1980/Ankara
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 0533 640 18 94
 e-mail : eser.burcu@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Tıp) Anabilim	Devam ediyor
Lisans	Kırıkkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2013
Lisans	Anadolu Üniversitesi İşletme Fakültesi İşletme Bölümü	2013
Ön Lisans	Hacettepe Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Tıbbi Laboratuvar	2000
Lise	Sağlık Bakanlığı Adana Laboratuvar Sağlık Meslek Lisesi	1998

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
Ağustos 2017- Halen	Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ar-Ge Merkezi, UPKYK- Kromatografi Lab.	Biyolog
2013- 2017	Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ar-Ge Merkezi, UPKYK- Kromatografi Lab.	Biyolog
2012- 2013	Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Kan Eğitim Merkezi ve Kan Bankası Laboratuvarı	Laboratuvar Teknikeri

2010- 20212	Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Biokimya Anabilim Dalı, Acil Biyokimya Laboratuvarı	Laboratuvar Teknikeri
2007- 2010	Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Toksikoloji Laboratuvarı ve Terapötik İlaç İzleme Laboratuvarları	Laboratuvar Teknikeri
2004- 2007	Gelibolu Asker Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı ve Kan Bankası Laboratuvarları	Laboratuvar Teknikeri
2001- 2004	Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Özel Testler Laboratuvarı	Laboratuvar Teknikeri

Mezuniyet Sonrası Eğitim ve Sertifika

LCMS/MS Eğitim Sertifikası

HPLC Eğitim Sertifikası

GC-MS Çalıştay Sertifikası (3rd National HPLC and Mass Spectrometry Workshop and Symposium (with international attendance))

Temel Hücre Kültürü Kurs Sertifikası,

Temel Epidemiyoloji Kursu Sertifikası

Deney Hayvanı Kullanım Sertifikası

Kan Bankacılığı Uygulamaları Eğitim Sertifikası

Western Blot Uygulamaları Eğitici Sertifikası

Yayınlar

LC-MS/MS ile Kolşisin Ölçüm Metodunun Optimizasyonu, **B Eser**, H Gul, Y Önen, E Demirkaya, II. Ulusal Çocuk Romatoloji Kongresi, P080, 25- 26.04.2014 Ankara/ Türkiye

LC-MS/MS ile Kolşisinin Internal Standart Olarak Pimozid Kullanımı ile Ölçülmesi, H Gül, **B Eser**, Y Önen, E Demirkaya, KBUD 2014 | Uluslararası Katılımlı Kongre & LAB - EXPO 2014, PS020, 16-20.09.2014 Çeşme/İzmir/ Türkiye

Comparison of the colchicine concentration between different matrix; plasma, leucocytes, ficoll solution measured by ESI LC-MS/MS, H Gul, E Demirkaya, **B Eser**, T Honca, FN Felek, D Simsek, 8th International Congress of Familial Mediterranean Fever and Systemic Autoinflammatory Diseases, Dresden, Germany. 30 September - 3

October 2015, *Pediatr Rheumatol Online J.* 2015; 13(Suppl 1): P137. Published online 2015 Sep 28. doi: 10.1186/1546-0096-13-S1-P137

Colchicine measurement using LC-MS/MS with ESI in serum with liquid liquid extraction, H Gul, E Demirkaya, **B Eser**, H Kapucu, V Tuncbilek, D Simsek, 8th International Congress of Familial Mediterranean Fever and Systemic Autoinflammatory Diseases, Dresden, Germany. 30 September - 3 October 2015, *Pediatr Rheumatol Online J.* 2015; 13(Suppl 1): P118. Published online 2015 Sep 28. doi: 10.1186/1546-0096-13-S1-P118

Comparison of serum sphingosine 1 phosphate level among euthymic, manic and depressive patients with bipolar disorder, Y Öztaş, **B Eser**, S Atik, A Yalçınkaya, M Semiz, M Erdem, H Gül, International Ceramide Conference /Sphingolipid Club joint meeting, P61, May 6-10 2015; İzmir, Turkey;

A New Alternative For Prehospital Hemorrhagic Shock Resuscitation: Lyophilized Plasma and Starting of It's Production Studies in Turkey, S Yılmaz, İ Eker, RA Çetinkaya, E Yenilmez, A Ünlü, B Bektöre, TK Atik, T Bayhan, B Şimşek, **B Eser**, E Yazıcı, O Gürsel, N Zeybek, S Yılmaz, MA Saraçlı, İY Avcı, XII. Asya Transfüzyon Tıbbı Birliği Kongresi, IX. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kongresi, Belek-Antalya, 2-6 Nisan 2016, Poster Presentation 1st Place Award PP-009

Detection Of Pepsin In Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Specimens, H Tasli, H Birkent, **B Eser**, B Asik, Y Karslioglu, M Gerek, American Head & Neck Society (AHNS) 9th International Conference on Head and Neck Cancer, July 16-20, 2016, Seattle, WA, USA, PP290

FMF Hastalarında Plazma Kolşisin Seviyeleri ile MDA Düzeylerinin Karşılaştırılması, B Eser, M Çınar, S Yüksel, R Tural, A S Dinçel, TBD Biyokimya Günleri, P069, 2-5 Kasım 2016, Sivas/Türkiye

Primer Sjögren Sendromlu Hastalarda Matriks Metalloproteinaz 9 (Mmp-9) ve Matriks Metalloproteinaz 13 (Mmp-13) Düzeylerinin Hastalık Aktivitesi İle İlişkisi, B Eser, D Tecer, Dinçel AS, II.Türkiye in vitro Diyagnostik Sempozyumu "Biyobelirteçler" (Hastalıkta ve Sağlıkta), PB42, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir, 10-12 Mayıs 2017

Kongre ve seminerler:

II. Ulusal Çocuk Romatoloji Kongresi, 25 - 26.04.2014 Ankara/ Türkiye

KBUD 2014 | Uluslararası Katılımlı Kongre & LAB - EXPO 2014, 16-20.09.2014 Çeşme/İzmir/ Türkiye

8th International Congress of Familial Mediterranean Fever and Systemic Auto-inflammatory Diseases, 30 September - 3 October 2015, Dresden, Germany

TSK 15. Askeri Tıp Kongresi, 31 Mayıs- 2 Haziran 2006, Ankara

3rd National HPLC and Mass Spectrometry Workshop and Symposium (with international attendance), 22-23 May 2008, Ankara

Lipit Araştırmaları alıştayı, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakóltesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 26.08.2016, Ankara

TBD Biyokimya Günleri, Cumhuriyet Üniversitesi, Sivas, 2-5 Kasım 2016

II.Türkiye in vitro Diyagnostik Sempozyumu “Biyobelirteçler” (Hastalıkta ve Sağlıkta), Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir, 10-12 Mayıs 2017





GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

