



T.C

**TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**SİLOSTAZOLÜN VE PİOGLİSTAZOLÜN SPİNAL KORD
HASARI YAPILAN TAVŞANLARDA
ADAMTS/AGREKANAZ GEN EKSPRESYONU ÜZERİNE
ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yudum YARAL

ANKARA – 2013

T.C
TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

SİLOSTAZOLÜN VE PİOGLİTAZONUN SPİNAL KORD
HASARI YAPILAN TAVŞANLARDA
ADAMTS/AGREKANAZ GEN EKSPRESYONU ÜZERİNE
ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Yudum YARAL

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Mehmet NAMUSLU

ANKARA – 2013

ÖNSÖZ

Bu tezin pratik ve teorik alanlarında her daim madden ve manen desteklerini esirgemeyen tez danışmanım sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet NAMUSLU hocam ve tez yürütücüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Kadir DEMİRCAN hocama teşekkürü bir borç bilirim. Yüksek lisans eğitimim süresince desteklerini hiç esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. M. Ramazan YİĞİTOĞLU'na ve Doç. Dr. Hüsamettin ERDAMAR'a teşekkürlerimi sunuyorum. Ayrıca değerli fikirleri ile yol gösteren Prof. Dr. Ferah ARMUTÇU ve Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Tuğrul ÇELİK'e teşekkür ederim. Bu süreçte tüm tıbbi biyokimya ve tıbbi genetik yüksek lisans öğrenci kadrosundaki arkadaşlarıma da teşekkür ederim. Tez çalışmalarım boyunca ayrı kaldığım buna rağmen maddi manevi destekleri ile her daim yanımda olan babama, anneme ve kardeşlerime; ayrıca Turgut ÖZAL Üniversitesi Tıp Fakültesi öğrencilerine teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs 2013

Yudum YARAL

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET	i
ABSTRACT	vi
ŞEKİL ve GRAFİKLER.....	viii
TABLOLAR ve RESİMLER.....	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	4
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. MEDULLA SPİNALİS	4
2.1.1. Omurilik Yaralanmaları	4
2.1.2. Omurilik Yaralanmalarının Nedeni.....	4
2.1.3. Omurilik Yaralanmalarının Etkileri	4
2.2. İSKEMİ/REPERFÜZYON	6
2.2.1. İskemi- Reperfüzyon Hasar Mekanizmaları ve Serbest Radikaller	7
2.3. ANTİOKSİDANLAR.....	9
2.3.1. Bazı Önemli Antioksidanlar.....	11
2.3.1.1. Enzim Olan Antioksidanlar.....	11
2.3.1.2. Enzim Olmayan Antioksidanlar	13
2.4. SİLOSTAZOL	16
2.5. PİOGLİTAZON.....	17
2.6. ADAMTS AİLESİ.....	17
2.6.1. ADAMTS Proteazların Domain Yapısı	18
2.6.2. ADAMTS Ailesinin Bilinen Fonksiyonları	20
2.6.3. ADAMTS Proteinlerinin Moleküler Organizasyonu	23
2.6.4. ADAMTS Proteinlerinin Ekspresyonu	25
2.6.5. ADAMTS Proteinlerinin İnhibisyonu	26
2.6.6. ADAMTS Proteinlerinin Hastalıkla İlişkisi	27
3. MATERYAL VE METOD	29
3.1. DENEY HAYVANLARI PROSEDÜRÜ	29
3.2. DOKUDAN RNA İZOLASİYON PROTOKOLÜ.....	30

3.3. cDNA SENTEZ PROTOKOLÜ	31
3.4. PRİMERLERİN HAZIRLANMASI	32
3.5. GRADİYENT PCR.....	32
3.6. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ	34
3.7. WESTERN BLOT	34
3.7.1. Protein İzolasyonu.....	35
3.7.2. Protein Miktar Tayini	37
3.7.3. Kaynatma	39
3.7.4. SDS-PAGE.....	40
3.7.5. Yükleme	43
3.7.6. Transfer İşlemi	44
3.7.7. Bloklama	44
3.7.8. Birinci Antikor	45
3.7.9. İkinci Antikor	46
3.8. DENEYDE KULLANILAN CİHAZLAR	48
3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	49
4. BULGULAR	50
4.1. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZ	50
4.2. WESTERN BLOT GÖRÜNTÜLEME SONUÇLARI.....	54
4.2.1. ADAMTS1	54
4.2.2. ADAMTS15	55
4.2.3. ADAMTS18.....	55
4.2.4. ADAMTS5	56
4.2.5. ADAMTS16.....	56
4.3. SONUÇLARIN SPSS'DE DEĞERLENDİRİLMESİ.....	58
4.3.1. Mann-Whitney Testi İle Sham ve İskemi/Reperfüzyon Gruplarında ADAMTS16 Expresyonunun Karşılaştırılması	60
4.3.2. Mann-Whitney Testi İle İskemi/Reperfüzyon ve İlaç Uygulanmış Tavşan Dokularında ADAMTS16 Gen Expresyonunun Karşılaştırılması.....	60
4.3.3. Sonuçların Grafiğe Dökülmesi.....	62
5. TARTIŞMA.....	65
6. KAYNAKLAR.....	68

Enstitüsü : Sağlık Bilimleri
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyokimya
Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Mehmet NAMUSLU
Tez Tarihi : Haziran 2013

ÖZET

SİLOSTAZOLÜN VE PİOGLİTAZON SPİNAL KORD HASARI YAPILAN TAVŞANLARDA ADAMTS/AGREKANAZ GEN EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ

Yudum YARAL

ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) proteinazları ilk olarak 1997'de keşfedilmişlerdir. Keşiflerinden bu yana özellikle ekstraselüler matriks ilişkili proteolizde görev aldıkları tespit edilmiştir. ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) ailesinde bugüne kadar keşfedilen toplam 19 adet üye vardır. Bir disintegrin ve metalloproteinaz (MP) olan ADAM genleri; transmembran proteinleri, integrin bağlamaları, hücre içi sinyal iletimi ve adezyon aktivitesi gibi hücrenin birçok hayati fonksiyonuyla ilişkilidir. Diğer MP'lerin tersine ADAM'ların hücre içi proteinleri kesme-bağlama aktivasyonu da bulunmaktadır. ADAM genlerinin bu özelliğinden dolayı birçok hastalığın patogenezinde de rol aldığı düşünülmektedir.

Silostazol antiagregan, antitrombotik ve vazodilatasyon etkileri nedeniyle inoperabl periferik arter hastalıklarında klinikte rutin kullanılan bir ajandır. Bu ajanın nöroprotektif özelliği son yapılan klinik ve deneysel çalışmalarla gösterilmiştir. Vasküler cerrahide medulla spinalis iskemi-reperfüzyon (I/R) modeli üzerinde henüz klinik ve deneysel çalışma yapılmamıştır. Yapılan çalışmalarda silostazol'ün periferik arter hastalığı olan hastalarda egzersizin indüklediği (I/R) hasarını azalttığı klinik olarak gösterilmiştir. Bunun yanında, silostazol'ün yapılan deneysel çalışmalarda transient serebral iskemi sonrası nöronal hasarı azalttığı gösterilmiştir. Diğer bir deneysel çalışmada fokal serebral iskemide apoptotik ve oksidatif hücre ölümü inhibisyonu yoluyla Silostazol'ün nöroprotektif etkisi gösterilmiştir. Endotelial nitrik oksit sentazı (eNOS) aktive ederek nitrik oksit (NO)

yapımını indüklediği gösterilmiştir. Aynı zamanda antiinflamatuvar ve antioksidan özellikleri de vardır.

Bu çalışmada spinal kord travma modeli oluşturulan tavşanlarda ADAMTS ailesinin rolünü ve silostazolün bunlara etkisini araştırmayı amaçladık. Bu çalışma dört farklı tavşan grubu üzerinden yürüdü. Birinci grup tavşanlarda omurilik yaralanması yoktur. Bu grup kontrol grubu olarak kullanıldı. İkinci grup ise omuriliklerinde (I/R) oluşturulan tavşanlardır. Üçüncü grup tavşanlar da omuriliklerinde I/R oluşturulmuş ve öncesinde silostazol verilmiş tavşanlardır. Dördüncü grupta da I/R ile birlikte öncesinde silostazol yerine pioglitazon verilmiş tavşanlar bulunmaktadır..

Çalışmanın ilk evresinde dokulardan elde edilen genlerde, PCR yöntemi ile agrekanaz ADAMTS gen ailesinin tümü tarandı. ADAMTS-1, -4, -5, -9, -15, -16, -18 genlerinin ekspresyonu diğer aile üyelerinden daha fazla olduğu saptandı (sayfa 54).

Çalışmanın ikinci evresinde dokulardan protein eldesi yapıp Western Blot yöntemi ile dokulardaki protein ekspresyonu tespit edildi. ADAMTS/ β -ACTİN oranı göz önüne alınarak ADAMTS gen ailesinden ADAMTS1, ADAMTS16 ve ADAMTS18 gen ekspresyonunun (I/R) yapılan dokularda katlanarak arttığı saptandı.

Buna ek olarak silostazol ve pioglitazon ilacı verilen (I/R) dokularda ADAMTS gen ekspresyonunun baskılandığı bulundu.

Buna göre (I/R) yapılan omurilikte silostazol ve pioglitazon ilacının iyileştirme faktörü olarak kullanılmasının yanında farklı ilaçlarında bu etkiyi yapabileceği düşünülmektedir. Bu etkinin ve ilaçların bulunması için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Silostazol, spinal kord hasarı, ADAMTS/agrekanaz

University : Fatih University
Institute : Institua of Healty Sciences
Department : Medical Biochemistry
Supervisor : Yrd. Doç. Dr. Mehmet NAMUSLU
Degree Awarded and Date : June 2013

ABSTRACT

THE EFFECTS OF CILOSTAZOL AND PIOGLITAZON IN SPINAL CORD INJURY IN RABBITS ON GENE EXPRESSION OF ADAMTS/Aggrecanase

Yudum YARAL

ADAMTS proteinases were first discovered in 1997. Since their discovery, their roles in extracellular matrix proteolysis have been established. ADAMTS belong to the metalloprotease superfamily and consist of 19 members distinct functions, ADAMTS1-ADAMTS19. These transmembrane proteins play roles in numerous vital cellular events such as integrin binding, intracellular signaling, and cell adhesion. In contrast to other metalloproteases ADAMTS proteins can also cleave and bind to intracellular proteins. Therefore, mutations in the gene coding for ADAMTS proteins are associated with the risks of various diseases.

Cilostazol is a widely used drug in the treatment of arterial disorders. It inhibits platelet aggregation and smoothens muscle contraction, thereby exerting its vasodilatory effect. The neuroprotective properties of this drug has recently been demonstrated. However, its effect on medulla spinalis ischemia/reperfusion (I/R) damage is unknown. Other clinical studies have shown that Cilostazol represses the exercise-induced I/R damage in patients with peripheral arterial disorders. Cilostazol is also shown to repress the neuronal damage following a transient cerebral ischemia. Moreover, another study has illustrated the neuroprotective properties of Cilostazol in focal cerebral ischemia through the inhibition of apoptosis and oxidative cell death.

In the present study, using a spinal cord injury model in rabbits, we aimed to study the neuroprotective role of ADAMTS family and the impact Cilostazol has on these proteases. In order to, we established four sample groups. Group 1 consisted of rabbits lacking a spinal cord injury and were selected as controls. Rabbits in Group 2 had I/R damage induced on them. Group 3 samples were treated with Cilostazol prior to I/R damage, and

members of Group 4 were treated with Pioglitazon instead of Cilostazol. In the first stage of the experiment, using polymerase chain reaction, the expression of ADAMTS gene family was analysed in Groups 1 and 2. It was found that I/R upregulates the expression of ADAMTS1, 4, 5, 9, 15, 16, 18 genes (page 54).

Next, protein extracts from tissues were used in Western Blot analysis to detect the protein expression across the groups. Using ADAMTS/ β -ACTIN ratio as a reference, it is established that I/R damage induces an upregulation of ADAMTS1, 16, and 18. Additionally, the repressive effects of Cilostazol and Pioglitazon on ADAMTS gene expression was displayed.

Altogether, we present Pioglitazon and Cilostazol as effective agents for the recovery from I/R damage in the spinal cord. They exert their functions through repression of ADAMTS expression. In future studies, the molecular bases of the repression mechanism need to be investigated further.

Key Words: Cilostazol, spinal cord injury, ADAMTS/Aggreganases

ŞEKİL VE GRAFİKLER

Şekil 1: İskemi döneminde doku hasarını gelişmesinde rol oynayan mekanizmalar.

Şekil 2: ADAM, ADAMTS ve MMP'ler ve aralarındaki motif farklılıkları.

Şekil 3: ADAMTS ailesi ve sınıflandırılması.

Şekil 4: ADAMTS proteinazların domain organizasyonu

Şekil 5: Genel PCR döngüsü

Şekil 6. ADAMTS1' in ACTİN ile birlikte western blot yöntemi ile elde edilmiş bant görüntüleri.

Şekil 7. ADAMTS15' in ACTİN ile birlikte western blot yöntemi ile elde edilmiş bant görüntüleri.

Şekil 8. ADAMTS18' in ACTİN ile birlikte western blot yöntemi ile elde edilmiş bant görüntüleri.

Şekil 9. ADAMTS5' in ACTİN ile birlikte western blot yöntemi ile elde edilmiş bant görüntüleri.

Şekil 10. ADAMTS16 proteininin SC iskemi reperfüzyon tavşan modeli: D:silostazol, P: piatiasilostazol. Western Blot Protein tayini ile ADAMTS16 genine ve ACTİN' ait bantların görüntüsü.

Grafik 1. İ/R yapılan SC'da ADAMTS16 ekspresyonu ve bu ekspresyona silostazol ile piasilostazol etkisi yukarıda verilmiştir. Kontrol grubu ADAMTS16 gen ekspresyonuna göre İ/R dokuda gen ekspresyonunun 1.824 kat arttığı ve bu artışın SPSS sonucu anlamlı olduğu bulunmuştur. Ayrıca ilaç verilen dokularda ADAMTS16 gen ekspresyonunun anlamlı şekilde azaldığı saptanmıştır.

Grafik 2. ADAMTS1

Grafik 3. ADAMTS15

Grafik 4. ADAMTS18

Grafik 5. ADAMTS5

TABLolar VE RESİMLER

Tablo 1: ADAMTS ailesi ile ilgili bilgilerin özeti

Tablo 2: ADAMTS üyelerinin doku dağılımları

Tablo 3. ACTİN ve ADAMTS16 geninin ekspresyon düzeylerinin WESTERN BLOT analizi sonucu sayısal verileri.

Tablo 4. SPSS’de veri tabanı oluşturulması

Tablo 5. Verilerin SPSS’ e girilmesi

Tablo 6. Grup ortalamalarının SPSS’de hesaplanması

Resim 1: A) Sonikasyon cihazı B) Sonikatörde parçalama

Resim 2: A) Liysis buffer ve proteaz B) Santrifüj 14,000 rpm, 20 dk, +4 °C

Resim 3: Coomassie boyası eklenmiş proteinler

Resim 4: Spektrofotometre

Resim 5. Heat Block

Resim 6. Sample buffer

Resim 7. Jel dökme aparatı

Resim 8. Jel Yükleme Tankı

Resim 9. Turbo Transfer Cihazı

Resim 10. A) Streptactin ve 2. Ab B) Membranın naylon poşete presleme

Resim 11. Membranların ECL solüsyonu ile inkübasyona bırakılması

Resim 12. ADAMTS-1’in gradyent PCR sonucunda elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Resim 13. Deney sonucuna göre ve yapılan literatür çalışmasına göre ADAMTS4'ün Western çalışması yapılmamıştır.

Resim 14. Deney sonucuna göre ve yapılan literatür çalışmasına göre ADAMTS9'ün Western çalışması yapılmıştır. ADAMTS9 Western Blot çalışması sonucu ileride gösterilmiştir

Resim 15. Deney sonucuna göre ve yapılan literatür çalışmasına göre ADAMTS12'nin Western çalışması yapılmamıştır.

Resim 16. Deney sonucuna göre ve yapılan literatür çalışmasına göre ADAMTS15'in Western çalışması yapılmıştır. ADAMTS15'in Western Blot çalışması sonucu ileride gösterilmiştir.

Resim 17. Deney sonucuna göre ve yapılan literatür çalışmasına göre ADAMTS16'in Western çalışması yapılmıştır. ADAMTS16'in Western Blot çalışması sonucu ileride gösterilmiştir.

Resim 18. Deney sonucuna göre ve yapılan literatür çalışmasına göre ADAMTS17'ün Western çalışması yapılmamıştır.

Resim 19. Deney sonucuna göre ve yapılan literatür çalışmasına göre ADAMTS18'in Western çalışması yapılmıştır. ADAMTS18'in Western Blot çalışması sonucu ileride gösterilmiştir.

SİMGELER VE KISALTMALAR

L	Litre
ml	Mililitre
dl	Desilitre
U	Ünite
µg	Mikrogram
NaCl	Sodyum Klorür
ROT	Reaktif Oksijen Türevleri
O ₂ -.	Süperoksit Radikali
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HO.	Hidroksil Radikali
OH	Hidroksi Molekülü
LOO•	Lipid Peroksil Radikali
L•	Lipid Radikali
LOOH	Lipid Hidroperoksit
MDA	Malondialdehit
SOD	Süperoksit Dismutaz
NO	Nitrik Oksit
Mn-SOD	Mangan Süperoksit Dismutaz
Cu-Zn SOD	Bakır Çinko Süperoksit Dismutaz
ADAM	A Disintegrin and Metalloproteinase
ADAMTS	A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motif
cDNA	Complementer DNA

EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	Proprotein Convertase
PCR	Polymerase Chain Reaction
TIMP	Tissue Inhibitors of Metalloproteinase

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Medulla Spinalis Yaralanması (MSY) diğerk bir adı ile spinal cord (SC) hasarı, torasik ve torakoabdominal aort cerrahisi sonrası görülebilen medikal bir komplikasyondur. MSY'e bağılı gelişen pleji tablosunda hastalar pek çok vücut fonksiyonlarını kaybetmelerinin yanı sıra fiziksel, psikososyal ve ekonomik sorunlar yaşamakta ve bu sorunlar bireysel olduğu kadar toplumsal bir boyut da taşımaktadır(1). Bu sayıllanlara ek olarak anestezi-hipoestezik bölgeler ve diğerk organik yapılardan kaynaklanan kronik ağrı da gelişebilmektedir. Kronik ağrı MSY'nin en önemli komplikasyonlarından biridir(2,3). Bu komplikasyonları önlemek için değışik spinal cord koruma yöntemleri kullanılmaktadır.

Cerrahi tekniklerde ve spinal cord koruma yöntemlerindeki ilerlemelere rağmen cerrahi girişim sırasında SC yaralanmaları tamamen önlenememiştir. Cerrahi işlem sırasında spinal kord yaralanmalarında başlıca patogenezi, yaralanma yerindeki mikroperfüzyonun santral gri cevherden başlayarak ilerleyici bir şekilde azalmasıdır. Hipoperfüzyon beyaz cevhere yayıldığında iskemiden dolayı aksiyon potansiyeli durur ve spinal şok başlar (9).

Kardiyo vasküler sistem hastalıklarının cerrahi girişimleri esnasında aortun klempenmesi ile kan akımı durdurulur ve işlem bittikten sonra klempin alınması ile tekrar aortta kan akımı sağlanır. Bu esnada arteriyel kan akımı azalmasına bağılı organ ve dokunun yetersiz perfüzyonu sonucu bu doku veya organların oksijenden yoksun kalması şeklinde iskemi meydana gelir. Bu durum, hücresele enerji depolarının boşalmasından, toksik metabolitlerin birikmesi sebebi ile hücre ölümüne kadar gidebilen olaylara neden olabilir. İskemik dokuya hem hücrenin yenilenmesi, hem de toksik elementlerin temizlenmesi için yeniden kan akımı gerekir. Ancak, iskemik dokunun reperfüzyonu dokuda paradoksal olarak sadece iskemi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi bir hasara yol açar(4). Meydana gelen bu duruma iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı denir. Reperfüzyon döneminde gözlenen hasarda, hücre içine moleküler oksijen girişi ile hızla oluşan serbest oksijen radikal (ROS) türevleri başta olmak üzere birçok mekanizma rol oynamaktadır. Reperfüzyon hasarına en fazla duyarlı olan hücresele yapılar, zar lipitleri, proteinler, nükleik asitler ve deoksiribonükleik asit molekülleridir(5).

Cerrahi işlem sırasında oluşan bu hasarı önlemek için çeşitli yöntemler geliştirilmekte, yeni ilaç etken maddeleri keşfedilmektedir. Reaktif oksijen türleri ve inflamasyon, iskemi reperfüzyon (I/R) hasarı patofizyolojisinde önemli rol oynamaktadır. Peroksizom proliferatör aktive reseptör- γ (PPAR- γ) agonistlerinin anti-inflamatuar ve antioksidan etkilerinin olduğu bilinmektedir. Pioglitazonun peroksizom proliferatör aktive reseptör- γ (PPAR- γ) agonist etkisi bulunmaktadır (6).

Trombosit, fosfodiesteraz-3 inhibitörü ve vazodilatör etkileri olan silostazol, periferik arter hastalığına bağlı intermitan klodikasyon tedavisinde yararlı olabilmektedir(7). Ayrıca kaslara yeterli kan gitmemesine ve bu nedenle bacaklarda kramp benzeri ağrılara neden olan dolaşım bozukluğunun tedavisinde kullanılır. Aynı zamanda ağrısız yürüme mesafesinin artmasına da yardımcı olur(8). Yapılan bazı çalışmalarda omuriliklerinde İ/R hasarı oluşturulan rat modellerinde; İ/R'dan önce verilen silostazolün oksidatif stresi azaltarak, nörolojik yaralanmayı azalttığı ve klinik iyileşmeyi geliştirdiği bulunmuştur(9).

Birçok hastalığın patolojisindeki rolü sebebiyle A Disintegrin-like and Metalloproteinase with Trombospondin type-1 motif (ADAMTS) proteinazlarına gösterilen ilgi her geçen gün artmaktadır. İlk olarak 1997 yılında Kuno ve arkadaşları tarafından kolon kanserinde, inflamasyonla ilişkili olarak tanımlanmış olan ADAMTS proteinazların, günümüzde birçok fizyolojik ve patolojik süreçlerde yer aldığı bilinmektedir. ADAMTS enzimleri birçok dokuda bulunmakla beraber embriyonik dönemde de sentezlenirler. ADAMTS'lerin önemli fizyolojik fonksiyonlarından bazıları; doku yeniden yapılanması, pıhtılaşma, anjiyogenez ve ovulasyondur. Ayrıca hücre dışı matriksin ve bazal membranın parçalanması, tümör hücresi invazyonu ve metastaz gibi patolojik süreçlerde de rol alırlar(10). Buna göre ADAMTS'leri alt gruplarına ayırırsak: Kollajen N-proteinazlar; ADAMTS-2, 3 ve 14. Prokollajenin N-ucundaki propeptitleri uzaklaştırarak kollajene dönüşmesinde rol oynarlar. Agrekanazlar; ADAMTS-1, 4, 5, 8, 9, ve 15. Matriks proteoglikanı olan agrekanın parçalanmasında agrekanaz aktivitesine sahiptirler. Daha sonra bu grubun, merkezi sinir sisteminde yoğun şekilde ifade olan brevikan ile kan damarlarında bulunan versikanı da parçaladığı bulunmuştur. Anjiogenezin inhibisyonunda görev alanlar; ADAMTS-1 ve 8. Kan pıhtılaşması homeostasta von Willebrand Faktörünü Parçalayan Proteaz olarak bilinen; ADAMTS-13 (vWFPC) dir. Bu görevlerinin dışında ayrıca ADAMTS'ler organogenez, inflamasyon ve fertilitede görev almaktadırlar. Ayrıca son

çalışmalar göstermektedir ki artrit ve pek çok kanserde bazı ADAMTS genlerinin ekspresyonları değişmektedir (11,12).

Maalesef önemine rağmen ADAMTS ailesiyle ilgili hala birçok bilinmeyen vardır. İşte bu yüzden biz de bu çalışmamızda ADAMTS'lerden; ADAMTS-1, ADAMTS-4, ADAMTS-5, ADAMTS-8, ADAMTS-9, ADAMTS-15, ADAMTS-16, ADAMTS-18 'in özellikle SC hasarı üzerindeki rolünü moleküler düzeyde saptamayı amaçladık. Literatürde böyle bir çalışmanın bulunmaması, şu ana kadar spinal kord hasarı modelinde sadece ADAMTS-8 gen ekspresyonuna bakılmış olması da çalışmayı kıymetli kılmaktadır. Ayrıca silostazolün reperfüzyondan sonra antiagregan etkisi sayesinde ADAMTS'ler üzerinden spinal cord hasarını önleyebileceği düşünülmüş, bu konuda da daha önceden yapılan araştırma olmaması bizi araştırmaya sevk etmiştir.

Bu çalışmada omurilik yaralanması, iskemi reperfüzyon (İ/R) hasarı modeli Yeni Zelanda tavşanları üzerinde yapılmıştır. İ/R sebebi ile oluşan spinal cord hasarının silostazol ve pioglitazonun ADAMTS'ler üzerinden etkisi ile önleyebileceğini düşündük.

Yapılan ön çalışmalardan sonra elde edilen verilere göre ADAMTS-16 üzerine yoğunlaştık ve dört farklı SC hasarlı tavşan modeli kıyaslamasını Western Blot yöntemiyle yaptık. ADAMTS-16 gen ekspresyonunun protein düzeyinde incelenmesi sonucu bu genin önemli ölçüde I/R dokuda arttığını saptadık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 MEDULLA SPİNALİS

Omurilik otuz bir bölgeden oluşur: sekiz servikal, on iki torasik (arka), beş lumbar, beş sakral ve bir koksiks. Bunların her biri vücudun özel bir bölümünü etkileyen ve merkezi sinir sistemi (MSS) ile bağlantısını sağlayan bir çift sinire sahiptir. MSS beyin ve omurilikten oluşmaktadır. Omuriliğin merkezi, duyu ve motor sinir uyarılarını ileten myelinize sinir lifi demetlerinden oluşur. Myelinize sinir lifleri yalıtkan elektrik telleri gibidir. Beyin ve omurilik, merkezi sinir sisteminin hassas yumuşak dokusu olan, kafatasının ve omur kemiklerinin arasında yerleşmiş, üç (3) tabaka halindeki bağ dokudan oluşan beyin zarları tarafından sarılmıştır. Omurilik omur (vertebra) veya omur korpusu (vertebral bodies) adı verilen omurgayı (vertebral column) oluşturan yirmi beş (26) kemik tarafından korunmaktadır. Omurga omuriliği destekler ve korur.(13)

2.1.1. Omurilik Yaralanması

Medulla Spinalis Yaralanması yüzyıllarca hastayı kısa surede ölüme götüren bir durum olarak bilinirken, 1930'lerden sonra bu konuda organize girişimlerin başlamasıyla akut bakım ve rehabilitatif yaklaşımlarda ciddi yenilikler olmuştur. Günümüzde MSY olan pek çok hastanın sadece hayatta kalması değil, aynı zamanda üretken ve toplumsal bir yaşam sürmesi sağlanabilmektedir. MSY'de tedavinin amacı, hastalara bireysel ve mesleki açıdan tatmin edici, sağlık problemleri önlerinde bir engel olmadan hayatlarının devamını sağlamaktır. (14).

2.1.2. Omurilik Yaralanmalarının Nedeni

En büyük nedenlerden biri travmadır. Travma, yaralanma sonucu oluşur. Travmatik omurilik yaralanmalarının nedenleri, sıklığına göre; otomobil kazaları, düşme, silah yaralanmaları ve sığ sularda dalma (yılda en az 2000). Bir diğer sebep Polio (çocuk felci) ve Multipl Skleroz (MS) gibi enfeksiyonlardır. Bunlarla beraber Spina Bifida gibi doğumsal deformasyonlar da omurilik yaralanmasına sebep olabilmektedir (13). Ayrıca cerrahi işlemler sırasında da omurilik yaralanmaları meydana gelebilmektedir.

2.1.3. Omurilik Yaralanmalarının Etkileri

Bası yaraları: MSY'nin en sık morbidite nedenlerindedir. Bası yaraları hem diğer komplikasyonlara zemin hazırlayabilirler hem de enfekte oldukları zaman sepsis hatta ölüm nedeni olabilirler(1).

Kardiovasküler Komplikasyonlar: MSY'de egzersiz kapasitesi, bazal metabolizma ve venöz dönüş azalır. Torakal 6 ve üzeri MSY'de ise ortostatik hipotansiyon görülür. Sistolik ve diastolik kan basınçlarında ani düşüş ve taşikardi saptanır (1, 15).

Derin Ven Trombozu: Erken dönemde pulmoner emboliye yol açabileceği için önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Etyolojide flask dönemdeki immobilitenin yanı sıra kanın koagulabilitesindeki değişiklikler de rol oynar. Kesin tanısı venografi ile konur (1, 15, 16).

Otonom Disrefleksi: Sıklıkla torakal 6 üzerindeki yaralanmalarda görülür. Genellikle yaralanmadan birkaç ay sonra ortaya çıkar ve üç yıl içerisinde geriler. Mesane, kolon, rektum, uterus ve deriden kalkıp spinal korda giden stimuluslar, supraspinal inhibitor mekanizma bozulduğundan pek çok sempatik ve parasempatik refleks cevaplara neden olur. Lezyon seviyesinin altında vazokonstrüksiyon ve hipertansiyon, lezyon seviyesinin üzerinde vasodilatasyona bağlı flushing, soğuk terleme, bradikardi, solunum sıkıntısı gelişir (1,15).

Anemi: MSY sonrası akut dönemde görülen aneminin nedeni yaralanmanın kendisi veya operasyona sekonder iken, kronik dönemde idrar yolu enfeksiyonları, kateterizasyona bağlı mikroskopik hematuri, hemoroid kanamaları, gastrik kanamalar, bası yaralarıdır. %60'a varan oranlarda görülebilir.

Ağrı: MSY olan hastalarda ağrı prevalansı %94'lere çıkabilmektedir ve hastaların %5-45'i günlük yaşam aktivitelerinde ağrıya bağlı sorunlar yaşarlar.

Psikolojik sorunlar, uyum süreci ve yaşam kalitesi: MSY geçiren kişi pek çok dramatik fiziksel, psikolojik ve sosyal problemle karşılaşır (14).

2.2. İSKEMİ/REPERFÜZYON

Spinal kord yaralanmalarında esas problem yaralanma yerindeki mikroperfüzyonun santral gri cevherden başlayarak ilerleyici bir şekilde azalmasıdır. Hipoperfüzyon beyaz cevhere yayıldığında iskemiden dolayı aksiyon potansiyeli durur ve spinal şok başlar.

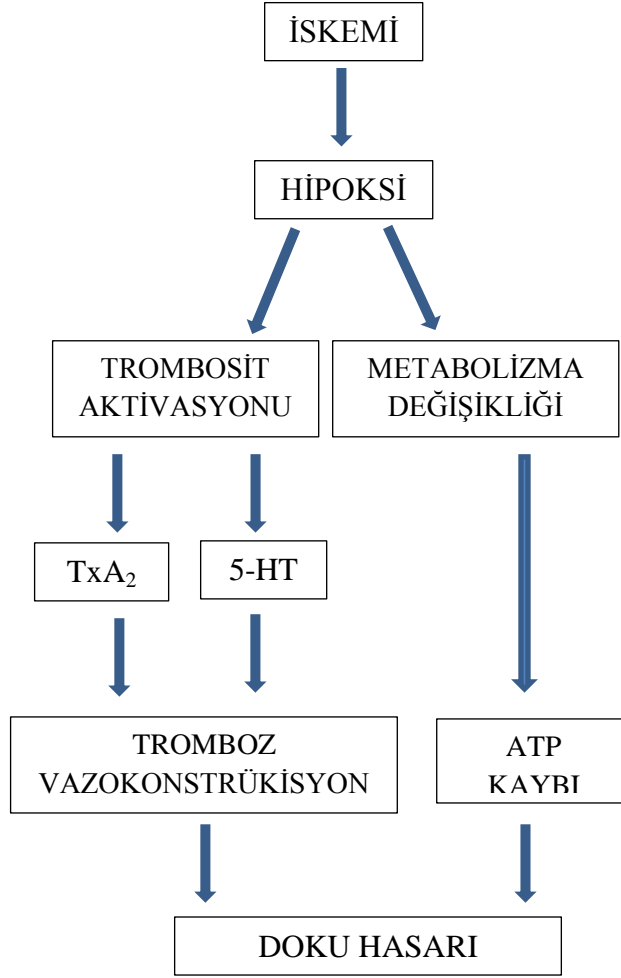
Dokulara kan sağlayan damarların, bir pıhtı veya mekanik etkenle tıkanması sonucu dokunun beslenmesinin bozulmasına iskemi denir. Doku kanlanmasının ilaçlarla veya mekanik müdahalelerle yeniden sağlanmasına reperfüzyon denir (17).

Daha geniş bir tanım yapılacak olursa: Arteriyel ya da venöz kan akımı azalmasına bağlı organ ve dokunun yetersiz perfüzyonu sonucu bu doku veya organların oksijenden yoksun kalması şeklinde iskemi tanımı yapılabilir. Hücresel enerji depolarının boşalması ve toksik maddelerin birikmesi sonucunda iskemi hücre ölümüne yol açmaktadır (şekil 1). Hem hücrenin rejenerasyonu, hem de toksik maddelerin temizlenmesi için iskemik dokuya yeniden kan akımına ihtiyaç vardır. Ancak, iskemik dokunun reperfüzyonu yani tekrardan kan akımının gitmesi dokuda paradoksal olarak sadece iskemi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi bir hasara yol açar. Reperfüzyon döneminde gözlenen hasarda, hücre içine moleküler oksijen girişi ile hızla oluşan serbest oksijen radikal (ROS) türevleri başta olmak üzere birçok mekanizma rol oynamaktadır(4, 5).

Dokuların iskemiye dayanıklılığı birbirinden farklıdır. İskelet kasları iskemiye uzun süre dayanabildiği halde nöronlarda dakikalar içinde geri dönüşümsüz yıkım ortaya çıkabilir.

Hücresel homeostaz için gerekli olan enerji kaynaklarının özellikle ATP'nin tükenmesi, hücre membranında iyon dengesizliğine yol açar. Na⁺ ve Ca⁺⁺ iyon dengesi bozulur. Bunu asidoz ve ozmotik şok gibi klinik bulgular ile kromatin kümelenmesi ve piknozis gibi histolojik bulgular takip eder (18, 19, 20).

Reperfüzyon hasarına doğrudan veya dolaylı olarak katılan pek çok madde ve biyokimyasal reaksiyon tanımlanmıştır. Bu maddelerin birbiriyle etkileşimi sonucunda iskemi-reperfüzyon hasarının reperfüzyon kısmının mediatörleri olan serbest oksijen radikalleri ortaya çıkar. Hücresel antioksidan savunma sistemleri de iskemi nedeniyle zayıflar (21).



Şekil 1. İskemi döneminde doku hasarını gelişmesinde rol oynayan mekanizmalar.(22)

2.2.1. İskemi- Reperfüzyon Hasar Mekanizmaları ve Serbest Radikaller

Genelde elektronlar atom veya molekülde eşlenik olarak bulunmaları nedeniyle molekül kararlıdır ve reaktif değildir. Ancak, moleküle bir elektron ilavesi ya da bir elektron kaybı onu reaktif hale getirir (23). Serbest radikaller, dış yörüngelerinde paylaşılmamış elektron içeren kimyasal bileşiklerdir. Paylaşılmamış elektrona sahip moleküller kararsız bir haldedir. Başka bir molekülle etkileşime girerek, dış yörüngesindeki elektronu eşleme ve kararlı duruma gelme eğilimindedirler. Böylece bu moleküller herhangi bir molekül ile etkileşime girerek, elektron alırlar veya verirler (24).

Oksijenin redüksiyonu ve aerobik hücrelerin enzimatik oksidasyonu sırasında negatif yüklü bir ara ürün olan süperoksit radikali (O_2^-) oluşur. Süperoksit radikalinden enzimatik yolla veya spontan dismutasyonla ikinci bir ara ürün olan hidrojen peroksit radikali (H_2O_2) oluşur. Daha sonra özellikle mitokondride diğer bir ürün olan hidroksil radikali (OH^-) oluşur. Organizmada bu serbest radikaller dışında hidrojen peroksit, hipoklorik asit gibi radikal olmayan, bununla birlikte serbest radikal oluşturma potansiyelinde olan zararlı oksijen türleri de oluşabilmektedir. Diğerleriyle karşılaştırıldığında O_2^- radikali yüksek elektron aktivitesine sahiptir ve çok reaktiftir. Ancak oksijen radikallerinden en aktif olanı OH^- radikalidir (25). Hücreler serbest oksijen radikallerinin hasarına bağışık değildir. Ancak genellikle glutatyon ve katalaz ile oksijen hasarına karşı korunmuşlardır. İskemik dokularda, serbest oksijen radikali üreten intraselüler mekanizmalar tam aktive edilmiş durumdadır. Ancak oksijen sağlanmasındaki eksiklikten dolayı fonksiyon görmezler. Kan akımı ve oksijen sağlanmasının restorasyonu ile büyük miktarlardaki serbest oksijen radikali üretilerek reperfüzyon hasarı indüklenir (18).

Organizmada serbest oksijen radikalleri ortaya çıktıktan sonra radikal reaksiyon dizileri başlar. Eğer bir serbest radikal, radikal olmayan bir molekülle reaksiyona girerse, binlerce reaksiyondan oluşan reaksiyon zincirlerini başlatır. Serbest oksijen radikalleri paylaşılmamış elektronlarından dolayı lipid, protein, karbonhidrat, nükleik asit gibi çeşitli makromoleküllerin oksidatif hasarına neden olurlar (26). Bu hasarlanma özetle şu mekanizmalarla olur:

a-Lipid Peroksidasyonu: Serbest radikallerin hücrede başlattığı en önemli ve zararlı etki lipid peroksidasyonudur. Çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikaller ile oksidasyonu lipid peroksidasyonu olarak tanımlanır. Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan kuvvetli yükseltgen bir radikalın etkisiyle membran yapısındaki çoklu doymamış yağ asidi zincirindeki alfa metilen gruplarından bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlamaktadır. Biyolojik sistemlerde bu radikalın süperoksit ile hidroksil radikalının olduğu kabul edilmektedir. Yağ asidi, zincirinden bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması sonucu zincir radikal niteliğini kazanır. Bunun sonucunda oluşan radikal alkil radikali olup dayanıksız bir türevidir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Özellikle molekül içi çift bağ aktarılması ile dien konjugatları ve daha sonra lipid radikalının moleküler oksijenle etkileşimi sonucunda lipid peroksi radikali (LOO^-) oluşur. Lipid peroksi radikali zar yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek hidroperoksit ($ROOH$) ve yeni

bir alkil radikali oluşturur. Lipid peroksidasyonu, lipid hidroksiperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşikleri ile etkileşmesi sonucu etan, pentan gibi uçucu gazlara dönüşür. Lipid peroksidasyonu biyolojik membranlarda akıcılığın kaybına, membran potansiyelinde azalmaya, hidrojen ve diğer iyonlara karşı geçirgenliğin artışı neticesinde hücrenin hasarına ve içeriğinin serbestleşmesine neden olur. Ek olarak lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan malondialdehit (MDA) membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağ yapmalarına yol açar. Bu da, hücre yüzeyinin durumunu, enzim aktivitesini, iyon transportunu etkileyebilir (26,27).

b-Protein oksidasyonu: Serbest radikaller ile oluşan protein oksidasyonunun kimyasal sonucu olarak metionin sülfokside, histidin oksihistidine veya asparagine, tirozin ditirozine ve sistein disulfitlere dönüşür. Bu değişiklikler proteinlerin bağlanma özelliklerinde ve enzim aktivitelerinde farklılaşmaya neden olarak hücre fonksiyonlarında bozulmalara yol açabilir (28).

c-DNA: Serbest oksijen radikalleri adenin ve piridin nukleotid durumlarının sürdürülebilmesi için gerekli yollara engel olabilirler. Serbest oksijen radikalleri DNA ile tepkimeye girerek mutajenik olan 8-Hidroksiguanin'in ortaya çıkmasına neden olurlar (28).

d-Kovalen bağlanma: Serbest radikaller polisiklik hidrokarbonlar, aromatik aminler ve nitrozaminler gibi ksenobiyotiklerin çeşitli biyomoleküllere kovalent bağlanmasına neden olabilir. Bu da doğrudan hücre hasarına yol açabilir (29).

e-Kalsiyum: Hücre yaralanması ile ilgili olduğu düşünülen bir elementtir. Kalsiyumun transportunu engelleyen herhangi bir durum hücre fonksiyonlarını olumsuz etkiler. Kalsiyum ATPaz enzimleri önemli sulfidril gruplarına sahiptir ve serbest oksijen radikalleri (SOR) tarafından inaktive edilebilir. Sitokinler, hipoksi, endotoksin gibi faktörler SOR aracılı yol kullanarak, hücre enerjisini azaltabilirler (30).

2.3 ANTİOKSİDANLAR

Vücudumuzda serbest radikallerin oluşturduğu zararlı etkilere karşı koruyucu mekanizmalar bulunmaktadır. Bu mekanizmalar hem serbest radikal oluşumunu hem de

oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önlemede görev alırlar. Bu koruyucu mekanizmalarda görev alan yapıların hepsine antioksidanlar denir. Antioksidanların belirgin özellikleri okside olan substratlara oranla çok daha az konsantrasyonlar da bile substratın oksidasyonunu geciktirmeleri veya inhibe etmeleridir(31, 32).

Antioksidanların etki mekanizması (33):

1. Temizleme (scavenging) etkisi: Oksidanları zayıf bir moleküle çevirme şeklinde olur. Bu etki enzimler tarafından yapılır.
2. Baskılama (quencher) etkisi: Oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme şeklinde olur. Bu etki vitaminler ve flavonoidler tarafından yapılır.
3. Onarma etkisi
4. Zincir koparma etkisi: Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyen ağır metaller şeklinde olur. Bu etki hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamini tarafından yapılır.

Antioksidanların sınıflandırılması:

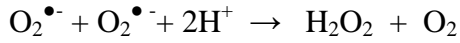
1. Yapılarına göre:
 - Enzimler
 - Enzim olmayanlar
2. Yerleşimlerine göre:
 - İntraselüler yerleşimli olanlar
 - Plazma ve diğer ekstraselüler sıvılarda bulunanlar
3. Çözünürlüklerine göre:
 - Suda çözünenler
 - Yağda çözünenler
4. Kaynaklarına göre:
 - Endojen olanlar
 - Ekzojen olanlar

2.3.1. Bazı Önemli Antioksidanlar:

2.3.1.1. Enzim Olan Antioksidanlar:

Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz enzimi süperoksit radikalinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştüğü reaksiyonu katalizleyen enzimdir. SOD bir süperoksit molekülünü O_2 molekülüne yükseltgeyip, diğer süperoksit molekülünü H_2O_2 'e indirger



Üç tür SOD vardır. Birincisi mitokondride lokalize Mn-SOD, ikincisi sitozolde lokalize Cu-Zn SOD ve üçüncüsü de Cu içeren ve plazmadaki süperoksit radikallerini metabolize eden vasküler endotele bağlı Cu-SOD'dir.

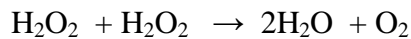
Bu dismutasyon reaksiyonu süperoksit radikalinin anyon ve katyon formlarının eşit oranda bulunduğu pH 4,8'de kendiliğinden de cereyan eder. Ancak fizyolojik şartlarda yani pH'nın 7,35- 7,45 arasında iken bu reaksiyon çok daha yavaş olacaktır. SOD enzimi varlığında pH en az 7,4 olduğu koşullarda bu reaksiyon 4000 kat daha hızlı olur.

Oksijen kullanımı fazla olan dokularda SOD aktivitesi yüksek olup, ekstraselüler sıvılarda SOD aktivitesi düşüktür.

Katalaz

Katalaz enzimi hidrojen peroksidi moleküler oksijen ve suya katalizler. Enzim dört tane hem grubu içeren bir hemoproteindir. Daha çok peroksizomlarda bulunmaktadır. Enzim tüm hücrelerde bulunmakla birlikte kan, böbrek ve karaciğer ve müköz membranlarda yüksek miktarda bulunur.

Reaksiyon aşağıdaki gibi gerçekleşir (34):



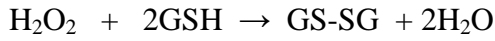
Enzim bir molekül hidrojen peroksiti elektron vericisi, diğer hidrojen peroksiti elektron alıcısı olarak kullanır.

Reaksiyon hidrojen peroksit konsantrasyonları yükseldiğinde önemlidir. Düşük hidrojen peroksit konsantrasyonlarında diğer peroksidazlar hidroperoksitlerin daha az reaktif olan alkollere ve suya parçalanmasını katalizler. Granümatöz hücrelerde katalaz, hücreyi kendi solunumsal patlamasına karşı koruma işlevini de görür.

Glutasyon Peroksidaz

Hücrelerde oluşan hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasından sorumlu olan bir enzimdir. Redükte glutasyon kullanarak hidrojenperoksit ve lipid peroksitlerin parçalanmasında rol alır. Birbirinin aynı dört subunitten oluşur. Her subunit bir selenyum atomu içerir. Bu nedenle hücreleri çeşitli hasarlara karşı koruyan bir selenoenzim olduğu düşünülür. Glutasyon peroksidaz sitoplazmada yerleşik bir enzimdir. İntrasellüler mesafede lipidleri peroksidasyondan koruyan en önemli enzimdir.

Rol aldığı reaksiyonlar aşağıdaki şekildedir.



GSH-Px in iki substratı vardır. Substratlarından biri olan peroksitler alkole indirgenirken diğer substrat olan glutasyon (GSH) yükseltgenir. Ortaya çıkan yükseltgenmiş (GSSG) glutasyon redüktaz enziminin katalizlenen başka bir reaksiyon ile tekrar indirgenmiş glutasyona çevrilir.

Glutasyon Redüktaz

Glutasyon peroksidazın fonksiyonunun devamlılığı için okside glutasyon tekrar indirgenmelidir. Reaksiyon GSH redüktaz tarafından katalizlenir. Enzim NADPH bağımlı bir flavoproteindir. NADPH heksosmonofosfat yolundan elde edilir

Rol aldığı reaksiyon aşağıdaki şekildedir.



Glutasyon Transferaz

Selenyuma bağı olmayan glutasyon peroksidaz olarak adlandırılır. Öncelikle araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksidlerine karşı selenyum bağımsız GSH peroksidaz gibi aktivite göstererek antioksidan etki gösterir

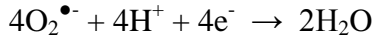
Rol aldığı reaksiyon aşağıdaki şekildedir.



Sitokrom Oksidaz:

Solunum zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz süperoksidi detoksifiye eden enzimdir.

Rol aldığı reaksiyon aşağıdaki şekildedir



Bu reaksiyon, fizyolojik şartlarda sürekli cereyan eden normal bir reaksiyon olup, bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji üretimi sağlanır.

2.3.1.2 Enzim Olmayan Antioksidanlar

Glutasyon (GSH)

Redükte glutasyon (GSH), glutamik asit, sistein ve glisin içeren bir tripeptit olup, aktif bir sülfidril (-SH) grubuna sahiptir. Serbest radikaller ve peroksidlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Ayrıca tiyol grubuna sahip birçok enzim düşük hızda fakat okside olarak veya O_2 'nin direkt etkisiyle hızla aktivitelerini yitirirler. GSH kendisi okside olup tiyol gruplarını tekrar indirgeyerek bunların aktivasyonunu sağlar (35).

E Vitamini

E vitamini “Tokoferoller” ve “Tokotrienoller” olarak iki ana grupta toplanabilen, alfa, beta, gama, delta, eta ve zeta olmak üzere 6 türevi bulunmaktadır (36). Alfa tokoferol içlerinde en yüksek antioksidan güce sahip olanıdır (37). Yapısında bulunan fenolik hidroksil grubuna ait aromatik halka, vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır. E vitaminini, süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksit radikallerini ve diğer radikal örneklerini indirger. E vitamini ve GSH-Px serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterir.

C Vitamini

C Vitamini pek çok biyolojik fonksiyon için gerekli suda çözünebilen bir mikronutrienttir. Birçok enzimin kofaktörü olarak görev yapar. Bunlar; kollajenin post-translasyonel hidroksilasyonu, karnitin biyosentezi, dopaminin norepinefrine dönmesi, peptid amidasyonu ve tirozin metabolizmasında görev alan enzimlerdir. Ayrıca C vitamini demir alımının önemli bir düzenleyicisidir. Ferrik demir iyonlarını ferröz demir iyonlarına indirger böylece gastrointestinal kanaldan non-hem demir emilimini kolaylaştırır. Pek çok hayvan glukozdan C vitamini sentez edebilir ancak insanda C vitamini sentezinde son enzim olan gulonolakton oksidaz olmadığı için C vitamininin diyetle alımına ihtiyaç duyulur. C vitamininin uzun süreli eksikliği kollajenin post-translasyonel modifikasyonunda soruna yol açarak skorbüte ve sonuçta ölüme yol açar (38,39,40).

Anti-skorbütik fonksiyonu yanında C vitamini potent bir indirgeyici ajan ve biyolojik sistemlerde serbest radikal toplayıcısıdır (41,42,43). Biyolojik sıvılarda en çok bulunan ve suda çözünen bir anti-oksidandır. Süperoksit, hidroperoksit radikalleri ve singlet oksijen ile peroksinitrit, nitrojen dioksit ve nitroksit radikallerini toplayabilme özelliğine sahiptir. Fizyolojik rolü çok güçlü redoks potansiyeli ve glutatyon, NAD ve NADP gibi hücre içi antioksidanlarca rejenere edilebilmesi sebebiyle önemlidir. Ek olarak C vitamini alfa tokoferol ve glutatyon gibi diğer önemli antioksidan molekülleri dönüştürebilir (44,45,46)

Demir yüküyle seyreden talasemi, hemakromatozis gibi durumlarda C vitamini desteği önerilmemektedir. Bununla birlikte C vitamininin tüm bu istenmeyen etkileri geçiş metallerine bağlı olmayabilir. C vitamininin in vitro koşullarda serbest geçiş metal iyonlarına ihtiyaç duymaksızın lipid hidroperoksitleri genotoksik elektrofillere dönüştürdüğü başka bir mekanizma varlığı düşünülmektedir(44,47,48). Ancak halen bu mekanizmanın in vivo geçerliliği kanıtlanamamıştır. Ayrıca insan plazmasının in vitro inkübasyonu yöntemiyle yapılan çalışmalar C vitamininin aktive redoks geçiş metalleri ve hidrojen peroksit eklenmesi durumunda bile lipid peroksidasyonunu engellediğini göstermiştir (45,49).

Karotenoidler

Doğada yaygın olarak bulunan ve hücreleri korumada önemli görevleri olan pigmentlerdir.

A vitamininin metabolik ön maddesi olan β -karotenin, singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikalini temizlediği ve peroksi radikalleri ile direkt olarak etkileşerek antioksidan vazife gördüğü tesbit edilmiştir (50).

Flavonoidler

Lipidlerde çözünen antioksidanlar sınıfından olan flavonoidler bitkilerdeki kırmızı, mavi ve sarı renk pigmentlerini oluşturan polifenollerdir. Heterosiklik piron veya piron halkası yardımıyla birleşmiş iki benzen halkasından oluşurlar.

Hidroksil gruplarının sayısı ve spesifik pozisyonları anti oksidan aktiviteyi belirler. 3'-4' dihidroksi konfigürasyonuna sahip olanlar antioksidan aktiviteye sahiptir.

Melatonin

En zararlı radikal olan hidroksil radikalini ortadan kaldıran en güçlü antioksidandır. Lipofilik özelliğe sahiptir. Böylece hücrenin bütün organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabildiği gibi kan-beyin bariyerini de kolayca geçer. DNA hasarını da çok etkili bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir.

Ubikinonlar

Yapılarında izoprenoid takı içeren kinon türevleridir. Lipidlerde çözünürler. Ubikinon 10 (Koenzim Q) insanlarda bulunan temel ubikinondur. Elektron taşıma zincirinde görev alır ayrıca E vitamininin rejenerasyonunu sağlar.

Ürat

Süperoksit, hidroksil, peroksi radikallerini ve singlet oksijeni temizler. Demir ve bakır iyonlarını bağlayarak etkisizleştirir fakat lipid radikalleri üzerine etkisi yoktur. C vitamini oksidasyonunu da engeller.

Bilirubin

Hem proteinlerinin yıkım ürünü olup aynı zamanda lipid peroksidasyonunu engelleyen efektif bir antioksidandır. Düşük konsantrasyonlarda bile peroksil radikalini yakaladığı ve zincir kıran antioksidan olarak davrandığı gösterilmiştir (50).

Albumin

Plazma sülfidril gruplarının major komponentidir. Sülfidril grubu aracılığıyla bakır iyonlarını bağlayıp lipit peroksidasyonunu engeller.

Seruloplazmin

Ekstrasellüler SOD gibi davranır. Ferrik demiri ferro demire yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu önler. Ayrıca demirin transferrine bağlanmasını kolaylaştırır.

Sistein

Süperoksit ve hidroksil radikallerinin toplayıcısıdır.

2.4. SİLOSTAZOL

Silostazol, bazı kan damarların genişlemesini ve damarlar içerisinde trombosit (kan pulcuğu) olarak adlandırılan ve pıhtılaşmaya aracılık eden hücrelerin aktivitesinin azaltılmasını sağlayan bir etken madde olarak tanımlanabilir. Ayrıca kaslara yeterli kan gitmemesine ve bu nedenle bacaklarda kramp benzeri ağrılara neden olan dolaşım bozukluğunun tedavisinde de kullanılır. Aynı zamanda ağrısız yürüme mesafesinin artmasına da yardımcı olur(8). Türk Kardiyoloji Derneği Ulusal Kalp Sağlığı Politikası Ana İlkeleri kitapçığında da belirtildiği gibi platelet fosfodiesteraz-3 inhibitörü ve vazodilatör etkileri olan bu ilaç, periferik arter hastalığına bağlı intermitan klodikasyon tedavisinde yararlı olabilmektedir.

Cauda equina sendromu (CES), travmatik yaralanmalar, omurilik tümörü gibi Paget hastalığı gibi durumlarda ortaya çıkan nadir ve ciddi bir hastalıktır. Bu kauda equina, omuriliğin alt ucundan iner ve ilk lomber vertebra (sakral ve kuyruk sokumu sinirleri) seviyesinin altındaki tüm spinal sinir köklerinde bir paket sıkıştırma içerir. Bu sıkıştırma sinirler üzerinde basınç sebebi ile mesane kontrolü (nörojenik mesane) ve gevşek bir rektal sfinkter barsak kontrolünün kaybı ile sonuçlanabilir. Silostazolun Cauda equina sendromu (CES) sebebi ile gözlenen semptomlar için iyileştirme ajanı olarak kullanılabileceği bulunmuştur. Çünkü sinir iletim hızı (NCV) ve geliştirilmiş kan akımını düzenleyici rolü vardır (51).

İstirahat halinde ağrısı olmayan ve periferik doku nekrozu olmayan hastalardaki intermitent klodikasyonun tedavisi için günde 2 kez 100 mg aç karnına kullanılabilir. Başlıca yan tesirleri baş ağrısı, palpasyon ve diyaredir (52).

Silostazol içeren ilaçlar kullanan insanlarda özellikle; soluk alma bozukluğu, göğüs ağrısı, çarpıntı, tansiyon düşmesi ya da artması, durdurulamayan kanama veya dil, dudak, boğazda şişme gibi durumlar ciddi yan etkilerdendir ve bu durumlarda acilen doktora başvurulması gerekmektedir (8).

2.5. PİOGLİTAZON

Pioglitazon tiazolidindion grubu antidiyabetik bir ajandır ve pankreatik insülin salgılanmasında artışa neden olmadan, insüline karşı hedef hücrelerin cevabını arttırarak kan glukoz seviyesini düşürür. Pioglitazonun etkileri insülin direncinde azalmaya neden olabilir. Pioglitazon, hayvanlardaki karaciğer, yağ ve iskelet kas hücrelerinde insülin duyarlılığının artmasına neden olan nükleer reseptörleri (peroksizom proliferatör-aktive edici gamma-reseptör) aktifleştirerek etkisini göstermektedir. Pioglitazon tedavisi karaciğerden glukoz yapımını azaltır ve insülin direncinin olduğu olgularda periferik glukoz kullanımını arttırır. Tip II Diabetes Mellitus'u olan hastaların açlık ve tokluk glisemi kontrolünde düzelme sağlanır. Glisemik kontrolün düzelmesine hem açlık hem de tokluk plazma insülin konsantrasyonlarındaki azalma eşlik eder.

Pioglitazon vücutta su tutulumuna neden olarak, kalp yetmezliğine zemin hazırlayabilir ya da mevcut kalp yetmezliğini arttırabilir. Hastalar kalp yetmezliğinin belirti ve bulguları açısından izlenmelidir. Kalp durumu ile ilgili göstergelerde olumsuzluklar belirdiğinde ilacın kullanımı durdurulmalıdır. İnsülin ile birlikte kullanıldığında kalp yetmezliği olguları bildirilmiştir. Non steroid antiinflamatuvar ilaçlar vücutta su tutulumuna neden olabildiğinden, birlikte kullanılmaları halinde ödem riski artabilir (53).

2.6. ADAMTS AİLESİ

ADAMTS'ler (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) hem memelilerde hem de omurgasızlarda bulunan bir ekstraselüler proteaz ailesidir. Ekstraselüler matriks (ECM), bütün dokulardaki hücreleri çevreleyen bir yapıdır.

Hücrelere yapısal bir desteğin yanı sıra ECM, hücrelerin şekil, yaşam, farklılaşma, hareket, çoğalma ve ölüm dâhil bütün aktivitelerini ve davranışlarını düzenleyen aktif bir role de sahiptir. Bu hücresel aktiviteler ve davranışlar, örneğin yüklü glikozaminoglikan yan zincirlerine sahip proteoglikanlar, kollajen, elastin, laminin ve fibronektin gibi fibril ve ağ kurucu moleküller dâhil olmak üzere özelleşmiş bazı ECM proteinleri ve glikoproteinleri tarafından yönetilmekte ve yönlendirilmektedir. Proteoglikanlar ECM'nin anahtar bileşikleridir ve onlarca yıldır bunlar iyice tanımlanmış ve tarif edilmiştir (54).

Ekstraselüler matriksin proteolitik yıkımında proteaz aktivitesine sahip çok sayıda molekül görev alır. Bu moleküller domain yapılarına göre çok sayıda protein ailesi olarak gruplandırılırlar. Bu gruplardan biri, kemik farklılaşma protein 1/tolloid ailesi metalloproteinazlarıdır. ADAM ailesinde yer alan proteinler, hücre membranında bulunan ve çok sayıda domaine sahip olan çinko bağımlı metalloproteinazlardır. "ADAM" terimi "bir disintegrin ve metalloproteinaz" anlamına gelmektedir. Disintegrin ve metalloproteinaz domainleri sayesinde ADAM'lar, hem adezyon proteinlerinin hem de proteinazların özelliklerine sahiptirler. Bu özellikleri ADAM'ları diğer hücre yüzey proteinlerinden ayırır ve hücre-hücre etkileşimleri ile hücre-matriks etkileşimlerinde önemli rollere sahip olmalarını sağlar (55).

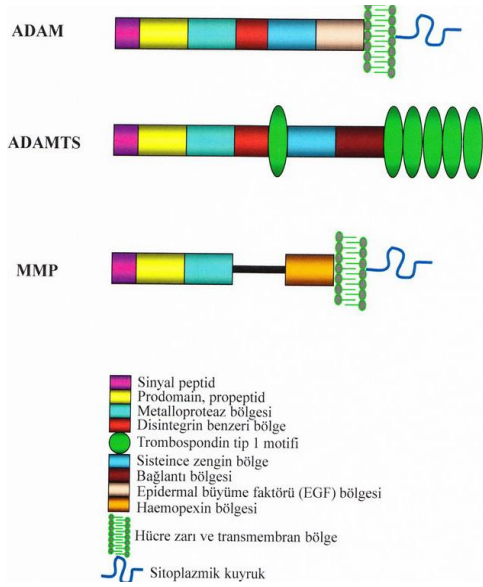
ADAMTS ailesinin üyeleri, ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) ailesi üyelerinden, çok sayıda kopyası bulunan thrombospondin 1 benzeri tekrarlar ile ayrılır. ADAM ailesi üyelerinin aksine, hücre membranında yer almayıp, ekstraselüler matrikse salgılanan ADAMTS'ler; ADAM ailesi üyelerinin sahip oldukları tüm domainleri içermelerine rağmen kendilerine özgü TSP1 motifleri de bulundurdukları için ADAM üyeleri olarak kabul edilmeyip yeni bir aileyi oluşturmuşlardır. ADAMTS proteazlar agrekan, versikan ve brevikanı parçalama, prokollejenin ve von willebrand faktör işlenmesinde görev alırlar. Bağ doku organizasyonu, koagülasyon, inflamasyon, artrit, anjiyogenez ve hücre göçü gibi pek çok önemli role sahip olduğu gösterilmiştir. ADAMTS'ler modüler organizasyon, protein sekansı, gen sekansı ve substrat tercihinin korunmuşluğu ile gruplandırılırlar (56).

2.6.1. ADAMTS Proteazların Domain Yapısı (57,58)

ADAMTS kısmında en başta bir sinyal peptid sekansı vardır. Bu değişen uzunluktaki prodomain ve katalitik metalloproteinaz domain ile takip edilir. Bu proteaz domain kısmı

bütün ADAMTS üyeleri arasında hayli korunmuştur: Yedek (kuyruk) domain; disintegrin benzeri domain, trombospondin tip I tekrarları, sisteinden zengin domain ve bir ara domainden oluşmaktadır.

Şekil 2. ADAM, ADAMTS ve MMP'ler ve aralarındaki motif farklılıkları.



Proteinin kalan kısmı farklı aile üyelerine göre farklılık arz etmektedir. Değişken bölümler bir kısım trombospondin tip I tekrarlar ve diğer domainlerden oluşur (Şekil Doç. Dr Kadir Demircan'ın Jurnal of Clinical and Analytical Medicine dergisinde yayınlanan Artritten Kansere ADAMTS Metalloproteinazlar / ADAMTS Metalloproteinases From Arthritis to Cancer adlı makalesinden alınmıştır).

ADAMTS'ler, çinko bağımlı matriks enzimleridir.

Matriks metalloproteinaz (MMP) ve disintegrin ve

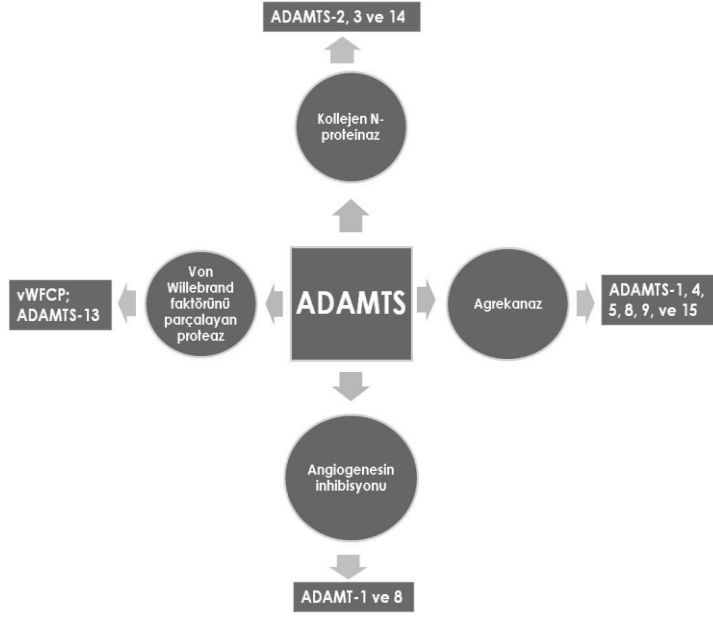
metalloproteinazlar (ADAM), ADAMTS'ler ile ilgili diğer çinko bağımlı proteazlardır (Şekil 2). Bu proteazların hücre dışı matriksin hasar ve onarım sürecindeki rolleri bilinmektedir (59). ADAMTS'ler kollajen, versikan ve agrekan gibi hücre dışı matriksin yapısal proteinlerini parçalayarak etkilerini gösterirler ve metalloproteinazların doku inhibitörleri olarak bilinen tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP) tarafından inhibe edilirler. TIMP-3 şu an için bilinen en etkili ADAMTS inhibitörüdür. Farklı 19 adet genin ürünü olan ADAMTS proteazlar görevlerine göre sınıflandırılmaktadır (10).

ADAMTS proteazların ECM'e bağlanma kabiliyeti, ADAMTS ailesini ADAM ve MMP ailelerinden ayıran önemli bir özelliktir. Proteazlar ECM'de bulunan heparin ve agrekan da dâhil sülfatlı glikozaminoglikanlara bağlanırlar. ADAMTS proteazların hem katalitik hem de katalitik olmayan bölgeleri tam proteolitik aktivite ve substrat bağlanma kabiliyeti gösterirler. Bu özellik olgun ADAMTS proteazların ara bölgedeki posttranslasyonel işlemleri esnasında (C terminal budanması) kazanılır ve MMP'ler tarafından kontrol edilir.

2.6.2. ADAMTS Ailesinin Bilinen Fonksiyonları

Bu görevlerinin dışında ayrıca ADAMTS'ler, organo-genez, inflamasyon ve fertilité de görev almaktadırlar. Ayrıca son çalışmalar göstermektedir ki artritde ve pek çok kanserde bazı ADAMTS genlerinin ekspresyonları değişmektedir (60).

Şekil 3. ADAMTS ailesi ve sınıflandırılması.



A) Anti-anjiyogenetik olanlar; ADAMTS 1 ve 8

2000'li yılların başında yapılan çalışmalarda ADAMTS-1 ve ADAMTS8'in; Vasküler Endotelial Büyüme Faktörünün (VEGF) uyardığı anjiyogenezi inhibe ettikleri ve Fibroblast Büyüme Faktörü 2'nin uyardığı vaskülarizasyonu baskıladıklarını bulmuşlardır. ADAMTS-1 ve ADAMTS-8 anti-anjiyogenik ajanlar olarak bilinirler. Bu yüzden bu iki proteaz tümör supresyonunda hedef proteinazlardır. 2009 yılında hipoksinin, ADAMTS-1 gen ekspresyonunu hipoksi-indüklenebilir faktör (HIF-1) yoluyla harekete geçirdiği ilk kez gösterilmiş (61). ADAMTS-1, ovulasyonda görev almakla beraber kalp krizinde güçlü bir şekilde eksprese edilen bir proteazdır (62). ADAMTS-1 birçok organda eksprese edilirken, ADAMTS-8 ekspresyonunun sadece akciğerde gözleendiği de yapılan çalışmalarda bulunmuştur (63). Kıkırdak dokuda eksprese edilmeyen ADAMTS-8, aterosklerozda makrofajdan zengin bölgelerde eksprese olmaktadır (64).

B) Prokollajen N-proteinazlar; ADAMTS-2, -3 ve -14

ADAMTS-2, ADAMTS-3 ve ADAMTS-14, prokollajen kesim enzimleri olarak bilinmektedir (65). Kollajeni enzimatik olarak keserek prokollajenin kollajen haline dönüşümünü sağlar. Bunu prokollajenin N-ucundaki propeptitleri uzaklaştırarak yaparlar. ADAMTS-2 gen mutasyonları tipi otozomal resesif bir hastalık olan VIIC Ehlers-Danlos sendromuna yol açar. İlk kez büyükbaş hayvanlarda tanımlanan bu bağ dokusu hastalığında, dermisteki tip I prokollajenin propeptid kısmı kesilip çıkarılamaz ve kollajen yapımında bozukluk ortaya çıkar. Sonuçta normal kollajen fibril oluşumu tamamlanamadığı için aşırı elastik ve kırılabilir deri tabakası ile karakterize Ehlers-Danlos sendromu meydana gelir (60). Deride meydana gelen anormalliklerin tip I kollajen liflerinin anormal morfolojisiyle birlikte kollajen liflerinin çaplarını arttıramamalarına da bağlı olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak deride kollajen liflerinin olgunlaşması için ADAMTS-2'nin fonksiyon göstermesi zorunludur (66).

C) von Willebrand Faktörünü Parçalayan Proteaz (von Willebrand factor-Cleaving Protease, vWFPCP); ADAMTS-13

Von Willebrand Faktörü (vWF) plazmada, trombositlerde ve vasküler endotel hücrelerde bulunan büyük, multimerik bir glikoproteindir. Pıhtılaşma faktörlerinden birisi olan faktör VIII'in taşıyıcı proteindir ve trombosit agregasyonuna destek olur. Ayrıca, damar hasarı olduğunda, hem trombositlerin yüzeyinde bulunan glikoproteinlere hem de ortaya çıkan ekstraselüler matriks bileşenlerine bağlanarak trombosit adezyonunu sağlar (58). ADAMTS-13 ise von Willebrand faktörünü (vWF) kesen bir proteindir. ADAMTS-13, aynı zamanda "vWF cleaving protease (vWFPCP)" olarak da tanımlanmaktadır. ADAMTS-13, vWF proteininin 1605. sırasındaki tirozin ve 1606. sırasındaki metiyonin amino asitleri arasındaki peptid bağı koparır ve pıhtılaşma için gerekli olan, daha küçük boyutlu vWF meydana gelir. İdeal boyuta gelen vWF, faktör VIII gibi pıhtılaşma faktörleri ile etkileşerek pıhtı oluşumunda rol alır. Anemi ve trombositopeni ile karakterize olan Trombotik Trombositopenik Purpura vakalarının çoğu büyük vWF multimerlerinin daha küçük birimlere ayrılmasından sorumlu olan ADAMTS-13 enziminin eksikliğinden kaynaklanır. Von Willebrand faktörünün proteolizi için gerekli olan ADAMTS-13'ün hepatik stellat hücrelerde varlığı gösterilmiştir (10).

D) Agrekanazlar; ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9, -15, -16 ve 18

Agrekan kıkırdak dokusunda bulunan ve kıkırdak dokusunu basınç ve sıkıştırmalara karşı koruyan en önemli moleküldür. Ayrıca agrekanın bir diğer görevi kıkırdak dokusunda bulunan kollajeni degrade olmaktan korumasıdır (67,68). Bazı ADAMTS'ler (1, 4, 5, 8, 9, 15, 16 ve 18) kıkırdağın ana bileşeni olan bu agrekan proteoglikanını enzimatik kesme özelliğine sahiptir (60). Agrekanı kesip parçaladıkları için bu grup agrekanazlar olarak adlandırılır. İlk kez 1999 yılında ADAMTS-4, agrekanaz-1 olarak isimlendirilmiştir (69). Daha sonraları ADAMTS-5, agrekanaz-2 olarak sınıflandırıldı. Matriks proteoglikanlarından versikan ve brevikanı da kesen agrekanazlar, osteoartrit gibi kas-iskelet sistemi hastalıklarının patogenezinde rol alırlar (60). Osteoartritte agrekanaz düzeyleri artmaktadır. ADAMTS-5 nakavt farelerde yapılan çalışmalarda, bu farelerin osteoartrite karşı direnç kazandıkları görülmüştür (70, 71). Bu iki çalışmadan sonra ADAMTS-5 (agrekanaz-2), farelerde esas 'agrekanaz' olarak sınıflandırılmıştır. Fibröz dokularda ADAMTS-5 eksikliğinin, fibroblast kök hücrelerinin olgun fibroblastlara dönüşümünü önleyen agrekan birikimine bağlı olarak sağlıklı bir onarım cevabına yol açtığı ve ADAMTS ailesi proteinazların diğer üyelerinden farklı olarak ADAMTS-5'nin kritik doku tamir sinyal olaylarını düzenleme kapasitesine sahip olduğu ileri sürülmüştür (72).

Kıkırdak oligomerik matriks proteini (COMP) parçalayan proteazlar; ADAMTS7 ve ADAMTS12'dir. Bu iki ADAMTS, COMP-ADAMTS'ler olarak bilinir. COMP (Trombospondin-5 olarak da bilinir) 524 kDa ağırlığında, kalsiyum bağlayan, kıkırdağın yapısal bütünlüğünden ve diğer matriks molekülleriyle etkileşiminden sorumlu matriks glikoproteinidir. Agresif artrit hastalarında COMP düzeyleri yüksek bulunmuştur (73).

Tablo 1. ADAMTS ailesi ile ilgili bilgilerin özeti (Protein & Cell 2010; 1:33-47 makalesinden adapte edilmiştir)

ADAMTS	Diğer adı	Bilinen substrat(lar)ı	Hastalıklardaki rolü
1	METH-1	Agrekan, versikan	Antianjiojenik, renal interstisyel fibrozis, kemik yeniden modellenmesi, over follikülogenezi, ürogenital gelişim, tümör büyümesi/ yeniden şekillenmesi
2	PCINP	Kollajen I, II, III N-	Ehler-Danlos sendrom tip 7C, sığır

		propeptidleri	dermatopraksis
3	KIAA0366	Prokollajen II N-propeptidleri	Bilinmemektedir
4	Agrekanaz1	Agrekan, brevikan, COMP, dekorin, fibromodulin, versikan	Artrit, ateroskleroz
5	Agrekanaz1 ADAMTS1	Agrekan, α 2M	Artrit
6		Bilinmemektedir	Bilinmemektedir
7	ADAMT7B	COMP, α 2M	Artrit
8	METH-2	Agrekan	Antianjiogenez, beyin kanserleri,
9	KIAA1312	Agrekan, versikan	Artrit
10		Bilinmemektedir	Bilinmemektedir
12		Agrekan, COMP, α 2M	Artrit
13	Vwfc	Von Willebrand faktör	Trombotik trombositopenik purpura
14		Prokollajen I ve II N-propeptidi	Bilinmemektedir
15		Agrekan	Bilinmemektedir
16		Agrekan	Bilinmemektedir
17		Bilinmemektedir	Bilinmemektedir
18			Antitromboz/inme
19		Agrekan	Bilinmemektedir
20		Bilinmemektedir	Bilinmemektedir

2.6.3. ADAMTS Proteinlerinin Moleküler Organizasyonu

ADAMTS'ler, aktif enzim kısmını içeren proteaz kısım ve trombospondin tekrarları içeren yardımcı yan modüllerden meydana gelirler (Şekil 4).

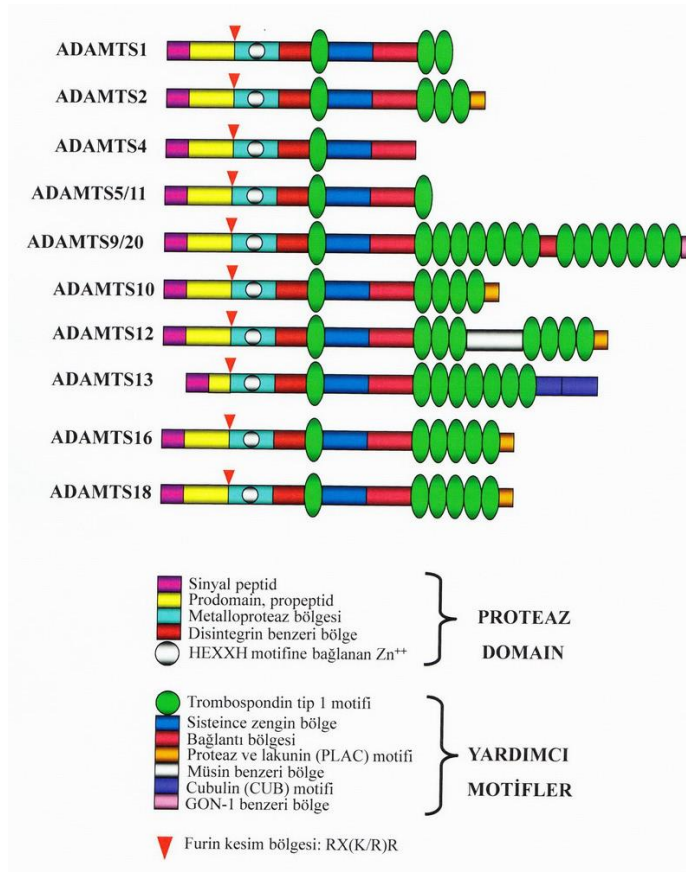
Proteaz kısım sinyal peptid, propeptid, katalitik domain ve disintegrin benzeri modüllerden; yardımcı yan modüller ise trombospondin tekrarları içeren kısım, sisteince zengin modül ve 'spacer' adı verilen bağlantı bölgesinden oluşur (56).

Propeptid kısım, enzimi inaktif halde tutan kısım (74) . Propeptid sayesinde enzim substrat ile etkileşim içine giremez.

Çinko bağlama bölgesi içeren katalitik kısım, enzim aktivitesinden sorumludur. Tüm ADAMTS proteinazları, katalitik bölgelerinde aktif motif dizisine sahiptir. Aktif motif, HEXXHXXGXXHD dizisinden oluşur. Burada X herhangi bir amino asidi simgeler. Bu motifte mutasyon olursa katalitik aktivite tamamen kaybolur (59).

Bir diğer kısım, disintegrin benzeri bölge, amino asit dizilişi, yılan zehirli proteazlarında (snake venom metalloprotease) bulunan disintegrin motifi ile benzerlik gösterdiği için bu adı almıştır. Disintegrin benzeri bölge ADAMTS aktivitesi için gereklidir (65).

ADAMTS'lere ismini veren trombospondin (TSP), 1971 yılında keşfedilen ilk anjiyogenez inhibitörüdür (74). TSP, trombositlerden salınan ekstraselüler matris adezyon glikoproteinidir. Sisteince zengin bölge ve bağlantı bölgesi, substrat spesifikliği ve matrise yerleşme mekanizmalarında rol alır. Bu modüllere ilave olarak bazı ADAMTS'ler kendilerine özgü, GON, PLAC ve CUB gibi özel motifler içerir (65).



Şekil 4. ADAMTS proteinazlarının domain organizasyonu (10).

ADAMTS'ler yapısal olarak iki kısımda incelenebilirler: Enzim aktivitesinin olduğu proteaz kısım ve trombospondin tekrar dizilerinin yer aldığı yardımcı yan modüller. ADAMTS-4 trombospondin tekrar motifleri (TSP) içermezken, ADAMTS-9 ve ADAMTS-20, 14 adet TSP tekrar motifi içerir. ADAMTS-13 en kısa prodomain dizisine sahip iken, ADAMTS-5 ve

ADAMTS-11 aynı enzimdir. ADAMTS-4, ilk bulunan agrekanaz olup agrekanaz-1; ADAMTS5 ise agrekanaz-2 olarak adlandırılır. İnaktif ADAMTS, propeptid kısmının furin enzimleri ile uzaklaştırılmasıyla aktif hale gelir. Çinko, metalloproteinaz kısmındaki aktif motif dizisi (HEXXH) ile bağ yapar. ADAMTS'ler furin enzimi ile arjinin ve lizin yönünden zengin (RX(K/R)R) tanıma bölgesinden kesilerek aktif hale gelir. Bu olaya zimojen aktivasyonu denmektedir.

2.6.4. ADAMTS Proteinlerinin Ekspresyonu

ADAMTS proteinlerinin mRNA ekspresyonu çok geniş normal erişkin dokusu dağılımı göstermektedir. Farklı ADAMTS üyelerine farklı erişkin ve fetal dokularda rastlanabilmektedir. Fetal dokulardaki ekspresyonu ise erişkin dokuya kıyasla daha sınırlıdır.

Tablo 2. ADAMTS üyelerinin doku dağılımları (58).

Genin ismi	Fetal dokular	Normal erişkin dokusu	Malignant erişkin dokusu
<i>ADAMTS1</i>	Böbrekler, Akciğerler	Kalp, plasenta, karaciğer, iskelet kası, böbrek, tiroid bezi, adrenal medulla, adrenal korteks, mide, uterus, mesane, serviks, aorta, kolon, özefagus, overler, prostat, medulla spinalis, kıkırdak	Sadece hücre hatları
<i>ADAMTS2</i>	Çalışılmamış	Aort, kemik, deri, tendon, mesane, retina, böbrekler, akciğerler, bağırsaklar, karaciğer, iskelet kası	Test edilmemiş
<i>ADAMTS3</i>	Çalışılmamış	Plasenta, akciğerler, beyin, kalp, deri	Test edilmemiş
<i>ADAMTS4</i>	Çalışılmamış	Mesane, beyin, over, kalp, iskelet kası, uterus, mide, medulla spinalis, kıkırdak	Test edilmemiş
<i>ADAMTS5</i>	Çalışılmamış	Mesane, serviks, özefagus, plasenta, uterus, kıkırdak	Test edilmemiş
<i>ADAMTS6</i>	Çalışılmamış	Plasenta	Test edilmemiş
<i>ADAMTS7</i>	Çalışılmamış	Kalp, iskelet kası, böbrek,	Test edilmemiş

		pankreas, beyin, karaciğer	
<i>ADAMTS8</i>	Beyin, akciğer, böbrek	Akciğer, kalp, plasenta, beyin	Sadece hücre hatları
<i>ADAMTS9</i>	Beyin, kalp, böbrek, karaciğer, akciğer, iskelet kası, dalak, timus	Kalp, plasenta, akciğer, iskelet kası, böbrek, pankreas, over, kolon, kıkırdak	Test edilmemiş
<i>ADAMTS10</i>	Çalışılmamış	Pankreas, kalp, beyin, akciğer, plasenta, karaciğer, böbrek	Sadece hücre hatları
<i>ADAMTS12</i>	Akciğerler	Belirlenememiş	Mide kanseri
<i>ADAMTS13</i>	Karaciğer	Prostat, beyin, karaciğer, plasenta, kalp, iskelet kası	İncelenmiş dokularda tespit edilememiş
<i>ADAMTS14</i>	Akciğer	Prostat, beyin, karaciğer, retina, akciğer, plasenta, uterus	Böbrek ve göğüs kanseri
<i>ADAMTS15</i>	Karaciğer, böbrek	Belirlenememiş	İncelenmiş dokularda tespit edilememiş
<i>ADAMTS16</i>	Akciğer, böbrek	Beyin, over, prostat, uterus	İncelenmiş dokularda tespit edilememiş
<i>ADAMTS17</i>	Akciğer	Over, prostat, beyin, karaciğer	İncelenmiş dokularda tespit edilememiş
<i>ADAMTS18</i>	Akciğer, böbrek	Prostat, beyin, endotel, submaksiller bez	İncelenmiş dokularda tespit edilememiş
<i>ADAMTS19</i>	Akciğer	Belirlenememiş	Osteosarkom
<i>ADAMTS20</i>	Çalışılmamış	Testis, prostat, over, kalp, plasenta, akciğer, pankreas, beyin	Beyin, kolon ve göğüs kanseri

2.6.5. ADAMTS Proteinlerinin İnhibisyonu

Metalloproteinazların doku inhibitörleri olarak bilinen tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP) tarafından inhibe edilirler. TIMP'ler diğer matriks proteazlarda olduğu gibi ADAMTS'lerin aktivitesinin kontrolünde de anahtar rol oynarlar. TIMP'ler hem ADAM proteinlerine hem de ADAMTS proteinlerine karşı çok daha fazla seçici davranırlar. TIMP-3 şu an için bilinen en etkili ADAMTS inhibitörüdür (75). Örneğin, agrekanazlardan ADAMTS-4 ve ADAMTS-5, TIMP-3 tarafından güçlü bir şekilde inhibe

edilirken; TIMP-1, -2 ve -4'e karşı duyarsızdırlar (76). Yine, TIMP-2 ve TIMP-3'ün ADAMTS-1'i 500 nM'lık konsantrasyonlarda kısmi olarak inhibe ettiği gözlenirken aynı konsantrasyonlardaki TIMP-1 ve TIPM-4'ün ADAMTS-1 üzerinde inhibitör etkisinin bulunmadığı görülmektedir (77). Özellikle artritlerde aktivitelerinin arttığı bilinen ADAMTS-1, -4 ve -5'in agrekanolitik aktivitesi yeşil çayda bulunan katekin galat esterleri tarafından da etkin bir biçimde inhibe edilmektedir (78).

2.6.6. ADAMTS Proteinlerinin Hastalıklarla İlişkisi

Osteoartrit ve romatoid artrit gibi hastalıklarda kırıkta matriks parçalanmasından sorumlu enzimler olarak bilinen ADAMTS enzimleri, bağ dokusunun yeniden yapılandırılması, pıhtılaşma, morfogenez, ovulasyon, anjiyogenez ve merkezi sinir sistemi hastalıklarında kritik görevler üstlenen bir proteinaz ailesidir. Kritik öneme sahip ADAMTS'lerin eksikliğinde ve kusurunda ciddi hastalıklar ortaya çıkar (79). Örneğin, ADAMTS-13 proteinazın tam eksikliği ölümcüldür. ADAMTS-9 geni olmayan fareler embriyonik hayatta ölürken, diğer ADAMTS genlerindeki mutasyonlar ciddi hastalıklara yol açar (11, 54).

Bazı ADAMTS üyelerinin hastalıklarla olan ilişkisine bakılacak olursa ADAMTS-1 ve ADAMTS-15 mRNA düzeylerinin, astımla ilişkili olduğu ve hasta balgam örneklerinde mRNA düzeylerinin azaldığı gözlenmiştir. ADAMTS inhibitörü olan TIPM-3'ün mRNA düzeyleri astım vakalarında arttığından, ADAMTS-1'in bronşiyal dokunun yenilenmesinde rol alabileceği belirtilmektedir (80). Benzer şekilde ADAMTS-4, ADAMTS-9 ve ADAMTS-15'in kronik astım hastalarında indüklendiği de rapor edilmiştir (81).

Kronik karaciğer hastalığında ADAMTS-1 artışı ile fibrogenez arasında bir ilişki bulunmuştur. Sağlıklı karaciğerler ile karşılaştırıldığında fibrotik ve sirotik dokularda ADAMTS-1 mRNA düzeylerinde anlamlı artışlar gösterilmiştir. Hepatik stellat hücrelerde ADAMTS-1'in TGF- β ile etkileşerek, TGF- β bağımlı transkripsiyonel aktiviteyi artırdığı rapor edilen bu çalışmada, ADAMTS-1'in beklenenin aksine katalitik olmayan bir aktivite gösterdiği sonucuna varılmıştır (81).

Diğer bir çalışma ile ADAMTS-5, ADAMTS-9 ve ADAMTS-20 proteazlarının yeni bir görevi daha keşfedilmiştir. Bu üç proteazın, apoptozis ile hücrelerin ortadan kaldırılması ve hücre dışı matriksinin temizlenmesinde rol oynadığı bulunmuştur. Bu sürecin sekteye uğraması 'sindaktili' ile sonuçlanır (82).

Deri, göz ve kalp gelişiminde kritik roller üstlenen ADAMTS-10'un eksikliği nadir görülen bir bağ dokusu hastalığı olan, brakidaktili, kısa boy, göz ve kalp anomalileri ile karakterize "Weill- Marchesani" sendromuna sebep olur (83).

ADAMTS-16, avuç içinde deri altındaki palmar faysa dokusunun fibrotik bir hastalığı olan ve kollajen birikimi ile karakterize Dupuytren hastalığında fazla eksprese olur. Özefagial skuamöz hücreli karsinomada potansiyel bir gen olan ADAMTS-16 ile yapılan bir çalışmada yirmi hastanın sekizinde (%40) ADAMTS-16 gen ekspresyonu yüksek bulunmuştur. 2009 yılında Joe ve ark. ADAMTS-16'nın kan basıncı düzenlenmesinde anahtar rol oynayan yeni bir gen olduğunu rapor etti. Gerçekten de ADAMTS-16, kan basıncı düzenlenmesinde rol alan böbreklerde daha fazla eksprese olmaktadır (10).

ADAMTS-18 proteazının çeşitli kanserlerle sıkı bir ilişki içinde olduğu bilinmektedir. Endotel hücrelerin ADAMTS-18 salgıladıkları, trombinin bu salgılamayı indüklediği ve ADAMTS-18'i enzimatik olarak keserek 45 kDa'luk C-terminal bir fragment oluşturduğu, oluşan bu fragmentin ADAMTS-18 C-terminal fragmentinin in vivo kanama zamanını düzenleyerek karotid arter trombus oluşumunu önlediği gösterilmiştir (84, 85).

Ekstraselüler matrikste yer alan proteoglikanları parçalayan ADAMTS'lerin yakın gelecekte hastalıklarla olan ilişkisinin aydınlatılması sonucu gerek tanı koyma gerekse tedavi açısından önemli katkılar yapabileceği düşünülmektedir.

ADAMTS'leri inhibe eden faktörlerin belirlenmesi ve bu enzimlerin sinyal iletim yollarının belirlenmesi ile klinikte ADAMTS'lerin kullanım alanlarının artacağı beklenmekte, ayrıca ADAMTS'lerin proteolitik aktivitesiyle ortaya çıkan bazı proteoglikan parçaların yeni ilaçların geliştirilmesinde kullanılabileceği tahmin edilmektedir (86).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. DENEY HAYVANLARI PROSEDÜRÜ

Çalışmamız tavşanlar üzerinde yapıldığı için öncelikle T.C. Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu tarafından etik kurul izinleri alınmıştır ve hayvanlara etik kurallara uygun şekilde muamele edilmiştir. Çalışmada 32 erişkin 3-3,5 kg ağırlığında erkek veya dişi Yeni Zelanda tipi beyaz tavşanlar kullanıldı. Toplam 32 tavşan 4 eşit gruba ayrıldı. Anestezi Ketamin HCl (KETALAR amp.) 35 mg/kg ve xylazine 5 mg/kg (ROMPUN amp.) intramüsküler yolla uygulanarak sağlandı. Pedal reflekslerin kaybı anestezi indüksiyonunda değerlendirildi. 5 dakikada bir kontrol edilip ihtiyaç halinde ilk dozun yarısı oranında ek olarak Ketamine/xylazine IM olarak tekrarlandı. Sağ kulak veni kanule edilen işlem süresince 3 ml/kg serum fizyolojik infüzyonu yapıldı. Proksimal ve distal aorta basınçları aorta ve femoral arterlere yerleştirilen iki kanulle monitorize edildi. Spontan solunum devam ederken ve pediatrik nazal maske ile 200 ml/dk oranında oksijen inhalasyonu uygulandı. Rektal ısı probu konularak vücut ısısı monitorize edildi.

Cerrahi sterilizasyon sonrasında median laparotomi ile batına girilip, renal arterlerin altından ve iliak arterlerin üzerinden abdominal aorta eksplere edildi ve vasküler klemple oklüzyonu kolaylaştırmak amacıyla ipekle dönüldü. Posterior mesenterik arter retrograd akımı engellemek için ipekle dönüldü. Deneklerin ısısı pad yardımıyla normotermide tutuldu (38°C). Aortik kros klemple öncesinde 100 U/kg heparin ile sistemik antikoagülasyon yapıldı. Aorta renal arterlerin distalinden ve iliak arterlerin proksimalinden vasküler klemple ile oklude edildi. 30 dakika aort klemplendikten sonra klemple kaldırıldı. Aortik kros klemple kaldırıldıktan sonra batın kapatıldı. Postoperatif analjezi 5 mg/kg S.C. Morfin HCl (MORFİN amp.) ile ve sedasyon 25 mg/kg IM klorpromazine (LARGACTİL amp.) ile sağlandı.

Silostazol, 30 dakika renal arterlerin distalinden ve iliak bifurkasyonun proksimalinden aortik oklüzyon yapıldı. Bu gruptaki deneklere aortik oklüzyon gününden 3 gün önceden silostazol 30 mg/kg/gün günde 2 kez gastrik lavaj ile verildi.

Tavşanlar 4 ayrı grupta eş sayılarda tasarlanmıştır. Birinci grup tavşanlar kontrol grubudur. Sham olarak adlandırılan ve sadece SC'ından doku örneği alınan gruptur. Grupta bulunan tavşan sayısı beş tanedir. İkinci grup tavşanlar ise SC'larında prosedüre uygun iskemi/reperfüzyon yapılan tavşan grubudur ve adlandırması I/R şeklindedir. Bu grup ise toplamda sekiz tavşandan oluşmaktadır. Üçüncü grup tavşanlar iskemi/reperfüzyon yapılmadan önce silostazol verilmiş ve daha sonra SC'larda I/R yapıp dokular bu işlemlerden sonra çıkarılmıştır. Grup isimlendirilmesi D harfi ile yapıp toplamda 9 farklı tavşan üzerinde çalışılmıştır. Son grup ise I/R'dan önce silostazol yerine piaglitazon verilen ve daha sonra SC'larından örnek alınan tavşan grubudur. P harfi ile gruplandırma ismi yapılmıştır ve grupta 9 farklı tavşan ile çalışılmıştır.

Deneyin laboratuvar kısmında sham grubundan bir doku örneği PCR kısmına kadar yeterli miktarda kullanıldı fakat Western Blot kısmına deneyi tamamlayacak kadar yetmediği için bu kısımda 4 farklı sham örneği ile çalışma tamamlanmıştır.

3.2. DOKUDAN RNA İZOLASYON PROTOKOLÜ

Deneyde SC dokusundan RNA izolasyonu yapılırken aşağıda belirtilen prosedür basamak basamak uygulanmıştır.

1. Dokular bistüri ile küçük parçalara ayrılıp, 2 ml'lik ependorf tüpe konur.
2. Çeker ocakta sterilazyona dikkat ederek parçalanmış her bir dokuya 1000 µl Trizol eklenir.
3. Dokuların homojenize olması için yaklaşık 2 dk sallanır.
4. Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilir.
5. Her bir ependorfa 200 µl kloroform eklenir ve renk değişene kadar 2-3 dk sallanır.
6. 12.000 rpm 15 dk 4⁰C de santrifüj yapılır.
7. Üstteki şeffaf kısım yeni 1,5 ml'lik ependorf tüpe aktarılır.
8. Bu kısmın üzerine 500 µl 2-propanol eklenir. Sallanarak karıştırılır ve oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilir.
9. 12.000 rpm 10 dk 4⁰C de santrifüj yapılır.
10. Süpernatant RNA ya zarar vermeden dikkatlice atılır. %75 lik etanolden 1000 µl eklenir ve hafifçe sallanır.
11. 12.000 rpm 5 dk 4⁰C de santrifüj yapılır.

12. Süpernatant atılır ve alkolün uzaklaşması için 10-15 dk oda sıcaklığında kapakları açık olarak bekletilir.
13. 40 µl DEPC water eklenerek RNA pipetejla çözülür.
14. RNA -85 °C dolaba konuluncaya kadar mutlaka buzun içinde tutulmalıdır.

Nano drop'da ölçüm yapıldıktan sonra RNA etiketlenir ve -85 °C'de saklanır.

3.3. cDNA SENTEZ PROTOKOLÜ

Tüm RNA'lar sabit bir sayıya eşitlenir. (0,5-1-2 µg gibi)

Hesaplama işlemi şöyle yapılır;

Örneğin;

RNA değeri X= 274.2 ng/µL

$274.2/1000= 0.274 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. → Bunu 1 µg'ya eşitlemek istiyorsanız;

$1/0.274= 3.65 \mu\text{L}$ → Alınacak RNA miktarı olmuş oluyor.

Bu hacimde RNA alınıp deneye devam edilir. Kullanılacak malzeme ve solüsyonlar çözüldükten sonra dışarıda bekletilmez, bundan sonraki her basamak buzun içinde yapılmalıdır özellikle RNA ve primerler çabuk bozulabileceğinden bu basamağa dikkat edilmelidir.

1. Örnek sayısı kadar 1,5 ml'lik ependorf tüp çıkartılır.
 2. Her tüpe ayrı ayrı 1µl oligo(dT)₁₈ primer konulur.
 3. Her bir örnek için hesaplanan miktarda RNA sırasıyla ependorf tüplere konulur.
 4. Her bir örnek için hesaplanan miktarda su sırasıyla ependorf tüplere konulur (örneğin RNA 2µl ise 11µl'ye tamamlayacak şekilde yani 9µl su tüplere konur).
 5. Ayrı bir temiz ependorf tüpün içinde aşağıdaki oranlarda mix hazırlanır.
- Bir örnek için hazırlanacak miktarlar (örnek sayısıyla çarpılarak mix hazırlanır).
- 5X Reaction Buffer 4µl
 - Ribolock™ RNase Inhibitor(20 u/µl) 1µl
 - 10mM DNTP Mix 2µl
 - RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase(200 u/µl) 1µl

6. Hazırlanan mix örnek tüplerinin üstüne 8µl olacak şekilde dağıtılır.

Toplam hacim 20 µl olmalıdır (12 önceden vardı. 8 µl mix ekledik toplam 20 µl oldu).

7. 42 °C 60 dk inkübasyona bırakılır. Sonra 70°C de 5 dk bekletilir. **Spin attırılır.**

8. Elde edilen cDNA 1 hafta bekleme süresi için -20 °C’de, daha uzun süre bekleyecekse -70 °C’de saklanır.

3.4. PRİMERLERİN HAZIRLANMASI

ALPHA DNA kullanma talimatında belirtilen miktarda gelen (100 pmol/mL’lik) stok çözeltiler PCR işleminde kullanılmak üzere stoktan 10 µL alınarak 90 µL 1×TE ((Tris-EDTA) tamponu eklenerek 10 pmol/ml’lik çalışma çözeltisi (working solution) olarak hazırlanır ve böylece PCR’da kullanılacak primerler elde edilmiş olunur.

3.5. GRADYENT PCR

Deneyler boyunca kullanılacak olan gradyent PCR işlemi için belirlenen master mix solüsyonu aşağıdaki gibi belirlendi. Örnek sayısı ise 10:

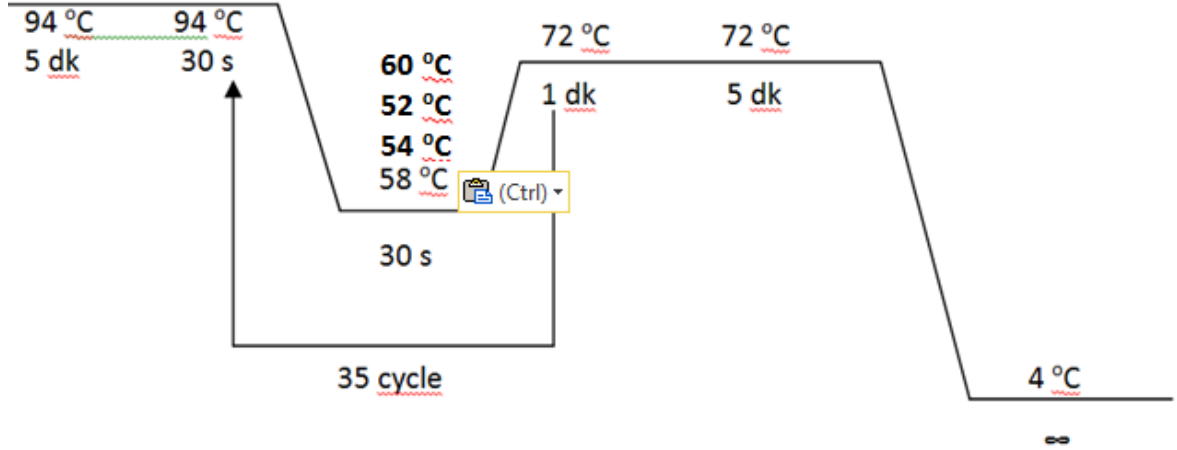
Solüsyon	Miktar	10 örnek için toplam hazırlanan
Taq PCR Master Mix (Tampon+Mg+2+dNTP’lar+Taq polimeraz) (QIAGEN, Cat No: 201445)	12.5 µL	X10= 125 µL
PCR grade distile su (nuclease-free)	9.5 µL	X10= 95 µL
Primer (reverse)	0.5 µL	X10= 5 µL
Primer (forward)	0.5 µL	X10= 5 µL
Total Master Mix	23 µL	230 µL
cDNA	2 µL	

PCR eppendorfunu konulan toplam hacim	25 µL	
---------------------------------------	-------	--

Gradyent PCR yapmak üzere β -aktin ve tüm ADAMTS ailesi için belirlenen program koşulları şu şekildedir:

Ön denatürasyon	95 °C	5 dk	
Denatürasyon	95 °C	30 sn	36 Döngü
Primer bağlanma	52-58 °C	30 sn	
Uzama	72 °C	1 dk	
Son Uzama	72 °C	5 dk	

Genel PCR döngüsü;



Şekil 5. Genel PCR döngüsü

Deneyler boyunca ADAMTS ailesi için PCR bağlanma sıcaklıkları aşağıda belirtildiği gibidir optimize edilmiştir.

ADAMTS-3,-5,-6,-9'nin çalışma sıcaklığı 52°C

ADAMTS-12 ve 16'nın çalışma sıcaklığı 54°C

ADAMTS-1,-10,-15,-18,-19,-20'nin çalışma sıcaklığı 56°C

ADAMTS-2,-4,-13,-14, -17, -7 ve -8'in çalışma sıcaklığı 58°C

3.6 AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

Araştırdığımız gen bölgelerinin PCR ürünlerinin amplifiye olup olmadığını kontrol etmek için % 2'lük agaroz jelde PCR ürünleri yürütüldü. 100 mL 1XTAE (Tris/ Asetik Asit / EDTA) tamponunun içine 2 gr agaroz (Invitrogen kat no: 16500-100 g) konulur. Mikrodalga fırında agaroz iyice eriyinceye kadar tutulur (400°C de 5dk gibi). Çıkarılınca karıştırıcının eşliğinde 2.5 µL etidyum bromür ilave edildikten sonra katılaşmadan jel kalıba dökülür. Jel döküldükten sonra taraklar dikkatlice takılır daha sonra 30 dk katılaşmaya bırakılır.

PCR ürünlerinden 5 µL alınarak 1 µL 6XLoading dye ile karıştırılıp kuyucuklara yüklenir. Jel, 110 V'de 15 dk ya da 100 V'de 20-30 dk yürütüldükten sonra UV transliminatörde görüntülenir.

3.7. WESTERN BLOT

Spesifik bir proteini görüntülememizi sağlayan moleküler biyoloji tekniğinin adına western blot denir. Bu ismi almasının sebebi Edwin Southern adlı bir araştırmacının Southern blot tekniğini bulması ile başlamıştır. Southern blot tekniğinin amacı DNA molekülünü görüntülemektir. Daha sonra gelen araştırmacılar da Edwin'e saygı amacıyla protein görüntüleme yöntemine western blot, RNA görüntüleme yöntemine de northern blot ismi verilmişlerdir.

Jelden membrana (nitroselüloz veya PVDF) *geçirme/emdirme* işlemine ise **blotlama** diyoruz. Bu teknik aşağıdaki basamaklardan oluşmaktadır.

1. Yükleme (Loading)
2. Elektroforez (Running)

3. Transfer
4. Antikorla muamele
5. Görüntüleme

Daha geniş bir sıralama yapılacak olursa;

1. Total protein eldesi (Protein extraction)
2. Protein miktar tayini
3. Proteinlerin kaynatılması
4. SDS-PAGE hazırlama
5. Proteinlerin jele yüklenmesi
6. Jel elektroforezi (Running)
7. Jelden membrana aktarım (transfer), jelin membrana emdirilmesi (Blotting)
8. Bloklama (Blocking)
9. Birinci antikor ile muamele
10. Yıkama
11. İkinci antikor ile muamele
12. Yıkama
13. Görüntüleme (ECL, enhanced chemiluminescence)
14. Kontrol proteini (Internal control) çalışması
15. Analiz ve yayın için şekil hazırlanması

sıralaması karşımıza çıkmaktadır.

3.7.1. Protein İzolasyonu (Protein Extraction)

İster *in vitro* (hücre dışı, hücre kültürü, vb) ister *in vivo* (hücre içi, deney hayvanı çalışmaları) deneyler yapıldıktan sonra doku içerisindeki hücreler veya kültür hücreleri parçalanarak proteinleri içeren kısım diğer kısımlardan ayrıştırılır.

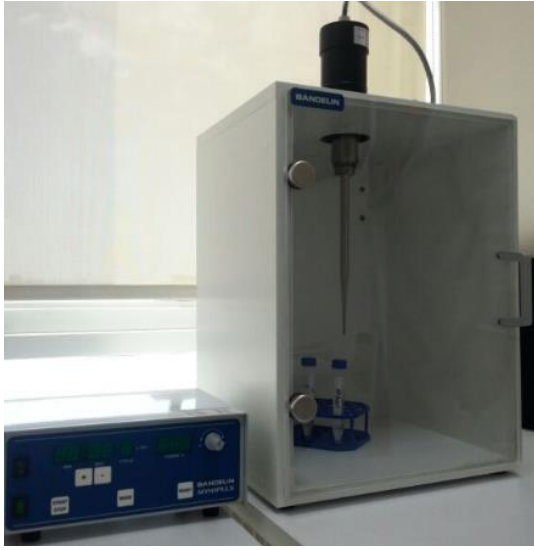
Hücre zarını ve çekirdek zarını parçalarsak sitoplazma ve çekirdekte bulunan proteinleri elde edilir. Çekirdek proteinlerini elde etmek daha zordur. Bu hücre ekstraktında hücredeki binlerce protein bulunur ve total hücre ekstraktı (**total cell lysate**) denir.

Lizis solüsyonu (deterjan, lipidleri ayrıştırır) hücre zarlarını parçalar. Hücre parçalanınca hücredeki protein parçalayıcı proteaz enzimleri de ortaya çıkacağından

proteinleri bundan korumak gerektiği için **proteaz inhibitör kokteylleri** kullanılır. Bu inhibitörler proteazların aktivitesini engeller, proteinler parçalanmaktan korunur.

İzolasyon Protokolü

-80 °C den çıkarılan dokuyu temizlemek için soğuk PBS ile 2 kez yıkama yapılır, ardından dokular bistrü ile kıyılır, çok küçük parçalara ayrılır veya sonikasyonla parçalanır.



Resim 1. A) Sonikasyon cihazı

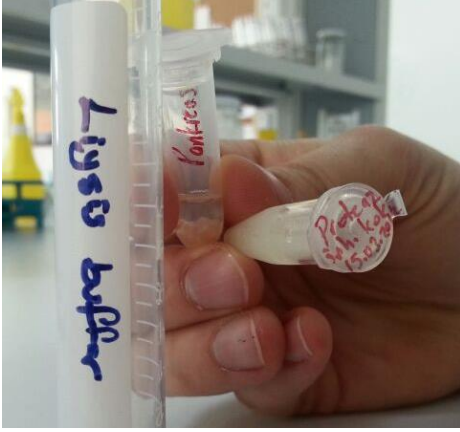


B) Sonikatörde parçalama

Parçalanmış doku 2 ml'lik tüplere alınıp 10.000 rpm 4 °C' de 5 dk santrifüj edilir.

Bundan sonraki tüm kısımlar buz üzerinde gerçekleşmelidir ki proteinler ısı etkisiyle denatüre olmasın. Santrifüjden alınan tüplerin içindeki sıvı kısım atılır ve katı kısım olan dipteki pellet artık protein eldesi için kullanılır.

Parçalanmış ve çöktürülmüş dokulara (pellet), 240 µl lizis solüsyonu ve 10 µl proteaz inhibitörü (1/100) pipetlenir.



Resim 2. A) Lysis buffer ve proteaz

B) Santrifüj 14,000 rpm, 20 dk, +4 °C

15 dakika shakerda sallanır. Lysis solüsyonunun görevi biyolojik membranları parçalamak, proteaz inhibitörünün görevi ise proteinleri proteaz enzimlerinin saldırısından korumaktır.

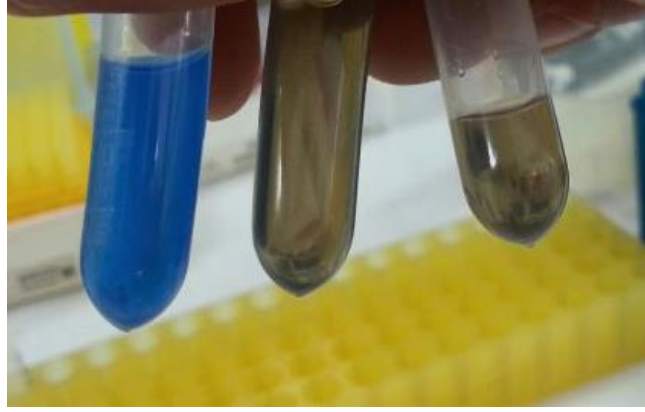
Dokular tekrar santrifüj edilir. (14.000 rpm 20 dk) Protein içeren kısım olan süpernatant başka bir tüpe aktarılır. Katı kısım olan pellet atılır veya saklanır.

3.7.2. Protein Miktar Tayini

Bu yöntemde jele ortalama 10-30 µg arası protein yüklenmesi gerekir. Bunu hesaplamak için elimizdeki protein miktarının bilinmesi gerekmektedir. Bunun için spektrofotometrik ölçüm yapıp Bradford protein tayin metodunu kullanılır.

Protokol (Bradford)

1. Elimizde bulunan süpernatantlardan 25µl (230-240 µl örneğim vardı. 25µl harcadık. Örnekten kalan 200 µl civarındır) alınır ve temiz eppendorflara aktarılır
2. Üzerine 1,5 ml Bradford solüsyonu eklenir ve karıştırılır.



Resim 3. Coomassie boyası eklenmiş proteinler

Spektrofotometreyi 595 nm dalga boyuna ayarlayıp önce 2 tane mikro küvete sadece Bradford koyulur. 595 nm dalga boyunun seçilmesinin sebebi proteinlerin bu dalga boyunda en iyi absorbands vermesidir. Burada ilk basamak oto-zero yapmaktır. İçinde sadece Bradford solüsyonu olan 2 adet mikro küvetten birini kör kuyucuğuna diğerini ise birinci örnek kuyucuğuna koyup oto-zero tuşuna basılır. Gösterge de absorbands 0.00'ı gösterdikten sonra birinci örnek kuyucugundaki mikro küveti çıkarıp yerine örneklerimizi tek tek koyarak absorbands değerlerini tespit edilir.



Resim 4. Spektrofotometre

$$y = 0,6146x + 0,1751$$

(Bu denklem daha önce konsantrasyonları bilinen çözeltilere karşı elde edilen absorbands değerleri baz alınarak hocalarımız tarafından çizilmiştir.)

Örneğin:

Örnek	Absorbance (y) OD	Miktar (x) µg/µl
1	1,142	1,57
2	1,093	1,49
3	1,146	1,60

Burada absorbans ölçülüp denklemde y yerine yazılıp protein miktarı (x) hesaplanır.

Birinci örnek miktar 1,57 µg/µl ise => 15µg yüklemek için kaç µl alacağız.

$$X = 15/1,57 = 9,53\mu\text{l}$$

3.7.3. Kaynatma (Boil)

Protein miktarı bu şekilde hesaplanır. Bundan sonraki basamak jel elektroforezdir. Fakat bundan önce proteinler 95°C'de 5 dk kaynatılmalıdır. Kaynatma işleminin amacı proteinlerin üç boyutlu yapılarını tek boyuta indirgemektir. Bunu için Sample buffer ve betamerkaptoetanol (BME) kullanılır. Önce %5 betamerkaptoetanollü sample buffer hazırlanır.



Resim 5. Heat Block

Protein örnekleri %5'lik BME ile 1:1 dilasyon edilir. Bu karışım 95°C'de 5-10 dk kaynatılır. Proteinler arasındaki bağlar kırılır. Kaynatma ile proteini lineer hale getirilir.

Yürütmenin gerçekleşeceği SDS ile proteinler negatif yükle yüklenir. Bu işlem yapılmazsa proteinin jelde hareketi güçleşir.



Resim 6. Sample buffer

3.7.4. SDS-PAGE

Yüklü moleküllerin elektrik alanında ayrılmalarını sağlayan teknik elektroforezdir. Agaroz gibi çeşitli jel hazırlama materyali olmasına rağmen en iyi ayrışım poliakrilamid jel elektroforezi ile sağlanmaktadır. Burada mekanizma kimyasal bir reaksiyona dayanır. Akrilamid monomerleri, TEMED ve APS gibi katalizörler ve polimerizasyon başlatıcılar ile akrilamid polimerine dönüşür. Proteinlerin yürüyeceği ortam matriksi oluşur. Etrafı eksi yüklerle sarılan proteinler elektrik akım verilince pozitif kutba doğru koşarlar. Binlerce protein bu şekilde moleküler ağırlık ve elektrik yükü gibi faktörler nedeniyle birbirinden ayrılır.

SDS; sodyum dodesil sülfat, SDS bir deterjandır ve köpürür. Hücre zarındaki lipid tabakayı parçalar aynı zamanda proteinleri etrafında negatif yük katmanı oluşturur. Böylece tüm protein aynı hızda jelde hareket etmesini sağlar.

PAGE; poliakrilamid jel elektroforezidir. Jel veya matriks ortam proteinleri ayırtırmaya yarar. Agar veya akrilamid kullanılır. Akrilamid, cross linker ile katılır ve poliakrilamidli porlu matriksi oluşturur. Akrilamid nörotoksin olduğu için kullanırken eldiven kullanılmalıdır.

Bundan sonraki işlem hazırlanan proteinleri jelde yürütmektir. Bunun için iki yöntem mevcuttur; biri hazır jel diğeri ise gerekli kimyasalları kullanarak hazırlanan jeldir. Kendi hazırladığımız jel prosedürü aşağıda belirtilmiştir.

APS; amonyum persülfat. Suda çözünür, amonyum persülfat birçok uygulamada kullanılan güçlü bir okside edici ajandır. Poliakrilamid jel yapımında akrilamid polimerizasyonunu katalize etmek için tetrametilendiamin ile birlikte kullanılır. Göz, burun, boğaz, akciğer ve temas halinde deriyi tahriş edebilir. % APS taze olarak hazırlanır. (0,1 gr / 1 ml dH₂O)

TEMED; tetrametilendiamin. TEMED hızlı donmayı sağlar.

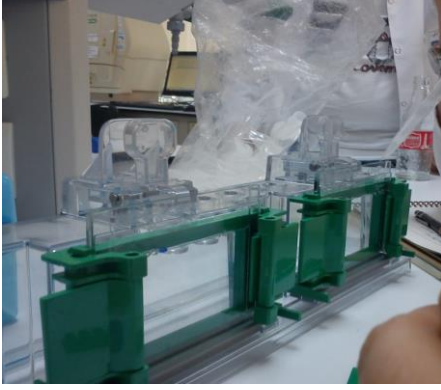
Bisakrilamid; protein analizinde kullanılır. Por çapı küçüktür. Porlarının küçük olması proteinlerin daha iyi bir şekilde yürümesini sağlar.

Akrilamid; ortam matriksini oluşturan kimyasaldır. Monomer haldedir. Çapraz bağlayıcı bis molekülü ile akrilamid kovalent bağlanır ve poliakrilamid oluşur. Porlu jel elde edilir. Proteinler bu aralıklarda geçerek ilerler. Polimerizasyon başlatıcı olarak APS kullanılır. Katalizör ise TEMED'dir.

Tris; tampondur ayrıca iki farklı molarite ve pH'da hazırlanır. Bunu sebebi jelin iki kısımdan oluşmasıdır.

%10'luk 1 jel için gerekli malzemeler:

	Running - resolving jel için	Stacking jel için
MiliQ	3 ml	1,125 ml
%30 Acrylamide Bis	2,25 ml	262 µl
Tris HCl	1,875 ml	475 µl
	1,5 M pH=8.8	0,5 M pH=6.8
%10 SDS	75 µl	19 µl
%10 APS	37,5 µl	19 µl
TEMED	20 µl	5 µl



Resim 7. Jel dökme aparatı

Yukarıdaki resimde görüldüğü gibi jel dökme aparatı hazırlandıktan sonra; yukarıdaki kimyasal sırayı takip ederek hazırladığımız running jelimizi TEMED hızlıca polimerize etmeden camlar arasına pipetliyoruz. Camlar iki kısımdan oluşmaktadır; biri kalın cam diğeri ise ince camdır. Bunların arası 1 mm'dir. Bu sayede bantların keskin ve çözünürlüğünün fazla olması sağlanmış olur. Bu kısım polimerize olmadan izopropanol ile hava teması kesilir. Hava temasının kesilmesinin sebebi de polimerizasyonun en iyi şekilde olmasıdır. Bununla birlikte alkol dökülen jelde oluşan dalgalanmaları da yok eder ve düz bir hat halinde jelin polimerleşmesine vesile olur. Bu sayede proteinler aynı seviyeden yürümeye başlar ve aynı kDa' sahip bantların, aynı hizada olması sağlanır. Polimerleşme tamamlandıktan sonra izopropanol dökülür ve stacing jel kısmı hazırlanır. Kimyasallar aynı şekilde belirtilen sıraya göre pipetlenir ve running jelin üzerine stacing jel aktarılır. Aktarım tamamlanır tamamlanmaz tarak dikkatlice iki cam arasına yerleştirilir ve polimerleşme bitince yükleme işlemine geçilebilir.

Running ve stacking jellerin farkı tris tamponundan kaynaklanır. Burada hem molariteleri hem de pH'larının farklı olmasının sebebi sctacking kısmında yüklemenin yapılması sebebi ile proteinlerin sadece ağırlıkları sebebi ile running kısma kadar gelmeleridir. Bundan sonra stacking kısmından running kısmına geçiş olur ve burada proteinlerin ayrılması hem yüklerine göre hem ağırlıklarına göre olacaktır.

3.7.5. Yükleme (Loading)



Resim 8. Jel Yükleme Tankı

İlk önce elektroforez tankının içine running buffer (Tris Glisin SDS) yarıya gelecek şekilde doldurulur. SDS, deterjan olduğu için çok köpürür. Çok fazla sallamamaya özen gösterilmesi gerekir. Jel tanka yerleştirilir fakat burada dikkat edilmesi gereken nokta hazır jel kullanılıyorsa alt kısımdaki yeşil bandın çıkarılmasıdır.

Yoksa yüklenen örnekler olduğu yerde koşmaya çalışır buda zaman kaybı doğurur. Jelde bulunan tarak dikkatli çıkarılmalıdır ki kuyucuklar kopmasın, yırtılmasın. Örnekleri yüklemekten önceki son aşamada kuyucukların içinde oluşabilen kristalleri ve hava kabarcıklarını ortadan kaldırmak için pipetaj yapılması gerekir ki örnekler kuyucuğa rahatça yerleşsin ve kolayca koşmaya başlasın. OD ölçümünde belirlenen miktarlarda proteinler kuyucuklara yüklenir. Yürütülen proteinlerin kaç kDa olduğunu anlamak için marker yüklemesi bizim yaptığımız deneylerde 3 µl yapılmıştır.

Jelin 120 V 5 dakika, 100 v 45 dakika yürütülmesi yeterli olmuştur bizim yaptığımız deneylerde. Bu yürütme koşulları kazanılan tecrübe ile değişiklik gösterebilir.

Jel yürüdüktan sonra dikkat edilmesi gereken bazı noktalar bulunmaktadır. Bunlardan biri jelin mutlaka kurutulmaması gerektiğidir. Diğer SDS solüsyonunun saflığıdır. Jel aparatının içine hiç kullanılmamış SDS konulması önerilir. Tankın içindeki SDS ise 2 yada 3 kez kullanılabilir. SDS 10x oranında hazır alınabileceği gibi aşağıda belirtildiği gibi kimyasallarla araştırmacı kendi de hazırlayabilir.

10X Running solüsyonu (1 litre dw)

Tris	30,3 gr
Glisin	144,1 gr
SDS	10 gr

3.7.6. Transfer İşlemi



Transfer cihazı – yükten + kutba doğru elektrik akımı vererek proteinlerin jelden membrana geçmesini sağlar. Yani jeldeki proteinlerin daha sağlam ve deneyin diğer aşamalarında rahatça kullanılabilen membrana emdirilmesidir. Bu yüzden blotlama tabiri kullanılır. Transferimiz bittikte sonra membranın ön yüzüne işaret atılır. Sonra membran üzerindeki gözükken marker'ın 50, 75 ve 100 kDa bantlarına

Resim 9. Turbo Transfer Cihazı

karşılık gelen bantların yerleri işaretlenir. Bunun sebebi bloklamadan sonra markerlar gözükmediğinden görüntüleme sonunda proteinin kaç kDa olduğunu kolayca saptayabilmektir. Transferin başarılı olduğunu öğrenmek için membranın western cihazı ile görüntülemesinin yapılması gerekir ki deneyin sağlıklı yürüdüğünden emin olunsun.

3.7.7. Bloklama

Membran üzerindeki nonspesifik bağlanma bölgelerinin bloke edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla süt tozu bovin serum albümin (BSA) kullanılabilir Hangi bloklama ajanının kullanılacağı antijen ve enzim konjugata bağlıdır. Alkalen fosfataz kullanıldığında buffer olarak tris-buffered salin seçilmelidir. Ayrıca membranda bulunan proteinlerin sabitlenmesi ve membranın arka yüzünün beyaz veya temiz olması için de mutlaka yapılması gereken bir basamaktır.

Bunun için bu deneylerde % 5'lik süt tozu ile 1.5 saat bloklama yapılmıştır. Shaker üzerinde membranın iyice sallandığından emin olunması gerekir.

%5 lik süt tozu çözeltisi hazırlamak için TBS-T çözeltisi kullanılır:

TBS-T hazırlama

8,8 gr Tris Base

1,2 gr NaCl

500 µl Tween 20

750 ml water

En son pH ayarı yapılır

Hacim 1 litreye tamamlanır

%5'lik süt tozu

(Taze hazırla, kullan at)

2.5 gr süt tozu tartınız.

50 ml'lik falkona koyunuz.

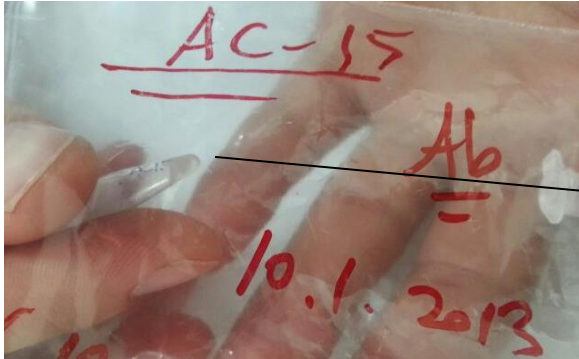
50 ml TBS-T içinde
çözünüz.

%5 lik süt tozu +4 derece
saklanır.

Buna dikkat ediniz.

3.7.8. Birinci Antikor (Primary antibody, 1. Ab)

Birinci antikor pipetlenirken dikkat edilmesi gereken bazı noktalar vardır. Bunların ilki prosedür göre dilasyon yapmaktır. Bizim antikorumuz internal bir kontrol olan β -actin (Thermo, Ac-15, monoclonal antibody, host: mouse). Burada 1/10.000 ila 1/20.000 oranında β -actin %5'lik süt tozunda hazırlanabilir.



β -actin

15 ml %5 lik süt tozuna 1 µl β -actin antikorunu pipetlenir. 1/15.000

Küçük membran için: 3 ml'lik total çözelti yeterli olmakta bunun için;

1/15.000 β -actin yapmalıyız, bunun için ise;

3ml %5 lik süt tozuna 0.2 µl β actin pipetlenir.

Bu solüsyon membranın ön yüzü ile temas edilecek şekilde pipetlenir ve naylon arasına koyduğumuz membrana bu şekilde + 4 °C de bir gece shaker üzerinde beklemeye bırakılır.

NOT!!! Antikor bilgi notuna göre (data sheet) bu oranlar deęişebilir. Bir gece yerine 1-2 saat de olabilir.

Bir gece sonra antikor mutlaka alınır kesinlikle atılmaz. Tekrar kullanılabilir. Bunların saklanma koşulları +4 ° C dir.

3.7.9. İkinci Antikor (Secondary antibody, 2. Ab)

Birinci antikorları üzerine iyice bağlanmış bu membranı 3 kez 5 er dk (3x5) TBS-T ile yıkadıktan sonra artık ikinci antikorı pipetleyebiliriz. Yine %5 lik süt tozunda 1/2000-4000 oranında 2.Ab ve 1/10.000 oranında streptactin (Streptaktin markerın 2. Ab'dir) hazırlanır. Birinci Ab hangi kaynaktan ise ikinci ondan seçilir. Mouse-mouse, rabbit-rabbit, goat-goat, human-human.

Bizim örneğimiz olan β -actin antikorı mouse kaynaklıdır. Dolayısı ile 2. Ab'si de Mouse olacaktır.

2. Ab oda sıcaklığında shakerda 1 saat inkübe edilir.



Resim 10. A) Streptactin ve 2. Ab

B) Membranın naylon poşete presleme

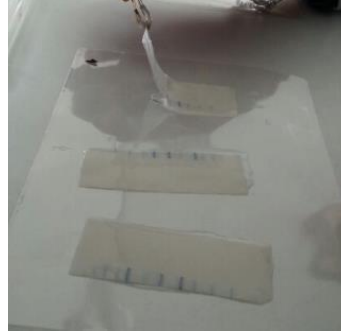
1 saat sonra membran TBS-T ile 3x5 yıkanır.

Bu yıkamaların sebebi başka zayıf bağlanmaları temizlemektir. Ortamdaki gereksiz şeyler temizlenir.

Son olarak ECL solüsyonu eklenir.

2.7 ml distile su, 150µl Lumi A ve 150 µl Lumi B (Cell Signaling, ECL). ECL solüsyonu farklı firmalardan farklı isimler altında temin edilebilir.

Streç film gergince serilir. Damlalar halinde ECL solüsyonu eklenir. Membranın ön yüzü ile temas edecek şekilde ECL'nin üzerine konur. 5-10 dakika beklenir. Sonra görüntüleme işlemine geçilir.



Resim 11. Membranların ECL solüsyonu ile inkübasyona bırakılması

3.8. DENEYDE KULLANILAN CİHAZLAR

Hettich Rotina 380R santrifüj (Germany),
Nüve Bench Topsantrifüj (Turkey),
Himac Microcentrifuge CT 15RE (Japan),
Shimadzu AUW220D Hassas terazi (Japan),
Herolab UV transluminator (Germany),
VWR International Vortex (Germany),
Sanyo -80 deepfreezer (MDF-U7386S,U5386S)(Japan),
Scotsman AF80 Buz makinesi (IL, USA),
VWR Galaxy Ministar spin arttırıcı (Korea),
Thermo Scientific OWL EASYCASTTM B2 Jel elektroforez sistemi (USA),
Techne TC-3000X PCR cihazı (normal PCR)(USA),
Techne TC-5000 PCR cihazı (Gradient PCR)(USA),
Schimadzu UV-Pharmaspec 1700 spektrofotometre (Japan),
Schimadzu Biotech Biospec-nano spektrofotometre (Japan),
Qiagen Rotor-Gene Q RT-PCR cihazı (Germany),
Thermo Scientific Barnstead Easypure II ultra saf su cihazı (USA),
Techne Dri-Block DB-2D heatblock (UK),
Heidolph Promax 1020 shaker (Germany),
Consort EV265 elektroforez güç kaynağı (Belgium),
Cleaver Scientific MSCHOICE elektroforez tankı,
Mikrodalgafırını SAMSUNG MV71E (Korea),
VWR advanced VMS-C7 manyetik karıştırıcı (Korea),
Westen Blot
Turbo Taransfer

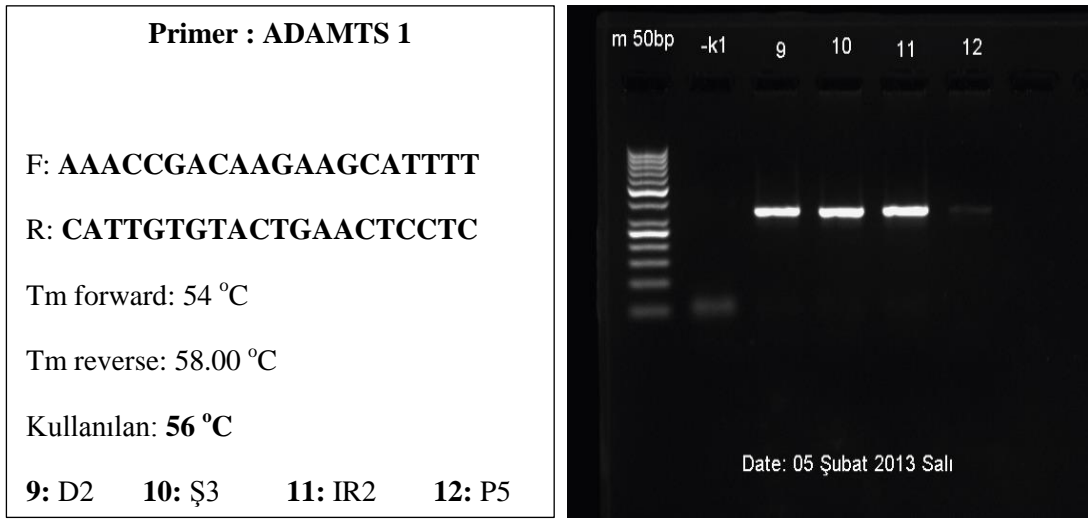
3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

ADAMTS genlerinin ekspresyonlarına ait veriler, sonuçlar kısmında grafik olarak yer aldı. Grafiklerdeki veriler bar ve bar çubukları şeklinde ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi. Gruplarda yer alan deney sayısının az olması nedeniyle istatistiksel analizlerde nonparametrik test kullanıldı. Değişkenler arası ilişki Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi. Tüm verilerin istatistiksel analizi SPSS 16.0 programı kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZ

Bu deneyler kapsamında, PCR ile yürütülen tüm ADAMTS genlerinin cDNA'dan uygun primerler kullanılarak elde edilen ürünlerinin agaroz jelde yapılan standart bir yürütme sonucunda UV altında çekilen resimler aşağıda görülmektedir.



Resim 12. ADAMTS-1'in gradyent PCR sonucunda elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Bu görüntüyü baz alarak SC- İ/R modelinde (11 nolu örnek) ışımının fazla olması ve aynı zamanda ilaç verilen P ve D gruplarında (9 ve 12 nolu örnekler) ışımının azalması ADAMTS1'in ekspresyonunun gruplar arası farklı olduğunun bir ön göstergesi oldu. Bu sonucu esas alarak ADAMTS-1'in Western Blot aşamasında kullanılmasına karar verildi.

Aşağıda sıra ile çalışılan tüm ADAMTS ailesi üyelerinin PCR sonuçları vardır. Bu sonuçlara göre Western Blot yöntemi ile çalışılacak ADAMTS üyeleri seçilmiştir.



Primer : ADAMTS-4

F: GTGCTATCGTGGAAGATGAT

R: TCATGCAGCATGTTGAAGAC

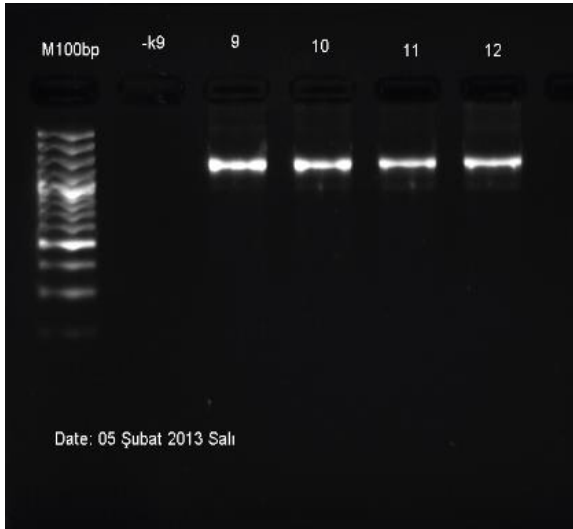
Tm forward: 58 °C

Tm reverse: 58.00 °C

Kullanılan: **58 °C**

9: D2 10: Ş3 11: IR2 12: P5

Resim 13. Deney sonucuna göre ve yapılan literatür çalışmasına göre ADAMTS-4'ün Western çalışması yapılmamıştır.



Primer : ADAMTS -9

F: AAATACATCACGGAGTTTTT

R: CAAAATCAATTCACATTGC

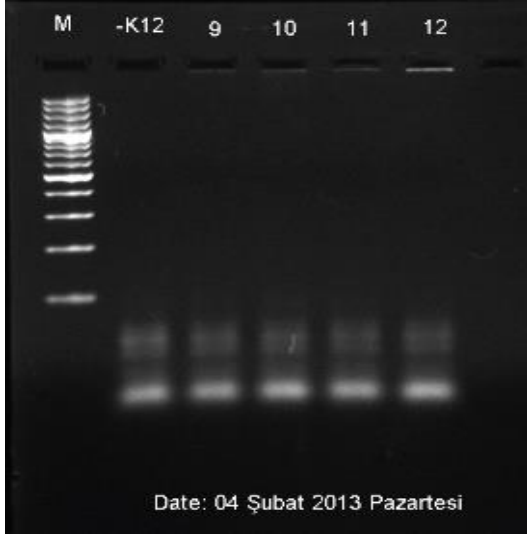
Tm forward: 52 °C

Tm reverse: 52.00 °C

Kullanılan: **52 °C**

9: D2 10: Ş3 11: IR2 12: P5

Resim 14. Deney sonucuna göre ve yapılan literatür çalışmasına göre ADAMTS-9'ün Western çalışması yapılmıştır. ADAMTS-9 Western Blot çalışması sonucu ileride gösterilmiştir.



Primer: ADAMTS-12

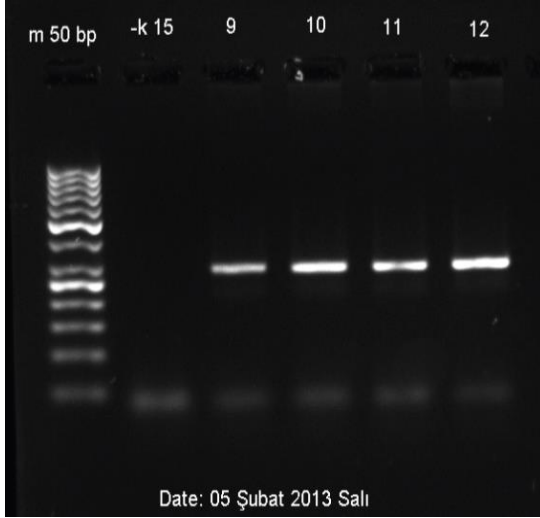
F: TACCACTGGTATCCAGTT
R: GGCAACAGCAGAAATGTCT

Tm forward: 52 °C
Tm reverse: 56.00 °C

Kullanılan: 54 °C

9: D2 10: Ş3 11: IR2 12: P5

Resim 15. Deney sonucuna göre ve yapılan literatür çalışmasına göre ADAMTS-4'ün Western çalışması yapılmamıştır.



Primer: ADAMTS-15

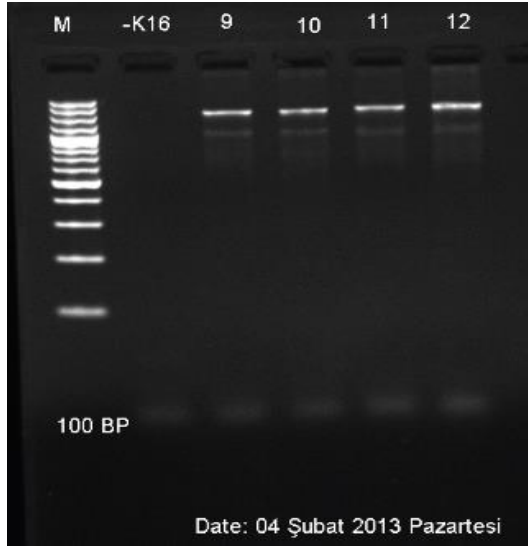
F: ATAAGTGCAAACCTCATCTGC
R: GTCAAACCTTCTTCTTGGAGC

Tm forward: 56 °C
Tm reverse: 58.00 °C

Kullanılan: 56 °C

9: D2 10: Ş3 11: IR2 12: P5

Resim 16. Deney sonucuna göre ve yapılan literatür çalışmasına göre ADAMTS-15'in Western çalışması yapılmıştır. ADAMTS-15'in Western Blot çalışması sonucu ileride gösterilmiştir.



Primer : ADAMTS-16

F: TCAAAAGCAGCATTCTGTG

R: TTTTGCATCATCGTTTTGTC

Tm forward: 56 °C

Tm reverse: 54.00 °C

Kullanılan: 54 °C

9: D2 10: Ş3 11: IR2 12: P5

Resim 17. Deney sonucuna göre ve yapılan literatür çalışmasına göre ADAMTS-16'in Western çalışması yapılmıştır. ADAMTS-16'in Western Blot çalışması sonucu ileride gösterilmiştir.



Primer: ADAMTS-17

F: TGTACAACATGTTTCAGCAC

R: TTTGCCAGTGACAGAAGCTC

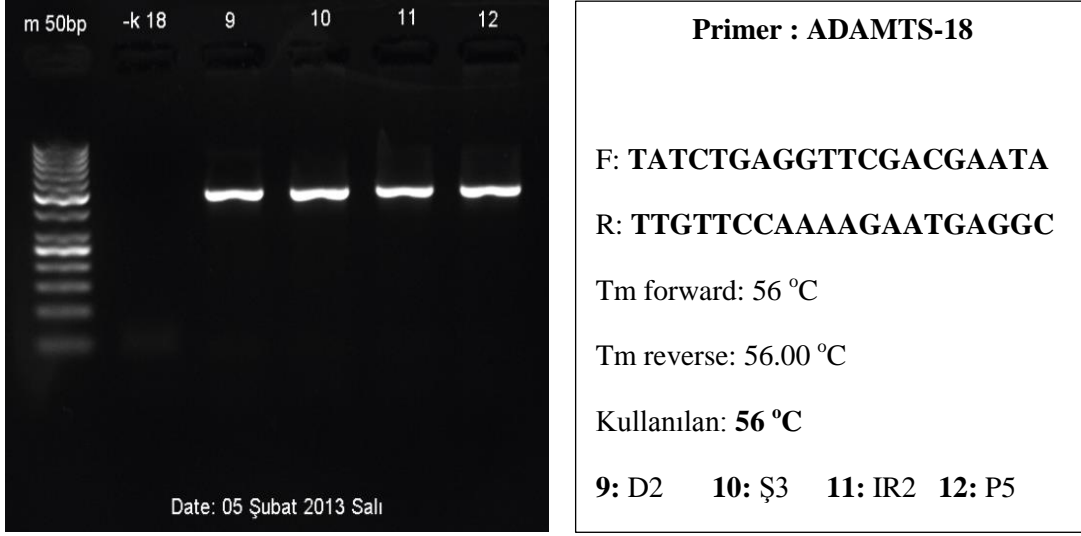
Tm forward: 56 °C

Tm reverse: 60.00 °C

Kullanılan: 58 °C

9: D2 10: Ş3 11: IR2 12: P5

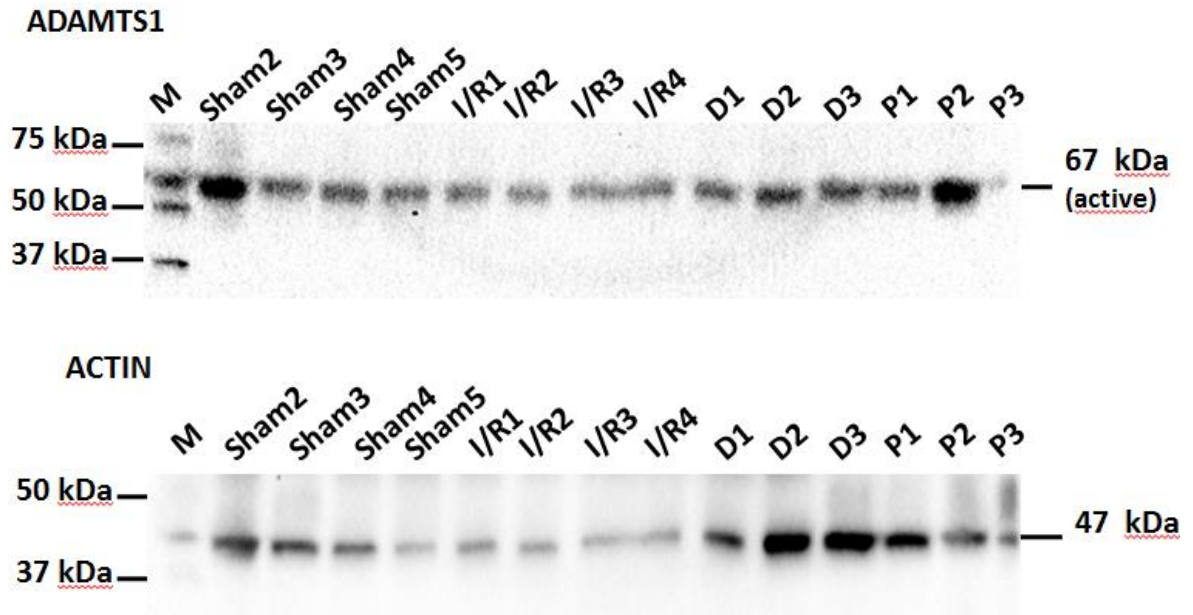
Resim 18. Deney sonucuna göre ve yapılan literatür çalışmasına göre ADAMTS-17'nin Western çalışması yapılmamıştır.



Resim 19. Deney sonucuna göre ve yapılan literatür çalışmasına göre ADAMTS-18'in Western çalışması yapılmıştır. ADAMTS-18'in Western Blot çalışması sonucu ileride gösterilmiştir.

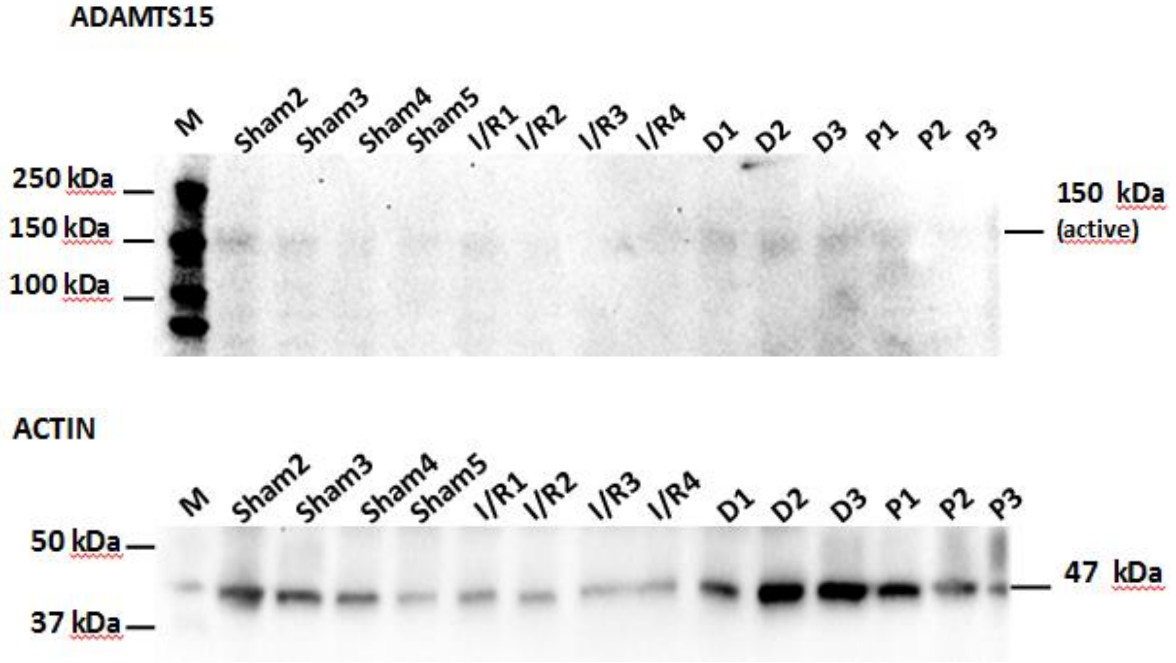
4.2. WESTERN BLOT GÖRÜNTÜLEME SONUÇLARI

4.2.1 ADAMTS-1



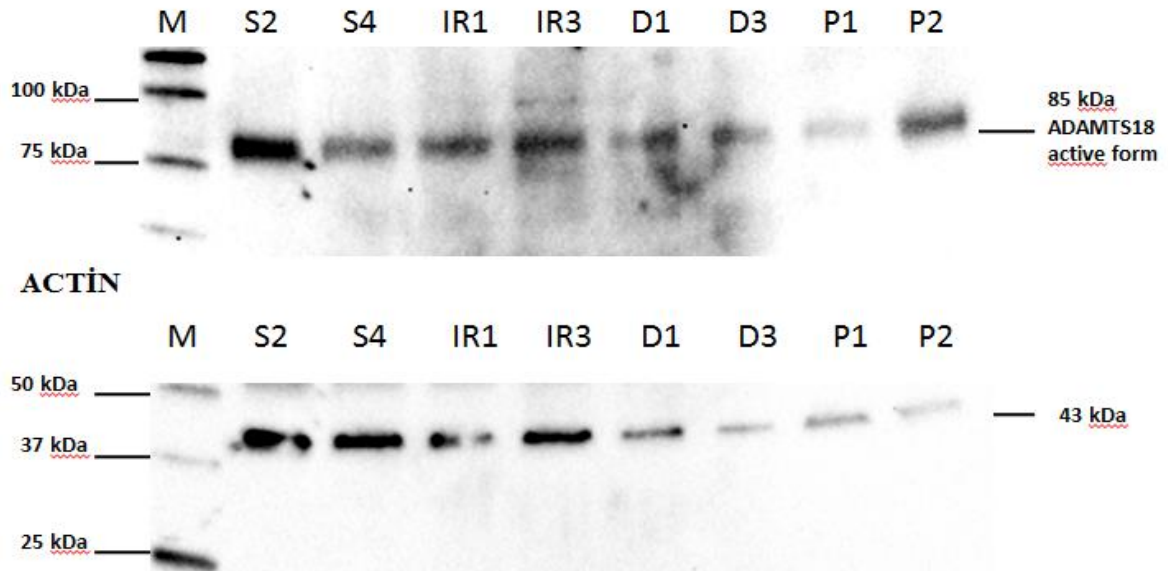
Şekil 6. ADAMTS-1' in ACTİN ile birlikte western blot yöntemi ile elde edilmiş bant görüntüleri.

4.2.2 ADAMTS-15



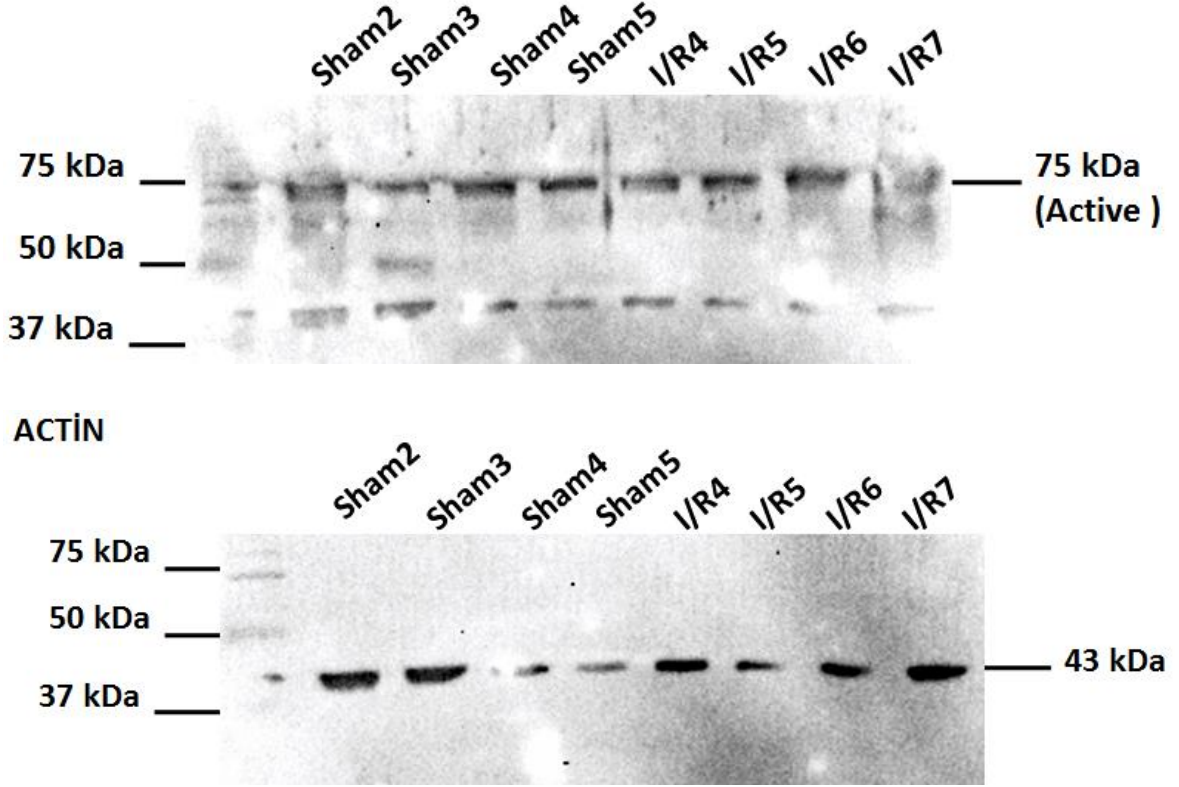
Şekil 7. ADAMTS-15' in ACTİN ile birlikte western blot yöntemi ile elde edilmiş bant görüntüleri.

4.2.3. ADAMTS-18



Şekil 8. ADAMTS-18' in ACTİN ile birlikte western blot yöntemi ile elde edilmiş bant görüntüleri.

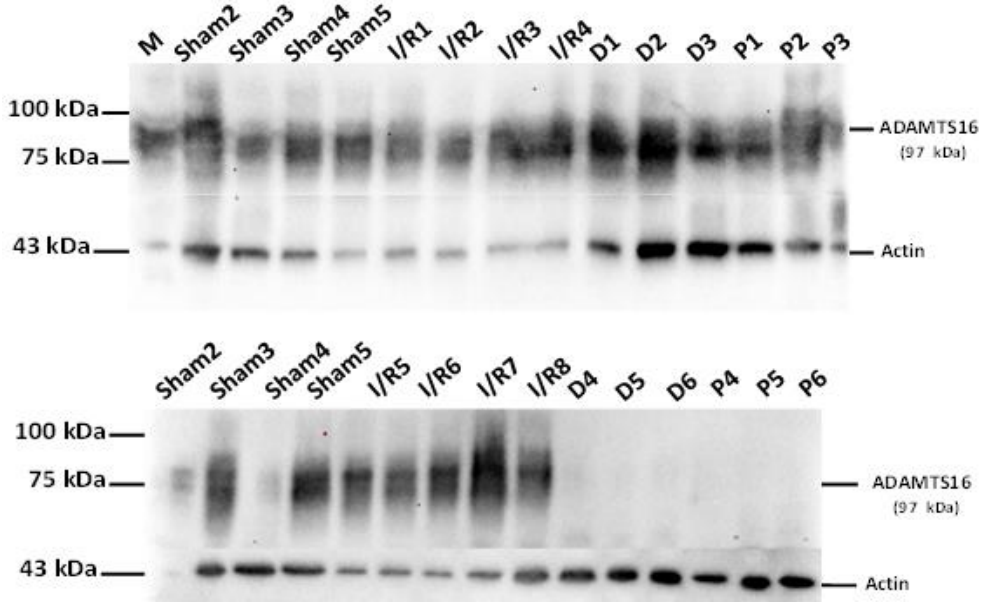
4.2.4. ADAMTS-5



Şekil 9. ADAMTS-5' in ACTİN ile birlikte western blot yöntemi ile elde edilmiş bant görüntüleri.

4.2.5. ADAMTS-16

En anlamlı sonuçların alındığı, western blot yöntemi ile birkaç çalışma daha yapılan ADAMTS gen ailesinin 16. üyesidir. ADAMTS-16'nın western blot yöntemi ile elde edilen ve ekspresyonu veren bantların görüntüsü, bantların hacimlerini baz alarak cihazın kantitatif analiz sonuçları ve istatistiksel veriler aşağıda belirtilmiştir.



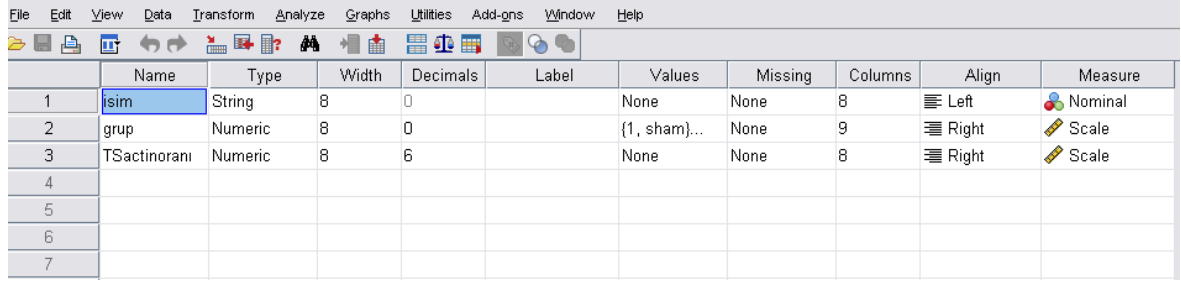
Şekil 10. ADAMTS-16 proteininin SC iskemi reperfüzyon tavşan modeli: D:silostazol, P:piatiasilostazol. Western Blot Protein tayini ile ADAMTS-16 genine ve ACTİN'e ait bantların görüntüsü.

Tablo 3. ACTİN ve ADAMTS-16 geninin ekspresyon düzeylerinin WESTERN BLOT analizi sonucu sayısal verileri

	actin	ts16	ts16/actin		actin	ts16	ts16/actin
ş2	1718748	6209874	3,613022	d 1	1224017	8890722	7,263561
ş3	1397808	4201020	3,005434	d2	2996640	1033394	3,448509
ş4	1086640	7808076	7,185522	d3	3136940	6986106	2,227045
ş5	521936	7249536	13,8897	d4	2298672	200005	0,08700893
Ş2a	1747928	7008250	4,009461488	d5	2099792	79050	0,03764658
Ş3a	2529820	829838	0,328022547	d6	2834155	116025	0,04093812
Ş4a	2181720	8565865	3,926198137	p1	2169504	5894658	2,717053
Ş5a	852124	6050955	7,101026376	p2	1349280	6757974	5,008578
ı/r 1	673489	5805360	8,619829	p3	619883	2819676	4,548723
ı/r 2	521276	5228910	10,03098	p4	1681878	116603	0,06932904
ı/r 3	495630	8338281	16,8236	p5	2274752	32759	0,01440113
ı/r 4	592432	9134028	15,41785	p6	2715100	38080	0,01402526
ır5	1135890	5911801	5,204554138				
ır6	721916	6669406	9,238479269				
ır7	1124567	11236728	9,992048495				
ır8	2054875	6630578	3,226754912				

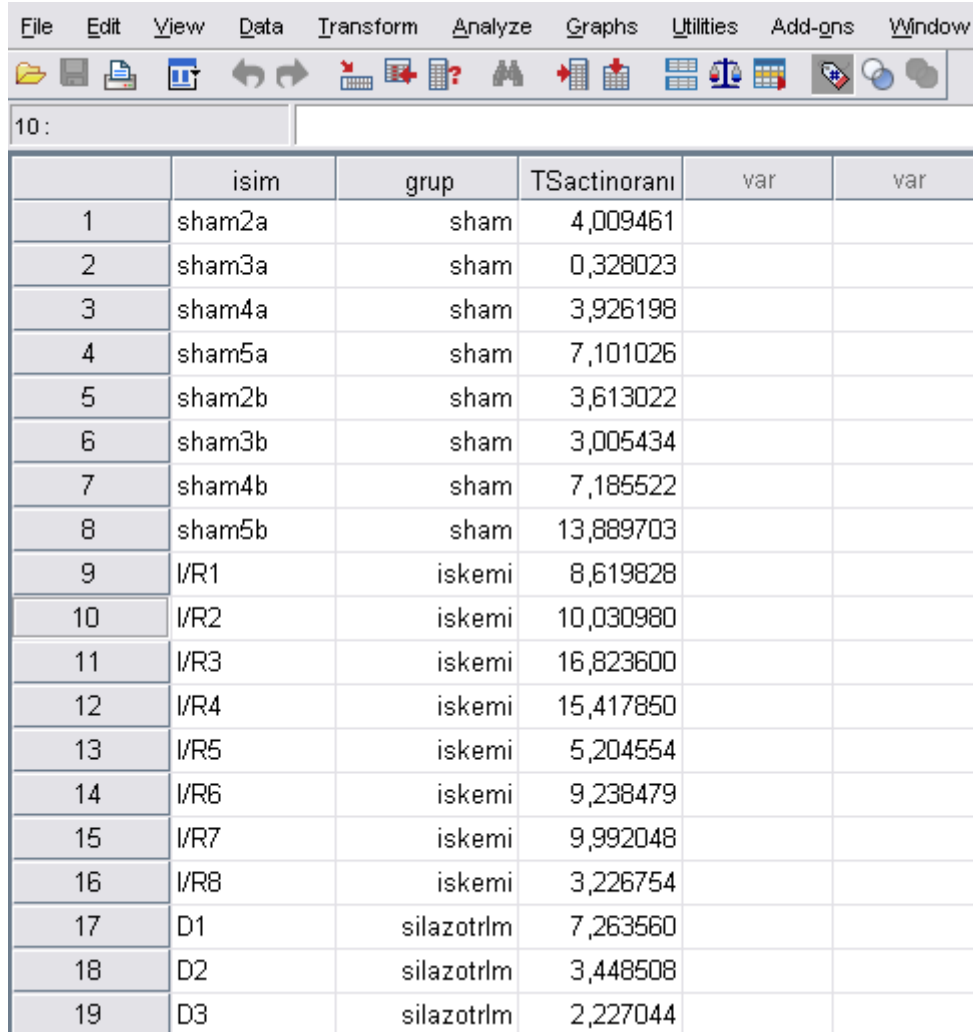
4.3. SONUÇLARIN SPSS'DE DEĞERLENDİRİLMESİ

Tablo 4. SPSS’de veri tabanı oluşturulması



	Name	Type	Width	Decimals	Label	Values	Missing	Columns	Align	Measure
1	isim	String	8	0		None	None	8	Left	Nominal
2	grup	Numeric	8	0		{1, sham}...	None	9	Right	Scale
3	TSactinoranı	Numeric	8	6		None	None	8	Right	Scale
4										
5										
6										
7										

Tablo 5. Verilerin SPSS’ e girilmesi



	isim	grup	TSactinoranı	var	var
1	sham2a	sham	4,009461		
2	sham3a	sham	0,328023		
3	sham4a	sham	3,926198		
4	sham5a	sham	7,101026		
5	sham2b	sham	3,613022		
6	sham3b	sham	3,005434		
7	sham4b	sham	7,185522		
8	sham5b	sham	13,889703		
9	I/R1	iskemi	8,619828		
10	I/R2	iskemi	10,030980		
11	I/R3	iskemi	16,823600		
12	I/R4	iskemi	15,417850		
13	I/R5	iskemi	5,204554		
14	I/R6	iskemi	9,238479		
15	I/R7	iskemi	9,992048		
16	I/R8	iskemi	3,226754		
17	D1	silazotrlm	7,263560		
18	D2	silazotrlm	3,448508		
19	D3	silazotrlm	2,227044		

20	D4	silazotrlm	0,087008		
21	D5	silazotrlm	0,037646		
22	D6	silazotrlm	0,040938		
23	P1	piasilosortlm	2,717053		
24	P2	piasilosortlm	5,008577		
25	P3	piasilosortlm	4,548722		
26	P4	piasilosortlm	0,069329		
27	P5	piasilosortlm	0,014401		
28	P6	piasilosortlm	0,014025		
29					
30					

Tablo 6. Grup ortalamalarının SPSS’de hesaplanması

Statistics

TSactinorani

sham	N	Valid	8
		Missing	0
		Mean	5,38229873
iskemi	N	Valid	8
		Missing	0
		Mean	9,81926162
silazotrlm	N	Valid	6
		Missing	0
		Mean	2,18411733
piasilosortlm	N	Valid	6
		Missing	0
		Mean	2,06201783

4.3.1. Mann-Whitney Testi İle Sham ve İskemi/Reperfüzyon Gruplarında ADAMTS-16 Expresyonunun Karşılaştırılması

Ranks			
grup	N	Mean Rank	Sum of Ranks
TSactinoranı sham	8	6,12	49,00
iskemi	8	10,88	87,00
Total	16		

Test Statistics^b

	TSactinoranı
Mann-Whitney U	13,000
Wilcoxon W	49,000
Z	-1,995
Asymp. Sig. (2-tailed)	.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.050 ^a

P < 0,05

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: grup

P<0,05 Değerine göre; İ/R yapılan dokularda ADAMTS-16 gen expresyonunun, SHAM(kontrol) dokularındaki expresyonuna göre fazla olması istatistiksel olarak anlamlıdır.

4.3.2. Mann-Whitney Testi İle İskemi/Reperfüzyon ve İlaç Uygulanmış Tavşan Dokularında ADAMTS-16 Gen Expresyonunun Karşılaştırılması.

Ranks			
grup	N	Mean Rank	Sum of Ranks
TSactinoranı iskemi	8	10,12	81,00
silazotrlm	6	4,00	24,00
Total	14		

Test Statistics^b

	TSactinoranı
Mann-Whitney U	3,000
Wilcoxon W	24,000
Z	-2,711
Asymp. Sig. (2-tailed)	,007
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,005 ^a

P < 0,05

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: grup

P<0,05 Değerine göre; İ/R yapılan dokularda ADAMTS-16 gen ekspresyonunun, silostazol sonrası dokularındaki ekspresyonuna göre az olması istatistiksel olarak anlamlıdır.

Ranks

grup	N	Mean Rank	Sum of Ranks
TSactinoranı iskemi	8	10,25	82,00
piasilosortlm	6	3,83	23,00
Total	14		

Test Statistics^b

	TSactinoranı
Mann-Whitney U	2,000
Wilcoxon W	23,000
Z	-2,840
Asymp. Sig. (2-tailed)	,005
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,003 ^a

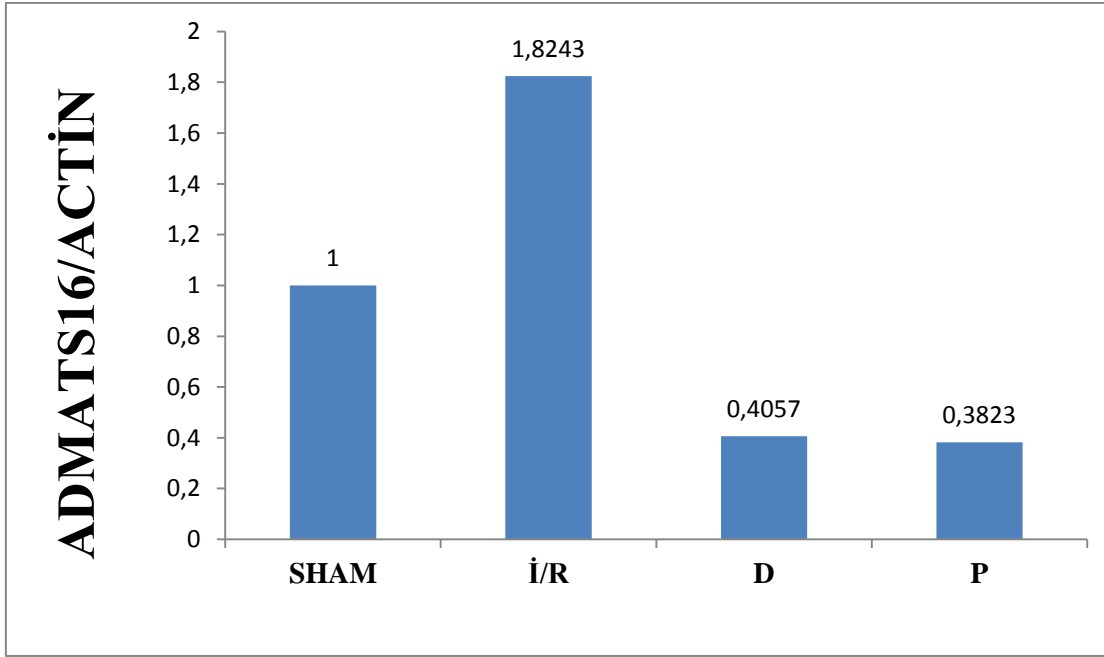
P < 0,05

a. Not corrected for ties.

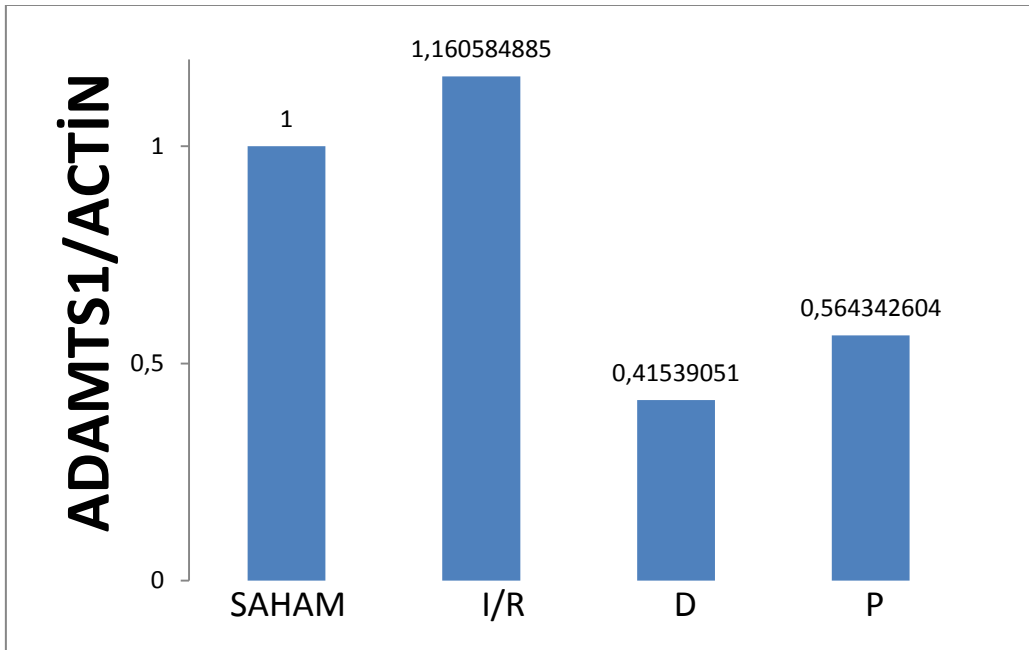
b. Grouping Variable: grup

P<0,05 Değerine göre; İ/R yapılan dokularda ADAMTS-16 gen ekspresyonunun, piyosilostazol sonrası dokularındaki ekspresyonuna göre az olması istatistiksel olarak anlamlıdır.

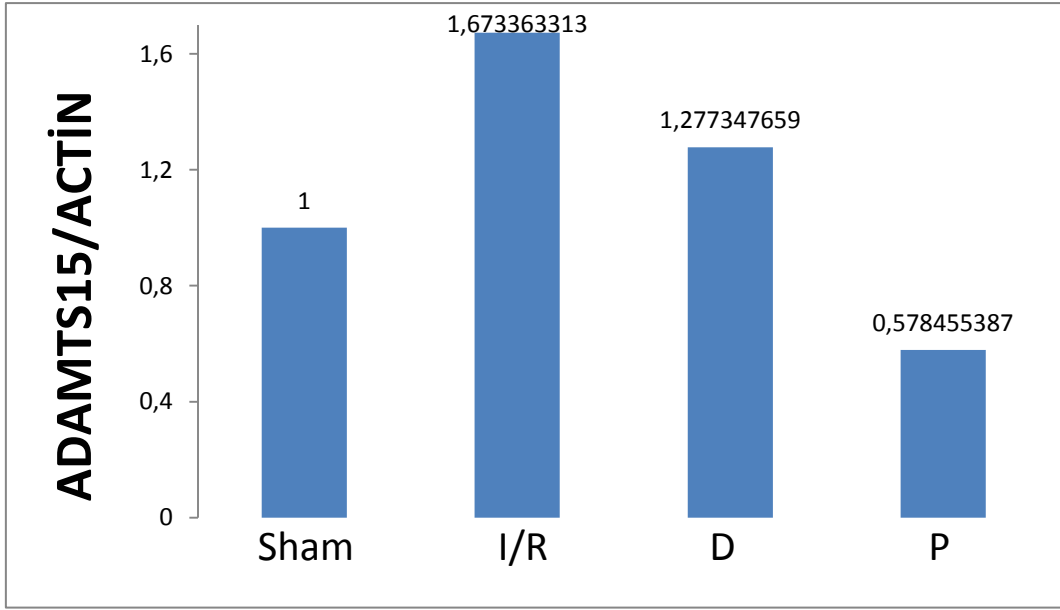
4.3.3. Sonuçların Grafiğe Dökülmesi



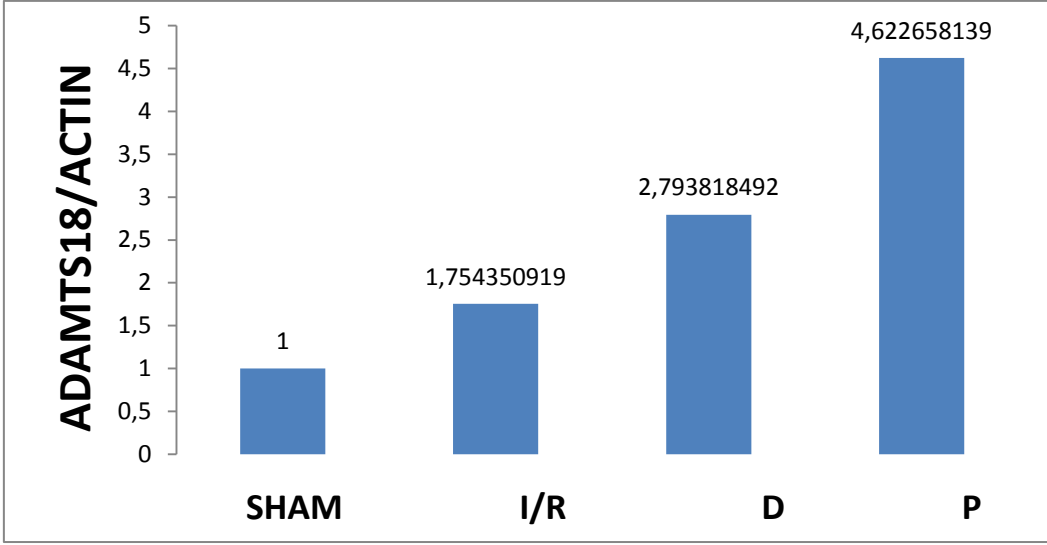
Grafik 1. İ/R yapılan SC'da ADAMTS-16 ekspresyonu ve bu ekspresyona silostazol ile piasilostazol etkisi yukarıda verilmiştir. Kontrol grubu ADAMTS-16 gen ekspresyonuna göre İ/R dokuda gen ekspresyonunun 1.824 kat arttığı ve bu artışın SPSS sonucu anlamlı olduğu bulunmuştur. Ayrıca ilaç verilen dokularda ADAMTS16 gen ekspresyonunun anlamlı şekilde azaldığı saptanmıştır.



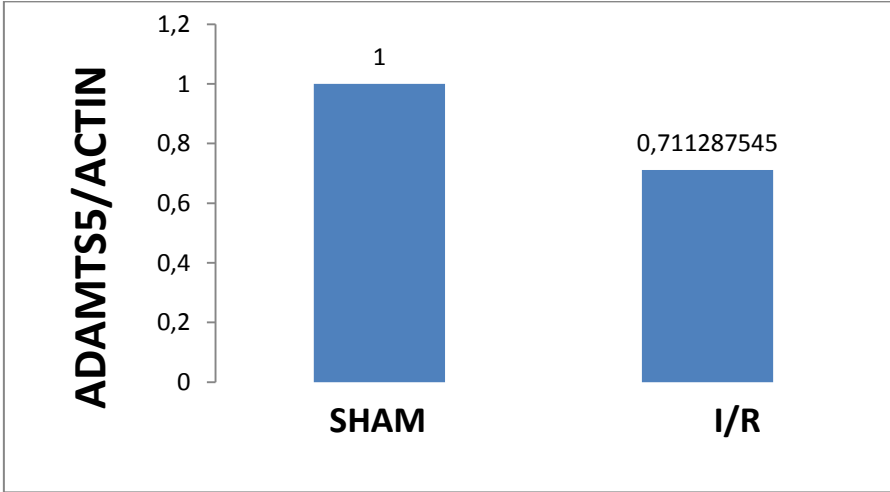
Grafik 2. İ/R yapılan SC'da ADAMTS-1 ekspresyonu ve bu ekspresyona silostazol ile piasilostazol etkisi yukarıda verilmiştir. Kontrol grubu ADAMTS-1 gen ekspresyonuna göre İ/R dokuda gen ekspresyonunun 1.16 kat arttığı saptanmıştır. Ayrıca ilaç verilen dokularda ADAMTS-1 gen ekspresyonunun azaldığı da bulunmuştur. Özellikle silostazolün ADAMTS-1'in ekspresyonunu piasilostazolden daha çok baskıladığı sonucuna ulaşılmıştır. Fakat sonuçlar anlamlı bulunmadığı için özellikle ADAMTS-16 üzerinden deneye devam edilmiştir.



Grafik 3. İ/R yapılan SC'da ADAMTS-15 ekspresyonu ve bu ekspresyona silostazol ile piasilostazol etkisi yukarıda verilmiştir. Kontrol grubu ADAMTS-15 gen ekspresyonuna göre İ/R dokuda gen ekspresyonunun 1.67 kat arttığı saptanmıştır. Ayrıca ilaç verilen dokularda ADAMTS-15 gen ekspresyonunun azaldığı da bulunmuştur. Özellikle piasilostazolün ADAMTS-15'in ekspresyonunu silostazolden daha çok baskıladığı sonucuna ulaşılmıştır. Fakat sonuçlar anlamlı bulunmadığı için özellikle ADAMTS-16 üzerinden deneye devam edilmiştir.



Grafik 4. İ/R yapılan SC’da ADAMTS-18 ekspresyonu ve bu ekspresyona silostazol ile piasilostazol etkisi yukarıda verilmiştir. Kontrol grubu ADAMTS-18 gen ekspresyonuna göre İ/R dokuda gen ekspresyonunun 1,7 kat arttığı saptanmıştır. Ayrıca ilaç verilen dokularda ADAMTS-18 gen ekspresyonunun arttığı bulunmuştur. Özellikle piasilostazolün ADAMTS-18’in ekspresyonunu silostazolden daha çok arttırdığı sonucuna ulaşılmıştır. Fakat sonuçlar anlamlı bulunmadığı için özellikle ADAMTS-16 üzerinden deneye devam edilmiştir.



Grafik 5. İ/R yapılan SC’da ADAMTS-5 ekspresyonu yukarıda verilmiştir. Kontrol grubu ADAMTS-5 gen ekspresyonuna göre İ/R dokuda gen ekspresyonunun 0,7 kat azaldığı saptanmıştır. Fakat sonuçlar anlamlı bulunmadığı için özellikle ADAMTS-16 üzerinden deneye devam edilmiştir

5. TARTIŞMA

SC hasarı ya da omurilik yaralanmaları ve parapleji, torasik ve torakoabdominal aort cerrahisi sonrası görülebilen medikal bir komplikasyondur. SCY'e bağlı gelişen pleji tablosunda hastalar, pek çok vücut fonksiyonlarını kaybedebilirler. Bu kayıplar beraberinde getirdiği fiziksel, psikososyal, ekonomik sorunlar ile bireysel olduğu kadar toplumsal bir boyut da taşımaktadır(1). MSY sonrası çeşitli fonksiyon kayıplarının yanı sıra, anestezi-hipoestezi bölgeler ve diğer organik yapılardan kaynaklanan kronik ağrı da gelişebilmektedir. Kronik ağrı MSY'nin majör komplikasyonlarından biridir(2,3). Bu komplikasyonları önlemek için değişik spinal kord koruma yöntemleri kullanılmıştır fakat cerrahi tekniklerde ve spinal cord koruma yöntemlerindeki ilerlemelere rağmen cerrahi girişim sırasında SC yaralanmaları tamamen önlenememiştir.

Kardiyo vasküler sistem hastalıklarının cerrahi girişimleri esnasında aortun klempenmesi ve işlem bittikten sonra klempin alınması ile tekrar aortta kan akımı sağlanır. Bunun dokularda ilk önce iskemi sonrasında reperfüzyona sebebiyet verdiğiinden daha önce bahsedilmişti(4). Reperfüzyon döneminde gözlenen hasarda, hücre içine moleküler oksijen girişi ile hızla oluşan serbest oksijen radikal (ROS) türevleri başta olmak üzere birçok mekanizmanın rol oynadığı bilinmektedir.

Spinal kord enfarktüsü, serabral enfarktüse göre daha nadir görülür ve tüm felçlerin %1'inden sorumludur. Araştırmalar genellikle aortik cerrahi müdahale sonucu oluşan spinal kord iskemisi üzerine yoğunlaşmıştır. Bu sebeplerden dolayı spontan veya cerrahi olmayan spinal kord enfarktüsünün patogenezi ve ilerlemesi hakkında bilinmeyen çok şey vardır. Spinal kord iskemisindeki bir problem hasar bölgesindeki mikroperfüzyonun santral gri cevherden başlayarak ilerleyici bir şekilde azalmasıdır. Hipoperfüzyon beyaz cevhere yayıldığında iskemiden dolayı aksiyon potansiyeli durur ve spinal şok başlar. Dolayısıyla bu proseslerdeki moleküler oyuncuların ve genetik mekanizmalarının keşfedilmesi büyük öneme sahiptir. Biz de spinal kord iskemi modelinde ilk kez bir aday genin rolünü araştırmaya karar verdik. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda ADAMTS'lerin bir takım üyelerinin çeşitli hastalıklarda ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Demircan ve arkadaşlarının yaptığı son çalışmalarda ADAMTS'lerin spinal kord hasarlarında önemli oyuncular olabileceği ilk kez gösterildi.

Buradan yola çıkarak ADAMTS genleri ve spinal kord iskemisi arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmak amacıyla bu çalışma planlandı. Ayrıca kardiyovasküler sistem hastalıklarının cerrahi girişimleri esnasında aortun klemlenmesinden önce silostazol ve piasilostazol adındaki etken maddeleri içeren ilaçların verilmesi dikkatimizi çekti. Bunu baz alarak kullanılan etken maddelerin ADAMTS'ler üzerinden mekanizmayı nasıl etkilediği hiç araştırılmamış olması araştırmamızı değerli kılmaktadır.

Bu tezde bilinen 19 adet ADAMTS genlerinin öncelikle PCR sonuçlarına bakarak ve daha önce yapılan bazı çalışmaları da baz alarak bu genlerden ADAMTS-1, -5, -9, -15, -16 ve -18'in üzerinde yoğunlaşıldı. Tablo 1'de de görüldüğü gibi bu genlerin ürünü olan proteinlerin proteaz aktivitesi ile agreganı parçalayabilme kabiliyetleri bu genler üzerinde yoğunlaşmamıza diğer bir sebebidir. Bunların dışında agregan molekülünü parçalayabilecek diğer bazı ADAMTS enzimleri olsa da, ADAMTS türlerinden agreganaz aktivitesi en çok araştırılan ve hakkında en iyi veriler elde edilen ADAMTS genleri 1, 5 ve 9 tipleridir. Yapılan bu çalışmada yukarıda belirtilen genlerin dışında ADAMTS-16'nın SCI ile bağlantısı olduğunu saptanmıştır.

ADAMTS-16 ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda, avuç içinde deri altındaki palmar faysa dokusunun fibrotik bir hastalığı olan ve kollajen birikimi ile karakterize Dupuytren hastalığında fazla eksprese olduğu saptanmıştır(87). Özefagial skuamöz hücreli karsinomada potansiyel bir gen olan ADAMTS-16 ile yapılan bir çalışmada yirmi hastanın sekizinde (%40) ADAMTS-16 gen ekspresyonu yüksek bulunmuştur(88). ADAMTS-16'nın kan basıncı düzenlenmesinde anahtar rol oynayan yeni bir gen olduğunu da kayıtlarda mevcuttur(89). Bu ve buna benzer çalışmalarda daha önce SCI hiç araştırılmamış. Bu çalışmada SC ile ADAMTS-16 arasında bir olduğu grafik 1'de gösterilmiştir. Ayrıca elde edilen western blot görüntüleri şekil 10'da bunu bize göstermektedir.

Bunun yanında grafik 1'de SC-İ/R grubunda, SHAM grubuna oranla ADAMTS-16'nın 1,8 kat fazla arttığı gösterilmiştir. Bunun sebebi İ/R dan dolayı ECM'te bir kaos yaşanmasıdır. ECM'teki bu deformasyon sonucunda sinyal iletim mekanizmasında aksaklıklar meydana gelmekte ve hem hücre hem doku görevini yerine getirememektedir. Özellikle ROS'ların saldırısına uğrayan SC ECM'ini tekrardan işlev göreceğe hale getirebilmek için burada yer alan proteoglikanları parçalamak ve sinyal iletim yollarını açmak amacı ile ADAMTS-16 eksprese olur. Normal doku ile İ/R'lu doku arasındaki ADAMTS-16'nın ekspresyon farkı buna dayanmaktadır. ADAMTS-16 hasarlı olan bölgede fazla eksprese olur çünkü

agrek an proteoglikanını enzimatik kesme özelliğine sahiptir. Bu kesme işlemini yaparak sinyal yolağını açar ve iyileşmeye vesile olur.

Bunlara ek olarak iki etken maddenin çalışıldığı D ve P gruplarında ADAMTS-16'nın ekspresyonun azaldığı bulunmuştur. Bunu sebebinin ise bu etken maddelerinin İ/R'den önce verilip kanın pıhtılaşmasını engelleyerek İ/R'nin vereceği hasarı engellemesidir. Hasar engellenince ADAMTS-16'nın salgılanmasına gerek kalmamıştır. Bu yüzden ADAMTS-16'nın ekspresyonu bu gruplarda baskılanmıştır. Fakat bu etken maddelerin hangi yolları kullanarak İ/R hasarını önledikleri araştırılmaya açık bir konudur.

Böylece yapılan çalışmada ADAMTS-16'nın SC ile bağlantısı saptanmış, İ/R'dan dolayı oluşan hasarı agreganaz olduğu için tamir etme amacı ile eksprese olduğu bulunmuştur. Son olarak da silostazol ve pioglitazon damarlar klemplenmeden önce verilince İ/R'yi en aza indirgeyen işlevsel birer etken madde olduğu bilgisine kavuşulmuştur. İki ilaç arasında bir karşılaştırılma yapılacak olursa, pioglitazonun silostazolden biraz daha etkili olduğu söylene de arada anlamlı bir fark saptanmamıştır.

6. KAYNAKLAR

1. Dursun E, Cakıcı A: Medulla Spinalis Yaralanmaları. Editor Oğuz H. Tıbbi Rehabilitasyon. İstanbul: Nobel Tıp 1. Baskı, 1995:407-427
2. Anke WAG, Stenehjem AE et al: Pain and life quality within 2 years of spinal cord injury. Paraplegia, 1995; 33: 555-559
3. Cairns M, Adkins H: Pain and depression in acute traumatic spinal cord injury. Origins of chronic Problematic pain? Arch Phys Med Rehabil, April 1996, Vol 77:329-335
4. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. Surg Clin North Am 1992; 72: 65-83.
5. Wilhelm J. Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. Acta Univ Carol Med Monogr 1990; 137:1-53.
6. Buket Reel, PhD, Mehmet Guzeloglu, MD, Alper Bagriyanik, Soner Atmaca, MD, Koray Aykut, MD, Gokhan Albayrak, MD, and Eyup Hazan. The effects of PPAR-gagonist pioglitazone on renal ischemia/reperfusion injury in rats. journal of surgical research 182(2013) 176e184.
7. Türk Kardiyoloji Derneği Ulusal Kalp Sağlığı Politikası Ana İlkeleri. Sayfa:299
8. http://www.ieg.gov.tr/Folders/KubKT/Ruhsatl%C4%B1%20%C3%9Cr%C3%BCnler%20%C5%9Eube%20M%C3%BCd%C3%BCrl%C3%BC%C4%9F%C3%BC/T%C4%B0TCK%20Onayl%C4%B1%20KT%20PLETAL%2050%20MG%20TB_a26b461.pdf
9. Sahin MA, Onan B, Guler A, Oztas E, Uysal B, Arslan S, Demirkilic U, Tatar H: Cilostazol, a type III phosphodiesterase inhibitor, reduces ischemia/reperfusion-induced spinal cord injury. Heart Surg Forum. 2011 Jun;14(3):E171-7
10. Kadir Demircan, Sümeyya Akyol, Ferah Armutcu: A Multi-Functional Gene Family From Arthritis to Cancer: A Disintegrin-Like Metalloproteinase with Thrombospondin Type-1 Motif (ADAMTS). Journal of Clinical and Analytical Medicine, Published Online: 28.07.2012
11. Apte S. “A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motifs: the ADAMTS family”, The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 36, 981, (2004).

12. Jones G.C. Riley G.P., "ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis", *Arthritis Research & Therapy*, 7, 4, 160, (2005).
13. Evrim Coşkun Çelik. Medulla spinalis yaralanmalı hastalardaki nöropatik ağrıya akupunktur benzeri Tens'in etkisi. Uzmanlık Tezi İstanbul 2005.
14. Güzel R, Uysal FG: Spinal Kord Yaralanmaları. Editor Oğuz H, Dursun E,Dursun N Tıbbi Rehabilitasyon. İstanbul Nobel Tıp 2. Baskı, 2004;627-647
15. Denise I, Campagnolo and Geno J: Autonomic and cardiovascular complications of spinal cord injury. Editors Kirschblum S, Campagnolo D L, Delisa J A, *Spinal Cord Medicine*.2002;123;134
16. Ağzıkara M: Medulla Spinalis Yaralanmalı Hastalarda Ağrı. Ankara Tez, 1998
17. Mustafa Birincioğlu: İskemi-reperfüzyon tekniklerine genel giriş Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı
18. Lin E, Lowry SF, Calvano SE. The systemic response to injury. Schwartz SI (ed), *Principles of Surgery*. Mc Graw-Hill 7th Edition 1999; Vol I: 13-32.
19. Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury ROS within and without. *Circ Res*. 2000;86: 117-118.
20. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res*. 2000; 39:1529-1542.
21. Dr. Serdar Basım: Alt Ekstremitede İskemi-Reperfüzyon Oluşturulan Ratlarda Ginkgo Biloba Egb 761' İn Barsak Anastomoz İyileşmesi Üzerine Etkisi. İstanbul-2005
22. Lefer AM, Lefer DJ. Pharmacology of the endothelium in ischemia-reperfusion and circulatory shock. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1993;33:71-90.
23. Acworth IN, Bailey B. Reactive Oxygen Species. In: *The handbook of oxidative metabolism*. Massachusetts: ESA Inc., 1997, p. 1-1 to4-4
24. Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 2002; 33(2): 110-8.
25. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *British J of Surgery* 1994; 81: 637-647.
26. Ertan T, Soran A, Kılıc M, Aşlar AK, Koc M, Cengiz O. Kan Malondialdehid ve total antioksidan seviyesinin(TAS) onemi.Cerrahi Tıp Bulteni 2001,2;4: 154-167.

27. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res.* 2000; 39:1529-1542.
28. Huang HY, Helzlsouer KJ, Appel LJ. The effects of vitamin C and vitamin E on oxidative DNA damage: Results from a randomized controlled trial. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2000; 9: 647-652.
29. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000, 21;3:361-370
30. Unno N, Fink MP. Nutritional, physiologic, and pathophysiologic considerations of the gastrointestinal tract. Intestinal epithelial hyperpermeability. Mechanisms and relevance to disease. *Gastroenterology Clinics* 1998,27;2: 289-307.
31. Halliwell B and Gutteridge J. The antioxidants of Human Extracellular Fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 1990; 280(1):1-8.
32. Memişoğulları R. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. *Düzce tıp Fakültesi Dergisi.* 2005; 3:30-39.
33. Fang Y-Z, Yang S and Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition.* 2002; 18: 872-879.
34. Cheeseman KH and Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* Jul. 1993; 49(3): 481-493.
35. Fritsma GA, George A and Fritsma MS. Vitamin E and Autoxidation. *American Journal of Medical Technology.* 1983; 49: 453-456.
36. Eicholzer M, Stahelin HB, Gey KF, Ludin E and Bernasconi F. Prediction of Male Cancer Mortality by Plasma Levels of Interacting Vitamins. *Int J Cancer.* 1996; 66:145-150.
37. Barry Halliwell. Vitamin C & genomic stability. *Mutat Res.* 2001; 475: 29-35.
38. Arrigoni O, De Tullio MC. Ascorbic Acid: Much more than just an oxidant. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1569: 1-9.
39. Rose RC and Bode AM. Biology of free-radical-scavengers- an evaluation of ascorbate. *FASEB J.* 1993; 7: 1135-1142.
40. Halliwell B and Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* Oxford: Oxford University Press, 1999.
41. Halliwell B. Vitamin C poison, prophylactic or panacea? *Trends Biochem Sci.* 1999; 24: 255-259.

42. Carr A and Frei B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *Faseb J.* 1999; 13: 1007-1024.
43. Lee SH, Oe T and Blair IA. Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins. *Science.* 2001; 292: 2083-2086.
44. Suh J, Zhu BZ and Frei B. Ascorbate does not act as a pro-oxidant toward lipids and proteins in human plasma exposed to redox-active transition metal ions and hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med.* 2003; 34: 1306-1314
45. Notrhop-Clewes CA and Thurnham DI. Monitoring micronutrients in cigarette smokers. *Clinica Chimica Acta.* 2007; 377:14-38.
46. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids. A report of the panel on dietary antioxidants and related compounds, subcommittees on upper reference levels of nutrients and interpretation and uses of dietary reference intakes. Washington D. C.: National Academy Press; 2000.
47. Chow CK. Vitamin C and cigarette smoke exposure. In: Packer L, Fuchs J, editors. *Vitamin C in health and disease.* New York: Marcel Dekker Inc; 1997; 413-424.
48. Young A.J and Lowe G.M. Antioxidant properties of carotenoids. *Arch Biochem Biophys.* 2001; 385: 20-27.
49. Dahle LK, Hill EG and Hollmann RT. The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Arch Biochem Biophys.* 1962; 98: 253-261.
50. Gutteridge J. Lipid peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. *Clin Chem.* 1995; 41(12):18-19.
51. Miho Sekiguchi, MD, PhD, Yoshihito Aoki, MD, PhD, Shin-ichi Konno, MD, PhD, and Shin-ichi Kikuchi, MD, PhD. The Effects of Cilostazol on Nerve Conduction Velocity and Blood Flow Acute and Chronic Cauda Equina Compression in a Canine Model. *SPINE* Volume 33, Number 24, pp 2605-2611 ©2008, Lippincott Williams & Wilkins.
52. Prof. Dr. S. Oğuz KAYAALP. Akılcı Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 1. cilt, 13. baskı, ISBN: 978-605-5270-10-0. Sayfa: 415.
53. http://www.bilimilac.com.tr/tr/dosyalar/urun-portfoyu/urunler/1_6973245_glifix-30-mg-tablet.pdf. GLX30-110523P15. 12009171-01

54. Stanton H, Melrose J, Little CB, Fosang AJ. Proteoglycan degradation by the ADAMTS family of proteinases. *BBA-Mol Basis Dis.* 2011;1812(12):1616-29.
55. Tang B.L. "ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases", *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 33, 33. (2001).
56. Kuno K, Kanada N, Nakashima E, Fujiki F, Ichimura F, Matsushima K. Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. *J Biol Chem.* 1997;272(1):556-62.
57. Salter RC, Ashlin TG, Kwan APL, Ramji DP. ADAMTS proteases: key roles in atherosclerosis? *J Mol Med.* 2010;88(12):1203-11.
58. Porter S, Clark IM, Kevorkian L, Edwards DR. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J.* 2005;386:15-27.
59. Nagase H, Kashiwagi M. Aggrecanases and cartilage matrix degradation. *Arthritis Res Ther* 2003;5(2):94-103.
60. Apte SS. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms. *J Biol Chem* 2009;284(46):31493-7.
61. Hatipoglu OF, Hirohata S, Cilek MZ, Ogawa H, Miyoshi H, Obika M, et al. ADAMTS1 is a unique hypoxic early response gene expressed by endothelial cells. *J Biol Chem* 2009;284(24):16325-33.
62. Nakamura K, Hirohata S, Murakami T, Miyoshi T, Demircan K, Oohashi T, et al. Dynamic induction of ADAMTS1 gene in the early phase of acute myocardial infarction. *J Biochem* 2004;136(4):439-46.
63. Vazquez F, Hastings G, Ortega MA, Lane TF, Oikemus S, Lombardo M, et al. METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity. *J Biol Chem* 1999;274(33):23349-57.
64. Wagsater D, Bjork H, Zhu C, Bjorkegren J, Valen G, Hamsten A, et al. ADAMTS-4 and -8 are inflammatory regulated enzymes expressed in macrophage-rich areas of human atherosclerotic.

65. Tortorella MD, Malfait F, Barve RA, Shieh HS, Malfait AM. A review of the ADAMTS family pharmaceutical targets of the future. *Curr Pharm Des* 2009;15(20):2359-74.
66. Clark M.E., Kelner G. S., Turbeville L.A., Boyer A., Arden K.C., Maki R.A., “ADAMTS9, a Novel Member of the ADAM-TS/ Metallospodin Gene Family”, *Genomics*, 67, 343, (2000).
67. Roughley P.J., “Articular cartilage and changes in arthritis noncollagenous proteins and proteoglycans in the extracellular matrix of cartilage”, *Arthritis Res*, 3, 342, (2001).
68. Pratta M.A., Yao W., Decicco C., Tortorella M.D., Liu R.-Q., Copeland R.A., Magolda R., Newton R.C., Trzaskos J.M., Arner E.C., “Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage”, *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 46, 45539, (2003).
69. Tortorella MD, Burn TC, Pratta MA, Abbaszade I, Hollis JM, Liu R, et al. Purification and cloning of aggrecanase-1: A member of the ADAMTS family of proteins. *Science* 1999;284(5420):1664-6.
70. Stanton H, Rogerson FM, East CJ, Golub SB, Lawlor KE, Meeker CT, et al. ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature* 2005;434(7033):648-52.
71. Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma HL, et al. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature* 2005;434(7033):644-8.
72. Velasco J, Li J, DiPietro L, Stepp MA, Sandy JD, Plaas A. Adamts5 deletion blocks murine dermal repair through CD44-mediated aggrecan accumulation and modulation of transforming growth factor $\text{po}\beta 1$ (TGF $\beta 1$) signaling. *J Biol Chem* 2011;286(29):26016-27.
73. Liu CJ. The role of ADAMTS-7 and ADAMTS-12 in the pathogenesis of arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2009;5(1): 38-45.
74. Baenziger NL, Brodie GN, Majerus PW. A thrombin-sensitive protein of human platelet membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971;68(1):240-3.
75. Levy GG, Motto DG, Ginsburg D. ADAMTS13 turns 3. *Blood* 2005; 106(1): 11-7.

76. Hashimoto T., Wen G., Lawton M.T., Boudreau N.J., Bollen A.W., Yang G.Y., Barbaro N.M., Higashida R.T., Dowd C.F., Halbach V.V., Young W.L., “Abnormal expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in brain arteriovenous malformations”, *Stroke*, 34, 925, (2003).
77. Rodríguez-Manzaneque J.C., Westling J., Thai S.N.-M., Luque A., Knauper V., Murphy G., Sandy J.D., Iruela-Arispe M.L., “ADAMTS 1 cleaves aggrecan at multiple sites and is differentially inhibited by metalloproteinase inhibitors”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 293, 501, (2002).
78. Vankemmelbeke M.N., Jones G.C., Fowles C., Ilic M.Z., Handley C.J., Day A.J., Knight C.G., Mort J.S., Buttle D.J., “Selective inhibition of ADAMTS-1, -4 and -5 by catechin gallate esters”, *Eur. J. Biochem.*, 270, 2394, (2003).
79. Jones GC, Riley GP. ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005;7(4):160-9.
80. Paulissen G, Rocks N, Gueders MM, Bedoret D, Crahay C, Quesada-Calvo F, et al. Role of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in airway diseases. *Respir Res* 2009;10:127.
81. Di Valentin E, Crahay C, Garbacki N, Hennuy B, Gueders M, Noel A, et al. New asthma biomarkers: lessons from murine models of acute and chronic asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;296(2): L185-97.
82. McCulloch DR, Nelson CM, Dixon LJ, Silver DL, Wylie JD, Lindner V, et al. ADAMTS metalloproteases generate active versican fragments that regulate in terdigital web regression. *Dev Cell* 2009;17(5): 687-98.
83. Dagoneau N, Benoist-Lassel C, Huber C, Faivre L, Megarbane A, Alswaid A, et al. ADAMTS10 mutations in autosomal recessive Weill-Marchesani syndrome. *Am J Hum Genet* 2004;75(5):801-6.
84. Li Z, Zhang W, Shao Y, Zhang C, Wu Q, Yang H, et al. High-resolution melting analysis of ADAMTS18 methylation levels in gastric, colorectal and pancreatic cancers. *Med Oncol* 2009;27(3):998-1004.
85. Li Z, Nardi MA, Li YS, Zhang W, Pan R, Dang S, et al. C-terminal ADAMTS-18 fragment induces oxidative platelet fragmentation, dissolves platelet aggregates,

- and protects against carotid artery occlusion and cerebral stroke. *Blood* 2009;113(24):6051-60.
86. Stanton H, Melrose J, Little CB, Fosang AJ. Proteoglycan degradation by the ADAMTS family of proteinases. *Biochim Biophys Acta* 2011;1812(12):1616-29.
87. Johnston P, Larson D, Clark I, Chojnowski A. Metalloproteinase gene expression correlates with clinical outcome in Dupuytren's disease. *J Hand Surg Am* 2008;33(7):1160-7.
88. Sakamoto N, Oue N, Noguchi T, Sentani K, Anami K, Sanada Y, et al. Serial analysis of gene expression of esophageal squamous cell carcinoma: ADAMTS16 is upregulated in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2009;101(4):1038-44.
89. Joe B, Saad Y, Dhindaw S, Lee NH, Frank BC, Achinike OH, et al. Positional identification of variants of Adamts16 linked to inherited hypertension. *Hum Mol Genet.* 2009;18(15):2825-38.