

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**OSTEOSARKOMDA MMP-3 GEN
POLİMORFİZMLERİNİN İNCELENMESİ**

MUSTAFA ADIGÜZEL

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. H. ARZU ERGEN**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI**

İSTANBUL-2012

TEZ ONAYI**TEZ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü MOLEKÜLER TIP Anabilim Dalı YÜKSEK LİSANS Programında MUSTAFA ADIGÜZEL tarafından hazırlanan Osteosarkomda MMP3 gen polimorfizmlerinin incelenmesi başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

19 / 11 / 2012

Tez Sınav JürisiÜnvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)

- 1.PROF.DR.İLHAN YAYLIM, İ.Ü DETAE MOLEKÜLER TIP AD
- 2.PROF.DR.BEDİA AĞAÇHAN, İ.Ü DETAE MOLEKÜLER TIP AD
- 3.DOÇ.DR.H.ARZU ERGEN, İ.Ü DETAE MOLEKÜLER TIP AD
- 4.DOÇ.DR.ÜMİT ZEYBEK, İ.Ü DETAE MOLEKÜLER TIP AD
- 5.DOÇ.DR. ALİ OSMAN GÜROL,İ.Ü DETAE İMMÜNOLOJİ AD

İmzası



BEYAN

iii

BEYAN

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

Mustafa Adıgüzel

ITHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İlhan Yaylım'a,

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı Kurucusu Prof. Dr. Turgay İsbir'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca danışmanlığımı üstlenen, bana her konuda destek olan saygıdeğer hocam İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Arzu Ergen'e,

Tezim için gerekli olan hasta örneklerinin toplanmasında yardımcı olan İstanbul Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Önder Kılıçoğlu'na,

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince yardımları ve her türlü destekleri için başta Prof. Dr. Oğuz Öztürk, Prof. Dr. Bedia Ağaçhan, Prof. Dr. Sadrettin Pençe, Prof. Dr. Hülya Yılmaz Aydoğan, Doç.Dr. Ümit Zeybek, Öğr. Gör. Bahar Toptaş ve Araş. Gör. Canan Cacina olmak üzere tüm Moleküler Tıp Anabilim Dalı çalışanlarına,

Labaratuvar çalışmalarında yardımcı olan Eren Sayın'a,

Bio. Ümit Yılmaz, Bio. Selçuk Daşdemir, Bio Faruk Çelik başta olmak üzere tüm Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğrencilerine,

Har şartta bana destek olan aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 19358

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Osteosarkom	3
2.1.1. Epidemiyoloji.....	3
2.1.2. Klinik Tanımı.....	4
2.1.3. Etiyoloji.....	5
2.1.4. Metastatik Hastalık	6
2.1.5. Sınıflandırma.....	6
2.2. Ekstrasellüler Matriks	8
2.2.1. Metastaz ve İnvazyon.....	9
2.3. Matriks Metalloproteinazlar.....	10
2.3.1. MMP Yapısı.....	11
2.3.2. MMP'lerin Sınıflandırılması.....	12
2.3.3. MMP Aktivasyonu	15
2.3.4. MMP Aktivasyonunun Düzenlenmesi	16
2.3.5. MMP'lerin Çeşitli Patolojik ve Fizyolojik Durumlarla İlişkisi	18
2.3.6. MMP'lerin OS İnvazyonuna Katılmaları.....	20
2.4. MMP-3 (Stromelysin-1).....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. Seçilen Örneklerin Tanımı	23

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	23
3.3. Kullanılan Gereçler	24
3.4. Çözeltiler.....	24
3.4.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler	24
3.4.1.1. Eritrosit Parçalama Tamponu (Lysis Buffer).....	24
3.4.1.2. 0,5 M Disodium Etilen Diamin Tetra Asetat (EDTA) (pH:8.0)	24
3.4.1.3. 4 Molar Sodyum Klorür (NaCl) Çözeltisi.....	25
3.4.1.4. Lökositleri Parçalama Tamponu (White Blood Cell Buffer-WBL).....	25
3.4.1.5. 1 Molar Tris Tamponu (Stok)	25
3.4.1.6. 9,5 Molar Amonyum Asetat Çözeltisi	25
3.4.1.7. %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisi	25
3.4.1.8. Proteinaz K (20 mg/ml).....	25
3.4.2. Agaroz Jel Elektroforezi'nde Kullanılan Çözeltiler.....	26
3.4.2.1. Etidyum Bromür (10 mg/ml)	26
3.4.2.2. Agaroz Jel Yükleme Tamponu (5x).....	26
3.4.2.3. 50x Tris - Asetik asit - Etilen Diamin Tetra Asetat (TAE) Tamponu.....	26
3.4.2.4. 5X Tris-Borik Asit-Etilen Diamin Tetra Asetat (TBE) Tamponu	26
3.5. Kullanılan Yöntemler.....	26
3.5.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu	26
3.5.2. Elde Edilen DNA'nın Konsantrasyon ve Kalitesinin Tayini	27
3.6. PCR Yöntemi İle Mmp-3 Gen Bölgelerinin Çoğaltılması Ve RFLP Yöntemiyle Polimorfizm Analizi.....	27
3.6.1. MMP-3 Gen Bölgelerinin PCR Yöntemi ile Çoğaltılması	28
3.6.1.1. %1'lik Agaroz Jel Hazırlanması	29
3.6.1.2. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel'e Yüklenmesi.....	29
3.6.1.3. PCR Ürünlerinin Kontrolü	29
3.6.2. Enzim Kesim Sonuçlarının Değerlendirilmesi	31
3.6.2.1. Taq I Enzimi Kesim Sonuçlarının Değerlendirilmesi	31
3.6.2.2. Acl I Enzimi Kesim Sonuçlarının Değerlendirilmesi	31
3.6.2.3. MMP-3 Genine Ait Polimorfizmlerin DNA Dizileme Sonuçları	32
3.7. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	34
4. BULGULAR.....	35
5. TARTIŞMA.....	41

KAYNAKLAR	45
ETİK KURUL KARARI	55
ÖZGEÇMİŞ	58

TABLolar LISTESİ

Tablo 2-1: OS'nin alt tiplerinin sınıflandırılması	7
Tablo 2-2: MMP'lerin sınıflandırılması	12
Tablo 3-1: MMP3, E45K ve T102T polimorfizmleri spesifik primerleri.....	24
Tablo 3-2: MMP-3- A/G E45K,- C/G T102T Gen Bölgelerinin Çoğaltılması İçin Kullanılan Protokol.....	27
Tablo 3-3: MMP-3- A/G E45K gen bölgesi için PCR koşulları.....	28
Tablo 3-4: MMP-3 -C/G T102T gen bölgesi için PCR koşulları	28
Tablo 3-5: E45K ve T102T polimorfizmlerinin analizleri için kullanılacak enzimler...	30
Tablo 3-6: E45K ve T102T polimorfizmlerinin analizleri için kullanılacak enzim protokolü.....	30
Tablo 4-1: Çalışma gruplarına ait demografik bilgiler	35
Tablo 4-2: Çalışma gruplarında MMP-3 E45K genotip ve allel dağılımları.....	36
Tablo 4-3: Çalışma gruplarında MMP-3 T102T genotip ve allel dağılımları	37
Tablo 4-4: Her iki mutant alleli taşıma açısından çalışma gruplarının karşılaştırılması	37
Tablo 4-5: Hasta grubuna ait demografik özellikler	38
Tablo 4-6: Demografik özelliklere göre MMP-3 E45K genotiplerinin dağılımı.....	38
Tablo 4-7: Demografik özelliklere göre MMP-3 T102T genotiplerinin dağılımı	39
Tablo 4-8: MMP-3 E45K polimorfizmi genotip dağılımlarının kontrol ve hasta gruplarında cinsiyete göre dağılımları	39
Tablo 4-9: MMP-3 T102T polimorfizmi genotip dağılımlarının kontrol ve hasta gruplarında cinsiyete göre dağılımları	40

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Kemiğin yapısı	4
Şekil 2-2: ECM'nin yapısı	9
Şekil 2-3: Metastaz	10
Şekil 2-4: MMP yapısı	11
Şekil 2-5: MMP aktivasyonu	15
Şekil 2-6: MMP aktivitesinin düzenlenmesi	16
Şekil 2-7: MMP aktivasyon kaskadı	17
Şekil 3-1: Taq I enzimi kesim sonuçlarının %2'lik agaroz jelde görüntüsü	31
Şekil 3-2: Acl I enzim kesimi sonuçlarının %2'lik agaroz jelde görüntüsü	32
Şekil 3-3: MMP-3 geni E45K polimorfizmi mutant DNA dizileme görüntüsü	32
Şekil 3-4: MMP-3 geni E45K polimorfizmi doğal tip DNA dizileme görüntüsü	33
Şekil 3-5: MMP-3 geni T102T polimorfizmi doğal tip DNA dizileme görüntüsü	33
Şekil 3-6: MMP-3 geni T102T polimorfizmi mutant DNA dizileme görüntüsü	34

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- OS : Osteosarkom
- MMP : Matriks Metalloproteinaz
- ECM : Ekstrasellüler Matriks
- TIMP : Sepesifik Matriks Metalloproteinaz İnhibitörü
- SNP : Tek Nükleotid Polimorfizmi
- DNA : Deoksiribonükleik Asit
- MRI : Manyetik Rezonans Görüntüleme
- WHO : Dünya Sağlık Örgütü
- EGF : Epidermal Büyüme Faktörü
- TNF : Tümör Nekrozis Faktör
- IL : İnterlökin
- PG : Prostaglandin
- uPA : Ürokinaz Plazminojen Aktivatörü
- PAI : Plazminojen Aktivatör İnhibitörü
- PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
- RFLP : Restriksiyon Fragmanı Uzunluk Polimorfizmi

ÖZET

ADIGÜZEL, M. Osteosarkomda MMP-3 Gen Polimorfizmlerinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2012.

Osteosarkom (OS), ortaya çıkan en yaygın primer malignant kemik tümörüdür. Genellikle insan hayatının ikinci on yılında meydana gelir ve uzun kemiklerin metafizinde görülür. OS çeşitli alt tiplere ayrılır. OS sınıflama ve gradlaması tedaviye yardımcıdır.

MMP'lerin, apoptotik süreci etkileyen substratları hedefleme ve ECM'yi parçalama yetenekleri kanserle ilişkilidir. MMP'lerin yapısında, korunmuş bir katalitik domen, bir sinyal peptid ve C terminal hemopeksin bölgesi vardır. Bu endopeptidazlar; kollajenazlar, jelatinazlar, stromelisinler, membran tip, matrisinler ve diğer MMP'ler olmak üzere altı kısma ayrılırlar. MMP-3 geni 10 ekzondan oluşan 11.q22.3 kromozom bölgesinde bulunan bir gendir.

Çalışmamızda MMP-3 E45K ve T102T polimorfizmleri osteosarkom tanısı konmuş hastalar ve sağlıklı bireylerde PCR-RFLP yöntemine göre incelenmesi yapılmıştır. Elde edilen bulgulara göre MMP-3 E45K (rs679620) polimorfizminde AA genotipi sağlıklı bireylerde (p:0,004), G alleli hasta grubunda (p:0,010), AG genotipi ise hasta grubunda (p:0,001) artmıştır. MMP-3 T102T (rs 41380244) polimorfizminde genotip ve allel dağılımları karşılaştırıldığında hasta ve kontrol bireyleri arasında istatistiksel bir fark bulunamamıştır. Çalışmamıza dahil ettiğimiz lokal nüks, metastaz ve cinsiyet durumuna göre her iki polimorfizm için hasta ve kontrol bireyleri arasında istatistiksel bir fark gözlenmemiştir. Özetle, bulgularımız sonucunda MMP-3 E45K polimorfizminin osteosarkomda etkisi olabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kanser, Osteosarkom, Matris Metalloproteinaz, MMP-3, Polimorfizm

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 19358

ABSTRACT

ADIGUZEL, M. Investigation of MMP-3 Gene Polymorphism in Osteosarcoma. Istanbul University, Institute of Health Science, Molecular Medicine. Istanbul. 2012.

Osteosarcoma is the most common primary malignant bone tumour. Generally, it emerges at the second decade of human life and it is seen in the metaphysis of long bones. OS is divided into various subtypes. The classification and grading of OS is auxiliary to treatment.

The MMPs' ability to target substrates affecting apoptotic process and to fragment ECMs is related to cancer. In MMPs' structure, there is a protected catalytic domain, a signal peptide and C terminal hemopexin domain. These endopeptidases are divided into six groups: collagenases, gelatinases, stromelysines, membran type, matrilysines and other MMPs. MMP-3 gene is present in 11.q22.3 chromosome section and is consisted of ten exons.

In our study, MMP-3 E45K and T102T polymorphisms are investigated in osteosarcoma patients and healthy controls according to PCR-RFLP method. According to our findings, in MMP-3 E45K (rs679620) polymorphism, AA genotype is increased in controls (p:0,004) and allele G (p:0,010) and AG genotype (p:0,001) is increased in cases. In MMP-3 T102T (rs41380244) polymorphism, there is no statistical difference between cases and controls in genotype and allele distributions. No statistical difference observed between cases and controls for both polymorphism according to their sex, metastasis and local recurrence situation. In summary, our results suggest that MMP-3 E45K polymorphism may have a substantial effect on osteosarcoma.

Key Words: Cancer, Osteosarcoma, Matrix Metalloproteinase, MMP-3, Polymorphism

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 19358

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Osteosarkom (OS), kemik tümörleri içinde en yaygın tür olup yıllık görülme insidansı 2/1.000.000'dir. OS genellikle uzun kemiklerin metafizinde görülen bir kanser türüdür. Görülme aralıkları hayatın ikinci dekatında yani kemiklerin uzanımsal gelişme atağında olduğu dönemdir. OS'ye neden olduğu bilinen çevresel ajan iyonize radyasyondur. Diğer nedenler ise başka kanser türlerinde olduğu gibi hücre büyüme faktörleri ve tümör supresör genlerde meydana gelen değişimlerdir. OS hastalarında akciğer metastazı görülme riski yüksektir. OS sınıflandırma ve gradlaması tedaviye yardımcıdır. Çeşitli alt tipleri bulunmakla beraber en yaygın tip konvansiyonel tiptir.

Matriks metalloproteinazlar (MMP) çinko bağımlı endopeptidazlardır. Bu enzimler çeşitli fizyolojik ve patolojik olaylarda görev alırlar. En önemli görevleri ekstrasellüler matriksi (ECM) ve bazal membranı parçalamaktır. Bu iki yapının parçalanması tümörlerin invazyonu, metastazı, gelişimi, penetrasyonu ve anjiyogenezinde oldukça önemlidir. MMP'ler pro-MMP olarak salgılanırlar. Aktivasyonları adım adım gerçekleşir. Bu aktivasyon çeşitli şekillerde düzenlenir. MMP'lerin spesifik doku inhibitörleri (TIMP) tarafından düzenlenmesi en yaygın düzenleme biçimidir.

MMP'ler son sınıflandırmalara göre 6 sınıfa ayrılırlar. MMP'lerin OS'deki rolü ise MMP/TIMP homeostazının bozulması sonucu kanserleşme sürecini hızlandırması ve metastaz görülme riskini arttırmasıdır.

Stromelin-1 olarak isimlendirilen MMP-3 endopeptidaz ailesinin önemli bir üyesidir, bazı MMP'lerin aktivasyonunda ve bazı squamoz hücre karsinomalarında görev alır.

MMP-3 geni 11.kromozomda lokalize olup 13,003 bç uzunluğundadır. Yapılan çalışmalar sonucunda bu gene ait bazı SNP'ler (tek nükleotid polimorfizmi) tanımlanmıştır. Bu gende meydana gelen polimorfizmlerin bazı kanser türlerinde etkili olduğu gözlemlenmiştir.

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda MMP-3 geninde E45K (A/G) ve T102T (C/G) polimorfizmlerini incelemeyi amaçladık. Bu polimorfizmlerin kanser alanında yapıldığı çalışmalar oldukça az olup, bazı kanser türlerinde etkileri olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamız osteosarkomda bu polimorfizmler ile yapılan ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

Normal hücrelerde, hücre büyümesi ve çoğalması kontrol altındadır. Kanser hücrelerinde ise bu büyüme kontrol mekanizmasına karşı bir duyarsızlaşma mevcuttur ki bunun sonucu olarak hücre kontrolsüz olarak çoğalır ve tümör oluşur.

Kanser, protoonkogenlerde, tümör supresör genlerde, apoptozu düzenleyen genlerde ve DNA onarım genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu ortaya çıkar. Bu mutasyonlar sonucunda büyüme sinyallerinin kendiliğinden üretilmesi, büyüme baskılayıcı sinyallerin inhibisyonu, hücrenin apoptoza girmemesi, sonsuz replikasyon yeteneği kazanması, anjiyogenez ve metastaz gibi aşamalarla kendini gösterir.

2.1. Osteosarkom

Osteosarkom (OS), kemik sarkomaları içinde en yaygın, primer malignant kemik tümörlerinde ise multipl-myelomadan sonra ikinci sırada olup yıllık görülme insidansı 2/1.000.000'dir. Çoğu OS hastaları birkaç ay semptomlardan şikayet ederler. Hastalık ilk başlarda kendini bir patolojik fraksiyonla gösterir(1,2,3). OS, herhangi bir kemikte meydana gelse de, sıklıkla uzanımsal gelişme atağı esnasında yüksek kemik turnoverının meydana geldiği uzun kemiklerin metafizinde (Şekil 2-1) meydana gelir(2).

Her yaşta meydana gelmesine rağmen, en çok görüldüğü aralıklar, ikinci ve üçüncü on yıldır. İstatistiksel dağılımı iskelet gelişimi ile paralellik gösterebilir(2).

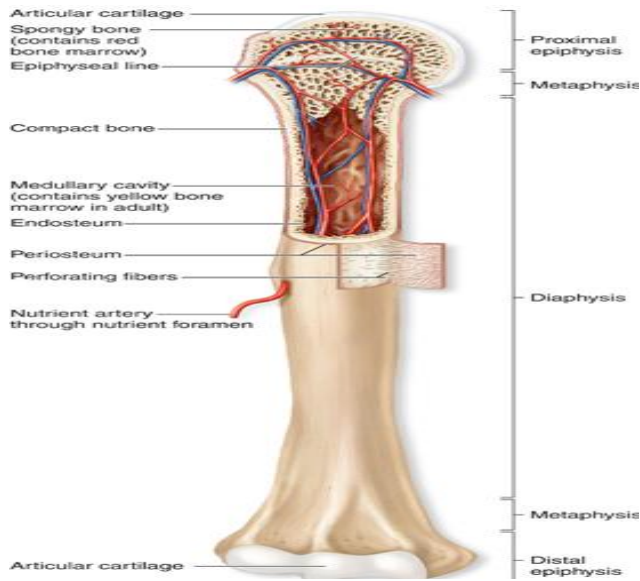
2.1.1. Epidemiyoloji

Klasik OS, biyopsi ile analiz edilebilen kemik tümörlerinin yaklaşık % 15'ini oluştururken tüm malignant kemik tümörlerinin de %2'sini oluşturur(4).

Vakaların % 75'ine yakınında OS hastaları 15-20 yaş arasındadır. Erkekler kadınlara göre daha sık etkilenirler. OS, 6 yaşından küçük veya 60 yaşından büyük kişilerde nadiren görünür. İleri yaşlarda görünen tümörler genellikle Paget Hastalığı, radyasyon veya aynılaşmış kondrosarkomlara sekonderdir. Genellikle % 80-90'ı tubular kemiklerde meydana gelir. Aksial iskelet nadiren etkilenir. Femur, tibia ve humerus ekstremite tümörlerinin % 85'ini oluştururken, % 1'den daha azı el ve ayak kemiklerinde görünür(5). Kemik yüzeyinde meydana gelen tümörler, medulladan kaynaklanana göre ileri yaşlarda görülür ve düşük gradlıdır(2).

2.1.2. Klinik Tanımı

OS'li bir hastanın değerlendirilmesi, fiziksel muayene, radyografi ve hastalığın oluşum süreci ile başlar. Hastalık geçmişi genellikle primer tümör bölgesinde önemli ölçüde bir kitle ve acı bulunmasını ifade eder. Diğer bölgelerdeki ağrılar metastatik gelişim sonucudur. Fiziksel muayene, genellikle primer tümör bölgesindeki bir yumuşak doku kitlesinde ortaya koyulur, laboratuvar tetkiki ise prognostik öneme sahip oldukları bilinen alkalinfosfataz ve laktat dehidrogenaz seviyelerinin yükselmesi ile ortaya çıkar(6). Radyolojik görünüm; sklerotik, litik veya mikst lezyonlar şeklinde olabilir. Görünümü, kemiğin yapısındaki (Şekil 2-1) periostun kalkmasına neden olan, metafizde yerleşen radyodens lezyondur. Büyüyen tümör "kodman üçgeni"ni oluşturur. Bu yapı; tümör periostu yüzeyden ayrılır ve kambiyumun yeni kemik tabakası oluşturması sonucunda kenarlarını periost, korteks ve tümörün oluşturduğu bir üçgendir(2,7). Dinamik MRI görüntüleme hastalığın kemoterapiye verdiği cevapta ve tümörü değerlendirmede faydalı bir yöntemdir(8).



Şekil 2-1: Kemiğin yapısı(9)

Ekstremitenin osteojenik sarkomasına sahip hastalar, yumuşak doku şişmesinden önce ağrıdan şikayet ederler. Periosteumun esnemesi genellikle tümör farkedilmeden önce acıya sebep olur. İkinci genel şikayet ise, yumuşak doku kitlesi ile alakalı olan şişmedir. Her ne kadar OS'nin çoğunda yumuşak doku uzaması görülse de

bazı hastalar şişmeden şikayet ederler. Kilo kaybı, beniz solgunluğu, ateş ve anoreksia gibi sistemik semptomlar nadir görülür(5).

Hastalığın tedavisinde; mikrometastazları önlemek amacıyla uygulanan adjuvant kemoterapi ile beş yıllık sağ kalım % 20 civarındadır(10). Her ne kadar, malignitesi değişmese de modern adjuvant kemoterapi ile sağ kalımı üç katından daha fazla uzamış olup ekstremitte koruyucu cerrahi kolaylaştırmıştır(11).

2.1.3. Etiyoloji

OS etiyojisi tam olarak bilinmemektedir. İnsanda OS'ye neden olduğu bilinen tek çevresel ajan iyonize radyasyondur(12). Radyasyon, OS'lerin yaklaşık % 2'sinde vardır. Radyasyonla indüklenen OS'nin artan insidansı, primer ışınlamadan sonra daha uzun bir hayatta kalma ile ilişkilidir(5).

Bazı ailelerde, bu tümöre genetik yatkınlığı olan birden fazla sayıda birey gözlenebilir(13). Şimdiye dek, en güçlü genetik yatkınlık kalıtsal retinoblastoma hastalarında görülür(14).

Sarkomlarda genetik değişimler ikiye ayrılır;

- a) Dengeli karyotipler ile beraber çift taraflı translokasyonlar ve tümör baskılayıcı gen yolaklarında görülen değişimler,
- b) p53 ve retinoblastoma (Rb) gen yolaklarının değişimi ile dengesiz karyotipler(15).

Her ne kadar OS etiyojisi çok az bilinse de tümörler genellikle ergen yetişme atağı gibi yüksek kemik turnoverının olduğu dönemlerde gelişir(2). Bunun yanında, tümör supresörler ve onkogenlerin mutasyonu, kromozomal amplifikasyonlar, delesyonlar ve translokasyonlar gibi bir çok genetik ve sitogenetik anormalilerle OS ilişkilidir(1,2,16). En yaygın değişimler kromozom -1, -9, -10, -13 ve -17 ile bağlantılıdır veya p53 ve Rb genleri ile ilgilidir(1). Rb, hücre döngüsünün G1/S fazının düzenleyicisidir(17). p53 (TP53) ise hücre döngüsünü düzenleyen bir diğer transkripsiyon faktörü olup DNA hasarına karşılık olarak artış gösterir ve hücre döngüsünü hasar onarılan kadar durdurur ya da apoptoza götürür(18). p53 ve Rb geninin germline mutasyonları nadir olarak görülmesine rağmen, OS tümör örneklerinin çoğunda başkalaşmışlardır(15). OS ile bağlantılı genetik ve epigenetik değişimlerin,

hücreleri farklılaşmamış prokürsörler olarak bloke ederek osteojenik farklılaşma ile alakalı sinyal yollarını değiştirmesi olasıdır(1).

2.1.4. Metastatik Hastalık

OS hastalarının % 15-20'si radyografik olarak tespit edilebilen pulmoner metastazlara (akciğer yerleşimli) sahip iken % 80'i radyografik olarak tespit edilemeyen mikrometastazlara sahiptir. OS metastazı için en yaygın bölge akciğerler olduğu gibi diğer kemik ve yumuşak dokularda da oluşabilir. Bu pulmoner lezyonlar OS ile ilişkili ölümden sorumludur. Ancak hastalar yüksek mikrometastazlar sebebiyle operasyon öncesi ve sonrasında kemoterapi alırlar. Tespit edilebilen metastazları olmayan hastalar % 70 hayatta kalma oranına sahiptir(1,2,19).

OS'nin nüksetmesi çoğunlukla akciğerde görülür. Bu durumda mümkün olduğunca cerrahi tedavi uygulanmalıdır. Metastatik pulmoner lezyonların komple kesilip alınmasını takiben % 20-45 ve diğer bölgelerdeki metastazların % 10-15 oranıyla bir sağ kalıma sahiptir(20,21).

2.1.5. Sınıflandırma

OS çeşitli tiplerde ekstrasellüler matriks üretebildiğinden ve değişik farklılaşma derecelerine sahip olduğundan, histolojik paterni sadece olaydan olaya değil ayrıca aynı vakada bölgeden bölgeye de değişiklik gösterir. Klein ve ark. OS'yi sadece predominant histolojik paternine göre değil anatomik lokasyonuna ve gradına göre de sınıflandırmışlardır(7). Ama günümüzde Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün yaptığı sınıflandırma sistemi kullanılmaktadır (Tablo 2-1). Bu sınıflandırma, anatomik lokalizasyon, histoloji, grad gibi kriterler göz önüne alınarak yapılmıştır(2,22).

OS'de histolojik gradlama tümörün onkolojik derecelendirilmesinde ve cerrahiye ek olarak adjuvant tedavide önemlidir(23).

a- Konvansiyonel OS

Konvansiyonel tip OS en sık görülen tiptir. Uzun kemiklerin metafizinde yerleşen, büyüme ile ilişkili olduğundan adolesan (ikinci dekatta) dönemde görülen yüksek gradlı bir sarkomdur(2,7,24). Bu tip OS üç sınıfa ayrılır; osteoblastik, kondroblastik ve fibroblastik. Osteoblastik; osteoid matriksi dominant, küçük yuvarlak, iğsi hücreler veya multinukleer büyük hücrelerden oluşan malign osteoblastlardan oluşan OS'nin en çok görülen tipidir(2,7,24,25).

Kondroblastik; kondroid matriks baskın ve iğsi hücrelerden oluşan tipi iken fibroblastik; minimal kemik veya kıkırdak matriks içeren ve iğsi hücrelerden oluşan tiptir(25).

Tablo 2-1: OS'nin alt tiplerinin sınıflandırılması(25)

-
1. Konvansiyonel OS
 - a-Kondroblastik OS
 - b-Fibroblastik OS
 - c-Osteoplastik OS
 2. Telenjektatik OS
 3. Küçük hücreli OS
 4. Düşük gradlı santral OS
 5. Sekonder (Paget hastalığı) Osteosarkomlar
 6. Parosteal OS
 7. Periosteal OS
 8. Yüksek gradlı yüzeyel OS
-

b- Telenjektatik OS

Bu tip OS radyografik ve histolojik olarak anevrizmal kemik kistini andıran bir OS türüdür. Lezyon genellikle radyolusen kemik yıkımı üretir ve ilgili kemiğin asimetrik büyümesi gözlenir. Telenjektatik OS, anevrizmal kemik kisti gibi sıklıkla osteoklast benzeri büyük hücre odaklarını içerir(26). Kemoterapinin uygulanmaya başlanmasıyla telenjektatik OS'nin prognozunun konvansiyonel tipler kadar iyi olduğu rapor edilmiştir(10).

c- Küçük hücreli OS

Bu tip OS, Ewing sarkom ve osteosarkomun histolojik özelliklerini içeren, dar sitoplazmalı küçük iğsi hücrelerden oluşan nadir görülen bir tiptir(27). Adjuvant kemoterapiye yanıtı düşüktür(28).

d- Düşük Gradlı OS

Fibröz stromaya eşlik eden mikrotrabeküler oseus matriks sebebiyle fibröz displazi gibi benign lezyonlara, düşük gradlı parosteal OS'ye ve kemik formasyonundan fakir olduğunda desmoplastik fibromaya benzerlik gösterir(29,30). Cerrahi olarak tedavisi konvansiyonel OS'ye göre daha iyi olmasına rağmen nüks ve sekonder yüksek gradlı OS görülme oranı yüksektir (31).

e- Sekonder (Paget Hastalığı) Osteosarkomlar

Yaşlılarda sık görülen prognozu kötü olan tiptir. Cerrahi tedavi zordur(32).

f- Parosteal OS

Osteosarkomların % 4'ünü oluşturan kemik yüzeyinden kaynaklanan düşük gradlı bir tiptir(33). Konvansiyonel OS'ye nazaran üçüncü dekatta meydana gelen, bayanlarda daha fazla görülen femur distalinin arka kısmına yerleşen bir sarkomdur(34).

g- Periosteal OS

Kemik yüzeyinden kaynaklanan, kıkırdak yapısında, parosteal OS'ye göre daha nadir görülen, genelde uzun kemiklerin diafiz ve metafiz-diafiz birleşiminde yerleşen yüksek gradlı bir sarkomdur(35).

h- Yüksek Gradlı Yüzeyel OS

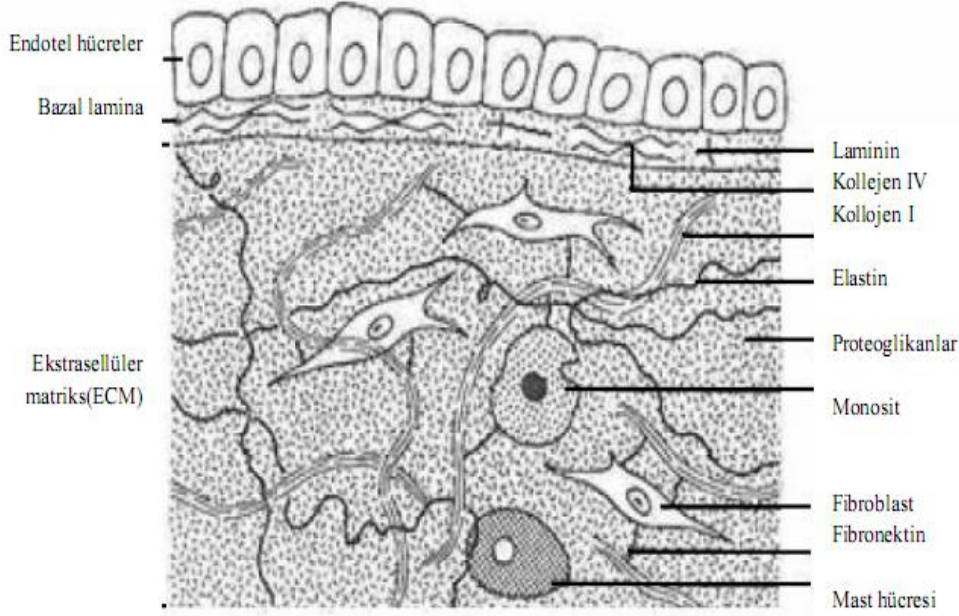
Yüzeye yerleşip korteks harabiyetine ve yeni kemik oluşumuna neden olur. Konvansiyonel tipe benzerlik gösterir(7,25).

2.2. Ekstrasellüler Matriks

Ekstrasellüler matriks (ECM), proteinleri ve proteoglikanları içeren, organizmaya yapısal destek sağlayıp, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve hücre göçü ile yapışma ve doku morfogenezi gibi biyolojik aktiviteleri olan bir yapıdır(36).

ECM yapısı iki kısımdır; bazal lamina ve bağ dokusu (Şekil 2-2). Bazal lamina, epitel ve endotel hücrelerini bağ dokudan ayıran ekstrasellüler yapıdır. Bağ dokusu ise, kollajen fibriller, glikoproteinler ve proteoglikanlardan oluşan bir yapıdır(37). Proteinler, proteoglikanların ve kollajen fibrillerin yüzeye yapışmasını sağlarlar.

Proteoglikanlar hücelere destek kazandırırken kollajen fibriller hücreye esneklik ve güç kazandırır(38).



Şekil 2-2: ECM'nin yapısı(38)

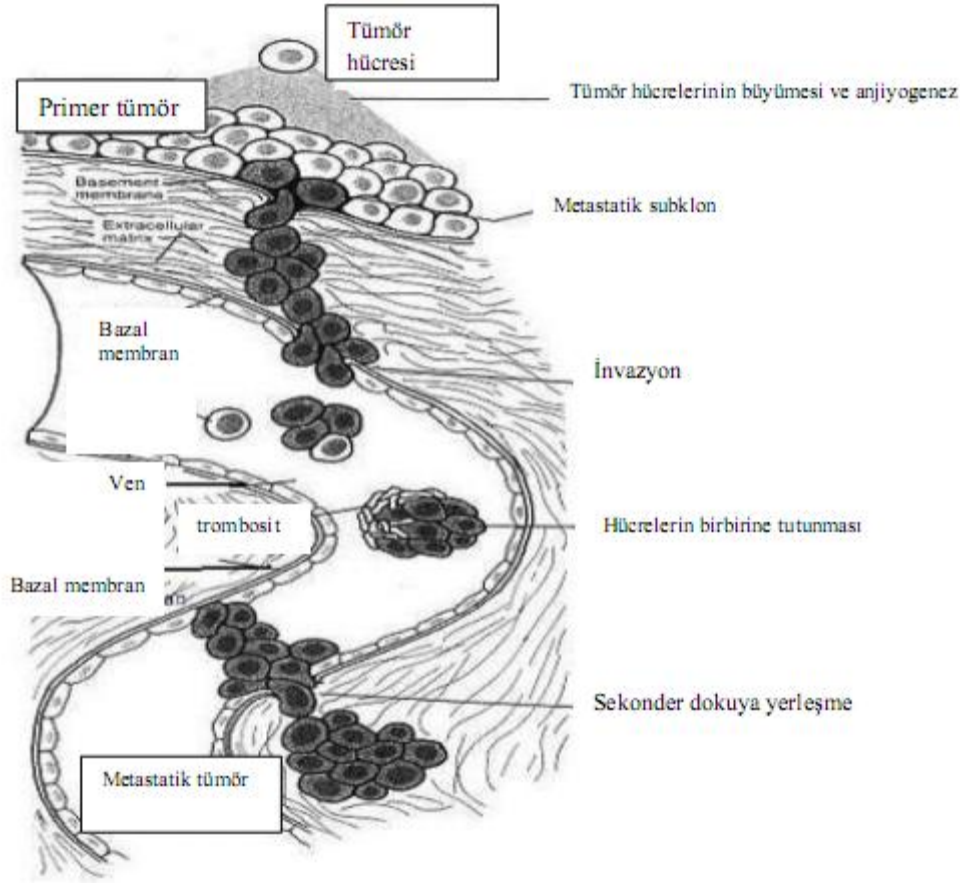
Ekstrasellüler matriks proteinleri, hücreye gelen sitosolik sinyallerin iletilmesinde direkt ve indirekt olarak önemli rol oynarlar(38).

2.2.1. Metastaz ve İnvazyon

İnvazyon ve metastaz kansere bağlı ölümden en önemli nedenlerdir. Kontrolsüz hücre bölünmesine neoplazmik büyüme denir. Fakat bu kontrolsüz büyümenin malign karakter kazanması için hücrelerin komşu dokulara invazyonu ve metastazı şarttır(39).

Metastazda öncelikle tümör hücreleri birbirinden ayrılır. Bu ayrılma kaderin adlı kalsiyum bağımlı transmembran proteininin azalması ile sağlanır(40,41). İntegrin adlı reseptör molekülleri sayesinde tümör hücreleri matriks komponentlerine tutunur. Bu sayede ekstrasellüler matrikse geçerler(40,41,42). Tümör hücrelerinin göç edebilmeleri için ekstrasellüler membranı ve matriksi geçmeleri gerekmektedir. Bu aşamada matriks metalloproteinazlar işlev görür(41). Dolaşıma katılan tümör hücreleri birbirlerine ve trombositlere yapışarak agregatlar oluştururlar. Bu agregatlar immün sisteme karşı

destek sağlarlar. Hücreler sekonder dokuya geldiklerinde adezyon molekülleri ile endotele yapışırlar. Böylece metastaz gerçekleşmiş olur (Şekil 2-3)(37).



Şekil 2-3: Metastaz(41)

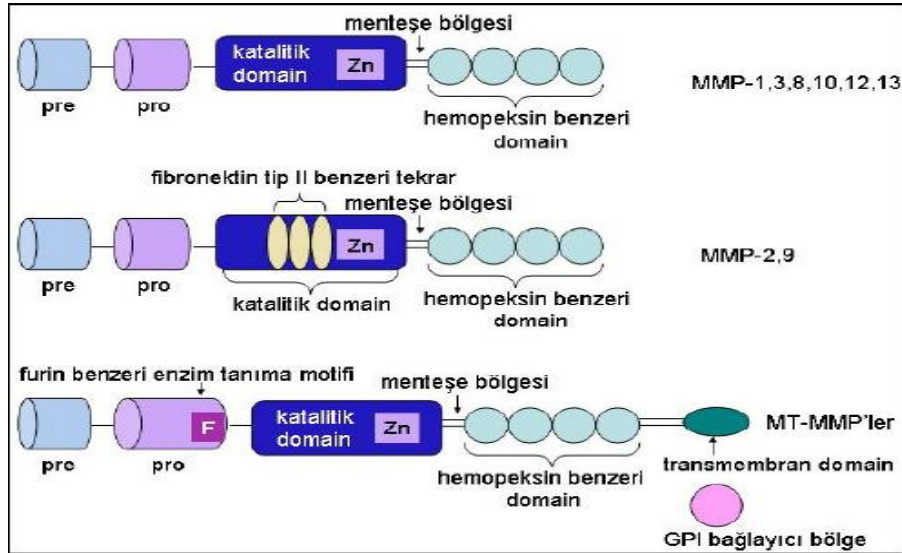
2.3. Matriks Metalloproteinazlar

Metastaz gelişiminde, doku inhibitörleri ile dengelenen matriks metalloproteinazlar (MMP), ECM ve bazal membranın parçalanmasıyla önem kazanırlar(43). MMP'ler, çinko (Zn) ve kalsiyum (Ca) bağımlı fizyolojik ve patolojik doku yıkımında görev alan endopeptidazlardır. Endotel hücreleri, makrofajlar, T lenfositler, lökositler, epiteliyal ve mezenşimal hücreler, nötrofiller ve osteoblastlar gibi hücrelerde çoğunlukla embriyogenez aşamasında eksprese edilirler. Doku gelişiminde ve farklılaşmasında, ovulasyon, hücre göçü, anjiyogenez ve bazı hastalıkların patolojilerinde rol oynarlar(44,45).

2.3.1. MMP Yapısı

MMP'ler ortak yapısal özelliklere sahiptirler. MMP'lerin tümü N terminalinde enzimin öncü dizilimi olan prodomen olarak tanımlanan, molekülü sekresyon için hedefleyen, daha sonra kaybolan sinyal peptid dizisi içerir ve 80-90 amino asid (aa) dizisinden oluşur. Bu bölgede aktif bölgedeki Zn atomuna karşılık olarak sistein bulunur ve enzim aktivitesini düzenlediği için sistein anahtarı olarak isimlendirilir(46). İkinci bölge olan prodomen enzimin latent formda kalmasından sorumludur ve aktivasyondan sonra çıkarılır. Prodomenin çıkarılması inaktif proenzimin aktif forma dönüşmesini sağlar(47,48,49). Bir sonraki kısım Zn^{++} bağlayan bölgeyi içeren katalitik domendir. Bu kısım bir Zn^{++} iyonu ve 2-3 Ca^{++} iyonu barındırır, stabilite ve aktivitenin oluşması için gereklidir(48). Çoğu MMP'ler C terminalinde hemopeksin benzeri domen içerirler(50). Bu bölge hem bağlar; N ve C kısımlarını bağlayan disülfid bağı içerir(49).

Katalitik domeni hemopeksin benzeri domene bağlayan peptid, prolin bakımından zengindir ve menteşe bölgesi adını alır(51). Bu yapıya ek olarak bazı MMP'lerde prodomen ile katalitik domen arasında enzimin hücre içi furin benzeri proteazlar tarafından tanınmasını sağlayan bölge vardır (Şekil 2-4)(52,53).



Şekil 2-4: MMP yapısı(54)

2.3.2. MMP'lerin Sınıflandırılması

MMP'ler substrat spesifiteleri, dizi benzerlikleri ve bölge organizasyonlarına göre altı gruba sınıflandırılırlar (Tablo 2-2).

Tablo 2-2: MMP'lerin sınıflandırılması(50,54)

Grup adı	Tanımlayıcı isim	Numara	Temel substrat
Kollajenazlar	İnterstisyel kollajenaz	MMP-1	Kollajen Tip 1, 2, 3, 7 ve 10, jelatin, PG
	Nötrofil kollajenaz	MMP-8	Kollajen Tip 1, 2, 3, PG
	Kollajenaz 3	MMP-13	Kollajen Tip 1, 2, 3
	Kollajenaz-4	MMP-18	Kollajen I
Jelatinazlar	Jelatinaz A	MMP-2	Jelatin, kollajen IV, V, VII; X, XI, elastin
	Jelatinaz B	MMP-9	Jelatin, kollajen IV, V, XIV, elastin, PG
Stromelisinler	Stromelisin 1	MMP-3	PG, laminin, FN, jelatin, kollajen III, IV, IX ve X
	Stromelisin 2	MMP-10	PG, laminin, FN, jelatin, kollajen III, IV, IX ve X
	Stromelisin 3	MMP-11	PG, laminin, elastin, entaktin, tenaskin, versikan, jelatin, kollajen III, IV, IX, X
Membran tipi MMP'ler (MT-MMP'ler)	MT1-MMP	MMP-14	Kollajen I, II, III, FN, laminin, VN
	MT2-MMP	MMP-15	Agrekan, FN, laminin, tenaskin
	MT3-MMP	MMP-16	Kollajen III, FN, jelatin
	MT4-MMP	MMP-17	Jelatin
	MT5-MMP	MMP-24	PG
	MT6-MMP	MMP-25	Kollajen IV, fibrin, FN, jelatin
Matrilisinler	Matrilisin 1	MMP-7	Serin proteaz inhibitörleri
	Matrilisin 2	MMP-26	Kollajen IV, FN, jelatin, VN
Diğerleri	RASI-1	MMP-19	Kollajen IV, entaktin, FN, jelatin, laminin, tenaskin
	Enamelisin	MMP-20	Agrekan, amelogenin
	X-MMP	MMP-21	Tanımlanmamıştır
	CA-MMP	MMP-23	Tanımlanmamıştır
	Metaloelastaz	MMP-12	Kollajen I, IV, elastin, FN, jelatin, laminin, VN
	UMMP (Horoz)	MMP-27	Tanımlanmamıştır
	Epilisin	MMP-28	Tanımlanmamıştır

PG: Proteoglikan. FN: Fibronektin. VN: Vitronektin.

a- Kollajenazlar

Bu enzimlerin temel özelliği N terminalinden itibaren interstisyel kollajen-I, -II, -III, ECM ve non-ECM moleküllerini parçalayabilmeleridir(50).

MMP-1 (Fibroblast Kollajenaz); latent formu 43 kDa, aktif formu 55 kDa ağırlığında olup interstisyel kollajeni parçalar(48).

MMP-8 (Nötrofil Kollajenaz); latent formu 75 kDa, aktif formu 58 kDa olan nötrofillerce sentezlenen artmış glikozilasyondan sorumlu üyedir(55).

MMP-13; kollajen-1'i yıkar.

b- Jelatinazlar

Bu enzimler kollajen ve jelatini kolayca parçalayabilirler. Katalitik bölgeye eklenmiş tip-II fibronektin tekrarlarına sahiptir(50).

MMP-2 (Jelatinaz A); latent formu 72 kDa, aktif formu 66 kDa ağırlığında olup, tip-I, -II, -III kollajeni, jelatin, laminin ve elastini parçalar(48,49,50).

MMP-9 (Jelatinaz B); latent formu 92 kDa, aktif formu 84 kDa ağırlığındadır ve bazal membran kollajeni için substrat spesifiktir(48,49,50).

c- Stromelisinler

MMP-3 (Stromelisin-1); latent formu 57 kDa, aktif formu 46 kDa ağırlığındadır(48). MMP-3'ün proteolitik etkisi fazladır. Proteoglikanlar, laminin, fibronektin, kollajen ve jelatini parçalamasının yanında pro-MMP'lerin bir kaçını aktifler. Bu aktivasyon MMP-1'in tam aktivasyonu için gereklidir(56). MMP-3, fibroblast ve kondrositlerde büyüme faktörleri, sitokinler ve tümör öncülleri ile indüklenir(49).

MMP-10 (Stromelisin-2); latent formu 57 kDa, aktif formu 46 kDa ağırlığındadır(48). Fibronektin, jelatin ve kollajeni parçalar.

MMP-11 (Stromelisin-3); substrat spesifiteleri ve aa dizileri ayrı olduğu için diğer MMP'ler sınıfına dahildir(50).

d- Matrilsinler

Hemopeksin domeninin eksikliği ile karakterize edilirler(50).

MMP-7 (Matrilsin-1) ve MMP-26 (Matrilsin-2) endometaz olarak isimlendirilirler ve bu gruba dahildirler. MMP-7, ECM komponentlerinin yıkımının yanısıra fosfoligand, protümör nekroz faktör, E-kaderin gibi hücre yüzey moleküllerinin üzerinde işlevseldir(50).

e- Membran Tip MMP'ler

Altı tane membran tip MMP (MT-MMP) vardır. Bunlardan dördü (MMP-14, MMP-15, MMP-16 ve MMP-24) transmembran proteinler, ikisi (MMP-17 ve MMP-25) glikozilfosfotidilinositol bağlı proteinlerdir. MT4-MMP haricinde pro-MMP'yi aktive yeteneklerine sahiptirler. Bu enzimler ECM komponentlerini parçalayabilirler. Bunun yanında MT1-MMP, tip-I,-II,-III kollajen üzerinde kollajenik aktiviteye sahiptir(57).

MT5-MMP beyne özgüdür ve temel olarak serebellumda eksprese edilir(58). MT6-MMP, menenjiomlar haricinde glioblastomalar, anaplastik astroblastomalar ve periferik kan lökositlerinde eksprese edilir(59,60).

f- Diğer MMP'ler

Metalloelastaz (MMP-12), temel olarak makrofajlarda eksprese edilir ve makrofaj göçü için gereklidir(61). Elastinin yanında diğer proteinleri de parçalar.

MMP-19, klonlanmış karaciğer cDNA'sında tanımlanmıştır ve romatoid artrit hastalarında otoantijen T-hücreleri gibi ayrılmıştır(62).

Enameylisin (MMP-20), amelogenin proteinini parçalar ve yeni oluşan diş minesinin içinde lokalize olur. Amelogenin imperfekta, MMP-20 klavaj bölgesindeki mutasyonlara bağlı diş minesini defektlerinin neden olduğu genetik bir hastalıktır(63).

MMP-22 ilk olarak tavuk fibroblastlarında tanımlanmıştır ve fonksiyonu bilinmemektedir(64).

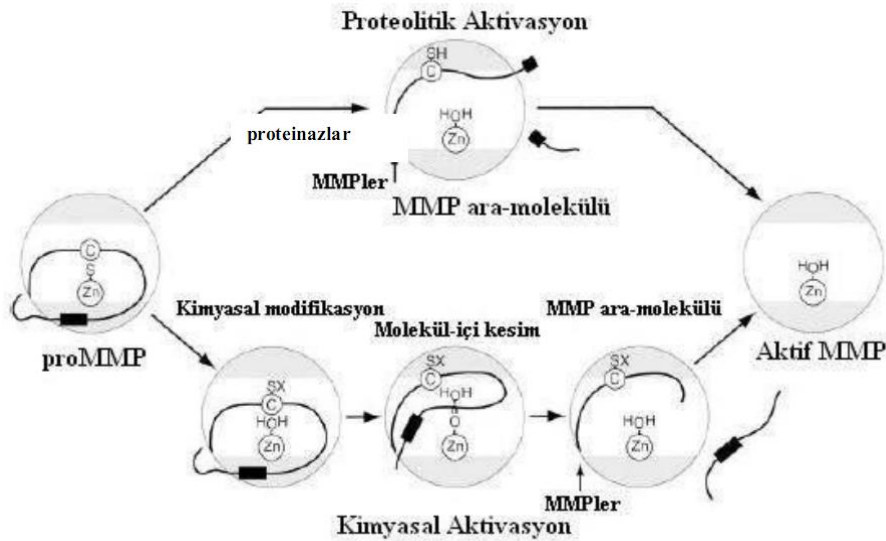
Sistein dizi MMP'si olarakta isimlendirilen MMP-23, genel olarak üreme dokularında eksprese edilir(65). Bu enzim sistein geçiş metafizinden yoksundur. Hemopeksin domeni bulunmaz, onun yerine imminoglobülin benzeri bir domen tarafından takip edilen sisteince zengin bir domene sahiptir(66).

MMP ailesine son eklenen epilisin (MMP-28), genelde keratinositlerde eksprese edilir(67). Hasarlı ve bozulmamış ciltte ekspresyon proteinleri, yara tamiri ve doku homeostazında MMP-28'in fonksiyonunun olabileceği ileri sürülmüştür(68).

2.3.3. MMP Aktivasyonu

MMP'lerin çoğunluğu pro-MMP olarak ekstrasellüler alana salgılanır ve gerek duyulduğunda aktive edilirler. MMP aktivasyonu adım adım gerçekleşir. MMP'ler proteinazlar veya tiyol modifiye edici ajanlar, sodyum dodesil sülfat (SDS), reaktif oksijen gibi kimyasal ajanlar tarafından in vitro aktive edilebilirler. Düşük pH ve ısı, aktivasyonu artırabilir. Bu ajanlar sistein anahtarında bulunan sistein-çinko etkileşimini bozarlar(69,70). İlk proteolitik atak, birinci ve ikinci heliks arasındaki döngüsel bölgeye maruz kalan alanda gerçekleşir. Halka bölgesinin bölünme spesifitesi her MMP'de bulunan dizi tarafından belirlenir(50). Propeptidin bir kısmı çıkarıldığında propeptidin geri kalanı destabilize olur ve sistein anahtarı-çinko etkileşim bozukluğu kısmen aktif MMP veya aktif MMP'ler tarafından intermoleküler işleme izin verir. Böylece son basamak bir MMP tarafından kontrol edilir(50,56).

Pro-MMP'ler inaktif zimojenler olarak salgılanır ve proteinazlar ve non-proteolitik ajanlar tarafından aktive edilirler (Şekil 2-5).



Şekil 2-5: MMP aktivasyonu(50)

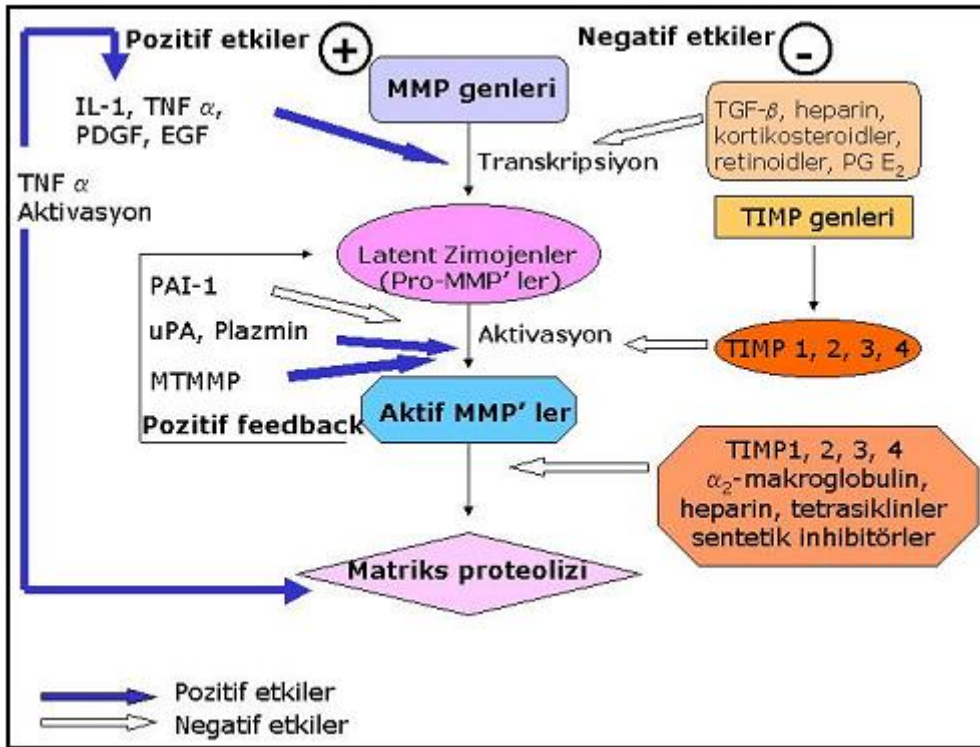
(Gri olarak gösterilen bölge katalitik domen, beyaz bölge çinko bölgesinin de dahil olduğu aktif bölgedir. Propeptid siyah bölgede şematik bir biçimde gösterilmiştir ve buraya halka bölgesi ve sistein anahtarı dahil edilmiştir.)

Halka bölgesinin bölünmesi ile proteinaz aktivasyonu sağlanır, bu da kısmen MMP aktivasyonuna yol açar. İntermoleküler işlem tarafından propeptidin kaldırılmasıyla tamamen aktivasyon sağlanır. Kimyasal aktivasyon sistein anahtarı sülfidril etkileşimine

dayanır ve propeptidin intramoleküler bölünmesi ve MMP'nin kısmen aktivasyonu ile sonuçlanır. İntramoleküler işlem tarafından propeptidin geri kalanının çıkarılması ile tam aktivasyon sağlanır(50).

2.3.4. MMP Aktivasyonunun Düzenlenmesi

MMP'lerin proteolitik aktiviteleri üç basamakta düzenlenir; transkripsiyon, proenzim aktivasyonu ve enzim aktivitesinin inhibisyonu (Şekil 2-6).



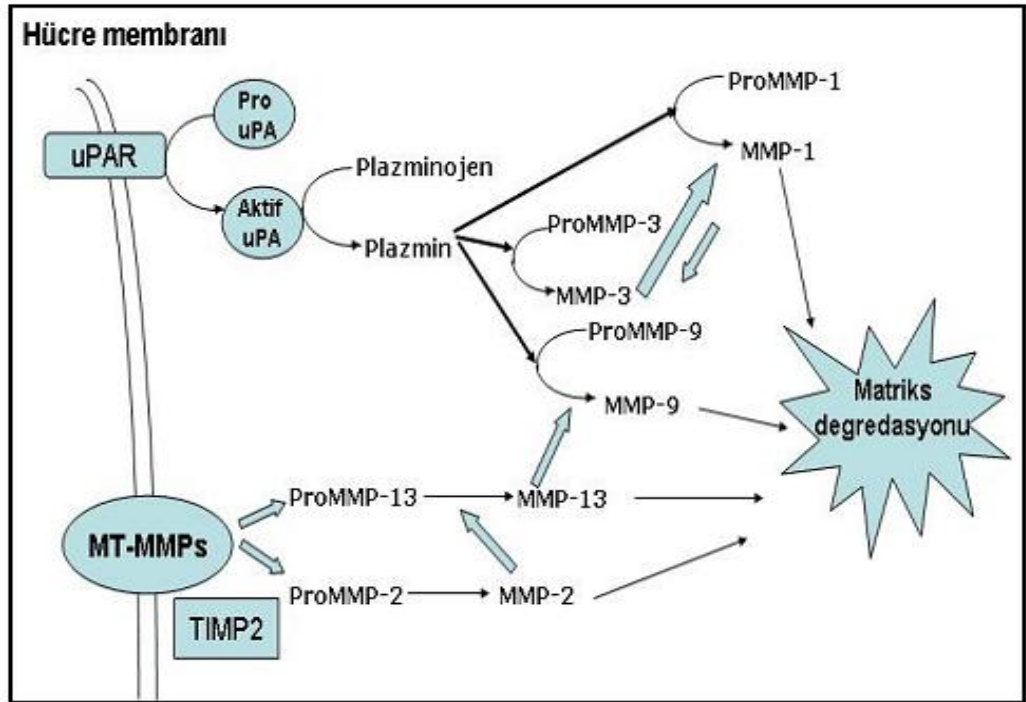
Şekil 2-6: MMP aktivitesinin düzenlenmesi(54)

1- Transkripsiyonel Düzenleme

MMP gen ekspresyonu; büyüme faktörleri, sitokinler/epidermal büyüme faktörleri (EGF), tümör nekrozis faktör (TNF-α), interlekin-1 (IL-1) gibi büyüme faktörleri ve hormonlar ile uyarılır. Transforme edici büyüme faktörü (TGF-β), heparin, prostaglandin E₂ (PGE₂) ve diğer eikozanoidler ile ise ekspresyon inhibe olur(47,52).

2- Proenzim Aşamasında Düzenlenme

Peptid bölgesindeki sistein sülfidril grubu ile çinko iyonu arasındaki etkileşim, latentliği sürdürür. Temel fizyolojik aktivatör plazmindir. Plazmin, ürokinaz-tip plazminojen aktivatörü (uPA) tarafından aktiflenir. Bu aktivatör, aterosklerozda ve doku remodellenmesinde de rol oynar. Plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1), uPA üzerinde inhibitör etkisi gösterir ve aktivasyon kaskadı ile zıt çalışır(71). uPA aracılı aktivasyon kaskadında bir MMP diğer MMP'yi aktifler. Plazmin, pro-MMP-1,-3,-9'u aktifler. Daha sonra MMP-3, pro-MMP-1'i aktifler. Aktifleşen MMP-1, MMP-9'u aktif forma dönüştürür. MT-MMP'ler diğer MMP'lerin aktivatörüdürler. MMP-2,-9 makrofajlar tarafından üretilen serbest radikallerin etkisiyle aktifleşirler (Şekil 2-7)(71,72).



Şekil 2-7: MMP aktivasyon kaskadı(54)

3- Enzim Aktivitesinin İnhibisyonu

MMP'leri inhibe eden bazı moleküller vardır. Bunlardan biri, proteinaz inhibitörü olan fakat molekül ağırlığı fazla olduğu için dokulara girişi zor olan α -makroglobülinidir. Ayrıca aktif MMP-2'ye bağlandığında enzimin hareket yeteneğini azaltır(47,73).

Bunun yanında MMP'lerin spesifik doku inhibitörleri (TIMP), MMP aktivitesini düzenlerler. MMP ve TIMP'ler arasındaki denge ECM homeostazı için çok önemlidir. TIMP'ler, kemik remodellenmesinde, doku hasarı, anjiyogenez ve metastazda önemli rol alan, birçok doku ve vücut sıvılarında bulunan, MMP'lere geri dönüşümsüz non-kovalent 1:1 oranında bağlanan, MMP'leri inhibe edici büyük N terminal kısım ve proenzimlerle kompleks oluşturan küçük C terminaline sahip olan moleküllerdir(47,74,75). TIMP'ler, vasküler düz kas hücreleri, endotel hücreleri, kan hücreleri, makrofajlar ve bağ dokusu hücreleri tarafından sentez edilirler(72). Bugüne kadar tanımlanmış dört tip TIMP vardır. TIMP-1, 28 kDa ağırlığında, yapısında disülfid bağı bulunduran, glikolizasyon ile aktive olan, genelde makrofajlarda sentezlenen özellikle MMP-1,-3 üzerinde etkili bir proteindir(76,77). TIMP-1'in, metalloendopeptidazlar üzerinde inhibitör etkisi yoktur(73). TIMP-2, 21 kDa ağırlığında, non-glikolize, makrofajlarda ve tek başına sentezlenebilen bir inhibitördür. MMP-2'yi inhibe eder(75). TIMP-3, 21 kDa ağırlığında, hücrelerin ekstrasellüler matriksten ayrılmasını kolaylaştıran non-glikolize proteindir(76). Son tanımlanan TIMP-4, MT-MMP'leri inhibe etme yeteneğine sahip proteindir(78). Bunun yanısıra, sentetik MMP inhibitörleri bulunmaktadır. Bunlardan bazıları marimastat, kanser blokeri batimastat ve kloronattır(79).

2.3.5. MMP'lerin Çeşitli Patolojik ve Fizyolojik Durumlarla İlişkisi

Kanser invazyonunda ECM'nin ve bazal membranın parçalanması önemlidir. Bu parçalanma proteolitik enzimlerle sağlanır. Bu enzimlerden biri de MMP'lerdir. MMP'ler bir çok hücre tarafından eksprese edilir. MMP'ler tümör mikroçevresini regüle ederler. MMP'ler büyüme faktörlerinin aktivasyonunu, proteinleri birleştiren büyüme faktörlerinin inaktivasyonunu; hücre göçü, anjiyogenez ve hücre proliferasyonuna yol açan proteinleri ve ECM bileşenlerini hareket ettirerek hem primer tümör büyümesini hem de metastazı uyarırlar. Bu işlemi ECM'yi degrade ederek gerçekleştirirler(80). Kanser sürecinde MMP'lerin etkisi üç aşamada gerçekleşir; tümör

anjyogenezi, gelişimi ve metastazı(79). MMP'ler hücre büyüme ve çoğalmasını üç farklı yolla gerçekleştirirler. Birincisi, büyüme faktörlerini serbest bırakırlar, ikinci olarak peptid büyüme faktörlerini aktiflerler ve üçüncü aşamada ise ekstrasellüler alandaki etkisi ile integrinlerle birlikte hücre çoğalmasını tetiklerler(81,82,83).

Tümör hücreleri fibroblastların MMP üretimini tetikleyen faktörler üretir. Farklı MMP'ler değişik tümör gelişim evrelerinde bulunurlar(52).

Bir tümörün büyümesi için anjyogenez gereklidir. Bu süreç kılcal damarları saran bazal membranın degradasyonu ile başlar endotelial hücrelerce kuşatılan stroma invazyonu ile devam eder. MMP'ler, endotelial hücre invazyonuna olanak tanıyarak ve anjiyogenetik fenotipi uyaran serbestleştirici faktörlerle bu işleme katkı sağlarlar(80).

Ayrıca MMP'lerin kanserle alakalı olarak apoptotik ve antiapoptotik etkisi vardır. MMP-3,-7,-11 laminini yıkıma uğratarak apoptozu düzenlerler(84).

Aterosklerozda MMP'lerin etkileri vardır. MMP'ler kardiovasküler remodelizasyonla sonuçlanan ECM'yi degrade eder ve vasküler duvarın zayıflamasına neden olurlar(80). MMP gen promotöründeki bir polimorfizmin, koroner kalp hastalığına duyarlılıkta etkili olduğu ileri sürülmüştür(85).

Anjiyotensin II'nin, MMP aktivitesini inhibe özelliği vardır. Anjiyotensin II ve aldosteron kollajenin MMP ile parçalanmasını engelleyerek kollajen matriksin yapımında rol alır(86).

Malign beyin tümörlerinin invazyonunda interstisyel kollajenaz, jelatinaz ve stromelisinler rol alırlar(87). MMP ekspresyonundaki artış Alzheimer hastalığına ve malign gliomalara neden olur(88).

Peridontal hastalıklarda, dişeti hastalıklarında, kollajenaz aktivitesinin arttığı görülmüştür. MMP-20, amelogenin proteinini parçalayarak amelogenin imperfektaya neden olabilmektedir(63).

2.3.6. MMP'lerin OS İnvazyonuna Katılmaları

Normal kemikte matriks devamlı olarak aşınmaya uğrar ve yeni bir matriks ile değiştirilir. Bu işlem kemik aşınması ve sentezi arasında düzenli bir dengeyi gerektiren bir süreçtir(89). MMP'ler, plazminojen aktivatörleri ve katepsinler gibi proteolitik enzimler ile beraber bu süreçte önemli rol oynarlar(90,91). Knock-out gen çalışmaları normal iskelet gelişimi için MMP'lerin önemini vurgulamıştır(92,93). MMP'ler kollajen, proteoglikan, fibronektin ve laminin gibi kemik matriksinin çeşitli komponentlerini degrade ederler. Ayrıca ekstrasellüler çevrede alterasyonlar başlatabilir ve dolayısıyla hücre aktivitesini etkilerler. TGF- β 'nın kemik matriksinden, IL- β ve kalsiton parçalanmasında salınımı örnek olarak verilebilir. MMP'ler bazal membranı parçalamak suretiyle metastatik sürece dahil olurlar ve invazyon ve metastaza katkı sağlarlar. MMP'ler, ECM'de yer alan büyüme faktörlerinin biyoyararlılığını çoğaltarak tümör büyümesini kolaylaştırırlar. Anjiyogenezde önemli rol oynarlar. Akciğer, kolon, meme, prostat ve pankreas kanseri gibi malign tümörlerde ekspresyonları artar. Klinik kanıtlar, bu tümör çeşitlerinde MMP'lerin aşırı ekspresyonunun teşhisi zorlaştırdığını göstermiştir(94).

OS kemik dokusunun formasyonundan karakterize edilen malign kemik tümörü olup çocuklarda ve yetişkinlerde görülür(95). OS büyümesi, gelişmiş sabit kemik yıkımı ve oluşumu ile beraber olduğu için proteolitik enzimlere bağlı bir süreçtir. MMP/TIMP homeostazının bozukluğu OS için risk teşkil etmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda insan OS hücre hatlarında, ksenografilerde ve biyopsilerde MMP ve TIMP'lerin önemi vurgulanmaya çalışılmaktadır(94).

2.4. MMP-3 (Stromelisin-1)

Latent formu 57 kDa, aktif formu 46 kDa ağırlığında olan ve ECM komponentleri ile beraber kollajen, proteoglikanlar, laminin, fibronektin, jelatin ve elastini degrade eden, MMP ailesinin önemli bir üyesidir. Ayrıca çapraz bağlı fibrini yıkma yeteneğine de sahiptir. Aynı zamanda insan fibroblast stromelisini olarakta bilinmektedir(96). MMP-1,-7,-8,-9 gibi MMP'leri inaktif formdan aktif forma dönüştürür(97). Stromelisin üretimi fibroblast ve kondrositlerde büyüme faktörleri, sitokinler ve tümör promotörleri ile indüklenir(36).

MMP-3 ekspresyonu normal dokularda düşüktür fakat tümör formasyonu boyunca değişir. ECM'nin remodellenmesinde önemli rol oynar(98). Transkripsiyonel

aşamada hücre-hücre ilişkisi ve sitokinler ile regüle edilir(99). Karsinogenezde MMP-3 ekspresyonu ilk olarak transkripsiyon aşamasında düzenlenir, fakat tümör hücrelerinin yanısıra tümör-infiltratuar inflamatuvar hücrelerinde sentezlenen sitokin ve büyüme faktörlerine cevapta mRNA stabilitesine ait bazı kanıtlar öne sürülmüştür(52). MMP-3 transkripsiyonu baş ve boyun squamoz hücre karsinomalarında, akciğer ve meme kanserlerinin malignant tipinde yüksek olarak bulunmuştur(100). MMP-3'ün beyin gliomaları patogenezinde rolü olduğuna dair bazı çalışmalar vardır. Ekspresyonun tümör gradında artması beynin hiyaluronik asitçe zengin matriksini degrade eder ve glioma hücrelerinin invazyonu ve göçüne öncülük eder(101,102).

MMP-3'ün hasarlı arter duvarlarında MMP-2 ve -9'un aktivasyonu ve ekspresyonunda da potansiyel olarak fiziksel bir rolü bulunur(103). MMP-3, plazminojen ve uPA arasında spesifik moleküler bir etkileşim vardır. Bu sayede MMP-3 hücre fibronolitik aktivitede rol alır(104). Ayrıca insan koroner aterosklerozisinde, in-situ hibridizasyon çalışmaları, aterosklerotik plaklarda, köpük hücrelerinde, makrofaj ve düz kas hücrelerinde MMP-3 ekspresyonunun arttığını göstermiştir(105). Koroner müdahaleler sonrasında restenozun gelişiminde de rol alır(97).

MMP-3 geni 10 ekzonlu 13,003 bp uzunluğunda 11q22.3 kromozomunun uzun kolunda MMP-1 genine bitişik halde bulunur. Genin % 92 dizilemesi yapılmıştır ve 8-9 kadar tek nükleotid polimorfizmi (SNP) tanımlanmıştır(106,107). MMP-3 genindeki farklı polimorfizmler tümör gelişim ve invazyonunda değişik tip tümörlerde farklılık gösterir. Meme kanserinin lenfatik metastaz ve gelişimi riski ile ilişkilendirilmiştir. Fakat ovaryum kanseri ve miyokardial infarksiyon riski ile bir bağlantı kurulamamıştır(107,108). Son çalışmalar göstermiştir ki, MMP-3 polimorfizmi boyun ve baş squamoz hücre karsinomalarında neo-adjuvant kemoterapiye cevapta prediktif faktör olarak belirtilmiştir(109).

MMP-3 E45K polimorfizminde genin 2.ekzonunda rol alan A/G baz değişimi lizin/glutamat amino asit değişimi ile sonuçlanmaktadır. Bu değişim polipeptid zincirinin 45. pozisyonunda meydana gelmektedir. Pro-MMP-3'ten olgun MMP-3 oluşumu aşamasında başlangıçtaki ilk 82 peptid kesilerek atılmaktadır. Yapılan çalışmalarda propeptidin kesilmesi glutamat/lizin varlığına bağımlı olabileceği ileri sürülmüştür ki, bu durum olgun MMP-3 oluşmasında azalmaya neden olur. T102T

polimorfizmde ise genin 371. pozisyonunda C/G baz değişimi gözlenmektedir. Ancak bu değişim proteinde herhangi bir amino asit değişimine yol açmamaktadır(110).

Tüm bu bilgiler ışığında çalışmamızda MMP-3 geni E45K ve T102T polimorfizmlerinin osteosarkom hastalarındaki dağılımı ve etkinliğini incelemeyi amaçladık.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Seçilen Örneklerin Tanımı

Bu çalışma iki örnek grubu üzerinde yapılmıştır. Birinci grup İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği tarafından takip edilen yaş ortalamaları $23,60 \pm 8,61$ olan osteosarkom tanısı konmuş 54 (24 kadın ve 30 erkek) hasta çalışmaya dahil edilmiştir.

İkinci grup kontrol grubu olmak üzere kendisinde ve birinci derece akrabalarında kanser görülmeyen yaş ortalamaları $27,03 \pm 8,97$ olan 81 (50 kadın ve 31 erkek) sağlıklı birey normal popülasyonu örnek olarak kullanılmıştır.

Seçilen vakalardan 10ml.lik kan örnekleri EDTA'lı ve kuru tüplere toplanmıştır. EDTA'lı tüplerdeki periferik kan lökositlerinden elde edilen DNA örneklerinde MMP3 geni üzerinde bulunan E45K ve T102T polimorfizmlerini saptamak için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Restriksiyon Fragmanı Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) ve agaroz jel elektroforezi teknikleri kullanılmıştır.

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Agaroz, Amonyum asetat, Amonyum klorür, Asetik asit, Borik asit, dNTP seti, EDTA (dihidrat), Etanol (%99), Brom fenol mavisi, Etidyum bromür, Mineral yağ, Potasyum bikarbonat, Sodyum dodesil (lauril) sulfat, Sodyum hidroksit, Potasyumdihidrojenfosfat, Sodyum klorür, Tris baz, Taq DNA polimeraz, DNA marker (50-100 bp DNA size marker), Proteinaz K, Potasyum hidroksit, restriksiyon enzimleri (Taq I ve Acl I), primer dizileri.

Genotiplendirmede Kullanılan Primer Dizileri

MMP3, E45K ve T102T polimorfizmlerini içerdiği bilinen hedef diziler spesifik primerler kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltıldı. Çalışmada kullanılan primerler tablo 3-1'de gösterilmiştir.

Tablo 3-1: MMP3, E45K ve T102T polimorfizmleri spesifik primerleri

Varyasyon	Primer Dizisi	Ürün Boyutu
E45K	F-5'- AAATTTGCCATTATTTTCAGCAAG -3'	399 bp
	R-5'- CCCCTCTGAACCATTACCTG -3'	
T102T	F-5'- GTTCCTTGGATTGGAGGTGA -3'	237 bp
	R-5'- CCTGTAGGAGAAAAATTGAAGCA -3'	

3.3. Kullanılan Gereçler

Thermal Cycler cihazı (Gold Plate), Otoklav, Etüv, Hot plate, Dijital Görüntüleme sistemi, Elektroforez için güç kaynağı (E-C Apparatus Corporation), Hassas terazi (Mettler), Polaroid kamera (Kodak), Isıtcılı manyetik karıştırıcı (Elektromag), Mikrodalga fırın (Philco), Mikrosantrifüj, pH metre (Hanna), Pipet takımı (Eppendorf), Falkon santrifüj (Hettich), Spektrofotometre (Biochrom-S2100 diode array spectrophotometer), Su banyosu (Elektromag), UV transilluminator (Stratagene UV/White light Transilluminator), Elektroforez Sistemi (E-C 400 P).

3.4. Çözeltiler

3.4.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

3.4.1.1. Eritrosit Parçalama Tamponu (Lysis Buffer)

8,74 gram amonyum klorür, 1 gram potasyum bikarbonat, 200µl 0,5 molarlık etilen diamin tetra asetat (EDTA)'nın tartımları yapılarak erlen içine alınır. 900ml ddH₂O eklenir ve çözeltinin pH'sı bir normal sodyum hidroksit çözeltisi ile 7.4'e ayarlanır. Daha sonra balon joje içine alınarak bir litreye tamamlanır. Çözelti ısıya dayanıklı cam şişeye alınarak 120°C'ye alınarak 15 dakika otoklavda steril edildikten sonra +4°C'de saklanır.

3.4.1.2. 0,5 M Disodium Etilen Diamin Tetra Asetat (EDTA) (pH:8.0)

186,1 gram etilen diamin tetra asetat tartılarak beher içine alınır ve 800ml ddH₂O eklendikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürülür ve pH'sı sodyum hidroksit çözeltisi ile 8,0'e ayarlanarak ddH₂O ile 1lt'ye tamamlanır. Çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir.

3.4.1.3. 4 Molar Sodyum Klorür (NaCl) Çözeltisi

233,6 gram sodyum klorür tartılarak erlene alınır. Üzerine 800ml ddH₂O ilave edildikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözündürülür. Balon jøjeye aktarılarak 1lt'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir.

3.4.1.4. Lökositleri Parçalama Tamponu (White Blood Cell Buffer-WBL)

25ml 4M sodyum klorür ve 50ml 0.5M etilen diamin tetra asetat (EDTA) direkt balon jøjeye aktarılarak 1lt'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildikten sonra oda ısısında saklanır.

3.4.1.5. 1 Molar Tris Tamponu (Stok)

121,1 gram Tris baz tartılarak bir behere alınır. Üzerine 42ul hidroklorik asit ile yaklaşık 800ml ddH₂O eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözündürülür. Daha sonra balon jøjeye aktarılır ve 1lt'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir.

3.4.1.6. 9,5 Molar Amonyum Asetat Çözeltisi

73,22 gram amonyum asetat tartılarak beher içine alınır. Üzerine 80ml ddH₂O eklenerek manyetik karıştırıcıda çözündürülür. Balon jøjeye aktarılır ve ddH₂O ile 100ml'ye tamamlanır. 0,22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edilir ve +4°C'de saklanır.

3.4.1.7. %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisi

10 gr sodyum dodesil sülfat tartılır. SDS tozlarını kaldırmamaya dikkat ederek beher içine alınır ve üzerine 80ml ddH₂O eklenir. Manyetik karıştırıcı yardımı ile çözündürülür ve pH'sı 7,2'ye ayarlanır. 0,22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edilir ve oda ısısında saklanır.

3.4.1.8. Proteinaz K (20 mg/ml)

20 mg proteinaz K tartılarak steril bir gode içinde steril ddH₂O ile 1ml'ye tamamlanır ve -20°C'de saklanır.

3.4.2. Agaroz Jel Elektroforezi'nde Kullanılan Çözeltiler

3.4.2.1. Etidyum Bromür (10 mg/ml)

10 gram etidyum bromür tartılarak steril ddH₂O ile 10ml'ye tamamlanır.

3.4.2.2. Agaroz Jel Yükleme Tamponu (5x)

20 gram Ficoll 400, 1gram SDS, 1,2ml 0,5 molarlık etilen diamin tetra asetat, 1ml 1molarlık Tris (pH 8.0), 200 mg Bromo fenol mavisi, 200 mg Ksilen siyanol tartılarak steril ddH₂O ile 100ml'ye tamamlanır. Oda ısısında saklanır.

3.4.2.3. 50x Tris - Asetik asit - Etilen Diamin Tetra Asetat (TAE) Tamponu

242 gram tris baz tartılarak bir behere alınır. Üzerine 57,1ml Glasiyal asetik asit ve 100ml 0,5 molarlık etilen diamin tetra asetat ve 800ml ddH₂O ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözündürülür. Balon jojeye aktarılarak 1 litreye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir ve oda ısısında saklanır.

3.4.2.4. 5X Tris-Borik Asit-Etilen Diamin Tetra Asetat (TBE) Tamponu

54 gram tris baz ve 27,5 gram borik asit tartılarak bir behere alınır. Üzerine 20ml 0.5 molarlık etilen diamin tetra asetat ve 800ml ddH₂O ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözündürülür. Balon jojeye aktarılarak 1 litreye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir ve oda ısısında saklanır.

3.5. Kullanılan Yöntemler

3.5.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

EDTA'lı tüplerle alınan 10ml.lik kan örnekleri çalışma için falkon tüplerine aktarılır. Üzerlerine 1:3 oranında lizis eklenerek +4°C'de 15dk. bekletilir. Daha sonra 1500rpm'de 10dk. santrifüj edilir ve süpernatant kısımları atılarak pelletler tamamen süspansiyon durumuna getirilir ve üzerlerine tekrar 15-20ml. lizis eklenir. Örnekler +4°C'de 15dk. bekledikten sonra 10dk. 1500 rpm'de santrifüj edilir. Süpernatant kısımları atılır ve süspansiyon olan pellet üzerine 500 µl %10'luk SDS, 75µl proteinaz K (20mg/ml) ve 9,4 ml lökosit parçalama çözeltisi eklenerek 56°C'de su banyosunda bir gece inkübe edilir. İnkübasyondan sonra her 1ml örnek başına 0,37ml olacak şekilde 9,5M'lık amonyum asetat çözeltisi eklendikten sonra karıştırılır ve 3000rpm'de 25dk santrifüj edilerek proteinler çöktürülür. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı temiz bir

falkona aktarılır ve üzerine 1:2 oranında %99'luk absöü alkol eklenir ve DNA'nın presipitasyonu sağlanır. Yoğunlaşan DNA'nın alkol yüzeyine çıkması beklenir ve DNA mikropipet ucuyla alınır. DNA %70'lik alkolde yıkanır ve korunmak üzere Tris-EDTA çözeltisinde çözündürölerek +4°C'de saklanır.

3.5.2. Elde Edilen DNA'nın Konsantrasyon ve Kalitesinin Tayini

Elde edilen DNA örneklerinden 1'er µl alınarak nanodrop spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boylarında yapılan ölçümlerle DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu belirlendi. DNA örneklerinin saflığı OD260/ OD280 oranı kullanılarak belirlendi. Yeterince iyi saflıkta kabul edilen DNA'nın OD260/ OD280 değeri 1,7-1,8 olarak kabul edildi.

3.6. PCR Yöntemi İle Mmp-3 Gen Bölgelerinin Çoğaltılması ve RFLP Yöntemiyle Polimorfizm Analizi

Genomik DNA örneklerinde MMP-3 gen bölgeleri PCR ile çoğaltıldı. Her iki polimorfizm için ayrı PCR reaksiyonları aşağıdaki protokole (Tablo 3-2) uygun olarak yapıldı.

Tablo 3-2: MMP-3- A/G E45K,- C/G T102T Gen Bölgelerinin Çoğaltılması İçin Kullanılan Protokol

Stok Konsantrasyonu	PCR Malzemesi	Miktar	Son Konsantrasyon
10 X	DreamTaq Buffer with MgCl ₂	2,5 µL	1 X
25 mM	MgCl ₂	0.5 µL	0,5 M
2 mM	dNTP Mix	2,5 µL	0,2 M
10 pmol/µL	Forward Primer	0,5 µL	0.2 pmol/ µL
10 pmol/µL	Reverse Primer	0,5 µL	0.2 pmol/ µL
-	dH ₂ O	16.375 µL	-
5 U/ µL	DreamTaq Polymerase	0.125 µL	0.025 U/µL
50 g/ µL	Template DNA	2 µL	100 ng/µL
TOTAL		25 µL	

3.6.1. MMP-3 Gen Bölgelerinin PCR Yöntemi ile Çoğaltılması

MMP-3- A/G E45K gen bölgesi için PCR protokolü (Tablo 3-2) ve PCR koşulları (Tablo 3-3) ile amplifiye edilmiştir.

MMP-3 C/G T102T gen bölgesi için PCR protokolü (Tablo 3-2) ve PCR koşulları (Tablo 3-4) ile amplifiye edilmiştir.

Tablo 3-3: MMP-3- A/G E45K gen bölgesi için PCR koşulları

PCR Fazı	Sıcaklık	Süre	Tekrar Sayısı
Initial Denaturation	94 °C	5 min.	1
Denaturation	94 °C	30 sec.	
Annealing	59 °C	30 sec.	35
Extension	72 °C	30 sec.	
Final Extension	72 °C	7 min.	1
Final Hold	4 °C	∞	

Tablo 3-4: MMP-3 -C/G T102T gen bölgesi için PCR koşulları

PCR Fazı	Sıcaklık	Süre	Tekrar Sayısı
Initial Denaturation	94 °C	5 min.	1
Denaturation	94 °C	30 sec.	
Annealing	58 °C	30 sec.	35
Extension	72 °C	30 sec.	
Final Extension	72 °C	7 min.	1
Final Hold	4 °C	∞	

3.6.1.1. %1'lik Agaroz Jel Hazırlanması

Elektroforezde stok 5X TBE tamponundan hazırlanan 1 X TBE kullanıldı. 2 g agaroz (Promega MBG) tartılarak erlen içine konuldu. Üzerine son hacim 200 ml olacak şekilde 1X TBE tamponu eklenerek, mikrodalga fırında kaynatma yolu ile çözüldürüldü. Erlenin sıcaklığı elle tutulabilecek sıcaklığa düştüğünde (50-55°C) çözülmüş agaroz jel içine 1 µl etidyum bromür (10mg/ml) ilave edildi. Hazırlanan jel yatay jel yatağı içine dökülüp, yükleme kuyucuklarının oluşması için tarak yerleştirilerek donmaya bırakıldı. Jel donduktan sonra tarak dikkatlice çıkarıldı ve jel örnek yüklenmesi için hazır duruma geldi.

3.6.1.2. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel'e Yüklenmesi

Yükleme Tamponu (Loading Buffer : 6X)

Yükleme tamponu (loading buffer) olarak %40 sükröz + %0,25 bromfenol mavisi karışımı kullanıldı

%1'lik jel hazırlandıktan sonra 1X TBE tamponu içeren jel tankı içine uygun şekilde konuldu. Agaroz jelin üzerini 2-3 ml geçecek şekilde 1X TBE tamponu jel üzerine eklendi. 7 µl PCR ürününe, 1,5 µl yükleme tamponu (6X) eklenip pipetleme yapılarak karıştırıldı. 10 µl'lik örnek karışımı kuyucuklara sırasıyla yüklendi. Yükleme işleminden sonra jel tankının kapağı kapatıldı. Güç kaynağı (E-C apparatus Corporation, E-C4000P) 500 miliamper 90 volt elektrik gücüne ayarlanarak 35 dakika elektroforez jel yürütülmesi gerçekleştirildi.

3.6.1.3. PCR Ürünlerinin Kontrolü

MMP-3- A/G E45K,- C/G T102T genlerine ait istenilen bölgelerinin PCR ürünlerinin oluşup oluşmadığını kontrol etmek amacı ile her iki bölge için de ayrı ayrı PCR tüpünden alınan 7 µl örnek 1,5 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak yukarıda tanımlanan elektroforez sisteminde 90 voltluk elektrik akımında 35 dakika yürütüldü. Yürütme işleminden sonra jel UV ışık altında (304 nm dalga boyunda) PCR ürünleri incelendi ve fotoğrafı UV transillüminator düzeneğinde çekildi. PCR reaksiyonları sonucu MMP-3 - A/G geninde 399 bp ve C/G T102T geninden 237 bp'lık bir ürün elde edildi.

Genotiplendirmede Kullanılan Enzimler

İlgili enzimler ve fragment boyutları aşağıda (Tablo 3-5) verilmektedir.

Tablo 3-5: E45K ve T102T polimorfizmlerinin analizleri için kullanılacak enzimler

Varyasyon	Restriksiyon Enzimi	Fragment Boyutu
E45K	Taq I	Doğal Tip: 1 fragment → 399 bp Mutant: 2 fragment → 163bp + 236bp
T102T	Acl I	Doğal Tip: 1 fragment → 237 bp Mutant: 1 fragment → 98bp + 139bp

Her iki enzim kesimi için protokol aşağıda gösterilmiştir (Tablo 3-6).

Tablo 3-6: E45K ve T102T polimorfizmlerinin analizleri için kullanılacak enzim protokolü

PCR Fazı	Miktar
dH ₂ O	3 µL
10 X Restriction Buffer	2 µL
BSA	1 µL
Restriction Enzyme	1 µL
PCR Ürünü	13 µL

E45K polimorfizm analizi için, örnekler Taq I enzimi ile 60 °C'de 3 saat inkübe edildi. T102T polimorfizmi için ise örnekler Acl I enzimi ile 37 °C'de 3 saat inkübe edildi.

Acl-I enziminin tanıdığı dizi ve kesim yeri:



Taq I enzimin tanıdığı dizi ve kesim yeri:



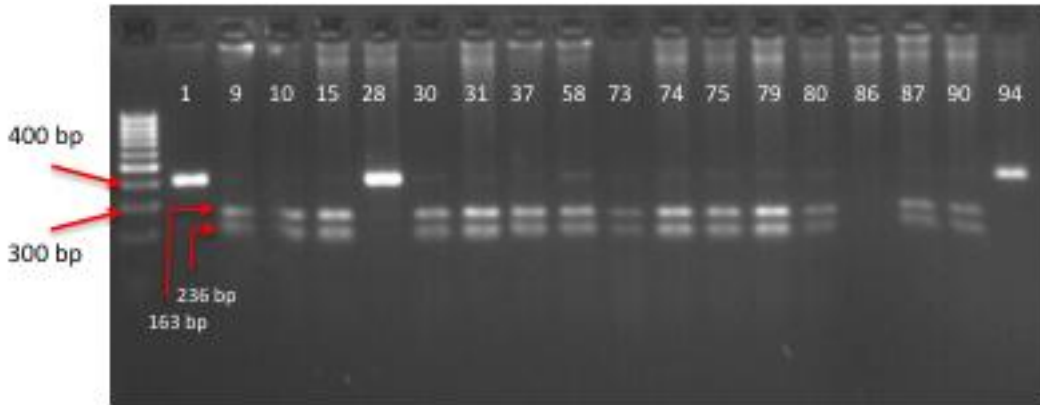
3.6.2. Enzim Kesim Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Enzim kesimi sonuçları %2'lik agaroz jelde 90 voltta 40 dakika yürütülerek genotip analizi yapıldı.

Jel görüntüleme marker olarak Fermentas MassRuler Low Range DNA Ladder kullanılmıştır.

3.6.2.1. Taq I Enzimi Kesim Sonuçlarının Değerlendirilmesi

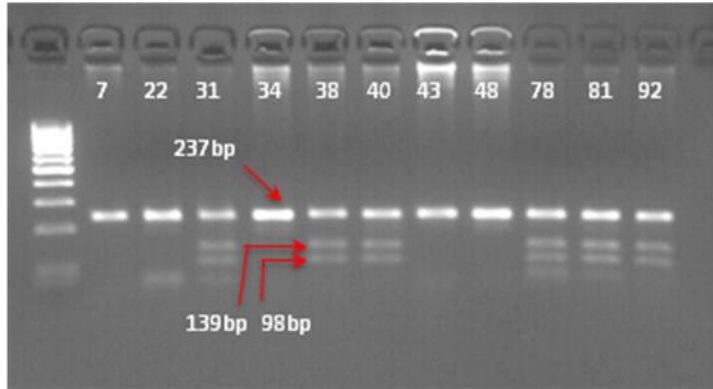
Kesim işlemi yapılmadan önce elde edilen PCR ürünlerinin bant büyüklüklerinin 399 bç olduğu saptandı. Taq I enzimi ile kesim sonrası; 399, 236 ve 163 bç büyüklüğünde bantlar görüldü. Kesim sonucu sadece 399 bç'lik bant görüldüğünde AA genotipi (homozigot doğal tip), 236 ve 163 bç'lik bantlar görüldüğünde GG (homozigot mutant), 399,236 ve 163 bç'lik bantlar görüldüğünde ise AG (heterozigot) olarak değerlendirildi (Şekil 3-1).



Şekil 3-1: Taq I enzimi kesim sonuçlarının %2'lik agaroz jelde görüntüsü

3.6.2.2. Acl I Enzimi Kesim Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Kesim işlemi yapılmadan önce elde edilen PCR ürünlerinin bant büyüklüklerinin 237 bç olduğu saptandı. Acl I enzimi ile kesim sonrası; 237, 139 ve 98 bç büyüklüğünde bantlar görüldü. Kesim sonucu sadece 237 bç'lik bant görüldüğünde CC (homozigot doğal tip), 139 ve 98 bç'lik bantlar görüldüğünde GG (homozigot mutant), 237, 139 ve 98 bç'lik bantlar görüldüğünde ise CG (heterozigot) olarak değerlendirildi (Şekil 3-2).



Şekil 3-2: Acl I enzim kesimi sonuçlarının %2'lik agaroz jelde görüntüsü

3.6.2.3. MMP-3 Genine Ait Polimorfizmlerin DNA Dizileme Sonuçları E45K Polimorfizmi (Şekil 3-3, Şekil 3-4)

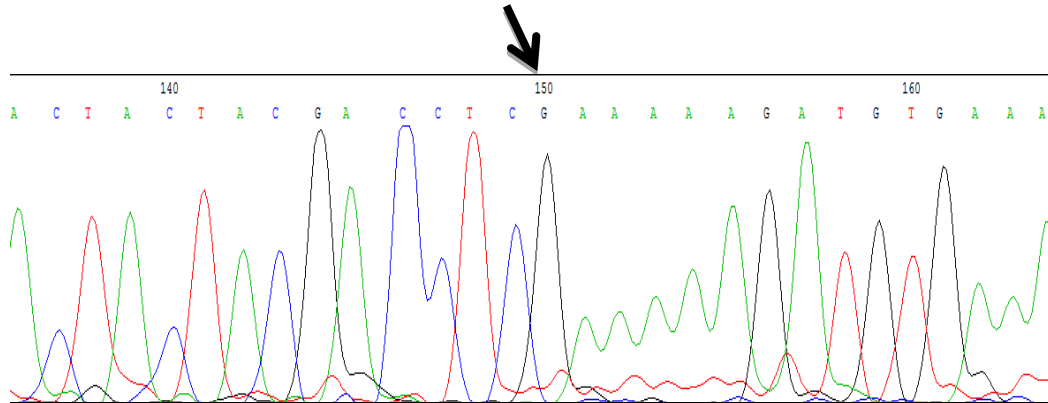
E45K Polimorfizmi (rs679620)

rs679620 [Homo sapiens]

1.

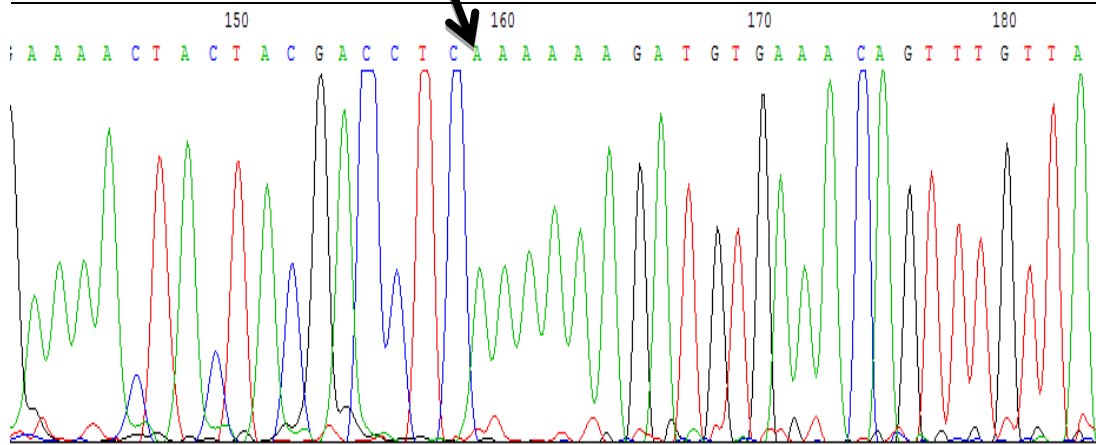
AATATCTAGAAAACACTACTACGACC**TC**[A/G]AAAAAGATGTGAAACAGTTTGTAG

DT12-5296 → K [Lys] ⇒ E [Glu] (MUTANT) (E45K)



Şekil 3-3: MMP-3 geni E45K polimorfizmi mutant DNA dizileme görüntüsü

DT12-5297 → K [Lys] ⇒ K [Lys] (Doğal Tip) (E45K)



Şekil 3-4: MMP-3 geni E45K polimorfizmi doğal tip DNA dizileme görüntüsü

T102T Polimorfizmi (Şekil 3-5, Şekil 3-6)

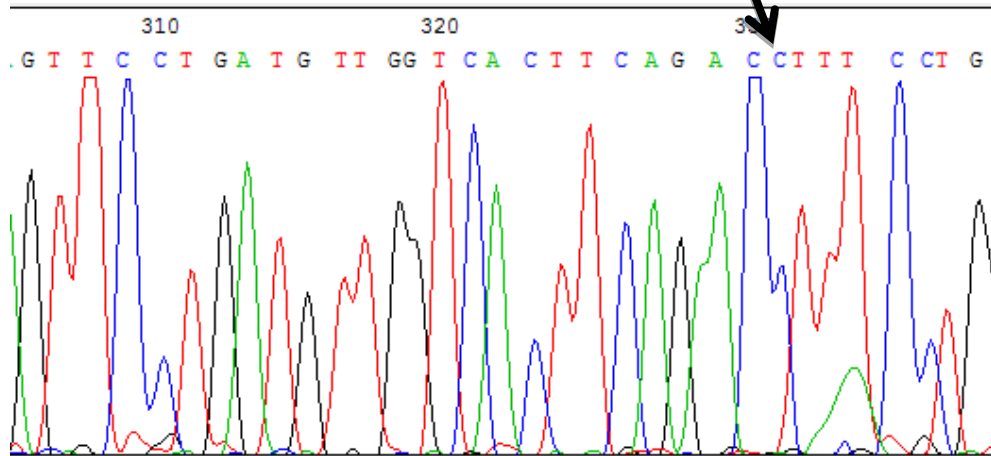
T102T Polimorfizmi (rs41380244)

rs41380244 [Homo sapiens]

1.

GTTCTGATGTTGGTCACTTCAGAAC [C/G] TTTCTGGCATCCCGAAGTGGAGGA

DT12-5297 → T [Thr] ⇒ T [Thr] (Doğal Tip) (T102T)



Şekil 3-5: MMP-3 geni T102T polimorfizmi doğal tip DNA dizileme görüntüsü

4. BULGULAR

Çalışma gruplarımıza ait yaş ve cinsiyet bilgileri tablo 4-1’de gösterilmiştir. Çalışma gruplarımızda yaş dağılımları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0,005$).

Tablo 4-1: Çalışma gruplarına ait demografik bilgiler

GRUP	HASTA (n= 54)	KONTROL (n= 81)
Cinsiyet (Kadın/erkek)	24/30	50/31
Yaş (yıl)	23,60±8,61	27,03±8,97

n: birey sayısı

Tümör lokalizasyonuna baktığımızda 1 vakada sol diz, 1 vakada sol femur, 1 vakada sol femur alt uç, 1 vakada sol femur proksimal, 8 vakada sol femur distal, 1 vakada sol klavikula, 1 vakada sol skapula, 1 vakada sol tibia alt uç, 2 vakada sol tibia proksimal, 1 vakada sağ femur alt uç, 4 vakada sağ femur distal, 1 vakada sağ femur proksimal, 1 vakada sağ humerus üst uç, 1 vakada sağ tibia diafiz, 8 vakada sağ tibia proksimal, 1 vakada sağ tibia üst uç olarak lokalizasyonlar gözlemlendi. 19 vakaya ait bilgiye ise ulaşamamıştır.

Tablo 4-2’de çalışma gruplarımıza ait MMP-3 E45K genotip ve allel dağılımları verilmiştir. Sağlıklı grupta AA genotipi taşıma sıklığının hasta grubuna göre anlamlı şekilde arttığı gözlenmiştir ($p:0,004$, ki kare:8,182, OR:2,929, %95CI:1,38-6,19).

İstatistiksel değerlendirmeye göre hasta grubunda G alleli taşıma sıklığının kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı gözlenmiştir ($p:0,010$, ki kare:6,710, OR:1,429, %95CI:1,019-1,858).

Benzer şekilde hasta grubunda AG genotipi taşıma sıklığı da kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı şekilde artmıştır (p:0,001, ki kare:14,753, OR:2,32, %95CI:1,491-3,626).

Tablo 4-2: Çalışma gruplarında MMP-3 E45K genotip ve allel dağılımları

MMP-3 E45K	HASTA (n=54)	KONTROL (n=81)
GENOTİP		
AA	14 (%25,9)	41(%50,6)**
GG	9 (%16,7)	20(%24,7)
AG	31(%57,4)***	20(%24,7)
ALLEL		
A	59(%54,6)	102(%62,9)
G	49(%45,4)*	60 (%37,1)

n: birey sayısı, Grup içi karşılaştırmalar Ki kare testi ile yapılmıştır.

* p:0,010, ki kare:6,710, OR:1,429, %95CI:1,019-1,858)

** p:0,004, ki kare:8,182, OR:2,929, %95CI:1,38-6,19

*** p:0,001, ki kare:14,753, OR:2,32, %95CI:1,491-3,626

MMP-3 T102T genotip ve allel dağılımlarına göre grupları karşılaştırdığımızda ise istatistiksel bir farklılık gözlemlenmemiştir (Tablo 4-3).

Tablo 4-3: Çalışma gruplarında MMP-3 T102T genotip ve allel dağılımları

MMP-3 T102T	HASTA (n=54)	KONTROL (n=81)
GENOTİP		
CC	45 (%83,3)	65 (%80,2)
GG	0 (%0)	0 (%0)
CG	9 (%16,7)	16 (%19,8)
ALLEL		
C	99(%91,6)	146(%90,12)
G	9(%8,4)	16(%9,88)

n: birey sayısı , Grup içi karşılaştırmalar Ki kare testi ile yapılmıştır.

Her iki mutant alleli taşıma açısından gruplar karşılaştırıldığında hasta grubunda her iki mutant allel, taşıma oranı artmış olarak görünmesine karşılık istatistiksel bir anlamlılık elde edilememiştir (p:0,818)(Tablo 4-4).

Tablo 4-4: Her iki mutant alleli taşıma açısından çalışma gruplarının karşılaştırılması

Gruplar	MMP-3 E45K G + MMP-3 T102T G alleli taşıyanlar	MMP-3 E45K G + MMP-3 T102T G alleli taşımayanlar
Kontrol	8	73
	%9,9	%90,1
Hasta	6	48
	%11,1	%88,9

Grup içi karşılaştırmalar Ki testi ile yapılmıştır.

Hasta grubuna ait metastaz ve lokal nüks görülme sıklığına ait bilgiler Tablo 4-5'te gösterilmiştir.

Tablo 4-5: Hasta grubuna ait demografik özellikler

	Var	Yok
Metastaz (n/%)	6 (%11,1)	48(%89,9)
Lokal Nüks (n/%)	4(%7,4)	50(%92,6)

n: birey sayısı

Hastalarda lokal nüks ve metastaz görülme durumuna göre MMP-3 E45K genotip dağılımlarını incelediğimizde istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir ($p>0,005$) (Tablo 4-6).

Tablo 4-6: Demografik özelliklere göre MMP-3 E45K genotiplerinin dağılımı

	MMP-3 E45K GENOTİPLERİ		
	AA	GG	AG
LOKAL NÜKS			
Var (n/%)	1(%25)	2(%50)	1(%25)
Yok (n/%)	13(%26)	8(%16)	29(%58)
METASTAZ	AA	GG	AG
Var (n/%)	1(%16,7)	2(%33,3)	3(%50)
Yok (n/%)	13(%27,1)	7(%14,6)	28(%58,3)

n: birey sayısı

Benzer bir durum MMP-3 T102T genotipleri açısından da geçerlidir. T102T genotiplerinin lokal nüks ve metastaz görülme durumuna göre dağılımlarında anlamlı bir bulguya ulaşılamamıştır ($p>0,005$) (Tablo 7).

Tablo 4-7: Demografik özelliklere göre MMP-3 T102T genotiplerinin dağılımı

	MMP-3 T102T GENOTİPLERİ	
LOKAL NÜKS	CC	CG
Var (n/%)	3(%75)	1(%25)
Yok (n/%)	42(%84)	8(%16)
METASTAZ	CC	CG
Var (n/%)	4(%66,7)	2(%33,3)
Yok (n/%)	41(%85,4)	7(%14,6)

n: birey sayısı

Tablo 4-8’de çalışma gruplarında cinsiyete göre MMP-3 E45K genotiplerinin dağılımları verilmiştir. Cinsiyetler arasında genotip dağılımları açısından istatistiksel bir farklılık gözlemlenmemiştir ($p>0,005$).

Tablo 4-8: MMP-3 E45K polimorfizmi genotip dağılımlarının kontrol ve hasta gruplarında cinsiyete göre dağılımları

KONTROL GRUBU			MMP-3 E45K		
			AA	GG	AG
CİNSİYET	KADIN		23 %46	12 %24	15 %30
	ERKEK		18 %58,1	8 %25,8	5 %16,1
HASTA GRUBU			MMP-3 E45K		
			AA	GG	AG
CİNSİYET	KADIN		8 %33,3	4 %16,7	12 %50
	ERKEK		6 %20	5 %16,7	19 %63,3

Grup içi karşılaştırmalar Ki kare ve Fisher’s Exact testi ile yapılmıştır.

MMP-3 T102T genotip dağılımlarına baktığımızda ise yine cinsiyetler arasında anlamlı düzeyde bir farklılığa rastlanılmamıştır ($p>0,005$) (Tablo 4-9).

Tablo 4-9: MMP-3 T102T polimorfizmi genotip dağılımlarının kontrol ve hasta gruplarında cinsiyete göre dağılımları

		MMP-3 T102T		
		CC	CG	
KONTROL GRUBU	CİNSİYET	KADIN	42 %84	8 %16
		ERKEK	23 %74,2	8 %25,8
		MMP-3 T102T		
		CC	CG	
HASTA GRUBU	CİNSİYET	KADIN	19 %79,2	5 %20,8
		ERKEK	26 %86,7	4 %13,3

Grup içi karşılaştırmalar Ki kare ve Fisher's Exact testi ile yapılmıştır.

5. TARTIŞMA

Osteosarkom (OS) kemik sarkomları içinde en yaygın primer malignant kemik tümörlerindedir. Görülme sıklığı yılda 1 milyon kişide 2'dir(1,2,3). Uzanımsal gelişme atağı gösteren uzun kemiklerin metafizinde görülür(2). Genellikle adolesan dönemde yani 15-20 yaş aralığındaki kişilerde görülür(5). OS'ye neden olduğu bilinen çevresel faktör iyonize radyasyondur(12). OS metastazı genelde akciğerde daha sonra diğer kemik ve yumuşak dokularda görülebilir(1). OS'nin farklı tipleri bulunmakla beraber en yaygın görünen tip konvansiyonel tip OS'dir.

MMP'ler kanser invazyonu ve metastazında ECM'nin parçalanmasında önemli göreve sahiptirler. Bazal membranın parçalanmasının yanı sıra kanser gelişimi için gerekli olan anjiyogenezde de rol alırlar(80). MMP ve MMP'lerin spesifik doku inhibitörleri arasındaki homeostaz (MMP/TIMP) metastaz ve invazyon için önem arz eder(94).

MMP-3 çapraz bağlı fibrini yıkma yeteneğine sahiptir. Bu enzim aynı zamanda bazı MMP'lerin aktivasyon ve ekspresyonunda görev alır(96). MMP-3 geni 10 ekzonlu 13,003 bç uzunluğunda 11q22.3 kromozomunun uzun kolunda lokalizedir. Yapılan dizileme çalışmaları sonucunda bu gene ait 8-9 kadar tek nükleotid polimorfizmi tanımlanmıştır(106,107).

MMP-3 genine ait en yaygın olarak çalışılan polimorfizm 5A/6A polimorfizmidir. Smolarz ve ark.(111) ovaryum kanserli hasta ve kontrol grubu arasında yaptıkları çalışmada 5A ve 6A allelleri arasında bulunma sıklığı açısından farklılık olmadığını gözlemlemişlerdir.

Chaudhary ve ark.(112) baş boyun lezyonu ve oral submukozal fibroziste Hintli bireylerde yaptıkları çalışmada 6A/6A genotipinin 45 yaşından daha büyük olanlarda her iki vaka için, 5A/5A genotipinin ise 45 yaşından küçük olanlarda her iki vaka için önemli olduklarını göstermişlerdir.

Biondi ve ark.(113) MMP-1 ve MMP-3 promoter bölgesi ve kanser arasındaki ilişkiyi incelemek için yaptıkları İtalyan popülasyondaki çalışmaya, meme kanserli, kolon kanserli, pulmoner kanserli ve ovaryum kanserli hasta ve sağlıklı bireyleri dahil etmişlerdir. MMP-3 genine ait olan 5A/6A polimorfizmi çalışmasında, 6A allelinden

daha yüksek promoter aktivitesine sahip olan 5A alleli için heterozigot ve homozigotların sıklığı kolon kanseri istisna olmak üzere (%73), kanserli hastalarda belirgin olarak daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (%84,5). Çalışma sonucundaki bulgulara göre bu polimorfizmin, kanserin gelişmesi ve progresyonu için özellikle memeli tümörlerinde risk faktörü olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Çalışmamıza, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji ABD. tarafından temin edilen, yaş ortalamaları $23,60 \pm 8,61$ olan 54 (24 kadın ve 30 erkek) osteosarkom tanısı konmuş hasta ve yaş ortalamaları $27,03 \pm 8,97$ olan kendisinde ve ailesinde kanser geçmişi olmayan 81 (50 kadın ve 31) sağlıklı bireyi dahil ettik. Bu gruplara ait MMP-3 E45K ve T102T polimorfizmlerini istatistiksel açıdan değerlendirdik.

MMP-3 E45K polimorfizmi, MMP-3 proteininin 45. aa'de Lys-Glu non-sinonim bir varyantı kodlar. MMP-3 oluşumu aşamasında başlangıçtaki ilk 82 peptid kesilerek atılmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda propeptidin kesilmesi Glu-Lys varlığına bağımlı olabileceği ve bu durumun MMP-3 oluşmasında azalmaya neden olabileceği ileri sürülmüştür(110).

Fan ve ark.(114), 766 glioma hastası ve 824 sağlıklı birey Çin popülasyonunda yaptıkları çalışmada MMP-3 E45K polimorfizmini incelemişlerdir. Her iki grup arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmaya göre bu polimorfizmin glioma riskini arttırdığına dair bir veriye rastlanmamıştır.

Nan ve ark.(115), 218 melanoma, 285 squamoz hücre karsinoması, 300 bazal hücre karsinomasına sahip kanserli hasta ve 870 sağlıklı bireyde E45K polimorfizmini de içine alan 6 tane SNP çalışması yapmışlardır. Bu çalışma sonucunda kontrol bireyleri ve hasta grubu arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemişlerdir.

Ouyang ve ark.(116), Çin popülasyonu özofagal squamoz hücre kanserinde, 227 hasta ve 378 sağlıklı bireyde yaptıkları çalışmada MMP-3 E45K polimorfizminin kontrol ve hasta gruplarında istatistiksel bir farkının olmadığını gözlemlenmişlerdir.

Hirata ve ark.(117), renal hücre kanserli 156 hasta ve 326 sağlıklı bireyde yaptıkları çalışmada MMP-3 E45K polimorfizminde GG genotipinin frekansının kontrol bireylerine göre hastalarda arttığını gözlemlenmişlerdir.

Bulduğumuz sonuçlara göre; sağlıklı bireylerde MMP-3 E45K AA genotipi taşıma sıklığı hasta grubuna göre anlamlı şekilde artmıştır (p:0,004, ki kare:8,182, OR:2,929, %95CI:1,38-6,19). Buna paralel olarak hasta grubunda da G alleli taşıma sıklığının sağlıklı bireylere göre anlamlı bir şekilde arttığını gözlemledik (p:0,010, ki kare:6,710, OR:1,429, %95CI:1,019-1,858). Benzer şekilde AG genotipi taşıma sıklığı da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde artmış olarak saptandı (p:0,001, ki kare:14,753, OR:2,32, %95CI:1,491-3,626).

MMP-3 genine ait diğer bir polimorfizm olan T102T (C/G) polimorfizmi literatürlerde taranmıştır ve az sayıda çalışmaya rastlanmıştır.

Hong ve ark.(118), Koreli çocuklarda Kawasaki hastalığında bu polimorfizmi hasta ve kontrol bireyleri arasında karşılaştırmışlardır. Kawasaki hastalığı, koroner arter gelişimini içeren multisistemik vasküler bir hastalıktır. Bu polimorfizmdeki genomik ve allelik sıklıkların hasta ve kontrol bireyleri arasında farklılaşma göstermediği sonucunu elde etmişlerdir.

Li ve ark.(119), MMP-3 genine ait birtakım polimorfizmleri çalışmalarına dahil etmişler; MMP-3 E45K polimorfizm çalışması için 1853 koroner hastası ve 1207 kontrol bireyi, MMP-3 T102T polimorfizm çalışması için 1197 koroner arter hastası ve 1791 kontrol bireyini çalışmaya dahil etmişlerdir. Bu çalışmada, A aleli ve AA genotipinin koroner hastalık riskinin artmasıyla ilişkili olduğunu GG genotipinin ise koruyucu rol oynadığını gözlemlemişlerdir. MMP-3 T102T polimorfizminde GG genotipi taşıyıcılarının C alleli taşıyıcıları ile karşılaştırıldığında daha yüksek koroner hastalık riskine sahip olduklarını gözlemlemişlerdir.

Beyzade ve ark.(120), 1240 koroner arter hastasında bazı polimorfizmleri (-1986 T>C, -1612 5A>6A, -1346 A>C, -709 A>G, -376 G>C ve +802 A>G) çalışmalarına dahil etmiş ve 5A>6A haricindeki diğer polimorfizmlerin bu hastalıkta anlamlılığını gözlemlememişlerdir.

Çalışmamızda MMP-3 T102T genotip ve allel dağılımlarını sağlıklı ve osteosarkomlu bireylerde karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak bir farklılık gözlemlemedik. Her iki çalışma grubumuzda da mutant GG genotipine rastlamadık.

Her iki polimorfizme ait mutant alleli taşıma açısından grupları karşılaştırdığımızda hasta grubunda her iki mutant allel taşıma oranı artmış olarak görünmesine karşın istatistiksel bir anlamlılık elde edilememiştir (p:0,818).

Hastalarda metastaz ve lokal nüks görülme durumuna göre MMP-3 E45K ve T102T genotip dağılımlarını incelediğimizde hem E45K hem de T102T polimorfizmleri açısından anlamlı bulgular elde edilmemiştir.

Çalışmamıza her iki polimorfizme ait genotip dağılımlarının kontrol ve hasta gruplarında cinsiyete göre dağılımları da dahil edilmiş olup, MMP-3 E45K ve T102T polimorfizmi açısından istatistiksel bir farklılık gözlemlenmemiştir.

Sonuç olarak, çalışmamız her iki polimorfizm açısından da osteosarkomda yapılan ilk çalışma özelliğini taşımaktadır. Yaptığımız deneysel çalışmalar sonucunda elde ettiğimiz bulgular MMP-3 E45K polimorfizminin osteosarkom gelişiminde rol oynayabileceği izlenimi elde etmemize neden olmuşken, bu polimorfizmin metastaz ve lokal nüks görülme gibi süreçlerde etkisi olmadığı kanısına varmamıza neden olmuştur. Bir diğer polimorfik varyant olan T102T açısından çalışma gruplarımızı değerlendirdiğimizde ise anlamlılığa ulaşan bulgular elde edemedik. Her iki polimorfizmin karsinogenezdeki etkinliğinin belirlenmesi açısından daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Tang N, Song WX, Luo J, Haydon RC, He TC. "Osteosarcoma development and stem cell differentiation," *Clinical Orthopaedics and Related Research*, vol. 466, no. 9, pp. 2114–2130, 2008.
2. N. Marina, M. Gebhardt, L. Teot, and R. Gorlick. "Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma," *Oncologist*, vol. 9, no. 4, pp. 422–441, 2004.
3. Dahlin DC, Unni KK. Osteosarcoma of bone and its important recognizable varieties: *AM. J. Surg. Pathol* 1977, 11:61-72.
4. Campanacci M: *Bone and Soft Tissue Tumors: Clinical Features, Imaging, Pathology and Treatment* 2nd edition. Wien, Austria: Springer-Verlag; 1999:464-491.
5. Picci P. Osteosarcoma (osteogenic sarcoma). *Orphanet J Rare Dis*. 2007 Jan 23;2:6.
6. Link MP, Goorin AM, Miser AW et al. The effect of adjuvant chemotherapy on relapse-free survival in patients with osteosarcoma of the extremity. *N Engl J Med* 1986;314:1600-1606
7. Klein M.J, Siegal G.P. Osteosarcoma; Anatomic and Histologic Variants. *Am J Clin Pathol* 2006;125:555-581.
8. Toricelli P, Montanari N, Spina V, Manfrini M, Bertoni F, Saguatti G, Romagnoli R: Dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging subtraction in evaluating osteosarcoma response to chemotherapy: *Radiol Med (Torino)* 2001 Mar; 101 (3): 145-151
9. http://www.academic.kellogg.edu/herbrandsonc/bio201_mckinley/skeletal.htm
10. Dorfman HD, Czerniak B. *Bone Tumors*. St Louis, MO: Mosby; 1998.
11. Ferguson WS, Harris MB, Goorin AM, et al. Presurgical window of carboplatin and surgery and multi-drug chemotherapy for the treatment of newly diagnosed metastatic or unresectable osteosarcoma: Pediatric Oncology Group Trial. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2001;23:340-348.
12. Finkel MP, Reilly CA Jr, Biskis BO. Pathogenesis of radiation and virus-induced bone tumors. *Recent Results Cancer Res* 1976:92-103.
13. Swaney JJ. Familial osteogenic sarcoma. *Clin Orthop Relat Res* 1973:64-68.
14. Huvos AG. *Bone Tumors: Diagnosis. Treatment and Prognosis* 2nd edition. Philadelphia, W.B. Saunders. Co; 1991.

15. Mitelman F. Recurrent chromosome aberrations in cancer. *Mutat Res* 2000;462,247-262
16. A.A. Sandberg and J. A. Bridge, "Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: osteosarcoma and related tumors," *Cancer Genetics and Cytogenetics*, vol. 145, no. 1, pp. 1–30, 2003.
17. Nevins JR, Leone G, DeGregori J, Jakoi L. Role of the Rb/E2F pathway in cell growth control. *J Cell Physiol*. 1997;173:233–236.
18. Diller L, Kassel J, Nelson CE et al. p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcomas. *Mol Cell Biol* 1990;10:5772-5781
19. Kaste SC, Pratt CB, Cain AM, Jones-Wallace DJ, Rao BN. Metastases detected at the time of diagnosis of primary pediatric extremity osteosarcoma at diagnosis: imaging features, *Cancer*, vol. 86, no. 8, pp. 1602–1608, 1999.
20. Bacci G, Briccoli A, Rocca M, Ferrari S, Donati D, Longhi A, Bertoni F, Bacchini P, Giacomini S, Forni C, Manfrini M, Galletti S: Neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremities with metastases at presentation: recent experience at the Rizzoli Institute in 57 patients treated with cisplatin, doxorubicin, and a high dose of methotrexate and ifosfamide. *Ann Oncol* 2003, 14(7):1126-1134.
21. Kager L, Zoubek A, Potschger U, Kastner U, Flege S, Kempf-Bielack B, Branscheid D, Kotz R, Salzer-Kuntschik M, Winkelmann W, Jundt G, Kabisch H, Reichardt P, Jurgens H, Gadner H, Bielack SS: Cooperative German-Austrian-Swiss Osteosarcoma Study Group. Primary metastatic osteosarcoma: presentation and outcome of patients treated on neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group protocols. *J Clin Oncol* 2003, 21(10):2011-2018.
22. Rosai J. ed. Bone and Joints: Osteosarcoma. In: Rosai and Ackerman's Surgical Pathology, 9th ed., Volume 2, Edinburgh: Mosby;2004;p2150-2158.
23. Unni KK, ed. Osteosarcoma of bone. In: *Bone Tumors*. New York, NY: Churchill Livingstone; 1988. *Contemporary Issues in Surgical Pathology*; vol 11.
24. James O, Johnston. Tumors in orthopedics. *Current Diagnosis and Treatment in Orthopedics*, Harry B. Skinner, 1995: 236-314.
25. Fletcher C, Unni KK, Mertens F. ed. Osteogenic Tumours; Conventional Osteosarcoma. In: World Health Organization Classification of Tumours. Pathology of Genetics Tumours of Soft Tissue and Bone. Lyon: IARC;2002;p.264-270.

26. Matsuno T, Unni KK, McLeod RA, et al. Telangiectatic osteogenic sarcoma. *Cancer*. 1976;38:2538-2547.
27. Sim FH, Unni KK, Beabout JW, et al. Osteosarcoma with small cells simulating Ewing's tumor. *J Bone Joint Surg Am*. 1979;61:207-215.
28. Nakajima H, Sim FH, Bond JR, et al. Small cell osteosarcoma of bone: review of 72 cases. *Cancer* 1997;79:2095-2106.
29. Kurt AM, Unni KK, McLeod RA, et al. Low-grade intraosseous osteosarcoma. *Cancer*. 1990;65:1418-1428.
30. Bertoni F, Bacchini P, Fabbri N, et al. Osteosarcoma: low-grade intraosseous-type osteosarcoma, histologically resembling parosteal osteosarcoma, fibrous dysplasia, and desmoplastic fibroma. *Cancer*. 1993;71:338-345.
31. Choong PF, Pritchard DJ, Rock M, et al. Low grade central osteogenic sarcoma; a long-term followup of 20 patients. *Clin Orthop*. 1996;322:198-206.
32. Kars. A, Birincil Kemik Tumorleri. Beyazova M, Kutsal YG Edt, Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon, Nobel Tıp Kitabevi, Ankara, 2000; 2351-2371.
33. Shelt DS, Yasko AW, Raymond AK, Ayala AG, Carrasco CH, Benjamin RS, Jaffe N, Murray JA, Conventional and dedifferentiated parosteal osteosarcoma diagnosis, treatment and outcome. *Cancer* 1996;78:2136-45.
34. Choong PF, Qureshi AA, Sim FH, Unni KK: Osteosarcoma of the foot: a review of 52 patients at the Mayo Clinic: *Acta Ortop Scan* 1999 Aug; 70(4): 361-4.
35. Ritts GD, Pritchard DJ, Unni KK, Beabout JW, Eckardt JJ: Periosteal osteosarcoma. *Clin ortop* 1987: 219.299-307.
36. Apakkan S, Özmen D, Bayındır O. Metalloproteinazlar, İnhibitörleri ve İlişkili Fizyolojik ve Patolojik Durumlar, *T Klin Tıp Bilimleri* 2001, 21:332-342
37. Ekmekçi A. Erbaş D. Metastaz ve onkogenler Bölüm V: Kanserin Moleküler Mekanizması Onkogenler ve Büyüme Faktörleri, Ankara 1991: 201–222.
38. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular Cell Biology*. 4th ed. New York: W.H. Freeman and Company; 1999. p.968-93.
39. Taşdemiroğlu E. Tümör-Metastaz İlişkisi; 154 *Pediatric Solid Malign Tumor Olgusunun Analizi. Türk Nöroşirürji Dergisi* 2003; 13: 8 – 11
40. Fidler IJ. Principles of molecular cell biology of cancer: cancer metastasis. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer: principles and practice of oncology*, 5th.ed. Philadelphia: Lippincot, 1993:134–149

41. Cotran RS, Kumar V, Collins T, eds. Pathologic Basis of disease. W.B. Saunders Company, 1994:272–280.
42. Holzmann B, Gossler U, Bittner M. $\alpha 4$ integrins and tumor metastasis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1998; 231: 125–41.
43. Hofmann UB, Houben R, Bröcker EB, Becker JC: Role of the matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie* 87:307-314, 2005
44. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002;90:251-262.
45. Springman EB, Angleton EL, Birkedal-Hansen H, Van Wart HE. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(1):364-8.
46. Sanchez-Lopez R, Nicholson R, Gensel MC, Matrisian LM, Breathnach R. "Structure-function relationships in the collagenase family member transin" *J. Biol. Chem.*, 263 (1988) 11892-11899.
47. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274:21491-4.
48. Sethi CS, Bailey TA, Luthert PJ, Chong NHV. Matrix metalloproteinase biology applied to vitreoretinal disorders. *Br J Ophthalmol* 2000; 84:654-64.
49. Evans JD, Ghaneh P, Kawesha A, Neoptolemos JP. Role of Matrix Metalloproteinases and their inhibitors in pancreatic cancer. *Digestion*. 1997; 58:520-8.
50. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92:827-39.
51. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:463-516.
52. Wihinen P, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in cancer: Prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer* 2002;99:157-66.
53. Kuzuya M, Iguchi A. Role of matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *J Atheroscler Thromb* 2003;10:275-82.
54. Reel B. Matriks Metalloproteinaz Enzimleri ve Ateroskleroz. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2006;26:527-537.
55. Gordon JL, Drummond AH, Galloway WA. Metalloproteinase inhibitors as therapeutics. *Clinical and Experimental Rheumatology* 1993; 11(Suppl.8):S91-94.

56. Suzuki K, Enghild JJ, Morodomi T, Salvesen G, Nagase H. Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry*. 1990;29:10261–10270.
57. Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Membrane type matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem*. 1997;272:2446–2451.
58. Sekine-Aizawa Y, Hama E, Watanabe K, Tsubuki S, Kanai-Azuma M, Kanai Y, Arai H, Aizawa H, Iwata N, Saido TC. Matrix metalloproteinase (MMP) system in brain: identification and characterization of brain-specific MMP highly expressed in cerebellum. *Eur J Neurosci*. 2001;13:935–948.
59. Velasco G, Cal S, Merlos-Suárez A, Ferrando AA, Alvarez S, Nakano A, Arribas J, López-Otín C. Human MT6-matrix metalloproteinase: identification, progelatinase A activation, and expression in brain tumors. *Cancer Res*. 2000;60:877–882.
60. Pei D. Leukolysin/MMP25/MT6-MMP: a novel matrix metalloproteinase specifically expressed in the leukocyte lineage. *Cell Res*. 1999; 9:291–303.
61. Shipley JM, Wesselschmidt RL, Kobayashi DK, Ley TJ, Shapiro SD. Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:3942–3946.
62. Kolb C, Mauch S, Peter HH, Krawinkel U, Sedlacek R. The matrix metalloproteinase RASI-1 is expressed in synovial blood vessels of a rheumatoid arthritis patient. *Immunol Lett*. 1997;57:83–88.
63. Li W, Gibson CW, Abrams WR, Andrews DW, DenBesten PK. Reduced hydrolysis of amelogenin may result in X-linked amelogenesis imperfecta. *Matrix Biol*. 2001;19:755–760.
64. Yang M, Kurkinen M. Cloning and characterization of a novel matrix metalloproteinase (MMP), CMMP, from chicken embryo fibroblasts: CMMP, *Xenopus* XMMP, and human MMP19 have a conserved unique cysteine in the catalytic domain. *J Biol Chem*. 1998;273:17893–17900.
65. Velasco G, Pendas AM, Fueyo A, Knäuper V, Murphy G, López-Otín C. Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members. *J Biol Chem*. 1999;274:4570–4576.

66. Pei D, Kang T, Qi H. Cysteine array matrix metalloproteinase (CA-MMP)/MMP-23 is a type II transmembrane matrix metalloproteinase regulated by a single cleavage for both secretion and activation. *J Biol Chem.* 2000;275:33988–33997.
67. Lohi J, Wilson CL, Roby JD, Parks WC. Epilysin, a novel human matrix metalloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes and in response to injury. *J Biol Chem.* 2001;276:10134–10144.
68. Saarialho-Kere U, Kerkela E, Jahkola T, Suomela S, Keski-Oja J, Lohi J. Epilysin (MMP-28) expression is associated with cell proliferation during epithelial repair. *J Invest Dermatol.* 2002;119:14–21.
69. Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:5578–5582.
70. Chen LC, Noelken ME, Nagase H. Disruption of the cysteine-75 and zinc ion coordination is not sufficient to activate the precursor of human matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1). *Biochemistry.* 1993;32: 10289–10295.
71. Beaudeau JL, Giral P, Bruckert E, Foglietti MJ, Chapman MJ. Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: Therapeutic perspectives. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:121-31.
72. Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res* 1995;77:863-8.
73. Murphy G. The regulation of connective tissue Metalloproteinases by natural inhibitors. *Progress in Inflammation Research and Therapy* 1991.
74. Aksun SA, Metalloproteinazlar, İnhibitörleri ve İlikili Fizyolojik ve Patolojik Durumlar. *T Klin Bilimleri*, 2001, 21:332-342.
75. Curan S, Murray GI: Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *J Pathol* 189:300-308, 1999
76. Thorgeirsson UP, Lindsay CK, Cottam DW, Gomez DE. Tumor invasion, proteolysis and angiogenesis. *Journal of Neuro-Oncology* 1994;18:89-103.
77. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:463-516.
78. Grene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE. Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase, *J. Biol. Chem.*, 271 (1996) 30375-30380.

79. Klein G, Vellenga E, Fraaije MW, Kamps WA, Bont ESJM. Possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia, *Critical Review in Oncology/Hematology*, 50 (2004) 87- 100.
80. Hijova E. Matrix metalloproteinases: their biological functions and clinical implications. *Bratisl Lek Listy*. 2005;106(3):127-32
81. Peschon JJ. et al. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 1998; 282, 1281–1284
82. Manes S. et al. Identification of insulin-like growth factor binding protein-1 as a potential physiological substrate for human stromelysin-3. *J. Biol. Chem.* 1997; 272, 25706–25712
83. Agrez M, Chen A, Cone RI, Pytela R, Sheppard D. The $\alpha\beta 6$ integrin promotes proliferation of colon carcinoma cells through a unique region of the $\beta 6$ cytoplasmic domain. *J. Cell Biol.* 1994; 127, 547–556
84. Alexander CM, Howard EW, Bissell MJ, Werb Z. Rescue of mammary epithelial cell apoptosis and entactin degradation by a tissue inhibitor of metalloproteinases-1 transgene. *J. Cell Biol.* 1996; 135, 1669–1677
85. Watanabe N, Ikeda U. Matrix metalloproteinases and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2004 Mar;6(2):112-20.
86. Wilke A, Funck R, Rupp H, Brilla CG. Effect of the renin- angiotensin-aldosterone system on the cardiac interstium in heart failure. *Basic Res Cardiol* 1996, 91: Suppl.2, 79-84.
87. Chintala SK, Tonn JC, Rao JS. Matrix metalloproteinases and their biological function in human gliomas. *Int J Dev Neurosci* 1999 Aug- Oct; 17 (5-6): 495-502.
88. Bellucci C, Lilli L, Baroni T, Parnetti L, Sorbi S, Emiliani C, Lumare E, Calabresi P, Balloni S, Bodo M. Differences in Extracellular Matrix Production and Basic Fibroblast Growth Factor Response in Skin Fibroblasts from Sporadic and Familial Alzheimer's Disease. *Mol Med.* 13 (2007) 542– 550.
89. Ortega N, Behonick D, Stickens D, Werb Z. How proteases regulate bone morphogenesis. *Ann. NY Acad. Sci.* 995: 109, 2003.
90. Hoekman K, Lowik CW, vd Ruit M, Bijvoet OL, Verheijen J, Papapoulos S.E. Regulation of the production of plasminogen activators by bone resorption enhancing and inhibiting factors in three types of osteoblast-like cells. *Bone Miner.* 14: 189, 1991.

91. Meikle MC, Bord S, Hembry RM, Compston J, Croucher P I, Reynolds JJ. Human osteoblasts in culture synthesize collagenase and other matrix metalloproteinases in response to osteotropic hormones and cytokines. *J. Cell. Sci.* 103: 1093, 1992.
92. Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, *et al.* MT1-MMPdeficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* 99: 81, 1999.
93. Martignetti JA, Aqeel AA, Sewairi WA, *et al.* Mutation of the matrix metalloproteinase 2 gene (MMP2) causes a multicentric osteolysis and arthritis syndrome. *Nat. Genet.* 28: 261, 2001.
94. Bjørnland K, Flatmark K, Pettersen S, Aaasen AO, Fodstad O, Maelandsmo GM. Matrix metalloproteinases participate in osteosarcoma invasion. *J Surg Res.* 2005 Aug;127(2):151-6. Epub 2005 Apr 14.
95. Thompson R.C Jr, Cheng EY, Clohisy DR, Perentesis J, Manivel C, Le CT. Results of treatment for metastatic osteosarcoma with neoadjuvant chemotherapy and surgery. *Clin. Orthop.* 397: 240, 2002.
96. Bini A, Itoh Y, Kudryk BJ, Nagase H. Degradation of cross-linked fibrin by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1): hydrolysis of the gamma Gly 404-Ala 405 peptide bond. *Biochemistry* 1996;35:13056–63
97. Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK *et al.* Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4: 197–250.
98. Johansson N, Ahonen M, Kähäri VM: Matrix metalloproteinases in tumor invasion. *Cell Mol Life Sci* 2000, 57:5-15.
99. Jenkins K, Javadi M, Borghaei RC. Interleukin-4 suppresses IL-1- induced expression of matrix metalloproteinase-3 in human gingival fibroblasts. *Periodontol* 2004;75:283-291.
100. Laccourreye O, Tregouet DA, Stucker I, Laurent-Puig P: Single nucleotide polymorphisms in MMP1 and MMP3 gene promoters as risk factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2004, 24(3b):2021-6
101. Bodey B, Bodey B, Jr., Siegel SE, Kaiser HE. Matrix metalloproteinase expression in childhood astrocytomas. *Anticancer Res* 2000;20:3287–3292.

102. Mercurio J, Lopez De Cicco R, Castresana JS, Klein-Szanto AJ. Stromelysin-1/matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) expression accounts for invasive properties of human astrocytoma cell lines. *Int J Cancer* 2003;106:676–682.
103. Lijnen HR, Silence J, Van Hoef B, Collen D. Stromelysin-1 (MMP-3)-independent gelatinase expression and activation in mice. *Blood*. 1998 Mar 15;91(6):204–53.
104. Ugwu F, Lemmens G, Collen D, Lijnen HR. Modulation of cell-associated plasminogen activation by stromelysin-1 (MMP-3). *Thromb Haemost*. 1999 Sep;82(3):1127–31
105. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994; 94:2493–503.
106. Ye S, Eriksson P, Hamsten A, Kurkinen M, Humphries SE, Henney AM: Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. *J Biol Chem* 1996, 271(22):13055–13060
107. Kaplan RC, Smith NL, Zucker S, Heckbert SR, Rice K, Psaty BM. Matrix metalloproteinase-3 (MMP3) and MMP9 genes and risk of myocardial infarction, ischemic stroke, and hemorrhagic stroke. *Atherosclerosis*. 2008 Nov;201(1):130–7. Epub 2008 Mar 14.
108. Szyłło, K., Smolarz, B., Romanowicz-Makowska, H., Niewiadomski, M., Kozłowska, E. and Kulig, A. (2002) The promoter polymorphism of the matrix metalloproteinase 3 (MMP-3) gene in women with ovarian cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 21, 357—361.
109. Blons H, Gad S, Zinzindohoue F. et al. (2004) Matrix metalloproteinase 3 polymorphism: a predictive factor of response to neoadjuvant chemotherapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 10, 2594--2599.
110. Raleigh SM, van der Merwe L, Ribbans WJ, Smith RK, Schwellnus MP, Collins M. Variants within the MMP3 gene are associated with Achilles tendinopathy: possible interaction with the COL5A1 gene. *Br J Sports Med*. 2009 Jul;43(7):514–20.
111. Smolarz B, Szyłło K, Romanowicz-Makowska H, Niewiadomski M, Kozłowska E, Kulig A. PCR analysis of matrix metalloproteinase 3 (MMP-3) gene promoter polymorphism in ovarian cancer. *Pol J Pathol*. 2003;54(4):233–8.

112. Chaudhary AK, Singh M, Bharti AC, Singh M, Shukla S, Singh AK, Mehrotra R. Synergistic effect of stromelysin-1 (matrix metalloproteinase-3) promoter (-1171 5A->6A) polymorphism in oral submucous fibrosis and head and neck lesions. *BMC Cancer*. 2010 Jul 14;10:369.
113. Biondi ML, Turri O, Leviti S, Seminati R, Cecchini F, Bernini M, Ghilardi G, Guagnellini E. MMP1 and MMP3 polymorphisms in promoter regions and cancer. *Clin Chem*. 2000 Dec;46(12):2023-4
114. Fan W, Zhou K, Hu D, Song X, Zhao Y, Chen H, Wei Q, Chen G, Shi J, Du G, Mao Y, Lu D and Zhou L. Single nucleotide polymorphisms of matrix metalloproteinase 3 and risk of gliomas in a Chinese Han population. 2011 Oct;DOI: 10.1002/mc.20842
115. Nan H, Niu T, Hunter DJ, Han J. Missense polymorphisms in matrix metalloproteinase genes and skin cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008 Dec;17(12):3551-7.
116. Ouyang G, Yao P, Hu W, Chen Q, Wang H, Wang L and Li J. A non-synonymous coding SNP lys45Glu of mmp3 associated with ESCC genetic susceptibility in population of Henan, China. *Chinese-German J Clin Oncol* 2009; 8: 510-515
117. Hirata H, Okayama N, Naito K, Inoue R, Yoshihiro S, Matsuyama H, Suehiro Y, Hamanaka Y, Hinoda Y. Association of a haplotype of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 polymorphisms with renal cell carcinoma. *Carcinogenesis*. 2004 Dec;25(12):2379-84. Epub 2004 Aug 19.
118. Hong YM, Jin HS, Park IS, Hong SJ. Association of the matrix metalloproteinase-3 (-439C/G) promoter polymorphism with Kawasaki disease in Korean children. *Heart Vessels*. 2008 Sep;23(5):341-7. Epub 2008 Sep 20.
119. Li M, Shi J, Fu L, Wang H, Zhou B, Wu X. Genetic polymorphism of MMP family and coronary disease susceptibility: a meta-analysis. *Gene*. 2012 Mar 1;495(1):36-41. Epub 2011 Dec 29.
120. Beyzade S, Zhang S, Wong YK, Day IN, Eriksson P, Ye S. Influences of matrix metalloproteinase-3 gene variation on extent of coronary atherosclerosis and risk of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:2130-7.

ETİK KURUL KARARI

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 1390

Tarih : 29.07.2011

Konu : Doç Dr. H.Arzu ERGEN hk,

Sayın Doç. Dr. H.Arzu ERGEN
DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı
Öğretim üyesi

İlgi :25.05.2011 tarihli 445 sayılı yazınız

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Yüksek lisans öğrencisi Mustafa ADIGÜZEL'in yürüteceği 2011/1258-661 dosya numaralı "Osteosarkomda MMP3 gen polimorfizmlerinin incelenmesi" başlıklı tez çalışması kurulumuzun 27.07.2011 tarihli 10 sayılı toplantısında etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize saygılarımla rica ederim.

Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: Tutanak

ETİK KURULUN ADI	İstanbul Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
AÇIK ADRES	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Hulusi Behçet Kütüphanesi Kat 3 Çapa Fatih/İstanbul 34380
TELEFON	0 212 414 20 00 – 313 46
FAKS	0 212 414 21 53
E-POSTA	

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Osteosarkomda MMP3 gen polimorfizmlerinin incelenmesi			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU	-			
	EUDRACT NUMARASI	-			
	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. H.Arzu ERGEN			
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	DETAE-Moleküler Tıp Anabilim Dalı			
	KOORDİNATÖRÜN UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. H.Arzu ERGEN			
	KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI	DETAE- Moleküler Tıp Anabilim Dalı			
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Moleküler Tıp Anabilim Dalı			
	ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Moleküler Tıp Anabilim Dalı			
	BAŞVURULAN ETİK KURULUN ADI	İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu			
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi			
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ	AKADEMİK AMAÇLI (X)		
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1			
		FAZ 2			
FAZ 3					
FAZ 4					
BE/BY					
DİĞER		Diğer ise belirtiniz:			
İLAÇ DIŞI ARAŞTIRMA	Belirtiniz:				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ	ÇOK MERKEZLİ X	ULUSAL X	ULUSLARARASI	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ		24.05.2011	-	TürkçeX	İngilizce
ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ				Türkçe	İngilizce	Diğer
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU		24.05.2011	-	TürkçeX	İngilizce	Diğer
OLGU RAPOR FORMU				Türkçe	İngilizce	Diğer

	Belge Adı		Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	X	
	SIGORTA		
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ		
	ILAN		
	YILLIK BİLDİRİM		
	SONUÇ RAPORU		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ		
DİĞER	Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgu Rapor Formu, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD		

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 10	Tarih: 27.07.2011
İstanbul Tıp Fakültesi DETAE-Moleküler Tıp Anabilim Dalı Doç. Dr. H.Arzu ERGEN ve Yüksek Lisans Öğrencisi Mustafa ADIGÜZEL'in koordinatörlüğü ve sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen tez başvuru dosyası ve araştırma ile ilgili belgeler gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etkisiz bulunmadığına karar verilmiştir.		

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	İstanbul Üniversitesi İnsan Denekler Üzerinde Yürütülecek Bilimsel Araştırmalar ve Etik Değerlendirme Kurulları Yönergesi, 10 Aralık 2010 tarihli, T.C. Sağlık Bakanlığı İyi Klinik Uygulamaları Klavuzu
---------------	--

ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		İlişki *		Katılım **		İmza			
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E	X	K	E	H	X	H			
Prof. Dr. Bernin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E		K	X	E	H	X	H		
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E	X	K		E	H	X	E	H	
Prof. Dr. Rukiye EKER OMEROĞLU	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	İstanbul Tıp Fakültesi	E		K	X	E	H	X	E	H	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E	X	K		E	H	X	E	H	
Prof. Dr. Pınar SAİP	Onkoloji	I.U. Onkoloji Enstitüsü	E		K	X	E	H	X	E	H	
Uzm. Dr. Ahmet Rıza URAS	Biyokimya	Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Emekli	E	X	K		E	H	X	E	H	
Prof. Dr. Ayşen BULUT	Halk Sağlığı	Emekli	E		K	X	E	H	X	E	H	
Doç. Dr. Tufan TÜKEK	İç Hastalıkları	Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi İç Hastalıkları 1. Dahiliye Kliniği	E	X	K		E	H	X	E	H	
Prof. Dr. Ünal KUZGUN	Ortopedi	Sişli Etfal E. ve Arş. Hst.	E	X	K		E	H	X	E	H	T. Katılmadı.
Prof. Dr. Ahmet O. ARAMAN	Eczacılık	I.U. Eczacılık Fakültesi	E	X	K		E	H	X	E	H	T. Katılmadı.
Av. Dilek TEMİZ ÖZBEK	Hukukçu	İstanbul Üniversitesi	E		K	X	E	H	X	E	H	
Prof. Dr. Demir TIRYAKI	Biyofizik	Emekli	E	X	K		E	H	X	E	H	
M. Kerim AKMAN	İİBF İktisat Bölümü	Özel (Ekonomist)	E	X	K		E	H	X	E	H	T. Katılmadı.

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Mustafa	Soyadı	Adıgüzel
Doğ.Yeri	Emet	Doğ.Tar.	13.10.985
Uyruğu	TC	TC Kim No	24881273162
Email	adiguzelmustafa@windowslive.com	Tel	0555 566 33 42

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İÜ. DETAE Moleküler Tıp ABD.	2012
Lisans	İÜ. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2009
Lise	Kütahya Atatürk Lisesi	2004

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Orta	Orta	50	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

- *P.149 Aterosklerotik Koroner Arter Hastalığında Myeloperoksidaz Gen Polimorfizmi ve Plazma Düzeyleri Arasındaki İlişki*, H.Arzu Ergen, Özlem Timirci Kahraman, Atike Tekeli, Selim İşbir, A.Nazlı Turan, Y.Emre Ekşi, **Mustafa**

Adıgüzel, Turgay İsbir (XXIII Ulusal Biyokimya Kongresi, 29 Kasım-2 Aralık 2011, Adana)

- *Examination Of Plasma Myeloperoxidase Levels In Myocardial Infarction*, H.Arzu Ergen, Özlem Timirci Kahraman, Atike Tekeli, A.Nazlı Turan, Y.Emre Ekşi, **Mustafa Adıgüzel**, Selim İsbir, Turgay İsbir.(4th International Congress Of Molecular Medicine, 27, 30 June 2011, Istanbul, Turkey)

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Seyehat