

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

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ADAMTS-8, ADAMTS-9, ADAMTS-15 GENLERİNİN
PSORİATİK ARTRİT PATOGENEZİNDEKİ
ROLLERİNİN VE MOLEKÜLER
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. Sevgi İRTEGÜN KANDEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mehmet Ali TEKİN

Diyarbakır 2017

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

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ADAMTS-8, ADAMTS-9, ADAMTS-15 GENLERİNİN
PSORİATİK ARTRİT PATOGENEZİNDEKİ
ROLLERİNİN VE MOLEKÜLER
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. Sevgi İRTEGÜN KANDEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mehmet Ali TEKİN

(Bu tez 214S024 No' lu TÜBİTAK ve Tıp.16.024 No' lu DÜBAP projeleriyle
desteklenmiştir.)

Diyarbakır 2017

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

“ADAMTS-8, ADAMTS-9, ADAMTS-15) GENLERİNİN PSORİATİK ARTRİT PATOGENEZİNDEKİ ROLLERİNİN VE MOLEKÜLER MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI” başlıklı Yüksek Lisans tezi tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Sevgi İRTEGÜN KANDEMİR

Tezi Teslim Eden : Mehmet Ali TEKİN

Jüri Üyesinin Ünvanı	Adı Soyadı	Üniversitesi
----------------------	------------	--------------

Başkan :

Üye :

Üye :

Yukarıdaki imzalar tasdik olunur.

...../...../.....

Doç. Dr. Hakkı Murat BİLGİN
Dicle Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu araştırma projesini yazan ve çalışmanın planlanmasından başlayarak her aşamasında devamlı teşvik ve desteğini esirgemeyen, hocalıktan öte bir arkadaş gibi bilgi ve deneyimleriyle bize ışık tutan, değerli hocam ve tez danışmanım Yrd. Doç. Dr Sevgi İRTEGÜN KANDEMİR' e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince kendi tecrübeleri ve bilgilerini bana aktararak destek olan başta bölüm başkanı Doç. Dr. Hilmi İŞİ olmak üzere Tıbbi Biyoloji bölümdeki tüm hocalarıma, öğrenci arkadaşlarıma ve diğer tüm bölüm çalışanlarına içten teşekkürlerimi sunarım.

Birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum, çalışmalarımız süresince sevinç ve sıkıntılarımı paylaşan sevgili arkadaşlarım Gülsüm PEKTANÇ ve Dr. Irmak İÇEN TAŞKIN' a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamıza hasta yönlendirmesiyle büyük katkı sağlayan Prof. Dr. Kemal NAS hocaya ve Uz. Dr. A.Zübeyir DAĞLI' ya içten teşekkürlerimi sunarım.

Projelerimizi destekleyen (214S024 No'lu Proje) Türkiye Bilimsel Ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)' na ve (Tıp.16.024 No'lu Proje) Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (DÜBAP) Koordinatörlüğü' ne teşekkürlerimi sunarım.

‘‘Ne zaman bitecek çalışmaların?’’ sorusuyla beni sürekli motive eden ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme ve arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Mehmet Ali TEKİN
DİYARBAKIR- 2017

İÇİNDEKİLER

Tez Onayı.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER.....	vii
TABLolar.....	ix
SİMGE VE KISALTMALAR.....	x
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiv
1.GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2.GENELBİLGİLER.....	2
2.1. Psoriasis.....	2
2.2.Psoriatik Artrit.....	3
2.2.1.Tanım ve Tarihçe.....	3
2.2.2.Epidemiyoloji	3
2.2.3.Patogenez	4
2.2.4.Klinik.....	4
2.2.4.1.Eklem tutulum şekilleri.....	4
2.2.4.2.Eklem dışı bulgular.....	5
2.2.5.Laboratuar Bulguları.....	6
2.2.6.Radyografik Değişiklikler.....	6
2.2.7.Ayırıcı Tanı.....	7
2.2.8.Tanı.....	7
2.2.9.Tedavi	7
2.2.9.1.Nonsteroidal anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ)	7
2.2.9.2.Kortikosteroidler.....	8
2.2.9.3.Metotreksat.....	8
2.2.9.4.Sülfasalazinin.....	9
2.2.9.5.Anti TNF Ajanlar.....	9
2.3.ADAMTS Gen Ailesi.....	9
2.4.SİTOKİNLER	11
2.4.1.Tümör Nekroz Faktörü- α (TNF- α)	11
2.4.2.İnterlökin-1.....	12
2.4.3.İnterlökin-6.....	12
3.GEREÇ ve YÖNTEM.....	13
3.1. Periferik kandan Ficoll-Paque yöntemi ile PBMC' lerin izolasyonu.....	14
3.2. PBMC' lerin primer kültürleri.	15
3.3. PBMC' lerin aktivitesinin MAPK (Erk1/2, p-38 ve JNK), STAT3 ve NFkB inhibitörleriyle baskılanması	15
3.3.2. PBMC' lerin İnhibitörlerle Muamelesi	16
3.4 PBMC' lerin Pro-inflamatuvar sitokinler olan TNF- α , IL-6 ve IL-1 β ile stimülasyonu.....	17
3.4.2. PBMC' lerin sitokinlerle stimülasyonu	18
3.5. RNA izolasyonu ve kantitasyonu.....	18
3.6. cDNA sentezi.....	18
3.7. Kantitatif (Real-Time) PCR (qPCR).....	19
3.8. Western Blot.....	20
3.8.1. Western Blot için PBMC hücrelerinin ekimi ve inhibitör ve stimulant	

uygulanması.....	20
3.8.2 PBMC hücre lizatlarının hazırlanması ve protein miktarı ölçümü.....	21
3.8.3 Protein örneklerinin jelde ayrımı ve membrana transferi.....	22
4.BULGULAR.....	24
4.1 ERK1/2, P38, JNK STAT3 VE NFkB spesifik inhibitörlerin PBMC hücrelerindeki baskılayıcı etkilerinin Western Blot ile analizi.....	24
4.2 ADAMTS8, -9 ve -15 mRNA düzeylerinin qPCR ile analizi.....	27
5.TARTIŞMA.....	41
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	49
7. KAYNAKLAR	51
8. EKLER	61
8.1 EK-1. Etik Kurul Kararı	
8.2 ÖZGEÇMİŞ	
8.3 Orjinallik Raporu	



ŞEKİLLER

Şekil.3.1: PBMC hücrelerinin 24 kuyucuklu plakalara ekimi	15
Şekil 3.2: PBMC hücrelerine Erk1/2 ,P38, JNK, STAT3 ve NFkB inhibitörlerinin uygulaması.	17
Şekil 3.3: PBMC hücrelerinin TNF- α , IL- 6 ve IL-1 β ile stimülasyonu.	18
Şekil.3.4: Real time PCR protokolü	20
Şekil.3.5: PBMC hücrelerinin 6 kuyucuklu plakalara ekimi ve inhibisyon-stimülasyon uygulamaları	21
Şekil.4.1: ERK1/2 inhibitörü uygulanmış ve TNF- α ile uyarılmış PBMC hücrelerinin Western Blot yöntemiyle incelenmesi	25
Şekil.4.2: p38 inhibitörü uygulanmış ve TNF- α ile uyarılmış PBMC hücrelerinin Western Blot yöntemiyle incelenmesi	25
Şekil.4.3: JNK inhibitörü uygulanmış ve TNF- α ile uyarılmış PBMC hücrelerinin Western Blot yöntemiyle incelenmesi	26
Şekil.4.4: STAT3 inhibitörü uygulanmış ve IL-6 ile uyarılmış PBMC hücrelerinin Western Blot yöntemiyle incelenmesi	26
Şekil.4.5: NFkB inhibitörü uygulanmış ve IL-1 β ile uyarılmış PBMC hücrelerinin Western Blot yöntemiyle incelenmesi	26
Şekil.4.6: PBMC hücrelerinde ADAMTS8 (A), ADAMTS9 (B) ve ADAMTS15 (C) genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri ve istatistiksel verileri (n:15)	28
Şekil.4.7: ERK1/2, p38 ve JNK inhibitörü uygulanmış ve TNF- α ile uyarılmış olan kontrol(A), Ps(B) ve PsA (C) PBMC hücrelerinde ADAMTS8 geninin mRNA ekspresyon düzeyleri ve istatistiksel verileri (n:15)	30
Şekil.4.8: ERK1/2, p38 ve JNK inhibitörü uygulanmış ve TNF- α ile uyarılmış olan kontrol (A), Ps (B) ve PsA (C) PBMC hücrelerinde ADAMTS9 geninin mRNA ekspresyon düzeyleri ve istatistiksel verileri (n:15)	31
Şekil.4.9: ERK1/2, p38 ve JNK inhibitörü uygulanmış ve TNF- α ile uyarılmış olan kontrol (A), Ps (B) ve PsA (C) PBMC hücrelerinde ADAMTS15 geninin mRNA ekspresyon düzeyleri ve istatistiksel verileri (n:15)	33

Şekil.4.10: STAT3 inhibitörü uygulanmış ve IL-6 ile uyarılmış olan kontrol (A), Ps (B) ve PsA (C) PBMC hücrelerinde ADAMTS8 geninin mRNA ekspresyon düzeyleri ve istatistiksel verileri (n:15)	34
Şekil.4.11: STAT3 inhibitörü uygulanmış ve IL-6 ile uyarılmış olan kontrol (A), Ps (B) ve PsA (C) PBMC hücrelerinde ADAMTS9 geninin mRNA ekspresyon düzeyleri ve istatistiksel verileri (n:15)	35
Şekil.4.12: STAT3 inhibitörü uygulanmış ve IL-6 ile uyarılmış olan kontrol (A), Ps (B) ve PsA (C) PBMC hücrelerinde ADAMTS15 geninin mRNA ekspresyon düzeyleri ve istatistiksel verileri (n:15)	37
Şekil.4.13: NFkB inhibitörü uygulanmış ve IL-1 β ile uyarılmış olan kontrol (A), Ps (B) ve PsA (C) PBMC hücrelerinde ADAMTS8 geninin mRNA ekspresyon düzeyleri ve istatistiksel verileri (n:15)	38
Şekil.4.14: NFkB inhibitörü uygulanmış ve IL-1 β ile uyarılmış olan kontrol (A), Ps (B) ve PsA (C) PBMC hücrelerinde ADAMTS9 geninin mRNA ekspresyon düzeyleri ve istatistiksel verileri (n:15)	39
Şekil.4.15: NFkB inhibitörü uygulanmış ve IL-1 β ile uyarılmış olan kontrol (A), Ps (B) ve PsA (C) PBMC hücrelerinde ADAMTS15 geninin mRNA ekspresyon düzeyleri ve istatistiksel verileri (n:15)	40
Şekil 5.1: MAPK yolları (ERK1/2, p38 ve JNK)	42

TABLULAR

Tablo.1.1: PsA&CASPAR KRİTERLERİ	8
Tablo.3.1: PsA, Ps ve kontrol gruplarının yaş, cinsiyet ve kaç yıllık hasta olduklarına dair bilgiler	13
Tablo.3.2: ADAMTS ve GAPDH primer dizileri	19
Tablo.3.3: PCR karışım miktarları	20
Tablo.3.4: PBMC' lerin uygulama şekillerine göre gruplandırılması	21
Tablo.3.5: Primer antikorların listesi	23
Tablo.3.6: Sekonder antikorların listesi	23

SİMGE VE KISALTMALAR

ADAM : A Disintegrin And Metalloproteinase

ADAMTS : A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs

ANA : Antinükleer antikor

AS : Ankilozan spondilit

BSA : Bovine Serum Albumine

CASPAR : Classification of Psriatic Arthritis

CRP : C-reaktif protein

DİF : Distal interfalangeal eklem tutulumu

ERK1/2 : Extracellular signal-regulated kinaz

ESH : Eritrosit sedimentasyon hızı

HLA : Human lökosit antijen

HIV : Human immunodeficiency virus

IL : İnterlökin

JNK : c-Jun N-terminal kinaz

MAPK : Mitogen activated protein kinase

MKF : Metakarpofalangial

MTF : Metatarsofalangial

MHC : Majör histokompatibilite kompleks

NSAİİ : Nonsteroidal anti-inflamatuar ilaçlar

NFkB : Nükleer faktör kappa B

OA: Osteoartrit

PBMC : Periferal mononükleer kan hücreleri

PİF : Proksimal interfalangial

PsA : Psoriatik artrit

Ps: Psoriasis

RA : Romatoid artrit

RF : Romatoid faktör

SpA : Spondilartropati

STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3

SLZ : Sulfasalazin

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

qPCR: Real time PCR

TNF- α : Tumor nekrosis faktör alfa

TSR : Thrombospondin type 1 Sequence Repeat

VEGF: Vasküler endotel büyüme faktörü



ÖZET

Amaç: Matris yıkımında rol aldıkları bilinen ADAMTS8, -9 ve -15 agrekanazlarının kronik inflamatuvar bir hastalık olan Psoriatik artrit (PsA) patogenezindeki rollerini ve ADAMTS8, -9 ve -15 gen ekspresyon düzeylerinin inflamatuvar sinyal yollarında hangi mediyatörler tarafından regüle edildiklerini araştırmaktır.

Yöntem: 15 PsA hastasından, 15 Psoriasis (Ps) hastasından ve 15 sağlıklı bireyden alınan total kandan periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) izole edildikten sonra bu PBMC'lerin primer kültürleri yapıldı. PBMC'lerde ADAMTS8, -9 ve -15 genlerinin mRNA ifadeleri qPCR yöntemi kullanılarak ölçüldü. Primer kültürleri yapılan PBMC'ler TNF- α , IL-1 β ve IL-6 sitokinleriyle uyarıldı ve uyarılmış PBMC hücrelerinin ADAMTS8, -9 ve -15 mRNA ekspresyon düzeylerindeki değişimler qPCR yöntemiyle tespit edildi. Ayrıca PBMC'ler TNF- α , IL-1 β ve IL-6 ile uyarılmadan önce mitogen-activated protein kinases (MAPK), transkripsiyon faktörü nuclear faktor kappa B (NFkB) ve signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) inhibitörleri ile muamele edildi ve ADAMTS genlerinin ekspresyonunun pro-inflamatuvar sinyal yollarındaki MAPK (ERK1/2, p38, JNK), NFkB, ve STAT3 mediyatörleri tarafından regüle edilip edilmediği qPCR yöntemi kullanılarak araştırıldı. Ayrıca inhibitörlerin (ERK1/2, p38, JNK, NFkB ve STAT3) ve sitokinlerin (TNF- α , IL-1 β ve IL-6) protein düzeylerindeki etkileri Western Blot yöntemi kullanılarak gösterildi.

Bulgular: PsA grubunun PBMC hücrelerinde ADAMTS15 ekspresyonunun arttığı, fakat ADAMTS8 ve -9 ekspresyonlarının ise değişmediği tespit edildi. Ps grubunda PBMC hücrelerinin ADAMTS8 ekspresyonunun artış gösterdiği bulundu. Kontrol grubunda TNF- α uyarılmasıyla sadece ADAMTS15 ekspresyonunun arttığı, ADAMTS8 ve -9 ekspresyonlarının ise değişmediği gösterildi. Ayrıca, IL-1 β ve IL-6 uyarılmalarıyla ADAMTS8, -9 ve -15 mRNA ekspresyonlarının değişmediği tespit edildi. Ps grubunda, ADAMTS8 ve -9 ekspresyonlarının TNF- α , IL-1 β ve IL-6

uyarılmaları sonucunda azalış gösterdiği fakat, ADAMTS15 ekspresyonunun ise TNF- α , IL-1 β ve IL-6 uyarılmalarıyla değişmediği bulundu. PsA grubunda, TNF- α , IL-1 β ve IL-6 uyarılmaları sonucunda ADAMTS9 mRNA ekspresyonunun değişmediği, ADAMTS15 ekspresyonunun ise sadece IL-1 β stimülasyonu ile azaldığı ortaya kondu. Ayrıca, TNF- α ve IL-1 β stimülasyonlarının ADAMTS8 ekspresyonunu arttırdığı, IL-6 stimülasyonunun ise ADAMTS8 ekspresyonunu değiştirmedikleri gözlemlendi. Kontrol grubunda, JNK, STAT3 ve NF κ B inhibisyonları sonucunda ADAMTS8, -9 ve -15 mRNA ekspresyon düzeylerinin arttığı tespit edildi. ERK1/2 ve p38 inhibisyonları sonrası ADAMTS8 ve -15 ekspresyonlarının azaldığı ama, ADAMTS9 ekspresyonunun değişmediği gösterildi. Ps grubunda, ERK1/2, p38 ve JNK inhibisyonlarıyla ADAMTS8 ve -9 ekspresyonlarının azaldığı, ADAMTS15 ekspresyonunun ise değişmediği tespit edildi. STAT3 inhibisyonu ile ADAMTS8 ekspresyonunun arttığı, ADAMTS9 ekspresyonunun azaldığı ve ADAMTS15 ekspresyonunun ise değişmediği bulundu. Öte yandan, Ps ve PsA gruplarında NF κ B inhibisyonu ile ADAMTS9 ve -15 ekspresyonlarının arttığı, ADAMTS8 ekspresyonunun ise azaldığı ortaya kondu. PsA grubunda, ERK1/2, p38 ve JNK inhibisyonlarıyla ADAMTS9 ekspresyonunun arttığı, ADAMTS8 ekspresyonunun azaldığı ve ADAMTS15 ekspresyonunun ise değişmediği tespit edildi. STAT3 inhibisyonu sonucunda ADAMTS8 ve -9 ekspresyonlarının arttığı, ADAMTS15 ekspresyonunun ise değişmediği bulundu.

Sonuçlar: PsA' lı hastaların PBMC hücrelerinde diğer artirit türevlerinin literatür bulgularıyla uyumlu olarak ADAMTS8 ve -9 gen ekspresyonlarının değişmediği bulundu. ADAMTS15 ekspresyonundaki artış, ADAMTS15 enziminin PsA' lı hastalarda artirit gelişimiyle ilişkili bir proteaz olabileceğini önermektedir. PsA patogenezinde, MAPK ve NF κ B sinyal yollarının ADAMTS8 ve -9 mRNA düzeyleri üzerinde düzenleyici etkileri olabileceği tespit edildi. Ayrıca, STAT3 sinyal yolağının ADAMTS ailesi agrekanaz aktivitelerini farklı regülasyon mekanizmalarıyla düzenleyebileceğini gösterdik..

Anahtar Sözcükler: Psoriatik artrit, ADAMTS , qPCR, biyobelirteç, PBMC

ABSTRACT

Investigation of The Roles and Molecular Mechanisms of ADAMTS-8, ADAMTS-9, ADAMTS-15 genes in The Pathogenesis of Psoriatic Arthritis

Aim of this study is to investigate the roles of ADAMTS8, -9 and -15 aggrecanases, which are known to play roles in matrix destruction, in the pathogenesis of Psoriatic Arthritis (PsA), a chronic inflammatory disease, and which mediators involved in inflammatory signaling pathways regulate the expression level of these aggrecanases.

Method: Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from total blood obtained from 15 PsA patients, 15 Psoriasis (Ps) patients and 15 healthy individuals and their primary culture have been done. The mRNA expression levels of ADAMTS8, -9 and -15 genes in PBMCs were measured by qPCR. After the stimulation of the cultured PBMC by TNF- α , IL-1 β and IL-6, the mRNA expression levels of ADAMTS genes in the stimulated PBMC were determined by qPCR. Furthermore, PBMCs have been treated by mitogen-activated protein kinases (MAPK), transcription factor nuclear factor kappa B (NFkB) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) inhibitors before the stimulation with TNF- α , IL-1 β and IL-6 and the expression of ADAMTS genes whether are regulated by MAPK (ERK1/2, p38, JNK), NFkB and STAT3 mediators in pro-inflammatory signaling pathways were examined by qPCR. Moreover, the effects of the inhibitors on the activities of MAPK (ERK1/2, p38, JNK), NFkB and STAT3 were determined by Western Blot.

Results: It was found that the expression of ADAMTS15 in PBMCs of PsA group was increased, but the expression levels of ADAMTS 8 and -9 did not change. The expression of ADAMTS8in in PBMCs of Ps group was increased. The expression of ADAMTS15 was increased by TNF- α stimulation, while the expression of ADAMTS8 and -9 were not changed in PBMCs of control group. Furthermore, it was determined that the mRNA expression levels of ADAMTS8, -9 and -15 mRNA were not changed by the IL-1 β and IL-6 stimulations. The expression of ADAMTS8 and -9 in Ps group were decreased as a result of TNF- α , IL-1 β and IL-6 stimulations; however, ADAMTS15 expression was not changed by these stimulations. It was found that there was no significant difference at the expression

level of ADAMTS9 in PsA group after the TNF- α , IL-1 β and IL-6 stimulations, whereas ADAMTS15 expression was decreased only by IL-1 β stimulation. Moreover, it was observed that TNF- α and IL-1 β stimulations led to an increase in ADAMTS8 expression, while IL-6 stimulation did not alter the ADAMTS8 expression. It was determined that the ADAMTS8, -9 and -15 mRNA expression levels were increased as a result of JNK, STAT3 and NF κ B inhibitions in the control group. Furthermore, the expression levels of ADAMTS8 and -15 were decreased after ERK1/2 and p38 inhibitions, but there was no significant difference at the ADAMTS9 expression level. It was determined that the expression levels of ADAMTS8 and -9 in Ps group were decreased by ERK1/2, p38 and JNK inhibition, and ADAMTS15 expression was not changed by these inhibition. Additionally, it was found that ADAMTS8 expression was increased by STAT3 inhibition, whereas the expression of ADAMTS9 was decreased and ADAMTS15 expression did not change. On the other hand, the expression of ADAMTS9 and -15 in Ps and PsA group were increased by NF κ B inhibition, while ADAMTS8 expression was decreased. It was determined that the expression of ADAMTS9 in PsA group was increased by ERK1/2, p38 and JNK inhibitions, while ADAMTS8 expression was decreased and there was no significant difference at the ADAMTS15 expression level. STAT3 inhibition resulted in an increase in the expression of ADAMTS8 and -9, but ADAMTS15 expression was not changed by STAT3 inhibition.

Conclusion: We found that the expression of ADAMTS8 and -9 were not changed in PBMCs of the patients with PsA, which is consistent with the literature findings about other arthritic derivatives. The increased expression of the ADAMTS15 gene suggests that this enzyme may be associated with the development of arthritis in PsA patients. Furthermore, we found that MAPK and NF κ B signaling pathways may have regulatory effects on ADAMTS8 and -9 mRNA expression in the pathogenesis of PsA. We also showed that STAT3 signaling pathway could regulate the ADAMTS family aggrecanases' activities with different regulatory mechanisms.

Key Words: Psoriatic Arthritis, ADAMTS, qPCR, biomarkers, PBMC

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Psoriatik artrit (PsA), Psoriasis (Ps) ile ilişkili olan hem deri hem de omurga, periferal eklemler ve entesitleri etkileyen kronik, inflamatuvar bir hastalıktır. Eklem hastalığı sistemik inflamasyon ve ciddi kemik ve kıkırdak yıkımına, fonksiyonel bozukluğa ve yaşam kalitesinin azalmasına neden olan yoğun sinovitis ile karakterizedir (1,2). Günümüzde PsA' nın kesin bir tedavisi yoktur ve hastalık progresyonunu ve terapötik yanıtı tam olarak tahmin edebilen spesifik biomarkırlar bulunmamaktadır (3,4). Bu nedenle hastalığın diagnozu, prognozu ve tedaviye yanıtı için PsA' ya spesifik biomarkırların keşfedilmesi yeni terapötiklerin geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir.

ADAMTS' ler (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) önemli bir ekstrasellular proteaz ailesidir ve astım, artrit ve kanser gibi birçok yaygın hastalığın fizyopatolojisinde önemli görevler üstlenirler (5,6,7). ADAMTS genlerinin ekspresyonunun IL-1 β , TNF- α ve IL-6 gibi pro-inflamatuvar sitokinler tarafından indüklendiği bilinmektedir (1,8).

Bu çalışmada ADAMTS proteazlarının PsA' daki ekspresyon profillerinin ve potansiyel rollerinin araştırılmasıyla, PsA'nın gelişimi ve prosesi için yeni biomarkırların bulunmasını ve PsA'nın patogenezinde rol alan hücrel ve moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması sayesinde yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini hedeflemekteyiz. Bu amaç doğrultusunda çalışmamızda, PsA görülme sıklığının ciddi düzeyde arttırdığı çeşitli çalışmalarla ortaya konan Ps (37) ve sağlık bireylerden oluşan üç farklı grubun PBMC hücreleri farklı biomarkırlarla muamele edilmiştir.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Psoriasis

Ps kronik, genetik ve çevresel faktörler tarafından başlatılan immün aracılı inflamatuvar bir deri hastalığıdır(9). Ps' de genellikle bitişik sedefi-beyaz skuamli-eritemli oval plaklar görülür, remisyon ve lezyonlarda alevlenmelerle seyrederek (10). Dünya popülasyonunda sıklığının % 1-3 olduğu tahmin edilse de soğuk iklimlerde ve beyaz ırkta daha fazladır (9).Kundakçı ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, bizim ülkemizdeki Ps görülme sıklığı %1.3 olarak belirlenmiştir (11). Her yaşta görülebilen bir hastalık olan Ps' nin kadın ve erkekteki prevalansı hemen hemen eşittir (9) .

Hastalık doğal ve edinsel immün sistemin aktivasyonu ile ortaya çıkar. Ps' nin nedeni tam olarak bilinmemekte ancak genetik yatkınlıkla birlikte çevresel faktörler, enfeksiyonlar, ilaçlar, psikojenik faktörler ve travmanın hastalığın başlamasına ve ilerlemesine neden olduğu düşünülmektedir.

Genetik yatkınlık ile ilgili yapılan popülasyon çalışmalarında: bir ebeveyninde Ps olan çocuğun, aile öyküsü olmayan bir çocuğa göre Ps gelişme riski %5-10 artmaktadır ve daha erken yaşta Ps' ye yakalanan ebeveynlerin çocuklarında hastalık gelişme riskinin geç yaşta hastalığa yakalananlara göre daha fazla olduğu da belirtilmiştir (12). Farklı bir çalışmada ise akrabasında Ps olan kişilerde Ps gelişme riskinin arttığı da saptanmıştır (13). Genetik çalışmalarda Ps için bazı spesifik bölgeler tanımlanmıştır: Ps' ye yatkınlığın ana genetik kaynağı olarak düşünülen PSRS1 gen kümesi (14,15) ve erken Ps ile ilişkili MHC genleri arasından HLA–Cw6, Ps için önemlidir(16, 17).

Ps' li hastalarda yüksek kan şekeri, obezite, hipertansiyon vb. metabolik problemler (18), kalp hastalıkları (19), diabetes mellitus tip-2 (20) ve lenfoma (21) gibi farklı hastalıklarda yüksek oranlarda görülmektedir. Ayrıca hastalarda depresyon, intihar, sigara ve alkol tüketimi de sıklıkla görülmektedir (22,23).

Dolayısıyla Ps' nin birçok sistemi aynı anda etkilediğinin gösterilmesi sistemik inflamatuvar bir hastalık olduğu görüşünü giderek yaygınlaştırmaktadır.

1.2. Psoriatik Artrit

1.2.1. Tanım Ve Tarihçe

PsA gelişimi itibarıyla Ps ile yakından ilişkili olan, eklem inflamasyonlarıyla ilerleyen, çoğunlukla romatoid faktörün (RF) negatif olduğu ve romatoid nodülün bulunmadığı kronik inflamatuvar bir hastalıktır (1). İlk olarak Ps ile artrit arasındaki ilişkiyi 1818 yılında Alibert tanımlamış; "Psoriatik artrit" terimini ise ilk kez 1860 yılında Fransız Dermatolog Bazin kullanılmıştır (24). 1888'de Ps ile artrit etkinliğinde distal interfalangeal eklem (DİF) tutulumu Bourdillon tarafından vurgulanmıştır (25). RF' nin 1948 de tespiti ile RF ve romatoid artrit (RA) arasındaki ilişkinin tanımlanmış, RA için ayrı tanı kriterlerinin belirlenmiş ve PsA üzerinde durulmaya başlanmıştır (26). Amerikan Romatizma Birliği (American Collage of Rheumatology-ACR), PsA' nın ayrı bir hastalık olduğunu ilk olarak 1964 yılında onaylamış ve 1976' da ise RF negatifliğini vurgulamak için PsA' nın seronegatif spondiloartritler içerisinde incelenmesi gerektiğini belirtmiştir (26,27).

2.2.2. Epidemiyoloji

PsA' nın gerçek prevalansı, kısıtlı dermatolojik ve romatolojik kriterler ve kısmi olarak doğru tanı konulamamasından tam bilinmemektedir (28). Birçok çalışma Ps' si olan hastalarda PsA' nın sık görüldüğünü göstermektedir. Yapılan klinik değerlendirmeler de; Ps' nin inflamatuvar artritlerde sıklığının %2,6; osteoartritlerde ise %0,3 olduğu belirtilmiştir (29). Bir başka dikkat çekici çalışma ise seronegatif artritli hastalarda Ps sıklığının %20,2 olarak görülmesidir (30). Genel popülasyonda PsA prevalansı ise %0,04-0,1 arasında değişmektedir (31). Shbeeb ve arkadaşları yaptıkları çalışmada PsA'nın yıllık insidansını 3,6/100.000 olarak saptamıştır (32). Hastalığın cinsiyet bağlı olmadığı, kadın-erkek görülme sıklığının eşit olduğu gözlemlenmiştir. Türkiye'de Ps vulgarisli hastalar üzerinde yapılan üç farklı çalışmada PsA insidansı: %13,7, %11,4 ve %20 olarak tespit edilmiştir (33-35).

2.2.3. Patogenez

PsA' nın nedeni tam olarak bilinmemektedir. Hastalık patogenezinde genetik, immünolojik ve çevresel faktörlerin rol oynadığı öngörülmektedir. Seronegatif artritlerde HLA-B13,-B27 -B17 gibi bazı HLA grupları ile hastalığın etkileşimi hastalarda bu grupların normal popülasyona göre artışının gözlemlenmesi üzerinden ilişkilendirilmiştir (36). İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü (human immunodeficiency virus-HIV) enfeksiyonlu hastalarda yapılan çalışmalarda, Ps ve PsA prevalansının yükseldiği bildirilmiştir. Bu sebeple enfeksiyonla PsA ilişkisi düşünülmektedir (37). İspatlanamamış olmasına rağmen stresin PsA ve Ps hastaları üzerinde tetikleyici etkileri olduğu söylenmektedir (38). Koebner fenomeni, travma veya cilt hasarı papiller tabakayı etkilediğinde Ps lezyonları gelişme durumu, Ps' li hastalarda negatif etkinliği iyi bilinen bir durumdur (39). Posttravmatik başlangıçlı PsA' da artmış Koebner fenomeni görülmektedir (40).

2.2.4. Klinik

PsA başlangıcı genellikle sinsi olup en önemli semptomları etkilenen eklemde ağrı, şişlik, ısı artışı ve tutukluktur. Hastaların çoğunda 30 dakikadan uzun süren sabah tutukluluğu görülür. Fiziki muayenede eklemde şişlik, hassasiyet, ağrı mevcut iken, eklem tutulumu sıklıkla asimetrik oligoartrit şeklindedir (41, 42). PsA Hastalarının % 40' unda distal interfalangeal eklem tutulumu (DİF) ve % 50' sinde vertebralarda tutulum görülür (43). eklem deformasyonları şiddetli ağrı olmadan da gelişebilir. Artrit hastaların % 70 inde cilt bulgularından sonra ortaya çıkmaktadır (44). Artrit genelde hastalık başladıktan 10-20 yıl sonra görülmektedir (45).

2.2.4.1. Eklem tutulum şekilleri

DİF, PsA' da diğer hastalıklardan ayırt edici özellik olarak bilinmektedir. Bu tutulum, PsA' lı hastalarda diğer inflamatuvar artritlere göre daha sık görülür. Bir çok çalışmada simetrik DİF eklem tutulumunun % 56 oranında PsA ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Genelde tırnakta psoriatik lezyonlar ile karakterizedir(45-47).

Spondiloartropati: nadir bir predominant özellik olan PsA spondiloartropatisi, dikkatli klinik ve radyolojik değerlendirmeye, olguların % 20-40' ında aksiyal omurga tutulumunu ortaya çıkarır (48).

Asimetrik oligoartiküler artrit: En karakteristik PsA eklem tutulumu olan asimetrik oligoartiküler artritte genelde ilk olarak el ve ayak parmakları etkilenir ve fleksör tendon ile sinovyum inflamasyonu eşlik ederek tipik sosis parmak görünümüne (daktilite) neden olur. Diz gibi büyük eklemlerle birlikte DİF, proksimal interfalangial (PİF), metakarpofalangial (MKF) ve metatarsofalangial (MTF) eklemleri asimetrik olarak tutar (26,48,49).

Simetrik poliartrit: PsA ile RA' arasında ayırıcı tanısı zordur. Kadınlarda daha sık görülür. DİF tutulumu, DİF ve PİF görülen ankiloz sonrasında gelişen pençe eli deformitesi ile RA' dan ayrılır(26,45).

Arthritis Mutilans: Ellerde falanksalarda ve metakarplerda osteoliz ile ortaya çıkar ve sakroileit eşlik eder. Teleskopik parmak, hokka kalem belirtisi gibi deformiteler görülür (50).

2.2.4.2. Eklem dışı bulgular

PsA için özgül ve de önemli bir tutulum şekli de daktilittir. Hastaların % 30' unda görülen daktilit tüm parmağın şişmesine neden olur (sosis parmak) ve ayaklar daha sık etkilenir (48). Seronegatif spondiloartropatilerin karakteristik özelliklerinden olan Entezit ise tendon ve ligamentlerin kemiğe yapışma yerindeki inflamasyondur, olgularda %30-40 oranında entesopati geliştiği bildirilmiştir (51,52).

PsA gelişen hastalarda tırnak tutulumu da bir başka önemli oluşumdur ve %67-90 arası oranlarda görülmektedir (26). Yaygın olarak el tırnaklarında çukurlaşmalar (nail pitting) görülürken, ayak tırnaklarında subungual hiperkeratoz oluşmaktadır. Bunlar dışında görülen tırnak lezyonları: onikolizis, tırnakta dışa doğru kabarıklaşma, diskolarasyon, ufalanma ve tırnak kaybıdır (37). DİF eklem artritinin varlığında tırnak tutulumları hastaların %80- 100 'ünde sıklıkla bitişik tırnakta ortaya çıkar (53).

Periferik ödem inflamatuvar hastalarda daha çok alt ekstremitede ve simetrik olarak görülmektedir. Hastalığın ilk evresinde ya da sonraki aşamalarında ortaya çıkabilir. Artiritli bölgede ödem, tenosinovit ve lokal entezit görülebilmektedir (54).

PsA' lı hastalarda %30-35' lik kısmında inflamatuvar göz hastalığı mevcuttur. En yaygın sorun %20 oranında görülen konjunktivittir. Diğer yandan, hastaların sadece %7-16' sında anterior üveit görülür. Üveit, sakroiliitli ve spondilitli hastalarda kronikleşme eğilimindedir(26).

2.2.5. Laboratuvar Bulguları

Günümüzde PsA için tanısal bir laboratuvar testi yoktur. Yapılan çalışmalar hastalığın aktif dönemlerinde hipoalbuminemi, eritrosit sedimentasyon hızı (ESH), C-reaktif protein (CRP) ve fibrinojen gibi akut faz değerlerinin yükselebileceğini göstermektedir(37). Bazı olgularda hipergamaglobulinemi gözlemlenmiş ve özellikle spondilartiritli hastalarda artmış IgA düzeyleri bildirilmiştir(55). RF pozitifliği yaklaşık olarak %5-10 arasındayken, Antinükleer antikor (ANA) pozitiflik oranı ise %10-14 civarındadır (22). PsA' lı hastalarda anti-CCP düzeyi daha çok poliartriküler tipte ve kadınlarda artarken, oransal olarak %6-10 aralığındadır (56).

2.2.6. Radyografik Değişiklikler

PsA da radyografik görünümler dekstrüktif değişiklikler ve proliferatif değişiklikler olarak sınıflandırılabilir.

Dekstrüktif değişiklikler; plantar fasya veya aşil tendonunda kemiğe yapışma yerlerinde yeni kemik oluşumları görülebileceği gibi osteoliz bir falanksın yontulmuş görünümü (whitting) veya kalemleşmesi (penciling) ile sonuçlanabilir. Bu durum tek başına görülebileceği gibi çoğu zaman komşu falanksda erozyonla seyreden kalem hokka görünümü ile birlikte de bulunabilir(37).

Proliferatif değişiklikler: Asimetrik veya simetrik sakroiliak tutulum ile periostit proliferatif kemik formasyonu görülebilir. Bu durum erozyonla beraber olunca saçaklanma (whiskering) adı verilir. Başlıca diğer proliferatif değişiklikler ise; fildişi falanks, kemik ankilozu ve eklem füzyonudur(57).

2.2.7. Ayırıcı Tanı

PsA tanıda önemli ipuçları veren bir hastalık olmasına rağmen RA ayırımı bazen oldukça zordur. RA' ya göre PsA'da daha sık olarak; RF' nin negatif olması, asimetrik eklem tutulumu, sakroiliak ve spinal tutulum, cilt ve tırnak değişiklikleri, entezit ve daktilit görülmektedir (37). Travma sonrası hastalarda kalıcı artrit varlığı durumunda PsA olasılığı göz ardı edilmemelidir (26).

2.2.8. Tanı

İlk olarak 1973 yılında Moll ve Wright PsA'yı Predominant klinik özelliğe dayanarak 5 alt grup olarak ayırmışlar: Distal interfalangeal artrit, asimetrik oligoartrit, simetrik poliartrit, spondilit ve artrit mutilans'dır. Bu klasifikasyon sistemi hastanın o andaki klinik prezentasyonuna dayanır, ancak zamanla hastanın klinik prezentasyonu değişebilir. PsA' nın alt gruplarına göre görülme sıklıkları farklıdır (58). Tanıdaki eksikliği gidermek için "Classification of Psoriatic Arthritis" (CASPAR) grubunun 2006 yılında yaptığı çalışma sonrası yeni bir sınıflama geliştirmiştir (**Tablo- 1.1**) . PsA için bu kriterlerin özgüllüğü ve hassasiyeti oldukça yüksek bulunmuş ve bu kriterlere göre PsA tanısı için Ps varlığı zorunlu değildir (59).

2.2.9. Tedavi

2.2.9.1. Nonsteroidal anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ)

Genelde orta şiddette PsA hastalarında kullanılan bu ilaçlar ağrı, şişlik ve eklemlerde hassasiyeti azaltarak etkisini göstermektedir (60,61). Fakat bu ilaçlar hastalık ilerlemesini engelleyememekle birlikte bazı çalışmalarda ibuprofen ve indometazin gibi türevlerinin cilt döküntülerini arttırdıkları tespit edilmiştir (62). PsA ile birlikte gastrointestinal rahatsızlığı olan hastalarda ve özellikle yaşlılarda yan etki riski yüksek olduğundan, bu ilaçların misoprostol veya proton pompa inhibitörleri ile birlikte kullanımı önerilmektedir(63).

Tablo-1.1: PsA&CASPAR KRİTERLERİ

KRİTER	PUAN
Ps varlığına dair mevcut bulgu	2
Geçmişte Ps öyküsü veya aile öyküsü	1
Pitting ve onikolizis gibi mevcut tırnak bulguları	1
Negatif romatoid faktör	1
Daktilit (romatolog tarafından saptanmalı)	1
Radyografilerde tespit edilmiş olan periostit	1
*İnflamatuvar artiküler hastalığa ilaveten yukarıdaki kriterlerden 3 veya daha fazla puan alınmalıdır **Aile öyküsü olarak hastanın birinci veya ikinci derece yakınlarında öykü bulunmalıdır *** Periostit formasyonu osteofit dışlanarak hesaplanmalıdır	

2.2.9.2. Kortikosteroidler

Oral ve intraartiküler olarak kullanılabilen bu ilaçlar NSAİİ'lerin eklem yakınmalarını düzeltmediği veya NSAİİ'lerin yan etkilerinden dolayı kullanılmadığı olgularda uzun süreli kullanım tercih edilmektedirler. Fakat uzun süreli steroid kullanımı deri lezyonlarını alevlendirebilmektedir (63).

2.2.9.3. Metotreksat

Folik asit antagonistidir ve DNA sentezini baskılayarak etkinlik gösterir. Dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe eder. En sık tercih edilen ilaçtır özellikle deri ve artrit bulguları üzerinde etkinlik göstermektedir. Hastaya 7,5-25 mg/hafta dozu tek seferde veya aynı gün içerisinde bölünerek verilebilir ve uygun doza yanıt 4-6

hafta arasında oluşur. Bu ilacı kullanan hastaların karaciğer toksisitesi açısından takibi önemlidir. Amerikan Romatoloji Derneği alkol bağımlılığı olan veya kronik hepatit B ya da C hastalarında tedavi öncesi biyopsi önermiştir (64).

2.2.9.4. Sülfasalazinin

Sülfasalazinin (SLZ) RA gibi diğer periferik eklem tutulumlu seronegatif artritlerin tedavisinde sık kullanımı, PsA' da da kullanılmasını sağlamıştır. Çalışmalarda özellikle poliartiküler tutulumlu hastalarda, sabah tutukluğu ve ağrılı eklem sayısında anlamlı iyileşmenin 4 hafta gibi kısa bir sürede sağlandığı tespit edilmiştir (65,66). Daha sonraki detaylı çalışmalarda gözlenen iyileşmeler; ağrılı ve şiş eklem sayısında azalma ve ESH' de anlamlı düşmedir (66).

2.2.9.5. Anti TNF Ajanlar

TNF- α PsA'da inflamasyon ve eklem hasarına sebep olduğundan bazı TNF- α baskılayıcıların da hastalığın tedavisinde kullanılmasına onay verilmiştir (67). Bu ajanların başlıcaları: özgül olarak solubl ve membrana bağlı TNF- α ' yı nötralize eden etanercept, kimerik monoklonal bir antikor olan infliksimab ve tamamen insan kaynaklı bir monoklonal antikor olan adalimumabtır.

2.3. ADAMTS Gen Ailesi

Ekstraselüler proteaz ailesi olan ADAMTS protein ailesi ilk olarak 1997 yılında Kuno ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir ve ileride birçok hastalığın bilinmeyen kısımlarına ışık tutacağı düşünülmektedir (68). ADAMTS enzimlerinin; anjiogenez, tümör gelişimi ve metastazı, bağ dokusunun remodellingi, koagülasyon, ovulasyon ve artrit gibi birçok farklı olguda etkin rollerinin olduğu bilinmektedir (69). Başta artritlerde kıkırdak ekstraselüler matriks parçalanması olmak üzere insan kıkırdağında birçok ADAMTS üyesinin konnektif doku homeostazında ve patolojisinde etkili olduğu gösterilmiştir (70).

Proteazlar hücre dışı matrisin yıkımında görev alırlar ve farklı moleküller içeren birçok grupları mevcuttur. Çinko bağımlı matris enzim grubundan olan

ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase)' lar, adezyon proteinleri olmalarının yanı sıra proteinaz özellikleri sayesinde hücre-hücre etkileşimleri ile hücre-matris etkileşimlerinde önemli rollere sahiptirler (71). ADAMTS' ler ise, ADAM ailesi üyelerinden, thrombospondin 1 benzeri tekrarlar ile ayrılır. Kollojen, versikan ve agrekan gibi ekstraselüler matrisinin yapısal proteinlerini parçalayan ADAMTS' ler, hem ekstraselüler matrise salgılandıkları hem de özgül thrombospondin 1 motifleri buldukları için yeni bir aile oluşturmuşlardır (68,72).

İlk olarak 20 adet tanımlanan, daha sonra ADAMTS11 ile -5' in aynı olduğu anlaşılınca sayıları 19' a düşen ADAMTS ailesi metzincin metalloendopeptidaz üst ailesindedir (73,74). ADAMTS enzimlerinin kompleks yapısı; sinyal sekans, pro-domain, katalitik domain, disintegrin-like domain, zengin sistin bölgesi, bağlantı bölgesi (spacer) ve Thrombospondin type 1 Sequence Repeat (TSR) bölgelerinden oluşmaktadır (75).

Çalışmamızda kullandığımız ADAMTS8,-9 ve -15 daha çok agrekanı kesip parçaladıkları için agrekanazlar olarak tanımlanırlar fakat, brevikan ve versikan gibi birçok ekstraselüler matris bariyer komponentini de parçalayabilirler. Bu nedenle yapılan çalışmalarda inflamatuvar kas iskelet sistemi hastalıklarının patogenezinde rol aldıkları ve bazı hastalıklarda düzeylerinin arttığı gösterilmiştir(72, 76, 77).

ADAMTS8, ADAMTS1 ile birlikte anjiyogenezi düzenler ve anti anjiyogenik ajanlar olarak adlandırılırlar. Bu genler, endotelde FGF-2 bağımlı vaskülarizasyonu ve VEGF' i inhibe ederek anjiyogenezi engellerler. Bu özellikleriyle bu iki proteaz tümör supresyonunda hedef proteazlardır (78). Yapılan çalışmalarda ADAMTS8 proteazlarının küçük hücreli dışı akciğer kanserli (non-small-cell lung cancer) hastalarda downregüle olduğu ve bu gen susturma durumunun promoter bölgesindeki metilasyondan kaynaklanabileceği belirtilmektedir (79). Farklı çalışmalarda, meme, beyin ve pankreas gibi birçok kanser türünde downregüle olan ADAMTS8 ekspresyonunun düzeltilmesinin, apoptozu indükleyerek tümör hücresi kolonileşmesini baskıladığını gösterilmiştir (80).

GON embriyonik gelişimde gonad distal tip hücrelerinde eksprese edilen ADAMTS9 ve ADAMTS20 genleri GON-ADAMTS proteazlar olarak adlandırılırlar ve gonadların gelişmesinde hücre migrasyonundan sorumludurlar (70,81). ADAMTS9 geni olmayan farelerin embriyonik hayatta öldükleri gösterilmiştir (82). ADAMTS9 geni, özefagial ve nazofaringeal kanserlerde tümör supresör gen olarak rol oynadığı bazı çalışmalarla gösterilmiştir (83). ADAMTS9 geninin metastaz ile ilişkisinin araştırıldığı çalışmalarda, metastatik tümörlerde bu genin downregüle olduğu gösterilmiştir (84). ADAMTS9 hücrede endojen anjiyogenez inhibisyonu yapar ve bu özelliğiyle tümör gelişimi ve metastazın inhibisyonunda rol oynayabileceği düşünülmektedir (85). Yapılan farklı bir çalışma da, ADAMTS5, -9 ve -20 proteazlarının apoptozis ve hücre dışı matrisinin temizlenmesinde rol aldığı bulunmuştur. Bu sürecin sekteye uğraması sonucu sindaktili olduğu gözlenmiştir (86).

ADAMTS15 geninin ADAMTS1 ile birlikte astımla hastalarının balgam örneklerinde mRNA düzeylerinin azaldığı gözlenmiş ve yine ADAMTS4 ve -9 ile birlikte kronik astım hastalarında indüklendiği de rapor edilmiştir (87,88). ADAMTS-15'in prostat kanserinde de yüksek oranda eksprese olduğu ortaya konmuş fakat prostat kanserindeki rolü henüz aydınlatılamamıştır (89). Meme kanserinin 3. aşamasındaki hastalarda 1 ve 2. aşamadaki hastalardan daha az eksprese olan ADAMTS15' in meme kanserinde koruyucu etkisi olduğu düşünülmektedir (90).

2.4. SİTOKİNLER

2.4.1. Tümör Nekroz Faktörü- α (TNF- α)

Pro-inflamatuvar sitokinler içinde en erken salgılanan ve konakçı cevabın en güçlü mediatör olan TNF- α monosit ve makrofajlar tarafından üretilir. nötrofillerin aktivasyonunu, kaşeksiyi, anjiyogenezisi, inflamatuvarı, dokuların metabolik aktivitelerinin düzenlenmesini sağlar ve immun sistem üzerindeki etkisiyle birçok hastalığın patogenezinde rol oynar (91,92). Ayrıca lipoprotein lipaz aktivitesini inhibe ederek fiziksel zayıflamaya neden olur (91,92). Yapımı endotoksinler ve

lenfokinler tarafından düzenlenen TNF- α , enfeksiyon ve doku yaralanmaları gibi uyaranlar ile dolaşıma katılan güçlü bir pirojendir. TNF α 'nın üretimini gamma interferon artırırken, TNF- α ise MHC Class I antijen ve IL-1 yapımını artırır(93). Sinoviyal sıvılarla yapılan bir çalışmada PsA hasta örneklerinde TNF- α reseptör miktarının RA hastalarına göre daha fazla olduğu saptanmıştır(94).

2.4.2. İnterlökin-1

İnterlökin-1 (IL-1) iki farklı proteinden IL-1 α ve IL-1 β meydana gelmektedir. Aynı genler tarafından meydana getirilen IL-1 α ve IL-1 β 'ın morfolojik yapıları farklı olmasına rağmen biyolojik aktiviteleri ve etkinlikleri aynıdır: Yangı, sepsis, diabet, otoimmün hastalıklar ve osteoporozun oluşumunda etkilidirler. Monositler daha çok IL-1 β yaparken, keratinositler daha çok IL-1 α yaparlar (95). Kandaki monositler ve doku makrofajları IL-1 için başlıca yapı kaynağıdır ancak IL-1'ın asıl kaynağı belirsizdir (96). IL-1 nötrofilleri ve akut faz proteinlerinin üretimini artırırken düşük seviyelerde farelerde ateş, anoreksia ve IL-6 üretimine sebep olduğu çalışmalarla gösterilmiştir. IL-1 β ve diğer pro-inflamatuar sitokinler artrit türevi hastalıklarda hastaların sinoviyal sıvılarında değişken oranlarda artış göstermektedir (97). IL-1 β 'ın kondrosit fonksiyonları üzerinde regülatör etkisiyle kartilaj yıkımına sebep olması tespit edilen biyolojik özelliklerindedir (98). IL-1- TNF- α 'ya göre daha etkilidir ve birlikte çok kuvvetli sinerjik etki göstermektedirler (99).

2.4.3. İnterlökin-6

İnterlökin-6 (IL-6), ağırlıklı olarak makrofajlar, fibroblastlar ve endotelial hücrelerden sentezlenirken bunun yanında T ve B hücrelerince, kardiyak miksoma, myeloma ve hipernefroma gibi tümör hücrelerince de oluşturulabilmektedir (100,101). IL-6 immünglobülin üretiminin artmasını sağlar, T-hücre aktivasyonunda ve büyümesinde görev alır ayrıca megakaryositlerin son dönem gelişiminde rol oynar (102). IL-6'nın bir başka önemli özelliği hepatik akut faz yanıtının oluşumunu indükler, gösterdiği anti-inflamatuar etkinin dışında bağışık hücre fonksiyonlarını ve inflamasyonu da güçlendirir (103). IL-6'nın sepsiste TNF- α ile birlikte yüksek oranda üretildiği ortaya konmuştur (104). Enfeksiyon veya doku hasarı gibi durumlarda IL-1 ve TNF- α direkt gene etki ederek IL-6 yapımını artırır (105).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bütün deneyler Dicle Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezinde (DÜBTAM) gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim dalı, Romatoloji polikliniğine başvuran hastalardan CASPAR kriterlerine göre PsA tanısı konulmuş ve farklı bir kronik hastalığı bulunmayan 15 hastadan izinleri alınarak gerçekleştirildi. Kontrol grubu olarak ise Dermatoloji Anabilim dalı polikliniğine başvuran hastalardan gerekli tetkikler yapılarak tanısı konulmuş 15 Ps hastası ve 15 sağlıklı kişiden (proje çalışanlarının arkadaş ve yakınları) temin edildi.

Çalışma protokolünün amacı, gereç ve yöntemlerinin gözden geçirilmesi sonucunda, Helsinki Deklarasyonu Kararlarına, Hasta Hakları Yönetmeliği'ne ve etik kurallarına uygun olarak tasarlandığına ilişkin Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 26.04.2016 tarihinde 2016/181 kodlu etik kurul onay belgesi alındı (**Ek 1**).

Çalışmamızda, her hastanın cinsiyeti, doğum tarihi, Ps ve PsA başlangıç yaşı, Ps ve PsA tutulum bölgeleri ve ailede Ps ve PsA varlığı kaydedildi (**Tablo-3.1**).

Tablo-3.1: PsA, Ps ve kontrol gruplarının yaş, cinsiyet ve kaç yıllık hasta olduklarına dair bilgiler verilmiştir. PsA (46,26±14,77) Ps (35,93±17,46) ve kontrol (39,33±10,79) grupları arasında yaş ortalamaları açısından istatistiksel olarak farklılık yoktur (p=0,140).

Sıra	Grup	Cinsiyet	Yaş	Hastalık Geçmişi
1	PsA	Kadın	32	9 yıl
2	PsA	Kadın	46	6 yıl
3	PsA	Kadın	23	3 yıl
4	PsA	Erkek	46	15 yıl
5	PsA	Erkek	45	2 yıl
6	PsA	Kadın	37	15 yıl
7	PsA	Erkek	65	2 yıl
8	PsA	Erkek	65	34 yıl
9	PsA	Kadın	29	5 yıl
10	PsA	Erkek	55	2 yıl
11	PsA	Kadın	57	10 yıl
12	PsA	Kadın	60	20 yıl

Sıra	Grup	Cinsiyet	Yaş	Hastalık Geçmişi
13	PsA	Kadın	68	35 yıl
14	PsA	Erkek	36	13 yıl
15	PsA	Erkek	30	yok
16	Ps	Kadın	42	14 yıl
17	Ps	Kadın	23	2 yıl
18	Ps	Kadın	18	6 yıl
19	Ps	Erkek	18	12 yıl
20	Ps	Erkek	27	20 yıl
21	Ps	Kadın	30	5 yıl
22	Ps	Erkek	50	15 yıl
23	Ps	Erkek	35	8 yıl
24	Ps	Kadın	53	5 yıl
25	Ps	Erkek	77	50 yıl
26	Ps	Kadın	20	7 yıl
27	Ps	Kadın	23	14 yıl
28	Ps	Kadın	27	10 yıl
29	Ps	Erkek	61	10 yıl
30	Ps	Erkek	35	25 yıl
31	Kontrol	Kadın	40	yok
32	Kontrol	Kadın	48	yok
33	Kontrol	Kadın	19	yok
34	Kontrol	Erkek	36	yok
35	Kontrol	Erkek	47	yok
36	Kontrol	Kadın	22	yok
37	Kontrol	Erkek	39	yok
38	Kontrol	Erkek	50	yok
39	Kontrol	Kadın	37	yok
40	Kontrol	Erkek	37	yok
41	Kontrol	Kadın	48	yok
42	Kontrol	Kadın	27	yok
43	Kontrol	Kadın	51	yok
44	Kontrol	Erkek	49	yok
45	Kontrol	Erkek	25	yok

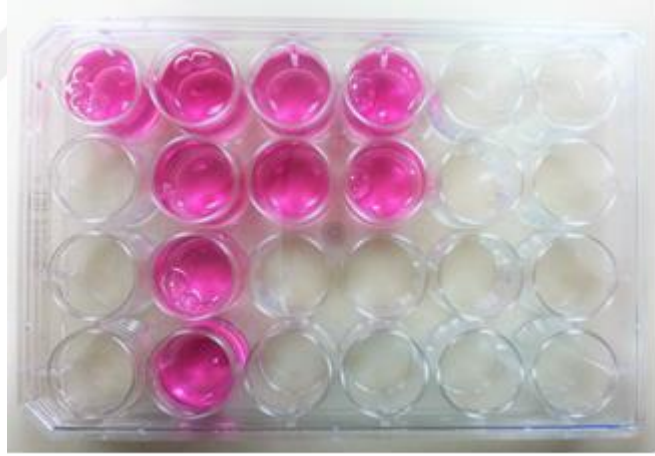
3.1. Periferik kandan Ficoll-Paque yöntemi ile PBMC' lerin izolasyonu

PsA hastaları, Ps hastaları ve sağlıklı bireylerden 20 ml venöz kan heparinize tüplere alındı. Hücre izolasyon basamakları steril koşulları sağlamak amacıyla Class II tip laminar kabinde (Thermo safe 1.2 class II) yürütüldü. Total kandan PBMC izolasyonu için kanlar 50 ml' lik falkon tüp içine boşaltılarak üzerine, 15 ml Phosphate Buffered Saline (PBS) [Gibco®] eklendi. Sulandırılan kan, içinde 15 ml FicollPaque PLUS (GE Healthcare Life Sciences) bulunan tüpün yan duvarından

pipet en düşük hızdayken yavaşça bırakıldı. Tüpler soğutmalı santrifüjde (Thermo SL16R) 30 dakika, 400 g, 18 °C , 0 declarationa ayarlanarak santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında oluşan katmanlardan PBS-ficol birleşim noktasında yer alan PBMC' ler 5 ml steril pipet kullanılarak toplandı ve ilk yıkama işlemi için farklı 50 ml' lik falkon tüpe aktarılıp, üzerine toplam volüm 40 ml olacak şekilde PBS ilave edildi. Tüpler tekrar 200 g, 18 °C da 10 dakika santrifüj edildi. Aynı işlem 2. yıkama için tekrarlandı. Santrifüj sonrasında PBS dökülüp, dibe çöken PBMC' ler 10 ml serum-free medium RPMI 1640 (2mM L-Glutamine [Gibco®] ve 100 units/ml penicillin/streptomycin, Gibco®) ile sulandırıldı.

3.2. PBMC' lerin primer kültürleri

İzolasyon sonunda yaklaşık 30.000 PBMC hücresi elde edildi. Serum-free medium ile sulandırılan PBMC' ler 24 kuyucuklu plate (plaka), her kuyucuğa 1 ml olacak şekilde toplam 9 kuyucuğa aktarıldı. Plate 37 °C %5' lik CO2' li nemli ortamda (Thermo Steri-Cycle 371) bir gün inkübe edildi (**Şekil-3.1**).



Şekil-3.1: PBMC hücrelerinin 24 kuyucuklu plakalara ekimi

3.3. PBMC'lerin aktivitesinin MAPK (Erk1/2, p-38 ve JNK), STAT3 ve NFkB inhibitörleriyle baskılanması

3.3.1. İnhibitörlerin çözülmesi ve hesaplanması

İnhibitörlerin stok konsantrasyonları hesaplandı:

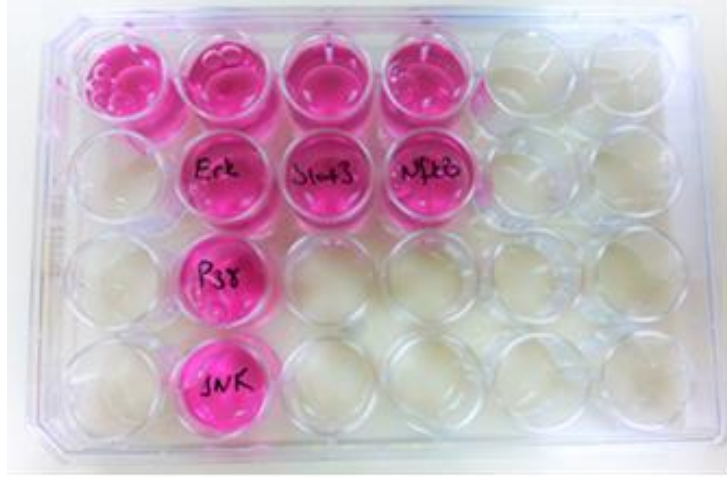
- ❖ ERK1/2 inhibitörü PD98059 (Sigma-Aldrich): Stok konsantrasyon 18.7 mM olacak şekilde 5 mg ERK1/2 1 ml DMSO içinde çözüldü. (10 µM ERK1/2 inhibitörü ile hücreler muamele edildi.).
- ❖ p-38 inhibitörü SB203580 (Sigma-Aldrich): Stok konsantrasyon 10.5 mM olacak şekilde 1 mg p38 250 µl DMSO içinde çözüldü. (10 µM p38 inhibitörü ile hücreler muamele edildi.).
- ❖ JNK inhibitörü SP600125 (Sigma-Aldrich): Stok konsantrasyon 22.7 mM olacak şekilde 10 mg JNK 2 ml DMSO içinde çözüldü. (10 µM JNK inhibitörü ile hücreler muamele edildi.).
- ❖ STAT3 inhibitörü parthenolide (Sigma-Aldrich): Stok konsantrasyon 20.1 mM olacak şekilde 5 mg STAT3 1 ml DMSO içinde çözüldü. (10 µM STAT3 inhibitörü ile hücreler muamele edildi.).
- ❖ NFkB inhibitörü sm-7368 (Sigma-Aldrich): Stok konsantrasyon 15.2 mM olacak şekilde 5 mg NFkB 1 ml DMSO içinde çözüldü. (10 µM NFkB inhibitörü ile hücreler muamele edildi.).

Daha sonra PBMC'lere muamele edilecek MAPK (Erk1/2, p-38 ve JNK), STAT3 ve NFkB inhibitörlerinin kullanılacak miktarları hesaplandı:

- ✓ ERK1/2 :1 ml serum-free medium içine 3,2 µl inhibitör
- ✓ p38 :600 µl serum-free medium içine 3,42 µl inhibitör
- ✓ JNK :1 ml serum-free medium içine 2,64 µl inhibitör
- ✓ STAT3 :1 ml serum-free medium içine 2,98 µl inhibitör
- ✓ NFkB :1 ml serum-free medium içine 3,94 µl inhibitör

3.3.2. PBMC'lerin İnhibitörlerle Muamelesi

Serum-free medium da belirtilen miktarlarda seyreltilen MAPK (ERK1/2, p38 ve JNK), STAT3 ve NFkB inhibitörlerinden kuyucuklara 250 µl ilave edildi (**Şekil-3.2**). İçinde PBMC bulunan diğer kuyucuklara ise 250 µl serum-free medium eklendi. Plate elle hafif çalkalanıp bırakılan inhibitörlerin kuyucuğun her tarafına yayılması sağlandı. Plate 37 °C %5' lik CO₂' li nemli ortamda 2 saat inkübe edildi.



Şekil 3.2: PBMC hücrelerine Erk1/2 ,P38, JNK, STAT3 ve NFkB inhibitörlerinin uygulaması.

3.4 PBMC' lerin Pro-inflamatuar sitokinler olan TNF- α , IL-6 ve IL-1 β ile stimülasyonu

3.4.1 Pro-inflamatuar sitokinlerin çözülmesi ve hesaplanması

Pro-inflamatuar sitokinlerin stok konsantrasyonları hesaplandı:

- ❖ TNF- α (Sigma-Aldrich): Stok konsantrasyon 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ olacak şekilde 10 μg TNF- α 1 ml distile su içinde çözüldü. Kuyucuklarda 100 ng/ml TNF- α olacak şekilde hücreler uyarıldı.
- ❖ IL-6 (Sigma-Aldrich):Stok konsantrasyon 20 $\mu\text{g} /\text{ml}$ olacak şekilde 5 μg IL-6 250 μl distile su içinde çözüldü. Kuyucuklarda 100 ng/ml IL-6 olacak şekilde hücreler uyarıldı.
- ❖ IL-1 β (Sigma-Aldrich) : Stok konsantrasyon 5 $\mu\text{g} /\text{ml}$ olacak şekilde 5 μg IL-1 β 1,5 ml distile su içinde çözüldü.Kuyucuklarda 20 ng/ml IL-1 β olacak şekilde hücreler uyarıldı.

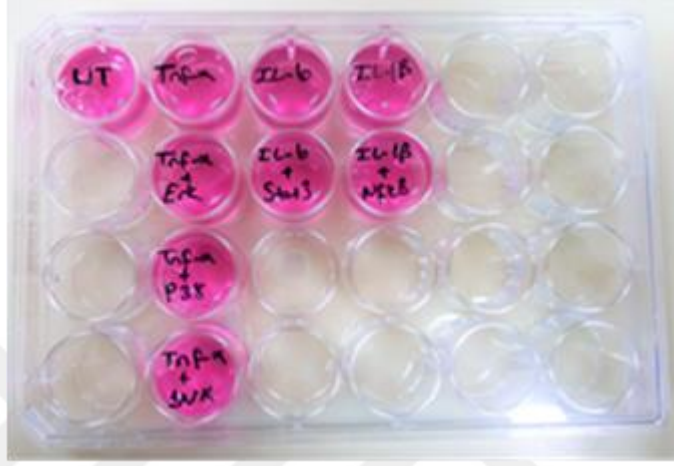
Pro-inflamatuar sitokinler (TNF- α , IL-6 , IL-1 β) -20'de muhafaza edildi.

TNF- α (100 ng/ml), IL-6(100 ng/ml) ve IL-1 β (20 ng/ml) pro-inflamatuar sitokinlerin stimülasyonda kullanılacak değerleri hesaplandı:

- ✓ TNF- α :1,1 ml serum-free medium içine 66 μl uyarıcı
- ✓ IL-6 :600 μl serum-free medium içine 18 μl uyarıcı
- ✓ IL-1 β :600 μl serum-free medium içine 18 μl uyarıcı

3.4.2. PBMC'lerin sitokinlerle stimülasyonu

2 saatlik inkübasyondan sonra hücreler TNF- α (100 ng/ml), IL-6 (100 ng/ml) ve IL-1 β (20 ng/ml) ile uyarıldı ve UT kuyucuğuna 250 μ l serum-free medium eklendi (Şekil-3.3). 24 kuyucuklu plakalar 37 °C de, %5' lik CO₂' li nemli ortamda 24 saat inkübasyona bırakıldı.



Şekil 3.3: PBMC hücrelerinin TNF- α , IL- 6 ve IL-1 β ile stimülasyonu.

3.5. RNA izolasyonu ve kantitasyonu

24 saatlik stimülasyon süresinden sonra hücreler kuyucuklardan filtrelili uçlar kullanılarak pipetle pipetaj yapılarak kaldırıldı. Serum-free medium içinde bulunan PBMC'ler 1,5 ml' lik ependorf tüplere aktarılıp, tüpler 5000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Ependorf tüpün dibine çöken PBMC' lere değdirilmeden pipet yardımıyla tüpteki serum-free medium alındı. Daha sonra RNA izolasyonu High pure RNA isolation kiti (Roche) ile protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Elde edilen RNA miktarları nanodrop (BIODROP) kullanılarak ölçüldü.

3.6. cDNA sentezi

RNA' lar transcriptor first strand cDNA sentez kiti (Roche) kullanılarak ve firmanın kullanma talimatlarına uyularak cDNA lara çevrildi. Aşamalar sırasıyla aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

- ❖ Tüpler hazırlanıp, her tüpe 1 μ l oligo 1 μ l hexamer solüsyonundan olacak şekilde toplam 2 μ l karışım bırakıldı.

- ❖ Her bir uygulama kendi tüpüne gelecek şekilde 11 µl RNA bırakılıp, tüpler spin yapıldı.
- ❖ Tüpler Thermal Cycler kullanılarak, cDNA 1 işaretlenmiş programda 65 °C de 10 dk bırakıldı.
- ❖ Süre sonunda kitin talimatlarıyla hazırlanmış master karışımdan her bir tüpe 7 µl bırakılıp, Thermal Cycler kullanılarak cDNA 2 işaretlenmiş programda 55 °C de 1 saat, 85 °C de 5 dk ve 4 °C de duracak şekilde ayarlandı.

Master karışım aşağıdaki gibi hazırlanmıştır:

- a) Vial 2 : 4 × 1
- b) Vial 4 : 0,5 × 1
- c) Vial 3 : 2 × 1
- d) Vial 1 : 0,5 × 1

3.7. Kantitatif (Real-Time) PCR (qPCR)

Elde edilen cDNA örnekleri 1:6 oranında sulandırıldı. PCR mastermix olarak LC 480 Probe Master (Roche) kullanıldı. Referans gen GAPDH ve ADAMTS-8,-9 ve -15 için PCR primerleri olarak dizileri **Tablo-3.2'** de verilen Real Time Ready kitleri (Roche) kullanıldı. **Tablo-3.3'** te belirtilen şekilde hazırlanan mikşler LC 480 well plateye (Roche) 3 tekrarlı yüklenip, Light Cycler 480 (Roche) cihazında **Şekil-3.4'** te belirtilen protokole uygun olarak qPCR yapıldı. Elde edilen verilerin istatistiki analizleri SigmaPlot 11.0 programı kullanılarak yapıldı ve P<0,05 olması istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo-3.2: ADAMTS ve GAPDH primer dizileri

ASSAY/ID	FORWARD PRİMER	REVERSE PRİMER
GAPDH/141139	'AGCCACATCGCTCAGAC AC'	'GCCCAATACGACCAAA TCC'
ADAMTS8/108591	'CCTCACCCCCACCAATT A'	'CCGCTGCTTCACGTCAA TA'
ADAMTS9/108927	'ACGCTGCATGGAGTACT GG'	'TTTATGCCCTCGACCAC AA'
ADAMTS15/108956	'TGAGGGTGAAATACCGA TCC'	'CTCCTCCCGGAAGCTCT TT'

Tablo-3.3: PCR karışım miktarları

Ürün	Kullanılan Miktar	Total Hacim
cDNA (1:6 dilüsyon)	5 µl	5 µl
Probe Master	10 µl	15 µl
Su	4 µl	19 µl
Primer	1 µl	20 µl

Program Name	pre-incubation						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:10:00	4.40		0	0	0

Program Name	amplification						
Cycles	55	Analysis Mode	Quantification				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:10	4.40		0	0	0
60	Single	00:00:30	2.20		0	0	0
72	None	00:00:01	4.40		0	0	0

Program Name	cooling						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
40	None	00:00:30	2.20		0	0	0

Şekil-3.4: Real time PCR protokolü

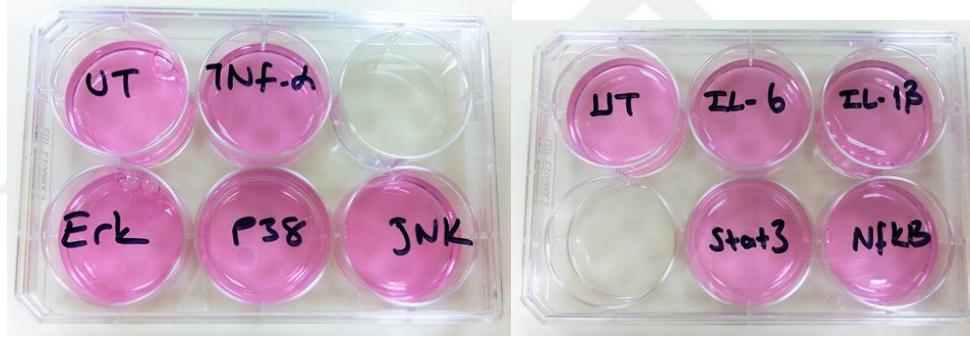
3.8. Western Blot

3.8.1. Western Blot için PBMC hücrelerinin ekimi ve inhibitör ve stimulant uygulanması

Periferik kandan izole edilen PBMC' ler Western Blot için 10ul Trypan blue boyası + 10ul PBMC örneği karıştırılarak Thoma lamında sayıldı ve ortalama 40.000 hücre elde edildi. Sayımdan sonra 5×10^6 PBMC hücresi 6 kuyucuklu plakalara yerleştirilip hücreler 37 °C de, %5' lik CO₂' li nemli ortamda (Thermo Steri-Cycle) 24 saat inkübe edildi. Daha sonra kuyucuklara yerleştirilen PBMC' ler uygulama şekillerine göre 9 gruba ayrıldı (Şekil-3.5, Tablo-3.4).

Tablo-3.4: PBMC' lerin uygulama şekillerine göre gruplandırılması

Gruplar	Uygulanan stimulant ve/veya İnhibitör
1	UT
2	TNF- α
3	TNF- α + ERK1/2 inhibitör (PD98059)
4	TNF- α + p38 inhibitör (SB203580)
5	TNF- α + JNK inhibitör (SP600125)
6	IL- 6
7	IL- 6 + STAT3 inhibitör (parthenolide)
8	IL-1 β
9	IL-1 β + NFkB inhibitör (sm7368)



Şekil-3.5: PBMC hücrelerinin 6 kuyucuklu plakalara ekimi ve inhibisyon-stimülasyon uygulamaları

3.8.2 PBMC hücre lizatlarının hazırlanması ve protein miktarı ölçümü*

PBMC hücrelerine ERK1/2 , p38, JNK, STAT3 ve NFkB inhibitörleri uygulanıp 2 saat inhibe edildi. Daha sonra, ERK1/2 , p38 ve JNK inhibisyonları yapılan hücreler TNF- α ile, STAT3 inhibisyonu yapılan hücreler IL-6 ile ve NFkB inhibisyonu yapılan hücreler ise IL-1 β ile 15 dk uyarıldı. Stimülasyonları durdurmak için 6 kuyucuklu plakalar buz üzerine taşındı. Bazı hücreler kuyucuklara yapışmadığı için supernatantlar 15 ml falkon tüp içine toplandı. Supernatantdaki hücreler 5000 rpm' de 5 dk santrifüj edilerek çöktürüldü ve pelete dokunmadan pompa yardımıyla sıvı kısım uzaklaştırıldı. Kuyucuklara yapışık halde bulunan PBMC hücrelerine 5 ml soğuk PBS eklenip pipetlenerek kuyucuklardan kaldırıldı ve 15 ml falkon

içerisindeki peletlerin üzerine eklendi. Tüpler tekrar 5000 rpm' de 5 dk santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü ve sıvı kısım pompayla uzaklaştırıldı. Sonraki bütün aşamalar buz üzerinde gerçekleştirildi. Peletlerin üzerine proteaz-fosfotaz inhibitör kokteyli (Thermo Fischer) ve nükleaz (Thermo Fischer) içeren soğuk RIPA buffer (160 µl, Sigma Aldrich) eklendi. Önce pipet ile sonra vortekslenerek karıştırılan örnekler buzun üzerinde 1 saat bekletilerek liziz edildi.

Protein karışımı içindeki toplam protein miktarı BCA protein assay kiti (Thermo Scientific Pierce) kullanılarak ölçüldü. Kitin kullanma talimatına uyularak BSA (Bovine Serum Albumine) standartları kullanıldı ve 562 nm' de ölçüm yapılarak µg/ml deki total protein konsantrasyonu belirlendi.

3.8.3 Protein örneklerinin jelde ayrımı ve membrana transferi

- ❖ Bütün protein örneklerinin ayrımı % 10 'luk TGX stain-free fast cast acrylamid jel (Bio-Rad) üzerinde Mini Protean Tetra Cell apparatus sistemi (Bio-Rad) kullanılarak yapıldı.
- ❖ Protein örnekleri 1× SDS loading buffer [% 2 (w/v) SDS, % 5 (v/v) glycerol, % 0.01 (w/v) bromophenol blue, % 8 (w/v) DTT] içinde hazırlandı ve 92-95 °C de 5 dk ısıtıldı.
- ❖ İlgili eşit miktardaki (20 µg) ve eşit hacimdeki (20 µl) proteinler % 10 'luk TGX stain-free fast cast acrylamid jel üzerine yüklendi ve 300 V' da 20 dk SDS running buffer (2.4 mM Tris, 19.2 mM glycine, % 0.01 (w/v) SDS) içerisinde elektroforez edildi.
- ❖ Ayrılmış proteinler jelden Trans blot turbo (Bio-Rad) hızlı tranfer sistemi kullanılarak PVDF membrana transfer edildi.
- ❖ Membranlar % 5' lik yağsız süt tozu (PBS-Tween içerisinde hazırlanmış) içerisinde çalkalayıcı üzerinde 1 saat oda sıcaklığında bloke edildi.
- ❖ Bloke edilen membranlar % 5 'lik süt tozu PBS-Tween içerisinde 1/1000 oranında hazırlanan primer antikorlar ile çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi (**Tablo.3.5, 3.6**).
- ❖ Membranlar 15 dk 25 ml PBS-Tween ve 3x 5 dk 25 ml PBS-Tween ile yıkandıktan sonra sekonder antikorlar(1/10000 oranında PBS-Tween

içerinde hazırlanmış) ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.

- ❖ PBS-Tween yıkama işlemi tekrarlandı ve son olarak enhanced chemiluminiscent (ECL, Bio-Rad) metoduna göre görüntüleme cihazı ChemiDoc MP (Bio-Rad) kullanılarak görüntülenmiştir.

Tablo.3.5 Primer antikorların listesi

Primer antikor	Firma
ERK 1/2 antibody	Cell Signaling
Phospho ERK 1 /2 antibody	Cell Signaling
p38 antibody	Abcam
Phospho -p38 antibody	Cell Signaling
JNK antibody	Santa Cruz Biotechnology
Phospho- SAPK/JNK antibody antibody	Abcam
STAT3 antibody	BD Biosciences
Phospho- STAT3 antibody	Cell Signaling
NFkB antibody	Cell Signaling
Phospho-NFkB p65 antibody	Abcam
GAPDH antibody	Abcam

Tablo.3.5 Sekonder antikorların listesi

Sekonder antikor	Firma
1. HRP conjugated anti-mouse antibody	Abcam
2. HRP conjugated anti-rabbit antibody	Abcam

4. BULGULAR

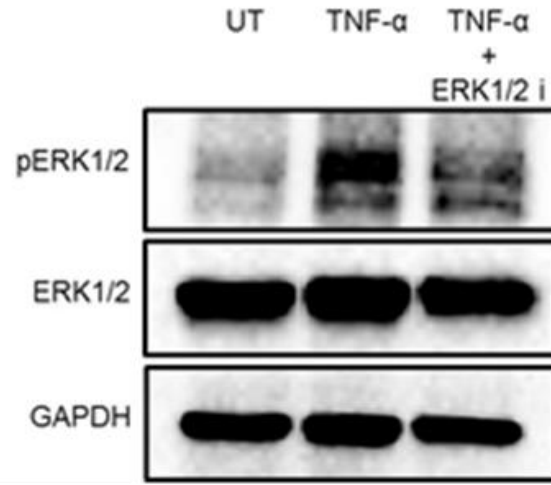
Çalışmaya Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim dalı, Romatoloji polikliniğine Mayıs 2016 ile Mayıs 2017 tarihleri arasında başvuran, CASPAR kriterlerine göre PsA tanısı konulmuş 8 bayan 7 erkek toplam 15 PsA hastası alındı. Kontrol grubu olarak ise Dermatoloji Anabilim dalı polikliniğine başvuran klinik ve gerekli durumlarda biyopsi ile tanısı konulmuş 8 bayan 7 erkek toplam 15 Ps hastası ve sağlıklı bireylerden 8 bayan 7 erkek toplam 15 kişi dahil edildi. Çalışmaya alınan PsA' lı hastaların yaş ortalaması $46,26 \pm 14,77$ olarak belirlenirken Ps'li hastalarda bu değer $35,93 \pm 17,46$ ve sağlıklı kontrol grubunda ise $39,33 \pm 10,79$ olarak hesaplandı. Gruplar arası istatistiksel olarak farklılık yoktur ($p=0,140$, **Tablo-3.1**).

4.1 ERK1/2, P38, JNK STAT3 VE NFKB spesifik inhibitörlerin PBMC hücrelerindeki baskılayıcı etkilerinin Western Blot ile analizi

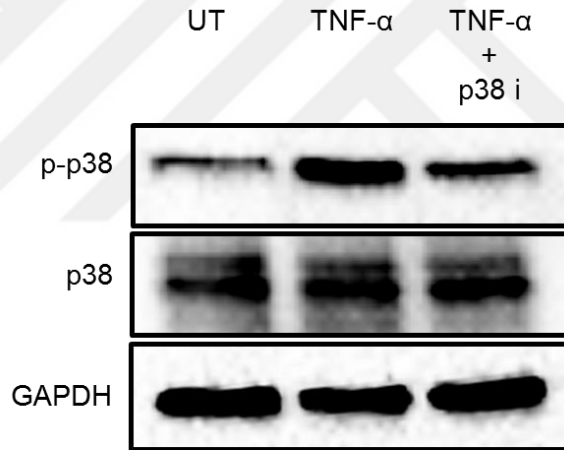
Çalışmamızda, kullandığımız inhibitör ve sitokinlerin ilgili sinyal yolları için işlevsel olup/olmadığını göstermek amacıyla total kandan izole edilen PBMC hücrelerinde uyarıcı ve inhibe edici etkileri araştırılmıştır. ERK1/2, p38, JNK, STAT3 ve NFkB total protein ekspresyonları ve fosforilasyon düzeyleri bu proteinler için spesifik olan antikolar kullanılarak Western blot yöntemiyle analiz edilmiştir. Ayrıca tüm blotlarda yükleme kontrolü olarak GAPDH kullanılmıştır.

Sağlıklı bireylerden elde edilen PBMC hücrelerinde ERK1/2 ekspresyon düzeyinin gruplar arası benzer olduğu anti-ERK1/2 antikoru ile gösterilmiştir. TNF- α stimülasyonu sonucu artmış olan ERK1/2 fosforilasyonunun ERK1/2 inhibitörü ile baskılandığı anti-phospho-ERK1/2 antikoru kullanılarak ortaya koyulmuştur. (**Şekil-4.1**).

p38 ekspresyon düzeyinin gruplar arası benzer olduğu anti-p38 antikoru ile tespit edilmiştir. Ayrıca, TNF- α stimülasyonu sonucu artmış olan p38 fosforilasyonunun p38 inhibitörü ile baskılandığı anti-phospho-p38 antikoru kullanılarak saptanmıştır (**Şekil-4.2**).

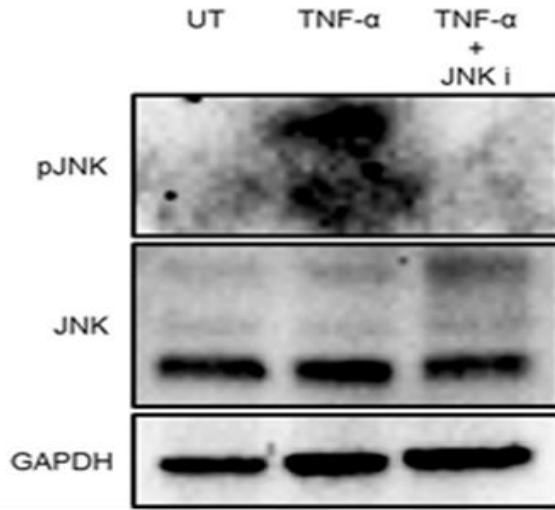


Şekil-4.1: ERK1/2 inhibitörü uygulanmış ve TNF- α ile uyarılmış PBMC hücrelerinin Western Blot yöntemiyle incelenmesi



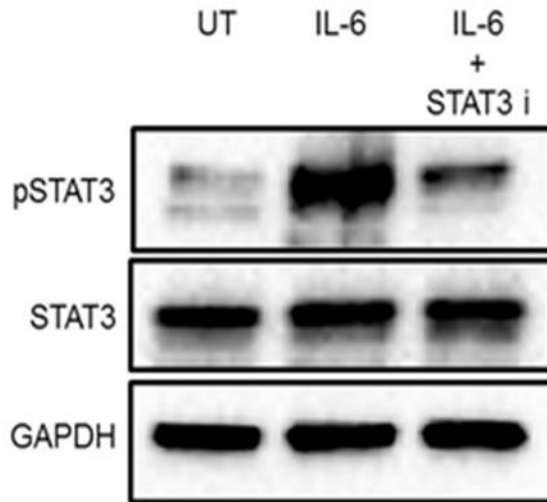
Şekil-4.2: p38 inhibitörü uygulanmış ve TNF- α ile uyarılmış PBMC hücrelerinin Western Blot yöntemiyle incelenmesi

Sağlıklı bireylerden Elde edilen PBMC hücrelerinde JNK ekspresyon düzeyinin gruplar arası benzer olduğu anti-JNK antikoru ile ortaya konulmuştur. Fakat, TNF- α stimülasyonu sonucu artmış olan JNK fosforilasyonunun JNK inhibitörü ile baskılandığı anti-phospho-JNK antikoru kullanılarak gözlenmiştir (Şekil-4.3).



Şekil-4.3: JNK inhibitörü uygulanmış ve TNF- α ile uyarılmış PBMC hücrelerinin Western Blot yöntemiyle incelenmesi

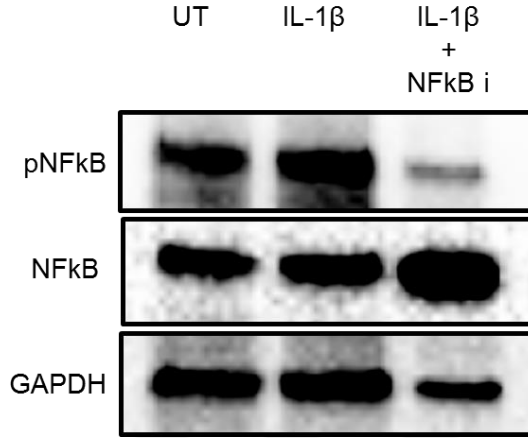
STAT3 ekspresyon düzeyinin gruplar arası benzer olduğu anti-STAT3 antikoruna ile gösterilmiştir. Öte yandan, IL-6 stimülasyonu sonucu artmış olan STAT3 fosforilasyonunun STAT3 inhibitörü ile baskılandığı anti-phospho-STAT3 antikoruna kullanılarak tespit edilmiştir (Şekil-4.4).



Şekil-4.4: STAT3 inhibitörü uygulanmış ve IL-6 ile uyarılmış PBMC hücrelerinin Western Blot yöntemiyle incelenmesi

NFkB ekspresyon düzeyinin gruplar arası benzer olduğu anti- NFkB antikoruna ile saptanmıştır. Fakat, IL-1 β stimülasyonu sonucu artmış olan

NFkB fosforilasyonunun NFkB inhibitörü ile baskılandığı anti-phospho-NFkB antikoru kullanılarak ortaya konmuştur (Şekil-4.5).

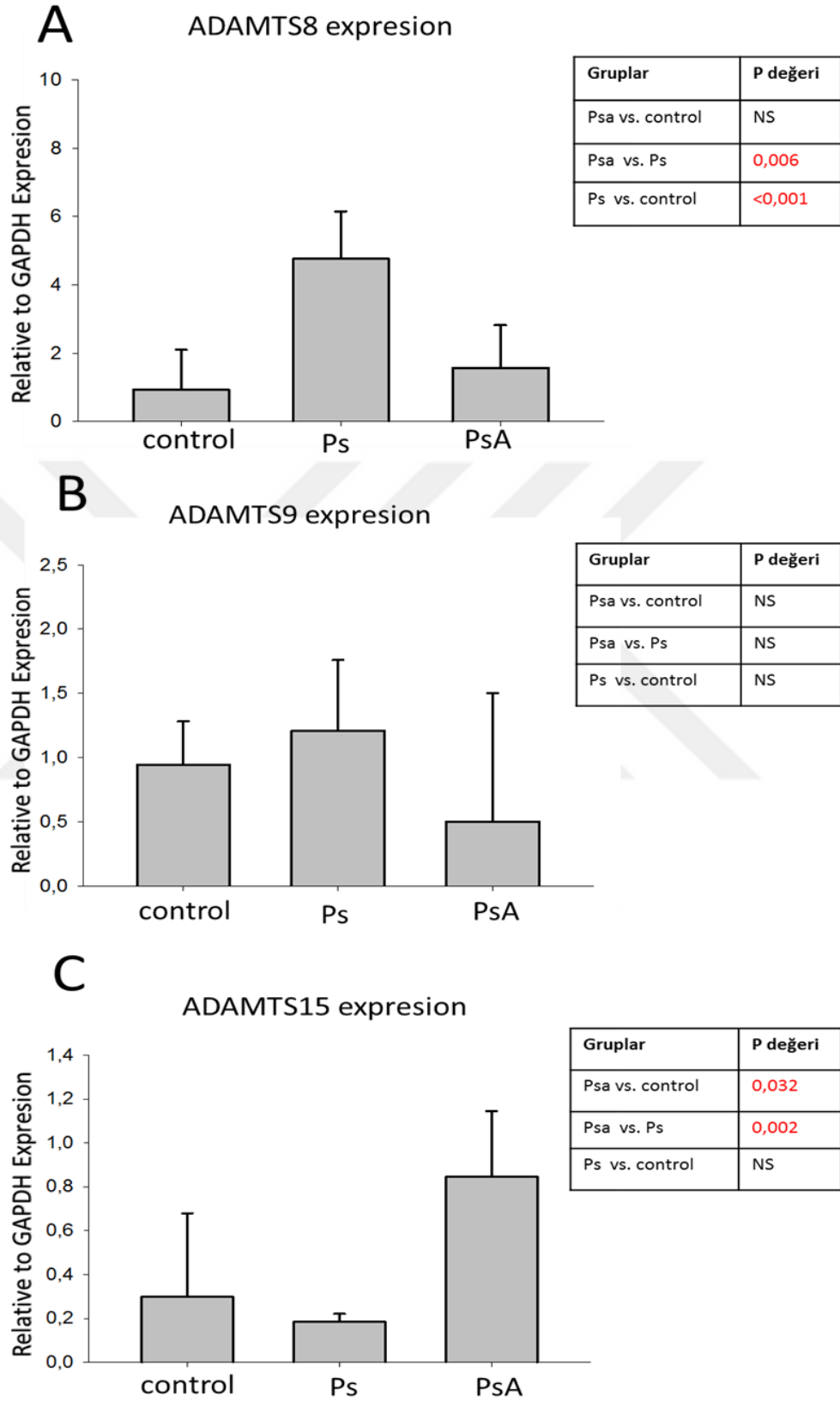


Şekil-4.5: NFkB inhibitörü uygulanmış ve IL-1β ile uyarılmış PBMC hücrelerinin Western Blot yöntemiyle incelenmesi

4.2 ADAMTS8, -9 ve -15 mRNA düzeylerinin qPCR ile analizi

Çalışmamızın qPCR kısmında ADAMTS8, -9 ve -15 gen ekspresyonlarının kontrol, Ps ve PsA gruplarına ait PBMC hücreleri için sitokin (TNF- α , IL-1 β ve IL-6) ve inhibitör (Erk1/2, p38, JNK, STAT3 ve NFkB) varlığındaki değişimleri araştırılmıştır.

Herhangi bir inhibitör veya sitokinle muamele edilmeyen (untreated, UT) PBMC hücrelerinin ADAMTS8, -9, ve -15 gen ekspresyon düzeyleri ve istatistiksel analizi Şekil-4.6'da gösterilmiştir. ADAMTS8 ekspresyon düzeyinin Ps grubunda kontrol ve PsA' ya oranla ciddi bir artış gösterdiği ve istatistiksel olarak Ps ile kontrol ve Ps ile PsA arasında anlamlı bir farklılığın olduğu gözlemlenmiştir (Şekil-4.6A). Ayrıca ADAMTS8 gen ekspresyonunun PsA ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği bulunmuştur. ADAMTS9 gen ekspresyonunun her üç grup için de istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermediği tespit edilmiştir (Şekil-4.6B). ADAMTS15 gen ekspresyonunun PsA grubunda kontrol ve Ps gruplarına oranla artmış olduğunu ve istatistiksel olarak PsA ile kontrol ve PsA ile Ps arasında anlamlı farklılığın olduğu gözlemlenmiştir(Şekil-4.6C).

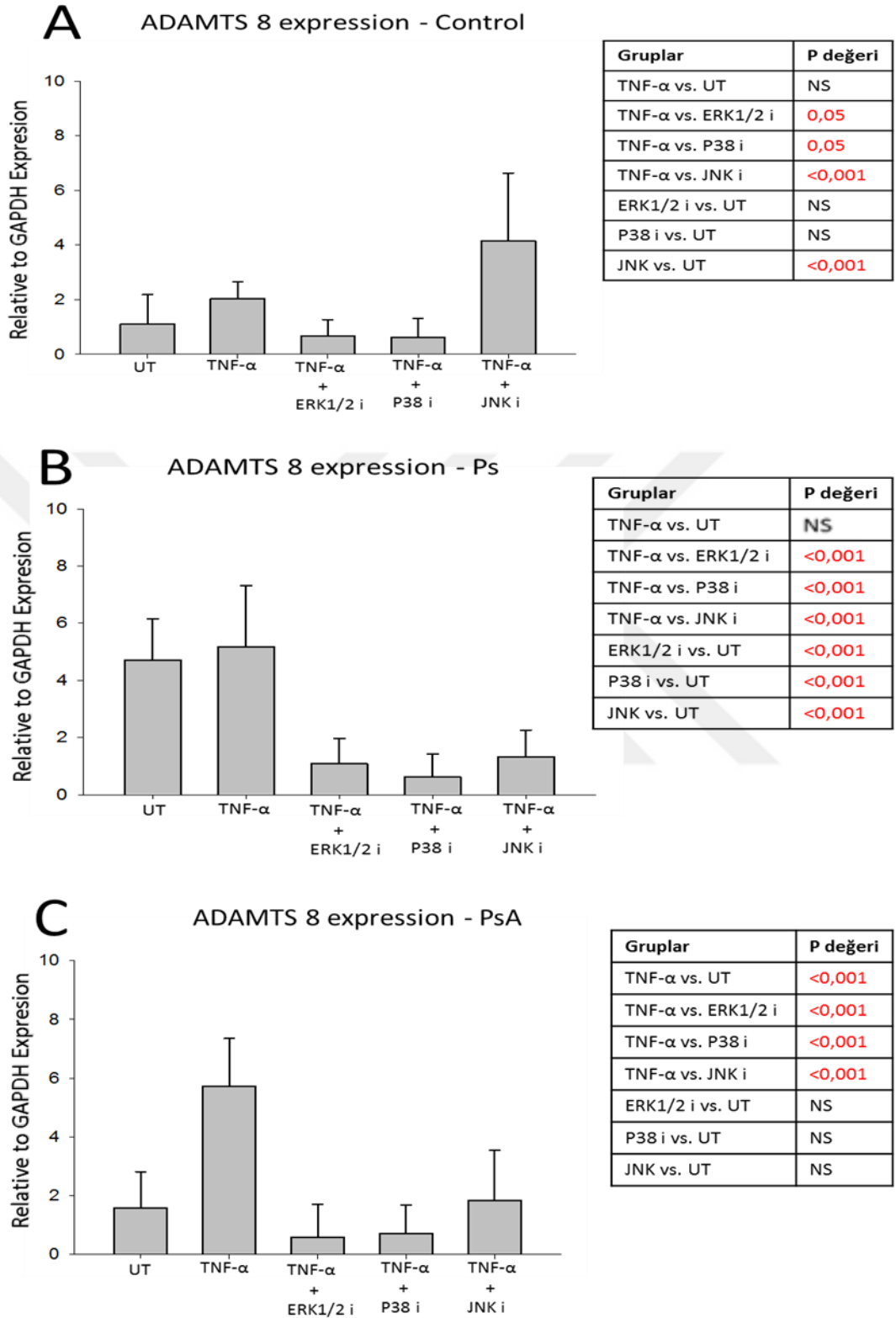


Şekil-4.6: PBMC hücrelerinde ADAMTS8 (A), ADAMTS9 (B) ve ADAMTS15 (C) genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri ve istatistiksel verileri (n:15)

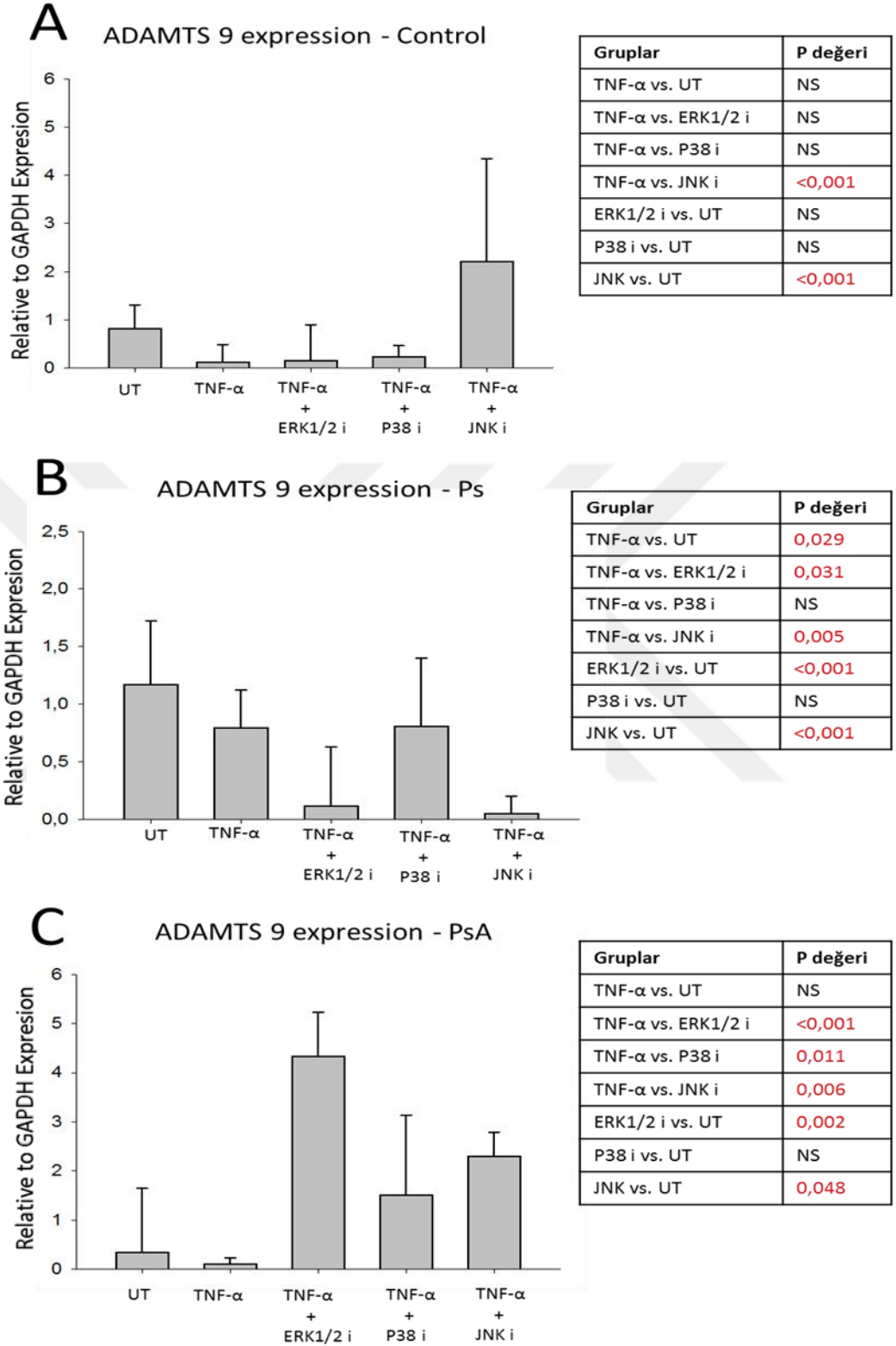
Kontrol, Ps ve PsA gruplarındaki PBMC hücreleri ERK1/2, p38, JNK spesifik inhibitörler ile (10 μ M) 2 saat muamele edildikten sonra TNF- α (100 ng/ml) ile 24 saat stimule edildi. İnhibisyon ve uyarılma işlemi sonrası, qPCR yöntemiyle analiz edilen ADAMTS8, -9 ve -15 gen ekspresyon düzeyleri ve istatistiksel verileri **Şekil-4.7,8 ve 9'** da verilmiştir.

Kontrol grubunda, ADAMTS8 gen ekspresyonunun TNF- α stimülasyonu sonucu değişmediği, fakat, ERK1/2 ve p38 inhibisyonları sonrası TNF- α uyarımına yanıt olarak ADAMTS8 ekspresyonunda, istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu görülmüştür. JNK inhibisyonu sonucunda ADAMTS8 gen ekspresyon düzeyi TNF- α stimülasyonuna yanıt olarak artmıştır (**Şekil-4.7A**). Ps grubunda, ADAMTS8 gen ekspresyonunun TNF- α stimülasyonu sonucu değişmediği tespit edilmiştir. ERK1/2, p38 ve JNK inhibisyonlarıyla TNF- α ile indüklenmiş ADAMTS8 gen ekspresyon düzeyi önemli oranda azalmıştır (**Şekil-4.7B**). PsA grubunda, TNF- α stimülasyonu ADAMTS8 gen ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olmuştur. ERK1/2, p38 ve JNK inhibisyonlarının ise TNF- α 'nın ADAMTS8 ekspresyonu üzerindeki indükleyici etkisini ortadan kaldırarak istatistiksel olarak anlamlı azalışlara sebep oldukları gözlemlenmiştir(**Şekil-4.7C**).

Kontrol grubunda, ADAMTS9 gen ekspresyonunun TNF- α stimülasyonu sonucu değişmediği, JNK inhibisyonu sonrası ise TNF- α uyarımına bağlı olarak ADAMTS9 ekspresyonunda bir artış olduğu bulunmuştur (**Şekil-4.8A**). Ps grubunda, ADAMTS9 gen ekspresyon düzeyi TNF- α uyarılmasıyla azalış göstermiş ve TNF- α 'nın baskılayıcı etkisi ERK1/2 ve JNK inhibisyonlarıyla daha da artmıştır (**Şekil-4.8B**). PsA grubunda, ADAMTS9 gen ekspresyonunun TNF- α stimülasyonu sonucu değişmediği, ancak ERK1/2, p38 ve JNK inhibisyonlarının TNF- α uyarımına yanıt olarak ADAMTS9 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı artışlara neden olduğu bulunmuştur (**Şekil-4.8C**).



Şekil-4.7: ERK1/2, p38 ve JNK inhibitörleri uygulanmış ve TNF- α ile uyarılmış olan kontrol(A), Ps(B) ve PsA (C) PBMC hücrelerinde ADAMTS8 geninin mRNA ekspresyon düzeyleri ve istatistiksel verileri (n:15).



Şekil-4.8: ERK1/2, p38 ve JNK inhibitörleri uygulanmış ve TNF- α ile uyarılmış olan kontrol (A), Ps (B) ve PsA (C) PBMC hücrelerinde ADAMTS9 geninin mRNA ekspresyon düzeyleri ve istatistiksel verileri (n:15).

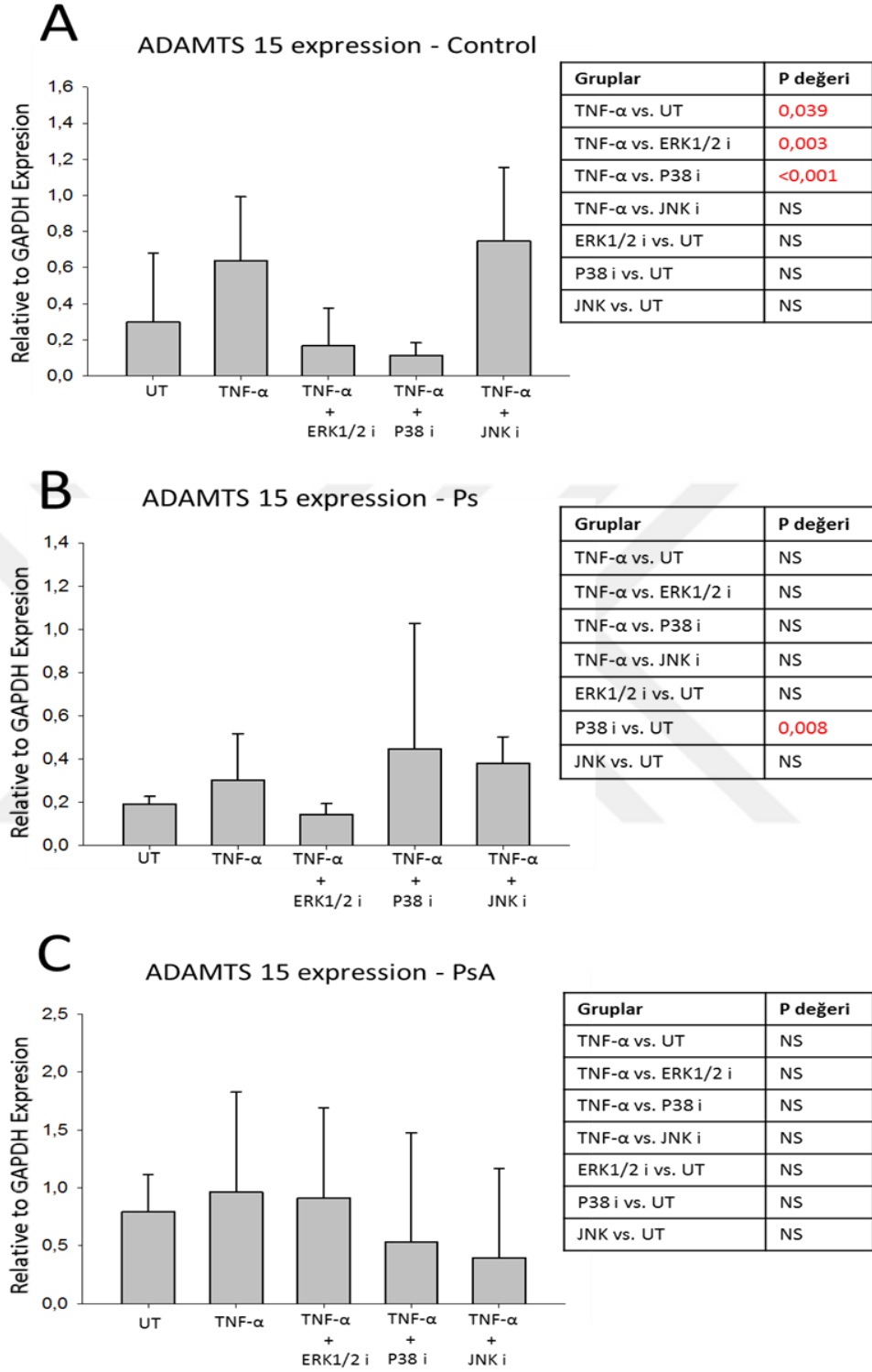
Kontrol grubunda, ADAMTS15 gen ekspresyonunun TNF- α stimülasyonu sonucu upregüle olduğu ortaya konmuştur. ERK1/2 ve p38 inhibisyonlarının TNF- α 'nın indükleyici etkisini ortadan kaldırarak ADAMTS15 ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı azalışlara sebep oldukları gözlemlenmiştir (**Şekil-4.9A**). Ps ve PsA gruplarında ADAMTS15 gen ekspresyon düzeylerinin TNF- α stimülasyonu ve ERK1/2, JNK ve p38 inhibisyonları sonucu değişmediği gözlemlenmiştir (**Şekil-4.9B**, **Şekil-4.9C**).

Kontrol, Ps ve PsA gruplarının PBMC hücreleri STAT3 inhibitörüyle (10 μ M) 2 saat muamele edildikten sonra IL-6 (100 ng/ml) ile 24 saat uyarıldı. İnhibisyon ve uyarılma işlemi sonrası, qPCR yöntemiyle analiz edilen ADAMTS8, -9 ve -15 gen ekspresyon düzeyleri ve istatistiksel verileri **Şekil-4.10**, **.11** ve **.12**'de verilmiştir.

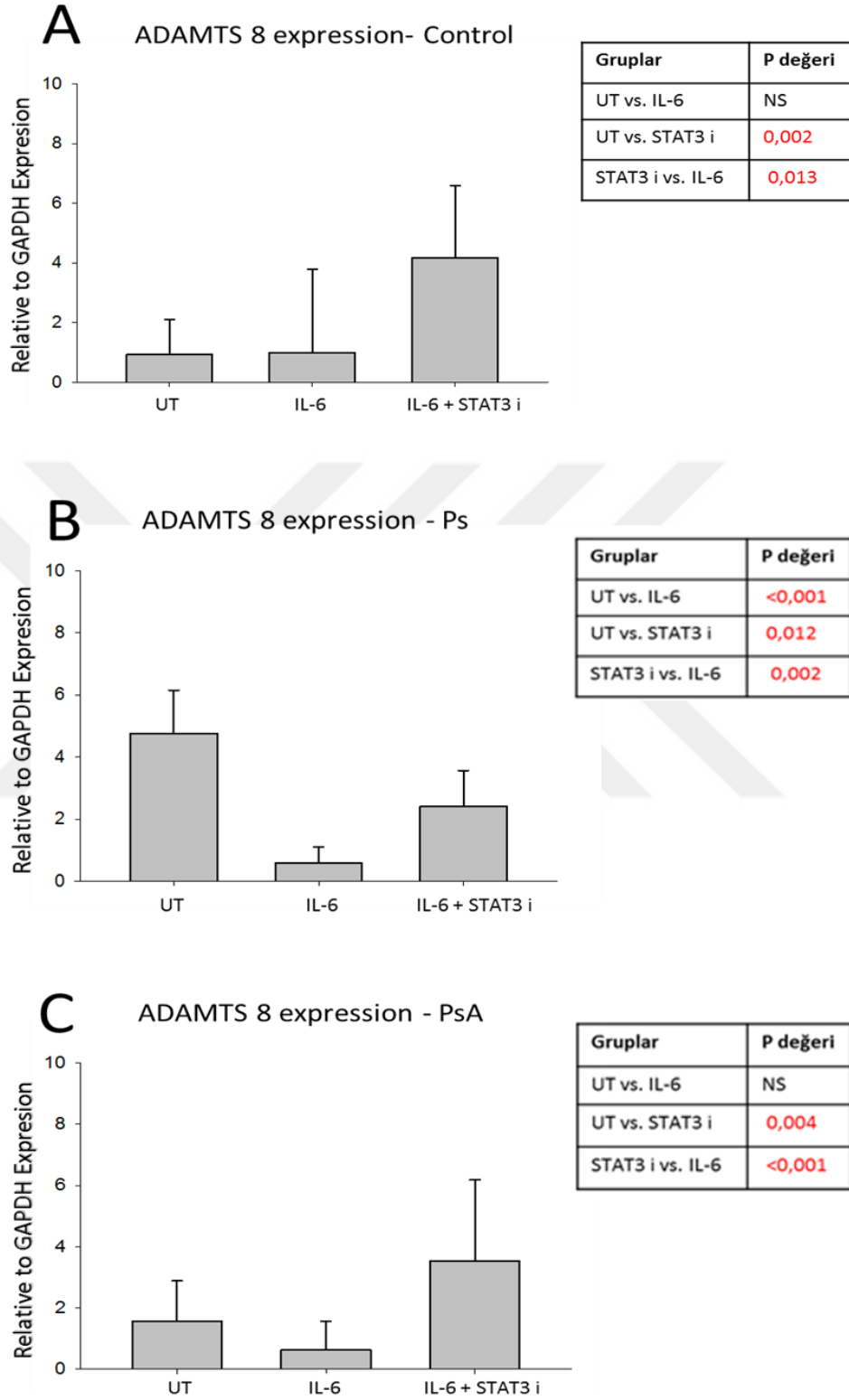
Kontrol ve PsA gruplarında ADAMTS8 gen ekspresyonu IL-6 stimülasyonu sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermemiştir. Fakat, kontrol ve PsA grupları için STAT3 inhibisyonu sonrası IL-6 uyarımına bağlı olarak ADAMTS8 gen ekspresyonunda anlamlı artışlar tespit edilmiştir (**Şekil-4.10C**, **Şekil-4.10A**). Ps grubunda ise ADAMTS8 gen ekspresyonunun IL-6 stimülasyonu sonucu downregüle olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, ADAMTS8 gen ekspresyonunun STAT3 inhibisyonu sonrası IL-6 uyarılmasına yanıt olarak artış gösterdiği ortaya konmuştur (**Şekil-4.10B**).

Kontrol ve PsA gruplarında ADAMTS9 gen ekspresyon düzeyinde IL-6 stimülasyonu sonucunda anlamlı bir değişim gözlemlenmezken, STAT3 inhibisyonu sonrası IL-6 uyarılmasına yanıt olarak ADAMTS9 gen ekspresyonunun artış gösterdiği ortaya konmuştur (**Şekil-4.11A**, **Şekil-4.11C**). Ps grubunda IL-6 stimülasyonu sonucunda azalan ADAMTS9 gen ekspresyon düzeyi, STAT3 inhibisyonu sonrasında IL-6 uyarılmasına bağlı olarak daha da azaldığı bulunmuştur (**Şekil-4.11B**).

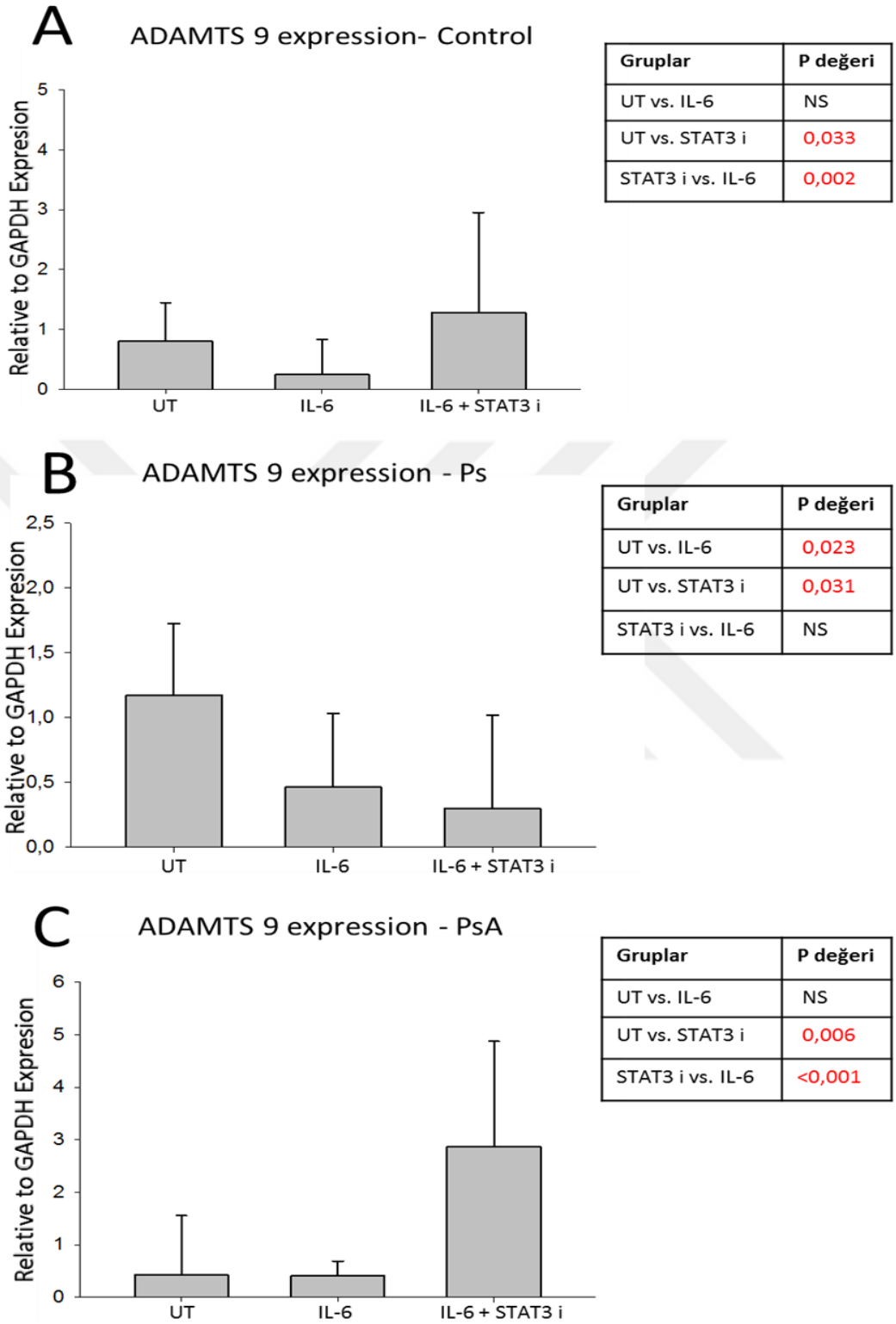
Ps grubunda ADAMTS15 gen ekspresyon düzeyi IL-6 stimülasyonu sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir (**Şekil-4.12B**).



Şekil-4.9: ERK1/2, p38 ve JNK inhibitörleri uygulanmış ve TNF- α ile uyarılmış olan kontrol (A), Ps (B) ve PsA (C) PBMC hücrelerinde ADAMTS15 geninin mRNA ekspresyon düzeyleri ve istatistiksel verileri (n:15).



Şekil-4.10: STAT3 inhibitörü uygulanmış ve IL-6 ile uyarılmış olan kontrol (A), Ps (B) ve PsA (C) PBMC hücrelerinde ADAMTS8 geninin mRNA ekspresyon düzeyleri ve istatistiksel verileri (n:15).



Şekil-4.11: STAT3 inhibitörü uygulanmış ve IL-6 ile uyarılmış olan kontrol (A), Ps (B) ve PsA (C) PBMC hücrelerinde ADAMTS9 geninin mRNA ekspresyon düzeyleri ve istatistiksel verileri (n:15).

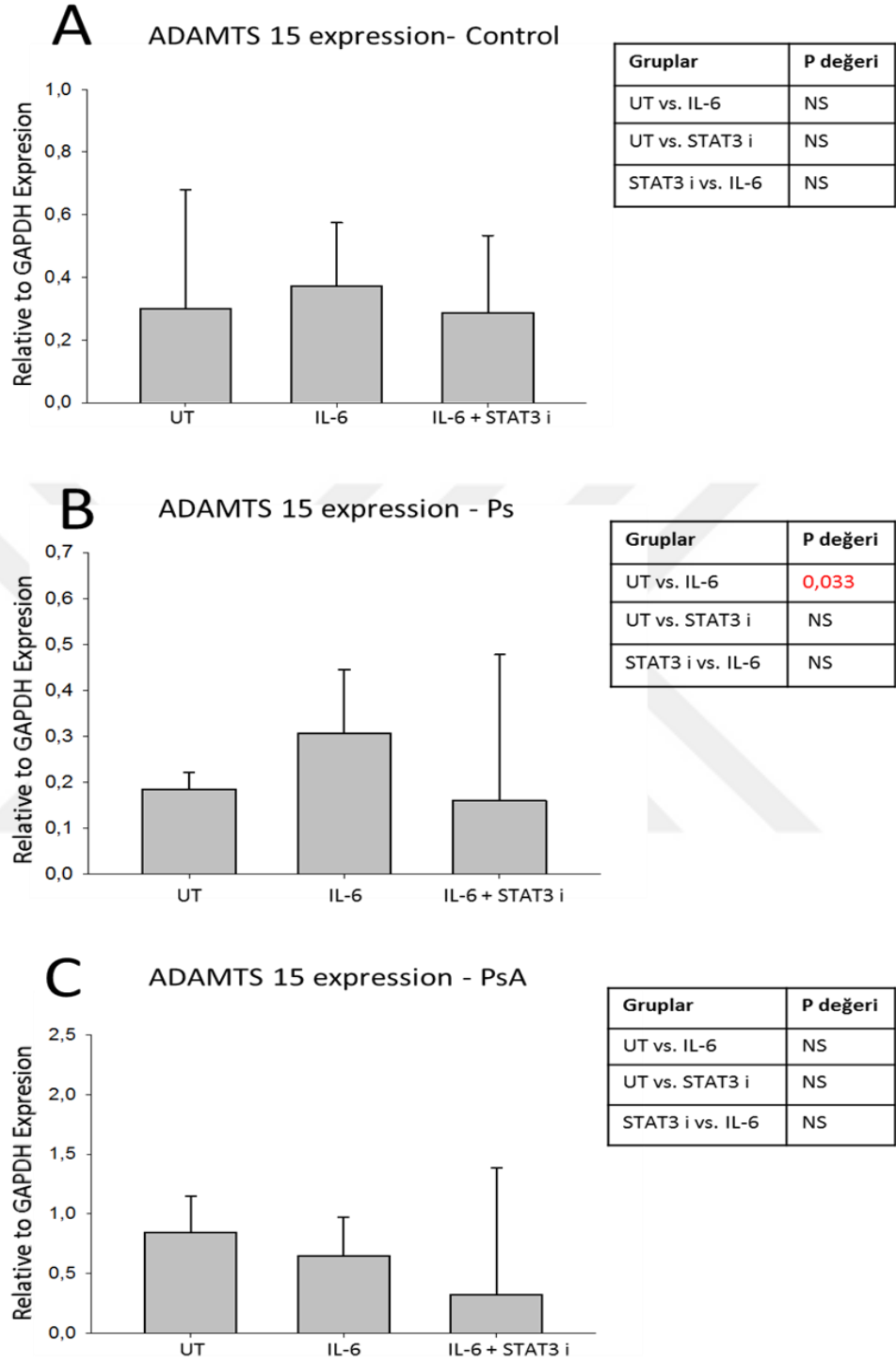
Kontrol ve PsA gruplarında ADAMTS15 gen ekspresyonunun IL-6 stimülasyonu ve STAT3 inhibisyonu sonucu değişmediği gözlemlenmiştir (**Şekil-4.12**).

Kontrol, Ps ve PsA gruplarında, PBMC hücreleri NFkB inhibitörüyle (10 µM) 2 saat muamele edildikten sonra IL-1β (20 ng/ml) ile 24 saat uyarıldı. İnhibisyon ve uyarılma işlemi sonrası, qPCR yöntemiyle analiz edilen ADAMTS8, -9 ve -15 gen ekspresyon düzeyleri ve istatistiksel verileri **Şekil-4.13, .14 ve .15**'da verilmiştir.

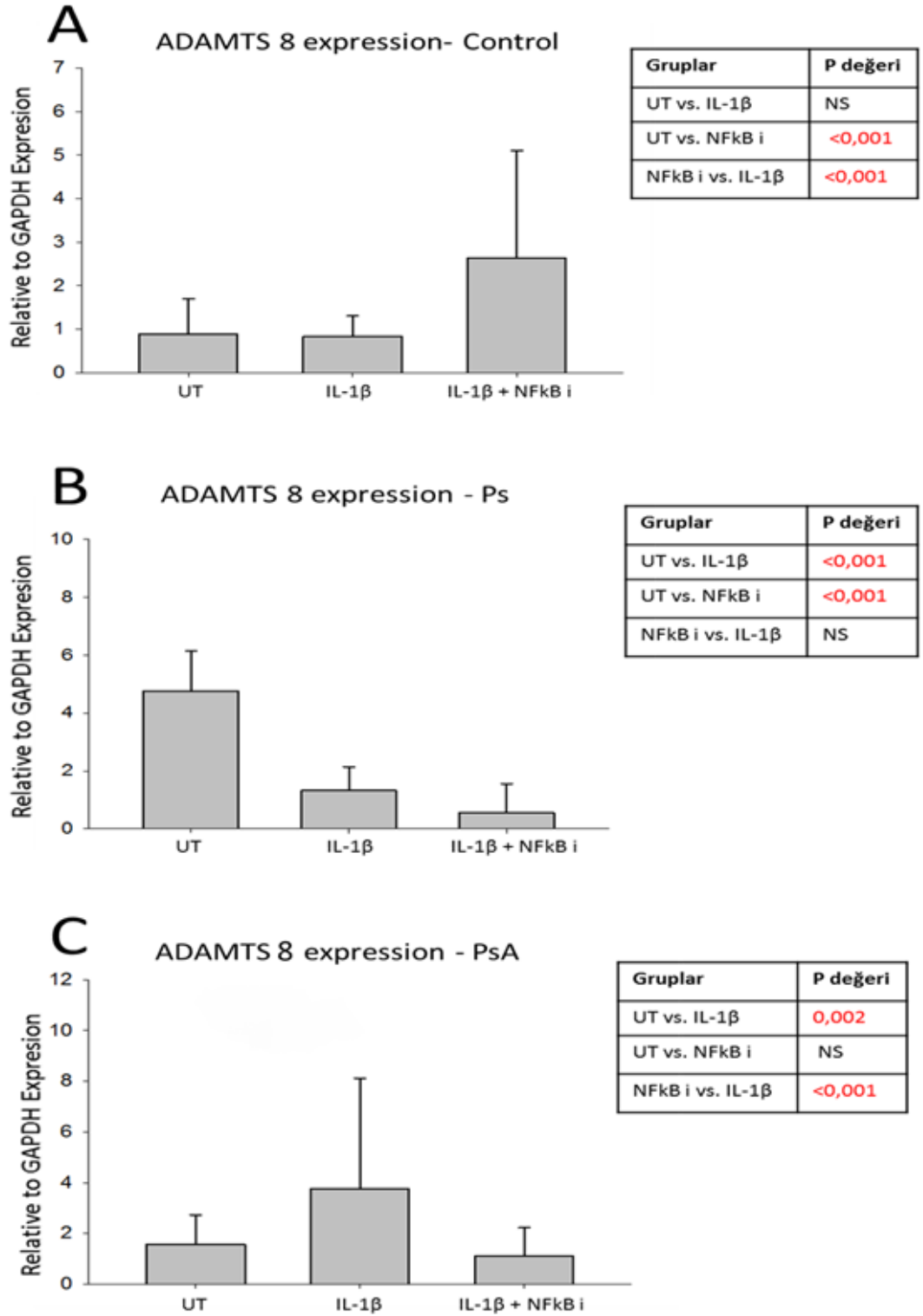
Kontrol grubunda, ADAMTS8 gen ekspresyonu IL-1β stimülasyonu sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermemiştir. Fakat, NFkB inhibisyonu sonrası IL-1β uyarılmasına yanıt olarak ADAMTS8 gen ekspresyonunun upregüle olduğu tespit edilmiştir (**Şekil-4.13A**). Ps grubunda IL-1β ile stimüle edilen hücrelerde azalan ADAMTS9 gen ekspresyonunun, NFkB inhibisyonu sonrası IL-1β uyarılmasına yanıt olarak daha da azaldığı ortaya konulmuştur (**Şekil-4.13B**). PsA grubunda ise IL-1β stimülasyonunun ADAMTS8 gen ekspresyonunda anlamlı bir artışa neden olduğu gözlenmiştir. Fakat, NFkB inhibisyonunun IL-1β' nin ADAMTS8 gen ekspresyonu üzerindeki indükleyici etkisini ortadan kaldırdığı bulunmuştur (**Şekil-4.13C**).

Kontrol, Ps ve PsA gruplarının her üçü içinde ADAMTS9 gen ekspresyonu IL-1β stimülasyonu sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermemiştir. Ancak, her üç grup içinde, NFkB inhibisyonu sonrası IL-1β uyarılmasına yanıt olarak ADAMTS9 gen ekspresyon düzeylerinde ciddi ve anlamlı artışlar olduğu gözlemlenmiştir (**Şekil-4.14**).

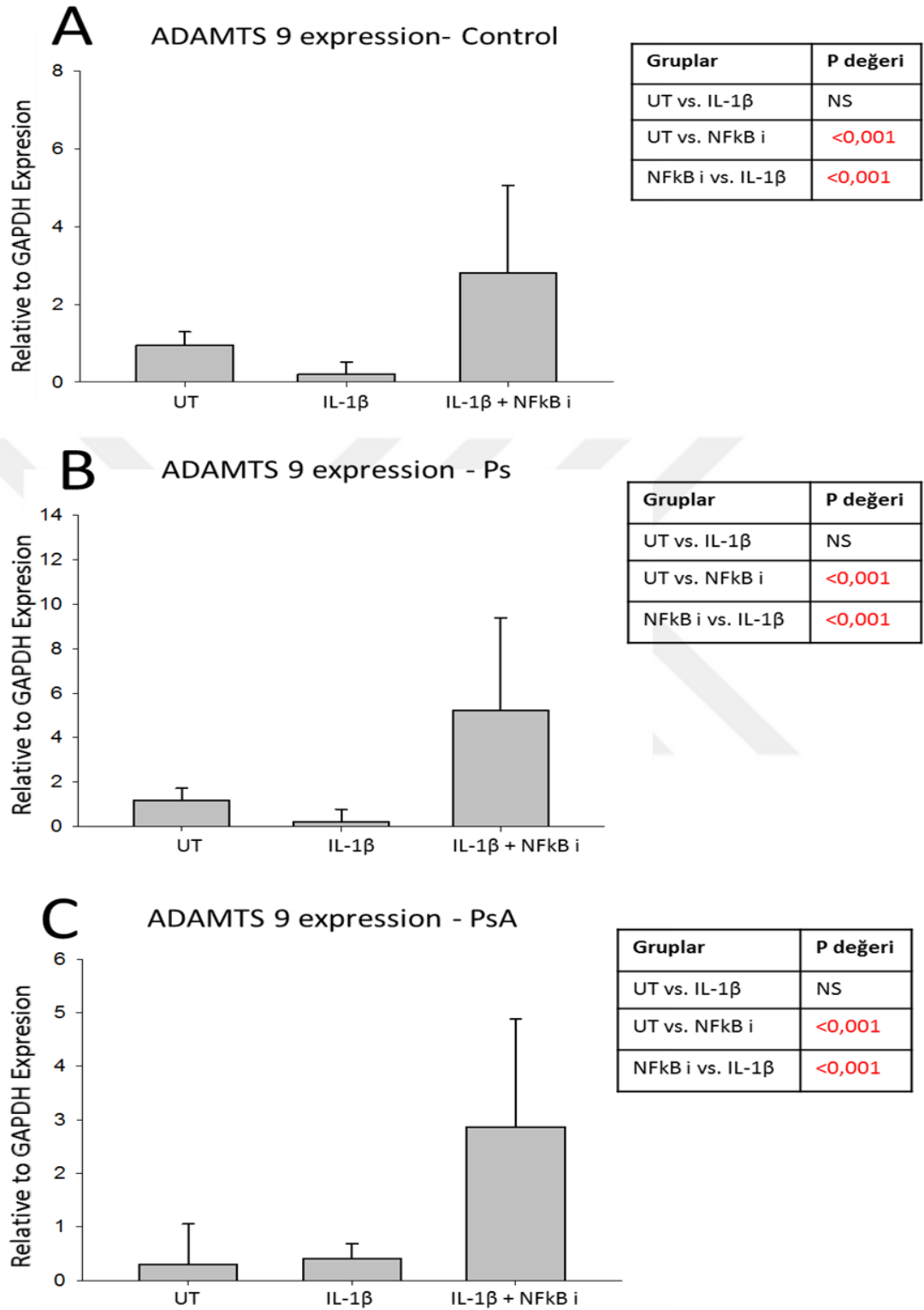
Kontrol ve Ps gruplarında ADAMTS15 gen ekspresyonunun IL-1β stimülasyonu sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermediği, fakat PsA grubunda ADAMTS15 gen ekspresyonunun IL-1β uyarımıyla downregüle olduğu bulunmuştur. Öte yandan, kontrol ve Ps ve PsA gruplarının tamamı için NFkB inhibisyonu sonrası IL-6 stimülasyonuna yanıt olarak ADAMTS15 gen ekspresyonunun indüklendiği tespit edilmiştir (**Şekil-4.15**).



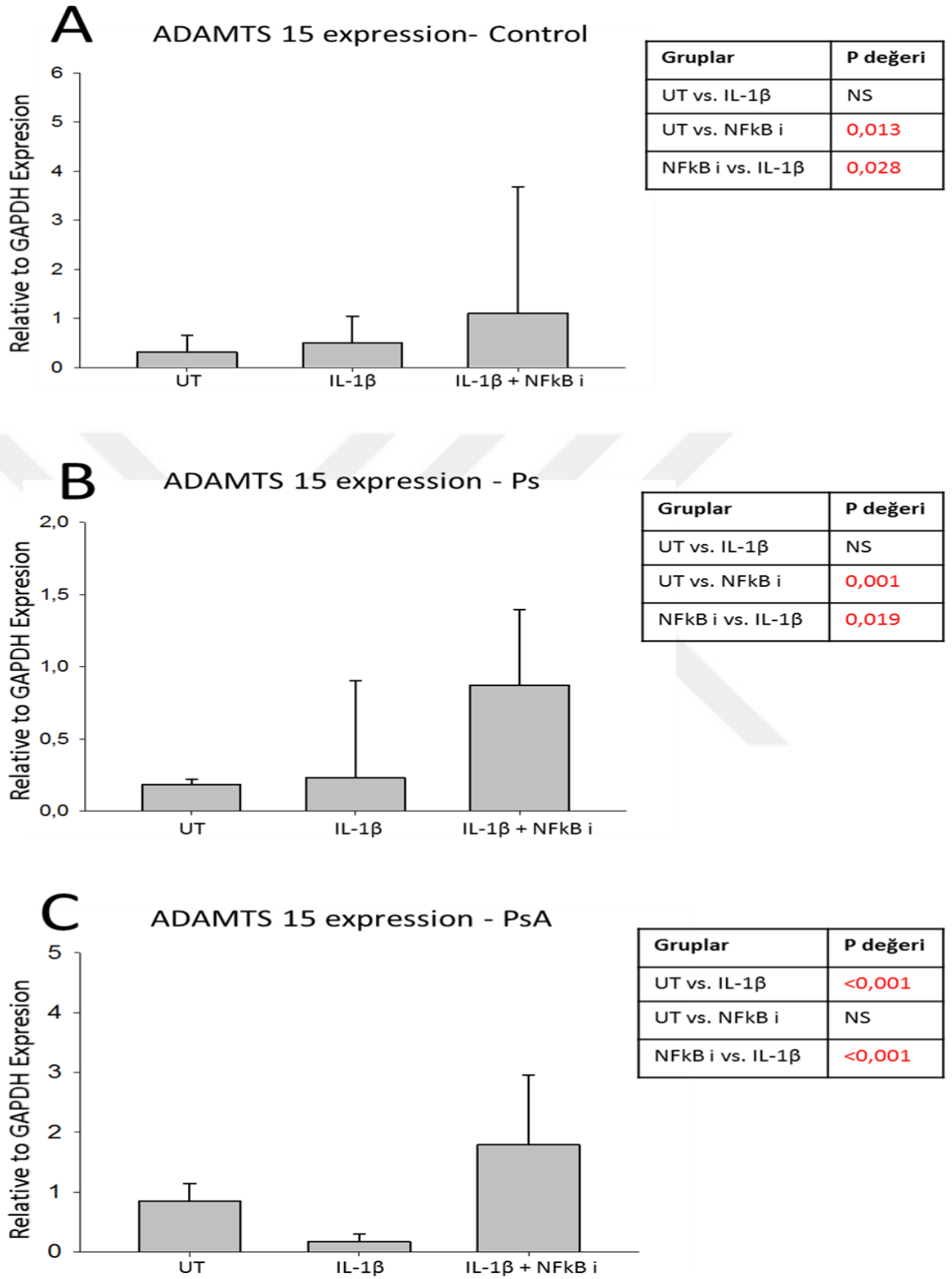
Şekil-4.12: STAT3 inhibitörü uygulanmış ve IL-6 ile uyarılmış olan kontrol (A), Ps (B) ve PsA (C) PBMC hücrelerinde ADAMTS15 geninin mRNA ekspresyon düzeyleri ve istatistiksel verileri (n:15).



Şekil-4.13: NF κ B inhibitörü uygulanmış ve IL-1 β ile uyarılmış olan kontrol (A), Ps (B) ve PsA (C) PBMC hücrelerinde ADAMTS8 geninin mRNA ekspresyon düzeyleri ve istatistiksel verileri (n:15).



Şekil-4.14: NF κ B inhibitörü uygulanmış ve IL-1 β ile uyarılmış olan kontrol (A), Ps (B) ve PsA (C) PBMC hücrelerinde ADAMTS9 geninin mRNA ekspresyon düzeyleri ve istatistiksel verileri (n:15).



Şekil-4.15: NF κ B inhibitörü uygulanmış ve IL-1 β ile uyarılmış olan kontrol (A), Ps (B) ve PsA (C) PBMC hücrelerinde ADAMTS15 geninin mRNA ekspresyon düzeyleri ve istatistiksel verileri (n:15)

5. TARTIŞMA

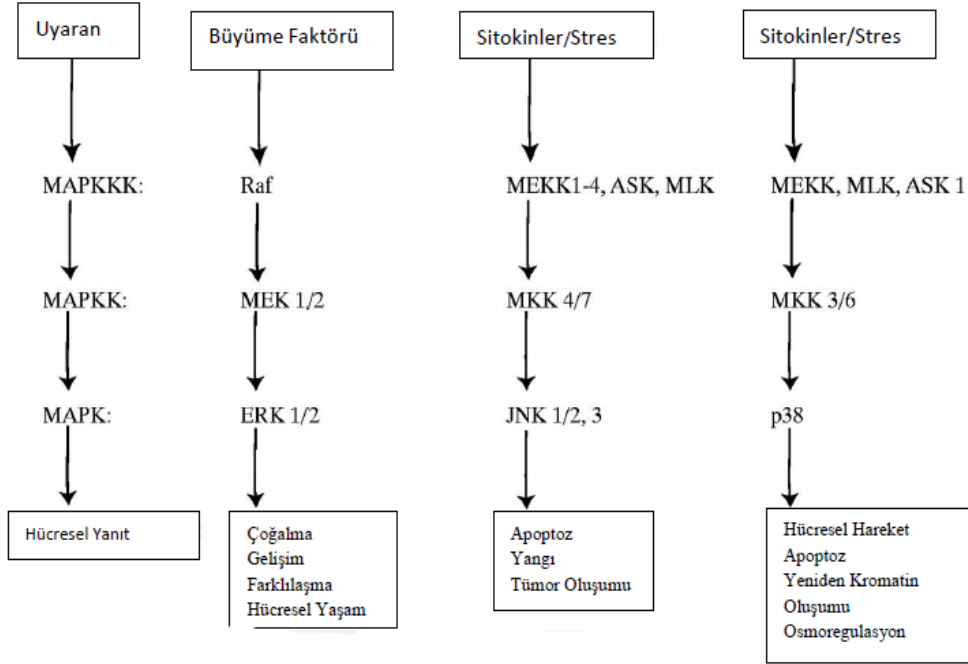
Ps, görülme sıklığı toplumda %1-3 aralığında olan, deri ve tırnak tutulumu ile seyreden kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Etiyolojisi tam olarak bilinmeyen bu hastalığın, genetik ve çevresel faktörler ile immün sistem arasındaki etkileşimler sonucunda geliştiği öngörülmektedir (9,10).

PsA, hem deri hem de eklemleri etkileyen kemik ve kıkırdak yıkımına, fonksiyonel bozukluğa ve yaşam kalitesinin azalmasına neden olan kronik, inflamatuvar bir hastalıktır (1,2). PsA' nın patogeneğinde genetik, çevresel ve immünolojik faktörler rol oynamaktadır ve bu faktörlerin etkileşimleri tam olarak anlaşılammıştır. Günümüzde PsA' nın kesin bir tedavisi yoktur ve hastalık progresyonunu ve terapötik yanıtı tam olarak tahmin edebilen spesifik biyobelirteçler mevcut değildir (3,4).

Çalışmaya alınan PsA'lı hastaların yaş ortalaması $46,26 \pm 14,77$ olarak belirlenirken Ps'li hastalarda bu değer $35,93 \pm 17,46$ ve sağlıklı kontrol grubunda ise $27,93 \pm 7,75$ olarak hesaplandı. PsA her yaşta görülebilmekle birlikte 4. ve 5. dekatlarda daha sık görülmektedir. Agarwal ve ark. 596 PsA hastasını değerlendirdikleri çalışmalarında ortalama başlangıç yaşını 47.7yıl olarak bulmuşlardır (119). Bizim çalışmamızdaki hastaların yaşları da literatürle benzerlik göstermektedir.

Mayadan insana kadar tüm ökaryotik hücrelerde bulunan MAPK ailesi, hücrelerde sinyal iletiminde hayati rolü olan reseptörler aracılığı ile gerçekleşen uyarının kesişme ve/veya birleşmesinden sorumlu bir dizi proteinden oluşmaktadır (106). Hücre regülasyonundaki en geniş mekanizmalar arasında yer alan MAPK sinyal ileti ağının fizyolojik aktivasyonu hücre membran reseptörleri sayesinde bir çok büyüme faktörü, hormon ve sitokinlerin üretimini tetikleyebilmektedir (107). Birbirini takip eden yolaklarla aktif hale gelen bu sitoplazmik proteinler, hücre içindeki diğer proteinlerin, serin (Ser) / treonin (Thr) amino asitlerine fosfat

gruplarını aktararak etkinliklerini düzenlerler (108). MAPK' lar hücrelerden gelen uyarılara yanıt olarak oluşturulan hücre bölünmesi, hücre canlılığı, apoptosis, metabolizma, farklılaşma ve motilite ile ilişkili süreçler ve gen ifadelerinin düzenlenmesinde rol oynayan sinyal iletiminden sorumlu proteinlerdir (109).



Çalışmamızda inhibitörlerini kullandığımız ERK1/2, p38 ve JNK klasik MAPK yolları olarak bilinirler ve MAPK yolağının sinyal iletim ağında yer alırlar (Şekil 5.1).

Şekil 5.1: MAPK yolları (ERK1/2, p38 ve JNK)

Sitoplazmik transkripsiyon faktörleri olarak bilinen STAT ailesi proteinleri sitokin, büyüme faktörü veya peptid reseptörlerinden sinyal olarak aktif duruma geçer ve bu sinyalleri çekirdeğe iletirler (110). Sitoplazmada inaktif formda bulunan STAT proteinlerinin aktif duruma geçişi fosforillenmeyle olur ve dimerleşerek çekirdeğe yönelirler. İşlevlerini hedef genin promotör bölgesine bağlanarak gen ekspresyon değişiklikleriyle gösterirler (111). Bu ailenin yedi üyesinden biri olan STAT3, Epitelial hücrelerin apoptozunda, hücre büyümesinin düzenlenmesinde, derinin yeniden şekillenmesinde, makrofaj inaktivasyonunda, IL6' ya bağımlı rejenerasyonda, hücresel transformasyonda ve inflamatuvar sitokinlerin downregülasyonunda rolleri bulunmaktadır (112-114).

B lenfositlerin çekirdeğinde bulunan immunglobulin κ hafif zincirine bağlanan NFkB immün yanıtta yer alan, hücre proliferasyonuna ve apoptoza katılan gen regülasyonu ile ilgili dimerik bir transkripsiyon faktörüdür (115,116). NFkB, I κ B olarak bilinen inhibitör sitoplazmik protein ailesine bağlı halde bulunur ve bu proteinlerin fosforillenmesiyle aktifleşir (117). NFkB mikroorganizmalar, interlökinler, büyüme faktörleri, kemoterapötik ajanlar, virüsler gibi yüzlerce farklı hücre dışı uyaran ile indüklenebilir ve bunun sonucunda yine yüzlerce hedef genin ekspresyonunu düzenler (118).

Çalışmamızın Western blot kısmındaki amacı, gen ekspresyonu aşamasındaki stimülasyon ve inhibisyon basamaklarının gerçekleştiğinin protein düzeyinde ilgili antikolarla gösterilmesi idi. Western blot bulgularımız ERK1/2, JNK, p38, STAT3 ve NFkB inhibisyonları ile IL-6, IL-1 β ve TNF- α uyarılmalarının protein düzeyinde de gerçekleştiğini göstermektedir. Western blot bulgularımız, qPCR çalışmalarımızın güvenilirliğini arttırmıştır.

Çalışmamızda, ADAMTS8,-9 ve -15 genlerinin PsA, Ps ve kontrol grubundaki ekspresyon düzeylerini araştırdık. ADAMTS8, -9 ve -15 preteazları, agrekanazlar olarak adlandırılan ADAMTS türevleridirler. ADAMTS' ler bildirildiği üzere büyüme gelişme sırasında ve eklem hastalıklarının ilerlemesi sırasında kıkırdığın hücre dışı matrisinin metabolizmasında önemli roller üstlenmektedirler (120). Bilgimiz dahilinde, literatürde ADAMTS8,-9 ve -15 genlerinin PsA patogenezindeki rolü için yapılmış spesifik çalışmalar mevcut değildir, bu anlamda çalışmamız ADAMTS8,-9 ve -15 genlerinin PsA patogenezinde bir rolü olup olmadığını araştıran ilk çalışmadır. Diğer artrit türevleri için yapılmış çalışmalar mevcuttur. Naito ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada; insan artiküler kıkırdığında ADAMTS türlerinin ekspresyonu qPCR yöntemi ile araştırılmıştır. ADAMTS4' ün osteoartritlik kıkırdakta baskın olarak eksprese edilen ADAMTS olduğu, buna rağmen ADAMTS5' in hem OA' lı hemde normal kıkırdakta eksprese edildiği gösterilmiştir. ADAMTS9' un esas olarak normal kıkırdaktan eksprese edildiği, ADAMTS1, ADAMTS8 ve ADAMTS15' in ise hem OA' lı hem de normal kıkırdakta ekspresyonunun olmadığı veya önemsiz düzeyde olduğunu bulmuşlardır.

Bu verilere dayanarak, ADAMTS8,-9 ve -15 gen ekspresyon düzeylerinin artritli hastalarla kontrol grubuna kıyasla değişmediği belirtilmiştir (121). Kevorkian ve arkadaşlarının insan kıkırdağında qPCR ile yaptığı başka bir çalışmada ise, normal kıkırdağa göre ADAMTS7, ADAMTS17, ADAMTS14 ve ADAMTS11 gen ekspresyonlarının arttığı, ADAMTS1, ADAMTS5, ADAMTS9 ve ADAMTS15 gen ekspresyonlarının ise azaldığı gösterilmiştir (122). Collins-Racie ve arkadaşlarının artritli ADAMTS8 ekspresyon değişimi ile ilgili yapmış oldukları çalışmada ADAMTS8 ekspresyonunun artmış olduğu belirtilmiştir. Fakat, aynı çalışmada da belirtildiği üzere artritlerde ADAMTS8 ekspresyonu için literatürde çelişkili sonuçlar mevcuttur (123). Çalışmamızda ADAMTS8 ve -9 gen ekspresyonları için PsA hastalarıyla kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlemleyemedik. Buna karşın, ADAMTS15 ekspresyonu için anlamlı bir artış olduğunu gözlemledik. Bu sonuçlar ADAMTS15' in PsA patogenezinde potansiyel bir rolü olabileceğini ortaya koymaktadır. ADAMTS8 ve -9 enzimleri için bulgularımız literatürler benzerlik göstermektedir. Ayrıca, diğer artrit türlerinde olduğu gibi PsA' lı hastalarda da ADAMTS8 ve -9 enzimlerinin sürekli agreganaz etkinliğinin gözlemlenemediğini düşündürmektedir. ADAMTS8 ekspresyonunun bir başka inflamatuvar hastalık olan Ps grubunda ise ciddi oranda arttığını bulduk. ADAMTS8 ekspresyonundaki artış, Ps hastalığı için bu enzimin önemli bir tetikleyici faktör olabileceği ihtimalini önermektedir.

TNF- α çoğu inflamatuvar ve otoimmün hastalıkta artış gösteren pro-inflamatuvar bir sitokindir. Son yıllarda anti TNF- α ilaçlarının RA, PsA ve Ps gibi inflamatuvar hastalıkların tedavisinde kullanılmasıyla hastalığın hem cilt lezyonlarında hem de artrit gelişimi üzerinde belirgin şekilde iyileşme sağladığı gösterilmiştir, fakat bazı hastalarda da etkinlik göstermediği veya gösterse bile sürekliliğinin olmadığı belirtilmiştir (31,124-126). Bu durum hem PsA, hem de Ps patogenezinde TNF- α ' nın önemli bir rolü olduğunu ve TNF- α inhibitörlerinin aslında bu hastalıkları inaktive etmediği sadece baskıladığı fikrini de güçlendirmektedir (127). Sonuçlarımıza göre TNF- α stimülasyonu sonucunda ADAMTS8 gen ekspresyonu Ps ve PsA gruplarında artış göstermiştir. Literatürle uyumlu olan bu veriler ADAMTS8 enziminin TNF- α varlığında PsA ve Ps gibi

inflatuar hastalıkların patogeneğinde ECM yıkımında rolü olabileceğini ortaya koymaktadır. Buna karşın, kontrol, PsA ve Ps gruplarının tamamında da ADAMTS9 gen ekspresyonu TNF- α stimülasyonu sonucu düşüş göstermiştir. Çalışmamızda kullandığımız hücre türleri ve çalışma materyalinin literatürdeki diğer çalışmalarda kullanılan farklı olması ADAMTS9 gen ekspresyonu için literatürle farklı sonuçlar elde etmemize neden olmuş olabilir.

Önceki çalışmalarda gösterildiği gibi, MAPK ailesi proteinleri pro-inflatuar sitokinlerin ve matrix metaloproteinaz enzimlerin indüklenmesinde rol almaktadırlar. MAPK aktivasyonunun TNF- α sinyalinin başlangıç ve devamlılığında rolü olduğu ortaya konmuştur. TNF- α 'nın birçok inflamatuvar hastalığın başlangıç ve gelişimde yer alması sebebiyle, MAPK aktivasyonun da inflamasyonda etkisinin olabileceği raporlanmıştır (128,129). Yapılan çalışmalarda MAPK sinyal aktivasyonunun RA sinoviyalinde ve Ps deri lezyonlarında rolü olduğu tanımlanmıştır (130,131). İyi tanımlanmış üç MAPK yolağında biri olan ERK1/2, TNF- α gibi pro-inflatuar sitokinlerin etkinliğini artıran önemli bir sinyal yolağıdır (132). Yapılan çalışmalarda ERK1/2 yolağı aktivasyonunun RA sinoviyal sıvılarındaki inflamasyon için önemli olduğu ortaya konmuştur, ayrıca TNF- α stimülasyonunun ERK1/2 aktivitesini de arttırdığı vurgulanmıştır (133,130). Ayrıca, son çalışmalarda sitokin üretiminde posttranskripsiyonel regülasyonundan dolayı özellikle RA tedavisinde bir diğer MAPK yolağı olan p38 inhibitörlerin zayıf etkileri olduğu belirtilmiştir (134). İyi tanımlanmış diğer MAPK yolağı olan JNK aktivitesinin de inflamatuvar hastalıklardaki önemi araştırılmıştır. JNK epidermal delesyonlu farelerle yapılan çalışmada Ps'li hastalarda görülen deri lezyonlarına benzer yapılar ve artrit artışı olduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada JNK ile birlikte TNF delesyonu olan farelerde ise deri lezyonlarında azalma olduğu ve artrit gelişmediği rapor edilmiştir (135).

Çalışmamızda ADAMTS8 geninin Ps patogeneğinde, TNF- α stimülasyonu ile artan ekspresyonu, bu enzimin Ps için önemli bir tetikleyici faktör olduğunu düşündürmektedir. Öte yandan, Ps grubu için MAPK sinyal yolağı inhibisyonunda ADAMTS8 enzim etkinliğinin ciddi ve istatistiksel olarak anlamlı azalış profili, genin bu yolağlar üzerinden olası etkinliği içinde önemli kanıtlar

sunmaktadır. PsA grubunda MAPK sinyal yolları inhibisyonundaki ADAMTS8 geninin anlamlı ekspresyon azalışları, TNF- α sitokininin varlığında bu yolların inflamasyon etkililiğinde önemli aktivatörlerinden olabilecekleri fikrini pekiştirmektedir. Ayrıca, MAPK yollarının ADAMTS8 enzim aktivitesi için düzenleyici proteinler olabileceklerini göstermektedir. PsA ve Ps gruplarında TNF- α ile uyarılmaları sonucu ADAMTS8 gen ekspresyonunda kontrol grubuna oranla artış olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum TNF- α uyarılmasının literatürde de görüldüğü gibi matris yıkılımının tetikleyici unsurlarından olduğunu göstermektedir. Kontrol grubunda ise JNK inhibisyonu için tersi bir durum söz konusudur, JNK inhibisyonu sonrasında TNF- α uyarılmasına yanıt olarak ADAMTS8 gen ekspresyonunda ciddi artış gözlenmiştir ve bu artış aynı şekilde ADAMTS9 ve -15 gen ekspresyon düzeyleri için de geçerlidir. Bu durum JNK inhibisyonunun sağlıklı bireylerde agrekanaz etkinliği olan ADAMTS genlerinin ekspresyonunu arttırdığını ortaya koymakta ve JNK'nın bu genlerin ekspresyonu üzerinde baskılayıcı etkisinin olabileceği düşündürmektedir.

Ps'li hastalarda, TNF- α sitümlasyonu sonucunda artan ADAMTS9 ekspresyonunun, ERK1/2 ve JNK inhibisyonlarıyla ciddi düşüş gösterdiği bulunmuştur. Bu bulgular, Ps hastaları için ADAMTS9 enziminin TNF- α varlığında MAPK yollarını kullanarak etkinliğini arttırdığı olasılığını güçlendirmektedir. PsA'lı hastalarda ise Ps'li hastaların tam tersi olarak, TNF- α uyarılımı ile değişmeyen ADAMTS9 ekspresyonunun MAPK inhibisyonlarıyla arttığı gözlemlenmiştir. ADAMTS9 ekspresyonunun PsA grubunda, Ps grubu ve sağlıklı bireylerden farklı olarak MAPK inhibisyonlarıyla artış göstermesi, ADAMTS9 enziminin PsA patogenezinde sadece TNF- α uyarılmasına değil aynı zamanda MAPK inhibisyonuna da ihtiyaç duyduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, PsA hastalarında MAPK yollarının ADAMTS9 ekspresyonu üzerinde baskılayıcı etki gösterdiği olasılığını ortaya koymaktadır.

ADAMTS15 geni ise çalışmamızın bütününde kontrol, Ps ve PsA gruplarının tamamında TNF- α ve IL-6 sitümlasyonları ile MAPK ve STAT3 inhibisyonları için herhangi bir anlamlı değişim göstermemiştir. ADAMTS15 geni için diğer genlere oranla da düşük ekspresyon profilleri gözlemlenmiştir. Bu durum Ps ve PsA

hastalıklarının patogeneğinde ADAMTS15 enziminin bu sitokin ve inhibitörlerden etkilenmediğini düşündürmektedir.

IL-6'nın IL-1 ve TNF- α ile sinerjik etki yaptığı ve PsA hastalarının serum IL-6 düzeylerinin Ps hastalarından fazla olduğu belirtilmiştir (136). Bu durum IL-6'nın PsA da eklem sorunlarıyla ilişkili olduğunu düşündürmektedir. RA' lı hastalarla yapılan bir çalışmada kartilaj hasarı yaratan enzimlerin artışında rol alan IL-17 diferansiyonunu IL-6'nın dışında birçok sitokin uyardığı, bundan dolayı IL-6 varlığının artrit gelişiminde vazgeçilmez olmadığı vurgulanmıştır (137). Yapılan farklı bir çalışmada, STAT3 proteininin IL-6'nın aktiveştirilmesinde ve dolaylı olarak otoimmün cevap oluşumunda etkili olduğu bulunmuştur (138). Öte yandan, STAT3 proteinin anti-inflamatuar etkisi olan IL-10 etkinliği için de önemli bir uyarıcı olduğu da tespit edilmiştir (139). Mimata ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada pro-inflamatuar sitokin IL-6'nın, ADAMTS4 ve -5 genlerinin ekspresyonunu STAT3 proteinine bağımlı olarak artırdığı ve STAT3 inhibitörü varlığında ise IL-6'nın ADAMTS4 ve -5 ekspresyon düzeyleri üzerindeki indükleyici etkinin ortadan kalktığı gösterilmiştir (140).

Çalışmamızda, literatürde artritler için görülen tersine, IL-6 ile uyarılan Ps ve PsA PBMC hücrelerinin ADAMTS8 ve -9 gen ekspresyon düzeylerinde azalma görülürken, STAT3 inhibisyonu sonucunda ise ADAMTS8 ve -9 genlerinin upregüle olduğu gözlemlenmiştir. Artritli hastalarda yapılmış önceki çalışmalarla karşılaştırıldığında STAT3 inhibisyonu sonrası IL-6 ile uyarılmada, aynı gen ailesinden ve agrekanaz etkinliği gösteren farklı genler için farklı etkiler görülmesi, bu proteinlerin ADAMTS gen ekspresyonları için düzenleyici etkilerinin farklı olabileceğini göstermektedir. Özellikle PsA grubunda, ADAMTS8 ve -9 gen ekspresyonlarının STAT3 inhibitörünün varlığında upregülasyonları, STAT3 yolağının anti-inflamatuar etkisinin bu genler üzerinde baskılayıcı rolü olabileceği fikrini güçlendirmektedir.

Demircan ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada kondrosarkomlu hücrelerde IL-1 β ' nin ADAMTS4, -5 ve -9' un mRNA seviyelerinde artışa neden olduğu, ADAMTS1 ve -3 mRNA seviyelerinde ise artış gözlenmediği belirtilmiştir.

Aynı çalışmada bu artışın en fazla ADAMTS9 ekspresyon düzeyinde izlendiği, fibroblastlardan çok kondrositlerde artış görüldüğü ve TNF- α 'nın da IL-1 β ile sinerjistik etki gösterdiği ortaya konmuştur (141). Bu bulgular, artrit patogenezinde önemli yeri olan IL-1' in; ADAMTS-4 ve -5 gen ekspresyonlarıyla birlikte ADAMTS9' u da indükleyerek, artrit gelişimine katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir. RA gibi bazı inflamatuvar hastalıklarda yüksek NFkB aktivasyonunun NFkB' nin inflamasyon patogenezinde rolü olduğunu ortaya koymaktadır (142). Öte yandan, farklı inflamatuvar hastalıklarda. NFkB aktivitesi için çelişkili artış veya azalışlar olduğu da bildirilmiştir (143,144). Çalışmamızda literatürün tersine, ADAMTS8 ekspresyonu IL-1 β stimülasyonu ile artarken ADAMTS9 ekspresyonu ise azalmıştır. Bulgularımız IL-1 β ile uyarılmanın ADAMTS8 ekspresyonu üzerinde TNF- α stimülasyonunda görüldüğü gibi tetikleyici etkisi olduğunu göstermektedir. NFkB inhibisyonu ile ADAMTS8 ekspresyonunun downregüle olduğu ve ADAMTS9 ve -15 ekspresyonlarının ise upregüle olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum NFkB' nin ADAMTS9 ve -15 genlerinin regülasyonunda baskılayıcı rolü olduğunu, ama ADAMTS8 geninin regülasyonunda ise tetikleyici rolü olduğunu düşündürmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Pro-inflamatuar sitokinler olan TNF- α ve IL-1 β ' nin MAPK ve NFkB sinyal yollarını kullanarak ADAMTS8 geninin PsA' lı hastalarda ekspresyonunu arttırdığını tespit ettik. Bu bulgular, ADAMTS8 enziminin artan pro-inflamatuar sitokinlerle birlikte, PsA hastalarının kartilaj hasarında önemli bir rol oynadığını göstermektedir. ADAMTS8 enzimini baskılayan ilaçlarla, PsA' nın inflamasyon etkisinin azaltılabileceğini öngörmekteyiz. ADAMTS9 gen ekspresyonunun TNF- α , IL-1 β ve IL-6 sitokin uyarılmalarıyla değişmediği ama, MAPK, STAT3 ve NFkB gibi yolların inhibisyonuyla indüklendiği gösterildi. Bu sonuçlar, ADAMTS9 gen regülasyonunda pro-inflamatuar sitokinlerden ziyade sinyal yollarının etkili olduğunu ortaya koymaktadır. ADAMTS15 ekspresyonunun PsA patogenezinde artış gösterdiği, fakat TNF- α , ve IL-6 stimülasyonları ve MAPK ile STAT3 inhibisyonlarından etkilenmediği ortaya konuldu. Bu sonuç, ADAMTS15 proteazının PsA' lı hastalarda matris yıkımındaki etkinliğinin araştırdığımız sitokin ve yollardan bağımsız olduğunu düşündürmektedir.

PsA patogenezinde ADAMTS8, -9 ve -15 gen ekspresyonlarını araştırdığımız çalışma, kullanılan yöntem ve materyal bakımından PsA hastalığı için öncü bir çalışma niteliğindedir. Fakat çalışmamızın gerçek anlamda hedefine ulaşması için ileriki çalışmalarla daha da detaylandırılıp genişletilmeye ihtiyacı vardır.

ADAMTS8 -9 ve -15 gen ekspresyon düzeyleri için elde ettiğimiz veriler , farklı materyal veya yöntemler kullanılarak yapılacak yeni çalışmalarla güçlendirilmelidir.

MAPK üyeleri ve STAT3 proteinin PsA patogenezinde ADAMTS8, -9 ve -15 genleri üzerindeki etkileri değişkenlik göstermektedir, bu değişkenlikler farklı çalışmalarla da desteklenmelidir.

PsA grubu PBMC hücreleri için IL-6, IL-1 β ve TNF- α ile uyarılmaları sonucu elde edilen ADAMTS8, -9 ve -15 ekspresyonları, literatürdeki artrit

çalışmalarıyla uyumsuzdur. Elde ettiğimiz bulguların güçlendirilmesi için yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Agrekanaz aktivitesi NFkB proteininin rolü için IL-1 β sitokinlerin kullandığımız çalışmaların genelinde anlamlı değişimler gözlemleyemedik. Farklı sitokinler veya ADAMTS agrekanaz ailesinin farklı enzimleriyle yapılacak çalışmalar NFkB' nin olası rolüne ışık tutabilir.

Çalışmamızda Kontrol grubu için elde ettiğimiz en ilgi çekici sonuç JNK inhibisyonunda ADAMTS8, -9 ve -15 ekspresyonunun ciddi artış göstermesidir. Bu sonuç JNK proteinin agrekanaz baskılanmasında önemli bir rolü olabileceği ihtimalini göstermektedir. Artrit gelişiminin JNK proteiniyle engellenebileceği ihtimali için yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

- 1- Wright V, Moll JMH, Psriatic Arthritis. In: Wright V, Moll JMH, eds. Seronegative polyarthritis. Amsterdam: North Holland Publishing Co, 1976: 169-223
- 2- Alenius, G.M., Eriksson, C., Dahlqvist, S.R. 2009. "Interleukin-6 and soluble interleukin-2 receptor alpha markers of inflammation in patients with Psriatic arthritis?", *Clin Exp Rheumatol*, 27, 120–123.
- 3- Villanova, F., Meglio, P.D., Nestle, F.O. 2013. "Biomarkers in Psand Psriatic arthritis", *Ann Rheum Dis*, 72, 104-110.
- 4- Fiocco, U., Sfriso, P., Oliviero, F., Roux-Lombard, P., Scagliori, E., Cozzi, L., Lunardi, F., Calabrese, F., Vezzù, M., Dainese, S., Molena, B., Scanu, A., Nardacchione, R., Rubaltelli, L., Dayer, J.M., Punzi, L. 2010. "Synovial effusion and synovial fluid biomarkers in Psriatic arthritis to assess intraarticular tumor necrosis factor-alpha blockade in the knee joint", *Arthritis Res Ther*, 12, R148.
- 5- Brocker, C.N., Vasiliou, V., Nebert, D.W. 2009. "Evolutionary divergence and functions of the ADAM and ADAMTS gene families", *Human Genomics*, 4, 43–55.
- 6- Bondeson, J., Wainwright, S., Hughes, C., Caterson, B. 2008. "The regulation of the ADAMTS4 and ADAMTS5 aggrecanases in osteoarthritis: a review", *Clin Exp Rheumatol*, 26, 139–145.
- 7- Han, C., Robinson, D.W., Hackett, M.V., Paramore, L.C., Fraeman, K.H., Bala, M.V. 2006. "Cardiovascular disease and risk factors in patients with rheumatoid arthritis, Psriatic arthritis, and ankylosing spondylitis", *J Rheumatol*, 33, 2167–2172.
- 8- Jönsson-Rylander, A., Nilsson, T., Fritsche-Danielson, R., Hammarström, A., Behrendt, M., Andersson, J., Lindgren, K., Andersson, A., Wallbrandt, P., Rosengren, B., Brodin P., Thelin, A., Westin, A., Hurt-Camejo, E., Lee-Søgaard, C. 2005. "Role of ADAMTS-1 in atherosclerosis: Remodeling of carotid artery, immunohistochemistry, and proteolysis of Versican", *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25, 180–185.
- 9- Griffiths C, Barker JNWN. Psriasis. In: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C. eds. *Rook's Textbook of Dermatology*. (8th ed), Wiley-Blackwell, Oxford, 2010;1-20.
- 10- Gudjonsson JE, Elder JT. Psriasis: epidemiology. *Clin Dermatol* 2007;25(6):535-46
- 11- Kundakci N, Türsen U, Babiker MO, Gürgey E. The evaluation of the sociodemographic and clinical features of Turkish Pspatients. *Int J Dermatol* 2002;41:220-24.
- 12- Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf WHC. Erythematopapulo-squamous Diseases. *Dermatology*. 2nd ed. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin; 2000. p.585-610.
- 13- Schafer T. Epidemiology of Psriasis. Review and the German perspective. *Dermatol* 2006; 212:327-37. Trembath RC, Clough RL, Rosbotham AL et al. Identification of a major

- 14- susceptibility locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by a two stage genome –wide search in Psoriasis. *Hum Mol Genet* 1997;6:813-20.
- 15- Sagoo GS, Tazi-Ahni R, Barker JW et al. Meta-analysis of genome-wide studies of Psoriasis susceptibility reveals linkage to chromosomes 6p21 and 4q28 – q31 in Caucasian and Chinese Han population. *J Invest Dermatol* 2004;122 :1401-5.
- 16- Mallon E, Bunce M, Wojnarowska F, Welsh K. HLA–C* 0602 is a susceptibility factor in type 1 Psoriasis, and evidence Ala -73 is increased in male type 1 Psoriasis. *J Invest Dermatol* 1997; 109 : 183-6.
- 17- Nair RP, Stuart PE, Nistor I et al. Sequence and haplotype analysis supports HLA –C as the Psoriasis susceptibility 1 gene. *Am J Hum Genet* 2006;78: 827-51.
- 18- Gisoni P, Tessari G, Conti A, Piaserico S, Schianchi S, Peserico A, Giannetti A, Girolomoni G. Prevalence of metabolic syndrome in patients with Psoriasis: a hospital-based case-control study. *Br J Dermatol* 2007;157(1): 68-73.
- 19- Gelfand JM, Neimann AL, Shin DB, Wang X, Margolis DJ, Troxel AB. Risk of myocardial infarction in patients with Psoriasis. *JAMA* 2006; 296(14): 1735-41.
- 20- Qureshi AA, Choi HK, Setty AR, Curhan GC. Psoriasis and the risk of diabetes and hypertension: a prospective study of US female nurses. *Arch Dermatol* 2009;145(4): 379-82.
- 21- Gelfand JM, Shin DB, Neimann AL, Wang X, Margolis DJ, Troxel AB. The risk of lymphoma in patients with Psoriasis. *J Invest Dermatol* 2006;126(10): 2194-201.
- 22- Krueger G, Koo J, Lebwohl M, Menter A, Stern RS, Rolstad T. The impact of Psoriasis on quality of life: results of a 1998 National Psoriasis Foundation patient-membership survey. *Arch Dermatol* 2001;137(3): 280-4.
- 23- Poikolainen K, Reunala T, Karvonen J, Lauharanta J, Kärkkäinen P. Alcohol intake: a risk factor for Psoriasis in young and middle aged men? *BMJ* 1990;300(6727): 780-3.
- 24- Bruce IN. Psoriatic Arthritis: Clinical Features. In: Hochberg MC, Silman AJ, Jaffe H, Weinblatt ME, Weisman MH (Eds.). *Rheumatology*. 4th ed. Philadelphia: Elsevier Limited; 2008 .p.1165-76.
- 25- Bourdillon C. Psoriasis Arthropathies. University of Paris: 1888. MD Thesis.
- 26- Erdem HR. Psoriatic arthritis klinik özellikleri. *Turkish J Rheum* 2000;15(1):31-8.
- 27- Wright V. Rheumatism and Psoriasis: a re-evaluation. *Am J Med* 1959;27:454-62.
- 28- Bodur H, Ataman Ş, Buğdaycı DS, Rezvani A, Nas K, Uzunca K, et al. Description of the registry of patients with ankylosing spondylitis in Turkey: TRASD-IP. *Rheumatology international*. 2012;32(1):169-76.
- 29- Hellgren L. Association between rheumatoid arthritis and Psoriasis in total populations. *Acta Rheumatol Scand* 1969;15(4):316-26.
- 30- Harrison BJ, Silman AJ, Barrett EM, Scott DG, Symmons DP. Presence of Psoriasis does not influence the presentation or short-term outcome of patients with early inflammatory polyarthritis. *J Rheumatol* 1997;24(9):1744-9.
- 31- Gladman DD, Antoni C, Mease P, Clegg DO, Nash P. Psoriatic arthritis: epidemiology, clinical features, course, and outcome. *Ann Rheum Dis*, 2005;64 Suppl 2:ii14-7.
- 32- Shbeeb M, Uramoto KM, Gibson LE, O'Fallon WM, Gabriel SE. The epidemiology of Psoriatic arthritis in Olmsted County, Minnesota, USA, 1982-1991. *J Rheumatol* 2000;27(5):1247-50.

- 33- Karaođlan B, Gül O, Koca İ, Karabay Y. Psriazis Vulgariste Psriatik Artrit insidansı, hastalarda klinik ve laboratuvar bulgular. *Romatol Tıb Rehab* 1992;3(3):10-4.
- 34- 53. Alper S, Peker Ö, Avcı O ve ark. Psriazis Vulgariste Psöriatik Artrit görülme sıklığı. *Ege Fizik Tıp Reh Der* 1997;3(2): 93-6.
- 35- 54. Özel S, Tetik S, Ünal B, Koca I. Psöriazis Vulgariste Psöriatik Artrit görülme sıklığı. *Ege Fiz Tıp Reh Der* 1997;3(4):259- 61.
- 36- Eastmond CJ. Psriatic arthritis. Genetics and HLA antigens. *Baillieres Clin Rheumatol* 1994;8(2):263-76.
- 37- Veale D, FitzGerald O. Psriatic arthritis-pathogenesis and epidemiology. *Clinical and experimental rheumatology*. 2002;20(6; SUPP/28):S-27.
- 38- Bruce I, Silman A. The aetiology of Psriatic arthritis. *Rheumatology*. 2001;40(4):363-6.
- 39- Fitzgerald O, Veale D. Psriatic arthritis. *Clin Rheum* 2002;16(4):523-35.
- 40- Scarpa R, Puente A, Girolamo C, Valle G, Lubrano E, Oriente P. Interplay between environmental factors, articular involvement, and HLA-B27 in patients with Psriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 1992;51(1):78-9.
- 41- Gladman DD, Farewell V, Buskila D, et al. Reliability of measurements of active and damaged joints in Psriatic arthritis. *J Rheumatol* 1990; 17: 62.
- 42- 40. Oriente P, Biondi-Oriente C, Scarpa R. Psriatic arthritis: Clinical manifestations. *Baillieres Clin Rheumatol* 1994; 8: 277.
- 43- Gladman DD. Current concepts in Psriatic arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2002; 14: 361.
- 44- Colombo, E., Latiano, A., Palmieri O., Bossa, F., Andriulli, A., Annese, V. 2009. "Enteropathic spondyloarthropathy: a common genetic background with inflammatory bowel disease?", *World J Gastroenterol*, 15, 2456–2462.
- 45- Gladman DD, Schuckett R, Russell ML, et al: Psriatic arthritis Clinical and laboratory analysis of 220 patients. *QJ Med* 62: 127, 1987
- 46- Jones SM, Armas JB, Cohen MG, Lovell CR, Evison G, McHugh NJ. Psriatic arthritis: outcome of disease subsets and relationship of joint disease to nail and skin disease. *Br J Rheumatol* 1994;33(9):834-9. 36.
- 47- Van Romunde LK, Cats A, Hermans J, Valkenburg HA. A cross-sectional comparative study of patients with "Psriatic arthritis" and seronegative and seropositive polyarthritis: clinical aspects. *Rheumatol Int* 1984;4(2):61-5. 37.
- 48- Bruce IN. Psriatic Arthritis: Clinical Features. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblat ME, Weisman MH (Eds.). *Rheumatology*. 4th ed. Philadelphia: Elsevier Limited; 2008 p.1165-76.
- 49- Fitzgerald O. Psriatic arthritis: One or more diseases? *Clin Rheum* 2006;20(3):435-50.
- 50- Ritchlin CT, Haas-Smith SA, Li P, Hicks DG, Schwarz EM. Mechanisms of TNF-alpha and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in Psriatic arthritis. *J Clin Invest* 2003;111(6):821-31.
- 51- Kane D, Stafford L, Bresnihan B, FitzGerald O. A classification study of clinical subsets in an inception cohort of early Psriatic peripheral arthritis— 'DIP or not DIP revisited'. *Rheumatology*. 2003;42(12):1469-76.
- 52- Colombo, E., Latiano, A., Palmieri O., Bossa, F., Andriulli, A., Annese, V. 2009. "Enteropathic spondyloarthropathy: a common genetic background with inflammatory bowel disease?", *World J Gastroenterol*, 15, 2456–2462.
- 53- Bruce I. Psriatic arthritis: clinical features. *Rheumatology*. 2003;2.
- 54- Cantini F, Salvarani C, Olivieri I, Macchioni L, Niccoli L, Padula A, et al. Distal extremity swelling with pitting edema in Psriatic arthritis: a case-control study. *Clinical and experimental rheumatology*. 2001;19(3):291-6.

- 55- Torre JC, Rodriguez PA, Arribas JM, Ballina GJ, Riestra JL, Lopez LC. Psoriatic arthritis (PA): a clinical, immunological and radiological study of 180 patients. *Br J Rheumatol* 1991;30(4):245-50.
- 56- Korendowych E, Owen P, Ravindran J, Carmichael C, McHugh N. The clinical and genetic associations of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in Psoriatic arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2005;44(8):1056-60.
- 57- Hochberg MC, Silman A, Smolen JS, *Romatoloji*, 4. baskı Türkçe çeviri, Editör Arasıl T, Ankara, 2011.
- 58- Moll, J.M. and V. Wright, Psoriatic arthritis. *Semin Arthritis Rheum*, 1973. 3(1): p. 55-78.
- 59- Robinson, H., S. Kelly, and C. Pitzalis, Basic synovial biology and immunopathology in Psoriatic arthritis. *J Rheumatol Suppl*, 2009. 83: p. 14-6.
- 60- Nash P, Clegg DO. Psoriatic arthritis therapy: NSAIDs and traditional DMARDs. *Ann Rheum Dis*. 2005; 64(suppl 2):ii74-ii77
- 61- Kivitz AJ, Espinoza LR, Sherrer YR, Liu-Dumaw M, West CR. A comparison of the efficacy and safety of celecoxib 200 mg and celecoxib 400 mg once daily in treating the signs and symptoms of Psoriatic arthritis. *Semin Arthritis Rheum*. 2007;37:164-173.
- 62- Soriano ER, McHugh NJ. Therapies for peripheral joint disease in Psoriatic arthritis. A systematic review. *J Rheumatol*. 2006;33:1422-1430. Epub May 15, 2006.
- 63- Pipitone N, Kingsley GH, Manzo A, Scott DL, Pitzalis C. Current concepts and new developments in the treatment of Psoriatic arthritis. *Rheumatology (Oxford)*.
- 64- Kremer, JM, Alarcon, GS, Lightfoot, RW Jr, et al. Methotrexate for rheumatoid arthritis. Suggested guidelines for monitoring liver toxicity. American College of Rheumatology. *Arthritis Rheum* 1994; 37:316.
- 65- Fraser SM, Hopkins R, Hunter JA et al. Sulphasalazine in the management of Psoriatic arthritis. *Br J Rheumatol* 1993;32:923-5.
- 66- Dougados M, Vam Der Linden S, Leirisalo-Repo M et al. Sulfasalazine in the treatment of spondyloarthritis. A randomized, multicenter, double-blind, placebo - controlled study. *Arthritis Rheum* 1995;38:618-27.
- 67- Creamer D, Jaggar R, Allen M, Bicknell R, Barker J. Overexpression of the angiogenic factor platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in Psoriatic epidermis. *Br J Dermatol* 1997;137(6):851-5.
- 68- Kuno K, Kanada N, Nakashima E, Fujiki F, Ichimura F, Matsushima K. Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. *J Biol Chem*. 1997;272(1):556-62.
- 69- Glasson-Nicholson AC, Malik SB, Logsdon JM, Jr., Van Meir EG. Functional evolution of ADAMTS genes: evidence from analyses of phylogeny and gene organization. *BMC evolutionary biology*. 2005;5:11.
- 70- Jones GC, Riley GP. ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2005;7(4):160-9. Epub 2005/07/01.
- 71- Tang B.L. "ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases", *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 33, 33. (2001).
- 72- Apte SS. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms. *J Biol Chem*. 2009;284(46):31493-7.
- 73- Lo PH, Leung AC, Kwok CY, Cheung WS, Ko JM, Yang LC, Law S, Wang LD, Li J, Stanbridge EJ, Srivastava G, Tang JC, Tsao SW, Lung ML. "Identification of a tumor suppressive critical region mapping to 3p14.2 in

- esophageal squamous cell carcinoma and studies of a candidate tumor suppressor gene, ADAMTS9". *Oncogene*. 2007 Jan 4;26(1):148-57
- 74- McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ "Understanding the IL-23-IL-17 immunepathway". *Trends Immunol*. 2006 Jan; 27(1):17-23.
- 75- Nicholson AC, Malik SB, Logsdon JM, Jr., Van Meir EG. Functional evolution of ADAMTS genes: evidence from analyses of phylogeny and gene organization. *BMC evolutionary biology*. 2005;5:11.
- 76- Tortorella MD, Malfait F, Barve RA, Shieh HS, Malfait AM. A review of the ADAMTS family, pharmaceutical targets of the future. *Current pharmaceutical design*. 2009;15(20):2359-74. Epub 2009/07/16.
- 77- Demircan K, Hirohata S, Nishida K, Hatipoglu OF, Oohashi T, Yonezawa T, et al. ADAMTS-9 is synergistically induced by interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha in OUMS-27 chondrosarcoma cells and in human chondrocytes. *Arthritis and rheumatism*. 2005;52(5):1451-60. Epub 2005/05/10.
- 78- Vazquez F, Hastings G, Ortega MA, Lane TF, Oikemus S, Lombardo M, Iruela-Arispe ML (1999) METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity. *J Biol Chem* 274: 23349– 23357
- 79- Dunn, J. R., J. E. Reed, D. G Du Plessis, E. J. Shaw, P. Reeves, A. L. Gee, P. Warnke, and C. Walker. "Expression of ADAMTS-8, a Secreted Protease with Antiangiogenic Properties, Is Downregulated in Brain Tumours." *British Journal of Cancer* 94.8 (2006): 1186-193. Web.
- 80- G. C. G. Choi, J. Li, Y. Wang et al., "The metalloprotease ADAMTS8 displays antitumor properties through antagonizing EGFR-MEK-ERK signaling and is silenced in carcinomas by CpG methylation," *Molecular Cancer Research*, vol. 12, no. 2, pp. 228–238, 2014.
- 81- Belloch R, Anna-Arriola SS, Gao D, Li Y, Hodgkin J, Kimble J. The gon-1 gene is required for gonadal morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology*. 1999;216(1):382-93. Epub 1999/12/10.
- 82- Jungers KA, Le Goff C, Somerville RP, Apte SS. Adamts9 is widely expressed during mouse embryo development. *Gene expression patterns : GEP*. 2005;5(5):609-17. Epub 2005/06/09.
- 83- Lung HL, Lo PH, Xie D, Apte SS, Cheung AK, Cheng Y, et al. Characterization of a novel epigenetically-silenced, growth-suppressive gene, ADAMTS9, and its association with lymph node metastases in nasopharyngeal carcinoma. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2008;123(2):401-8. Epub 2008/05/02.
- 84- Demircan K, Gunduz E, Gunduz M, Beder LB, Hirohata S, Nagatsuka H, et al. Increased mRNA expression of ADAMTS metalloproteinases in metastatic foci of head and neck cancer. *Head & neck*. 2009;31(6):793-801. Epub 2009/03/05.
- 85- Koo BH, Coe DM, Dixon LJ, Somerville RP, Nelson CM, Wang LW, et al. ADAMTS9 is a cell-autonomously acting, anti-angiogenic metalloprotease expressed by microvascular endothelial cells. *The American journal of pathology*. 2010;176(3):1494-504. Epub 2010/01/23.
- 86- McCulloch DR, Nelson CM, Dixon LJ, Silver DL, Wylie JD, Lindner V, et al. ADAMTS metalloproteases generate active versican fragments that regulate interdigital web regression. *Developmental cell*. 2009;17(5):687-98. Epub 2009/11/20.
- 87- Paulissen G, Rocks N, Gueders MM, Bedoret D, Crahay C, Quesada-Calvo F, et al. Role of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in airway diseases. *Respir Res* 2009;10:127. 81.

- 88- Di Valentin E, Crahay C, Garbacki N, Hennuy B, Gueders M, Noel A, et al. New asthma biomarkers: lessons from murine models of acute and chronic asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;296(2): L185-97.
- 89- Molokwu, C. N., Adeniji, O. O., Chandrasekharan, S., Hamdy, F. C., & Buttle, D. J. Androgen Regulates ADAMTS15 Gene Expression in Prostate Cancer Cells. *Cancer Investigation*, 28(7), 698-710. (2010). doi:10.3109/07357907.2010.489538
- 90- Vilorio, C. G., A. J. Obaya, A. Moncada-Pazos, M. Llamazares, A. Astudillo, G. Capella, S. Cal, and C. Lopez-Otin. "Genetic Inactivation of ADAMTS15 Metalloprotease in Human Colorectal Cancer." *Cancer Research* 69, no. 11 (2009): 4926-934. doi:10.1158/0008-5472.can-08-4155.
- 91- Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest J* 2000; 117:1162-1172.
- 92- Maury CP. Tumour necrosis factor--an overview. *Acta Med Scand*. 1986;220(5):387-394 21.
- 93- Smith MR, Munger WE, Kung HF, Takacs L, Durum SK. Direct evidence for an intracellular role for tumor necrosis factor- α 1. Microinjection of tumor necrosis factor kills target cells. *J Immunol*. 1990 Jan 1;144(1):162-169
- 94- Partsch G, Wagner E, Leeb BF, Dunky A, Steiner G, Smolen JS. Upregulation of cytokine receptors sTNF-R55, sTNF-R75, and sIL-2R in Psoriatic arthritis synovial fluid. *J Rheumatol* 1998;25:105–10.
- 95- Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. International Edition: New York, Mosby and WB Saunders. 2001;119-129.
- 96- Plataniotis LC, Vogelzang NJ. Interleukin-1: biology, pathophysiology, and clinical prospects. *The American journal of medicine* [Internet]. 1990 Nov [cited 02/12/2016];89 (5):621–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2239982>
- 97- Wojdasiewicz P, Poniatowski LA, Szukiewicz D (2014). The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm* 2014; 56: 14-59.
- 98- Fell HB, Jubb RW (1977). The effect of synovial tissue on the breakdown of articular cartilage in organ culture. *Arthritis Rheum* 20: 1359-1371.
- 99- Campbell IK, Piccoli DS, Roberts MJ, Muirden KD, Hamilton JA (1990). Effects of tumor necrosis factor alpha and beta on resorption of human articular cartilage and production of plasminogen activator by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 33: 542-552.
- 100- Ishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood* [Internet]. 1989 Jul;74 (1):1–10.
- 101- Topley WWC (2006). *Microbiology and Microbial Infections*. 9th Edition. Oxford University Press, London.
- 102- Zhang XG, Klein B, Bataille R. Interleukin-6 is a potent myeloma-cell growth factor in patients with aggressive multiple myeloma. *Blood* [Internet]. 1989 Jul 74 (1):11–3.
- 103- Goldring SR, Goldring MB (2004). The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res* 22: 27-36.
- 104- Groll AH, Meiser A, Weise M. IL-6 is an early mediator in neonatal sepsis. *Pediatr Infect Dis J* 1992;11:496-8.
- 105- Sullivan JS, Kilpatrick L, Castarino AT Jr, Lee SC, Harris MC. Correlation of plasma cytokine elevations with mortality rate in children with sepsis. *J Pediatr* 1992;120:510-5.
- 106- Offermans S, Simon MI. Organization of transmembrane signaling by heterotrimeric G proteins. *Cancer Surv* 1997; 27:177-98.

- 107- Schenk, P.W. ve B.E. Snaar-Jagalska, Signal perception and transduction, the role of protein kinases. *Biochimica et Biophysica Acta* (BBA)/Molecular Cell Research, 1999. 1449, p. 1-24.
- 108- Yang SH, Sharrock AD, Whitmarsh A. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene* 2013; 513(1):1-13.
- 109- Goldsmith ZG, Dhanasekaran DN. G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* 2007; 26(22):3122-42.
- 110- Yu, H. and R. Jove, The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer*, 2004. 4(2): p. 97-105.
- 111- Williams, J.G., Serpentine receptors and STAT activation: more than one way to twin a STAT. *Trends in Biochemical Sciences*, 1999. 24(9): p. 333-4.
- 112- Chapman, R.S., et al., Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes Dev*, 1999. 13(19): p. 2604-16.
- 113- Takeda, K., et al., Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity*, 1999. 10(1): p. 39-49.
- 114- Sano, S., et al., Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis. *EMBO J*, 1999. 18(17): p. 4657-68.
- 115- Baeuerle PA. Pro-inflammatory signaling: last pieces in the NF- κ B puzzle? *Curr Biol* 8,19-22,1998.
- 116- Bossola M, Pacelli F, Tortorelli A. Skeletal muscle in cancer cachexia: the ideal target of drug therapy. *Current Cancer Drug Targets* 2008: 285-98.
- 117- Baldwin, A.S., Jr., The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*, 1996. 14: p. 649-83.
- 118- Pahl, H.L. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*, 18, 6853-6866, 1999.
- 119- Agarwal S, Gullick N, Macedo A et al. 10-year cardiovascular risk in patients with psoriatic arthritis. Presented at the 71st annual scientific meeting of the American College of Rheumatology, Boston, 2007; 11-6.
- 120- Arner, E. C. (2002). Aggrecanase-mediated cartilage degradation. [Review]. *Curr Opin Pharmacol*, 2(3), 322-329.
- 121- Naito S, Shiomi T, Okada A, Kimura T, Chijiwa M, Fujita Y, et al. Expression of ADAMTS4 (aggrecanase-1) in human osteoarthritic cartilage. *Pathology international*. 2007;57(11):703-11. Epub 2007/10/10.
- 122- Kevorkian L, Young DA, Darrah C, Donell ST, Shepstone L, Porter S, et al. Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(1):131-41. Epub 2004/01/20.
- 123- Collins-Racie LA, Flannery CR, Zeng W, Corcoran C, Annis-Freeman B, Agostino MJ, et al. ADAMTS-8 exhibits aggrecanase activity and is expressed in human articular cartilage. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2004;23(4):219-30. Epub 2004/08/07
- 124- ANTONI C, KRUEGER GG, DE VLAM K et al.: Infliximab improves signs and symptoms of psoriatic arthritis: results of the IMPACT 2 trial. *Ann Rheum Dis* 2005; 64:1150-7.
- 125- MEASE PJ, GLADMAN DD, RITCHLIN CT et al.: Adalimumab for the treatment of patients with moderately to severely active psoriatic arthritis: Results of a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 3279-89.
- 126- Antony M. Turkiewicz, Moreland LW. Psoriatic arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 2007; 56: 1051-66.

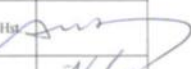




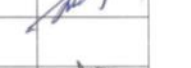

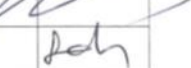



- 127- Lories R.J.U., Derese I., Luyten F.P., K. de Vlam, Activation of nuclear factor kappa B and mitogen activated protein kinases in psoriatic arthritis before and after etanercept treatment. *Clinical and Experimental Rheumatology* 2008; 26: 96-102
- 128- Sweeney SE, Firestem GS: Signal transduction in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16: 231-7. 8.
- 129- Johnson GL, Lapadat R: Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002; 298: 1911-2. 9.
- 130- Schett G, Tohidast-Akrad M, Smolen JS et al.: Activation, differential localization, and regulation of the stress-activated protein kinases, extracellular signal-regulated kinase, c-Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase, in synovial tissue and cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 2501-12. 10.
- 131- Haase I, Hobbs RM, Romero MR, Broad S, Watt FM: A role for mitogen-activated protein kinase activation by integrins in the pathogenesis of psoriasis. *J Clin Invest* 2001; 108: 527-36.
- 132- Dumitru CD, Ceci JD, Tsatsanis C, Kontoyiannis D, Stamatakis K, Lin JH, et al. TNF- induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* 2000;103: 1071-83.
- 133- Thiel MJ, Schaefer CJ, Lesch ME, Mobley JL, Dudley DT, Teclé H, et al. Central role of the MEK/ERK MAP kinase pathway in a mouse model of rheumatoid arthritis: potential proinflammatory mechanisms. *Arthritis Rheum* 2007;56:3347-57.
- 134- Cohen SB, Cheng TT, Chindalore V, et al. Evaluation of the efficacy and safety of pamapimod , a p38 MAP kinase inhibitor, in a double- blind, methotrexate-controlled study of patients with active rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009; 60 (2): 335-44.
- 135- ZENZ R, EFERL R, KENNER L et al.: Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins. *Nature* 2005; 437: 369-75.
- 136- Chandran V, Cook RJ, Edwin J, et al. Soluble biomarkers differentiate patients with psoriatic arthritis from those with psoriasis without arthritis. *Rheumatology* 2010;49:1399-405.
- 137- Hwang SY, Kim JY, Kim KW, Park MK, Moon Y, Kim WU, Kim HY. IL-17 induces production of IL-6 and IL-8 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via NF-kappaB PI3-kinase/Akt-dependent pathways. *Arthritis Res Ther* 2004; 6 (2):R120-8.
- 138- Harris TJ, Grosso JF, Yen HR, Xin H, Kortylewski M, Albesiano E, et al. Cutting edge: an in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *J. Immunol.* 2007;179(7):4313-7.
- 139- Niemand C, Nimmesgern A, Haan S, Fischer P, Schaper F, Rossaint R, et al. Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling 3. *J. Immunol.* 2003;170(6):3263-72.
- 140- Mimata, Y., Kamataki, A., Oikawa, S., Murakami, K., Uzuki, M., Shimamura, T., Sawai, T. 2012. "Interleukin-6 upregulates expression of ADAMTS-4 in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis", *International Journal of Rheumatic Diseases*, 15, 36-44.
- 141- Demircan K, Hirohata S, Nishida K, Hatipoglu OF, Oohashi T, Yonezawa T, et al. ADAMTS-9 is synergistically induced by interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha in OUMS-27 chondrosarcoma cells and in human

- chondrocytes. *Arthritis and rheumatism*. 2005;52(5):1451-60. Epub 2005/05/10.
- 142- Makarov SS. NF-kappa B in rheumatoidarthritis: a pivotal regulator of inflammation,hyperplasia and tissue destruction. *Arthritis Res* 2001; 3: 200–6.
- 143- Orozco G, Sanchez E, Collado MD, López-Nevot MA, Paco L, García A ve ark. Analysis of the functional NFKB1 promoter polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens*. 2005, 65:183-186.
- 144- Li H, Gao L, Shen Z, Li CY, Li K ve ark. Association study of NFKB1 and SUMO4 polymorphisms in Chinese patients with psoriasis vulgaris. *Archives of Dermatologic Research*. 2008, 300(8):425-33.



8. EKLER

8.1. EK-1: Etik kurul kararı

DİCLE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU					
DİCLE UNIVERSITY MEDICAL FACULTY ETHICS COMMITTEE FOR NONINTERVENTIONAL STUDIES					
KARAR					
Yrd. Doç. Dr. Sevgi İRTEGÜN, Yük. Lis. Öğrc. Mehmet Ali TEKİN, Yrd. Doç. Dr. Bilal SULA, Prof. Dr. Remzi ÇEVİK isimli araştırmacılar tarafından planlanan "ADAMTS (-8,-9,-11) genlerinin psoriatik artrit patogenezindeki rollerinin ve moleküler mekanizmalarının araştırılması" başlıklı araştırmaya <i>Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul'u</i> tarafından toplantıda hazır bulunan üyeler tarafından oy birliği ile onay verilmiştir. Klinik araştırma tamamlanıp yayın aşamasına geldiğinde, yayına sunulan bildiri veya makalenin bir örneğinin Etik Kurul'a verilmesi zorunludur.					
DECISION					
The project titled as "Investigation of the roles and molecular mechanisms with ADAMTS (-8,-9,-11) genes in the pathogenesis of psoriatic arthritis" planned by Sevgi İRTEGÜN, Mehmet Ali TEKİN, Bilal SULA, Remzi ÇEVİK has been approved by Ethics Committee of Dicle University Faculty of Medicine.					
Oturum No (Meeting number) :		Tarih (Date): 26.04.2016		Saat (Hour): 13:00-15:00	
KURUL BAŞKANI (CHIEF)		Prof. Dr. Aydın ECE			
KURUL ÜYELERİ / MEMBERS					
	ÜNVANI	ADI-SOYADI	KURUMU	BRANŞI	İMZA
1	Prof. Dr.	Aydın ECE	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	
2	Yrd. Doç. Dr.	İbrahim KAPLAN	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Biyokimya	
3	Prof. Dr.	Süleyman GÖREN	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Adli Tıp	
4	Yrd. Doç. Dr.	İlker KELLE	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Tıbbi Farmakoloji	
5	Doç. Dr.	A. Çetin TANRIKULU	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Göğüs Hastalıkları	
6	Doç. Dr.	Abdullah BÖYÜK	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Genel Cerrahi	
7	Yrd. Doç. Dr.	İsmail YILDIZ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Biyoistatistik	
8	Doç. Dr.	Uğur FIRAT	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Patoloji	
9	Doç. Dr.	Orhan ATEŞ	Dicle Üniversitesi İlahiyat Fakültesi	Temel İslam Bilimleri	
10	Doç. Dr.	Mehmet Uğur ÇEVİK	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Nöroloji	
11	Avukat	Şahhanım KAPLAN	Dicle Üniversitesi Hastaneleri Başhekimlik	Avukat	

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası Zemin Kat 21280 Kampüs/DIYARBAKIR
Telefon:+90.412 . 248 80 01-16/4631 Faks:+90.412. 248 84 40 kuruletikdiyar@gmail.com

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Mardin’de doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Mardin’de tamamladım. 2008 yılında başladığım İstanbul Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde Temmuz 2013 yılında mezun oldum. Sonrasında 2014 yılında başladığım Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji yüksek lisansına halen devam etmekteyim.

Yayımlar:

- Irmak Icen Taskin , **Mehmet Ali Tekin**, Gulsum Pektanc, Omer Munzuroglu, Sevgi Irtegun, 2017, Polymorphism In Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (FGFR2) Contribute To Suspectibility Of Early Onset Breast Cancer In Turkish Women Oral presentation submitted to Athens, Greece
- Sevgi Irtegun, **Mehmet Ali Tekin**, Rojbin Alpaycı, 2016. Increased Expression of E-cadherin, Endothelin-1, and CD68 in Preeclamptic Placentas. Erciyes Med J 2016; 38(4): 149-52 • DOI: 10.5152
- Özevren Hüseyin, Irteğün Sevgi, Deveci Engin, Özgür Esref Mustafa, Asır Fırat, **Tekin Mehmet Ali**, and Deveci Senay, 2017. Neuroprotective Effects of Potentilla Fulgens on Traumatic Brain Injury in Rats. 0884-6812/17/3901-0034/\$18.00/0 © Science Printers and Publishers, Inc. Analytical and Quantitative Cytopathology and Histopathology
- S. Hande Tekarslan, Tugba Sezgin, Ulku Yılmaz, Ceren Alkim, Nilay Ordek, **M. Ali Tekin**, Sema Gunduz, Suleyman Akman, Z. Petek Cakar, 2013. Evolutionary engineering and molecular characterization of NaCl-resistant *Saccharomyces cerevisiae*. Oral presentation submitted to PYFF5, Montpellier, France.

MEHMET ALİ TEKİN

05063813558

Turnitin Orjinallik Raporu

ADAMTS (-8,-9,-15) GENLERİNİN PSORİATİK ARTRİT PATOGENEZİNDEKİ ROLLERİNİN VE MOLEKÜLER MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI Mehmet Ali TEKİN
 tarafından

Yüksek Lisans Tez (Yüksek lisans tez) den

- 22-May-2017 12:53 EEST' de işleme kondu
- NUMARA: 817327665
- Kelime Sayısı: 8736

Benzerlik Endeksi

%6

Kaynağa göre Benzerlik

Internet Sources:

%5

Yayınlar:

%2

Öğrenci Ödevleri:

%1

kaynaklar:

- 1 2% match (25-Haz-2015 tarihli internet)
<http://dspace.trakya.edu.tr:8080/jspui/bitstream/1/1176/1/110.pdf>
- 2 1% match (04-Ağu-2015 tarihli internet)
<http://dspace.trakya.edu.tr:8080/jspui/bitstream/1/1050/1/%C3%96M%C3%9CR%20KAYIK%C3%87I.pdf>
- 3 < 1% match (16-Ara-2016 tarihli internet)
http://www.intjmorphol.com/wp-content/uploads/2016/07/art_53_342.pdf
- 4 < 1% match (09-Eyl-2013 tarihli internet)
<http://www.turkishchem.com/2013/218-228.pdf>
- 5 < 1% match (23-Mar-2014 tarihli internet)
<http://www.jimmunol.org/content/185/10/6348.full>
- 6 < 1% match (yayınlar)
CÖMERTOĞLU, İsmail, SABİKAYA, Esma, DEMİREL, Mehmet, AKYOL, Sümayya and DEMİRCAN, Kadir. "ADAMTS Gen Ailesinin Obstatirik ve İnkaloiddeki Yeri". DNT Ortadağı Yayınları Ltd. Şti. 2014.
- 7 < 1% match (yayınlar)
Matsubara, M. "Staphylococcus aureus pentadecan stimulates granulocyte macrophage colony-stimulating factor production from human epidermal keratinocytes via mitogen-activated protein kinases". FEBS Letters. 20040521.