

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**ABORTUS İMMİNENS VAKALARINDA MATRİKS
METALLOPROTEİNAZ-9 VE MATRİKS
METALLOPROTEİNAZ-2 DÜZEYLERİNİN TESPİTİ**

Dr. Özgür ŞAHİNCİOĞLU

**KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Lügen CENGİZ

ANKARA

2008

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**ABORTUS İMMİNENS VAKALARINDA MATRİKS
METALLOPROTEİNAZ-9 VE MATRİKS
METALLOPROTEİNAZ-2 DÜZEYLERİNİN TESPİTİ**

Dr. Özgür ŞAHİNCİOĞLU

**KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Lügen CENGİZ

**Bu tez Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
2006-0809247 Proje numarası ile desteklenmiştir**

ANKARA

2008

TEZ DEĞERLENDİRME JÜRİSİ RAPORU

Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı araştırma görevlilerinden Dr.Özgür ŞAHİNCİOĞLU'nun tezi ile ilgili " Tez Değerlendirme Jürisi " raporu:

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığının 14.10.2008 tarih ve 1-4/21337 sayılı yazısı üzerine, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı araştırma görevlilerinden Dr.Özgür ŞAHİNCİOĞLU'nun "*Abortus imminens vakalarında Matriks Metalloproteinaz-9 ve Matriks Metalloproteinaz-2 düzeylerinin tespiti.*" konulu tezin sözlü savunması 16/10/2008 tarihinde öğretim üyelerine ve araştırma görevlilerine açık bir toplantıda gerçekleştirilmiştir. Prof.Dr.Lügen CENGİZ, Prof.Dr.Ruşen AYTAÇ ve Prof.Dr.Mete GÜNGÖR'den oluşan Tez Değerlendirme Jürisi anılan toplantıyı takiben bir araya gelmiş ve adayın tezini incelemiştir. Tezin kabul edilmesine oybirliği ile karar verilmiştir.

Prof.Dr.Lügen CENGİZ

Prof.Dr.Ruşen AYTAÇ

Prof.Dr.Mete GÜNGÖR

ÖNSÖZ

Bu tezin gerçekleştirilmesine katkıda bulunan başta tez danışmanım Prof. Dr. Lügen CENGİZ'e, tezin laboratuvar çalışmasındaki yardımlarından ötürü Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk İmmunoloji ve Alerji Bilim Dalı başkanı ve laboratuvar sorumlusu Prof. Dr. Aydan İKİNCİOĞULLARI ve biyolog Deniz GÜLOĞLU'na, tezin istatistik ve yazım aşamasındaki katkılarından ötürü Dr. M. Murat SEVAL'e, tezimin mali finansmanını karşılayan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'ne, ihtisas sürem boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, ayrıcalıklı bir eğitim alma şansını bana sunan tüm hocalarıma ve bugünlere gelmemdeki en büyük emeğe sahip olan anneme teşekkürü bir borç bilirim.

Dr. Özgür ŞAHİNCİOĞLU

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	i
Önsöz.....	ii
İçindekiler.....	iii
Simgeler ve Kısaltmalar.....	v
Şekiller Dizini.....	vi
Tablolar Dizini.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Abortus İmmينens.....	2
2.2. Matriks Metalloproteinaz Sistemi.....	5
2.2.1. Matriks Metalloproteinazların Sınıflaması.....	6
2.2.2. Metalloproteinazların Doku İnhibitörleri.....	9
2.3. Matriks Metalloproteinazların İmplantasyon ve Gebelikteki Rolü.....	9
2.3.1. İmplantasyon, Erken Gebelik ve Matriks Metalloproteinaz Sistemi.....	10
2.3.2. Erken Membran Ruptürü ve Matriks Metalloproteinazlar.....	13
2.3.3. Doğum Eylemi ve Matriks Metalloproteinazlar.....	14
2.3.4. Erken Doğum Eylemi ve Matriks Metalloproteinazlar.....	16
2.3.5. Gestasyonel Hipertansiyon, Preeklampsi ve Matriks Metalloproteinazlar.....	17
2.3.6. İntrauterin Gelişme Geriliği ve Matriks Metalloproteinazlar.....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1. Araştırma Gruplarının Belirlenmesi.....	19
3.2. Serum Örneklerinin Toplanması ve Saklanması.....	20
3.3. Serum Örneklerinde MMP-2 ve MMP-9 Düzeylerinin Tespiti.....	20
3.4. İstatistiksel Değerlendirme.....	20
4. BULGULAR.....	21
5. TARTIŞMA.....	29
6. SONUÇLAR.....	33
ÖZET.....	34

<i>SUMMARY</i>	35
KAYNAKLAR	36
EKLER	47
Ek 1. Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu	47
Ek 2. Hasta Takip Formu	49

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

βhCG	: Beta-insan koryonik gonodotropini (beta-human chorionic gonadotropin)
BMI	: Vücut kitle indeksi
CI	: Güven aralığı
CRL	: Baş-popo mesafesi (<i>Crown-rump lenght</i>)
DGA	: Gestasyonel yaş
EDE	: Erken doğum eylemi
ELISA	: Enzim immün assay
EMR	: Erken membran rüptürü
ESM	: Ekstraselüler matriks
IL-1R	: İnterlökin 1 reseptörü
IQR	: Çeyrek değerler arası genişlik (Interquartile Range)
IUGR	: İntrauterin gelişme geriliği
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
MoM	: <i>Multiple of Medians</i>
MT-MMP	: Membrana bağlı matriks metalloproteinaz
OR	: Tahmini rölatif risk (odds ratio)
PMNL	: Polimorfonükleer lökosit
PUMP-1	: Putatif metalloproteinaz-1
RR	: Rölatif risk
SS	: Standart sapma
TIMP	: Metalloproteinazların doku inhibitörleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: MMP ailesinin molekül yapısının şematik gösterimi.....	7
Şekil 2.2: MMP sisteminin regülasyonunun şematik gösterimi.....	10
Şekil 2.3: Fetal membran yapısının ve matriks metalloproteinaz içeriğinin şematik gösterimi.....	14
Şekil 4.1: Gebe kontrol ve normal kontrol gruplarının ortalama MMP-9 düzeyleri.....	22
Şekil 4.2: Gebe kontrol ve normal kontrol gruplarının ortalama MMP-2 düzeyleri.....	22
Şekil 4.3: Abortus imminens ve normal kontrol gruplarının MMP-9 düzeyleri.....	24
Şekil 4.4: Abortus imminens ve normal kontrol gruplarının MMP-2 düzeyleri.....	24

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1: Abortus imminensde kötü risk faktörleri.....	2
Tablo 2.2: Matriks metalloproteinazların sınıflaması ve etkileri.....	8
Tablo 2.3: Gebelikte insan endometriumundaki MMP ekspresyonu.....	12
Tablo 4.1: Normal kontrol ve gebe kontrol gruplarının karşılaştırılması.....	21
Tablo 4.2: Abortus imminens ve gebe kontrol gruplarının karşılaştırılması.....	23
Tablo 4.3: Abortus imminens ve gebe kontrol gruplarındaki 10 hafta altında gebeliğe sahip olan bireylerin karşılaştırması.....	25
Tablo 4.4: Abortus imminens ve gebe kontrol gruplarındaki 10 hafta üzerinde gebeliğe sahip olan bireylerin karşılaştırması.....	26
Tablo 4.5: Abortus imminens grubundaki gebelerin subkoryonik hematom varlığı açısından karşılaştırılması.....	27

1. GİRİŞ

Günümüzde modern tıbbın ilerlemesiyle birlikte, birçok hastalığın patofizyolojisinin aydınlatılabilmesi ve buradan yola çıkarak tedavi modalitelerinin geliştirilebilmesi amacıyla hastalıkların moleküller temellerini inceleyen çalışmaların sayısında artış görülmektedir. Moleküler temelde ortaya konan gerçekler bir hastalığın anlaşılabilmesinde yadsınamayacak öneme sahiptir.

Abortus imminens erken gebelik haftalarında kanamanın görüldüğü, düşük tehtidi olarak da adlandırılan ve her 4-5 gebeden birinde görülen klinik bir tablodur. Oldukça sık olarak karşılaşılması, abortus ve diğer gebelik sorunlarında risk artışına yol açması nedeniyle abortus imminens, gerek gebeler gerek ise hekimler için önemli bir obstetrik sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Genelde ampirik olarak tedavi edilen ve çoğu zaman etiyolojik nedeni aydınlatılamayan bu tablonun temelinde moleküler bazı defektlerin olduğu düşünülmektedir.

Proteolitik aktiviteye sahip bir grup enzimden oluşan ve “Matriks metalloproteinaz (MMP)” adı verilen enzim sistemi ekstraselüler matriksin düzenlenmesinde ve dolayısıyla hücre fizyolojisinde oldukça önemli bir role sahiptir. Yapılan hayvan çalışmalarıyla, birçok organ ve sistemin homeostazında görev alan MMP’lerin reproduktif sistemde de gerek menstrüel siklusun, gerekse ovuluar fonksiyonların düzenlenmesinde rolü olduğu kanıtlanmış, bunun yanı sıra implantasyonda ve gebeliğin devamında da rolü olduğu gösterilmiştir. Ancak bu enzim sisteminin gebelikte ortaya çıkan hastalıklarla ilişkisini inceleyen yeterli çalışma literatürde mevcut değildir. Bu nedenle, özellikle gebelik ürününün endometriyuma tutunmasında ve buradaki gelişiminin idamesindeki defektif sorunlar nedeniyle olduğu düşünülen abortus imminens ve diğer bazı hastalıkların etiyopatogenezinde matriks metalloproteinazların rolünün araştırılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Buradan yola çıkarak bu tezde, implantasyon ve erken gebelik haftalarında gebeliğin devamı üzerindeki etkileri hayvan deneyleriyle gösterilmiş olan MMP-2 ve MMP-9’un sağlıklı gebelerdeki, sağlıklı ancak gebe olmayan kadınlara oranla değişimini ve abortus imminens tanısı almış gebelerdeki, sağlıklı gebelere oranla değişimini incelemek ve bu metalloproteinazların abortus imminens gelişimindeki rollerini ortaya koymak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Abortus İmminens

Abortus imminens gebeliğin ilk yarısında meydana gelen kanlı vajinal akıntı veya uterin kanama olarak tanımlanmaktadır. Gebeliğin ilk aylarındaki vajinal lekelenme veya kanama, gebeliklerin yaklaşık %20'sinde görülebilmektedir. Kanama, kahverengi bir akıntı veya parlak kırmızı renkte kendini gösterebilir ve tek bir seferde olabileceği gibi tekrarlayıcı da olabilir. Kanamaya çoğunlukla uterin kramplar ve bel-kasık ağrısı eşlik etmektedir. Pelvik muayenede serviksin kapalı olduğu ve servikal silinmenin olmadığı tespit edilir (1). Ayırıcı tanıda ektopik gebelik, molar gebelik, vajinal kanama, servisit, servikal erozyon, servikal polip ve serviks kanseri yer almaktadır (1).

Abortus imminens gerek psikososyal gerekse medikal açıdan önemli bir gebelik sorunudur. Abortus imminens tanısı almış ve tanı anında yapılan ultrasonografide intrauterin canlı embriyonun görüldüğü gebeliklerin yaklaşık %9-30'u ilk trimesterde abortus ile sonuçlanmaktadır (2, 3). Abortus imminens tanısı almış bir gebelikteki kötü prognostik faktörler Tablo 2.1'de özetlenmektedir (4-7). İlk trimester abortuslarının risk faktörleri arasında ise ileri anne yaşı, önceki gebeliklerden birinin abortus ile sonuçlanması, annenin kötü alışkanlıkları (sigara, alkol, kokain vb.), konsepsiyon döneminde antiinflatuar ilaç kullanımı sayılabilir. İlk trimester abortuslarının en sık sebebi ise genetik anomalilerdir (1).

Tablo 2.1. Abortus imminensde kötü risk faktörleri

Öykü	Ultrasonografi	Maternal serum belirteçleri
<ul style="list-style-type: none">• Maternal yaş >34• Önceki gebeliklerde abortus öyküsü	<ul style="list-style-type: none">• Fetal bradikardi• DGA ile CRL ölçümü arasında uyumsuzluk• Boş gestasyonel kese (>15-17mm)	<ul style="list-style-type: none">• βhCG artışının %53-66'nın altında olması• Progesteron düzeyi <16 ng/ml• İnhibin A <0,553 MoM
DGA: Gestasyonel yaş, CRL: Baş-popo mesafesi (<i>Crown-rump length</i>)		

Abortus imminens olduğu düşünölen gebelerde fizik muayeneyi takiben gebeliğin yaşını, lokalizasyonunu ve canlılığını belirlemek için yapılması gereken ilk tetkik ultrasonografidir. Ultrasonografide endometrial kavitede canlı gebeliğin görölmediği durumlarda ektopik gebelik veya anormal intrauterin gebelik akla gelmelidir. Bu gibi durumlarda seri beta-insan koryonik gonodotropin (*beta human chorionic gonadotropin*) (β hCG) ölçümleri tanıya yardımcı olmaktadır (1). Normal bir gebelikte iki gün ara ile bakılan serum β hCG değerlerinde en az %66'lık bir artış beklenmelidir. Ancak son yıllarda yapılan daha geniş kapsamlı bir çalışma ile bu artış oranının %53 olduğu bildirilmiştir (5). Bu nedenle iki gün ara ile bakılan β hCG değerlerindeki artışın %53'ten daha az olduğu gebeliklerde anormal gebelik durumları (ektopik gebelik, spontan abortus vb.) düşünölmelidir. Serum progesteron düzeyleri de intrauterin canlı gebeliği öngörmeye kullanılabilir. Mol ve arkadaşlarının (ark.'nın) bu konu ile ilgili yapılmış 26 çalışmayı incelediği bir meta-analizde, 16 ng/ml'den daha yüksek serum progesteron düzeyinin canlı bir gebeliği öngörmeye %95 sensitivite ve %40 spesifiteye sahip olduğu gösterilmiştir (6). Diğer bazı serolojik belirteçlerin de abortus imminensde gebeliğin devamını öngörmeye kullanılabilceğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Florio ve ark. abortus imminensde bakılan serum inhibin A, aktivin A ve hCG düzeylerinin abortus ile sonuçlanan gebeliklerde, devam eden gebeliklere oranla daha düşük düzeylerde olduğunu ve serum inhibin A düzeyi için abortusu öngörmeye MoM (*multiple of medians*) değerinin 0,553 MoM olduğunu saptamışlardır (7).

Canlı bir gebelik ürünü modern bir ultrason ile 5,5 gebelik haftasında tespit edilebilir. Transvajinal ultrasonografi ile 5-6. haftalarda gebelik kesesi ve yolk kesesi görölebilir. 6. hafta civarında ultrasonografide fetal kalp atımları da izlenir. Olması muhtemel bir gebelik kaybının ultrasonografik görüntü bulguları: anormal şekil ve büyüklükteki gebelik kesesi ve yolk kesesi, olması gerekenden küçük bir embriyo ve yavaşlamış fetal kalp atımlarıdır. Bu bulguların olmadığı ve 8. gebelik haftasında ultrasonografik olarak canlı olduğu tespit edilen bir embriyoya sahip abortus imminens vakalarının %70'inde gebelik devam etmektedir (2). Bunun yanı sıra uterin kanamanın devam ettiği ancak ultrasonografi ile normal kardiyak aktiviteye ve haftası ile uyumlu ölçümlere sahip bir embriyo varlığının gösterildiği gebeliklerin 2/3'ünden fazlasının devam ettiği bildirilmektedir (8). 14-16. gebelik

haftasında canlı fetüse sahip olan gebeliklerin ise yalnızca %1'inde gebelik kaybı görülmektedir (9).

Abortus imminens sadece erken gebelik haftasındaki kayıplar ile ilişkili değildir. Yapılan birçok çalışma abortus imminens öyküsüne sahip olan gebelerin ilerleyen gebelik haftalarında gebeliğe bağlı bazı komplikasyonlar ile yüz yüze kaldığı gerçeğini ortaya koymaktadır. Johns ve ark. abortus imminens nedeniyle izlenen gebelerde, ilerleyen haftalarda istenmeyen gebelik komplikasyonlarının 2,2 kat daha fazla ortaya çıktığını göstermişlerdir (10). Benzer şekilde Mulik ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada, abortus imminens tanısı alan gebelerde abrupsiyo plasenta riskinin (2,8 kat), nedeni bilinmeyen antepartum kanama riskinin (2,3 kat), preterm doğum riskinin (2 kat) ve düşük doğum ağırlıklı infant riskinin (1,3 kat) arttığı saptanmıştır (11). Preterm doğum ve antepartum hemoraji riskinin abortus imminens tanısı almış gebelerde arttığını gösteren bir diğer çalışma ise Wijesiriwardana ve ark.'nın çalışmasıdır (12). Ancak Wijesiriwardana ve ark., abortus imminensin gebelik komplikasyonlarında sadece hafif bir risk artışına yol açtığını iddia etmişlerdir; preterm doğum riskinde 1,56 kat, antepartum kanama riskinde is 1,83kat risk artışı saptayan çalışmacılar Mulik ve ark.'nın aksine abortus imminensin abrupsiyo plasenta riskini arttırmadığını ortaya koymuşlardır (12). Abortus imminensin obstetrik sonuçlara etkisini inceleyen en geniş kapsamlı çalışma ise Weiss ve ark. tarafından yapılmıştır (13). Weiss ve ark. abortus imminensli gebelerden hafif kanaması olanlarda ilerleyen gebelik haftalarında preeklampsi riskinin 1,5 kat, preterm doğum riskinin 1,3 kat, abrupsiyo plasenta riskinin 1,6 kat, 24 haftanın altında gebelik kaybı riskinin 2,5 kat daha fazla olduğunu, ciddi kanaması olanlarda ise intrauterin gelişme geriliğine sahip fetus riskinin 2,6 kat, preterm doğum riskinin 3 kat, erken membran rüptürü riskinin 3,2 kat, 24 haftanın altında gebelik kaybı riskinin 4,2 kat ve abrupsiyo plasenta riskinin 3,6 kat daha fazla olduğunu göstermişlerdir (13).

Abortus imminensin gidişatını etkileyebilecek, uygunluğu ve sonuçları kanıtlanmış bir tedavi yöntemi yoktur. Abortus imminens vakalarında etkinliği en çok araştırılmış medikal ajan progesterindir. Yapılan çalışmalarda ve bu çalışmalardan elde edilen *Cochrane* verilerinde progesteronun abortus imminensi önleme veya tedavi etmedeki etkinliği net olarak ortaya konamamıştır (14-16).

Wahabi ve ark.'nın yaptıkları bir metaanalizde abortus imminensde vajinal progesteron tedavisinin düşük oranlarını azaltmada plaseboya üstünlüğünün olmadığı gösterilmiştir (rölatif risk [RR] 0,47; %95 güvenlik aralığı 0,17-1,30) (15). Bunun yanı sıra Haas ve ark.'nın yaptıkları bir başka meta-analizde de progesteronun, veriliş yolundan (oral, vajinal veya intramuskuler) bağımsız olarak, abortusu önlemede plaseboya bir üstünlüğünün olmadığı gösterilmiştir (tahmini rölatif risk-odds ratio[OR]- 0,98; %95 güven aralığı 0,78-1,24) (16). Abortus imminens tedavisinde düşük riskinin azaltılması için kullanılan bir diğer yöntem yatak istirahatidir. Ancak bu tedavi modalitesi ile ilgili *Cochrane* verilerine baktığımızda yatak istirahatı yapılan abortus imminensli gebeler ile yatak istirahatinin yapılmadığı gebeler arasında düşük riskinin engellemesi açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır (rölatif risk [RR] 1,54, 95% güven aralığı 0,92-2,58; p=0,099) (17). Bununla birlikte aynı meta-analizde istirahatın evde veya hastanede yapılmasının düşük oranlarına bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (p=0,053) (17). Tedavide denenen bir başka yöntem ise hCG uygulamasıdır. Bu konudaki en geniş kapsamlı çift kör- randomize çalışma Qureshi ve ark. tarafından yapılmıştır (18). Abortus imminens tanısı almış gebelere 14. haftaya kadar haftalık 5000 IU intramuskuler hCG verilmesinin düşük riskini önlemede plaseboya bir üstünlüğünün olmadığı gösterilmiştir (18). Sonuç olarak abortus imminens halen daha ampirik olarak tedavi edilen ve etkin bir tedavi modalitesine sahip olmayan bir gebelik sorunudur.

2.2. Matriks Metalloproteinaz Sistemi

Ekstraselüler matriks (ESM); hücre göçü, bölünmesi ve farklılaşması için bir çevre sağlayarak hücre fizyolojisinin düzenlenmesinde anahtar bir rol oynamaktadır. İyi derecede kontrol edilen bu ESM döngüsü ve homeostazında “Matriks Metalloproteinaz (MMP)” adı verilen bazı spesifik proteolitik enzimler görev almaktadır. MMP’ler ve bunların endojen inhibitörlerinden oluşan MMP sistemi, ESM regülasyonunu sağlayarak, embriyonel gelişim, üreme fonksiyonlarının sürdürülmesi, organ morfogenez, anjiogenez, kırıkta yapılanması, kemik büyümesi, korneal tamir ve yara iyileşmesi gibi birçok biyolojik işlevde görev

almaktadır. Hassas bir denge üzerine kurulu bu sistemdeki kontrolün kaybı, artrit ve kanser gibi hastalarda görülen ESM'in yaygın ve destrüktif bozulmasına sebep olmaktadır (19).

2.2.1. Matriks Metalloproteinazların Sınıflaması

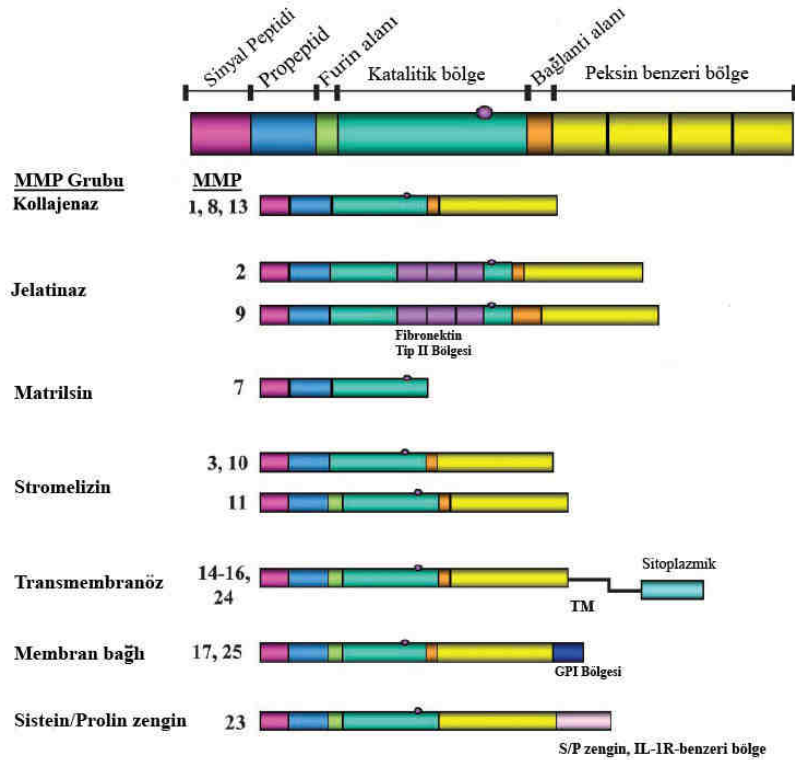
1962 yılında Gross ve Lapiere'in kollajenaz enzimini tanımlamalarından bu yana bağ dokunun yapılandırılmasında 200'den fazla proteolitik enzimin (metalloproteinazın) görev aldığı ortaya konmuştur. Bunlar içinde matriks metalloproteinazları veya interstisyel kollajenazlar olarak tanımlanan metalloproteinaz ailesi bu gruba üye enzim sistemlerinden sadece biridir (19).

MMP ailesi 25 farklı proteolitik enzimi içeren 4 ayrı gruba ayrılmaktadır (Tablo 2.2); kollajenazlar (MMP-1, MMP-8, MMP-13), jelatinazlar (MMP-2, MMP-9), stromelizinler (MMP-3, MMP-7, MMP-10, MMP-11, MMP-12) ve membrana bağlı MMP'ler (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP) (19, 20).

Bu proteinazların yapısal ve fonksiyonel birçok benzerlikleri vardır (Şekil 2.1). Bu enzim ailesinin ortak özellikleri: 1) Katalitik bölgenin aktif alanında çinko içermeleri, 2) Proenzim halinde sentezlenip inaktif formda salgılanmaları, 3) Latent proenzimin ekstraselüler alanda aktif hale dönüşmesi, 4) ESM'nin, enzimin katalik bölgesi tarafından tanınması ve ayrıştırılması, 5) Enzim aktivitesinin ekstraselüler alandaki hem serum hem de doku kökenli metalloproteinaz inhibitörleri tarafından sonlandırılması (19).

MMP'lerin yapısal bu benzerliklerinin yanı sıra belirgin farklılıkları da mevcuttur. Her bir MMP ailesinin farklı fonksiyonel işlevleri mevcuttur. Kollajenazlar (MMP-1, MMP-8 ve MMP-13) kollajen tip I, II, III, V ve XI gibi fibriler ve kollajen tip IX, XII gibi nonfibriler kollajenleri yıkıma uğratabilmektedir. MMP ailesinin bu üyeleri tarafından yıkıma uğrayan üçlü (*triple*) helikal kollajen molekülünün stabilitesinde ve çözünürlüğünde değişiklik olur ve kollajen jelatine denatüre olur. Jelatin ise doku proteinazlarının büyük bir çoğunluğuna (jelatinazlar ve stromelizinler) duyarlıdır. Jelatinazlar (MMP-2 ve MMP-9) katalitik bölgelerinde jelatine bağlanmayı ve yıkımı sağlayan fibronektin benzeri bölüm içerirler (Şekil

2.1). Stromelizinler (MMP-3, MMP-7, MMP-10 ve MMP-11) ESM bileşenlerinin birçoğuna etki edebilmektedir. Hem stromelizinler hem de jelatinazlar bazal membranın majör bileşenlerini (tip IV kollajen, laminin ve fibronektin) yıkabilmektedir. Membrana bağlı MMP'ler (MT-MMP) ise karboksi terminallerine yakın yerleşimli, bu molekülleri plazma membranına bağlayan transmembranöz bölge içerirler (Şekil 2.1). MT-MMP'lerin en önemli fonksiyonları MMP-2 aktivasyonudur (19).



Şekil 2.1: MMP ailesinin molekül yapısının şematik gösterimi.*

[MMP'ler bir sinyal peptidi, aktivasyon için ayrıştırılması gereken bir propeptid bölgesi, çinko bağlayan alanı içeren bir katalitik bölge ve hemopektin benzeri bölge içerirler. Jelatinazlar "Fibronektin Tip II bölgesi" içerirlerken diğer MMP'ler intraselüler aktivasyonu sağlayan "Furin alanı" içerirler. Transmembran tipteki MMP'ler sitoplazmik bölgeye uzanım gösteren bir transmembranöz bağlayıcı bölge (TM) içerirlerken membran bağlı MMP'ler glikofosfotidil inositol bölgesi içerirler (GPI bölgesi). MMP-23 ise sistein-prolin zengin interlökin-1 reseptör (IL-1R) benzeri bölge içerir.] (*Referans 19'dan uyarlanmıştır)

Tablo 2.2: Matriks metalloproteinazların sınıflaması ve etkileri*

Grup	MMP	Diğer İsimleri	Etki ettiği moleküller
Jeletinazlar	MMP-2	Jelatinaz A	Kollajen I, III, IV, V, VII, X, XI; Jelatin; Fibronektin; Elastin; Laminin
	MMP-9	Jelatinaz B	Kollajen IV, V, VII, XIV; Jelatin
Kollajenezlar	MMP-1	İntersitisyel kollajenaz Fibroblast kollajenaz	Kollajen I, II, III, VIII, X, XI; Jelatin; Fibrin; MMP-2 ve MMP-9
	MMP-8	Nötrofil kollajenaz PMNL kollajenaz	Kollajen I, II, III, V, VIII, X; Fibronektin; Jelatin; Laminin
	MMP-13	Kollajenaz 3	Kollajen I, II, III, IV; Jelatin Fibronektin;
Stromelizinler	MMP-3	Stromelizin-1 Transin-1	Kollajen II, III, IV, V, VII, IX, X, XII; Jelatin; Laminin; Fibronektin; Kazein
	MMP-7	Matrilsin PUMP-1	Kollajen I, IV, X; Elastin; Fibronektin; Jelatin; Laminin
	MMP-10	Stromelizin-2 Transin-2	Kollajen III, IV, V; Elastin; Fibronektin; Jelatin; Laminin
	MMP-11	Stromelizin-3	Kollajen IV; Fibronektin; Laminin
	MMP-12	Makrofaj metalloelastaz	Kollajen I, IV; Elastin; Fibronektin; Jelatin; Laminin
Membran bağlı	MMP-14	MT1-MMP, MMP-XI	MMP-2; Kollajen I, II, IV; Elastin; Fibronektin; Jelatin; Laminin
	MMP-15	MT2-MMP	MMP-2; Fibronektin; Jelatin; Laminin
	MMP-16	MT3-MMP	MMP-2; Kollajen III, Fibronektin
	MMP-17	MT4-MMP	

PMNL=Polimorfonükleer lökosit; PUMP-1=Putatif metalloproteinaz-1
*Referans 19 ve 20'den uyarlanmıştır

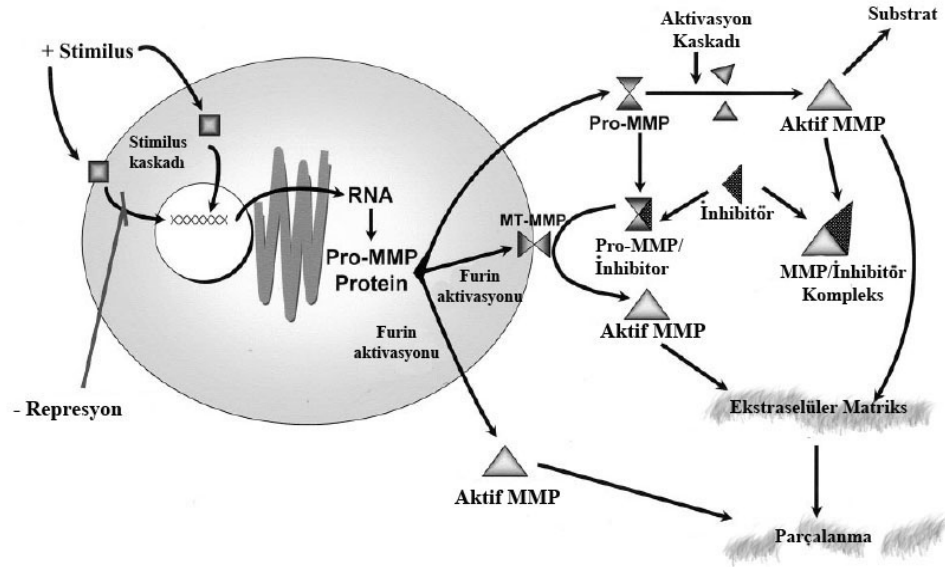
2.2.2. Metalloproteinazların Doku İnhibitörleri

ESM'deki MMP aktivitesinin kontrolünde, sentez ve aktivasyonun düzenlenmesinin yanı sıra MMP inhibitörlerinin de oldukça önemli etkisi vardır (Şekil 2.2). MMP inhibitörleri 2 majör sınıfa ayrılır; serum kaynaklı inhibitörler ve doku kaynaklı inhibitörler (21, 22). Her ne kadar serum veya doku kaynaklı olarak sınıflandırılırsalar da serum kaynaklı inhibitörlerin çeşitli dokularda mevcut olduğu, doku kaynaklı inhibitörlerin de serumda mevcut oldukları bilinmektedir (19). Serum kaynaklı inhibitörler makroglobulinlerden (α 2-makroglobulin, α 1-makroglobulin, α 1-inhibitör-3, gebelik bölgesi proteini [*pregnancy zone protein*], ovomakroglobulinler [ovostatin vb.]) oluşur ve proteinazların (MMP'ler dahil) büyük bir çoğunluğunun potent inhibitörleridir. “Metalloproteinazların doku inhibitörleri (TIMP)” ise lokal olarak üretilirler ve MMP'lerin spesifik inhibitörleridir. Bu inhibitörler hormonlar tarafından kontrol edilirler ve üreme sistemine ait dokulardaki konsantrasyonları oldukça fazladır (22, 23).

Bugüne kadar tanımlanmış 4 farklı tip TIMP mevcuttur. Tüm TIMP'lerin MMP inhibisyonu etkisi, TIMP'in N-terminali ile MMP'nin katalitik bölgesindeki aktif alanı ve substrat bağlama bölgesi arasındaki etkileşime bağlıdır. TIMP-1'in MMP-9'a, TIMP-2'nin MMP-2'ye, TIMP-3'ün MMP-9 ve MT1-MMP'ye afinitesi daha yüksek iken TIMP-4'ün tüm MMP tiplerine etki ettiği ve spesifik bir afinite göstermediği bilinmektedir (19, 22, 23).

2.3. Matriks Metalloproteinazların İmplantasyon ve Gebelikteki Rolü

Gebelikte maternal-fetal etkileşimin sağlanmasında lokal MMP ekspresyonunun oldukça önemli bir rolü mevcuttur. MMP ailesinin bu etkisi fetal orijinli invazif hücreler, maternal endometrium ve fetal doku arasındaki haberleşmeyi sağlayan yolak tarafından kontrol altındadır (19).



Şekil 2.2: MMP sisteminin regülasyonunun şematik gösterimi.* Dış uyaran ile aktive olan kaskat spesifik MMP mRNA'larının sentezine yol açar. Bu mRNA, pro-MMP adı verilen latent bir MMP'nin oluşumunu sağlar. Bazı MMP'ler (MT-MMP'ler ve MMP-11) intraselüler olarak furin aktivasyonu ile aktif hale dönüşüp sekrete edilir veya hücre membranına yerleşir. Pro-MMP'lerin büyük bir kısmı ise latent formunda sekrete edilir ve ekstraselüler alanda diğer proteinazlar tarafından aktif hale dönüştürülür. Aktif hale gelen MMP, ekstraselüler matriksi yıkıma uğratar veya MMP inhibitörü ile etkileşerek inhibe olur. (*Referans 19'dan uyarlanmıştır)

2.3.1. İmplantasyon, Erken Gebelik ve Matriks Metalloproteinaz Sistemi

MMP'lerin erken gebelik haftalarındaki etkileri bazı deneysel çalışmalarla ortaya konmuştur. Kemirgenler ve koyunlar üzerinde yapılan çalışmalar ile gebeliğin erken dönemlerinde MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-11, MMP-13 ve MT1-MMP'nin artmış mRNA ekspresyonu veya pozitif immünreaktivitesi gösterilmiştir (23-30). Bu çalışmaların birçoğu, gebeliğin oluşumu esnasında fetal hücreler tarafından en çok üretilen MMP'lerin MMP-2 ve MMP-9 olduğunu göstermektedir. Das ve ark. yaptıkları bir çalışmada, fare uterusunda MMP-2

mRNA'sının gebeliğin 3-5. günlerinde daha fazla olduğunu, MMP-9 mRNA'sının ise daha geç ortaya çıktığını göstermişlerdir (27). Rechtman ve ark. da benzer şekilde sıçanlarda MMP-2'nin 3. günde pik yaptığını, MMP-9'un ise 9. günde saptandığını göstermişlerdir (28). Hurst ve ark. ise bu iki MMP'nin gebeliğin 6-8. günlerinde değişen oranlarda sıçan uterusunda mevcut olduğunu ortaya koymuşlardır (24). MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunun artış zamanı ile ilgili farklı çalışmalar olsa da bu MMP'lerin implantasyon için oldukça büyük önemi olduğu açıktır. Örneğin MMP-9 proteinini bloke edecek nötralizan antikorların verilmesinin fare blastokistlerinde büyümeyi durdurduğu Behrendtsen ve ark. tarafından gösterilmiştir (31). Bunun yanı sıra MMP-9 ekspresyonunu etkileyecek gen bozulmalarında da embriyo gelişiminin durduğunu gösteren yayınlar mevcuttur (32, 33).

Diğer MMP tiplerinin gebeliğin oluşumundaki etkileri net değildir. Sıçanlarda MMP-7'nin endometriumdaki epitelyal ekspresyonunun implantasyon için önemli olduğu gösterilse de MMP-3, MMP-7, MMP-9 veya MT1-MMP eksikliği olan farelerde fertilitenin mevcut olduğu da gösterilmiştir (28, 34).

İnsan plasentası ile yapılan çalışmalarda ilk trimesterdeki insan trofoblastlarının MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonu yaptığı ve MMP-9 aktivasyonunun üçüncü trimester ile karşılatırıldığında daha fazla olduğu gösterilmiştir (35). Özellikle MMP-9'un insan gebeliklerindeki implantasyon ve plasantasyon aşamalarında oldukça önemli olduğu düşünülmektedir. İnvitro çalışmalarla MMP-9 blokajının, ilk trimester trofoblastlarının yapay bir matriks olan Matrigel'e invazyonunu önlediği gösterilmiştir (36). Diğer MMP'ler de trofoblastların invazyon özellikleri ile ilişkilidir (Tablo 2.3). Maternal-fetal ilişkisinin erken dönemde sağlanması için bu MMP'lerin birbiri ile etkileşimde olması gerekmektedir. Örneğin gebeliğin oluşabilmesi için MMP-2 aktivatörü olan MT1-MMP ile tip IV kollajen prekürsörünün aynı hücre tiplerinde lokalize olması gerekmektedir (37-40). İnsanlarda erken gebelik haftalarına ait doku örneklerini elde etmek zor olsa da yapılan kısıtlı sayıda çalışma ile erken gebelik haftalarında maternal-fetal yüzdeki stroma, epitel veya matür desiduada MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-11, MMP-13 ve MT1-MMP varlığı gösterilmiştir (39-43).

Metalloproteinazların doku inhibitörlerinin gebelikteki etkilerini inceleyen kısıtlı sayıda çalışma mevcuttur. Yapılan çalışmalar insanlarda gebelik öncesi endometriumda TIMP-1, TIMP-2 ve TIMP-3 ekspresyonunun olduğunu gösterirken, erken gebelik haftalarında plasental desiduada TIMP-2 ekspresyonunun daha fazla olduğunu göstermektedir (44-47). Yapılan çalışmalar insanlarda her üç trimesterde de TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 ve TIMP-4'ün sitotrofoblastik hücrelerde, vilusların endotelial ve fibroblastik hücrelerinde ve desidual membranda eksprese edildiğini göstermiştir (Tablo 2.3) (19).

Tablo 2.3: Gebelikte insan endometriumundaki MMP ekspresyonu*

	Erken Gebelik		Geç Gebelik		Doğum		İnvölüsyon
	Desidua	Trofoblast	Desidua	Trofoblast	Desidua	Trofoblast	
MMP-1	+	+	+	+	+	-	?
MMP-2	++	+	?	++	?	+	?
MMP-3	+	+	+	+	+	-	?
MMP-7	-	++	-	+	-	++	+++
MMP-9	+	++	+	++	++	++	?
MMP-10	?	-	?	?	?	?	?
MMP-11	+/-	+	?	+	?	?	?
MMP-13	?	++	?	?	?	?	++
MMP-14	+	+	?	?	?	?	?
MT1-MMP	+	++	?	?	?	?	?
MT2-MMP	-	+	?	?	?	?	?
TIMP-1	+	++	++	++	++	+	++
TIMP-2	+	-	++	++	++	+	++
TIMP-3	++	++	++	++	++	+	++
TIMP-4	+	+	++	++	++	+	?

Protein veya mRNA'nın göreceli değerleri (* referans 19'dan uyarlanmıştır);

-;yok +; fokal ++;orta +++;yoğun ?;bilinmiyor

2.3.2. Erken Membran Ruptürü ve Matriks Metalloproteinazlar

Erken membran ruptürü (EMR) herhangi bir gestasyonel haftada aktif doğum eylemi başlamadan önce amniotik membranların ruptürü olarak tanımlanmaktadır. EMR için son yıllarda kabul gören patofizyolojik mekanizma uterin kuvvetlerin varlığı olmaksızın fetal membranlardaki ESM'nin anormal yıkımıdır (48). ESM yıkımından büyük oranda sorumlu olan MMP'ler de EMR patofizyolojisinde rolü olan bileşiklerdir. Fetal membranlar, amnion ve koryon zarından oluşmaktadır. Bu zarların bileşenleri ve bu katmanlarda üretilen MMP'ler Şekil 2.3'de gösterilmektedir (49). MMP-9 fetal membranların yıkımında etkili olan en önemli MMP'dir ve bu nedenle EMR gelişiminden sorumlu tutulan en önemli metalloproteinazdır. Öyle ki: *i*) MMP-9 geni doğum eylemi esnasında, EMR'de ve enfeksiyon varlığında amniokoriyonda indüklenmektedir; *ii*) Gestasyonel hafta ilerledikçe ve doğum eylemi esnasında MMP-9 düzeyleri artmaktadır; *iii*) EMR'li gebelerde amniotik mayide MMP-9 düzeylerinin arttığı saptanmıştır; *iv*) EMR olsun veya olmasın amniotik mayide enfeksiyon varlığında MMP-9 düzeyinde artış olmaktadır; *v*) Stres uygulanıp zayıflatılmış fetal membranlarda MMP-9 düzeyi artmaktadır (50-54).

EMR patofizyolojisinde etkili olduğu savunulan tek metalloproteinaz MMP-9 değildir. Fortunato ve Menon yaptıkları bir çalışmada MMP-9'un yanı sıra MMP-2 ve MT1-MMP'nin de EMR'li gebelerin amnion mayisinde arttığını göstermişlerdir. Bu artışın da fetal membranlarda apoptozise yol açarak EMR'ye neden olduğunu savunmaktadırlar (50). Ota ve ark.'ları da benzer şekilde EMR'li gebelerde MMP-2 düzeylerini daha yüksek bulmuşlar ve buna ilaveten EMR'de MT1-MMP (MMP-2 aktivatörü) düzeylerinde artış ve TIMP-1 (MMP-2 inhibitörü) düzeylerinde düşüş saptamışlardır. Bunu da, artmış MMP-2 aktivitesinin ESM'de yıkıma yol açarak EMR'ye neden olduğu şeklinde yorumlamışlardır (55).

MMP-8'in de EMR gelişiminde ve EMR'ye neden olan intraamniotik enfeksiyonu belirlemede rolü olduğunu savunan çalışmalar mevcuttur. Biggio ve ark. ikinci trimesterde amniotik mayideki artmış MMP-8 düzeylerinin EMR riskini 3,4 kat arttırdığını saptamışlardır (56). Kim ve ark. ise amniotik mayide MMP-8

pozitifliğinin EMR’de, intraamniotik infeksiyonu %77 oranında öngördüğünü ortaya koymuşlardır (57).

EMR gelişiminde etkili olduğu savunulan bir diğer metalloproteinaz MMP-1’dir. Fujimoto ve ark. ile Wang ve ark.’nın yaptıkları çalışmalarda MMP-1 geninde mutasyon saptanan gebelerde EMR riskinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (58, 59). Buna ilaveten Maymon ve ark. EMR gelişen gebelerin amnion mayilerinde MMP-1 düzeylerinin normal gebelere kıyasla daha fazla olduğunu göstermişlerdir (60).

Tabaka	ESM İçeriği	Üretilen MMP veya TIMP
Amnion		
Amnion mayi		
Epitel		MMP-1, MMP-2, MMP-9
Bazal membran	Kollajen tip III, IV, V; laminin; fibronektin; nidojen	MMP-2, MMP-9
Kompakt tabaka	Kollajen tip I, III, V, VI; fibronektin	
Fibroblast katmanı	Kollajen tip I, III, VI; nidojen; laminin; fibronektin	MMP-1, MMP-9, TIMP-1
Spongios tabaka	Kollajen tip I, III, IV; proteoglikanlar	
Koryon		
Retiküler tabaka	Kollajen tip I, III, IV, V, VI; proteoglikanlar	
Bazal membran	Kollajen tip IV; fibronektin, laminin	MMP-2, MMP-9
Trofoblastlar		MMP-9
Maternal desidua		

Şekil 2.3: Fetal membran yapısının ve matriks metalloproteinaz içeriğinin şematik gösterimi (referans 49’dan uyarlanmıştır)

2.3.3. Doğum Eylemi ve Matriks Metalloproteinazlar

Doğum eyleminin fizyolojisi tam olarak netliğe kavuşmuş değildir. Birçok mekanizma doğum eyleminin başlamasından sorumlu tutulmaktadır. Son yıllarda

yapılan çalışmalar ile MMP'lerin de doğum eyleminin başlamasında rollerinin olduğu ortaya çıkmıştır.

Yonemoto ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada, MMP-2 ve MMP-9'un doğum eylemini başlatmada etkin oldukları savunulmaktadır. Çalışmacılar, doğum eylemi başlamış olan term gebelerdeki amnion mayisinde, aktif doğum eylemi başlamamış olanlara kıyasla MMP-2 ve MMP-9 düzeylerinin daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Bununla birlikte preterm doğumlarda MMP-2 düzeylerinin term doğumdaki kadar artmadığını da ortaya koymuşlardır (61). Benzer şekilde Goldman ve ark. da doğum eyleminin başlamasında MMP-2, MMP-9 ve TIMP-1'in etkisi olduğunu göstermişlerdir. Ancak bu etkinin amnion mayi, desidua ve korion zarında farklı şekillerde gerçekleştiğini öne sürmüşlerdir. Doğum eylemindeki kontraksiyonların başlamasından önce amnion mayisinde baskın olan MMP-2 ve TIMP-1 düzeylerinin kontraksiyonlar başladıktan sonra azaldığını, bunun yerine amniyon mayisindeki MMP-9 düzeyinin arttığını, desidua ve koryon zarında ise kontraksiyonların başlamasından sonra MMP-2 düzeyinde artış olduğunu göstermişlerdir. Buradan yola çıkarak farklı bölgelerde baskın jelatinolitik aktivite gösteren bu MMP'lerin amnion zarı rüptüründe ve plasental ayrılımda rolü olduğunu savunmuşlardır (62). Öyle ki Qin ve ark.'nın yaptıkları çalışmalarda doğum eylemi için gereken aktif kontraksiyonların başlamasından haftalar önce desidua tarafından salgılanan relaksinin, fetal zarlardaki proMMP-9 düzeylerinde artışa yol açarak amnion rüptüründe rol oynadığı hipotezi öne sürülmüştür (63, 64).

Doğum eyleminde MMP'lerin rolünü inceleyen O'Brien ve ark.'nın yaptıkları başka bir çalışmada ise doğum eyleminin primer tetikleyicisinin MMP-3 olduğu öne sürülmektedir. O'Brien ve ark. doğum eylemi esnasında myometrial hücrelerde MMP-3 düzeyinin doğum eylemi başlamamış olan gebelerin myometriyumundaki MMP-3 düzeylerine kıyasla artmış olduğunu saptamış ve buradan yola çıkarak asıl tetikleyici mekanizmanın MMP-3 düzeylerindeki artış olabileceğini iddia etmişlerdir (65).

MMP-2, MMP-9 ve MMP-3'ün yanı sıra MMP-8'in de doğum eyleminde rol oynadığı gösterilmiştir. Velasco ve ark. doğum eylemi esnasında fetal membranlarda MMP-8'in gerek mRNA'sının gerekse proteininin doğum eylemi başlamamış, elektif sezeryanla doğum yapan gebelerdeki fetal membranlardan

alınan örneklere kıyasla 4 kat fazla olduğunu ortaya koymuşlardır (66). Bunun yanı sıra MMP-1’inde doğum eylemi esnasında plasental korionik villuslarda arttığı gösterilmiştir (67).

2.3.4. Erken Doğum Eylemi ve Matriks Metalloproteinazlar

MMP’lerin doğum eylemindeki rolleri çeşitli çalışmalarla ortaya konulduktan sonra araştırmacılar erken doğum eylemi (EDE) olan gebelerde MMP’lerin etkisini inceleyen çalışmalara yönelmiştir. Yapılan kısıtlı sayıda çalışma olsa da MMP’lerin gerek term gerekse preterm doğumlarda tetikleyici mekanizmanın bir parçası olduğu görüşü son yıllarda önem kazanmıştır.

Makrakis ve ark.’nın 60 gebe üzerinde yaptıkları bir çalışmada MMP-9 düzeylerinin erken doğum eyleminde gerek kontraksiyonların durdurulamayıp doğumun gerçekleştiği gerekse erken doğum eyleminin durdurulduğu gebelerde artış gösterdiğini bulmuştur. Bununla birlikte doğum eylemi durdurulamayan gebelerdeki artışın durdurulan gebelere kıyasla daha fazla olduğunu ve gerçek doğum eylemini belirlemede MMP-9’un serum cut-off değerinin 68,45 ng/ml (pozitif prediktif değeri %87,5, negatif prediktif değeri %83,3) olduğunu saptamışlardır (68). Benzer şekilde Maymon ve ark. ile Xu ve ark. da erken doğum eyleminde MMP-9 düzeylerinin arttığını gösterirken, MMP-2 düzeyinin EDE’de artmadığını saptamışlardır (51, 69). Athayde ve ark. da erken doğum eyleminde amniotik mayideki MMP-9 düzeyinin normal doğum eylemindeki düzeylerine oranla 5 kat daha fazla olduğunu saptamışlardır (70).

Erken doğum eyleminde MMP-9’un yanı sıra MMP-3 düzeylerinin de arttığı gösterilmiştir. Park ve ark. gerek term doğumda gerekse preterm doğumda amniotik mayide artmış MMP-3 düzeylerinin olduğunu göstermişlerdir (71).

MMP’lerin erken doğum eylemindeki etkilerini ortaya koyan bir diğer çalışma ise Koscica ve ark. tarafından fareler üzerinde gösterilmiştir. Erken doğum eyleminin indüklendiği farelerden MMP inhibitörü verilenlerinde erken doğum eyleminin durduğu ve doğuma kadar geçen sürenin uzadığı gösterilmiştir (72).

2.3.5. Gestasyonel Hipertansiyon, Preeklampsi ve Matriks Metalloproteinazlar

Preeklampsi kompleks ve multifaktöryel bir etyolojiye sahip, sıklıkla zayıf trofoblastik invazyon ve zayıf maternal spiral arter transformasyonu ile karakterize bir hastalıktır. Birçok çalışma MMP'lerin trofoblast invazyonundaki düzenleyici rollerini göstermiştir (73-75). Bununla birlikte uygun bir trofoblast invazyonu için MMP/TIMP dengesinin optimal olması gerekliliği Blankenship ve ark. ile Freitas ve ark.'nın çalışmalarında gösterilmiştir (76, 77). Azalmış MMP aktivitesine bağlı maternal spiral arterlerindeki zayıf trofoblast invazyonun da preeklampsi etyolojisinde rolü olduğunu savunan çalışmalar mevcuttur (76).

Palei ve ark.'nın gestasyonel hipertansiyon veya preeklampsi saptanan 53 gebe üzerinde yaptıkları bir çalışmada MMP-9 düzeylerinin ve MMP-9/TIMP-1 oranlarının gestasyonel hipertansiyona sahip gebelerde normotansif gebelere oranla daha yüksek olduğunu ancak preeklamptik gebelerde normotansif gebelere kıyasla MMP-9 düzeylerinin azaldığını ortaya koymuşlardır (78). Benzer şekilde Narumiya ve ark. ile Kolben ve ark. da preeklamptik gebelerde MMP-9 düzeylerinin düşük olduğunu göstermişlerdir (79, 80). Buradan yola çıkarak Palei ve ark. preeklampsi gelişiminde MMP-9'un rolü olmadığı yorumunda bulunmuşlardır. Ancak patofizyolojik açıdan gestasyonel hipertansiyon gelişiminde MMP-9'un endotelin aktivasyonu ile vazokonstriksiyona yol açarak hipertansiyona sebep olduğunu iddia etmelerine rağmen, preeklampsi patofizyolojisinde de benzer mekanizmaların rolü olduğu görüşünü bir kenara itip, preeklampside MMP-9 düzeylerindeki azalmanın nedenini açıklayacak bir mekanizma ortaya koyamamışlardır (78). Bankowski ve ark.'nın preeklamptik gebelerden doğan infantların kordlarında, normotansif gebelerden doğan infantların kordlarına kıyasla 2 kat daha fazla kollajen olduğunu saptamalarının ardından, Galewska ve ark.'nın preeklamptik gebelerden doğan infantların kord kanında yaptıkları bir incelemede MMP-1, MMP-9 ve MMP-3 düzeylerinin, normotansif gebelerden doğan infantların kord kanlarındaki değerlerden daha düşük olduğunu saptamışlardır. Azalmış bu MMP düzeylerinin preeklampsi ile ilişkisini ise umbilikal kord duvarında azalmış olan kollajen yıkımına sekonder duvarda kollajen plaklarının birikimine, elastin düzeyinin azalmasına ve

bunun da kord kompliyansını azaltarak periferik direnç artışı nedeniyle fetüse giden kan miktarında azalışa bağlamışlardır (81, 82).

MMP-2'nin gestasyonel hipertansiyon ve preeklampsideki rolünü inceleyen çalışmalara baktığımızda ise Palei ve ark. preeklamptik veya hipertansif gebelerde normotansif gebelere kıyasla MMP-2 düzeylerinde bir farklılık saptamazken, Narumiya ve ark. ile Myers ve ark. preeklampside MMP-2 düzeylerinde artış olduğunu göstermişlerdir (78, 79, 83). Myers ve ark. MMP-2/TIMP-1 dengesindeki bozulmanın preeklamptik gebelerde 22. gebelik haftasında başladığını ve bu haftada bakılan MMP-2 ve TIMP-1 düzeylerinin preeklampsiyi öngörmeye kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir. MMP-2'nin preeklampsi patofizyolojisindeki rolü ise vazoaaktif peptidleri aktive etmesine bağlanmıştır (83). Öyle ki Fernandez ve ark. MMP-2'nin, büyük endotelin molekülünü yıktığını, bunun sonucunda potent bir vazokonstriktörün ortaya çıktığını ve vazodilatatör etkisi olan kalsitonin gen ilişkili peptidin kapasitesinde azalmaya yol açtığını ispatlamışlardır (84). Preeklampside MMP-2 düzeyinin artışı ise umbilikal korddaki düşük oksijen düzeylerine bağlanmaktadır (85).

2.3.6. İntrauterin Gelişme Geriliği ve Matriks Metalloproteinazlar

İntrauterin gelişme geriliği (IUGR) gelişiminde MMP'lerin rolünü inceleyen literatürde kısıtlı sayıda çalışma mevcuttur. Gremlich ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada MMP-2 gen mutasyonu olan fetüslerde IUGR riskinin 2,3-3,6 kat arttığı bulunmuştur. MMP-2 gen mutasyonunun da yetersiz plasentasyona neden olması sebebiyle IUGR riskini doğurduğu öne sürülmüştür (86). Merchant ve ark. da IUGR saptanan gebeliklerin doğumdan sonra elde edilen plasentalarında MMP-2, MMP-9 ve TIMP-1 düzeylerinin term doğumlardan elde edilen plasentalara kıyasla daha düşük olduğunu saptamışlardır. Bu düşük MMP aktivitesinin de plasentasyon bozukluğuna yol açarak IUGR'a neden olduğu görüşünü ortaya atmışlardır (87).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırma Gruplarının Belirlenmesi

Çalışma ve kontrol grupları Ankara Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı antenatal polikliniğine ve jinekoloji polikliniğine başvuran hastalardan oluşmuştur. Çalışma ve kontrol grubuna dahil edilen tüm bireyler çalışma hakkında bilgilendirilmiş ve “Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu” (Ek. 1.) aracılığı ile çalışma için izinleri alınmıştır.

Araştırmaya abortus imminens grubu, gebe kontrol grubu ve normal kontrol grubu olmak üzere 3 ayrı grupta toplam 80 hasta dahil edilmiştir. “Abortus imminens grubu”na Ankara Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı antenatal polikliniğine başvuran 20 haftanın altında, spontan olarak gebe kalmış, çoğul gebeliğe ve kötü obstetrik öyküye (önceki gebeliklerinde ölü doğum, düşük, prematürite, preeklampsi, anomalili fetüs veya yenidoğan, intrauterin gelişme geriliğine sahip fetüs öyküsü) sahip olmayan ve hiçbir dahili problemi (düzenli veya aralıklı ilaç kullanımı veya sürekli kontrol gerektiren sistemik kronik herhangi bir hastalık mevcudiyeti; örn. kronik hipertansiyon, diabetes mellitus, akut veya kronik böbrek yetmezliği, astım, hipertiroidi, hipotiroidi, kronik veya aktif hepatit, kardiyak hastalıklar [kapak, damar veya duvar fonksiyon bozuklukları], immünolojik bozukluklar vb.) olmayan uterin kaynaklı kanlı vajinal akıntıya sahip olup abortus imminens tanısı almış, 18-35 yaş arası 30 gebe alınmıştır. “Gebe kontrol grubu”na ise Ankara Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı antenatal polikliniğine başvuran, 20 haftanın altında, çoğul gebeliğe ve kötü obstetrik öyküye sahip olmayan, herhangi bir şikayeti ve dahili problemi olmayan 18-35 yaş arası 25 gebe; “normal kontrol grubu”na ise Ankara Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı jinekoloji polikliniğine rutin jinekolojik muayene amacıyla başvuran, kötü obstetrik öyküye sahip olmayan, dahili ve jinekolojik hiçbir hastalığı bulunmayan 18-35 yaş arası 25 kadın gönüllü dahil edilmiştir. Bu kriterlere uymayan ve araştırmaya katılmayı kabul etmeyen bireyler ise çalışmaya dahil edilmemiştir. Araştırmaya dahil edilen her bir bireyin kimlik bilgileri, demografik özellikleri, obstetrik öyküsü ve sistemik hastalık öyküsü “Hasta Takip Formu” (Ek. 2.) üzerine kaydedilip daha sonra elektronik ortama aktarılmıştır.

3.2. Serum Örneklerinin Toplanması ve Saklanması

Araştırmaya dahil edilen tüm bireylerden vacutainer sistemi ile ön koldan yaklaşık 10 ml periferik kan örneği herhangi bir antikoagülan veya diğer katkı maddelerini içermeyen düz tüplere alınıp, pıhtılaşmanın sağlanması için 30 dk bekledikten sonra 3000xg'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında ayrıştırılmış olan serum örnekleri, her birinde 1,5 ml olacak şekilde 2 ayrı eppendorf tüpüne aktarılmış ve tüpler çalışma gününe kadar -80 °C'de saklanmıştır.

3.3. Serum Örneklerinde MMP-2 ve MMP-9 Düzeylerinin Tespiti

Araştırmanın laboratuvar incelemeleri Ankara Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı İmmunoloji ve Alerji Bilim Dalı İmmunoloji Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır. Serum örneklerindeki MMP-2 ve MMP-9 düzeylerinin tespiti "*Human Serum Quantikine MMP-2 Immunoassay Kit (R&D Systems, Minneapolis, USA)*" ve "*Human Serum Quantikine MMP-9 Immunoassay Kit (R&D Systems, Minneapolis, USA)*" kullanılarak *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Enzim bağlı immün assay; ELISA) yöntemi ile yapılmıştır. Her bir serum örneği 2 kez çalışılmış ve standart eğrinin lineer aralığından daha yüksek düzeyde MMP-2 veya MMP-9 düzeyi saptanan serum örnekleri dilüe edilerek tekrar çalışılmıştır.

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

Gebe kontrol grubu ile normal kontrol grubu arasında yaş, vücut kitle indeksi (BMI), MMP-2 düzeyleri, MMP-9 düzeyleri ve sigara içme oranları karşılaştırılmıştır. Gebe kontrol grubu ile abortus imminens grubu arasında ise yaş, BMI, gestasyonel hafta (DGA), MMP-2 düzeyleri, MMP-9 düzeyleri ve sigara içme oranları karşılaştırılmıştır. Parametrik verilerde normalizasyon testleri yapıldıktan sonra normalizasyona uyan gruplar Student-t test kullanılarak, uymayan gruplar ise Mann-Whitney Rank Sum Testi kullanılarak istatistiksel analiz yapılmıştır. Nonparametrik veriler ise ki-kare testi kullanılarak analiz edilmiştir.

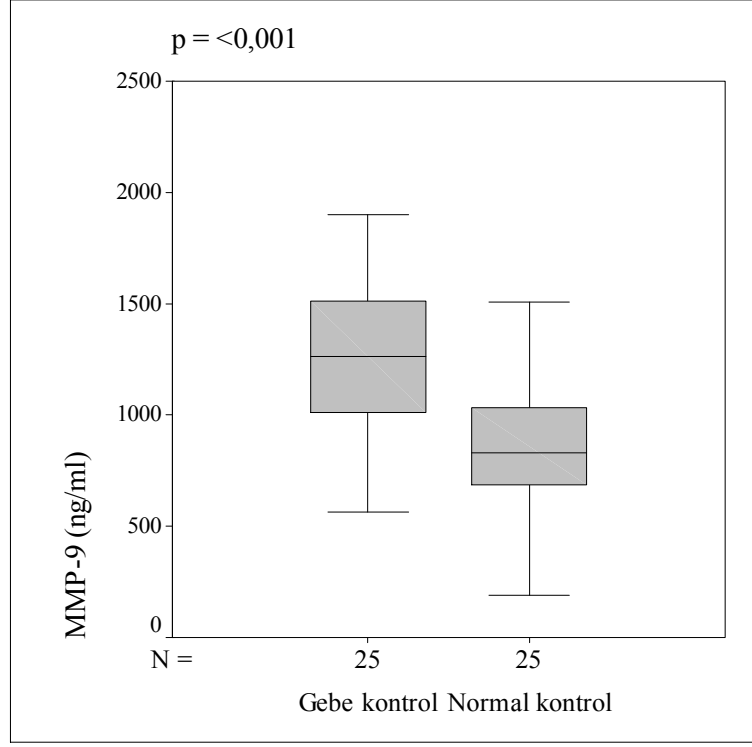
4. BULGULAR

Çalışmada ilk olarak gebe kontrol grubundaki ve normal kontrol grubundaki bireyler karşılaştırılmıştır. Elde edilen veriler Tablo 4.1’de gösterilmektedir. Her iki grup arasında yaş, BMI, sigara içimi açısından istatistiksel açıdan fark saptanmamıştır. Ancak gebe kontrol grubunda primigravid oranı normal kontrol grubuna göre daha fazladır ($p=0,011$). Gebe kontrol grubunda ortalama MMP-9 düzeyinin ($1275,24\pm329,203$) normal kontrol grubuna göre ($890,24\pm378,295$) anlamlı derecede daha yüksek olduğu görülmüştür ($p = <0,001$) (Şekil 4.1). MMP-2 ortalamaları açısından ise gebe kontrol ve normal kontrol grubu arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0,072$) (şekil 4.2).

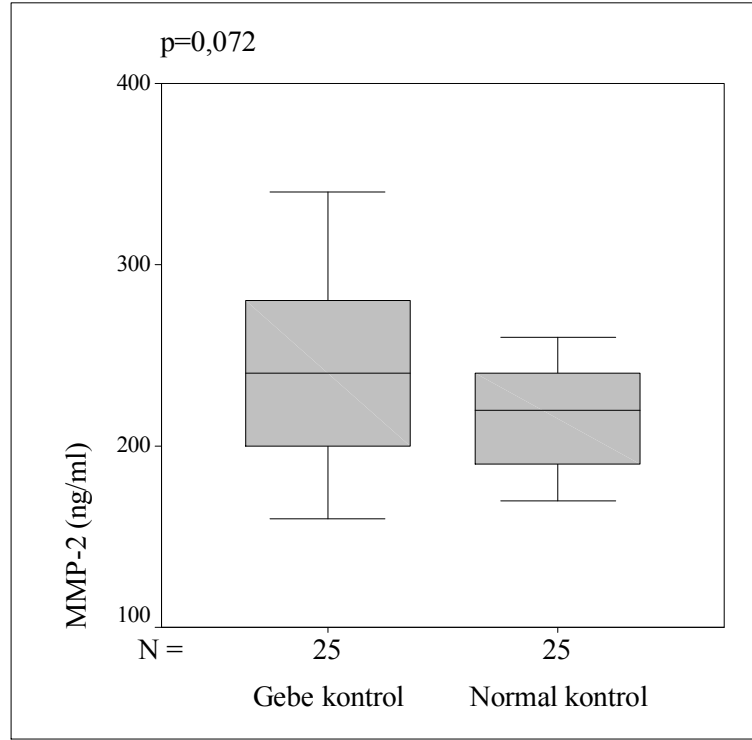
Tablo 4.1: Normal kontrol ve gebe kontrol gruplarının karşılaştırılması

	Normal Kontrol (<i>n</i> = 25)	Gebe Kontrol (<i>n</i> = 25)	<i>P</i>
Yaş (yıl)			
Ortalama (\pm SS)	24,44 (\pm 3,80)	23,84 (\pm 3,90)	0,585*
BMI (kg/m^2)			
Ortalama (\pm SS)	23,45 (\pm 3,01)	22,46 (\pm 2,58)	0,216*
Sigara Kullanımı (<i>n</i>)	10	3	0,051 [#]
Primigravid (<i>n</i>)	8	18	0,011 [#]
MMP-2 (ng/ml)			
Ortalama (\pm SS)	220,200 (\pm 36,982)	243,000 (\pm 49,812)	0,072*
MMP-9 (ng/ml)			
Ortalama (\pm SS)	890,240 (\pm 378,295)	1275,200 (\pm 329,203)	<0,001*

SS= Standart sapma
BMI= Vücut kitle indeksi
* = Student t-test kullanılmıştır
= Ki-Kare testi kullanılmıştır



Şekil 4.1: Gebe kontrol ve normal kontrol gruplarının ortalama MMP-9 düzeyleri

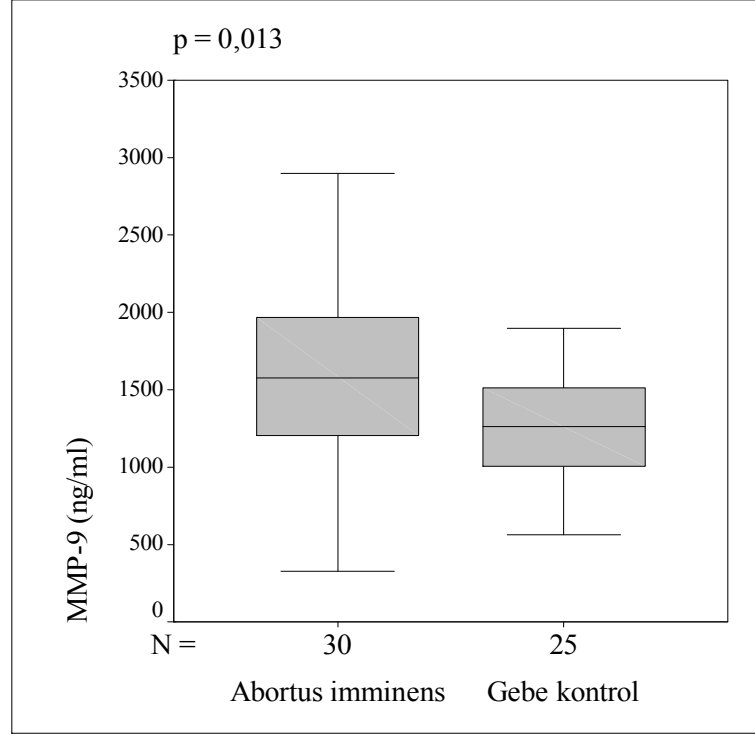


Şekil 4.2: Gebe kontrol ve normal kontrol gruplarının ortalama MMP-2 düzeyleri

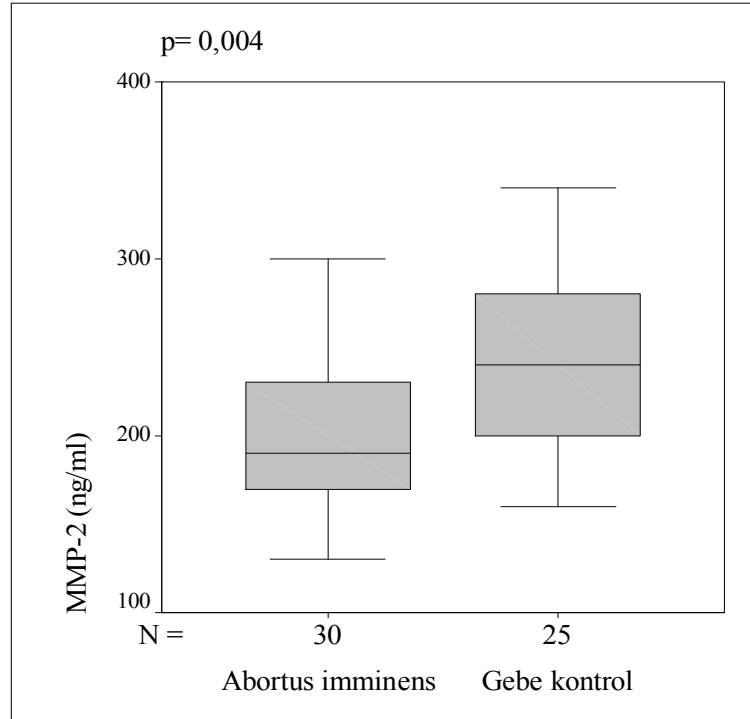
Çalışmanın ikinci aşamasında abortus imminens grubundaki hastalar ile gebe kontrol grubundaki bireyler karşılaştırılmıştır. Elde edilen veriler Tablo 4.2’de gösterilmektedir. Her iki grup arasında yaş, BMI, sigara kullanımı, primigravid oranı ve gebelik yaşı açısından istatistiksel fark yoktur. Abortus imminens grubundaki MMP-9 düzeyleri gebe kontrol grubuna oranla daha yüksek bulunmuştur (p=0,013) (Şekil. 4.3). MMP-2 düzeyleri ise abortus imminens grubunda daha düşüktür (p=0,004) (Şekil 4.4).

Tablo 4.2: Abortus imminens ve gebe kontrol gruplarının karşılaştırılması

	Abortus İminens (n= 30)	Gebe Kontrol (n= 25)	p
Yaş (yıl)			
Ortalama (±SS)	25,96 (±4,83)	23,84 (±3,90)	0,083*
BMI (kg/m²)			
Ortalama (±SS)	24,000(±3,816)	22,462 (±2,589)	0,082*
Gebelik yaşı (hafta)			
Ortanca	9,5	11,0	0,132 ^Δ
IQR	(7,0 - 12,0)	(9,0 - 12,0)	
Sigara Kullanımı (n)	4	3	1,00 [#]
Primigravid (n)	16	18	0,192 [#]
MMP-2 (ng/ml)			
Ortanca	190,00	240,00	0,004 ^Δ
IQR	(170,00 - 230,00)	(198,75 - 282,50)	
MMP-9 (ng/ml)			
Ortanca	1574,50	1262,00	0,013 ^Δ
IQR	(1205,00 - 1965,00)	(1001,75 - 1513,25)	
SS= Standart sapma			
IQR = Çeyrek değerler arası genişlik (Interquartile Range)			
* = Student t-testi kullanılmıştır			
[#] = Ki-Kare testi kullanılmıştır			
^Δ = Mann-Whitney U testi kullanılmıştır			



Şekil 4.3: Abortus imminens ve normal kontrol gruplarının MMP-9 düzeyleri



Şekil 4.4. Abortus imminens ve normal kontrol gruplarının MMP-2 düzeyleri

MMP-9 ve MMP-2 düzeylerinin gebelik haftasından etkilenip etkilenmediğini belirlemek amacıyla ise abortus imminens ve gebe kontrol grubundaki bireyler 10. gebelik haftasından küçük veya büyük gebeliğe sahip olmaları açısından iki alt gruba ayrılmış ve her iki grubun alt grupları kendi aralarında karşılaştırılmıştır (Tablo 4.3 ve Tablo 4.4).

10 haftanın altında gebeliğe sahip her iki gruptaki bireyler arasında yaş, BMI, gebelik haftası, sigara kullanımı, primigravid oranı açısından istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. MMP-2 düzeylerinin 10 haftanın altındaki abortus imminensli hastalarda istatistiksel olarak daha düşük düzeylerde bulunduğu saptanırken ($p=0,026$), MMP-9 düzeyleri arasında bir fark saptanmamıştır ($p=0,609$) (Tablo 4.3).

Tablo 4.3: Abortus imminens ve gebe kontrol gruplarındaki 10 hafta altında gebeliğe sahip olan bireylerin karşılaştırılması

	<10 hafta Abortus İminens (n=15)	<10 hafta Gebe Kontrol (n=7)	p
Yaş (yıl)			
Ortalama (\pm SS)	26,13 (\pm 5,76)	23,14 (\pm 3,48)	0,223*
BMI (kg/m^2)			
Ortalama (\pm SS)	24,22 (\pm 3,955)	21,74 (\pm 2,36)	0,144*
Gebelik yaşı (hafta)			
Ortalama (\pm SS)	7,2 (\pm 1,2)	8,0 (\pm 0,8)	0,129*
Sigara Kullanımı (n)	1	0	1,0 [#]
Primigravid (n)	9	6	0,35 [#]
MMP-2 (ng/ml)			
Ortalama (\pm SS)	203,667 (\pm 44,620)	257,857 (\pm 58,442)	0,026*
MMP-9 (ng/ml)			
Ortalama (\pm SS)	1649,467 (\pm 631,958)	1515,00 (\pm 368,776)	0,609*

SS= Standart sapma
* = Student t-testi kullanılmıştır
= Ki-Kare testi kullanılmıştır

10 haftanın üzerinde gebeliğe sahip her iki gruptaki bireyler arasında da yaş, BMI, gebelik haftası, sigara kullanımı, primigravid oranı açısından istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. Ancak 10 haftanın üzerindeki abortus imminensli hastalarda istatistiksel olarak MMP-2 düzeylerinin daha düşük düzeylerde bulunduğu ($p=0,049$), MMP-9 düzeylerinin ise daha yüksek olduğu saptanmıştır ($p=0,017$) (Tablo 4.4).

Tablo 4.4: Abortus imminens ve gebe kontrol gruplarındaki 10 hafta üzerinde gebeliğe sahip olan bireylerin karşılaştırması

	>10 hafta Abortus İminens ($n=15$)	>10 hafta Gebe Kontrol ($n=18$)	p
Yaş (yıl)			
Ortalama (\pm SS)	25,80 (\pm 3,89)	24,11 (\pm 4,11)	0,238*
BMI (kg/m^2)			
Ortalama (\pm SS)	23,777 (\pm 3,798)	22,739 (\pm 2,683)	0,382*
Gebelik yaşı (hafta)			
Ortanca	12,0	12,0	0,651 Δ
IQR	(10,2-12,5)	(10,0-12,0)	
Sigara Kullanımı (n)	4	3	1,0 $\#$
Primigravid (n)	7	12	0,118 $\#$
MMP-2 (ng/ml)			
Ortalama (\pm SS)	205,00 (\pm 43,095)	237,222 (\pm 46,597)	0,049*
MMP-9 (ng/ml)			
Ortalama (\pm SS)	1609,533 (\pm 583,653)	1182,00 (\pm 63,30)	0,017*

SS= Standart sapma
IQR = Çeyrek değerler arası genişlik (Interquartile Range)
* = Student t-testi kullanılmıştır
= Ki-Kare testi kullanılmıştır
 Δ = Mann-Whitney U testi kullanılmıştır

Çalışmada karşılaştırılan bir diğer parametre ise abortus imminens grubundaki gebelerde subkoryonik hematoma varlığının MMP-9 ve MMP-2 düzeyleri ile ilişkisidir. Bu amaçla abortus imminens grubundaki gebeler hematoma varlığı açısından 2 alt gruba ayrılmış (hematom var / hematoma yok) ve bu iki alt grup birbirleriyle karşılaştırılmıştır (Tablo 4.5). İstatistiksel olarak MMP-9 ve MMP-2 düzeylerinin hematoma varlığı açısından her iki alt grup arasında farklı olmadığı görülmüştür (sırasıyla $p=1,0$ ve $p=0,651$) (Tablo 4.5).

Tablo 4.5: Abortus imminens grubundaki gebelerin subkoryonik hematoma varlığı açısından karşılaştırılması

	Hematoma (+) (n=9)	Hematoma (-) (n=21)	p
Yaş (yıl)			
Ortalama (\pm SS)	23,55 (\pm 4,12)	27,00 (\pm 4,83)	0,073*
BMI (kg/m^2)			
Ortalama (\pm SS)	24,17 (\pm 4,75)	23,925 (\pm 3,47)	0,874*
Gebelik yaşı (hafta)			
Ortalama (\pm SS)	9,4 (\pm 2,6)	9,4 (\pm 2,6)	0,988*
Sigara Kullanımı (n)	3	1	0,069 [#]
Primigravid (n)	5	11	1,0 [#]
MMP-2 (ng/ml)			
Ortanca	190,00	190,00	0,651 $^{\Delta}$
IQR	(165,00-230,00)	(177,50-232,50)	
MMP-9 (ng/ml)			
Ortanca	1597,00	1552,00	1,0 $^{\Delta}$
IQR	(1256,75-1975,25)	(1169,50-2019,00)	

SS= Standart sapma
IQR = Çeyrek değerler arası genişlik (Interquartile Range)
* = Student t-testi kullanılmıştır
[#] = Ki-Kare testi kullanılmıştır
 $^{\Delta}$ = Mann-Whitney U testi kullanılmıştır

Gebelik sonuçları açısından bakıldığında abortus imminens tanısı alarak çalışmaya dahil edilen 30 gebeden 3'ünde abort gerçekleşmiştir. Bu gebeliklerden birincisi 7⁵ haftada missed abortus şeklinde, diğer ikisi ise 12¹ haftada ve 15² haftada spontan abortus şeklinde sonlanmıştır. Geriye kalan 27 gebeden 20'sinin gebeliği canlı doğum ile sonuçlanmıştır. 7 gebenin ise gebeliği üçüncü trimestere kadar ulaşmış ve halen devam etmektedir. Abortus ile sonuçlanan gebelerin sayısındaki yetersizlik nedeniyle MMP-2 ve MMP-9 düzeylerinin abortusu öngörmedeki rolleri istatistiksel açıdan değerlendirilmemiştir.

5. TARTIŞMA

Bu çalışma, bizim bilgilerimize göre abortus imminens vakalarında MMP'lerin rolünü ve gebelikteki serum MMP-2 ve MMP-9 düzeylerini inceleyen ilk çalışmadır. Çalışma iki boyutta ele alınmıştır; MMP-2 ve MMP-9'un *i)* Gebelikteki değişimlerini, *ii)* Abortus imminensdeki değişimlerini incelemek.

Çalışma sonunda serum MMP-2 düzeylerinin sağlıklı gebeler ile gebe olmayan sağlıklı kadınlar arasında anlamlı bir farklılık göstermediği (MMP-2 ortalamaları sırasıyla 243,0 ng/ml ve 220,2 ng/ml [$p=0,072$]), MMP-9 düzeylerinin ise sağlıklı gebelerde, sağlıklı kadınlara oranla daha yüksek olduğu (MMP-9 ortalamaları sırasıyla 1275,2 ng/ml ve 890,24 ng/ml [$p<0,001$]) saptanmıştır. Her ne kadar erken gebelik haftalarında MMP-2 ve MMP-9 düzeylerinin serumdaki değişimlerini inceleyen bir çalışma bugüne kadar yayınlanmış olmasa da gerek trofoblastlarda gerekse desiduada MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunun ilk trimesterde arttığını gösteren yayınlar mevcuttur. Örneğin Seval ve ark.'nın yaptıkları bir çalışma ile gebeliğin ilk 4 haftasında desidual hücrelerde MMP-2, trofoblastik hücrelerde ise MMP-9 konsantrasyonunun daha baskın olduğu gösterilmiştir (88). Bugüne kadar yapılmış birçok çalışma MMP-9'un trofoblast invazyonunda MMP-2'ye göre daha önemli bir rol oynadığı görüşünü ortaya koymuştur (35, 36, 89-91). Ancak bu çalışmaların aksine Isaka ve ark.'nın ilk trimester trofoblast örnekleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada MMP-2'nin ekstravillöz trofoblastlardan, MMP-9'un ise villöz trofoblastlardan daha fazla sentezlendiği, bu nedenle de trofoblast invazyonunda MMP-2'nin rolünün daha önemli olduğu sonucuna varılmıştır (92). Benzer şekilde Staun-Ram ve ark.'nın yaptıkları bir çalışma sonucunda, erken gebelik haftalarındaki trofoblast invazyonunda MMP-2'nin rolünün daha fazla olduğu, ancak gebeliğin 6-7. haftasından sonra MMP-2 ekspresyonunun azaldığı, MMP-9 ekspresyonunun ise arttığı gösterilmiştir (93). Bizim çalışmamızda da sağlıklı gebelerde serum MMP-9 düzeylerinin, gebe olmayan sağlıklı bireylere oranla anlamlı derecede daha fazla olduğu görülmüştür. Bunun da, gebeliğin devamı esnasında trofoblastlardan salgılanan MMP-9'un maternal kana geçişinin bir yansıması olduğu düşünülmektedir. Normal bir gebeliğin devamı için gerekli olduğu gösterilen bu iki

metalloproteinazdan MMP-2'nin gebelerdeki ve sağlıklı bireylerdeki serum konsantrasyonlarında belirgin bir farklılığın olmaması ise, Staun-Ram ve ark.'nın yaptıkları çalışmaya dayandırılarak, MMP-2'nin 6. gebelik haftasından sonra trofoblastlardaki sekresyonunun ve bunun serumdaki düzeyine yansımalarının azalması nedenine bağlanabilir. Öyle ki çalışmaya dahil edilen sağlıklı gebelerin gestasyonel yaşları 7-13. hafta arasında değişmektedir.

Çalışmadan elde edilen ikinci ana sonuç ise, abortus imminens grubundaki metalloproteinaz düzeyleri gebe kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, abortus imminens grubunda MMP-2 düzeyinin daha düşük ($p=0,004$), MMP-9 düzeyinin ise daha yüksek değerlerde ($p=0,013$) olmasıdır.

MMP-2'nin, gerek kanser hücreleri gerekse normal endometriyal hücreler ve gebelik materyallerinden elde edilen örnekler ile yapılan çalışmalarda anjiogenez üzerindeki etkileri aşikardır. Iurlaro ve ark. endometrium kanserinde gerek MMP-2'nin gerekse MMP-9'un yeni damarlanma artışı olan bölgelerde yoğun bir şekilde sentezlendiğini göstermişlerdir (94). Bunun yanı sıra endotelial hücrelerde MMP-2'nin MMP-9'a kıyasla daha fazla sentezlendiğini bildiren çalışmalar da mevcuttur (88, 95). Uygun bir plasentasyon için yeterli trofoblast invazyonunun yanı sıra yeni damar oluşumunun gerekliliği de çalışmalarla ortaya konmuş bir gerçektir (96). Dolayısıyla ilk trimesterdeki gebeliğin gelişimi esnasında, gerek trofoblastların endometriuma invazyonunda gerekse plasentasyondaki yeni damar gelişiminde MMP-2'nin rolü yadsınamaz. Tüm bu verilerin ışığında, bu çalışmadan elde edilen veriler göz önüne alınacak olunursa, abortus imminens grubundaki hastalarda MMP-2 düzeylerinin daha düşük olması, bu hasta grubundaki plasentasyon bozukluğunun bir göstergesi olabilir. Bu çalışma her ne kadar hücresel temelde yapılmamış olsa da doku bazındaki defektif MMP-2 fonksiyonlarının çeşitli hastalıklarda (özellikle preeklampside) serolojik yansımalarının olduğu bilinmektedir (79,80, 82, 83). Bu nedenle abortus imminens vakalarındaki serum MMP-2 düzeylerinin düşüklüğü doku bazında bir plasentasyon sorununa işaret edebileceğini düşündürmektedir.

Çalışma sonucunda MMP-9'un abortus imminensli hastalarda daha yüksek düzeylerde saptanmasının ise MMP-2 düzeyindeki azalmaya sekonder, reaktif bir cevap olduğu düşünülmektedir. Azalan MMP-2 aktivasyonunun trofoblast

invazyonu ve yeni damar gelişiminde yeteri kadar ESM degradasyonuna yol açamaması MMP-9 tarafından kompanse edilip bu şekilde plasantasyonun devamlılığının sağlanması muhtemel gözükmektedir. Öyle ki Xu ve ark. MMP-9'un çevredeki ESM bileşenleri tarafından lokal kontrolünün MMP-2'ye nazaran daha fazla olduğunu ve MMP-9'un çevre ESM bileşenlerinin içeriğine göre aktivasyonunda değişiklikler olduğunu bildirmişlerdir (97). Bizim düşüncemize göre MMP-2 tarafından yeteri kadar degradasyonu yapılamayan, bu nedenle de çevre dokuda artan ESM bileşenleri trofoblastları aktive ederek MMP-9 konsantrasyonunun artmasına ve plasantasyon için gerekli olan ESM yıkımının devamlılığının sağlanmasına yol açmaktadır. Bu nedenle abortus imminensli vakalarda MMP-9 düzeyleri daha yüksek saptanmaktadır. Ancak bu görüşün desteklenebilmesi için hücre bazda yapılacak olan çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Gebelik haftası göz önüne alındığında MMP-2 düzeylerinin gerek 10 haftanın altında gerekse 10 haftanın üstünde abortus imminensli hastalarda sağlıklı gebelere kıyasla daha düşük olduğunu görmekteyiz. Ancak MMP-9 düzeyleri açısından baktığımızda 10 hafta altında her iki grup arasında anlamlı bir farklılık olmadığını görmekteyiz. Bunun nedeninin de MMP-9'un özellikle ilerleyen gebelik haftalarındaki rolünün daha baskın olmasına bağlamaktayız (93).

Abortus imminens tanısı almış bireylerde hematoma varlığının MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri ile ilişkisine baktığımızda hematoma olan ve olmayan hastalardaki MMP-9 ve MMP-2 düzeylerinde anlamlı bir fark olmadığı sonucuna varılmıştır. Ancak MMP'lerin abortus imminensde hematoma gelişiminde sorumlu olmadığı sonucuna varabilmek için daha geniş kapsamlı çalışmaların yapılması gerekmektedir. Öyle ki gebelikteki gerek trofoblast invazyonu gerekse anjiogenez aşamasındaki rolleri kanıtlanmış bu metalloproteinazların inhibisyon mekanizmalarındaki anormal kontrolünün böyle bir komplikasyona yol açması muhtemel gibi gözükmektedir. Ancak bu çalışmada bunu destekleyecek sonuçlara gerek hasta sayısındaki azlık, gerekse abortus imminens vakalarından elde edilecek materyallerin hücre bazda incelenmesine engel olacak etik sorunlar nedeniyle ulaşılamadığı kanısına varılmaktadır.

Abortus imminens tanısı olarak çalışmaya dahil edilen gebelerin gebelik sonuçları ile MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri arasında istatistiksel açıdan bir karşılaştırma hasta sayısının azlığı nedeniyle yapılamamıştır. Öyle ki çalışmaya dahil edilen 30 abortus imminens vakasından sadece 3'ünün gebeliği abortus (1 gebelik missed abortus, 2 gebelik spontan abortus) ile sonuçlanırken, geriye kalan 27 gebeden 20'sinin gebeliği canlı doğum ile sonuçlanmıştır. 7 gebenin ise gebeliği üçüncü trimestere kadar ulaşmış ve halen devam etmektedir. Bu veriler ışığında MMP-2 ve MMP-9 düzeylerinin abortus imminens vakalarındaki gebelik sonuçlarını öngörebilmeleri adına değerlendirme yapabilmek için yeterli hasta sayısına bu çalışmada ulaşılamamıştır. Bunun aydınlatılabilmesi için daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR

- Bu çalışmada ekstraselüler matriks yapılandırılmasında oldukça önemli işlevleri olduğu kanıtlanan matriks metalloproteinaz enzimlerinden MMP-2 ve MMP-9'un sağlıklı bireylere kıyasla gebelikteki değişimleri ve bu enzimlerin abortus imminens patofizyolojisinde rollerinin olup olmadığı araştırılmıştır.
- Çalışma sonucunda MMP-9'un gebeliğin ilk yarısındaki düzeylerinin sağlıklı bireylere oranla daha yüksek değerlerde olduğu bulunmuş, bunun da MMP-9'un gebeliğin gelişimi ve plasentasyon aşamalarındaki daha önceden kanıtlanmış olan etkilerinin serolojik bir yansıması olduğu sonucuna varılmıştır. Sağlıklı bireyler ve sağlıklı gebeler arasında MMP-2 düzeylerinde böyle bir farklılığın saptanmaması ise 6. gebelik haftasından sonra bu enzimin desidua ve trofoblastlardaki sekresyonunun azalması nedeniyle olduğu düşünülmüştür.
- Abortus imminens tanısı almış gebelerde, sağlıklı gebelere oranla serum MMP-2 düzeyleri daha düşük, serum MMP-9 düzeyleri ise daha yüksek bulunmuştur. MMP-2 düzeyindeki bu düşüklüğün plasentasyon aşamasındaki bir soruna işaret etmekte olduğunu ve bu düşüklüğün MMP-9 düzeylerinin arttırılarak kompanse edilmeye çalışıldığını düşünmekteyiz. Ancak bu hipotezin kanıtlanabilmesi için trofoblast ve desidua hücrelerinden oluşturulmuş hücre kültürlerinde bu iki enzimin interaksiyonunu incelemek gerekmektedir.
- MMP-2 ve MMP-9 serum düzeylerinin, abortus imminens tanısı almış gebelerde gebeliğin sonuçlarını öngörebilmesindeki etkinliklerine yönelik inceleme hasta sayısının yetersizliği nedeniyle bu çalışmada yapılamamıştır. Bu nedenle daha fazla hasta sayısına sahip, daha geniş kapsamlı çalışmalar ile bu konuyla ilgili literatür eksikliğinin kapatılabileceği görüşüne sahibiz.

ÖZET

ABORTUS İMMİNENS VAKALARINDA MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-9 VE MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-2 DÜZEYLERİNİN TESPİTİ

Çoğu zaman etiyolojik nedeni aydınlatılmayan abortus imminensin temelinde moleküler bazı defektlerin olduğu düşünülmektedir. Ekstraselüler matriksin düzenlenmesinde görev alan ve proteolitik aktiviteye sahip bir grup enzimden oluşan “Matriks metalloproteinaz (MMP)” enzim sisteminin gebelikteki bazı hastalıklarda rolünün olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada bu enzim sistemine üye olan MMP-2 ve MMP-9’un gebelikteki ve abortus imminens tanısı almış gebelerdeki değişimini incelemek ve bu metalloproteinazların abortus imminens gelişimindeki rollerini ortaya koymak amaçlanmıştır.

Araştırmaya toplam 80 hasta dahil edilmiştir; çalışma grubu abortus imminens tanısı almış 30 gebeden, gebe kontrol grubu 25 sağlıklı gebeden, normal kontrol grubu ise sağlıklı 25 gönüllü kadından oluşmaktadır. Çalışmaya dahil edilen tüm hastaların serum örnekleri toplanmış ve bu örneklerde ELISA yöntemiyle MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri belirlenmiştir.

Sağlıklı gebelerdeki serum MMP-9 düzeylerinin sağlıklı kadınlara kıyasla daha yüksek (sırasıyla 1275,2 ng/ml ve 890,24 ng/ml; $p<0,01$) olduğu saptanırken, bu iki grup arasında MMP-2 düzeyi açısından fark bulunamamıştır (sırasıyla 243,0 ng/ml ve 220,2 ng/ml; $p=0,072$). Abortus imminens grubundaki hastalarda ise sağlıklı gebelere oranla MMP-2 düzeylerinin daha düşük (sırasıyla 190,0 ng/ml ve 240,0 ng/ml; $p=0,004$), MMP-9 düzeylerinin ise daha yüksek (sırasıyla 1574,5 ng/ml ve 1262,0 ng/ml; $p=0,013$) olduğu görülmüştür.

Çalışma sonucunda abortus imminensde serum MMP-2 düzeylerinde azalma olduğu, MMP-9 düzeylerinde ise artış olduğu saptanmıştır. MMP-2 düzeylerindeki bu azalmanın plasantasyon aşamasındaki bir soruna işaret edebileceği, MMP-9 artışının ise bu sorunu düzeltmek için gerçekleşen kompanzatuvar bir artış olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: Matriks metalloproteinaz-2, Matriks metalloproteinaz-9, Abortus imminens

SUMMARY

SERUM MATRIX METALLOPROTEINASE-2 AND MATRIX METALLOPROTEINASE -9 LEVELS IN THREATENED ABORTION

The etiology of threatened abortion is still unclear and it is thought that there may be some molecular defects in the pathophysiology of this disorder. It's known that the matrix metalloproteinase system which consists of many proteolytic enzymes and plays an important role in the regulation of extracellular matrix, is related with some pregnancy disorders. In this study, we investigated the changes in MMP-2 and MMP-9 serum levels in the normal pregnancy and the threatened abortion; and tried to define whether these metalloproteinases play a role in the formation of threatened abortion or not.

Eighty patient were included the study; 30 pregnant women complicated with threatened abortion (threatened abortion group), 25 healthy pregnant women (pregnant control group) and 25 healthy non-pregnant women (non-pregnant control group). Serum samples were taken from all patients and analyzed serum MMP-2 and MMP-9 levels with ELISA.

Serum MMP-9 levels were higher in healthy pregnant women than in healthy non-pregnant women (respectively 1275,2 ng/ml and 890,24 ng/ml; $p < 0,01$) and there is no statistical difference in MMP-2 levels between these groups (respectively 243,0 ng/ml and 220,2 ng/ml; $p = 0,072$). In threatened abortion group, serum MMP-2 levels were lower than healthy pregnant group (respectively 190,0 ng/ml and 240 ng/ml; $p = 0,004$) and serum MMP-9 levels were higher than healthy pregnant group (respectively 1574,5 ng/ml and 1262,0 ng/ml; $p = 0,013$).

We found that there is a decrease in serum MMP-2 levels and an increase in serum MMP-9 levels in threatened abortion. We suppose that the decrease in MMP-2 levels may indicate a placentation problem and the increase in MMP-9 levels may be due to compensatory response of trofoblasts for MMP-2 decrease.

Key Words: Matrix metalloproteinase-2, Matrix metalloproteinase-9, Threatened abortion.

KAYNAKLAR

1. Porter TF, Branch DW, Scott JR. Early pregnancy loss. In: Scott JR, Gibbs RS, Karlan BY, Haney AF, eds. Danforth's Obstetrics and Gynecology. 9th ed. Lippincott Williams and Wilkins; 2003. p.77-78.
2. Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, Baird DD, Schlatterer JP, Canfield RE, Armstrong EG, Nisula BC. Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1988; 319:189-194.
3. Johns J, Jauniaux E. Threatened miscarriage as a predictor of obstetric outcome. *Obstet Gynecol* 2006;107:845-850
4. Sotiriadis A, Papatheodorou S, Makrydimas G. Threatened miscarriage: evaluation and management. *BMJ* 2004;329;152-155.
5. Barnhart KT, Sammel MD, Rinaudo PF, Zhou L, Hummel AC, Guo W. Symptomatic patients with an early viable intrauterine pregnancy; hCG curves redefined. *Obstet Gynecol* 2004;104:50-55.
6. Mol BW, Lijmer JG, Ankum WM, van der Veen F, Bossuyt PM. The accuracy of single serum progesterone measurement in the diagnosis of ectopic pregnancy: a meta-analysis. *Human Reprod* 1998;13:3220–3227.
7. Florio P, Luisi S, D'Antona D, Severi FM, Rago G, Petraglia F. Maternal serum inhibin A levels may predict pregnancy outcome in women with threatened abortion. *Fertil Steril* 2004;81:468-470.
8. Deaton, JL, Honore, GM, Huffman, CS, Bauguess, P. Early transvaginal ultrasound following an accurately dated pregnancy: the importance of finding a yolk sac or fetal heart motion. *Hum Reprod* 1997; 12:2820-2823
9. Wyatt, PR, Owolabi, T, Meier, C, Huang, T. Age-specific risk of fetal loss observed in a second trimester serum screening population. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192:240-246.
10. Johns J, Hyett J, Jauniaux E. Obstetric outcome after threatened miscarriage with and without a hematoma on ultrasound. *Obstet Gynecol* 2003;102:483-487.

11. Mulik V, Bethel J, Bhal K. A retrospective population-based study of primigravid women on the potential effect of threatened miscarriage on obstetric outcome. *J Obstet Gynaecol* 2004;24:249-253.
12. Wijesiriwardana A, Bhattacharya S, Shetty A, Smith N, Bhattacharya S. Obstetric outcome in women with threatened miscarriage in the first trimester. *Obstet Gynecol* 2006;107:557-562.
13. Weiss JL, Malone FD, Vidaver J, Ball RH, Nyberg DA, Comstock CH, Hankins GD, Berkowitz RL, Gross SJ, Dugoff L, Timor-Tritsch IE, D'Alton ME; FASTER Consortium. Threatened abortion: A risk factor for poor pregnancy outcome, a population-based screening study. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190:745-750.
14. Kalinka J, Szekeres-Bartho J. The impact of dydrogesterone supplementation on hormonal profile and progesterone-induced blocking factor concentrations in women with threatened abortion. *Am J Reprod Immunol* 2005;53:166-171.
15. Wahabi HA, Abed Althagafi NF, Elawad M. Progestogen for treating threatened miscarriage. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;3:CD005943
16. Haas DM, Ramsey PS. Progestogen for preventing miscarriage. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;2:CD003511
17. Aleman A, Althabe F, Belizán J, Bergel E. Bed rest during pregnancy for preventing miscarriage. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;3
18. Qureshi NS, Edi-Osagie EC, Ogbo V, Ray S, Hopkins RE. First trimester threatened miscarriage treatment with human chorionic gonadotrophins: a randomised controlled trial. *BJOG* 2005;112:1536-1541.
19. Curry TE, Osteen KG. The matrix metalloproteinase system: Changes, regulation, and impact through the ovarian and uterin reproductive cycle. *Endocrine Reviews* 2003; 24: 428-465
20. Bischof P, Campana A. Molecular mediators of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000; 14: 801-814
21. Gomez DE, Alonzo DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997;74:111-122

22. Brew K, Dinakarbandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000;1477:267–283
23. Waterhouse P, Denhardt DT, Khokha R. Temporal expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in mouse reproductive tissues during gestation. *Mol Reprod Dev* 1993;35:219–226
24. Hurst PR, Palmy RD. Matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors during the implantation period in the rat uterus. *Reprod Fertil Dev* 1999;11:395–402
25. Alexander CM, Hansell EJ, Behrendtsen O, Flannery ML, Kishnani NS, Hawkes SP, Werb Z. Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternalembryonic boundary during mouse embryo implantation. *Development* 1996;122:1723–1736
26. Salamonsen LA, Nagase H, Woolley DE. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors at the ovine trophoblast-uterine interface. *J Reprod Fertil Suppl* 1995;49:29–37
27. Das SK, Yano S, Wang J, Edwards DR, Nagase H, Dey SK. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the mouse uterus during the peri-implantation period. *Dev Genet* 1997;21:44–54
28. Rechtman MP, Zhang J, Salamonsen LA. Effect of inhibition of matrix metalloproteinases on endometrial decidualization and implantation in mated rats. *J Reprod Fertil* 1999;117:169–177
29. Riley S, Webb CJ, Leask R, McCaig FM, Howe DC. Involvement of matrix metalloproteinases 2 and 9, tissue inhibitor of metalloproteinases and apoptosis in tissue remodelling in the sheep placenta. *J Reprod Fertil* 2000;118:19–27
30. Nakano M, Hara T, Hayama T, Obara M, Yoshizato K, Ohama K. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase is induced in decidual stroma without direct invasion by trophoblasts. *Mol Hum Reprod* 2001;7:271–277
31. Behrendtsen O, Alexander CM, Werb Z. Metalloproteinases mediate extracellular matrix degradation by cells from mouse blastocyst outgrowths. *Development* 1992;114:447–456

32. Yamamoto H, Flannery ML, Kupriyanov S, Pearce J, McKercher SR, Henkel GW, Maki RA, Werb Z, Oshima RG. Defective trophoblast function in mice with a targeted mutation of *Ets2*. *Genes Dev* 1998;12:1315–1326
33. Schorpp-Kistner M, Wang ZQ, Angel P, Wagner EF. JunB is essential for mammalian placentation. *EMBO J* 1999;18:934–948
34. Rudolph-Owens L, Hulboy DL, Wilson CL, Mudgett J, Matrisian LM. Coordinate expression of matrix metalloproteinase family members in the uterus of normal, matrilysin-deficient, and stromelysin-1-deficient mice. *Endocrinology* 1997;138:4902–4911
35. Shimonovitz S, Hurwitz A, Dushnik M, Anteby E, Geva-Eldar T, Yagel S. Developmental regulation of 72 kD and 92 kD type IV collagenases in human trophoblasts: a possible mechanism for control of trophoblast invasion. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:832–838
36. Librach CL, Werb Z, Fitzgerald ML, Chiu K, Corwin NM, Esteves RA, Grobelny D, Galardy R, Damsky CH, Fisher SJ. 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J Cell Biol* 1991;113:437–449
37. Autio-Harmanen H, Hurskainen T, Niskasaari K, Höyhty M, Tryggvason K. Simultaneous expression of 70 kilodalton type IV collagenase and type IV collagen al (IV) chain genes by cells of early human placenta and gestational endometrium. *Lab Invest* 1992;67:191–200
38. Bjorn SF, Hastrup N, Lund LR, Dano K, Larsen JF, Pyke C. Co-ordinated expression of MMP-2 and its putative activator, MT1-MMP, in human placentation. *Hum Reprod* 1997;3:713–723
39. Nawrocki B, Polette M, Marchand V, Maquoi E, Beorchia A, Tournier JM, Foidart JM, Birembaut P. Membrane-type matrix metalloproteinase-1 expression at the site of human placentation. *Placenta* 1996;17:565–572
40. Bjorn SF, Hastrup N, Larsen JF, Lund LR, Pyke C. Messenger RNA for membrane-type 2 matrix metalloproteinase, MT2-MMP, is expressed in human placenta of first trimester. *Placenta* 2000;21:170–176
41. Blankenship TN, King BF. Identification of 72-kilodalton type IV collagenase at sites of trophoblastic invasion of macaque spiral arteries. *Placenta* 1994;15:177–187

42. Vettraiño I, Roby J, Tolley T, Parks WC. Collagenase-1, stromelysin-1, and matrilysin are expressed within the placenta during multiple stages of human pregnancy. *Placenta* 1996;17:557–563
43. Vegh GL, Selcuk TZ, Fulop V, Genest DR, Mok SC, Berkowitz RS. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gestational trophoblastic diseases and normal placenta. *Gynecol Oncol* 1999;75:248–253
44. Rodgers WH, Matrisian LM, Giudice LC, Dsupin B, Cannon P, Svitek C, Gorstein F, Osteen KG. Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. *J Clin Invest* 1994;94:946–953
45. Zhang J, Salamonsen LA. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1, -2 and -3 in human endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 1997;3:735–741
46. Ruck P, Marzusch K, Horny HP, Dietl JA, Kaiserling E. The distribution of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) in human placenta. *Placenta* 1996;17:263–266
47. Marzusch K, Ruck P, Dietl JA, Horny HP, Kaiserling E. Immunohistochemical localization of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) in first trimester human placental decidua. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996;68:105–107
48. Parry S, Strauss JF 3rd. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med* 1998;338:663-670.
49. Vadillo-Ortega F, Estrada-Gutiérrez G. Role of matrix metalloproteinases in preterm labour. *BJOG* 2005;112:19-22.
50. Fortunato SJ, Menon R. Distinct molecular events suggest different pathways for preterm labour and premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:1399-1406.
51. Maymon E, Romero R, Pacora P, Gervasi MT, Gomez R, Edwin SS, Yoon BH. Evidence of in vivo differential bioavailability of the active forms of matrix metalloproteinases 9 and 2 in parturition, spontaneous rupture of membranes, and intra-amniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:887-894.

52. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Amniochorion gelatinase/gelatinase inhibitor imbalance in vitro: a possible infectious pathway to rupture. *Obstet Gynecol* 2000;95:240-244.
53. Athayde N, Romero R, Gomez R, Maymon E, Pacora P, Mazor M, Yoon BH, Fortunato S, Menon R, Ghezzi F, Edwin SS. MMPs-9 in preterm and term human parturition. *J Matern Fetal Med* 1999;8:213-219.
54. Uchide K, Ueno H, Inoue M, Sakai A, Fujimoto N, Okada Y. Matrix metalloproteinase-9 and tensile strength of fetal membranes in uncomplicated labor. *Obstet Gynecol* 2000;95:851-855.
55. Ota A, Yonemoto H, Someya A, Itoh S, Kinoshita K, Nagaoka I. Changes in matrix metalloproteinase 2 activities in amniochorions during premature rupture of membranes. *J Soc Gynecol Investig* 2006;13:592-597.
56. Biggio JR, Ramsey PS, Cliver SP, Lyon MD, Goldenberg RL, Wenstrom KD. Midtrimester amniotic fluid matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) levels above the 90th percentile are a marker for subsequent preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192:109-113.
57. Kim KW, Romero R, Park HS, Park CW, Shim SS, Jun JK, Yoon BH. A rapid matrix metalloproteinase-8 bedside test for the detection of intraamniotic inflammation in women with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2007;197:292.e1-292.e5.
58. Fujimoto T, Parry S, Urbanek M, Sammel M, Macones G, Kuivaniemi H, Romero R, Strauss JF. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) promoter influences amnion cell MMP-1 expression and risk for preterm premature rupture of the fetal membranes. *J Biol Chem* 2002;277:6296-6302.
59. Wang H, Ogawa M, Wood JR, Bartolomei MS, Sammel MD, Kusanovic JP, Walsh SW, Romero R, Strauss JF 3rd. Genetic and epigenetic mechanisms combine to control MMP1 expression and its association with preterm premature rupture of membranes. *Hum Mol Genet* 2008;17:1087-1096.

60. Maymon E, Romero R, Pacora P, Gervasi MT, Bianco K, Ghezzi F, Yoon BH. Evidence for the participation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase 1) in preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183: 914-920.
61. Yonemoto H, Young CB, Ross JT, Guilbert LL, Fairclough RJ, Olson DM. Changes in matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in the fetal amnion and chorion during gestation and at term and preterm labor. *Placenta* 2006;27:669-677
62. Goldman S, Weiss A, Eyali V, Shalev E. Differential activity of the gelatinases (matrix metalloproteinases 2 and 9) in the fetal membranes and decidua, associated with labour. *Mol Hum Reprod* 2003;9:367-373.
63. Qin X, Chua PK, Ohira RH, Greenwood BGD. An autocrine/paracrine role of human decidual relaxin. I: Interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) and tissue plasminogen activator. *Biol Reprod* 1997;56:800-812.
64. Qin X, Chua PK, Ohira RH, Greenwood BGD. An autocrine/paracrine role of human decidual relaxin. II: Stromelysin-1(MMP-3) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1). *Biol Reprod* 1997;56:812-817.
65. O'Brien M, O'Shaughnessy D, Ahamide E, Morrison JJ, Smith TJ. Differential expression of the metalloproteinase MMP3 and the alpha5 integrin subunit in human myometrium at labour. *Mol Hum Reprod* 2007;13:655-661.
66. Arechavaleta-Velasco F, Marciano D, Díaz-Cueto L, Parry S. Matrix metalloproteinase-8 is expressed in human chorion during labor. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190:843-850
67. Vu TD, Yun Feng , Placido J, Reznik SE. Placental matrix metalloproteinase--1 expression is increased in labor. *Reprod Sci* 2008;15:420-424.
68. Makrakis E, Grigoriou O, Kouskouni E, Vitoratos N, Salamalekis E, Chatzoudi E, Creatsas G. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in plasma/serum and urine of women during term and threatened preterm labor: a clinical approach. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2003;14:170-176

69. Xu P, Alfaidy N, Challis JRG. Expression of matrix metalloproteinase MMP-2 and MMP-9 in human placenta and fetal membranes in relation to preterm and term labor. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1353-1361.
70. Athayde N, Romero R, Gomez R, Maymon E, Pacora P, Mazor M, Yoon BH, Fortunato S, Menon R, Ghezzi F, Edwin S. Matrix metalloproteinase-9 in preterm and term human parturition. *J Matern Fetal Med* 1999;8:213-219
71. Park KH, Chaiworapongsa T, Kim YM, Espinoza J, Yoshimatsu J, Edwin S, Gomez R, Yoon BH, Romero R. Matrix metalloproteinase 3 in parturition, premature rupture of the membranes, and microbial invasion of the amniotic cavity. *J Perinat Med* 2003;31:12-22
72. Koscica KL, Ananth CV, Placido J, Reznik SE. The effect of a matrix metalloproteinase inhibitor on inflammation-mediated preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196:551.e1-3.
73. Morgan M, Kniss D, McDonnell S. Expression of metalloproteinases and their inhibitors in human trophoblast continuous cell lines. *Exp Cell Res* 1998;242:18-26.
74. Nawrocki B, Polette M, Marchand V, Maquoi E, Beorchia A, Tournier JM, Foidart JM, Birembaut P. Membrane-type matrix metalloproteinase-1 expression at the site of human placentation. *Placenta* 1996;17:565-572.
75. Huppertz B, Kertschanska S, Demir AY, Frank HG, Kaufmann P. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. *Cell Tissue Res* 1998;291:133-148.
76. Blankenship TN, King BF. Identification of 72-kilodalton type IV collagenase at sites of trophoblastic invasion of macaque spiral arteries. *Placenta* 1994;15:177-187.
77. Freitas S, Meduri G, Le Nestour E, Bausero P, Perrot-Appianat M. Expression of metalloproteinases and their inhibitors in blood vessels in human endometrium. *Biol Reprod* 1999;61:1070-1082.

78. Palei AC, Sandrim VC, Cavalli RC, Tanus-Santos JE. Comparative assessment of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9, and their inhibitors, tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in preeclampsia and gestational hypertension. *Clin Biochem* 2008;41:875-880
79. Narumiya H, Zhang Y, Fernandez-Patron C, Guilbert LJ, Davidge ST. Matrix metalloproteinase-2 is elevated in the plasma of women with preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2001;20:185-194.
80. Kolben M, Lopens A, Bläser J, Ulm K, Schmitt M, Schneider KT, Tschesche H. Proteases and their inhibitors are indicative in gestational disease. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996;68:59-65.
81. Bankowski E, Romanowicz L, Jaworski S. Collagen of umbilical cord arteries and its alterations in EPH gestosis. *J Perinat Med* 1993;21:491– 498.
82. Galewska Z, Bańkowski E, Romanowicz L, Jaworski S. Pre-eclampsia (EPH-gestosis)-induced decrease of MMP-s content in the umbilical cord artery. *Clin Chim Acta* 2003;335:109-115.
83. Myers JE, Merchant SJ, Macleod M, Mires GJ, Baker PN, Davidge ST. MMP-2 levels are elevated in the plasma of women who subsequently develop preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2005;24:103–115.
84. Fernandez-Patron C, Stewart KG, Zhang Y, Koivunen E, Radomski MW, Davidge ST. Vascular matrix metalloproteinase-2-dependent cleavage of calcitonin generelated peptide promotes vasoconstriction. *Circ Res* 2000;87:670–676.
85. Merchant SJ, Narumiya H, Zhang Y, Guilbert LJ, Davidge ST. The effects of preeclampsia and oxygen environment on endothelial release of matrix metalloproteinase-2. *Hypertens Pregnancy* 2004;23:47-60.
86. Gremlich S, Nguyen D, Reymondin D, Hohlfeld P, Vial Y, Witkin SS, Gerber S. Fetal MMP2/MMP9 polymorphisms and intrauterine growth restriction risk. *J Reprod Immunol* 2007;74:143-151.
87. Merchant SJ, Crocker IP, Baker PN, Tansinda D, Davidge ST, Guilbert LJ. Matrix metalloproteinase release from placental explants of pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. *J Soc Gynecol Investig* 2004;11:97-103.

88. Seval Y, Akkoyunlu G, Demir R, Asar M. Distribution patterns of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and -9 and their inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in the human decidua during early pregnancy. *Acta histochemica* 2004;106:353-362.
89. Polette M, Nawrocki B, Pintiaux A, Massenat C, Maquoi E, Volders L, Schaaps JP, Birembaut P, Foidart JM. Expression of gelatinases A and B and their tissue inhibitors by cells of early and term human placenta and gestational endometrium. *Lab Invest* 1994;71:838-846.
90. Xu P, Wang YL, Zhu SJ, Luo SY, Piao YS, Zhuang LZ. Expression of matrix metalloproteinase-2, -9, and -14, tissue inhibitors of metalloproteinase-1, and matrix proteins in human placenta during the first trimester. *Biol Reprod* 2000;62:988-994.
91. Huppertz B, Kertschanska S, Demir AY, Frank HG, Kaufmann P. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. *Cell Tissue Res* 1998;291:133-148
92. Isaka K, Usuda S, Ito H, Sagawa Y, Nakamura H, Nishi H, Suzuki Y, Li YF, Takayama M. Expression and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in human trophoblasts. *Placenta* 2003;24:53-64.
93. Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E. Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol* 2004;2:59-71.
94. Iurlaro M, Loverro G, Vacca A, Cormio G, Ribatti D, Minischetti M, Ria R, Bruno M, Selvaggi L. Angiogenesis extent and expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 correlate with upgrading and myometrial invasion in endometrial carcinoma. *Eur J Clin Invest* 1999;29:793-801.
95. Freitas S, Meduri G, Le Nestour E, Bausero P, Perrot-Appianat M. Expression of metalloproteinases and their inhibitors in blood vessels in human endometrium. *Biol Reprod* 1999;61:1070-1082
96. Reynolds LP, Redmer DA. Utero-placental vascular development and placental function. *J Anim Sci* 1995;73:1839-1851.

97. Xu P, Wang Y, Piao Y, Bai S, Xiao Z, Jia Y, Luo S, Zhuang L. Effects of matrix proteins on the expression of matrix metalloproteinase-2, -9, and -14 and tissue inhibitors of metalloproteinases in human cytotrophoblast cells during the first trimester. *Biol Reprod* 2001;65:240-246.

EK-1. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Bu form, katılmanız önerilen araştırma ile ilgili olarak sizi bilgilendirmek amacı ile düzenlenmiştir. Formun düzenlenmesinde, araştırmaya katılıp katılmama konusunda karar vermenizi kolaylaştırılması hedeflenmiştir. “Abortus imminens vakalarında Matriks Metalloproteinaz-9 (MMP-9) ve Matriks Metalloproteinaz-2 (MMP-2) düzeylerinin tespiti” adlı bu araştırma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğinde, Prof. Dr. Lügen Cengiz’in sorumluluğunda yürütülmektedir.

Araştırmamızın amacı, düşük tehdidi olan gebelerde düşüğün sebeplerinden biri olduğu düşünülen “matriks metalloproteinaz-2 ve matriks metalloproteinaz-9” adı verilen iki enzimin anne kanındaki miktarını belirlemek ve bu değerleri sağlıklı gebeler ve gebe olmayan sağlıklı kadınların kanlarındaki değerlerle karşılaştırarak aralarındaki ilişkinin belirlenmesidir. Bu sayede bahsedilen bu iki enzimin düşük ile sonuçlanabilecek gebeliklerin öngörülmesinde kullanılıp kullanılmayacağını belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Çalışma toplam 80 kadın ile yapılacaktır; sırasıyla çalışma grubuna düşük tehdidi olan 30 gebe, kontrol grubuna ise 25’i sağlıklı gebe ve 25’i sağlıklı kadın olmak üzere toplam 50 kadının dahil edilmesi planlanmaktadır. Çalışmaya katılan kadınlardan rutin yapılması gereken kan tahlilleri esnasında ek olarak 1 defa periferik (ön koldan) çalışma için kan örneği alınacaktır. Alınan kanlar Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri Anabilim Dalı İmmunoloji ve Alerji Bilim Dalı İmmunoloji Araştırma Laboratuvarı’nda incelenecek ve matriks metalloproteinaz-2 ve matriks metalloproteinaz-9 düzeyleri belirlenecektir.

Sizin çalışmaya katılma süreniz sadece kan vermekle sınırlıdır. Sizin bu uygulama sırasında herhangi bir rahatsızlığınız olmayacaktır. Bu yöntem herhangi bir yan etki taşımamaktadır. Çalışmaya katılmayı kabul eden veya etmeyen gebeler ile diğer gönüllü kadınların rutin takipleri aynen devam edecektir. Çalışma süresince bir defaya mahsus olmak üzere gebe olan kadınların gebeliğinin sonlanma biçimi ve gebelik boyunca oluşan tıbbi rahatsızlıkların öğrenilmesi amacıyla çalışmacılar tarafından telefon ile size ulaşılabilecek ve gerekli bilgiler size sorulan sorular ile alınacaktır.

EK-1. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu (Devam)

Sizin çalışmaya gönüllü katıldığınızı beyan ettiğiniz yazı aşağıda sunulmuştur. Bu çalışmaya katılmayı reddetme ve araştırma başladıktan sonra devam etmek istemediğiniz takdirde çalışmadan çıkarılma hakkına sahipsiniz. Bununla birlikte eğer gerekli görülürse araştırmacılar tarafından size haber verilmeksizin çalışmadan çıkartılabilirsiniz.

Çalışmada size hiçbir ilaç verilmeyecek, testlerle ilgili siz ve sosyal güvencenizi sağlayan kurumunuz herhangi bir yük altına girmeyecektir.

Sizden alınan kan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri Anabilim Dalı İmmunoloji ve Alerji Bilim Dalı İmmunoloji Araştırma Laboratuvarı'nda işleme tabi tutulacaktır. Alınan kan örneği sadece size bahsedilen çalışma için kullanılacaktır, başka bir amaçla kullanılmayacaktır.

Ben, bu araştırma ile ilgili yeterli bilgiye sahibim. Yukarıda okuduğum çalışma ile ilgili bilgiler bana sözlü olarak iletildi. Bu bilgiler ışığında çalışmaya gönüllü olarak kendi rızamla katılmak istiyorum.

Hastanın ADI SOYADI:

Tarih:

İmza:

Veli ADI SOYADI:

Tarih:

İmza:

Doktorun ADI SOYADI:

Tarih:

İmza:

Tanıklık eden kurum yetkilisinin

ADI SOYADI:

Tarih:

İmza:

EK-2. Hasta Takip Formu

Hasta No:/.../.....

Adı Soyadı:		Yaş:		
Adres / Tel:				
Meslek:		Eğitim durumu:		
Akrabalık:	Var	Yok	Akrabalık Derecesi:	

Önceki gebelikler:						
No	Tarih	Hafta	Ağırlık	Doğum şekli / Endikasyon	Cinsiyet	Komplikasyon

Sistemik hastalık*:	Var	Yok			
(HT, DM, Hiperlipidemi, Romatizmal Hastalıklar, Kalp hastalıkları vb.) (*Sistemik herhangi bir hastalığa sahip kadınlar çalışma dışı bırakılacaktır)					
İlaç kullanımı*:	Var	Yok			
(Düzenli olarak kullanılan tüm ilaçlar ve progesteron türevleri) (*İlaç kullanım öyküsü olan kadınlar çalışma dışı bırakılacaktır)					
Sigara:	Var	Yok	Alkol:	Var	Yok

Gebelik Bilgileri					
VA:		SAT: (kesin/şüpheli)			
Boy:		DGA (SAT'a göre):			
İlk trimester USG:					
<i>GS:</i>		<i>CRL:</i>		<i>FHR:</i>	
<i>Subkoryonik Hematom:</i>				<i>NT (Ölçüm yapıldıysa):</i>	

Laboratuvar Sonuçları (Tarih)			
MMP-2:		MMP-9:	

Gebelik Sonucu:		
Spontan Abortus	Missed abortus	Vajinal Doğum
Sezeryan		
Gebeliğin sonlandığı gestasyonel yaş (Hafta ^{gün}):		