

Matriks Metalloproteinaz-9 Ekspresyonunun Preterm Prematür Membran Rüptürü ile İlişkisinin İncelenmesi

EVALUATION OF MMP-9 EXPRESSION IN PPROM CASES

Dr. Aylin SAĞLAM,^a Dr. B. Serdar ÜNLÜ,^a Dr. Tamer MUNGAN,^b Dr. Cantekin İSKENDER,^a
Dr. Mesut MISIRLIOĞLU,^a Dr. Füsün CANTÜRK,^a Dr. Emine KOÇ,^a Dr. Serkan TAPAN^c

^aKadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, Dr. Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, ANKARA

^bKadın Hastalıkları ve Doğum AD, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, ISPARTA

^cBiokimya Kliniği, Beytepe Asker Hastanesi, ANKARA

Özet

Amaç: Klinik olarak enfeksiyonu gösterilemeyen preterm prematür membran rüptürü (PPROM) vakalarında fetal membranlarda matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) aktivitesinde lokal veya jeneralize bir artış olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Çalışma grubuna 26-37 gebelik haftası arasında PPROM tanısı konan 8 hasta dahil edildi. PPROM grubundaki hastaların ateş, taşikardi, lökositoz, C-reaktif protein (CRP), servikovajinal kültür gibi enfeksiyon parametrelerine bakılarak, enfeksiyon bulgusu olmayanlar çalışmaya dahil edildi. Kontrol grubuna obstetrik endikasyonlar ile sezaryene alınan ve aktif doğum eyleminde olmayan 8 hasta dahil edildi. Membran örnekleri 3 farklı zondan (servikal, midzon, periplasental) alınarak ELISA yöntemiyle MMP-9 çalışıldı.

Bulgular: Servikal bölgedeki (perforasyon bölgesi civarı) ortalama MMP-9 konsantrasyonu hasta grubunda 2.10 µgr/gram protein (0.69-4.87 µgr/gram protein) olup kontrol grubundaki MMP-9 miktarı 0.64 µgr/gram protein (0.29-1.97 µgr/gram protein) idi. Servikal bölgedeki MMP-9 miktarı kontrol bölgesinden yaklaşık 4 kat fazla yüksekti ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p: 0.016). Periplasental ve midzon bölgelerinde her 2 grupta MMP-9 konsantrasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu.

Sonuç: MMP-9'un servikal rüptür bölgesi civarı lokal aktivasyonu, enfeksiyonu olmayan gebeliklerde PPROM ile ilişkili olabilir.

Anahtar Kelimeler: Preterm prematür membran rüptürü (PPROM), matriks metalloproteinazları

Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst 2006, 16:229-233

Abstract

Objective: To examine whether or not a local or generalized increase in matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity is associated with preterm premature rupture of membranes (PPROM) in cases in which infection is excluded.

Material and Methods: Women (n= 8) with pregnancies at 26-37 weeks gestation complicated by PPROM with no evidence of concurrent infection were included in study group. Pregnant women (n= 8) with obstetric indications for cesarean delivery at term gestation who are not in active labor were involved as control group. Infection was excluded by clinical parameters (body temperature, C-reactive protein, white blood cell count, erythrocyte sedimentation rate) and by microbiological screening of membrane swabs. Fetal membrane samples were collected from 3 zones (cervical, midzone, periplasental) MMP-9 activity was measured by ELISA method.

Results: Mean MMP-9 concentration in cervical region was 2.10 µgr/gram protein (0.69-4.87 µgr/gram protein) in PPROM group and 0.64 µgr/gram protein (0.29-1.97 µgr/gram protein) in control group. This difference was statistically significant (p: 0.016). No statistically significant difference was observed in periplasental or midzonal region between groups.

Conclusion: Local activation of MMP-9 around the rupture zone may lead to PPROM in gestations which intraamniotic infection is not evident.

Key Words: Fetal membranes, premature rupture, matrix metalloproteinases

Preterm prematür membran rüptürü (PPROM) 37. gebelik haftasından önce membran bütünlüğünün bozulmasıdır. Tüm

gebeliklerin %1-4'ünde görülür ve preterm doğumların %20-50'sine neden olur.^{1,2}

PPROM preterm doğumlara en sık neden olan etiyolojik faktördür. PPROM'a bağlı neonatal morbidite ve mortalite hala ciddi perinatal problemler olmaya devam etmektedir. Enfeksiyon başta olmak üzere birçok eksojen ve endojen faktör PPROM etiyolojisinde rol oynamaktadır. Subklinik enfeksiyon, vakaların %20-50'sinde saptanmıştır.^{3,4}

Geliş Tarihi/Received: 21.04.2006 Kabul Tarihi/Accepted: 01.09.2006

Yazışma Adresi/Correspondence: Dr. Cantekin İSKENDER
Dr. Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı ve Hastalıkları
Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, ANKARA
c_iskender@yahoo.com

Copyright © 2006 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst 2006, 16

229

İnsan amnionu; her biri gebelik kesesinin bütünlüğü ve fiziksel streslere direnci açısından belli rollere sahip 5 tabakadan oluşmuştur.⁵ Koryon zarı amniondan daha kalın 3 tabakadan oluşmasına rağmen, membranın tensil kuvveti amnion tabaka tarafından sağlanır.^{5,6} Fetal membranların bütünlüğü, yeterli gerilim kuvvetini korumalarına bağlıdır. Membranlarda kollajen içeriğinin azalması, yapısının değişmesi ve kollajenolitik aktivitenin artması membran rüptürü ile ilişkili bulunmuştur.⁷ Matriks metalloproteinazlar (MMP) kollajen katabolizmasından primer olarak sorumludur.^{4,8} Gebeliğin ilerlemesine bağlı olarak oluşan hacim artışı ve intrauterin basıncın artması, fetal membranlarda programlı bir kollajenolitik yeniden yapılanma sürecinin devamlı olarak işlemesine neden olur.^{7,9} Bu süreç, fetal membranların gebelik ilerledikçe artan gerilme kuvvetine dayanıklılığını artırır ve MMP'ler tarafından meydana getirilir. MMP'ler matriksinler olarak da bilinir ve ekstraselüler matriksin embriyogenez, remodeling ve doku rezorpsiyonu gibi süreçler için yıkımını gerçekleştirirler.^{10,11} Omurgalılarda şu ana kadar 20 adet MMP tanımlanmıştır. Her bir MMP spesifik bir substratı parçalar. Önceki çalışmalar MMP'nin, amniyotik membranın fizyolojik ve patolojik rüptüründe rol oynadığını göstermişti.^{12,13} Menon ve ark., PPRM'un, MMP'lerin konağın inflamatuvar yanıtına bağlı olarak aktive olduğu bir endojen ototoksik hastalık olduğunu öne sürmüşlerdir.^{4,5} Biz bu çalışmamızda; klinik olarak enfeksiyonu gösterilemeyen vakalarda, fetal membranlarda MMP-9 aktivitesinde lokal veya jeneralize bir artış olup olmadığını belirlemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntemler

Bu çalışma protokolü Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı ve Hastalıkları Hastanesi Eğitim Planlama Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Hasta seçimi: Çalışma grubuna 26-37 gebelik haftası arasında PPRM tanısı konan 8 hasta dahil edildi. PPRM grubundaki hastaların ateş, taşikardi, lökositoz, C-reaktif protein (CRP) gibi enfeksi-

yon parametrelerine bakılarak, enfeksiyon bulgusu olmayanlar çalışmaya dahil edildi. Kontrol grubuna obstetrik endikasyonlar ile sezaryene alınan ve aktif doğum eyleminde olmayan 8 hasta dahil edildi.

Örneklerin toplanması: Membran örnekleri bebeğin doğumundan sonraki 5-10 dakika içinde Babcock klip kullanılarak alındı. Klabin dudakları arasında kalan dokular bırakılarak klabin yaklaşık 2-3 cm² etrafından doku örnekleri alındı. Doku örnekleri; servikal bölge (S) (rüptür bölgesi), midzon bölge (M), periplasental bölge (P) olmak üzere 3 farklı bölgeden elde edildi. Periplasental bölge örnekleri rüptür bölgesinden 10-12 cm uzaklıktan alındı. Midzon bölgesi, rüptür bölgesi ile periplasental bölgenin ortasındaki alan olarak belirlendi. Alınan örnekler herhangi bir kimyasal madde eklenmeden kaplara konarak -80°C'de muhafaza edildi.

Biyokimyasal çalışma: Doku örneklerindeki MMP-9 konsantrasyonu ELISA yöntemi kullanılarak çalışılmıştır. MMP-9 spesifik monoklonal antikorlar bir mikrolam üzerine önceden yerleştirildi. Standartlar ve örnekler pipetle tüp içine konuldu. Yıkama sonrası tüp içine enzim-linked poliklonal antikora spesifik MMP-9 ilave edildi. Bağlanmamış antikor enzim ayırıcı, bir substrat solüsyonu tüpe eklendi ve renk oluşumu total MMP-9 miktarına bağlı olarak ilk basamakta gelişti. Renk değişimi durdurularak yoğunluk ölçüldü.

Verilerin istatistiksel analizi SPSS 11.5 (Statistical Package for Social Sciences Chicago, USA) paket programında yapıldı. Ölçüm yönünden gruplar arası karşılaştırmada Mann Whitney U testi, grup içi karşılaştırmalarda ise Friedmann testi kullanıldı. p< 0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Bu çalışmada toplam 16 hastanın amnion zarlarındaki 3 farklı bölgede ELISA yöntemiyle MMP-9 miktarı ölçüldü. Periplasental bölgedeki

Tablo 1. MMP-9 ölçümlerinin ($\mu\text{gr}/\text{gram}$ protein) gruplar arası ve grup içi karşılaştırmaları.

	Kontrol Grubu			Hasta Grubu			p* değeri
	Ortanca	Minimum	Maksimum	Ortanca	Minimum	Maksimum	
S bölgesi	0.64	0.29	1.97	2.10	0.69	4.87	0.016
P bölgesi	1.22	0.25	4.41	1.72	0.46	5.49	0.294
M bölgesi	0.59	0.14	1.06	1.87	0.24	5.26	0.208
p** değeri	0.197			0.325			

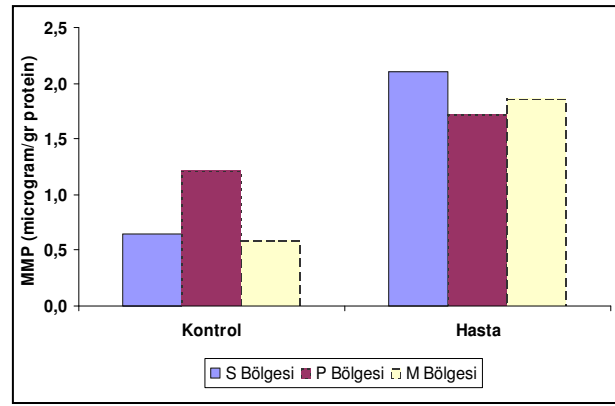
* Gruplar arası karşılaştırma

** Grup içi karşılaştırma

MMP-9 konsantrasyonu PPRM grubunda $1.72 \mu\text{gr}/\text{gr}$ protein ($0.46-5.49 \mu\text{gr}/\text{gr}$ protein) iken kontrol grubunda aynı bölgedeki MMP-9 miktarı $1.22 \mu\text{gr}/\text{gr}$ protein ($0.25-4.41 \mu\text{gr}/\text{gr}$ protein) idi. Hasta grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak bir fark bulunamadı (p: 0.294) (Tablo 1). Midzon bölgesindeki MMP-9 konsantrasyonu PPRM grubunda $1.87 \mu\text{gr}/\text{gr}$ protein ($0.24-5.26$) iken kontrol grubunda MMP-9 konsantrasyonu $0.59 \mu\text{gr}/\text{gr}$ protein ($0.14-1.06 \mu\text{gr}/\text{gr}$ protein) olarak ölçüldü. Midzon bölgesindeki MMP-9 miktarı kontrol bölgesine göre klinik olarak 3 kat artış gösterse de istatistiksel olarak anlamlı değildi (p: 0.208). Servikal bölgedeki (perforasyon bölgesi civarı) MMP-9 konsantrasyonu hasta grubunda $2.10 \mu\text{gr}/\text{gr}$ protein ($0.69-4.87 \mu\text{gr}/\text{gr}$ protein) olup, kontrol grubundaki MMP-9 miktarı $0.64 \mu\text{gr}/\text{gr}$ protein ($0.29-1.97 \mu\text{gr}/\text{gr}$ protein) idi. Servikal bölgedeki MMP-9 miktarı kontrol bölgesinden yaklaşık 4 kat yüksekti ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p: 0.016) (Şekil 1).

Sonuç

MMP, kollajen katabolizmasından primer olarak sorumludur ve bu enzimler matriks parçalanmasının başlıca fizyolojik ve patolojik aracısıdır.^{11,14} Son dönemde yapılan çalışmalarda, gebeliğin devam ettirilmesinde fetal membran yapısının önemi ve MMP'lerin erken membran rüptürü gibi klinik durumlardaki rolü üzerinde durulmaktadır.^{8,11,14-17} Bu çalışmalarda fetal membranlar-



Şekil 1. MMP-9 ölçümlerinin gruplara göre dağılımı.

daki MMP'lerin endojen aktivasyonu ve bunun sonucunda ekstrasellüler matriksin MMP'ler tarafından yıkılması ve membranlardaki lokal zayıflıklar, erken membran rüptürü gelişmesinin ana mekanizması olarak kabul görmektedir.^{14,15,17,18}

PPROM gelişiminde eksojen ve endojen uyarılara karşı konakta oluşan inflamatuvar yanıtın rol oynadığı düşünülmektedir.^{4,5,19} Muhtemelen enfeksiyonun şiddeti, süresi ve konak cevabı klinik tablonun PPRM (veya preterm eylem) şeklinde gelişeceğini belirlemektedir.²⁰⁻²² Bu çalışmada, PPRM ve kontrol grubundaki hastalar, klinik ve biyokimyasal olarak enfeksiyonu olmayan hastalardan seçildi. Enfeksiyon bulgusu olmayan hastaların çalışmaya dahil edilmesindeki amaç; enfeksiyon gibi bilinen bir etiyolojinin yokluğunda MMP-

9 aktivasyonunun PPRM ile ilişkili olabileceğini göstermekti. MMP-9 aktivitesinin, PPRM grubunda S bölgesinde, kontrol grubuna göre anlamlı bir biçimde artmış olduğunu gözlemledik. Yine ortalama MMP-9 aktivitesi M bölgesinde PPRM grubunda, kontrol grubuna göre yaklaşık 3 kat artmış bulundu, ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi. Önceki çalışmalarda MMP-9 aktivasyonunun enfeksiyonu olan vakalarda PPRM'a neden olduğuna dair veriler mevcuttur.¹⁶⁻¹⁸ Ancak enfeksiyon PPRM'a neden olan etiyolojik faktörlerden yalnızca biridir ve enfeksiyon dışında fetal genotip gibi faktörlerin de PPRM gelişimine katkısı olabileceği belirtilmiştir.^{4,5,20,21} Bizim bulgularımız MMP-9 aktivasyonunun enfeksiyonu olmayan PPRM olgularında lokal olarak gerçekleştiğini göstermektedir ve çalışmamıza dahil olan vakalarda enfeksiyon ekarte edildiği için PPRM gelişiminin endojen ototoksik bir süreç sonunda gerçekleşebileceği görüşünü desteklemektedir. Mc Laren ve ark., yaptıkları çalışmada term gebeliklerde pro MMP-9 aktivasyonunun bölgesel farklılıklar gösterdiğini bildirmişlerdir.²³ Bu bulgular bizim çalışmamızla da uyumludur. MMP-9 aktivasyonunun PPRM grubunda midzon bölgesinde artmış olması, servikal bölgede başlayan MMP-9 aktivasyonunun giderek tüm membrana yayılması şeklinde açıklanabilir. Şüphesiz PPRM olgularında MMP aktivasyonun enfeksiyon dışı nedenleri üzerinde daha çok kontrollü deneye ihtiyaç vardır. Sonuç olarak MMP-9'un lokal aktivasyonu, enfeksiyonu olmayan gebeliklerde PPRM ile ilişkili olabilir.

KAYNAKLAR

- Gibbs RS, Blanco JD. Premature rupture of the membranes. *Obstet Gynecol* 1982;60:671-9.
- Miller HC, Jekel JF. Epidemiology of spontaneous premature rupture of membranes: Factors in preterm births. *Yale J Biol Med* 1989;62:241-51.
- Cox SM, Williams ML, Leveno KJ. The natural history of preterm ruptured membranes. *Obstet Gynecol* 1998;71:558-67.
- French FI, McGregor JA. The pathobiology of premature rupture of membranes. *Semin Perinatol* 1996;20:344-68.
- Menon R, Fortunato SJ. The role of matrix degrading enzymes and apoptosis in rupture of membranes. *J Soc Gynecol Investig* 2004;11:427-37.
- Amenta PS, Gay S, Vaheri A, Martinez-Hernandez A. The extracellular matrix is an integrated unit: Ultrastructural localization of collagen types I, III, IV, V, VI, fibronectin and laminin in human term placenta. *Coll Relat Res* 1986;6:125-52.
- Skinner SJ, Campos GA, Liggins GC. Collagen content of human amniotic membranes: Effect on gestation length and premature rupture. *Obstet Gynecol* 1981;57:487-9.
- Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. MMP/TIMP imbalance in amniotic fluid during prom: An indirect support for endogenous pathway to membrane rupture. *J Perinatal Medicine* 1999;27:362-8.
- Bryant-Greenwood GD, Yamamoto SY. Control of peripartal collagenolysis in the human chorion-decidua. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:63-70.
- Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274:21491-4.
- Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Collagenolytic enzymes (gelatinases) and their inhibitors in human amnio-chorionic membrane. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:731-41.
- Draper D, McGregor J, Hall J, et al. Elevated protease activities in human amnion and chorion correlate with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173:1506-12.
- Hampson V, Liu D, Billett E, Kirk S. Amniotic membrane collagen content and type distribution in women with preterm premature rupture of the membranes in pregnancy. *Br J Obstet Gynecol* 1997;104:1087-91.
- Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Stromelysins in placental membranes and amniotic fluid with premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol* 1999;94:435-40.
- Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Amniochorion gelatinase-gelatinase inhibitor imbalance in vitro: A possible infectious pathway to rupture. *Obstet Gynecol* 2000;95:240-4.
- Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Presence of four tissue inhibitors of matrix metalloproteinases TIMP 1,2,3,4 in human fetal membranes. *Am J Reprod Immunol* 1998;40:395-400.
- Vadillo OF, Hernandez A, Gonzales AG, Bermejo L, Iwata K, Strauss JF. Increased matrix metalloproteinase and reduced tissue inhibitor of metalloproteinase levels in amniotic fluids from pregnancies complicated by premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:1371-6.
- Athayde N, Edwin SS, Romero R, et al. A role for MMP-9 in the spontaneous rupture of the fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:1248-53.

19. Dudley DJ. Preterm Labor: An intrauterine inflammatory response syndrome? *J Reprod Immunol* 1997;36:93-109.
20. Parry S, Strauss JF. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med* 1998;338:663-70.
21. Maymon E, Romero R, Pacora P, et al. Evidence of mini 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;183:887-94.
22. Afhayde N, Edwin SS, Romero R, et al. A role for matrix-metalloproteinase-9 in spontaneous rupture of the fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:1248-53.
23. Mc Laren J, Taylor DJ, Bell SC. Increased concentration of pro-matrix metalloproteinase 9 in term fetal membranes overlying the cervix before labor: Implications for membrane remodeling and rupture. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:409-16.