

Metalloproteinazlar, İnhibitörleri ve İlişkili Fizyolojik ve Patolojik Durumlar

METALLOPROTEINASES, THEIR INHIBITORS AND RELATED PHYSIOLOGICAL AND PATHOLOGICAL CONDITIONS

Saliha APAKKAN AKSUN*, Dilek ÖZMEN**, Oya BAYINDIR***

* Uz.Öğ., Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD,

** Doç.Dr., Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Biyokimya BD,

*** Prof.Dr., Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Biyokimya BD, İZMİR

Özet

Matriks metalloproteinazları (MMPs); ekstrasellüler matriks (ECM) ile bazal membran komponentlerini parçalama yeteneğine sahip olan ve aktif bölgesinde çinko içeren homolog bir enzim ailesidir. Bu enzimler doku yeniden yapılanması, morfogenezis, yara iyileşmesi ve normal gelişimsel süreç gibi fizyolojik durumlarda önemli bir rol oynadıkları gibi tümör hücreleri invazyonu, anjiyogenezis ve metastaz gibi patolojik süreçlerde de yer alırlar.

Matriks metalloproteinaz ailesinin önceden tanımlanmış 7 üyesine birçok yeni metalloproteinazların eklenmesi ile bugün 18 den fazla enzim bildirilmektedir.

MMPs'ni inhibe eden bazı faktörler mevcuttur. Bunlardan metalloproteinazların spesifik doku inhibitörleri (TIMPs) invivo koşullarda bu enzimlerin aktivitesinin regülasyonunda önemli rol oynarlar.

MMPs ve TIMPs arasında bulunan oran çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde değişmekte ve böylece bunlar arasındaki denge değişik patolojik durumların patogenezinde önemli bir rol oynayabilmektedir. Hepatik dokularda yara iyileşmesi sürecinde TIMP:MMP oranında artış ECM nin MMPs aracılığı ile parçalanmasını önleyerek fibrozisi kolaylaştırabilir.

Üreme fonksiyonu içinde yer alan, ovulasyon, implantasyon, gestasyon, laktasyon ve involusyonu içeren pekçok süreç, TIMP ve/veya MMP aktivasyonuna gereksinim gösterir.

ECM nin ve bazal membranın parçalanması; nonneoplastik doku yeniden oluşum sürecinde olduğu gibi kanser invazyonunda da önemli rol oynar. MMPs santral sinir sistemi, baş boyun, mide, pankreas, kolon, böbrek, deri ve prostatın malign tümörlerinin invazyonunda belirgin bir rol oynar.

Anjiyotensin II myokardda interstisyel kollajen parçalanması için anahtar enzim olan MMP I aktivitesini inhibe ederken, anjiyotensin II ve aldosteronun birlikte kollajen sentezini uyardıkları gösterilmiştir. Bu bulgular konjestif kalp yetmezliği ve dilate kardiyomyopatiye anjiyotensin konverting enzim inhibisyonu ile tedavi için akla uygun olarak yardımcı olabilir.

Hem kollajen hem de elastik bileşenler aşırı proteolitik aktivite ile uyumlu bir dejenerasyon gösterirler. Özellikle yaşlı dermal fibroblastlar ECM yapısının yaşla ilişkili atrofisini açıklayabilecek şekilde metalloproteinaz aktivitelerini artırırılar.

Anahtar Kelimeler: Matriks metalloproteinazları,
Metalloproteinazların doku inhibitörleri,
Ekstrasellüler matriks

T Klin Tıp Bilimleri 2001, 21:332-342

Geliş Tarihi: 22.09.2000

Yazışma Adresi: Dr. Dilek Özmen
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Klinik Biyokimya BD, 35100, Bornova, İZMİR

Summary

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a homologous family of enzymes containing a zinc ion at the active site and are capable of degrading extracellular matrix and basal membrane components.

These enzymes play an essential role in physiological states such as tissue remodeling, morphogenesis and wound healing and also in pathological processes such as tumor cell invasion and metastasis.

With the addition of several new MMPs to 7 previously identified enzymes from this family, today more than 18 enzymes are reported.

There are some factors that inhibit MMPs. Among these, specific tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) have an essential role in the regulation of the activity of these enzymes in vivo.

The ratio of MMPs to TIMPs changes in many physiological and pathological processes, consequently the balance between these substances seems to play an important role in the pathogenesis of various disorders. During the process of wound healing in hepatic tissues, increase in TIMP:MMP ratio may promote fibrosis by protecting deposited ECM from degradation by MMPs.

Many processes regarding reproduction including ovulation, implantation, gestation, lactation and involution, require TIMP and / or MMP activities.

Degradation of the extracellular matrix and basement membranes plays a crucial role in cancer invasion as well as in non neoplastic tissue remodelling processes.

MMPs play a prominent role in the invasion of malignant tumors of the central nervous system, head and neck, stomach, pancreas, colon, kidney, skin and prostate.

Angiotensin II and aldosterone have been shown to stimulate collagen synthesis while angiotensin II additionally inhibits MMP I activity, which is the key enzyme for interstitial collagen degradation in the myocardium. These findings may serve as rationale for a therapy with angiotensin converting enzyme inhibition in congestive heart failure and dilated cardiomyopathy.

Both collagenous and elastic components display a degeneration consistent with the overexpression of proteolytic activity. In particular, senescent dermal fibroblasts overexpress metalloproteinase activities that may explain the age related atrophy of ECM architecture.

Key Words: Matrix metalloproteinases,
Tissue inhibitors of metalloproteinases,
Extracellular matrix

T Klin J Med Sci 2001, 21:332-342

Ekstrasellüler matriks (ECM) proteinleri ve proteoglikanları içeren, organizmalara sadece yapısal destek sağlamakla kalmayıp aynı zamanda hücre proliferasyonu, farklılaşması ve migrasyonu ile yapışma, doku morfojenезisi gibi pekçok biyolojik aktivitede etkisi olan karmaşık ve dinamik bir oluşumdur.

ECM sentez, parçalanma ve yeniden yapılanma süreçlerindeki hücre regülasyonu, dönüşümü gibi etkilerini metalloproteinazlar (MMPs) aracılığı ile ortaya koyar.

MMPs ekstrasellüler matriksi parçalayan, nötral pH da aktif olan, multigenik bir endopeptidaz ailesidir. Tümü proenzim olarak fibroblastlar, osteoblastlar, kondrositler, endotel hücreleri, makrofajlar, nötrofiller gibi çeşitli bağ dokusu hücrelerinden salgılanırlar.

MMPs yara iyileşmesi, kemiğin yeniden yapılanması, uterus ve meme dokusu fizyolojik fonksiyonları, ovulasyon, embriyogenezis, embriyo implantasyonu, laktasyon gibi fizyolojik süreçlerde yer aldığı gibi aynı zamanda artirit, tümör hücrelerinin invazyonu ve metastaz gibi patolojik süreçlerde de rol oynarlar.

Kanserde ECM tümör dokusunun büyümesi ve tümör hücrelerinin yayılımını önlemek için primer bir bariyer olarak görev yapar. Malign tümörler bu bariyeri aşmak için metalloproteinazları kullanırlar (1-6).

Matriks metalloproteinaz ailesi

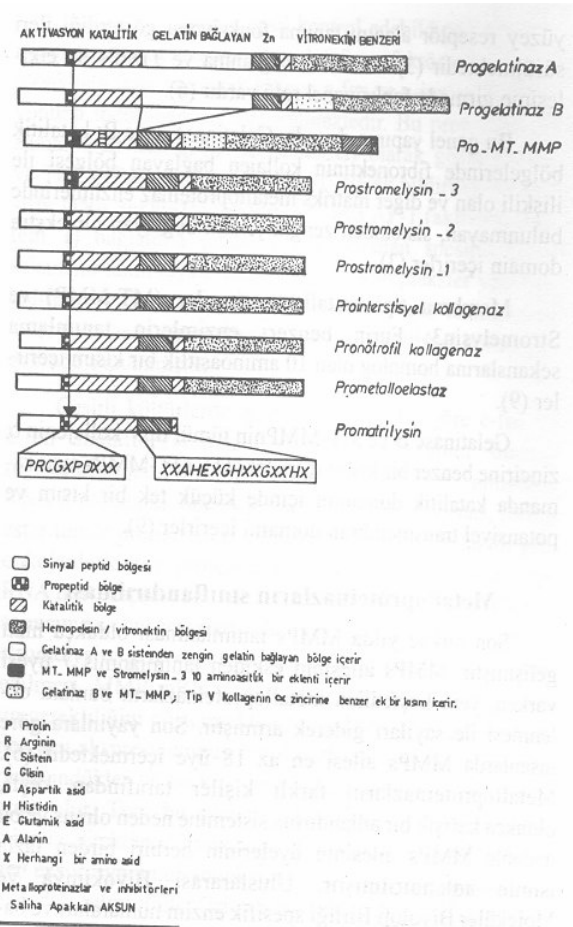
Matriks metalloproteinaz ailesi aşağıdaki özelliklere sahiptir (1,7,8).

1. Ekstrasellüler matriksin en az bir komponentini parçalayan proteinazlardır.
2. Zn iyonu içerirler ve bu nedenle şelatlayıcı ajanlarla inhibe olabilirler.
3. Latent formda salgılanırlar ve proteolitik aktivitelerini göstermeleri için aktive olmaları gereklidir. İn-vitro olarak organomerküriyel bileşenlerle aktive olabilirler.
4. Metalloproteinazlara spesifik doku inhibitörleri ile (Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, TIMPs) inhibe olurlar.
5. Moleküler klonlama yöntemleri ile çeşitli grup üyelerinin aminoasit benzerlikleri olduğu gösterilmiştir.

Metalloproteinazların yapısı (3,8,9)

Klonlanmış MMPs'ların primer yapısı incelendiğinde bu proteinlerin birkaç farklı bölge içerdiği görülür (3) (Şekil 1) (10).

1. Prodomain: İlk bölge prodomain olarak tanımlanan, molekül sekresyon için hedefleyen, ancak daha sonra uzaklaştırılan ve latent enzimde bulunmayan sinyal peptid dizisidir (3,6). 80-90 aminoasit içeren aminoterminal propeptiddir (6).



Şekil 1.

2. Prodomain: Enzim aktive olduğunda çıkarılır ve yüksek derecede korunmuş PRCGXPDV dizisi içerir. Prodomain yapısında bulunan sistein rezidülerinin enzimin latent formunun korunmasında rol oynadığına inanılır (3). Prodomainin çıkarılması, inaktif proenzimin aktif forma dönüşmesini sağlar (6,9).

3. Katalitik bölge: Katalitik bölge, histidin rezidüleri içeren, bakteriyel metalloproteinazlardan termolizine analog olan ve fonksiyonel stabilitenin korunması için gerekli olan çinko iyonunu içeren bölgedir (6).

4. Prolinden zengin bölge: Katalitik bölge ve son bölge arasında yer alır.

5. Hemopeksin benzeri bölge: Son kısımda hem bağlayan moleküllere dizin benzerliği nedeniyle, hemopeksin olarak adlandırılan bölge yer alır. Bu bölge N ve C terminal kısımları bağlayan disülfid bağı içerir ve katalitik bölgeye 5-10 aminoasitlik prolinden zengin bir bölge ile bağlanır. Matrilysin (MMP7) dışında tüm metalloproteinazlarda bulunur (9). Bu bölgenin fonksiyonu bilinmemekle birlikte substrat spesifitesini sağlama ya da plazminojen aktivatör ürokinaz sistemine analog olma özelliği ile, hücre

yüzey reseptör alanını tanıma fonksiyonu gösterdiği ileri sürülmektedir (3). Substrata bağlanma ve TIMPs ile etki-leşime girmede fonksiyonel rolü vardır (6).

Bu genel yapının dışında; Gelatinase A ve B; katalitik bölgelerinde fibronektinin kollajen bağlayan bölgesi ile ilişkili olan ve diğer matriks metalloproteinaz enzimlerinde bulunmayan, sisteinden zengin jelatin bağlayan bir ekstra domain içerirler (3).

Membran tipi metalloproteinazlar (MT-MMP) ve Stromelysin3; Furin benzeri enzimlerin tanımlama sekanslarına homolog olan 10 aminoasitlik bir kısım içerirler (9).

Gelatinase B ve MT-MMPnin tümü; tipV kollajenin α zincirine benzer bir kısım içerirler (11). MT-MMPs aynı zamanda katalitik domainin içinde küçük tek bir kısım ve potansiyel transmembran domaini içerirler (9).

Metalloproteinazların sınıflandırılması

Son birkaç yılda MMPs tanımlanması oldukça hızlı gelişmiştir. MMPs ailesinin eskiden tanımlanmış 7 üyesi varken, yeni keşfedilen metalloproteinazların bunlara eklenmesi ile sayıları giderek artmıştır. Son yayınlara göre insanlarda MMPs ailesi en az 18 üye içermektedir (6). Metalloproteinazların farklı kişiler tarafından keşfi, oldukça karışık bir adlandırma sistemine neden olmuş ve bu nedenle MMPs ailesinin üyelerinin herbiri birden fazla isimle adlandırılmıştır. Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği spesifik enzim numaraları ve basit isimler vermeyi önermiştir (Tablo 1) (6,8,9).

MMPs substrat spesifitesine göre 4 ana grupta sınıflandırılabilir (9).

Kollajenazlar: MMP1, MMP8, MMP13

Gelatinazlar: MMP2, MMP9

Stromelysinler: MMP3, MMP10, MMP11

Son zamanlarda bunlara eklenen membran tip metalloproteinaz 1-5 (MT-MMPs) (6).

İnterstisyel kollajenaz (MMP 1, Fibroblast kollajenaz):

MMPs ailesinin prototipik üyesidir, 1962 de ilk kez kurbağa yavrusunun kuyruk kısmının çözünmesini sağlayan bir proteaz olarak tanımlanmıştır. Latent formu 55 kDa ağırlığında, aktif formu 43 kDa ağırlığındadır (6). TipI, TipII, TipIII interstisyel kollajeni sindirir. İnterstisyel kollajenler bazal membranda bulunan TipIV kollajenden ve perisellüler olarak bulunan TipV kollajenden farklıdır (1). Ayrıca kollajen tipV, II ve X kollajenin yıkılmasında rol oynar.

Nötrofil kollajenaz (MMP 8):

75 kDa büyüklüğünde proenzimdir ve aktif formu 58 kDa büyüklüğündedir. Tip I, II, III interstisyel kollajeni yıkar, nötrofillerce üretilir ve diğer interstisyel kollajenazdan farklı bir genden derive edilir. Nötrofil kollajenazda, fibroblast kollajenazda bulunmayan altı glikozilasyon sahası vardır ve bu nedenle nötrofil kollajenaz artmış glikozilasyondan sorumludur (7).

Kollajenaz 3 (MMP 13):

Tip I kollajeni yıkar.

Gelatinaz A (MMP 2):

Latent formu 72 kDa, aktif formu 66 kDa ağırlığındadır (6). TipIV kollajeni, gelatini, ek olarak tipV, VII, X,

Tablo 1. İnsanlarda metalloproteinaz ailesinin üyeleri (6,8,9)

Grup	MMP	MA Latent (kDa)	MA Aktif (kDa)	Etki ettiği substrat
<i>Kollajenazlar</i>				
İnterstisyel kollajenaz	MMP-1	55	43	Kollajen tip I, II, III, VII, X (Fibriler)
Nötrofil kollajenaz	MMP-8	75	58	Kollajen tip I, II, III
Kollajenaz 3	MMP-13	65	55	Kollajen tip I, II, III, IV, gelatin
<i>Gelatinazlar</i>				
Gelatinaz A	MMP-2	72	66	Gelatin, kollajen IV, V, VII, X, elastin, fibronektin
Gelatinaz B	MMP-9	92	84	Gelatin, kollajen tip IV,V, I, III, fibronektin, elastin
<i>Stromelysinler</i>				
Stromelysin 1	MMP-3	57	46	Kollajen tip III, IV, V, IX, proteoglikanlar, fibronektin, laminin
Stromelysin 2	MMP-10	57	46	Gelatin, tip III, IV, V kollajen, fibronektin
Stromelysin 3	MMP-11	51	44	α 1 proteinaz inhibitörleridir.
<i>MT-MMPs</i>				
MT1-MMP	MMP-14	64	54	Pro MMP-2, pro MMP-13, kollajenler, fibronektin
MT2-MMP	MMP-15	72	61	MT1-MMP ile benzerdir.
MT3-MMP	MMP-16	66	55	Pro MMP-2
MT4-MMP	MMP-17	?	54	Pro MMP-2
MT5-MMP	MMP-24	63	62	Pro MMP-2
<i>Diğerleri</i>				
Matriysin	MMP-7	28	19	Gelatin, fibronektin, elastin, kollajen tipIV
Metalloelastaz	MMP-12	54	45	Elastin, fibronektin, kazein.

kollajeni (11), elastin ve fibronektini, laminini (2,9) parçalar.

Gelatinaz B (MMP 9, 92kDa kollajenaz):

Gelatin ve tip IV bazal membran kollajeni için substrat spesifiktir. Latent formu 92 kDa, aktif formu 84 kDa ağırlığındadır (9). Diğer substratları tip I, III, V kollajen, elastin (1,9) ve fibronektindir (6).

Stromelysin 1 (MMP 3, Transin):

Latent formu 57 kDa, aktif formu 46 kDa ağırlığındadır (6). Substratı; proteoglikanlar, laminin, fibronektin, tip III,IV,V,IX (1) kollajen ve gelatinlerdir. Stromelysin üretimi fibroblast ve kondrositlerde growth faktörler, sitokinler ve tümör promoterleri ile indüklenir (9,11).

Stromelysin 2 (MMP 10):

Latent formu 57 kDa, aktif formu 46 kDa ağırlığındadır (6). Substratı, fibronektin, gelatinler, tip III, IV ve V kollajendir. Transin 2 olarak da bilinen ve insan tümörlerinden kopyalanan bu molekülün, aminoasit dizilimi, büyüklüğü ve substrat spesifitesi stromelysin 1 ile benzer özellikler taşımakla birlikte, aralarında gen ayrılığı vardır (11).

Stromelysin 3 (MMP 11):

Stromelysin 1 ve stromelysin 2 ile aminoasit sekans benzerliği vardır. α 1-proteaz inhibitörleridir (6). İnsanlarda görülen stromal hücre kaynaklı çeşitli kanser dokularında varlığı onaylanmış (1), ancak epitelial hücre ile ilişkili kanserlerde saptanamamıştır (1). Ek olarak uterus, plasenta ve insan embriyosunda bulunur.

Matrilysin (MMP 7, Putative matrix metalloproteinase 1, PUMP 1):

Ek metalloproteinaz (1,9) olarak da bilinen bu molekülün latent formu 28 kDa, aktif formu 19 kDa ağırlığındadır (1,9). Metalloproteinaz ailesinde stromelysinlerin bir alt grubu olarak bilinir ve gelatin, elastin, fibronektin, laminin, entaktini parçalama özelliği nedeni ile stromelysinlere benzer geniş substrat spesifitesi gösterir (1).

Metalloelastaz (MMP 12):

Elastin, fibronektin ve kazeini parçalar. Murin makrofajlarından klonlanır.

Metalloproteinazların Regülasyonu

I. Transkripsiyonel Regülasyonu:

MMPs genlerinin yapısı tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte mRNA larının growth faktör, sitokinler, tümör promoterleri, onkojen ürünleri gibi çeşitli ajanlarla indüklenildiği bilinmektedir. MMP gen ekspresyonunun pozitif regülasyonu transkripsiyonel aktivasyon düzeyinde ortaya çıkmaktadır (3). MMP'ların transkripsiyonel olarak düzenlenişi ile ilgili çalışmalar, büyüme faktörü ve onko-

jenlerin bu regülasyonu nasıl kontrol edebildiğini daha iyi anlamamızı sağlamıştır. Bazı büyüme faktörlerinin, protoonkojen ürünler olarak bilinen c-fos ve c-jun'un ekspresyonunu indükledikleri düşünülmektedir. Bu proteinler son zamanlarda transkripsiyon faktörleri olarak gösterilmekte ve TRE (TPA responsive element) olarak bildirilen bir spesifik DNA sekansını tanımlayan veya AP-1 (aktivatör protein 1) bağlanma sahası olarak sunulan spesifik DNA sekansını tanımlayan heterodimerik kompleksler yapmaktadırlar. TRE ve AP-1 bağlayan saha sekans tanımlaması tavşan ve insan stromelysin ve insan interstisyel kollajenaz geninde saptanmıştır.

Çeşitli kültürlerde gösterilen kanıtlara göre c-fos ve c-jun metalloproteinaz gen ekspresyonunun önemli regülatörleridir. En çok üzerinde durulan kanıt; antisense RNA kullanılarak ortaya konulandır. Ha-ras, v-mas, forbol ester tümör promoterleri, platelet derive growth faktör gibi onkojenlerle fos proteininin indüksiyonu antisense c-fos RNA'nın ekspresyonu ile bloke edilebilmektedir. Bunun sonucunda, bu vakaların herbirinde kollajenaz ve/veya stromelysin gen ekspresyonunun indüksiyonunun bloke edilmesi, MMP mRNA sentezinin stümlasyonunda c-fos'un gerekliliğini göstermektedir (3). TNF- α ; jun ve kollajenaz gen ekspresyonunun her ikisinin de uzamış aktivasyonunu indükler ve bu kollajenaz aktivasyonuna; TRE/AP-1 aracı olur. Tüm bu sonuçlar, kollajenaz ekspresyonunun c-jun ile direkt modülasyonunu düşündürür. Metalloproteinaz gen ekspresyonunun indüksiyonu; c-fos, c-jun'un majör rol oynadığı intrasellüler üçüncü mesajcı yolunu kullanır.

Kollajenaz gen ekspresyonunun glukokortikoidler ile inhibisyonu, TRE/AP-1 bağlayan bölümde etkisini gösterir ve c-fos ya da c-jun bu etkiye aracılık eder.

TGF- β ratlarda transin olarak bilinen stromelysinin gen ekspresyonunu inhibe eder. c-fos TGF- β ile ortaya konan MMP nin bu negatif regülasyonunda da rol alabilir (3).

II. Metalloproteinaz Aktivitesinin Regülasyonu:

MMP mRNA'sı kodlandıktan sonra translasyon gerçekleşir ve enzim proenzim formunda sekrete olur.

Latent formda bulunan MMP; organik civa bileşenleri, şelasyon yapıcı ajanlar ve proteazlar gibi bazı invitro ajanlarla aktive edilebilir ve bu aktivasyon proteolitik sindirimle sınırlandırılabilir (3).

Latent molekül, prodomaini etrafında katlanmıştır ve korunmuş olarak bulunan PRCGVDPV bölgesindeki sistein rezidüleri çinko molekülü ile bir kompleks yapmıştır. MMP aktivatörleri molekülde çinko ile etkileşimi bozarak ve proteolitik reaksiyona eşlik edecek olan çinkoyu serbestleştirerek, MMP latent molekülünde bir konformasyonel değişikliğe yol açarlar. PRCGVDPV sekansını içeren aminoterminal prodomaini uzaklaştırılmış aktif MMP otoproteoliz yeteneğine sahiptir. Latent molekülün aktif enzime konversiyonu MMP aktivitesinin regüle olduğu bir sonraki aşama olan proteinaz kaskadı aktivasyo-

nunu da içerir. Plazminojen aktivatörlerinin aktivasyonu ile plazminojen prekürsörlerinden üretilen plazmin MMPs'in endojen aktivatörüdür. Bu kaskat hücre membranında lokalize olmuştur. Plazmin hem prokollajenaz hem de prostromelysini aktif forma çevirir ve aktive stromelysin proteolitik yıkımla interstisyel kollajenazı aktive eder, böylelikle kollajenaz aktivitesinde 5-8 katı kadar bir artış olur. MMP ve plazminojen aktivatörlerinin etkilerinin birlikte düzenlenmesi, sinerjik bir etki ile ekstrasellüler matrisin tamamen parçalanması ile sonuçlanır. Katepsin B,G, elastaz, tripsin benzeri proteazlar, hormonlar, sitokinler, protoonkojenler, steroidler ve büyüme faktörleri aktivitenin regülasyonunda yer alan diğer endojen faktörlerdir (3). Bu ajanları direkt etkileyen maddeler eklendiğinde, bunlar ECM'i parçalayan enzim ve inhibitörlerinin miktarlarını düzenleyerek hücre-hücre ve hücre-matris etkileşimini etkilerler.

Bunun yanında bu regülasyonda MMPs inhibitörlerinin rolü de belirtilmelidir. ECM substratları üzerinde MMP'nin aktivitesi enzimlere ve enzim inhibitörleri arasındaki dengeye bağlıdır (3,5).

Metalloproteinazların Spesifik Doku İnhibitörleri (TIMP)

MMP'ları inhibe eden bazı faktörler tanımlanmıştır. Bunlardan biri, genel proteinaz inhibitörü olarak bilinen ve yüksek molekül ağırlığı nedeni ile dokulara girmesi zor olan α 2-makroglobulin (4,12-15) diğeri ise antikollajenaz aktiviteye sahip olan serum C-reaktif proteindir. Bunun yanı sıra bazı spesifik MMPs doku inhibitörleri (TIMPs) tanımlanmıştır. İn vivo koşullarda, MMP aktivasyonunun regülasyonunda TIMPs önemli rol oynar (13,16,17)

TIMPs aktivitesi için bütünlüğü bozulmamış yapı gereklidir, yapısının bozulması ile aktivitesi ortadan kalkar ve tripsinle muamele edilerek oluşturulan parçalanmış kısmının aktivitesi yoktur.

TIMPs aktivitesi EGF, TGF- β , IL-1 β , IL-6, retinoik asit, onkostatin, forbol esterleri, sitokinler, temel fibroblast büyüme faktörü gibi çeşitli ajanlarla artırılabilir. Konkonovalin A ve deksametazon tedavisi sonrasında ise TIMPs aktivitesi inhibe olur (12). Tümör nekroz faktörün (TNF) TIMPs aktivitesinin regülasyonundaki rolü tartışmalıdır, bifonksiyonel rolü olabileceği üzerine yorumlar vardır. TNF- α 'nın düşük konsantrasyonlarında TIMP-1 üretimi artarken, yüksek konsantrasyonlarında TIMP-1 üretimi baskılanmaktadır.

TIMPs, MMPs aktivitesini hem proenzim aktivasyonu aşamasında hem de substrat parçalanması sırasında regüle eder. Diğer proteinaz inhibitörleri ile olduğu gibi aktivite sadece spesifik lokalizasyonlarda ortaya çıkar (12).

MMPs ve TIMPs arasında bulunan oran çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde değişmektedir. Bazı bağ dokusu hücreleri tarafından TIMP üretiminde değişiklik

oluşturulması rezorptif durumlarla ilişkili olarak bulunmuştur. Hem kollajenaz hem de TIMPs hipertrofik skar dokusunda lokalize edilmiş ancak normal dokuda bulunmamışlardır (12). Bir grup araştırmacı intrakraniyal tümörün invazyon potansiyeli ile TIMP-1 miktarları arasında zıt korelasyon bulmuştur. İnvaziv tümörlerin daha az miktarda TIMP içerdiği ve her bir tümörün kendi içinde, örneğin; kapsüler bölgede daha çok, santral bölgede daha az bulunması gibi bölgesel olarak TIMP-1 düzey farklılıkları gösterdiği saptanmıştır (4).

TIMP-1: Primer gen ürünü, X kromozomu üzerinde tanımlanmış, 20kDa ağırlığında proteindir ve yapısında konformasyonel mobilitiyi sağlayan altı adet disülfid bağı vardır. Glikozilasyon ile aktive olur. Aktif formu 28 kDa ağırlığında bir siyaloglikoproteindir (4,13). Özellikle makrofajlar olmak üzere pek çok hücrede üretilir ve salgılanır (4,12,13), trombositlerde rezidü olarak bulunur (12) ve çeşitli dokular ile amnion sıvısı, sinovyal sıvı gibi vücut sıvılarında yer alır. TIMP1 spesifik olarak metalloproteinazlara karşı aktivite gösterir, diğer metalloendopeptidazlar üzerine inhibitör etkisi yoktur (12). TIMP-1 MMPs'in aktif formuna yüksek afinite ile nonkovalent bağlarla, bire bir oranında, irreversibl olarak bağlanır (12). Bu oranda küçük bir değişiklik olduğunda sonuç MMP aktivitesi lehinedir. Ek olarak gelatinaz B nin proformuna bağlanabilir (4,12,13) ve MMP-9 ile ilişkili olarak salgılanır (13).

TIMP-1 in eritrosit üretimini artırıcı etkisi vardır. Ayrıca hücre yüzey reseptörlerine bağlanması ile ortaya çıkan direkt sellüler etkisi ile çeşitli hücre tiplerinde replikasyonu uyarır (Tablo 2) (6,9).

TIMP-2: 21 kDa ağırlığında glikolize olmamış bir proteindir. TIMP-1 ile homolog özellik gösteren 12 sistein rezidüsü vardır (4). Dağılımı iyi bilinmemekle birlikte eklem kıkırdaklarından izole edilmiştir. TIMP-1 ve TIMP-2 nin %40 oranında aminoasit dizin benzerliği vardır. Aktive olmuş MMPs'lara bağlanma yönünden TIMP-1 ile benzerdir (12), ek olarak MMP-2'nin proformu ile birebir kompleks yapar (4,12).

TIMP-2 ile ilgili olarak daha az bilgi vardır. TIMP-2, TIMP-1'den farklı bir şekilde regüle edilir, forbol esterleri ile üretimi uyarılmaz, TGF- β ile inhibe olmaz. TIMP-2'nin kan beyin bariyerinin proteolitik sızıntısını azalttığı saptanmıştır (4).

Tablo 2. Metalloproteinazların doğal inhibitörleri (6,9)

TIMP	MA Aktif form (kDa)	Fonksiyonu
TIMP 1	28	Pro MMP 9 ve çeşitli aktive MMP leri inhibe eder
TIMP 2	21	Pro MMP 2 ve aktive MMP 2 yi inhibe eder
TIMP 3	21.6	Tanımlanmamış

(TIMP: Tissue inhibitor of metalloproteinases)

CHIMP-3: 21 kDa ağırlığında non glikolize MMP inhibitörüdür. TIMP-1 ve TIMP-2 den farklı olmakla birlikte, yapısal olarak benzerliği vardır. TIMP-3 olarak da adlandırılmaktadır (4).

TIMP-3 ekstrasellüler matriksten transforme olmuş hücrelerin ayrılmasını kolaylaştırır ve morfolojik değişiklikleri başlatır (4).

Son zamanlarda insan glioma hücrelerinin kültür ortamında üç yeni MMP inhibitörü daha tanımlanmıştır. Bunlarda; IMP-1 (MA:22 kDa), IMP-2 (MA:19 kDa), IMP-3 (MA:16.5 kDa) olarak adlandırılmıştır (4).

TIMPs'in kemik yeniden yapılanması, meme bezlerinin küçülmesi, korpus luteumun prematür hasarının önlenerek hamileliğin devamının sağlanması gibi fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. TIMPs, doku hasarı ve anjiogenezisi içeren çeşitli malign olmayan hastalıklarda da yer alır. TIMPs ve MMPs arasında ki dengesizlik romatoid artrit gibi çeşitli kronik inflamatuvar durumlarda gözlenmektedir. Osteoartrit eklem artmış miktarda MMPs ve daha az oranda artmış TIMPs içerirler. Kollajenle uyarılmış artrit modeli kullanıldığında, rekombinant TIMP'in sistemik verilmesinin buradaki patolojiyi baskıladığı, TIMP-1'in sistemik olarak uygulanması ile artrit farelerde eklem hasarının azaldığı gösterilmiştir.

TIMP in tümör invazyonu ve metastazında baskılayıcı rol oynadığına ilişkin giderek artan kanıtlar görülmektedir. Benign tümörler ile karşılaştırıldığında, malign tümörlerde TIMP miktarları azalmıştır. Fare B-16, F-10 melanom hücreleri ile oluşturulan akciğer metastatik kolonizasyonunun TIMP ile inhibe olduğu, antisense ekspresyon vektörü ile TIMP-1'in üretimini azaltılması ile ise metastatik fenomenin başlatıldığına ilişkin çalışmalar vardır (4).

Metalloproteinazlar (MMPs) ve İnhibitörlerinin (TIMPs) Çeşitli Patolojik ve Fizyolojik Durumlarla İlişkisi

Embriyogenez ve Üremede MMPs ve TIMPs

Üremede yer alan; ovulasyon, implantasyon, gestasyon, parturisyon, laktasyon ve involusyonu içeren pekçok süreç TIMPs ve MMPs aktivitesine gereksinim gösterir. Fonksiyonel MMP-9 ve TIMP-1 mRNA fertilize olmamış oositlerde bulunmaktadır. Döllenmeden sonra, her ikisi de blastosit implantasyonu sırasında artmaktadır. Blastositin uterus epiteli ve stromayı invaze edebilme yeteneği MMPs ile ilişkilidir. Bu durum embriyo ve desidua tarafından üretilen TIMPs ile oluşan lokal değişikliklerle ortadan kaldırılabılır. Fare embriyosu gelişimi sırasında kollajenaz, gelatinaz ve stromelysin düzeyleri embriyonun uterin duvara implante olduğu zamanla uyumlu olarak artar. Eksojen olarak ortama TIMP-1 eklendiğinde ise blastosit aşırı büyümesi ile ilgili olarak oluşan matriks yapısındaki parçalanma inhibe edilir. Ekstra plasental bölgede desidua

bazalisi 7.5 günde invaze eden, hızla bölünen trofoblastlar yer almaktadır. TIMP-1 mRNA miktarında bu dönemde 6-8. günlerde gözlenen pik, embriyo gelişiminde en fazla invazyonun gözlendiği dönemle uyumludur. TGF- β insan trofoblast hücre kültürüne eklendiğinde TIMP-1 mRNA artışı ile birlikte trofoblastların invaziv özelliklerinde azalma olur. TIMPs ve MMPs deki artış büyüme ve fetal-maternal bütünlüğün devamı için şarttır, maternal TIMP-1 in oldukça invaziv olan fetal trofoblastların invazyonuna set çekmesi, onun metastaz sırasındaki organ invazyonuna da engel olabileceğini düşündürmektedir (18-21).

Metalloproteinazlar ve Anjiyogenezis

Tümör hücresi invazyonu ve anjiyogenezisin fonksiyonel olarak pekçok yönden benzerlikleri vardır. Tümör dokusu oluşumu ile başlatılmış anjiyogeneziste ilk kanıt bazal membranda yer alan çözülmedir. Anjiyogenezisi oluşturan faktörler, tipIV ve tipV kollajen içeren bazal membranın yıkılması için MMPs üretimini artırır. Ekstrasellüler matriksten salınan enzimlere ek olarak konak fibroblastları ve mast hücreleri kollajenolitik aktivite açığa çıkarılır ve bu da bazal membran çözülümünü hızlandırır. İnvaze eden hücreler bu bağ dokusu bariyerini aştıktan sonra hücre proliferasyonu ve süregelen invaziv davranış ya yeni damar lümeni oluşumu ile ya da yeni bir metastatik odak ile sonuçlanır. Yeni damar oluşumunun önlenmesinde MMP inhibitörlerinin kullanılabilmesi ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (22). Örneğin doğal metalloproteinaz inhibitörleri olan TIMP-1 ve TIMP-2'nin topikal olarak verilmesi ile civciv koriyoallantoik membranında spermin ile indüklenmiş anjiyogenezisin inhibe olduğu gösterilmiştir (18).

TGF- β TIMP-1 için güçlü bir uyarıcı faktör olması nedeni ile endotelial hücre proliferasyonunu inhibe ederek antianjiyogenik faktör olarak davranır.

Böylece anjiyogenezisin inhibisyonu ile TIMPs, tümör büyümesi ve metastazını sınırlayıcı rol oynamaktadır (4-6,10,18,23).

Kanser ve nonneoplastik doku yeniden yapılanması arası benzerlikler, kanser ve metalloproteinaz ilişkisi

Malign hücrelerin bir özelliği invazyon ve metastaz yapma kapasiteleridir. İnsan kanserlerinde, tümör ile infiltre olmuş stromal hücrelerde matriksi degrade eden proteaz sisteminin komponentleri sıklıkla saptanmaktadır. Bu bulgular göstermektedir ki; kanser invazyon sürecinde stromal hücreler aktif olarak rol almaktadır. Kanser invazyonunda ekstrasellüler matriksin ve bazal membranın parçalanması, nonneoplastik doku yeniden oluşum sürecinde olduğu gibi önemli rol oynar. Bu parçalanma çeşitli ekstrasellüler proteolitik enzimlerin birlikte çalışmaları ile başarılıdır. Bu enzimler matriksi parçalayan proteazlar olarak bilinirler ve bu grupta serin proteaz ailesi (tPA sistemi) ile birlikte Matriks Metalloproteinaz ailesi (MMPs) yer almaktadır. Bu enzimlerin aktivitesi, proenzim aktivatörleri (UPA, MT-MMPs),

spesifik inhibitörler (PAIs, TIMPs) ve hücre yüzey reseptörleri (UPAR) ile düzenlenmektedir. Matriks parçalanması üç değişken arasındaki dengeye bağlıdır. Bunlar sırası ile; ekstrasellüler matriks komponentlerinin üretimi, proteinaz üretimi, proteinaz inhibitörlerinin üretimidir. Kanser invazyonu bir çeşit doku yeniden yapılanma modeli olarak düşünülebilir. Bir dokuda kanser başlangıcı ile malign olmayan yeniden yapılanma süreci arasında benzerlikler vardır. Örneğin; meme dokusunun postlaktasyonel involüsyonu ile memede karsinoma in situ gelişimi karşılaştırıldığında her iki vakada da fibroblast benzeri stromal hücrelerde gelatinaz ve stromelysin-3 mRNA'larına rastlanmıştır. Deri yara iyileşmesi ve deri karsinomları arasında da aynı tür benzerlikler saptanmıştır. Bazı yassı hücreli karsinomlarda; neoplastik epitelde interstisyel kollajenaz ve stromelysinin varlığı gösterilmiş ve tüm bu moleküllere reepitelizasyon ve yara iyileşmesi sırasında da rastlanmıştır.

Kanser tiplerinin metalloproteinazlarla ilişkisini gösteren bazı çalışmalar mevcuttur (2). İnterstisyel kollajenaz (MMP-1); meme, beyin, mide, baş boyun kanserlerinde saptanmıştır. Kolorektal kanserlerde insutu hibridizasyon (ISH) tekniği ile eozinofil ve fibroblastlarda artmış MMP-1 izlenimi, bazal hücre karsinomlarında İŞH ve immunosito kimyasal (İCK) yöntemle stromal hücrelerde artmış MMP-1 izlenimi saptanmıştır. Mide kanserinde İSH sinyalleri tümör stromasının makrofaj ve fibroblast benzeri hücrelerinde lokalize olmuştur.

Gelatinaz A (MMP-2); kolon, pankreas (9), mesane, prostat, deri karsinomlarında, meme ve over kanserinde ve hemen tüm kanser tiplerinde tümör stromasına lokalize olarak izlenir. Prostat kanserinde neoplastik epitel dokusunda, hipofarinks ve pankreas kanserinde ise hem neoplastik epitel hem de tümör stromasında görülmesi ender rastlanan durumlardır.

Gelatinaz B (MMP-9); kolorektal kanserde, akciğer, mesane, mide kanserinde ve derinin yassı hücreli karsinomlarında makrofajlarda saptanmıştır (2). Hepatosellüler karsinomda artmış MMP-9 düzeyleri bildirilmiştir (24).

Stromelysin1 (MMP-3) ve Stromelysin2 (MMP-10); baş boyun yassı hücreli karsinomlarında, bazal hücreli kanserde, pankreas, mide, kolon ve prostat kanserinde saptanmıştır.

Stromelysin3 (MMP-11); baş boyun, mide, kolorektum, pankreas, karaciğer, akciğer, böbrek, deri ve prostat kanserinde stromada artmıştır, neoplastik epitelde ise lokalizasyonu saptanmamıştır. İnvaziv meme kanserinde insutu meme kanserinden daha fazla olması ve kolorektal kanserde izlenim verirken benign kolon adenomunda olmaması nedeni ile giderek artan miktarlarının tümörün invaziv olma potansiyeli ile doğru orantılı olduğu söylenebilir (2,11,25).

Matrilysin (PUMP-1, MMM-7); mide, meme, prostat, ve kolorektal kanserde artar. Tüm tümör hücrelerinde bu artış neoplastik hücrede saptanmaktadır. Kolorektal kanserde artmış matrilysin düzeyleri tümörün geç evresi ile ilişkilidir. Bazal hücreli karsinomların atipik malign tümörler oldukları ve metastaz yapmadıkları bilinmektedir ve bu tümörlerde matrilysin düzeyinde artış olmayışı matrilysin tümör progresyonunda önemli bir rolü olduğuna kanıttır.

Membran tipi MMPs (MT-MMPs); gelatinaz A aktivasyonunda rol alır ve bu aktivasyon tümör hücrelerinin göçü için önemli olabilir. MT-MMPs mRNA ve proteini mide kanserinde neoplastik bölgede saptanmıştır. Kolon, meme, baş boyun kanserinde ise MT-MMP1 stromada saptanmıştır.

TIMPs; kolorektal kanserlerde hem TIMP1 protein hem de mRNA'sı stromada fibroblastlarda görülür. Hastalığın ilerlemesi ile düzeylerinin arttığı bildirilmiştir. Karsinomlarda benign adenomlardan, adenomlarda da normal mukozada olduğundan daha fazla oranda saptanmıştır. Artan miktarların tümörün invaziv olma özelliği ile doğru orantılı olduğu söylenebilir (2).

Kanser hücrelerinin kemik üzerine etkisi incelendiğinde; tümör hücreleri ile oluşturulmuş osteoliziste metalloproteinazların yer aldığı görülmüştür. Özellikle katepsin K gibi sistein proteinazlara ek olarak homeostatik kemik büyümesi ve yeniden yapılanması sürecinde mediator olarak metalloproteinazlara rastlanmaktadır. İnterstisyel kollajenaz (MMP-1) ve kollajenaz 3 (MMP-13) kemik organik matriksinde yer alan tip I kollajeni parçalama yeteneğine sahiptir. MMP-2 ve MMP-9 parçalanmış tip I kollajen üzerine etki edebilmektedir. Ek olarak stromelysin 1 (MMP-3) ve MT-MMPs; hem MMP-1 hem de MMP-9'un aktivasyonunda son aşamada rol oynayabilmektedir. MMP-1, MMP-2 ve MMP-9 insan osteoblast hücre kültüründe saptanmış ve MMP-1 osteoblastlarda osteoklastlara oranla daha yüksek miktarda bulunmuştur. Kemikte kollajen tip I'in bazı kanser hücreleri aracılığı ile parçalanması, osteoklastlardan yoksun cansız kemik dokusunda MMP-2 ve MMP-9'un lokal olarak salgılanması ile ilişkilidir. MMPs multipl myeloma ve kemiğin dev hücreli tümöründe kemiğe invazyon ve kemikte normal yapının kaybı sürecini hızlandırmaktadırlar (26).

Mide kanserinde MMP-9 ve MMP-2 aktivitesi diğer metalloproteinazlara oranla daha fazla araştırılmıştır. MMP-9 mide dokusunda malign fenotip için karakteristik bulgu olarak tanımlanmıştır ve ilerlemiş mide kanserinde öncelikli olarak tayin edilmiş ve vasküler invazyon ile uyumlu düzeyleri saptanmıştır. Böylece hastalık prognozu ile ilişkisi tanımlanmıştır (27).

Pankreas kanserinde MMP-1 üretimine bağlı olarak tip I kollajenolitik aktivite tanımlanmıştır. Bununla beraber hücre kültürlerinde farklı MMP ekspresyon paternleri tanımlanmıştır. Örneğin; İnvaziv duktal adenokarsinomda

MMP-2 ekspresyonu intraduktal karsinomlara göre daha fazla bulunmuştur. Pankreatik ve ampullar kanserlerde immunohistokimyasal yöntemle MMP-2, MMP-7 artışı, in situ hibridizasyon çalışmaları ile MMP-2 ve MT-MMP1'in birlikte arttıkları, Northern analizleri ile MMP-2, MMP-7, MMP-11 artışı saptanmıştır. TIMP1 üretimi ile lenf nodu metastazı arasında negatif korelasyon, MMP üretimi ile tümör kötü diferansiyasyonu arasında ise pozitif korelasyon saptanmıştır (9).

Bir çalışmada; ilerlemiş üroteliyal karsinomlu hastalarda tam rezeksiyon sonrasında MMP-2 ve MMP-3 düzeyleri enzim immünassay yöntemi ile değerlendirilmiş ve rekürrens değerlendirilmesinde yeni belirleyiciler olacak şekilde MMP-2 ya da MMP-3 düzeylerinde veya her ikisinin de serum miktarlarında artış olduğu gözlenmiştir (28).

Merkezi Sinir Sistemi ve Metalloproteinazlar

Primer intrakraniyal tümörde mortalite genellikle primer tümör dokusuna bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. İntravazasyon ve hematojen metastaz nadir olarak gözlenir ancak dokunun normal yapısının yoğun olarak bozulması nedeni ile malign gliomlar beyin dokusu stromasına kadar uzanarak oldukça invaziv bir karakter sergilerler ve ek olarak serebrospinal sıvı ile taşınarak migratuar özellik gösterirler. Malign beyin tümörlerinin invazyonuna birkaç MMPs aracılık etmektedir. Bunlar interstisyel kollajenaz, gelatinazlar, stromelysinlerdir. Meningiomlarda tümör dokusunda kollajenaz aktivitesi düşük, meningiomla invaze olmuş dura ve kemikte ise yüksektir. Beyaz cevherin glioma hücreleri ile infiltrasyonuna kanıt olarak, glioblastomada myelin üzerine glioblastoma hücrelerinin yayılımına izin veren bir metalloproteinaz saptanmıştır. Glioma hücrelerinin in vitro koşullarda MMP-1, MMP-2, MMP-3 salgıladıkları ve glioblastoma beyin ekstraktları ve metastatik akciğer lezyonlarında MMP-9 artışı olduğu bildirilmiştir (29).

Anjiyotensin II ve Metalloproteinazlarla İlişkisi

Renin anjiyotensin aldosteron sistemi ve kalp büyümesi arasındaki ilişki kronik kalp hastalıkları için önemli bir rol oynamaktadır. Kardiyak fibroblastların aktivasyonu ile fibriler tip I ve tip II kollajen sentezlenir ve interstisyumda yerini alır. Kardiyak fibroblastların aktivasyonu sadece hemodinamik yol aracılığı ile düzenlenmez. Anjiyotensin II'nin MMP aktivitesini inhibe etme özelliği olduğundan, anjiyotensin II ve aldosteron kollajenin MMP ile parçalanmasını engelleyerek ve kollajen sentezini uyarak myokardın kollajen matriksinin yeniden yapılanma sürecinde rol alırlar. Bu nedenle myokarda interstisyel kollajenin parçalanması açısından anjiyotensin II anahtar enzimdir. Bu bulgular anjiyotensin konverting enzim blokerlerinin hipertansiyon, myokardiyal infarktüs ve dilate kardiyomyopati nedeni ile gelişen konjestif kalp hastalıklarında tedavide kullanımını açıklamaktadır (30).

Dermal Yaşlanmada Metalloproteinazların Rolü

Deride yer alan kollajen ve elastik moleküller, proteolitik aktivitenin artmış ekspresyonu ile dejenerasyon gösterirler. Dermal fibroblastlar sadece belirli sayıda replikasyon yeteneğine sahiptir. Belirli bir yaşdan sonra gelişen deri atrofisinin; kollajenin parçalanmasına yol açan yaşlı dermal fibroblastlardaki yüksek MMPs aktivitesine bağlı olduğunu bildiren çalışmalar vardır (31).

Karaciğer Fibrozisi ve Metalloproteinazlar ile İlişkisi

Karaciğerin yara iyileşmesine bir cevabı olan fibrozis dinamik bir süreçtir ve kalıcı skar oluşmaksızın çözülme potansiyeline sahiptir. Fibrozis ve siroz irreversibl olduğunda progresyon gösterebilir. Hepatik fibrogenesis hem karaciğer hücrelerinin hem de ECM nin oluşturduğu dinamik bir bütündür. Hepatik ECM nin kalite ve miktarındaki majör değişiklikler ile karaciğerde yer alan hepatosellüler hücreler, İto hücreleri, depo hücreleri, ve lipositlerin aktivasyonu fibrotik yeni matriksin gelişiminde majör rol oynar. Sirotik karaciğer altı kat daha fazla ECM içerir ve erken aşamada Disse aralığında kollajen tip III, tip V ve fibronektin miktarları artmıştır. Kronik hasarda artmış kollajen tip I, tip IV, elastin, laminin birikimi görülür. En fazla artış tip I kollajen düzeylerindedir. Karaciğer fibrozisinden geri dönüş multipl ECM komponentlerinin yeniden düzenlenmesini ve tip I kollajenin dejenerasyonunu gerektirir. Hepatosellüler hücreler ve Kupfer hücrelerinden salınan MMPs in çeşitli ECM komponentlerini parçalama kapasitesi vardır. İnterstisyel kollajenaz MMP-1 karaciğerden fazla miktarda salınmaktadır. Ayrıca MMP-2 ve MMP-14'ünde interstisyel kollajenolitik aktivitesi vardır, ancak bu aktivite ilerlemiş fibrozisde azalmıştır ve bu da kollajen birikimi ile sonuçlanır. TIMP-1 ve TIMP-2 insanlarda ve rat modelinde hepatik fibroziste artmış olarak saptanmıştır ve insan karaciğerinde TIMP-1 üretimi fibrozis derecesi ile uyumludur. TIMP/MMP oranındaki artış karaciğerde MMPs'in ECM i parçalamasını önleyerek hepatik fibrozisi artırıcı etki yapmaktadır. Ek olarak proMMP-1 aktivasyonu için bir proteaz olan plazmin gereklidir ve aktive karaciğer hücreleri fibrotik karaciğerde plazmin sentezini inhibe ederler. Sonuç olarak aktive karaciğer hücreleri tarafından aşırı ekstrasellüler matriks üretimi, azalmış MMP aktivasyonu, aktif MMPs'ın TIMP aracılığı ile inhibisyonu fibrojenik ortamı hazırlar. Tedavi yaklaşımı olarak aktive karaciğer hücrelerinin apoptozis yolu ile ortamdaki uzaklaştırılması fibrozisin geri döndürülmesi için bir yol olabilir (14, 32-38).

Ek olarak kronik hepatit C li insanlarda MMP-2, MMP-9 ve inhibitörlerinin periferik kan hücrelerinde tayini ile ilgili bir çalışmada, karaciğerde MMP-2 mRNA'nın, lökositlerde MMP-9 mRNA'nın arttığı, mononükleer lökositlerde TIMP mRNA'nın azaldığı, fakat ne MMP-9 ne de TIMP mRNA üretiminin inflamasyonun derecesi ve fibrozis ile korelasyon göstermediği bildirilmiştir (39).

Eklem Hastalıklarında Metalloproteinazların rolü

Eklem hasarının mediyatörü özellikle kollajenazdır. Romatoid artrit gibi inflamatuvar eklem hastalıklarında sinovya polimorfonükleer lökositlerle doludur ve proteinazlar bu hücrelerden ve makrofajlardan salınır. İnflamasyon yokluğunda ise eklem kondrosit ve sinoviyosit gibi mezenkimal hücrelerinden eklem komponentlerini parçalayan proteinazlar salınmaktadır. İmmunoreaktif kollajenaz kırıkta erozyon bölgesinde saptanmış ancak erozyon olmayan bölgede saptanmamıştır. İn situ hibridizasyon çalışmaları kullanılarak stromelysin ve kollajenaz hipertrofik sinovya da tayin edilmiştir. Osteoartritte eklem hasarı lokal olarak sentezlenen proteolitik enzimlerin aktivitesi ile ortaya konmaktadır. TGF- β , İL-1'e karşı MMP üretim kapasitesini azaltarak, deksametazon ve diğer steroidlerde MMP üretimini inhibe ederek osteoartritte ve diğer romatizmal eklem hastalıklarında kullanılabilirler (7,15).

Eklem kırıkta da cerrahi travmanın parçalayıcı enzim aktivitesi ve proteoglikan ve kollajen parçalanması arasındaki ilişki üzerine etkisini inceleyen bir çalışmada, operasyon öncesi düzeylerle karşılaştırıldığında cerrahi uygulanmış eklemlerde proteoglikan parçalanma ürünleri ve MMP1 düzeyleri anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Diz eklemi üzerinde yapılan bu çalışmada, eklem kırıkta da bağlar ya da menisküs düzeyinde bir hasar varlığında sinovya sıvısında kollajenaz, stromelysin 1 miktarları artmış olarak bildirilmiştir. Sinovya proteazları üreten dokulardan biri olduğundan diz eklemi bağları ile ilgili bir hasarlanma ve cerrahi sonrası metalloproteinazlar aktive olur ve proteoglikan ve kollajen yıkımı artar (40).

Vitreoretinal hastalıklarda Metalloproteinazlar ve İnhibitörleri

Posterior segment; yara iyileşmesi, anjiyogenezis, karsinogenezis ve dejeneratif hastalıklar için önemli bir alandır. MMPs ve TIMPs normal retinal homeostaziste rol alırlar. Western blot analizleri ile MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 ve TIMP-3 insan interfolloreseptör matriksinde ve vitreusta tanımlanmıştır. Bu bulgulara göre posterior segmentin patolojik durumlarında MMPs ve TIMPs patojenik önem taşımaktadır. Bu tür patolojik durumlar arasında retinal yeni damar oluşumu ile ilgili olarak proliferatif diyabetik retinopati, tümör dokusu olarak uveal melanom, herediter ve dejeneratif hastalıklardan Sorsby'nin fundus distrofisi ve yaşa bağlı maküler dejenerasyon sayılabilir (6).

Ek olarak korneal yara iyileşmesinde kollajenolitik ve gelatinolitik enzimler yer alırlar (41).

Metalloproteinazların Sentetik İnhibitörleri

Tümöral olaylarda spesifik olarak metastazı hedefleyen bir tedavi yaklaşımı olarak Batimastat ve Marimastat adlı iki sentetik MMPs inhibitörü kullanılmaktadır. Bu tip

ilaçlar en az yan etki potansiyeline ve en yüksek özgünlüğe sahip olmalıdırlar.

Batimastat: Geniş spektrumlu, aktivitesi güçlü MMPs inhibitörüdür. Metalloproteinazların substratını taklit ederek kompetitif, güçlü, reversibl inhibisyon yapar. İnsolubl olduğu için oral alınımında biyoyararlanımı düşüktür, direkt enjeksiyonla çeşitli vücut boşluklarına verilebilir. Periton içine verilmesi sürekli bir plazma konsantrasyonu sağlar, yarılanma ömrü 28 gündür. Farmakokinetik profili insan çalışmaları için uygun olmadığından rodent çalışmalarında kullanılmaktadır.

Marimastat: İnhibitör spektrumu batimastata benzer ve geniş spektrumludur. Oral alınımının biyoyararlanımı iyi olduğu için insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda kullanılabilir. Yarılanma süresi 15 saattir. Rodentlerde hızlı metabolize edildiği için test edilmesi ve sürekli plazma konsantrasyonunun görülmesi zordur.

Sonuç olarak prelinik çalışmalar batimastat ile, klinik çalışmalar ise marimastat ile yapılabilmektedir (42-44).

Metalloproteinazların ve inhibitörlerinin tayin yöntemleri

MMPs ve TIMPs varlığının belirlenmesinde;

Monoklonal antikorlar kullanılarak tek basamaklı sandwich enzim immün assay (45-47), in situ hibridizasyon, polimeraz zincir reaksiyonu, Northern blotting (38), Zimografî, Western immunoblotting analizleri (48), immunositokimyasal yöntemler (49), gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Ennis BW, Matrisian LM. Matrix degrading metalloproteinases. *Journal of Neuro-Oncology* 1994;18:105-9.
2. Hewitt R, Dan K. Stromal cell expression of components of matrix-degrading protease systems in human cancer. *Enzyme Protein* 1996;49:163-73.
3. Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Tıp April* 1990; vol.6 no.4.
4. Thorgeirsson UP, Lindsay CK, Cottam DW, Gomez DE. Tumor invasion, proteolysis and angiogenesis. *Journal of Neuro-Oncology* 1994;18:89-103.
5. Ekmekçi A, Erbaş D. Kanserin Moleküler Mekanizması, Onkogenler ve Büyüme Faktörleri. Ankara 1991; 201-19.
6. Sethi CS, Bailey TA, Luthert PJ, Chong NHV. Matrix metalloproteinase biology applied to vitreoretinal disorders. *Br J Ophthalmol* 2000; 84:654-64.
7. Gordon JL, Drummond AH, Galloway WA. Metalloproteinase inhibitors as therapeutics. *Clinical and Experimental Rheumatology* 1993; 11(Suppl.8):S91-94.
8. Nagase H, Fields GB. Human matrix metalloproteinase specificity studies using collagen sequence-based synthetic peptides. *Biopolymers (Peptid science)* 1996; vol. 40,399-416.

9. Evans JD, Ghaneh P, Kawesha A, Neoptolemos JP. Role of Matrix Metalloproteinases and their inhibitors in pancreatic cancer. *Digestion*. 1997; 58:520-8.
10. Ray JM, Stetler-Stevenson WG. The role of Matrix Metalloproteinases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J* 1994; 7, 2062-72.
11. Welgus HG. Stromelysin: Structure and function. *Progress in Inflammation Research and Therapy*. 1991; 61-5.
12. Murphy G. The regulation of connective tissue Metalloproteinases by natural inhibitors. *Progress in Inflammation Research and Therapy* 1991.
13. Tanaka H, Miyazaki N, Oashi K, Tanaka S, Ocmichi M, Abe S. Sputum Matrix Metalloproteinase-9:Tissue inhibitor of Metalloproteinase-1 ratio in acute asthma. *J. Allergy Clin Immunol* 2000 May; vol.105 no: 5.
14. Arthur MJP. Degradation of matrix proteins in liver fibrosis. *Path Res Pract* 1994; 190, 825-33.
15. Evans CH. The role of proteinases in cartilage destruction. *Drugs in Inflammation*. 1991 Birkhauser Verlag Basel.
16. Nagase H, Suzuki K, Itoh Y, Kan C-C, Gehring MR, Huang W, Brew K. Involvement of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPS) during matrix metalloproteinase activation. *Intracellular Protein Catabolism*, New York, 1996; 23-31.
17. Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000 Mar 7; 1477 (1-2): 267-83.
18. Khokha R, Waterhouse P. The role of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in specific aspects of cancer progression and reproduction. *Journal of Neuro- Oncology* 1994;18: 123-7.
19. Salamonsen LA, Cherny RA, Findlay JK. Studies in vitro of effects of steroid hormones and the blastocyst on endometrial function in the sheep. *Reprod Fertil Dev* 1992, 4, 275-81.
20. Duncan WC. The human corpus luteum: remodelling during luteolysis and maternal recognition of pregnancy. *Rev Reprod* 2000 Jan; 5 (1): 12-7.
21. Murray MJ, Lessey BA. Embryo implantation and tumor metastasis: common pathways of invasion and angiogenesis. *Semin Reprod Endocrinol* 1999; 17 (3): 275-90.
22. Moses MA. The regulation of neovascularization by matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Stem Cells* 1997; 15: 180-9.
23. Haas TL, Madri JA. Extracellular matrix- driven matrix metalloproteinase production in endothelial cells implications for angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 1999 Apr- May; 9 (3-4): 70-7.
24. Hayasaka A, Suzuki N, Fujimoto N, Iwama S, Fukuyama E, Kanda Y, Saisho H. Elevated plasma levels of matrix metalloproteinase-9 (92- kd type IV collagenase/ gelatinase B) in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1996; vol:24, no:5.
25. Basset P, Wolf C, Chambon P. Expression of the stromelysin-3 gene in fibroblastic cells of invasive carcinomas of the breast and other human tissues: a review. *Breast Cancer Research and Treatment* 1993;24:185-93.
26. Orr FW, Lee J, Duivenvoorden WCM, Singh G. Pathophysiological interactions in skeletal metastasis. *Cancer Supplement*. June 15, 2000; vol: 88, no:12.
27. Allgayer H, Heiss MM, Schildberg FW. Prognostic factors in gastric cancer. *British Journal of Surgery* 1997, 84, 1651-64.
28. Gohji K, Fujimoto N, Komiyama T, Fujii A, Ohkawa J, Kamidono S, Nakajima M. Elevation of serum levels of matrix metalloproteinase-2 and -3 as new predictors of recurrence in patients with urothelial carcinoma. *Cancer*. December 1996; vol: 78, no:11.
29. Chintala SK; Tonn JC, Rao JS. Matrix metalloproteinases and their biological function in human gliomas. *Int J Dev Neurosci* 1999 Aug- Oct; 17 (5-6): 495-502.
30. Wilke A, Funck R, Rupp H, Brilla CG. Effect of the renin- angiotensin- aldosterone system on the cardiac interstium in heart failure. *Basic Res Cardiol* 1996, 91: Suppl.2, 79-84.
31. West MD. The cellular and molecular biology of skin aging. *Arch Dermatol*. Jan 1994; vol:130
32. Benyon RC, Iredale JP. Is liver fibrosis reversible? *Gut* 2000; 46: 443-446.
33. Takahara T, Furui K, Funaki J, Nakayama Y, Itoh H, Miyabayashi C, Sato H, Seiki M, Ooshima A, Watanabe A. Increased expression of matrix metalloproteinase-II in experimental liver fibrosis in rats. *Hepatology* March 1995; 787-95.
34. Iredale JP, Murphy G, Hembry RM, Friedman SL, Arthur MJP. Human hepatic lipocytes synthesize tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Clin Invest* July 1992; vol:90, 282-7.
35. Milani S, Herbst H, Schuppan D, Grappone C, Pellegrini G, Pinzani M, Casini A, Calabro A, Ciancio G, Stefanini F, Burroughs AK, Surrenti C. Differential expression of matrix- metalloproteinase-1 and -2 genes in normal and fibrotic human liver. *American Journal of Pathology*, March 1994; vol:144, no:3.
36. Arthur MJP, Friedman SL, Roll FJ, Bissell DM. Lipocytes from normal rat liver release a neutral metalloproteinase that degrades basement membrane (Type IV) collagen. *J Clin Invest* October 1989; vol.84, 1076-85.
37. Burt AD. Cellular and molecular aspects of hepatic fibrosis. *Journal of pathology*, 1993; vol.170:105-14.
38. Okazaki I, Watanabe T, Hozawa S. et al. Molecular mechanism of the reversibility of hepatic fibrosis: with special reference the role of matrix metalloproteinases. *J Gastroenterol Hepatol* 2000 ;15 Suppl : D 26-32.
39. Lichtinghagen R, Huegel O, Seifert T, Haberkorn CI, Michels D, Flemming P, Bahr M, Boeker KHW. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and their inhibitors in peripheral blood cells of patients with chronic hepatitis C. *Clinical Chemistry* 2000; 46:2 183-92.
40. Taşkıran D, Taşkıran E, Özsoy H, Lök V. Effects of Surgical Trauma on Articular Cartilage. *Tr. J. of Medical Sciences TÜBİTAK* 1999; 29:2 177-80.
41. Fini ME, Girard MT, Matsubara M. Collagenolytic/gelatinolytic enzymes in corneal wound healing. *Acta Ophthalmologica* vol. 70 (1992 Suppl. 202).
42. Rasmussen HS, McCann PP. Matrix metalloproteinase inhibition as a novel anticancer strategy: A review with special focus on Batimastat and Marimastat. *Pharmacol Ther* 1997; vol 75, No.1, pp. 69-75.
43. Wojtowicz-Praga S. Clinical potential of matrix metalloproteinase inhibitors. *Drugs R D* 1999 Feb;1(2):117-29.
44. Belotti D, Paganoni P, Giavazzi R. MMP inhibitors: experimental and clinical studies. *Int J Biol Markers* 1999 Oct-Dec; 14 (4): 232-8.

- 45.Fujimoto N, Zhang J, Iwata K, Shinya T, Okada Y, Hayakawa T. A one-step sandwich enzyme immunoassay for tissue inhibitor of metalloproteinases-2 using monoclonal antibodies. *Clinica Chimica Acta* 220 (1993) 31-45.
- 46.Fujimoto N, Mouri N, Iwata K, Ohuchi E, Okada Y, Hayakawa T. A one-step sandwich enzyme immunoassay for human matrix metalloproteinase 2 (72-kDa gelatinase/ type IV collagenase) using monoclonal antibodies. *Clinica Chimica Acta* 1993; 221, 91-103.
- 47.Zucker S, Lysik RM, DiMassimo BI, Zarrabi HM, Moll UM, Grimson R, Tickle SP, Docherty AJ. Plasma assay of gelatinase B:Tissue inhibitor of metalloproteinase complexes in cancer. *Cancer* August 15, 1995; vol.76, no:4.
- 48.Niu R, Okamoto T, Iwase K, Nomura S, Mizutani S. Quantitative analysis of matrix metalloproteinases-2 and -9, and their tissue inhibitors -1 and -2 in human placenta throughout gestation. *Life Sci* 2000 Feb 11;66 (12):1127-37.
- 49.Creange A, Sharshar T, Planchenault T, Christov C, Poron F, Raphael Gherardi RK. Matrix metalloproteinase-9 is increased and correlates with severity in Guillain-Barre syndrome. *Neurology* 1999 Nov 10;53(8):1683-91.