

KÖPEK ARTRİTİSLERİNİN OLUŞUMUNDA ENZİMLERİN ROLÜ VE SAĞALTIMINA YENİ BİR BAKIŞ II:

Matriks Metalloproteinazları, Etki Mekanizmaları, Metalloproteinaz İnhibitörleri

Mustafa Arıcan¹@

Kerim Nida Çalım¹

Enzymatic Roles of Arthritis in Dogs and a New Aspect for Treatment Procedure II:

Matrix Metalloproteinase, Mechanism, Inhibitors of Metalloproteinases

Özet : Matriks metalloproteinazlar, homolog çinko endopeptidazlar ailesindedir. Matriks metalloproteinazları, bağ dokusunda bulunan önemli enzimlerden olup kırıkta yıkımına katkıda bulunduğu düşünülmüştür. Ekstraselüler matriks makromoleküllerinin artışı artritis gibi hastalıklarda yıkımına katkıda bulunur, merkez rolü oynarlar. Son zamanlarda yapılan çalışmalar ekstraselüler yapının fizyolojik ve patolojik yıkımında öncelik adımını metalloproteinaz adını verdiğimiz enzimler yaptığı bildirilmiştir. Bu derlemede, MMP ailesinin üyeleri, yapısal özellikleri, spesifitesi, aktivasyon mekanizmasının genel özellikleri ve metalloproteinaz inhibitörleri ve mekanizmalarından bahsedilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Matriks Metalloproteinaz, Matriks Metalloproteinaz İnhibitörleri

Summary : The matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of homologous zinc endopeptidases. Increased degradation of extracellular matrix macromolecules is a central event in the disease process of illness such as arthritis. Matrix metalloproteinases are important enzymes found in connective tissues and thought to be involved in cartilage degradation. The current view is that the initial step in the breakdown of the matrix in physiology and pathological situations is an extracellular process, often involving matrix metalloproteinases. They are detectable in synovial fluids and may play a destructive role in septic arthritis. In this review, it is introduced that the members of the MMP family and describe their structural features, substrate specificities, general features of the activation mechanism, and the involvement of tissue inhibitors of metalloproteinases in the activation process.

Key Words: Matrix Metalloproteinases, Inhibitors of Matrix Metalloproteinases

Giriş

MATRIKS METALLOPROTEİNAZLAR (MMP)

Matriks metalloproteinaz (MMP)'ler, çeşitli hücre tiplerinden salgılanan, bağ dokuda bulunan, ekstraselüler matriks (ECM)'in normal fizyolojik dönüşümünde yer alan, ECM'nin ve kırıkta yıkımına katkıda bulunduğu düşünülen, çinko (Zn)'ya bağlı ve 20'den fazla enzimi içeren, homolog bir endopeptidazlar ailesidirler (Nagase 1994, Clegg ve ark 1997a, Clegg ve ark 1997b, Clegg ve ark 1998, Arıcan ve ark 2000, Levin ve ark 2001).

MMP'lerin Sınıflandırılması

Proteinazlar genel olarak katabolik mekanizmalarına göre 4 alt gruba ayrılır;

1- Serin proteinazlar,

2- Sistein proteinazlar,

3- Aspartik proteinazlar,

4- Metalloproteinazlar (Clegg ve ark 1997a, Clegg ve ark 1997b, Okada 2000).

Matriks yıkımlayan metalloproteinazlar; matriks metalloproteinaz üyelerini ve bir disintegrin ile metalloproteinaz gen ailelerini (ADAM) içerirler. MMP'ler yapısal benzerlik ve substrat spesifitesine göre 5 alt gruba ayrılırlar;

1- Kollojenazlar,

2- Jelatinazlar /tip-IV kollojenazlar,

3- Stromelisinler /proteoglikanazlar,

4- Membran tip MMP'ler,

5- Diğerleri (Nagase 1994, Clegg ve ark 1997,

Okada 2000, Ye S 2000).

MMP'lerin kollojenaz alt ailesi 5 üye içerir;

- 1- MMP-1 (kollojenaz-1, doku kollojenazi, non-rodent intersitisyel kollojenaz),
- 2- MMP-8 (kollojenaz-2, nötrofil kollojenaz),
- 3- MMP-13 (kollojenaz-3, intersitisyel kollojenaz),
- 4- Ve yeni olarak belirlenen iki tane farklı protein; Mcol-A ve Mcol-B (murin benzeri kollojenaz A ve B).

MMP'lerin jelatinaz alt ailesi benzer aktiviteye sahip 2 üye içerir;

- 1- MMP-2 (Jelatinaz A, pek çok bağ doku hücresi tarafından salgılanan 72 kDa tip-IV kollojenaz),
- 2- MMP-9 (Jelatinaz B, yangı fagositleri ile tümör hücreleri tarafından salgılanan 92 kDa tip-IV kollojenaz).

MMP'lerin stromelisin alt ailesi 3 üye içerir;

- 1- MMP-3 (Stromelisin-1),
- 2- MMP-10 (Stromelisin-2),
- 3- MMP-11 (Stromelisin-3).

MMP'lerin membran tip MMP alt ailesi 6 üye içerir;

- 1- MMP-14 (MT MMP-1),
- 2- MMP-15 (MT MMP-2),
- 3- MMP-16 (MT MMP-3),
- 4- MMP-17 (MT MMP-4),
- 5- MMP-24 (MT MMP-5),
- 6- MMP-25 (MT MMP-6, leukolisin).

MMP-7 (Matrilizin, PUMP-1), MMP-12 (Makrofaq metalloelastaz), MMP-19, MMP-20 (Enamelisin), MMP-23 ve MMP-26 (Endometaz) diğerlerini oluşturur (Nagase 1994, Clegg ve ark 1997, Okada 2000, Ye 2000, D'armiento 2002).

Metalloproteinaz gen ailesi (ADAM)

Metalloproteinaz gen ailesi (ADAM) çeşitli hayvan türlerinde son olarak 23 adet belirlenmiştir. Aktif kısmın sırasındaki farklılığa göre, ADAM metalloproteinazlar ve katalitik olarak inaktif non proteolitik homologlar olarak sınıflandırılır. ADAM metalloproteinazların 2 alt grubu vardır;

- 1- Transmembran sahali ADAM'lar (ADAM-1, -8, -9, -10, -12, -13, -15, -17, -19 ve -20),
- 2- Trombospondin motifli ADAM'lar (ADAMTS-1, -2, -3, -4 ve -5) (Okada 2000).

MMP'lerin Genel Etki Mekanizmaları

Genel olarak eklem kıkırdak matriksindeki yıkımın; kondrositlerin kendinden veya lökosit ve makrofajlar gibi sinovial sıvıda bulunan hücreler veya sinoviumdaki hücreler tarafından oluşturulan proteazların hareketinden kaynaklandığı düşünülür (Lohmander 1994).

Kollojen yıkımınması; kollojen matriksin yenilenmesinde önemli bir basamaktır. Kollojenler; enzimatik olarak ekstraselüler matriksin büyük çoğunluğunu sindirebilme yeteneğine sahip MMP'lerin bir ailesi tarafından ekstraselüler olarak yıkımlanırlar (D'armiento 2002).

MMP'ler inaktif zimojenler olarak salgılanırlar ve aktivasyon için bir N-terminal propeptidinin kaybına ihtiyaç duyarlar. Dolayısıyla molekül ağırlıkları da azalır (Clegg ve ark 1997a, Clegg ve ark 1997b).

Bağ dokunun fizyolojik ve patolojik katabolizmasına MMP'lerin karıştığı şu sonuçlardan dolayı ortaya konmuştur;

1- Bütün MMP'ler hücrelerden salgılanır ve bunların pek çoğu nötr pH'da optimum aktiviteye sahiptirler,

2- Normal hücreler içerisinde MMP'lerin çok az aktiviteleri belirlenir. Fakat bir çok MMP'nin sentezi; IL-1 veya α -tümör nekroz faktörü, bir takım büyüme faktörleri, onkojenik viruslar tarafından yapılan selüler transformasyon, formol esterleri ve diğer çeşitli ajanlar gibi yangısal mediatörler tarafından artırılır. Artan sentez retinoik asit, glukokortikoidler, beta büyüme faktörlerinin dönüşümü, progesteron, interferon tarafından belki negatif olarak düzenlenebilir. Sonuçta; MMP'lerin biyolojik aktivitesi substratları tutarak ve endojen inhibitörlerin inhibisyonuyla ekstraselüler olarak kontrol edilir (Nagase 1994).

MMP Gruplarının Ayrı Ayrı Etkileri

Kollojenazlar

Osteoartritli vakalarda yapılan çalışmalarda, MMP-1 ve MMP-3'ü içeren matriks metalloproteinaz seviyeleri sinovial sıvıda gösterilmiştir. Her iki enziminde, kollojen ve proteoglikanın parçalanmasında spesifik aktivitelerinin olması; kollojen ağına olan bu etkinin, eklem hareketsizliğinin dönemlerini takiben proteolitik bir mekanizmayla ortaya çıktığını düşündürür (Narmonova ve ark 2002).

Yaş ilerledikçe kollojen miktarıyla beraber MMP-1 aktivitesinde düşüş olduğu gösterilmiştir (D'armiento 2002).

Kollojenazlar; MMP'lerin çözünemeyen fibriler kollojenleri (özellikle tip-I ve tip-II) yıkımlayabilen yüksek düzeyde spesifik bir grubudur. Sadece kollojenazlar ve MT MMP-1 fibriler kollojenin yıkımıyla ilişkilidir ki bu da bu enzimlerin doku yenilenmesinde kritik olduklarını dü-

şündürür. MMP-1'in proteinin karboksi terminal çeyreğinde yerleşen Gly-Leu veya Gly-Ile bölgesinde, kollojenin doğal üçlü heliksini parçalaması gibi substrat spesifitesini değerlendiren bir derecesi vardır. Oluşan parçalar vücut ısısında sabit bir üçlü halka yapısı oluşturamazlar ve daha sonra denature olarak parçalanan α zincirleri, non-spesifik proteazlar tarafından ilerde oluşturulabilecek yıkımlanmalara karşı savunmasızdırlar (D'armiento 2002).

Kollojenazlar; intersitsiyel kollojenler -I, -II ve -III'ün helikal kısmını sindiren tek memeli proteinazlarıdır. Kollojen-IV ve -V'i küçültmezler. Buna rağmen; MMP-1'in en iyi substratı taklit ederek bir çok endopeptidazla etkileşen bir plazma proteinaz inhibitörü olan α -2 makroglobulinin çekici kısmıdır. C-terminal kısım; tüm kollojenazların kollojenolitik aktivitelerini devam ettirmek için şarttır, fakat genel proteolitik aktivite için gerekli değildir. MMP-8; sadece nötrofillerde bulunur, fakat MMP-1; makrofajları da içeren çeşitli hücre tiplerinden sentezlenebilir (Nagase 1994).

MMP'ler insan dokularında bulunan pek çok ECM makro moleküllerine karşı aktiftirler ve eğer iki veya daha fazla MMP beraber etki ederse tabii ki tüm bileşikler kolayca yıkımlanırlar. Kollojenazlar (MMP-1, -8 ve -13); genellikle intersitsiyel kollojen tip-I, -II ve -III'ün üçlü helikal kısımlarına -NH₂ ucundan yaklaşık üç çeyrek uzaklıkta lokalize olan spesifik bir bölgeden yıkımlanırlar. Oluşan parçalar orjinal molekülün yaklaşık üç veya bir çeyrek büyüklüğü kadardır. Tabii ki bu üç MMP; MMP-1, -8 ve -13, fibriler kollojenler; tercihen tip-I, -II ve -III kollojenlerini sindirirler. MMP-1; entaktin, kollojen-X, jelatinler, agrekan ve kırkırdak zincir proteinini de sindirir. MMP-8; agrekan, jelatinler ve kırkırdak zincir proteinini parçalar. MMP-13 tercihen agrekan, tip-IV, -IX, -X ve -XIV kollojenlerini, fibronektin ve tenaskini hidrolize eder (Okada 2000).

Jelatinazlar

İnsanlarda ve köpeklerde MMP jelatinaz üretiminin sinovial fibroblastlar, kondrositler ve yangı hücreleri tarafından yapıldığı gösterilmiştir (Arıcan ve ark 2000).

MMP-2; sinovial fibroblastlar ve kondrositler tarafından salgılanır. Sinovial sıvılardaki MMP-2; dolaylı olarak temin edilir; fakat muhtemelen kalıcı eklem hücreleri tarafından üretilir. MMP-9 seviyeleri, artritise enfekte eklemelerin sinovial sıvılarında belirgin olarak artar. Artmış MMP-9 infiltrate olan nötrofillerden köken alır. Jelatinazın romatoid artritise beraber, sinovistide de rolü olabileceği gösterilmiştir. Bu aktiveleştirilmiş enzim; diğer MMP'ler ve MMP-9 üzerindeki diğer proteinaz sınıflarının hareketiyle üretilir. OA'da MMP-2'nin kondrositlerden köken alması, eklem kırıkdağından si-

novial sıvıya geçmesi mümkündür. Alternatif olarak enzim; sinovial membranın tip A hücrelerinden köken alabilir. MMP-2 çoğu hücre tipi ve tümör hücrelerinde bulunur. MMP-9 orjinal olarak nötrofillerde bulunur fakat makrofajlar, bir takım değişikliğe uğramış hücreler ve stimüle edilmiş bağ doku hücreleri tarafından da sentezlenir (Nagase 1994, Clegg ve ark 1997a, Clegg ve ark 1997b, Arıcan ve ark 2000).

Jelatinaz A (MMP-2) ve Jelatinaz B (MMP-9); sırasıyla 72 kDa jelatinaz/tip IV kollojenaz ve 92 kDa jelatinaz/tip IV kollojenaz olarak da bilinir. Doğal kollojenler -IV ve -V ile jelatinleri belirli uzunluklara bölerler. Bu enzimler; elastin ve proteoglikanı da sindirebilirler ve MMP-2, fibronektin, laminin ve kollojen-VII ve -XI' i sindirebilir (Nagase 1994). MMP-9; bu substratlara karşı aktif değildir, fakat tip-III ve -I kollojenin α -2 zincirlerini sindirir (Okada 2000).

Jelatinazlar (MMP-2 ve -9); onları jelatine bağlı özelliklerle hazırlayan tek bir fibronektin tip-II modülünün üçlü tekrarı içerirler (Okada 2000).

Köpeklerin osteoartritlik ve romatik sinovial sıvı örneklerinde yükselmiş MMP-2 ve MMP-9 seviyeleri, normal sinovial sıvı örnekleri ile karşılaştırılarak gösterilmiştir (Clegg ve ark 1997a, Clegg ve ark 1997b, Arıcan ve ark 2000, Bee ve ark 2000).

Normal sinovial sıvı minimum jelatinaz aktivitesi içerirken, aseptik artritli vakalardan elde edilen sinovial sıvı ile normal sıvıların jelatinaz biyoaktivitesi yönünden karşılaştırılmasında, istatistik olarak belirgin bir artış gösterir. Buna rağmen; aseptik artritli sinovial sıvılarında jelatinaz biyoaktivitesi düşük bir seviyededir ve hiçbir vakada yüksek seviyede değildir. Septik artritli gruptan elde edilen sonuçlar, jelatinaz biyoaktivitesi yönünden normal grupla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak belirgin artış gösterir. Böylece bazı vakalarda herhangi bir inhibitör artışında önemli sayılabilecek aktif enzim bulunmalıdır. Bu; septik artritisin bazı vakalarında görülen hızlı klinik seyri açıklayabilirken, OA gibi aseptik eklem hastalıklı vakaların daha uzun zamanları vardır (Clegg ve ark 1997).

Bununla beraber; yaş ilerledikçe kollojen miktarıyla birlikte MMP-2 aktivitesinde de düşüş olduğu gösterilmiştir (D'armiento 2002).

Yapılan çalışmalar; MMP-2 ve -9'un sinovial sıvıdaki seviyelerinin, hastalık belirleyici olarak kullanılabileceği ortaya çıkmıştır (Clegg ve ark 1997a, Clegg ve ark 1997b, Arıcan ve ark 2000).

Stromelisinler

Stromelisin kollojen tip-II, -IX, -X ve -XI'i parçalayabilme kapasitesi vardır. Bu MMP; kondrositler ve sinovial hücreler tarafından sentezlenir ve OA gelişimi

sırasında kırıkta kollojenlerinin yıkımına karşı (Lohmander 1994).

Eklem hareketsizliği ile ilgili yapılan son çalışmalar; MMP-1 ve MMP-3'ü içeren matriks metalloproteinaz seviyelerini göstermişlerdir. Her iki enziminde kollojen ve proteoglikanın parçalanmasında spesifik aktivitelerinin olması; kollojen ağına olan bu etkinin, eklem hareketsizliğinin dönemlerini takiben, proteolitik bir mekanizmayla ortaya çıktığını düşündürür (Narmonova ve ark 2002).

Stromelisin-3 (MMP-11)'ün enzimatik aktivitesi henüz belirlenmemiştir. Yapılan çalışmalarda amino asit dizisinin etkileri MMP-3 ve MMP-10 arasında %79 iken, stromelisin-1 ve -3 arasında %40'tır. Stromelisin-1 (MMP-3)'in agrekan, proteoglikan, fibronektin, kollojenler-IV, -IX, -X, laminin ve daha az olarak da elastin üzerine etkisi vardır. Pro-MMP-1 ve pro-MMP-9 aktivasyonuna katılan anahtar bir enzimdir. Stromelisin-2 (MMP-10)'nin MMP-3'e benzer bir aktivite spektrumu vardır, fakat MMP-3'ünkünden daha zayıftır. MMP-3 stimüle edilmiş bağ doku hücreleri tarafından sentezlenirken, MMP-10 üreten hücre tipleri hakkında daha az bilgi vardır (Nagase 1994, Okada 2000).

MMP-11; sadece fibronektin, laminin, proteoglikan ve jelatin üzerinde zayıf bir proteolitik aktivite gösterir (Okada 2000).

Stromelisin (MMP-3); kollojen-IX'u yıkımlamasının dışında, kollojen-II'yi yıkımlayan kollojenazı aktive eder (Rorvik ve Grondahl 1995).

Membran tip metalloproteinazlar (MT MMP)

MT MMP'lerin COOH-terminal bölgesinde trans membran kısımları vardır ve katalitik kısım hücre yüzeyine doğru çıkar. Buna rağmen; MT MMP-4 glikozilfosfolinositole bağlı MMP olduğundan, diğer MT MMP'lerden farklıdır ve hücre yüzeylerinden kolayca yayılır (Okada 2000).

Altı farklı MT MMP'ler arasında hepsinden farklı olarak MT MMP-4 ve MT MMP-6 pro-MMP-2'yi aktive edebilir ve MT MMP-1'in çeşitli dokularda pro-MMP-2'nin aktivasyonunda büyük bir rol oynadığı düşünülür. Bundan dolayı aktivatör fonksiyonuna rağmen MT MMP-1; intersitisyel kollojen tip-I, -II ve -III'ün üçlü helikal kısımlarını, fibronektin, laminin, agrekan ve jelatin içeren diğer ECM bileşikleri kadar iyi sindirir. MT MMP-2; fibronektin, tenaskin, nidojen, agrekan, perlekan ve laminini sindirir ve MT MMP-3; kollojen tip-III, fibronektin ve jelatinleri parçalar. MT MMP-5; proteoglikanları ve MT MMP-6; jelatini sindirir, fakat MT MMP-4'ün ECM substratları bilinmemektedir (Okada 2000).

Diğerleri

PUMP-1 olarak bilinen matrilisin (MMP-7) post partum involü olan rat uterusunda, mono nükleer fagositlerde ve bazı tümör hücrelerinde bulunmuştur. MMP-7'nin proteoglikan, fibronektin, jelatinler, kollojen-IV, elastin ve entaktine karşı güçlü bir proteolitik aktivitesi vardır. Metalloelastaz (MMP-12); tamamen fare makrofajının c DNA'sından klonlanmıştır ve rekombinant enzim E.coli'ye aktarılmıştır. Fakat substratları küçülebiliği diğerlerine göre elastinden daha belirsizdir (Nagase 1994).

MMP üyeleri arasında en küçüğü olan MMP-7'de hemopeksin benzeri saha eksiktir. MMP-19; sistein anahtar motifinde (PRCG(V/N)PD) glutamik asit tarafından yerine konulan, tek ikinci prolindir ve özel glutamik asit sırası, temel bölgede treoninden zengin bölge ve -COOH ucu vardır. MMP-23; MMP üyeleri arasında tek peptidi, sistein anahtar motifi ve hemopeksin benzeri kısmının eksikliğinden dolayı farklıdır, fakat pro-peptidde bir transmembran bölgesi bulunur (Okada 2000).

MMP-7; agrekan, kırıkta zincir proteini, fibronektin, laminin, kollojen-IV ve elastin gibi geniş bir substrat grubunu sindirir. MMP-12; elastin ve α -1 proteinaz inhibitörünü sindirir. MMP-18 ile protein sırası yönünden benzer olan MMP-19; agrekan ve jelatini sindirir. MMP-20; enamelini parçaladığından beri enamelisin olarak ifade edilir, fakat biyokimyasal özellikleri ayrıntılı olarak belirtilmemiştir. MMP-23; MMP'lerin sentetik bir substratını hidrolize eder, fakat ECM substratları bilinmemektedir (Okada 2000).

METALLOPROTEİNAZ İNHİBİTÖRLERİ

Osteoartritisin eklem patolojisinde, eklem kırıktaındaki ekstraselüler matriksin yıkımlanması hastalığın temel patogenezedir. Bu proteoglikan ve kollojenlerin, eklem kırıktaındaki yıkımın primer olarak MMP'ler gibi enzimler tarafından enzimatik olarak oluşturulduğu düşünülür. Proteolizisin kontrolü; kontrol edilemeyen matriks yıkımının düzenlenmesi bakımından çok önemlidir. Bu üç seviyede ortaya çıkar;

- 1- Hücreden zimojenin üretilmesi,
- 2- Zimojenin aktivasyonu,
- 3- Ve inhibitörlerin varlığı (Clegg ve ark 1998).

MMP'lerin baskılanması; aktivasyon boyunca sistemik ve lokal inhibitörler tarafından sağlanır (Clegg ve ark 1997a, Clegg ve ark 1997b, Clegg ve ark 1998, Bee ve ark 2000).

Sistemik İnhibitörler

Sistemik inhibitörler düzenli olarak dolaşımdan

elde edilirler. Tüm MMP'leri inhibe edebilen ve serumda yüksek seviyelerde bulunan α -2 makroglobulin; etkili bir sistemik inhibitördür. Molekül ağırlığı 750 kDa'dır. Plazmada yüksek seviyelerde bulunmasına rağmen büyük hacmi olduğu halde, genellikle sinovial sıvıda düşük konsantrasyonda bulunur. Buna rağmen; büyük miktarlardaki α -2 makroglobulin, insan osteoartrit ve romatoid artrit vakalarının sinovial sıvılarında gösterilmiştir. Sağlıklı kıkırdak dokusunda α -2 makroglobulinin varlığı gösterilmiştir (Clegg ve ark 1998, Bee ve ark 2000).

Lokal İnhibitörler

Metalloproteinazların lokal inhibitörleri, MMP'lerin doku inhibitörleri (TIMP)'dir. Lokal inhibitörlerin MMP aktivitesinin büyük bir düzenleyicisi oldukları düşünülür (Clegg ve ark 1998, Bee ve ark 2000).

TIMP'ler; 4 kadar üyesi bulunan protein ailesidirler. Bunlar; TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 ve TIMP-4'tür (Kostaulas ve ark 1999).

TIMP'lerin eklem kıkırdağı ve kondrositler, romatoid sinovial fibroblastlar, sinovial fibroblastlar, deri fibroblastları, polimorf nükleer lökositler, alveolar makrofajlar, osteoklastlar, kemik, gingival fibroblastlar ve çeşitli tümör hücreleri gibi çeşitli hücre ve doku tiplerinde üretildikleri gösterilmiştir. Kalıcı eklem hücreleri (kondrositler ve sinovial fibroblastlar), periferik kan monositleri daha ağır molekül ağırlıklı TIMP-1 üretirken, TIMP-1 ve TIMP-2 de üretebilirler. Kalıcı eklem hücreleri; potansiyel olarak yıkımlayıcı enzimlerin lokal inhibitörlerini üreterek, ekstraselüler proteolizisin kontrolünde rol oynayabilirler. Kan polimorf nötrofillerinden elde edilen süpermatantların, reverse zimografi ile elektroforez edildiklerinde, MMP-9'a karşı TIMP-1 inhibitör aktivitesi gösterilmiştir (Clegg ve ark 1998).

TIMP'lerin tüm formları; non-kovalent bağlı MMP'lerin aktif formlarına affinite gösterirler. Bu komplekslerin 1:1 stochiometry'leri vardır. Aktif MMP'yi inhibe ederler ve MMP zimojeninin aktivasyonunu yavaşlatırlar. Bundan dolayı; enzimleri ve MMP'lerin aktivasyonunu bloke ederek, ekstraselüler proteolizisin kontrolünde rol oynarlar. Sonuçta; spesifik TIMP'ler ile jelatinaz MMP'lerin zimojenleri arasında; örneğin TIMP-1 ile MMP-9 ve TIMP-2 ile MMP-2 arasında, kompleksler oluşur (Clegg ve ark 1998).

TIMP'ler; N-terminal uçlarının MMP aktif kısmına 1:1 kovalent kompleksle bağlanmasından dolayı MMP'leri inhibe ederler (Bee ve ark 2000, Okada 2000).

TIMP-1

TIMP-1'in molekül ağırlığı 28 kDa'dır ve MMP-9 ile

kompleks oluşturur (Bee ve ark 2000). RA ve OA hastalarının serumlarında TIMP-1 konsantrasyonu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Fakat bu konsantrasyon artış düzeyinde değildir (Clegg ve ark 1998). TIMP-1 jelatinaz enzimlerine karşı gösterdiği aktivasyonu, MT MMP'lerin aktivitelerine karşı göstermez (Okada 2000).

TIMP-2

TIMP-2'nin molekül ağırlığı 22 kDa'dır ve MMP-2 ile kompleks oluşturur (Bee ve ark 2000). MMP-2/TIMP-2 kompleksinin katalitik olarak yetenekli bir enzime dönüşmesi TIMP'in aktif bölgeye bağlanmadığını gösterir. TIMP yokluğunda MMP-9'un kendi kendine bir dimer veya MMP-1 ile kompleks oluşturduğu gösterilmiştir. MMP-9/ TIMP-1 kompleksi; MMP-3'ün inhibisyonunda rol oynar. TIMP'lerin birçok MMP'nin aktivasyonunu bloke ettiği gösterilmişken, TIMP-2; MMP-2'nin aktivasyonuna, enzimin hücre yüzeyine bağlanmasını ve MT MMP'ler tarafından aktivasyonunu kolaylaştırarak yardımcı olur. MMP-2/ TIMP-2 kompleksinin MMP-2 enzimini oto yıkımlanmadan da koruduğu gösterilmiştir (Clegg ve ark 1998).

TIMP-2'nin MMP-2'yi inhibe etmek dışında başka rolü de vardır. TIMP-2; MMP-2 pro-enziminin aktivasyonuna da karşıdır. Bu bağlamda; MT MMP-1, zimojeni aktive etmek için MMP-2'nin pro-peptid kısmına uyum gösterir. Strongin ve ark 1995'te; küçük miktarlarda TIMP-2'yi hücre ekstraktlarına ayırarak, aktif MMP-2'nin izlediği yolu gösterdiler. MMP-2'nin; pro-MMP-2/ TIMP-2/ MT MMP-1 sırasıyla aktive olduğuna inanılır. TIMP-2; MT MMP-1'e bağlanır ve pro-MMP-2; MT MMP-1 tarafından kendi aktivasyonu için proenzimi doğru yönde tutan TIMP-2'ye bağlanır. Bundan dolayı; TIMP-2, doku değişiminde iki tane önemli, fakat çelişkili rol oynar. Bir tanesi aynı enzimin aktivasyonunda inhibitör, diğeri de intermedierdir. TIMP-2'nin artropatilerde ve tümör invazyonu gibi anormal doku değişimine yol açan diğer hastalıklarda etkili terapötik kullanımı olduğu bildirilmiştir (Bee ve ark 2000).

TIMP-1 ve TIMP-2 %66 oranında benzer amino asit sıralarına sahiptirler (Clegg ve ark 1998).

TIMP-3

TIMP-3'ün molekül ağırlığı 24 kDa'dır (Bee ve ark 2000). TIMP-3; ECM bileşiklerine bağlanır ve depolanır. TIMP-3; TACE (ADAM-17)'nin aktivitesini spesifik olarak inhibe eder (Okada 2000).

TIMP-4

TIMP-4'ün molekül ağırlığı 23 kDa'dır ve primer görevinin tümör gelişimi ve kanser hücrelerinin ilerleyişini inhibe etmek olduğu yapılan çalışmalarda belirlenmiştir (Bee ve ark 2000).

Genel Etkileri

TIMP-1 ve TIMP-2; sadece MMP inhibisyonunun dışında, büyüme faktörü ve damarlaşmanın inhibisyonunu sağlarlar ve multi fonksiyonel proteinlerdir (Kostaulas ve ark 1999).

Katepsin-B'de sonraki komponentlerin inaktivasyonu, MMP ve TIMP arasındaki dengenin değişmesinde yanıt olabilir. MT MMP-1; neovaskülarizasyonun seyri sırasında periselüler fibrinolisin gibi etki eder. Fakat TIMP-1 tarafından inhibe edilmez. Bunun yanı sıra TIMP-2 ve -3 tarafından düzenlenir. Bundan dolayı; TIMP-2'nin katepsin B tarafından inaktivasyonu bu enzimin etkisini artırır (Kostaulas ve ark 1999).

TIMP'ler tarafından oluşturulan aktivitenin direkt inhibisyonunda; TIMP-1 pro-MMP-9'un, TIMP-2'de pro-MMP-2'nin C-terminal kısımlarına bağlanır ve bu pro-MMP'lerin aktivasyonu kompleks formlarda basılır (Okada 2000).

TIMP'lerin varlığı OA'lı sinovial sıvılar ile normal sinovial sıvılarda gösterilmiştir. TIMP'lerin dayanıklılığı çeşitli ajanlar (IL-1 ve TNF- α) tarafından düzenlenir. İn vitro olarak, tavşan artiküler kondrositleri tarafından TIMP üretiminin IL-1 ve TNF- α sitokinlerinden etkilenmediği gösterilmiştir. TIMP'ler RA, travmatik artrit ve OA'yı kapsayan çeşitli eklem hastalıklarının sinovial sıvılarında belirlenmiştir. Septik artritli eklemlerin sinovial sıvıları aktif proteinaz inhibitörleri içermektedir. Septik sinovial sıvıların, biyolojik olarak inaktif proteinaz inhibitörleri olarak TIMP'leri içerdiği gösterilmiştir. Bununla beraber, OA'lı kıkırdakta, MMP/TIMP dengesizliğinde proteinaz seviyelerinde bir artış olduğunda, TIMP seviyelerinde artış olmadığı gösterilmiştir (Clegg ve ark 1998).

Metalloproteinazların Sentetik İnhibitörleri

Son zamanlarda primer olarak eklem hastalıklarında geçici semptomları hedef almayan, fakat eklemdaki dokuları etkileyen nedenlerin, temel patogenetik mekanizmalarını hedefleyen ilaçlara ilgi artmıştır. OA'da kullanılan bu ilaçlar, kısmen MMP'leri inhibe ederek veya anabolik aktiviteyi stimüle ederek, kıkırdaktaki patobiyolojik ve patoanatomik değişiklikleri azaltmayı amaçlarlar (Tamura ve ark 2002).

Klinik çalışmalar; diacerhein'in OA'nın semptomatik tedavisinde etkili olduğunu göstermiştir. IL-1 üretimini, granülomlu bir farede kıkırdak yıkımını ve OA'lı bir köpekte kıkırdak lezyonlarının ilerleyişini önlediği bilinmektedir (Tamura ve ark 2002).

Diacerhein; hayvanlar ve insanlar tarafından aktif bir metaboliti olan rhein'e dönüştürülür. Rhein; insan

nötrofillerinde süperoksit anyon üretimini sağlar. Rhein; tavşan eklem kıkırdığında MMP üretimini azaltırken, TIMP-1 üretimini artırır. Diacerhein ve rhein'in siklooksijenaz üzerine etkileri yoktur. Buna rağmen; NSAID'lerin etkileri siklooksijenazın inhibisyonuna yöneliktir. Bu yüzden diacerhein'in etki mekanizması henüz sınıflandırılmamıştır (Tamura ve ark 2002).

Kemik erimesi; osteoklastların farklılaşması ve aktivasyonu ile MMP'leri kapsayan pek çok durum tarafından oluşturulur. Prostaglandin E₂; seviyelerine bağlı olarak kemiğin yenilenmesinde ve erimesinde kritik bir faktör olarak bilinir. IL-1 ve -6 gibi sitokinlerin kemik eritme etkileri vardır ve osteoporozisin patogenezi karışıyor gibidirler. Everts ve ark, osteoklastik kemik erimesinin, katepsin-K ve MMP'ler gibi sistein proteinazların aktivitelerine bağlı olduğunu belirtmiştir. Hill ve ark, MMP inhibitörlerinin IL-1 veya paratiroid hormonunun başlattığı kemik erimesini önlediklerini yaptıkları çalışmalarda göstermişlerdir. Rhein; IL-1- α 'nın başlattığı kondrositlerdeki pro-MMP üretimini düşük düzeyde düzenler. Fakat MMP inhibisyonunun nasıl olduğu belli değildir (Tamura ve ark 2002).

CGS-27023A ve BAY 12-9566; stromelisin ve jellatinaz enzimleri ile kıyaslandığı zaman kollojenaz enzimlerine daha etkili olduğundan, OA vakalarında kıkırdak lezyonlarını azalttığı belirtilmiştir. Kollojenaz-2 ve -3'e karşı artmış selektivitesi ile bir inhibitör olan Ro-113830; ülserasyon, çukurlaşma ve kıkırdak kaybını azaltmıştır. MMP-13; spesifik inhibitörlerin gelişiminde, kollojenazların arasında en geniş substrat spesifitesi, tip-II kollojene karşı en yüksek aktivitesi ve OA'lı kıkırdakta uzun süre bulunmasından dolayı cazip bir hedef olabilir (Jouzeau ve ark. 2000). Tüm antranilat hidroksemik asitler; MMP-1, -9, -13 ve TACE'yi inhibe etme yetenekleri için in vitro olarak test edilmişlerdir. MMP-9 inhibitörleri; tümör metastaz inhibitörü olarak değerlendirilince, MMP-13; OA'da kıkırdak yıkımından korunma sağlar. TACE inhibitörlerinin de RA'nın tedavisinde kullanılabileceği belirtilmiştir. MMP-9, -13 ve TACE için selektivite MMP-1'den daha fazladır (Levin ve ark 2001).

Son olarak; Zn tutucu element olarak küçük bir karboksilik parçası içeren selektif MMP inhibitörlerine belirgin olarak ilgi artmıştır. Bu Zn ile olan bağ; BAY-129566 tarafından oluşturulur ve Warner-Lambert ve Shionogi tarafından açıklanmıştır. Bu inhibitörler; MMP-1 ve -7'yi azaltırken MMP-2 ve -13'ünde yüksek düzeyde inhibitördürler (Tullis ve ark 2001).

MMP'lerin İnhibisyonunda Kullanılabilecek İlaçlar

Tetrasiklinler

Osteoartritisli eklem kıkırdığında MMP ak-

tivitelerinin artmış olduğuna dair gözlemler ve tetrasiklinlerin MMP'leri inhibe ettiğini gösterir çalışmalar nedeniyle araştırmacılar, doksisisiklinin MMP aktivitesi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Köpek, fare ve tavşan OA modellerinde tetrasiklinlerin oral olarak verilmesiyle kıkırdak harabiyetinin azaltıldığı gösterilmiştir. Doksisisiklinin bu etkisinin; transkripsiyon ve translasyon inhibisyonu yoluyla, MMP ekspresyonunu kontrol ederek gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Olası yeni bir mekanizma da nitrik oksidin (NO) baskılanmasıdır. NO; OA kıkırdağından doku hasarı oluşturmaya yetecek seviyelerde salınmaktadır. Tetrasiklinlerin enzim nitrik oksit sentetazın (NOS) translasyon ve RNA'nın gösterimini bloke ettiği saptanmıştır (Kırcalı ve Akıncı 2002).

Diacerhein

Diacerhein OA'daki kıkırdak yıkımında anahtar bir rol oynayan katabolik bir sitokin olan IL-1'in sentez ve aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Prostaglandin sentezini inhibe etmemektedir. İnsanlarda OA semptomlarını geçirmede etkili olduğu bildirilmiştir (Kırcalı ve Akıncı 2002).

Heparinoidler

Glikozaminoglikan polisülfat (Arteparon) ve glikozaminoglikan peptid kompleksinin (Rumalon) hayvan OA modellerinde, in vivo çalışmalarda hastalık modifiye edici etkisine dair kanıtlar gözlenmiştir. Ancak sığırdokularından elde edildiği için sığırdokularında bulaştırma riski, kontrollü insan çalışmalarında hastalık modifiye edici etkisinin gösterilememesi, heparinoid yapıya bağlı kanama komplikasyonları ve antijenik protein varlığı ile ilişkili anafilaksi olguları nedeniyle, her iki ilacın da klinik kullanımdan kaldırılması yoluna gidilmiştir. Bu iki ilacın tersine, pentozan polisülfatın (PPS) antijenik protein yapısı yoktur. Pentozan polisülfat; MMP, lökosit elastaz ve hyaluronidazın güçlü inhibitörüdür. Çeşitli çalışmalarda eklem kıkırdağı proteoglikan konsantrasyonu ve kıkırdak bütünlüğünü koruduğu saptanmıştır. Oral uygulamadan sonra iyi derecede absorbe olur. Ca PPS'nin insanların OA'larındaki çalışmalarda plaseboya göre anlamlı olduğu gösterilmiştir (Kırcalı ve Akıncı 2002).

Kaynaklar

Arcan M (1995) Bone and Cartilage Metabolism in Canine Arthropathies, Department of Veterinary Clinical Science, University of Liverpool, Chapter I, 1-23.
Arcan M, Carter SD, Bennett D (1996) Osteocalcine in canine joint diseases. Br. Vet. J 152, 1-12.
Arcan M, Yavru N (1997) Köpeklerdeki eklem hastalıklarının teşhisinde kullanılan biyokimyasal, immunolojik ve enzim parametreleri, Vet Cer Der, 3 (1), 54-57.
Arcan M, Elma E, Özkan K (1998) Buzağılarda eksremiteelerde görülen enfeksiyöz artrit olgularının klinik de-

ğerlendirilmesi, Vet Cer Der, 4 (1-2), 5-7.

Arcan M, Coughlan AR, Clegg PD, Carter SD (2000) Matrix metalloproteinases 2 and 9 in bovine synovial fluids, J Vet Med A, 47, 449-456.

Bee A, Barnes A, Jones MD, Robertson DHL, Clegg PD, Carter SD (2000) Canine TIMP-2: purification, characterization and molecular detection, The Vet J, 160, 126-134.

Clegg PD, Coughlan AR, Riggs CM, Burke R, Carter SD (1997a) Characterisation of equine matrix metalloproteinase 2 and 9 and identification of the cellular sources of these enzymes in joints, Equine Vet J, 29 (5), 335-342.

Clegg PD, Coughlan AR, Riggs CM, Carter SD (1997b) Matrix metalloproteinases 2 and 9 in equine synovial fluids, Equine Vet J, 29 (5), 343-348.

Clegg PD, Coughlan AR, Riggs CM, Carter SD (1998) Equine TIMP-1 and TIMP-2: identification, activity and cellular sources, Equine Vet J, 30,416-423.

D'armiento J (2002) Matrix metalloproteinase disruption of the extracellular matrix and cardiac dysfunction, Trends Cardiovasc Med, 12 (3), 97-101.

Kırcalı Y, Akıncı A (2002) Osteoartritte hastalık modifiye edici ilaçlar, Rom Bül, 3, 2-4.

Kostaulas G, Lang A, Nagase H, Baici A (1999) Stimulation of angiogenesis through cathepsin B inactivation of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, FEBS Let, 455, 286-290.

Levin JI, Chen J, Du M, Hogan M, Kincaid S, Nelson FC et al (2001) The discovery of anthranilic acid-based MMP inhibitors. Part 2: SAR of the 5-position and P1 groups, Bioorg Med Chem Let, 11, 2189-2192.

Lohmander LS (1994) Articular cartilage and osteoarthritis. The role of molecular markers to monitor breakdown, repair and disease, J Anat, 184, 477-492.

Nagase H (1994) Matrix metalloproteinases, Extracellular Matrix in the Kidney, Contrib Nephrol, Basel, Karger, 107, 85-93.

Narmoneva DA, Cheung HS, Wang JY, Howell DS, Setton LA (2002) Altered swelling behavior of femoral cartilage following joint immobilization in a canine model, J Orthop Res, 20, 83-91.

Okada Y (2000) Matrix-degrading metalloproteinases and their roles in joint destruction, Mod Rheumatol, 10, 121-128.

Rorvik AM, Grondahl M (1995) Markers of osteoarthritis: A review of literature, Vet Surg, 24, 255-262.

Tamura T, Shirai T, Kosaka N, Ohmori K, Takafumi N (2002) Pharmacological studies of diacerein in animal models of inflammation, arthritis and bone resorption, Euro J Pharma, 448, 81-87.

Tullis JS, Laifersweiler MJ, VanRens JC, Natchus MG, Bokland RG, Almstead NG et al (2001) The development of new carboxylic acid-based MMP inhibitors derived from a cyclohexylglycine scaffold, Bioorg Med Chem Let, 11, 1975-1979.

Ye S (2000) Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases, Mat Bio, 19, 623-629.