



T.C.  
DICLE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADAMTS (-1,-4,-5) GENLERİNİN PSORİYATİK ARTRİT  
PATOGENEZİNDEKİ ROLLERİNİN VE MOLEKÜLER  
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Gülsüm PEKTANÇ

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Yusuf NERGİZ

Diyarbakır 2017



T.C.  
DICLE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADAMTS (-1,-4,-5) GENLERİNİN PSORİYATİK ARTRİT  
PATOGENEZİNDEKİ ROLLERİNİN VE MOLEKÜLER  
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülsüm PEKTANÇ

II. Danışman

Yrd. Doç. Dr. Sevgi İRTEGÜN KANDEMİR

Diyarbakır 2017

\* TÜBİTAK' ın 214S024 nolu projesiyle desteklenmiştir.

\*\* DÜBAP' ın Tıp.16.010 nolu projesiyle desteklenmiştir.

T.C  
DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

“ADAMTS (-1,-4,-5) GENLERİNİN PSORİYATİK ARTRİT PATOGENEZİNDEKİ ROLLERİNİN VE MOLEKÜLER MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI” başlıklı Yüksek Lisans tezi ...03.07.2017..... tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

**Tez Danışmanı** : Prof. Dr. Yusuf NERGİZ

**Tezi Teslim Eden** : Gülüm PEKTANÇ

Jüri Üyesinin Ünvanı	Adı Soyadı	Üniversitesi	İmza
Başkan :	Prof. Dr. Yusuf NERGİZ	Dicle Üniversitesi	
Üye :	Prof. Dr. Murat AKKUŞ	Dicle Üniversitesi	
Üye :	Prof. Dr. Nigar VARDI	İnönü Üniversitesi	
Üye :	Prof. Dr. Mehmet GÜL	İnönü Üniversitesi	
Üye :	Yrd. Doç. Dr. Sevgi İRTEGÜN KANDEMİR	Dicle Üniversitesi	

Yukarıdaki imzalar tasdik olunur.

  
Doç. Dr. Hakkı Murat BİLGİN

Dicle Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Öğrencisi olmaktan onur duyduğum ve eğitimimin ilk gününden son gününe kadar desteğini hep hissettiğim sevgili ve saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Yusuf NERGİZ' e,

Çalışmalarımın her aşamasında bana büyük destek veren ve deneysel çalışmalarım sırasında yardım, sıcaklık ve desteğini gördüğüm, derin bilgi ve deneyimlerini sürekli benimle paylaşan, tez yazım aşamasında yardımlarını hiç bir zaman esirgemeyen çok değerli ikinci danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Sevgi İRTEGÜN KANDEMİR' e,

İyi bir akademisyen olma yolunda beni hep motive eden, yoğun bilgi birikimi ile sürekli beni destekleyen saygı değer hocam Prof. Dr. Engin DEVECİ' ye

Değerli hocam Prof. Dr. Murat AKKUŞ başta olmak üzere Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma,

Tezimin her aşamasında desteklerini aldığım ve onlarla çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli arkadaşlarım Ars. Gör. Irmak İÇEN TAŞKIN ve Mehmet Ali TEKİN' e, master eğitimime başladığımda tanıştığım ve her koşulda yanımda olan, güler yüzlü, samimi, içten oluşuyla bilinen nadide insan Günsel KIRMAN' a,

Materyal temininde yardımlarını esirgemeyen sayın Prof. Dr. Kemal NAS, Uzm. Dr. Abdullah Zübeyir DAĞLI ve Uzm. Dr. Şule NERGİZ BAYKARA' ya,

214S024 nolu projeyi desteklediği için TÜBİTAK' a ve Tıp.16.010 nolu projeyi destekledikleri için DÜBAP' a,

Hayatımın her anında sabır, sevgi ve desteklerini esirgemeyen, maddi ve manevi her koşulda yanımda olan, her zorluğu aşabileceğime dair bana güç veren sevgili babam Yaşar PEKTANÇ, biricik annem Necla PEKTANÇ, değerli abim Mehmet PEKTANÇ, canım ablam Canan PEKTANÇ ve kardeşlerim Uğur PEKTANÇ, Yusuf PEKTANÇ' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Gülsüm PEKTANÇ**  
**DİYARBAKIR- 2017**

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER .....	viii
TABLolar .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
TÜRKÇE ÖZET.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Psoriasis.....	3
2.2 Psoriatik Artrit.....	4
2.2.1 Tarihçe.....	4
2.2.2 Epidemiyoloji.....	4
2.2.3 Patogenez.....	5
2.2.3.1 Genetik Faktörler.....	5
2.2.3.2 İmmünolojik Faktörler.....	5
2.2.3.2.1 Sellüler İmmünopatoloji.....	5
2.2.3.2.2 Vasküler Rol.....	6
2.2.3.2.3 Pro-inflamatuvar Sitokinler.....	6
2.2.3.3 Çevresel Faktörler.....	6
2.2.3.3.1 Enfeksiyonlar .....	6
2.2.3.3.2 Travma.....	6
2.2.4 Tanı.....	7
2.2.5 PsA Kliniği ve Eklem Tutulum Tipleri.....	7
2.2.5.1 Eklem tutulum Şekilleri .....	8
2.2.5.1.1 Distal interfalangeal eklem tutulumu .....	8
2.2.5.1.2 Simetrik poliartrit .....	8

2.2.5.1.3 Spondiloartropati .....	8
2.2.5.1.4 Asimetrik oligoartiküler eklem tutulumu .....	8
2.2.5.1.5 Artritis mutilans.....	8
2.2.6 Ayırıcı Tanı.....	8
2.2.7 Prognoz.....	9
2.2.8 Tedavi.....	9
2.2.8.1 Non-Steroid Antiinflatuar İlaçlar (NSAİİ) .....	9
2.2.8.2 Sülfasalazin (SSZ) .....	10
2.2.8.3 Kortikosteroidler.....	10
2.2.8.4 Antimalaryal İlaçlar .....	10
2.2.8.5 Azatioprin .....	10
2.2.8.6 Metotreksat (MTX) .....	10
2.2.8.7 Siklosporin.....	10
2.2.8.8 Leflunomid (LEF) .....	11
2.2.9 ADAMTS AİLESİ.....	11
2.2.9.1 Anti-anjiyogenikler: ADAMTS .....	12
2.2.9.2 Prokollajen kesimi :ADAMTS 2/3/14 .....	12
2.2.9.3 Major agrekanazlar :ADAMTS 4/5.....	12
2.2.9.4 ADAMTS 6 .....	13
2.2.9.5 COMP-ADAMTS :ADAMTS 7/12 .....	13
2.2.9.6 GON-ADAMTS :ADAMTS 9/20.....	13
2.2.9.7 Pıhtılaşma :ADAMTS 13.....	13
2.2.9.8 Agrekanazlar :ADAMTS 15/16.....	13
2.2.9.9 ADAMTS 10/17/18/19.....	13
2.2.10 Sitokinler.....	14
2.2.10.1 İnterlökin- 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) .....	14
2.2.10.2 İnterlökin-6 (IL-6) .....	15
2.2.10.3 Tümör Nekrozis Faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ) .....	16
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>17</b>
3.1 Periferik kandan Ficoll-Paque yöntemi ile PBMC' lerin izolasyonu.....	18

3.2 PBMC'lerin primer kültürleri.....	21
3.3 PBMC'lerin MAPK (ERK1/2, p38 ve JNK), STAT3 ve NFκB aktivitesinin inhibitörler ile baskılanması.....	22
3.3.1 İnhibitörlerin çözülmesi ve hesaplanması.....	22
3.3.2 Pro-inflamatuar sitokinlerin çözülmesi ve hesaplanması.....	23
3.3.3 İnhibitörlerin uygulanması.....	23
3.4 RNA izolasyonu, kantitasyonu ve cDNA sentezi.....	25
3.4.1 cDNA sentezi.....	26
3.5 Kantitatif Real-Time PCR (qPCR) .....	26
3.6 Western Blot.....	28
3.6.1 Western Blot için PBMC hücrelerinin ekimi ve TNF-α, L- 6, IL-1β,ERK1/2, p38, JNK, STAT3 ve NFκB uygulaması.....	28
3.6.2 Western Blot için PBMC hücre lizatlarının hazırlanması.....	29
3.6.3 Western Blot için protein örneklerinin jelde ayrımı ve membrana transferi.....	31
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>35</b>
4.1 ERK1/2, p38, JNK STAT3 VE NFκB spesifik inhibitörlerin PBMC hücrelerindeki baskılayıcı etkisinin Western Blot ile analizi.....	35
4.2 ADAMTS1, -4 ve -5 mRNA düzeylerinin qPCR ile analizi.....	38
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>57</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>65</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>66</b>
<b>8. EK-1 ETİK KURUL KARAR FORMU</b>	
<b>9. Orjinallik Raporu</b>	

## ŞEKİLLER

	<b>Sayfa No</b>
Şekil 3.1.1 : Kanların heparinli tüplere alımı	19
Şekil 3.1.2 : Kanların 50 ml falkon tüpe aktarımı	20
Şekil 3.1.3 : Çalışmanın Class II tip laminar kabinde gerçekleştirilmesi	20
Şekil 3.1.4 : Santrifüj sonrası görülen tabakalanma	20
Şekil 3.1.5 : Elde edilen PBMC hücreleri	21
Şekil 3.2.1 : PBMC hücrelerinin 24 kuyucuklu plakalara ekimi	21
Şekil 3.3.3.2 :PBMC hücrelerinin ERK1/2 , p38 , JNK , STAT3 ve NFκB ile stimülasyonu	24
Şekil 3.3.3.3 :PBMC hücrelerinin TNF-α , IL-6 ve IL-1β ile uyarılması	24
Şekil 3.6.1.1 :PBMC hücrelerinin 6 kuyucuklu plakalara ekimi	30
Şekil 3.6.2.1 :PBMC hücreleri kuyucuklardan alımı	30
Şekil 3.6.2.2 :Liziz eklenen PBMC hücrelerinin buzda bekletilmesi	30
Şekil 3.6.2.3 :Protein miktarlarının ölçümü	31
Şekil 3.6.3.1 : Hazırlanan jel	32
Şekil 3.6.3.2 :Örneklerin yüklenmesi	32
Şekil 3.6.3.3 :Örneklerin yürürtülmesi	33
Şekil 3.6.3.4 : Proteinlerin ayrıştığı jel	33
Şekil 3.6.3.5 :Örneklerin membrana aktarımı	33
Şekil 3.6.3.6 :Membranlara antikor uygulaması	34
Şekil 4.1.1 : ERK1/2 inhibitörü uygulanmış ve TNF-α ile uyarılmış PBMC hücrelerinin Western Blot yöntemiyle analizi	35
Şekil 4.1.2 : p38 inhibitörü uygulanmış ve TNF-α ile uyarılmış PBMC hücrelerinin Western Blot yöntemiyle analizi	36
Şekil 4.1.3 : JNK inhibitörü uygulanmış ve TNF-α ile uyarılmış PBMC hücrelerinin Western Blot yöntemiyle analizi	36
Şekil 4.1.4 : STAT3 inhibitörü uygulanmış ve IL-6 ile uyarılmış PBMC hücrelerinin Western Blot yöntemiyle analizi	37
Şekil 4.1.5 : NFκB inhibitörü uygulanmış ve IL-1β ile uyarılmış PBMC hücrelerinin Western Blot yöntemiyle analizi	37



<b>Şekil 4.2</b> : PBMC hücrelerinde ADAMTS genlerinin (-1, -4, -5) mRNA ekspresyon düzeyleri ve istatistiksel verileri (n:15)	38
<b>Şekil 4.2.1</b> : İnhibitör (ERK1/2 i, p38 i ve JNK i) ve TNF- $\alpha$ uygulaması yapılmış olan PBMC hücrelerinde ADAMTS1' in mRNA ekspresyon düzeyi ve istatistiksel verileri (n:15)	40
<b>Şekil 4.2.2</b> : İnhibitör (ERK1/2 i, p38 i ve JNK i) ve TNF- $\alpha$ uygulaması yapılmış olan PBMC hücrelerinde ADAMTS4' ün mRNA ekspresyon düzeyi ve istatistiksel verileri (n:15)	42
<b>Şekil 4.2.3</b> : İnhibitör (ERK1/2 i, p38 i ve JNK i) ve TNF- $\alpha$ uygulaması yapılmış olan PBMC hücrelerinde ADAMTS5' in mRNA ekspresyon düzeyi ve istatistiksel verileri (n:15)	44
<b>Şekil 4.2.4</b> : İnhibitör (STAT3 i) ve IL-6 uygulaması yapılmış olan PBMC hücrelerinde ADAMTS1' in mRNA ekspresyon düzeyi ve istatistiksel analizi (n:15)	46
<b>Şekil 4.2.5</b> : İnhibitör (STAT3 i) ve IL-6 uygulaması yapılmış olan PBMC hücrelerinde ADAMTS4' ün mRNA ekspresyon düzeyi ve istatistiksel analizi (n:15)	48
<b>Şekil 4.2.6</b> : İnhibitör (STAT3 i) ve IL-6 uygulaması yapılmış olan PBMC hücrelerinde ADAMTS5' in mRNA ekspresyon düzeyi ve istatistiksel analizi (n:15)	50
<b>Şekil 4.2.7</b> : İnhibitör (NF $\kappa$ B i) ve IL-1 $\beta$ uygulaması yapılmış olan PBMC hücrelerinde ADAMTS1' in mRNA ekspresyon düzeyi ve istatistiksel verileri (n:15)	52
<b>Şekil 4.2.8</b> : İnhibitör (NF $\kappa$ B i) ve IL-1 $\beta$ uygulaması yapılmış olan PBMC hücrelerinde ADAMTS4' ün mRNA ekspresyon düzeyi ve istatistiksel verileri (n:15)	54
<b>Şekil 4.2.9</b> : İnhibitör (NF $\kappa$ B i) ve IL-1 $\beta$ uygulaması yapılmış olan PBMC hücrelerinde ADAMTS5' in mRNA ekspresyon düzeyi ve istatistiksel verileri (n:15)	56
<b>Şekil 5.1</b> : MAPK (ERK1/2, JNK1/2,3, p38) yolağı	58

## TABLULAR

	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1</b> : PsA klasifikasyon kriterleri.	7
<b>Tablo 2</b> : PsA' da eklem tutulum şekilleri	7
<b>Tablo 3</b> : PsA-Romatoid artrit özelliklerinin karşılaştırılması	9
<b>Tablo 4</b> : Kontrol, Ps ve PsA ve gruplarının cinsiyet, yaş ve kaç yıllık hasta olduklarına dair bilgiler	17
<b>Tablo : 3.3.3.1:</b> Kuyucuklara yerleştirilen PBMC hücrelerinin uygulama şekillerine göre 9 gruba ayrılımı	23
<b>Tablo-5</b> : ADAMTS ve GAPDH primer dizileri	27
<b>Tablo-6</b> : PCR kimyasal miktarları	27
<b>Tablo -7</b> : Real time PCR protokolü	27
<b>Tablo : 3.6.1.1</b> : Kuyucuklara yerleştirilen PBMC hücreleri uygulama şekillerine göre 9 gruba ayrılımı	28
<b>Tablo-8</b> : Primer antikorların listesi	34
<b>Tablo-9</b> : Sekonder antikorların listesi	34

## SİMGELER VE KISALTMALAR

- ACR** : Amerikan Romatizma Birliği (American Collage of Rheumatology)
- ADAM** : Disintegrin ve metalloproteinazlar
- ADAMTS** : A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs
- AS** : Ankilozan spondilit
- BSA** : Bovine Serum Albumine
- CASPAR** : The Classification of Psoriatic Arthritis
- COMP** : Kıkırdak oligomerik matriks proteinini
- CRP** : C-reaktif protein
- DİF** : Distal interfalangial eklem
- DMARD** : Hastalık modifiye edici ilaçlar
- ECM** : Ekstraselüler matriks
- ERK1/2** : Extracellular signal-regulated kinaz
- ESH** : Eritrosit sedimentasyon hızı
- HIV** : İnsan immün yetmezlik virüsü
- HLA** : Human lökosit antijen
- ICAM** : Hücre içi adhezyon molekülü
- IgA** : İmmünglobulin A
- IgG** : İmmünglobulin G
- IgM** : İmmünglobulin M
- IL** : İnterlökin
- JNK** : c-Jun N-terminal kinaz
- MAPK** : Mitogen activated protein kinase
- MHC** : Majör histokompatibilite kompleks
- MKF** : Metakarpofalangial eklem
- MM** : Multipl myelom
- MMP** : Matriks metalloproteinaz
- MTF** : Metatarsofalangial
- NFκB** : Nükleer faktör kappa B
- NSAİİ** : Nonsteroid antiinflamatuvar
- OA** : Osteoartrit

**PDGF** : Plateletten köken alan büyüme faktörleri  
**PİF** : Proksimal interfalangial eklem  
**Ps** : Psoriasis  
**PsA** : Psoriatik artrit  
**PBS** : Phosphate Buffered Saline  
**PBMC** : Periferik kan mononükleer hücre  
**PCR** : Polimeraz Zincir Reaksiyonu  
**RF** : Romatoid faktör  
**RA** : Romatoid artrit  
**STAT3** : Signal transducer and activator of transcription 3  
**TIMP** : Tissue inhibitors of metalloproteinase  
**TNF- $\alpha$**  : Tümör nekrozis faktör alfa  
**TTP** : Trombotik trombositopenik purpura  
**VCAM** : Vasküler hücre adhezyon molekülü  
**VEGF** : Vasküler endotel büyüme faktörü

## ÖZET

**Amaç:** Amacımız, eklem yıkımında önemli rolleri olan ADAMTS proteazlarından ADAMTS1, -4, -5' in kronik inflamatuvar bir hastalık olan Psoriatik artrit (PsA) patogenezindeki rollerini ve bu proteazların inflamatuvar sinyal yollarında hangi mediyatörler tarafından regüle edildiklerinin araştırılmasıdır.

**Yöntem:** 15 PsA hastası, 15 Ps hastası ve 15 sağlıklı bireyden alınan total kandan periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) izole edildi ve primer kültürleri yapıldı. PBMC hücrelerinde ADAMTS1, -4, ve -5 genlerinin mRNA ifadeleri qPCR yöntemi kullanılarak belirlendi. Primer kültürleri yapılan PBMC hücreleri TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6 ile uyarıldıktan sonra, pro-inflamatuvar sitokinlere yanıt olarak ADAMTS genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerinde bir farklılık olup olmadığı belirlendi. Ayrıca PBMC hücreleri TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6 ile uyarılmadan önce mitogen-activated protein kinases (MAPK), transkripsiyon faktörü nuclear faktor kappa B (NF $\kappa$ B) 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), NF $\kappa$ B, ve STAT3 mediyatörleri tarafından regüle edilip edilmediği qPCR yöntemi kullanılarak araştırıldı. Buna ek olarak inhibitörlerin MAPK (ERK1/2, p38, JNK), NF $\kappa$ B, ve STAT3 aktiviteleri üzerindeki etkileri Western Blot yöntemi kullanılarak tespit edildi.

**Bulgular:** PsA grubunun PBMC hücrelerinde ADAMTS1 ve -4 ekspresyonlarında artış olduğu, ancak ADAMTS5 ekspresyonunda anlamlı bir değişim olmadığı bulundu. TNF- $\alpha$  ve IL-6 stimülasyonlarının ADAMTS1, -4 ve -5 ekspresyonlarında, IL-1 $\beta$  uyarılmasının ise sadece ADAMTS1 ve -4 ekspresyonlarında azalışa neden olduğu görüldü. Ancak, IL-1 $\beta$  uyarılmasıyla ADAMTS5 ekspresyonunun değişim göstermediği gözlemlendi. p38, JNK ve STAT3 inhibisyonlarının ADAMTS1 ekspresyonunda azalmaya neden olduğu belirlendi. Öte yandan, ADAMTS5 ekspresyon düzeyinin NF $\kappa$ B, ERK1/2 ve JNK inhibisyonlarıyla azaldığı ve STAT3 inhibisyonu sonucunda ise ADAMTS5 ekspresyonunun değişime uğramadığı tespit edildi. Ayrıca, STAT3 ve NF $\kappa$ B inhibisyonlarının ise ADAMTS4 ekspresyonunda azalışa neden olduğu görüldü. Bununla birlikte, kontrol grubunda

JNK inhibisyonuyla ADAMTS1 ve -5 ekspresyonlarının, Ps grubunda ise ERK1/2, p38 ve JNK inhibisyonlarının üçünün de ADAMTS1 gen ekspresyonunda önemli bir artış gösterdiği bulundu. Ayrıca, STAT3 ve NFκB inhibisyonlarının kontrol ve Ps gruplarının ikisinde de ADAMTS1 ekspresyon düzeyinde artış sağladığı gözlemlendi.

**Tartışma:** Diğer artrit türlerine ait literatürlerde gözlemlendiği gibi PsA hastalarının PBMC hücrelerinde de ADAMTS1 ve -4 ekspresyonlarının Ps ve kontrol gruplarına kıyasla artış gösterdiği, ancak ADAMTS5 ekspresyonunun değişmediği bulundu. Bu sonuç, ADAMTS1 ve -4 genlerinin PsA hastalığında ekstra sellüler matriks (ECM) yıkılımında etkin agrekanazlar olabileceğini ortaya koymaktadır. PsA' lı bireylerin PBMC hücrelerinde TNF-α , IL-6 ve IL-1β uyarılmasıyla ADAMTS1 ve -4 gen ekspresyonlarının, TNF-α ve IL-6 uyarılmasıyla ise ADAMTS5 gen ekspresyonunda azalma olduğu tespit edildi. Bu bulgular, TNF-α, IL-6 yada IL-1β uyarılmalarının ADAMTS1 -4 ve -5 agrekanaz aktivitesine baskılayıcı etkileri olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, PsA patogeneğinde, MAPK, STAT3 ve NFκB sinyal yollarının ADAMTS1, -4 ve -5 üzerinde modölatör etkileri olabileceği görüldü.

**Anahtar Kelimeler :** PsA, ADAMTS, PBMC, qPCR, biyobelirteç.

## ABSTRACT

### **Investigation of The Roles and Molecular Mechanisms with ADAMTS ( -1,-4,-5 ) genes in The Pathogenesis of Psoriatic Arthritis**

**Aim:** Our aim is to investigate the roles of ADAMTS proteases (ADAMTS-1, -4 and -5), which have important roles in articular destruction in the pathogenesis of Psoriatic Arthritis (PsA), which is a chronic inflammatory disease and which mediators involved in inflammatory signaling pathways regulate these proteases.

**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- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  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 (NF $\kappa$ B) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) inhibitors before the stimulation with TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 and the expression of ADAMTS genes whether are regulated by MAPK (ERK1/2, p38, JNK), NF $\kappa$ B 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), NF $\kappa$ B and STAT3 were determined by Western Blot.

**Results:** It was found that the expression of ADAMTS1 and -4 in the PBMCs of PsA group were increased, but there was no any significant change in the expression levels of ADAMTS5. While stimulations by TNF- $\alpha$  and IL-6 caused a decrease in the expression of ADAMTS1, -4 and -5, stimulation by IL-1 $\beta$  caused a reduction only in the expression of ADAMTS1 and -4. However, it was observed that the expression of ADAMTS5 was not changed by IL-1 $\beta$  stimulation. Moreover, it was determined that inhibition of the p38, JNK and STAT3 resulted in a decline in the expression level of ADAMTS1. On the other hand, while the expression levels of

ADAMTS5 was decreased by inhibition of NFκB, ERK1/2 and JNK, the expression of the ADAMTS5 was not influenced by inhibition of STAT3. Moreover, it was seen that STAT3 and NFκB inhibitors led to a reduction in the expression of ADAMTS4. However, JNK inhibition in the control group, and ERK1/2, p38 and JNK inhibition in the Ps group led to a significant increase in the expression of ADAMTS1 expression. It was also observed that STAT3 and NF-κB inhibition resulted in an increase in the expression level of ADAMTS1 in both control and Ps groups.

**Conclusion:** As observed in the literature of other arthritis types, the expression of ADAMTS1 and -4 in PBMC cells of PsA patients were increased compared to Ps and control groups, but ADAMTS5 expression did not change. These results suggest that ADAMTS1 and -4 genes may be effective aggrecanases in the degradation of extra cellular matrix (ECM) in PsA disease. It was determined that the expression of ADAMTS1 and -4 in PBMCs of the patients with PsA were decreased by TNF-α , IL-6 ve IL-1β stimulation. The expression of ADAMTS5 was also decreased by TNF-α ve IL-6 stimulation. These findings imply that TNF-α and IL-6 stimulations may have suppressive effects on the activity of ADAMTS1, -4 and -5 aggrecanases. Furthermore, it was observed that MAPK and NFκB signaling pathways may have modulator effects on ADAMTS1, -4 ve -5 in the pathogenesis of PsA.

**Keywords :** PsA, ADAMTS, PBMC, qPCR, biomarkers.



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Psoriatik artrit (PsA), psoriasis (Ps) ile ilişkili olarak gelişen, eklem inflamasyonu ile seyreden, romatoid faktörün (RF) genellikle negatif olduğu, romatoid nodülün bulunmadığı ve seronegatif spondilartritler içinde değerlendirilen kronik inflamatuvar bir hastalıktır (1).

Ps ilişkili olarak gelişen hem deri hemde eklemleri etkileyen kronik inflamatuvar bir artrit olan PsA (2), herhangi bir sinovial eklem etki edebilir ve PsA'nın en yaygın formları el ve ayak eklemlerini içermektedir. PsA eklemlerin şişme ve ağrısıyla, daktilitis (bir parmağın tümünün inflamasyonu, sosis parmak), entezit (tendon ve ligamentlerin kemiğe yapışma yerindeki inflamasyon) ve aksiyal tutulumla (sakroiliak eklemler veya omurgada inflamasyon) karakterize edilmektedir (3). PsA'nın patogenezinde inflamatuvar elementler ve sitokin yolları önemli rol almaktadır. Entezitlerde PsA'nın başlamasına sebep olan prosesin, romatoid artrit (RA) de olduğu gibi eklemlerin sinoviumuna T hücreleri, dentritik hücreler, mast hücreleri, nötrofiller ve makrofajların infiltrasyonunun olduğu düşünülmektedir (4). PsA'lı hastaların sinoviumunda TNF- $\alpha$  düzeyleri artış göstermektedir ve plazmalarında da görülmektedir. PsA'lı hastaların sinovial sıvılarında IL-1, IL6, IL-8 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin sistemik inflamasyon markırları ile (eritrosit sedimentasyon oranı ve C-reaktif protein(CRP)) orantılı olarak upregüle olduğu gösterilmiştir (5). Bunun yanısıra, PsA'lı hastalarda serum IL-6 düzeyi Ps'ye oranla daha yüksek olduğu ve hastalığın şiddetiyle orantılı olduğu kaydedilmiştir (6). PsA'nın patogenezinde sorumlu olan moleküler mekanizmalar henüz tamamen bilinmemesine rağmen, otoimmün artritlerde TNF- $\alpha$ , IL-17 ve diğer inflamatuvar sitokinlerin fazladan üretiminin osteoklastogenesis, kemik rezorpsiyonu ve kemik yıkımında değişikliklere neden olduğu ve bu değişikliklerin PsA'da da olduğu bilinmektedir (7).

Artritisde, ekstraselüler matris (ECM) parçalanması sonucu meydana gelen artikular kıkırdak kaybı hastalığın patogenezinde ayırıcı bir özelliktir. ECM'nin proteazlar tarafından degradasyonunda meydana gelen değişiklikler RA, osteoartrit (OA) ve ateroskleroz gibi birçok patolojik inflamatuvar durumlar ile ilişkilidir (8).

ADAMTS proteazları inflamatuvar prosesle ilişkilidir. IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  ve IL-6 gibi pro-inflamatuvar sitokinler immün yanıtta ve inflamasyonda önemli roller oynamaktadırlar. ADAMTS genlerinin ekspresyonunun sitokinler tarafından indüklendiği bilinmektedir (9).

İnflamatuvar yanıtta MAPK ailesinden olan extracellular signal-regulated kinaz (ERK1/2), c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve p38' in aktivitesinin arttığı bilinmektedir (10). NF $\kappa$ B (Nükleer faktör kappa B) ve STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) inflamasyon ve immüniteyle ilgili pekçok genin ekspresyonunu kontrol eden transkripsiyon faktörleridir. Pro-inflamatuvar sitokinler MAPK, NF $\kappa$ B ve STAT3 moleküler sinyal yollarını kullanıp biyolojik aktivitelerini gerçekleştirirler (11).

Günümüzde PsA' nın kesin bir tedavisi yoktur ve hastalık progresyonunu ve terapötik yanıtı tam olarak tahmin edebilen spesifik biyobelirteçler bulunmamaktadır. Bu durum hastalığı yöneten hücresel ve moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılmasının önemini vurgulamaktadır. PsA' nın patogenezinde rol alan hücresel ve moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması hastalıkla başedebilmek için yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yol açacaktır.

Bu çalışmada amacımız; eklem yıkımında önemli rollere sahip olan ADAMTS proteazlarından ADAMTS1, ADAMTS4, ve ADAMTS5' in kronik inflamatuvar bir hastalık olan PsA patogenezindeki rollerinin ve bu proteazların inflamatuvar sinyal yollarında hangi mediyatörler tarafından regüle edildiklerinin araştırılmasıdır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Psoriasis

Psoriasis (Ps), genetik ve çevresel faktörler tarafından başlatılan immünolojik mekanizmalar ile ortaya çıktığı düşünülen ve dünya popülasyonunun % 1-3' ünü etkileyen kronik bir hastalıktır (12). Keskin sınırlı eritemli ve skuamli plaklar ile karakterizedir. Skuamların parlak sedefi rengi nedeniyle halk arasında sedef hastalığı olarak bilinir.

Galen, Ps terimini ilk kez Yunanca' da kaşıntı anlamını taşıyan 'psora' sözcüğünden türeterek kullanmıştır (13). Hipokrat (M.Ö. 416-377) ilk olarak Ps' yi tanımlamak için "psora" ve "lepra" terimlerini kullanmıştır (14). 'Psora' terimi Yunanca' da kaşıntılı ve skuamli deri hastalıklarını tanımlamak amacıyla kullanılmıştır. 1841' de Ferdinand von Hebra (1816-1880) hastalığın tek bir antite olduğunu ayrıntılarıyla belirtmiş ve 'psoriasis' sözcüğünü bu özel hastalığa veren ilk kişi olmuştur (15).

Ps hastadan hastaya ve aynı hastada değişik zamanlarda farklı morfolojide lezyonların oluşmasına neden olabilmektedir. En yaygın şekli olan kronik plak Ps' de, sıklıkla ekstremitelerin ekstansör yüzlerinde ve saçlı deride yerleşmekle beraber tüm gövdeyi tutabilen, keskin sınırlı, eritemli, skuamli ve endüre plaklar görülmektedir (16).

Popülasyon çalışmalarına göre aile öyküsü olmayan bir çocukta Ps gelişme riski % 1-2 iken, bir ebeveyninde Ps var ise % 10, her iki ebeveyninde Ps var ise % 50' dir. Yine aynı çalışmada, erken başlangıçlı Ps' li ebeveynlerin çocuklarında Ps gelişme riskinin geç başlangıçlı olanlara göre daha fazla olduğu da görülmüştür (15).

Ps' ye eşlik eden hastalıklardan birkaçı şunlardır: Artrit, Crohn hastalığı, kardiovasküler hastalıklar, hipertansiyon ve diyabet' tir (17).

Ps dünya popülasyonunun % 2-4' nü etkiler ve hastalar düşük yaşam kalitesinin dışında fiziksel ve mental semptomlar da yaşarlar. Hastalığın etiyopatogenezi genetik, çevresel ve immünolojik faktörlerin kompleks

interaksiyonundan kaynaklanır (18). Ps hastalarının yaklaşık % 40' ı psoriatik artrit (PsA) olarak adlandırılan kronik inflamatuvar artrit geliştirirler (19).

## **2.2 Psoriatik Artrit**

### **2.2.1 Tarihçe**

PsA genelde Romatoid faktörün (RF) negatif olduğu, Ps ile ilişkili inflamatuvar bir artrittir (20). Ps' nin artrit ile olan ilişkisi ilk olarak 1818' de Alibert tarafından tanımlanmıştır. Psoriatik Artrit terimi ise ilk olarak Fransız dermatolog olan Pierre Bazin tarafından 1860' da kullanılmıştır (21).

Ps ve artrit birlikteliğinde distal interfalangial (DİF) eklemlerinin karakteristik tutulumu 1888' de Bourdillon tarafından vurgulanmıştır (22). 1964 yılında Amerikan Romatizma Birliği (American Collage of Rheumatology-ACR) PsA' yı ayrı bir hastalık olarak onaylamış ve RF negatifliğine vurgu yapmak için 1976' da PsA' nın seronegatif spondiloartritler içerisinde incelenmesi gerektiğini vurgulamışlardır (23).

### **2.2.2 Epidemiyoloji**

Genel populasyon içinde Ps prevalansı % 0.1-2.8 iken, Ps' li hastalardaki artrit varlığı ortalama % 7-25 arasında değişir (24). Şiddetli deri tutulumu olan vakalarda özellikle püstüler Ps' de bu oran % 30-40' a kadar yükselir. Karaoğlan ve ark.' nın Ps vulgarisli hastalarda yaptıkları bir çalışmada PsA insidansı % 13.7, Alper ve ark.' nın çalışmasında % 11.4, Özel ve ark.' nın çalışmasındaysa % 20 olarak bulunmuştur. Juvenil PsA genel olarak 9-12 yaşları arasında başlamaktadır. Spinal tutulum ve distal interfalangial tutulumu erkeklerde, simetrik poliartrit ise kadınlarda daha sık görülmektedir (22).

PsA hastalarının ortalama % 70' inde cilt lezyonlarının eklemde ağrı, şişlik, ısı artışı gibi eklem şikayetlerinden önce geliştiği, % 14-21' inde ise eklem şikayetlerinin daha önceden görüldüğü, yaklaşık % 11-15' inde de eklem yakınmaları ve cilt lezyonlarının eş zamanlı ortaya çıktığı tespit edilmiştir (25, 26). Yakın zamanda İsveç' te yapılan bir çalışmada Ps' nin genel populasyon içerisinde % 2-3 oranında görüldüğü, bu hastaların % 30' unda artrit geliştiği ve sonuç olarak PsA prevalansının yaklaşık olarak % 1 olduğu bildirilmiştir (27).

### **2.2.3 Patogenez**

PsA' nın nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte genetik, immünolojik ve çevresel faktörlerin hastalık patogenezinde rollerinin olduğu düşünülmektedir (28).

#### **2.2.3.1 Genetik Faktörler**

Ps ve PsA' lı hastaların %30' unda aile öyküsü mevcuttur (29). Moll ve Wright' ın yaptığı bir çalışmada PsA' lı hastaların 1. derece akrabalarında PsA gelişme riskinin 50 kat arttığı gösterilmiştir (30). Monozigot ikizlerde Ps konkordansı % 65-72, dizigotik ikizlerde ise % 15-30' dur (31). PsA konkordansı monozigotik ikizlerde % 30' un üzerinde bulunmuştur (32). Ailesel ve ikiz çalışmaları genetik komponentin etkisinin oldukça güçlü olduğunu, travma ve enfeksiyon, özellikle de HIV enfeksiyonu gibi presipite edici çevresel faktörlerin etkili olduğunu düşündürmektedir (33).

#### **2.2.3.2 İmmünolojik Faktörler:**

PsA' lı olgularda gözlenmekte olan, inflamasyonlu sinoviyal dokuya ait temel patolojik özellikler, eklemi çevreleyen tabakada hiperplazi, inflamatuvar hücre birikimi ve belirgin vaskülarite artışıdır. İnflamatuvar hücre infiltratları, entezal tutulum bölgelerinde gözlenmektedir.

##### **2.2.3.2.1 Sellüler İmmünopatoloji:**

Hem PsA hem de Ps patogenezinde T hücrelerinin ve pro-inflamatuvar sitokinlerin rolü mevcuttur. İki hastalığın tedavisinde de, T hücreleri veya sitokinleri hedef alan tedaviler etkili olabilmektedir. Psoriatik deri ve sinoviyal dokuda CD4+ T hücreleri en sık görülen hücre türü iken, entezis ve sinovyal sıvıda CD8+ T hücreleri daha çok görülmektedir (34).

PsA' lı hastaların cilt ve sinoviyasındaki fibroblastlar artmış proliferatif aktiviteye sahiptir. İnterlökin-1 (IL1), interlökin-6 (IL-6) ve plateletten köken alan büyüme faktörlerinin [platelet derived growth factors (PDGF' ler)] sekresyonlarında da artış mevcuttur. Farklı çalışmalarda aktive T hücrelerinden salınan sitokinlerin ve diğer mononükleer proinflamatuvar hücrelerin, sinoviyal ve epidermal fibroblastların proliferasyonuna ve aktivasyonuna neden olduklarını düşündürmektedir (35).

#### **2.2.3.2.2 Vasküler Rol:**

PsA' da sinoviyal doku ve ciltteki morfolojik damar değişiklikleri RA' ten farklı görülmektedir. RA' da vasküler yapılarda hipertrofi ve hiperplazi görülürken, PsA' da ise perivasküler inflamasyon görülmektedir (36).

Ps' li hastalarda TNF- $\alpha$ , PDGF ve VEGF ekspresyonunun yüksek olduğu bulunmuştur. Bu moleküller endotelial hücrelerde fonksiyon ve anjiyogenez gibi birçok değişimden sorumlu tutulmuştur (37). PsA' da oluşan spesifik vasküler değişiklikler ve bu büyüme faktörlerinin varlığı anjiyogenezin cilt ve eklem inflamasyonunda önemli rol alabileceğini düşündürmektedir (34).

#### **2.2.3.2.3 Pro-inflamatuvar Sitokinler:**

Ps ve PsA' da cilt ve sinoviyal membranda özellikle TNF- $\alpha$  ve IL-1 pro-inflamatuvar sitokinlerin arttığı gösterilmiştir (37).

Sinoviyal hücre proliferasyonu ve eklem yıkımında rol oynayan matriks metalloproteinazların salınımını da uyarıcı TNF- $\alpha$  ve IL-1 aktive T hücrelerden ve mezenkimal hücrelerden salınır. Pro-inflamatuvar sitokinlerden TNF- $\alpha$ ' nın Ps ve PsA' da önemli rol oynaması anti-TNF tedavisinin önemini de ortaya koymaktadır. Aynı şekilde nükleer faktör kappa B (NF $\kappa$ B) seviyelerinin PsA' lı hastaların cilt ve sinoviyal dokularında arttığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar bazı sitokinlerin PsA' da inflamasyonu tetikleyici rollerinin olabileceğini düşündürmektedir (38).

#### **2.2.3.3 Çevresel Faktörler:**

**2.2.3.3.1 Enfeksiyonlar :** PsA patogeneğinde çeşitli viral ve bakteriyel enfeksiyonların rolünün olabileceği düşünülmektedir. Bu enfeksiyonlardan bazıları, HIV ve streptokok enfeksiyonlarıdır.

**2.2.3.3.2 Travma:** Ps' li olguların yaklaşık % 25' inde bu reaksiyon gözlenmektedir. 138 PsA' lı hastanın 12 'sinde (% 9) ve 138 RA' lı hastanın 2' sinde (% 1) artrit öncesi travma olduğu yapılan bir retrospektif çalışmada bildirilmiştir (39).

### 2.2.4 Tanı

PsA için birçok tanı kriterleri geliştirilmiştir. Bu kriterlerden bazılarının yapılması zordur yada pahalıdır. Bu tanı zorluğundan dolayı, 2006 yılında PsA için ‘Classification of Psoriatic Arthritis’ (CASPAR) grubunun gerçekleştirdiği çalışma sonrasında yeni bir sınıflama getirilmiştir (40,41). Bu kriterlerin PsA için spesifikliği %99 ve sensitivitesi %91’ dir (42). Tablo 1’ de CASPAR kriterleri görülmektedir.

**Tablo 1 : PsA klasifikasyon kriterleri (40)**

<b>Puan</b>	<b>Kategori</b>	<b>Açıklama</b>
<b>2</b>	Ps varlığı, öyküsü yada aile öyküsü	Hastanın birinci yada ikinci derece yakınlarında öykü bulunmalıdır
<b>1</b>	Tırnak değişikliği	Onikoliz, pitting yada hiperkeratoz
<b>1</b>	Romatoid faktör negatifliği	ELİSA yada nefolometrik
<b>1</b>	Daktilit varlığı yada öyküsü	Parmağın tamamında şişme
<b>1</b>	Radyografide (el veya ayak) jukstaartiküler yeni kemik oluşumu	Osteofit formasyonu dışlanmalıdır.

### 2.2.5 PsA Kliniği ve Eklem Tutulum Tipleri

PsA; reaktif artrit ve ankilozan spondilit gibi hastalıklarla beraber klinik özelliklerinden dolayı seronegatif spondiloartritler arasında sayılmaktadır (32). Hastalığın başlangıçta çoğunlukla mono veya oligoartiküler olduğunu ve ortalama 12,1 yıl takipte hastaların % 63’ ünün poliartritik seyrettikleri Jones ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (43). 1973’ de Moll ve Wright tarafından PsA ile ilk sınıflama yapılmış ve halen en sık kullanılan sınıflama kriterleridir (44). Bu kriterlere göre hastada Ps tanısı bulunmalıdır (45).

**Tablo 2 : PsA’ da eklem tutulum şekilleri**

<b>Psoriatik artritte eklem tutulum tipleri</b>	<b>Sıklığı (%)</b>
Asimetrik oligoartiküler artrit	70
Distal interfalangial eklem tutulumunun baskın olduğu artrit	25-60
Spondilit ağırlıklı artrit	40
Simetrik poliartritis (Romatoid Artrit benzeri)	25
Artritis mutilans	<10

**2.2.5.1 Eklem tutulum Şekilleri :** En çok kullanılan sınıflama kriterleri Moll ve Wright tarafından geliştirilen, PsA' yı 5 alt tipe ayıran kriterlerdir (46).

**2.2.5.1.1 Distal interfalangeal eklem tutulumu :** Eklem bulgularına çoğu zaman tırnak değişiklikleri eşlik etmektedir. DİF tutulumu daktilit ile ilişkilendirilmiştir (47).

**2.2.5.1.2 Simetrik poliartrit :** Simetrik poliartrit daha çok el ve ayak parmaklarında olmaktadır. Kadınlarda daha fazla görülmektedir (26). Poliartiküler form PsA başlangıcında % 3 oranında görülmektedir, daha çok uzun hastalık süresine sahip hastalarda görülmektedir (48).

**2.2.5.1.3 Spondiloartropati :** Spondiloartropati %15-40 hastada görülür. Erken dönemlerde görülmez. Periferik eklem hastalığından uzun bir zaman sonrasında oluşur. İzole spondiloartropati ise nadir olup %1-4 sıklıktadır. Asimetrik sakroileit ve vertebralarda atipik sindesmofitler (kaba sindesmofitler) hastaların 1/3'ünde görülür. PsA' da % 21 sakroileit , % 40 spondilit görülmektedir. Spondilartropati PsA' da erkeklerde 6 kat fazla görülür (49).

**2.2.5.1.4 Asimetrik oligoartiküler eklem tutulumu :** PsA'da eklem tutulumunun en karakteristik tipidir. Genel olarak ilk el ve ayak parmakları etkilenir. Buna fleksör tendon ve sinovyum inflamasyonu eşlik eder ve tipik sosis parmak görünümüne (daktilite) neden olur. Diz gibi büyük eklemlerin yanısıra DİF, MKF (Metakarpofalangeal eklem), proksimal interfarengal (PİF) ve metatarsofalangeal (MTF) eklemleri asimetrik olarak tutmaktadır. Daktilite yol açabilmektedir (50).

**2.2.5.1.5 Arthritis mutilans :** Genellikle, subluksasyonla giden, ciddi hasar görmüş eklemlere ve teleskopik parmaklara yol açan bozukluğun olduğu destrüktif eroziv artrit son dönemi olarak tanımlanır (51). Arthritis mutilans, uzun süren hastalık ve kadın hakimiyetiyle ilişkilidir (48).

## **2.2.6 Ayırıcı Tanı**

PsA' nın travma sonrası gelişebileceği yada alevlenebileceği bilinmektedir. PsA, travma sonrası artrit kalıcı olduğu durumlarda akla gelmesi gereken hastalıklardandır (50). RA ile PsA ayrımı bazen oldukça zordur. Genel olarak RF' nin negatif olması, DİF eklemlerinin tutulumu, asimetrik eklem tutulumu,



sakroiliak ve spinal tutulum, cilt ve tırnak değişikliklerinin olması, entezit ve daktilit PsA’ da daha çok görülür.

**Tablo 3 : PsA-Romatoid artrit özelliklerinin karşılaştırılması (48)**

Özellik	Psöriatik Artrit	Romatoid Artrit
Erkek:Kadın	1:1	2:1
RF Pozitifliği	<%10	%80
DİF Eklem Tutulumu	%30-50	Çok nadir
Eklem Tutulum Paterni	Asimetrik	Simetri
Sakroiliak/Spinal Tutulum	%35/ Tüm vertebra	Servikal tutulum
Diğer Kas İskelet Bulguları	Entezit,Daktilit, Periartiküler Eritem	
Ekstra Artiküler Tutulum	Cilt bulgusu,Tırnak değişikliği	Nodül,Sikka septomları, Vaskülit
Radyoloji	Erezyon (DİF eklem), Periostit,Kemik proliferasyonu	Periartiküler Erezyon (el bileği)
<b>*RF: Romatoid Faktör, DİF: Distal İnterfalangeal.</b>		

### 2.2.7 Prognoz

Bir çok faktörün PsA’ da prognoz’ la ilişkili olduğu bilinmektedir. Beş yada daha fazla şiş ekleme sahip olan ve geçmişte çok sayıda tedavi gören hastalar, hastalık progresyonu bakımından daha yüksek risk taşıırken, düşük ESH hızı koruyucu olarak bulunmuştur (52). HLA tipleri de prognozu tahmin etmede önemlidir. HLA – B27, B19, ve DQw3 pozitif hastalarda klinik hasar riski artmıştır, bu antijenler klinik değişikliklerden daha önemli prognostik faktörlerdir (53).

### 2.2.8 Tedavi

#### 2.2.8.1 Non-Steroid Antiinflamatuvar İlaçlar (NSAİİ)

Nonsteroid anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ), hastalığın başlangıç tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. NSAİİ, hem periferik hem de aksiyel tutulumu olan hastalarda etkilidir. Nonsteroid anti-inflamatuvar ilaçların etkinliğini değerlendiren

kontrollü çalışmaların sayısı oldukça azdır. NSAİİ' ların ağrılı/şiş eklem sayısı ve ağrı skorları bakımından plaseboya karşı daha üstün oldukları; ancak hastalık modifikasyonu üzerine (Ps ve ESH üzerine) etkisi olmadığı gösterilmiştir (54).

#### **2.2.8.2 Sülfasalazin (SSZ)**

Tedavide kullanılan etkin doz 2-3 gr/gün' dür. Sülfasalazin, RA' da klinik, laboratuvar ve radyolojik iyileşme sağlar. Sülfasalazin diğer DMARD' lar ile kombine edilerek de kullanılabilir (55).

#### **2.2.8.3 Kortikosteroidler**

Düşük doz kortikosteroid tedavisi (15 mg/gün prednisolon) aktif RA' lı hastalarda inflamasyona bağlı semptom ve bulguları baskılamada kısa ve orta vadede plasebo ve NSAİD' lara göre üstündür. Aktif RA' da doz arttırılabilir, gerektiği zaman pulse steroid tedavisi tercih edilebilir. Ancak kronik kullanımda çok fazla yan etkisi olması nedeniyle hastayı kontrol altında tutan en düşük doz verilmelidir (56).

#### **2.2.8.4 Antimalaryal İlaçlar**

Tedavideki günlük doz ortalama 4-6 mg/kg' dır. Antimalaryal İlaçların, RA' da klinik ve laboratuvar olarak etkili oldukları ispatlanmıştır, ancak radyolojik olarak erozyonları önleyemedikleri anlaşılmıştır. En fazla metotreksat ile kombine edilmektedir (57).

#### **2.2.8.5 Azatioprin**

Azatioprin , RA tedavisinde diğer uzun etkili ilaçlar kadar etkilidir (58).

#### **2.2.8.6 Metotreksat (MTX)**

Hastalık aktivitesinde düzelme sağlar, radyolojik erozyon ve yapısal hasar gelişimini azaltır (59).

#### **2.2.8.7 Siklosporin**

Siklosporin, diğer tedavilere yanıt vermeyen hastalarda veya metotreksatla kombine olarak kullanılır. Yan etkileri fazla olduğu için ilk tercih ilaçlar arasında yer almamaktadır (60).

### **2.2.8.8 Leflunomid (LEF)**

Leflunomid, özellikle metotreksat ile kombine edildiğinde hastalar karaciğer toksisitesi bakımından yakından takip edilmelidir. Leflunomid tedavisinin hastanın fonksiyonel durumunda belirgin bir düzelme sağladığı ve radyolojik erozyonların ilerlemesini önlediği bildirilmiştir (61).

### **2.2.9 ADAMTS AİLESİ**

ADAMTS' ler (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) bir ekstrasellular proteaz ailesidir. İnsan proteomunda benzer domain yapısı ve substrat çeşitliliğine sahip 19 tane ADAMTS proteini bulunmuştur (62). Kuno ve arkadaşları tarafından ilk olarak 1997 yılında kolon adenokarsinomunda bulunan ADAMTS proteazların, şu an birçok fizyolojik ve patolojik süreçte yer aldığı bildirilmiştir (63,67).

ADAMTS' ler, M12 Metallopeptidaz ailesinden olup, çinko bağımlı matriks enzimleridir. Matriks metalloproteinaz (MMP) ve disintegrin ve metalloproteinazlar (ADAM) da, ADAMTS' lerle ilgili diğer çinko bağımlı proteazlardır. Bu proteazların hücre dışı matriks hasarında ve onarım sürecinde rol aldıkları bilinmektedir (64). ADAMTS' ler kollajen, versikan ve agrekan gibi hücre dışı matriksin yapısal proteinlerini parçalayarak etkilerini gösterirler ve metalloproteinazların doku inhibitörleri olarak bilinen tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)' la inhibe edilirler. Şimdilik bilinen en etkili ADAMTS inhibitörü TIMP-3' dür (65).

OA gibi hastalıkların tedavisinde ilaç geliştirme çalışmalarında kullanılmalarından dolayı ADAMTS genlerine ve gen ürünlerine ilgi artmıştır. ADAMTS düzeyleri ve aktiviteleri; gen ekspresyon kontrolü, mRNA' nın bağlanması, TIMP tarafından protein yapımı ve inhibisyonu gibi pek çok basamakta kontrol edilmektedir. Son dönemlerde insan kıkırdağında ADAMTS aile üyesinin birçoğunun konnektif doku hemostazında ve patolojisinde rol aldığı gösterilmektedir (66).

### **2.2.9.1 Anti-anjiyogenikler : ADAMTS 1/8**

Bütün ADAMTS proteinlerinde olduğu gibi inaktif ADAMTS1 proteini, prodomainin argininden zengin olan kısımdan furin enzimleri ile kesilmesiyle aktifleşmektedir. ADAMTS1 ilk defa kolon kanserinde inflamasyon ilişkili gen olarak bulunmuştur (67). ADAMTS1'in vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) uyardığı anjiyogenezi inhibe ettiği ve fibroblast büyüme faktörü 2' nin uyardığı vaskülarizasyonu baskıladığı bulunmuştur. ADAMTS 1, -4, -5, -8, -9, -15, -16 ve -18 ECM' nin temel bileşenlerinden biri olan agrekanı parçaladıkları için agrekanazlar grubunu oluştururlar (68). ECM' de yer alan diğer proteoglikanlardan brevikan ve versikan yıkımından da sorumludur (69). ADAMTS8 geni, ADAMTS1 ile beraber anti-anjiyogenik özelliği belirgindir (70). ADAMTS8 substratı agrekandır (8).

### **2.2.9.2 Prokollajen kesimi :ADAMTS 2/3/14**

1211 aa'den meydana gelen ve 134 kDa ağırlığında olan ADAMTS2 proteini ADAMTS3 ve -14 ile beraber prokollajen kesim enzimleri olarak bilinir ve kollajen sentezinde önemli fonksiyonlar gerçekleştirirler (71). ADAMTS3 geni 4. kromozomun uzun kolunda yer alıp, 23 ekzondan meydana gelmektedir. 1205 aa' den meydana gelen proteini sentezler. ADAMTS14 geni 1226 aa büyüklüğünde protein üretmektedir.

### **2.2.9.3 Major agrekanazlar :ADAMTS 4/5**

837 aa' den meydana gelen ADAMTS4 proteini, OA, nöral plastisite ve ovulasyonda önemli rol almaktadır (72-74). ADAMTS4' ün substratları agrekan, versikan, matrilin, brevikan, reelin ve hevindir (75-79). ADAMTS5 genine ADAMTS11 adı da verilir. ADAMTS5, 8 ekzondan meydana gelir ve 830 aa' lik 100 kDa ağırlığında protein sentezler. OA ve inflamatuvar olaylarda önemli rol aldığı düşünülür (80). ADAMTS4' le birlikte beyin tümörlerinde sekresyonu artış göstermiştir (81). ADAMTS9 ve ADAMTS20 ile birlikte apoptozis ile hücrelerin ortadan kaldırılması ve hücre dışı matriksinin temizlenmesinde rol aldığı bulunmuştur (82).

#### **2.2.9.4 ADAMTS 6**

Hipofiz tümörlerinin prognozunda ADAMTS6'nın rolü ile ilgili çalışmalar vardır (83).

#### **2.2.9.5 COMP-ADAMTS : ADAMTS 7/12**

1686 aa' den meydana gelen ADAMTS7 proteini OA ve RA gibi kıkırdak inflamasyonu ile giden hastalıklarla alakalı olabileceği gösterilmiştir (84). Kıkırdak yapısında bulunan kıkırdak oligomerik matriks proteinini (COMP) parçaladıkları için COMP-ADAMTS' ler olarak bilinir (85). ADAMTS12 geni 1594 aa büyüklüğünde protein sentezlemektedir. ADAMTS7 ile beraber kıkırdak yapımında önemli bir glikoprotein olan COMP bileşimini parçalar (86).

#### **2.2.9.6 GON-ADAMTS : ADAMTS 9/20**

ADAMTS9, ADAMTS20 ile beraber GON-ADAMTS grubunu oluşturmaktadırlar (87). ADAMTS9' un özafagial ve nazofaringeal kanserlerde tümör supresör gen olarak rol oynadığı fonksiyonel çalışmalarda belirtilmiştir (88). ADAMTS20 geni 1910 aa büyüklüğünde bir protein sentezler. Fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir (89).

#### **2.2.9.7 Pıhtılaşma : ADAMTS 13**

1450 aa' den meydana gelen 150 kDa' luk ADAMTS13 proteini trombotik trombositopenik purpura (TTP) ile ilişkili bulunmuştur (90).

#### **2.2.9.8 Agrekanazlar : ADAMTS 15/16**

ADAMTS15 geni 950 aa büyüklüğünde bir protein sentezler. Agrekanazlar grubunda yer almaktadır. ADAMTS15' in substratı agrekan ve versikandır. ADAMTS16 geni 1224 aa büyüklüğünde bir protein sentezler. Dupuytren hastalığı ve özefagus skuamöz hücreli kanserinde rolleri olabileceği düşünülmektedir (91).

#### **2.2.9.9 ADAMTS 10/17/18/19**

ADAMTS10 geni 1103 aa büyüklüğünde bir protein sentezler (92). ADAMTS17 geni 1095 aa büyüklüğünde bir protein sentezler. ADAMTS10 gibi ADAMTS-17' nin de Weil Marchesani Sendromu' yla ilişkili olduğu düşünülür (93).

Bu hastalıkta kısa boy ve ekstremiteler, lens dislokasyonu, zayıf cilt ve eklem hareket kısıtlılığı görülür. ADAMTS18 geni otozomal resesif erken başlangıçlı ağır retinal distrofiyle ilişkili bulunmuştur. ADAMTS19 geninin fonksiyonu tamamen bilinmemektedir (94).

### **2.2.10 Sitokinler**

Sitokinler, canlıda immün sistemin reglasyonunda ve inflamatuvar olaylarda önemli rol alan moleküllerdir. Yabancı antijen ve ajanlara karşı organizmanın reaksiyonlarının kontrol ve düzenlenmesinde önemli rol alırken bunun yanı sıra hücreler arası ilişkileri de düzenleyerek lokal ve sistemik inflamatuvar cevapta önemli rol oynarlar. Sitokinler hormona benzemek ile birlikte özelleşmiş bir dokudan değil de çeşitli hücreler tarafından yapıldıklarından dolayı hormon kabul edilmezler ve etkilerini otokrin veya parakrin şeklinde gösterirler. Çeşitli sitokinlerin genleri bulunup klonlanmıştır, bu klonlama sayesinde sitokinlerin daha fazla miktarda üretimi mümkün olmuştur. İmmün sistem tarafından salgılanan sitokinlerin önemli bir kısmı interlökinler olup başlıca görevleri immün sistem hücrelerini uyarmaktır.

#### **2.2.10.1 İnterlökin- 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )**

IL-1 gen ailesinde üç üye mevcuttur. Bunlar IL-1 $\alpha$  (İnterlökin- 1 $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  (İnterlökin- 1 $\beta$ ) ve IL-1 (İnterlökin- 1) reseptör antagonistleridir (95). IL-1 iki farklı proteinden meydana gelmektedir; bunlar IL-1  $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ ' dir. İkinci kromozom üzerinde iki ayrı genden meydana getirilen IL-1 $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ ' nin antijenik yapıları farklı olmasına rağmen biyolojik aktivite ve etkinlikleri aynıdır. Monositler IL-1 $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ ' nin her ikisini de oluşturmalarına rağmen IL- 1 $\beta$ ' yı daha çok yaparlar. Buna karşın keratinositler IL-1  $\alpha$ ' yı daha çok oluştururlar (96).

IL -1 $\alpha$  ve IL - 1 $\beta$ ' nin RA ile ilişkili biyolojik işlevleri arasında :

- 1) Hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonunda artış ve vasküler endotelial hücrelerin aktivasyonu
- 2) Prostaglandin sentezinin bağ dokusu hücreleri ve polimorfonükleer lökositlerden uyarılması

3) Kondrosit ve osteoklastların uyarılmasını, kemik ve kıkırdak rezorpsiyonu ile proteoglikan yıkımını, proteoglikan sentezinin inhibisyonunu, kollajenaz sentezi ve kemikten kalsiyum salınımını sıralayabiliriz (97).

IL-1 $\beta$ ; ICAM-1, VCAM-1 gibi farklı adezyon moleküllerinin sellüler sistemdeki ekspresyonunu artırır. IL-1 $\beta$ , MM hücrelerinin kemik iliğine yerleşmesine yön verir, MM hücrelerinde IL-6 salınımını uyarır, hücre büyümesini, osteoklastları ve kemik yıkımını aktive eder (98). IL-1 $\beta$  upregülasyonu hastalığın patogenezinde önemli bir göreve sahiptir (95, 99,100).

#### **2.2.10.2 İnterlökin-6 (IL-6)**

IL-6, insanda 26 kd molekül ağırlığında bir protein olup, aralarında monosit, fibroblast ve endotelyal hücrelerin de bulunduğu birçok hücrenin uyarılması sonucunda sentezlenerek ortama bırakılmaktadır (101). IL-6, immünglobülin üretiminin artmasını sağlar, T-hücre aktivasyonunda ve büyümesinde görev alır, aynı zamanda megakaryositlerin son dönem gelişiminde de rol oynar (102). B lenfositlerin antikor üretimi için gerekli faktörlerden biri olan IL-6, lenfositlerin IgG, IgM, IgA yapan plazma hücrelerine dönüşümünü de artırır (103).

RA' lı eklemlerden alınan inflamatuvar sıvılarda IL-6 seviyesi, serumda bulunan seviyelerinin 1000 katına ulaşan değerlere kadar bulunurken, OA' lı hastaların eklem sıvılarında rastlanmamıştır. Çalışmalarda RA' lı hastaların serumunda IL-6 düzeyleri ile CRP, fibrinojen ve haptoglobülin arasında ilişki bulunduğu gösterilmiştir. Bundan dolayı RA' da akut faz cevabının majör aracısı olarak IL-6 düşünülmektedir (104). Taze olarak izole edilen RA' lı sinovyal hücrelerden IL-6 spontan şekilde salınmaktadır. Bu hücrelerden salınan IL-6 kuvvetlice immünglobülin ve akut faz protein sentezine neden olmaktadır (97).

Monosit/makrofaj kaynaklı IL-1, TNF- $\alpha$  ve IL-6 gibi sitokinler sinovyal sıvıda kolay bir şekilde ölçülebilmektedir. Sinovyal sıvıdaki sitokinlere bakılarak TNF- $\alpha$ ' nın, IL-1 düzeylerini arttırdığı, bununla birlikte IL-6 seviyelerinde artış meydana geldiği ve böylelikle eklemdaki akut inflamasyonun aracısı olduğu öne sürülmüştür (101).

### 2.2.10.3 Tümör Nekrozis Faktör-alfa (TNF- $\alpha$ )

Kaşektin olarak da bilinen TNF- $\alpha$ , endotoksinle karşılaşmış makrofajlar tarafından oluşturulan ve salınan potent bir biyolojik maddedir (104). TNF- $\alpha$  için monositler ve makrofajlar ana kaynak oluşturmaktadır. Fakat makrofaja benzer hücrelerden izole edilse de sonradan anlaşılmıştır ki monositler, T, B ve NK hücreler, astrositler, fibroblastlar, bazofiller ve mast hücreleri gibi farklı hücre tiplerinden de üretilmektedir (105).

TNF-  $\alpha$  ve IL-1, inflamatuvar eklem hastalığının patofizyolojisinde rol aldığı düşünülen birçok biyolojik aktiviteyi paylaşmaktadırlar (106). IL-1 gibi TNF- $\alpha$  da in vitro olarak immün sistemde kuvvetli etkilere sahiptir. Bu etkilere T-hücre proliferasyonunda, MHC klas 1 ve 2 ekspresyonunda artış ve diğer sitokinlerden IL-1, IL-2, IL-6 ve IL-8 sentezinin uyarılması örnek verilebilir (107). RA' lı eklemlerde TNF- $\alpha$ ' nın aşırı üretiminin, IL-1 sentezine neden olduğu öne sürülmektedir. Gerçekleştirilen birçok çalışmada RA' lı hastaların sinoviyal sıvılarında yüksek miktarda TNF- $\alpha$  bulunduğu bildirilmiştir (108). TNF- $\alpha$  da IL-1 $\beta$  gibi kondrositlerde matriks yıkımını indükleyen proteinazların üretimi ve kartilaj matriks sentezinin inhibisyonu gibi etkiler göstermektedir (109).

TNF- $\alpha$ ' nın RA' daki etkilerini kısaca yazarsak :

- 1) PGE2 ve kollajenaz üretimini arttırarak kıkırdak harabiyetine neden olmak,
- 2) Osteoklastları aktive ederek kemikte rezorpsiyona sebep olmak,
- 3) IL-1 sentezini uyarmak,
- 4) HLA klas-1 ve 2 ekspresyonunu uyamak,
- 5) Adezyon molekülü ICAM-1' i uyarmak,
- 6) T ve B-hücre aktivasyonunda rol amaktır (110).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda yer alan bütün deneyler Dicle Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezinde (DÜBTAM) gerçekleştirildi. Çalışmamız Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim dalı, Romatoloji polikliniğine başvuran hastalardan CASPAR (Classification for Psoriatic Arthritis Criteria) kriterlerine göre PsA tanısı konulmuş 15 PsA hastası (cinsiyet farkı gözetilmeden) ile gerçekleştirildi. Kontrol grubu olarak ise Dermatoloji Anabilim dalı polikliniğine başvuran hastalardan klinik ve gerekli durumlarda biyopsi ile tanısı konulmuş 15 Ps hastası ve 15 sağlıklı bireyden (cinsiyet ve yaş açısından uyumlu) kan örnekleri 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 27.11.2015 tarihinde 2015/424 kodlu etik kurul onay belgesi alındı (Ek 1).

**Tablo 4 :** Kontrol, Ps ve PsA gruplarının cinsiyet, yaş ve kaç yıllık hasta olduklarına dair bilgiler.

Sıra	Grup	Cinsiyet	Yaş	Hastalık Geçmişi
1	Kontrol	Kadın	40	yok
2	Kontrol	Kadın	48	yok
3	Kontrol	Kadın	19	yok
4	Kontrol	Erkek	36	yok
5	Kontrol	Erkek	47	yok
6	Kontrol	Kadın	22	yok
7	Kontrol	Erkek	39	yok
8	Kontrol	Erkek	50	yok
9	Kontrol	Kadın	37	yok
10	Kontrol	Erkek	37	yok
11	Kontrol	Kadın	48	yok
12	Kontrol	Kadın	27	yok
13	Kontrol	Kadın	51	yok
14	Kontrol	Erkek	49	yok
15	Kontrol	Erkek	25	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	PsA	Kadın	32	9 yıl
32	PsA	Kadın	46	6 yıl
33	PsA	Kadın	23	3 yıl
34	PsA	Erkek	46	15 yıl
35	PsA	Erkek	45	2 yıl
36	PsA	Kadın	37	15 yıl
37	PsA	Erkek	65	2 yıl
38	PsA	Erkek	65	34 yıl
39	PsA	Kadın	29	5 yıl
40	PsA	Erkek	55	2 yıl
41	PsA	Kadın	57	10 yıl
42	PsA	Kadın	60	20 yıl
43	PsA	Kadın	68	35 yıl
44	PsA	Erkek	36	13 yıl
45	PsA	Erkek	30	yok

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

PsA hastaları, Ps hastaları ve sağlıklı bireylerden elde edilen 20 ml venöz kan heparinize tüp içine alındı (**Şekil 3.1.1**). Tüm hücre izolasyon basamakları steril koşulları sağlamak amacıyla Class II tip laminar kabinde (Thermo safe 1.2 class II) yürütüldü (**Şekil 3.1.3**). Total kandan PBMC izolasyonu standart protokol kullanılarak aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

1) 50 ml'lik falkon tüp içine heparinize kan boşaltılarak üzerine 15 ml Phosphate Buffered Saline (PBS) [Gibco®] eklendi (**Şekil 3.1.2**).

2) PBS ile sulandırılan kan pipet ile üç-dört kez (pipetaj) karıştırıldı. Sulandırılan kan, içinde 15 ml FicollPaque PLUS (GE Healthcare Life Sciences) bulunan tüpün yan duvarından çok yavaşça sızdırılarak bırakıldı.

- 3) Tüpler 400 g' de 30 dk 18 °C' de acc ayarı 4 declarationa ayarı 0 olacak şekilde santrifüj edildi (Thermo SL16R).
- 4) Santrifüj sonrasında en altta eritrositler, eritrositlerin üzerinde yoğunluğu yüksek olan ficoll ve en yukarıda PBS ve plazma yer aldı. Ficoll ve PBS birleşim yerinde bir halka şeklinde PBMC' ler görüldü (**Şekil 3.1.4**).
- 5) 25 ml steril pipet kullanılıp PBS ve plazma uzaklaştırıldı.
- 6) Yeni 5 ml steril pipet kullanılarak PBMC' ler toplandı. Toplanan PBMC' ler yeni bir 50 ml' lik falkon tüpe aktarılıp, üzerine toplam volüm 40 ml olacak şekilde PBS ilave edildi.
- 7) Tüpler 200 g' de 10 dk 18 °C' de acc ayarı 9 declarationa ayarı 9 olacak şekilde ayarlanıp santrifüj edildi (**Şekil 3.1.5**).
- 8) Falkon tüpünün dibine çöken PBMC' lerin üzerindeki PBS dökülerek, falkon tüpünün dibindeki hücreler tüpe hafifçe vurularak kaldırıldı. Hücrelerin üzerine tekrar total miktar 40 ml olacak şekilde PBS eklenip, 10 dk 200 g' de 18 °C' de acc ayarı 9 declarationa ayarı 9 olacak şekilde santrifüj edildi.
- 9) Santrifüj sonrasında PBS dökülüp, dibe çöken PBMC' ler 10 ml serum-free medium RPMI 1640 (Gibco®) ile sulandırıldı. Serum-free medium RPMI 1640 2mM L-Glutamine [Gibco®] ve 100 units/ml penicillin/streptomycin [Gibco®] içermektedir.



**Şekil 3.1.1** : Kanların heparinli tüplere alımı



Şekil 3.1.2 : Kanların 50 ml falkon tüpe aktarımı.



Şekil 3.1.3 : Çalışmanın Class II tip laminar kabinde gerçekleştirilmesi.



Şekil 3.1.4 : Santrifüj sonrası görülen tabakalanma



**Şekil 3.1.5** : Elde edilen PBMC hücreleri

### **3.2 PBMC' lerin primer kültürleri**

İzolasyon sonunda ortalama 30.000 PBMC hücresi elde edildi. Serum-free medium ile sulandırılan PBMC' ler 24 kuyucuklu plate (plakaya), her kuyucuğa 1 ml olacak şekilde toplam 9 kuyucuğa aktarıldı (**Şekil 3.2.1**). Her kuyucuğa ortalama 4 milyon hücre bırakılmıştır. Plaka 37 °C %5' lik CO<sub>2</sub>' li nemli ortamda (Thermo Steri-Cycle 371) bir gün inkübe edildi.



**Şekil 3.2.1** : PBMC hücrelerinin 24 kuyucuklu plakalara ekimi

### 3.3 PBMC'lerin MAPK (ERK1/2, p38 ve JNK), STAT3 ve NFκB aktivitesinin inhibitörler ile baskılanması

#### 3.3.1 İnhibitörlerin çözülmesi ve hesaplanması

İnhibitörlerin stok konsantrasyonları hesaplandı.

- a) **ERK1/2 inhibitörü PD98059** : Stok konsantrasyon 18.7 mM olacak şekilde 5 mg ERK1/2 inhibitörü 1 ml DMSO içinde çözüldü (10 µM ERK1/2 inhibitörü ile hücreler muamele edildi).
- b) **p38 inhibitörü SB203580** : Stok konsantrasyon 10.5 mM olacak şekilde 1 mg p38 inhibitörü 250 µl DMSO içinde çözüldü. (10 µM p38 inhibitörü ile hücreler muamele edildi).
- c) **JNK inhibitörü SP600125** : Stok konsantrasyon 22.7 mM olacak şekilde 10 mg JNK inhibitörü 2 ml DMSO içinde çözüldü. (10 µM JNK inhibitörü ile hücreler muamele edildi).
- d) **STAT3 inhibitörü parthenolide** : Stok konsantrasyon 20.1 mM olacak şekilde 5 mg STAT3 inhibitörü 1 ml DMSO içinde çözüldü. (10 µM STAT3 inhibitörü ile hücreler muamele edildi).
- e) **NFκB inhibitörü sm-7368** : Stok konsantrasyon 15.2 mM olacak şekilde 5mg NFκB 1 ml DMSO içinde çözüldü. (10 µM NFκB inhibitörü ile hücreler muamele edildi).

JNK, STAT3 ve NFκB inhibitörleri +4 °C'de , ERK1/2 ve p38 inhibitörleri - 20 °C' de muhafaza edildi.

Daha sonra PBMC'lere muamele edilecek MAPK (ERK1/2, p38 ve JNK), STAT3 ve NFκB inhibitörlerinin kullanılacak miktarları hesaplandı.

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

### 3.3.2 Pro-inflamatuar sitokinlerin çözülmesi ve hesaplanması

Pro-inflamatuar sitokinlerin stok konsantrasyonları hesaplandı.

**a)TNF- $\alpha$**  : Stok konsantrasyon 10  $\mu\text{g/ml}$  olacak şekilde 10  $\mu\text{g}$  TNF- $\alpha$  1 ml distile su içinde çözüldü. Kuyucuklarda 100 ng/ml TNF- $\alpha$  olacak şekilde hücreler uyarıldı.

**b)IL-6** : Stok konsantrasyon 20  $\mu\text{g/ml}$  olacak şekilde 5  $\mu\text{g}$  IL-6 250  $\mu\text{l}$  distile su içinde çözüldü. Kuyucuklarda 100 ng/ml IL-6 olacak şekilde hücreler uyarıldı.

**c)IL-1 $\beta$**  : Stok konsantrasyon 5  $\mu\text{g/ml}$  olacak şekilde 5  $\mu\text{g}$  IL-1 $\beta$  1 ml distile su içinde çözüldü. Kuyucuklarda 20 ng/ml IL-1 $\beta$  olacak şekilde hücreler uyarıldı.

Pro-inflamatuar sitokinler (TNF- $\alpha$  , IL-6 , IL-1 $\beta$  ) -20°C' de muhafaza edildi.

TNF- $\alpha$  (100 ng/ml), IL-6(100 ng/ml) ve IL-1 $\beta$  (20 ng/ml) pro-inflamatuar sitokinlerin (Sigma-Aldrich) stimülasyonda kullanılacak değerleri hesaplandı.

- TNF- $\alpha$  : 1,1 ml serum-free medium içine 66  $\mu\text{l}$  uyarıcı
- IL-6 : 600  $\mu\text{l}$  serum-free medium içine 18  $\mu\text{l}$  uyarıcı
- IL-1 $\beta$  : 600  $\mu\text{l}$  serum-free medium içine 18  $\mu\text{l}$  uyarıcı

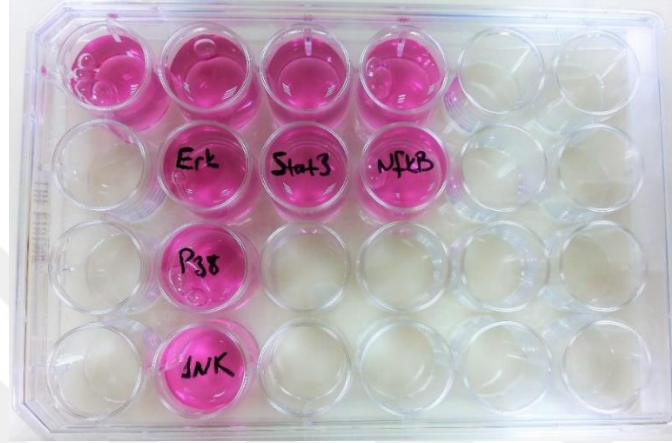
### 3.3.3 İnhibitörlerin uygulanması

**Tablo : 3.3.3.1:** Kuyucuklara yerleştirilen PBMC hücreleri uygulama şekillerine göre 9 gruba ayrıldı.

Grup 1	UT (Untreated)
Grup 2	TNF- $\alpha$
Grup 3	TNF- $\alpha$ + ERK1/2 inhibitörü (PD98059)
Grup 4	TNF- $\alpha$ + p38 inhibitörü (SB203580)
Grup 5	TNF- $\alpha$ + JNK inhibitörü (SP600125)
Grup 6	IL- 6
Grup 7	IL- 6 + STAT3 inhibitörü (parthenolide)
Grup 8	IL-1 $\beta$
Grup 9	IL-1 $\beta$ + NF $\kappa$ B inhibitörü (sm7368)

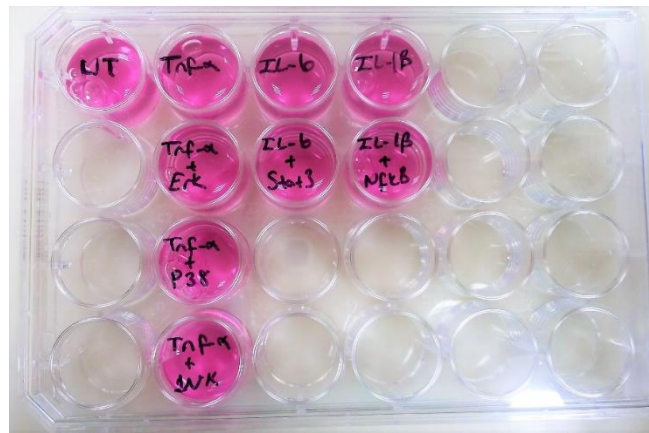
MAPK (ERK1/2, p38 ve JNK), STAT3 ve NFκB aktivitelerini baskılamak için PBMC' ler ERK1/2, p38, JNK, STAT3 ve NFκB inhibitörleriyle muamele edildi (Sigma-Aldrich).

ERK1/2, p38, JNK, STAT3 ve NFκB inhibitörleri 10 μM konsantrasyonda ilgili kuyucuklara bırakıldı (Grup 3, 4, 5, 7 ve 9) ve 2 saat inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.3.3.2, Tablo : 3.3.3.1).



Şekil 3.3.3.2 : PBMC hücrelerinin ERK, p38, JNK, STAT3 ve NFκB ile stimülasyonu

2 saatlik inkübasyondan sonra hücreler pro-inflamatuar sitokinler olan TNF-α (100 ng/ml), IL-6 (100 ng/ml) ve IL-1β (20 ng/ml) ile uyarıldı ve 24 kuyucuklu plakalar 37 °C' de, %5' lik CO<sub>2</sub>' li nemli ortamda 24 saat inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.3.3.3).



Şekil 3.3.3.3 : PBMC hücrelerinin TNF-α, IL-6 ve IL-1β ile uyarılması



### 3.4 RNA izolasyonu, kantitasyonu ve cDNA sentezi

İnkübasyon süresinden sonra hücreler kuyucuklardan filtrelili uçlar kullanarak ve 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. High pure RNA isolation kiti (Roche) kullanılarak izolasyon aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

- 1) PBMC' ler 200 µl PBS kullanılarak pipetle yerlerinden kaldırıldı.
- 2) Üzerine kitte bulunan 400 µl lisis-binding solüsyonu bırakılıp, pipetaj yapıldı ve karışımın homojen bir yapı alması sağlandı.
- 3) Tüpler 15 sn vortexlenip, filtrelili tüplere aktarıldı. Tüpler 8000 fcr' da 15 sn santrifüj edildi.
- 4) Dibe çöken sıvı döküldü. Tüpe 10 µl DNAaz 90 µl' de DNAaz incubation karışımı içeren solüsyondan bırakılıp oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. DNA ların liziz olması sağlandı.
- 5) Süre sonunda tüplere 500 µl wash buffer I den bırakılıp 8000 fcr' da 15 sn santrifüj edildi.
- 6) Santrifüj sonunda dibe çöken sıvı dökülüp, tüplere 500 µl wash buffer II bırakıldı ve 8000 fcr' da 15 sn santrifüj edildi.
- 7) Dibe çöken sıvı dökülüp, üzerine tekrar wash buffer II' den 200 µl bırakıldı ve 15000 fcr' da 3 dk santrifüj edildi.
- 8) Santrifüj sonunda tüplerin filtrelili kısmı hazırlanmış yeni ependorf tüplere bırakıldı ve tüplere 50 µl elution buffer bırakıldı.
- 9) 8000 fcr' da 1 dk santrifüj edilip, RNA' ların ependorf tüplere aktarımı sağlandı.

Elde edilen RNA' ların konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrik yöntemle (nanodrop ile) belirlendi. Ortalama 40-45 ng/ml RNA miktarları elde edildi.

### 3.4.1 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.

- 1) Tüpler hazırlanıp, her tüpe 1 µl oligo 1 µl hexamer solüsyonundan olacak şekilde toplam 2 µl karışım bırakıldı.
- 2) Her bir uygulama kendi tüpüne gelecek şekilde 11 µl RNA bırakılıp, tüpler spin yapıldı.
- 3) Tüpler Thermal Cycler kullanılarak, cDNA 1 işaretlenmiş programda 65 °C' de 10 dk bırakıldı.
- 4) 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 hazırlandı:

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

- 5) Süre dolduktan sonra tüpler -20°C' de muhafaza edildi.

### 3.5 Kantitatif Real-Time PCR (qPCR)

PsA' lı, Ps' li ve sağlıklı bireylerin periferik kanlarından izole edilen PBMC' lerde ADAMTS (ADAMTS 1, -4, -5) genlerinin mRNA ekspresyonlarını belirlemek ve kantite etmek amacıyla qPCR yapıldı.

PBMC hücrelerinden elde edilen cDNA örnekleri 1:6 oranında sulandırıldı. LC 480 Probe Master (Roche) PCR mastermix olarak kullanıldı. Referans gen GAPDH ve ADAMTS 1,-4 ve -5 için PCR primerler dizileri olarak Tablo-5' de verilen Real Time Ready kitleri (Roche) kullanıldı. Tablo-6' da belirtildiği gibi hazırlanan miksler LC 480 well plakaya (Roche) 3 tekrarlı yüklenip, Light Cycler 480 (Roche) cihazında Tablo-7' de belirtilen protokole uygun olarak real time PCR

yapıldı. Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SigmaPlot 11.0 programı kullanılarak yapıldı ve  $P < 0,05$  olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

**Tablo-5 : ADAMTS ve GAPDH primer dizileri**

ASSAY/ID	FORWARD PRİMER	REVERSE PRİMER
GAPDH/141139	'AGCCACATCGCTCAGACAC'	'GCCCAATACGACCAAATCC'
ADAMTS1/108591	'GCTGCTCCGTCATAGAAGATG'	'GCATCATCATGTGGCATGTTA'
ADAMTS4/108927	'ACTTCCTGGACAATGGCTATG'	'AAAGTCACAGGCAGATGCAA'
ADAMTS5/108956	'TGGCAGCACCAACACAAC'	'GAATGATGCCACATAAAATCCT'

**Tablo-6 : PCR kimyasal 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

**Tablo -7 : Real time PCR protokolü**

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

### 3.6 Western Blot

#### 3.6.1 Western Blot için PBMC hücrelerinin ekimi ve TNF- $\alpha$ , IL- 6, IL-1 $\beta$ , ERK1/2, p38, JNK, STAT3 ve NF $\kappa$ B uygulaması

Real time PCR' da kullanılan inhibitörlerin etki derecesine Western Blot ile bakıldı. Bu amaçla sadece sağlıklı bireylerin PBMC' lerinde ilacın inhibitör etkisine bakmak yeterliydi. Periferik kandan izole edilen PBMC' ler medium free RPMI 1640 içinde çözülüp, Western Blot için 10 ul Trypan blue boyası + 10 ul PBMC örneği karıştırılarak Thoma lamında sayıldı ve ortalama 40.000 hücre elde edildi. Sayımdan sonra  $5 \times 10^6$  PBMC hücresi 6 kuyucuklu plakalara yerleştirilip hücreler 37 °C' de, %5' lik CO<sub>2</sub>' li nemli ortamda (Thermo Steri-Cycle) 24 saat inkübe edildi. Daha sonra kuyucuklara yerleştirilen PBMC' ler uygulama şekillerine göre aşağıdaki gibi 9 gruba ayrıldı (**Tablo : 3.6.1.1**).

**Tablo : 3.6.1.1:** Kuyucuklara yerleştirilen PBMC hücreleri uygulama şekillerine göre 9 gruba ayrılması

<b>Grup 1</b>	<b>UT (Untreated)</b>
<b>Grup 2</b>	TNF- $\alpha$
<b>Grup 3</b>	TNF- $\alpha$ + Erk1/2 inhibitör (PD98059)
<b>Grup 4</b>	TNF- $\alpha$ + P38 inhibitör (SB203580)
<b>Grup 5</b>	TNF- $\alpha$ + JNK inhibitör (SP600125)
<b>Grup 6</b>	IL- 6
<b>Grup 7</b>	IL- 6 + STAT3 inhibitör (parthenolide)
<b>Grup 8</b>	IL-1 $\beta$
<b>Grup 9</b>	IL-1 $\beta$ + NF $\kappa$ B inhibitör (sm7368)

ERK1/2, p38, JNK, STAT3 ve NF $\kappa$ B inhibitörleri 10  $\mu$ M konsantrasyonda ilgili kuyucuklara bırakıldı (Grup 3, 4, 5, 7 ve 9) ve 2 saat inkübasyona bırakıldı (**Şekil 3.6.1.1**). 2 saatlik inkübasyondan sonra hücreler TNF- $\alpha$  (100 ng/ml), IL-6 (100 ng/ml) ve IL-1 $\beta$  (20 ng/ml) ile 15 dk 37 °C' de, %5' lik CO<sub>2</sub>' li nemli ortamda uyarıldı (**Şekil 3.6.1.1**).

### 3.6.2 Western Blot için PBMC hücre lizatlarının hazırlanması

Hücre lizatları aşağıdaki protokol takip edilerek yapıldı.

1. PBMC hücreleri 2 saat inhibitörler [ERK1/2, p38, JNK, STAT3 ve NFκB] ile muamele edildikten sonra ve 15 dk [TNF-α + (ERK1/2, p38, JNK) , L- 6 +( STAT3), IL-1β + (NFκB)] ile uyarıldı ve sonra stimulasyonu durdurmak için 6 kuyucuklu plakalar buz üzerine taşındı.
2. Bazı hücreler kuyucuklara yapışmadığı için supernatantlar 15 ml falkon tüp içine toplandı.
3. Supernatantdaki hücreler 5000 rpm' de 5 dk santrifüj edilerek çöktürüldü ve hücre peletine değdirilmeden pompa yardımıyla sıvı kısım uzaklaştırıldı.
4. Kuyucuklara yapışık halde bulunan PBMC hücreleri 5 ml soğuk PBS ile yıkandıktan sonra hücreler 5 ml soğuk PBS içerisinde pipetlenerek kuyucuklardan kaldırıldı ve 15 ml falkon içerisindeki peletlerin üzerine eklendi (**Şekil 3.6.2.1**).
5. Tüpler tekrar 5000 rpm' de 5 dk santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü ve hücre peletine değdirilmeden pompa yardımıyla sıvı kısım uzaklaştırıldı.
6. İçinde hücre peleti bulunan tüpler buz üzerinde taşındı ve sonraki tüm aşamalar buz üzerinde gerçekleştirildi.
7. Sıvı uzaklaştırıldıktan sonra pelet üzerine proteaz-fosfotaz inhibitör kokteyli (Thermo Fischer) ve nükleaz (Thermo Fischer) içeren soğuk RIPA buffer (160 µl) (Sigma Aldrich) eklendi.
8. Önce pipet ile sonra vortekslenerek karıştırılan örnekler buzun üzerinde 1 saat bekletilerek liziz edildi (**Şekil 3.6.2.2**).
9. 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 (**Şekil 3.6.2.3**).



Şekil 3.6.1.1 : PBMC hücrelerinin 6 kuyucuklu plakalara ekimi



Şekil 3.6.2.1 : PBMC hücreleri kuyucuklardan alımı



Şekil 3.6.2.2 : Liziz eklenen PBMC hücrelerinin buzda bekletilmesi.



**Şekil 3.6.2.3** : Protein miktarlarının ölçümü.

### **3.6.3 Western Blot için protein örneklerinin jelde ayrımı ve membrana transferi**

- 1.** 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 (**Şekil 3.6.3.1**).
- 2.** 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' °C de 2 dk ısıtıldı.
- 3.** İlgili eşit miktardaki (20 µg) ve eşit hacimdeki (20 µl) proteinler % 10' luk TGX stain-free fast cast acrylamid jel üzerine yüklendi (**Şekil 3.6.3.2**) 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 (**Şekil 3.6.3.3**).
- 4.** Ayrılmış proteinler jelden (**Şekil 3.6.3.4**) PVDF membrana transfer edildi (Bio-Rad, Transfer pack) (**Şekil 3.6.3.5**).
- 5.** Membranlar % 5' lik yağsız süt tozu (PBS-Tween içerisinde hazırlanmış) içerisinde çalkalayıcı üzerinde 1 saat oda sıcaklığında bloke edildi.

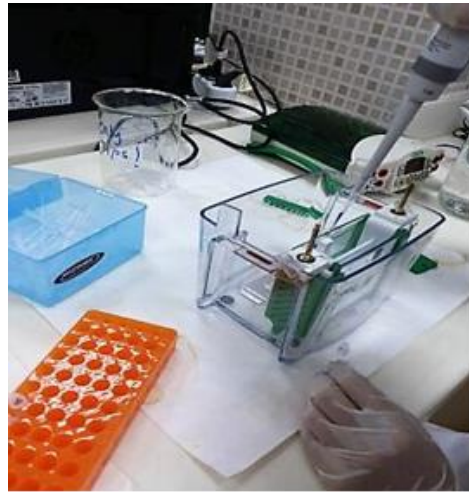
6. Bloke edilen membranlar % 5' lik süt tozu PBS-Tween içerisinde 1/1000 oranında hazırlanan primer antikolar ile çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.

7. Membranlar 15 dk 25 ml PBS-Tween ve toplam 15 dk olacak Şekilde 3 defa (5 dk+5 dk+5 dk) 25 ml PBS-Tween ile yıkandıktan sonra sekonder antikolar (1/10000 oranında PBS-Tween içerinde hazırlanmış) ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi (Şekil 3.6.3.6).

8. Membranlar 15 dk 25 ml PBS-Tween ve toplam 15 dk olacak Şekilde 3 defa (5 dk+5 dk+5 dk) 25 ml PBS-Tween ile yıkandıktan sonra, proteinler, ECL (enhanced chemiluminiscent) (Bio-Rad) metoduna göre görüntüleme cihazı (Bio-Rad ChemiDoc MP) kullanılarak görüntülendi.



Şekil 3.6.3.1 : Hazırlanan jel.



Şekil 3.6.3.2 : Örneklerin yüklenmesi.





Şekil 3.6.3.3 : Örneklerin yürütülmesi.



Şekil 3.6.3.4 : Proteinlerin ayrıştığı jel.



Şekil 3.6.3.5 : Örneklerin membrana aktarımı.



Şekil 3.6.3.6 : Membranlara antikor uygulaması.

**Tablo-8 : Primer antikorların listesi**

<b>Primer antikor</b>	<b>Firma</b>
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-NF-kB p65 antibody	Abcam
GAPDH antibody	Abcam

**Tablo-9 : Sekonder antikorların listesi**

<b>Sekonder antikor</b>	<b>Firma</b>
1. HRP conjugated anti-mouse antibody	Abcam
2. HRP conjugated anti-rabbit antibody	Abcam

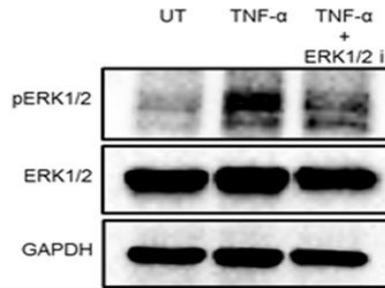
## 4. BULGULAR

Çalışmaya Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim dalı, Romatoloji polikliniğine 2016 - 2017 yılları arasında başvuran, CASPAR (Classification for Psoriatic Arthritis Criteria) 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.

### 4.1 ERK1/2, p38, JNK, STAT3 VE NFκB spesifik inhibitörlerin PBMC hücrelerindeki baskılayıcı etkisinin Western Blot ile analizi

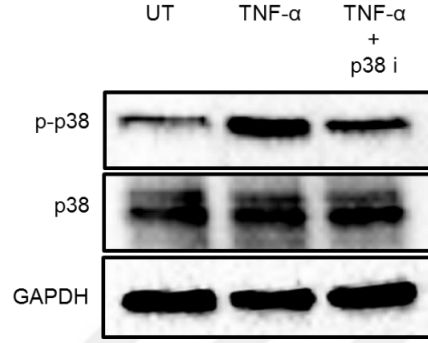
Çalışmamızda, kullandığımız inhibitör ve sitokinlerin ilgili sinyal yolları için işlevsel olup/olmadığını göstermek amacıyla total kandan izole edilen PBMC hücrelerinde uyarıcı ve inhibe edici etkileri araştırılmıştır. ERK1/2, p38, JNK, STAT3 ve NFκB total protein ekspresyonları ve fosforilasyon düzeyleri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

Sağlıklı bireylerden izole edilen PBMC hücrelerinde ERK1/2 ekspresyon düzeyinin gruplar arası benzer olduğu anti-ERK1/2 antikoru ile gösterildi. TNF-α stimülasyonu sonucu artmış olan ERK1/2 fosforilasyonunun ERK inhibitörü ile baskılandığı anti-phospho-ERK1/2 antikoru kullanılarak ortaya koyuldu (**Şekil 4.1.1**).



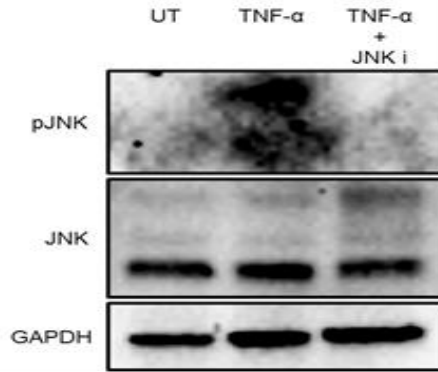
**Şekil 4.1.1** : ERK1/2 inhibitörü uygulanmış ve TNF-α ile uyarılmış PBMC hücrelerinin Western Blot yöntemiyle analizi

p38 ekspresyon düzeyinin gruplar arası benzer olduğu anti-p38 antikoruna gösterildi. TNF- $\alpha$  stimülasyonu sonucu artmış olan p38 fosforilasyonunun p38 inhibitörü ile baskılandığı anti-phospho-p38 antikoruna kullanılarak gözlemlendi (Şekil 4.1.2).



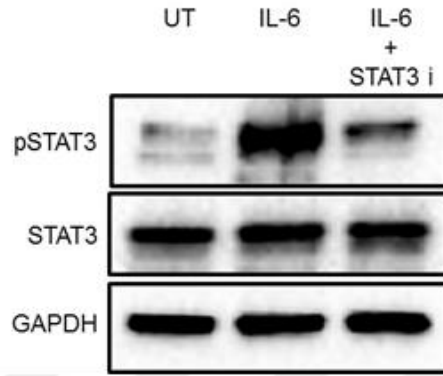
Şekil 4.1.2 : p38 inhibitörü uygulanmış ve TNF- $\alpha$  ile uyarılmış PBMC hücrelerinin Western Blot yöntemiyle analizi.

Sağlıklı bireylerden izole edilen PBMC hücrelerinde JNK ekspresyon düzeyinin gruplar arası benzer olduğu anti-JNK antikoruna gösterildi. TNF- $\alpha$  stimülasyonu sonucu artmış olan JNK fosforilasyonunun JNK inhibitörü ile baskılandığı anti-phospho-JNK antikoruna kullanılarak tespit edildi (Şekil 4.1.3).



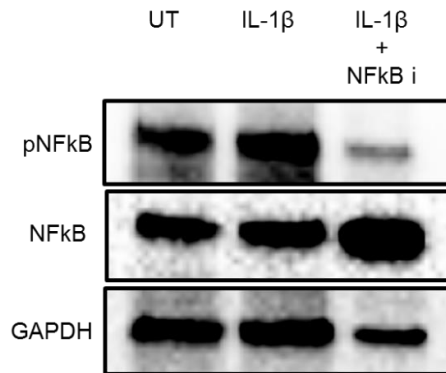
Şekil 4.1.3 : JNK inhibitörü uygulanmış ve TNF- $\alpha$  ile uyarılmış PBMC hücrelerinin Western Blot yöntemiyle analizi.

STAT3 ekspresyon düzeyinin gruplar arası benzer olduğu anti-STAT3 antikoru ile gösterildi. IL-6 stimülasyonu sonucu artmış olan STAT3 fosforilasyonunun STAT3 inhibitörü ile baskılandığı anti-phospho-STAT3 antikoru kullanılarak ortaya koyuldu (Şekil 4.1.4).



Şekil 4.1.4 : STAT3 inhibitörü uygulanmış ve IL-6 ile uyarılmış PBMC hücrelerinin Western Blot yöntemiyle analizi.

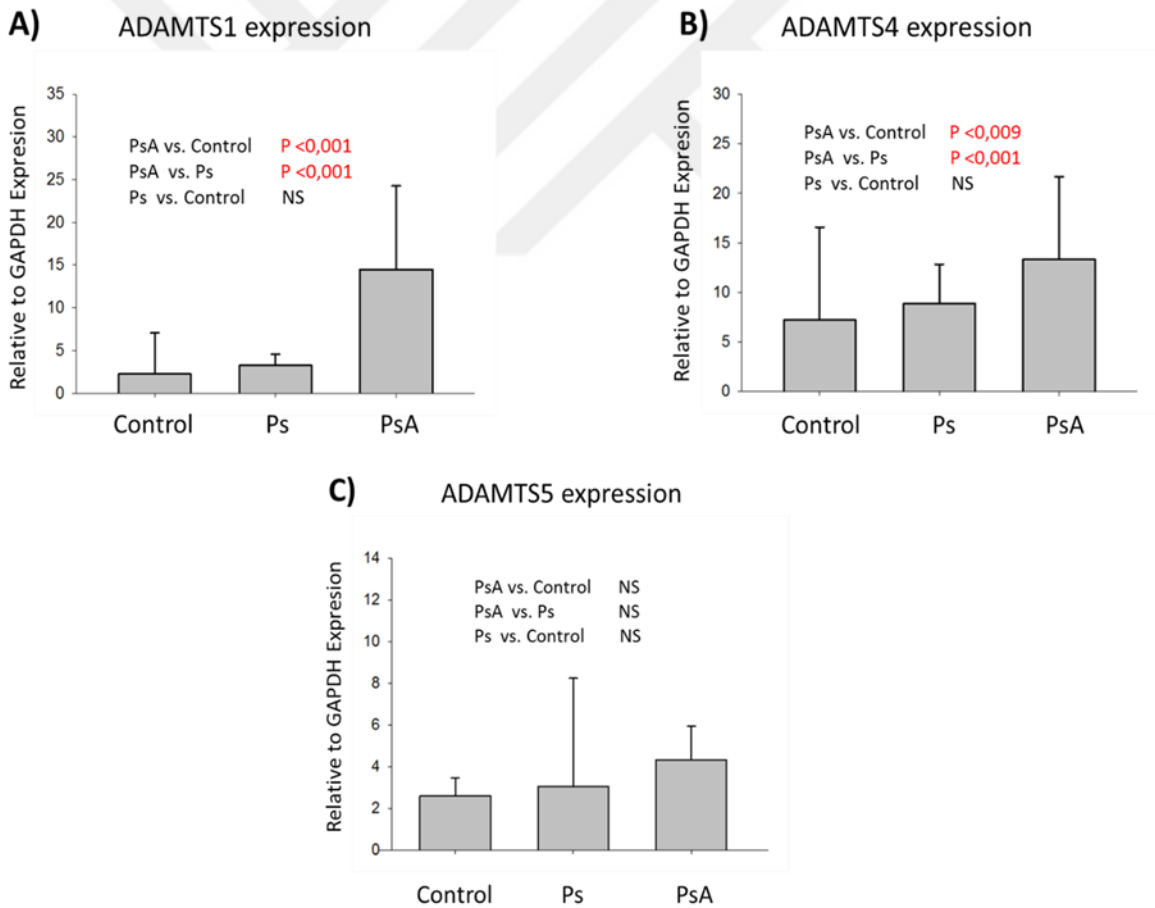
Sağlıklı bireylerden izole edilen PBMC hücrelerinde NFκB ekspresyon düzeyinin gruplar arası çok fark olmaksızın hemen hemen benzer olduğu anti- NFκB antikoru ile gösterildi. IL-1β stimülasyonu sonucu artmış olan NFκB fosforilasyonunun NFκB inhibitörü ile baskılandığı anti-phospho- NFκB antikoru kullanılarak gözlemlendi (Şekil 4.1.5).



Şekil 4.1.5 : NFκB inhibitörü uygulanmış ve IL-1β ile uyarılmış PBMC hücrelerinin Western Blot yöntemiyle analizi.

## 4.2 ADAMTS1, -4 ve -5 mRNA düzeylerinin qPCR ile analizi

Çalışmamızda herhangi bir inhibitör yada sitokin uygulaması yapılmamış (untreated, UT) PBMC hücrelerinin ADAMTS1, -4, -5 gen ekspresyon grafikleri ve istatistiksel analizleri **Şekil-4.2**' de gösterilmiştir. ADAMTS-1 gen ekspresyon düzeyinin PsA grubunda kontrol ve Ps gruplarına oranla ciddi bir artış gösterdiği ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (**Şekil-4.2 A**). ADAMTS4 gen ekspresyonunda PsA grubunda, kontrol ve Ps gruplarına oranla istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana geldiği gözlenmiştir (**Şekil-4.2 B**). ADAMTS5 gen ekspresyon düzeyinin Ps ve PsA gruplarında kontrol grubuna oranla artmış olduğu görülmüştür, ancak bu ekspresyon artışları istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (**Şekil-4.2 C**).



**Şekil 4.2** : PBMC hücrelerinde ADAMTS genlerinin (-1, -4, -5) mRNA ekspresyon düzeyleri ve istatistiksel verileri (n:15).

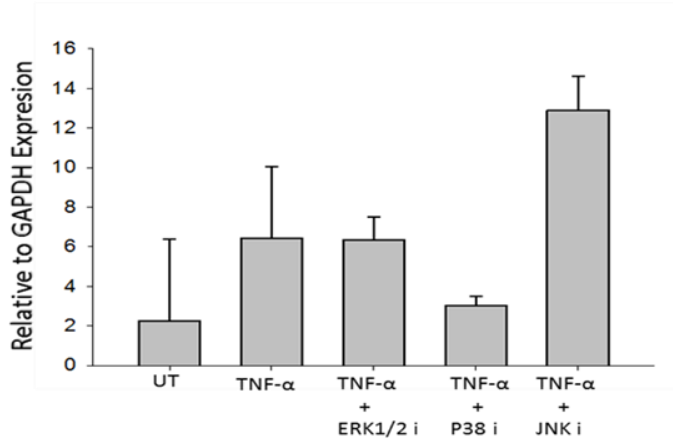
Sağlıklı, Ps' li ve PsA' lı bireylerden elde edilen PBMC hücreleri ERK1/2, p38, JNK spesifik inhibitörler ile (10 µM) 2 saat muamele edildikten sonra TNF-α (100 ng/ml) ile 24 saat stimule edildi ve ADAMTS1 -4 ve -5 gen ekspresyon düzeyleri qPCR ile analiz edildi.

Kontrol grubunda, TNF-α stimülasyonunun ADAMTS1 gen ekspresyonunda anlamlı bir artışa neden olduğu gözlenmiştir. ERK1/2 ve p38 inhibisyonlarının TNF-α' nın indüklediği ADAMTS1 gen ekspresyonunda bir değişikliğe neden olmadığı, fakat JNK inhibisyonunun TNF-α' nın ADAMTS1 için indükleyici etkisini daha da arttırdığı bulunmuştur (**Şekil-4.2.1 A**).

Ps grubunda, TNF-α uyarılması ADAMTS1 gen ekspresyonunda anlamlı bir değişime neden olmamıştır. Ancak, ERK1/2, p38 ve JNK inhibisyonları sonucunda TNF-α stimülasyonuna yanıt olarak ADAMTS1 gen ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir (**Şekil-4.2.1 B**).

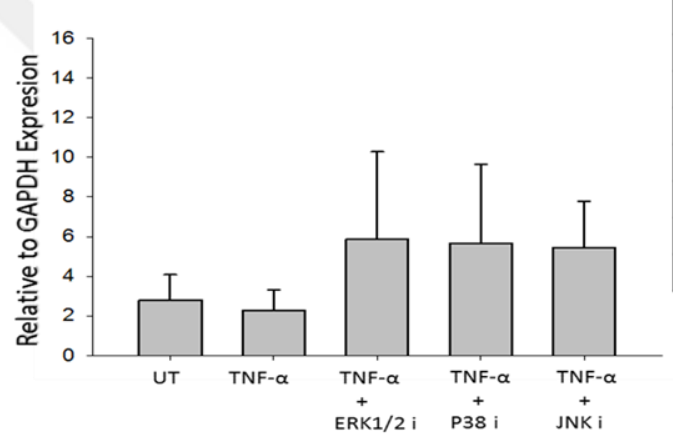
PsA grubunda, TNF-α stimülasyonunun ADAMTS 1 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olduğu bulunmuştur. ERK1/2 inhibisyonu TNF-α' nın ADAMTS1 gen ekspresyonu üzerindeki baskılayıcı etkisini ortadan kaldırmıştır. Ancak TNF-α' nın ADAMTS1 geni üzerindeki baskılayıcı etkisinin p38 ve JNK inhibisyonlarından etkilenmediği gözlenmiştir (**Şekil-4.2.1 C**).

**A) ADAMTS 1 expression-Control**



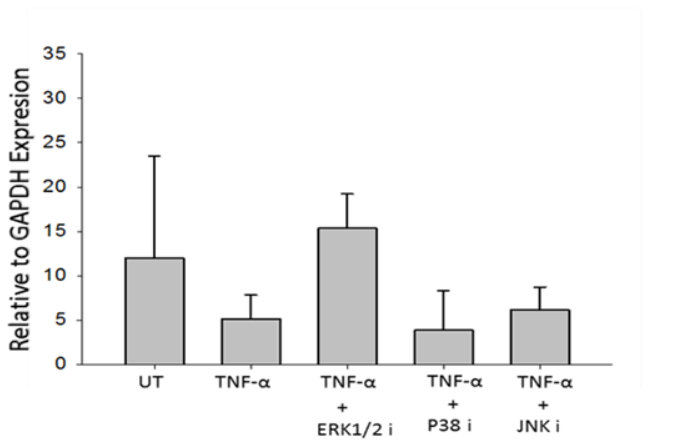
Gruplar	P değeri
TNF-α vs. UT	0,001
TNF-α vs. ERK1/2 i	NS
TNF-α vs. P38 i	NS
TNF-α vs. JNK i	<0,001
ERK1/2 i vs. UT	NS
P38 i vs. UT	<0,001
JNK i vs. UT	<0,001

**B) ADAMTS 1 expression - Ps**



Gruplar	P değeri
TNF-α vs. UT	NS
TNF-α vs. ERK1/2 i	<0,001
TNF-α vs. P38 i	<0,001
TNF-α vs. JNK i	0,005
ERK1/2 i vs. UT	<0,001
P38 i vs. UT	0,002
JNK i vs. UT	0,008

**C) ADAMTS 1 expression - PsA**



Gruplar	P değeri
TNF-α vs. UT	<0,001
TNF-α vs. ERK1/2 i	<0,001
TNF-α vs. P38 i	NS
TNF-α vs. JNK i	NS
ERK1/2 i vs. UT	NS
P38 i vs. UT	<0,001
JNK i vs. UT	<0,001

**Şekil 4.2.1 :** İnhibitör (ERK1/2 i, p38 i ve JNK i) ve TNF-α uygulaması yapılmış olan PBMC hücrelerinde ADAMTS1' in mRNA ekspresyon düzeyi ve istatistiksel verileri (n:15).

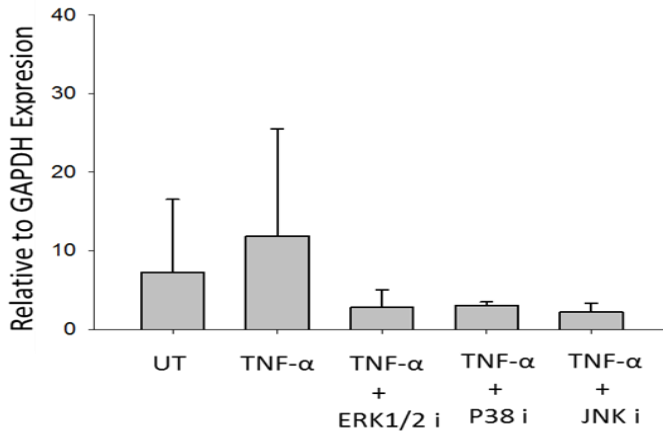


Kontrol grubunda, TNF- $\alpha$  uyarılmasının ADAMTS-4 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olduğu belirlenmiştir. ERK1/2, p38 ve JNK inhibisyonlarının TNF- $\alpha$ 'nın stimüle ettiği ADAMTS4 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olduğu bulunmuştur (**Şekil-4.2.2 A**).

Ps grubunda, hem TNF- $\alpha$  stimülasyonunun hemde ERK1/2 inhibisyonunun ADAMTS4 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişime neden olmadığı, ancak, p38 ve JNK inhibisyonları sonucu TNF- $\alpha$  uyarımına yanıt olarak ADAMTS4 gen ekspresyon düzeyinde anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür (**Şekil-4.2.2 B**).

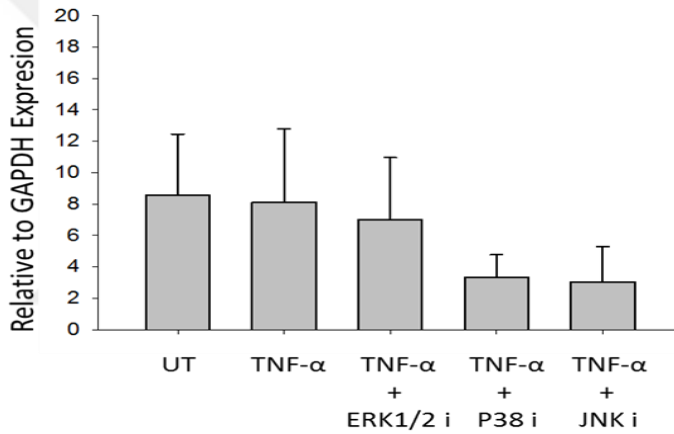
PsA grubunda, TNF- $\alpha$  stimülasyonu ADAMTS4 gen ekspresyonunda anlamlı bir azalışa neden olmuştur. Ancak, ERK1/2 inhibisyonunun TNF- $\alpha$ 'nın ADAMTS4 geni üzerindeki baskılayıcı etkisini değiştirmediği, p38 ve JNK inhibisyonlarının ise baskılayıcı etkiyi daha da arttırdığı gözlenmiştir (**Şekil-4.2.2 C**).

**A) ADAMTS 4 expression - Control**



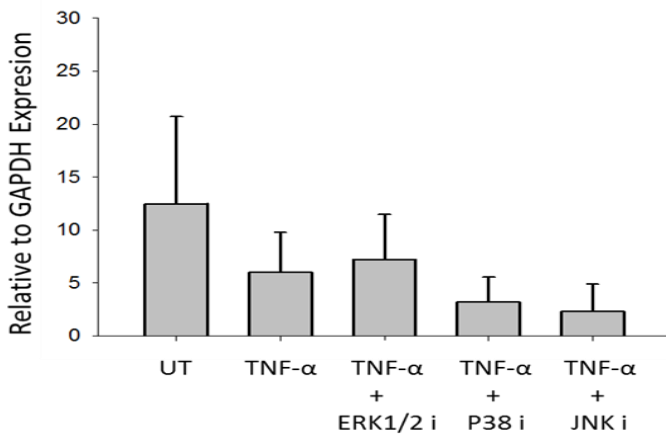
Gruplar	P değeri
TNF-α vs. UT	0,01
TNF-α vs. ERK1/2 i	<0,001
TNF-α vs. P38 i	<0,001
TNF-α vs. JNK i	<0,001
ERK1/2 i vs. UT	0,012
P38 i vs. UT	0,006
JNK vs. UT	0,003

**B) ADAMTS 4 expression - Ps**



Gruplar	P değeri
TNF-α vs. UT	NS
TNF-α vs. ERK1/2 i	NS
TNF-α vs. P38 i	<0,001
TNF-α vs. JNK i	0,001
ERK1/2 i vs. UT	NS
P38 i vs. UT	<0,001
JNK vs. UT	0,003

**C) ADAMTS 4 expression - PsA**



Gruplar	P değeri
TNF-α vs. UT	0,003
TNF-α vs. ERK1/2 i	NS
TNF-α vs. P38 i	0,01
TNF-α vs. JNK i	0,004
ERK1/2 i vs. UT	0,03
P38 i vs. UT	<0,001
JNK vs. UT	<0,001

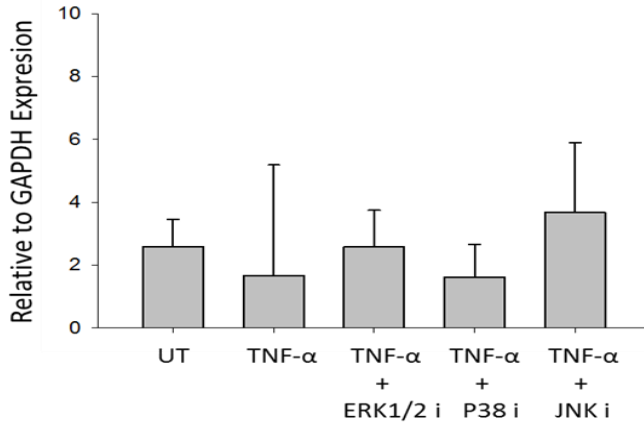
**Şekil 4.2.2 :** İnhibitör (ERK1/2 i, p38 i ve JNK i) ve TNF-α uygulaması yapılmış olan PBMC hücrelerinde ADAMTS4' ün mRNA ekspresyon düzeyi ve istatistiksel verileri (n:15).

Kontrol grubunda, TNF- $\alpha$  uyarılmasının ADAMTS5 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalışa neden olduğu saptanmıştır. Ancak, ERK1/2 ve p38 inhibisyonlarının TNF- $\alpha$ ' nın ADAMTS5 geni üzerindeki baskılayıcı etkisini değiştirmediği, JNK inhibisyonunun ise TNF- $\alpha$ ' nın ADAMTS5 gen ekspresyonu üzerindeki baskılayıcı etkisini ortadan kaldırdığı görülmüstür (**şekil-4.2.3 A**).

Ps grubunda, hem TNF- $\alpha$  stimlasyonu hemde p38 inhibisyonu ADAMTS5 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişime neden olmamıştır. Ancak, TNF- $\alpha$  uyarımına yanıt olarak ADAMTS5 gen ekspresyon düzeyinde ERK1/2 ve JNK inhibisyonları sonucu anlamlı bir azalma olduğu görülmüstür (**şekil-4.2.3 B**).

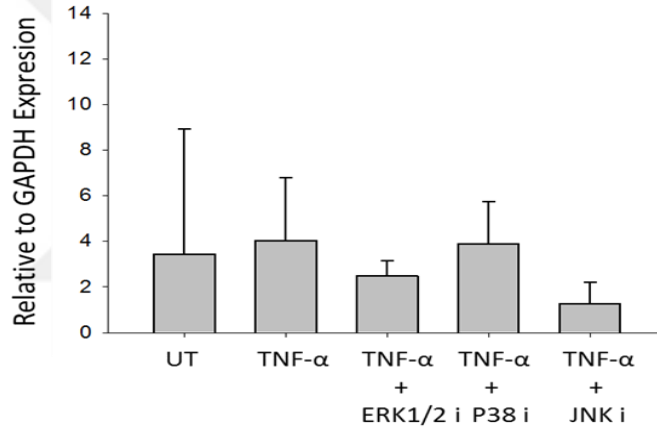
PsA grubunda, TNF- $\alpha$  stimlasyonunun ADAMTS5 gen ekspresyonunda önemli bir azalışa neden olduğu görülmüstür. Fakat, TNF- $\alpha$ ' nın ADAMTS5 geni üzerindeki baskılayıcı etkisinin ERK1/2, p38, JNK inhibisyonlarından etkilenmediği gözlenmiştir (**şekil-4.2.3 C**).

**A) ADAMTS 5 expression - Control**



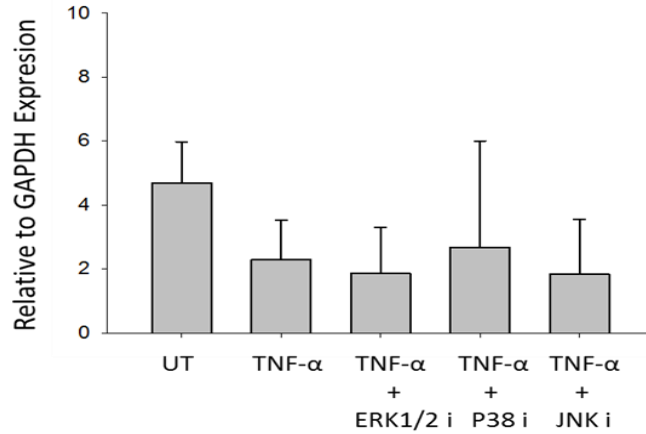
Gruplar	P değeri
TNF-α vs. UT	0,016
TNF-α vs. ERK1/2 i	NS
TNF-α vs. P38 i	NS
TNF-α vs. JNK i	0,036
ERK1/2 i vs. UT	NS
P38 i vs. UT	NS
JNK vs. UT	0,020

**B) ADAMTS 5 expression - Ps**



Gruplar	P değeri
TNF-α vs. UT	NS
TNF-α vs. ERK1/2 i	0,043
TNF-α vs. P38 i	NS
TNF-α vs. JNK i	0,002
ERK1/2 i vs. UT	0,014
P38 i vs. UT	NS
JNK vs. UT	<0,001

**C) ADAMTS 5 expression - PsA**



Gruplar	P değeri
TNF-α vs. UT	0,040
TNF-α vs. ERK1/2 i	NS
TNF-α vs. P38 i	NS
TNF-α vs. JNK i	NS
ERK1/2 i vs. UT	0,008
P38 i vs. UT	NS
JNK vs. UT	0,009

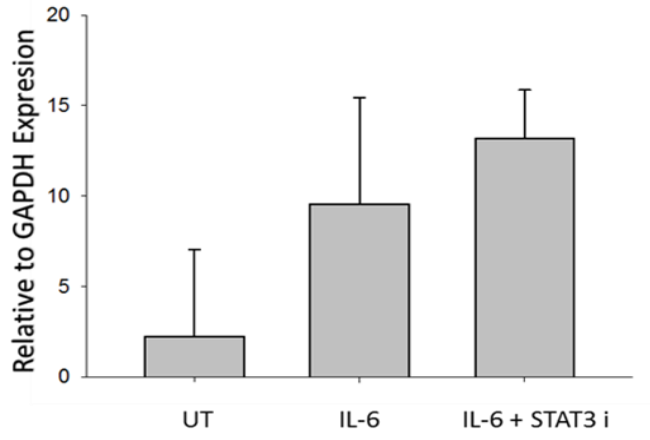
**Şekil 4.2.3 :** İnhibitör (ERK1/2 i, p38 i ve JNK i) ve TNF-α uygulaması yapılmış olan PBMC hücrelerinde ADAMTS5' in mRNA ekspresyon düzeyi ve istatistiksel verileri (n:15).

Sağlıklı, Ps' li ve PsA' lı bireylerden elde edilen PBMC hücreleri STAT3 spesifik inhibitörü (10 µM) ile 2 saat muamele edildikten sonra IL-6 (100 ng/ml) ile 24 saat stimule edildi ve ADAMTS1, -4 ve -5 gen ekspresyon düzeyleri qPCR ile analiz edildi.

Kontrol ve Ps gruplarında, IL-6 stimülasyonu sonucu ADAMTS1 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana geldiği görülmüştür. Ancak, STAT3 inhibisyonu sonucunda IL-6 ile indüklenen ADAMTS1 gen ekspresyon düzeyinde bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir (**Şekil-4.2.4 A, B**).

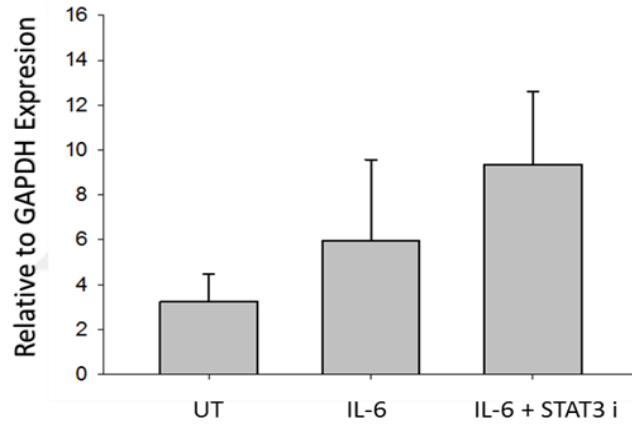
PsA grubunda, IL-6 stimülasyonunun ADAMTS1 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olduğu bulunmuştur. IL-6' nın ADAMTS1 geni üzerindeki baskılayıcı etkisinin STAT3 inhibisyonundan etkilenmediği gözlenmiştir (**Şekil-4.2.4 C**).

**A)** ADAMTS 1 expression - Control



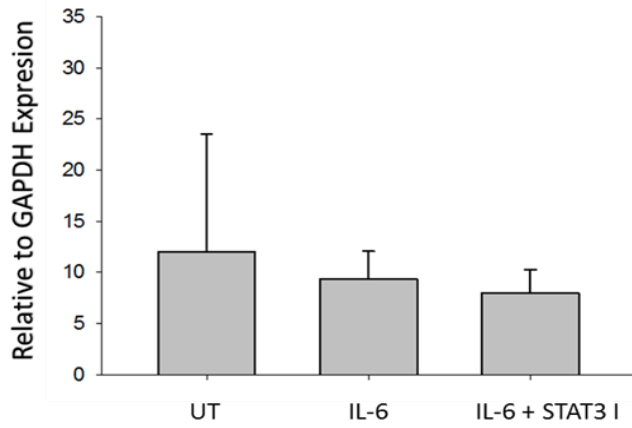
Gruplar	P değeri
UT vs. IL-6	<0,001
UT vs. STAT3 i	<0,001
STAT3 i vs. IL-6	NS

**B)** ADAMTS 1 expression - Ps



Gruplar	P değeri
UT vs. IL-6	0,002
UT vs. STAT3 i	<0,001
STAT3 i vs. IL-6	NS

**C)** ADAMTS 1 expression - PsA



Gruplar	P değeri
UT vs. IL-6	0,014
UT vs. STAT3 i	0,004
STAT3 i vs. IL-6	NS

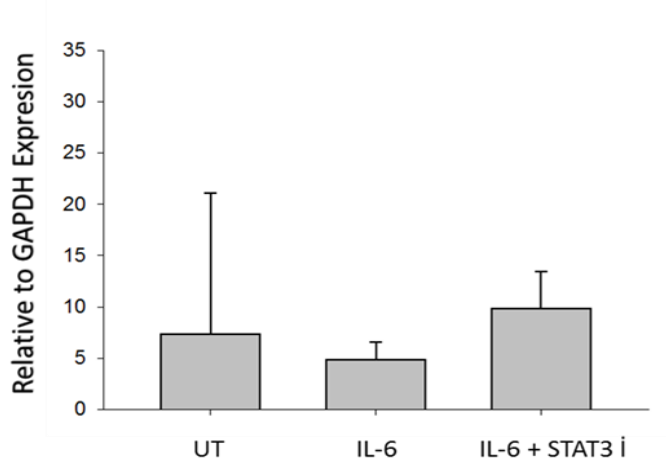
**Şekil 4.2.4 :** İnhibitör (STAT3 i) ve IL-6 uygulaması yapılmış olan PBMC hücrelerinde ADAMTS1' in mRNA ekspresyon düzeyi ve istatistiksel analizi (n:15).

Kontrol grubunda, IL-6 stimölasyonu ADAMTS4 gen ekspresyonunda anlamlı bir azalışa neden olmuştur. Ancak, STAT3 inhibisyonu IL-6' nın ADAMTS4 gen ekspresyonu üzerindeki baskılayıcı etkisini ortadan kaldırmıştır (**Şekil-4.2.5 A**).

Ps grubunda, IL-6 uyarılmasının ADAMTS4 gen ekspresyonunda anlamlı bir azalışa neden olduğu bulunmuştur. Fakat, STAT3 inhibisyonunun IL-6' nın ADAMTS4 gen ekspresyonu üzerindeki baskılayıcı etkisini ortadan kaldırdığı görölmüştür (**Şekil-4.2.5 B**).

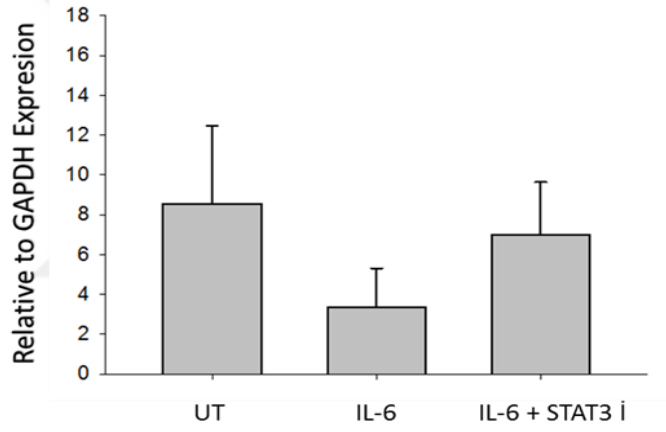
PsA grubunda, IL-6 stimölasyonunun ADAMTS4 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalışa neden olduğu tespit edilmiştir. Ancak, IL-6' nın ADAMTS4 gen ekspresyonu üzerindeki baskılayıcı etkisi STAT3 inhibisyonu sonucunda ortadan kalkmıştır (**Şekil-4.2.5 C**).

**A)** ADAMTS 4 expression - Control



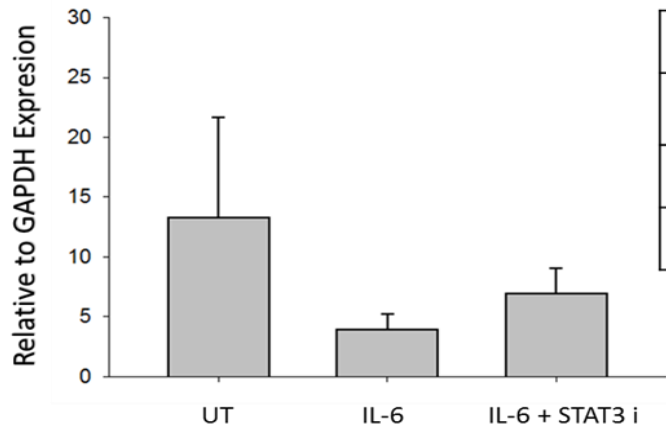
Gruplar	P değeri
UT vs. IL-6	0,023
UT vs. STAT3 i	NS
STAT3 i vs. IL-6	0,009

**B)** ADAMTS 4 expression - Ps



Gruplar	P değeri
UT vs. IL-6	0,003
UT vs. STAT3 i	NS
STAT3 i vs. IL-6	0,014

**C)** ADAMTS 4 expression - PsA



Gruplar	P değeri
UT vs. IL-6	<0,001
UT vs. STAT3 i	<0,001
STAT3 i vs. IL-6	0,034

**Şekil 4.2.5 :** İnhibitör (STAT3 i) ve IL-6 uygulaması yapılmış olan PBMC hücrelerinde ADAMTS4' ün mRNA ekspresyon düzeyi ve istatistiksel analizi (n:15).

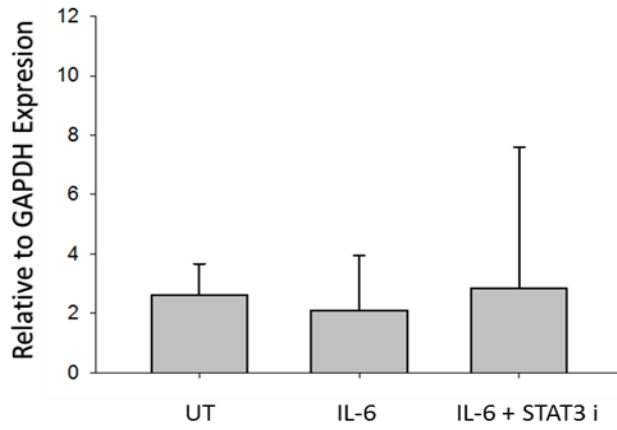


Kontrol grubunda, hem IL-6 stimölasyonu hemde STAT3 inhibisyonu ADAMTS5 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişime neden olmamıştır (**Şekil-4.2.6 A**).

Ps grubunda, IL-6 stimölasyonunun ADAMTS5 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalışa neden olduğu bulunmuştur. Ancak, IL-6' nın ADAMTS5 geni üzerindeki baskılayıcı etkisinin STAT3 inhibisyonundan etkilenmediği gözlenmiştir (**Şekil-4.2.6 B**).

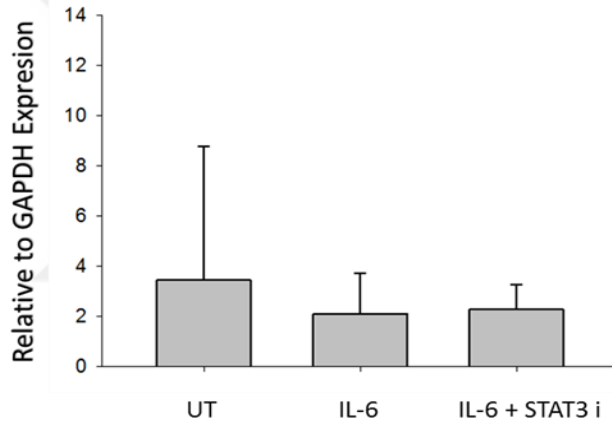
PsA grubunda, IL-6 uyarılmasının ADAMTS5 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Fakat, STAT3 inhibisyonunun IL-6' nın ADAMTS5 geni üzerindeki baskılayıcı etkisini değiştirmediği görölmüştür (**Şekil-4.2.6 C**).

**A)** ADAMTS 5 expression - Control



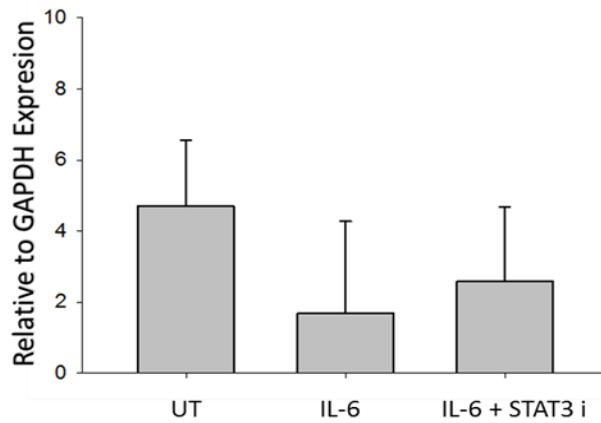
Gruplar	P değeri
UT vs. IL-6	NS
UT vs. STAT3 i	NS
STAT3 i vs. IL-6	NS

**B)** ADAMTS 5 expression - Ps



Gruplar	P değeri
UT vs. IL-6	0,008
UT vs. STAT3 i	0,006
STAT3 i vs. IL-6	NS

**C)** ADAMTS 5 expression - PsA



Gruplar	P değeri
UT vs. IL-6	0,030
UT vs. STAT3 i	NS
STAT3 i vs. IL-6	NS

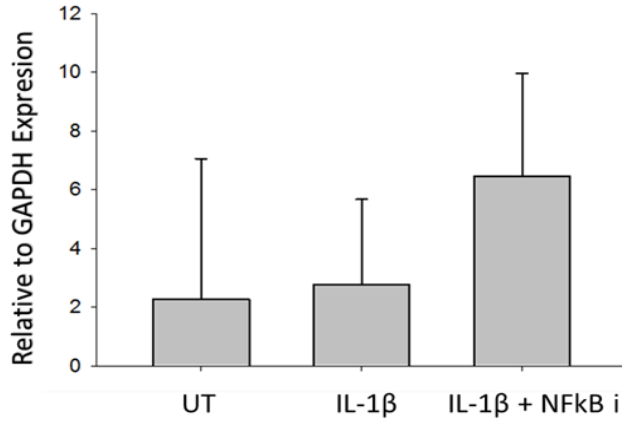
**Şekil 4.2.6 :** İnhibitör (STAT3 i) ve IL-6 uygulaması yapılmış olan PBMC hücrelerinde ADAMTS5' in mRNA ekspresyon düzeyi ve istatistiksel analizi (n:15).

Sağlıklı, Ps' li ve PsA' lı bireylerden elde edilen PBMC hücreleri NFκB spesifik inhibitörü (10 μM) ile 2 saat muamele edildikten sonra IL-1β (20 ng/ml) ile 24 saat stimule edildi ve ADAMTS1,4 ve 5 gen ekspresyon düzeyleri qPCR ile analiz edildi.

Kontrol ve Ps gruplarında, IL-1β stimülasyonu ADAMTS1 gen ekspresyonunda anlamlı bir değişime neden olmamıştır. Ancak, NFκB inhibisyonu sonucunda IL-1β stimülasyonuna yanıt olarak ADAMTS1 gen ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir (**Şekil-4.2.7 A, B**).

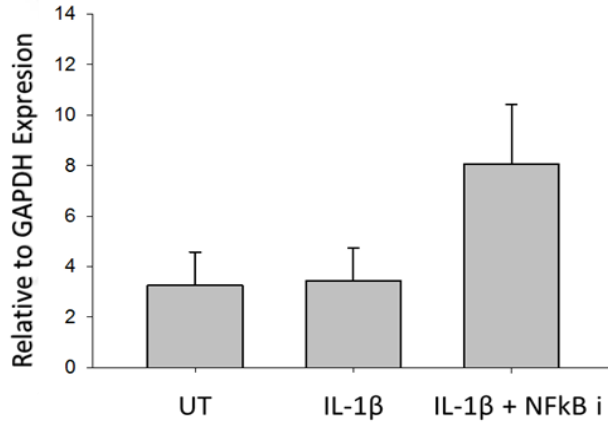
PsA grubunda, IL-1β stimülasyonu ADAMTS1 gen ekspresyonunda anlamlı bir azalışa neden olmuştur. Ancak, IL-1β' nin ADAMTS1 gen ekspresyonu üzerindeki baskılayıcı etksi NFκB inhibisyonu tarafından ortadan kaldırılmıştır (**Şekil-4.2.7 C**).

**A)** ADAMTS 1 expression - Control



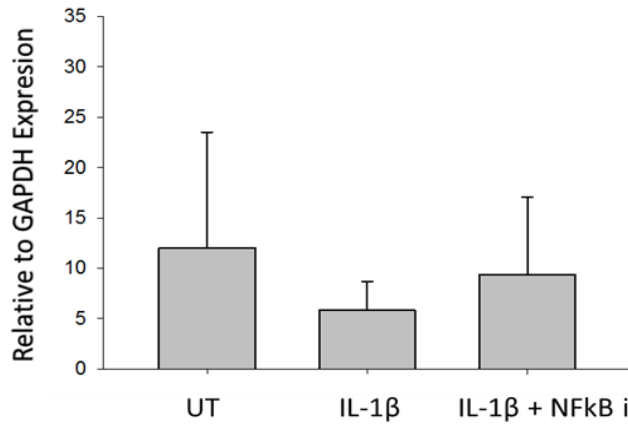
Gruplar	P değeri
UT vs. IL-1 $\beta$	NS
UT vs. NF $\kappa$ B i	0,008
NF $\kappa$ B i vs. IL-1 $\beta$	0,002

**B)** ADAMTS 1 expression - Ps



Gruplar	P değeri
UT vs. IL-1 $\beta$	NS
UT vs. NF $\kappa$ B i	<0,001
NF $\kappa$ B i vs. IL-1 $\beta$	<0,001

**C)** ADAMTS 1 expression - PsA



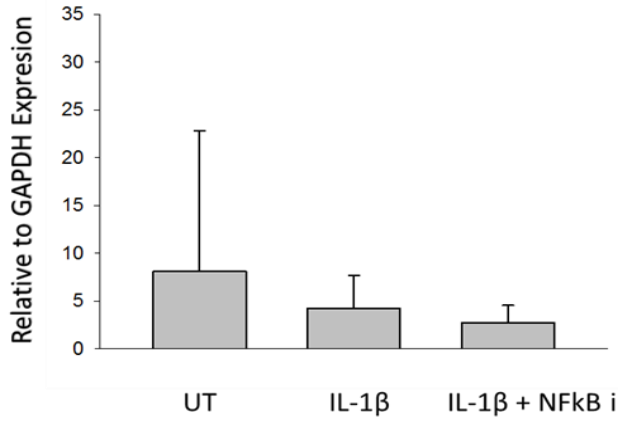
Gruplar	P değeri
UT vs. IL-1 $\beta$	<0,001
UT vs. NF $\kappa$ B i	NS
NF $\kappa$ B i vs. IL-1 $\beta$	0,023

**Şekil 4.2.7 :** İnhibitör (NF $\kappa$ B i) ve IL-1 $\beta$  uygulaması yapılmış olan PBMC hücrelerinde ADAMTS 1' in mRNA ekspresyon düzeyi ve istatistiksel verileri (n:15).

Kontrol, Ps ve PsA gruplarında, IL-1 $\beta$  uyarılmasının ADAMTS4 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalışa neden olduğu saptanmıştır. Ancak, NF $\kappa$ B inhibisyonunun IL-1 $\beta$ ' nın ADAMTS4 geni üzerindeki baskılayıcı etkisini değiştirmediği gözlenmiştir (**Şekil-4.2.8 A, B, C**).

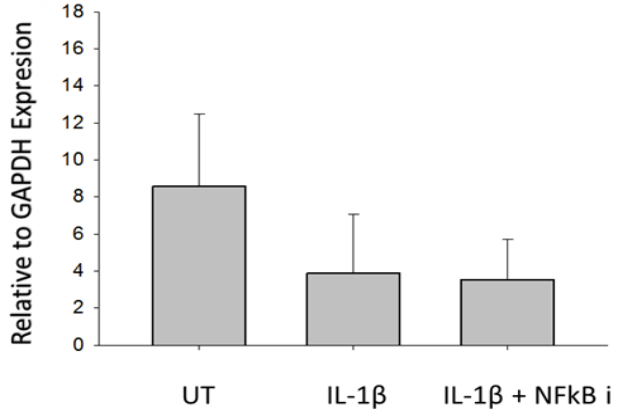


**A)** ADAMTS 4 expression - Control



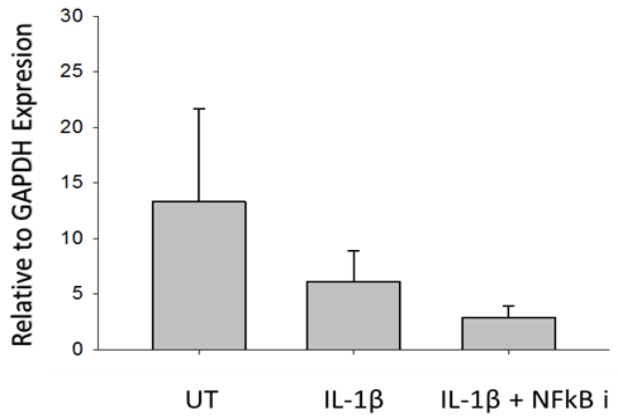
Gruplar	P değeri
UT vs. IL-1β	0,005
UT vs. NFκB i	<0,001
NFκB i vs. IL-1β	NS

**B)** ADAMTS 4 expression - Ps



Gruplar	P değeri
UT vs. IL-1β	0,01
UT vs. NFκB i	0,003
NFκB i vs. IL-1β	NS

**C)** ADAMTS 4 expression - PsA



Gruplar	P değeri
UT vs. IL-1β	<0,001
UT vs. NFκB i	<0,001
NFκB i vs. IL-1β	NS

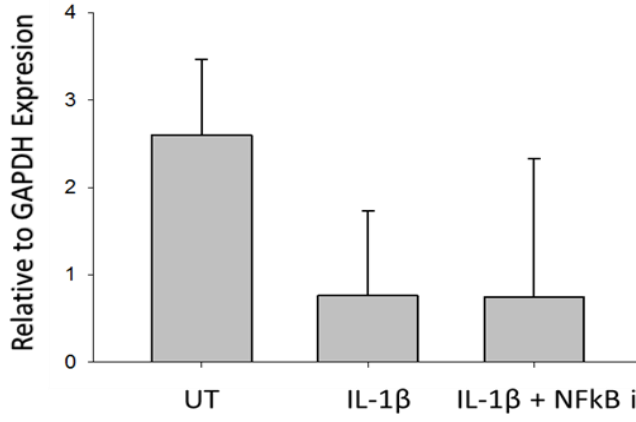
**Şekil 4.2.8 :** İnhibitör (NFκB i) ve IL-1β uygulaması yapılmış olan PBMC hücrelerinde ADAMTS4' ün mRNA ekspresyon düzeyi ve istatistiksel verileri (n:15).

Kontrol ve Ps gruplarında, IL-1 $\beta$  stimölasyonu ADAMTS5 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalışa neden olmuştur. Ancak, NF $\kappa$ B inhibisyonunun IL-1 $\beta$ ' nın ADAMTS5 geni üzerindeki baskılayıcı etkisini değiştirmedeği gözlenmiştir (**Şekil-4.2.9 A, B**).

PsA grubunda, hem IL-1 $\beta$  stimölasyonu hemde NF $\kappa$ B inhibisyonu ADAMTS5 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişime neden olmamıştır (**Şekil-4.2.9 C**).

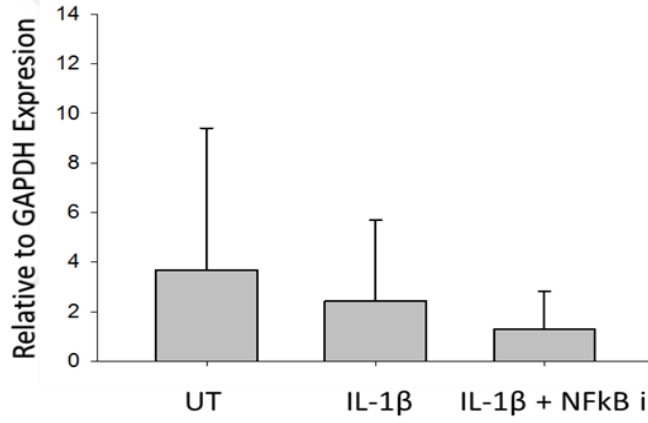


**A)** ADAMTS 5 expression - Control



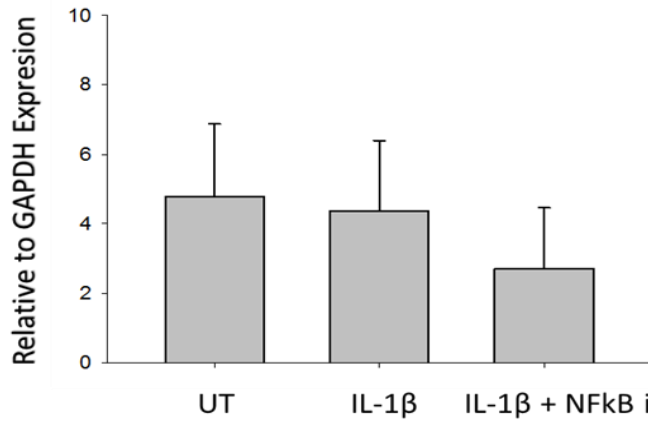
Gruplar	P değeri
UT vs. IL-1β	<0,001
UT vs. NFκB i	0,002
NFκB i vs. IL-1β	NS

**B)** ADAMTS 5 expression - Ps



Gruplar	P değeri
UT vs. IL-1β	0,009
UT vs. NFκB i	0,002
NFκB i vs. IL-1β	NS

**C)** ADAMTS 5 expression - PsA



Gruplar	P değeri
UT vs. IL-1β	NS
UT vs. NFκB i	0,013
NFκB i vs. IL-1β	NS

**Şekil 4.2.9 :** İnhibitör (NFκB i) ve IL-1β uygulaması yapılmış olan PBMC hücrelerinde ADAMTS5' in mRNA ekspresyon düzeyi ve istatistiksel verileri (n:15).



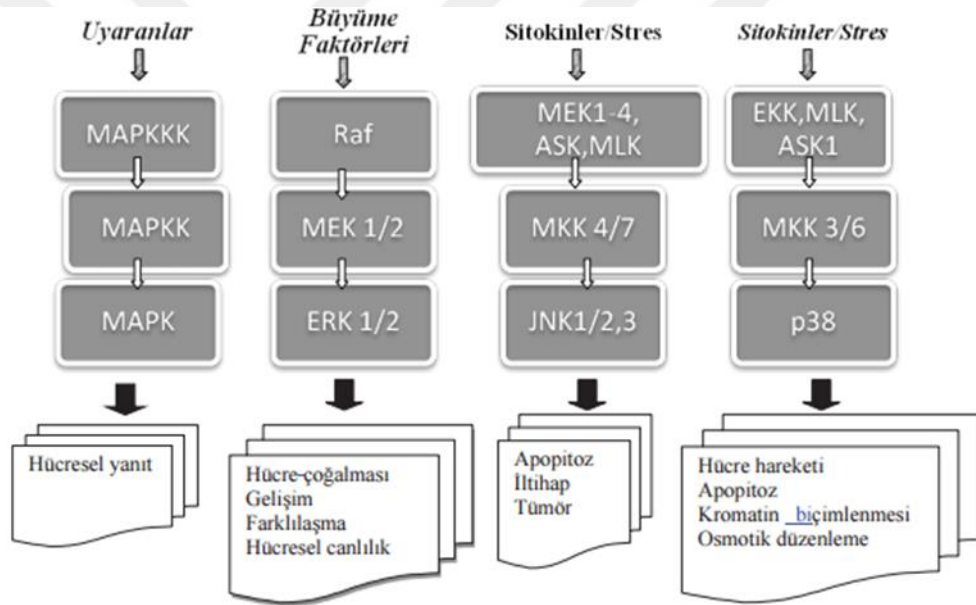
## 5. TARTIŞMA

Psoriasis ile ilişkili olan PsA hem deri hem de omurga, periferal eklemler ve entesitleri etkileyen kronik, inflamatuvar bir hastalıktır (1). PsA genellikle 40 ile 50 yaşları arasında meydana geldiği gibi genç çocuklarda ve yaşlı hastalarda da meydana gelebilmektedir (26). PsA' nın klinik skalası geniştir; psoriatik hastalar aksiyel iskelet bozuklukları, tırnak değişiklikleri, periferal eklem iltihaplanması, entezis, tenosinovit yada daktilitis' e sahip olabilirler. Enfeksiyon (örneğin; streptococcus, insan bağışıklık yetmezliği virüsü), ilaç kullanımı, özellikle çocuklarda görülen eklem travmaları gibi çevresel faktörlerin PsA' ya katkı yaptığı bilinmektedir (111,112). PsA' nın patogenizi tam olarak bilinmediği için günümüzde kesin bir tedavisi yoktur. PsA' nın patogenezinin tam olarak anlaşılabilmesi ve yeni terapötiklerin geliştirilmesi için artikular kıkırdak dejenerasyonuna yol açan inflamatuvar sinyal yollarındaki mediyatörlerin rollerinin ve izlemiş oldukları moleküler mekanizmaların ortaya çıkartılması büyük önem taşımaktadır.

ADAMTS' ler ekstrasellular proteaz ailesini oluşturmaktadırlar. ADAMTS proteazları membrana bağlı olmadan salgılanan enzimlerdir ve prokollojen, hiyalaktan, kıkırdak oligomerik matriks protein gibi ECM bileşenleri ile etkileşime girerek bu proteinlerin degradasyonunu gerçekleştirirler. ADAMTS proteazları gelişimsel regülasyon, inflamasyon, hücre adezyonu, hücre sinyali ve angiogenesis gibi bir çok farklı fizyolojik prosese katkıda bulunmaktadır. Bu proteazlar astım, artrit, kanser ve aterosklerosis gibi birçok yaygın hastalığın fizyopatolojisinde önemli görevler üstlenmektedirler (62). Bazı ADAMTS' ler (-1, -4, -5, -8, -9, -15, -16 ) kıkırdağın ana bileşeni olan agrekan proteoglikanını enzimatik kesme özelliğine sahiptirler (63). Agrekanı kesip parçaladıklarından dolayı bu grup agrekanazlar olarak adlandırılmaktadır. Ancak, ADAMTS 1, -8, -9, 15 ve -16' nın agrekanaz ekspresyonu yada sindirim aktivitesi oldukça düşük olduğundan dolayı ADAMTS 4 ve -5 iki ana fonksiyonel agrekanaz olarak belirlenmiştir (113).

Tüm ökaryotik hücrelerde bulunan MAPK enzimleri, hücrelerde sinyal iletiminde görev alan farklı reseptörler aracılığıyla oluşan uyarıların kesişme yada birleşme noktalarıdır (114). Sitoplazmada bulunan bu proteinler hücre zarından çekirdeğe doğru bilgi aktarılmasında ve hücre içindeki diğer proteinlerin, serin (Ser)/

treonin (Thr) amino asitlerine fosfat gruplarını aktararak etkinliklerini düzenlemede görev almaktadırlar. İnsan genomunda 14 MAPK geni ve 7 farklı MAPK sinyal iletimi yolağı olduğu ifade edilmiştir (115-117). MAPK ailesinin; gen ekspresyonu, hücre bölünmesi, hücre canlılığı, apoptoz, metabolizma, farklılaşma ve motiliteyle ilişkili süreçlerin kontrolündeki sinyal iletimi yollarını meydana getirdikleri öne sürülmüştür. MAPK ailesi, klasik MAPK' lar olarak isimlendirilen dış sinyal düzenleyici kinaz (ERK)1/2, c-Jun N-terminal kinaz (JNK)' lar, p38 MAPK' lar ve ERK5 ile atipik MAPK' lar olarak bilinen ERK3, ERK4, nemo benzeri kinaz (NLK) ve ERK7 MAPK' larını içermektedir (115). Çalışmamızda sinyal iletiminde görev alan ve klasik MAPK grubunda yer alan ERK1/2 , p38 ve JNK yollarına yer verdik.



**Şekil 5.1 :** MAPK (ERK1/2, JNK1/2,3, p38) yolağı.

Genlerin transkripsiyonunu düzenlemek için DNA üzerinde belli dizilere bağlanan STAT (Sinyal transducer and activator of transcription) proteinleri, sitokin bağımlı gen ekspresyonunda, immün yanıt ve çeşitli hücre fonksiyonlarını (büyüme, farklılaşma ve hayatta kalma) düzenlemede görev alırlar. STAT' lar Janus kinaz (JAK), tarafından aktive olup ve tirozin fosforilasyonu yaparlar (116). Bu güne kadar belirlenmiş toplam 7 tane STAT proteini mevcuttur: STAT-1, STAT-2, STAT-3, STAT-4, STAT-5a, STAT-5b ve STAT-6 (117). Bu proteinlerden biri olan STAT3'

ün, hücre büyümesinin düzenlenmesinde, derinin yeniden şekillenmesinde, keratinosit göçünde, makrofaj inaktivasyonunda, IL-6' ya bağımlı karaciğer rejenerasyonunda, hücresel transformasyonda, epitelial hücrelerin apoptozunda ve T-helper hücre cevabında oluşan inflamatuvar sitokinlerin downregülasyonunda rol aldığı belirtilmiştir (118-120).

Transkripsiyon faktörü olan NFκB apoptozis ve inflamasyon gibi patolojik olaylarda genlerin regülasyonu ile ilgili olan dimerik transkripsiyon faktörüdür (121,122). NFκB inflamasyon, immün cevap, hücre büyümesi, kanser, ateroskleroz, diyabet ve bazı viral genlerin ekspresyonunu içeren birçok fizyolojik işlem ve hastalıkla ilişkilendirilmiştir (123,124). NFκB 150' den fazla farklı hücre dışı uyarılarla (bakteriler, virüsler, interlökinler, büyüme faktörleri, kemoterapötik ajanlar, çeşitli fizyolojik, fiziksel ve oksidatif uyarılar vb.) indüklenmektedir. NFκB ayrıca 150' den fazla hedef genin (sitokinler, kemokinler, interlökinler, immünglobulinler, akut faz proteinleri, hücre adhezyon molekülleri, hücre proliferasyonu, anti-apoptoz, hücre migrasyonu ve anjiyogenezle ilişkili) ekspresyonunu düzenlemektedir (125). NFκB beş üyeden oluşmaktadır (p65/RelA, RelB, c-Rel, NF-κB1/p50 and NFκB/p52) (126).

Pro-inflamatuar sitokinlerin fazladan üretimi inflamatuvar hastalıkların patogenezinde ve progresyonunda önemli rol oynamaktadır. PsA' da kıkırdak dejenerasyonu ile ilişkili olan patofizyolojik, moleküler ve biyokimyasal mekanizmaları anlamak yeni potansiyel terapötiklerin gelişmesine olanak sağlayabilecektir. Bildiğimiz kadarıyla, literatürde ADAMTS1,-4 ve -5 genlerinin PsA patogenezindeki rolü için yapılmış spesifik çalışmalar bulunmamaktadır, bu nedenle çalışmamız ADAMTS1,-4 ve -5 genlerinin PsA patogenezinde bir rolü olup olmadığını araştıran ilk çalışmadır. Çalışmamızda RA ve OA' da ECM degradasyonunu gerçekleştirerek eklem yıkımında önemli rolleri olduğu rapor edilen ADAMTS proteazlardan ADAMTS1, -4, -5' in Ps ile ilişkili kronik inflamatuvar bir artrit türevi olan PsA patogenezindeki rollerini ve pro-inflamatuar sinyal yollarındaki moleküler mekanizmalarını araştırmayı amaçladık.

Western Blot analizlerimizde PBMC hücrelerinin stimülantlara (TNF-α, IL-6, IL-1β) ve inhibitörlere (ERK1/2, p38, JNK, STAT3, NFκB) karşı yanıtı gösterildi.

Western Blot sonuçlarımıza göre ERK1/2, JNK, p38, STAT3 ve NFκB fosforilasyonlarının kullanılan spesifik inhibitörler ile baskılandığı görüldü ve bu baskılanma RT-PCR çalışmamızda kullandığımız inhibisyon ve uyarılma mekanizmalarının işlerliğine kanıt oluşturmaktadır.

Little ve arkadaşları ADAMTS1' in devre dışı bırakılmasının hayvanları deneysel artritlen kurtarmadığını göstermişlerdir (127). 2002 yılında Malfait ve arkadaşlarının yaptıkları bir hayvan çalışmasında ADAMTS4 ve ADAMTS5 enzimlerinin agrekanaz enzim aktivitesinin olduğunu, kıkırdak dokusunda bu genlere ait mRNA ve protein örneklerini ve eklem sıvısında ise agrekan yıkım ürünlerini göstererek kanıtlamışlardır (128). Yine hayvan modellerinde, ex vivo ortamda yapılan çalışmalarda ADAMTS4 ve ADAMTS5 genlerinin silinmesinin, hayvanlarda proteoglikan yıkımını önlediği ve OA şiddetini azalttığı gösterilmiştir. 2005 yılında Glasson ve arkadaşlarının yaptıkları bir hayvan çalışmasında, öncelikle genetik olarak modifiye edilmiş farelerin ADAMTS5 (agrekanaz-2)' inin katalitik kısmı silinmiş ve cerrahi olarak dizlerinde instabilite oluşturulmuştur. Modifiye edilmiş hayvanlarda kontrol grubuna kıyasla kıkırdak bozulmasının şiddetinin anlamlı olarak azaldığı rapor edilmiştir (129,130). Çalışmamızda, PsA' da ADAMTS1 ve -4 ekspresyonunun Ps ve kontrol gruplarına kıyasla anlamlı bir artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Önceki çalışmalarda, ADAMTS1 ve 4 ekspresyon düzeylerinin OA ve RA'de artış gösterdiği ve kıkırdak yıkımındaki rolleri bildirilmiştir (131). Sonucumuz literatürle uyumlu olup, ADAMTS1 ve -4 genlerinin PsA hastalığında ECM yıkımında etkin agrekanazlar olabileceğini önermektedir. ADAMTS5 ekspresyonunun arttırıtların genelinde artığı bildirilmiştir. Ancak bizim çalışmamızda anlamlı değişim elde edemememizin nedeni diğer çalışmalarda kullanılan sinovial sıvı, kıkırdak gibi materyallerden farklı olarak PBMC düzeyinde çalışmamızdan kaynaklı olabilmektedir.

Sağlıklı kıkırdak dokusunda, OA' lı kıkırdak dokusunda ve kültüre edilmiş artiküler kondrositlerde bulunan ADAMTS1 ekspresyon düzeyleri üzerinde IL-1β ve insülin benzeri büyüme faktörü-1' in (IGF-1) etkisinin araştırıldığı bir çalışmada; IL-1β uygulanan örneklerde ADAMTS1' in protein ekspresyonunun azaldığı, IGF-1 uygulanan örneklerde ise ADAMTS1' in ekspresyon düzeyinde anlamlı değişiklikler meydana gelmediği ifade edilmiştir (132). Yapılan diğer bir çalışmada; OUMS-27

kondrositoma hücrelerinden ve osteoartritlik eklemlerden temin edilen insan kondrositlerine IL-1 $\beta$  yada TNF- $\alpha$  eklendiğinde, IL-1 $\beta$ ' nın ADAMTS4, ADAMTS5 ve ADAMTS9 mRNA seviyelerini arttırdığı, ADAMTS1 ve ADAMTS8 seviyelerini değiştirmediği, IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$ ' nın beraber kullanımında ise özellikle ADAMTS9 mRNA seviyelerinin sinerjistik olarak arttığı gösterilmiştir (133). Pro-inflamatuar bir sitokin olan IL-1, hamilelik gelişimi süresince oldukça kritik bir basamak olan ekstrasellüler matriksin proteolitik degradasyonunu ilerletirken, anti-inflamatuar bir sitokin olan TGF- $\beta$ 1 ise bu etkiyi dengeleyici bir rol oynamaktadır. Bu sonuç doğrultusunda Hunt Ng ve arkadaşları (134), her iki sitokinin inflamasyon ile ilişkili bir protein olan ADAMTS1' in insan desidual stroma hücrelerindeki ekspresyonuna etkisini in vitro olarak araştırmışlardır. Çalışma sonunda IL-1 $\beta$ ' nın ADAMTS1' in mRNA ve protein seviyelerinde artış sağladığını, TGF- $\beta$ 1' in ise azalışa neden olduğunu ve bu gerçekleşen değişimlerin konsantrasyon ve doza dayalı olarak meydana geldiğini belirtmişlerdir. Birçok alışmada Ps ve PsA' nın patofizyolojisinde inflamasyon ile IL-1, IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$ , ve TNF- $\alpha$  gibi sitokinler arasındaki ilişki gösterilmiştir. T-lenfosit ve makrofajlarda üretilen TNF- $\alpha$ ' nın IL-1 ve TNF- $\alpha$ ' ya sinerjik etki yaptığını bildirilmiştir (24). Çalışmalarda görüldüğü gibi TNF- $\alpha$ , IL-6 ve IL-1 $\beta$ ' nın artiritli hastalardaki etkinliği için çelişkili sonuçlar mevcuttur. Çalışmamızda PsA' lı bireylerin PBMC hücrelerinde şimdiye kadar çalışılmamış pro-inflamatuar sitokinler olan TNF- $\alpha$ , IL-6 ve IL-1 $\beta$ ' nın ADAMTS1 gen ekspresyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir. TNF- $\alpha$ , IL-6 ve IL-1 $\beta$  uyarılması yapılmış PBMC hücrelerinde ADAMTS1 gen ekspresyonunun PsA grubunda azaldığı elde edilmiştir. Bu bulgular TNF- $\alpha$ , IL-6 ve IL-1 $\beta$  uyarılmalarının ADAMTS1 agrekanaz aktivitesine baskılayıcı etkileri olabileceğini düşündürmektedir.

Diğer bir çalışmada insan makrofajlarında ADAMTS1,-4 ve -5' in ekspresyonları üzerinde IL-33' ün etkisini inceleyen Tim G. Ashlin ve arkadaşları ADAMTS1,-4 ve -5' in ST2 resptörü aracılığıyla IL-33 tarafından inhibe edildiğini elde etmişlerdir. IL-33' ün ADAMTS1 ve -4' ün inhibisyonu için ERK1/2 ve JNK/c-Jun' a ihtiyaç duyulurken, p38' e gereksinim duyulmadığını öne sürmüşlerdir. ADAMTS5 inhibisyonu için ise bu proteinlerin etkinliği ortaya konmamıştır (135). Çalışmamızda PBMC hücrelerinde MAPK (ERK1/2, p38 ve JNK) yolaklarının

inhibisyonu ile TNF- $\alpha$ 'nın indüklediği ADAMTS1, -4, -5 gen ekspresyonları üzerindeki etkinliği incelenmiştir. Bunun sonucunda PsA grubunda ADAMTS1 ekspresyonu ERK1/2 inhibisyonu ile artarken JNK ve p38 inhibisyonlarıyla azalmıştır. ADAMTS1 ekspresyonu için JNK ve p38 proteinleri tetikleyici etki gösterirken, ERK proteininin ise baskılayıcı etki gösterdiği öngürülebilir. ADAMTS4 ekspresyonu için kontrol, Ps ve PsA gruplarının tamamında ERK1/2, p38 ve JNK'nin üçüne de ihtiyaç duyulduğu elde edilmiştir. Bu durum ADAMTS4 enzim aktivitesinde MAPK yollarının önemli olabileceğini göstermektedir. ADAMTS5 ekspresyonu Ps ve PsA gruplarında ERK1/2 ve JNK inhibisyonlarıyla azalmıştır. ADAMTS5 gen aktivitesinde ERK1/2 ve JNK önemli tetikleyiciler olabilir. Ayrıca sağlıklı bireylerin ADAMTS1 ve -5 ekspresyonları JNK inhibisyonu ile ciddi şekilde artmaktadır, bu sebeple JNK proteini sağlıklı bireylerde agrekanaz etkinliğinin baskılanmasında önemli bir engel olabilir.

ADAMTS4 ve -5 en iyi karakterize edilmiş ve en yüksek agrekanaz aktivite gösteren agrekanazlardır ve bu agrekanazlar OA ve RA'da kıkırdak degradasyonunda önemli rol oynamaktadır (128,136). Farede yapılan çalışmalar ADAMTS5 delesyonunun inflamatuvar artrit ve OA gelişmesine karşı koruduğunu göstermiştir (137). Yapılan bir diğer çalışmada ADAMTS4 ve ADAMTS5'in her ikisinin de sitokin uyarılmış normal dokularda ve OA kıkırdağında gözlenen ilerlemiş yıkımda agrekan kaybının önemli mediatörleri olduğu öne sürülmüştür (138). Bunun yanısıra, siRNA deneylerinde de insan kıkırdak agrekan degradasyonu için ADAMTS4 ve -5'in gerekli olduğu gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada, insan kondrosit ve kıkırdak örneklerinde ADAMTS4 ve ADAMTS5'in inhibitör etkisini değerlendirmek için siRNA kullanılmıştır. ADAMTS4 yada ADAMTS5'in bastırılması TNF- $\alpha$  ve oncostatin M'in kombinasyonu ile indüklenen agrekanın yıkılmasını önemli bir şekilde engellemeye neden olmuştur (139). Kültüre edilen sığır ve domuz kondrosit yada kıkırdak örnek modellerinde, IL-1, TNF- $\alpha$ , oncostatin M yada transforme edici büyüme faktörü  $\beta$  ile stimülasyon sonrasında ADAMTS4'ün indüklendiği, ancak ADAMTS5'in indüklenmediği elde edilmiştir (140-142). Yapılan yeni bir çalışmada ya IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  yada oncostatin M tedavisiyle ADAMTS4'ün gen ekspresyonu upregüle edilebilirken, insan kondrositleri yada kültür edilen insan kıkırdak örneklerinde ADAMTS5 üzerine etkisinin oldukça az

olduğu belirtilmiştir. Buna karşılık, bu sistemlerde ekstra bir etki olarak oncostatin M ile IL-1 $\beta$  yada TNF- $\alpha$  tedavisi ADAMTS4 gen ekspresyonunu hatta ADAMTS5 gen ekspresyonunu da indüklediği öne sürülmüştür (139). Pro-inflamatuar sitokinlerden IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$ 'nın ADAMTS4 ekspresyonunu upregüle ettiği gösterilmiştir (142,143). ADAMTS4 ve -5 gen ekspresyonun PsA grubunda IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$  uyarılması yapılmış hücrelerde azalış gösterdiği elde edilmiştir. Elde ettiğimiz bulgular literatürdekilerle ters düşmektedir ve farklılığın hastalığa bağlı nedenlerden yada diğer çalışmalarda kullanılan materyallerden farklı olarak PBMC hücreleriyle çalışmamızdan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Yakın bir zamanda yapılan bir çalışmada, pro-inflamatuar sitokin TNF- $\alpha$  ve IL- $\beta$ 'nin ADAMTS4 ekspresyonunu NF $\kappa$ B ve MAPK sinyal yollarını kullanarak regüle ettiği rapor edilmiştir (11). Bizim çalışmamızda ise TNF- $\alpha$ 'nın PBMC hücrelerinde ADAMTS4 gen ekspresyonunu kontrol grubunda artırdığı, Ps grubunda değiştirmedeği, PsA grubunda ise istatistiksel anlamda önemli bir azalışa neden olduğu saptanmıştır. Elde ettiğimiz bulgular literatürle uyumlu olup, diğer inflamatuvar hastalıklarda gözlemlendiği gibi PsA patogenezinde de ADAMTS4 enziminin artirit oluşumunda rol aldığı söylenebilir. Diğer bir sitokin olan IL-1 $\beta$  ile stimüle edilen PBMC hücrelerinde ADAMTS4 ekspresyonunun kontrol, Ps ve PsA gruplarının üçünde de istatistiksel anlamda önemli bir azalış gösterdiği elde edilmiştir. NF $\kappa$ B inhibisyonunun IL-1 $\beta$ 'nin ADAMTS4 gen ekspresyonundaki baskılayıcı etkisine bağlı olmaksızın her üç grupta da (kontrol, Ps, PsA) anlamlı bir azalışa neden olduğu tespit edilmiştir. PsA patogenezinde rol alan NF $\kappa$ B yolağının baskılanmasıyla majör agrekanaz olup eklem yıkımlarına neden olan ADAMTS4 proteazının aktivitesinin düşürülebileceğini göstermektedir.

Yapılan bir çalışmada diğer bir pro-inflamatuar sitokin olan IL-6'nın RA'lı hastaların fibroblast benzeri sinoviositlerinde ADAMTS4 ekspresyonunu indüklediği rapor edilmiştir. Ayrıca pro-inflamatuar sitokin olan IL-6'nın ADAMTS4 ve ADAMTS5'in ekspresyonunu STAT3'e bağımlı olarak upregüle ettiği ve STAT3 inhibitörü parthenolide'nin IL-6'nın ADAMTS4 ve ADAMTS5 ekspresyonu üzerindeki indükleyici etkiyi inhibe ettiği gösterilmiştir (144). Literatürde bulunan bu sonuçlar doğrultusunda bizim çalışmamızda da STAT3 inhibisyonunun IL-6'nın stimüle ettiği ADAMTS4 gen ekspresyonunda kontrol, Ps ve PsA gruplarında

upregüle olduğu, ADAMTS5 gen ekspresyonunun ise kontrol ve PsA gruplarında değişmediği bulunmuştur. Böylece PsA’ da IL-6 varlığında STAT3’ e bağlı olarak ADAMTS4 gen ekspresyonunun düzenlenebileceğini söyleyebiliriz.

Önceki çalışmalarda; IL-1 yada TNF- $\alpha$  ile uyarılan ADAMTS4’ ün upregülasyonunun güçlü bir şekilde NF $\kappa$ B bağımlı olduğu öne sürülmüştür. Ancak ADAMTS5 ekspresyonunun regülasyonunun herhangi bir kısmında NF $\kappa$ B’ nin rol oynayıp/oynamadığı bilinmemektedir (145-147). Çalışmamızda PsA grubunda IL-1 $\beta$  ile uyarılan ADAMTS5 geninin NF $\kappa$ B inhibisyonundan etkilenmediği gözlemlenmiştir. Bu bulgu ADAMTS5 ekspresyonunun IL-1 $\beta$  varlığında NF $\kappa$ B bağımlı olmadığı fikrini ön görmektedir.





## SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, ADAMTS1 gen ekspresyonunun PsA' lı bireylerde oldukça fazla olduğu RT-PCR sonucunda elde edilmiştir. ADAMTS1' in anti-anjiogenik özelliği, yara iyileşmelerinde rol alan sistemlerdeki baskılayıcı özelliği ve agrekanaz oluşu göz önüne alındığında Ps' li yada PsA' lı hastalarda cilt ve eklem inflamasyonlarına neden olduğunu ve bunun artışı sağladığı düşünülmektedir.

PsA'lı hastalarda, TNF- $\alpha$ , IL-6 ve IL-1 $\beta$  uyarılmalarının ADAMTS1 agrekanaz aktivitesine baskılayıcı etkileri olabileceği düşünülmektedir. MAPK ailesinden olan p38 ve JNK yolları yada inflamasyon ve immünite ile ilgili birçok genin transkripsiyonunu uyararak STAT3 yolağının baskılanması yoluyla ADAMTS1 gen ekspresyonunun düzenlenebileceği görülmektedir. Bilgimiz dahilinde, çalışmamız ADAMTS genlerinin (-1, -4 ve -5) PsA' daki rollerinin araştırıldığı ilk çalışma olduğu için PsA patogenezinde rol alan mediyatörler tarafından regüle edilebildiği görülen ADAMTS1 geninin PsA hastalarında daha detaylı araştırılan çalışmalarla desteklenmesi önerilebilir.

PsA patogenezinde IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$  pro-inflamatuvar sitokinleriyle uyarılan hücrelerde majör agrekanazlardan olan ADAMTS4 ve -5 ekspresyonlarının azalış gösterdiği tespit edildi. Bu bulgular literatür bilgileriyle çelişmektedir, bu sebeple elde ettiğimiz bulguların güçlendirilmesi için yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

PsA' lı hastalarda ERK1/2, p38, JNK, STAT3 ve NF $\kappa$ B inhibisyonlarının tamamında ADAMTS4 gen ekspresyonu azalış göstermektedir. Bu sinyal yollarının modülatör etkisi göz önünde bulundurularak PsA hastalarının kartilaj hasarını önlemek için yeni potansiyel terapötiklerin gelişmesine öncülük edeceği düşünülmektedir.

PsA, kontrol ve Ps gruplarında, ADAMTS5 gen ekspresyonunun IL-1 $\beta$  stimülasyonuna bağlı olmaksızın NF $\kappa$ B inhibisyonuyla azalış gösterdiği elde edildi. Bu da bize eklem yıkımlarında rol alan NF $\kappa$ B proteininin PsA patogenezinde aktif bir şekilde rol aldığını düşündürmektedir. NF $\kappa$ B yolağının baskılanmasıyla ADAMTS5 gen ekspresyonunun düzenlenebileceği öngörülmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

- 1- Wright V, Moll JMH, Psoriatic Arthritis. In: Wright V, Moll JMH, eds. polyarthritis. Amsterdam: North Holland Publishing Co, 1976: 169223.
- 2- Wilson, F.C., Icen, M., Crowson, C.S., McEvoy, M.T., Gabriel, S.E., Kremers, H.M. 2009. "Incidence and clinical predictors of psoriatic arthritis in patients with psoriasis: a population-based study", *Arthritis Rheum*, 61, 233–239.
- 3- 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.
- 4- Kruithof, E., Baeten, D., De Rycke, L., Vandooren, B., Foell, D., Roth, J., Canete, J.D., Boots, A.M., Veys, E.M., De Keyse, F. 2005. "Synovial histopathology of psoriatic arthritis, both oligo- and polyarticular, resembles spondyloarthropathy more than it does rheumatoid arthritis", *Arthritis research*, 7, 569-580.
- 5- 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 psoriatic arthritis to assess intraarticular tumor necrosis factor-alpha blockade in the knee joint", *Arthritis Res Ther*, 12, R148.
- 6- Alenius, G.M., Eriksson, C., Dahlqvist, S.R. 2009. "Interleukin-6 and soluble interleukin-2 receptor alpha markers of inflammation in patients with psoriatic arthritis?", *Clin Exp Rheumatol*, 27, 120–123.
- 7- Moran, E.M., Mullan, R., McCormick, J., Connolly, M., Sullivan, O., FitzGerald, O., Bresnihan, B., Veale, D.J., Fearon, U. 2009. "Human rheumatoid arthritis tissue production of IL-17A drives matrix and cartilage degradation: synergy with tumour necrosis factor-alpha, oncostatin M and response to biologic therapies", *Arthritis Res Ther*, 11, R113.
- 8- Wagsater, D., Bjork, H., Zhu, C., Bjorkegren, J., Valen, G., Hamsten, A., Eriksson. "ADAMTS-4 and -8 are inflammatory regulated enzymes expressed in macrophage-rich areas of human atherosclerotic plaques", *Atherosclerosis*, 2008 Feb;196(2):514-22.
- 9- 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.
- 10- Dai, J.N., Zong, Y., Zhong L.M., Li Y.M., Zhang, W., Bian L.G., Ai, Q.L., Liu, Y.D., Sun, J., Lu, D. 2011. "Gastrodin inhibits expression of inducible NO synthase, cyclooxygenase-2 and proinflammatory cytokines in cultured LPS-stimulated microglia via MAPK pathways", *PLoS One*, 6, e21891.
- 11- Tian, Y., Yuan, W., Fujita, N., Wang, J., Wang, H., Shapiro, I.M., Risbud, M.V. 2013. "Inflammatory Cytokines Associated with Degenerative Disc Disease Control Aggrecanase-1 (ADAMTS-4) Expression in Nucleus Pulposus Cells through MAPK and NF-kB", *The American Journal of Pathology*, 182, 2310-2321.
- 12- Chandran NS, Greaves M, Gao F, Lim L, Cheng BCL. Psoriasis and the eye:Prevalence of eye disease in Singaporean Asian Patients with psoriasis.The *Journal of Dermatol* 2007;34:805-810.

- 13- Gudjonsson JE, Elder JT. Psoriasis: epidemiology. *Clin Dermatol* 2007; 25: 535-46.
- 14- Gudjonsson JE, Elder JT. Psoriasis. In: Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrist BA, Paller AS, Leffell DJ. Mc Graw Hill Inc (eds), *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine* (7th ed). New York 2008, pp 169-193.
- 15- Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, et al. *Dermatology*. (2nd ed). Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2000, pp 585-607.
- 16- Naldi L, Gambini D, The clinical spectrum of psoriasis. *Clin Dermatol* 2007;25(6): 510-8.
- 17- Rapp SR et al. Psoriasis causes as much disability as other major medical diseases. *J Am Acad Dermatol* 1999; 41: 401.
- 18- Guttman-Yassky, E., Nograles, KE., Kruege, JG. 2011. "Contrasting pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis-part I: clinical and pathologic concepts", *J Allergy Clin Immunol*, 127, 1110–1118.
- 19- Gladman, D.D., Antoni, C., Mease, P., Clegg, D.O., Nash, O. 2005. "Psoriatic arthritis: epidemiology, clinical features, course, and outcome", *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64, 14-17.
- 20- Gladman DD. Psoriatic Arthritis. *Rheum. Dis Clin North Am*1998; 24(4): 829-44.
- 21- Antony M. Turkiewicz, Moreland LW. Psoriatic arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 2007; 56: 1051-66.
- 22- Arasil T. Psoriatik artrit. In: Beyazova M, Kutsal YG, Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon. Güneş kitabevi, Ankara 2000, ss 1598-1603.
- 23- Wright V. Rheumatism and psoriasis: a re-evaluation. *Am J Med* 1959;27:454-62.
- 24- Gladman DD. Kelley's Textbook of Rheumatology. In: Tüzün F. Psoriatic Arthritis. Arasil T. (eds), *Kelley Romatoloji*. Güneş kitabevi, Ankara 2006, ss 1155-65.
- 25- Pitzalis C. Skin and joint disease in psoriatic arthritis: what is the link? *Br J Rheumatol* 1998; 37: 480- 483.
- 26- Gladman DD, Shuckett R, Russell ML, Thorne JC, Schachter RK. Psoriatic arthritis (PSA)-an analysis of 220 patients. *Q J Med* 1987;62(238):127-41.
- 27- Zachariae H. Prevalence of joint disease in patients with psoriasis: implications for therapy. *Am J Clin Dermatol* 2003;4:441-7.
- 28- Eastmond CJ. Genetics and HLA antigens. *Baillière's clinical rheumatology*. 1994;8(2):263-76.
- 29- Myers, A, Kay, LJ, Lynch, SA, Walker, DJ. Recurrence risk for psoriasis and psoriatic arthritis within sibships. *Rheumatology (Oxford)* 2005 Jun;44(6):773-6.
- 30- Gottlieb M. Calin A. Discordance for psoriatic arthropathy in monozygotic twins. *Arthritis Rheum* 1979; 22: 805-806.
- 31- Dönmez S. Psoriatik artrit'li eklem tutulum tipleri ve klinik özellikleri. Uzmanlık tezi. Trakya üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıklar AD. Romatoloji BD. Edirne, 2012.
- 32- Köseoğlu HK, Yücel EA. Psoriatik artrit. *T Klin İmmünol Romatol* 2004;4(1):44-53.
- 33- Zell, D., S. Hu, and R. Kirsner, Genetic alterations in psoriasis. *J Invest Dermatol*, 2008. 128(7): p. 1614.
- 34- Veale D, Fitzgerald O. Psoriatic arthritis. *Best Pract Res Clin Rheum* 2002;16(4):523-35.
- 35- Espinoza LR, Aguilar JL, Espinoza CG, et al. Fibroblast function in psoriatic arthritis. Alteration of cell kinetics and growth factor responses. *J Rheumatol*. 1994; 21: 1502.

- 36- Espinoza LR, Vasey FB, Espinoza CG, Bocanegra TS, Germain BF. Vascular changes in psoriatic synovium. A light and electron microscopic study. *Arthritis Rheum* 1982;25(6):677-84.
- 37- 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.
- 38- Danning CL, Illei GG, Hitchon C, Greer MR, Boumpas DT, McInnes IB. Macrophage-derived cytokine and nuclear factor kappaB p65 expression in synovial membrane and skin of patients with psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43(6):1244-56.
- 39- Gladman DD: Psoriatic arthritis: Recent advances in pathogenesis and treatment. *Rheum Dis Clin North Am* 18:247, 1992.
- 40- Taylor W, Gladman D, Helliwell P, Marchesoni A, Mease P, Mielants H: CASPAR Study Group. Classification criteria for psoriatic arthritis: development of new criteria from a large international study. *Arthritis Rheum* 2006;54(8):2665-73.
- 41- Congi L, Roussou E. Clinical application of the CASPAR criteria for psoriatic arthritis compared to other existing criteria. *Clin Exp Rheumatol* 2010 May-Jun;28(3):304-10.
- 42- Njobvu P, McGill P. Psoriatic arthritis and human immunodeficiency virus infection in Zambia. *J Rheumatol* 2000;27(7):1699-702.
- 43- Kınıklı G. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Romatoloji Kitabı, 2014,273-280.
- 44- Moll JM, Wright V. Familial occurrence of psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 1973;32(3):181-201.
- 45- Gladman DD. Psoriatic arthritis. In: Harris E, Budd R, Freistein G (Eds.). *Kelly's Textbook of Rheumatology*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders;2005. p.1156-64.
- 46- Jones SM, Armas JB, Cohen MG, Lovell CR, Evison G, McHugh NJ. Psoriatic arthritis: outcome of disease subsets and relationship of joint disease to nail and skin disease. *Br J Rheumatol* 1994;33(9):834-9.
- 47- Hochberg MC, Silman A, Smolen JS, Romatoloji, 4. baskı Türkçe çeviri, Editör Arasil T, Ankara, 2011.
- 48- Bruce IN. Psoriatic Arthritis: Clinical Features. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH (Eds.). *Rheumatology*. 4th ed. Philadelphia: Elsevier Limited; 2008 .p.1165-76.
- 49- Gladman DD. Clinical aspects of the spondyloarthropathies. *Am J Med Sci* 1998; 316:234-8.
- 50- Erdem HR. Psoriatic artritinin klinik özellikleri. *Turkish Journal Rheumatology* 2000;15(1): 31-8.
- 51- Ritchlin CT, Haas-Smith SA, Li P, Hicks DG, Schwarz EM. Mechanisms of TNF-alpha and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis. *J Clin Invest* 2003;111(6):821-31.
- 52- Gladman DD, Farewell VT, Wong K, Husted J. Mortality studies in psoriatic arthritis: results from a single outpatient center. II. Prognostic indicators for death. *Arthritis Rheum* 1998;41(6):1103-10.
- 53- Gladman, DD, Farewell, CT. The role of HLA antigens as indicators of progression in psoriatic arthritis (PSA): Multivariate relative risk model. *Arthritis Rheum* 1995; 38:845.

- 54- Sarzi- Puttini P, Santandrea S, Boccassini L, Panni B, Caruso I. The role of NSAIDs in psoriatic arthritis: evidence from a controlled study with nimesulide. *Clin Exp Rheumatol* 2001; 19: 17- 20.
- 55- Plosker GL, Croom KF. Sulfasalazine. *Drugs*. 2005;65(13):1825-49.
- 56- Saag KG, Koehnke R, Caldwell JR, Brasington R, Burmeister LF, Zimmerman B, et al. Low dose long-term corticosteroid therapy in rheumatoid arthritis: an analysis of serious adverse events. *The American journal of medicine*. 1994;96(2):115-23.
- 57- Conaghan PG, Brooks P. Disease-modifying antirheumatic drugs, including methotrexate, gold, antimalarials, and D-penicillamine. *Current opinion in rheumatology*. 1995;7(3):167-73.
- 58- YURDAKUL S. Uzun etkili ilaçlar. *Turkiye Klinikleri Journal of Internal Medical Sciences*. 2006;2(25):52-9.
- 59- Ćwierkot J, Szechiński J. Methotrexate in rheumatoid arthritis. *Pharmacological Reports*. 2006;58(473):473-92.
- 60- Yocum DE, Klippel JH, Wilder RL, Gerber NL, Austin HA, Wahl SM, et al. Cyclosporin A in severe, treatment-refractory rheumatoid arthritis: a randomized study. *Annals of internal medicine*. 1988;109(11):863-9.
- 61- Pinto P, Dougados M. Leflunomide in clinical practice. *Acta reumatológica portuguesa*. 2005;31(3):215-24.
- 62- 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.
- 63- 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.
- 64- Nagase H, Kashiwagi M. Aggrecanases and cartilage matrix degradation. *Arthritis Res Ther* 2003;5(2):94-103.
- 65- Levy GG, Motto DG, Ginsburg D. ADAMTS13 turns 3. *Blood* 2005; 106(1): 11-7.
- 66- 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.
- 67- 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;272:556-62.
- 68- Demircan K, Topcu V, Takigawa T, Akyol S, Yonezawa T, Ozturk G, et al. ADAMTS4 and ADAMTS5 knockout mice are protected from versican but not aggrecan or brevican proteolysis during spinal cord injury. *Biomed Res Int*. 2014;2014:693746.
- 69- Torres-Collado AX, Kisiel W, Iruela-Arispe ML, Rodriguez-Manzaneque JC. ADAMTS1 interacts with, cleaves, and modifies the extracellular location of the matrix inhibitor tissue factor pathway inhibitor-2. *J Biol Chem*. 2006;281:17827-37.
- 70- Vazquez F, Hastings G, Ortega MA, Lane TF, Oikemus S, Lombardo M, et al. 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*. 1999;274:23349-57.
- 71- Colige A, Vandenberghe I, Thiry M, Lambert CA, Van Beeumen J, Li SW, et al. Cloning and characterization of ADAMTS-14, a novel ADAMTS displaying high homology with ADAMTS-2 and ADAMTS-3. *J Biol Chem*. 2002;277:5756-66.

- 72- Yatabe T, Mochizuki S, Takizawa M, Chijiwa M, Okada A, Kimura T, et al. Hyaluronan inhibits expression of ADAMTS4 (aggrecanase-1) in human osteoarthritic chondrocytes. *Ann Rheum Dis*. 2009;68:1051-8.
- 73- Valenzuela JC, Heise C, Franken G, Singh J, Schweitzer B, Seidenbecher CI, et al. Hyaluronan-based extracellular matrix under conditions of homeostatic plasticity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014;369:20130606.
- 74- Peluffo MC, Murphy MJ, Baughman ST, Stouffer RL, Hennebold JD. Systematic analysis of protease gene expression in the rhesus macaque ovulatory follicle: metalloproteinase involvement in follicle rupture. *Endocrinology*. 2011;152:3963-74.
- 75- Held-Feindt J, Paredes EB, Blomer U, Seidenbecher C, Stark AM, Mehdorn HM, et al. Matrix-degrading proteases ADAMTS4 and ADAMTS5 (disintegrins and metalloproteinases with thrombospondin motifs 4 and 5) are expressed in human glioblastomas. *Int J Cancer*. 2006; 118:55-61.
- 76- Westling J, Gottschall PE, Thompson VP, Cockburn A, Perides G, Zimmermann DR, et al. ADAMTS4 (aggrecanase-1) cleaves human brain versican V2 at Glu405-Gln406 to generate glial hyaluronate binding protein. *Biochem J*. 2004;377(Pt 3):787-95.
- 77- Ehlen HW, Sengle G, Klatt AR, Talke A, Muller S, Paulsson M, et al. Proteolytic processing causes extensive heterogeneity of tissue matrilin forms. *J Biol Chem*. 2009;284:21545-56.
- 78- Hisanaga A, Morishita S, Suzuki K, Sasaki K, Koie M, Kohno T, et al. A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4 (ADAMTS-4) cleaves Reelin in an isoform-dependent manner. *FEBS letters*. 2012;586:3349-53.
- 79- Weaver MS, Workman G, Cardo-Vila M, Arap W, Pasqualini R, Sage EH. Processing of the matricellular protein hevin in mouse brain is dependent on ADAMTS4. *J Biol Chem*. 2010;285:5868-77.
- 80- Bateman JF, Rowley L, Belluoccio D, Chan B, Bell K, Fosang AJ, et al. Transcriptomics of wild-type mice and mice lacking ADAMTS-5 activity identifies genes involved in osteoarthritis initiation and cartilage destruction. *Arthritis Rheum*. 2013;65:1547-60.
- 81- Nakada M, Miyamori H, Kita D, Takahashi T, Yamashita J, Sato H, et al. Human glioblastomas overexpress ADAMTS-5 that degrades brevican. *Acta Neuropathol*. 2005;110:239-46.
- 82- 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. *Dev Cell*. 2009;17:687-98.
- 83- Wierinckx A, Auger C, Devauchelle P, Reynaud A, Chevallier P, Jan M, et al. A diagnostic marker set for invasion, proliferation, and aggressiveness of prolactin pituitary tumors. *Endocr Relat Cancer*. 2007;14:887-900.
- 84- Lopez-Mejias R, Genre F, Garcia-Bermudez M, Ubilla B, Castaneda S, Llorca J, et al. Lack of association between ABO, PPAP2B, ADAMST7, PIK3CG, and EDNRA and carotid intima-media thickness, carotid plaques, and cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:756279.
- 85- Pu X, Xiao Q, Kiechl S, Chan K, Ng FL, Gor S, et al. ADAMTS7 cleavage and vascular smooth muscle cell migration is affected by a coronary-artery-disease-associated variant. *Am J Hum Genet*. 2013;92(3):366-74.
- 86- Liu CJ. The role of ADAMTS-7 and ADAMTS-12 in the pathogenesis of arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2009;5:38-45.

- 87- Kern CB, Wessels A, McGarity J, Dixon LJ, Alston E, Argraves WS, et al. Reduced versican cleavage due to Adamts9 haploinsufficiency is associated with cardiac and aortic anomalies. *Matrix Biol.* 2010;29:304-16.
- 88- Lo PH, Lung HL, Cheung AK, Apte SS, Chan KW, Kwong FM, et al. Extracellular protease ADAMTS9 suppresses esophageal and nasopharyngeal carcinoma tumor formation by inhibiting angiogenesis. *Cancer research.* 2010;70:5567-76.
- 89- Silver DL, Hou L, Somerville R, Young ME, Apte SS, Pavan WJ. The secreted metalloprotease ADAMTS20 is required for melanoblast survival. *PLoS genetics.* 2008;4:e1000003.
- 90- Hanby HA, Zheng XL. Current status in diagnosis and treatment of hereditary thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hereditary genetics : current research.* 2014;3(1). pii:e 108.
- 91- Johnston P, Larson D, Clark IM, Chojnowski AJ. Metalloproteinase gene expression correlates with clinical outcome in Dupuytren's disease. *J Hand Surg Am.* 2008;33:1160-7.
- 92- Tsilou E, MacDonald IM. Weill-Marchesani Syndrome. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, et al., editors. *GeneReviews(R)*. Seattle (WA)1993.
- 93- Kochhar A, Kirmani S, Cetta F, Younge B, Hyland JC, Michels V. Similarity of geleophysic dysplasia and Weill-Marchesani syndrome. *Am J Med Genet A.* 2013;161A:3130-2.
- 94- Ohnishi J, Ohnishi E, Shibuya H, Takahashi T. Functions for proteinases in the ovulatory process. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1751:95-109.
- 95- Lust JA, Donovan KA. The role of interleukin-1beta in the pathogenesis of multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1999 Dec;13(6):1117-1125.
- 96- Leonides C, Plataniias MD, Nicholas J, et al. Interleukin 1: Biology, pathophysiology and clinical prospect. *Am J Med* 1990;89 (5):621-62.
- 97- Duff GW : Cytokines and anticytokines. *Br J Rheumatol* 32 (supp) : 15-20, 1993.
- 98- Sirohi B, Powles R. Multiple myeloma. *The Lancet.* 2004 Mar 13; 363:875-887.
- 99- Donovan KA, Lacy MQ, Gertz MA, Lust JA. IL-1beta expression in IgM monoclonal gammopathy and its relationship to multiple myeloma. *Leukemia.* 2002 Mar;16(3):382-5.
- 100- Kuku I, Bayraktar MR, Kaya E, Erkurt MA, Bayraktar N, Cikim K, Aydogdu I. Serum proinflammatory mediators at different periods of therapy in patients with multiple myeloma. *Mediators Inflamm.* 2005 Aug 14;2005(3):171-174.
- 101- Emery P Luqmani R : The validity of surrogate markers in rheumatic disease. *Br J Rheumatol* 32 (supp) : 3-8,1993.
- 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- Taylor FB, Chang ACK, Peer G, Li A, Ezban M, and Hedner U. Active Site Inhibited Factor VII a (DEGR VIIa) Attenuates the Coagulant and Interleukin-6 and -8, but not Tumor Necrosis Factor, Responses of the Baboon to LD 100 Escherichia coli. *BLOOD* 1998; 91(5): 1609-1615.
- 104- Suzuki N, Kansas G, Engleman EG : Lymphocytes. In : *Arthritis and allied conditions.* McCarty DJ, Koopman WJ (Eds). Lea and Febiger pp : 377-387, 1993.
- 105- Guven O, Tekin U, Salmanoglu B, Kaymak E (2015). Tumor necrosis factor-alpha levels in the synovial fluid of patients with temporomandibular joint internal derangement. *J Craniomaxillofac Surg* 43: 102-105.

- 106- Lombard PR Punzi L Hasler F et al : Solubl TNF receptor in human inflammatory synovial fluids. *Arthritis Rheum* 36 : 485-489, 1993.
- 107- Esselens C, Malapeira J, Colome N, Casal C, Rodriguez-Manzaneque JC, Canals F, et al. The cleavage of semaphorin 3C induced by ADAMTS1 promotes cell migration. *J Biol Chem.* 2010;285:2463-73.
- 108- Manicourt DH Triki R Fukuda K et al : Levels of circulating TNF- alfa and IL-6 in patients with rheumatoid arlthritis. *Arthritis Rheum* 36 : 490-499, 1993.
- 109- Meyer FA, Yaron I, Yaron M (1990). Synergistic, additive, and antagonistic effects of interleukin-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and gamma-interferon on prostaglandin E, hyaluronic acid, and collagenase production by cultured synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 33: 1518-25.
- 110- Brennan FM Field M Chu CQ et al.: Cytokine expression in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 30 (supp) : 76-80, 1991.
- 111- Gladman DD, Farewell VT, Kopciuk KA, Cook RJ. HLA markers and progression in psoriatic arthritis. *J Rheumatol* 1998; 25: 730-733 [PMID: 9558177].
- 112- Mease P, Goffe BS. Diagnosis and treatment of psoriatic arthritis. *J Am Acad Dermatol* 2005; 52: 1-19 [PMID: 15627075 DOI: 10.1016/j.jaad.2004.06.013].
- 113- Fosang AJ, Little CB. Drug insight: aggrecanases as therapeutic targets for osteoarthritis. *Nat Clin Pract Rheum.* 2008;4(8):420-7.
- 114- Offermans S, Simon MI. Organization of transmembrane signaling by heterotrimeric G proteins. *Cancer Surv* 1997; 27:177-98.
- 115- Goldsmith ZG, Dhanasekaran DN. G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* 2007; 26(22):3122-42.
- 116- FRANK, D.A. STAT3 as a central mediator of neoplastic cellular transformation. *Cancer Letters.* 28 June 2007. 251(2):199-210.
- 117- BOWMAN, T., GARCIA, R., TURKSON, J., & JOVE, R. (2000). STATs in oncogenesis. *Oncogene*, 19: 2474-2488.
- 118- 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.
- 119- 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.
- 120- 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.
- 121- Baeuerle PA. Pro-inflammatory signaling: last pieces in the NF- $\kappa$ B puzzle? *Curr Biol* 8,19-22,1998.
- 122- Waddick K, Uckun FM. Innovative treatment programs against cancer: II. Nuclear factor- $\kappa$ B (NF-KB) as a molecular target. *Biochem Pharmacol* 57,9-17, 1999.
- 123- Wu, J.T., Kral, J.G. The NF- $\kappa$ B/ I $\kappa$ B signaling system: A molecular target in breast cancer therapy. *The Journal of Surgical Research*, 123, 158-169, 2005.
- 124- Baldwin, A.S.Jr. Series introduction: The transcription factor NF- $\kappa$ B and human disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 107, 3-6, 2001.
- 125- Pahl, H.L. Activators and target genes of Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors. *Oncogene*, 18, 6853-6866, 1999.



- 126- Hayden MS, Ghosh S. NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev.* 2012; 26:203–34. [PubMed: 22302935]
- 127- Little CB, Mittaz L, Belluoccio D, Rogerson FM, Campbell IK, Meeker CT, Bateman JF, Pritchard MA, Fosang AJ. ADAMTS-1-knockout mice do not exhibit abnormalities in aggrecan turnover in vitro or in vivo. *Arthritis Rheum.* 2005; 52:1461-72.
- 128- Malfait AM, Liu RQ, Ijiri K, et al: Inhibition of ADAM-TS4 and ADAMTS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage. *J Biol Chem* 2002; 277: 22201–8.
- 129- Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma HL, Flannery CR, Peluso D, Kanki K, Yang Z, Majumdar MK, Morris EA. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature.* 2005; 434(7033):644-8.
- 130- Sonya S. Glasson, Roger Askew, Barbara Sheppard, Brenda Carito, Tracey Blanchet, Hak-Ling Ma, Carl R. Flannery, Diane Peluso, Kim Kanki, Zhiyong Yang, Manas K. Majumdar, Elisabeth A. Morris. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. 2005;434: 644-8.
- 131- Vankemmelbeke M.N., Jones G.C., Fowles C., Ilic M.Z., Handley C.J., Day A.J., Knight C.G., Mort J.S., Buttle D.J., "Selective inhibition of ADAMTS-1, -4 and -5 by catechin gallate esters", *Eur. J. Biochem.*, (2003), 270, 2394.
- 132- Wachsmuth L., Bau B., Fan Z., Pecht A., Gerwin N., Aigner T., 'ADAMTS-1, a gene product of articular chondrocytes in vivo and in vitro, is downregulated by interleukin 1 beta', *J. Rheumatol.*, (2004), 31, 2, 315.
- 133- Demircan K., Hirohata S., Nishida K., Hatipoğlu O.F., Oohashi T., Yonezawa T., Apte S.S., Ninomiya Y., 'ADAMTS-9 is synergistically induced by interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor  $\alpha$  in OUMS-27 chondrosarcoma cells and in human chondrocytes', *Arthritis and Rheumatism*, (2005), 52, 5, 1451.
- 134- Hunt Ng Y., Zhu H., Pallen C.J., Leung P.C.K., Mac Calman C.D., 'Differential effects of interleukin-1 $\beta$  and transforming growth factor- $\beta$ 1 on the expression of the inflammation-associated protein, ADAMTS-1, in human decidual stromal cells in vitro', *Human Reproduction*, (2006), 21, 8, 1990.
- 135- Tim G. Ashlin, Melanie L. Buckley, Rebecca C. Salter, Jason L. Johnson, Alvin P.L. Kwan, Dipak P. Ramjia. 'The anti-atherogenic cytokine interleukin-33 inhibits the expression of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-1, -4 and -5 in human macrophages: Requirement of extracellular signal-regulated kinase, c-Jun N-terminal kinase and phosphoinositide 3-kinase signaling pathways.' 2014. 46(100): 113–123.
- 136- 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.
- 137- Botter, S.M., Glasson, S.S., Hopkins, B., Clockaerts, S., Weinans, H., Van Leeuwen, J.P.T.M., van Osch, G.J.V.M. 2009. "ADAMTS5 $^{-/-}$  mice have less subchondral bone changes after induction of osteoarthritis through surgical instability: Implications for a link between cartilage and subchondral bone changes", *Osteoarthritis Cartilage*, 17, 636-645.
- 138- Ruo-Hua Song, Micky D. Tortorella, Anne-Marie Malfait, James T. Alston, Zhiyong Yang, Elizabeth C. Arner, and David W. Griggs. 'Aggrecan Degradation in Human

- Articular Cartilage Explants Is Mediated by Both ADAMTS-4 and ADAMTS-5'. *ARTHRITIS & RHEUMATISM* Vol. 56, No. 2, February 2007, pp 575–585.
- 139- SONG R-H, TORTORELLA MD, MALFAIT AM et al.: Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both ADAMTS4 and ADAMTS5. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 575-85.
- 140- TORTORELLA MD, MALFAIT AM, DECCICO C, ARNER E: The role of ADAM-TS4 (aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (aggrecanase-2) in a model of cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 2001; 9: 539-52.
- 141- BAU B, GEBHARD PM, HAAG J, KNORR T, BARTNIK E, AIGNER T: Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 2648-57.
- 142- Pratta M.A., Scherle, P.A., Yang, G., Liu, R.Q., Newton, R.C. 2003. "Induction of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) by interleukin-1 occurs through activation of constitutively produced protein", *Arthritis Rheum*, 48, 119-133.
- 143- Koshy, P.J., Lundy, C.J., Rowan, A.D., Porter, S., Edwards DR., Hogan A, Clark, I.M., Cawston, T.E. 2002. "The modulation of matrix metalloproteinase and ADAM gene expression in human chondrocytes by interleukin-1 and oncostatin M: a timecourse study using real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction", *Arthritis Rheum*, 46, 961-967.
- 144- 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.
- 145- WAINWRIGHT SD, HEMING M, HUGHES CE: Evidence suggesting a role for NFκB in the IL-1-induced transcriptional regulation of the ADAMTS4 gene. Manuscript submitted for publication.
- 146- SEGUIN CA, BOJARSKI M, PILLIAR RM, ROUGHLEY PJ, KANDEL RA: Differential regulation of matrix degrading enzymes in TNF-alpha-induced model of nucleus pulposus tissue degradation. *Matrix Biol* 2006; 25: Matrix Biol 2006; 25: Matrix Biol 409-18.
- 147- BONDESON J, LAUDER S, WAINWRIGHT SD et al.: Adenoviral gene transfer of the endogenous inhibitor IkappaBalpha into human osteoarthritis synovial fibroblasts demonstrates that several matrix metalloproteinases and aggrecanases are NFkappaB dependent. *J Rheumatol* 2007; 34: 523-33.

## 8. ETİK KURUL KARAR FORMU

**DİCLE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK  
ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**  
**DICLE UNIVERSITY MEDICAL FACULTY ETHICS COMMITTEE FOR  
NONINTERVENTIONAL STUDIES**

**KARAR**

Prof. Dr. Yusuf NERGİZ, Ytk. Lis. Öğr. Gülsüm PEKTANÇ, Yrd. Doç. Dr. Sevgi İRTEGÜN, Prof. Dr. Remzi ÇEVİK, Yrd. Doç. Dr. Bilal SULA isimli araştırmacılar tarafından planlanan "ADAMTS (-1,-4,-5) Genlerinin Psoriatik Artrit Patogenezindeki Rollerinin ve Moleküler Mekanizmalarının Araştırılması" başlıklı araştırmaya *Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul'u* 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 (-1,-4,-5) genes in the pathogenesis of psoriatic arthritis" planned by Yusuf NERGİZ, Gülsüm PEKTANÇ, Sevgi İRTEGÜN, Remzi ÇEVİK, Bilal SULA has been approved by Ethics Committee of Dicle University Faculty of Medicine.

**Oturum No ( Meeting number) :** Tarih (Date): 27.11.2015 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.	Sahin 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 Tanısal Patoloji	
5	Doç. Dr.	A. Çetin TANRIKULU	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Genel Hastalıklar	
6	Doç. Dr.	Abdullah BOYOK	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Genel Cerrahi	
7	Yrd. Doç. Dr.	İsmail YILDIZ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Biyostatistik	
8	Doç. Dr.	Uğur EKİT	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Patoloji	
9	Doç. Dr.	Özhan ATES	Dicle Üniversitesi İlahiyat Fakültesi	Tıbbi İlahiyat Bilimleri	
10	Doç. Dr.	Mehmet Uğur ÇEVİK	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Nöroloji	
11	Avukat	Sahin KAPLAN	Dicle Üniversitesi Hastaneleri Başhekimlik	Avukat	

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası Zemin Kat 21280 Kampüsü/DIYARBAKIR  
Telefon:+90.412.248 80 01-16/4631 Faks:+90.412.248 84 40 kuruletikdilar@gmail.com

**Ek 1: Etik kurul karar formu**

## Turnitin Orjinallik Raporu

ADAMTS (-1,-4,-5) GENLERİNİN PSORIATİK ARTRİT PATOGENEZİNDEKİ ROLLERİNİN VE MOLEKÜLER MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI Gölşüm Pektaş tarafından



Tez Metni (yüksek lisans) den

- 22-May-2017 16:25 EEST' de İşleme konu
- NUMARA: 817382897
- Kelime Sayısı: 10490

## Benzerlik Endeksi

%12

Kaynağa göre Benzerlik

İnternet Sources:

%10

Yayımlar:

%6

Öğrenci Ödevleri:

%2

## kaynaklar:

- 1 2% match (09-May-2016 tarihli İnternet)  
<http://docplayer.biz.tr/2735466-3-yildirim-bevazil-universitesi-ile-fakultesi-kadin-bastaliklari-ve-dogum-s-b-d-ankara-bursev.html>
- 2 2% match (10-Nis-2016 tarihli İnternet)  
<http://dergihank.ulaokim.gov.tr/iaufm/arkive/download/5000081939/5000075248>
- 3 1% match (15-May-2015 tarihli İnternet)  
[http://uludaatlioderisi.org/pdf/pdf\\_UTF\\_332.pdf](http://uludaatlioderisi.org/pdf/pdf_UTF_332.pdf)
- 4 1% match (09-Eyl-2013 tarihli İnternet)  
<http://www.turkijobchem.com/2013/218-228.pdf>
- 6 1% match (16-Nis-2016 tarihli İnternet)  
<http://docplayer.biz.tr/4505817-Kadiri-demircan-1-numevva-alkol-2-ferah-armutcu-2-1.html>
- 8 1% match (30-Oca-2017 tarihli öğrenci ödevleri)  
[Submitted to Eskişehir Osmanpaşa University on 2017-01-30](#)
- 7 < 1% match (22-Haz-2015 tarihli İnternet)  
<http://www.turkijobchem.com/arkive/interokimler-2325.html>
- 8 < 1% match (16-Ara-2016 tarihli İnternet)  
[http://www.informobol.com/wp-content/uploads/2016/07/art\\_53\\_342.pdf](http://www.informobol.com/wp-content/uploads/2016/07/art_53_342.pdf)
- 8 < 1% match (15-Ara-2015 tarihli öğrenci ödevleri)  
[Submitted to Ankara University on 2015-12-15](#)
- < 1% match (23-Mar-2014 tarihli İnternet)