TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÖLÜM ZAMANI TAYİNİNDE ADAMTS'İN ROLÜ

Merve PARLAKGÖRÜR

DİSİPLİNLER ARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman
Prof. Dr. Aslıhan AVCI

2015- ANKARA

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÖLÜM ZAMANI TAYİNİNDE ADAMTS'İN ROLÜ

Merve PARLAKGÖRÜR

DİSİPLİNLER ARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman
Prof. Dr. Aslıhan AVCI
Doç. Dr. Yeşim ER ÖZTAŞ

2015- ANKARA

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum "ÖLÜM ZAMANI TAYİNİNDE ADAMTS'İN ROLÜ" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/ hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/ araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümle ve yorumlar bana aittir.
Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Merve PARLAKGÖRÜR
30.12.2015

KABUL ve ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Disiplinlerarası Adli Bilimler Anabilim Dalı
Adli Biyoloji Tezli Yüksek Lisans Programında

Merve PARLAKGÖRÜR tarafından hazırlanan

"Ölüm Zamanı Tayininde ADAM-TS'in Rolü" adlı tez çalışması

aşağıdaki jüri tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak

OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

15.01.2016

Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU
Ankara Ü. Tıp Fakültesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Aslıhan AVCI
Ankara Ü. Tıp Fakültesi
Üye

Doç. Dr. Mukaddes GÜRLER
Hacettepe Ü. Tıp Fakültesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof.Dr.K.Zafer KARAER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, post mortem zaman tayininde ADAMTSler ile ölüm zamanı arasında ilişki olup olmadığını belirleyip, kriminal olaylara katkı sağlanması amaçlanmıştır. Postmortem insan iskelet kas dokusunda ADAMTS düzeyi Western Blot Analizi ile belirlenmiştir. Ölüm zaman aralığının artması ile proteaz düzeylerinin de arttığı tespit edilmiştir. Bu çalışma, postmortem insan kas dokusu ADAMTS düzeyi ile ölüm zaman aralığı arasındaki ilişkiyi araştıran ilk çalışma olma özelliğindedir. Bu nedenle çalışmamızın, literatüre katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Bu çalışma süresince tüm bilgi ve deneyimlerini paylaşmaktan kaçınmayan, her türlü konuda desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve tezimde büyük emeği olan, aynı zamanda kişilik olarak da büyük artı katan Ankara Üniversitesi öğretim üyelerinden danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Aslıhan AVCI´ya sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

İlkokul dönemimden itibaren merak duyduğum, üniversite tercihimi ve sonrasındaki kariyerimi gerçekleştirmek istediğim alan olan Adli Bilimler ile tanıştıran çok değerli hocam, Sayın Prof. Dr. Hamit HANCI'ya ideallerim doğrultusunda ilerlememde her zaman destek olduğu için sonsuz teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Deneylerin yapılması ve yürütülmesinde, deney düzeneğinin hazırlanmasında desteklerini esirgemeyen değerli Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU, Arş. Gör. Yunus YÜKSELTEN ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı ailesine çok teşekkür ederim.

Çalışma süresince her daim destekleyen ve sonsuz güvenen çok sevdiğim biricik anneme ve tüm aileme, canım arkadaşlarım Kübra Özdemir ve Belce Erdoğan'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN		ii
KABUL ve ONAY		iii
ÖNSÖZ		iv
İÇİNDEKİLER		v
SİMGELER ve KISALTMALAR		vii
ŞEKİLLER		viii
1.	GİRİŞ	1
1.1.	Hücre Dışı Matriks	2
1.1.1.	Hücre Dışı Matriks Yapım ve Yıkımında Rol Oynayan Protein Bileşenleri	3
1.2.	Matriks Metalloproteinazlar (MMP)	5
1.2.1.	Sınıflandırılması ve Biyokimyasal Özellikleri	7
1.2.2.	MMP Ailesinin Üyeleri	10
1.3.	Proteaz Ailesinin Üyeleri	15
1.4.	İskelet Kası	16
1.4.1.	Matriks Metalloproteinazlar ve İskelet Kası	17
1.4.2.	MMP ve Kalp Damar Hastalıkları	18
1.5.	ADAMTS	19
1.5.1.	ADAMTS Proteaz Ailesi	23
2.	GEREÇ ve YÖNTEM	26
2.1.	Çalışma Etik Kurulu	26
2.2.	Hastaların Seçimi ve Örnek Toplanması	26
2.3.	Deney Prosedürü	27
2.3.1.	Dokudan Protein İzolasyonu	27
2.3.2.	Protein Miktar Tayini	29
2.3.3.	Bradford Yöntemi	29
2.3.4.	Proteinlerin Denatürasyonu	31
2.3.5.	SDS-PAGE (Poliakrilamid Jel Elektroforezi) ve Proteinlerin Yürütülmesi	31
2.4.	Deney Düzeneği	32

2.5. İstatiksel Analizler 33
3. BULGULAR 34
3.1. MMP-1 Edilen Bulgular 34
3.1.1. MMP-1 Western Blot Analiz Sonuçları 36
3.2. MMP-2 Elde Edilen Bulgular 38
3.2.1. MMP-2 Western Blot Analizi Sonuçları 40
3.3. MMP-9 Elde Edilen Bulgular 41
3.3.1. MMP-9 Western Blot Analizi Sonuçları 43
3.4. ADAMTS-1 Elde Edilen Bulgular 44
3.4.1. ADAMTS-1 Western Blot Analizi Sonuçları 46
3.5. ADAMTS-5 Elde Edilen Bulgular 48
3.5.1. ADAMTS-5 Western Blot Analizi Sonuçları 50
3.6. ADAMTS-9 Elde Edilen Bulgular 51
3.6.1. ADAMTS-9 Western Analiz Sonuçları 54
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 62
ÖZET 65
SUMMARY 66
KAYNAKLAR 67
EKLER 77
Ek 1. Etik Kurul Onayı 77
Ek 2. Etik Kurul Onayı 78
ÖZGEÇMİŞ 79

SİMGELER ve KISALTMALAR

ADAMTS	- Trombospondin Motifli Disintegrin Metalloproteinaz
ADAM	- Disintegrin Metalloproteinaz
MMP	- Matriks Metalloproteinaz
ECM	- Hücre Dışı Matriks
TIMP	- Metallopeptidaz İnhibitörü
TNF	- Tümör Nekroz Faktörü
MT-MMP	- Membran Tipi Matriks Metalloproteinaz
LV	- Sol Ventrikül
kDa	- Kilo dalton
UV	- Ultraviyole
BSA	- Bovine Serum Albumin
SDS	- Sodyum Dodesil Sülfat
PAGE	- Poliakrilamid Jel Elektroforezi
APS	- Amonyum Persülfat
TEMED	- Tetrametilendiamin

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Hücre Dışı Matriksin Temel Görevleri 2

Şekil 1.2. Hücre Dışı Matriks Bileşenleri 3

Şekil 1.3. Hücre Dışı Matriksin Histolojik Yapısı 4

Şekil 1.4. Matriks Yeniden Düzenlenmesi 10

Şekil 1.5. MMP Evrimi, Gen Düzenlenmesi Ve Fonksiyonel Analizi 13

Şekil 1.6. Vasküler Sistemin Yeniden Düzenlenmesinde MMP 13

Şekil 1.7. Metalloproteazların Rolü 15

Şekil 1.8. MMP Yapısı ve Düzenleyici Elemanları 18

Şekil 1.9. Hücre Yüzey Proteazları 20

Şekil 1.10. Proteazların Rolü 20

Şekil 1.11. Adamts ve MMP Yapı Farklılıkları 21

Şekil 1.12. Metzinkin Familyasının Düzenlenmesi 22

Şekil 2.1. a,b,c**.** Dokudan Protein İzolasyonu 28
Zaman saatlerine göre ayırdığımız vakaları, a,b ve c şeklinde gruplara ayrılmıştır. 28

Şekil 2.2. BSA Konsantrasyonu (µg/ml) 30

Şekil 2.3. Optik Dansite - Protein Konsantrasyonu 30

Şekil 2.4. SDS-PAGE düzeneği 32

Şekil 3.1. MMP-1 Ölüm Saatlerine Göre Kat Oranları 35

Şekil 3.2. MMP-1 Ölüm Zamanına Göre Protein Ekspresyonu 36

Şekil 3.3. MMP-1 İfadesinin Ölüm Şekillerine Göre Protein Ekspresyonu 36

Şekil 3.4. MMP-1 Western Blot Görüntüsü 37

Şekil 3.5. MMP-2 Ölüm Saatlerine Göre Kat Oranları 39

Şekil 3.6. MMP-2 Ölüm Zamanına Göre Protein Ekspresyonu 39

Şekil 3.7. MMP-2 İfadesinin Ölüm Şekillerine Göre Protein Ekspresyonu 39

Şekil 3.8. MMP-2 Western Blot Görüntüsü 40

Şekil 3.9 MMP-9 Ölüm Saatlerine Göre Kat Oranları 42

Şekil 3.10. MMP-9 Ölüm Zamanına Göre Protein Ekspresyonu 42

Şekil. 3.11. MMP-9 İfadesinin Ölüm Şekillerine Göre Protein Ekspresyonu 43
Şekil 3.12. MMP-9 Western Blot Görüntüsü 44
Şekil 3.13. ADAMTS-1 Ölüm Saatlerine Göre Kat Oranları 45
Şekil 3.14. ADAMTS-1 Ölüm Zamanına Göre Protein Ekspresyonu 46
Şekil 3.15. ADAMTS-1İfadesinin Ölüm Şekillerine Göre Protein Ekspresyonu 46
Şekil 3.16. ADAMTS-1Western Blot Görüntüsü 47
Şekil 3.17. ADAMTS-5 Ölüm Saatlerine Göre Kat Oranları 49
Şekil 3.18. ADAMTS-5 Ölüm Zamanına Göre Protein Ekspresyonu 49
Şekil 3.19. ADAMTS-5 İfadesinin Ölüm Şekillerine Göre Protein Ekspresyonu 50
Şekil 3.20. ADAMTS-5Western Blot Görüntüsü 51
Şekil 3.21. ADAMTS-9 Ölüm Saatlerine Göre Kat Oranları 53
Şekil 3.22. ADAMTS-9 Ölüm Zamanına Göre Protein Ekspresyonu 53
Şekil 3.23. ADAMTS-9 İfadesinin Ölüm Şekillerine Göre Protein Ekspresyonu 54
Şekil 3.24. ADAMTS-9 Western Blot Görüntüsü 55

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. İnsan Matriks Metalloproteazları ve Ortak İsimleri 7

Çizelge 1.2. MMP Sınıflandırması 8

Çizelge 1.3. Matriks Metalloproteazların Yapısı 9

Çizelge 1.4. Matriks Metalloproteaz Fizyolojisi 11

Çizelge 1.5. ADAMTS metalloproteinazların biyolojik rolü 23

Çizelge 3.1. Kullanılan Tüm Proteaz Belirteçleri, Kat Oranı ve Protein Ekspresyon Miktarı 56

1. GİRİŞ

Adli vakalarda bulunan cesetlerin ölüm zamanının tayin edilmesi, olay mekanizmasının çözümlenmesinde büyük katkı sağlamaktadır. Günümüzde kullanılan adli ve moleküler yöntemler net ölüm saati vermekten ziyade muhtemel ölüm zaman aralığı bilgisini sunmaktadır. Postmortem zaman aralığının daraltılması ve gerçek ölüm saatine yakın ölüm saatine yakın sonuçların elde edilebilmesi için; çalışmamızda ölüm saatleri bilinen postmortem olguların Adli Tıp Kurumu tarafından gerçekleştirilen iskelet kası dokusunda, belirlenen saatlere göre moleküler bilimsel metotlar kullanılarak ölüm saati tayini ADAMTSler kullanılarak araştırılmıştır.

İnsan genomu günümüzdeki bilgilere göre yirmi bin civarında genden oluşmaktadır. ADAMTS gen ailesi hücre dışı matrikste mevcut bulunan matrizom adı verilen 300den fazla gen içerisinde yer almaktadır.

1800lü yıllarda yılan zehiri çalışmaları ile temeli atılan bu gen ailesi, 1962 yılında matriks metalloproteinazların tanımlanmasıyla ivme kazanmıştır. 1995 yılında ise, ailenin 3. Üyesi ADAM gen ailesi bulundu. Bu aileye 1997 yılında anjiyogenez ile ilişkili olarak bulunan trombospondin eklenmesiyle ADAMTS genleri keşfedildi. (Wolfsberg ve ark., 1995; Kuno ve ark., 1997)

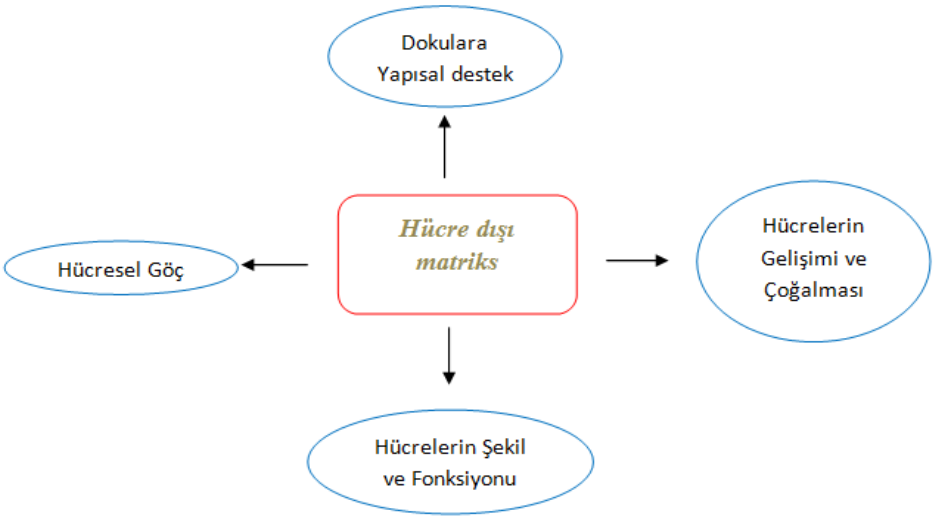
ADAMTS proteinleri özelleşmiş çok farklı kısımlardan oluştuğu için, bu özel yapı ADAMTS proteinlerine çok fonksiyonlu bir yapı kazandırmaktadır. Adamts proteinlerini, Adam ve MMPlerden en ayırıcı özelliği trombospondin motiflere sahip olmasıdır. (Stanton ve ark., 2011)

Ölüm zamanı tayini için ADAMTS enzimini seçmemizin nedeni dokularda metalloproteinaz ailesinden olmakla birlikte aynı zamanda da hücre farklılaşması, göç, invazyon, anjiyogenez (kan damarlarının oluşumu) ve apoptoz gibi pek çok sayıda biyolojik aktiviteyi içeren çok fonksiyonlu proteinlerdir. (Tang., 2001) Ölümle birlikte dokularda yıkım gerçekleşmektedir. Literatür taramaları neticesinde, ölümle birlikte ekstrasellüler matrikste de yıkım olmaktadır. ADAMTSler de ECMde aktif biyolojik role sahip olan metalloproteinaz üyeleri olduklarından dolayı ölüm

zamanı tayininde ışık tutacağını hedeflemekteyiz. Post mortem zaman tayininde ADAMTSler ile zaman arasında korelasyon olup olmadığını keşfedip, kriminal olaylarda katkı sağlamayı amaçlamaktadır. Literatürde postmortem ADAMTS çalışması olmadığı için yenilik katmayı amaçlamaktayız. Çalışmamızın özgünlüğü açısından katkı sağlamaktadır.

1.1. Hücre Dışı Matriks

Tüm dokularda mevcut bulunan hücre yapıları, hücre dışı matriks (ECM) ile çevrilidir ve böylelikle yapısal desteğini sağlamakla birlikte, hücrenin davranış ve aktivitelerini de düzenlemek gibi önemli bir rol üstlenmektedirler. Ekstrasellüler matriks(ECM) hücresel şekli vermekle birlikte aynı zamanda farklılaşma, hayatta kalma, hareket, çoğalma ve hücre ölümü de dahil olmak üzere pek çok fizyolojik süreçten de sorumludurlar. Bu hücresel aktivite ve davranışlar özelleşmiş ECM proteinleri ve glikoproteinleri tarafından düzenlenmektedirler. Örneğin, oldukça yüklü glikozaminoglikanları ile birlikte proteoglikanlar, kollajen, elastin, laminin ve fibronektin gibi moleküllere ağ yapısının oluşmasında katkı sağlamaktadır. Morfogenez, ovulasyon, doğum ve yaranın iyileşmesi için gerekli işlemlerin gerçekleşmesi gibi pek çok fizyolojik süreç ECMnin yıkımının düzenlenmesiyle elde edilir, ki aksi durumlarda matriks yıkımı patolojiye kadar gidebilen ciddi bir duruma sebep olabilmektedir.

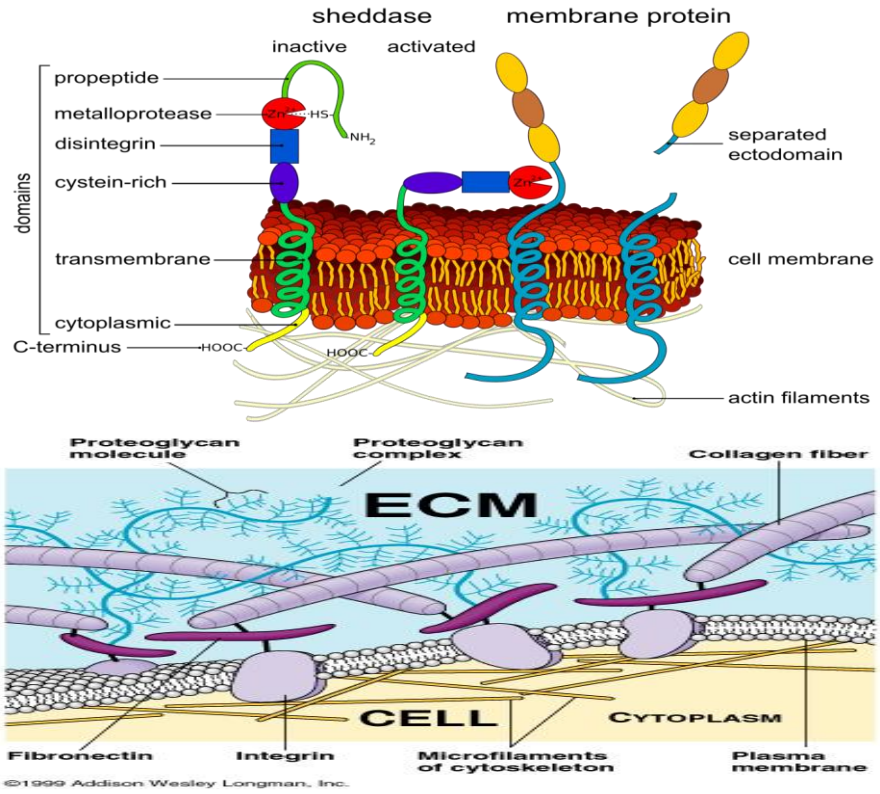


Şekil 1.1. Hücre Dışı Matriksin Temel Görevleri

Dokular hem proteinlerin ifade edilmesinde hem de salgılanan proteinlerin düzenlenmesinde etkin role sahip dinamik yapılardır. Bu salgılanan proteinlerden ve hücre yüzeyinde mevcut bulunan protein ve metalloproteinazlardan bazıları hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşiminde kritik bölgelerde yer almaktadır. Bunun yanında kanser, enflamasyon ve kas-iskelet sistemi hastalıkları gibi çeşitli klinik durumların patogenezinde de önemlidir. Bu nedenle Adamtslerin moleküler organizasyonu ve fonksiyonunun anlaşılması önem kazanmaktadır.

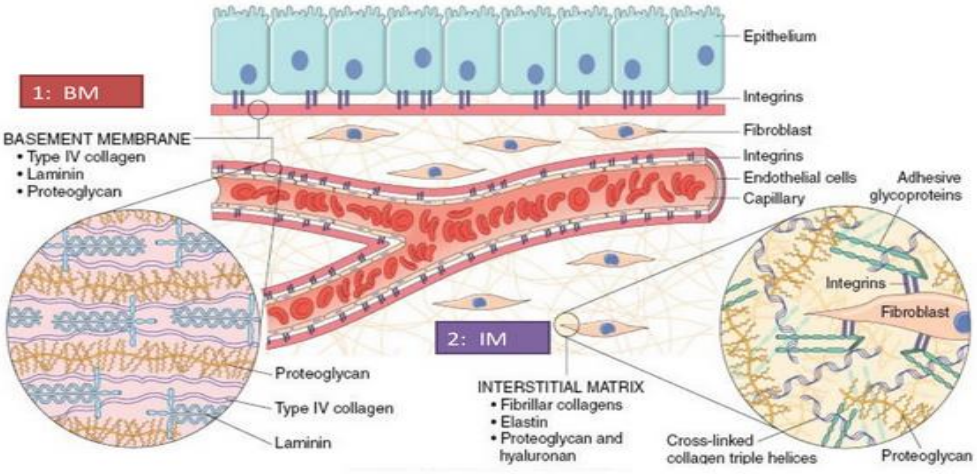
1.1.1. Hücre Dışı Matriks Yapım Ve Yıkımında Rol Oynayan Protein Bileşenleri

Biyokimyasal ve yapısal çeşitliliğinin bir parçasını oluşturan hücre dışı matriks, proteinler, proteoglikanlar ve glikoproteinlere ayrılır. Hepsi kendi içinde farklı fiziksel ve biyokimyasal kategorilerde görevlere sahiptirler.



Şekil 1.2. Hücre Dışı Matriks Bileşenleri

Proteoglikanlar, tüm ökaryotlarda ekstrasellüler matriksin (ECM) anahtar bileşenidir, fizyolojik ve patolojik süreçte hücresel davranışını etkilediği gibi yapısal desteği de sağlamaktadırlar. ADAMTS enzim ailesinin üyeleri proteoglikanları parçalarına ayrıştırırlar, dolayısıyla hücresel fonksiyonları düzenleme ve doku yapısını değiştirmede potansiyel role sahiptirler. Tüm dokulardaki hücreler; hücre şekli, yapısal destek, değişikliği, hareketi, çoğalma ve hücre ölümü gibi görevlerde etkin ECM ile çevrilidir. Bu tür hücresel aktiviteler özelleşmiş ECM proteinleri ve glikoproteinler tarafından düzenlenmektedir (Stanton ve ark., 2011).



Şekil 1.3. Hücre Dışı Matriksin Histolojik Yapısı

Hücre dışı matriks (ECM) hücreler arası ortam için baş oluşanıdır ve çeşitli fonksiyonlar sunmaktadır; oldukça dinamik bir yapıya sahip olmakla birlikte, parçalandığında veya yıkıma uğramaya maruz kaldığında tekrar bütünlüğünü sağlayabilmek için birtakım gerçekleştirmesi gereken işlemler yer almaktadır. Örneğin; hücre farklılaşması düzenlenebilir, kök hücre yapım ve onarımı gibi, anjiyogenez, kemiğin tekrar onarımı ve yaranın tekrar iyileşmesi gibi işlemler. Aksine; normal olmayan hücre dışı membran, hücrenin çoğalması ve saldırıya maruz kaldığı gibi hayati durumları düzenleyemez ve daha sonrasında hücreler arasındaki lifli bağdokunun artması ve kanser gibi patolojik süreçlere maruz bırakır (Lu ve ark., 2011).

Ekstrasellüler matriks (ECM), sadece fiziksel desteği sağlamanın yanı sıra doku morfogenezi, farklılaşması ve homeotasi gibi hayati biyokimyasal ve biyomekanik olayları da gerçekleştiren kollajen, proteoglikan, elastin, laminin, fibronektin ve diğer glikoproteinler içermektedir (Visse ve ark., 2003). ECM makromolekülleri gelişim ve morfogenez sürecinde hücresel çevreyi yaratabilmek için oldukça önemlidir.

1.2. Matriks Metalloproteinazlar (MMP)

Matriks metalloproteinazlar (MMP), matriksin adıyla da bilinirler, ECM yıkımında yer alan proteinazladır. Normal bir fizyolojik süreçte, MMPlerin aktiviteleri transkripsiyon seviyesinde ölçülür, ECM bileşenleri ile etkileşime girer ve endojen inhibitörü tarafından inhibe edilmektedir (Frantz ve ark., 2010). Artrit, kanser, ateroskleroz, ülser ve fibrozis gibi normal aktivitenin kontrol edilemediği koşullarda ise bu tip hastalıklarla sonuçlanır. Metalloproteinazların doku inhibitörleri (TIMP) matriksine özgü inhibitörlerdir ve dokulardaki MMPleri aktivitelerini kontrol etmekten sorumludur (Nagase ve ark., 1999).

Matriks metalloproteinazlar literatürde hücre oluşumu, hücrenin şeklini değiştirme ve hücre dışı matriks bileşenlerinin hem fizyolojik hem de biyokimyasal seviyede parçalanmasında rol alan düzenleyici moleküller olarak da tanımlanmaktadır. İskelet kasında ise; MMPler, homeostazi, hücre dışı matriksin parçalanmasıyla açığa çıkan kas lifinin bütünlüğünün fonksiyonunun dengesini sağlamakta, iskelet kası hücrelerinin düzenlenmesi, farklılaşması ve yeniden oluşumunda görev almaktadırlar. İskelet kası satellit hücreleri, miyofibrilin bazal membran ile plazmalemma arasındaki kısımda bir grup devinimsiz kök hücrelerdir; ve hayatboyu denge ve onarımdan sorumludurlar.

MMPler hücre dışı matriksin yıkımında görev alır, bu yolla satellit hücrenin göç ve farklılaşmasını sağlar. Bununla birlikte; hem patolojik hem de normal durum altında hücre dışı matriksin kendi oluşumlarını parçalamakla görevli mmpler enzim ailesinin üyelerindendir. Şuana kadar tanımlanmış 26 üyesi mevcut bulunmakta; bunların altısı da membrana özgüdür. Her bir mmp hücre dışı matriksin belirli

elementleri ile özel yollardan etkileşime girerler. MMP kollajenazlar (MMP-1, -8, -13 ve -18) doku içi kollejan 1,2 ve 3ün kesiminden sorumlu iken; MMP jelatinazlar (MMP-2 ve -9) pek çok dokudaki denatüre kollajen tipleri olan 4,6 ve 10u parçalara ayırırlar. MMPler zimojen olarak salınırlar ve birkaç proteinaz tarafından hücre dışında aktive edilebilirler.

Bir diğer taraftan da, metalloproteinazların dokuya özgü proteinleri tarafından (TIMP) tarafından düzenlenebilmektedirler. TIMP ailesinin dört üyesi makrofaj olarak da tanımlanabilen bağ doku hücreleri tarafından sentezlenebilmektedir. TIMP-1 tüm kollajenaz, stromelizin ve jelatinaz çeşitlerine karşı etki edebilmektedir. MMPler ister yalnız olsunlar isterse plazmojen sistemde aynı anda yer alsınlar hücre dışı matriksin parçalanmasından sorumludur. Hücre göçü, dokunun yeniden oluşumunda hem fizyolojik ve patolojik süreçte gerekli rollere sahiptir. Bir kaza ya da yaralanmadan sonra iskelet kasının onarımı süreci de benzer süreçlerdendir. İskelet kası hücrelerinin de farklılaşması ve yeniden oluşumu gibi durumlarda metalloproteinazlar anahtar rol oynamaktadır. Kas dokusu oluşumunda (miyojenesis) MMPlerin rol oynadığı ileri sürülmektedir, tanımlanmış proteinazlardan sorumludur. Son yapılan araştırmalar sonucunda MMP-1, MMP-2 ve MMP-9un çok önemli rol oynadıklarını ortaya konulmaktadır (Chen ve ark., 2009).

MMPler, çoğunlukla hem fizyolojik hem de patolojik koşullar altında ECM proteinlerinin yıkımından sorumlu çinko ve kalsiyum bağımlı endopeptidazlardır (Nagase ve ark., 2006). MMPler omurgalılarda oldukça geniş dağılım göstermektedir. Günümüzde, yaklaşık 26 MMP keşfedilmiştir. Kollajenaz, jelatinaz, stromelizin, marilizin, membran tip MMP ve diğer MMPler olmak üzere toplam altı altfamilyaya ayrılmıştır (Kupai ve ark., 2010). Bu familyalar ışığında, jelatinaz ailesinin iki üyesi olan MMP-2 ve MMP-9, etkili bir biçimde kollajeni parçalamaktadır. Jelatinazların birincil yapısını sinyal peptit, propeptid domain, katalitik domain, cysteine switch, çinko bağımlı motif ve hemopexin benzeri bölge oluşturmaktadır. Katalitik domain, sadece jelatinazlara özgü olarak üçlü tekrar fibronektin içermektedir (Nagase ve ark., 2006).

1.2.1. Sınıflandırılması ve Biyokimyasal Özellikleri

Matriks metalloproteinazlar veya matriksinler, metalloproteazların altfamilyasıdır. İlk MMP üyesi, 1962 yılında tanımlanmıştır, metamorfoz sırasında iribaş kuyruğundaki fibriller kollajenin yıkımından sorumlu proteazdır (Gross ve ark., 1962) . Matriksinler aynı zamanda hidra, deniz kestanesi ve Arabidopsis'te de bulunmakta. MMP-1, kollajenaz 1 ile sekans homolojiye sahiptir.

Çizelge 1.1. İnsan Matriks Metalloproteazları ve Ortak İsimleri

MMP	Alternative name	MMP	Alternative name
1	Collagenase-1 Interstitial collagenase	16	Membrane type-3 MMP
2	Gelatinase A 72-kDa type IV collagenase	17	Membrane type-4 MMP
3	Stromelysin-1 Transin-1	19	None Human ortholog of *Xenopus* MMP-18
7	Matrilysin Pump-1	20	Enamelysin
8	Collagenase-2 Neutrophil collagenase	21	None Human ortholog of *Xenopus* xMMP
9	Gelatinase B 92-kDa type IV collagenase	23	Cysteine array MMP Femalysin MMP-22
10	Stromelysin-2	24	Membrane type-5 MMP
11	Stromelysin-3	25	Membrane type-6 MMP Leukolysin
12	Macrophage metallo-elastase	26	Matrilysin-2/endometase
13	Collagenase-3	27	None
14	Membrane type-1 MMP	28	Epilysin
15	Membrane type-2 MMP		

Çizelge 1.2. MMP Sınıflandırması (Klein ve ark., 2011)

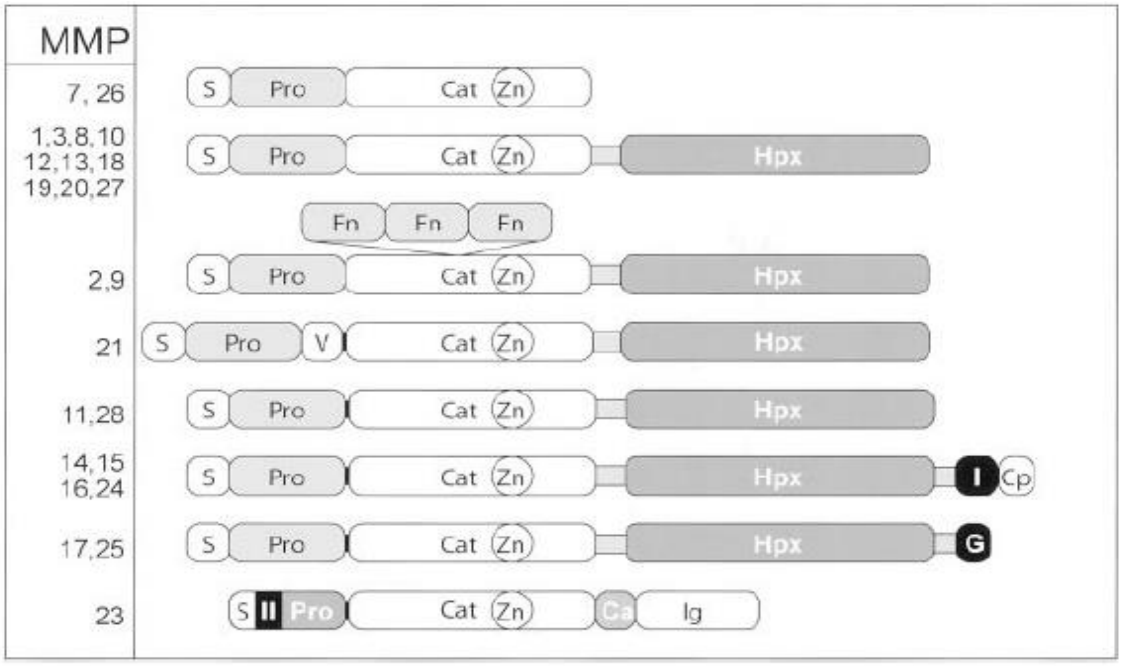
Enzyme	MMP	Human Chromosome	3D Structure (PDB Code)
Collagenases			
Interstitial collagenase; collagenase 1	MMP-1	11q22-q23	Mature protein; 1FBL cat domain; 1CGF, 2TCL, 1AYK, 2AYK, 1HFC, 1CGL, 1CGE, 966C, 3AYK, 4AYK
Neutrophil collagenase; collagenase 2	MMP-8	11q21-q22	Cat domain; 1MNC, 1I76, 1JAO, 1MMB, 1JAN, 1JAP, 1JAQ, 1I73, 1KBC, 1A85, 1A86, 1BZS, 1JJ9, 1JH1
Collagenase 3	MMP-13	11q22.3	Cat domain; 1CXV, 1FM1, 1PLS, 456c, 830c, 1EUB Hpx domain; 1PEX
Collagenase 4 (*Xenopus*)	MMP-18	NA	
Gelatinases			
Gelatinase A	MMP-2	16q13	proMMP-2; 1CK7; proMMP-2–TIMP-2 complex; 1GXD; cat domain; 1QIB, 1HOV, 1EAK; Hpx domain; 1GEN, 1RTG; Fn; 1CXW, 1KSO
Gelatinase B	MMP-9	20q11.2-q13.1	Pro-cat domain; 1L6J; cat domain; 1GKC, 1GKD; Hpx domain; 1ITV
Stromelysins			
Stromelysin 1	MMP-3	11q23	Pro-cat domain; 1SLM; cat domain; D8M, 1CIZ, 1CAQ, 1B8Y, 2SRT, 1HFS, 1SLN, 2USN, 1USN, 1D5J, 1BQO, 1D7X, 1D8F, 1BIW, 1UMS, 3USN, 1UMT, 1BM6, 1B3D, 1CQR, 1G4K, 1G49, 1HY7, 1G05; complex with N-TIMP-1; 1UEA
Stromelysin 2	MMP-10	11q22.3-q23	
Stromelysin 3	MMP-11	22q11.2	1HV5
Matrilysins			
Matrilysin 1; Pump-1	MMP-7	11q21-q22	Cat domain; 1MMP, 1MMQ, 1MMR
Matrilysin 2	MMP-26	11p15	
Membrane-type MMPs			
Transmembrane			
MT1-MMP	MMP-14	14q11-q12	Cat domain in complex with TIMP-2; 1BQQ, 1BUV
MT2-MMP	MMP-15	15q13-q21	
MT3-MMP	MMP-16	8q21	
MT5-MMP	MMP-24	20q11.2	
GPI anchor			
MT4-MMP	MMP-17	12q24.3	
MT6-MMP	MMP-25	16p13.3	
Others			
Macrophage elastase	MMP-12	11q22.2-q22.3	Cat domain 1JK3, 1JIZ
No trivial name	MMP-19	12q14	
Enamelysin	MMP-20	11q22.3	
XMMP (*Xenopus*)	MMP-21	ND	
CA-MMP	MMP-23	1p36.3	
CMMP (*Gallus*)	MMP-27	11q24	
Epilysin	MMP-28	17q21.1	

(Visse ve ark., 2003)

1.2.1.1. MMP Yapısı

MMPler prodomain, katalitik domain ve hemopeksin domain kısımlarından oluşmaktadır. Tüm MMPler katalitik domain içerir, enzim prodomaini tarafından inaktif formun etrafını çevriler. Bu propeptid katalitik bölge ile etkileşime geçer, ki bu bölge de katalitik paketteki sistein kısmı ve çinko iyonunu korur (Nagase ve ark., 1997), (Van Wart ve ark., 1990).

Çizelge 1.3. Matriks Metalloproteazların Yapısı



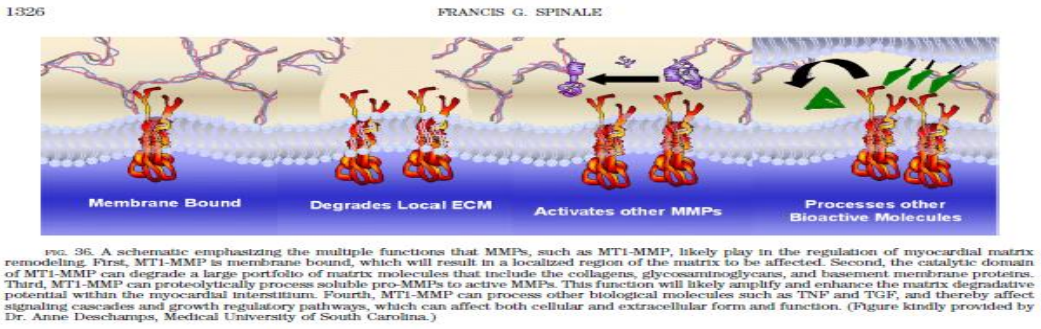
(Visse ve ark., 2003)

MMP-7, MMP-23 ve MMP-26 hariç tüm MMPler, substrat için gerekli sekans bölgesinin tanınmasında görevli C-terminal hemopeksin benzeri domaine sahiptir.(Murphy ve ark., 1997) Jelatinaz üyelerinden MMP-2 ve MMP-9, jelatin ile kollajene bağlanmasını sağlamak için üçlü fibronektin tip 2 katalitik domain arasında yer alır (Bode ve ark., 1999).

MMP fonksiyonu çeşitli seviyelerde düzenlenmektedir. İlk olarak, gen ifadesinin başlatılması büyüme hormonları ve sitokinler tarafından kontrol

edilmektedir; aynı zamanda da dönüştürücü büyüme faktörü β ve glukokortikoid tarafından bastırılır (Nagase ve ark., 1999).

Yeni gerçekleştirilen araştırmalar ışığında, bu yapıların MMP ifadesindeki epigenetik süreçte önemli düzenleyici role sahip oldukları ortaya çıkmıştır (Chernov ve ark., 2009).

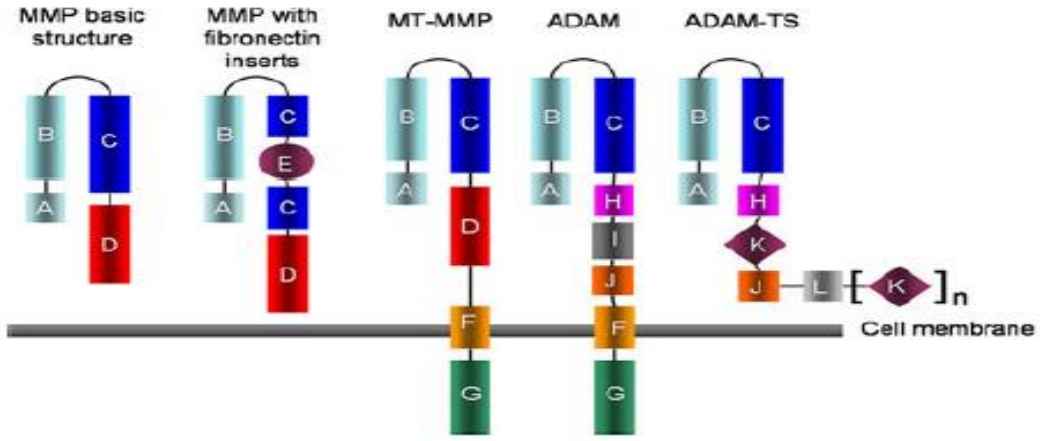


Şekil 1.4. Matriks Yeniden Düzenlenmesi (Spinale ve Ark., 2007)

1.2.2. MMP Ailesinin Üyeleri

Substrat özelliği, sekans benzerliği ve domain dizilimini esas alarak, omurgalılara ait MMPler altı gruba ayrılmaktadır.

Çizelge 1.4. Matriks Metalloproteaz Fizyolojisi



1.2.2.1. Kollajenaz

MMP-1, MMP-8,MMP-13 ve MMP-18 (*Xenopus*) bu grupta yer almaktadır. Kollajen 1,2 ve 3'ü N terminus bölgesinden kesmeleri kendilerine özgüdür. Kollajenazlar aynı zamanda interleukin-8 (IL-8), pro-tümör nekrozis faktör (TNF-α) gibi çeşitli biyoaktif molekülleri gibi diğer ECM moleküllerinde de proteolitik süreç gerçekleşmektedir.

1.2.2.2. Stromelizin

Stromelizin 1 (MMP-3) ve stromelizin 2 (MMP-10) kollajenazlar gibi aynı yapıya sahiptir, ve pek çok farklı ECM bileşeninin yıkımını gerçekleştirebilir; sadece tabii kollajenazı parçalayamaz. Buna ek olarak; stromelizin-1, E-katerin ve pro-interleukin 1 betayı da içeren birtakım biyoaktif substratı işlemden geçirir. MMP-3, MMP-10'a kıyasla daha yüksek proteolitik etkiye sahiptir. ECM bileşenlerini parçalamanın yanı sıra; MMP-3 pro-MMPlerin aktive edilmesinden de sorumludur, MMP-1'in tam olarak aktif olabilmesi için öncelikle proMMP-1'in işlemden geçmesinden yükümlüdürler. MMP-11 de stromelizin 3 olarak adlandırılmaktadır, ancak çoğunlukla diğer MMPler grubunda sınıflandırılır, çünkü sekans ve substrat özelliği bakımından MMP-3ten ayrılmaktadır.

1.2.2.3. Jelatinaz

Jelatinaz A (MMP-2) ve Jelatinaz B (MMP-9) bu gruba dahildir. Bu enzimler, jelatin, kollajen ve laminine bağlanabilen, katalitik domaine üçlü fibronektin domain tekrarını ekleyebilme özelliğine sahiptir. MMP-2, tip1,2 ve 3 kollajeni parçalayabilmektedir. İnsanda MMP-2, kemik doku gelişiminde oldukça önemlidir.

1.2.2.4. Matrilizin

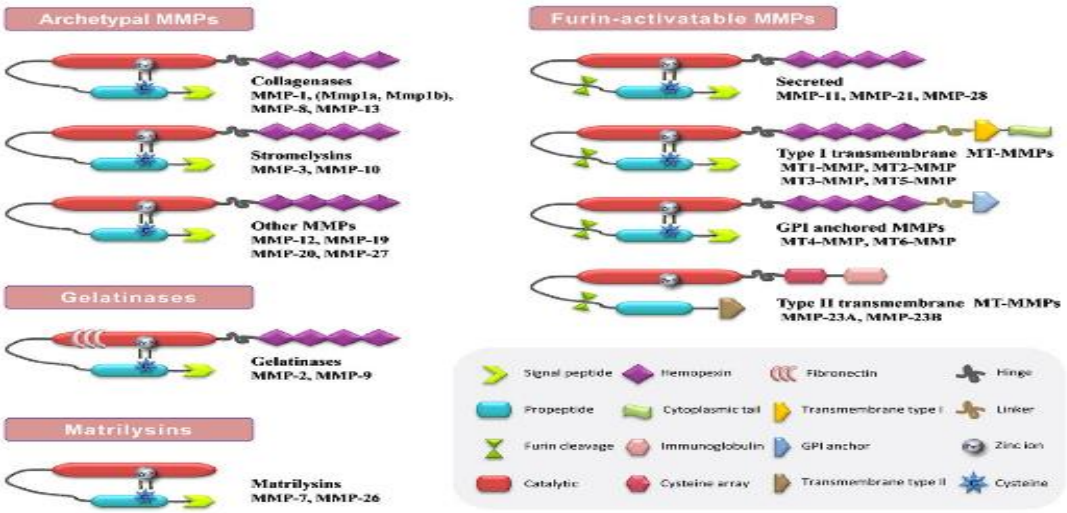
Yapısında hemopeksin domainin olmaması bu grup için karakteristik bir özelliktir. Matrilizin 1 (MMP-7) ve matrilizin 2 (MMP-26), endometaz olarak adlandırılmaktadır.(Agnihotri ve ark., 2001; Lochter ve ark., 1997) ECM bileşenlerinin yanı sıra, MMP-7 Fas-ligand, pro-tümör nekrozis faktör (TNF-α) ve E-katerin gibi hücre yüzey moleküllerinin işlemden geçmesinden sorumludur. MMP-26 ise patolojik koşullarda proMMP-9'un aktivatörü olarak göreve sahiptir.

1.2.2.5. Membran Tipi MMP (MT-MMP)

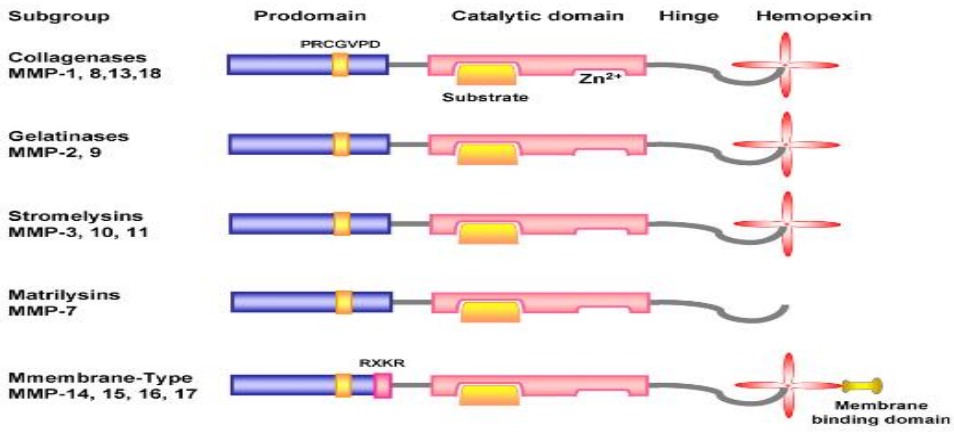
Bu gruba ait altı üye mevcut bulunmaktadır; şöyle ki bunların dördü tip 1 transmembran proteindir (MMP-14, MMP-15, MMP-16 ve MMP-24) ve diğer ikisi de glikozilfosfatidilinositol (GPI) bağlı proteindir. MT4-MMP hariç diğer hepsi proMMP-2 ile aktive olurlar. Bu enzimler aynı zamanda ECM moleküllerini parçalayabilmektedirler. MT1-MMP, tip1,2 ve 3 kollajenler üzerinde kollajenolitik etkiye sahiptir ve anjiyogenezde önemli rol oynamaktadır (Noe ve ark., 2001; Lijnen ve ark. 2000). MT5-MMP, beyine özgüdür ve serebellumda ifade edilir (Nakamura ve ark., 1998) . MT6-MMP (MMP-25) ise özellikle periferik kanda lökositi, anaplastik astrositomas ve glioblastomalarda ifade edilirken; meningiomada ifade edilemez (Murphy ve ark., 1993; Pei ve ark., 1994).

1.2.2.6. Diğer MMPler

Bu grupta, makrofajda ifade gösteren ve makrofaj göçünde elzem olan MMP-12 (Gall ve ark., 2001; Wilson ve ark., 1999) amelogenin yıkımından sorumlu MMP-20, karaciğerde cDNA sentezi yapılan MMP-19, ilk kez tavuk fibroblastından klonlanan MMP-22 (Marchenko ve ark., 2001) üreme hücrelerinde ifade edilen MMP-23 (Park ve ark., 2000) ve keratinositlerde ifade veren MMP-28 (Belkin ve ark., 2001; d'Ortho ve ark., 1997) yer almaktadır.



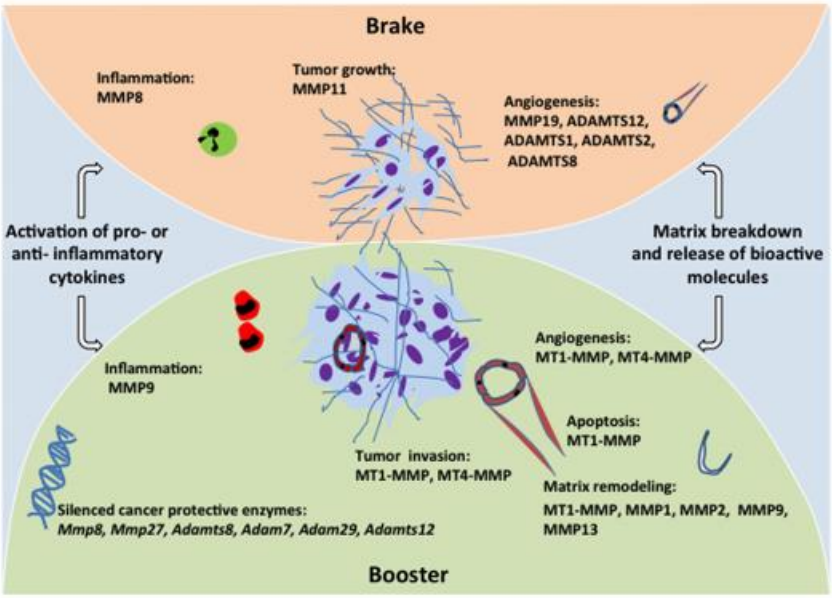
Şekil 1.5. MMP Evrimi, Gen Düzenlenmesi Ve Fonksiyonel Analizi (Fanjul-Fernández ve Ark., 2010)



Şekil 1.6. Vasküler Sistemin Yeniden Düzenlenmesinde MMP (Raffetto Ve Ark., 2008)

Matriks metalloproteinazlar oldukça geniş yelpazede yer alan bitki, omurgalı ve omurgasız sınıfında bulunan enzim ailesindendir. Pek çoğu klonlanmış ve sekanslanmıştır. Hücre dışı matriksin (ECM) çeşitli bileşenlerinin yıkımından sorumlu proteolitik enzimlerdir. Bu enzimler, kalsiyum ve çinko bağımlı endopeptidazlardır; hücre dışı matriksin hayati düzenleyici rollerinden sorumludur. Embriyonik gelişim, hücresel göç, morfogenez ve dokunun yeniden oluşumu gibi süreçler esnasında bu enzimler hücre dışı matriksin yıkımında görev alırlar. Büyüme, gelişim ve yaşlanmayı da içeren normal hayati fonksiyonları da kapsayan olaylarda; kemiğin yeniden düzenlenmesi, uterus, salgı bezleri ve ovulasyonun fonksiyonu gibi süreçlerde de önemli rollere sahiptirler (Carmeli ve ark., 2004).

Matriks metalloproteinazlar aynı zamanda, hücre dışı matriksin enflamasyonu, tümor oluşumu, metastaz ve hücre ölümü gibi pek çok patolojik süreçte de yer alırlar. Sitokinler tarafından indüklenirler ve enflamatuar hücreler tarafından salgılanırlar. İndüklenen MMPler transkripsiyon faktörü içeren aktive edici protein-1 (AP-1) içerirler, ki bunlar sitokinler tarafından indüklenebilmeleri için gereklidir. MMPlerin aktiviteleri matriks metalloproteinazların doku inhibitör enzimleri (TIMP) tarafından kontrol altına alınırlar. TIMP-1, MMPlerin aktif formuna kovalent olmayan şekilde bağlanabilmektedir; bunun aksine TIMP-2 ise, inaktif formunu düzenler ve bu yüzden de proteolitik enzimin aktif formunu inhibe eder. MMP aktifleştirici formunun aktivasyonu mitojen aktif protein kinaz (MAPK) sinyal yolağını içerir; Tümör nekroz faktör (TNF- α) ve interleukin (IL-1) tarafından aktif hale gelir.



Şekil 1.7. Metalloproteazların Rolü (Noël ve Ark., 2012)

MMPler metzincin familyasına ait bir grup proteazlardır; aynı zamanda da, sinyal peptid, propeptid ve hedef çinko iyonuna bağlanabilecek katalitik domain yollama özelliğine sahiptirler. Hücre zarında yer alan veya hücre zarından salgılanan çeşitli hücreler tarafından üretilmektedirler. MMPler hücre çoğalması, göç, farklılaşma, apoptoz ve anjiyogenez gibi çeşitli hayati olayları başlatmasının yanı sıra, parçalanmış hücre dışı membranı (ECM) yeniden düzenlemekle sorumlu enzimlerdir (Bellayr ve ark., 2009).

1.3. Proteaz Ailesinin Üyeleri

Metzinkinler, çinko bağımlı endopeptidaz ailesi tarafından ifade edilen, matriks metalloproteinazlar (MMP), disintegrin ve metalloproteinaz (ADAM) (White ve ark., 2003), trombospondin motifli ADAMlar (ADAMTS) (Tang ve ark., 2001) bakteriyal serralizin (Nakahama ve ark., 1986) ve astakin gibi proteazları (Bode ve ark., 1992; Butler ve ark., 1987) da içeren metalloproteinaz ailesidir. Proteazların bu süperfamilyası, üçlü histidin içeren katalitik merkezde çinko bağımlı iyon bulunması ile diğerlerinden ayrılırlar.

Bu proteazların esas fizyolojik görevi ekstrasellüler matriksin (ECM) kollajen, proteoglikan ve fibronektin gibi proteinleri yıkıldıktan sonra yeniden

düzenlenmesidir (Woessner ve ark., 1991). Diğer bir önemli görevleri ise, biyolojik olarak aktif olan sitokin, büyüme faktörü ve kemokinler gibi membran bağımlı proformların serbest bırakılmasını sağlamaktadırlar. Sahip oldukları fizyolojik roller gereği daha geniş bir tanımla degradomik de denilebilmektedir (Butler ve ark., 2009). Tam olarak bu yüzden matriks metalloproteinazlar (MMP), oldukça geniş yelpazede farklı çeşit protein türlerinin oluşumuna da katkı sağlayan orijinal bir gen ürünüdür.

1.4. İskelet Kası

İskelet kası, çeşitli çevresel uyarıları alan ve tepki verebilen geniş esneklikte uyarıların bütünüdür. İskelet kasının hücre dışı matriksi, yapısal bütünlüğü, esnekliği ve normal fonksiyonları sağlayabilen önemli bir destekleyicisidir. İskelet kasının esnekliği kişinin yaptığı egzersiz ile yakından ilişkilidir. Aşırı yapılan egzersiz de kas yapısında patoloji görülmesine, iskelet kasında kas distrofisi ve enflamatuar miyopati gibi dejeneratif bozukluklara neden olacaktır (Dahiya ve ark., 2011).

İskelet kası, yetişkin bir insanın toplam vücut indeksinin %40-50 oranındaki kısmını oluşturmaktadır. İskelet kasının kasılabilen kısmı olan miyofibriller, membran ve sarkolemmaya en yakın olan kısım olduğundan dolayı hücredışı sıvının normal koşullar altında geçirgen olmayan yapıda ve miyofibrillerin elektrolit homeostazi dengesini sağlayan önemli role sahiptir. Sarkolemma, dış bazal lamina ile bağlantılıdır. Düz kas hücrelerini çevreleyen ve elektron mikroskop görüntüsü altında bağ dokusundan epitelyum dokuyu bazal laminaya ayıran özelliğe sahiptir (Carmeli ve ark., 2004).

Adli bilimler ve klinik araştırmalarda postmortem iskelet kasındaki hücresel değişimler zaman tayininde belirteç olarak etkili bir role sahiptir. İskelet kasındaki yapısal, metabolik ve protein değişimleri ölüm sonrasındaki süreçte fizyolojik olarak değişim göstermektedir. Membran hasarı, pH değişimi, homeostaside bozulma ve nihayetinde de hücresel biyosentetik aktivitenin durması gibi anahtar postmortem değişimler gözlenmektedir (Tokunaga ve ark., 1993; Sanoudou ve ark., 2004).

Protein seviyelerindeki değişim ve proteaz aktivitesi de ölüm ile birlikte değişmektedir. Hücre dışı matriks de ölüm sonrasında hücresel bütünlüğün bozulmaya başlamasıyla değişim göstermektedir. Bu çalışmada hücre dışı matriks (ECM) ile etkileşime giren proteazlar olan ADAMTS ve MMPlerin ölüm sonrasındaki değişimleri de bu yüzden incelenmektedir.

1.4.1. Matriks Metalloproteinazlar ve İskelet Kası

Hücre ve dokular arasında hücre dengesi karşılıklı çeşitli sinyal yolakları tarafından dengelenmektedir. Normal koşullar altında, bu iletişim, hücre dışı membranın yeniden düzenlenmesi süreci boyunca sinyal moleküllerinin hücre dışı membrandan salınması ve dinamik yapısının sağlanması matriks metalloproteinazlar (MMP) tarafından düzenlenir (Alameddine ve ark., 2012; Morrison ve ark., 2009).

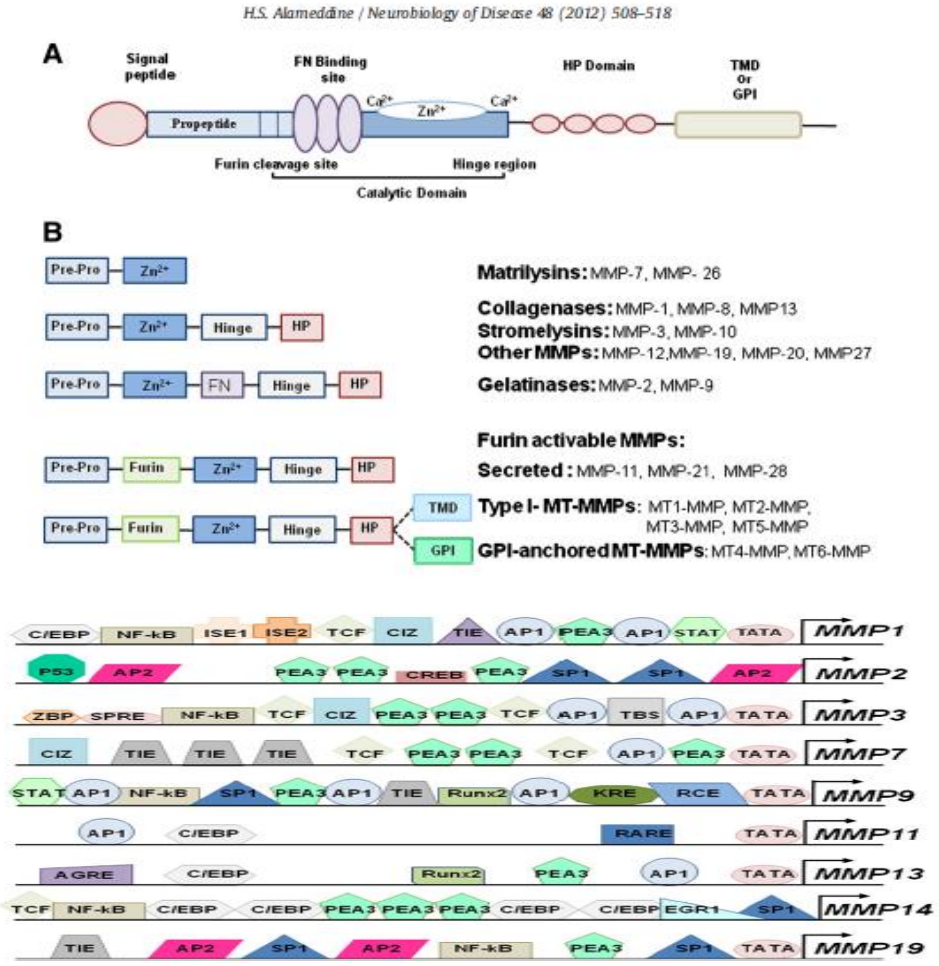
Kas dokusunda, büyüme, gelişim ve yaralanma gibi fizyolojik ve patolojik durumlarda hücre dışı membranın yeniden düzenlenmesini gerektiren süreçleri tetikler. Hücre dışı membran proteinleri, başta MMPler ve daha sonrasında diğer enzimlerden sistein proteazlar, serin proteazlar ve bağ dokusunun yıkımına neden olabilen proteozomlar gibi proteolitik enzimler tarafından parçalanır (Geesink ve ark., 2009; Mignatti ve ark. 1993).

Başta hücre dışı matriks bileşenlerine karşı hidrolitik fonksiyonları bilinse de, günümüzde yapılan araştırmalar ışığında doku mikroçevresinin düzenlenmesi, hücre-hücre ve hücre- matriks etkileşimlerini sağlamak ve doğal bağışıklık ile enflamasyonun temel düzenleyicisi olarak esas görevleri ortaya çıkmıştır. Bununla beraber; literatür kapsamında iskelet kasındaki MMPler ile kalp ve sinir kasındakilerin patolojik durumu karşılaştırılmıştır (Rivera ve ark. 2012; Rosenberg ve ark., 2009; Spinale ve ark., 2007).

Yapılan son çalışmalara göre MMP ve ADAMlar sadece yıkıcı özelliklerinin yanı sıra, hücre davranışları ve sinyal yolaklarının düzenleyici anahtarı görevini üstlenmektedir (Murphy ve ark., 2010; Rodriguez ve ark., 2010). MMPler oksidatif strese karşı tepki veren S-glutatyonu da içeren non-proteolitik mekanizmada kaveoleler, çekirdekler (Kwan ve ark., 2004; Yang, ve ark. 2010) ve mitokondride

(Mohammad ve ark., 2010) ya da sistein rezidünün tek yönlü oksidatif stresinde (Fu ve ark., 2004) alır.

MMP-2 aktivasyonu arttıkça, oksidatif stres de artar; apoptotik yolak tetiklenir, ve nihayetinde doku hasarı ile MMP azalır, tedavi edici müdahale için yeni yolaklar açılır (Kandasamy ve ark., 2009; Kandasamy ve ark., 2010; Kunugi ve ark. 2011).



Şekil 1.8. MMP Yapısı ve Düzenleyici Elemanları (Alameddine ve Ark., 2012)

1.4.2. MMP ve Kalp Damar Hastalıkları

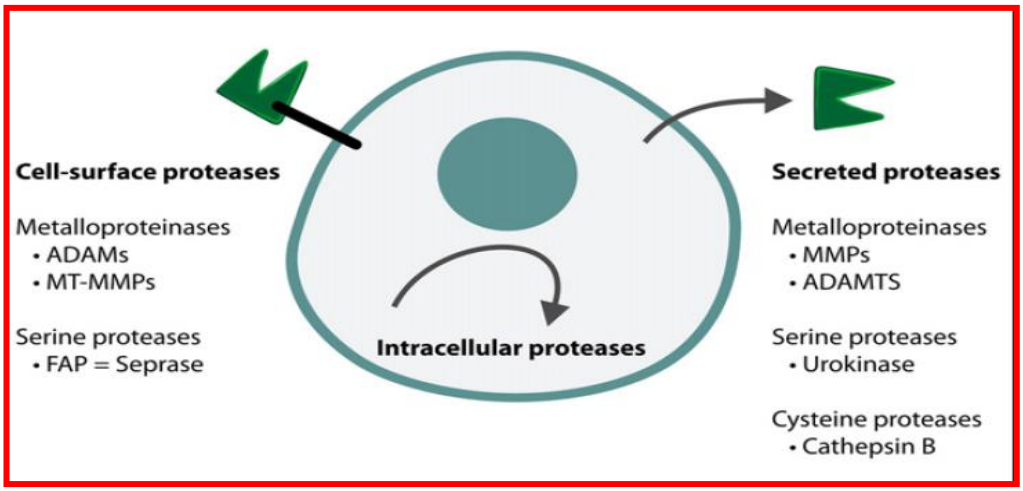
Kalp rahatsızlıkları günümüzde hastalık ve ölümlerin esas nedenini oluşturmakta ve bu oranda ciddi bir artış yaşanmaktadır. Kalp damar stres altında,

zorunlu yapısal olayın yolağı myokardium ile ilişkilidir. Sol ventrikülde (LV) bozukluğa neden olur ve kalp rahatsızlık sendromu ile neticelenir (Spinale ve ark., 2007).

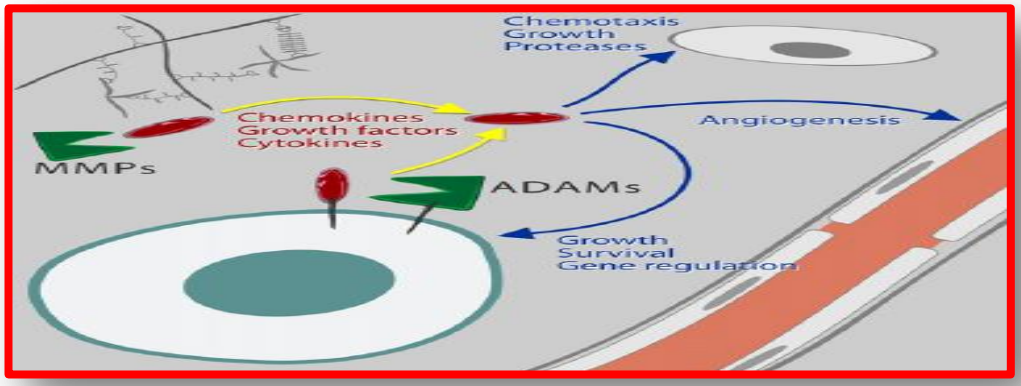
1.5. ADAMTS

ADAM (Disintegrin ve Metalloproteinaz) ve ADAMTS (Trombospondin Motifli disintegrin metalloproteinaz), hücre yüzey proteinlerinin ectodomain ve hücre dışı matriks moleküllerinin ayrılması, hücre yüzey proteinlerine tutunması gibi hücresel etkileşim ve hücre sinyal mekanizmasını düzenleyen hücre dışı proteazlardır. ADAM ve ADAMTS aileleri, matriks metalloproteinazlar ile ilişkili çinko bağımlı metalloproteinazlardan M12 adamalizin ailesinin üyeleridir. Hücre sinyali gibi hücre dışı mikro çevreyi düzenlemek için çok fonksiyonlu enzimlerdir. Özellikle de ADAM ailesi, kendi disintegrin ve cys-rich domainine yapışma özelliğine sahiptir, ve çeşitli protein- hücre yüzeyindeki aktif biyolojik molekülleri düzenleyen aktif proteazlardır.

ADAMTS ailesi üyeleri ise; prokollajen moleküllerin ve agrekan gibi matriks hyalektanın kesim işlemlerinden sorumludurlar. Birkaç ADAM/ ADAMTS enzimleri hücre farklılaşması ve gelişim boyunca hücresel mekanizma süreçlerinde görev almaktadır. ADAMTS üyelerinin, hücre dışı matriks fonksiyonlarını düzenleyen transmembran domainden ve aynı zamanda Epidermal Büyüme Faktöründen (EGF) yoksundur; bununla birlikte sahip olduğu görevine göre değişik sayılarda trombospondin motife sahip olması yapısal olarak ADAM ailesinden ayrılmasını sağlamaktadır (Hodgkinson ve ark., 2010).

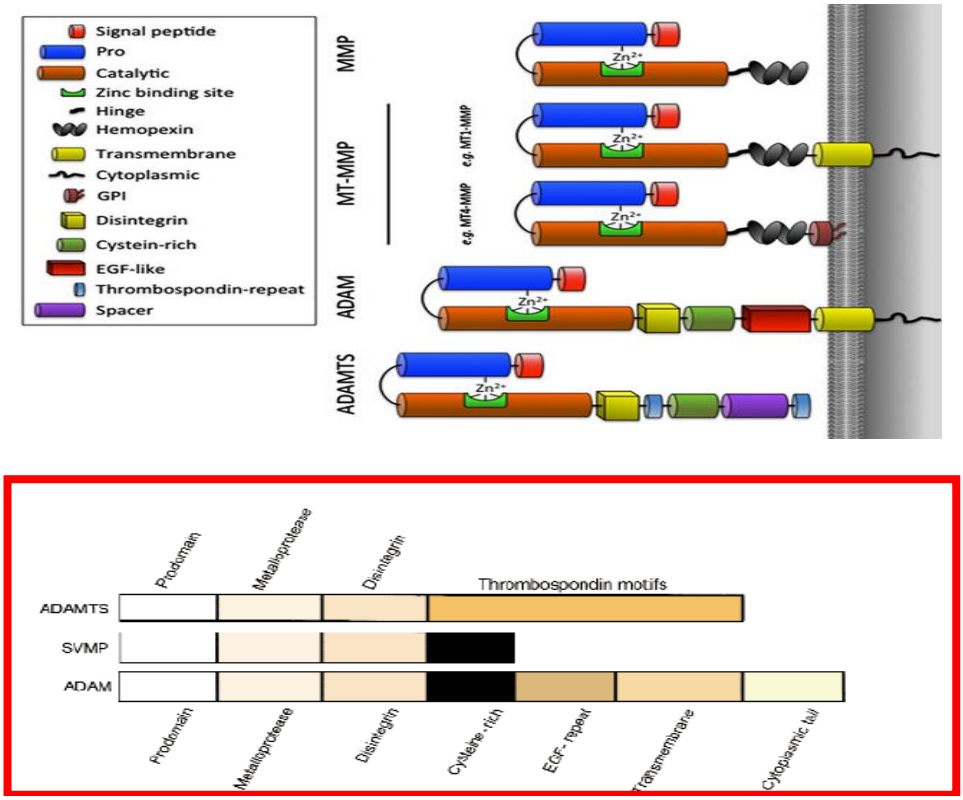


Şekil 1.9. Hücre Yüzey Proteazları (Mentlein ve Ark., 2012)



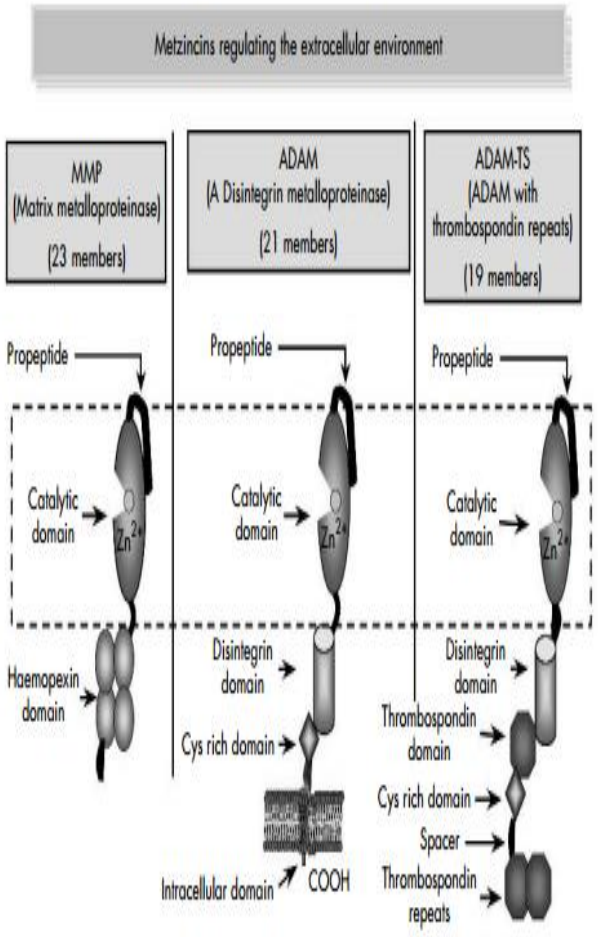
Şekil 1.10. Proteazların Rolü (Mentlein ve Ark., 2012)

ADAMTS ailesi, metalloendopeptidazların üst familyası olan metzincine bağlıdır ve üyeleri ekstrasellüler matriks yıkımında rol oynarlar; bununla birlikte kanser, koagülasyon, anjiyogenez ve hücre göçü gibi oldukça geniş yelpazede görevi kapsamakta olan insan biyolojik işleminde de etkili role sahiptirler.



Şekil 1.11. Adamts ve MMP Yapı Farklılıkları (Kaushal ve Ark., 2000)

ADAMTS proteazlar, özel matriks bileşenleri tarafından ECMnin yeniden yapılandırılmasını düzenlemek amacıyla salgılanan enzimlerdir. ADAMTS, 19 üyeye sahip matriks metalloproteinaz (MMP) ailesindendir ve yapısal olarak hem ADAMlar ile hem de proteinaz ailesinden MMP ailesi ile benzer özelliklere sahiptir. ADAMTS proteazları, hücrede yıkıma neden olan prokollajen, hyalektan ve kartilaj oligomerik matriks proteini gibi hücre dışı matriksin (ECM) birleşenleri ile etkileşime giren enzimlerdir (Salter ve ark., 2010).



Şekil 1.12. Metzinkin Familyasının Düzenlenmesi (Murphy ve Ark., 2005)

Çizelge 1.5. ADAMTS metalloproteinazların biyolojik rolü (Lin ve ark., 2009)

ADAMTS	Alternative name(s)	Known substrate(s)	Biological role
1	METH-1	Aggrecan, versican	Antiangiogenesis[106] Renal interstitial fibrosis[14,107] Bone remodeling[108,109] Ovarian folliculogenesis[110,111] Atherosclerosis[15] Urogenital development[112] Tumor growth/remodeling[113]
2	PCINP	Collagen I, II and III N-propeptides	Ehler–Danlos syndrome type 7C[10,11] Bovine dermatopraxis[10]
3	KIAA0366	Procollagen II N-propeptide	
4	Aggrecanase-1	Aggrecan, brevican, COMP, decorin, fibromodulin, versican	Arthritis[114–117] Atherosclerosis[17,18] Tendinopathy[118,119]
5	Aggrecanase-2ADAMTS-11	Aggrecan, brevican	Arthritis[19–22] Glioblastoma[97]
6	NA	NA	
7	ADAMTS-7B	COMP, α2M	Arthritis
8	METH-2	Aggrecan	Antiangiogenesis[120] Brain malignancy[120] Arthritis[23] Atherosclerosis[17,18]
9	KIAA1312	Aggrecan, versican	Arthritis[121]
10	NA	NA	

1.5.1. ADAMTS Proteaz Ailesi

1997 yılında Japon araştırmacılar (Kuno et al., 1997) tarafından Trombospondin Motifli Matriks Metalloproteinazları (ADAMTS) tanımlamıştır. Günümüzde 19 üyesiyle büyük bir gen ailesidir. Matriks metalloproteinaz ailesinin üyesi olan Adamtsler, hücre dışı matriksin yıkım ve onarımında önemli görevlere sahiptir. Hücre dışı matrikse salınan bu enzimlerin dokuların yeniden düzenlenmesi, pıhtılaşma, fibrozis gibi pek çok önemli fizyolojik olayda hayati görevleri vardır.

İlki ADAMTS1 olan üyesi 1997 yılında Kuno ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir. ADAMTS üst ailesi salgılanan enzim olan toplamda 19 ADAMTS

içermektedir, bunlardan yedisi enzim aktivitesine sahip değildir ve bunlara ADAMTS-benzeri proteinler (ADAMTSL) denmektedir. ADAMTS iki domaine sahiptir; bunlar, N terminusunda mevcut bulunan katalitik domain ve C terminusunda yer almakta olan ancillary (yardımcı) domaindir, ve bunlar substrat ile özellikle etkileşime geçebilmesi için gereklidir aynı zamanda ADAM ailesinden bir ya da daha fazla sayıda trombospondin tekrara sahip olması ile yapı olarak kesin bir şekilde ayrılmaktadır. ADAMTS4 hariç tüm ADAMTS enzimleri trombospondin tekrarları içermektedirler.(Stanton ve ark., 2011)

1.5.1.1. Anti- anjiyogenik: ADAMTS-1

Hücre yüzey proteinlerinin proteolitik modifikasyonu ve hücre dışı matriks, embriyogenez ve kanser metastazı da dahil olmak üzere biyolojik ve patolojik süreçlerde hayati role sahiptirler. ADAM ailesi hem metalloproteinaz hem de disintegrin domain içeren protein ailesini temsil etmektedir (Shindo ve ark., 2000).

ADAM ailesi, yılan zehri metalloproteinaz ve disintentigrin sekanslarına çarpıcı şekilde benzemektedir ve gen ürünleri ailesinin yeni üyelerini temsil etmektedirler. ADAMlar, çeşitli hücre yüzeyi etkileşiminde ectodomain shedding gibi hücre-hücre etkileşiminde rol almaktadır. ADAMTS-1 hem reprolizin tipi metalloproteinaz domain hem de üç trombospondin tip 1 motifi içeren bir ADAM ailesi proteinidir. ADAMTS-1 geni esas olarak kolon 26 kaksijenik tümöründe gen ifadesi olarak tanımlanmıştır ve fare kromozomu 16da yer almaktadır ve C3-C5 bölgesindedir. ADAMTS-1,proprotein, metalloproteinaz ve disintegrin benzeri domain, merkezi TSP tip 1 motif, spacing bölgesi ve C-terminal TSP submotifi içermektedir. ADAMTS-1'in tip 1 motifi heparine bağlanma bölgesinde fonksiyonel iken; hücre dışı matrikse (ECM) kendiliğinden salgılanan proteindir. ADAMTS-1 proteini üretilen hücre tarafından salgılandıktan sonra hücre dışı matrikse (ECM) bağlanabilir. Bunun yanı sıra, mutantların desleyonu analizi TSP tip 1 motifi ve ECMye bağlanan karboksil-terminal bölgelerinde spacer bölgesini ortaya çıkarmıştır. (Kuno ve ark., 2000) Ve dahası, kovalent formdaki kompleksi olma kapasitesine sahiptirler ve böylece ADAMTS-1'in metalloproteinaz domaini katalitik aktivite

gösterir. Diğer bir yandan ise, güncel yapılan araştırmalar da gösteriyor ki ADAMTS-1 (METH-1) anti-anjiyonik aktivite gösterirler (Kuno ve ark., 1998).

21. kromozom uzun kolunda yer alır, 8 ekzon ve 1600 aminoasitten (aa) meydana gelir, 110 kDa ağırlığındadır (Demircan ve ark., 2014).

1.5.1.2. Agrekanaz: ADAMTS-5

Agrekan, yoğun olarak kıkırdakta bulunan, proteoglikan ailesinin bir üyesidir, MMPnin agrekanı parçalayamadığı durumlarda ADAMTS agrekanaz ailesi devreye girer (Wight, 2014). Aynı zamanda hücreyi hidrasyona karşı oluşacak basınca karşı da korumaktan sorumludur. Sahip olduğu kesim noktalarından dolayı agrekanaz ile en çok çalışılması tercih edilen Adamts-5'tir (Porter ve ark., 2005).

Adamts-9 ile birlikte apoptoz yoluyla hücrelerin ortadan kalkmasında ve ECM yüzeyinin temizlenmesinde rol oynadığı araştırma sonucunda ortaya konulmuştur (McCulloch ve ark., 2009).

1.5.1.3. Adamts-9: GON-Adamts

Apoptozis özelliğine sahiptir. Hücre düzenlenmesinde önemli görevi vardır. İskelet kasında yüksek oranda ifade edilir. Fizyolojik süreç doğrultusunda hücre duvarının parçalanmasında görev alabilir. 3. Kromozomun kısa kolunda bulunan Adamts-9 geni 39 ekzondan meydana gelmektedir (Demircan ve ark., 2014).

Post mortem zaman tayininde insan iskelet kas dokusunda ADAMTSler ile ölüm zaman aralığı arasında ilişki olup olmadığı incelenip, kriminal olaylarda zaman tespiti açısından katkı sağlamayı amaçlamaktadır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Çalışma Etik Kurulu

Çalışmanın hayata geçmesi için öncelikle etik kurul ve biyolojik materyal izni alınmıştır. Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi 30/06/2014 tarihli klinik araştırmalar etik kurulu toplantısında 99950669/215 sayılı etik kurul kararı (Bkz. Ek-1) ve Adalet Bakanlığı Adli Tıp Kurumu Başkanlığının 09/09/2014 tarihli Eğitim ve Bilimsel Araştırma Komisyon toplantısında 21589509/596 sayılı bilimsel çalışma onayı alınmıştır. (Bkz. Ek-2)

2.2. Hastaların Seçimi ve Örnek Toplanması

Çalışmada Adli Tıp Kurumundan alınan izin çerçevesinde Ankara Grup Başkanlığında yapılan 17'si erkek 4'ü kadın 21 otopsiden temin edilen psoas kası kullanılmıştır. Alınan kayıtlara göre bilinen en genç vaka 15; en yaşlı vaka ise 71 yaşındadır.

Ölüm sebepleri heterojen dağılım göstermektedir; ateşli silah, yüksekten düşmeye bağlı travma, trafik kazası, iş kazası, uçucu madde intoksikasyonu, yüksek akım, intihar. Ayrıca grup içerisinde kalp-damar hastalığı ve şizofreni tanısı konulan vakalar bulunmaktadır.

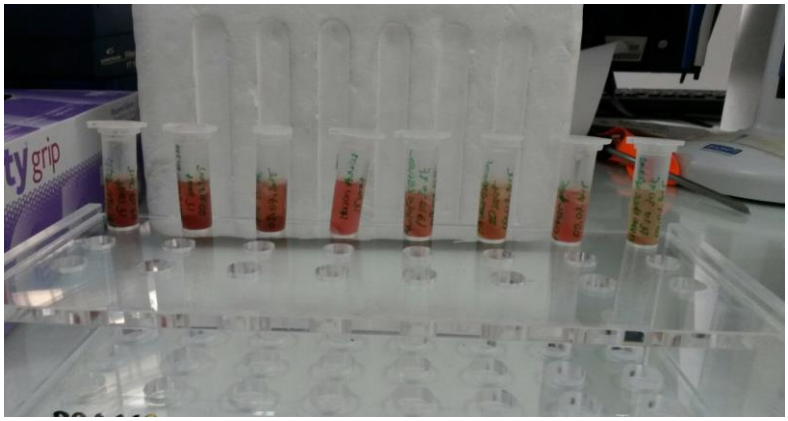
Vaka raporlarına göre 4 farklı gruplandırma yapılmıştır. İlk grup 21 kişiden oluşur ve tüm vakalar bu grubun içinde dahildir. İkinci grupta ölüm öncesi 2-67 gün hastanede yatan 7 kişi vardır. Üçüncü grupta ise; aynı gün ölen kişilerden oluşmaktadır. Bu grupta yer alan kalp-damar hastası kişilerin de dâhil olduğu 13 kişilik ve hariç oldukları 10 kişilik 2 alt gruba ayrılmıştır.

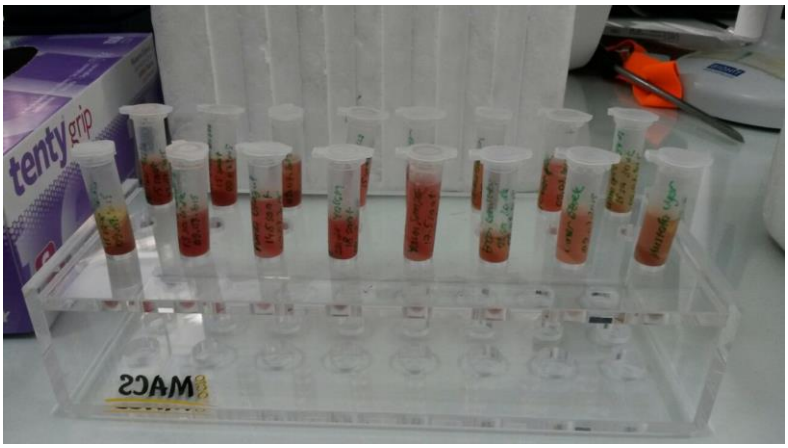
2.3. Deney Prosedürü

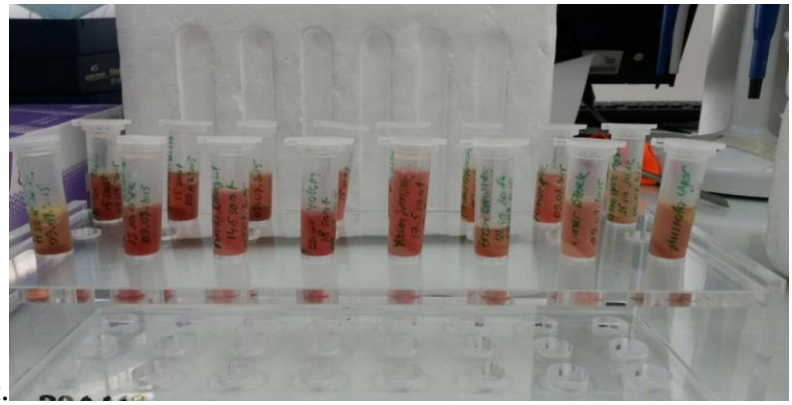
Adli Tıp Kurumu'ndan "iliopsoas kası"ndan yaklaşık 1 cm^3 boyutlarında post mortem doku örnekleri temin edildi. Deney gününe kadar -80°C'de saklandı.

2.3.1. Dokudan Protein İzolasyonu

-80°C'den alınan dokular buz üzerinde çözünmeye bırakıldı ve PBS ile iki kez yıkama yapıldı. Yıkanan dokular bistrü yardımı ile küçük kesitlere bölündü, ve ardından sonikatörle parçalandı. Parçalanan doku 1,5 ml'lik ependorf tüplere alındı, 14.000 rpm 4°C'de 5 dk. santrifüj edildi. Santrifüjden alınan tüplerin içindeki sıvı kısım (süpernatant) ayrıldı ve alt kısımdaki pellet protein eldesi için kullanıldı. Pellet, lizis solüsyonu ve proteaz inhibitörü (1/100 şeklinde) pipetleme yapıldı. Lizis solüsyonun görevi biyolojik membranları parçalamaktır; proteaz inhibitörünün rolü ise proteinleri proteaz inhibitölerinden korumaktır. 15 dakikada soğuk odada çalkalayıcıda çalkalandı. Daha sonrasında 16.000 rpm'de 15 dk. santrifüj yapıldı. Süpernatant (protein içeren kısım) başka bir tüpe aktarıldı.

a. 

b. 

c. 

Şekil 2.1. a,b,c. Dokudan Protein İzolasyonu

Zaman saatlerine göre ayırdığımız vakaları, a,b ve c şeklinde gruplara ayrılmıştır.

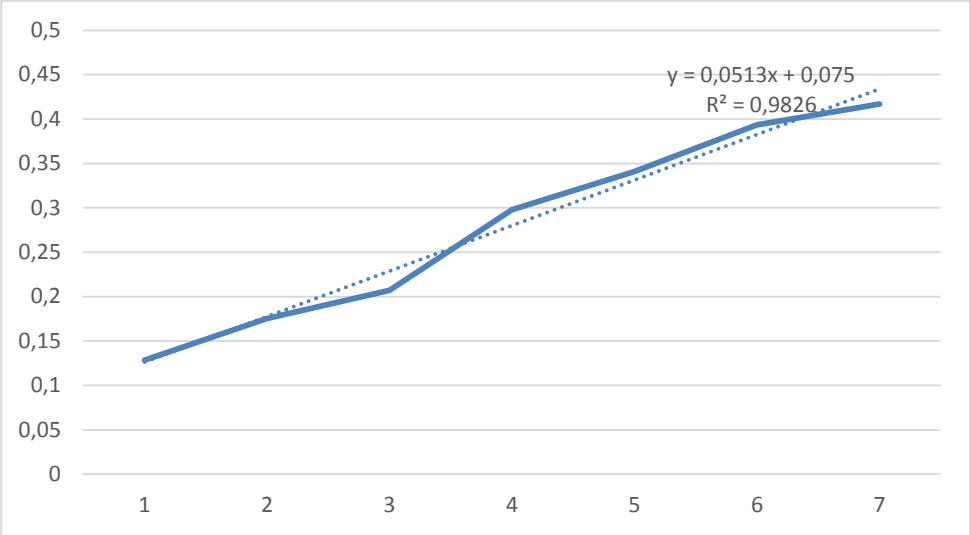
2.3.2. Protein Miktar Tayini

Hazırlanan jele ortalama 10 ile 50 µg arasında protein yüklenir. Bu oranı hesaplamak için elimizde ne kadar total protein olduğu bilinmesi gerekmektedir. Deneyimizde UV absorbsiyonu ölçülerek bir belirtçe reaksiyonu ile oluşan rengin spektral tespit edilmesi esasına dayanarak tayin edildi.

2.3.3. Bradford Yöntemi

Alınan örneklerin protein miktarını ölçmek için spektrofotometrik ölçüm yapılarak Bradford Yöntemi uygulandı. Ölçümde kullanılmak üzere standartlar hazırlandı. Standart hazırlamada BSA kullanıldı. Bovine Serum Albumin Temiz 96 kuyucuklu platelere 2 µl standartlara ve proteinler yüklendi. Üzerine 98 µl Coomassie Blue eklendi, bu oran bütün örnekler için platelere konuldu. Fotometrik okuma yapılmak üzere spektrofotometre cihazı 595 nm dalga boyuna ayarlandı. Tüm örneklerin optik dansiteleri elde edildi. Elde edilen absorbans değerleri Şekil 2.2'de belirtilen denklemde 'y' yerine yazıp protein miktarı hesaplandı. Elde edilen denklem, bilinmeyen protein değerlerini, bilinen standartlar üzerinden hesaplama yapmamızı sağladı.

Bradford yönteminde, Coomassie Brilliant Blue G-250 Boyası ile renk değişimi kaydedildi. Ne kadar fazla protein var ise, renk değiminin maviliğinin yoğun olduğu gözlemlendi.



Şekil 2.2. BSA Konsantrasyonu (µg/ml)

Protein Standartlar: 0, 250, 500, 750, 1.000, 1.500 ve 2.000 µg/ml şeklinde (BSA)

Optik dansite	protein konsantrasyonu (µg/µl)
0,575	9,746588694
0,5875	9,990253411
0,5745	9,736842105
0,5475	9,210526316
0,6275	10,76998051
0,547	9,200779727
0,577	9,785575049
0,58	9,844054581
0,5775	9,795321637
0,626	10,74074074
0,6245	10,71150097
0,572	9,688109162
0,568	9,610136452
0,5845	9,931773879
0,618	10,58479532
0,5625	9,502923977
0,571	9,668615984
0,5695	9,639376218
0,6375	10,96491228
0,6205	10,63352827
0,665	11,50097466

Şekil 2.3. Optik Dansite - Protein Konsantrasyonu

2.3.4. Proteinlerin Denatürasyonu

Protein miktarları hesaplandı. Bir sonraki basamağımız jel elektroforezinde yürütmek. Öncesinde proteinlerimiz kaynatmamız gerekmekte. Proteinleri 95°C'de 5-10 dakika kaynatıldı. Kaynatma işlemi için Sample Buffer ve Beta Mercaptoetanol (BME) kullanılmaktadır. Kaynatma işlemi yapılmazsa proteinin jelde hareketi güçleşir. Kaynatma ile proteinler kırılır, protein denatüre olarak düzleşir. BME'nin görevi proteindeki disülfit bağlarını kırmaktır.

2.3.5. SDS-PAGE (Poliakrilamid Jel Elektroforezi) ve Proteinlerin Yürütülmesi

Proteinler jelde yürümeye hazır hale geldi. Jel hazırlamak için gerekli malzemeler:

1. APS: (Amonyum Persülfat): Suda çözünür, birçok uygulamada kullanılan güçlü bir okside edici ajandır. Poliakrilamid jel yapımında akrilamid polimerizasyonu katalize etmek için tetrametilendiamin ile birlikte kullanılır. Vücuda temasından kaçınılmalıdır.

2. TEMED: (Tetrametilendiamin): Jelin hızla donmasını sağlar. Kötü bir kokuya sahiptir.

3. BİSAKRİLAMİD: Protein analizinde kullanılır. Por çapı küçüktür. Porlarının küçük olması proteinlerin daha iyi bir şekilde yürümesini sağlar.

SDS (Sodyum Dodesil Sülfat): Bir deterjandır. Hücre zarındaki lipid tabakayı parçalar (lizis). Aynı zamanda proteinlerin etrafında negatif yük katmanı oluşturur. Böylece tüm proteinler aynı hızda jelde hareket ederler.

PAGE (Poliakrilamid Jel Elektroforezi): Agar veya Akrilamid kullanılır.

Dikkat edilmesi gereken en önemli noktalardan birisi de, akrimalid nörotoksin olduğu için kullanılırken muhakkak eldiven kullanılmalıdır.



Şekil 2.4. SDS-PAGE düzeneği

1. Tank, 2. Taraklar, 3. Kalın Cam, 4. İnce Cam, 5. Western kalıp tutacağı, 6., Örnek yükleme kuyucukları, 7. Stant

2.4. Deney Düzeneği



2.5. İstatiksel Analizler

Western Blot sonucunda bulunan proteinlerin ek kat artış/azalışları ortalamalarının 1'e karşı test edilmesinde tek örneklem T-testi kullanılıp sonuçlar ortalama ± standart sapma şeklinde özetlendi. Ayrıca hastaların gruplar şeklinde toplanan verilerinin analiz edilmesi amacıyla öncelikle her bir gene ait ölçümler Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ile gruplar arasında karşılaştırılıp farklılığı yaratan grupların tespiti amacıyla post-hoc çoklu karşılaştırma testlerinden yararlanıldı. Hasta ve kontrol gruplarına ait ölçümlerin sonuçları ortalama ± standart sapma kullanılarak özetlendi. İstatistiksel anlamlılık seviyesi olarak $p<0.05$ alındı.

3. BULGULAR

Adli Tıp Kurumu'na bağlı Etik Kurul tarafından temin edilen "iliopsoas kası"ndan yaklaşık 1 cm^3 boyutlarında post mortem doku örneklerinde matriks proteazlarının saate ve ölüm şekline göre gösterdiği değişimler analiz edildi. Çalışma populasyonunda yer alan vakalar yaşları 15- 71 arasında değişen 4 (%19) kadın ve 17 (%81) erkek bireyden oluşmaktadır. Post mortem dokular, ölüm saati ile otopsi saatleri arasındaki fark en erken 2 saat ve en geç 26 saat 40 dakika olacak şekilde 3 ayrı gruba bölündü. 1. grup "0-12 saat" aralığını; 2. grup "12-18 saat" aralığını (18. saat hariç) kapsarken; 3. grup ise "18-27 saat" aralığını (18. saat dahil) kapsamaktadır. Ölüm şekillerine göre ayrılırken ise, 2- 67 gün arasında hastanede yatan toplam 7 vaka "hastanede yatan" grubuna dahil edildi. Kalp damar hastalığı nedeniyle hayatını kaybeden toplam 13 vaka (18. Saat dahil) "kalp damar hastalığı nedeniyle ani ölüm" grubuna ayrılırken; son grubumuz olan "kalp damar hastalığı hariç ani ölüm" grubu ise toplam 10 vakadan oluşmaktadır. Ölüm saati bilinen ancak; ölüm nedeni bilinmeyen bir vaka ölüm şekline göre yapılan değerlendirmelerde gruplandırma dışı bırakıldı.

Hücre dışı matriksin yıkım ve onarımında önemli görevlere sahip olan proteazlardan "MMP" ve "ADAMTS"lerin ölüm saatine ve ölüm şekline göre nasıl bir değişim gösterdiği incelendi, şekil ve tablolar ile elde edilen değerler açıklandı. Doku izolasyonu yapılan 21 vakadan elde edilen kas dokularının protein miktar tayini Coomassie Blue ile yapıldı. 595 nm dalga boyunda spektrofotometrede fotometrik okumaları kaydedildikten sonra dansiteleri (O.D.) elde edildi. Her bir kuyuya 15 µg/µl protein yüklendi. Protein ve O.D. grafiği hesaplandı. Western Blot yöntemi ile protein ifadesi ölçüldü.

3.1. MMP-1 Edilen Bulgular

Şekil 3.1'de görüldüğü üzere; 2. Grup zaman aralığı, 1. Grup zaman aralığına göre 0,51 kat değişim gösterirken; 3. Grup 1. Saate kıyaslandığında 0,25'lik bir değişim sergilemiştir. P değerleri ise 0,05'ten büyük olduğu için MMP-1 ile kat oranı arasında istatiksel olarak anlamlı bir değişim göstermemektedir. Kat oranları

karşılaştırıldığında ise; grup 2 (p= 0,51) ve grup 3 (p= 0,25)'ün p değerleri 0.05'ten büyük olduğundan dolayı anlam saptanamamıştır.

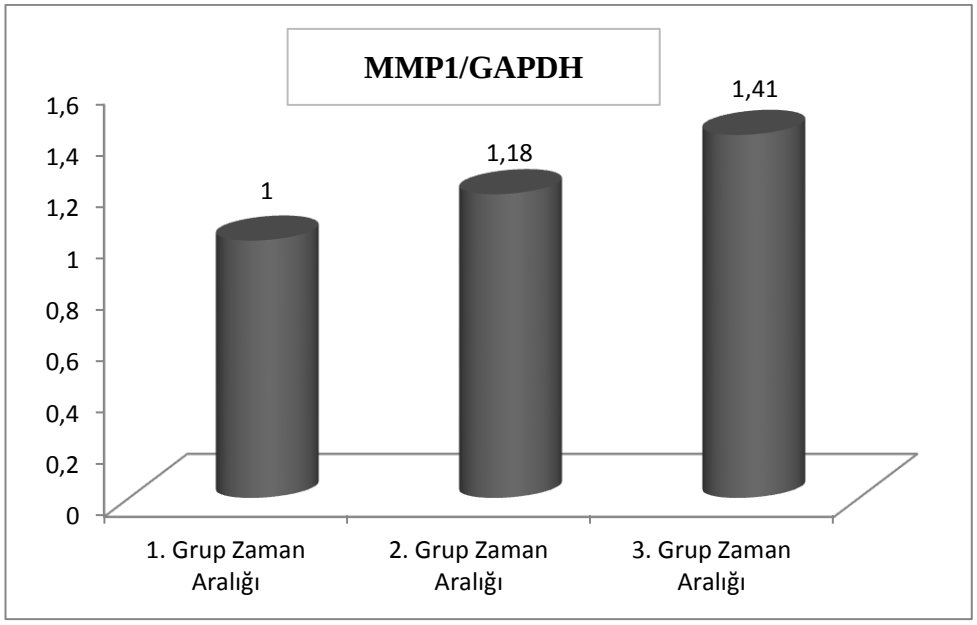
Grupların ölüm zaman aralıklarındaki protein ekspresyonuna bakıldığında elde edilen oran şekil 3.2'de gösterilmiştir. MMP-1 seviyeleri, postmortem doku örneklerinin ölüm zaman aralığındaki protein ekspresyonuna bakılan vakalardan grup 2 (12-18 saat zaman aralığı) ve grup 3 (18-27 saat zaman aralığı)'ün her ikisinin de, grup 1 (0- 12 saat zaman aralığı)'e göre artış sergilediği kaydedilmiştir.

Vakalar ölüm şekillerine göre kıyaslığında (şekil 3) ise: hastanede yatanlar, kalp damar hastalığı dahil ani ölüm (A.S. dahil) ve kalp damar hastalığı hariç ani ölüm (A.S hariç) şeklinde ayrılmıştır. Vakalar şekil 3.3'te belirtildiği gibi kendi içlerinde zamana göre kıyaslandığında, grup 2 ve grup 3 (12- 27 saat zaman aralığı) grup 1 (0- 12 saat zaman aralığı)'e oranla her 3 ölüm şeklinde de MMP-1 ekspresyon oranının yüksek olduğu saptandı. Ancak bu artış ifadesinin istatiksel anlamlılığına (P>0,05 olduğu için) ulaşılamadı.

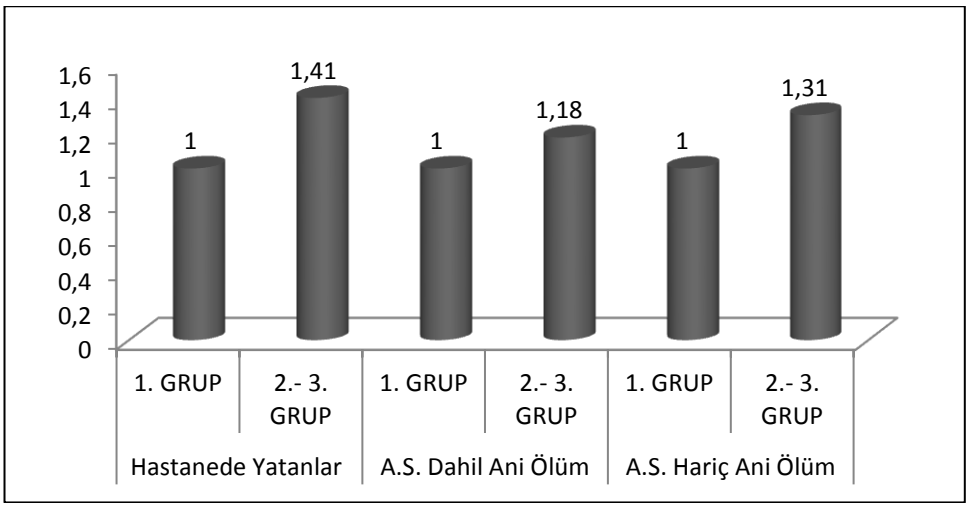
Yapılan analizlere göre ölüm zaman aralıkları ve şekillerine göre bakıldığında MMP-1 protein ekspresyonu analiz edildiğinde anlamlı derecede artış olduğu şekillerde de belirtildi; ancak saptanan bu artışın kat oranları istatiksel anlamlılığa (P>0,05 olduğu için) ulaşamadığı kaydedildi.

		n(%)	fold change	p
MMP-1	0-12 SAAT	3 (15%)	0,23 ± 0,24	0,51
	12-18 SAAT	9 (42,5%)	1,18± 0,27	
	0-12 SAAT	3 (15%)	0,23 ± 0,24	0,25
	18-27 SAAT	9 (42,5%)	1,41± 0,33	

Şekil 3.1. MMP-1 Ölüm Saatlerine Göre Kat Oranları



Şekil 3.2. MMP-1 Ölüm Zamanına Göre Protein Ekspresyonu

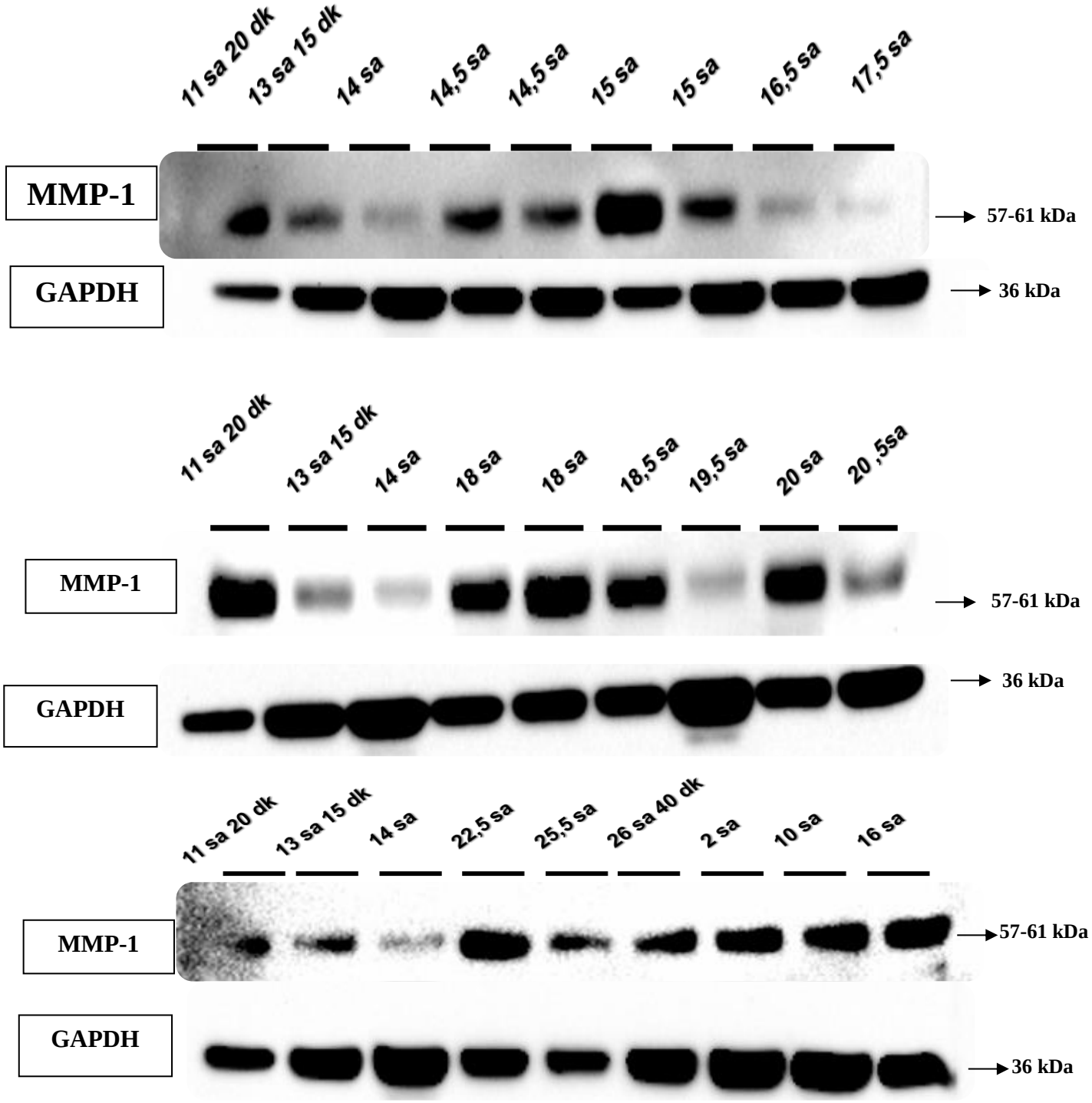


Şekil 3.3. MMP-1 İfadesinin Ölüm Şekillerine Göre Protein Ekspresyonu

3.1.1. MMP-1 Western Blot Analiz Sonuçları

Postmortem dokuları ölüm saati ile otopsi saati arasındaki zaman aralığına göre eşit miktarlarda olacak şekilde en kısa zamandan en uzun zamana göre gruplara ayrıldı. Ölüm saati ve proteazlar arasındaki ilişki Western Blot Analizi ile tayin

edildi. Analizde ölüm şekilleri de dahil olduğu için her bir proteaza göre Western sonucu değişmektedir. MMP-1 57-61 kDa ağırlığındadır.



Şekil 3.4. MMP-1 Western Blot Görüntüsü

3.2. MMP-2 Elde Edilen Bulgular

Şekil 3.5'te bahsedilen ölüm zaman aralığı ve kat değişim tablosuna göre; 2. Grup zaman aralığı (p=0,001) ve grup 3 zaman aralığı (p=0,007) kat artış oranları P değerleri 0,05'ten küçük olduğu için MMP-2 ile kat oranı arasında istatiksel olarak anlamlı bir değişim ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla, MMP-2 ile ölüm zamanı arasında anlamlı bir değişim saptanmaktadır.

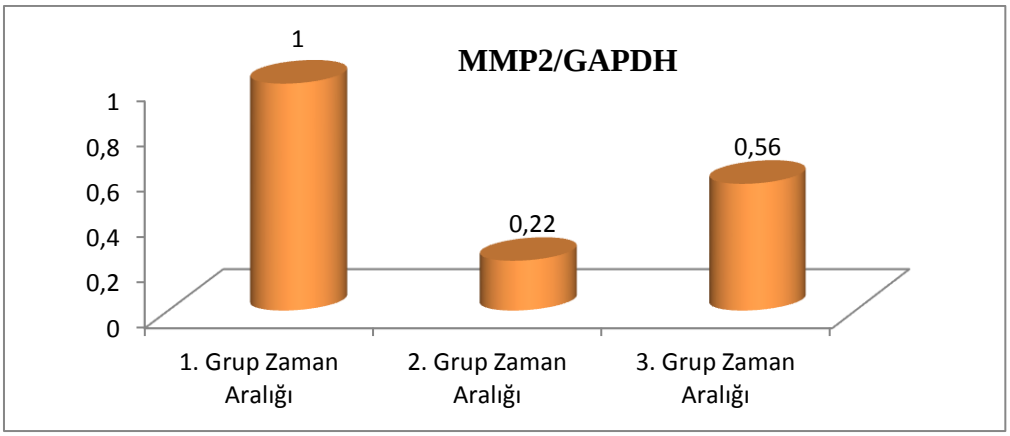
Grupların ölüm zaman aralıklarındaki protein ekspresyonuna bakıldığında elde edilen fark şekil 3.6'da gösterilmiştir. Postmortem doku örneklerinin ölüm zaman aralığındaki MMP-2 seviyelerinin ekspresyonuna bakılan vakalardan, grup 2 (12-18 saat zaman aralığı)'nin grup 1 (0- 12 saat zaman aralığı)'e göre yaklaşık %80'lik düşüş sergilerken; grup 3 (18-27 saat zaman aralığı)'ün grup 1 (0- 12 saat zaman aralığı)'e kıyasla yaklaşık %40 azalış gösterdiği kaydedilmiştir. Bu azalış oranına bakılarak, MMP-2'nin ölüm saatinin giderek artması ile protein ekspresyonun giderek azalması sonucuna varıldı.

Vakalar ölüm şekillerine göre kıyaslığında ise: şekil 3.7'de belirtildiği gibi grup 2 ve grup 3 (12- 27 saat zaman aralığı), grup 1 (0- 12 saat zaman aralığı)'e oranla her 3 ölüm şeklinde de MMP-2 ekspresyon oranının düşük olduğu belirtildi. Gözlemlenen protein ekspresyonundaki bu düşüş; kat oranı ile kıyaslandığından ise "Hastanede Yatanlar" grubunun p değeri 0,019, "A.S. Dahil Ölenler" grubu p değeri 0 ve "A.S. Hariç Ölenler" grubunun p değeri 0 olarak kaydedilmiştir. Ölüm şekillerine göre ayırdığımız her üç grubun da p değerleri 0,05 değerinden küçük olduğu için, MMP-2 ile ölüm şekli arasında kat oranlarının istatiksel değeri ($P<0,05$ olduğu için) anlamlı farklılık vardır.

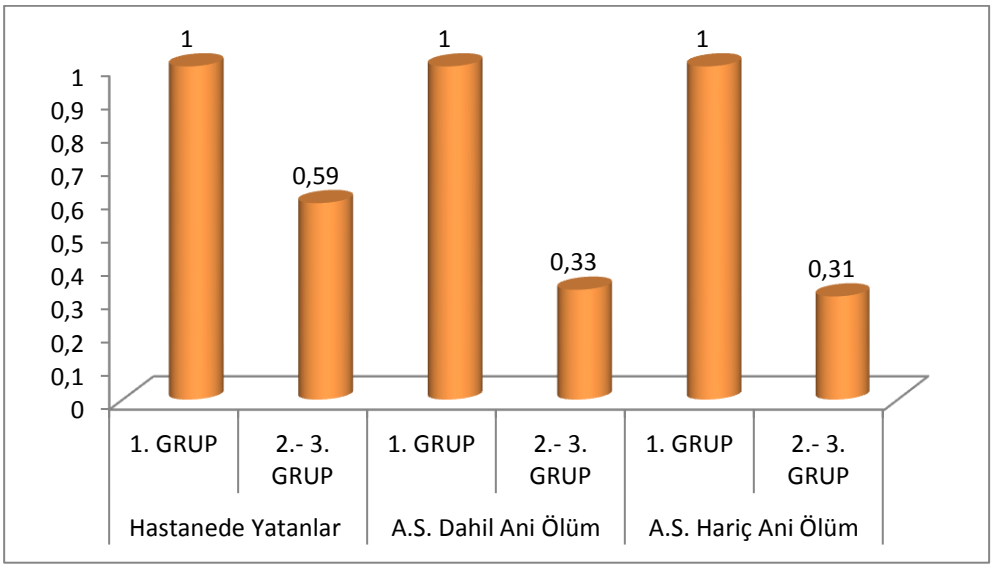
Yapılan analizlere göre ölüm zaman aralıkları ve şekillerine göre bakıldığında MMP-2 protein ekspresyonu analiz edildiğinde düşüş olduğu şekillerde de belirtildi; saptanan bu azalışın kat oranları istatiksel değeri ($P<0,05$ olduğu için) anlamlı olduğu desteklendi.

		n(%)	fold change	p
MMP-2	0-12 SAAT	3 (15%)	0,26 ± 0,18	0,001
	12-18 SAAT	9 (42,5%)	0,22± 0,59	
	0-12 SAAT	3 (15%)	0,26 ± 0,18	0,007
	18-27 SAAT	9 (42,5%)	0,56± 0,12	

Şekil 3.5. MMP-2 Ölüm Saatlerine Göre Kat Oranları



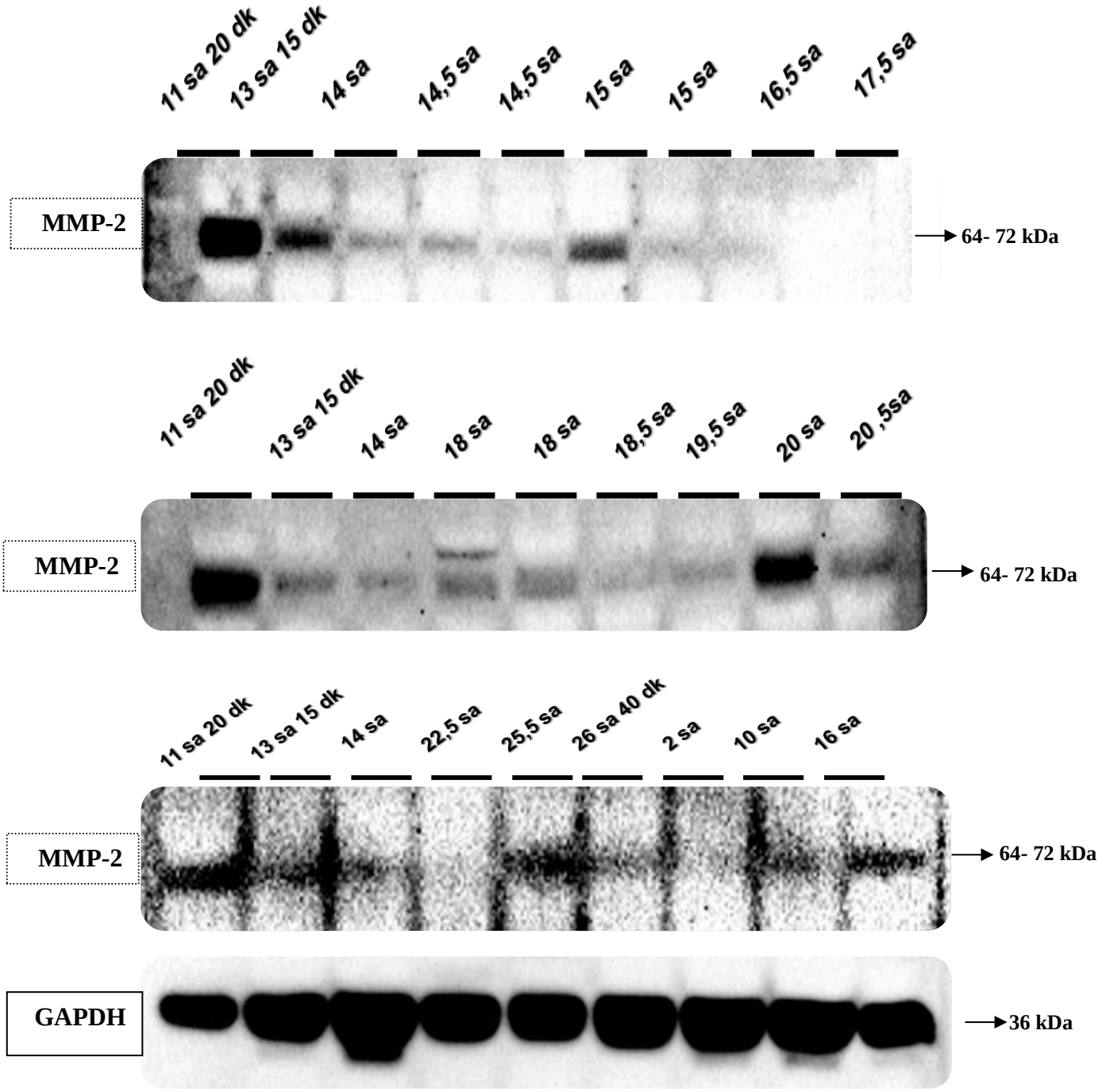
Şekil 3.6. MMP-2 Ölüm Zamanına Göre Protein Ekspresyonu



Şekil 3.7. MMP-2 İfadesinin Ölüm Şekillerine Göre Protein Ekspresyonu

3.2.1. MMP-2 Western Blot Analizi Sonuçları

Postmortem iskelet kas dokuları ile ölüm saati ve ölüm şeklinde göre proteazlardaki değişiklik Western Blot Analizi ile belirlendi. MMP-2 64-72 kDa ağırlığındadır.



Şekil 3.8. MMP-2 Western Blot Görüntüsü

3.3. MMP-9 Elde Edilen Bulgular

Ölüm zaman aralığı kat değişim tablosuna bakıldığında (şekil 3.9); 2. Grup zaman aralığı (p=0,004) 1. Grup zaman aralığına göre kat artış oranı P değeri 0,05'ten küçük olduğu için MMP-9 ile kat oranı arasında istatiksel olarak anlamlı bir değişim saptanmaktadır. Grup 3 zaman aralığı ise, 1. Grup zaman aralığına göre kıyaslandığında, kat artış oranı (p=0,33) 0,05'ten büyük olduğu için anlam tespit edilememiştir.

Grupların ölüm zaman aralıklarındaki protein ekspresyonuna bakıldığında elde edilen fark şekil 3.10'da gösterilmiştir. Örnek dokuların ölüm zaman aralığındaki MMP-9 seviyelerinin ekspresyonuna bakılan vakalardan, grup 2 (12-18 saat zaman aralığı)'nin grup 1 (0- 12 saat zaman aralığı)'e göre yaklaşık %32'lik düşüş sergilerken; grup 3 (18-27 saat zaman aralığı)'ün grup 1 (0- 12 saat zaman aralığı)'e kıyasla yaklaşık %13'lük azalış saptanmaktadır. Bu azalma farkına bakılarak, MMP-9'un ölüm saatinin giderek artması ile protein ekspresyonun giderek azalması sonucuna ortaya çıkmaktadır.

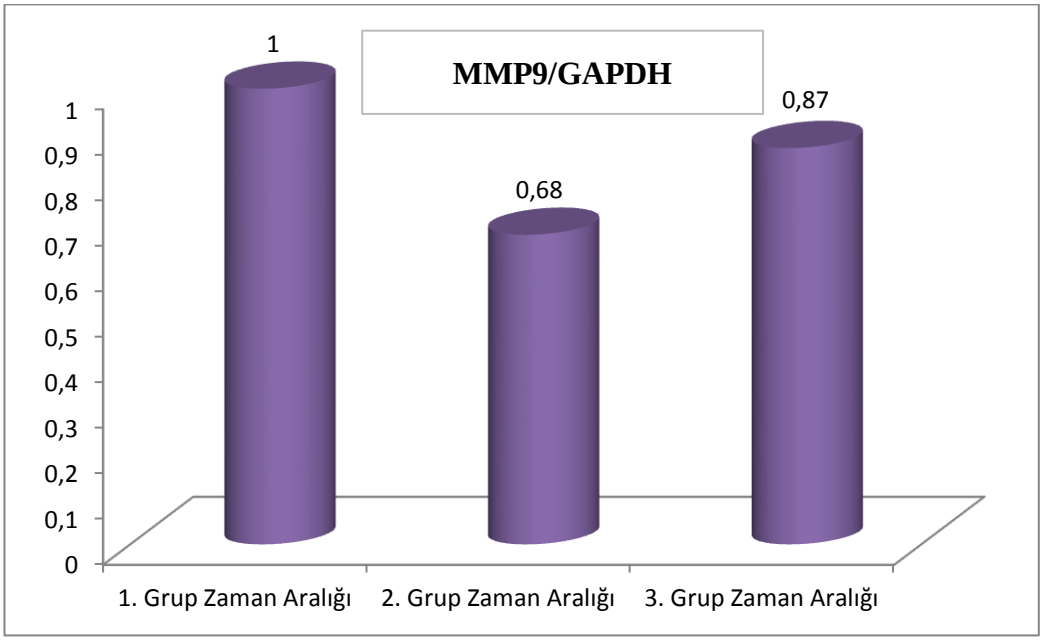
Vakalar ölüm şekillerine göre kıyaslığında ise: şekil 3.11'de belirtildiği gibi grup 2 ve grup 3 (12- 27 saat zaman aralığı), grup 1 (0- 12 saat zaman aralığı)'e oranla her 3 ölüm şeklinde de MMP-9 ekspresyon miktarında azalış olduğu kaydedildi. Gözlemlenen protein ekspresyonundaki bu düşüş; kat oranı ile kıyaslandığından ise "Hastanede Yatanlar" grubunun p değeri 0,4 ve "A.S. Hariç Ölenler" grubunun p değeri 0,43 iken; "A.S. Dahil Ölenler" grubu p değeri 0 olarak hesaplandı. "Hastanede Yatanlar" ve "A.S. Hariç Ölenler" grubunun p değerleri 0,05 değerinden büyük olduğu için, MMP-9 ile ölüm şekli arasında kat oranlarının istatiksel değeri P>0,05 olduğu için anlamlılığa ulaşmadığı saptandı.

Yapılan analizlere göre ölüm zaman aralıkları ve şekillerine göre bakıldığında MMP-9 protein ekspresyonu analiz edildiğinde düşüş olduğu şekil 3.10 ve şekil 3.11'de belirtildi. Saptanan bu azalışın kat oranlarına bakıldığında ise MMP-9 ile ölüm saati arasındaki ilişkiye göre grup 2'nin istatiksel değerinin (P<0,05 olduğu için) anlamlı olduğu kaydedildi. MMP-9 ve ölüm şekillerine göre yapılan

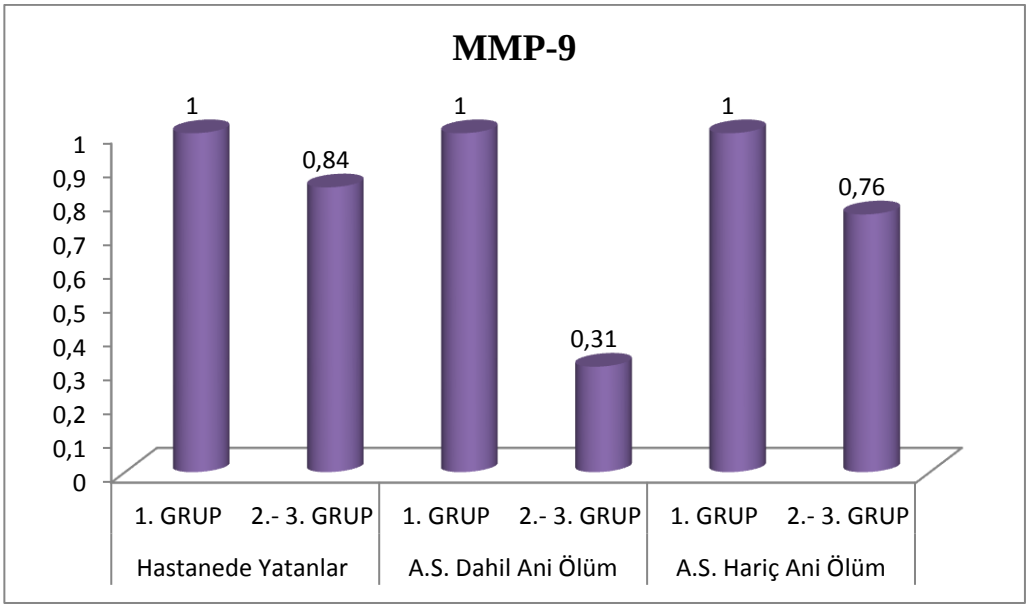
kıyaslamada ise "kalp damar hastalığı dahil ani ölüm"ün (A.S. dahil ani ölüm) istatiksel değeri P<0,05 olduğu için anlamlı tespit edildi.

		n(%)	fold change	p
MMP-9	0-12 SAAT	3 (15%)	0,40± 0,21	0,004
	12-18 SAAT	9 (42,5%)	0,68± 0,08	
	0-12 SAAT	3 (15%)	0,40± 0,21	0,33
	18-27 SAAT	9 (42,5%)	0,87± 0,11	

Şekil 3.9 MMP-9 Ölüm Saatlerine Göre Kat Oranları



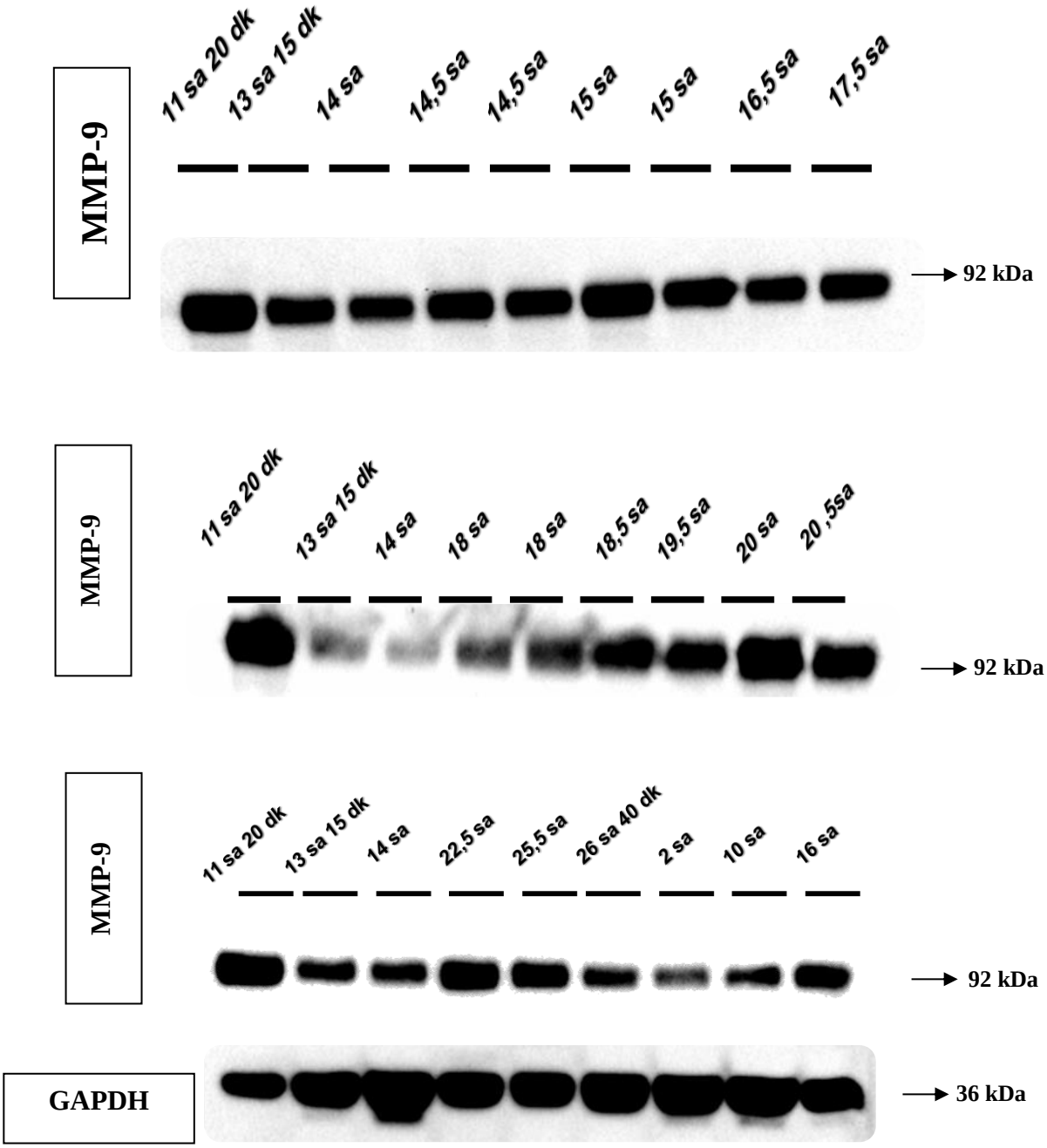
Şekil 3.10. MMP-9 Ölüm Zamanına Göre Protein Ekspresyonu



Şekil. 3.11. MMP-9 İfadesinin Ölüm Şekillerine Göre Protein Ekspresyonu

3.3.1. MMP-9 Western Blot Analizi Sonuçları

Postmortem iskelet kas dokuları ile ölüm saati ve ölüm şeklinde göre proteazlardaki değişiklik Western Blot Analizi ile belirlendi. MMP-9 92 kDa ağırlığındadır Sonuçlara bakıldığında; ilerleyen saatlerde western ifadesinde bir artış sergilenirken; erken saatlerde ekspresyon oldukça az gözükmektedir.



Şekil 3.12. MMP-9 Western Blot Görüntüsü

3.4. ADAMTS-1 Elde Edilen Bulgular

Kat değişim ile ölüm zaman aralığı tablosuna bakıldığında (Şekil 3.13); 2. Grup zaman aralığı (p=0,42) 1. Grup zaman aralığına göre P değeri 0,05'ten büyük

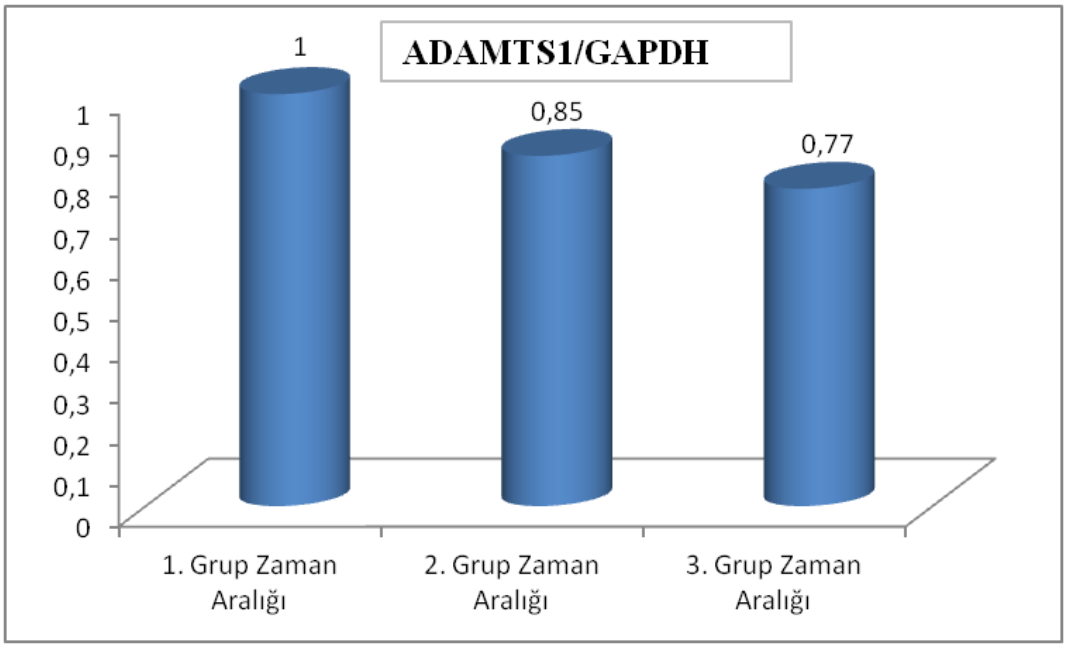
olduğundan dolayı ADAMTS-1 ile kat oranı arasında istatiksel olarak anlamlı bir değişim saptanamamaktadır. Grup 3 zaman aralığı (0,015) ; 1. Grup zaman aralığına göre; istatiksel değerinin (P<0,05 olduğu için) anlamlı olduğu kaydedildi.

Grupların ölüm zaman aralıklarındaki protein ekspresyonuna araştırıldığında ise şekil 3.14'teki tablo ortaya çıkmaktadır. Dokuların ölüm zaman aralığındaki ADAMTS-1 seviyelerinin ekspresyonuna çalışılan vakalardan, grup 2 (12-18 saat zaman aralığı)'nin grup 1 (0- 12 saat zaman aralığı)'e göre yaklaşık %15'lik düşüş sergilerken; grup 3 (18-27 saat zaman aralığı)'ün ise grup 1 (0- 12 saat zaman aralığı)'e oranla yaklaşık %23 azalış saptanmaktadır. Bu azalış oranına bakılarak, ADAMTS-1'in ölüm saatinin artması ile protein ekspresyonun giderek azalması sonucu doğmaktadır.

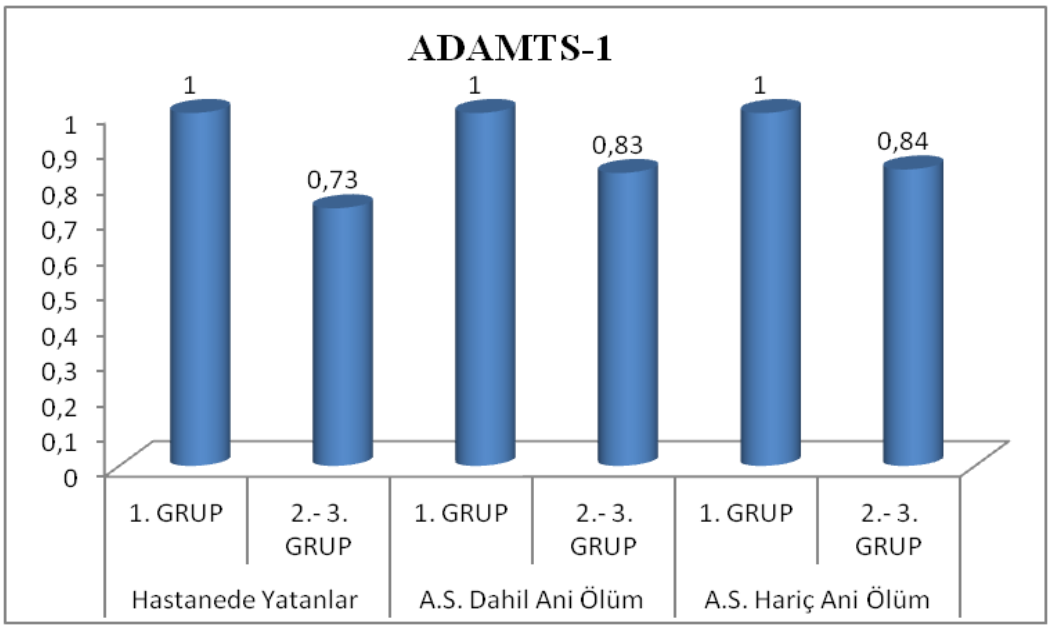
Vakalar ölüm şekillerine göre kıyaslığında ise: şekil 3.15'teki gibi grup 2 ve grup 3 (12- 27 saat zaman aralığı), grup 1 (0- 12 saat zaman aralığı)'e oranla her 3 ölüm şeklinde de ADAMTS-1 ekspresyon miktarında azalış olduğu kaydedildi. Kaydedilen protein ekspresyonundaki bu azalma; kat oranı ile kıyaslandığında; "Hastanede Yatanlar" grubunun p değeri 0,1; "A.S. Dahil Ölenler" grubunun p değeri 0,21; "A.S. Hariç Ölenler" grubunun p değeri ise 0,33 olarak hesaplandı. Ölüm şekline göre her 3 grubun p değerleri 0,05 değerinden büyük olduğu için, ADAMTS-1 ile ölüm şekli arasında kat oranlarının istatiksel değeri P>0,05 olduğu için anlamlılığa ulaşmadığı kaydedildi.

		n(%)	fold change	p
ADAMTS1	0-12 SAAT	3 (15%)	0,49 ± 0,32	0,42
	12-18 SAAT	9 (42,5%)	0,85 ± 0,16	
	0-12 SAAT	3 (15%)	0,49 ± 0,32	0,015
	18-27 SAAT	9 (42,5%)	0,77 ± 0,072	

Şekil 3.13. ADAMTS-1 Ölüm Saatlerine Göre Kat Oranları



Şekil 3.14. ADAMTS-1 Ölüm Zamanına Göre Protein Ekspresyonu

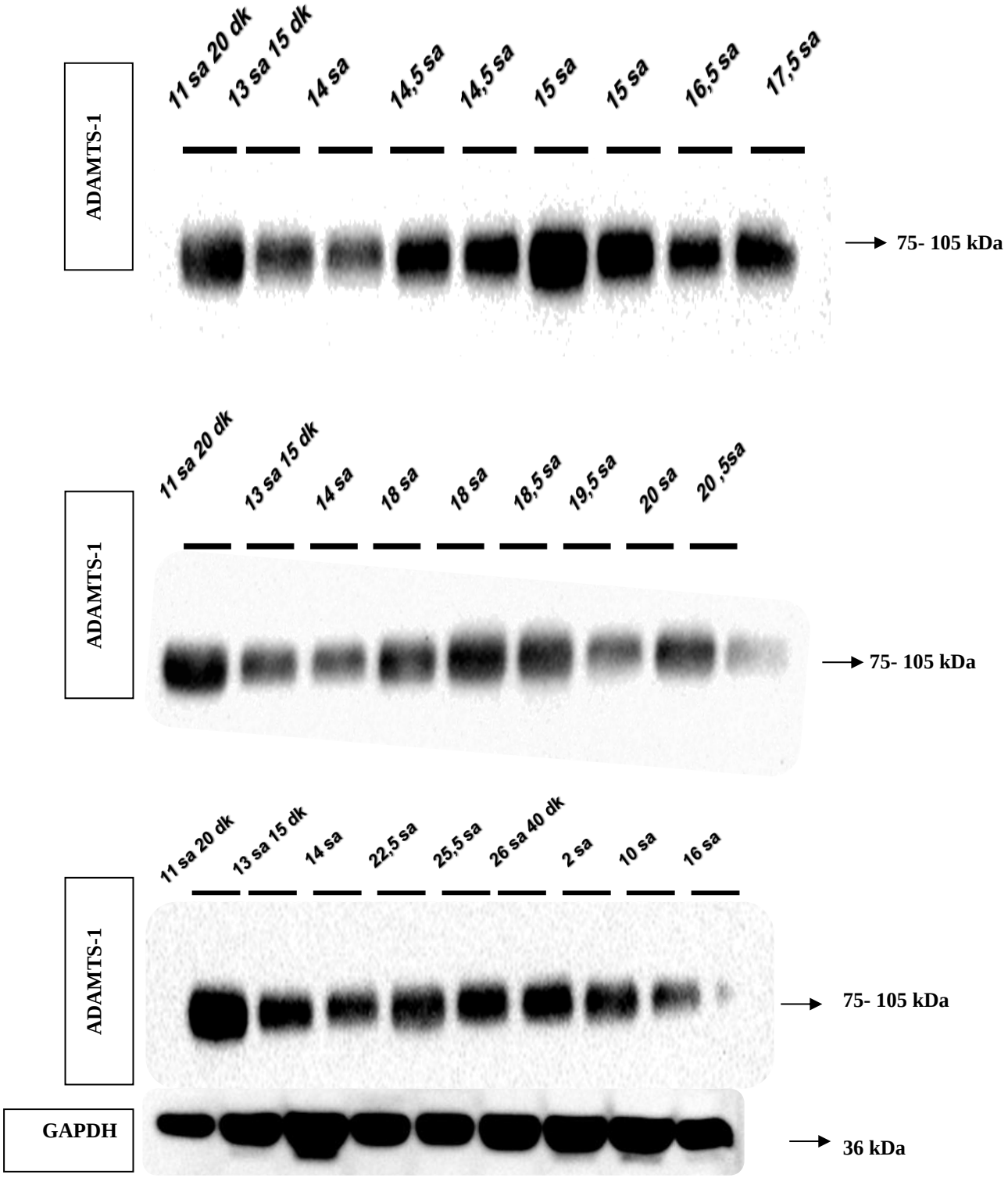


Şekil 3.15. ADAMTS-1İfadesinin Ölüm Şekillerine Göre Protein Ekspresyonu

3.4.1. ADAMTS-1 Western Blot Analizi Sonuçları

Postmortem iskelet kas dokuları ile ölüm saati ve ölüm şeklinde göre proteazlardaki değişiklik Western Blot Analizi ile belirlendi. ADAMTS-1 75-105 kDa ağırlığındadır.

Analizlere göre; ilerleyen saatlerde western ifadesinde bir azalış sergilenirken; erken saatlerde ekspresyon oldukça yüksek gözükmektedir.



Şekil 3.16. ADAMTS-1Western Blot Görüntüsü

3.5. ADAMTS-5 Elde Edilen Bulgular

Ölüm zaman aralığı ile kat oran grafiğine bakıldığında (Şekil 3.17); 2. grup zaman aralığı (p=0,06) ve 3. grup zaman aralığı (p=0,59), 1. grup zaman aralığına göre, kat artış değişimi P>0,05'ten olduğu için anlam tespit edilemedi.

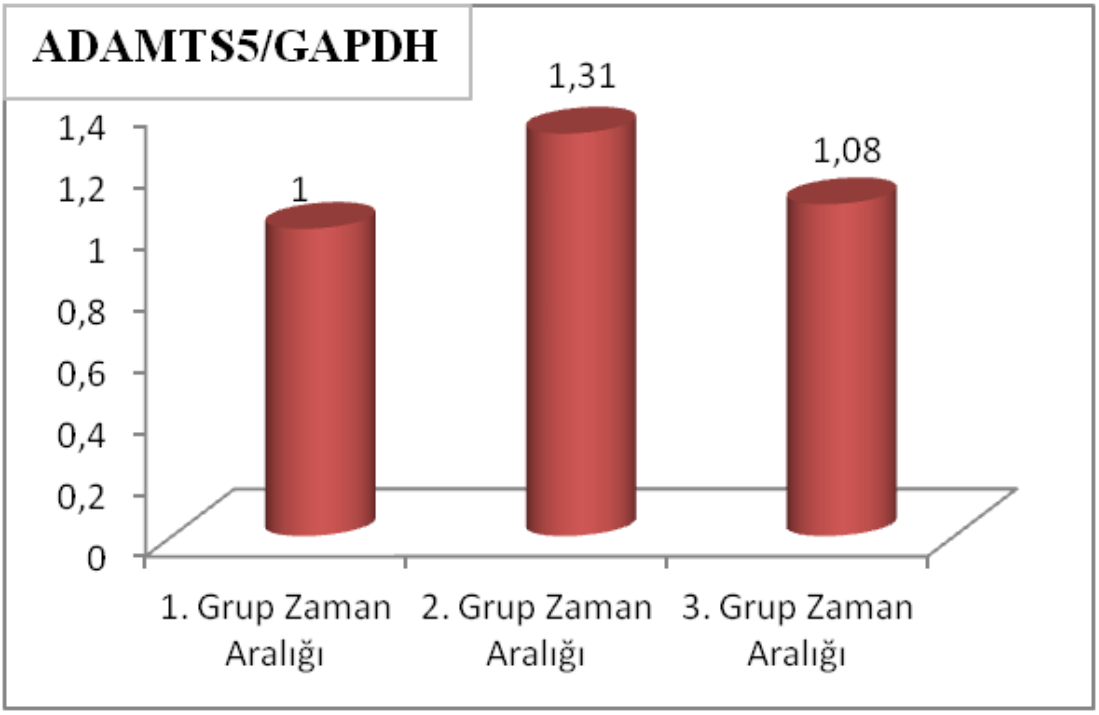
Grupların ölüm zaman aralıklarındaki protein ekspresyonu şekil 3.18'de belirtildi. Dokuların ölüm zaman aralığındaki ADAMTS-5 seviyelerinin ekspresyonu, grup 2 (12-18 saat zaman aralığı)'nin grup 1 (0- 12 saat zaman aralığı)'e göre yaklaşık %31'lik artış gösterirken; grup 3 (18-27 saat zaman aralığı)'ün grup 1 (0- 12 saat zaman aralığı)'e kıyasla yaklaşık %0,8'lik artış kaydedildi. Bu artma oranı göz önüne alınarak, ADAMTS-5'in ölüm saatinin artması ile protein ekspresyonun artması sonucuna varıldı.

Vakalar ölüm şekillerine göre kıyaslığında ise: şekil 3.19'da belirtildiği gibi grup 2 ve grup 3 (12- 27 saat zaman aralığı), grup 1 (0- 12 saat zaman aralığı)'e oranla her 3 ölüm şeklinde de ADAMTS-5 ekspresyon miktarında artış olduğu saptandı. Kaydedilen bu artış; kat oranı ile kıyaslandığında ise "Hastanede Yatanlar" grubu (0,87), "A.S. Dahil Ölenler" grubu (0,13) ve "A.S. Hariç Ölenler" grubu (0,17) p değerleri 0,05 değerinden büyük olduğu için, ADAMTS-5 ile ölüm şekli arasında kat oranlarının istatiksel değeri arasında anlamlı iliş kiye ulaşılamadığı saptandı.

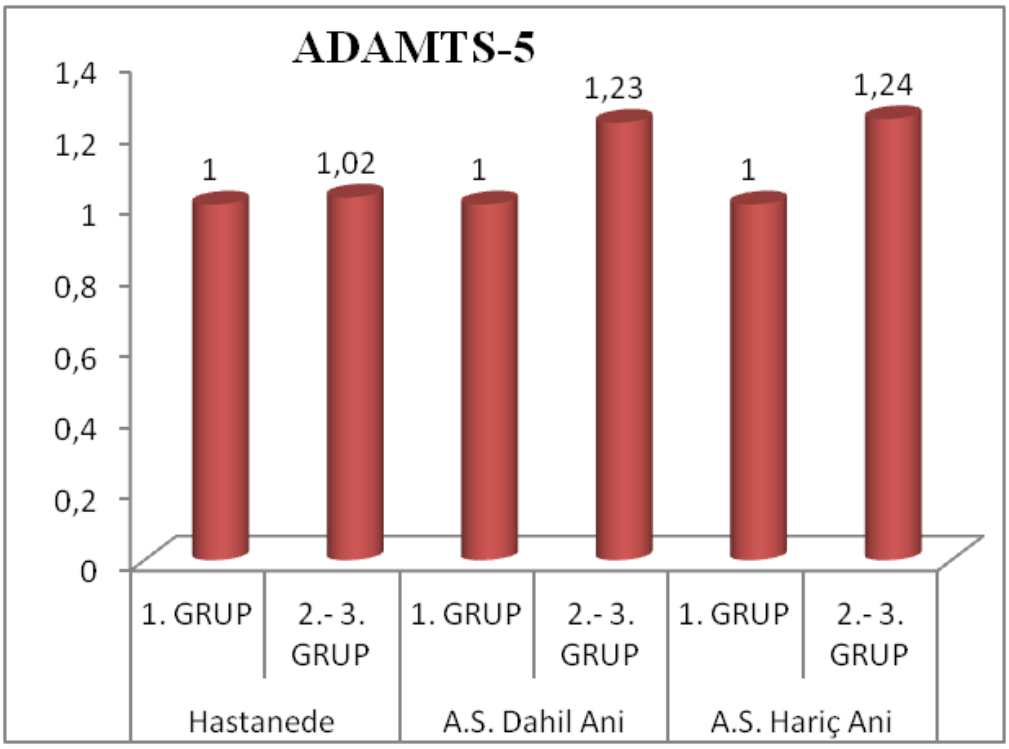
Yapılan analizlere göre ölüm zaman aralıkları ve şekillerine göre bakıldığında ADAMTS-5 protein ekspresyonu analiz edildiğinde artış olduğu şekil 3.18 ve şekil 3.19'da ifade edildi. Kaydedilen bu artışın kat oranlarına bakıldığında ise ADAMTS-5 ile ölüm saati arasındaki ilişkiye göre grup 2 ve grup 3'ün istatiksel değerinin P>0,05 olduğu için anlamlı olmadığı belirtildi. ADAMTS-5 ile ölüm şekillerine göre yapılan karşılaştırmada ise her üç ölüm şekli grubunun da p değerleri 0,05 değerinden büyük olduğu için, ADAMTS-5 ile ölüm şekli arasında istatiksel değerin (P>0,05 olduğu için) anlamlılığa ulaşmadığı saptandı.

		n(%)	fold change	p
ADAMTS5	0-12 SAAT	3 (15%)	0,38± 0,28	0,06
	12-18 SAAT	9 (42,5%)	1,31± 0,14	
	0-12 SAAT	3 (15%)	0,38± 0,28	0,59
	18-27 SAAT	9 (42,5%)	1,08± 0,16	

Şekil 3.17. ADAMTS-5 Ölüm Saatlerine Göre Kat Oranları



Şekil 3.18. ADAMTS-5 Ölüm Zamanına Göre Protein Ekspresyonu

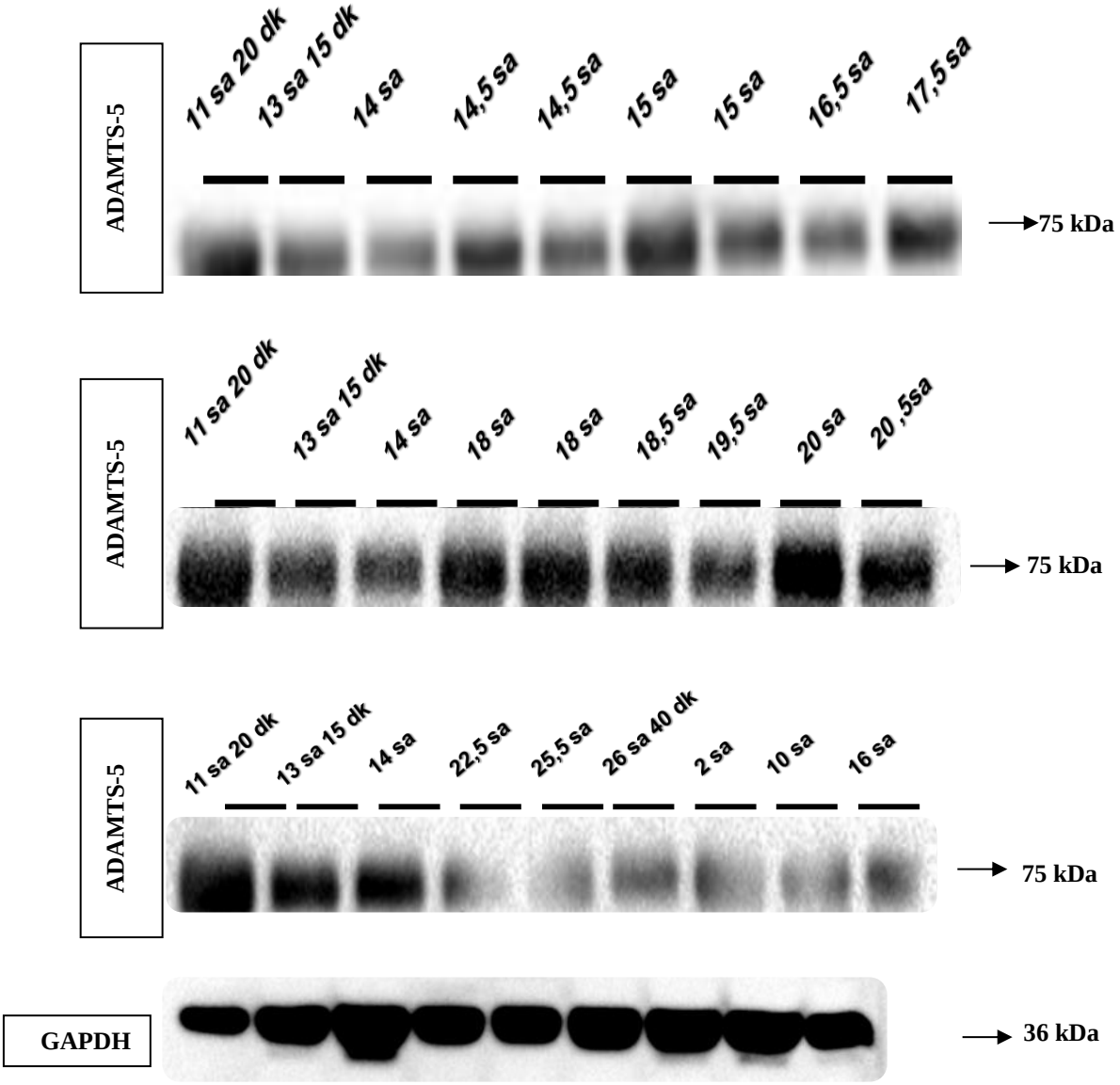


Şekil 3.19. ADAMTS-5 İfadesinin Ölüm Şekillerine Göre Protein Ekspresyonu

3.5.1. ADAMTS-5 Western Blot Analizi Sonuçları

Postmortem iskelet kas dokuları ile ölüm saati ve ölüm şeklinde göre proteazlardaki değişiklik Western Blot Analizi ile belirlendi. ADAMTS-5 75 kDa ağırlığındadır.

Analizlere göre; ilerleyen saatlerde western ifadesinde bir artış sergilenirken; erken saatlerde ekspresyon oldukça az gözükmektedir.



Şekil 3.20. ADAMTS-5Western Blot Görüntüsü

3.6. ADAMTS-9 Elde Edilen Bulgular

Ölüm zaman aralığına göre kat değişim grafiğine bakıldığında (şekil 3.21); 2. Grup zaman aralığı (p=0) ve 3. Grup zaman aralığı (p=0), 1. Grup zaman aralığına göre P değeri 0,05'ten küçük olduğu için ADAMTS-9 ile aralarında istatiksel olarak anlamlı bir değişim saptandı.

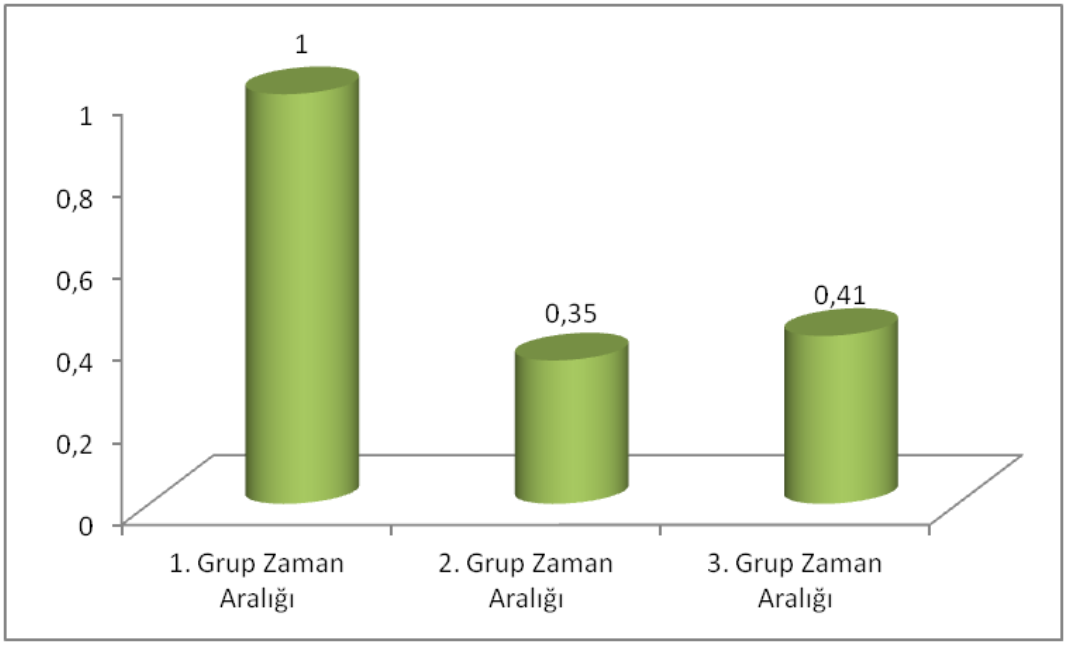
Şekil 3.22'de belirtildiği üzere grupların ölüm zaman aralıklarındaki ADAMTS-9 seviyelerinin ekspresyonu, grup 2 (12-18 saat aman aralığı)'nin grup 1 (0- 12 saat zaman aralığı)'e göre yaklaşık %65'lik azalış gösterirken; grup 3 (18-27 saat zaman aralığı)'ün grup 1 (0- 12 saat zaman aralığı)'e oranla yaklaşık %59'luk azalma olduğu belirtildi. Bu azalma oranına bakılarak, ADAMTS-9'un ölüm saatinin artması ile protein ekspresyonun azalış neticesine varıldı.

Vakalar ölüm şekillerine göre kıyaslığında ise: şekil 3.23'te belirtildiği üzere grup 2 ve grup 3 (12- 27 saat zaman aralığı), grup 1 (0- 12 saat zaman aralığı)'e oranla "Hastanede Yatanlar" grubu ve "A.S. Hariç Ölenler" grubu azalırken; "A.S. Dahil Ölenler " grubu artış sergilemektedir. "Hastanede Yatanlar" grubu ve "A.S. Hariç Ölenler" grubunda gözlenen azalma kat oranı ile kıyaslandığında; sırasıyla sahip oldukları 0,01 ve 0 p değerleri P<0,05'ten olduğu için ADAMTS-9 ile bu iki ölüm şeklinin kat oranlarının istatiksel değeri arasında anlamlı ilişkiye varıldı. "A.S. Dahil Ölenler " grubunda kaydedilen bu artış ise; kat oranı ile kıyaslandığında (0,49) p değeri 0,05 değerinden büyük olduğu için, ADAMTS-9 ile ölüm şekli arasında kat oranlarının istatiksel değeri arasında anlamlı ilişkiye ulaşılamadığı saptandı.

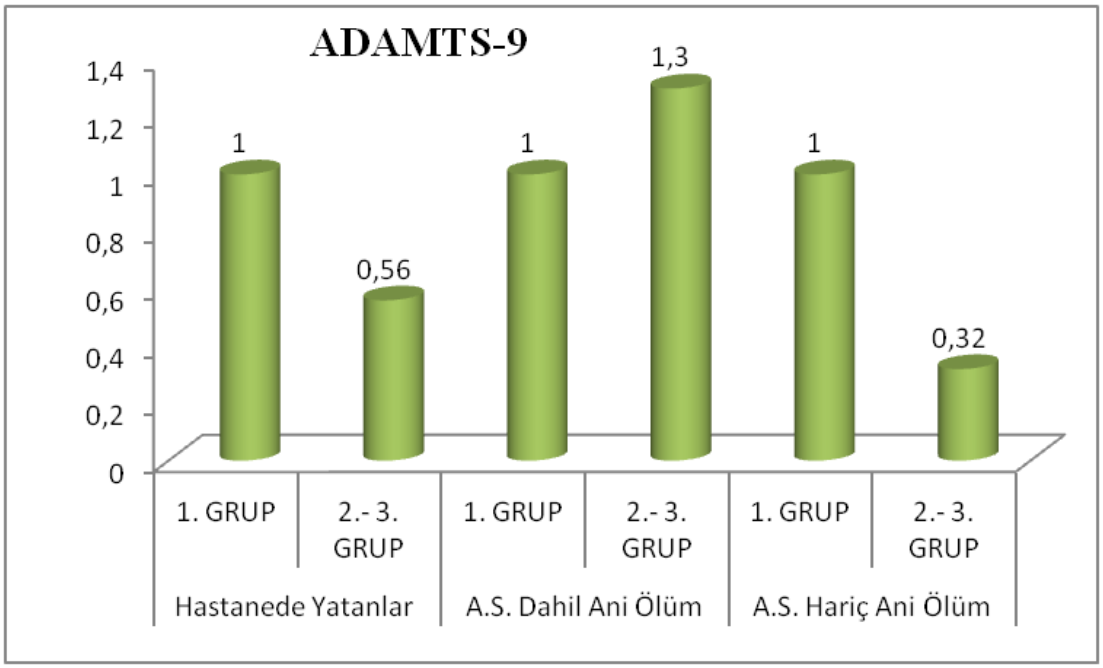
Yapılan analizlere göre ölüm zaman aralıklarına bakıldığında ADAMTS-9 protein ekspresyonu analiz edildiğinde azalma gözlenen şekil 3.22'de ifade edildi. Kaydedilen bu azalma kat oranlarına bakıldığında ise ADAMTS-9 ile ölüm saati arasındaki ilişki grup 2(p=0) ve grup 3 (p=0)'ün istatiksel değerinin (P<0,05 olduğu için) anlamlı olduğu sonucuna varıldı. ADAMTS-9 ile ölüm şekillerine göre yapılan karşılaştırmada ise. "A.S. Dahil Ölenler " grubunun (p=0,49) p değeri 0,05 değerinden büyük olduğu için, ADAMTS-9 ile ölüm şekli arasında istatiksel değerin (P>0,05 olduğu için) anlamlılığa ulaşmadığı sonucuna varılırken; "Hastanede Yatanlar" grubu (0,01) ve "A.S. Hariç Ölenler" grubunun (0) p değerleri 0,05'ten küçük olduğundan dolayı ADAMTS-9 ile bu iki ölüm şekli arasında istatiksel olarak anlamlı ilişkiye varıldı.

		n(%)	fold change	p
ADAMTS9	0-12 SAAT	3 (15%)	0,21 ± 0,13	0
	12-18 SAAT	9 (42,5%)	0,35± 0,08	
	0-12 SAAT	3 (15%)	0,21 ± 0,13	0
	18-27 SAAT	9 (42,5%)	0,41± 0,09	

Şekil 3.21. ADAMTS-9 Ölüm Saatlerine Göre Kat Oranları



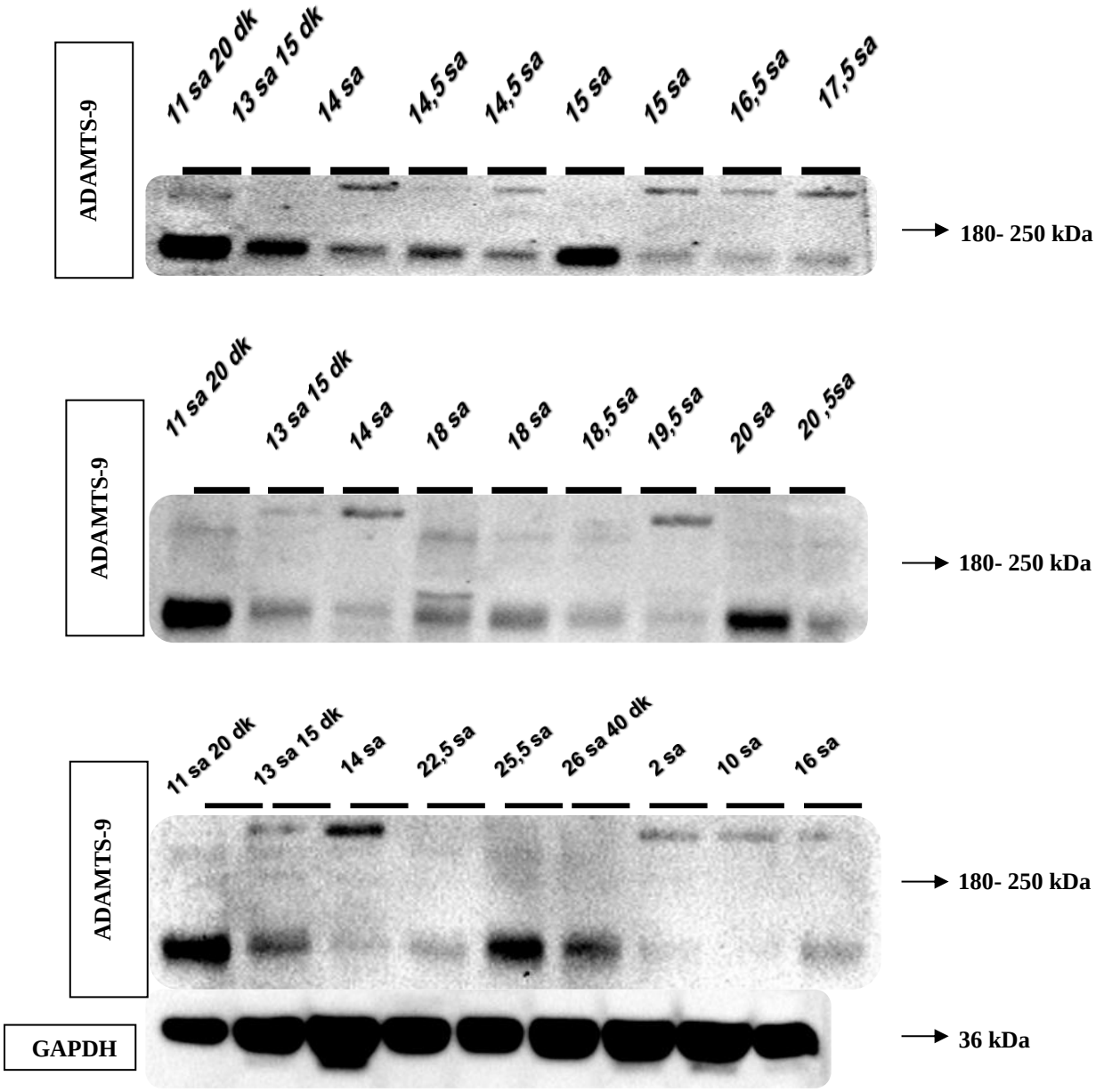
Şekil 3.22. ADAMTS-9 Ölüm Zamanına Göre Protein Ekspresyonu



Şekil 3.23. ADAMTS-9 İfadesinin Ölüm Şekillerine Göre Protein Ekspresyonu

3.6.1. ADAMTS-9 Western Analiz Sonuçları

ADAMTS-9 pro ve pre bandı olmak üzere iki Western görüntüsü verdi. Yaklaşık olarak ağırlığı 180-250 kDa arasındadır.



Şekil 3.24. ADAMTS-9 Western Blot Görüntüsü

Çizelge 3.1. Kullanılan Tüm Proteaz Belirteçleri, Kat Oranı ve Protein Ekspresyon Miktarı

Belirteçler	Grup/Zaman	n(%)	Protein Ekspresyon Miktarı	*p*
ADAMTS1	0-12 SAAT	3 (15%)	0,49± 0,42	0,42
	12-18 SAAT	9 (42,5%)	0,47± 0,21	
	0-12 SAAT	3 (15%)	0,49± 0,42	0,015
	18-27 SAAT	9 (42,5%)	0,33± 0,13	
ADAMTS5	0-12 SAAT	3 (15%)	0,37± 0,21	0,06
	12-18 SAAT	9 (42,5%)	0,17± 0,49	
	0-12 SAAT	3 (15%)	0,37± 0,21	0,59
	18-27 SAAT	9 (42,5%)	0,17± 0,47	
ADAMTS9 Pre Bant	0-12 SAAT	3 (15%)	0,11 ± 0,17	0,67
	12-18 SAAT	9 (42,5%)	0,26± 0,14	
	0-12 SAAT	3 (15%)	0,11 ± 0,17	0,34
	18-27 SAAT	9 (42,5%)	0,04± 0,04	
ADAMTS9 Pro Bant	0-12 SAAT	3 (15%)	0,21 ± 0,35	0,000
	12-18 SAAT	9 (42,5%)	0,08± 0,05	
	0-12 SAAT	3 (15%)	0,21 ± 0,35	0,000
	18-27 SAAT	9 (42,5%)	0,08± 0,06	
MMP-1	0-12 SAAT	3 (15%)	0,23 ± 0,31	0,51
	12-18 SAAT	9 (42,5%)	0,4± 0,21	
	0-12 SAAT	3 (15%)	0,23 ± 0,31	0,25
	18-27 SAAT	9 (42,5%)	0,2± 0,16	
MMP-2	0-12 SAAT	3 (15%)	0,26 ± 0,23	0,001
	12-18 SAAT	9 (42,5%)	0,06± 0,02	
	0-12 SAAT	3 (15%)	0,26 ± 0,23	0,007
	18-27 SAAT	9 (42,5%)	0,13± 0,11	
MMP-9	0-12 SAAT	3 (15%)	0,4± 0,29	0,004
	12-18 SAAT	9 (42,5%)	0,27± 0,09	
	0-12 SAAT	3 (15%)	0,4± 0,29	0,33
	18-27 SAAT	9 (42,5%)	0,34± 0,14	

4. TARTIŞMA

Dokulara destek ve bütünlük kazanmalarını sağlayana ECM, aynı zamanda yapım, onarım ve yıkım gibi hayati fonksiyonlardan da sorumlu proteazlar içermektedir. Biyokimyasal ve yapısal olarak farklı çeşitlilikte bileşenler içeren ECM'nin sahip olduğu protein yapılı bileşenler ECM proteazlar tarafından yıkılır. ECM'nin yeniden düzenlenmesinde en çarpıcı göreve sahip olan enzimler metalloproteinazlardır (Cawston ve ark., 2010).

Metalloproteinaz ailesinin iki alt sınıfı olan, matriks metalloproteinazlar (MMP) ve trombospondin motifli disintegrin ve mtalloproteinazlar (ADAMTS), ECM yıkımında özelleşmişlerdir. İskelet kasının gelişimi, yeniden düzenlenmesi ve farklılaşmasında da ECM oldukça dinamik rol oynar. ECM sahip olduğu biyokimyasal fonksiyonlardan ötürü hücre düzenlenmesinde oldukça önemli göreve sahiptir (Pengfei ve ark., 2011).

Matriks yıkımı ve dokunun yeniden düzenlenmesi matriks yıkımından sorumlu proteazlar tarafından yapılır ki bunlar da fizyolojik olaylardan sorumludurlar. ECM proteazlarından MMPler de dahil olmak üzere doku yeniden onarımında görev alırlar (Green ve ark., 2005).

Zimowska ve ekibinin 2008 yılında gerçekleştirdikleri çalışmalarında, geçirilen bir kaza veya yaralanma neticesine MMPlerin ECM'nin yeniden düzenlenmesinde rolünü ve MMP-2 ile MMP-9'un iskelet kasındaki miktarını araştırıyorlar. Kaza sonrası 1,3,5,7 ve 14 gün sonrasındaki MMP miktarlarını kaydederek ECM ve iskelet kası ile MMP arasındaki ilişkiyi analiz ettiler. Kullandıkları Western Blot Analizi neticesinde elde ettikleri sonuca göre; MMP-9 protein seviyesi ilk gün rejenerasyonda en yüksek seviyede iken; 14 günün sonucunda giderek azalıyor. MMP-2 protein seviyesi ise ilk gün rejenerasyonda en yüksek seviyede iken; ilerleyen günlerde de seviyesini yüksek miktarda korumakta. Özellikle 7 gün neticesinde MMP-2 protein yaptığı en zirveye ulaşıyor. Daha sonra yavaş yavaş azalmaktadır.

İskelet kası oldukça esnek bir yapıya sahip olmakla birlikte, yaralanmadan hemen sonra yeniden onarım yeteniğine sahip eşsiz bir yapıdır. (Allbrook ve ark., 1981; Chambers ve ark., 1996, Schultz ve ark., 1989). İskelet kasının onarılması iki aşamadan oluşur; miyolizis ve yeniden düzenlenmesinden oluşmaktadır. Miyoliz aşaması bozulmuş iskelet kasının çevresini aktif olarak sarar ve yaralanma- kazadan birkaç gün sonra enflamasyon sürecinin başlamasıyla gerçekleşir. Çeşitli sayıda makrofaj ve lökositler yara ve nekrotik hücrenin fragmenti etrafında toplanır. Teixeira ve ark., 2003; Tidball, 2005). Kasın yeniden düzenlenmesi ise, doku spesifik hücre havuzuna dayanmaktadır ve satellit hücre olarak bilinirler. Satellit hücreler yaralanma anında hemen aktif hale geçerler ve onarım için yeni miyofibril üretimini gerçekleştirmekten sorumludurlar (Mauro, 1961).

Kollajen ECM bileşenlerinden oldukça çok bulunmakla birlikte aynı zamanda hücresel büyüme ve çeşitliliği düzenlemektedir (Wess ve ark., 2005). Kollajenaz olan MMP-1, dokular arasında mevcut bulunan bir kollajenazdır ve çeşitli hücrelerde ifade edilmekle birlikte aynı zamanda dokunun yeniden düzenlenmesinde ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik süreçlerde temel görev almaktadır (Goldberg ve ark., 1986).

Kollajenin apoptozu bloke edebileceği sonucuna yaptıkları araştırma sonucunda varıldı. Porter ve ark., 2005; Wight ve ark., 2004 yaptıkları araştırmada ADAMTS-1 ve ADAMTS-9'un aterosklerozda etkin olduğu açıkladı. Agrekanın kesiminden sorumlu olduğu kadar, ADAMTSler tarafından versikanın kesilmesinde önemli rolleri olduğu belirtildi. Bu yüzden de aterosklerozda ADAMTS proteazlar önem taşımaktadır.

ADAMTS-1 ECM ile ilişkili bir metalloproteinazdır, ve kartilaj proteoglikanı olan, agrekanın yıkımından sorumlu bir proteinazdır. Agrekanın yeniden düzenlenmesi artiküler kartilaj matriksin homeostasizini de düzenleyeceğinden; agrekan biyosentezi veya yıkımındaki herhangi bir artış veya düşüş miktarı patolojik sonuçlar doğurmaktadır (Kuno ve ark., 1998; Kuno ve ark., 1999). ADAMTS-1 aterosklerozla ilişkili en çok çalışılan ADAMTS'tir. (Jones ve ark., 2005)

McCulloch ve ark., 2009 yaptıkları çalışmaya göre; ADAMTS-5 ve ADAMTS-9'un yeni görevi daha keşfedildi. Bu iki proteazın, apoptosiz ile hücrelerin ortadan kalkması ve ECM'nin düzenlenmesinde rol oynadıkları açıklandı.

Hücre-matriks etkileşiminin kaybolması ya da değişmesi gibi durumlarda (apoptozis, hücre ölümü, nekroz gibi) hücre içi sinyal yolaklarını aktive olur. Bu durum da ADAMTS'ler aterosklerozda rol alır. Ateroskleroz, en temel kalp damar nedenli hastalıktır ve batı toplumlarında bir numaralı ölümle sonuçlanan kalp krizine neden olmaktadır. Genetik faktörler başta olmak üzere, hipertansiyon, sigara kullanımı ve tip 2 diyabet gibi çeşitli risk faktörlerden kaynaklanmaktadır. Enflamatuar hücrelerin, yağ ve kolesterol bileşenlerinden oluşan plak formasyonun yapısal değişiminden kaynaklı bir hastalıktır ve hücresel apoptozise neden olmaktadır. (Bui ve ark, 2009; Lusis ve ark., 2004; Glass ve ark., 2001; Weber ve ark., 2008).

Matriks metalloproteinazların apoptozu tetiklediği ve dokuda normal fizyolojik hücre ölüm sürecinde de rol oynadığı literatürde bahsedilmektedir. (Alexander ve ark., 1996)

Çalışmamızda ölüm saatleri bilinen vakaların iskelet kas dokuları ile ECM proteazların ilişkisine araştırılırken; bu korelasyona ölüm şekilleri de dahil edildi. Matriks metalloproteazlarda MMP-1, MMP-2 ve MMP-9 araştırılırken; ADAMTS-1, ADAMTS-5 ve ADAMTS-9 araştırılmıştır.

Vakalarımızdan elde edilen iskelet kasında MMP-1 protein ifade değişimi, 12-18 saat zaman aralığı ve 18-27 saat zaman aralığı olarak bakıldığında, her ikisi de 0-12 saat zaman aralığına göre istatiksel olarak p değeri 0,05'ten büyük olduğu için anlamsız ifade edilirken; MMP-2'nin protein ifadesi ise her iki zaman aralığında da p değerleri 0,05 değerinden küçük olduğu için, ölüm zamanı ile MMP-2 arasında anlamlı değişim tespit edildi.

MMP-9'da ise, 12-18 saat zaman aralığında kat oranı $p<0,05$ olduğundan dolayı anlamlı iken; 18-27 saat zaman aralığı istatiksel değer olarak $p>0,05$ olduğu için anlamlılığa ulaşamadığı tespit edildi. MMPlerden sadece MMP-2 her iki saat

aralığında da (12-18 ve 18-27 saat) anlamlı ifade edildi, ve MMP-9'da da ilk 12-18 saat zaman aralığı 0-12 saate göre anlamlı olarak tespit edildi.

Ölüm zamanına göre protein ifadeleri kıyaslandığında ise, MMP-1 zaman ile protein ifadesi arasında doğru orantılı artış sergilerken; MMP-2 ve MMP-9'da zaman aralığı arttıkça protein ifadelerinde düşüş tespit edildi. Bu ilişkiyi, ölüm ile birlikte hücre dışı matrikste gerçekleşen yıkımı da düşündüğümüzde MMP-9'daki azalış (Garvin et al., 2009) çalışmasındaki gibi benzer gerçekleşmektedir.

Vakaların ölüm şekillerine göre protein ifadeleri kıyaslandığında ise, MMP-1'de her 3 ölüm şeklinin ilerleyen saatlerdeki ifadesi artarken; MMP-2 ve MMP9'da azalmaktadır. Jelatinaz kalp damar sağlığı için plak oluşumunda etkin role sahiptir (Bäck ve ark., 2010). Kollajen biyobelirteç olarak da kullanılabilmektedir. Şöyle ki; kardiyak rahatsızlığı hastalarla yapılan çalışmada alınan ilerlemiş koroner lezyonunda MMP-1 seviyesi oldukça yüksektir. İlerlemiş koroner lezyonunda MMP-1 seviyesi artmaktadır (Inoue ve ark., 2003). MMP-2 ise damar duvarları dahil pek çok hücre de ifade edilmektedir. Normal kan damarında, endotel hücreleri ve düz kas hücreleri MMP-2 üretmektedir (Galis ve ark., 2004; Hanemaaijer,1993). MMP1'in aksine; fibrotik ve nekrotik aterosklerotik plaklar daha az seviyede MMP-2 ve MMP-9 seviyesi ve aktivitesi içermektedir; inhibitörleri ise artmaktadır (de Nooijer ve ark., 2006; Choudhary ve ark., 2006).

MMPler normal, sağlıklı veya dinlenme halindeki dokuda eksprese edilemezken; doku onarımı ya da yenilenmesi esnasında seviyesinde artış görülmektedir (Galis ve ark., 2002). Proteazlar ECM'nin yıkımında görevli olmalarının yanı sıra, çeşitli dokuların ekstrasellüler matriksin yeniden yapılanmasında, kemiğin yeniden modellenmesinde, yara iyileşmesi, anjiyogenez, inflamasyon ve apoptosiste rol alır (Parks ve ark., 1999).

Çinko bağımlı metalloendopeptidaz olan ADAMTSlerdeki durumu ölüm zamanına göre değerlendirdiğimizde, ADAMTS-1 ve ADAMTS-9 ölümden sonra geçen zaman ilerledikçe protein ekspresyonu düşmektedir. ADAMTS-5 ise tam aksine; protein ifadesi zaman ilerledikçe artmaktadır. Her üç ADAMTS grubu da

agrekanaz ailesindendir ve artritte yıkılan kartilajın düzenlenmesinden sorumlu anahtar metalloproteazdır.

ADAMTS-1 ölümden sonra geçen sürenin giderek artması ile ters orantılı olarak azalmaktadır ve her üç ölüm şeklinde de azalış gösterirken; ADAMTS-5 artış göstermektedir.

ADAMTS-9 protein seviyeleri ise; hem 12-18 saat hem de 18-27 saat zaman aralığında istatiksel olarak anlamlı ilişki gözlemlendi. Ölüm saatinin giderek artması ile ADAMTS-9 protein ifadesi, ADAMTS-1 gibi protein ekspresyonunda azalış gösterdi. Ölüm şekillerinde ise; ADAMTS-1'deki gibi "Hastanede Yatanlar" grubu ile "A.S. Hariç Ani Ölümler"de azalış olurken; A.S. dahil ani ölümler ADAMTS-5 gibi artış sergiledi. Gözlemlenen bu artış istatiksel olarak anlamlı ifade edilemez iken; "Hastanede Yatanlar" ile "A.S. Hariç Ani Ölümler"deki azalış anlamlı bir ilişkiye ulaşıldı.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Matriks metalloproteinazlar hücre dışı matriks bileşenlerinin yıkım sürecinde rol aldıklarından dolayı hem biyolojik hem de patolojik olaylarda öneme sahiptirler. Hücre dışı matriksin hücre için sadece yapı görevi oluşturmasının yanı sıra proteolizde görevli çeşitli biyolojik fonksiyonları da yapısında barındırmaktadır. Bu durum da, hücre, hücre dışı membran ve onun katabolizması arasındaki etkileşime ışık tutmaktadır. Şuana kadar 23ten fazla MMP ve 30 civarında ADAM ailesi üyeleri tanımlanmıştır, fakat henüz daha tam olarak biyolojik görevleri ayrıntılı olarak saptanamamıştır.

Metalloproteinazlar için tasarlanan spesifik inhibitörlerin gelecek çalışmalarda önemli rol oynayacağı düşünülmekte. Bu inhibitörler sadece MMPlerin biyolojik rollerini keşfedilmesine katkı sağlamakla kalmayacak; aynı zamanda ECMnin yıkımıyla ilgili hastalıklar için tedavi edici müdahaleler geliştirmekte yardımcı olacağı düşünülmektir (Visse ve ark., 2003).

Yapılan araştırmalar ile ECM proteazlarının yeni ailesinin yapı ve işlevlerinin keşfedilmesi hedeflenmektedir. Çalışmalar doğrultusunda fizyolojik fonksiyonları kadar patolojik durumları da araştırılmaktadır. Son 30 yılda, ADAM ailesinin yeni üyeleri olan ADAM-TS'ler keşfedildi. ECMdeki proteoglikanlar ADAMTS enzimleri tarafından çeşitli biyolojik koşullar altında degrade edilir ve proteolize uğrayan proteoglikan ürünleri hücre dışı koşullarının bütünlüğüne ve sağlık durumuna göre sinyal molekülleri gönderir. Matriksin degrade olan kısınları diğer hücre ve matriks bileşenleri ile sinyal yoluyla etkileşime geçer (Stanton ve ark., 2011). Son 10 yılda bu proteazların fizyolojik ve patofizyolojik koşuldan önemleri saptanmıştır.

Araştırmamızda postmortem dokular ile proteaz ve ölüm saat zaman aralığı arasındaki ilişkiyi analiz ettik. Ölümün gerçekleşmesi ile apoptosis ve nekrozis gibi fizyolojik olaylar ile birlikte dokunun da gireceği fizyolojik stres, yıkım ve doku hasarı gibi süreçler hücrenin bütünlüğünü etkilemektedir.

Çalışmamızzda vakalarımızı ölüm saati ve ölüm şekillerine göre gruplara ayırdık. Özelliklerine göre belirlediğimiz matriks metalloproteinaz sınıflarına göre de aralarındaki ilişki kaydedildi. Proteinazlar hücre dışı matriks yıkımında rol aldıkları için hücre ölümü ile birlikte ifade miktarları da arttı.

Ölüm saatinin artmasıyla protein ekspresyon miktarı giderek artanlar ADAMTS-5 ve MMP-1 iken; MMP-2, MMP-9, ADAMTS-1 ve ADAMTS-9'da bu oran azalmaktadır.

Ölüm şekline göre protein ekspresyon miktarı ilişkisine bakıldığında incelenmek istediğinde ise vakalar, "hastanede yatanlar", "kalp damar hastalığı dahil ani ölüm" (A.S. dahil) ve "kalp damar hastalığı hariç ani ölüm" (A.S hariç) şeklinde üç ayrı gruba ayrılmıştır. Her üç ölüm şeklinde de MMP-1 ekspresyon miktarının yüksek olduğu belirtilirken; MMP-2 ve MMP-9 ekspresyon oranının ise düşük olduğu belirtildi. Bu oran sonucunda, MMP-1 (kollajenaz) ile MMP-2 ve MMP-9(jelatinaz)'un post mortem dokular üzerinde tersinir etkiye sahip olduğuna varıldı.

Ölüm zaman aralıklarındaki protein ekspresyonuna bakıldığında ise, MMP-2 ve MMP-9'da ölüm saatinin giderek artması ile protein ekspresyonun giderek azalması sonucuna ortaya çıkarken; MMP-1 miktarı artmaktadır. Ölüm şeklinde olduğu gibi ölüm saatinde de aynı sonuç ortaya çıkmaktadır.

ADAMTS ailesinin üyeleri ile yapılan çalışmalarda ise, ADAMTS-1 ile ADAMTS-9 ölüm saatinin artması ile protein ekspresyonun giderek azalırken; ADAMTS-5 ekspresyon miktarı artmaktadır.

Ölüm şekillerine göre bakıldığında ise; ADAMTS-1 ekspresyon miktarı her üç grupta da düşerken; ADAMTS-5'te artmaktadır. ADAMTS-9'da ise "Hastanede Yatanlar" grubu ve "A.S. Hariç Ölenler" grubu azalırken; "A.S. Dahil Ölenler " grubu artış sergilemektedir.

ADAMTS-9 protein ekspresyon miktarının "A.S. Dahil Ölenler " grubunda artış göstermesini, Porter ve ark, 2005 çalışmalarında olduğu gibi, ADAMTS-9'un aterosklerozda etkin olduğundan kaynakladığı düşünülmektedir. ADAMTS-5 ve ADAMTS-9 (McCulloch ve ark., 2009) apoptozis ile hücrelerin ortadan

kaldırılmasında ve ECM'nin yeniden düzenlenmesinde aktif rol oynadıkları için, yaptığımız çalışmada ölüm saati ile değişen miktarlarının bu nedenle olabileceği açıklanmaktadır. Proteazlar ile postmortem çalışma gerçekleştirmek, hücre dışı matriks yıkım ve onarımını bizzat gözlemlemek için en uygunudur.

Bu konu ile ilgili olarak yakın gelecekte gerçekleşecek diğer çalışmalarımızda TIMP-3'e bakılarak ADAMTS inhibitörü etkileşimine bakılması düşünülmektedir. Bununla birlikte sonuç ve önerilerimizin daha kuvvetli hale gelebilmesi için vaka sayılarımızın genişletileceği bir çalışma yapılması uygun görülmektedir.

Ölüm saatini veya ölüm sonrası zaman aralığını belirlemek adli bilimlerde cevap bulması gereken soruların en başında gelmektedir.

Yakın zamanda yapılacak araştırmalarda metalloproteinazların, adli bilimler alanına katkı sağlayacak özelliklerinin de ortaya çıkacağını düşünmekteyiz.

ÖZET

Ölüm Zamanı Tayininde Adamts'in Rolü

Şüpheli bir ölüm olayında kişinin ölüm nedeni kadar, ölüm zamanının tesbiti de önemlidir. Günümüzde ölüm zamanının tayininde tek başına kullanılabilecek net bir tayin metodu yoktur. Bu nedenle, tüm faktörler göz önünde bulundurulsa bile "ölüm zamanı" teriminden kaçınmak gerekir. Bununla birlikte, ölümün yaklaşık süresini "interval" yani zaman aralığı olarak belirlemek mümkün olabilir

Adli vakalarda bulunan cesetlerin ölüm zamanının tayin edilmesi olay basamaklarının çözümlenmesinde büyük katkılar sağlamaktadır. Günümüzde yararlanılan adli ve moleküler yöntemler net ölüm saati vermekten ziyade muhtemel ölüm zaman aralığı bilgisi sunmaktadır.

Son zamanlarda çok popüler olan ADAMTS ler ile post mortem ilişkisinin zamana bağlı değişiminin araştırılması post mortem zaman aralığının tayinine ışık tutacağına ve geleceği olacağına inanıyoruz.

Anahtar Kelimeler: ADAM-TS, Ölüm sonrası zaman aralığı

SUMMARY

Role of ADAM-TS for determination of post mortem interval

It is also important to determine the time of death in the case of a suspicious death until the cause of death of the person. Nowadays, there is no method that can be used alone in the determination of time of death. Therefore, even if all factors will be considered "time of death" is the term should be avoided. However, the approximate time of death "interval" that may be able to set the time interval.

In criminal cases, the determination of the time of death of the bodies step in the analysis of events is making a big contribution. Today, forensic and molecular methods utilized time of death rather than provide clear information offers potential death time interval.

In recently, popular ADAMTS s and cell death post mortem intracellular pathways of the relationship between time-dependent changes to investigate the post mortem time interval determination to shed light on the future.

Keywords: ADAM-TS, Post mortem interval

KAYNAKLAR

AGNIHOTRI R, CRAWFORD HC, HARO H, MATRISIAN LM, HAVRDA MC, LIAW L (2001). Osteopontin, a novel substrate for matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) and matrix metalloproteinase-7 (matrilysin). *J Biol* Chem., **276**:28261-7.

ALAMEDDINE HS (2012). Matrix metalloproteinases in skeletal muscles: friends or foes?. *Neurobiol Dis.*, **48**(3): 508- 18.

ALLBROOK D (1981). Skeletal muscle regeneration. *Muscle Nerve,* **4**: 234-45.

ALEXANDER CM, HOWARD EW, BİSSELL MJ, WERB Z (1996). Rescue of mammary epithelial cell apoptosis and entactin degradation by a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 transgene. *J. Cell Biol,* **135**:1669–1677.

BELKIN AM, AKIMOV SS, ZARITSKAYA LS, RATNIKOV BI, DERYUGINA EI, STRONGIN AY (2001). Matrix-dependent proteolysis of surface transglutaminase by membrane-type metalloproteinase regulates cancer cell adhesion and locomotion. *J Biol Chem,*. **276**: 18415- 22.

BELLAYR IH, MU X, LI Y (2009). Biochemical insights into the role of matrix metalloproteinases in regeneration: challenges and recent developments. *Future Med Chem,*. **1**(6): 1095- 1111.

BUI Q, PREMPEH M, WILENSKY R (2009). Atherosclerotic plaque development. *Int J Biochem Cell Biol,* **41**: 210–2113.

BODE W, FERNANDEZ-CATALAN C, TSCHESCHE H, GRAMS F, NAGASE H, MASKOS K (1999). Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell Mol Life Sci*., **55**(4): 639- 52.

BODE W, GOMIS-RUTH FX, HUBER R, ZWILLING R, STOCKER W (1992). Structure of astacin and implications for activation of astacins and zinc-ligation of collagenases. *Nature,* 9; **358**(6382): 164- 7.

BUTLER GS, OVERALL CM (2009). Updated biological roles for matrix metalloproteinases and new "intracellular" substrates revealed by degradomics. *Biochemistry,* 24; **48**(46): 10830-45.

BUTLER PE, MCKAY MJ, BOND JS (1987). Characterization of meprin, a membrane-bound metalloendopeptidase from mouse kidney. *Biochem J.*, 1; **241**(1): 229- 35.

CARMELI E, MOAS M, REZNICK AZ, COLEMAN R (2004). Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle Nerve*, **29**(2): 191- 7.

CHAMBERS RL, MCDERMOTT, J.C. (1996). Molecular basis of skeletal muscle regeneration. *Can J Appl Physiol*, **21**: 155-84.

CHEN X, LI Y (2009). Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle: migration, differentiation, regeneration and fibrosis. *Cell Adh Migr*., **3**(4): 337- 41.

CHERNOV AV, SOUNNI NE, REMACLE AG, STRONGIN AY (2009). Epigenetic control of the invasion-promoting MT1-MMP/MMP-2/TIMP-2 axis in cancer cells. *J Biol Chem*, **284**: 12727- 12734.

CHOUDHARY S, HIGGINS CL, CHEN IY, REARDON M, LAWRIE G, VICK GW, KARMONIK C, VIA DP, MORRISETT JD (2006). Quantitation and localization of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human carotid endarterectomy tissues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.,* **26**: 2351-2358.

COMETROGLU I, SARIKAYA E, DEMIREL M, AKYOL S, DEMIRCAN K (2014). Role of ADAMTS Gene Family in Obstetrics and Gynecology. *Jinekoloji - Obstetrik ve Neonatoloji Tıp Dergisi*, **11**; 4: 144- 149.

D'ORTHO MP, WILL H, ATKINSON S, BUTLER G, MESSENT A, GAVRILOVIC J, SMITH B, TIMPL R, ZARDI L, MURPHY G (1997). Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broadspectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem*, **250**: 751- 7.

DAHIYA S, BHATNAGAR S, HINDI SM, JIANG C, PAUL PK, KUANG S, KUMAR A (2011). Elevated levels of active matrix metalloproteinase-9 cause hypertrophy in skeletal muscle of normal and dystrophin-deficient mdx mice. *Hum Mol Genet.,* **15**; 20(22): 4345- 59.

DE NOOIJER R, VERKLEIJ CJ, VON DER THUSEN JH, JUKERNA JW, VAN DER WALL EE, VAN BERKEL TJ, BAKER AH, BIESSEN EA (2006). Lesional overexpression of matrix metalloproteinase-9 promotes intraplaque hemorrhage in advanced lesions but not at earlier stages of atherogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol, **26**: 340-346.

EGEBLAD M, WERB Z (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat Rev Cancer, **2**: 161-74.

FU X., KAO JL, BERGT C, KASSIM SY, HUG NP, D'AVIGNON A, PARKS WC, MECHAM RP, HENECKE JW (2004). Oxidative cross-linking of tryptophan to glycine restrains matrix metalloproteinase activity: specific structural motifs control protein oxidation. J. Biol. Chem., **279**, 6209–6212.

FRANTZ C, STEWART KM, WEAVER VM (2010). The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci.*, 15; **123**(24): 4195- 200.

GALIS ZS, KHATRI JJ (2002). Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: The good, the bad, and theugly. *Circ Res.*, **90**: 251- 62.

GALIS ZS, MUSZYNSKI M, SUKHOVA GK, SIMON- MORRISSEY E, UNEMORI EN, LARK MW, AMENTO E, LIBBY P (1994). Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ Res*, **75**: 181- 189.

GALL AL, RUFF M, KANNAN R, CUNIASSE P, YIOTAKIS A, DIVE V, RIO MC, BASSET P, MORAS D (2001). Crystal structure of the stromelysin-3 (MMP-11) catalytic domain complexed with a phosphinic inhibitor mimicking the transition-state. *J Mol Biol.*, **307**: 577- 86.

GARVIN P, NILSSON L, CARSTENSEN J, JONASSON L, KRISTENSON M (2009). Plasma levels of matrix metalloproteinase-9 are independently associated with psychosocial factors in a middle-aged normal population. *Psychosom Med.*, **71**(3): 292- 300.

GEESINK GH, VEISETH E (2009). Muscle enzymes: proteinases. *Hand Book of Muscle Foods Analysis.* CRC Press.

GLASS C, WITZTUM J (2001). Atherosclerosis: the road ahead. *Cell***, 104**: 503-516.

GREEN KA, LUND LR (2005). ECM degrading proteases and tissue remodelling in the mammary gland. *Bioessays*, **27**(9):894-903.

GROSS J, LAPIERE CM, Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay, *Proc Natl Acad Sci.*, 15; **48**: 1014- 22.

GOLDBERG G, WILHELM SM, KRONBERGER A, BAUER EA, GRANT GA, EISEN AZ (1986). Human fibroblast collagenase. *J. Biol. Chem.*, **261**–14: 6600–6605.

HANEMAAIJER R, KOOLWIJK P, LE CLERCQ L, DE VREE WJ, VAN HINSBERGH VW (1993). Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vein and microvascular endothelial cells. Effects of tumour necrosis factor alpha, interleukin 1 and phorbol ester. *Biochem J*, **296**: 803- 809.

HODGKINSON LM, WANG L, DUNCAN G, EDWARDS DR, WORMSTONE IM (2010). ADAM and ADAMTS gene expression in native and wound healing human lens epithelial cells. *Mol Vis.*, **15**; 16: 2765-76.

INOUE T, KATO T, TAKAYANAGI K, UCHIDA T, YAGUCHI I, KAMISHIRADO H, MOROOKA S, YOSHIMOTO N (2003). Circulating matrix metalloproteinase-1 and -3 in patients with an acute coronary syndrome. *Am J Cardiol*, **92**: 1461- 1464.

JONES GC, RILEY GP (2005). ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis. *Arthritis Res Ther*, **7**: 160–169.

KANDASAMY AD, CHOW AK, ALI MA, SCHULZ R (2010). Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. *Cardiovasc. Res.*, **85**, 413–423.

KANDASAMY AD, SCHULZ R (2009). Glycogen synthase kinase-3beta is activated by matrix metalloproteinase-2 mediated proteolysis in cardiomyoblasts. *Cardiovasc. Res.*, **83**, 698–706.

KUNO K, MATSUSHIMA K (1998). ADAMTS-1 protein anchors at the extracellular matrix through the thrombospondin type 1 motifs and its spacing region. *J. Biol. Chem.,* 29; **273**(22): 13912-7.

KUNO K, OKADAB Y, KAWASHIMAC H, NAKAMURAB H, MIYASAKAC M, OHNOA H, MATSUSHIMAD K (2000). ADAMTS-1 cleaves a cartilage proteoglycan, aggrecan. *Febs Lett.,* 4; **478**(3):241-5.

KUNO K, TERASHIMA Y, MATSUSHIMA K (1999). ADAMTS-1 is an active metalloproteinase associated with the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.,* **274**(26): 18821-18826.

KUNUGI S, SHIMIZU A, KUWAHARA N, DU X, TAKAHASHI M, TERASAKI Y, FUJITA E, MII A, NAGASAKA S, AKIMOTO T, MASUDA Y, FUKUDA Y (2011). Inhibition of matrix metalloproteinases reduces ischemia–- reperfusion acute kidney injury. *Lab. Invest.,* **91**, 170- 180.

KUPAI K, SZUCS G, CSEH S, HAJDU I, CSONKA C, CSONT T, FERDIANDY P (2010). Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. *J Pharmacol Toxicol Methods,* **61**(2): 205.

KWAN JA, SCHULZE CJ, WANG W, LEON H, SARIAHMETOGLU M, SUNG M, SAWICKA J, SIMS DE, SAWICKI G, SCHULZ R (2004). Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro. *FASEB J.,* **18**, 690- 692.

LIJNEN HR, ARZA B, VAN HOEF B, COLLEN D, DECLERCK PJ (2000). Inactivation of plasminogen activator inhibitor-1 by specific proteolysis with stromelysin-1 (MMP-3). *J Biol Chem.,* **275**: 37645-50.

LOCHTER A, GALOSY S, MUSCHLER J, FREEDMAN N, WERB Z, BISSELL MJ. Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J Cell Biol.,* **139**: 1861-72.

LU P, TAKAI K, WEAVER VM, WERB Z (2011). Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 1; **3**(12).

LUSIS A, MAR R, PAJUKANTA P (2004). Genetics of atherosclerosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, **5**: 189- 218.

MARCHENKO GN, RATNIKOV BI, ROZANOV DV, GODZIK A, DERYUGINA EI, STRONGIN AY (2001). Characterization of matrix metalloproteinase-26, a novel metalloproteinase widely expressed in cancer cells of epithelial origin. *Biochem J.*, **356**: 705- 18.

MAURO A (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol,* **9**: 493- 5.

MCCULLOCH DR, NELSON CM, DIXON LJ, SILVER DL, WYLIE JD, LIDNER V, SASAKI T, COOLEY MA, ARGRAVES WS, APTE SS (2009). ADAMTS metalloproteases generate active versican fragments that regulate interdigital web regression. *Dev Cell,* **17**(5): 687- 98.

MIGNATTI P, RIFKIN DB (1993). Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol. Rev.***, 73**, 161- 195.

MOHAMMAD G, KOWLURU RA (2010). Matrix metalloproteinase-2 in the development of diabetic retinopathy and mitochondrial dysfunction. *Lab. Invest.,* **90**, 1365- 1372.

MORRISON CJ, BUTLER GS, RODRIGUEZ D, OVERALL CM (2009). Matrix metalloproteinase proteomics: substrates, targets, and therapy. *Curr. Opin. Cell Biol.,* **21**, 645- 653.

MORRIS L, ALLEN KE, LA THANGUE NB (2000). Regulation of E2F transcription by cyclin E-Cdk2 kinase mediated through p300/CBP co-activators. *Nat Cell Biol.,* **2**: 232- 239.

MURPHY G (2010). Fell-Muir Lecture: metalloproteinases: from demolition squad to master regulators. *Int. J. Exp. Pathol.,* **91**, 303- 313.

MURPHY G, KNÄUPER V (1997). Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain?. *Matrix Biol.,* **15**(8-9): 511- 8.

MURPHY G, SEGAIN JP, O'SHEA M, COCKETT M, IOANNOU C, LEFEBVRE O, CHAMBON P, BASSET P (1993). The 28-kDa N-terminal domain of mouse stromelysin-3 has the general properties of a weak metalloproteinase. *J Biol Chem.,* **268**: 15435- 41.

NAGASE H (1997). Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem.,* **378**(3-4): 151- 60.

NAGASE H, VISSE R, MURPHY G (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPS. *Cardiovasc Res.*, 15; **69**(3): 562-73.

NAGASE H, WOESSNER JF (1999). Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.,* 30;**274**(31):21491-4

NAKAHAMA K, YOSHIMURA K, MARUMOTO R, KIKUCHI M, LEE IS, HASE T, MATSUBARA H (1986). Cloning and sequencing of Serratia protease gene. *Nucleic Acids Res.,* 25; **14**(14): 5843- 55.

NAKAMURA H, FUJII Y, OHUCHI E, YAMAMOTO E, OKADA Y (1998). Activation of the precursor of human stromelysin 2 and its interactions with other matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem.,* **253**: 67- 75.

NOE V, FINGLETON B, JACOBS K, CRAWFORD HC, VERMEULEN S, STEELANT W, BRUYNEEL E, MATRISIAN LM, MAREEL M (2001). Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci.,* **114**: 111- 118

PARK HI, NI J, GERKEMA FE, LIU D, BELOZEROV VE, SANG QX (2000). Identification and characterization of human endometase (Matrix metalloproteinase-26) from endometrial tumor. *J Biol Chem.,* **275**: 20540- 4.

PARKS WC (1999). Matrix metalloproteinases in repair. Wound Rep Reg **7**, 423-32.

PEI D, MAJMUDAR G, WEISS SJ (1994). Hydrolytic inactivation of a breast carcinoma cell-derived serpin by human stromelysin-3. *J Biol Chem.,* **269**: 25849- 55.

PORTER S, CLARK I, KEVEORKİAN L, EDWARDS D (2005). The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J,* **386**: 15–27.

RIVERA S, KHRETCHATISKY M, KACZMAREK L, ROSENBERG GA, JAWORSKI DM (2010). Metzincin proteases and their inhibitors: foes or friends in nervous system physiology?, *J. Neurosci.*, **30**, 15337–15357.

ROSENBERG GA (2009). Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol.*, **8**, 205–216.

RODRIGUEZ D, MORRISON CJ, OVERALL CM (2010). Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *BBA- Mol Cell Res.,* **1803**, 39–54.

SALTER RC, ASHLIN TG, KWAN AP, RAMJI DP (2010). ADAMTS proteases: key roles in atherosclerosis? *J Mol Med (Berl),* **88** (12):1203-11.

SANOUDOU D, KANG PB, HASLETT JN, HAN M, KUNKEL LM, BEGGS AH (2004). Transcriptional profile of postmortem skeletal muscle. *Physiol Genomics,* **16**: 222- 228.

SCHULTZ E (1989). Satellite cell behavior during skeletal muscle growth and regeneration. *Med Sci Sports Exerc*, **21**: 181-6.

SHINDO T, KURIHARA H, KUNO K, YOKOYAMA H, WADA T, KURIHARA Y, IMAI T, WANG Y, OGATA M, NISHIMATSU H, MORIYAMA N, OH-HASHI Y, MORITA H, ISHIKAWA T, NAGAI T, YAZAKI Y, MATSUSHIMA K (2000). ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function. *J Clin Invest.,* **105**(10):1345-52

SPINALE FG (2007). Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev.,* **87**(4): 1285- 342.

STANTON H, MELROSE J, LITTLE CB, FOSANG AJ (2011). Proteoglycan degradation by the ADAMTS family of proteinases. *Biochim Biophys Acta,* **1812**(12): 1616-29.

STERNLICHT MD, WERB Z (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol,* **17**: 463–516.

TANG BL (2001). ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases, *Int J Biochem Cell Biol*., **33**(1): 33- 44.

TEIXEIRA CF, ZAMUNER SR, ZULIANI JP, FERNANDES CM, CRUZHOFLING MA, FERNANDES I, CHAVES F, GUTIERREZ JM (2003). Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with Bothrops asper snake venom. *Muscle Nerve,* **28**: 449- 59.

TIDBALL, J.G. (2005). Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J*

Physiol Regul Integr Comp Physiol, **288**: 345-53.

TOKUNAGA I, TAKEICHI S, YAMAMOTO A, GOTODA M, MAEIWA M (1993). Comparison of postmortem autolysis in cardiac and skeletal muscle. *J Forensic Sci***, 38**: 1187–1193.

TUOMAINEN AM, NYYSSONEN K, LAUKKANEN JA, TERVAHARTIALA T, TUOMAINEN TP, SALONEN JT, SORSA T, PUSSINEN PJ (2007). Serum matrix metalloproteinase-8 concentrations are associated with cardiovascular outcome in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* **27**: 2722- 2728.

VAN WART H, BIRKEDAL-HANSEN H (1990). The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA,* **87**(14): 5578- 82.

VISSE R, NAGASE H (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.*, 2; **92**(8): 827- 39.

WEBER C, ZERNECKE A, LIBBY P (2008). The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. Nat Rev Immunol 8: 802– 815VISSE R, NAGASE H (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.*, 2; **92**(8): 827- 39.

WESS TJ (2005). Collagen fibril form and function. *Adv Protein Chem.,* **70**: 341-74.

WHITE JM (2003). ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Curr Opin Cell Biol.,* **15(**5): 598- 606.

WIGHT T, MERRILEES M (2004). Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis: key roles for versican. *Circ Res,* **94**: 1158- 1167.

WIGHT TN (2005). The ADAMTS proteases, extracellular matrix, and vascular disease: waking the sleeping giant(s)!, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*., **25**(1): 12- 4.

WILSON CL, OUELLETTE AJ, SATCHELL DP, AYABE T, LÓPEZ-BOADO YS, STRATMAN JL, HULTGREN SJ, MATRISIAN LM, PARKS WC (1999). Regulation of intestinal defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science,* **286**: 113- 7.

WOESSNER JF (1991). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *The FASEB Journal*, **5**; 8, 2145- 2154.

WOLFSBERG TG, PRIMAKO P, MYLES, DG, WHITE JM (1995). ADAM, a novel family of mmbrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *J. Cell Biol.,* **131**, 275- 278.

YANG Y, CANDELARIO-JALIL E, THOMPSON JF, CUADRADO E, ESTRADA EY, ROSELL A, MONTANER J, ROSENBERG GA (2010). Increased intranuclear matrix metalloproteinase activity in neurons interferes with oxidative DNA repair in focal cerebral ischemia. *J. Neurochem.,* **112**, 134- 149.

ZIMOWSKA M, BRZOSKA E, SWİERCZYNSKA M, STREMİNSKA W, MORACZEWSKİ J (2008). Distinct patterns of MMP-9 and MMP-2 activity in slow and fast twitch skeletal muscle regeneration in vivo. *Int J Dev Biol.*, **52**(2-3): 307- 14.

EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onayı

TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALARI
ETİK KURULU KARAR ÖRNEĞİ

SAYI : 99950669/215 30/06/2014
KONU : Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Kararı

SAYIN YRD.DOÇ.DR. DİLARA AKÇORA YILDIZ

Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 27 Haziran 2014 tarih ve 39 sayılı toplantısında sunulan **"Post Mortem Ölüm Zamanın İskelet Kasında Belirlenmesinde Yeni Moleküler Biyolojik Belirteçlerin Araştırılması; ADAMTS,ER Stres, Apoptotik, Otofajik, ECM."** başlıklı araştırma projesi öneriniz incelenmiş, adli tıp kurumundan izin alındıktan sonra etik ve bilimsel ilkelere uygun olduğuna oybirliğiyle karar verilmiştir.

Prof.Dr. Osman ÖZCAN
Başkan

Prof. Dr. Şenol DANE

Prof. Dr. N.Cenap DENER

Prof. Dr. Ali AKÇAY

Doç. Dr. Bülent BOZKURT
Başkan Yardımcısı

Doç. Dr. Esra GÜNDÜZ

Doç. Dr. Murat ULAŞ

Doç. Dr. Özlem EVLİYAOĞLU

Doç. Dr. Bünyamin MUSLU

Doç. Dr. Ayşe Esra YILMAZ

Doç. Dr. Nurhayat BAYAZIT

Yrd. Doç. Dr. Mehmet KAYA

Farm. Dr. Ayşe GÜREL
Raportör

Yrd.Doç.Dr.Mehmet NAMUSLU

Avukat Meltem BAĞCI

Yasin GÜRSOY

Ek 2. Etik Kurul Onayı

T. C.
ADALET BAKANLIĞI
Adli Tıp Kurumu Başkanlığı

Sayı : 21589509/ 596 09/09/2014
Konu: Bilimsel Çalışma

Sayın, Prof. Dr. Aslıhan AVCI

"Ölüm Zamanı Tayininde ADAM-TS'in Rolü ve Yeni Moleküler Biyolojik Belirteçlerin Belirlenmesi" isimli çalışma öneriniz, 09/09/2014 tarihli Eğitim ve Bilimsel Araştırma Komisyonu toplantısında görüşülmüş ve kabul edilmiştir.

Bilginize rica ederim.

Doç. Dr. Yalçın BÜYÜK
Başkan

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Ad- Soyad: Merve Parlakgörür

Doğum yeri ve tarihi: 16.07.1990- İzmir

Uyruk: T.C.

İletişim adresi ve telefonu: Zümrüt Mahallesi 2008 Sk. Umay Apt. No:11 K.2 D.7 Bağbaşı/ Denizli

merveparlakgorur@gmail.com

0555-5539496

II. Eğitim

Ankara Üniversitesi Adli Biyoloji Tezli Yüksek Lisans 2013

Polis Akademisi Adli Bilimler Tezli Yüksek Lisans 2013

Helsinki Üniversitesi 2011

Pamukkale Üniversitesi Biyoloji Bölümü (İngilizce) 2008-2013

İzmir Anadolu Lisesi (Almanca) 2004-2008

Yabancı Dili: İngilizce, Almanca

III. Bilimsel Etkinlikler

Certificates

10th Anatolian Forensic Sciences Congress with International Participation- 2013

Forensic Nuclear Sciences- 2013

Forensic Biology and Biotechnology- 2013

Stem Cell Symposium – 2012

Molecular Biotechnology- 2011

Urbanisation, Land Use, Land Degradation and Environment ‘’ULE-2009’’

Experience

2009 June- Voluntary assistant in Department of Embryology & Histology Laboratory of Pamukkale University

2009-2010&2011 Summer Period – voluntarily in DEKAMER (Sea Turtle Research, Rescue and Rehabilitation Centre in Turkey)

2012 June- August- Intern in Biochemistry Laboratory of Pamukkale University

2014 October- The Workshop of DNA Genotyping on Identification of Bıological Evidence, MJIB, ROC, Taiwan

9 November- 4 December- The Intensive Training Programme on Human Rights, The Raoul Wallenberg Institute of Human Rights and Humanitarian Law, Lund, Sweden

Laboratory skills

- Agarose & Polyacrylamide & Starch Gel Electrophoresis
- PCR (RAPD, Microsatellite)
- Real-time PCR
- Total RNA isolation
- DNA Isolation
- Western blotting, Southern Blotting
- Cell culture

Katılım Belgeleri

30 Ekim- 2 Kasım 2013
Uluslararası Katılımlı 10.Anadolu Adli Bilimler Kongresi / Malatya

7-9 Kasım 2013
1. Çocuk ve Bilgi Güvenliği Kongresi / Ankara

6-8 Aralık 2013
Dr.Mehmed Fuat Umay 4.Ulusal Tıp Günleri / Ankara

12 Şubat 2014
Adli Bilimlerde Yeni Ufuklar Sempozyumu /Ankara

21-22 Mart 2014
Adli Psikoloji Günleri /Ankara

8-11 Mayıs 2014
Adli Bilimler Bahar Sempozyumu / Muğla-Marmaris

31 Mayıs- 1 Haziran
Uluslararası Katılımlı Adli Bilişim Sempozyumu/ Ankara

12-14 Ağustos 2014
Kosova Türkiye Adli Bilimler Günleri/ Prizren- Kosova

7-14 Eylül 2014
Nükleer Adli Bilimler Yaz Okulu/ Manavgat

20-21 Eylül 2014
2. Ulusal Felaket Kurbanlarının Kimliklendirilmesi Kongresi/ Ankara

22-31 Ekim 2014
Workshop of DNA Genotyping on Identification of Biological Evidence/ Taiwan

27-28 Kasım 2014
1st International Forensic Biology& Genetics Congress

29-30 Kasım 2014
1st International Congress and Workshop of Forensic Toxicology

21-22 Şubat 2015
9. Aykut Kence Evrim Konferansı, METU

9-11 Nisan 2015
International Congress of Anthropological Sciences – ICAS2015

22-25 Nisan 2015
2. Sağlık Hukuku Kongresi/ Gaziantep

30 Nisan 2015
1. **Adli Muhasebe Sempozyumu**/ Ankara

Sözlü Bildiri

8-11 Mayıs 2014
Adli Bilimler Bahar Sempozyumu / Muğla-Marmaris
"İskeletimizdeki Konuşan Şifreler" Parlakgörür M., Kayaaltı Z.

12- 14 Ağustos 2014
Kosova Türkiye Adli Bilimler Günleri/ Prizren, Kosova
"Tek Yumurta İkizlerinin Kimliklendirilmesi" Iyras M., Parlakgorır M., Yıldırım E.F., Dogan Y.

20-23 Mayıs 2015
12. Uluslararası Adli Bilimler Kongresi/ Batman
"Yeni Psikoaktif Maddeler" Parlakgorur M., Sen N.

Posterler

8-11 Mayıs 2014, Adli Bilimler Bahar Sempozyumu
”Plasenta Örneklerinde Babalık Tayini ”
Kayaaltı Z., Enç E.M., Parlakgorur M., İyras M., Yıldırım E.F., Akyüzlü Kaya D.

8-11 Mayıs 2014, Adli Bilimler Bahar Sempozyumu

“**Adli Olaylarda Doku Örneklerinin Tanımlanması ve Kimliklendirmede Kullanımı” Kayaaltı Z., Yıldırım E.F., İyras M., Parlakgorur M., Enç E.M., Akyüzlü Kaya D.**

8-11 Mayıs 2014, Adli Bilimler Bahar Sempozyumu **”Dandy- Walker Sendromu: Bir Olgu Sunumu ”**

Cantürk N.,Yıldırım E.F., Parlakgorur M., Ünal B.M., Erdönmez F.

8-11 Mayıs 2014, Adli Bilimler Bahar Sempozyumu **“ Diyaliz Ünitesinde Tıbbi Uygulama Hatası İddiası:**

Bir Olgu Sunumu” Cantürk N., Parlakgörür M., Özdemir F., Ünal B.M.

12- 14 Ağustos 2014, Kosova Türkiye Adli Bilimler Günleri, **“Adli Bilimlerde SNP Analizi”,** Parlakgorur M. ,

Iyras M., Yıldırım E.F., Dogan Y.

29-30 Kasım 2014, 1st International Congress and Workshop of Forensic Toxicology, “**A review of the Perspectives on Synthetic Cannabinoids, Receptors and Acute Effects”,** Parlakgorur M., Sen N., Bora T., Yüksel B., Aksoy C.

9-11 Nisan 2015, International Congress of Anthropological Sciences – ICAS2015, **“Awaking of the underwater remains”**, Ozar H., Parlakgorur M.

22-25 Nisan 2015, 2. Sağlık Hukuku Kongresi, “**Malpraktis ve Sağlık Hizmetlerinin Yürütülmesinde Kusura Dayanan Sorumluluğun Uluslar arası İçtihatlar Yönünden Karşılaştırılmalı Olarak İncelenmesi”,** Çavuşoğlu H., Parlakgorur M.

Uluslar arası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

İskeletimizdeki Konuşan Şifreler, Parlakgorur M., Kayaaltı Z., Türkbilim Dergisi, 2014, Cilt:2, Sayı:15