

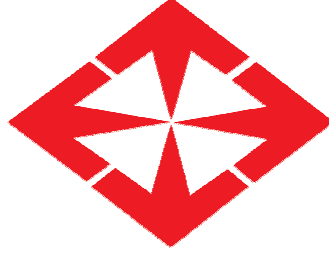
**T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI**

**SERVİKAL DEJENERATİF DİSK HASTALIĞINDA MATRİKS
METALLOPROTEİNAZLARIN EKSPRESYONUNUN
İMMÜNHİSTOKİMYASAL OLARAK ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Nuri Eralp ÇETİNALP

Ankara, 2007



**T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI**

**SERVİKAL DEJENERATİF DİSK HASTALIĞINDA MATRİKS
METALLOPROTEİNAZLARIN EKSPRESYONUNUN
İMMÜNHİSTOKİMYASAL OLARAK ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Nuri Eralp ÇETİNALP

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Arif Tarkan ÇALIŞANELLER

Ankara, 2007

04.04.2007 tarih ve KA 07/54-2007-AP-401 sayı

Bu tez çalışması Başkent Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Biz genç hekimlere tıpta uzmanlık eğitimi olanağı sağladığı ve çağdaş bir üniversite kurup bize her türlü desteği verdiği için rektörümüz Sayın Prof. Dr. Mehmet Haberal'a, dekanımız Sayın Prof. Dr. Faik Sarıalioğlu'na, uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve her konuda destek aldığım değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Nur Altınörs'e, Prof. Dr. Hakan Caner'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve tecrübesinden yararlandığım Prof. Dr. Selçuk Palaoğlu'na ve bir dönem birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli hocam Doç. Dr. Murad Bavbek ve üzerimde önemli derecede emeği bulunan Doç. Dr. Başar Atalay'a eğitimime olan katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanmasında ve yürütülmesinde destek ve bilgisini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Tarkan Çalışaneller'e, bana her konuda destek olan Yrd. Doç. Dr. Cem Yılmaz'a, eğitimimde emeği bulunan Uzm. Dr. Salih Gülşen'e saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Cerrahi eğitimime katkılarından dolayı Doç. Dr. Bülent Erdoğan'a, Doç. Dr. Orhan Şen'e, Uzm. Dr. Özgür Özdemir'e teşekkür ederim.

İhtisas süresince beraber çalıştığım Uzm. Dr. Melih Çekinmez'e, Uzm. Dr. Aşkın Hastürk'e, Uzm. Dr. Özkan Özger'e, Uzm. Dr. Cemal Gökce'ye, Dr. Erkin Sönmez'e, Dr. İlker Çöven'e, Dr. Fatih Aydemir'e, Dr. Aydın Gerilmez'e, Dr. Aykan Akar'a ve Dr. Berkay Köksoy'a teşekkür ederim.

Tezimin deney aşamasında yardımını esirgemeyen Uzm Dr.Melih Ünal ve onun şahsında T.C. Adalet Bakanlığı Adli Tıp Kurumu Başkanlığı'na, histopatolojik incelemelerde değerli katkılarından dolayı Dr. Gülnur Güven'e, tez aşamasındaki katkılarından dolayı dostum Dr. Reşit Gören'e teşekkür ederim.

Ayrıca bugünlere gelebilmemin asıl mimarları olan, hayattaki ilk öğretmenlerim, annem Necla Çetinalp, babam Prof.Dr.Erdal Çetinalp'e, her zaman desteğini hissettiğim kardeşim Erhan Çetinalp'e, cerrahi eğitimim boyunca tüm sıkıntılarımı paylaşan ve her zaman yanımda olan sevgili eşim Sibel Çetinalp'e ve neşe kaynağım, oğlum, Alp Erdal Çetinalp'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Dejeneratif disk hastalığı, altta yatan fizyopatolojik mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamış olsa da, disk yapısındaki vasküler, biyokimyasal ve anatomik değişikliklerle ilişkilidir. İntervertebral diskin fonksiyonel özelliklerini, ekstraselüler matriksin (ESM) yapısı ve bütünlüğü sağlar. İntervertebral disk dejenerasyonu süresince, normal matriks sentezi azalırken disk matriksinin yıkımı artar. Matriks metalloproteinazlar gibi matriks yıkıcı enzimlerin disk dokusunun yıkımında önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır.

Bu çalışmada, 20 servikal disk hernisi tanısı olan hastadan alınan 20 adet servikal disk materyali ve kontrol grubu olarak 17 taze kadavradan alınan 34 disk materyali kullanılarak dejenere disklerde, MMP-1, 3, 9 ve TIMP-1 varlığı immünohistokimyasal olarak ortaya koyuldu. İmmünopozitif hücreler morfometrik analiz yöntemi ile değerlendirildi. Thompson grade 3-4-5 olan hastalar çalışmaya dahil edildi. Spesimenlere histolojik olarak dejenerasyon skorlaması yapıldı. Mann-Whitney U testi ve lineer regresyon testleri kullanılarak yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda hasta grubunun anlamlı olarak daha dejenere olduğu ayrıca Thompson dejenerasyon skorları ile histolojik dejenerasyon skorları arasında anlamlı ilişki olduğu saptandı. MMP-1, 9 ve TIMP-1 düzeyleri hasta grubunda kontrol grubuna oranla anlamlı derecede yüksek bulundu. MMP-3 düzeylerinde anlamlı bir farklılık saptanmadı.

Literatürde ilk kez servikal bölgede kullanılan Thompson gradelemesi ile dejenerasyon arasında ilişkinin varlığı gösterilen bu çalışma ile Thompson skorlamasının servikal bölgede de kullanılabileceğini düşünüyoruz. Ayrıca matriks metalloproteinazların dejenere disklerde kontrol grubuna oranla yüksek saptanması MMP'lerin servikal disk dejenerasyonunda da rol oynadığını göstermektedir. MMP'lerin, dejenere disklerde belirgin olarak yüksek olması, lomber bölgede olduğu gibi servikal disklerde de MMP'lerin disk matriksini yıkıcı etkisinin söz konusu olduğunu gösteriyor. Bu çalışmaların en önemli özelliği ise matriks yıkımında rol alan enzimleri hedef alan dejenerasyonu önleyici tedavi edici ajanlar için ön çalışmalar oluşturmalarıdır.

Anahtar Kelimeler: Matriks metalloproteinaz, servikal disk dejenerasyonu.

ABSTRACT

Degenerative disc disease, even though underlying mechanisms are not fully understood, is associated with the vascular, biochemical and anatomical changes of the intervertebral disc. The integrity and the structure of the extracellular matrix provides the functional properties of the intervertebral disc. During the degeneration process, production of normal matrix decreases as the degradation of the matrix increases. Matrix degrading enzymes such as matrix metalloproteinases (MMPs) are assumed to play a pivotal role in intervertebral disc degradation.

In this study, 20 herniated cervical discs obtained from 20 patients and 34 cervical discs obtained from 17 fresh cadavers as a control group were used to show the expression of MMP-1, 3, 9 and TIMP-1 by using immunohistochemistry. The number of immunopositive cells were assessed by morphometric analyses. Thompson grade 3,4,5 patients were included as the degenerative disc group. Specimens were also scored for the degeneration according to the formation of clefts and tears, cellular proliferation, granular matrix changes and mucous degeneration. The patient group discs were statistically more degenerative than the control group. Also a significant close relation was found between Thompson grade and the histologic degeneration scores. In the patient group, MMP-1, 9 and TIMP-1 levels were significantly higher than the control group. There was no difference in MMP-3 levels between the groups.

For the first time Thompson grading system was applied in the cervical region and a significant correlation between the histological degeneration and Thompson grading was shown. According to this result we think that Thompson Scoring system can be used for the cervical region as well. Our data suggests that major MMPs play an important role in degradation of the intervertebral disc (IVD). This is evidenced by the statistically high levels of MMPs in the degeneration group than the control group. These kinds of studies highlight specific matrix metalloproteinases that might be most efficient to target in developing therapeutics for minimizing the degradation of the extracellular matrix of the intervertebral disc.

Keywords: Matrix metalloproteinase, cervical disc degeneration.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xi
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Tanım.....	2
2.2. Tarihçe	2
2.3. IVD Makroanatomisi	3
2.4. IVD Mikroanatomisi	7
2.5. IVD Hücreleri	8
2.6. IVD Kollajenleri	8
2.7. IVD Proteoglikanları	9
2.8. IVD'nin Link Proteinleri	11
2.9. IVD Sitokinleri	11
2.10. IVD Enzimleri ve İnhibitörleri	13
2.10.1. MMP'lerin Yapısı.....	15

2.10.2 MMP Doku İnhibitörleri (TIMP'ler).....	16
2.11. IVD Dejenerasyonunun Fیزیopatolojisi	16
2.12. Disk Dejenerasyonunun Genetiğı	19
2.12.1. Dejeneratif Disk Hastalığında Genetik Risk Faktörleri.....	19
2.12.2. DDH'da Moleküler Tedavi Stratejileri.....	21
3. HASTALAR ve YÖNTEM	25
3.1. Amaç.....	25
3.2. Hasta ve Kontrol Gruplarının Seçimi	25
3.3. Nöroradyolojik Değerlendirme.....	26
3.4. Histopatolojik Değerlendirme	29
3.5. İmmünohistokimyasal Değerlendirme	32
3.6. İstatistiksel Değerlendirme	36
4. BULGULAR	37
5. TARTIŞMA.....	43
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	49
7. KAYNAKLAR.....	50

KISALTMALAR

IVD	:	İntervertebral disk
ESM	:	Ekstraselüler matriks
MMP	:	Matriks metalloproteinaz
AF	:	Annulus Fibrosus
NP	:	Nukleus Pulposus
GAG	:	Glikozaminoglikan
PG	:	Proteoglikan
IL-1 α	:	İnterlökin-1 alfa
MCP-1	:	Monosit kemoatraktan protein-1
TNF- α	:	Tümör nekrotizan faktör alfa
IL-1 β	:	İnterlökin 1 beta
IL-6	:	İnterlökin 6
MIP-1 α	:	Makrofaj inflamatuvar protein-1 alfa
FGF	:	Fibroblast benzeri büyüme faktörü
IGF-1	:	İnsülin benzeri büyüme faktörü
PGE ₂	:	Prostoglandin E ₂
NO	:	Nitrik oksit
PDGF-1	:	Platelet ilişkili büyüme faktörü-1
TGF- β	:	Transforme edici büyüme faktörü beta
ICAM-1	:	İntraselüler adezyon molekülü-1

VEGF	:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
TIMP	:	Matriks metalloproteinazın doku inhibitörü
DDH	:	Dejeneratif disk hastalığı
VDR	:	Vitamin D reseptörü
EGF	:	Epidermal büyüme faktörü
BMP	:	Kemik morfogenetik protein
GDF	:	Büyüme ve diferansiyasyon faktörü
CDMP-2	:	Kıkırdak ilişkili morfogenetik protein-2
LMP-1	:	Latent membran protein-1

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1: İntervertebral disk	5
Şekil 2. 2: İntervertebral diskin beslenmesi	5
Şekil 2. 3: Proteoglikan agregatı ve bu yapıyı oluşturan proteoglikan monomerleri.	9
Şekil 3. 1: Histopatolojik dejenerasyon skorlamasında granüler değişiklik parametresi.....	29
Şekil 3. 2: Histopatolojik dejenerasyon skorlamasında kondrosit proliferasyonu ve müköz dejenerasyon parametrelerine örnek.	30
Şekil 3. 3: Histopatolojik dejenerasyon skorlamasında yapısal değişiklikler parametresine örnek.....	31
Şekil 3. 4: Hasta ve kontrol grubuna ait kesitlerde MMP-1 antikoruna ile sitoplazmik boyanma paterni.	33
Şekil 3. 5: Hasta ve kontrol grubuna ait kesitlerde MMP-3 ve MMP-9 antikoruna ile sitoplazmik boyanma paternleri.....	34
Şekil 3. 6: Hasta ve kontrol grubuna ait kesitlerde TIMP-1 antikoruna ile sitoplazmik boyanma paternleri.	35

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 2.1:	Matriks Metalloproteinaz Ailesi (Nagase ve Ark. 2001 Güncellenmiş Sınıflama)	14
Tablo 2.2:	Disk dejenerasyonunun fizyopatolojisi	18
Tablo 2.3:	Disk dejenerasyonunda moleküler tedavi stratejileri.....	21
Tablo 2.4:	Disk Dejenerasyonunun tedavisinde araştırılan moleküller	24
Tablo 3. 1:	Thompson radyolojik disk dejenerasyonu sınıflaması	27
Tablo 3. 2:	Disk dejenerasyonunun histolojik derecelemesi	28
Tablo 4. 1:	Grupların yaşlarının dağılım tablosu	37
Tablo 4. 2:	Gruplar arası dejenerasyon skorları şeması	38
Tablo 4. 3:	Gruplar arası MMP ve TIMP-1 düzeyleri şeması	39
Tablo 4. 4:	Gruplar arası dejenerasyon skorları tablosu	40
Tablo 4. 5:	Gruplar arası MMP ve TIMP düzeyleri tablosu	40
Tablo 4. 6:	Thompson gradeleme ile MMP-1, MMP-3, MMMP-9 ve TIMP-1 arasındaki ilişki.....	41
Tablo 4. 7:	Dejenerasyon skoru ile MMP-1, MMP-3, MMMP-9, TIMP-1 ve thompson grade arasındaki ilişki	41
Tablo 4. 8:	Yaş ile MMP-1, MMP-3, MMMP-9, TIMP-1, dejenerasyon skoru ve thompson grade arasında ki ilişki.	42

1.GİRİŞ

Dejeneratif disk hastalığı, intervertebral disk (IVD) dejenerasyonu zemininde gelişen ve klinik olarak oldukça sık görülen bir morbidite nedenidir. Altta yatan fizyopatolojik mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamış olsa da, disk hernisi, spondiloz, radikülopati gibi klinik sendromlarla karakterize bu hastalık, disk yapısındaki vasküler, biyokimyasal ve anatomik değişikliklerle ilişkilidir. Temelde dejeneratif disk hastalığı, omurganın yüklenme ve mekanik strese karşı bir anatomik adaptasyon sürecidir. Bu süreç eklem yapısında değişiklikler, ligament kalınlaşması ve ossifikasyonu ve anormal kemik oluşumu ile sonuçlanır. Servikal spondiloz genel olarak bu değişiklikleri tanımlamak için kullanılan bir terimdir ve geçmişte dejeneratif hastalığa sekonder vertebral osteofitoz olarak tarif edilmiştir (1).

Intervertebral diskin (IVD) fonksiyonel özelliklerini, ekstraselüler matriksin (ESM) yapısı ve bütünlüğü sağlar. Majör yapısal komponentlerin (ör: kollojen) denatüre veya disorganize olduğu dejeneratif disk hastalığı, disk hernisi gibi hastalıklarda ESM bütünlüğü bozulur (2;3). Özetle ESM sentez ve yıkımı arasındaki denge bozulmuştur. Bu dengede önemli rol oynayan matriks metalloproteinazlar (MMP) fizyolojik ve patolojik durumlardaki konnektif doku remodelinginde rol alan, nötral pH'da aktivite gösteren ve ESM komponentlerinin çoğunu yıkabilen çinko ve kalsiyum bağımlı endopeptidazlardır (4). MMP'lerin IVD dejenerasyonu ve servikal radikülopati fizyopatolojisinde önemli rol oynadığı düşünülse de, dejenerasyon sürecindeki temel biyokimyasal olaylar hakkında çok az bilgi elde edilebilmiştir (5). IVD'nin makromoleküler dejenerasyonunda rol alan ajanların ve bunların fonksiyonlarının, kısacası dejenerasyon kaskadının tam ve net olarak anlaşılması ile MMP'ler gibi bu ajanları hedef alan, gen tedavisini de içeren yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi mümkün olacak, böylece IVD dejenerasyonu henüz hücresel düzeydeyken tedavi edilebilecektir.

Bu çalışmanın amacı, servikal disk dejenerasyonu etyopatogenezinde; intervertebral disk dejenerasyonunda rol oynadığı düşünülen MMP-1, MMP-3, MMP-9 ve MMP inhibitörü olan Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP-1) varlığını ortaya koyarak elde edilen sonuçları olguların klinik ve nöroradyolojik bulguları ile istatistiksel olarak karşılaştırmaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Tanım

Dejeneratif disk hastalığı, IVD'nin biyokimyasal, vasküler, anatomik değişiklikleri ile karakterize; daha çok omurganın mekanik strese maruz kalan hareketli bölgelerinde; disk hernisi, spondiloz, radikülopati gibi klinik sendromlarla karşımıza çıkan bir patolojidir. Disk dejenerasyonun sıklıkla görüldüğü bu hareketli bölgeler, orta servikal, torakolomber ve alt lomber bölgelerdir (6).

2.2. Tarihçe

Servikal bölge patolojilerine, eski çağlardaki kayıtlarda bile rastlanabilmektedir. 4500 yıl önce, Mısırlılar servikal lezyonların kuadriplejiye neden olabileceğini biliyorlardı (7). Galen, servikal yaralanmalarda ortaya çıkan defisitlere göre servikal lezyon seviyesinin belirlenebileceğini bildirmiştir (8). 1555 yılında tarihte ilk defa Vesalius diskin anatomik yapısını ve kartilaj plakları tanımlamıştır. 1838'de Key, servikal disk mesafelerindeki çıkıntıların omuriliğe bası yaptığı durumlardan bahsetmiştir. 1893'de Von Becchterew ağrı, güçsüzlük, parestezi ve patolojik omurga kurvatürü oluşturan bir çeşit spinal hastalıktan bahsetmiştir. 1901'de Horsley servikal spondilopatik miyelopatisi olan bir hastaya C6 laminektomi uygulamış ve hasta fayda görmüştür. Bailey ve Casamajor, 1911'de, artrozun spinal kordu ve kökleri aynen bir tümör gibi sıkıştırabileceğini gözlemlemişlerdir. 1928'de servikal sendromları ventral kondromalar olarak tanımlayan Stookey'den 1 yıl sonra Dandy iki hastayı ameliyat ederek bu kondroid materyali çıkarmış ve bunların neoplastik dokudan ziyade disk dokusu olduğunu bildirmiştir. 1932'de Mixter ve Barr preoperatif tanı koyarak rüptüre intervertebral disk materyalini eksize eden ilk cerrahlar olma ünvanını elde etmişlerdir(7). Artroza bağlı basılarla disk rüptürlerinin ayırdedilmesi ancak 15 yıl sonra olabilmektedir. Northfield, Brain ve Wilkinson artroza bağlı servikal miyelopatik sendromları tanımladıktan sonra iki çeşit servikal disk hastalığı olduğu ortaya çıkmıştır. Brain, Frykholm ve Gooding, radiküler arter ve venlerin basısı sonucu oluşan iskemiye, patolojiyi açıklayan ana faktör olarak görmüşlerdir. Symonds akut

ve kronik boyun travmalarının önemini belirtmiş, servikal disk hastalığında klinik belirtilere yol açan predispozan faktörleri sınıflandırmıştır. Arnold, Payne ve Spillane normal ve spondilotik servikal omurganın anatomik ve radyolojik boyutlarını tanımlamıştır (9). Kahn spinal kord üzerinde gerilme yaratan denticulate ligamentleri tarif etti ve özellikle kortikospinal yolda lezyon oluşturabileceğini ortaya attı. Bu patolojiyi primer lateral skleroz olarak adlandırdı. Bunun ardından özellikle Kuzey Amerika’da denticulat ligament kesilmesi oldukça popüler olurken bu görüş Avrupa’da pek kabul görmedi (10).

1957’de disk dejenerasyonunda kompresyon kuvvetlerinin etkisini Lindblom gösterdi. Berry farelerde spontan olarak gelişen disk dejenerasyonunu ortaya koydu. Yaşlanma ile spontan disk dejenerasyonu ancak 1979’da sıçanlarda Silberger tarafından tanımlandı (11). İVD’in ilk biyokimyasal analizi 1980’de Lipson ve Muir tarafından yapılmıştır (12). 1990 yılında Moskowitz yaşlanma ile ilgili dejenerasyonu histolojik ve radyolojik olarak incelemiştir (13). Disk dejenerasyonun MR bulguları ise Sether tarafından gösterilmiştir (14). Buckwalter diskin ultrastrüktürel yapısı üzerinde çalışmıştır (15). Olczyk 1994 yılında insan İVD’inde yaşlanmayla birlikte gelişen proteoglikan değişikliklerini incelemiştir (16). Nerlich disk içerisindeki matriks proteinlerinin yaşa bağlı değişikliklerini araştırmış ve ortaya koymuştur (17;18). Kawaguchi 1999’da dejenerasyon-genetik ilişkisini ortaya koymaya çalışmıştır (19). Disk dejenerasyonu üzerine yapılan çalışmalar günümüzde de artan bir ilgiyle sürmektedir.

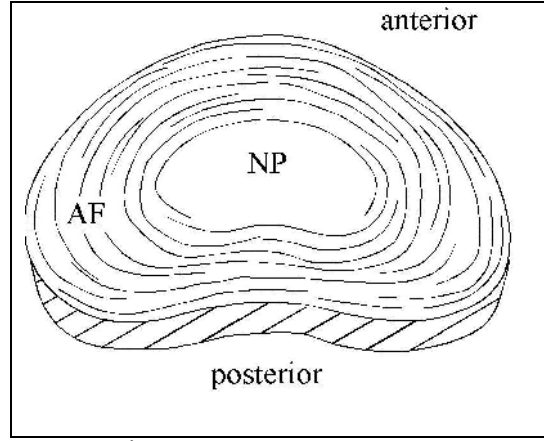
2.3. İVD Makroanatomi

İVD’ler temelde omurgalar arasındaki stabilize edici eklemler olmakla beraber, her yöne eğilme ve dönme hareketlerini sağlayan yapılardır (Şekil 2.1). Vücut ağırlığı ve kas kasılmaları ile oluşan kompresyon kuvvetlerinin absorbe edilmesini ve dağıtılmasını sağlar ve iki omurgayı birbirine bağlarlar. Disklerin bu mekanik görevleri yerine getirmeleri, proteoglikan ve kollajenler gibi, yapısını oluşturan makromoleküllerin kompozisyon ve organizasyonuna bağlıdır. Yaşlanma ile birlikte diskin kompozisyonu değişir ve bu değişim, diskin mekanik yüklenmeye olan cevabını etkiler. Diskler tüm omurga uzunluğunun % 22’sini oluşturur. İVD üç ana bölümden oluşur.

Son plak: Alt ve üst omurga korpusu ile disk arasındaki ince hyalin kıkırdaktır. Disk normal şartlarda avasküler bir yapıdır. Bu nedenle son plağın önemli mekanik görevlerinin yanında diskin diffüzyon ile beslenmesinde, majör bir rol oynadığı bilinmektedir (20;21). Ex vivo olarak yapılan deneylerde, son plağın, vertebral kolonun en zayıf yeri olduğu gösterilmiştir (22).

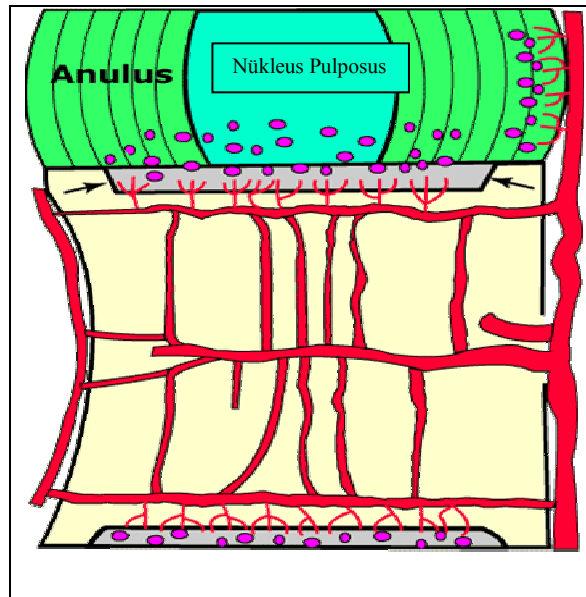
Annulus fibrosus (AF): Çoğunluğu Tip 1 olmak üzere, Tip 1, Tip 2, Tip 3 kollajenden oluşan konsantrik dizilimli lameller bir yapıdır ve nucleus pulposusunu çevreler. Mezenkimden köken alan fibrokondrosit benzeri hücreleri içerir. Dış kısımdaki liflere Sharpey lifleri de denmektedir. Fonksiyonel olarak, annulus fibrosus, her iki komşu vertebranın dış kenarlarını güçlü bir şekilde birbirine bağlar. Bu bağlantıyı yapan kollajen fibriller oblik olarak seyreder ve birbirini izleyen her lamelde bu açı değişir. Yapının sağlamlığı bu çapraz örgü sistemine bağlıdır. Kuru ağırlığının yaklaşık %60'ı kollajenler, %20'si proteoglikanlar tarafından oluşturulur. AF nucleus pulposusa oranla daha az su içerir. Su oranı yaklaşık %60-70'dir.

Nukleus pulposus (NP): Diskin merkezinde, şok emici özellikte, fibrojelatinöz bir yapıdır. NP, su, proteoglikan ve Tip 2 kollajenden oluşan bir matriks ve bu matriksi içerisinde notokorddan gelişmiş kondrositlerden oluşur. NP'nin, büyüme ve yeniden şekillenmenin olduğu dış kısmına transizyonel bölge adı verilir. Bu bölge fiziksel kuvvetlere olduğu kadar kimyasal ve hormonal uyarılara da duyarlıdır. Kollajen ve proteoglikanlar, IVD'nin mekanik yüklenme ve germe kuvvetlerine karşı resistansını sağlayan ana makromoleküllerdir. NP'nin %80'i sudur. Ayrıca NP'nin kuru ağırlığının %65'i proteoglikanlar, % 20'si kollajenler tarafından oluşturulur (23). Proteoglikanlar, negatif yüklerinden dolayı hidrofilik özellikte moleküllerdir ve diskin su tutarak şişmesini sağlarlar. Disk dejenerasyonu proteoglikan kaybı ile başlar ve bu süreç dejenere diskin su içeriğindeki azalmayı açıklar (24).



Şekil 2. 1: İntervertebral disk

Diskin beslenmesi: Son plak, ortalama 0,6 mm kalınlığında, vertebra cismi ile disk arasında yer alan hyalen kıkırdaktan oluşan bir yapıdır. Hayatın ilk iki yılında disk içerisinde damar yapıları bulunsa da, bunlar 2 yaşından sonra regrese olurlar. Besinler, avasküler olan nukleus pulposusa, vertebra cismindeki kan damarlarından diffüzyon yoluyla ulaşır (Şekil 2.1). Bu diffüzyon disk ile vertebra cismini ayıran son plak üzerinden olur. Maddelerin dolaşımdan disk dokusuna veya diskden dolaşıma geçişini, kıkırdak son plağın permeabilitesi belirler. Kıkırdak dokusundan solid maddelerin transport oranı, maddenin moleküler ağırlığı, şekli ve büyüklüğüne bağlıdır (25;26).



Şekil 2. 2: İntervertebral diskın beslenmesi

Disk dejenerasyonunda en kritik olayın, oksijen, besinler ve artıkların difüzyonundaki bozulma olduğu kabul edilmektedir. Diffüzyon süreci son plaklara olan kan akım miktarı ile yakından ilgilidir. Diabet veya vasküler hastalıklarda olduğu gibi birtakım mekanizmalarla son plaklara olan kan akımının azalması, diffüzyonu olumsuz yönde etkiler. Son plaklardaki damar yapıları, norepinefrin veya asetilkolin gibi nörotransmitterler tarafından etkilenir ve bunların fizyolojik etkileri sonucunda, bölgeye olan kan akımı azalır(27). İlerleyen yaşla birlikte, son plaklarda kalsifikasyon oluşur. Bu kalsifikasyon sonucunda, lamina kribrosadaki porlar küçülür ve azalır. Sonuçta, gerekli olan diffüzyon alanı daralmış olur. Diffüzyonu etkileyen bir diğer faktör de diskin dehidratasyonudur (3;28). Diskin su içeriği azaldıkça, diffüzyon süreci de bozulacaktır.

Diffüzyon bozukluğunun net sonucu disk içerisindeki oksijen düzeyinin düşmesidir. Bu şekilde anaerobik metabolizma ve laktat miktarı artar. Laktat, diffüzyon yoluyla etkin bir şekilde uzaklaştırılamadığı için disk içerisindeki Ph düzeyi düşer. Düşük Ph düzeyi hücrel metabolizma ve biyosentez fonksiyonlarını olumsuz yönde etkiler ve matriks yıkımı ile sonuçlanır. Matriks yıkımı ile diffüzyon daha da azalır ve bir kısır döngü başlar (29).

Diskinnervasyonu: Yenidoğan intervertebral diskinde, özellikle annulus fibrosusun dış tabakalarında birçok perivasküler ve serbest sinir sonlanmaları bulunmaktadır. Normal yaşlanma ile birlikte aynen IVD damar yapısında olduğu gibi bu sinir sonlanmaları regrese olur ve sağlıklı bir erişkin diskinin, annulus fibrosusun dış tabakaları dışında sinir innervasyonu bulunmaz. Bogduk 1983’de yayınladığı literatür taramasında, omurgayı innerve eden sinovertebral sinirlerin transverse ve desenden dallarının posterior longitudinal ligament ve ona komşu dış annulus fibrosus tabakalarını innerve ettiğini ortaya koymuştur. Annulus fibrosusun lateral ve ön bölümleri de ventral rami ve sempatik sinir sistemi tarafından innerve edilmektedir (30). Nukleus pulposusun sinir yapısı içerdiğine dair hiçbir çalışma yoktur.

2.4. IVD Mikroanatomi

IVD, diskoid yapıda, hücreden fakir bir kıkırdak dokudur. Disk dokusu, hücreler, su ve disk matriksini oluşturan kollajen ve agrekandan oluşur. Agrekan, protein çekirdeğe kovalent olarak bağlanmış, sülfatlanmış glikozaminoglikan (GAG) zincirlerinden oluşan proteoglikan (PG) kümeleridir.

Hücreler disk dokusunun %1-5' ini oluşturur. Erişkin diskinde kondrositler ve fibrositler olmak üzere iki tip hücre bulunur. Fibrosit benzeri hücreler primer olarak dış annulus fibrosus tabakasında, kondrosit benzeri hücreler de diğer disk bölgelerinde yer alır. Bu hücreler, içinde yer aldıkları matriksi sentez ederler (31).

Disk matriksi, su ve makromoleküler bir çatıdan oluşur. Diskin yapısal bütünlüğü ve mekanik özellikleri bu iki yapı arasındaki etkileşime bağlıdır. Matriksin temel makromolekülleri kollajen ve proteoglikanlardır. Kollajen lifler, su ve proteoglikandan oluşan bir jel içinde gömülü olarak bulunur. Kollajenler, diskin gerilme kuvvetini sağlayan makromoleküllerdir. Daha çok dış annulus fibrosus yapısında bulunurlar ve kollajen çatı, diskin biyomekanik özelliğini sağlar. Kollajen bu bölgenin kuru ağırlığının %70' ni yaparken Nukleus pulposusun kuru ağırlığının % 20' sini oluşturur (32).

Proteoglikanlar kollajen lifler arasında ve çoğunlukla NP yapısında yer alırlar. Diskin viskoelastik yapısını sağlarlar. Proteoglikanların yapısındaki negatif yüklü karboksil ve sülfat grupları, moleküle hidrofilik özellik sağlar. Bu sayede proteoglikanlar diskin su tutmasını sağlarlar. Disk dokusunun %80' ini oluşturan su, diskin mekanik özelliklerini belirlediği gibi besin ve metabolitlerin transportunda da önemli rol oynar (29;33).

Disk içerisindeki su miktarı, agrekan miktarına bağlı olduğu kadar, diske olan mekanik yüklenme miktarı ile de ilişkilidir. Disk üzerindeki basınç, vücut ağırlığından çok kas aktivitesi ile oluşur. Bu da basıncın, postür ve hareket ile değişmesine neden olur. Disk basıncı yatar pozisyonda en düşük düzeydeyken, ayakta durmak veya oturmakla 5-8 kat artar (34). Basınç arttıkça, osmotik dengeyi sağlamak amacıyla sıvı disk dışına çıkar. Günlük aktivite sırasındaki kas tonusu sonucu disk sıvısı % 25 azalır. Bu sıvı gece boyunca istirahat sırasında tekrar disk içerisine döner. Bu döngü sonucunda omurga uzunluğu sabahları, akşam olduğundan 1-2 cm daha uzun olur (35).

2.5. IVD Hücreleri

Disk dokusu hücreden fakir bir dokudur. Hücreler doku hacminin % 0,5' ni oluşturur. İnsan diskinde son plak hücreleri tipik kondrositler iken NP ve iç AF yoğunlukla, yuvarlak, kapsüllü, kondrosit benzeri hücreler içerir. Bu hücreler, kondrositlerden farklı olarak sitoplazma ile dolu çıkıntılara sahiptirler (36). Dış AF hücreleri incedirler ve tendon hücreleri gibi, kollajen lifler arasında uzanan fibrosit benzeri hücrelerdir (37;38).

IVD'in az sayıda hücresi olmasına rağmen bu hücrelerin hayati görevleri vardır. Proteoglikan ve diğer molekülleri sentezleyerek uygun bir makromoleküler kompozisyonda ortam sağlarlar. Ayrıca proteazları ve onların inhibitörlerini salgılarlar. Makromoleküler sentez ve yıkım dengede olduğu sürece disk sağlıklı bir şekilde hayatını sürdürür. Ancak yıkımın artması gibi bu dengenin bozulduğu durumlarda, matriks kompozisyonu bozulur ve disk dejenerasyonu başlar (39). Disk hücrelerinin aktiviteleri, büyüme faktörleri, sitokinler ve mekanik stres gibi fiziksel faktörlerce düzenlenir. Avasküler olan diskin beslenmesi de hücresel metabolizmayı etkiler ve beslenmenin azalması kıkırdak son plakta yapısal değişikliklere neden olarak dejenerasyon sürecinin başlamasında rol oynar (40-42).

2.6. IVD Kollajenleri

Kollajen, ekstraselüler matriks ve bağ doku yapısında yer alan majör proteindir. 16 tip kollajen mevcut olmasına rağmen insan vücudundaki kollajenlerin %80-90'ı Tip 1, Tip 2 ve Tip 3 kollajenlerdir. Bu değişik tiplerdeki kollajenlerin ve oluşturdukları yapıların asıl amacı, gerilmeye karşı direnç sağlamaktır.

Disk yapısındaki kollajenlerin pivot bir rolleri vardır. IVD majör olarak fibriler yapıda Tip 1 ve Tip 2 kollajenden oluşsa da (% 80), Tip 3,5,6,9,11 kollajenleri de içerir. NP ve AF yapısında bulunan kollajenlerin tipleri farklılık gösterir. Tip 2 kollajen kondrositler tarafından sentez edilir ve majör olarak NP yapısında yer alır. Tip 1 kollajen ise fibroblastlarca sentezlenir ve dış annulus fibrosusun majör kollajenidir. NP merkezinden periferine gidildikçe Tip 2, periferden merkeze doğru da Tip 1 kollajen miktarı azalır. NP'da

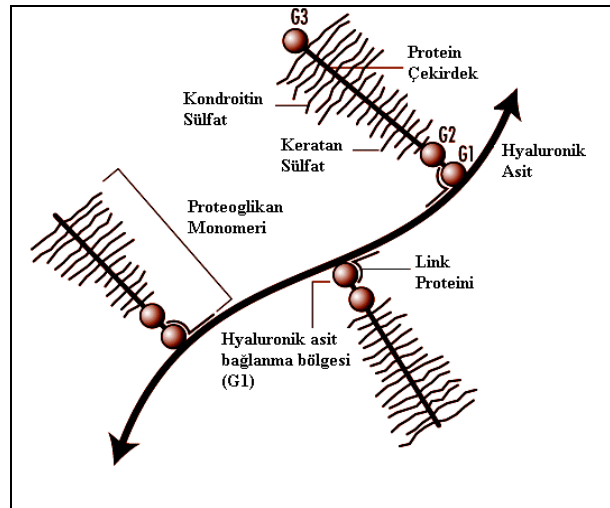
düşük miktarlarda da olsa Tip 6 (%15-20), Tip 9 (%1-2) ve Tip 11 (%3) kollajenler sentezlendiği gibi, AF yapısında da Tip 3, Tip 5 (%3), Tip 6 (%10) ve Tip 9 (%1-2) kollajen bulunur. Dış AF'da az miktarda bulunsa da, son plakın majör kollajeni, NP'da olduğu gibi Tip 2 kollajendir (37;43;44).

Disk dejenerasyonunda, normal disk için bahsedilen bu kollajen kompozisyonunda nitelik ve nicelik hatta yerleşim yerlerinde bile değişiklikler görülebilmektedir. Nerlich ve arkadaşları, dejenerasyon sürecindeki bu kollajen matris değişikliklerinin kalitatif olmaktan çok kantitatif olduğunu ve kişiler arasında dahi farklılıklar gösterdiğini belirtmiştir (18).

2.7. IVD Proteoglikanları

IVD'nin proteoglikan içeriği, dokunun su tutarak şişme, basınç ve akışkanlık özelliklerini belirlemede fonksiyonel bir öneme sahiptir. Dokunun mekanik özellikleri de proteoglikan içeriğine bağlıdır.

Proteoglikanlar, bir çekirdek proteinine kovalent olarak bağlanmış glikozaminoglikan (GAG) zincirlerinden oluşur. GAG'lar çekirdeğe dik açı ile bağlanarak, PG monomeri denilen, fırça benzeri bir yapı oluşturur (Şekil 2.3).



Şekil 2. 3: Proteoglikan agregatı ve bu yapıyı oluşturan proteoglikan monomerleri.

Canlı organizmasında 6 tip GAG bulunur. Bunlar, keratan sülfat, kondroitin sülfat, heparan sülfat, dermatan sülfat, heparin ve hyaluronandır. İlk iki GAG intervertebral disk yapısındaki majör GAG'lardır. Ayrıca az miktarda hyalüronik asit ve dermatan sülfat bulunur. Eklem kıkırdığının tersine, IVD'de kondroitin 4 sülfat yerine kondroitin 6 sülfat baskındır (45).

Proteoglikanlar çok geniş bir aile olmakla birlikte, değişik gruplara ayrılırlar. Geniş ekstraselüler proteoglikanlara en iyi örnek agrekandır ve IVD yapısında yer alır. Agrekanlar hyalüronan link proteinlerine bağlanarak geniş proteoglikan agregatlarını oluştururlar (Şekil 2.3). Ayrıca küçük lösinden zengin PG grubu (dekorin, biglycan, fibromodulin, lumican), hücre ilişkili PG'lar grubu (betaglycan, serglysinler, syndekan, trombomodulin), bazal membran PG'lar grubu (perlecan, bamekan vb), sinir dokusu PG'ları (neurokan, brevikan, agrin) gibi gruplar bulunmaktadır.

IVD' nin su tutma potansiyelini belirleyen ana öge proteoglikandır. Sülfatlanmış GAG zincirleri matriksin (-) iyonlarla yüklenmesine neden olur. Bu (-) yükler agrekanın osmotik basıncını sağlar. Gibbs-Donnan dengesine göre, (-) yüklü iyonların konsantrasyonu, dokudaki ekstraselüler iyonların konsantrasyonunu belirler (46). Küçük katyonlar gibi (+) yüklü moleküller, GAG'ların (-) yüklerini dengelemek için doku içine girerler. Aynı süreçte (-) yüklü moleküller de doku dışına itilirler. Normal serumda (+) yüklü Na ve (-) yüklü klor oranı 140 mmolar iken normal diskte (+) yüklü Na iyonu oranı 400 mmol'e çıkar. Bu sayede (+) yüklü Na iyonlarının suyu tutması sonucu disk dokusu şişer ve hacmi artar (47).

Disk su içeriği, şok absorbe etme kapasitesi ile yakından ilgilidir. Yaşla birlikte, disk su içeriği azaldıkça elastik özellikleri de azalır. Scott ve arkadaşları, GAG'lardan kondroitin sülfatın, keratan sülfata oranla, disk su içeriğini sağlamada daha önemli ve majör bir rol oynadığını belirlemişlerdir. Yaşla birlikte kondroitin sülfat miktarı azalmakta, keratan sülfat miktarı ise artmaktadır. Buna rağmen keratan sülfatın, su kaybını kompanse etmekte yetersiz kaldığını belirtmişlerdir (48). Disk dejenerasyonunda hücre fonksiyonların bozulduğu ve proteoglikan sentezinin azaldığı, yine proteoglikan kaybının arttığı gösterilmiştir (3;49;50).

2.8. IVD'nin Link Proteinleri

Proteoglikanlar hyaluronik asit ile birleşerek, büyük agregatlar oluşturma kapasitesine sahiptirler. Bu nedenle PG'lar en azından agrege olanlar ve olmayanlar şeklinde 2 gruba ayrılabilirler (51;52).

PG monomeri, IVD'de de kıkırdak dokuda olduğu gibi bir kondroitin sülfat bağlanma yeri, bir keratan sülfat bağlanma bölgesi ve bir de hyaluronik asit bağlanma bölgesi içerir. Agrege olmayan PG'lar hyaluronik asit bağlanma bölgesi içermez ve göreceli olarak daha fazla keratan sülfat ihtiva eder (53;54).

PG'ların, hyaluronik asit ile bağlanmasını link proteinleri sağlar. Link proteinleri glikoprotein yapısındaki makromoleküllerdir. Bu link proteinleri, agregatın, Ph değişiklikleri, ısı artışları ve yüksek üre konsantrasyonlarına karşı daha dayanıklı olmasını sağlar. Link proteinleri, LP-1, LP-2, LP-3 olmak üzere 3 subgruba ayrılır. LP-3'ün LP-1 ve LP-2'nin degradasyon ürünü olduğu ileri sürülmüştür. IVD'nin asıl link proteini LP-1'dir (55-58).

2.9. IVD Sitokinleri

Sitokinler, inflamasyon, hematopoez ve immüniteyi düzenleyen küçük proteinlerdir. Etkilerini otokrin veya parakrin yolla hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak yaparlar. Disk dejenerasyonu sürecinde de sitokinlerin önemli rolleri olduğu bilinmektedir.

Sitokinler, IVD yapısındaki NP hücreleri, esas olarak kondrositik hücreler, histiositler ve fibroblastlar tarafından üretilirler. Disk metabolizmasında rol alan sitokinler, IL-1 α , monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1), TNF- α , IL-6, IL-1 β , makrofaj inflamatuvar protein-1 α ve 1 β (MIP-1 α , MIP-1 β), fosfolipaz A₂, fibroblast benzeri büyüme faktörü (FGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1), prostoglandin E₂ 'dir (PGE₂). Bu mediatörler, hücre metabolizmasını kontrol ederken bazıları ise antiinflamatuvar etki yaparak süreci kontrol ederler. Ayrıca inflamasyon sürecinde azalmış sitokinler dışında, makrofajlar ve mast hücreleri gibi inflamatuvar hücreler de rol alırlar (59-62).

Diskin asıl proinflatuar sitokini IL-1'dir. IL-1'in kondrositleri anabolik aktiviteden katabolik aktiviteye çevirme yetenekleri vardır. Bu şekilde kıkırdak yıkımına yol açarlar. Ayrıca anjiyogenetik faktörleri artırarak anjiyogenezi sağlarlar. 2 izoform, IL-1 α ve IL-1 β proteoglikan serbestleşmesini ve yıkıcı enzimleri artırır. Ayrıca IL-1 β , IVD hücrelerinden PGE₂ gibi ağrı mediatörlerinin salınımını uyarır. IL-1 α , MMP-3, NO sentezini artırdığı gibi direkt olarak disk proteoglikanlarının katabolizmasını artırarak dejenerasyona zemin hazırlar (63-66)

TNF- α , MMP ekspresyonunu ve PGE₂ üretimini artıran bir diğer proinflatuar sitokindir. Ayrıca TNF- α 'nın klinik olarak ağrı oluşumunda da rolü vardır. TNF- α endonöral ödem ve sinir liflerinde demyelinizasyon yapar. Sinir liflerinde hasarlanma oluşturan makrofajları aktive eder ve NO ile birlikte ağrı oluşumunu tetikler (67).

Proinflatuar bir diğer sitokin olan MCP-1'in salınımı diğer sitokinler ve MMP'ler tarafından aktive edilir. Ayrıca, herniye olmuş disk içindeki yeni gelişen damarlarla sağlanan kan dolaşımı ile bölgeye göç eden makrofajlarca salındığı da gösterilmiştir (68;69).

Disk dejenerasyonunda antiinflatuar mediatörlerin de çeşitli roller üstlendiği gösterilmiştir. İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) ve platelet ilişkili büyüme faktörü-1 (PDGF-1)'in antiapoptotik etki ile disk dejenerasyonuna karşı koruyucu rolleri olduğu düşünülmektedir (70). IGF-1'in kemik ve kıkırdak büyümesini stimüle ettiği bilinmektedir (71). Thompson ve arkadaşları, IGF-1'in, NP içindeki proteoglikan sentezini stimüle ettiğini göstermişlerdir (40). IGF-1 matriksin tamirini sağlayan mediatörlerden biridir. Ayrıca yapılan çalışmalarda IGF-1'in yanında transforming growth factor β 'nın (TGF- β) da MMP-2 düzeylerini düşürerek disk dejenerasyonunu azalttığı ayrıca disk içerisindeki hücre proliferasyonunu ve ESM sentezini artırdığı gösterilmiştir (72). TGF- β , fibroblastlar ve monositler için kemoatraktandır ve hasarlı bölgeye hücre göçünü sağlar (73).

IL-6 akut inflammatuar süreçte rol alan bir mediatördür. IL-6 MMP inhibitörlerini indükleyerek disk dejenerasyonunda koruyucu bir rol oynar (74). IVD'de bulunan diğer sitokinlerden, intraselüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1), MIP-1 α ve MIP-1 β inflammatuar hücreleri bölgeye çekmekte kemoatraktan rol oynarlar (75). Fibroblast growth factor (FGF)

proanjiyogenetik bir ajandır ve MMP'ler üzerinden proteolizi stimüle eder. PDGF ve vasküler endotelial growth faktör (VEGF) neoanjiyogenezi stimüle eder (76).

Disk dejenerasyonu mekanizmasında aktif olarak rol alan bu proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinler kompleks bir biyokimyasal ağ oluşturarak, MMP, TIMP gibi bileşiklerin ekspresyonunu kontrol ederler. Bu nedenle son yıllarda, disk dejenerasyonunu kontrol etmek amacıyla anti TNF- α ajanlar gibi, sitokin antagonisti moleküller üzerindeki çalışmalar giderek hız kazanmaktadır.

2.10. IVD Enzimleri ve İnhibitörleri

Ekstraselüler matriks yıkımından dört mekanizma rol alır.

- 1) Matriks metalloproteinazlar
- 2) Plazmin bağımlı yol
- 3) Polimorfonükleer-Lökosit-Serin bağımlı proteinaz yolu
- 4) Fagositik yol

Mineralize yapıdaki matriks yıkımı ise osteoklastik yol vasıtası ile olur (77).

Matriks yıkımında rol oynayan ana enzim ailesi matriks metalloproteinazlardır. Nagase ve arkadaşlarının 2001 yılında güncelledikleri sınıflamaya göre 25 tane MMP vardır (78;79). MMP'ler kollajenazlar, stromelizinler, jelatinazlar, membran MMP'leri olmak üzere 4 ana subgruba ayrılrsa da birtakım ortak özellikleri vardır (Tablo 2.1).

Herbirisi ekstraselüler matriksin en az bir komponentini yıkan proteinazlardır. Hepsinin çinko bağlayıcı bir bölgesi vardır. Aktivite göstermek için Ca'a ihtiyaç duyarlar. Şelasyon yapan ajanlarca inhibe edilirler. Latent proenzim formunda salınırlar ve proteolitik fonksiyon için aktive olmaları gerekir. Kendilerine özel doku inhibitörleri tarafından (TIMP) inhibe edilirler. Substrat spesifiteleri değişiktir.

Tablo 2. 1:Matriks Metalloproteinaz Ailesi (Nagase ve Ark. 2001 Güncellenmiş Sınıflama)

MMP	Enzim Adı	Bilinen Substratları
<i>Kollajenazlar</i>		
1	İnterstisyel Kollajenaz	Koll.1,2,3,7,8,10,α1-antitripsin, kazein,α1-PI, α2- makroglobulin, agrekan, versikan, MMP-2,9 L-Selektin
8	Nötrofil Kollajenaz	Koll.1,2,3,5,8,10, α1-antitripsin,α1-PI
13	Kollajenaz-3	Koll. 1,2,3,4,jelatin,tenasin,perlekan,agrekan
18	Kollajenaz-4	Kollajen 1
<i>Jelatinazlar</i>		
2	Jelatinaz A	Koll.4,5,7,9,14, Jelatin, fibronektin, elastin, MMP-9,13
9	Jelatinaz B	Koll.4,5,7,10,14, jelatinler, elastin, fibronektin, α1- antitripsin, pro TNF-α
<i>Stromelizinler</i>		
3	Stromelizin 1	Proteoglikanlar, Koll.3,4,5,9,10,11, gelatinler, elastin, laminin,kazein,MMP-1,7,8,9,13, α- makroglobulin
10	Stromelizin 2	Fibronektin, laminin, Koll. 3,4,5, jelatin, kazein, MMP-1,8
<i>Membran Metalloproteinazları</i>		
14	Memb.Metalloproteinaz 1	Koll.1,2,3, jelatin, agrekan, kazein, laminin, MMP- 2,13,elastin, pro TNF-α
15	Memb.Metalloproteinaz 2	MMP-2, jelatinler, fibronektin, tenasin,laminin
16	Memb.Metalloproteinaz 3	Projelatinaz A, kazein, jelatin
17	Memb.Metalloproteinaz 4	Tenasin, perlekan, jelatin, kazein,α1-proteinaz inhibitör
24	Memb.Metalloproteinaz 5	
25	Memb.Metalloproteinaz 6	
23	Sistein dizili MMP	

2.10.1. MMP'lerin Yapısı

MMP'ler çinko bağımlı proteazlardır ve fizyolojik Ph'larda ekstraselüler matriks ve bazal membran proteinlerini yıkarlar. Çoğunlukla inflamatuvar uyarılara bağlı olarak fibroblast, kondrositler gibi dokunun kendi hücrelerince salınırlar.

MMP molekülünde beş ana bölge bulunur. 1. Bölge lider sekans adı verilen bölgedir ve sekresyondan sorumludur. Katalitik parça histidin rezidüleri içerir ve proteolitik aktivite için gerekli olan, çinko ve kalsiyum bağlanma bölgesidir. Enzim aktive olduğunda ayrılan “prodomain” adı verilen parçanın, enzimin latent formda kalmasını sağladığı düşünülmektedir. Hemopexin parçası “hem” bağlanmasını sağlar ve hücre yüzey reseptörlerini tanımlamakla görevlidir. Son olarak C-Terminal parçası ise kollajenazların üçlü helix yapısını sağlarlar (80-84).

MMP'ler, inaktif, latent enzimler olarak salınırlar. N-Terminalindeki sistein ayrılarak çinko içeren aktif katalitik bölgenin açığa çıkmasını sağlar (85).

Kollajenaz-1 (MMP-1), insan dokularında yaygın olarak bulunur. MMP-8 (Nötrofil Kollajenaz) PMNL içerisinde sentezlenir ve depolanır. Kollajenazlar grubundaki MMP'ler Tip 1-2-3 kollajenin doğal helix yapısını kırarak kollajeni diğer proteazların etkisine açık hale getirir. Diğer hiçbir enzim grubu kollajenin helikal yapısını yıkmaya yeteneğine sahip değildir (45;86;87). Proteoglikan yıkımı geri dönüşümlü iken, kollajen yıkımı geri dönüşümsüzdür. Bu nedenle kollajenazların kontrolünün anahtar rol oynadığı düşünülmektedir. MMP-13 daha çok Tip 2 kollajeni yıkar. MMP-1 Tip 3, MMP-8 ise Tip 1 kollajeni daha efektif olarak yıkar. Bu grupta MMP-13 en potent peptidolitik enzimdir zira MMP-1'den 44, MMP-8'den 8 kat daha etkilidir (88).

Jelatinazlar, bazal membran spesifik Tip 4 ve Tip 5 kollajen, bağ dokuda yoğunlukla bulunan Tip7, Tip 10, Tip 11 kollajeni yıkmakta başarılıdır. Bu gruptaki MMP-2'nin özellikle tümör invazyonu ve metastaz ile ilişkili yıkımda önemli rol oynadığı düşünülmektedir (89-91).

Stromelizinler, kollajenlerin yanı sıra özellikle ESM proteoglikanlarını, laminini, fibronektini yıkmakta rol oynar. Özellikle MMP-3 ESM yıkımında anahtar enzimdir. MMP-3 diğer MMP'leri aktive ederek, kıkırdak matriksin yıkımını indirek olarak tetikler.

Ayrıca MMP-3 proteoglikanların çekirdek proteinini degrade etme yeteneğine sahiptir (91;92).

MMP'ler birkaç yolla regüle edilirler.

- 1) Biyolojik olarak aktif ajanlarca (hormonlar, büyüme faktörleri, sitokinler vb.) düzenlenen MMP gen transkripsiyonu yoluyla.
- 2) Bu pozitif indüksiyon steroidler ve transforming growth factor- β (TGF- β) gibi ajanlarca bloke edilebilir.
- 3) İnaktif olan MMP'lerin plazminle ilişkili bir yol ile aktive edilmesi
- 4) TIMP'lerce blokaj.

Ayrıca MMP'lerin üretimi, kortikosteroidler, retinoik asit ve TGF- β tarafından inhibe edilir. Bunun dışında EDTA gibi şelasyon yapıcı ajanlar, inhibe edici antikorlar, α -makroglobulin gibi mediatörler proteinazların etkisini bloke ederler (77;91).

2.10.2 MMP Doku İnhibitörleri (TIMP'ler)

TIMP'ler, aktif MMP'lere non-kovalent olarak bağlanarak enzimatik aktivitelerini inhibe eden, siyaloglikoprotein yapısında moleküllerdir. Bugüne kadar 4 TIMP geni bulunmuş olsa da en çok çalışılmış olanları TIMP-1 ve TIMP-2'dir. Epidermal growth factor, dexametazon, forbol esterleri ve TGF- β , TIMP-1 üretimini artırır (93-95).

Dejenerasyonun ana mediatörlerinden olan IL-1 α , MMP sentezini artırmasının yanında, TIMP sentezini azaltarak dejenerasyona çift yönlü katkıda bulunur. IL-6'nın ise TIMP-1'in de novo sentezini indüklediği gösterilmiştir. Sonuçta dejenerasyonun temelinde MMP-TIMP dengesindeki bozukluğun rolü olduğu açıktır (94;96).

2.11. IVD Dejenerasyonunun Fizyopatolojisi

IVD yaşla birlikte gerek moleküler gerek makromoleküler düzeyde birtakım değişikliklere uğrar. Diskin yaşlanma sürecinde NP'un jelatinöz yapısının kaybı, AF liflerinin diziliminin

bozulması, fibrozis, NP ile AF arasındaki sınırın kaybolması gibi disk mimarisinde bazı değişiklikler oluşur. En erken makromoleküler değişiklikler; annüler yırtıklar ve son plaklarda fissürler oluşmasıdır. AF matriksi, normal kollajen liflerinin organizasyonunun bozulması ile miksomatöz dejenerasyona uğrar. Annulusu oluşturan katmanların kalınlıkları artarken, sayıları azalır. NP yüksekliğini kaybeder ve daha kuru bir hal alır. İçerdiği hücre sayısı belirgin şekilde azalırken, kollajen liflerin çapı ve konsantrasyonu artar. Son plaklardaki ilk değişiklik subkondral sklerozdur. Hyalin kıkırdak giderek kalsifiye olur. Bunun sonucunda zamanla diskin beslenmesi bozulur (97-99). Nitekim dejenerasyondaki en kritik olay, oksijen, besin ve atıkların disk mesafesindeki diffüzyon bozukluğudur. Disk, vertebra cismi ve komşu, kıkırdak son plaklardaki dolaşımdan diffüzyon yolu ile beslenir. Diskin su içeriğinin azalmasında, vibrasyon kuvvetleri, aşırı yüklenme, spinal deformite gibi dış etkenlerin de rolü vardır ve bu su içeriğinin azalması diffüzyonu olumsuz yönde etkiler. Diffüzyon bozukluğunun net sonucu disk içerisindeki oksijenin azalmasıdır. Bu da anaerobik metabolizmaya ve dolayısı ile laktat birikimine neden olur. Laktik asit artışı ile Ph düşer ve Ph değişikliklerine son derece duyarlı olan disk içi homeostaz bozulur. Bu dengenin bozulmasıyla hücresel düzeyde bozukluklar başlar. Disk matriksinin yenilenmesi ve sentezinden sorumlu hücre yoğunluğu azalır (100). Hidrofilik yapıdaki, (-) yüklü proteoglikanlar, disk içerisine suyu çeken moleküllerdir. Disk içi basıncı ve gerginliği bu özellikleri ile proteoglikanlar sağlar. Hücre yoğunluğu ve dolayısıyla hücresel fonksiyonların azalması ile proteoglikanların sentezi azaldığı gibi, yıkımları da artar ve su kaybı ile birlikte intradiskal basınç ve dolayısıyla disk yüksekliği azalır. Ayrıca proteoglikan yıkımı sonucu oluşan yıkım ürünlerinin birikmesi ve su miktarının azalması ile diffüzyon daha da bozulur. Sonuçta bir kısır döngü oluşur (75).

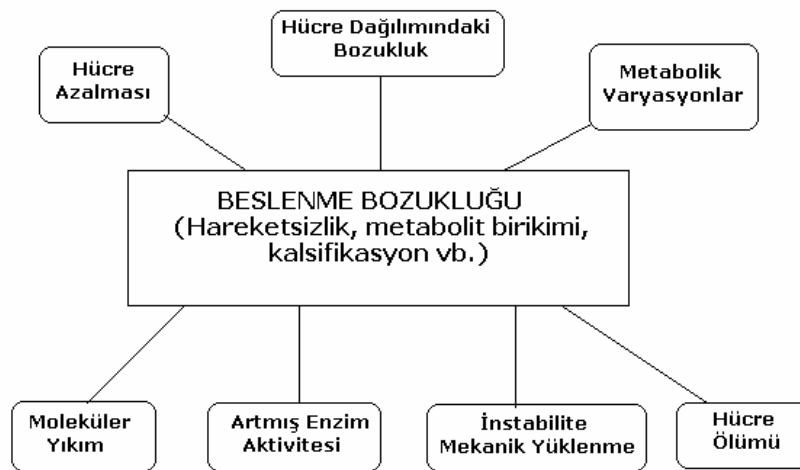
Dejenerasyonun erken aşamalarında, kollajen miktarında artış olur. NP’u kondrositik hücrelerindeki Tip 2 kollajenin mRNA miktarında artış olduğu gösterilmiştir (101). Ancak dejenerasyon ilerledikçe kollajen miktarı azaldığı gibi yerleşim yeri ve kalitesinde de değişiklik olmaya başlar. Normalde son plaklarda ve NP’da bulunan Tip 2 kollajen giderek kaybolur ve bu bölgelerdeki Tip 1 kollajen oranı artmaya başlar. Aynı şekilde AF’da normalde daha az olan Tip 2 kollajen artışı olur. Ancak bu artmış kollajenin yapısı bozuktur ve sağlıklı bir çatı oluşturamaz (18;102).

Gerek hücresel değişiklikler gerekse Ph'nın düşmesi gibi faktörler, disk remodelinginde görevli olan proteaz sistemini tetikler. Disk dejenerasyonunda inflamatuvar mediatörler ve MMP'ler gibi proteinazların rol aldığı gösterilmiştir (5;103).

Disk dejenerasyonuna neden olan en önemli dış etken mekanik yüklenmedir. Sağlıklı bir diskde vertebral kolona binen yük, son plağın merkezinden aşağıya iletilir. Oysa dejenere disklerde bu yük son plağın merkezinden ziyade laterallere yayılır. Bunun NP'un dehidratasyonu nedeniyle olduğu bilinmektedir (104). Bir başka çalışmada da disk yüksekliğinin azalması sonucu çevre ligamentlerin, gerginliğini kaybettiği ve bu nedenle laxitenin arttığı yine aynı nedenle de hareketin kısıtlandığı gösterilmiştir. Ligamentlerin gevşemesi sonucu diskin daha düşük intradiskal basınçlarda bile protrüde olabildiği belirtilmektedir (105-107).

Disk dejenerasyonu, ekstrasink, intrasink ve genetik faktörlerin rol oynadığı bir süreçtir. Spinal travma, deformite, yüklenme gibi faktörlerin disk içerisinde yarattığı stres, oksijen radikalleri gibi etkenler, sigara içiciliği, vasküler hastalıklar, diabetes mellitus (DM) gibi, dolaşımı, dolayısıyla disk beslenmesini bozan patolojiler, disk dejenerasyonuna katkıda bulunur. Tüm bu faktörlerin katkısına rağmen disk dejenerasyonundaki asıl olayın, diffüzyon bozukluğu olduğu görüşü kabul görmektedir (108).

Tablo 2. 2: Disk dejenerasyonunun fizyopatolojisi



2.12. Disk Dejenerasyonunun Genetiği

Disk dejenerasyonu etyolojisinde, daha önce bahsedilen faktörlerin yanında, son yıllarda yapılan çalışmalarda dejenerasyon genetiği üzerinde durulmaktadır. Değişik çevresel faktörlere maruz kalmış, monozigot ikizler üzerinde yapılan bir çalışmada, disk dejenerasyonunun primer olarak genetik etkiler ile açıklanabileceği belirtilmiştir (109). Başka bir çalışmada da disk dejenerasyonunun genetik risk faktörleri ile ilişkili olduğu ve bu popülasyonda disk dejenerasyonu gelişme riskinin normal popülasyona oranla 6 kat fazla olduğu bildirilmiştir (110).

2.12.1. Dejeneratif Disk Hastalığında Genetik Risk Faktörleri

Dejeneratif disk hastalığı (DDH) gibi, multifaktöryel bir hastalıkta bir çok risk faktörü söz konusudur. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, disk biyolojisi ile ilgili bilgilerimize dayanarak, kollajenler, PG'lar gibi, ESM komponentleri ile ilgili bilgiler ışığında yeni aday genler üzerinde de durulmaya başlanmıştır (111).

DDH ile ilgili olduğu düşünülen tüm genler, kıkırdak dokuda bulunan ESM fonksiyonu, yapısı, ile ilişkili kodlamaları yapan genlerdir. Birçok predispozan gen tarif edilmiş olsa da, DDH ile ilişkisi kesin olarak bildirilmiş 2 gen vardır. Vitamin D Reseptörü (VDR) ve COL9A2 geni.

Vitamin D Reseptörü

VDR, steroid çekirdekli bir reseptördür ve normal kemik mineralizasyonu ve remodelinginde görev alır. Gen polimorfizmi, osteoporoz, osteoartrit gibi birtakım hastalıklarla ilişkilidir (112;113). VDR, finli monozigot ikizlerde yapılan bir çalışmada DDH ile ilişkili olduğu gösterilen ilk genetik yapıdır (114). Taq1 ve Fok1 diye 2 alleli vardır ve bu alleller, MRG'de disklerdeki düşük intensite ile ilişkilidir. Ayrıca Taq polimorfizminde Tt genotipi, TT genotipine oranla multiseviye disk hastalığı ile ilişkilidir (115).

D vitamini, proteoglikan sentezi sürecinde, GAG'ların sülfatlanmasında önemli olan sülfat metabolizmasını etkiler. Bu nedenle reseptör düzeyindeki polimorfizmler, IVD'de yapısal değişikliklerle sonuçlanabilir (116).

Kollajen 9 Molekölünü Kodlayan Genler (COL9A2 ve COL9A3)

Yapılan bir çalışmada siyatik kliniği olan 157 Finli hastanın % 4'ünde kollajen tip 9'un $\alpha 2$ zincirinde (Trp 2 allelinde) bir aminoasit mutasyonu tespit edilmiştir. Kontrol grubunda bu mutasyona hiç rastlanmamıştır (117). Trp 2 allelinin DDH için yaşa bağlı risk faktörü olduğu gösterilmiştir. Ayrıca Trp 2 alleli annüler yırtıklar ve son plak herniasyonları ile ilişkilidir (118). Aynı çalışmada $\alpha 3$ zincirindeki (Trp 3 allelinde) bir mutasyonun da DDH ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bir adet Trp 3 allelinin bulunması DDH riskini 3 kat arttırmaktadır (119).

AGC1 Geni (Agrekan)

Agrekan çekirdek proteininde, CS1 ve CS2 domain olmak üzere, kondroitin sülfat zincirlerinin 2 adet bağlanma bölgesi bulunmaktadır. İnsanda CS1 domainini kodlayan AGC1 geni çeşitli polimorfizmler gösterir. Bu değişiklikler zincirin uzunluğunu belirler. Bu nedenle, kişiler arasında, kondroitin sülfatın bağlanacağı bölgelerin uzunluğu ve sayısı arasında farklılıklar olduğunu gösterir. Japonya'da yapılan bir çalışmada, dizilerin uzunluğundaki bu polimorfizmin DDH ile hatta zincirin boyutunun hastalığın şiddeti ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (19).

COL1A1 Geni

COL1A1, kollajen tip 1 molekülünün $\alpha 1$ zincirini kodlar. COL1A1 geninin intron 1 bölgesindeki bir transkripsiyon faktörü olan SP1'in polimorfizmi, artmış kemik kaybı ve düşük mineral dansitesi ile ilişkilidir (120). Yapılan çalışmalarda osteoporozun DDH ile ters orantılı olduğu gösterilmiştir. Almanya'da yapılan bir çalışmada, TT genotipine sahip bireylerin disk dejenerasyonu açısından, GT ve GG genotipli bireylere oranla daha yüksek risk altında oldukları gösterilmiştir (121).

MMP-3

MMP-3 geninin promotor bölgesinde yaygın bir polimorfizm tarif edilmiştir. Bir allel 6 adenozin içerirken diğer allelde 5 adenozin olduğu bulunmuştur ve bu 5A/6A polimorfizmi MMP-3 ekspresyonunun düzenlenmesi ile ilişkilidir. Nitekim 5A alleli, 6A allele göre 2 kat fazla promotor aktivite sağlamaktadır. Yine Japonya'da yapılan bir çalışmada, 5A5A

ve 5A6A genotipli yaşı hastalarda, 6A6A genotiplilere oranla daha yüksek oranda DDH görüldüğü saptanmıştır (122).

2.12.2. DDH’da Moleküler Tedavi Stratejileri

Günümüzde disk dejenerasyonu tedavisinde kullanılması amacıyla araştırılmakta olan stratejiler 4 grupta toplanabilir (123).

- 1) Antikatabolikler
- 2) Mitojenler
- 3) Morfojenler
- 4) Hücre içi düzenleyiciler (Tablo 2.3)

Tablo 2. 3: Disk dejenerasyonunda moleküler tedavi stratejileri

Hedef Molekül	Örnek
Hücre Kökenli	Disk Transplantasyonu
	Kültür disk hücre transplantasyonu
	Kondrosit transplantasyonu
	Mezenkimal kök hücre Transpl.
ESM	ESM Komponentleri Kökenli
Moleküler Kökenli	Anti-Katabolikler
	Mitojenler
	Morfojenler
	Hücreiçi Düzenleyiciler

Antikatabolikler

Antikatabolikler, disk içerisindeki yıkıcı enzimleri inhibe ederek matriks kaybını önlerler. MMP'lerin disk dejenerasyonundaki yıkıcı etkilerinin ispatlanmasından itibaren bu enzimlerin inhibitörleri üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Wallach ve arkadaşları, dejenere disk hücrelerine, bir adenoviral vektör kullanarak TIMP-1 geni yerleştirmiş ve bu şekilde, IVD içerisinde TIMP-1 ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir (124). Ayrıca aynı çalışmada, proteoglikan sentezinin de arttığı gösterilmiştir. Bu sonuçlarla, disk dejenerasyonunun tedavisinde de gen terapisi yoluyla katabolik inhibisyonun sağlanabileceği ve bu tedavinin gelecek vaat ettiği düşünülebilir.

Mitojenler

Büyüme faktörleri, disk hücre metabolizmasının anabolik düzenleyicileridir. Mitojenler mitoz oranını artırma yeteneğine sahip moleküllerdir. Tipik sitokinler olan büyüme faktörleri, transmembranik reseptörlere bağlanarak, hücre içi sinyalizasyon kaskadını aktive ederler.

Disk hücreleri için mitojenik moleküller, insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF)'dür. Thompson ve arkadaşları, mitojenlerin, disk içerisinde mitozu ve PG sentezini arttırdığını göstermişlerdir (40). Bazı büyüme faktörleri disk hücrelerini apoptozise karşı korumaktadır. IGF ve PDGF uygulanmasından sonra disk hücrelerinin apoptozis oranlarının belirgin olarak düştüğü gösterilmiştir (70).

Morfojenler

Transforming growth faktör- β , bone morphogenetic protein (BMP) ve büyüme ve diferansiasyon faktörleri (GDF), disk hücreleri için kondrojenik morfojenlerdir. Bu moleküllerin mitojenik kapasiteleri olduğu gibi, hücrenin kondrosit spesifik fenotipini artırma yetenekleri de vardır. Bu büyüme faktörleri, anabolik düzenleyiciler oldukları gibi, kollajen tip-2, sox9, agrekan, ve GAG üretimini artırma yeteneğine sahiptirler (40). Kondrojenik morfojenler ilgi çekicidir çünkü disk hücresinin fibrotik fenotipini, normal kondrositik fenotipe çevirme yetenekleri vardır.

TGF- β ilk çalışılan morfojenik moleküldür ve PG sentezini belirgin olarak artırır (40). Nishida ve arkadaşlarının, tavşan disklerine, in vivo olarak adenoviral vektör kullanarak, TGF- β 1 geni implante ettiği çalışmasında, PG sentezinin belirgin olarak arttığı

gösterilmiştir (125). Bu tip in vivo deneylerde TGF- β 1' in hücre proliferasyonunu arttırdığı ancak disk yüksekliğini etkilemediği bulunmuştur (126).

Bir diğer kondrojenik morfojen, morfogenetik protein-2 'dir (BMP-2). Yoon ve arkadaşları, BMP-2'nin, agrekan ve kollajen-2 gen ekspresyonunu arttırdığını ancak kollajen-1 üzerine etkisiz olduğunu göstermişlerdir (127). Ayrıca BMP-2 kondrositik genlerin ekspresyonunu da arttırmaktadır.

OP-1 olarak da bilinen BMP-7 bir diğer morfojendir. BMP-7 de, agrekan ve kollajen Tip-2 sentezini artırır. Bu molekülün önemli bir yanı da direk intradiskal enjeksiyonu ile disk yüksekliğinin artırılmasını sağlamasıdır (128;129).

GDF-6 veya CDMP-2 (cartilage-derived morphogenetic protein-2) olarak da bilinen morfogenetik protein-13, BMP ailesinin bir diğer üyesidir. Aminoasit sekansları olarak BMP-2'ye % 50 oranında homologdur ancak BMP-2'ye oranla çok daha az potent bir osteogenik moleküldür (130). Son çalışmalarda bu moleküllerin aditif etkilerinden yararlanmak için birlikte kullanılmaları gündemdedir.

Link proteinlerinin aminoterminal parçası olan Link N' in disk hücreleri üzerine stimülatör etkisi vardır. Dejenerasyon sürecinde, MMP'lerin etkisi ile yıkılan link proteinlerinin bu yıkım ürünleri, feedback bir etki ile büyüme faktörü gibi davranırlar. Bu nedenle Link N de bir kondrojenik morfojen olarak kabul edilebilir (123).

Hücre İçi Düzenleyiciler

Bu gruptaki moleküller sitokin olmamakla birlikte, daha önce bahsedilen moleküllere benzer etkileri vardır. Bu moleküller salgılanmaz veya hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak etki etmezler. Asıl rolleri, hücre içi aktiviteyi kontrol etmeleridir. Bu moleküllerden bazıları, SMAD'lar, Sox9, Latent membran protein-1 (LMP-1)'dir. LMP-1, BMP-2 ve BMP-7 üretimini artırır. SMAD'lar da BMP reseptör sinyalizasyonu üzerinden etki eder (131;132). Sox9, kollajen Tip-2 mRNA transkripsiyonunu artırır (133).

Elimizde tüm bu moleküllerle ilgili in vitro datalar olsa da, bunların sadece bir kısmı üzerinde in vivo deneyler yapılmıştır. Çalışmaların bir sonraki aşaması, disk dejenerasyonu ile ilgili daha gerçekçi hayvan modelleri üzerinde çalışmak olmalıdır. IVD araştırmalarında, moleküler terapi, gelecek için oldukça umut vaat edici görünmektedir.

Tablo 2. 4: Disk Dejenerasyonunun tedavisinde araştırılan moleküller

Kategori	Molekül
Anti-katabolikler	TIMP-1,2,3
	Anti TNF- α
	Anti-MMP'ler
Mitojenler	IGF-1
	PDGF
	EGF
	FGF
Morfojenler	TGF- β
	BMP-2
	BMP-7 1
	BMP-13(GDF-6, CDMP-2)
	GDF-5 (CDMP-1)
Hücreiçi Düzenleyiciler	Link N
	SMAD'lar
	Sox9
	LMP-1

3. HASTALAR ve YÖNTEM

Bu çalışma, Başkent Üniversitesi Etik Kurulu ve Başkent Üniversitesi Araştırma Kurulu tarafından, klinik araştırmalar için belirlenen kurallara ve prosedürlere uygun olarak, 04/04/2007 tarih, (2007/AP-401) 07/63 karar sayılı etik kurul onayı ve KA 07/54 proje numarası ayrıca T.C. Adalet Bakanlığı Adli Tıp Kurumu Başkanlığı Eğitim ve Bilimsel Araştırma Komisyonu'nun B.03.1.ATK.0.01.00.08/174 sayılı izni ile gerçekleştirilmiştir.

3.1. Amaç

Bu çalışmanın amacı, servikal disk dejenerasyonu etyopatogenezinde; intervertebral disk dejenerasyonunda rol oynadığı düşünülen MMP-1, MMP-3, MMP-9 ve MMP inhibitörü olan Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP-1) varlığını ortaya koyarak elde edilen sonuçları olguların klinik ve nöroradyolojik bulguları ile istatistiksel olarak karşılaştırmaktır.

3.2. Hasta ve Kontrol Gruplarının Seçimi

C5-6 tek mesafe servikal disk hernisi olan ve Thompson radyolojik dejenerasyon sınıflamasına göre grade 3,4,5 olarak değerlendirilen yirmi hasta çalışmaya dahil edildi (134). Hastaların yaşları 23 ile 67 aralığında olmakla birlikte, yaş ortalaması 42,24 (STD±11,686) olarak bulundu. Hastalar opere edilerek rutin anterior servikal diskektomi uygulandı ve 20 adet disk materyali elde edildi (Grup H). Kontrol grubu olarak, ölümünün üzerinden en fazla 24 saat geçmiş, 17 adet taze kadavranın herbirinden 2 mesafe olmak üzere, toplam 34 adet servikal disk materyali alındı (Grup K). Kontrol grubunun yaş aralığı 27-67 iken yaş ortalaması 44,53 (STD±11,817) olarak saptandı. İmmunolojik hastalıkları, diabetes mellitus, kronik böbrek yetmezliği gibi sistemik hastalığı, malignensisi, omurga travması veya cerrahisi geçiren hastalar çalışmaya dahil edilmedi.

3.3. N radyolojik Değerlendirme

Olguların n radyolojik değerlendirilmesi manyetik rezonans tetkiki ile yapıldı. Disk dejenerasyonunun değerlendirilmesinde, MRG T2 ağırlıklı kesitlerde Thompson dejenerasyon sınıflaması kullanıldı. Thompson grade 3,4,5 olan olgular  alışmaya dahil edildi (Tablo 3.1.).

Tablo 3. 1. Thompson radyolojik disk dejenerasyonu sınıflaması

Derece	Nukleus Pulposus	Annulus Fibrosus	Son-plak	Vertebra Cismi
I	Homojen, Parlak, sınırların ayrımı belirgin	Homojen, koyu gri	Koyu çizgi sinyali	Yuvarlak sınırlar
II	Annulus fibrosusun bir ucundan bir ucuna uzanan merkezi koyu bantlar	Sinyal intensitesinde artış olan alanlar	Merkezi konkavitede artış olması	Gittikçe incelen sınırlar
III	Sinyal intensitesinde azalma, koyu ve açık lekelenmelerle gri bir ton görülmesi	Nukleus pulposus ile ayırdedilemez	Hatlar daha az belirgin	Sınırlarda küçük koyu çıkıntılar olması
IV	Gri sinyal oranı azalmış ve koyu ve parlak alanlar daha büyük	Nukleus pulposusdan ayırdedilemez; Koyu ve parlak sinyal alanları hem AF hem NP ile bitişik izleniyor	Hatlarda fokal defisitler	Kemik iliği ile aynı intensitede, 2 mm'den küçük koyu çıkıntılar
V	Disk yüksekliğinde gross kayıp olması parlak ve koyu sinyaller dominant	Sinyaller nukleus pulposus ile bitişik olarak izleniyor	Kalınlaşmış ve defektli bölgeler	Kemik iliği ile aynı intensitede, 2 mm'den küçük çıkıntılar

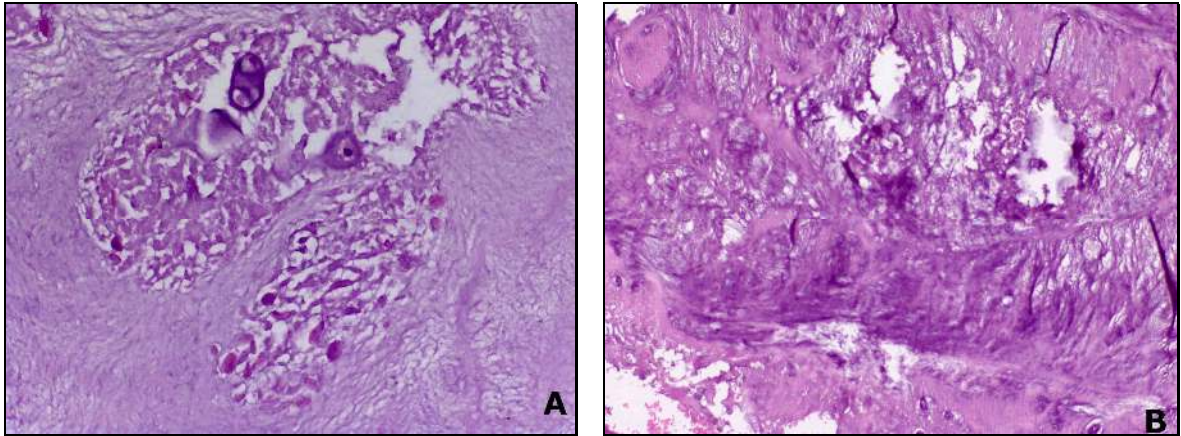
Tablo 3. 2: Disk dejenerasyonunun histolojik derecelemesi

Kriter	Grade
Hücre Dansitesi (Kondrosit Proliferasyonu): Çevresel matriks tarafından çevrelenmiş, küçük yuvarlak kümeler halinde multiple kondrositler	0: Proliferasyon yok 1: Artmış hücre dansitesi 2: İki kondrosit birleşmiş halde 3: Küçük koloniler (3-7 kondrosit birarada) 4: Orta düzeyde koloniler (8-15 hücre) 5: Dev koloniler (>15 hücre) 6: Skar/doku defektleri
Yapısal Değişiklikler (yırtık ve yarıklar): AF'daki kollajen lifler yönünde konsantrik yırtıklar veya son plaka paralel veya oblik şekilde, NP'dan dış AF'a uzanan defektler (Yarıklar)	0: yok 1: Nadiren var 2: Orta düzeyde (1-3) 3: Bol miktarda 4: Skar/ doku defektleri
Granüler Değişiklikler: Eozinofilik boyanma, fibrokartilaj matriksde amorf granüller	0: yok 1: Nadiren var 2: Orta düzeyde (1-3) 3: Bol miktarda 4: Skar/ doku defektleri
Müköz Dejenerasyon: Alc-PAS ile koyu mavi boyanan asit mukopolisakkarit (ör: sülfatlanmış glikozaminoglikanlar) birikimleri olan oval, kistik veya düzensiz alanlar.	0: yok 1: Nadiren var 2: Orta düzeyde (1-3) 3: Bol miktarda 4: Skar/ doku defektleri
Histolojik dejenerasyon skoru	0-18 puan

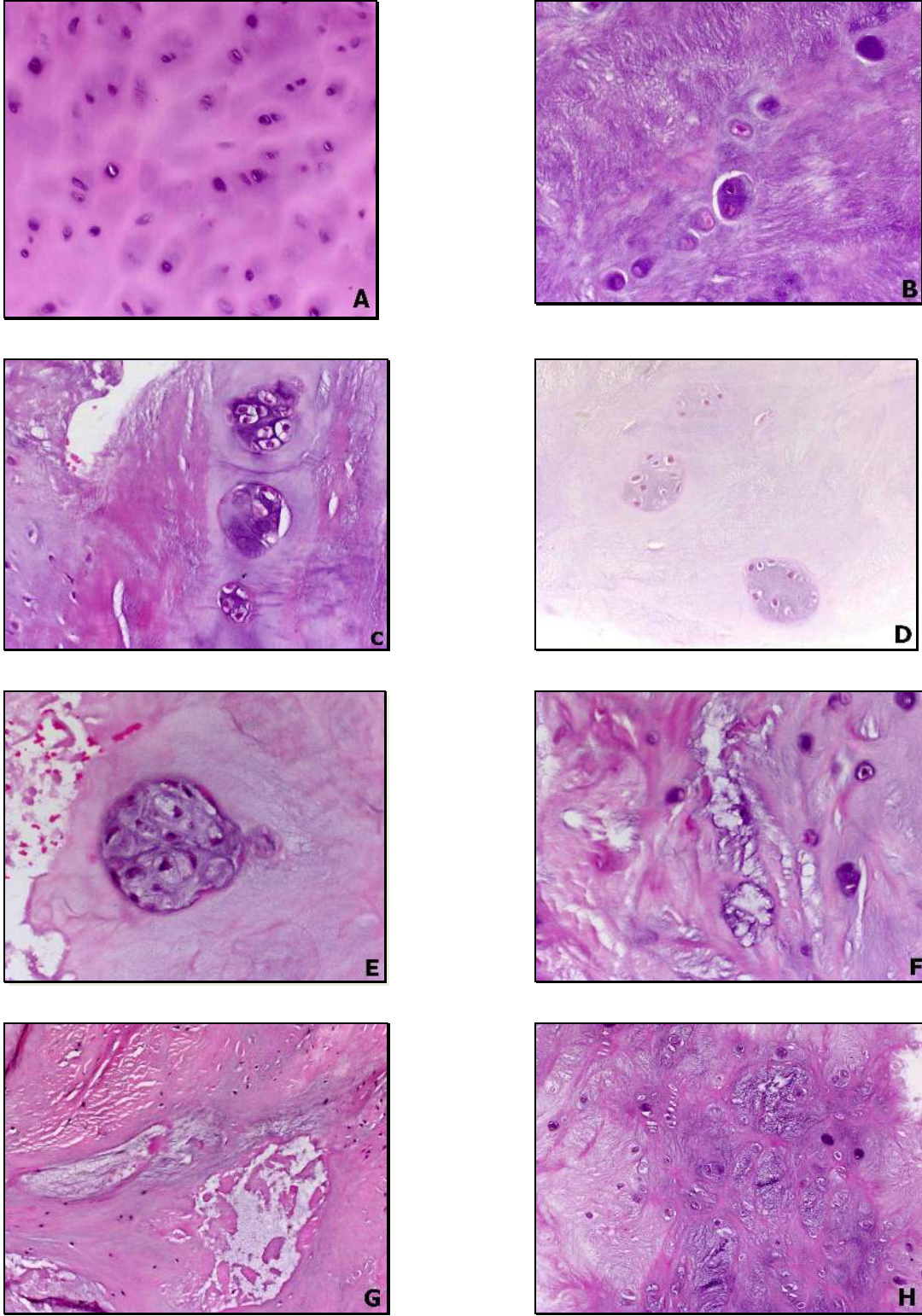
3.4. Histopatolojik Değerlendirme

Çalışmaya dahil edilen biyopsi materyalleri %10'luk formalin solusyonunda tespit edilerek, rutin takip işleminden sonra parafin bloklara gömüldü. Tüm bloklarda 3 mikron kalınlığında hematoxilen-eozin (H&E) boyalı kesitleri elde edildi. Kesitlerde disk dejenerasyon skorlamaları, daha önce Boos ve arkadaşları tarafından tarif edilen disk dejenerasyonunun histolojik sınıflamasına göre yapılarak puanlandı (Tablo 3.2.)(135).

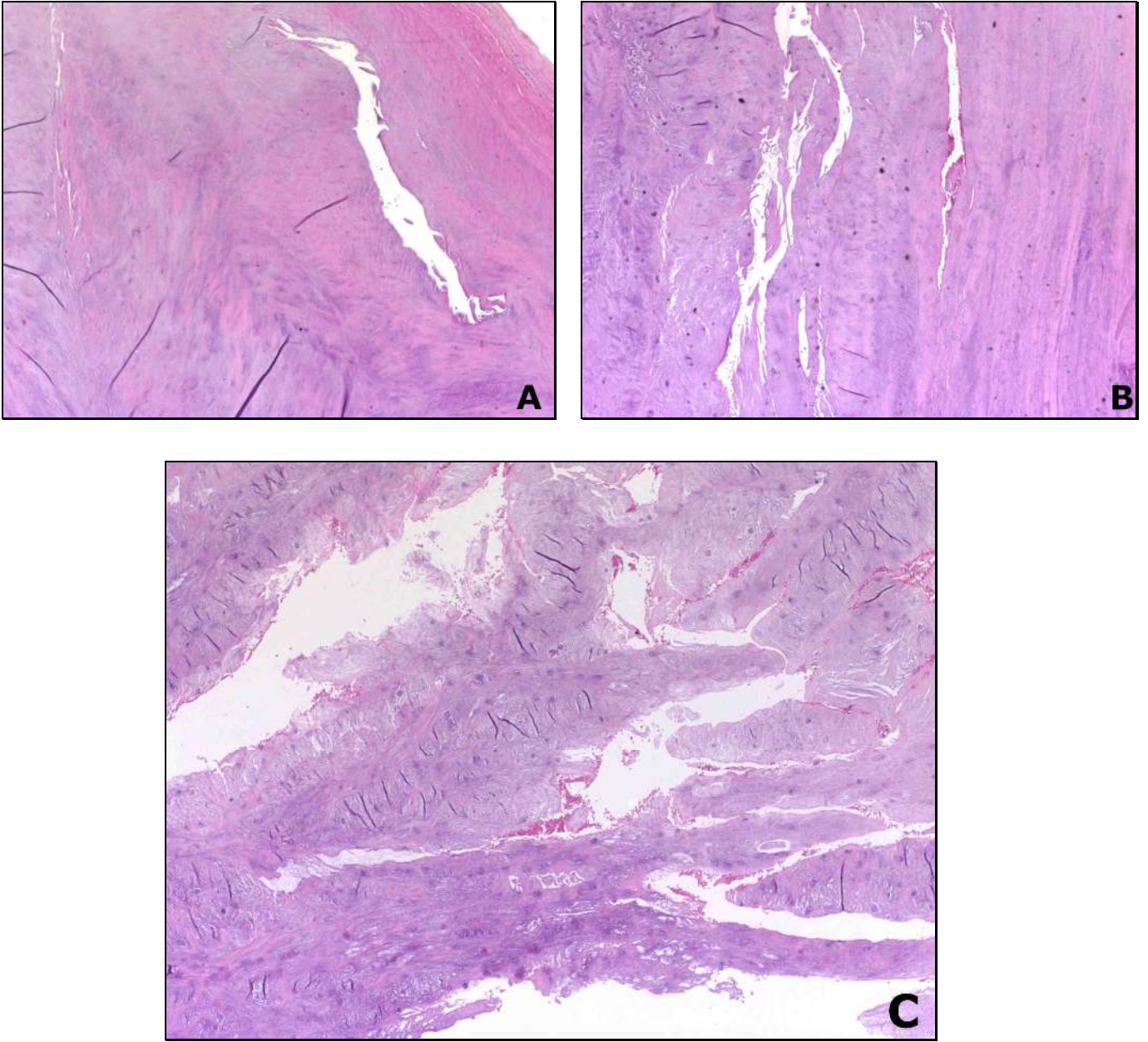
Kısaca bu puanlama sistemi değişik skorlara sahip şu parametrelere göre yapıldı. 1) Hücre dansitesi (kondrosit proliferasyonu), 2) Yapısal değişiklikler (yırtık ve yarıklar), 3) Müköz dejenerasyon, 4) Granüler matriks değişiklikleri. Her spesimen 0 ile 18 arasında bir puan aldı (Şekil 3.1, 3.2 ve 3.3). Tüm histomorfolojik değerlendirmeler immünohistokimyasal değerlendirmeden bağımsız ve ayrı olarak iki patolog tarafından yapıldı.



Şekil 3. 1: Histopatolojik dejenerasyon skorlamasında granüler değişiklik parametresine örnek. A)Nadiren var-1 puan B) Orta düzeyde-3 puan. (X200)



Şekil 3. 2: Histopatolojik dejenerasyon skorlamasında kondrosit proliferasyonu ve müköz dejenerasyon parametrelerine örnek. A-B-C-D-E sırasıyla kondrosit proliferasyonu 1,2,3,4,5 puanlık kesitlere örnekler. F-G-H sırasıyla müköz dejenerasyon 1,2,3 puanlık kesitlere örnek.X200 ve X400



Şekil 3. 3: Histopatolojik dejenerasyon skorlamasında yapısal değişiklikler parametresine örnek. Yarık ve yırtıklar açısından, A) Nadiren var-1 puan B) Orta düzeyde (1-3 arası)- 2 puan C) Bol miktarda- 3 puan (Bkz. Tablo 3.2.) (X200)

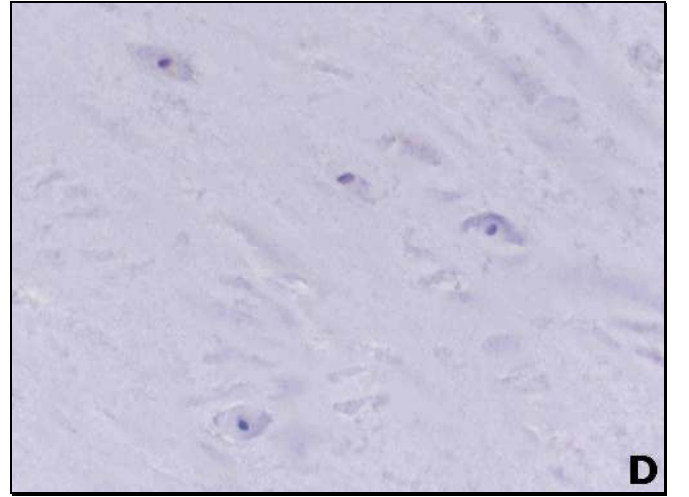
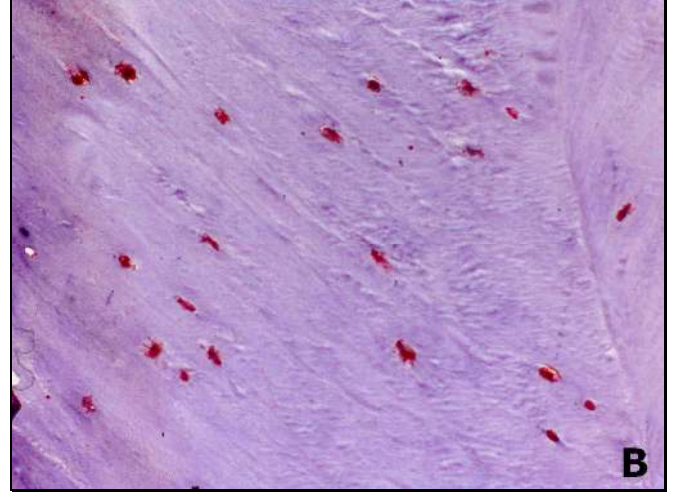
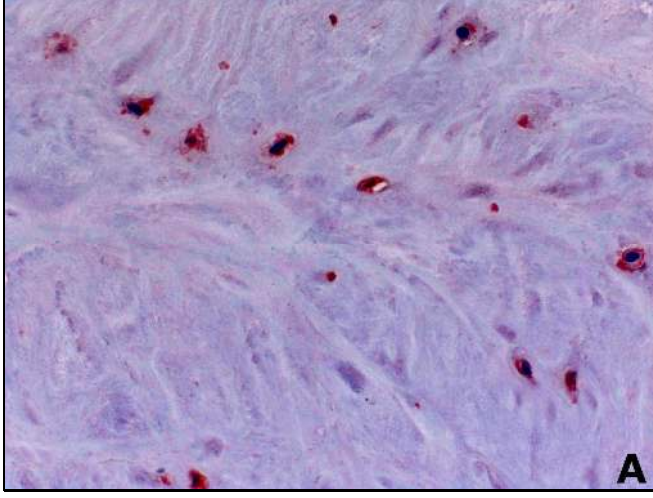
3.5. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Örnekler %10'luk formalin solusyonunda tespit edilip, rutin takip işleminden sonra parafin bloklara gömülmüştür. Parafin bloklardan hazırlanan 3 mikron incelikteki kesitler pol-L-lysin ile kaplanmış lamlara alındıktan sonra 56 C° deki etüvde 12 saat bekletilerek deparafinize edilmiştir. Kesitler, sitrat tampon çözeltisinde (10 mM ve pH: 6,0) 20 dakika kaynatılmıştır. Oda sıcaklığında 20 dakika soğutulduktan sonra kesitler distile su ile yıkanmıştır. Hidrojen peroksitte (H₂O₂) 15 dakika bekletildikten sonra kesitler phosphate buffered saline (PBS) (10 mM PBS, pH: 7,6) ile yıkanmıştır. "Protein blocking solution" damlatılarak oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiş ve TIMP-1 antikoru (epitope specific rabbit antibody, NeoMarkers) ile oda sıcaklığında 2,5 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben PBS ile yıkanan dokular biotin ile 15 dakika ve streptavidin HRP ile 15 dakika inkübe edilmiştir. Tekrar PBS ile yıkanan dokulara 15 dakika AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) uygulanmış ve bu işlemi takiben hematoksilen ile zemin boyası yapılarak su ile yıkanıp lamel ile kapatılmıştır.

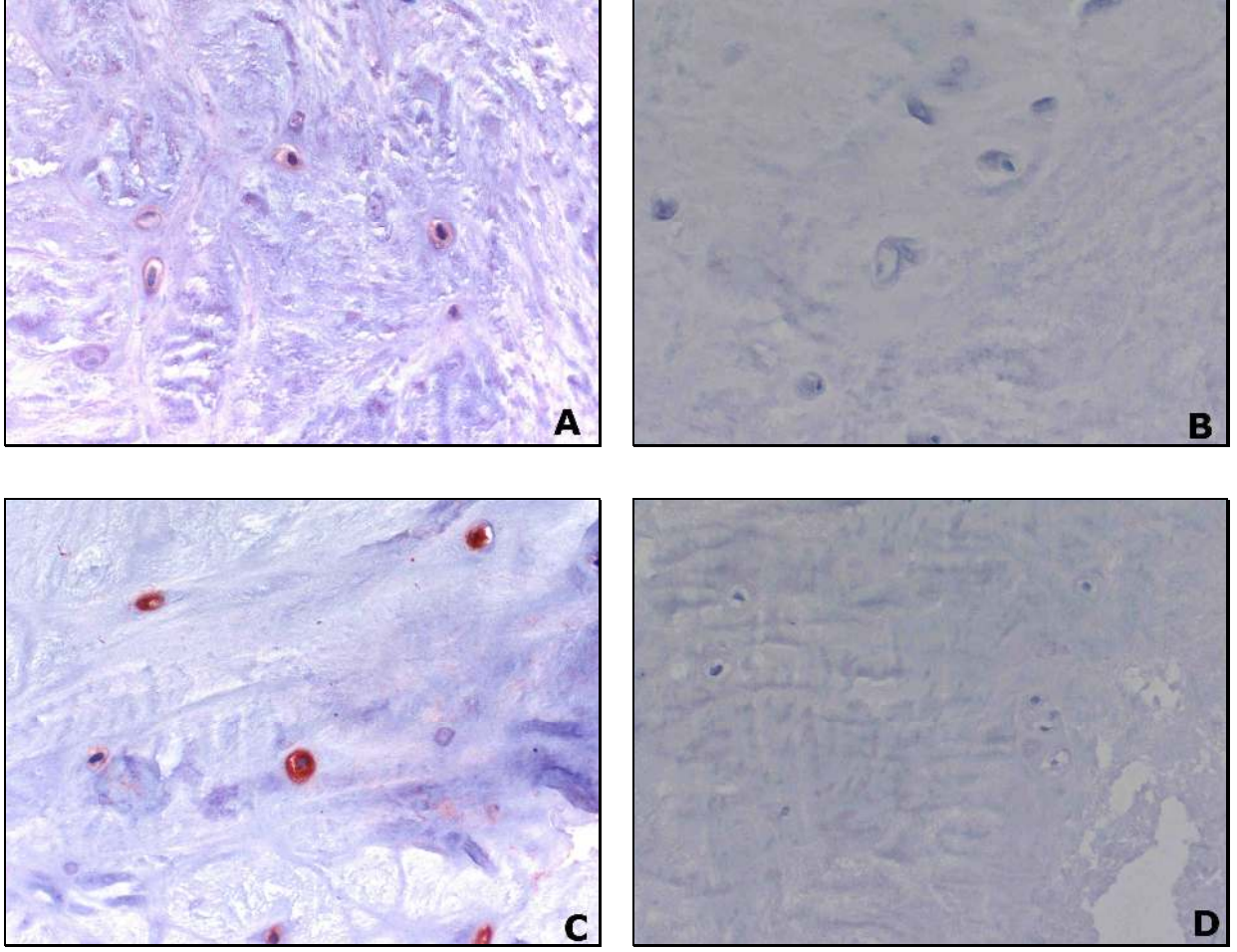
Aynı basamaklar MMP-1 (collagenase-1) Ab-6 (rabbit polyclonal antibody, NeoMarkers), MMP-3 (rabbit polyclonal antibody, Thermo Scientific) ve MMP-9 (92kDa Collagenase IV) (epitope specific rabbit antibody, NeoMarkers) antikorları için de farklı seri kesitlerde tekrarlanmıştır.

Pozitif kontrol olarak, TIMP-1, MMP-1 ve MMP-9 antikorları için invaziv intraduktal meme karsinomu kesitleri, MMP-3 antikoru için ise plasenta kesitleri kullanılmıştır. Sitoplazmik boyanma pozitif boyanma olarak kabul edilmiştir.

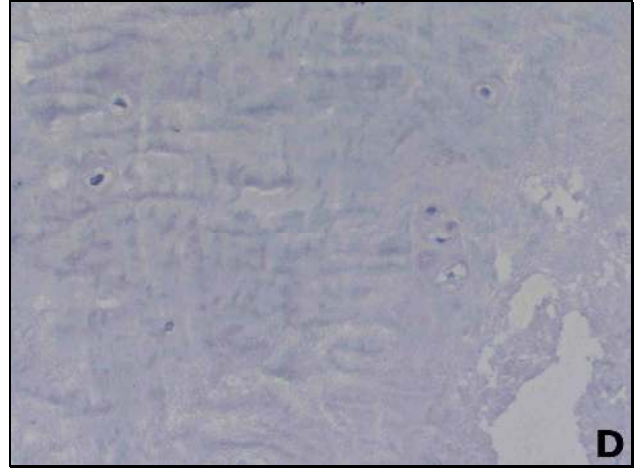
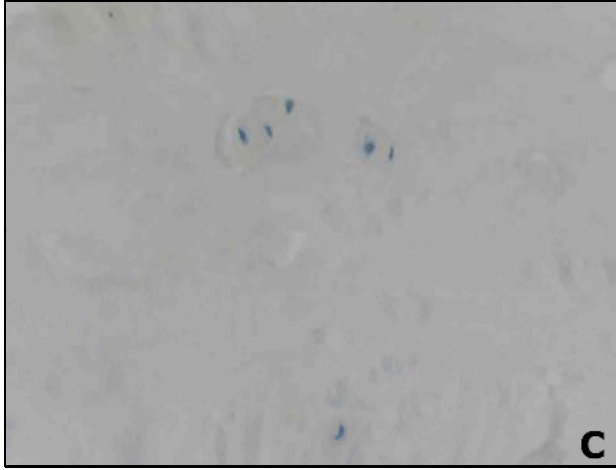
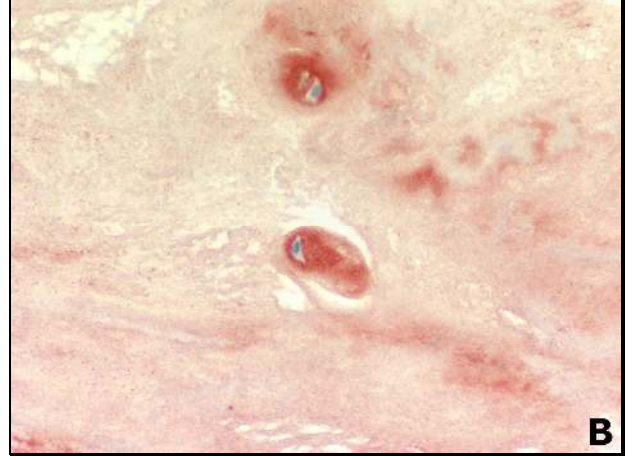
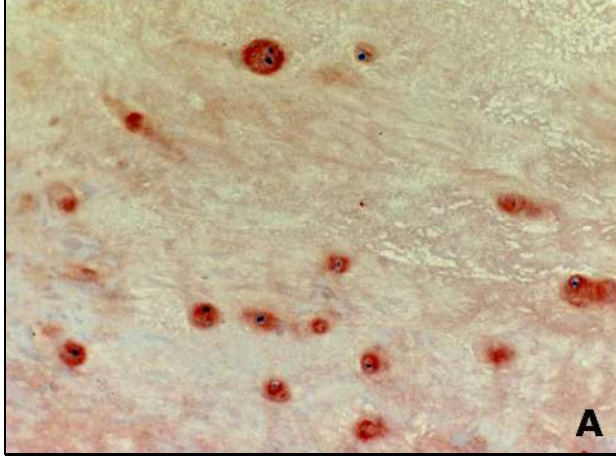
Değerlendirme için kantitatif morfometrik analiz uygulanmıştır. İmmünohistokimyasal yöntem ile boyanan her kesit ışık mikroskopunda incelenerek, her üç antikor için de sitoplazmik boyanan hücrelerin sayısı tüm hücrelerin sayısına oranlanarak yüzde (%) boyanma oranı tespit edildi.



Şekil 3. 4: A-B, 200 büyütmede hasta grubuna ait kesitlerde MMP-1 antikoru ile yoğun sitoplazmik boyanma izleniyor. C-D, 400 büyütmede kontrol grubunda boyanma izlenmiyor.



Şekil 3. 5: A) 400 büyütmede MMP-3 antikoruna (+) sitoplazmik boyanma izlenen hasta grubu kesiti. B) Kontrol grubu MMP-3 kesitinde boyanma izlenmiyor. C) 400 büyütmede MMP-9 antikoruna (+) sitoplazmik boyanma izleniyor. D) MMP-9 kontrol grubunda boyanma izlenmiyor.



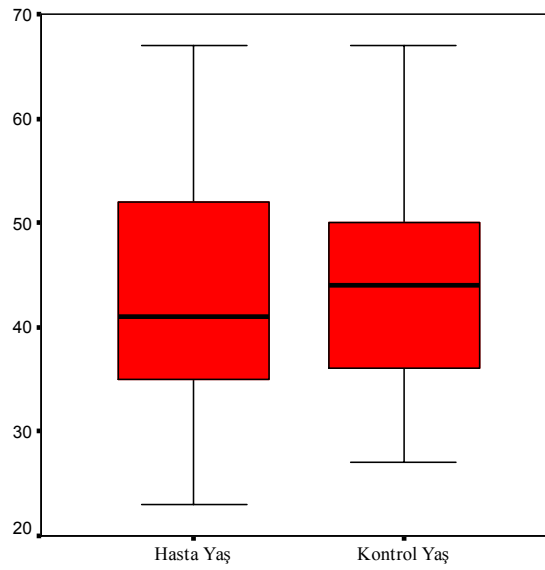
Şekil 3. 6: A) 200 büyütmede TIMP-1 antikoruna (+) sitoplazmik boyanma izlenen hasta grubu kesiti B) 400 büyütmede TIMP-1 antikoruna (+) boyanma C,D) Kontrol grubunda boyanma izlenmiyor.

3.6. İstatistiksel Değerlendirme

Yaş, MMP-1, MMP-3, MMP-9, TIMP-1, dejenerasyon skoru ve thompson grade verileri, gruplar arası Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Yaş, dejenerasyon skoru, thompson grade ile MMP-1, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 arasındaki ilişki lojistik regresyon testi ile değerlendirildi. İstatistiksel değerlendirme SPSS 12.0 bilgisayar programı kullanılarak yapıldı ve $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analiz: veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunuldu.

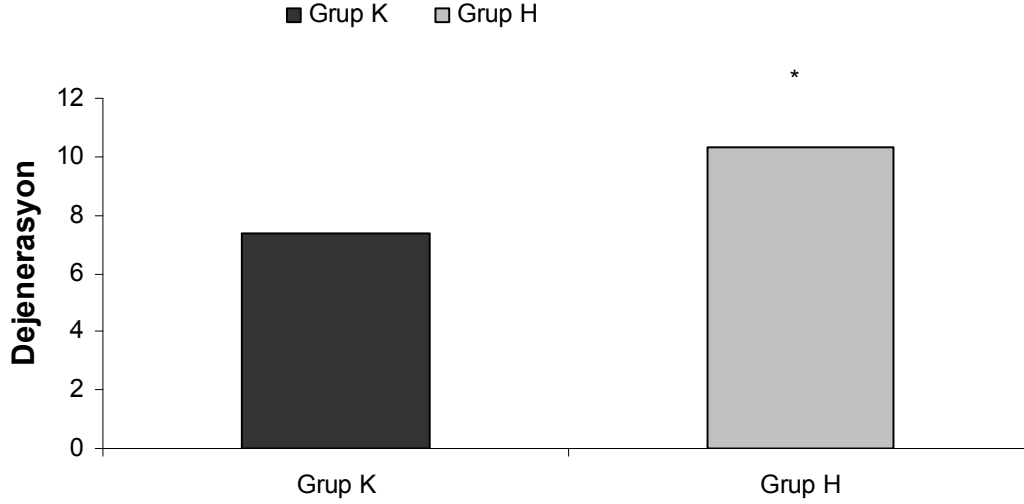
4. BULGULAR

Hastaların yaşları 23 ile 67 aralığında olmakla birlikte, yaş ortalaması 42,24 (STD±11,686) olarak bulundu. Kontrol grubunun yaş aralığı 27-67 iken yaş ortalaması 44,53 (STD±11,817) olarak saptandı. Hasta ve kontrol gruplarının yaşları paired sample T-test ile karşılaştırıldığında demografik özellik açısından benzer bulundu ($p>0,621$). Grupların yaş karşılaştırması tablo 4.1’de özetlenmiştir.



Tablo 4. 1: Grupların yaşlarının dağılım tablosu

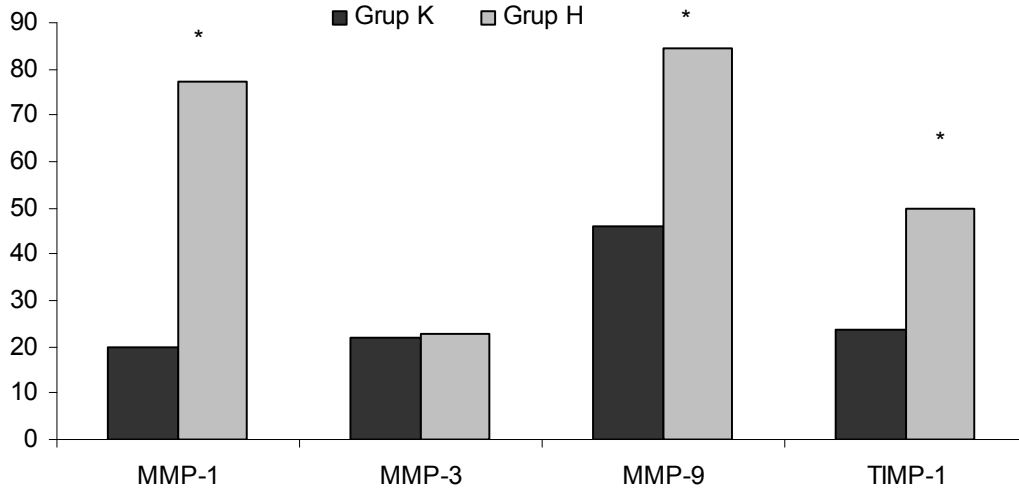
Gruplar arası dejenerasyon skorları karşılaştırıldığında, Grup H’ de Grup K değerinden belirgin olarak yüksek bulundu ($p<0.0001$) (Tablo 4.2 ve Tablo 4.4)



Tablo 4. 2: Gruplar arası dejenerasyon skorları şeması

Gruplar arası MMP-1, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 değerleri karşılaştırıldığında, Grup H' de MMP-1, MMP-9, TIMP-1 değerleri Grup K değerinden belirgin olarak yüksek bulundu ($p < 0.0001$, tüm ölçümlerde). İki grubun MMP-3 ölçümleri benzer bulundu ($p = 0.333$) (Tablo 4.3 ve Tablo 4.5).

Dejenerasyon skoru ile MMP-1, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 Thompson grade arasında ki ilişki araştırıldığında; Thompson grade ile dejenerasyon skoru arasında pozitif ilişki saptandı, ($r = 0.224$). MMP-1, MMP-3, MMP-9 ve TIMP-1 ile dejenerasyon skoru arasında ilişki saptanamadı (Tablo 4.7).



Tablo 4. 3: Gruplar arası MMP ve TIMP-1 düzeyleri şeması

Yaş ile MMP-1, MMP-3, MMP-9, TIMP-1, dejenerasyon skoru ve Thompson grade arasındaki ilişki araştırıldığında; MMP-1, MMP-3, MMP-9, TIMP-1, dejenerasyon skoru ve Thompson grade ile yaş arasında ilişki saptanamadı (Tablo 4.8).

Thompson gradeleme ile MMP-1, MMP-3, MMP-9 ve TIMP-1 arasında ki ilişki araştırıldığında; MMP-1, MMP-3, MMP-9 ve TIMP-1 ile thompson gradeleme arasında ilişki saptanamadı (Tablo 4.6).

Tablo 4. 4. Gruplar arası dejenerasyon skorları tablosu

	Grup K	Grup H	
Dejenerasyon	7.4±2.1 (4-12)	10.3±1.9* (6-14)	p<0.0001

Tablo 4. 5. Gruplar arası MMP ve TIMP düzeyleri tablosu

	Grup K (n=34)	Grup H (20)	
MMP-1	20.0±10.7 (0-50)	77.5±15.2* (50-90)	p<0.0001
MMP-3	21.9±21.5 (10-90)	23.0±17.8 (10-60)	p=0.333
MMP-9	45.9±27.5 (10-90)	84.5±6.9* (70-90)	p<0.0001
TIMP-1	23.5±24.1 (0-90)	50.0±9.2* (30-70)	p<0.0001

Tablo 4. 6: Thompson gradeleme ile MMP-1, MMP-3, MMP-9 ve TIMP-1 arasındaki ilişki

	Grup K (n=17)	Grup H (20)
MMP-1		$r=-0.008$
MMP-3		$r=0.099$
MMP-9		$r=-0.050$
TIMP-1		$r=0.110$

Tablo 4. 7: Dejenerasyon skoru ile MMP-1, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 ve thompson grade arasındaki ilişki

	Grup K (n=17)	Grup H (20)
MMP-1	$r=0.038$	$r=-0.053$
MMP-3	$r=-0.031$	$r=-0.038$
MMP-9	$r=-0.025$	$r=0.010$
TIMP-1	$r=0.063$	$r=-0.055$
Thompson		$r=0.224^*$

Tablo 4..8: Yaş ile MMP-1, MMP-3, MMP-9, TIMP-1, dejenerasyon skoru ve thompson grade arasındaki ilişki.

	Grup K (n=17)	Grup H (20)
MMP-1	$r=-0.031$	$r=-0.023$
MMP-3	$r=-0.018$	$r=-0.055$
MMP-9	$r=-0.031$	$r=-0.047$
TIMP-1	$r=-0.010$	$r=-0.003$
Dejenerasyon	$r=-0.030$	$r=-0.051$
Thompson		$r=0.014$

5. TARTIŞMA

Disk dejenerasyonunun histolojik ve makroskobik aşamaları belirlenmiş olsa da, dejenerasyonun altta yatan mekanizmaları halen net olarak ortaya koyulamamıştır. Literatürde lomber disk dejenerasyonu ile ilgili yapılmış birçok çalışma olmasına karşın, servikal disklerin konu alındığı çalışma sayısı oldukça azdır. Mekanik yüklenme ve omurganın biyomekanik özelliklerinin, disk dejenerasyonunun etyolojisinde rol oynadığı bilinmektedir. Servikal ve lomber bölgenin mekanik özelliklerindeki farklılıklar düşünüldüğünde, disk dejenerasyonu etyolojisinde bölgesel farklılıklar olup olmadığı sorusu gündeme gelmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda, disk dejenerasyonunun majör histopatolojik olaylarının, kollajen ağın yıkılması ve bunun yerine hyalen kollajen liflerle dolması ve fissürler oluşması olduğu gösterilmiştir (15;136). Ayrıca Nerlich ve arkadaşları, disk içerisindeki kondrositlerin proliferasyonunun, yırtık ve yarıkların oluşmasının ve hem mukoid hem granüler matriks dejenerasyonunun yaşlanma ve disk dejenerasyonu ile istatistiksel olarak ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

Literatürde disk dejenerasyonu sınıflamasında çeşitli klasifikasyon metodları kullanılmıştır (137). Biz çalışmamızda, disk dejenerasyonunun sınıflamasında, Boos ve arkadaşlarının lomber disklerde tanımladığı histolojik dejenerasyon sınıflamasını kullandık (135). Literatürde bu sınıflama servikal diskler için kullanılmamış olsa da kriterleri genel IVD özellikleri ile uyumludur. (Hücre dansitesi, yapısal değişiklikler, granüler değişiklikler, müköz dejenerasyon). Çalışmamızda hasta seçiminde ise MRG dejenerasyon sınıflaması için Thompson gradelemesi kullanıldı. Thompson gradelemesi lomber diskler için tarif edilmiş bir MRG dejenerasyon derecelendirmesidir (134) ve literatürde lomber disk dejenerasyonu, MRG sınıflaması için kullanılmıştır (138;139). Literatürde servikal disklerde kullanıldığı bir çalışmaya rastlayamadık ve çalışmamızda, kriterlerinin servikal diskler için de geçerli olduğunu düşünerek, ilk kez servikal disk dejenerasyonunda Thompson gradelemesini kullandık. Sonuçta literatürde ilk kez, her ikisi de lomber disklerde tarif edilmiş olan, Boos'un disk dejenerasyon sınıflaması ve Thompson gradelemesini servikal dejenerasyonda kullanarak, histolojik dejenerasyon ile radyolojik dejenerasyon arasında anlamlı bir ilişki saptadık. Bu nedenle Thompson sınıflamasının servikal disk dejenerasyonu için de kullanılabileceğini düşünüyoruz.

IVD içinde, NP majör olarak Tip-2 kollajen (Kollajen Tip 6, 9, 11 ile birlikte), AF ise büyük oranda Tip-1 kollajenden (Tip 3, 5, 6 ile birlikte) oluşmaktadır. Bu kollajenlerin yapısı ve birbirleriyle olan ilişkileri diskin mekanik fonksiyonunda hayati rol oynar. Bu kollajen molekülleri başta MMP'ler olmak üzere sadece spesifik enzimler tarafından yıkılabilirler. MMP'ler kollajen moleküllerinin katabolizmasındaki ana enzimlerdir. MMP'ler de kendi substrat spesifitelerine göre farklılıklar gösterirler.

MMP ailesi, diskin bilinen tüm matriks komponentlerini degrade edebilir. MMP'lerin diğer kıkırdak dokularda, normal ESM remodelinginden sorumlu olduğu bilinmektedir. Çalışmamızdaki hem patolojik hem normal kontrol grubunda olmak üzere tüm spesimenlerde MMP'nin varlığı, aynı sürecin IVD için de geçerli olduğunu düşündürmektedir. Patolojik örneklerde MMP'lerin anlamlı düzeyde yüksek bulunması, MMP'lerin ayrıca hastalıkta da farklı rolleri olduğunu düşündürmektedir. MMP'lerin aktivasyonu doku GAG içeriğinin %80 kaybına ve kollajen çatının ciddi denatürasyonuna neden olmaktadır (140).

Dejenerasyonun yaş ile arttığını gösteren çalışmalar olmasına karşın, yaş ve dejenerasyon ile MMP düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki olduğunu ilk kez Weiler ve arkadaşları ortaya koymuştur (141). Bu çalışmada infantil, juvenil, genç erişkin gibi tüm yaş gruplarında düzenli bir örnekleme yapılmıştır. Biz, çalışmamızda MMP düzeyleri ile dejenerasyon ve yaş arasında anlamlı bir ilişki bulamadık. Bunun nedeninin yenidoğandan erişkine kadar düzenli bir yaş grubu kullanmamış olmamızdan kaynaklandığını düşünüyoruz. Çalışmamızın amacı doğrultusunda gruplarımız sadece erişkin yaş grubu olgulardan oluşmaktaydı ve yenidoğan, çocuk, genç erişkin, erişkin gibi geniş bir yaş grubu yelpazesi oluşturarak, dengeli bir dağılımla, yaş-MMP ilişkisini araştırma amacı gütmedik.

Dejenere olmuş diskler, normal disklerden daha vaskülerdir ve vasküler yapıların MMP üretebildiği bilinmektedir (142). İmmünohistokimya her ne kadar kısıtlı bilgi sağlasa da, disk hücrelerinin vasküler hücrelere oranı, MMP'lerin çoğunun disk hücrelerince üretildiğini işaret etmektedir (143).

Herniye disklerdeki yüksek MMP düzeyi, disk hernilerinin doğal seyrinde tamirden sorumlu görünmektedir. Maigne J-Y yaptığı çalışmada, eğer yeterince uzun süre beklenirse herniye olmuş disklerin resorbe olduğunu belirtmiştir (144). Aynı şekilde Saal yaptığı

çalışmada, sekestre disklerin non-operatif tedavisi ile bir süre sonra kaybolduğunu MRG ile göstermiştir (145). MMP'ler bu noktada görev alıyor gibi görünmektedir. Hatta dejenere disklerdeki yükseklik kaybı bu sürecin (MMP yıkımı) bir sonucu olabilir.

Kollajenazlar (MMP 1-8-13), intakt interstisyel kollajen moleküllerini yıkabilen tek enzim grubudur. Jelatinazlar (MMP 2-9), denatüre olmuş kollajenleri ve bazal membran kollajenlerini yıkarlar. Stromelizinler (MMP-3-10-11) nonkollajen matriks proteinlerini ve denatüre kollajen moleküllerini yıkarlar. MMP-14-16-17-18 membranöz tip MMP'ler olarak bilinirler diğer MMP'lerin aktivasyonundan sorumludurlar. Matriks yıkımında sekonder bir rolleri vardır.

MMP-1, ilk grubun en etkili üyesidir ve majör olarak fibroblastlar, kondrositler, histiyosit ve makrofaj içerisinde yer alırlar. MMP-1, MMP-8 ve MMP-13 ile birlikte, fibriler kollajenler olan Tip-1-2-3 kollajenlerin helikal bölgesini yıkan kollajenazlar subgrubuna aittir. Bu 3 tip kollajen IVD'nin kollajen yapısının büyük kısmını oluşturur. Bu grupta özellikle nukleusun predominant kollajeni olan kollajen tip-2 olmak üzere kollajenlerin triple heliks yapısını yıkarlar. En potent üyeleri MMP-13'dür. Weiler, Roberts, Doita, dejenere lomber disklerde MMP-1 düzeyindeki artışı göstermişlerdir (4;141;146). Lyn Le Maitre, Roberts'ın çalışmasına uyumlu olacak şekilde, MMP-1'in dejenere IVD'de en büyük oranda bulunan MMP olduğunu belirtmiştir. Ayrıca MMP-1'in özellikle tip-3 kollajenin yoğun olduğu bölgelerde bol miktarda bulunduğunu ve bu nedenle özellikle Tip-3 kollajenin yıkımından sorumlu olduğunu bildirmiştir (147). Bizim çalışmamızda da bu bulgularla uyumlu olarak MMP-1 düzeyi hasta grubunda anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.

MMP-9, temel olarak bazal membran kollajeninin yıkımından sorumlu olmakla birlikte, MMP-1'in yıkımını takiben oluşan interstisyel kollajen gibi denatüre olmuş kollajenleri degrade eder. Robert's ve Weiler yaptıkları çalışmalarda dejenere lomber disklerde MMP-9 varlığı ve artışını ortaya koymuşlardır (4;141). Bizim çalışmamızdaki sonuçlar da literatür ile uyumlu olarak dejenere servikal disklerde de MMP-9 düzeyinin arttığını göstermektedir.

Yapılan çalışmalarda *TIMP-1*'in MMP inhibisyonu, büyüme faktörü etkisi ve antiapoptotik fonksiyonu gibi birden çok görevi olduğu saptanmıştır. Ayrıca Gaudin *TIMP-1*'in MMP-

9'un güçlü bir inhibitörü olduğunu göstermiştir (148). Birçok çalışma diğer kıkırdak dokularda MMP ve TIMP'lerin dengesinin bozulduğunu göstermiştir (96;149;150). Ayrıca Lyn Le Maitre dejenerasyon arttıkça TIMP-1 düzeyinde artış olduğunu, Roberts, Kanemoto ve Doita da yaptıkları çalışmalarla dejenerasyonda TIMP-1 düzeylerinin arttığını göstermişlerdir (4;139;146). Çalışmamızda da TIMP-1 düzeyi hasta grubunda belirgin olarak yüksek bulunmuştur. Kontrol grubunda ise var olmakla birlikte oldukça düşük düzeydedir. Diğer çalışmalarda da MMP'lerin doku inhibitörlerinin, degradatif enzimlere paralel olarak sentezlendiği ve bunların içinde de en yüksek oranda TIMP-1'lerin görüldüğü belirtilmiştir. Bizim çalışmamız da bu bulguyu desteklemektedir (95;151).

Bir stromelizin olan *MMP-3*, kollajenazları ve *MMP-7*'yi (Matrilizin) aktive ettiği gibi makrofajları da bölgeye çeker ve bu yolla diğer MMP'leri de indükler (4). Proteoglikanlar gibi non-kollajenaz proteinleri yıkan *MMP-3*, denatüre olmuş kollajen moleküllerini de yıkmaya yeteneğine sahiptir. Bu nedenle bu enzim, kollajen fibriller arasındaki intermoleküler ağı yıkabilir. Belki de tek bir enzimin üretiminin başlaması ile katabolik bir kaskad harekete geçiyor olabilir.

Nemoto ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda, prolabe olmuş disklerde %90, normal disklerde %57 oranında *MMP-3* varlığını göstermişlerdir (152). *MMP-3*'ün asıl olarak hafifçe dejenere diskler tarafından üretildiğini belirtmişlerdir. Biz, çalışmamızda *MMP-3* düzeyini hasta ve kontrol dokularında hemen hemen eşit düzeyde saptadık. Bunun bir nedeni, Nemoto'nun belirttiği gibi, *MMP-3*'ün hafifçe veya orta derecede dejenere disklerce üretilmesi olabilir zira biz çalışmamıza sadece Thompson 3-4-5 olan hastaları, başka bir deyişle ileri derecede dejenere diskleri dahil ettik. Hem kontrol hem hasta gruplarında var olmakla birlikte, *MMP-3*'ün eşit düzeyde olması, *MMP-3*'ün dejenerasyonun başlangıç aşamalarında yükselerek bir pik yaptığını ve dejenerasyon ilerledikçe azaldığını düşündürebilir. Literatürde *MMP* düzeylerinin zamansal ilişkisini konu alan bir çalışmaya rastlayamadık. Her ne kadar bu çalışmada değişik dejenerasyon safhalarındaki *MMP-3* düzeylerini karşılaştırma şansımız olmasa da, *MMP-3* düzeylerinin zamana bağımlı bir değişkenliği söz konusu olabilir diye düşünüyoruz. Zira Freemont ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, dejenere eklem kıkırdağında MMP'lerin ekspresyonunda kronolojik bir seyir olabileceği belirtilmiştir. Örneğin *MMP-9*'un bifazik

bir ekspresyonu olduğunu, osteoartritin erken safhalarında tek hücrelerde ve geç dönem osteoartritde hücre artıklarında en yüksek düzeyde saptandığı belirtilmiştir (153). MMP-3'e spesifik bir çalışma olmasa da IVD'de de benzer bir zamansal değişiklik sözkonusu olabilir. Kang ve arkadaşlarının, lomber ve servikal disklerde yaptıkları iki ayrı çalışmada da MMP-1 ile ilgili benzer bir sonuca ulaşılmıştır (103;154). Dejenere disklerde stromelizin ve jelatinazlar artarken MMP-1'in de içinde olduğu kollajenazlar grubunda anlamlı bir yükselme olmadığı belirtilmiştir. Bu sonuç literatürdeki birçok çalışma ile uyumsuzluk göstermektedir. Sonuçta MMP-3'e özel olmamakla birlikte tüm MMP'lerde zamana bağlı dalgalanmalar sözkonusu olabilir. Bunun için ileri çalışmalara ihtiyaç var gibi gözükmektedir (155).

Matriks metalloproteinazlar inaktif zimojenler olarak salınırlar ve işlevsel olmaları için enzimatik aktivasyona ihtiyaç duyarlar (45). Yani enzimin yüksek düzeylerde saptanması yüksek katalitik aktivite gösterdiği anlamına gelmez. Bizim çalışmamızda da kullandığımız, sadece enzimin varlığını gösteren antikorlar, enzimin aktif formu ile inaktif formunu ayırtedemez. Çalışmamızın handikapı olarak sayabileceğimiz bu durum, kontrol grubu ile anlamlı farklılık göstermeyen MMP-3 düzeylerinin işlevi hakkında yorum yapmamızı kısıtlamaktadır. Bu nedenle çalışmamızın sonucunda, MMP-3'ün aktif olan kısmının oranını bilemediğimiz için, servikal disk dejenerasyonunda MMP-3'ün rolü olmadığı gibi bir sonuç çıkarılması yanlış olacaktır. Böyle bir yorum yapabilmek için Weiler ve arkadaşlarının kullandığı in situ zimografi gibi yöntemlerin kullanıldığı ileri çalışmalara ihtiyaç vardır (141).

Bu bilgiler, sözkonusu enzimlerin varlığı veya aktivitesinin, bağ dokuların kompozisyonu ve bütünlüğünü etkilediğini göstermektedir. Bugüne kadar IVD'deki kollajenolitik enzimlerin varlığı ve aktivitesini gösteren sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır ve çoğunda biyokimyasal yöntemler kullanılmıştır. Crean, Goupille, Kang, Liu, Matsui, Furusawa, Kanemoto, Weiler, Doita disk materyalinde artmış MMP düzeylerini göstermişlerdir (5;45;100;103;139;141;143;146;156-159). Ancak bu çalışmalarda Furusawa ve Kang'ın çalışmaları dışındakiler hep lomber diskler üzerinde gerçekleştirilmiştir.

MMP'lerin artmış üretiminin birkaç hipotetik açıklaması olabilir. Birincisi; dejenere olan disk materyali, artan bir oranda matriks yıkıcı enzimler ve sitokinler salgılıyor ve bunun sonucunda herniasyonlara zemin hazırlıyor olabilir. Nitekim Yamagishi, dejenere disk

hücrelerinin IL-1 ve IL-6 ürettiğini belirtmiştir (160). Karşıt görüş olarak bu biyokimyasal ajanlar ve enzimler herniye olmuş disk materyali tarafından salgılanıyor olabilir. Yani bir şekilde disk hernisi kendisi bu ajanları stimüle ediyor olabilir. Bir üçüncü açıklama da bu her iki olasılığın ikisinin de sözkonusu olmasıdır. Dejenere olan disk hücrelerinin, normal matriks metabolizmasında görev alan MMP ve sitokinlerin üretiminin artmasıyla, kimyasal yapısının bozulması ve bunun sonucunda yine bu ajanların üretimini stimüle eden disk hernisi oluşması şeklinde kısır döngü sözkonusu olabilir.

Bu ve benzeri çalışmalarla, bu döngünün basamakları tam olarak ortaya koyulduğunda disk dejenerasyonu ve hernisi tedavisinde önemli gelişmeler sağlanacağı bir gerçektir. Ancak halen disk dejenerasyonunun mekanizmasının daha iyi anlaşılması için birçok çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız, Thompson dejenerasyon skorlamasının servikal disklerde kullanıldığı ve histolojik dejenerasyon ile anlamlı ilişkisinin gösterildiği ilk çalışmadır. Çalışmamızdaki sonuçlar ışığında servikal disk dejenerasyonunda MMP'lerin lomber disk dejenerasyonu ile benzer özellikler ve etkiler gösterdiğini düşünüyoruz. Ancak MMP'lerin üretimindeki zamansal değişiklikler ve varlığı gösterilen enzimlerin aktiviteleri ve hatta servikal-lomber gibi bölgesel farklılıkların karşılaştırıldığı daha ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Bu ve benzeri çalışmalar, sadece yeni tedavi şekillerinin gelişmesinde değil ayrıca degradatif kaskadın durdurulması hatta gelişmekte olan biyolojik tamir stratejilerinin geliştirilmesi açısından da önemlidir. Hangi enzimlerin ve hangi inhibitörlerinin ne şekilde ve hangi hücrelerce sentezlendiğinin belirlenmesiyle, gelecekteki gen terapisine hedef mekanizmalar ortaya koyulabilecektir. Nitekim disk dejenerasyonu tedavisinde gelecek vaat eden genetik çalışmalar başlamıştır. Ayrıca, disk dejenerasyonunun önlenmesi amacıyla MMP üretimini inhibe edebilen birçok madde üzerinde çalışılmaktadır (45). MMP inhibitörleri ile ilgili çalışmalar osteoartrit ile başlamıştır. Benzer uygulamalar disk dejenerasyonu ile uyumlu olabilir. Bunun yanında disk dejenerasyonunun kontrolünde, sinir lezyonlarının sınırlandırılması ve dolayısıyla disk hernisine bağlı ağrının kontrolünde sitokin antagonistleri kullanılabilir. Bu anti TNF- α ajanlar amaca uygun ajanlar gibi görünmektedir. Yabuki ve arkadaşları non-spesifik bir TNF- α ajanın (Pentoksifilin) hayvanlarda sinir kökü lezyonu ve intranöronal ödemi azalttığını göstermiştir (161). Doku yıkımının moleküler mekanizmaları ile ilgili bilgimiz arttıkça intradiskal ağrı tedavisi, gen tedavisi gibi yeni tedavi şekilleri sözkonusu olabilecektir. Ancak halen MMP sentezi ve aktivasyonu ile ilgili moleküler olaylar hakkında daha ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

- (1) Weinstein P, Ehni G, Wilson C. Lumbar Spondylosis:Diagnosis, management and surgical treatment. Chicago,Year Book Medical 1977.
- (2) Antoniou J, Steffen T, Nelson F, Winterbottom N, Hollander AP, Poole RA, Aebi M, Alini M. The human lumbar intervertebral disc: evidence for changes in the biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing, and degeneration. J Clin Invest 1996 Aug 15;98(4):996-1003.
- (3) Pearce RH, Grimmer BJ, Adams ME. Degeneration and the chemical composition of the human lumbar intervertebral disc. J Orthop Res 1987;5(2):198-205.
- (4) Roberts S, Caterson B, Menage J, Evans EH, Jaffray DC, Eisenstein SM. Matrix metalloproteinases and aggrecanase: their role in disorders of the human intervertebral disc. Spine 2000 Dec 1;25(23):3005-13.
- (5) James D.Kang, MD, Helga I.Georgesc, Lori McIntyre-Larkin, Maja Stefanovic-Racic MD, Cristopher H.Evans PhD. Herniated Cervical Intervertebral Disc Spontaneously Produce Matrix Metalloproteinases, Nitric Oxide, Interleukin-6, and Prostaglandin E2. Spine 1995;20(22):2373-8.
- (6) Anatomy and pathophysiology of acquired spinal lesions. In: Edward C.Benzel, editor. Spine Surgery Techniques,Complication Avoidance,and Management. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier; 2005. p. 88-99.
- (7) In: Ehni B, Ehni G, Patterson RH, editors. Youmans Neurological Surgery. 3rd ed. New York: W.B.Saunders; 1990. p. 2878-917.
- (8) Sanan A, Rengachary SS. The history of spinal biomechanics. Neurosurgery 1996;39:657-68.

- (9) Hargadine JR. Intraoperative Monitoring of Sensory Evoked Potentials. In: In Rand RW, editor. *Microneurosurgery*. 3rd ed. St. Louis: C.V.Mosby; 1985. p. 92-110.
- (10) Fager CA. Rationale and Techniques of Posterior Approaches to Cervical Disk Lesions and Spondylosis. *Surg clin North Am* 1986;**56**:581-92.
- (11) Silberberg R, Aufdermayr M, Adler JH. Degeneration of the intervertebral disks and spondylosis in aging sand rats. *Arch Pathol Med* 1979;**103**:231-5.
- (12) Lipson SJ, Muir H. Vertebral osteophyte formation in experimental disc degeneration. Morphologic and proteoglycan changes over time. *Arthritis Rheum* 1980 Mar;**23**(3):319-24.
- (13) Moskowitz RW, Ziv I, Denko CW, Boja B, Jones PK, Adler JH. Spondylosis in sand rats: a model of intervertebral disc degeneration and hyperostosis. *J Orthop Res* 1990 May;**8**(3):401-11.
- (14) Sether LA, Nguyen C, Yu S. Canine intervertebral disc: Correlation anatomy and MR. *Radiology* 1990;**175**:207-11.
- (15) Buckwalter JA. Aging and degeneration of the human intervertebral disc. *Spine* 1995 Jun 1;**20**(11):1307-14.
- (16) Olczyk K. Age-related changes in proteoglycans of human intervertebral disc. *Zeitschrift Für Rheumatologie* 1994;**53**(1):19-25.
- (17) Nerlich AG, Schleicher ED, Boos N. 1997 Volvo Award winner in basic science studies. Immunohistologic markers for age-related changes of human lumbar intervertebral discs. *Spine* 1997 Dec 15;**22**(24):2781-95.
- (18) Nerlich AG, Boos N, Wiest I, Aebi M. Immunolocalization of major interstitial collagen types in human lumbar intervertebral discs of various ages. *Virchows Arch* 1998 Jan;**432**(1):67-76.

- (19) Kawaguchi Y, Osada R, Kanamori M, Ishihara H, Ohmori K, Matsui H, Kimura T. Association between an aggrecan gene polymorphism and lumbar disc degeneration. *Spine* 1999 Dec 1;24(23):2456-60.
- (20) Holm S, Maroudas A, Urban JP, Selstam G, Nachemson A. Nutrition of the intervertebral disc: solute transport and metabolism. *Connect Tissue Res* 1981;8(2):101-19.
- (21) Maroudas A, Stockwell RA, Nachemson A, Urban J. Factors involved in the nutrition of the human lumbar intervertebral disc: cellularity and diffusion of glucose in vitro. *J Anat* 1975 Sep;120(Pt 1):113-30.
- (22) Holmes AD, Hukins DW, Freemont AJ. End-plate displacement during compression of lumbar vertebra-disc-vertebra segments and the mechanism of failure. *Spine* 1993 Jan;18(1):128-35.
- (23) Eyre DR, Muir H. Types I and II collagens in intervertebral disc. Interchanging radial distributions in annulus fibrosus. *Biochem J* 1976 Jul 1;157(1):267-70.
- (24) Roughley PJ, Alini M, Antoniou J. The role of proteoglycans in aging, degeneration and repair of the intervertebral disc. *Biochem Soc Trans* 2002 Nov;30(Pt 6):869-74.
- (25) Roberts S, Urban JP, Evans H, Eisenstein SM. Transport properties of the human cartilage endplate in relation to its composition and calcification. *Spine* 1996 Feb 15;21(4):415-20.
- (26) Cumming GJ, Handley CJ, Preston BN. Permeability of composite chondrocyte-culture-millipore membranes to solutes of varying size and shape. *Biochem J* 1979 Aug 1;181(2):257-66.
- (27) Wallace AL, Wyatt BC, McCarthy ID, Hughes SP. Humoral regulation of blood flow in the vertebral endplate. *Spine* 1994 Jun 15;19(12):1324-8.

- (28) Urban JP, McMullin JF. Swelling pressure of the lumbar intervertebral discs: influence of age, spinal level, composition, and degeneration. *Spine* 1988 Feb;13(2):179-87.
- (29) Guiot BH, Fessler RG. Molecular biology of degenerative disc disease. *Neurosurgery* 2000 Nov;47(5):1034-40.
- (30) Bogduk N. The innervation of the lumbar spine. *Spine* 1983 Apr;8(3):286-93.
- (31) Meachim G, Cornah MS. Fine structure of juvenile human nucleus pulposus. *J Anat* 1970 Sep;107(Pt 2):337-50.
- (32) Kempson GE, Muir H, Pollard C, Tuke M. The tensile properties of the cartilage of human femoral condyles related to the content of collagen and glycosaminoglycans. *Biochim Biophys Acta* 1973 Feb 28;297(2):456-72.
- (33) Schmidt MB, Mow VC, Chun LE, Eyre DR. Effects of proteoglycan extraction on the tensile behavior of articular cartilage. *J Orthop Res* 1990 May;8(3):353-63.
- (34) Nachemson A, Lewin T, Maroudas A, Freeman MA. In vitro diffusion of dye through the end-plates and the annulus fibrosus of human lumbar inter-vertebral discs. *Acta Orthop Scand* 1970;41(6):589-607.
- (35) Boos N, Wallin A, Gbedegbegnon T, Aebi M, Boesch C. Quantitative MR imaging of lumbar intervertebral disks and vertebral bodies: influence of diurnal water content variations. *Radiology* 1993 Aug;188(2):351-4.
- (36) Errington RJ, Puustjarvi K, White IR, Roberts S, Urban JP. Characterisation of cytoplasm-filled processes in cells of the intervertebral disc. *J Anat* 1998 Apr;192 (Pt 3):369-78.
- (37) Roberts S, Menage J, Duanne V, Wotton S, Ayad S. 1991 Volvo Award in basic sciences. Collagen types around the cells of the intervertebral disc and cartilage end plate: an immunolocalization study. *Spine* 1991 Sep;16(9):1030-8.

- (38) Postacchini F, Bellocchi M, Massobrio M. Morphologic changes in annulus fibrosus during aging. An ultrastructural study in rats. *Spine* 1984 Sep;9(6):596-603.
- (39) Urban JPG, Roberts S, Ralphs JR. The Nucleus of the Intervertebral Disc from Development to Degeneration. *American Zoology* 2000;40:53-61.
- (40) Thompson JP, Oegema TR, Jr., Bradford DS. Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth factors. *Spine* 1991 Mar;16(3):253-60.
- (41) Shinmei M, Kikuchi T, Yamagishi M, Shimomura Y. The role of interleukin-1 on proteoglycan metabolism of rabbit annulus fibrosus cells cultured in vitro. *Spine* 1988 Nov;13(11):1284-90.
- (42) Urban JP, Roberts S. Development and degeneration of the intervertebral discs. *Mol Med Today* 1995 Oct;1(7):329-35.
- (43) Eyre DR, Matsui Y, Wu JJ. Collagen polymorphisms of the intervertebral disc. *Biochem Soc Trans* 2002 Nov;30(Pt 6):844-8.
- (44) Kaapa E, Han X, Holm S, Peltonen J, Takala T, Vanharanta H. Collagen synthesis and types I, III, IV, and VI collagens in an animal model of disc degeneration. *Spine* 1995 Jan 1;20(1):59-66.
- (45) Goupille P, Jayson MI, Valat JP, Freemont AJ. Matrix metalloproteinases: the clue to intervertebral disc degeneration? *Spine* 1998 Jul 15;23(14):1612-26.
- (46) Maroudas A, Evans H. A study of ionic equilibria in cartilage. *Connect Tissue Res* 1974;1(1):69-79.
- (47) Urban JP, Maroudas A, Bayliss MT, Dillon J. Swelling pressures of proteoglycans at the concentrations found in cartilaginous tissues. *Biorheology* 1979;16(6):447-64.

- (48) Scott JE, Bosworth TR, Cribb AM, Taylor JR. The chemical morphology of age-related changes in human intervertebral disc glycosaminoglycans from cervical, thoracic and lumbar nucleus pulposus and annulus fibrosus. *J Anat* 1994 Feb;184 (Pt 1):73-82.
- (49) Lipson SJ, Muir H. 1980 Volvo award in basic science. Proteoglycans in experimental intervertebral disc degeneration. *Spine* 1981 May;6(3):194-210.
- (50) Stevens RL, Ryvar R, Robertson WR, O'Brien JP, Beard HK. Biological changes in the annulus fibrosus in patients with low-back pain. *Spine* 1982 May;7(3):223-33.
- (51) Emes JH, Pearce RH. The proteoglycans of the human intervertebral disc. *Biochem J* 1975 Mar;145(3):549-56.
- (52) Stevens RL, Ewins RJ, Revell PA, Muir H. Proteoglycans of the intervertebral disc. Homology of structure with laryngeal proteoglycans. *Biochem J* 1979 Jun 1;179(3):561-72.
- (53) Adams P, Muir H. Qualitative changes with age of proteoglycans of human lumbar discs. *Ann Rheum Dis* 1976 Aug;35(4):289-96.
- (54) DiFabio JL, Pearce RH, Caterson B, Hughes H. The heterogeneity of the non-aggregating proteoglycans of the human intervertebral disc. *Biochem J* 1987 May 15;244(1):27-33.
- (55) Donohue PJ, Jahnke MR, Blaha JD, Caterson B. Characterization of link protein(s) from human intervertebral-disc tissues. *Biochem J* 1988 May 1;251(3):739-47.
- (56) Tengblad A, Pearce RH, Grimmer BJ. Demonstration of link protein in proteoglycan aggregates from human intervertebral disc. *Biochem J* 1984 Aug 15;222(1):85-92.
- (57) Hardingham TE. The role of link-protein in the structure of cartilage proteoglycan aggregates. *Biochem J* 1979 Jan 1;177(1):237-47.

- (58) Mort JS, Caterson B, Poole AR, Roughley PJ. The origin of human cartilage proteoglycan link-protein heterogeneity and fragmentation during aging. *Biochem J* 1985 Dec 15;232(3):805-12.
- (59) Specchia N, Pagnotta A, Toesca A, Greco F. Cytokines and growth factors in the protruded intervertebral disc of the lumbar spine. *Eur Spine J* 2002 Apr;11(2):145-51.
- (60) Saal JS, Franson RC, Dobrow R, Saal JA, White AH, Goldthwaite N. High levels of inflammatory phospholipase A2 activity in lumbar disc herniations. *Spine* 1990 Jul;15(7):674-8.
- (61) Takahashi H, Suguro T, Okazima Y, Motegi M, Okada Y, Kakiuchi T. Inflammatory cytokines in the herniated disc of the lumbar spine. *Spine* 1996 Jan 15;21(2):218-24.
- (62) Osada R, Ohshima H, Ishihara H, Yudoh K, Sakai K, Matsui H, Tsuji H. Autocrine/paracrine mechanism of insulin-like growth factor-1 secretion, and the effect of insulin-like growth factor-1 on proteoglycan synthesis in bovine intervertebral discs. *J Orthop Res* 1996 Sep;14(5):690-9.
- (63) Nishida Y, D'Souza AL, Thonar EJ, Knudson W. Stimulation of hyaluronan metabolism by interleukin-1alpha in human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 2000 Jun;43(6):1315-26.
- (64) van den Berg WB. The role of cytokines and growth factors in cartilage destruction in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol* 1999 Jun;58(3):136-41.
- (65) Takae R, Matsunaga S, Origuchi N, Yamamoto T, Morimoto N, Suzuki S, Sakou T. Immunolocalization of bone morphogenetic protein and its receptors in degeneration of intervertebral disc. *Spine* 1999 Jul 15;24(14):1397-401.

- (66) Rannou F, Corvol MT, Hudry C, Anract P, Dumontier MF, Tsagris L, Revel M, Poiraudreau S. Sensitivity of anulus fibrosus cells to interleukin 1 beta. Comparison with articular chondrocytes. *Spine* 2000 Jan;25(1):17-23.
- (67) Igarashi T, Kikuchi S, Shubayev V, Myers RR. 2000 Volvo Award winner in basic science studies: Exogenous tumor necrosis factor-alpha mimics nucleus pulposus-induced neuropathology. Molecular, histologic, and behavioral comparisons in rats. *Spine* 2000 Dec 1;25(23):2975-80.
- (68) Haro H, Shinomiya K, Komori H, Okawa A, Saito I, Miyasaka N, Furuya K. Upregulated expression of chemokines in herniated nucleus pulposus resorption. *Spine* 1996 Jul 15;21(14):1647-52.
- (69) Haro H, Murakami S, Komori H, Okawa A, Shinomiya K. Chemonucleolysis with human stromelysin-1. *Spine* 1997 May 15;22(10):1098-104.
- (70) Gruber HE, Norton HJ, Hanley EN, Jr. Anti-apoptotic effects of IGF-1 and PDGF on human intervertebral disc cells in vitro. *Spine* 2000 Sep 1;25(17):2153-7.
- (71) Schoenle E, Zapf J, Humbel RE, Froesch ER. Insulin-like growth factor I stimulates growth in hypophysectomized rats. *Nature* 1982 Mar 18;296(5854):252-3.
- (72) Pattison ST, Melrose J, Ghosh P, Taylor TK. Regulation of gelatinase-A (MMP-2) production by ovine intervertebral disc nucleus pulposus cells grown in alginate bead culture by Transforming Growth Factor-beta(1) and insulin like growth factor-I. *Cell Biol Int* 2001;25(7):679-89.
- (73) Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta. *J Exp Med* 1987 Jan 1;165(1):251-6.

- (74) Silacci P, Dayer JM, Desgeorges A, Peter R, Manueddu C, Guerne PA. Interleukin (IL)-6 and its soluble receptor induce TIMP-1 expression in synoviocytes and chondrocytes, and block IL-1-induced collagenolytic activity. *J Biol Chem* 1998 May 29;273(22):13625-9.
- (75) Doita M, Kanatani T, Harada T, Mizuno K. Immunohistologic study of the ruptured intervertebral disc of the lumbar spine. *Spine* 1996 Jan 15;21(2):235-41.
- (76) Tolonen J, Gronblad M, Virri J, Seitsalo S, Rytomaa T, Karaharju E. Basic fibroblast growth factor immunoreactivity in blood vessels and cells of disc herniations. *Spine* 1995 Feb 1;20(3):271-6.
- (77) Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4(2):197-250.
- (78) Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997 Mar;378(3-4):151-60.
- (79) Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999 Jul 30;274(31):21491-4.
- (80) Clark IM, Cawston TE. Fragments of human fibroblast collagenase. Purification and characterization. *Biochem J* 1989 Oct 1;263(1):201-6.
- (81) Hirose T, Patterson C, Pourmotabbed T, Mainardi CL, Hasty KA. Structure-function relationship of human neutrophil collagenase: identification of regions responsible for substrate specificity and general proteinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Apr 1;90(7):2569-73.
- (82) Knauper V, Osthues A, DeClerck YA, Langley KE, Blaser J, Tschesche H. Fragmentation of human polymorphonuclear-leucocyte collagenase. *Biochem J* 1993 May 1;291 (Pt 3):847-54.

- (83) Murphy G, Allan JA, Willenbrock F, Cockett MI, O'Connell JP, Docherty AJ. The role of the C-terminal domain in collagenase and stromelysin specificity. *J Biol Chem* 1992 May 15;267(14):9612-8.
- (84) Sanchez-Lopez R, Nicholson R, Gesnel MC, Matrisian LM, Breathnach R. Structure-function relationships in the collagenase family member transin. *J Biol Chem* 1988 Aug 25;263(24):11892-9.
- (85) Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Jul;87(14):5578-82.
- (86) Harris ED, Jr., Welgus HG, Krane SM. Regulation of the mammalian collagenases. *Coll Relat Res* 1984 Dec;4(6):493-512.
- (87) Welgus HG, Kobayashi DK, Jeffrey JJ. The collagen substrate specificity of rat uterus collagenase. *J Biol Chem* 1983 Dec 10;258(23):14162-5.
- (88) Knauper V, Lopez-Otin C, Smith B, KNIGHT G, Murphy G. Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* 1996 Jan 19;271(3):1544-50.
- (89) Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Seltzer JL, Kronberger A, He CS, Bauer EA, Goldberg GI. H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. *J Biol Chem* 1988 May 15;263(14):6579-87.
- (90) Fessler LI, Duncan KG, Fessler JH, Salo T, Tryggvason K. Characterization of the procollagen IV cleavage products produced by a specific tumor collagenase. *J Biol Chem* 1984 Aug 10;259(15):9783-9.
- (91) Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 1990 Apr;6(4):121-5.

- (92) Murphy GJ, Murphy G, Reynolds JJ. The origin of matrix metalloproteinases and their familial relationships. *FEBS Lett* 1991 Sep 2;289(1):4-7.
- (93) Clark SD, Kobayashi DK, Welgus HG. Regulation of the expression of tissue inhibitor of metalloproteinases and collagenase by retinoids and glucocorticoids in human fibroblasts. *J Clin Invest* 1987 Nov;80(5):1280-8.
- (94) Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, Whitham SE, Docherty AJ, Angel P, Heath JK. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J* 1987 Jul;6(7):1899-904.
- (95) Murphy G, Reynolds JJ, Werb Z. Biosynthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases by human fibroblasts in culture. Stimulation by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate and interleukin 1 in parallel with collagenase. *J Biol Chem* 1985 Mar 10;260(5):3079-83.
- (96) Martel-Pelletier J, McCollum R, Fujimoto N, Obata K, Cloutier JM, Pelletier JP. Excess of metalloproteinases over tissue inhibitor of metalloproteinase may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Lab Invest* 1994 Jun;70(6):807-15.
- (97) Bernick S, Walker JM, Paule WJ. Age changes to the annulus fibrosus in human intervertebral discs. *Spine* 1991 May;16(5):520-4.
- (98) Marchand F, Ahmed AM. Investigation of the laminate structure of lumbar disc annulus fibrosus. *Spine* 1990 May;15(5):402-10.
- (99) Natarajan RN, Ke JH, Andersson GB. A model to study the disc degeneration process. *Spine* 1994 Feb 1;19(3):259-65.

- (100) Kang JD, Stefanovic-Racic M, McIntyre LA, Georgescu HI, Evans CH. Toward a biochemical understanding of human intervertebral disc degeneration and herniation. Contributions of nitric oxide, interleukins, prostaglandin E2, and matrix metalloproteinases. *Spine* 1997 May 15;22(10):1065-73.
- (101) Takaishi H, Nemoto O, Shiota M, Kikuchi T, Yamada H, Yamagishi M, Yabe Y. Type-II collagen gene expression is transiently upregulated in experimentally induced degeneration of rabbit intervertebral disc. *J Orthop Res* 1997 Jul;15(4):528-38.
- (102) Peng B, Hao J, Hou S, Wu W, Jiang D, Fu X, Yang Y. Possible pathogenesis of painful intervertebral disc degeneration. *Spine* 2006 Mar 1;31(5):560-6.
- (103) Kang JD, Georgescu HI, Intyre-Larkin L, Stefanovic-Racic M, Donaldson WF, III, Evans CH. Herniated lumbar intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6, and prostaglandin E2. *Spine* 1996 Feb 1;21(3):271-7.
- (104) Kurowski P, Kubo A. The relationship of degeneration of the intervertebral disc to mechanical loading conditions on lumbar vertebrae. *Spine* 1986 Sep;11(7):726-31.
- (105) Mimura M, Panjabi MM, Oxland TR, Crisco JJ, Yamamoto I, Vasavada A. Disc degeneration affects the multidirectional flexibility of the lumbar spine. *Spine* 1994 Jun 15;19(12):1371-80.
- (106) Iencean SM. Lumbar intervertebral disc herniation following experimental intradiscal pressure increase. *Acta Neurochir (Wien)* 2000;142(6):669-76.
- (107) Martin MD, Boxell CM, Malone DG. Pathophysiology of lumbar disc degeneration: a review of the literature. *Neurosurg Focus* 2002 Aug 15;13(2):E1.
- (108) Holm S. Pathophysiology of disc degeneration. *Acta Orthop Scand Suppl* 1993;251:13-5.

- (109) Battie MC, Videman T, Gibbons LE, Fisher LD, Manninen H, Gill K. 1995 Volvo Award in clinical sciences. Determinants of lumbar disc degeneration. A study relating lifetime exposures and magnetic resonance imaging findings in identical twins. *Spine* 1995 Dec 15;20(24):2601-12.
- (110) la-Kokko L. Genetic risk factors for lumbar disc disease. *Ann Med* 2002;34(1):42-7.
- (111) Chan D, Song Y, Sham P, Cheung KM. Genetics of disc degeneration. *Eur Spine J* 2006 Aug;15 Suppl 3:S317-S325.
- (112) Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, Sambrook PN, Eisman JA. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 1994 Jan 20;367(6460):284-7.
- (113) Riggs BL. Vitamin D-receptor genotypes and bone density. *N Engl J Med* 1997 Jul 10;337(2):125-6.
- (114) Videman T, Leppavuori J, Kaprio J, Battie MC, Gibbons LE, Peltonen L, Koskenvuo M. Intragenic polymorphisms of the vitamin D receptor gene associated with intervertebral disc degeneration. *Spine* 1998 Dec 1;23(23):2477-85.
- (115) Kawaguchi Y, Kanamori M, Ishihara H, Ohmori K, Matsui H, Kimura T. The association of lumbar disc disease with vitamin-D receptor gene polymorphism. *J Bone Joint Surg Am* 2002 Nov;84-A(11):2022-8.
- (116) Fernandes I, Hampson G, Cahours X, Morin P, Coureau C, Couette S, Prie D, Biber J, Murer H, Friedlander G, Silve C. Abnormal sulfate metabolism in vitamin D-deficient rats. *J Clin Invest* 1997 Nov 1;100(9):2196-203.
- (117) Annunen S, Paassilta P, Lohiniva J, Perala M, Pihlajamaa T, Karppinen J, Tervonen O, Kroger H, Lahde S, Vanharanta H, Ryhanen L, Goring HH, Ott J, Prockop DJ, la-Kokko L. An allele of COL9A2 associated with intervertebral disc disease. *Science* 1999 Jul 16;285(5426):409-12.

- (118) Jim JJ, Noponen-Hietala N, Cheung KM, Ott J, Karppinen J, Sahraravand A, Luk KD, Yip SP, Sham PC, Song YQ, Leong JC, Cheah KS, la-Kokko L, Chan D. The TRP2 allele of COL9A2 is an age-dependent risk factor for the development and severity of intervertebral disc degeneration. *Spine* 2005 Dec 15;30(24):2735-42.
- (119) Paassilta P, Lohiniva J, Goring HH, Perala M, Raina SS, Karppinen J, Hakala M, Palm T, Kroger H, Kaitila I, Vanharanta H, Ott J, la-Kokko L. Identification of a novel common genetic risk factor for lumbar disk disease. *JAMA* 2001 Apr 11;285(14):1843-9.
- (120) Grant SF, Reid DM, Blake G, Herd R, Fogelman I, Ralston SH. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene. *Nat Genet* 1996 Oct;14(2):203-5.
- (121) Pluijm SM, van Essen HW, Bravenboer N, Uitterlinden AG, Smit JH, Pols HA, Lips P. Collagen type I alpha1 Sp1 polymorphism, osteoporosis, and intervertebral disc degeneration in older men and women. *Ann Rheum Dis* 2004 Jan;63(1):71-7.
- (122) Takahashi M, Haro H, Wakabayashi Y, Kawa-uchi T, Komori H, Shinomiya K. The association of degeneration of the intervertebral disc with 5a/6a polymorphism in the promoter of the human matrix metalloproteinase-3 gene. *J Bone Joint Surg Br* 2001 May;83(4):491-5.
- (123) Yoon ST, Patel NM. Molecular therapy of the intervertebral disc. *Eur Spine J* 2006 Aug;15 Suppl 3:S379-S388.
- (124) Wallach CJ, Sobajima S, Watanabe Y, Kim JS, Georgescu HI, Robbins P, Gilbertson LG, Kang JD. Gene transfer of the catabolic inhibitor TIMP-1 increases measured proteoglycans in cells from degenerated human intervertebral discs. *Spine* 2003 Oct 15;28(20):2331-7.

- (125) Nishida K, Kang JD, Gilbertson LG, Moon SH, Suh JK, Vogt MT, Robbins PD, Evans CH. Modulation of the biologic activity of the rabbit intervertebral disc by gene therapy: an in vivo study of adenovirus-mediated transfer of the human transforming growth factor beta 1 encoding gene. *Spine* 1999 Dec 1;24(23):2419-25.
- (126) Walsh AJ, Bradford DS, Lotz JC. In vivo growth factor treatment of degenerated intervertebral discs. *Spine* 2004 Jan 15;29(2):156-63.
- (127) Tim YS, Su KK, Li J, Soo PJ, Akamaru T, Elmer WA, Hutton WC. The effect of bone morphogenetic protein-2 on rat intervertebral disc cells in vitro. *Spine* 2003 Aug 15;28(16):1773-80.
- (128) Masuda K, Takegami K, An H, Kumano F, Chiba K, Andersson GB, Schmid T, Thonar E. Recombinant osteogenic protein-1 upregulates extracellular matrix metabolism by rabbit annulus fibrosus and nucleus pulposus cells cultured in alginate beads. *J Orthop Res* 2003 Sep;21(5):922-30.
- (129) An HS, Takegami K, Kamada H, Nguyen CM, Thonar EJ, Singh K, Andersson GB, Masuda K. Intradiscal administration of osteogenic protein-1 increases intervertebral disc height and proteoglycan content in the nucleus pulposus in normal adolescent rabbits. *Spine* 2005 Jan 1;30(1):25-31.
- (130) Li J, Kim KS, Park JS, Elmer WA, Hutton WC, Yoon ST. BMP-2 and CDMP-2: stimulation of chondrocyte production of proteoglycan. *J Orthop Sci* 2003;8(6):829-35.
- (131) Nohe A, Keating E, Knaus P, Petersen NO. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal* 2004 Mar;16(3):291-9.
- (132) Hatakeyama Y, Nguyen J, Wang X, Nuckolls GH, Shum L. Smad signaling in mesenchymal and chondroprogenitor cells. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A Suppl 3:13-8.

- (133) Li Y, Tew SR, Russell AM, Gonzalez KR, Hardingham TE, Hawkins RE. Transduction of passaged human articular chondrocytes with adenoviral, retroviral, and lentiviral vectors and the effects of enhanced expression of SOX9. *Tissue Eng* 2004 Mar;10(3-4):575-84.

- (134) Eyre DR, Benya P, Buckwalter J, Frymoyer JW, Gordon SL. Intervertebral Disc:Part B.Basic Science Perspectives. In:New Perspectives in Low Back Pain.Park Ridge,IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 1989. p. 147-207.

- (135) Boos N, Weissbach S, Rohrbach H, Weiler C, Spratt KF, Nerlich AG. Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs: 2002 Volvo Award in basic science. *Spine* 2002 Dec 1;27(23):2631-44.

- (136) Buckwalter JA, Roughley PJ, Rosenberg LC. Age-related changes in cartilage proteoglycans: quantitative electron microscopic studies. *Microsc Res Tech* 1994 Aug 1;28(5):398-408.

- (137) Sive JJ, Baird P, Jeziorski M, Watkins A, Hoyland JA, Freemont AJ. Expression of chondrocyte markers by cells of normal and degenerate intervertebral discs. *Mol Pathol* 2002 Apr;55(2):91-7.

- (138) Gruber HE, Ingram JA, Hanley EN, Jr. Immunolocalization of MMP-13 in the human intervertebral disc: implications for disc aging and degeneration. *Biotech Histochem* 2005 May;80(3-4):157-62.

- (139) Kanemoto M, Hukuda S, Komiya Y, Katsuura A, Nishioka J. Immunohistochemical study of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 human intervertebral discs. *Spine* 1996 Jan 1;21(1):1-8.

- (140) Bonassar LJ, Stinn JL, Paguio CG, Frank EH, Moore VL, Lark MW, Sandy JD, Hollander AP, Poole AR, Grodzinsky AJ. Activation and inhibition of endogenous matrix metalloproteinases in articular cartilage: effects on composition and biophysical properties. *Arch Biochem Biophys* 1996 Sep 15;333(2):359-67.
- (141) Weiler C, Nerlich AG, Zipperer J, Bachmeier BE, Boos N. 2002 SSE Award Competition in Basic Science: expression of major matrix metalloproteinases is associated with intervertebral disc degradation and resorption. *Eur Spine J* 2002 Aug;11(4):308-20.
- (142) Kauppila LI. Ingrowth of blood vessels in disc degeneration. Angiographic and histological studies of cadaveric spines. *J Bone Joint Surg Am* 1995 Jan;77(1):26-31.
- (143) Crean JK, Roberts S, Jaffray DC, Eisenstein SM, Duance VC. Matrix metalloproteinases in the human intervertebral disc: role in disc degeneration and scoliosis. *Spine* 1997 Dec 15;22(24):2877-84.
- (144) Maigne JY, Rime B, Deligne B. Computed tomographic follow-up study of forty-eight cases of nonoperatively treated lumbar intervertebral disc herniation. *Spine* 1992 Sep;17(9):1071-4.
- (145) Saal JA, Saal JS, Herzog RJ. The natural history of lumbar intervertebral disc extrusions treated nonoperatively. *Spine* 1990 Jul;15(7):683-6.
- (146) Doita M, Kanatani T, Ozaki T, Matsui N, Kurosaka M, Yoshiya S. Influence of macrophage infiltration of herniated disc tissue on the production of matrix metalloproteinases leading to disc resorption. *Spine* 2001 Jul 15;26(14):1522-7.
- (147) Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. Localization of degradative enzymes and their inhibitors in the degenerate human intervertebral disc. *J Pathol* 2004 Sep;204(1):47-54.

- (148) Gaudin P, Trocme C, Berthier S, Kieffer S, Boutonnat J, Lamy C, Surla A, Garin J, Morel F. TIMP-1/MMP-9 imbalance in an EBV-immortalized B lymphocyte cellular model: evidence for TIMP-1 multifunctional properties. *Biochim Biophys Acta* 2000 Dec 11;1499(1-2):19-33.
- (149) Nakagawa T, Kubota T, Kabuto M, Sato K, Kawano H, Hayakawa T, Okada Y. Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by human brain tumors. *J Neurosurg* 1994 Jul;81(1):69-77.
- (150) Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Howell DS, Woessner JF, Jr. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1989 Aug;84(2):678-85.
- (151) Walter H, Kawashima A, Nebelung W, Neumann W, Roessner A. Immunohistochemical analysis of several proteolytic enzymes as parameters of cartilage degradation. *Pathol Res Pract* 1998;194(2):73-81.
- (152) Nemoto O, Yamagishi M, Yamada H, Kikuchi T, Takaishi H. Matrix metalloproteinase-3 production by human degenerated intervertebral disc. *J Spinal Disord* 1997 Dec;10(6):493-8.
- (153) Freemont AJ, Hampson V, Tilman R, Goupille P, Taiwo Y, Hoyland JA. Gene expression of matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 by chondrocytes in osteoarthritic human knee articular cartilage is zone and grade specific. *Ann Rheum Dis* 1997 Sep;56(9):542-9.
- (154) Kang JD, Georgescu HI, Intyre-Larkin L, Stefanovic-Racic M, Evans CH. Herniated cervical intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6, and prostaglandin E2. *Spine* 1995 Nov 15;20(22):2373-8.
- (155) Taskiran D, Stefanovic-Racic M, Georgescu H, Evans C. Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1994 Apr 15;200(1):142-8.

- (156) Liu GZ, Ishihara H, Osada R, Kimura T, Tsuji H. Nitric oxide mediates the change of proteoglycan synthesis in the human lumbar intervertebral disc in response to hydrostatic pressure. *Spine* 2001 Jan 15;26(2):134-41.
- (157) Liu J, Roughley PJ, Mort JS. Identification of human intervertebral disc stromelysin and its involvement in matrix degradation. *J Orthop Res* 1991 Jul;9(4):568-75.
- (158) Matsui Y, Maeda M, Nakagami W, Iwata H. The involvement of matrix metalloproteinases and inflammation in lumbar disc herniation. *Spine* 1998 Apr 15;23(8):863-8.
- (159) Furusawa N, Baba H, Miyoshi N, Maezawa Y, Uchida K, Kokubo Y, Fukuda M. Herniation of cervical intervertebral disc: immunohistochemical examination and measurement of nitric oxide production. *Spine* 2001 May 15;26(10):1110-6.
- (160) Yamagishi M, Nemoto H, Kikuchi T, Shinmei M. Ruptured human disc tissues produce matrix metalloproteinase-3 and IL-1. *Trans Orthop Res Soc* 1992;16:438.
- (161) Yabuki S, Onda A, Kikuchi S, Myers RR. Prevention of compartment syndrome in dorsal root ganglia caused by exposure to nucleus pulposus. *Spine* 2001 Apr 15;26(8):870-5.