



T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

DOĞUM EYLEMİ BAŞLAMISŞ ERKEN TERM VE TERM
GEBELERDE AP-1 (AKTİVATÖR PROTEİN-1) TRANSKRİPSİYON
FAKTÖRÜ AİLESİ ÜYELERİNDEN C-JUN, C-FOS VE FRA2
PROTEİNLERİNİN SERUM VE MİYOMETRİUM DOKUSUNDAKİ
GEN EKSPRESYONU DÜZEYLERİ

UZMANLIK TEZİ
DR.TOHRUL YAHYAYEV

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ALİ BENİAN

İSTANBUL- 2019

TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda yaptığım uzmanlık eğitimim esnasında bilgi ve tecrübelerini bizlerle paylaşmaktan çekinmeyen, bizleri sahiplenen, sevgisinin yanında saygısını da hissettiren Anabilim Dalı Başkanlarımız Sayın Prof. Dr. Fahri ÖÇER'e ve Prof. Dr. Altay GEZER'e,

Tezimi yazdığım zorlu süreçte çok değerli vaktini ve tecrübelerini benden esirgemeyen, samimi ve yapıcı uyarılarda bulunan, beni cesaretlendiren ve asla şüphe duymayan saygıdeğer ve sevgili tez danışmanı hocam Sayın Prof. Dr. Ali BENİAN'a,

Cerrahi eğitimimin ve tıbbi bilgilerimin çok büyük kısmının oluşmasında emeği geçen, ben ve tüm asistan arkadaşlarım için yeri geldiğinde abilik yapan, yeri geldiğinde arkadaşımız olmayı başaran, değerli hocamız Doç. Dr. Mahmut ÖNCÜL'e,

Eğitimimin her aşamasında tecrübelerinden, bilgilerinden, yaklaşımlarından ve hislerinden faydalandığım, mesleğimi icra ettiğim her anda izlerini taşıyacağım, haklarını asla ödeyemeyeceğim, izlemekten asla usanmayacağım elleri öpülecek üstadlarım ve en kıymetli hocalarım Prof. Dr. Altay GEZER'e, Prof. Dr. Pelin ÖCAL'a, Prof. Dr. Engin ORAL'a, Prof. Dr. Tamer EREL'e, Prof. Dr. İsmail ÇEPNİ'ye

Birlikte çalışmaktan asla pişman olmadığım yandal eğitimi alan tüm uzmanlarıma,

İlkokuldan üniversiteye kadar üzerimde emeği olan tüm öğretmenlerime,

Berber çalıştığım, beraber sevindiğim, beraber üzüldüğüm, beraber eğlendiğim, beraber çıldırdığım, beraber yorulduğum, beraber korktuğum en üst kademinden en alt kademine CTF Kadın Doğum asistanlık sürecini paylaştığım tüm arkadaşlarıma,

Doğumhanede, ameliyathanede, serviste, poliklinikte adımımı attığım ilk günden son güne kadar her zaman hem eğitim, hem de yardım aldığım, yeri geldiğinde elim ayağım olan, yeri geldiğinde dert ortağım olan, yeri geldiğinde anne şefkatini bulduğum, birlikte zaman geçirdiğim ebelerime, hemşirelerime ve personellerime,

Tüm cerrah huysuzluklarımıza rağmen bize sevgi ve saygı duyan tüm anestezi uzmanlarıma ve asistan doktorlarına ve pediatri asistan doktorlarına,

*Tezimin hazırlanmasında ve genetik çalışmalarımda bana destek olan, hertürlü yardımlarını, bilgi ve becerilerini benden esirgemeyen İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesinde görevli **Doç. Dr. Tuba GÜNEL**'e ve **Doktora Öğrencisi Tuğçe Şentürk**'e*

*Tez çalışmam için örnek alınmasında yardımcı olan anestezi doktor ve teknisyenlerine başta **Seda Nuhpaşa** olmakla*

Sonsuz teşekkür ediyorum...

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLO LİSTESİ.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	viii
ÖZET	x
ABSTRACT.....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. NORMAL DOĞUM.....	2
2.1.1. NORMAL DOĞUMUN TANIMI VE FİZYOPATOGENEZİSİ.....	2
2.1.2. ERKEN DOĞUM TEHDİDİNİN TANIMI VE RİSK FAKTÖRLERİ.....	5
2.2. AKTİVATÖR PROTEİN-1.....	9
2.2.1. DOĞUM EYLEMİNİN PATOGENEZİNDE AKTİVATÖR PROTEİN-1 ÜYELERİNİN ROLÜ	12

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.1. ÇALIŞMA GRUBU	17
3.2. LABORATUVAR	18
3.2.1. DOKUDAN TOTAL RNA İZOLASYONU.....	18
3.2.2. SERUMDAN TOTAL RNA İZOLASYONU.....	19
3.2.3. TOTAL RNA'NİN SPEKTROFOTOMETRİK ANALİZİ.....	23
3.2.4. TOTAL RNA'DAN CDNA SENTEZİ.....	23
3.2.5. DAMLACIKLI DİJİTAL POLİMERAZ ZİNCİR REAKİYONU (ddPZR).....	24
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	25
4. BULGULAR.....	26
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇ.....	37
7. KAYNAKLAR.....	38

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Erken doğum tanımları.....	6
Tablo 2. Erken doğum risk faktörleri.....	8
Tablo 3. Kit solüsyonlarının hazırlanışı.....	21
Tablo 4. Bir reaksiyon için gerekli bileşen miktarları.....	22
Tablo 5. Bir reaksiyon için gerekli termal döngü.....	22
Tablo 6. ddPZR için hazırlanan bir reaksiyon için gerekli “mix” bileşenleri ve miktarları.....	23
Tablo 7. ddPCR termal döngüsü	24
Tablo 8. Serum örnekleri için frekans analizi.....	26
Tablo 9. Doku örnekleri için frekans analizi.....	26
Tablo 10. c-Jun, c-Fos ve FRA2 genlerinin anlatımı, kat değişimi ve p değerleri.....	27

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. c-Jun homodimerinin helikal tekerlek şeklinde projeksiyonu.....	11
Şekil 2. c-Jun homodimerinin yandan görünüşü.....	11
Şekil 3. AP-1 proteinleri ile diğer transkripsiyon faktörleri arasında etkileşimler. TATA-binding protein (TBP)	12
Şekil 4. TcR/CD3 ve CD 28 ko-stimulatör yolları.....	15
Şekil 5. Serum c-Jun anlatım seviyesi	28
Şekil 6. Serum c-Fos anlatım seviyesi.....	28
Şekil 7. Serum FRA2 anlatım seviyesi.....	29
Şekil 8. Doku c-Jun anlatım seviyesi.....	29
Şekil 9. Doku c-Fos anlatım seviyesi.....	30
Şekil 10. Doku FRA2 anlatım seviyesi.....	30
Şekil 11. Doku örneklerinde c-Jun, c-Fos ve FRA2 genleri için yapılan ROC analizleri	31
Şekil 12. Doku örneklerinde c-Jun, c-Fos ve FRA2 genleri için yapılan ROC analizleri	32

KISALTMALAR LİSTESİ

TVUSG	: Transvajinal Ultrasonografi
EDT	: Erken Doğum Tehdidi
ddPZR	: droplet dijital Polimeraz Zincir Reaksiyonu
VKİ	: Vücut Kitle İndeksi
SSS	: Santral sinir sistemi
ÇDDA	: Çok Düşük Doğum Ağırlıklı
ADDA	: Aşırı Düşük Doğum Ağırlıklı
EMR	: Erken Membran Rüptürü
YÜT	: Yardımcı Üreme Teknikleri
AP-1	: Aktivatör Protein-1
G-CSF	: Granulosit- Colony Stimulation Factor
GBS	: Group B Streptococcus
NICHD	: National Institute of Child Health and Human Development
ACOG	: The American College of Obstetricians and Gynecologists
SMFM	: Society for Maternal-Fetal Medicine
TİMP2	: Tissue İnhibitor of Metalloproteinases 2
DES	: Diethylstilbesterol
İL	: İnterleukin
TNF	: Tumor Necrosis Factor
COX	: Cyclooxygenase

PGDH	: 15-hydroxy-Prostaglandin Dehydrogenase
CPR	: Cardiopulmonary Resuscitation
BPD	: Bronchopulmonary Dysplasia
NRN	: National Research Network
RDS	: Respiratory Distress Syndrome
NFkB	: Nuclear Factor kB
PR	: Progesterone Receptor
ATF	: Activating Transcription Factor
JDP	: Jun Dimerizing Protein
CREB	: cAMP Response Element Binding Protein
cAMP	: cyclic Adenosine Monophosphate
C/EBP	: CCAAT-Enhancer Binding Protein
TEF	: Thyrotroph Embryonic Factor
DBP	: D-site Binding Protein
NF-E2	: Nuclear Factor, Erythroid 2
RPM	: Revolutions Per Minute

ÖZET

AMAÇ: Dünya sağlık örgütünün normal doğum tanımlaması “kendiliğinden başlar, doğum eylemi başlangıcında düşük risklidir ve süreç boyunca bu şekilde devam eder. Bebek gebeliğin tamamlanmış 37 ve 42 haftası arasına baş gelişte spontan olarak doğar. Doğum sonrası bebek ve anne iyi durumdadırlar.” şeklindedir. Normal doğum uterusu giden değişikliklere karşılık gelecek şekilde 4 evreye bölünür: 1) başlangıç, 2) hazırlık, 3) ilerleme, 4) iyileşme. Birinci evrede uterusun sessizlik ve servikal yumuşama olmaktadır. Servikal yumuşama, artmış damarlanma, stromal ve glandüler hipertrofi ve hiperplazi gibi ekstrasellüler matrikste bileşimsel veya yapısal değişimlerin sonucu olarak gelişmektedir. İkinci evrede uterusu doğum kontraksiyonlarına hazırlanmak için CAPs (“contractions associated proteins”) , oksitosin reseptörü, prostaglandin F reseptörü ve konneksin 43 proteinlerinin sentezi artar ve servikte bağ doku değişikliklerini kapsayan servikal olgunlaşma gerçekleşir. Üçüncü evrede aktif doğum eylemi gerçekleşmektedir. Bu evre servikal açılma ve silinmeye neden olan uterusun kontraksiyonlarla başlar ve plasentanın ayrılması ile sonlanır. Dördüncü evrede uterus gebelikten önceki durumuna dönmektedir.

Miyometrial kontraksiyon aktin ve miyozin proteinleri arasındaki etkileşimler sonucu oluşmaktadır. Bu etkileşimler miyozin hafif-zincir kinaz enziminin aktive edilmesi sonucu gerçekleşir. Enzim aktivasyonu sitokinler, hormonlar ve gerilme gibi birçok faktörler tarafından olmaktadır. Servikal açılma ve doğum eylemi sırasında İL-1 β , İL-6, İL-8 ve TNF- α konsantrasyonları artar. Bu enflamatuar süreç hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu ve kalsiyum-bağlayıcı düzenleyici bir protein olan kalmoduline kalsiyumun bağlanmasını artırır. Kalsiyum-kalmodulin kompleksi miyozin hafif-zincir kinaz enzimine bağlanır ve onu aktive eder.

Bizim bu çalışmadaki amacımız enflamasyon sürecinin doğum eylemindeki rolünü araştırmaktır. Bu çalışmada Aktivatör Protein-1 (AP-1) transkripsiyon faktörü ailesi üyelerinin enflamasyon sürecinin belirlenmesindeki rolleri araştırıldı. Yapılan hayvan çalışmalarında AP-1 protein ailesi üyelerinin doğum sürecinde enflamasyon yolağında rollerinin olduğu gösterilmiştir. AP-1 (Aktivatör Protein-1) ailesi üyesi olan proteinler **Jun** (c-Jun, JunB, JunD), **Fos** (c-Fos, FRA1, FRA2, FosB, FosB2) homodimerler (Jun) veya heterodimerler (Fos ve Jun) oluştururlar ve AP-1 bölgeleri ile (TGAG/CTCA) DNA'ya bağlanarak farklı şekillerde transaktivasyon ve

transrepressyon yaparlar. Bu çalışmada doğum eyleminde olan ve olmayan gebe kadınların miyometriyum ve serum örneklerinde c-Jun, c-Fos ve FRA2 proteinlerinin gen ekspresyonlarındaki farkı araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM: İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum kliniğinde doğum servisine yatırılan 20 gebe çalışmaya dahil edildi. Bunlardan 10'u kontrol grubunda ve diğer 10'u çalışma grubundaydı. Çalışmaya alınma kriterleri: 18-35 yaş aralığında, bilinen kronik hastalığı olmayan, sürekli kullandığı bir ilaç bulunmayan, aktif su gelişi olmayan, polihidramniyozis veya plasenta previa gibi patolojik gebelik bulguları olmayan, sigara ve alkol kullanmayan ≥ 37 hafta gebelerdi. Çalışmaya alınan tüm gebelerde sezaryen öncesi NST (non-stress test) bağlandı. Kontraksiyon saptanan gebeler vajinal tuşe edildi. Çalışma grubunda olan gebelerde NST'de 20 dakikada ≥ 4 veya 60 dakikada ≥ 8 kontraksiyon veya vajinal tuşede ≥ 3 cm servikal açıklık vardı. Kontrol grubundaki gebelerde NST'de kontraksiyon yoktu ve elektif nedenlerle sezaryen yapılmıştı. Sezaryen sırasında alınan miyometriyum ve serum örneklerinde c-Jun, c-Fos, ve FRA2 proteinlerinin gen ekspresyonları araştırıldı. Sonuçların istatistiksel analizi SPSS Version20 programında yapıldı.

BULGULAR: Gruplar arası değişkenlerin normal dağılım eğilimleri belirlendikten sonra her iki grupta doku ve serum örneklerindeki c-Jun, c-Fos ve FRA2 genlerinin anlatım seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$). Rölatif karşılaştırma sonucunda doğum eyleminde olan grupta doku ve serum örneklerinde c-Jun, c-Fos ve FRA2 genlerinin anlatımında artış saptandı.

SONUÇ: Doğum eyleminde olan gebelerde c-Jun, c-Fos ve FRA2 genlerinin anlatımı seviyelerinde doku ve serum örneklerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark olmamaktadır, ancak bu genlerin anlatım seviyeleri doğum eyleminde olan grupta artmaktadır.

Anahtar kelimeler: Erken doğum, AP-1, prematürit

ABSTRACT

AIM: The World Health Organization defines normal birth as “spontaneous in onset, low-risk at the start of labor and remaining so throughout labor and delivery. The infant is born spontaneously in the vertex position between 37 and 42 completed weeks of pregnancy. After birth, mother and infant are in good condition”. Labor is divided 4 stages, which corresponds with uterine changes: 1) beginning, 2) preparation, 3) progression, 4) healing. Uterine quiescence and cervical softening occur in the first stage. Cervical softening occurs in consequence of compositional or structural changes in the extracellular matrix, like increased vascularization, stromal and glandular hypertrophy and hyperplasia. In the second stage, in the uterus the synthesis of CAPs (contractions associated proteins), oxytocin receptor, prostaglandin F receptor and connexin 43 proteins is increased to prepare for labor contractions and in the cervix occurs cervical maturation, which includes changes in the connective tissue. In the third stage occurs active labor process. This stage begins with the uterine contractions, which cause cervical opening and effacement, and ends with the placental separation. In the fourth stage uterus returns to its pre-pregnancy state.

Myometrial contractions occur in the result of interactions between actin and myosin proteins. This interactions occur in result of myosin light chain kinase enzyme activation. Enzyme activation occur by a lot of factors, such as cytokines, hormones and stretching. IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α concentrations increase during cervical opening and labor. This inflammatory process increases intracellular calcium concentrations and calcium binding to calmodulin, which is the calcium-binding protein. Calcium-calmodulin complex bind to myosin light chain kinase enzyme and activate it.

In this study our aim was to investigate the role of the inflammation in the birth. In this study the role of the members of Activator Protein-1 (AP-1) transcription factor's family was investigated in the determining of the inflammation. In the animal studies it has been shown that AP-1 protein family members have a role in the preterm labor via inflammation pathway. **Jun** (c-Jun, JunB, JunD) and **Fos** (c-Fos, FRA-1, FRA-2, FosB, FosB2) proteins, which are the members of the AP-1 family, form homodimers (Jun) and heterodimers (Jun and Fos) and do different transactivation or transrepression by binding to the DNA via AP-1 regions (TGAG/CTCA). In this study the difference between c-Jun, c-Fos and FRA2 gene

expressions in the myometrium and peripheral blood samples in the pregnant women who are in the labor and who are not in the labor was investigated.

MATERIAL AND METHODS: In Cerrahpasha Medical Faculty, Department of Obstetrics, Istanbul University, 20 pregnant women, who were hospitalized to the pregnant patient floor, were included to the study. 10 of them were in the control group and the other 10 women were in the working group. Study including criterias : ≥ 37 weeks of the pregnant women, between 18-35 ages who were not smoking or alcohol using, hadn't any chronic disease, hadn't any drug for continuous use, hadn't preterm rupture of fetal membranes, hadn't any pregnancy pathology such as polyhydramnios or plasenta previa. NST (non-stress test) was performed for all pregnant women, who were included to the study. Cervical examination was performed for women who had contractions in the non-stress test. In the pregnant women who were in the working group there were ≥ 4 contractions in the 20 minutes, or ≥ 8 contractions in the 60 minutes in the non-stress test or ≥ 3 cervical opening in the cervical examination. In the pregnant women, who were in the control group, there wasn't any contraction in the non-stress test and elective caesarean section was performed. The gene expressions of c-Jun, c-Fos, and FRA2 proteins were investigated in the serum and myometrium samples, which were taken during caesarean section. Statistical analyze of the results was performed in the SPSS Version20 programme.

RESULTS: After providing normal distribution tendency in comparison between the groups, there was not significantly difference between the levels of c-Jun, c-Fos and FRA2 gene expressions in the tissue and serum samples in both groups ($p > 0.05$). As a result of relative comparison in the group, which was in labor, the level of c-Jun, c-Fos and FRA2 gene expressions were increased.

CONCLUSION: In comparison with control group, among pregnant women, who are in the labor, there is not significant statistically difference between the levels of c-Jun, c-Fos and FRA2 gene expressions in the tissue and serum samples, but the expression levels of these genes increases in the labor group.

Key words: Preterm labor, AP-1, prematurity

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Normal doğum uterusu giden değişikliklere karşılık gelecek şekilde 4 evreye bölünür: 1) başlangıç, 2) hazırlık, 3) ilerleme, 4) iyileşme. Üçüncü evre doğum eylemini kapamaktadır. Doğum eylemi birbiriyle bağımlı 3 fizyolojik olaydan oluşmaktadır: 1) serviksın yeniden şekillendirilmesi, 2) fetal membranların zayıflaması ve yırtılması, 3) fetusu fundustan aşağı doğru iten, gittikçe sıklığı ve amplitudu artan ritmik uterusun kontraksiyonları.

Doğum eyleminin başlamasını düzenleyen mekanizmalarla ilgili iki genel teori vardır: 1) gebeliği devam ettiren faktörlerin kaybı ve 2) doğumu başlatan faktörlerin sentezi. Bunlar hem fetal, hem maternal uyarılarla olmaktadır.

Bu çalışmanın amacı erken doğum eyleminin patogeneğinde enflamatuar sitokinlerin salınımına neden olarak eylemin başlamasında görevi olduğu bilinen AP-1 transkripsiyon faktörlerinin serum ve miyometrium düzeylerinin kıyaslanması ve doğum eylemindeki rollerini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. NORMAL DOĞUM

2.1.1. NORMAL DOĞUM EYLEMİNİN TANIMI VE FİZYOPATOGENEZİSİ

Dünya sağlık örgütü normal doğumu “kendiliğinden başlar, doğum eyleminin başlangıcında düşük risklidir ve doğum eylemi ve doğum süreci boyunca bu şekilde devam eder. Bebek gebeliğin tamamlanmış 37 ve 42 haftası arasında baş gelişte spontan olarak doğar. Doğum sonrası bebek ve anne iyi durumdadırlar.” olarak tanımlıyor. Normal doğum uterusu giden değişikliklere karşılık gelecek şekilde 4 evreye bölünür: 1) başlangıç, 2) hazırlık, 3) ilerleme, 4)iyileşme. Birinci evrede uterusun sessizlik ve servikal yumuşama olmaktadır. Servikal yumuşama, artmış damarlanma, stromal ve glandüler hipertrofi ve hiperplazi gibi ekstrasellüler matrikste bileşimsel veya yapısal değişimlerin sonucu olarak gelişmektedir. İkinci evrede uterusu doğum kontraksiyonlarına hazırlanmak için CAPs (contractions associated proteins), oksitosin reseptörü, prostaglandin F reseptörü ve konneksin 43 proteinlerinin sentezi artar ve servikte bağ doku değişikliklerini kapsayan servikal olgunlaşma gerçekleşir. Üçüncü evrede aktif doğum eylemi gerçekleşmektedir. Bu evre servikal açılma ve efasmana neden olan uterusun kontraksiyonlarla başlar ve plasentanın ayrılması ile sonlanır. Dördüncü evrede uterus gebelikten önceki durumuna dönmektedir.

Üçüncü evrede bebeğin ve plasentanın doğumu gerçekleşir. Bu süreç de 3 evreden oluşmaktadır: 1) Servikal silinme ve açılma evresi yeterli sıklık, yoğunluk ve uzunluktaki aralıklı uterusun kontraksiyonların servikal efasman ve açıklık oluşturacak düzeye gelmesiyle başlar, serviksin tam açılmasına kadar devam eder. 2)

Fetusun atılma evresi fetusun doğumuyla sona erer. 3) Plasentanın ayrılma ve atılma evresi fetusun doğumundan hemen sonra başlar.

Doğum eylemi birbiriyle bağımlı 3 fizyolojik olaydan oluşmaktadır: 1) serviksin yeniden şekillendirilmesi, 2) fetal membranların zayıflaması ve yırtılması, 3) fetusu fundustan aşağı doğru iten, gittikçe sıklığı ve amplitudu artan ritmik uterin kontraksiyonlar.

Doğum eyleminin başlanmasını düzenleyen mekanizmalarla ilgili iki genel teori vardır: 1) gebeliği devam ettiren faktörlerin kaybı ve 2) doğumu başlatan faktörlerin sentezi.

Doğum eylemi en az 4 primer olayı içermektedir:

- Maternal ve ya fetal hipotalamik-pitüiter-adrenal aksın maternal stres ve depresyon veya fetal strese bağlı prematür aktivasyonu
- Enflamasyon ve enfeksiyon
- Desidual hemoraji
- Patolojik uterin distansiyon

Servikal açılma ve doğum eylemi sırasında İL-1 β , İL-6, İL-8 ve TNF- α miktarları artar. İL-1 β predominant olarak lökositlerden, İL-6 lökositlerden, glandüler ve yüzeyel epitel hücrelerinden, İL-8 ise lökositlerden, glandüler ve yüzeyel epitel hücrelerinden, stromal hücrelerden salgılanmaktadır. İL-1 β ve TNF- α , MMP-1, 3, 9 ve katepsin S üretimini artırır. İL-1 β TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase) ve MMP-2'nin endojen inhibitörü'nün ekspresyonunu azaltır. İL-1 β servikal dilatasyonu indükleyen en önemli ajanlardan olan COX-2 ve prostaglandin E₂ üretimi yapan birçok hücre tipi üzerine üretimin artırılması yönünde etkilidir. Nitrik oksit (NO) vazodilatasyona neden olarak lökosit geçişini arttırmaktadır. İL-8 nötrofillerin servikse migrasyonunu ve nötrofil kollajenaz (MMP-8) ve nötrofil elastaz üretimini arttırmaktadır. Servikte artan G-CSF faktör de nötrofil göçünü arttırmaktadır. Benzer değişiklikler fetal membranlarda ve miyometriyumda da oluşmaktadır.

İL-1beta ve TNF- α , amniyon ve desiduada prostaglandin sentezinde görev alan COX-2 enzim ekspresyonunu indükleyerek ve koryonda prostaglandinleri

metabolize eden PGDH enzimini inhibe ederek prostaglandin miktarını arttırmırlar[1,2]. İL-1beta ve/veya TNF- α fetal membranlar ve serviksteki ekstrasellüler matriksin yıkımını hızlandıran çeşitli MMPs'ın amniyo-koryon, desidua ve servikte ekspresyonunu arttırmırlar [3-5]. İL-8 ve CSF-2 membran rüptürüne neden olacak MMPs'ı serbest bırakma özelliği olan nötrofilleri toplar. TNF- α amniyon epitelial hücrelerinde apoptozisi indükleyerek membranların erken rüptürüne neden olur [6]. İL-6 desidual ve fetal membranlarda prostaglandin sentezine ve G-CSF ekspresyonunu arttırarak nötrofillerin toplanmasına ve aktivasyonuna neden olur [7,8]. Preterm doğum yapan intraamniyotik enflamasyonu olan gebelerde *neutrophil defensins-1 ve -2*, kalgranulin A ve C artmış olarak bulunmuştur [9].

Prostaglandinlerin artışı MMPs gibi genital traktus proteazlarının birikmesine ve artmış miyometrial kontraktileteye neden olur [10]. İn vitro insan çalışmalarında prostaglandinlerin progesteron reseptör-A/B oranını arttırdığı [11] ve desidual hücrelerde Prostaglandin F2 α -nın PR mRNA ve protein ekspresyonunu inhibe ettiği [12] gösterilmiştir. Bu çalışmalar prostaglandinlerin fonksiyonel progesteron çekilmesini indükleyebileceğini göstermektedirler. Böylece prostaglandinler gebeliğin herhangi bir aşamasında doğumu indükleyebilmektedirler ve erken doğumun patogeneğinde son ortak yoluğu oluşturdukları düşünölmektedir.

Maternal-fetal yüzeydeki proinflatuar sitokinler tarafından başlatılmış olan enflamasyon sonucunda fetus immunolojik dokunulmazlığını kaybederek doğal immun sistemin hedefine dönüşür. Kazanılmış immun sistem erken doğum eyleminde kaydedeğer rol oynamamaktadır. Maternal-fetal yüzeydeki proinflatuar sitokinlerin plasenta ve desiduanın gelişiminde bir sıra rolleri olduğu çalışmalarda gösterilse de, fazla miktarda İL-1 β , TNF- α , İFN- γ gibi proinflatuar sitokinlerin üretimi gebeliğin devamı için zararlı olduğu, yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir. İL-10 diğer hücreler tarafından proinflatuar sitokinlerin üretimini repress etmektedir. Maternal-fetal yüzeydeki en çok araştırılmış immunomodölatör progesterondur (P4). Enflatuar cevap yolaklarını ve kontraktıl elemanların gen ekspresyonunu uterus ve serviksde inhibe ederek ve immun hücrelerin kemotaksisini sağlayan kemokinlerin sentezini azaltarak uterin

sessizliği sağlar. Progesteron mitojenle stimule olmuş lenfosit stimulasyonunu bloke eder, allograft sağkalım süresini arttırır, antikor üretimini module eder, monositlerin *oksidatif patlama* olayını azaltır, makrofajların bakteri ürünlerine karşı proinflamatuvar sitokin üretimini azaltır. Bu immunomedulatör etkiler progesteronun immun sistem hücrelerine direkt ve indirekt etkisi sonucu olmaktadır.

2.1.2. ERKEN DOĞUM TEHDİDİNİN TANIMI VE RİSK FAKTÖRLERİ

Erken doğum tehdidi gebeliğin tamamlanmış 37. haftasından önce servikal açılmaya neden olan uterin kontraksiyonların başlanmasıdır. Erken doğum ise gebeliğin tamamlanmış 37. haftasından önce doğumun gerçekleşmesidir. Erken doğum için alt gebelik sınır ise 20+0 haftadır. Erken doğum dünya çapında tüm doğumların %5-18'ini oluşturmaktadır. Gelişmiş ülkelerde bebek morbidite ve mortalitesi nedenlerinin başında gelmektedir (CDC 2000). Preterm kontraksiyonları olan kadınlardan hangilerinin erken doğum yapacağı kesin olarak bilinmemektedir. Erken doğum eyleminde olan kadınların doğru belirlenmesi neonatal sonuçları iyileştirmek için bazı girişimlerin yapılmasına olanak sağlamaktadır. Bunlar: antenatal kortikosteroid tedavisi, GBS enfeksiyonu profilaksisi, fetal nöroproteksiyon amaçlı magnezyum sulfat verilmesi ve gereklilik durumunda uygun yenidoğan yoğun bakım ünitesinin olduğu birime transfer edilmesidir.

Erken doğumların %70-80'i spontan oluşmaktadır: %40-50 olguda preterm eylem, %20-80 olguda erken membran rüptürü, küçük bir grubu da servikal yetmezlik oluşturmaktadır. Kalan %20-30 olgu da maternal ve ya fetal endikasyonlar nedeniyle iatrojeniktir.

Tablo 1. Erken doğum tanımları

Gestasyonel yaşa göre	
WHO (World Health Organization)	
Orta-geç preterm	32-37 hafta
Çok pretem	28-32 hafta
Aşırı preterm	<28 hafta
CDC (Centers for Disease Control and Prevention)	
Preterm	<37 hafta
Geç preterm	34-36 hafta
Erken preterm	<34 hafta
Doğum kilosuna göre	
Düşük doğum aralıklı	< 2500 gr.
Çok düşük doğum ağırlıklı	< 1500 gr.
Aşırı düşük doğum aralıklı	<1000 gr.

Klein LL, Gibbs RS. Use of microbial cultures and antibiotics in the prevention of infection-associated preterm birth. Am J Obstet Gynecol 2004; 190:1493.

Erken doğum için risk faktörleri **Tablo 2**'de gösterilmiştir. Bu risk faktörlerinden biri veya birkaçı doğum eylemini başlatacak olaylar kaskadını aktive ederek veya süpresif faktörleri inhibe ederek erken doğuma neden olmaktadır.

Farklı alanlarda (epidemioloji, histopatoloji, mikrobiyoloji, biyokimya, maternal-fetal tıp) yapılan çalışmalar erken doğum ile enfeksiyon/enflamasyon arasında bağlantı olduğunu göstermiştir. Plasental patoloji üzerinde yapılan araştırmalarda erken doğumların %20-75'inde plasentada koryoamnionit

bulguları saptanmış ve bu hastaların %30-60'ında pozitif membran kültürleri görülmüştür [13-16].

Risk faktörleri önceden belirlenebilirse, erken doğuma bağlı komplikasyonların önüne geçilebilir. Ancak erken doğumların 2/3'si risk faktörü olmayan kadınlarda görülmektedir.

Servikojinal fFN kontraksiyonları ve hafif servikal dilatasyon ve efasmanı olan gebelerde özellikle ultrasonla servikal uzunluk ölçümü ile kombine edildiğinde erken doğumu 7-14 gün önceden öngörmede kullanışlıdır. 14 günün üzerinde ise prediktiv değeri düşüktür.



Tablo 2. Erken doğum risk faktörleri

<ul style="list-style-type: none">-Spontan erken doğum hikayesi [17-29]-İntrauterin enfeksiyon-Desisual hemoraji-Aşırı uterin gerginlik (polihidramniyozis, çoğul gebelik)-Maternal veya fetal stress-Uteroplasental vasküler yetmezlik-Aşırı inflamatuvar cevap-Hormonal faktörler-Genetik faktörler (Maternal birinci derece akrabalarda spontan erken doğum hikayesi veya annenin erken doğmuş olması)-Servikal yetmezlik-Partner olmaması-Düşük sosyoekonomik düzey-Anksiyete, stress-Boşanma, ayrılık, ölüm gibi olaylar-Gebelik sırasında abdominal cerrahi-Kötü çalışma koşulları(uzun süre ayakta kalma, endüstriyel makinelerin kullanımı, fiziki yorgunluk, mental ve ya iş ortamına bağlı stress)-Uterin anomaliler(DES maruziyeti, miyoma uteri)-Erken membran rüptürü-İkinci trimesterde düşük hikayesi-Servikal cerrahi hikayesi-Kısa servikal uzunluk-Prematür servikal dilatasyon ve efasman [56-58]-Cinsel yolla bulaşan hastalıklar	<ul style="list-style-type: none">-Sistemik enfeksiyon, piyelonefrit, apandisit, pnömoni-Genital trakt enfeksiyonları-Kronik maternal hastalıklar-Bakteriüri-Periodontal hastalık-Plasenta previa-Abrupsiyo plasenta-Vajinal kanama, özellikle bir trimesterden fazla-Madde bağımlılığı-Sigara kullanımı [19, 30, 31-37]-Maternal yaş (<18 veya >40) [38-40]-Afriko-Amerikan ırk-Zayıf beslenme ve düşük VKİ-Kısa boy [41-43].-Yetersiz prenatal bakım-Anemi (hemoglobin <10 g/dl)-Aşırı uterin kontraksiyon-Düşük eğitim seviyesi-Fetal anomaliler [44, 45]-Fetal büyüme geriliği [46-51]-Çevresel faktörler (aşırı sıcaklık, hava kirliliği)-Fetal ölüm-Vajinal sekresyonlarda fFN testi pozitifliği-YÜT kullanılarak gebe kalma-Deidual hemoraji sonucu oluşan erken gebelik kanamaları-Erkek cinsiyetli fetus [52-55]
--	---

2.2 AKTİVATÖR PROTEİN-1

AP-1 (Aktivatör Protein-1) ailesi '*basic leucine zipper*' ailesine ait yapısal ve fonksiyonel olarak benzer olan transkripsiyon faktörlerini içerir. Transkripsiyon faktörleri spesifik DNA bölgelerine bağlanarak genetik bilginin DNA'dan mRNA'ya (mesenger RNA) transkripsiyon oranını kontrol eden proteinlerdir. Çok sayıda ekstrasellüler sinyalin (stress, gerilme, dış ortam şartlarında değişiklikler, onkojenler, sitokinler) etkisinden sonra AP-1 aktivasyonu sonucu proliferasyon, nöronal hücre depolarizasyonu, apoptozis, sitokin salınımı gibi geniş yelpazede etkiler görülmektedir. Bu protein yapısındaki transkripsiyon faktörleri AP-1 ailesi üyesi olan proteinler Jun (c-Jun, JunB, JunD), Fos (c-Fos, FRA-1, FRA-2, FosB, FosB2) AP-1 bölgeleri ile (TGAG/CTCA) DNA'ya bağlanarak ve homodimerler (Jun) veya heterodimerler (Fos ve Jun) oluşturarak farklı şekillerde transaktivasyon ve transrepressyon yapan farklı biyokimyasal yapılar oluştururlar.

AP-1 ilk defa HeLa nuklear ekstraktlarda SV40 (simian virus 40) ve hMTIIA (human metallothionein IIA) genlerinin güçlendirici bölgesindeki DNA element (TGACTCA) olarak bulunmuştur [59]. AP-1 bağlama bölgeleri sonradan çok miktarda hücre ve virüs genlerinde bulunmuştur. AP-1 benzeri sekansa bağlandığı gösterilen ilk protein maya transkripsiyon faktörü GCN4 olmuştur [60-64]. Paralel olarak yapılan çalışmalarda c-Fos proteininin adiposit spesifik genlerin promotör bölgelerindeki AP-1 benzeri sekansa bağlanan DNA bağlama aktivitesinin bir komponenti olduğu gösterilmiştir [65, 66]. Sonradan Fos ve Jun ilişkili birçok proteinler AP-1 DNA bağlama aktivitesi olarak bulunmuştur [65, 67].

ATF (ATFa, ATF-2, ATF-3) ve JDP (JDP-1 ve JDP-2) ailesi üyesi olan bazı proteinler de predominant olarak Jun proteinleri ile olmak üzere AP-1 proteinleri ile heterodimerik kompleksler oluştururlar. Bu protein dimerleri hedef genlerin promotör ve güçlendirici kısımlarındaki *12-O-tetradecanoylphorbol-13acetate response elements* kısımlarına bağlanarak etki ederler. Dimerizasyon heptad lösin rezidü tekrarından oluşan *leucine zipper* alanı ile olmaktadır. Bu da birçok transkripsiyon faktörü arasındaki etkileşimi sağlamaktadır. Bu yapı amfipatik sarmal oluşturur, bu şekildeki iki struktur sarmal-sarmal şeklinde

birleşir. *Leucine zipper* alanına sahip proteinler *leucine zipper* alanındaki amino asit dağılımına göre spesifikite göstermektedirler. *Leucine zipper* alanına komşu bazik amino asitlerden zengin helikal alan DNA bağlama bölgesini oluşturur. Proteinlerin dimerizasyonu bazik alanların herbirinin DNA tanıma ve bağlanma bölgesine eşit oranda bağlanmasını sağlar. Dimerizasyon ve DNA'ya bağlanmak için bu şekilde helikal bölgelere sahip olan transkripsiyon faktörleri *b-zip* proteinler olarak adlandırılırlar. cAMP response element binding protein(CREB) veya ATFs (activating transcription factors), C/EBP, TEF/DBP, Maf/Nr1, NF-E2 gibi transkripsiyon faktörleri de *b-zip* grubuna aittirler. *b-zip* transkripsiyon faktörleri üyelerinin AP-1 bölgelerine benzer DNA paternlerinin olması, AP-1 yarı-alanlarının olması, çekirdek kısımlarında geniş AP-1 benzeri tekrarlarının olduğu görülmüştür. Farklı *b-zip* proteinleri arasında da dimerizasyonlar oluşmakta ve çok spesifik kombinasyonlar oluşabilmektedir. Aslında AP-1 protein ailesinin kontrol ettiği gen ekspresyonunu araştırırken diğer *b-zip* proteinleri de dikkate almak gerekmektedir.

AP-1 proteinleri *b-zip* olmayan transkripsiyon faktörleriyle de kompleksler oluştururlar (GR (glucocorticoid receptor), nuclear factor-kB (NF-kB), MyoD ve USF gibi bHLHZip proteinleri, nuclear factor of activated T cells (NFAT) gibi).

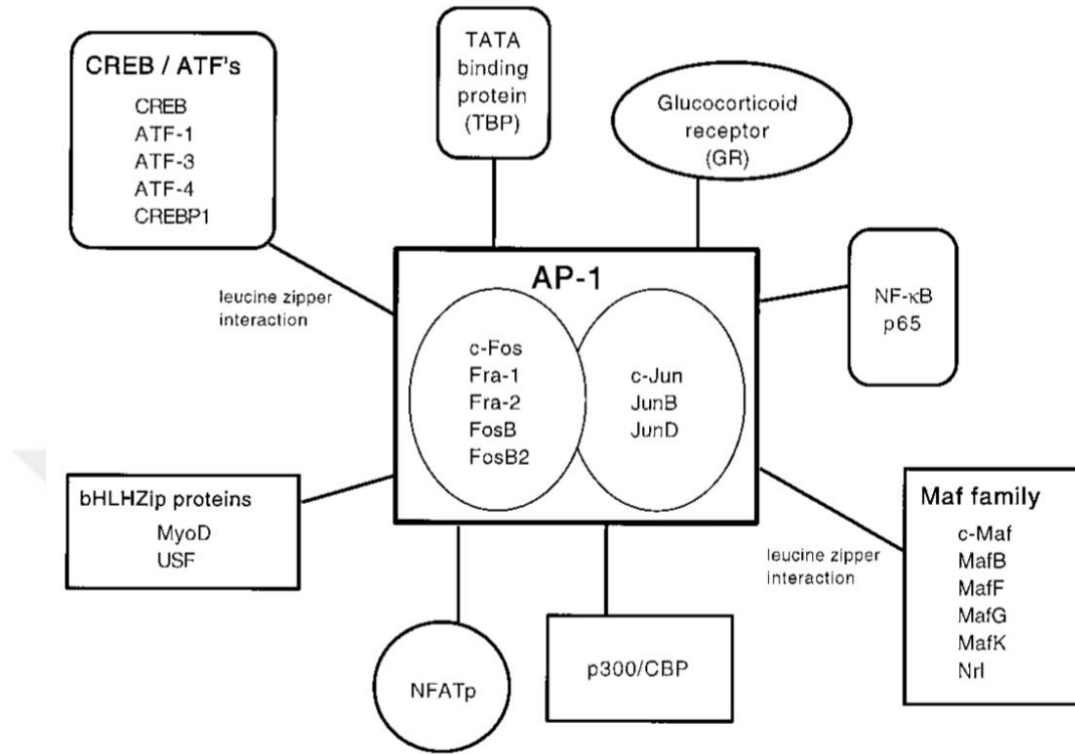
Fos ve Jun proteinleri tarafından oluşan dimerler Jun/Jun arasında oluşan dimerlerden daha dayanıklı olurlar ve transkripsiyonel aktivasyon güçleri daha fazla olmaktadır [94, 95]. Bu şekilde DNA'ya bağlanma ve transkripsiyonel aktivasyonları dimeri oluşturan spesifik partnerlere göre değişmektedir; AP-1 spesifitesinin temel mekanizmasının AP-1 proteinlerinin farklı ekspresyonlarından dolayı olduğu öngörülmektedir [96]. Fos proteinlerinin ekspresyonu ve stabilitesinin AP-1 proteinleri tarafından regule olan genlerin aktivitesi için önemli olduğu varsayılmaktadır. Jun ve Fos proteinlerinin her biri farklı transaktivasyon domainine sahiptir. C-Jun, c-Fos ve FosB proteinleri NH₂-terminal transaktivasyon domainine sahipken, JunB, JunD, Fra-1, Fra-2 ve FosB2 zayıf transaktivasyon aktivitesi sergilemektedir.

Transkripsiyonel regülasyona AP-1 üyelerinin katkısının ilk aşaması AP-1 proteinlerini kodlayan genlerin transkripsiyonudur. Hücrenin stimülasyonundan sonra tarif edilen ilk genler olmasına rağmen Fos ve Jun proteinleri geçici olarak eksprese edilirler. Genel olarak Jun ve Fos proteinlerinin transkripsiyonu de novo protein sentezine gerek duymamaktadır, bu da gerekli faktörlerin hücrede daha önceden aktive olmadan var olduklarını gösterir. AP-1 protein fonksiyonları primer olarak fosforilasyon ile aktive olur, redoks yoluyla da olabilmektedir [68-70]. AP-1 üyelerinin her biri transaktivasyon ve transrepressyon yapabilme özelliğine göre farklılıklar gösterirler. Hücre kültürü çalışmalarında her bir proteinin hücre proliferasyonu ve onkojenik dönüşümde farklı etkiler gösterdiği görülmüştür [71-75]. Bu farklılıkların büyük kısmı dimerizasyon partnerlerindeki değişikliklere göre olmaktadır. Her bir AP-1 proteininin fonksiyonu posttranslasyonel modifikasyona ve dimer oluşturulacak partnere göre değişmektedir.

Genel olarak Jun proteinleri erişkin dokularında çok miktarda olmaktadır, c-Jun organogenez dönemi boyunca eksprese olur, JunB fetal hayatın son dönemlerine kadar eksprese olmaz. Fos proteinlerinin çoğu erişkin dokularında ya çok az miktarlarda eksprese olur, ya da tespit edilemeyecek kadar az olur, bunun tek istisnası FRA-2'dir (erişkin dokularında miktarı Jun miktarına benzer düzeyde olur).

2.2.1 DOĞUM EYLEMİNİN PATOGENEZİNDE AKTİVATÖR PROTEİN-1 ÜYELERİNİN ROLÜ

Normal doğum eylemi ve erken doğumda görevli proinflatuar ve prokontraktil genlerin regülasyonunu NFkB (nuclear factor kB) ve AP-1 gibi transkripsiyon faktörleri sağlamaktadır. Gebeliğin büyük bir bölümünde süregelen sessizlik progesteron ve diğer faktörler tarafından sağlanmaktadır ki, bu faktörlerin kesilmesi ve miyometrial kontraksiyonlar ve servikal açılmanın başlanmasına neden olan inflammatuar yolların aktifleşmesi doğum eyleminin başlamasına neden olur. Miyometrial AP-1 aktivasyonu sitokinlerin (İL-6, İL-8, İL-1β), metalloproteinazların (Mmp3 ve Mmp10) ve prokontraktil proteinlerin (Cox-2 ve Cx43) salınımına neden olur.



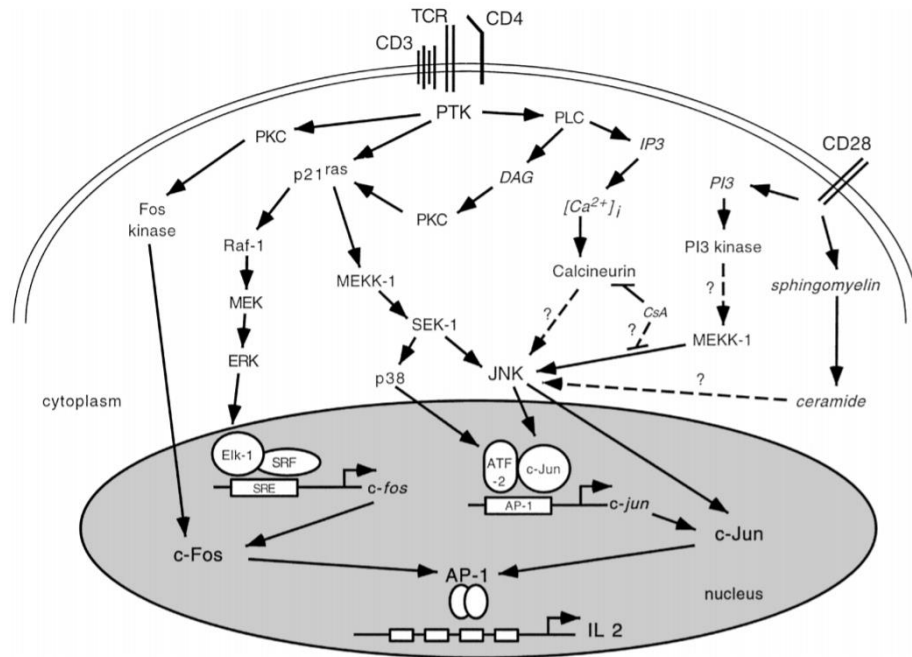
Şekil 3. AP-1 proteinleri ile diğer transkripsiyon faktörleri arasında etkileşimler. TATA-binding protein (TBP)

3-cü trimesterde enfeksiyon durumu olmayan gebelerde de amniyon, koryon-desidua ve miyometriumda İL-8 ve İL-1 β düzeylerinde artış saptanmıştır [122, 123]. İL-1 β , İL-6 ve TNF- α gibi sitokinlerin major kaynağı makrofajlardır. Gebeliğin geç dönemlerinde desiduada proinflamatuvar sitokin mRNA'larının kaynağı olan nötrofil ve makrofajların miktarı artar. Desiduada NK (natural killer), T lenfosit, desidua hücreleri, endotel hücreleri ve trofoblastlar gibi diğer hücreler de sitokin salınımına katkıda bulunur. Spontan preterm eyleme giren gebelerin koryo-desiduasındaki VEGF (vascular endothelial growth factor) miktarı term gebelikte spontan doğumla sonuçlanan hastalarinkine kıyasla daha fazla bulunur. VEGF aktivasyonu inflamatuvar hücrelerin uterusdaki miktarının artmasına neden olur. Bu da direkt veya indirekt olarak PGF $_{2\alpha}$ ve PTGFR aracılığıyla proinflamatuvar sitokinler tarafından oluşmaktadır. İL-1 β ve TNF- α direkt olarak *human decidual fibroblast VEGF*, *basic FGF*(fibroblast growth factor) ve *TGF- β* (transforming growth factor- β)düzeylerini arttırırlar.

Uterus aktivasyonu birçok gende ve onların ürünlerinde sürekli değişiklikler sonucu uterusun doğuma hazırlanması şeklinde olur. Bunların genel adı UAPs (*uterine activation proteins*) olup OTR, PGHS-2, CX-43 (connexin-43), iNOS (inducible nitric oxide synthase) ve PTGFR (Prostaglandin F Receptor)'dan oluşmaktadırlar. Aktivasyon sonucu uterusun oksitosin ve PGF2 α gibi kontraktil stimuluslara karşı sensitivitesi ve responsivitesi artar. Proinflamatuvar sitokinler tüm UAPs'lerin ekspresyonunu regule ederler. Term gebelikte MMP-2 ve -9 desidua ve diğer intrauterin dokularda artar. MMP-1,-2,-3 ve -9 İL-1 β 'yı inaktif formlarına degrade ederler. PGF2 α desiduada MMP-2 ve -9'un gen ekspresyonunu arttırır ve onların aktivitelerinin endojen inhibitörleri olan TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1) miktarını azaltır.

AP-1 proteinlerinin aktivasyonu farklı şekillerde module olmaktadır. Sitokinler, büyüme faktörleri, stress sinyalleri, onkojenik stimuluslar çok sayıda sinyal transduksiyon yollarının aktivasyonunu provoke ederek ekstrasellüler matriksdeki sinyallerin nukleusa ulaşmasına neden olurlar [77]. Bu regülasyon AP-1 proteinlerini kodlayan genlerde transkripsiyonel değişiklikler yapılarak, onların mRNA'larının stabilizasyonu kontrol edilerek, daha önceden varolan veya yeni sentezlenen AP-1 komponentlerinin postranslasyonel modifikasyonu sağlanarak, diğer transkripsiyon faktörleri ve kofaktörleri ile spesifik bağlantılar kurularak olmaktadır. Postranslasyonel kontrol farklı kinazlar tarafından fosforilasyonu içermektedir. Bu da DNA'ya bağlanma aktivitesini, transaktivasyon potansiyelini ve protein stabilitesini sağlar. En çok çalışma yapılan MAPK (Mitogen-activated protein kinase) ailesinin üyesi olan JNK'dır (Jun NH2-terminal kinases). MAPK kaskadı tarafından aktive olduktan sonra JNKs nukleusa geçer, Jun proteinini NH2-terminal transaktivasyon domaini kısmından fosforile ederek transaktivasyon potansiyelini ortaya çıkarır. JNKs aynı zamanda JunD ve ATF-2 proteinlerini de fosforile ve aktive ederler. Fos proteinlerinin aktivitesini kontrol eden kinazlar henüz kesin olarak belirlenememiştir. AP-1 proteinlerinin etki ve modülasyonunun kompleksliği ve selektivitesinin farklı genlerin farklı AP-1 dimerleri tarafından farklı şekilde uyarıldığından dolayı olduğu düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalarda fare miyometriyumunda gebeliğin sonuna kadar c-Jun mRNA'sının sabit olarak kaldığı, c-Fos mRNA'sının ise doğum başlangıcına kadar olan sürede arttığı görülmüştür [76]. Gebeliğin geç dönemlerinde uterusda ekstrasellüler matriks depozisyonu, sellüler remodeling, miyometrial hücre büyümesi gibi önemli yapısal değişiklikler olur. Laminin, kollajen, elastin, fibronektin gibi bazal membranı oluşturan yapıların, MMPs ve TİMPs (Tissue inhibitors of metalloproteinases) gibi ekstrasellüler matriks remodeling enzimlerinin genlerinin promoter bölgelerinde AP-1 bölgeleri vardır [78-82]. Miyometriyumun sessizlik döneminden koordine kontraksiyonlar dönemine geçişinde Cx43, OTR (oxytocin receptor) prostaglandin F2 α gibi CAPs (contraction associated proteins) proteinlerinin gen ekspresyonu artar. Bu protein genlerinin de promoter bölgelerinde AP-1 bölgeleri bulunmuştur.



Şekil 4. TcR/CD3 ve CD 28 ko-stimulatör yolları. PLC, fosfolipase C; [Ca]_i, intracellüler kalsiyum seviyeleri; MEK, MAP kinaz/ERK; MEKK-1, MAP kinaz/ERK kinaz-1; SEK-1, stres-aktive edilmiş protein kinaz/ERK-1; SRF, serum yanıt faktörü; SRE, serum yanıt elemanı

Yapılan çalışmalarda gebe ve gebe olmayan farelerde AP-1 ve CAP genlerinin indüksiyonu arasında korelasyon bulunmuştur. Gebe olmayan farelerin miyometriumunda östrojen tedavisinin c-Fos, c-Jun, JunD ve JunB ekspresyonunu arttırdığı görülmüştür. CAP mRNA'larında da artış saptanmıştır. C-Fos ve c-Jun mRNA düzeylerinin mekanik gerginlik artışı sonucu da arttığı gösterilmiştir.

JNK (c-Jun amino-terminal kinase) MAPK üyesidir. Hücreler sitokinlere veya stresse maruz kaldığında aktifleşir, bundan dolayı bu sinyal yolağının aktivasyonu inflamatuvar cevaplara neden olabilir. Bu yolak aynı zamanda hücre proliferasyonu, apoptozis, doku morfogenezisinde de rol alır. Kinaz subdomain VIII bölgesindeki Thr-Pro-Tyr alanındaki Thr ve Tyr rezidülerinin çift fosforilasyonu ile aktive olur. 3 gen tarafından kodlanır: jnk1, jnk2, jnk3. Bu genlerin ürünleri olarak 4 adet JNK1, 4 adet JNK2 ve 2 adet JNK3 izoformları oluşur.

JNK T- hücrelerin kostimulasyonu sırasında aktive olur, İL-2 sekresyonunda ve timositlerin proliferasyonunda rolü olduğu düşünülür. Th1 ve Th2 hücrelerinin diferensiasyon programı sırasında aktive olur. TNF- α sekresyonunda da rolü olduğu düşünülmektedir. JNK sinyal yolağının inflamatuvar cevaplardaki rolü endotelial hücreler üzerinde yapılan çalışmalarda daha çok araştırılmıştır. TNF- α gibi inflamatuvar sitokinlere cevap olarak lökosit adezyon molekülü olan E-selektin ekspresyonu artar.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dekanlığı Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan, 06.02.2018 tarihli ve 83045809-604.01.02 sayılı onay alındıktan sonra Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı bünyesinde, kurul kararından sonraki periyotta prospektif olarak gerçekleştirildi.

Anabilim Dalımız Doğum servisine yatan, çalışma için uygun hastalardan çalışma hakkında detaylı olarak bilgilendirilen ve katılmayı kabul edenlerin ilgili kayıtlı onamları alınmıştır. Hastaların anamnezleri, fizik muayene özellikleri, doğum sürecinin aşaması gibi bilgiler çalışmamız için oluşturulan ayrı bir form kullanılarak kayıt edildi.

3.1. ÇALIŞMA GRUBU

Çalışmaya Alınma Ölçütleri: 18-35 yaş arasında bilinen kronik hastalığı olmayan, sürekli kullandığı ilaç olmayan, aktif su gelişi olmayan, polihidramniyozis veya plasenta previa gibi patolojik gebelik bulguları olmayan, sigara ve alkol kullanmayan ≥ 37 hafta gebeler çalışmaya dahil edildi. Çalışma grubunu oluşturan hastalar aktif doğum eylemine giren ve fetal veya maternal nedenlerden dolayı sezaryene alınan hastalardan oluşmaktadır. Kontrol grubunu oluşturan hastalar ise non-stress testte kontraksiyon saptanmayan ve elektif olarak sezaryen yapılan hastalardan oluşmaktadır.

Çalışmadan Dışlanma Ölçütleri: 18 yaş altı ve 35 yaş üstü, bilinen kronik hastalığı olan, sürekli kullandığı ilaç olan, aktif su gelişi olan, polihidramniyozis veya plasenta previa gibi patolojik gebelik bulguları olan, sigara ve alkol kullanan ≤ 37 hafta gebeler çalışmaya alınmadı.

Tüm hastalar sezaryen öncesi NST'ye bağlandı. NST'de kontraksiyon çıkan gebeler vajinal yol ile muayene edildi. Çalışma grubunu oluşturan gebelerde NST'de 20 dakikada ≥ 4 veya 60 dakikada ≥ 8 kontraksiyon veya vajinal tuşede ≥ 3 cm servikal açıklık vardı.

Tüm hastalardan sezaryene alınmadan önce 9 ml kırmızı kapaklı *VACUETTE® Z Serum Sep Clot Activator* tüplerine periferik venöz kan alındı. Kan örnekleri alındıktan sonraki 6 saat içinde 3000 rpm'de (Revolutions Per Minute) 15 dakika santrifuj edildi ve serum örnekleri eppendorf tüplere alınarak -80°C'de tutuldu. Haftasonu şartlarında alınan örneklerden elde edilen serumlar -20°C'de tutuldu.

Sezaryen sırasında uterusda açılan Munro-Kerr insizyonunun üst kımından yaklaşık 1 cm³'lik miyometrium örneği alındı, içinde *RNAase later* solüsyonu olan eppendorf tüplere konuldu. Miyometrium örnekleri 24 saat +4°C'de tutulduktan sonra -80°C'ye alındı. Kan ve doku örnekleri alındığı tarih itibariyle en geç 48 saat içerisinde İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Moleküler Tanı ve Analiz birimi laboratuvarına soğuk zincir yöntemi ile transfer edildi.

3.2. LABORATUVAR

3.2.1 DOKUDAN TOTAL RNA İZOLASYONU

Dokudan total RNA izolasyonu için *PureLink™ RNA mini kit* (Invitrogen by ThermoFisher Scientific) kullanılmıştır. İzolasyon kitte önerilen prosedüre göre yapılmıştır;

1. Her bir örnek için 1 ml *Lysis Buffer'a* 10 µl β-merkaptoetanol eklenir ve 1 dakika bekletilip vorteks yapılır. Hazırlanan buffer kullanılır.
2. Miyometrium dokusundan kesit alınıp daha önceden -20°C'de bekletilmiş havanda sıvı azot ile ezilir. Tüm bu aşamalar sırasında dokular buzda bekletilir. Ezilen örnekler 2 ml'lik mikrosantrifuj tüplerine transfer edilir. Tüplere konulan örnekler 30-60 mg arasında olacak şekilde ayarlanmıştır.
3. 2 ml mikrosantrifuj tüplerindeki örneklerin miktarlarına göre hazırlanan *Lysis buffer* eklenir. Eklenecek *Lysis buffer* miktarı aşağıdaki gibi ayarlanmaktadır;
 - <20 mg → 350 µl
 - 20-40 mg → 600 µl
 - 40-60 mg → 800 µl
 - >60 mg → 1000 µl

4. Ardından 2600g'de 5 dakika santrifüj yapılır ve süpernatant başka bir 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpe aktarılır.
5. Aynı tübe süpernatant hacmi kadar %70'lik etanol eklenir ve vorteks yapılır.
6. Kitin içinde bulunan "*spin cartridge*" tübüne 700 µl örnek eklenir ve 12.000 g'de 15 saniye santrifüj yapılır. Santrifüjün ardından "*collection*" tüpte kalan sıvı atılır.
7. 5. ve 6. basamakta belirtilen teknikler 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpte örnek bitene kadar tekrarlanır.
8. "*Spin cartridge*" tübe 700 µl "*Wash Buffer 1*" eklenir ve 12.000 g'de 15 saniye santrifüj yapılır. Ardından "*Spin cartridge*" tüpün içerisindeki filtre yeni bir "*collection*" tübe aktarılır.
9. Filtrenin aktarıldığı yeni "*collection*" tüpe 500 µl "*Wash Buffer 2*" eklenir ve 12.000 g'de 15 saniye santrifüj yapılır. "*collection*" tüpte kalan sıvı atılır.
10. Yeniden 500 µl "*Wash Buffer 2*" eklenir. 12.000 g'de 15 saniye santrifüj yapılır ve "*collection*" tüpte kalan sıvı atılır.
11. Ardından 12.000 g'de 1 dakika santrifüj yapılır. Filtrenin bulunduğu "*collection*" tüp atılır ve filtre "*spin cartridge recovery*" tüpe yerleştirilir.
12. 30 µl RNAase'sız su filtrenin tam ortasına gelecek şekilde eklenir ve oda sıcaklığında 5 dakika beklenir.
13. 12.000 g'de 2 dakika santrifüj yapıldıktan sonra filtre atılır.
14. Nanodrop cihazında elde edilen örneklerin kalite kontrolü yapılır ardından örnek kullanılana kadar -80°C'de saklanır.

3.2.2. SERUMDAN TOTAL RNA İZOLASYONU

Total RNA İzolasyonu

İzolasyon "mirVana PARIS Kit" prosedüründeki önerilere göre yapılmıştır. Bu çalışma kapsamında, 625 µL ve daha fazla miktarlardaki sıvı örneklerinin RNA izolasyonu için kitin önerdiği protokol izlendi.

A.Organik Bileşenlerin Açığa Çıkarılması

1. Sıvı numunelerdeki RNA'yı izole etmek için, oda sıcaklığındaki 2ml'lik santrifüj içerisindeki 625 µL serum örneği ile aynı miktardaki 37⁰C su banyosunda önceden ısıtılmış 2X denatürasyon solüsyonu karıştırılır.

- Eğer 2X denatürasyon solüsyonu ilk kez kullanılıyorsa, 2X denatürasyon solüsyon etiketli şişeye 375 µL 2-merkaptoetanol eklenir. İyice karıştırılır. •

2. Serum ve 2X Denatürasyon Solüsyonunun toplam hacmi kadar (625µl) “*Fenol: Kloroform*” karışımının alt fazı eklenir. Çok iyi karıştırılır, 30-60 saniye vorteks yapılır ve sonra tekrar elde karıştırılır. 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra, masaüstü mini santrifüj cihazında maksimum hızda 5 dakika santrifüj edilir.

1. Karışım oda sıcaklığında maksimum hızda ($\geq 10.000 \times g$) 5 dakika boyunca santrifüj yapıldıktan sonra, karışımda sulu ve organik faz ayrımı görünmüyorsa, santrifüj işlemi ayırım netleşene kadar tekrarlanır.

4. Ayrılan fazlardan en üstteki şeffaf kısım 2mL'lik yeni steril santrifüj tüplerine aktarılır. Aktarılan hacmin 1,25 katı miktardaki oda sıcaklığındaki absolute “*EtOH*” (%100) eklenir.

5. Her bir örnek için, filtre kartuşu toplama tüplerinden birine yerleştirilir. 700 µL lizit/etanol karışımı filtre kartuşunun üzerine örnek bitene kadar eklenir.

6. 8.000 g*'de 18 saniye santrifüj edilir. Filtreden geçen sıvı boşaltılır ve lizat/etanol karışımının tamamı filtre içinden geçene kadar santrifüj işlemi tekrarlanır.

7. Bu aşamada sonraki adımda kullanılacak olan Elution Solüsyon, 95⁰C'ye ayarlanmış su banyosunda ısıtılmak üzere, her bir örnek için 100 µl olmak şartıyla 0,5 mL'lik santrifüj tüplerine paylaşılır.

8. Filtre kartuşu'na 700 µL miRNA yıkama solüsyonu 1'i uygulanır ve 15 saniye boyunca 8000g*'de santrifüj edilir. Filtreden geçen sıvı atılır ve filtre kartuşu aynı toplama tüpüne yerleştirilir.

- Eğer yıkama solüsyonları ilk kez kullanılıyorsa **Tablo 3'** de belirtildiği şekilde hazırlanır.

Tablo 3. Kit solüsyonlarının hazırlanışı.

SOLÜSYON	HAZIRLANIŞI
Yıkama Solüsyonu 1	Yıkama solüsyonu 1 etiketli şişeye 21 mL % 100 etanol eklenir. İyice karıştırılır.
Yıkama solüsyonu 2/3	Yıkama solüsyonu 2/3 etiketli şişeye 40 mL % 100 etanol eklenir. İyice karıştırılır.

9. Filtre kartuşu'na 500 µL miRNA yıkama solüsyonu 2/3 uygulanır ve 15 saniye boyunca 8000g*'de santrifüj edilir. Filtreden geçen sıvı atılır ve filtre kartuşu aynı toplama tüpüne yerleştirilir. 500 µL Yıkama Solüsyonu 2/3 ile bir önceki basamak tekrarlanır. Son yıkamada sonrası filtreden geçen sıvı atıldıktan sonra, aynı toplama tüpüne aynı filtre kartuşu yerleştirilir ve filtrede kalan sıvıyı çıkarmak için 1 dakika maksimum hızda santrifüj yapılır.

10. Filtre kartuşu yeni bir toplama tüpüne (Kit içerisinde her bir örnek için 2 toplama tüpü, 1 filtre kartuşu bulunmaktadır) aktarılır. Filtrenin merkezine 30 µL önceden 95°C'de ısıtılmış Elution Solüsyon uygulanır ve toplama tüpünün kapağı kapatılarak oda sıcaklığında 25 dk beklenir. Maksimum hızda 30 saniye santrifüj yapılır. Filtreler atılır.

11. Elde edilen total RNA kısa süre için -20°C'de, uzun süre için -80°C'de saklanır.

3.2.3. TOTAL RNA'NIN SPEKTROFOTOMETRİK ANALİZİ

Tez kapsamında toplanan serum ve doku örneklerinden izole edilen total RNA'ların kalite ve miktar tayinleri "*NanoDrop IMPLEN P-Class*" spektrofotometre cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Her izolasyon sonrasında serum örnekleri için "*mirVana PARIS Kit*" içerisinde yer alan çözme solüsyonu, doku örnekleri için "*PureLink™ RNA mini kit*" olarak kullanılmıştır. Her örnekten 1 µl alınarak ölçüm gerçekleştirilmiştir.

Total RNA dilüsyon oranları: Tüm dokudan elde edilen total RNA örnekleri µl 'de 100 ng olacak şekilde sulandırıldı.

3.2.4. TOTAL RNA'DAN CDNA SENTEZİ

İzole edilen total RNA'lardan cDNA sentezi 'iScript cDNA Synthesis Kit' kullanılarak yapılmıştır. Bir reaksiyon için gerekli bileşen miktarları ve termal döngü tablo 4 ve 5'de sırasıyla gösterilmiştir;

Tablo 4. Bir reaksiyon için gerekli bileşen miktarları

Bileşen	Bir Reaksiyon için Gerekli Miktar
5x "iScript Reaction Mix"	5 µl
Örnek (1µg total RNA olacak şekilde)	Örnek miktarına göre değişkenlik gösterir
"Nuclease-free water"	Örnek miktarına göre değişkenlik gösterir
Toplam hacim	20 µl

Tablo 5. Bir reaksiyon için gerekli termal döngü

Aşama	Süre	Sıcaklık
"Priming"	5 dakika	25°C
"Reverse Transcription"	20 dakika	46°C
"RT Inactivation"	1 dakika	95°C
"Optional Step"	Bekleme	4°C

Serum örnekleri için (sulandırılmadan) 5 µl RNA, 4ul mix, 11 µl su, doku için (sulandırılmış 100ng rna örnekleri ile) 5 µl RNA, 4ul mix, 11 µl su kullanılmıştır.

3.2.5. DAMLACIKLI DİJİTAL POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (ddPZR)

1. Kullanılan her primer için reaksiyon sayısına göre karışım (“*mix*”) hazırlanır ve steril PCR tüplerine dağıtılır. Karışım cDNA örneklerini içermez. Bir reaksiyon için gerekli bileşen miktarları ve termal döngü tablo 6 ve 7’de sırasıyla gösterilmiştir;

Tablo 6: ddPZR için hazırlanan bir reaksiyon için gerekli “*mix*” bileşenleri ve miktarları

BİLEŞEN	MİKTAR
“ <i>QX200™ ddPCR™ EvaGreen® Supermix</i> ”	10 µL
“ <i>Forward Primer</i> ”	1,6 µL
“ <i>Reverse Primer</i> ”	0,8 µL
cDNA örneği	2,5 µL
Nükleazsız su	5,1 µL
TOTAL	20 µL

2. Final konsantrasyon 1 ng olacak şekilde cDNA örnekleri de gerekli hacimlerde PCR tüplerine eklenir.

3. Her bir primer için cDNA örneği içermeyen “*no template control*” (NTC) örnekleri de hazırlanır. cDNA yerine aynı miktarda nükleazsız su kullanılır.

4. PCR tüplerindeki örnekler 2000 g’de 2 dk santrifüj edilir ve içlerinde baloncuk kalmamasına dikkat edilir.

5. Örnekler (20 µL) 8 kanallı pipet yardımıyla “*DG8 cartridge*”in “*sample*” kuyucuklarına yüklenir.

6. Ardından “*Droplet Generator Oil*” (70 µL) “*DG8 cartridge*”in “*oil*” kuyucuklarına 8 kanallı pipet ile yüklenir.

7. “*Droplet*” oluşumu için “*DG8 cartridge*”, “*QX200™ Droplet Generator*” cihazına yerleştirilir ve cihaz “*droplets*” kuyucuklarında “*droplet*”leri oluşturur.

8. “DG8 cartridge”den “droplet”ler 8 kanallı pipet yardımıyla yavaşça “droplet”leri kırmamaya dikkat edilerek 40 µL alınır ve 96 kuyucuklu “plate”e aktarılır.

9. Bu aşama tüm örnekler için tekrarlanır ve tüm örnekler 96 kuyucuklu “plate”e aktarıldıktan sonra “plate”in üzeri folyo ile “PXI™ PCR Plate Sealer” (Bio-Rad) cihazında 180°C’de kapatılır.

10. Folyo ile kapatılan 96’lı “plate”, PCR aşaması için “T100™ Thermal Cycler” (Bio-Rad) cihazına aktarılır. Termal döngü Tablo 3.5’te gösterilmiştir.

11. PCR sırasında “QuantaSoft” yazılımı kullanılarak örneklerin tanımlayıcı özellikleri, kullanılan “supermix” ve kullanılan yöntem bilgileri sisteme girilir.

12. PCR işlemi tamamlandıktan sonra 96’lı “plate” “QX200™ Droplet Reader” cihazına aktarılır. Cihaz kuyucuklardaki pozitif ve negatif dropletleri okur ve ardından sonuçlar analiz edilir.

Tablo 7: ddPCR termal döngüsü.

Aşama	Sıcaklık	Süre	Sıcaklık değişme süresi “Ramp rate”	Döngü sayısı
Enzim aktivasyonu	95°C	5 dk	2°C/sn	1
Denatürasyon	95°C	30 sn		40
Bağlanma/Uzama	59°C	1 dk		40
Sinyal stabilizasyonu	4°C	5 dk		1
	90°C	5 dk		1
Bekleme (opsiyonel)	4°C	∞		1

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Hesaplamalar hazır istatistiksel yazılım SPSS Statistics version 21.0 SPSS ile yapıldı. Kategorik değişkenler sayı ve yüzde (n; %), sayısal değişkenler ortalama (\pm) standart sapma ($\text{ort}\pm\text{SD}$) olarak gösterildi. Normal dağılım kontrolü için Skewnes-Kurtosis, Histogram, Varyasyon Katsayısı, Detrended, Shapiro-Wilk testleri kullanıldı. Gruplar içi ve gruplar arası bunlara bağlı olan işlemleri analiz etmek için istatistiksel yöntem olarak, normal dağılımlı parametrik değerler için Student-t testi, normal dağılım olmadığında nonparametrik değerler için Mann-Whitney U testi ve Spearman testi kullanıldı. $P < 0.05$ istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya 01/10/2018 ile 01/03/2019 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği Doğum servisine yatan hastalardan bulguları çalışma uygun olan 10 hasta ve 10 kontrol grubu oluşturmak üzere 20 sağlıklı gebe kadın çalışmaya alındı. 1-10 arasında olan grubu kontrol, 10-20 arasında olan grubu ise hasta grubunu oluşturmaktadır. **Tablo 8 ve 9**'da kontrol ve hasta grupları için frekans analizi gösterilmiştir.

Tablo 8. Serum örnekleri için frekans analizi

		Kontrol	Hasta	Kontrol	Hasta	Kontrol	Hasta
		serum_c-Jun	serum_c-Jun	serum_c-Fos	serum_c-Fos	serum_FRA2	serum_FRA2
N	Valid	10	9	9	10	8	8
	Missing	0	1	1	0	2	2
Mean		0,068461727	0,085842977	0,027702841	0,038802371	0,026087056	0,041666925
Median		0,037932901	0,066129032	0,027173913	0,018940227	0,029076087	0,018592111
Std. Deviation		0,0536598371	0,0615286572	0,0127717280	0,0436666416	0,0134146957	0,0713506450
Minimum		0,0146739	0,0153527	0,0060465	0,0082251	0,0039535	0,0049862
Maximum		0,1594203	0,1728395	0,0463768	0,1517857	0,0413793	0,2173913

Tablo 9. Doku örnekleri için frekans analizi

		Kontrol	Hasta	Kontrol	Hasta	Kontrol	Hasta
		doku_c-Jun	doku_c-Jun	doku_c-Fos	doku_c-Fos	doku_FRA2	doku_FRA2
N	Valid	10	9	10	10	10	10
	Missing	0	1	0	0	0	0
Mean		0,115756268	0,197404027	0,019693713	0,052694839	0,044529741	0,062510992
Median		0,113713876	0,106930693	0,014071060	0,045081446	0,048344401	0,051750000
Std. Deviation		0,0412250780	0,1802658787	0,0171410811	0,0531579876	0,0184291716	0,0353130964
Minimum		0,0375810	0,0420208	0,0038521	0,0085714	0,0151786	0,0194059
Maximum		0,1682927	0,5689655	0,0576642	0,1816832	0,0686099	0,1217213

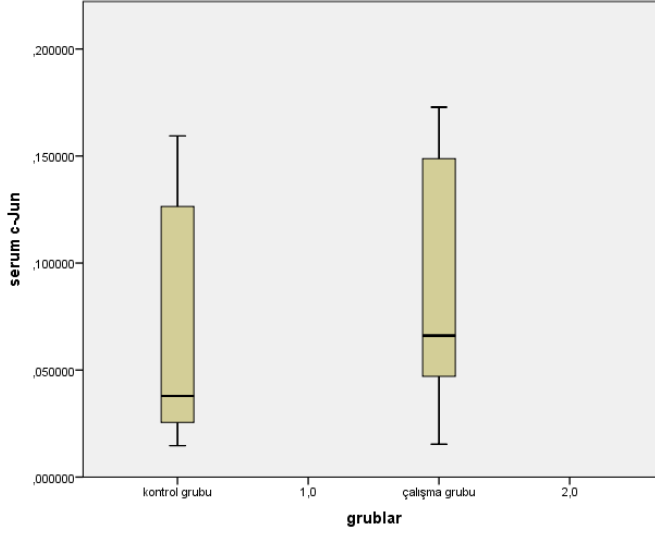
Parametrik olmayan *Mann-Whitney U* testi ile yapılan analizler sonucu serum ve doku örneklerindeki c-Jun, c-Fos ve FRA2 genlerinin anlatımı kontrol grubuna göre her iki hasta grubunda da istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir. Analizi yapılan tüm genlerin anlatım seviyelerindeki kat değişimi ve p değerleri **Tablo 10** 'da gösterilmiştir.

Tablo 10. c-Jun, c-Fos ve FRA2 genlerinin anlatımı, kat değişimi ve p değerleri

Örnek tipi	Gen adı	Anlatım	Kat değişimi	p değeri
Serum	c-Jun	artan	1.25	0.935
	c-Fos	artan	1.40	0.414
	FRA2	artan	1.57	0.345
Doku	c-Jun	artan	1.71	1.000
	c-Fos	artan	2.73	0.112
	FRA2	artan	1.40	0.406

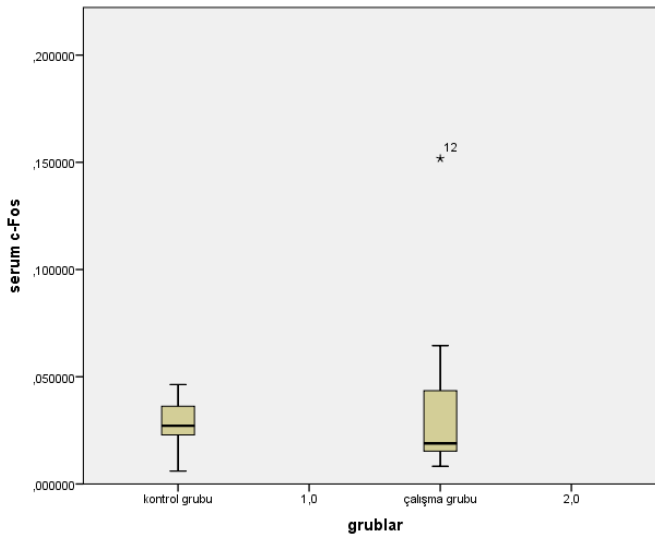
Serum örneklerinde rölatif karşılaştırma sonucu kontrol grubuna göre hasta grubundaki c-Jun anlatım seviyesi yaklaşık 1.25 kat artmıştır.

Şekil 5. Serum c-Jun anlatım seviyesi



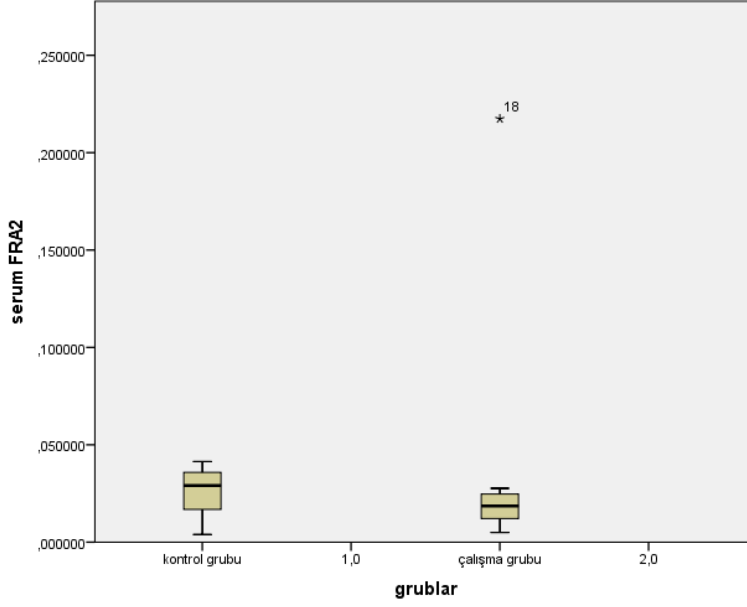
Serum örneklerinde rölatif karşılaştırma sonucu kontrol grubuna göre hasta grubundaki c-Fos anlatım seviyesi yaklaşık 1.40 kat artmıştır.

Şekil 6. Serum c-Fos anlatım seviyesi



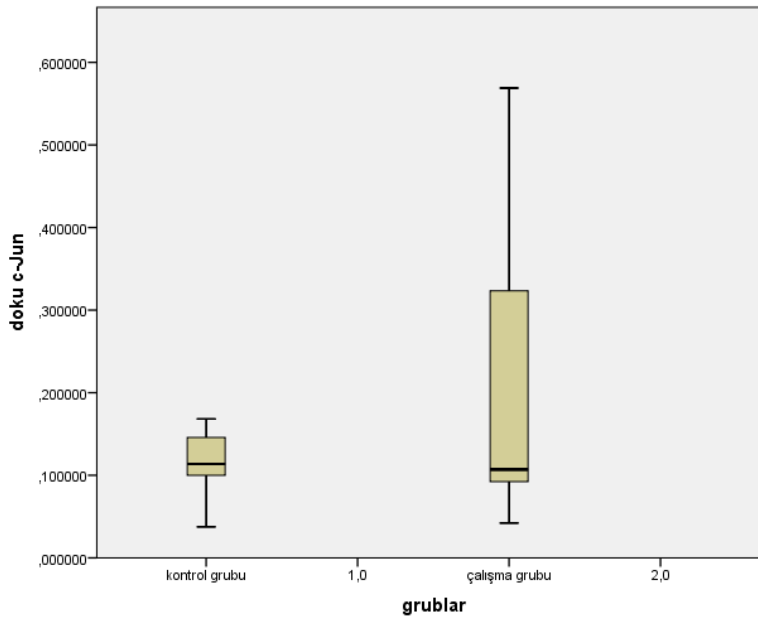
Serum örneklerinde rölatif karşılaştırma sonucu kontrol grubuna göre hasta grubundaki FRA2 anlatım seviyesi yaklaşık 1.57 kat artmıştır.

Şekil 7. Serum FRA2 anlatım seviyesi



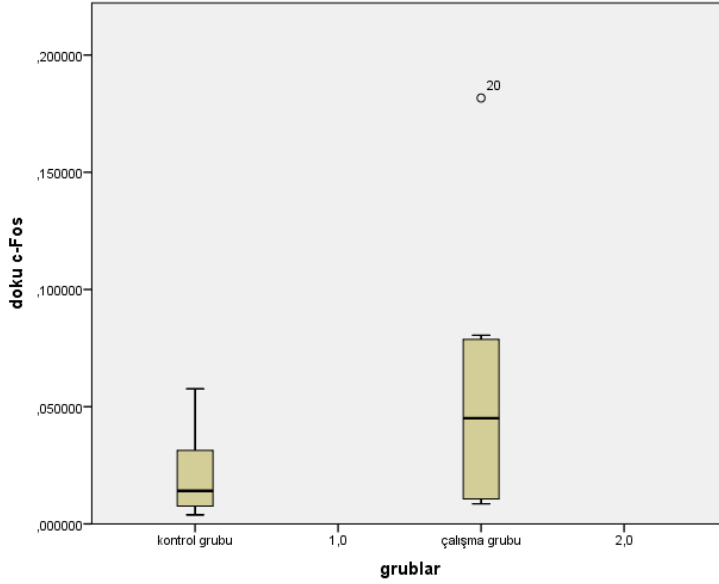
Doku örneklerinde rölatif karşılaştırma sonucu kontrol grubuna göre hasta grubundaki c-Jun anlatım seviyesi yaklaşık 1.71 kat artmıştır.

Şekil 8. Doku c-Jun anlatım seviyesi



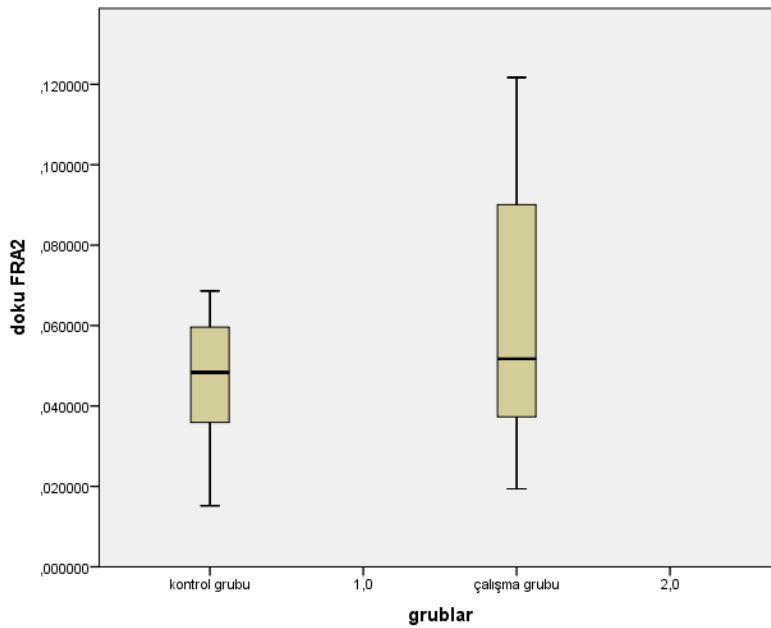
Doku örneklerinde rölatif karşılaştırma sonucu kontrol grubuna göre hasta grubundaki c-Fos anlatım seviyesi yaklaşık 2.73 kat artmıştır.

Şekil 9. Doku c-Fos anlatım seviyesi



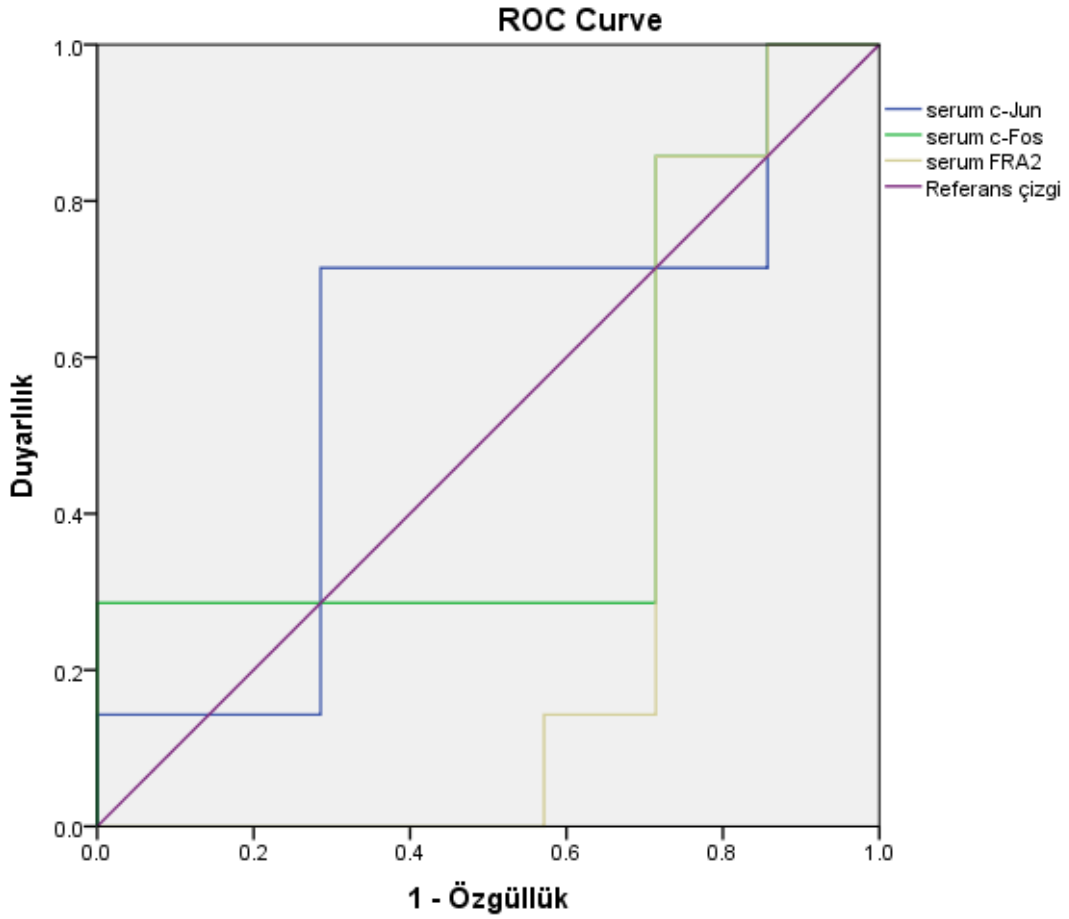
Doku örneklerinde rölatif karşılaştırma sonucu kontrol grubuna göre hasta grubundaki FRA2 anlatım seviyesi yaklaşık 1.40 kat artmıştır.

Şekil 10. Doku FRA2 anlatım seviyesi



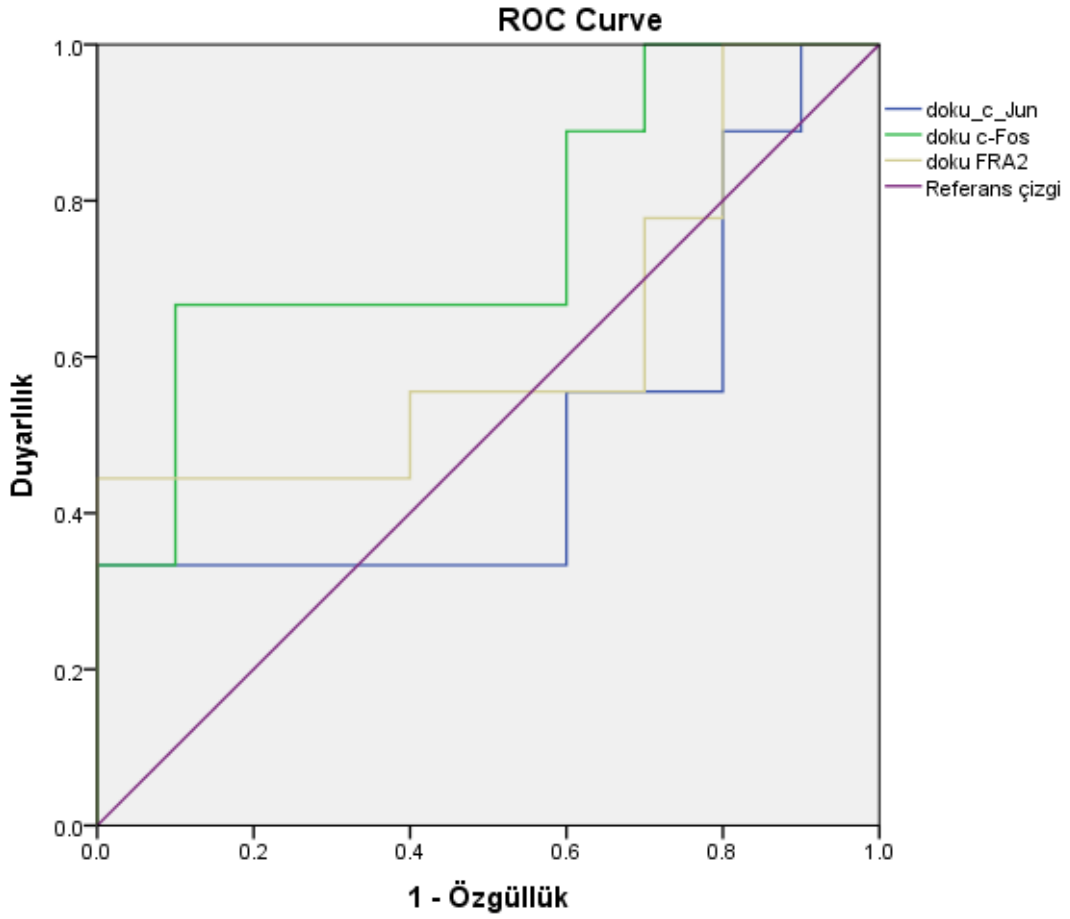
Serum örneklerinde c-Jun, c-Fos ve FRA2 genleri için yapılan ROC analizleri **Şekil 11'** de gösterilmiştir. C-Jun için eğri altında kalan alan ('Area Under the Curve', AUC) 0,59, c-Fos için AUC 0,46, FRA2 için AUC 0,28 olarak hesaplanmıştır. %95 güven aralığında, hasta grubunda c-Jun, c-Fos ve FRA2 genleri için istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Şekil 11. Serum örneklerinde c-Jun, c-Fos ve FRA2 genleri için yapılan ROC analizleri



Doku örneklerinde c-Jun, c-Fos ve FRA2 genleri için yapılan ROC analizleri Şekil 12’ de gösterilmiştir. C-Jun için AUC 0,5, c-Fos için AUC 0,75, FRA2 için AUC 0,62 olarak hesaplanmıştır. %95 güven aralığında, hasta grubunda c-Jun, c-Fos ve FRA2 genleri için istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Şekil 12. Doku örneklerinde c-Jun, c-Fos ve FRA2 genleri için yapılan ROC analizleri



5. TARTIŞMA

Enflamasyon yolakları üzerindeki etkilerinden dolayı AP-1 transkripsiyon faktörü ailesi üyelerinin doğum sürecinin başlatılmasında rolü olduğu düşünülmektedir. AP-1 ailesi Jun ve Fos proteinlerinden oluşmaktadır. Bu proteinler kendi aralarında ve ya ATF, JDP gibi diğer transkripsiyon faktörleri ile birleşerek dimerler oluştururlar. Dimerler farklı stimuluslarla oluşa bildikleri gibi, farklı dokularda da farklı etkiler göstermektedirler. AP-1 proteinlerinin karsinogenez, enflamasyon, apoptozis gibi süreçlerde görevi oldukları kanıtlanmıştır.

Yapılan çalışmada ≤ 37 hafta sağlıklı gebelere elektif sezaryen yapılamayacağı ve bundan dolayı miyometrium örneği alınmayacağı için sadece ≥ 37 hafta gebeler çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen kontrol grubundaki gebelerin doğum eylemi başlamamıştı ve elektif olarak sezaryene alınmışlardı. Bu hastalarda herhangi bir tanı konulmuş lokal veya sistemik enflamasyon bulguları, uterin distansiyona neden olabilecek polihidramniyozis gibi bulgular yoktu. Çalışma grubu doğum eylemi başlamış olan ve maternal (disproporsiyon, ağırlı mükerrer) veya fetal (fetal distres) endikasyonlardan dolayı acil sezaryene alınmış hastalardan oluşmaktaydı. Çalışma grubunu oluşturan hastalarda da herhangi bir tanı konulmuş lokal veya sistemik enflamasyon bulguları, uterin distansiyona neden olabilecek polihidramniyozis gibi bulgular yoktu. Çalışmada AP-1 üyelerinden c-Jun, c-Fos ve FRA2 proteinlerinin serum ve miyometrium dokusundaki gen ekspresyonlarına bakıldı. Çalışmaya dahil edilen hastalarda sezaryen öncesi periferik venöz kan, sezaryen sırasında ise miyometrium örnekleri alındı. Bakılan gruplarda hasta sayısı az olduğu için değişkenler normal dağılım göstermiyordu. Hem miyometrium, hem de serum örneği alınmasındaki amacımız aynı değişkenin hem serum hem de miyometrium dokusundaki miktarlarında artış olup olmadığını araştırmaktı.

Mitchell ve arkadaşlarının gebe fareler üzerinde yaptıkları çalışmada 12, 15, 17, 19, 21, 22. günlerde, doğum sürecinin gerçekleştiği 23. günde ve postpartum 1. günde

miyometrium doku örnekleri toplandı [83]. Çalışmada amaç AP-1 genlerinin ekspresyonu ve hormonal regülasyonunu araştırmaktı. Çalışma sonucunda c-Fos, FosB, FRA1, FRA2 ve junB gen ekspresyonu gebeliğin erken haftalarında düşük olmasına rağmen doğum sırasında 5-10 kat artmış olarak saptandı. C-Jun ve JunB gen ekspresyonu gebelik süresince sabit olarak belirlendi. 20. günde Progesteron verilmesi doğum eyleminin başlamasını önledi ve 23. günde olması beklenen c-Fos, FosB, FRA1, FRA2 ve junB gen ekspresyonu artışını bloke etti. 19. günde Progesteron antagonist RU486 verildiğinde c-Fos, FRA1, FRA2, JunB gen ekspresyonunda erken artış saptandı. Unilateral olarak gebe olan farelerde gebelik olan hornda fetusun büyümesiyle artan gerginliğin gebelik olmayan hornla kıyaslandığında c-Fos, FosB, FRA1, FRA2 ve junB gen ekspresyonunda artışa neden olduğu saptandı.

Shynlova ve arkadaşları fare miyometriumunda mekanik gerilmeye bağlı c-Fos proteininin gen ekspresyonunu araştırdılar [84]. Çalışma için taze izole edilmiş miyometrial düz kas hücreleri esnek kültür ortamı olan kablara yerleştirildi ve kompüterize sistem aracılığıyla gerilmeye maruz bırakıldılar. Northern blotting yöntemiyle değerlendirme yapıldığında c-Fos gen ekspresyonunda gerilme uygulandıktan sonra dramatik artış olduğu saptanmıştır ve 30. dakikada pik seviyeye ulaştığı görülmüştür. C-Fos gen ekspresyonu gerilmenin kuvvetine bağlı olarak değişiklik göstermekte idi. 1 dakikalık gerilme uygulanmasının bile c-Fos gen ekspresyonunun 30 dakika boyunca induksiyonu için yeterli olduğu görüldü.

Lim ve arkadaşlarının miad gebe kadınlar üzerinde yaptıkları çalışmada doğum sürecinin c-Fos, FosB, c-Jun, JunB ve JunD proteinlerinin miyometrium dokusundaki gen ve protein ekspresyonu üzerindeki etkisini araştırdı [85]. Çalışmada TNF- α ve bakteri ürünlerinin (lipopolisakkarit, flagellin) AP-1 proteinlerinin transkripsiyonel aktivitesi üzerine etkileri de araştırıldı. Ekspresyon analizi qRT-PCR (quantitative Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction) ve Western blotting yöntemiyle yapıldı. Çalışma sonucunda c-Fos ve JunB mRNA ve protein ekspresyonunda kaydadeğer artış saptandı. FosB mRNA ekspresyonunda kaydadeğer artış saptanmasına rağmen protein ekspresyonunda fark saptanmadı. C-jun mRNA ve protein ekspresyonunda değişiklik saptanmadı. TNF- α verilen grupta AP-1 aktivitesinde anlamlı artış saptandı. Bakteri ürünleri verilen grupta da artmış AP-1 aktivitesi görülse de, istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Bethin ve arkadaşlarının insan ve fare uterusunda yaptığı çalışmada fare miyometriumu 19. günde c-Fos microarray analizi yapıldığında c-Fos gen ekspresyonu 2.2 kat upregüle olarak saptanmıştır [86]. Bu da doğum eyleminde olan kadınların miyometrium örneklerindeki c-Fos upregülasyonuna benzer şekilde olmaktadır. Gebe olmayan uterusda *in situ hibridizasyon* yöntemiyle değerlendirildiğinde endometriumu c-Fos transkriptleri saptansa da, miyometriumu saptanamamıştır. C-Fos gen ekspresyonu gebe farelerde gebeliğin 13.5 ve 16.5 günlerinde yaklaşık olarak aynı değerlerde saptanmıştır, gebeliğin 19. gününden itibaren azalma görülmüştür, ancak fetal membranlarda yüksek miktarda c-Fos ekspresyonu görülmüştür.

Roh ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada c-Fos gen ekspresyonunun term gebelikte insan miyometriumu arttığı gösterilmiş, ancak c-Jun ekspresyonu daha dominant olarak saptanmıştır [87]. Geimonen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada c-Jun proteininin fosforile formunun artmış olduğu görülmüştür [88]. Lappas ve arkadaşlarının elektif nedenlerle sezaryene alınan doğum eyleminde olmayan term gebelerde yaptıkları çalışmada serviks internal os üzerindeki fetal membranlarda c-Jun fosforile formunun artmış olduğu, fosforile olmayan formunda değişiklik olmadığı saptanmıştır [89].

Doğum eyleminin kendisinin de uterus ve serviksde enflamatuar cevapla ilişkili olduğu için AP-1 proteinlerindeki artışın nedeni olabileceği de düşünülmektedir [90-92].

Nadeem ve arkadaşlarının gebe fareler üzerinde yaptıkları çalışmada hem term gebelikte hem de doğum induksiyonu yapılan olgularda immunoblot yöntemiyle AP-1 proteinlerinin nükleer ve sitoplazmik fraksiyonları analiz edildi [93]. Doğum induksiyonu için bakteriyel LPS (lipopolisakkarit) ve anti-progestin olan RU486 (mifepristone) kullanıldı. Çalışma sonucunda term doğumlarda fare miyometriumu c-Jun ve c-Fos proteinlerinin sitoplazmada belirgin olarak arttığı saptandı, JunB, JunD ve FRA2 proteinleri ise nükleusta belirgin şekilde upregüle olarak saptandı. Çalışmada term doğum yapan kadınlarda da analiz yapıldığında sitoplazmik Jun ve Fos proteinlerinde belirgin artış saptanamamıştır, nükleer JunD, c-Fos ve FRA2 ekspresyonlarında anlamlı artış saptanmıştır. İnsan miyometriumu nükleer FosB

belirlenememiştir, FRA1 ve JunB düzeyleri azalmış olarak saptanmıştır. İndüksiyon yapılan farelerde doğum sürecinde JunD ve FRA2 proteinlerinin nükleer fraksiyonunda belirgin upregülasyon saptandı.

AP-1 proteinlerinin erken doğum eyleminin başlatılmasındaki etkisi sadece hayvanlar üzerindeki çalışmalarda gösterilse de, miadında sezaryen ile doğum yapan gebeler üzerinde yapılan az sayıdaki çalışmalarda da bu proteinlerin artmış olduğu saptanmıştır. Bundan dolayı gebe kadınlarda erken doğum eyleminde de AP-1 proteinlerinin rolü olduğunu düşünmekteyiz.



6. SONUÇ

AP-1 ailesi proteinlerinin doğum eyleminin başlatılmasında görevi olduğu çalışmalarda gösterilmiştir. Yapılan az sayıda çalışma olmasına rağmen AP-1 protein ailesi üyelerinin erken doğumun enflamasyon yolağında katkısı olduğu bu çalışmaların çoğunda gösterilmiştir. Belli proteinlerin ekspresyonunun artması, diğerlerinin değişmemesinin mekanizması tam olarak belli olmasa da, ilerki çalışmalarda daha net sonuçlar alınacaktır. İnsan örneklerinde çalışmaya dahil edilen hasta sayısının az olmasının çalışmaların sonuçlarını etkilediği düşünülmektedir. Sadece periferik kandan örnek alınarak erken doğum tehdidi olan ve ya erken doğum için yüksek riskli hastalarda hastalarda tanı koymak ve prognozu belirlemede AP-1 protein ailesi üyelerinin katkısı olabileceğini düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Van Meir CA, Sangha RK, Walton JC, et al. Immunoreactive 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (PGDH) is reduced in fetal membranes from patients at preterm delivery in the presence of infection. *Placenta* 1996; 17:291.
2. Challis JR, Lye SJ, Gibb W, et al. Understanding preterm labor. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 943:225.
3. So T, Ito A, Sato T, et al. Tumor necrosis factor-alpha stimulates the biosynthesis of matrix metalloproteinases and plasminogen activator in cultured human chorionic cells. *Biol Reprod* 1992; 46:772.
4. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Role of tumor necrosis factor-alpha in the premature rupture of membranes and preterm labor pathways. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187:1159.
5. Oner C, Schatz F, Kizilay G, et al. Progestin-inflammatory cytokine interactions affect matrix metalloproteinase-1 and -3 expression in term decidual cells: implications for treatment of chorioamnionitis-induced preterm delivery. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:252.
6. Lei H, Furth EE, Kalluri R, et al. A program of cell death and extracellular matrix degradation is activated in the amnion before the onset of labor. *J Clin Invest* 1996; 98:1971.
7. Dudley DJ, Trautman MS, Araneo BA, et al. Decidual cell biosynthesis of interleukin-6: regulation by inflammatory cytokines. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74:884.
8. Fortunato SJ, Menon RP, Swan KF, Menon R. Inflammatory cytokine (interleukins 1, 6 and 8 and tumor necrosis factor-alpha) release from cultured human fetal membranes in response to endotoxic lipopolysaccharide mirrors amniotic fluid concentrations. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174:1855.

9. Espinoza, J., Chaiworapongsa, T., Romero, R., Edwin, S., Rathnasabapathy, C., Gomez, R., Sorokin, Y. (2003). Antimicrobial peptides in amniotic fluid: defensins, calprotectin and bacterial/permeability-increasing protein in patients with microbial invasion of the amniotic cavity, intra-amniotic inflammation, preterm labor and premature rupture of membranes. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 13(1), 2–21.
10. Gibb W. The role of prostaglandins in human parturition. *Ann Med* 1998; 30:235.
11. Madsen G, Zakar T, Ku CY, et al. Prostaglandins differentially modulate progesterone receptor-A and -B expression in human myometrial cells: evidence for prostaglandin-induced functional progesterone withdrawal. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:1010.
12. Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli UA, Semerci N, et al. Mechanisms of chorioamnionitis-associated preterm birth: interleukin-1 β inhibits progesterone receptor expression in decidual cells. *J Pathol* 2015; 237:423.
13. Heida KY, Velthuis BK, Oudijk MA, et al. Cardiovascular disease risk in women with a history of spontaneous preterm delivery: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Prev Cardiol* 2016; 23:253.
14. Norwitz ER, Robinson JN, Challis JR. The control of labor. *N Engl J Med* 1999; 341:660.
15. Salafia CM, Vogel CA, Vintzileos AM, et al. Placental pathologic findings in preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165:934.
16. Klein LL, Gibbs RS. Use of microbial cultures and antibiotics in the prevention of infection-associated preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190:1493.
17. Bloom SL, Yost NP, McIntire DD, Leveno KJ. Recurrence of preterm birth in singleton and twin pregnancies. *Obstet Gynecol* 2001; 98:379.

18. Esplin MS, O'Brien E, Fraser A, et al. Estimating recurrence of spontaneous preterm delivery. *Obstet Gynecol* 2008; 112:516.
19. Bhattacharya S, Raja EA, Mirazo ER, et al. Inherited predisposition to spontaneous preterm delivery. *Obstet Gynecol* 2010; 115:1125.
20. Mercer BM, Goldenberg RL, Moawad AH, et al. The preterm prediction study: effect of gestational age and cause of preterm birth on subsequent obstetric outcome. National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181:1216.
21. Lykke JA, Paidas MJ, Langhoff-Roos J. Recurring complications in second pregnancy. *Obstet Gynecol* 2009; 113:1217.
22. Kristensen J, Langhoff-Roos J, Kristensen FB. Implications of idiopathic preterm delivery for previous and subsequent pregnancies. *Obstet Gynecol* 1995; 86:800.
23. Laughon SK, Albert PS, Leishear K, Mendola P. The NICHD Consecutive Pregnancies Study: recurrent preterm delivery by subtype. *Am J Obstet Gynecol* 2014; 210:131.e1.
24. Yamashita M, Hayashi S, Endo M, et al. Incidence and risk factors for recurrent spontaneous preterm birth: A retrospective cohort study in Japan. *J Obstet Gynaecol Res* 2015; 41:1708.
25. Ferrero DM, Larson J, Jacobsson B, et al. Cross-Country Individual Participant Analysis of 4.1 Million Singleton Births in 5 Countries with Very High Human Development Index Confirms Known Associations but Provides No Biologic Explanation for 2/3 of All Preterm Births. *PLoS One* 2016; 11:2506.
26. Drassinower D, Običan SG, Siddiq Z, et al. Does the clinical presentation of a prior preterm birth predict risk in a subsequent pregnancy? *Am J Obstet Gynecol* 2015; 213:686.

27. Rafael TJ, Hoffman MK, Leiby BE, Berghella V. Gestational age of previous twin preterm birth as a predictor for subsequent singleton preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 206:156.
28. Schaaf JM, Hof MH, Mol BW, et al. Recurrence risk of preterm birth in subsequent singleton pregnancy after preterm twin delivery. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 207:279.
29. Schaaf JM, Hof MH, Mol BW, et al. Recurrence risk of preterm birth in subsequent twin pregnancy after preterm singleton delivery. *BJOG* 2012; 119:1624.
30. McGregor JA, Leff M, Orleans M, Baron A. Fetal gender differences in preterm birth: findings in a North American cohort. *Am J Perinatol* 1992; 9:43.
31. SIMPSON WJ. A preliminary report on cigarette smoking and the incidence of prematurity. *Am J Obstet Gynecol* 1957; 73:807.
32. Meyer MB, Tonascia JA. Maternal smoking, pregnancy complications, and perinatal mortality. *Am J Obstet Gynecol* 1977; 128:494.
33. Shiono PH, Klebanoff MA, Rhoads GG. Smoking and drinking during pregnancy. Their effects on preterm birth. *JAMA* 1986; 255:82.
34. Berkowitz GS, Papiernik E. Epidemiology of preterm birth. *Epidemiol Rev* 1993; 15:414.
35. Cnattingius S, Forman MR, Berendes HW, et al. Effect of age, parity, and smoking on pregnancy outcome: a population-based study. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 168:16.
36. Harlow BL, Frigoletto FD, Cramer DW, et al. Determinants of preterm delivery in low-risk pregnancies. The RADIUS Study Group. *J Clin Epidemiol* 1996; 49:441.

37. Kyrklund-Blomberg NB, Cnattingius S. Preterm birth and maternal smoking: risks related to gestational age and onset of delivery. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179:1051.
38. Fuchs F, Monet B, Ducruet T, et al. Effect of maternal age on the risk of preterm birth: A large cohort study. *PLoS One* 2018; 13:19.
39. Lawlor DA, Mortensen L, Andersen AM. Mechanisms underlying the associations of maternal age with adverse perinatal outcomes: a sibling study of 264 695 Danish women and their firstborn offspring. *Int J Epidemiol* 2011; 40:1205.
40. Fraser AM, Brockert JE, Ward RH. Association of young maternal age with adverse reproductive outcomes. *N Engl J Med* 1995; 332:1113.
41. Myklestad K, Vatten LJ, Magnussen EB, et al. Do parental heights influence pregnancy length?: A population-based prospective study, HUNT 2. *BMC Pregnancy Childbirth* 2013; 13:33.
42. Derraik JG, Lundgren M, Cutfield WS, Ahlsson F. Maternal Height and Preterm Birth: A Study on 192,432 Swedish Women. *PLoS One* 2016; 11:34.
43. Han Z, Lutsiv O, Mulla S, McDonald SD. Maternal height and the risk of preterm birth and low birth weight: a systematic review and meta-analyses. *J Obstet Gynaecol Can* 2012; 34:721.
44. Gruda, M. C., Van Amsterdam, J., Rizzo, C. A., Durham, S. K., Lira, S., Bravo, R. Expression of FosB during mouse development: normal development of FosB knockout mice. *Oncogene* 1996;12, 2177–218
45. Dolan SM, Gross SJ, Merkatz IR, et al. The contribution of birth defects to preterm birth and low birth weight. *Obstet Gynecol* 2007; 110:318.
46. Purisch SE, DeFranco EA, Muglia LJ, et al. Preterm birth in pregnancies complicated by major congenital malformations: a population-based study. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 199:287.

47. Lackman F, Capewell V, Richardson B, et al. The risks of spontaneous preterm delivery and perinatal mortality in relation to size at birth according to fetal versus neonatal growth standards. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184:946.
48. Morken NH, Källen K, Jacobsson B. Fetal growth and onset of delivery: a nationwide population-based study of preterm infants. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 195:154.
49. Ott WJ. Intrauterine growth retardation and preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 168:1710.
50. Zeitlin J, Ancel PY, Saurel-Cubizolles MJ, Papiernik E. The relationship between intrauterine growth restriction and preterm delivery: an empirical approach using data from a European case-control study. *BJOG* 2000; 107:750.
51. Gardosi JO. Prematurity and fetal growth restriction. *Early Hum Dev* 2005; 81:43.
52. Goldenberg RL, Andrews WW, Hauth JC. Choriodecidual infection and preterm birth. *Nutr Rev* 2002; 60:S19.
53. Zeitlin J, Ancel PY, Larroque B, et al. Fetal sex and indicated very preterm birth: results of the EPIPAGE study. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190:1322.
54. Zeitlin J, Saurel-Cubizolles MJ, De Mouzon J, et al. Fetal sex and preterm birth: are males at greater risk? *Hum Reprod* 2002; 17:2762.
55. Ingemarsson I. Gender aspects of preterm birth. *BJOG* 2003; 110 Suppl 20:34.
56. How HY, Khoury JC, Sibai BM. Cervical dilatation on presentation for preterm labor and subsequent preterm birth. *Am J Perinatol* 2009; 26:1.
57. Haas DM, Imperiale TF, Kirkpatrick PR, et al. Tocolytic therapy: a meta-analysis and decision analysis. *Obstet Gynecol* 2009; 113:585.

58. American College of Obstetricians and Gynecologists and the Society for Maternal–Fetal Medicine, Ecker JL, Kaimal A, et al. Periviable birth. *Am J Obstet Gynecol* 2015; 213:604
59. Lee, W., Haslinger, A., Karin, M., Tjian, R. Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40. *Nature* 1987; 325, 368–372.
60. Hill, D. E., Hope, I. A., Mackie, J. P., Struhl, K. Saturation mutagenesis of the yeast his regulatory site: requirements for transcriptional induction and for binding of GCN4 activator protein. *Science* 1986; 234, 451–457.
61. Hope, I. A., Struhl, K. GCN4, a eukaryotic transcriptional activator protein binds as a dimer to target DNA. *EMBO J.* 1987; 6, 2781–2784
62. Vogt, P. K., Bos, T. J., Doolittle, R. F. Homology between the DNA binding domain of the GCN4 regulatory protein of yeast and the carboxyl-terminal region of a protein coded for by the oncogene jun. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84, 3316–3319.
63. Struhl, K. The DNA binding domains of the jun oncoprotein and the yeast GCN4 transcriptional activator protein are functionally homologous. *Cell* 1987;50, 841–846
64. Angel, P., Allegretto, E. A., Okino, S. T., Hattori, K., Boyle, W. J., Hunter, T., Karin, M. Oncogene jun encodes a sequence-specific transactivator similar to AP-1. *Nature* 1988; 332, 166–171
65. Rauscher, F. J., III, Sambucetti, L. C., Curran, T., Distel, R. J., Spiegelman, B. M. Common DNA binding site for fos protein complexes and transcription factor AP-1. *Cell* 1988;52, 471–480.
66. Distel, R. J., Ro, H. S., Rosen, B. S., Groves, D. L., Spiegelman, B. M. Nuclear protein complexes that regulate gene expression in adipocyte differentiation: direct participation of c-fos. *Cell* 1987; 49, 835–844.

67. Franza, B. R., Jr., Rauscher, F. J., III, Joseph, S. F., Curran, T. The Fos complex and Fos-related antigens recognise sequence elements that contain AP-1. *Science* 1988; 239, 1150–1153.
68. Karin, M., Liu, Z.-G., Zandi, E. AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997; 9: 240–246.
69. Whitmarsh, A. J., Davis, R. J. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J. Mol. Med.* 1996; 74: 589–607.
70. Foletta, V. C. 1996 Transcription factor AP-1, and the role of Fra-2. *Immunol. Cell. Biol.* 1996; 74, 121–133.
71. Abate, C., Patel, L., Rauscher, F. J., III., Curran, T. Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science* 249, 1990; 1157–1161.
72. Bannister, A. J., Cook, A., Kouzarides, T. In vitro DNA binding activity of Fos/Jun and BZLF1 but not C/EBP is affected by redox changes. *Oncogene* 1991; 6, 1243–1250.
73. Vandell, L., Pfarr, C. M., Huguier, S., Loiseau, L., Sergeant, A., Castellazzi, M. Increased transforming activity of JunB and JunD by introduction of a heterologous homodimerisation domain. *Oncogene* 10, 1995; 495–507.
74. Kovary, K., Bravo, R. The Jun and Fos proteins during the G0 to G1 transition in mouse fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 1991; 9, 4466–4472.
75. Zephyrin LC, Hong KN, Wapner RJ, et al. Gestational age-specific risks vs benefits of multicourse antenatal corticosteroids for preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 2013; 209:330.
76. Piersanti M, Lye SJ. Increase in messenger ribonucleic acid encoding the myometrial gap junction protein, connexin-43, requires protein synthesis and is associated with increased expression of the activator protein-1, c-fos. *Endocrinology* 1995; 136:3571–3578.
77. Young MR, Colburn NH. Fra-1 a target for cancer prevention or intervention. *Gene* 2006;379:1–11

78. Ferrigno O, Virolle T, Galliano MF, Chauvin N, Ortonne JP, Meneguzzi G, Aberdam D. Murine laminin alpha3A and alpha3B isoform chains are generated by usage of two promoters and alternative splicing. *J Biol Chem* 1997; 272:20502–20507.
79. Benson-Chanda V, Su MW, Weil D, Chu ML, Ramirez F. Cloning and analysis of the 59 portion of the human type-III procollagen gene (COL3A1). *Gene* 1989; 78:255–265.
80. Rich CB, Fontanilla MR, Nugent M, Foster JA. Basic fibroblast growth factor decreases elastin gene transcription through an AP1/cAMP-response element hybrid site in the distal promoter. *J Biol Chem* 1999; 274:33433–33439.
81. Tamura K, Chen YE, Lopez-Illasaca M, Daviet L, Tamura N, Ishigami T, Akishita M, Takasaki I, Tokita Y, Pratt RE, Horiuchi M, Dzau VJ, Umemura S. Molecular mechanism of fibronectin gene activation by cyclic stretch in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2000; 275:627.
82. Westermarck J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 1999; 13:781–792.
83. Mitchell JA, Lye SJ. Differential expression of activator protein-1 transcription factors in pregnant rat myometrium. *Biol Reprod* 2002;67:240–6. Mitchell JA, Lye SJ. Differential expression of activator protein-1 transcription factors in pregnant rat myometrium. *Biol Reprod* 2002;67:240–6.
84. Shynlova OP, Oldenhof AD, Liu M, Langille L, Lye SJ. Regulation of c-fos expression by static stretch in rat myometrial smooth muscle cells. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186:1358–65.
85. Lim, R., & Lappas, M. (2014). Differential expression of AP-1 proteins in human myometrium after spontaneous term labour onset. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 177, 100–105.

86. Bethin KE, Nagai Y, Sladek R, Asada M, Sadovsky Y, Hudson TJ, et al. Microarray analysis of uterine gene expression in mouse and human pregnancy. *Mol Endocrinol* 2003;17:1454–69.
87. Roh CR, Lee BL, Oh WJ, Whang JD, Choi DS, Yoon BK, et al. Induction of c-Jun mRNA without changes of estrogen and progesterone receptor expression in myometrium during human labor. *J Korean Med Sci* 1999;14:552–8.
88. Geimonen E, Boylston E, Royek A, Andersen J. Elevated connexin-43 expression in term human myometrium correlates with elevated c-Jun expression and is independent of myometrial estrogen receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1177–85.
89. Lappas M, Riley C, Lim R, Barker G, Rice GE, Menon R, et al. MAPK and AP-1 proteins are increased in term pre-labour fetal membranes overlying the cervix: regulation of enzymes involved in the degradation of fetal membranes. *Placenta* 2011;32:1016–25.
90. Bollapragada S, Youssef R, Jordan F, Greer I, Norman J, Nelson S. Term labor is associated with a core inflammatory response in human fetal membranes, myometrium, and cervix. *Am J Obstet Gynecol* 2009;200:1–11.
91. Osman I, Young A, Ledingham MA, Thomson AJ, Jordan F, Greer IA, et al. Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term. *Mol Hum Reprod* 2003;9:41–5.
92. Romero R, Espinoza J, Goncalves LF, Kusanovic JP, Friel LA, Nien JK. Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006;11:317–26.
93. Nadeem, L., Farine, T., Dorogin, A., Matysiak-Zablocki, E., Shynlova, O., & Lye, S. (2017). Differential expression of myometrial AP-1 proteins during gestation and labour. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(1), 452–471.

94. Halazonetis TD, Georgopoulos K, Greenberg ME, Leder P. c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell* 1988; 55:917–924.
95. Kouzarides T, Ziff E. The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction. *Nature* 1988; 336:646–651.
96. Ryseck RP, Bravo R. c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins. *Oncogene* 1991; 6:533–542.

