

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

KALPTE BASINÇ YÜKLENMESİNE YOL AÇAN DOĞUMSAL
KALP HASTALIKLARINDA MATRİKS
METALLOPROTEİNAZLAR VE
DOKU İNHİBİTÖRLERİNİN SERUM DÜZEYLERİ VE KARDİYAK
FONKSİYONLARLA İLİŞKİLERİ

Dr. Birsen UÇAR

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı
Çocuk Kardiyoloji Bilim Dalı
YAN DAL UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR
2009

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

KALPTE BASINÇ YÜKLENMESİNE YOL AÇAN DOĞUMSAL
KALP HASTALIKLARINDA MATRİKS
METALLOPROTEİNAZLAR VE
DOKU İNHİBİTÖRLERİNİN SERUM DÜZEYLERİ VE KARDİYAK
FONKSİYONLARLA İLİŞKİLERİ

Dr. Birsen UÇAR

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı
Çocuk Kardiyoloji Bilim Dalı
YAN DAL UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Zübeyir KILIÇ

ESKİŞEHİR
2009

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Birsen UÇAR'a ait "Kalpte basınç yüklenmesine yol açan doğumsal kalp hastalıklarında matriks metalloproteinazlar ve doku inhibitörlerinin serum düzeyleri ve kardiyak fonksiyonlarla ilişkileri" adlı çalışma jürimiz tarafından Çocuk Kardiyoloji Bilim Dalı'nda Yan Dal Uzmanlık tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih:

Jüri Başkanı	Prof. Dr. Mehmet Arif AKŞİT Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Neonatoloji Bilim Dalı	İmza
Üye	Prof. Dr. Zübeyir KILIÇ Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Kardiyoloji Bilim Dalı	İmza
Üye	Prof. Dr. Sultan AYDOĞDU Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Beslenme ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı	İmza

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yönetim Kurulu'nun
Tarih ve Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zübeyir KILIÇ
Dekan

TEŞEKKÜR

Gerek yan dal uzmanlık eğitimim süresince, gerekse tezimin yazılması aşamasında bana yardımcı olan, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Sayın Hocam Prof. Dr. Zübeyir KILIÇ'a, değerli görüşlerinden yararlandığım Prof. Dr. Mehmet Arif AKŞİT ve Prof. Dr. Sultan AYDOĞDU'ya, istatistiksel analizler için yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Cengiz BAL'a ve projemize destek veren Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na teşekkür ederim.

ÖZET

Uçar, B. Kalpte basınç yüklenmesine yol açan doğumsal kalp hastalıklarında matriks metalloproteinazlar ve doku inhibitörlerinin serum düzeyleri ve kardiyak fonksiyonlarla ilişkileri. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Kardiyoloji Bilim Dalı Yan Dal Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2009. Matriks metalloproteinazlar (MMP) ekstraselüler matriksi (ESM) parçalayan endopeptidazlardır. Doku metalloproteinaz inhibitörleri (tissue inhibitors of matrix metalloproteinases; TIMP) MMP'lerin spesifik inhibitörleridir. Çalışmamızda kalpte basınç yüklenmesine yol açan doğumsal kalp hastalıklarındaki (DKH) serum MMP-2, MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 düzeylerini ve bunların ventrikül fonksiyonları ile ilişkilerini araştırmayı amaçladık. Çalışmaya sol ventrikülde basınç yüklenmesine yol açan aort darlığı (n: 14) ve aort koarktasyonu (n: 9) tanılarını alan 23 olgu ve sağ ventrikülde basınç yüklenmesine yol açan pulmoner darlık tanısı alan 16 olgu alındı. Hastaların yaşları 3-192 ay arasında değişmekte olup (88,2±9,6 ay; ortalama±SEM), 12'si kız, 27'si erkek idi. Kontrol grubu ise yaşları 3-216 ay arasında değişen (78,4±8,3 ay) 21'i kız, 26'sı erkek, toplam 47 sağlıklı çocuktan oluşuyordu. Hastalarda sol ventrikül sistolik ve diyastolik fonksiyonlarının konvansiyonel ekokardiyografik yöntemlerle değerlendirilmesinin yanısıra doku Doppler yöntemi ile sol ventrikülün ve sağ ventrikülün, eş zamanlı sistolik ve diyastolik pik akım velositeleri ve myokard performans indeksi (MPI) hesaplandı. Venöz kan örneklerinde serum MMP-2, MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 düzeyleri "enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA) yöntemi ile çalışıldı. Serum MMP-2 düzeyleri sol ventrikülde basınç yüklenmesi olan hastalarda sağ ventrikülde basınç yüklenmesi olan hastalardan ve kontrol grubundan düşük, sağ ventrikülde basınç yüklenmesi olan hastalarda ise sol ventrikülde basınç yüklenmesi olan hastalardan ve kontrol grubundan yüksek bulunmakla birlikte gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Serum MMP-9 düzeyleri de sol ventrikülde basınç yüklenmesi olan grupta sağ ventrikülde basınç yüklenmesi olan gruptan ve kontrol grubundan düşük bulunmakla birlikte gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Sol ventrikülde ve sağ ventrikülde basınç yüklenmesi olan gruplardaki TIMP-1 ve TIMP-2 düzeyleri kontrol grubundan düşük bulunurken sağ ventrikülde basınç yüklenmesi olan hastalardaki serum TIMP-1 ve TIMP-2 düzeyleri en düşük idi, ancak gruplar arasındaki bu farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Sol ventrikülde basınç yüklenmesi olan hastalarda MMP-9 düzeyleri sol ventrikül sistolik kitlesi, aorta diyastolik ve ortalama basınçları ile pozitif, MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri doku Doppler ile ölçülen sağ ventrikül İKZ ile, TIMP-2 düzeyleri ise doku Doppler ile ölçülen sağ ventrikül İVRZ ile negatif korelasyon göstermekteydi ($p<0,05$). Sağ ventrikülde basınç yüklenmesi olan hastalarda MMP-2 düzeyleri doku Doppler ile ölçülen sağ ventrikül İKZ değerleri ile pozitif korelasyon gösteriyordu ($p<0,05$). Sonuç olarak; çalışmamızda kalpte basınç yüklenmesine yol açan DKH'da serum MMP ve TIMP düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte değişimler olduğu gözlenmiş, bu hastalıklarda görülen kardiyak yeniden şekillenmede MMP ve TIMP'lerin rolü olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: Doğumsal kalp hastalığı, matriks metalloproteinaz, metalloproteinazların doku inhibitörleri, basınç yüklenmesi, kardiyak fonksiyonlar

ABSTRACT

Uçar, B. Serum levels of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in congenital heart diseases causing to cardiac pressure overload and their relations to cardiac functions. Eskişehir Osmangazi University Medical Faculty, Specialty Thesis in Department of Pediatric Cardiology, Eskişehir, 2009. Matrix metalloproteinases (MMP) are endopeptidases responsible for extracellular matrix (ECM) degradation. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) are specific inhibitors of MMPs. In this study, we aimed to investigate the serum levels of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 and their relations to ventricular functions in congenital heart diseases (CHDs) leading to cardiac pressure overload. Twenty-three patients with CHD leading to left ventricular (LV) pressure overload such as aortic stenosis (n: 14) and coarctation aorta (n: 9) and 16 patients with pulmonary stenosis which leads to right ventricular (RV) pressure overload were included in this study. The patients were aged between 3-192 months (88.2 ± 9.6 months; mean \pm SEM) and 12 of them were female, 27 were male. The control group was consisted of 47 healthy children aged between 3 months-18 years (78.4 ± 8.3 months). Besides the evaluation of LV systolic and diastolic functions by the conventional echocardiographic methods, simultaneous systolic and diastolic peak flow velocities of the both ventricles and myocardial performance indexes (MPI) were measured by tissue Doppler imaging (TDI). Serum levels of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 were analyzed with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. Serum MMP-2 levels were lower in the patients with LV pressure overload than the patients with RV pressure overload and than the control group. However MMP-2 levels were higher in the patients with RV pressure overload than the patients with LV pressure overload and than the control group. But these differences between the groups were not statistically significant ($p > 0.05$). Also serum MMP-9 levels were found to be lower in the patients with LV pressure overload than the patients with RV pressure overload and than the control group, but the differences between the groups were not statistically significant ($p > 0.05$). Besides the serum levels of TIMP-1 and TIMP-2 of both left and right ventricular overload groups were lower than those of the control group, the patients with RV pressure overload had the lowest serum levels of TIMP-1 and TIMP-2, but the differences between the groups were not statistically significant ($p > 0.05$). In the patients with LV pressure overload, serum MMP-9 levels positively correlated with LV systolic mass, diastolic and mean pressures of the aorta while both MMP-2 and MMP-9 levels negatively correlated with LV ICT measured by TDI and TIMP-2 levels negatively correlated with RV IVRT measured by TDI ($p < 0.05$). In the patients with RV pressure overload, serum MMP-2 levels positively correlated with RV ICT values measured by TDI ($p < 0.05$). In conclusion, in our study, even if they are not statistically significant, some changes in the serum levels of MMPs and TIMPs were observed in the CHDs leading to pressure overload in the heart. Therefore, it was thought that MMPs and TIMPs may have a role in the cardiac remodeling observed in these diseases.

Key words: Congenital heart disease, matrix metalloproteinase, tissue inhibitors of metalloproteinases, pressure overload, cardiac functions

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Matriks Metalloproteinazlar ve Metalloproteinazların Doku İnhibitörleri	4
2.1.1. Matriksin Ailesi	5
2.1.2. Matriks Metalloproteinazların Üç Boyutlu Yapıları	8
2.1.3. ProMMP'lerin Aktivasyonu	10
2.1.4. Matriks Metalloproteinazların Substrat Özgüllüğü	13
2.1.5. Matriks Metalloproteinaz-Aracılıklı Ayrışma ile Oluşturulan Biyolojik Aktiviteler	13
2.1.6. Endojen Matriks Metalloproteinaz İnhibitörleri	14
2.1.7. Metalloproteinazların Doku İnhibitörlerinin Biyolojik Fonksiyonları	15
2.2. Vasküler Yeniden Şekillenmede Matriks Metalloproteinazlar	16
2.3. Vasküler Matriks Metalloproteinaz Salınımının ve Aktivitesinin Major Uyarınları	17
2.4. Aterosklerozda Matriks Metalloproteinazlar ve Vasküler Yeniden Şekillenme	18
2.5. Sistolik Hipertansiyonda MMP Düzeyleri	20
2.6. Kalpte Ekstraselüler Matriks ve Matriks Metalloproteinaz Sistemleri	21

	<u>Sayfa No</u>
2.7. Miyokardiyal Yeniden Şekillenme	22
2.8. Sol Ventrikül Yeniden Şekillenmesinde ve Kalp Yetersizliğinde Matriks Metalloproteinazların ve Doku İnhibitörlerinin Rolü	22
2.9. Valvüler Kalp Lezyonlarında MMP'ler ve Doku İnhibitörleri	25
2.10. Basınç Yüklenmesi Olan Kalpte Matriks Metalloproteinazlar ve Doku İnhibitörleri	26
2.11. Hipertrofik Kardiyomiyopatide Görülen Kardiyak Yeniden Şekillenmede Matriks Metalloproteinazların Rolü	27
2.12. Dilate Kardiyomiyopati ve Miyokarditte Matriks Metallo- proteinazların Aktivitesi	27
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	29
3.1. Ekokardiyografik Değerlendirmeler	30
3.2. Biyokimyasal Analizler	30
3.3. İstatistiksel Değerlendirmeler	31
4. BULGULAR	32
4.1. Sol Ventrikülde ve Sağ Ventrikülde Basınç Yüklenmesi Olan Doğumsal Kalp Hastalıklarında Serum Matriks Metalloproteinaz ve Doku İnhibitörlerinin Düzeyleri	33
4.2. Matriks Metalloproteinaz ve Doku İnhibitörlerinin Düzeylerinin Ekokardiyografik ve Hemodinamik Parametrelerle Korelasyonları	34
5. TARTIŞMA	37
5.1. Sol Ventrikülde Basınç Yüklenmesi Olan Doğumsal Kalp Hastalıklarında Matriks Metalloproteinazlar ve Doku İnhibitörleri	37
5.2. Sağ Ventrikülde Basınç Yüklenmesi Olan Doğumsal Kalp Hastalıklarında Matriks Metalloproteinazlar ve Doku İnhibitörleri	45
5.3. Matriks Metalloproteinazlar ve Doku İnhibitörlerinin Serum Düzeyleri ile Ekokardiyografik ve Hemodinamik Parametrelerin Korelasyonları	46

	<u>Sayfa No</u>
5.4. Matriks Metalloproteinazlar ve Doku İnhibitörleri ile İlgili Gelecekteki Tedavi Yaklaşımları	47
6. SONUÇLAR	50
KAYNAKLAR	52

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACE	(Angiotensin converting enzyme) Anjiyotensin konverting enzim
AoP (d)	Aorta diyastolik basıncı
AoP (ort)	Aorta ortalama basıncı
DKH	Doğumsal kalp hastalığı
EF	Ejeksiyon fraksiyonu
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESM	Ekstraselüler matriks
ICAM-1	İnterselüler adezyon molekülü-1
IGF-BP	(Insulin like growth factor-binding protein) İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein
IL-2	İnterlökin-2
Ile	İzolösin
KF	Kısalma fraksiyonu
Leu	Lösin
LV	Sol ventrikül
Met	Metyonin
MMP	Matriks metalloproteinaz
MT-MMP	Membran tipi matriks metalloproteinaz NYHA: New York Heart Association
NMR	Nükleer manyetik rezonans
NO	Nitrik oksit
NT-proBNP	N-terminal pro- <i>brain</i> natriüretik peptit
PDE5	Fosfodiesteraz 5
Phe	Fenil alanin
ProIL-1 β	Pro-interlökin-1 β

ProTGF- β	(Pro-transforming growth factor- β) Pro-transforme edici büyüme faktörü- β
ProTNF- α	(Pro-tumor necrosing factor- α) Pro-tümör nekroze edici faktör- α
PWV	<i>Pulse wave velosite</i>
RV	Sağ ventrikül
TIMP	(Tissue inhibitors of metalloproteinases) Metalloproteinazların doku inhibitörleri
TNF- α	(Tumor necrosing factor- α) Tümör nekroze edici faktör- α
Tyr	Tirozin
VCAM-1	(Vascular cell adhesion molecule-1) Vasküler hücre adezyon molekülü-1
Zn	Çinko

M-mod Ekokardiyografik Ölçümler:

LVIDd	(Left ventricular internal dimension at end diastole) Sol ventrikül diyastol sonu iç çapı
LVIDs	(Left ventricular internal dimension at and end systole) Sol ventrikül sistol sonu iç çapı
LV kitlesi-d	Sol ventrikül diyastolik kitlesi
LV kitlesi-s	Sol ventrikül sistolik kitlesi

Pulsed-wave Doppler ile Yapılan Ekokardiyografik Ölçümler:

A	Mitral ikinci akım pik hızı
E	Mitral erken akım pik hızı
E/A	Mitral erken/ikinci akım pik hızları oranı
DZ	Deselerasyon zamanı
İKZ	İzovolumetrik kontraksiyon zamanı
İVRZ	İzovolumetrik relaksasyon zamanı

Doku Doppler Yöntemi ile Yapılan Ekokardiyografik Ölçümler:

A_m	Diyastolik atriyum kasılması ile oluşan ventrikül dolumu pik akım hızı (mitral için)
-------	--------------------------------------------------------------------------------------

A_t	Diyastolik atriyum kasılması ile oluşan ventrikül dolumu pik akım hızı (triküspid için)
E_m	Diyastolik hızlı pasif ventrikül dolumu ile oluşan pik akım hızı (mitral için)
E_t	Diyastolik hızlı pasif ventrikül dolumu ile oluşan pik akım hızı (triküspid için)
MPI	Miyokard performans indeksi
S_m	Sistolik ventrikül ejeksiyonu ile oluşan pik akım hızı (mitral için)
S_t	Sistolik ventrikül ejeksiyonu ile oluşan pik akım hızı (triküspid için)

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
2.1. MMP'lerin yapısal özellikleri.	5
2.2. MMP'lerin üç boyutlu yapıları: A. ProMMP-2-TIMP-2 kompleksi	10
B. MMP-2 propeptidinde, sistein anahtarı motifinin sisteini	
C. MMP-2'nin üç "fibronektin domaini" ve her birinin iki disülfid bağı.	
2.3. ProMMP'lerin kademeli aktivasyonu.	12

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
2.1. İnsan miyokardında belirlenen matriks metalloproteinazlar.	9
4.1. Çalışma ve kontrol gruplarının yaş ve cinsiyete göre dağılımları.	32
4.2. Çalışma gruplarındaki hastaların tanıları.	33
4.3. Basınç yüklenmesi olan hastaların ve kontrol grubunun serum MMP, TIMP düzeyleri ve MMP/TIMP oranları yönünden karşılaştırılmaları.	34
4.4. Hasta gruplarında serum MMP, TIMP düzeylerinin ekokardiyografik ölçümler ve hemodinamik parametrelerle korelasyonları.	35

1. GİRİŞ

Matriks metalloproteinazlar (MMP; matriksinler) ekstraselüler matriksi (ESM) parçalayan endopeptidazlardır. Bu proteinazlar embriyogenezis, normal doku yeniden şekillenmesi, yara iyileşmesi ve anjiyogenezis gibi fizyolojik süreçlerin yanı sıra ateroma, artrit, kanser ve doku ülserasyonu gibi birçok patolojik süreçte önemli rol oynarlar. İnsanlarda 23 adet MMP tanımlanmıştır (1, 2). MMP'ler, yeni matriks sentezi sürerken ESM yıkımını sağlayarak damar bütünlüğünü sürdürmekte önemli rol oynarlar. Ancak MMP'ler kardiyovasküler patolojik süreçlere de katılabilmektedir. MMP'ler düz kas hücrelerinin vasküler media tabakasından intimaya göçüne izin vererek, de novo aterosklerotik plakların ve anjiyoplasti sonrası restenotik plakların oluşumuna ve aterosklerotik plakları çevreleyen fibröz kapsülü parçalayarak bu plakların rüptürüne katkıda bulunmaktadır (1).

Doku metalloproteinaz inhibitörleri (TIMP) MMP'lerin özgül inhibitörleridir. Normalde MMP/TIMP aktiviteleri kontrol altındadır. Ateroskleroz, anevrizma, artrit, nefrit, doku ülseri ve fibrozis, tümör anjiyogenezisi ve metastazi gibi birçok durumda MMP aktivitesinin kontrolü bozulmuştur (2).

MMP-2 ve MMP-9, "jelatinaz A" ve "jelatinaz B" olarak adlandırılır. Jelatin, tip-1 kollagen, elastin ve laminini parçalarlar (2, 3). Vasküler yeniden şekillenmede önemli rol oynarlar. Serum elastaz aktivitesinin artmasının ateroskleroz ve artmış kardiyovasküler hastalık riski ile, artmış MMP-2 ve MMP-9 aktivitesinin ise insanlarda ve hayvanlarda arterlerin elastik laminasının parçalanması ve anevrizma oluşumuyla ilişkisi gösterilmiştir (3).

Fare karotis arter organ kültürlerinde artmış lümen içi basınçla endotel ve düz kas hücrelerinde MMP-2 ve MMP-9 aktivitelerinin arttığı ve vasküler yeniden şekillenmede önemli rollerinin olduğu (4), yüksek tuzlu diyet verilerek hipertansiyon modeli oluşturulmuş ratlarda sol ventrikül dilatasyonu gelişmeden önce MMP-2 ve MMP-9 gen ekspresyonunun ve doku jelatinaz aktivitesinin artmış olduğu, bunun sol ventrikül yeniden şekillenmesinde tetikleyici ve ilerletici rolü olduğu (5) gösterilmiştir. MMP aktivitelerinde daha ileri artışla birlikte sol ventrikül dilatasyonu, sistolik disfonksiyonu ve pulmoner ödem oluştuğu, ACE (angiotensin converting enzyme; anjiyotensin konverting enzim) inhibisyonunun doğrudan MMP'ler üzerine inhibitör etkisinin bulunduğu, bu şekilde sol ventrikül yeniden

şekillenmesini ve disfonksiyonunu önlediği gösterilmiştir (5). Akut ve uzamış basınç yükü stimulusundan sonra miyokardiyal MMP düzeylerinde zamana bağımlı değişiklikler gösterilmiştir (6). Basınç yüklenmesi durumlarında zamana bağımlı olarak miyokardiyal MMP ve TIMP ekspresyonlarında meydana gelen değişiklikler çalışmalar arasında farklılıklar göstermektedir (7-10).

Soini ve ark. (11), endokarditli ve degeneratif valvüler hastalığı olan mitral ve aort kapaklarında MMP'lerin (MMP-2 ve MMP-9) ve MMP inhibitörlerinin (TIMP-1 ve TIMP-2) mRNA'larının sentezlendiğini göstermiş ve bunların valvüler hastalıkta matriks yeniden şekillenmesine katkıda bulunabileceğini düşünmüşlerdir.

Sol ventrikülde basınç yüklenmesi oluşturulan deneysel hayvan modellerinde (9, 12, 13) ve dejeneratif aort darlığı nedeniyle kapak replasmanı yapılan ileri yaşlardaki bireylerde kardiyak dokuda MMP ve TIMP ekspresyonunun ya da aktivitesinin çalışıldığı çalışmalarda (10, 14-16), basınç yüklenmesi olan kalpte kompanze durumdan dekompanze duruma geçişten sorumlu olan ventriküler yeniden şekillenme sürecinde MMP'lerin ve doku inhibitörlerinin tutulumuna işaret edilmektedir, ancak bu çalışmalarda MMP ve TIMP düzeylerindeki değişimlerle ilgili çelişkili sonuçlar elde edilmiştir.

Sağ ventrikülde basınç yüklenmesi durumunda MMP ve TIMP'lerin araştırıldığı çalışmaları taradığımızda ise sildenafil'in pulmoner hipertansiyon tedavisindeki etki mekanizmasını araştırmak amacı ile planlanmış olan, pulmoner artere *banding* yapılarak sağ ventrikülde basınç yüklenmesi oluşturulan ratlarda sağ ventrikülde TIMP-1 mRNA ekspresyonunda artış olduğunu saptayan Schäfer ve ark.nın (17) çalışması dışında herhangi bir yayına rastlayamadık.

Gerek deneysel çalışmalarda, gerekse insanlarda yapılan çalışmalarda kalpte basınç yüklenmesine bağlı olarak miyokardiyal yeniden şekillenme meydana geldiğinin ve bu süreçte MMP ve TIMP'lerde çeşitli değişikliklerin olduğunun gösterilmesini göz önüne aldığımızda biz de kalpte basınç yüklenmesine yol açan doğumsal kalp hastalıklarında (DKH) kalpte meydana gelen değişikliklerde ve miyokardiyal yeniden şekillenmede MMP'lerin ve doku inhibitörlerinin rolü olabileceğini düşündük. Ancak yaptığımız literatür taramasında sol ventrikülde ya da sağ ventrikülde basınç yüklenmesine neden olan DKH'da MMP ve TIMP düzeylerinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlayamadık. Çalışmamızda kalpte

basınç yüklenmesine neden olan DKH'daki serum MMP-2, MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 düzeylerini, MMP ve TIMP düzeylerinin sağ ve sol ventrikül sistolik ve diyastolik fonksiyonları ve çeşitli hemodinamik parametrelerle (kardiyak kateterizasyon yapılan hastalarda) ilişkilerini değerlendirerek MMP'lerin ve doku inhibitörlerinin kalpte basınç yüklenmesine yol açan DKH'nın patogenezindeki rollerini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Matriks Metalloproteinazlar ve Metalloproteinazların Doku İnhibitörleri

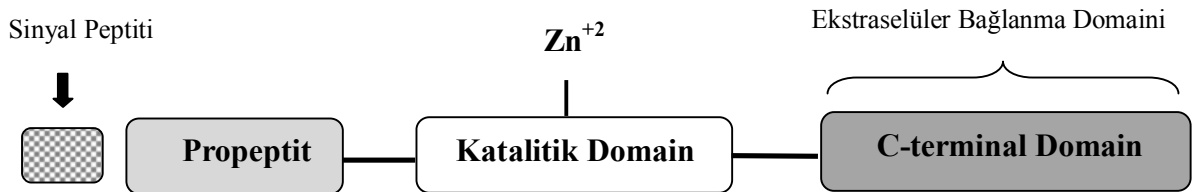
Ekstraselüler matriks makromolekülleri, gelişme, doku oluşumu ve tamiri sırasında gereksinim duyulan hücrese çevreyi yaratmada önemlidir. ESM basit bir ekstraselüler yapı iskeleti olmayıp aynı zamanda büyüme faktörleri gibi biyolojik olarak aktif moleküllerin bir rezervuarı olarak rol oynar (2). Matriks metalloproteinazlar ESM yıkımında rol alan endopeptidazlardır. Ortak özellikleri, çinko içeren katalitik bölgeleri, proformda yani inaktif olarak sentezlenip salınarak ekstraselüler alanda aktifleşmeleri, herbirinin özgül olarak bir ya da birkaç substratı parçalamasıdır. Bu proteinazlar embriyogenezis, normal doku yeniden şekillenmesi, yara iyileşmesi ve anjiyogeneziste rol oynarlar (1, 2, 18). Normal fizyolojik koşullarda MMP'lerin aktiviteleri birkaç düzeyde regüle edilir: gen transkripsiyonu ve inaktif zimojenlerin sentezi, prekürsör zimojenlerin aktivasyonu, özgül ESM komponentleri ile etkileşim ve sekrete edilen MMP'lerin endojen doku inhibitörleri tarafından inhibisyonu (2, 18). Aktivite kontrolünün kaybolması artrit, kanser, ateroskleroz, anevrizma, nefrit, doku ülserleri ve fibrozis gibi patolojik durumlarla sonuçlanabilir. Ayrıca MMP'ler çeşitli hastalıklarda meydana gelen istenmeyen ESM yıkımından sorumlu tutulmaktadır (1, 2).

MMP'ler, yeni matriks sentezi sürerken ESM yıkımını sağlayarak damar bütünlüğünü sürdürmekte önemli rol oynarlar. Oysa belirli ortamlarda bu MMP'ler kardiyovasküler patolojik süreçlere katılabilmektedir. MMP'lerin hem de novo aterosklerotik plakların ve anjiyoplasti sonrası restenotik plakların oluşumuna katkıda bulunduğunu, hem de aterosklerotik plakları çevreleyen fibröz kapsülü parçalayarak bu plakların rüptürüne katkıda bulunduğunu gösteren deliller mevcuttur (1, 18). İntrauterin dönemde normal kraniofasiyal ve kardiyak gelişim için esas olan nöral krestten hücre göçünde MMP-2'nin rolü olduğu gösterilmiştir (19).

Metalloproteinazların doku inhibitörleri, dokularda MMP'lerin lokal aktivitelerini kontrol altında tutan özgül inhibitörleridir. Normalde MMP/TIMP aktiviteleri kontrol altında ve denge halindedir. Ateroskleroz, anevrizma, artrit, nefrit, doku ülseri ve fibrozis, tümör anjiyogenezisi ve metastazı gibi birçok durumda MMP aktivitesinin kontrolü bozulmuştur (2).

2.1.1. Matriksin Ailesi

Şimdiye kadar vertebralılarda 24 farklı MMP belirlenmiştir ve bunların 23'ü insanlarda bulunur. Kollajenaz 1 (MMP-1) ile dizilim benzerliği, MMP'leri zimojen (proMMP) formunda tutan propeptitteki sistein anahtarı motifi PRCGXPD ve "katalitik domain"deki çinko bağlayıcı motif HEXGHXXGXXH bu ailedeki proteinazları ayırt etmek için kullanılan özelliklerdir. MMP'ler genel olarak bir "prodomain", bir "katalitik domain" ve bir "C-terminal domaini"nden oluşurlar. Ayrıca MMP'ler yeni sentezlenmiş olan MMP'yi ekstraselüler mesafeye sekrete edilmek üzere hücre membranına yönlendiren küçük bir sinyal peptiti içerirler; hücreden salındıktan sonra bu peptit hızla ayrılır. Propeptit, enzimatik olarak latent kalmayı sağlayan bir aminoasit dizilimi içerir. *Katalitik domain*, proteolitik aktivite için gerekli olan çinkoyu bağlayan üç adet histidin içerir. *C-terminal domaini* tüm MMP türlerinde mevcut olup hemopeksinle homoloji gösterir ve MMP'lerin substrat tanınmasıyla ilişkilidir (2, 20) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. MMP'lerin yapısal özellikleri.

MMP'lerin her biri farklı bir gen tarafından kodlanır ve monositler ve makrofajlar gibi inflamatuvar hücreler ve epitel ve endotel hücreleri, fibroblastlar gibi çeşitli hücre tiplerinde üretilirler (21). MMP'ler ya hücreden salgılanırlar, ya da plazma membranına tutunurlar. Substrat özgüllüğü, dizilim benzerliği ve *domain* organizasyonuna göre vertebralı MMP'leri kollajenazlar, jelatinazlar, stromelizinler, matrilizinler, membran tipi MMP'ler ve diğer MMP'ler olmak üzere altı gruba ayrılabilir (2):

Kollajenazlar

MMP-1, MMP-8, MMP-13 ve MMP-18 (*Xenopus*) bu gruptadır. Bu enzimlerin esas özelliği interstisyel kollajen I, II ve III'ü N-terminal ucuna 3/4

uzaklıktaki özgül bir bölgeden koparabilmesidir. Kollajenazlar aynı zamanda diğer bazı ESM ve ESM dışı molekülleri de parçalayabilirler (2).

Jelatinazlar

Jelatinaz A (MMP-2) ve jelatinaz B (MMP-9) bu gruba aittir. Denatüre kollajenleri, jelatinleri kolayca parçalayabilirler. Bu enzimler *katalitik domainin* arasına yerleşmiş, jelatin, kollajenler ve laminin'i bağlayan üç "*tip II fibronektin domaini*" tekrarına sahiptir. MMP-2 tip I, II ve III kollajenleri parçalar, MMP-9 ise parçalayamaz (2). MMP-2 insanda osteogenezis için önemlidir (22). MMP-2 ve MMP-9 vasküler yeniden şekillenmede önemli rol oynar (3). İnsanlarda ve hayvanlarda MMP-2 ve MMP-9 aktivitesindeki artış, arterlerin elastik laminasının destrüksiyonu ve anevrizma oluşumu ile birlikte (23, 24). Yakın zamanda plazma MMP-9 düzeyleri, koroner arter hastalığı ve strok hastalarında kardiyovasküler riskin yeni bir belirleyicisi olarak tanımlanmıştır (25, 26).

Stromelizinler

Stromelizin 1 (MMP-3) ve stromelizin 2 (MMP-10) benzer substrat özgülüğüne sahiptir. Ancak MMP-3'ün genelde MMP-10'dan daha yüksek proteolitik etkinliği vardır. MMP-3, ESM komponentlerini sindirmesinin yanı sıra birçok proMMP'leri aktive eder ve kısmen işlenmiş proMMP-1'in tam olarak aktif MMP-1'e dönüştürülmesindeki rolü önemlidir (27). MMP-11 stromelizin 3 olarak adlandırılır, ancak "diğer MMP'ler" arasında gruplandırılır. Zira dizilimi ve substrat özgülüğü MMP-3'ten farklıdır (2).

Matrilizinler

Matrilizinler bir "*hemopeksin domaini*"nin olmaması ile karakterizedir. "Endometaz" olarak da adlandırılan matrilizin 1 (MMP-7) ve matrilizin 2 (MMP-26) bu gruptadır. Birçok ESM komponentlerini parçalarlar. ESM komponentlerinin yanı sıra MMP-7 pro- α -defensin, Fas-ligand, proTNF- α (pro-tumor necrosing factor- α ; pro-tümör nekroze edici faktör- α) ve E-kaderin gibi hücre yüzey moleküllerini etkiler (2).

Membran Tipi Matriks Metalloproteinazlar

Altı adet membran tipi MMP (MT-MMP) vardır: dördü (MMP-14, MMP-15, MMP-16 ve MMP-24) tip I transmembran proteinlerdir, ikisi (MMP-17 ve MMP-25) ise glikozilfosfatidilinozitol'e tutunan proteinlerdir. MT4-MMP dışındakilerin tümü proMMP-2'yi aktive etme yeteneğine sahiptir. Bu enzimler aynı zamanda birçok ESM moleküllerini sindirebilirler ve MT1-MMP tip I, II ve III kollajenler üzerine kollajenolitik aktiviteye sahiptir (28). MT1-MMP anjiyogenezde de önemli rol oynar (29). MT5-MMP beyne özgüdür ve esas olarak serebellumda bulunur (30). MT6-MMP (MMP-25)'nin hemen hemen tamamı periferik kan lökositlerinde, anaplastik astrositomalarda ve glioblastomalarda bulunur, meningiomalarda ise bulunmaz (31, 32).

Diğer Matriks Metalloproteinazlar

Yedi MMP yukarıda sözü edilen gruplar içerisinde sınıflandırılmamıştır. Metalloelastaz (MMP-12) esas olarak makrofajlarda bulunur ve makrofaj migrasyonu için önemlidir. Elastinin yanı sıra diğer birçok proteinleri de parçalar (33, 34).

MMP-19 cDNA klonlama ile karaciğerden (35) ve T-hücre kökenli bir otoantijen (RASI) olarak romatoid artritli hastalardan (36) elde edilmiştir.

Amelogenin'i sindiren enamelizin (MMP-20) primer olarak yeni oluşmuş diş minesinde bulunur. Mine oluşumundaki defekte bağlı gelişen genetik bir bozukluk olan amelogenin imperfekta, MMP-20'nin ayrılma noktasındaki mutasyonlara bağlıdır (37).

MMP-22 ilk olarak civciv fibroblastlarından klonlanmıştır ve insan homoloğu EST dizilimlerine göre tayin edilmiştir. Bu enzimin fonksiyonu bilinmemektedir (2).

“*Cysteine array MMP*” diye de adlandırılan MMP-23 esas olarak reproduktif dokularda (üretimle ilgili dokularda) bulunur. Enzimde *prodomaindeki* “sistein anahtarı motifi” bulunmamaktadır. Ayrıca *hemopeksin domaini* de yoktur; bunun yerine immünglobulin benzeri *domainin* takip ettiği bir sisteinden zengin *domain* vardır. Propeptidinde bir “*furin tanıyıcı motif*” içerdiğinden Golgi içerisinde ayrılır ve ekstraselüler mesafeye aktif bir enzim olarak salınır (38).

MMP ailesine en son eklenen, esas olarak keratinositlerde bulunan epilizin ya da MMP-28'dir (39, 40). Sağlam ve hasarlı derideki bulunuş paterni MMP-28'in doku hemostazında ve yara tamirinde fonksiyonu olabileceğini düşündürmektedir (39-41).

İnterstisyel kollajenazlar (MMP-1 ve MMP-13 gibi), stromelizinler (MMP-3 gibi) ve jelatinazlar (MMP-2 ve MMP-9 gibi) memeli miyokardında gösterilmiştir. MT-MMP'lerin ve diğer yeni MMP'lerin de bu listeye eklenmesi olasıdır (20, 42). Özellikle myordiyal matriks yeniden şekillenmesi ile ilgili olabilecek MMP türleri ve başlıca substratları Tablo 2.1'de özetlenmiştir.

2.1.2. Matriks Metalloproteinazların Üç Boyutlu Yapıları

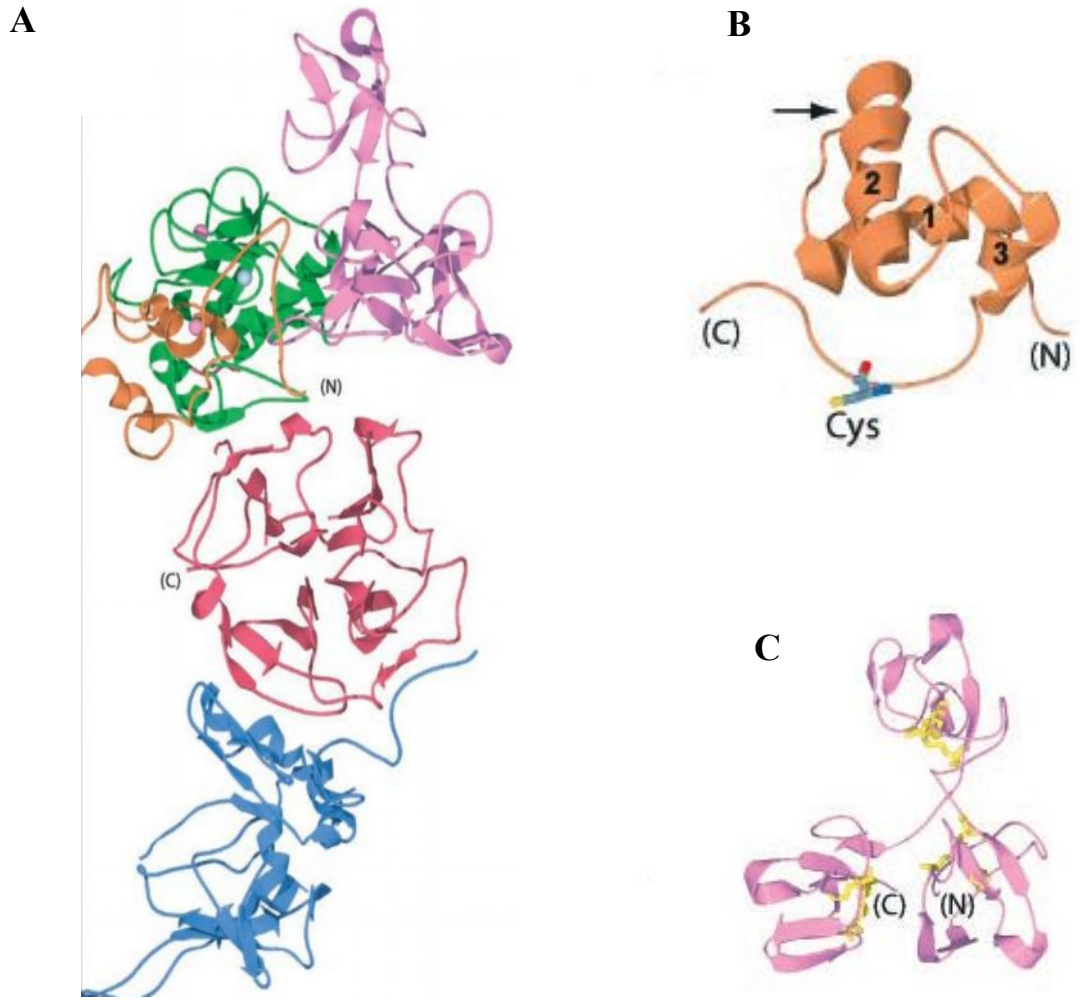
X ışını kristallografisi ve nükleer manyetik rezonans (NMR) MMP'lerin birçoğunun üç boyutlu yapılarını belirlemiştir. *Prodomainin* yapısı MMP-2, MMP-3 ve MMP-9'da bilinmektedir. Üç α sarmalı ve birleştirici loop'lardan oluşur (Şekil 2.2B). Sarmal 1 ile 2 arasındaki ilk loop proteaza duyarlı bir "cezbedici bölge"dir. *Katalitik domainin* substrat bağlayıcı yarığında sarmal 3'ten sonra bir peptit bölgesi uzantısı vardır. Bu bölge, zimojeni inaktif tutarak, aktif taraf çinko'sunun dördüncü ligandını oluşturan korunmuş "sistein anahtarı"nı içerir. Bir peptit substratın karşısındaki aktif taraf yarığı ile etkileşen propeptit omurgasının yönelmesi fark edilir. Aktif taraf ile etkileşen hidrojen bağları ise bir substrat omurgasınıninkilerle aynıdır (2).

MMP-2 ve MMP-9'da bulunan üç "*fibronektin tip II domaini*" tekrarı beşinci β -sarmalı ile katalitik taraf sarmalı arasına girmiştir (Şekil 2.2A ve 2.2C). Her bir *fibronektin domaininin* yapısı, kısa bir α sarmalı ile bağlanan ve iki disülfid bağı ile stabilize edilen birbirine paralel olmayan iki β tabakasından oluşur (2). NMR çalışmaları göstermiştir ki, *domain 2* ve *3*, muhtemelen ESM'deki birçok taraflar ile eş zamanlı olarak etkileşmelerinden dolayı oldukça esnektir (43).

MMP-9'un *hemopeksin domaini* TIMP-1'in *C-terminal domainini* bağlar (44). Rekombinant MMP-9 *hemopeksin domaini* gelatine bağlanır ve melanoma hücrelerinin invazyonunu inhibe edebilir (45). TIMP-2, proMMP-2'nin *hemopeksin domainine* bağlanır (2).

Tablo 2.1. İnsan miyokardında belirlenen matriks metalloproteinazlar.

İsim	Numara	Substrat/Fonksiyon
Kollajenazlar		
İnterstisyel kollajenaz	MMP-1	Kollajenler (I, II, III, VII) ve bazal membran komponentleri
Kollajenaz 3	MMP-13	Kollajenler (I, II ve III)
Jelatinazlar		
Jelatinaz A	MMP-2	Jelatinler, kollajenler (I, IV, V, VII) ve bazal membran komponentleri
Jelatinaz B	MMP-9	Jelatinler, kollajenler (IV, V, IX) ve bazal membran komponentleri
Stromelizinler		
Stromelizin 1	MMP-3	Fibronektin, laminin, kollajenler (III, IV, IX) ve MMP aktivasyonu
Membran tip MMP'ler		
MT1-MMP	MMP-14	Kollajenler (I, II, III), fibronektin, laminin-1; proMMP-2 ve proMMP-13'ün aktivasyonu



Şekil 2.2. MMP'lerin üç boyutlu yapıları: A. ProMMP-2-TIMP-2 kompleksi görülmektedir. Turuncu propeptidi, yeşil *karalitik domaini*, pembe *fibronektin domainlerini*, kırmızı *hemopeksin domainini* ve mavi TIMP-2'yi göstermektedir. B. MMP-2 propeptidinde, sistein anahtarı motifinin sisteini görülmektedir. Ok, parsiyel aktivasyon ile sonuçlanan ayrılmanın başlangıç yerini göstermektedir. C. MMP-2'nin üç *fibronektin domaini* ve her birinin iki disülfid bağı görülmektedir.

2.1.3. ProMMP'lerin Aktivasyonu

Kademeli Aktivasyon Mekanizması

MMP'ler proteinazlar tarafından veya *in vitro* olarak "thiol" modifiye edici ajanlar (4-aminofenilmerkürük asetat, HgCl_2 ve N-etilmaleimid), okside edilmiş glutatyon, SDS, *chaotropic* ajanlar ve reaktif oksijenler tarafından aktive edilebilir. Düşük pH ve ısı tedavisi de aktivasyona yol açabilir. Bu ajanlar çoğunlukla sistein

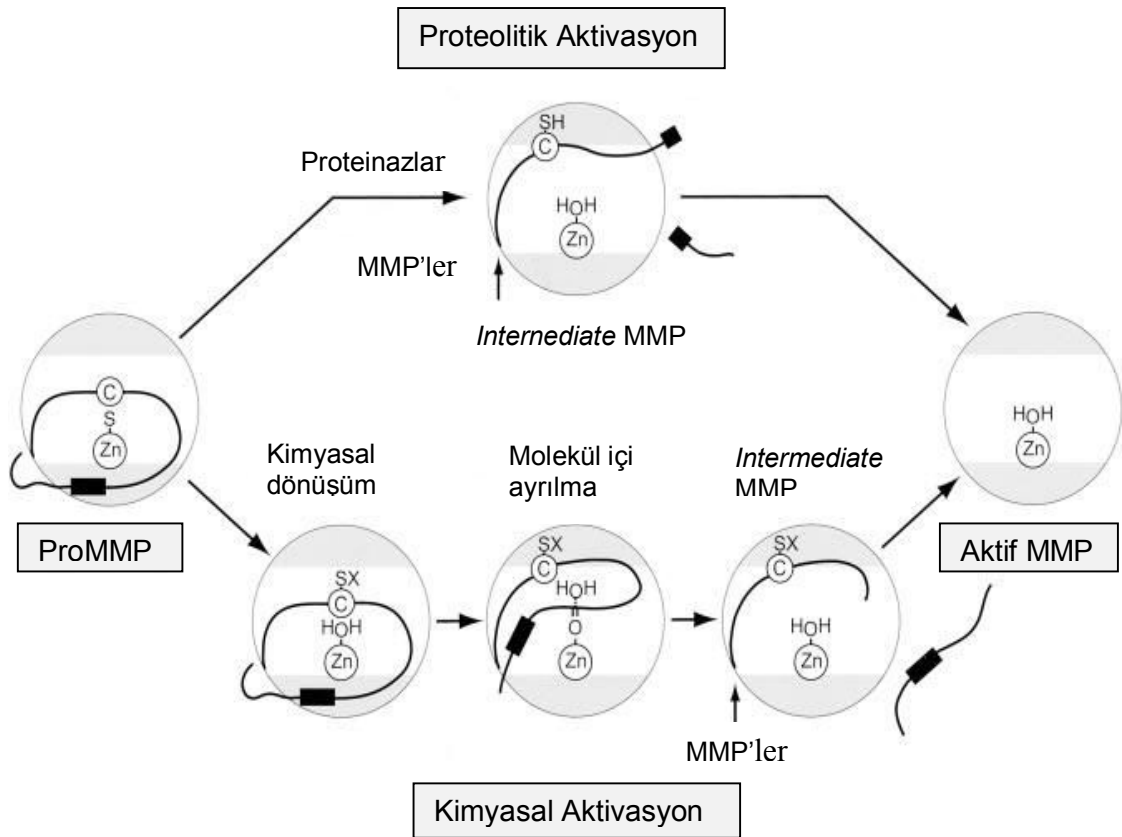
anahtarının sistein-çinko etkileşimini bozarak işlev görür (46, 47). Yakın zamanda nitrik oksitin (NO) serebral iskemi sırasında sistein anahtarının “thiol” grubu ile reaksiyona girerek ve S-nitrozile edilmiş bir türevini oluşturarak proMMP-9’u aktive ettiği gösterilmiştir (proMMP’nin in vivo kimyasal aktivasyonu) (48).

MMP’lerin proteolitik aktivasyonu birçok durumda kademelidir (Şekil 2.3). İlk proteolitik etki, propeptidin birinci ve ikinci sarmalları arasındaki bir korunmasız loop bölgesinde başlar. Cezbedici bölgenin ayırma özgülüğü her bir MMP’de bulunan dizilim tarafından kodlanır. Propeptidin bir parçası ayrılınca, bu, kısmen aktive olmuş ara MMP’ler veya diğer aktif MMP’ler tarafından moleküller arası etkileşime izin verecek şekilde sistein anahtarı-çinko etkileşimine olanak sağlayarak propetidin geri kalanını destabilize eder (27, 49). Böylece, aktivasyonun son basamağı bir MMP tarafından yürütülür.

Plazminin proMMP-1, proMMP-3, proMMP-7, proMMP-9, proMMP-10 ve proMMP-13’ü aktive ettiği bildirilmiştir (50). Aktive olan MMP’ler diğer MMP’lerin işlenmesinde rol alabilirler. TIMP’lerin MMP’ler tam olarak aktive olmadan önce ara MMP’lerle etkileşmek suretiyle MMP’lerin aktivasyonuna müdahale ettikleri göz önüne alındığında, kademeli aktivasyon sisteminin, destrüktif enzimleri kontrol eden daha hassas düzenleyici mekanizmalara uyum sağlamak için geliştirilmiş olabileceği düşünülebilir (51).

a. Hücre İçi Aktivasyon

ProMMP’lerin çoğunluğu hücrelerden sekrete edilir ve hücre dışında aktive edilir. İlk olarak Pei ve Weiss (52) proMMP-11’in (stromelizin 3) furin tarafından hücre içinde aktive edildiğini göstermiştir. ProMMP-11, propeptidin C-terminal ucunda furin’i tanıyan bir dizilime sahiptir. Altı adet MT-MMP, MMP-23 ve epilizin (MMP-28) gibi diğer bazı MMP’lerin de propeptidinde benzer bir temel motif vardır. Bu proteinler genellikle aktif enzimler olarak salgılandıklarından dolayı gen ekspresyonları ve endojen inhibitörler tarafından inhibisyonları aktivitelerinin regülasyonu için çok önemlidir (2).



Şekil 2.3. ProMMP'lerin kademeli aktivasyonu. İnaktif zimojenler olarak sekrete edilen proMMP'ler proteinazlar tarafından (proteolitik aktivasyon) ya da proteolitik olmayan ajanlar tarafından (kimyasal aktivasyon) aktive edilirler. *Katalitik domain* gri ile, katalitik taraf çinkosunu da (Zn) içine alan aktif taraf yarığı beyaz ile gösterilmiştir. Propeptit, şematik olarak cezbedici bölgeyi (siyah dikdörtgen) ve sistein anahtarını da (C) içine alan siyah bir çizgi ile gösterilmiştir. SH, sisteinin sülfhidril'ini göstermektedir. Proteinazların aktivasyonu cezbedici bölgenin ayrılması ile başlatılır; bu MMP'yi kısmen aktive eder. Tam aktivasyon, moleküller arası işlemler sonucunda propeptidin tam olarak uzaklaştırılması ile sağlanır. Kimyasal aktivasyon, sistein anahtar sülfhidrilinin (SX) dönüşümüne dayanır ve MMP'nin kısmi aktivasyonu ve propeptidin molekül içi ayrılması ile sonuçlanır. Tam aktivasyon, propeptidin geri kalan kısmının moleküller arası işlemler ile uzaklaştırılması sonucunda gerçekleşir.

b. ProMMP-2'nin Hücre Yüzey Aktivasyonu

ProMMP-2 genel proteinazlarla kolayca aktive edilmez. ProMMP-2'nin esas aktivasyonu hücre yüzeyinde ve MT-MMP'ler aracılığı ile oluşur. Burada MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT5-MMP ve MT6-MMP rol oynar (2). ProMMP-2'nin MT1-MMP aracılıklı aktivasyonu için TIMP-2'nin yardımı gereklidir. ProMMP-2, TIMP-2 ile *C-terminal domainlerinden* sıkı bir kompleks oluşturur, böylece kompleks içerisindeki TIMP-2'nin hücre yüzeyindeki MT1-MMP'ye bağlanmasına izin verir. Hücre yüzeyine bağlı olan proMMP-2 daha sonra TIMP-2'den bağımsız olan bir MT1-MMP tarafından aktive edilir. Alternatif olarak, TIMP-2 tarafından inhibe edilen MT1-MMP proMMP-2'nin bir "reseptörü" olarak görev yapabilir. Bu MT1-MMP-TIMP-2-proMMP-2 kompleksi aktivasyon için yakındaki serbest bir MT1-MMP'ye sunulur. MT2-MMP tarafından proMMP-2 aktivasyonu direkttir ve TIMP-2'den bağımsızdır (2).

2.1.4. Matriks Metalloproteinazların Substrat Özgüllüğü

Genel olarak MMP'ler bir peptid bağıcı lösin (Leu), izölösün (Ile), metyonin (Met), fenil alanin (Phe) veya tirozin (Tyr) gibi hidrofobik bir yan zinciri olan bir kalıntıdan önce ayırır. Bu pozisyondaki şarj olmuş kalıntısı olan bir peptid bağıcı nadiren ayrılır. Hidrofobik kalıntılar, MMP'ler arasında boyutu ve şekli belirgin olarak değışen S' özgüllük cebinin içine uyar. S' özgüllük cebinin yanı sıra diğere substrat temas yerleri de enzimin substrat özgüllüğünde rol alır (2).

2.1.5. Matriks Metalloproteinaz-Aracılıklı Ayrışma ile Oluşturulan Biyolojik Aktiviteler

MMP'lerin önemli bir fonksiyonu doku rezorpsiyonunda ESM'nin uzaklaştırılmasıdır. ESM ise basit bir ekstraselüler yapı iskelesi değıldir; aynı zamanda büyüme faktörleri gibi biyolojik olarak aktif moleküllerin bir rezervuarı olarak rol oynar. Bazı ESM komponentlerinin proteolizis üzerinde gizli biyolojik fonksiyonları bulunabilir. Bu nedenle ESM komponentlerinin MMP'ler tarafından parçalanması hücresel çevreyi ve fenotipleri değıştirebilir (2). Örneğın; tip I kollajenin kollajenaz tarafından parçalanması osteoklast aktivasyonu, reepitelizasyon sırasında keratinosit migrasyonu ve doğum başlamadan önce amnion □iske□yum hücrelerinin apoptozisi ile birlikte (53-55). Laminin 5'in γ_2 zincirinin MMP-2- ve

MT1-MMP–aracılıklı ayrılması gizli bir promigratuvar bölgeyi açığa çıkarır ve normal meme epiteliyal hücrelerinin migrasyonunu artırır (56, 57). Periferik sinirlerin Schwann hücrelerinden salınan MMP-2, kondroitin sülfat proteoglikanları parçalar ve nörit gelişimini kolaylaştırır (58). Görüldüğü gibi, MMP’lerin fonksiyonları basit bir yıkım değil, son derece kompleks ve incedir. MMP’lerin substratı olan ve biyolojik aktiviteler sergileyen ESM dışı proteinlerin de sayılarının giderek arttığı göz önüne alındığında MMP’lerin sağlık ve hastalık durumlarındaki rollerinin karmaşıklığı daha iyi anlaşılacaktır.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda MMP’lerin ESM komponentleri yanında ESM dışı molekülleri de substrat olarak kullandığına ve biyolojik aktivitelerini düzenlediğine ilişkin kanıtlar elde edilmiştir. Bunlar arasında IGF-BP (“insulin like growth factor-binding protein”; insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein), proTGF- β (“pro-transforming growth factor- β ”; pro-transforme edici büyüme faktörü- β), gibi büyüme faktörü öncülleri ve bağlayıcı proteinler; proTNF- α (“pro-tumor necrosing factor- α ”; pro-tümör nekroze edici faktör- α), proIL-1 β (pro-interlökin-1 β), ve IL-2 (interlökin-2) gibi sitokinler, E-kaderin, β_4 -integrin, sindekan-1, ICAM-1 (interselüler adezyon molekülü-1), α_v integrin gibi adezyon reseptörleri vardır. Bu yeni tanımlanan özellikler, MMP’lerin daha önce anlaşıldığından çok daha fazla fizyolojik ve patolojik olayla ilişkili olduğunu öngörmektedir (18, 59).

2.1.6. Endojen Matriks Metalloproteinaz İnhibitörleri

Doku metalloproteinaz inhibitörleri MMP’lerin özgül inhibitörleridir. Vertebralılarda dört tip TIMP (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 ve TIMP-4) belirlenmiştir ve salınmaları gelişim ve doku yeniden şekillenmesi sırasında düzenlenir. Dengesiz MMP aktivitelerinin bulunduğu patolojik koşullarda TIMP düzeylerindeki değişikliklerin önemli olduğu düşünülmektedir; çünkü direkt olarak MMP aktivitesinin düzeyini etkilerler (2).

TIMP’ler (21-29 kDa) her biri üç korunmuş disülfid bağı içeren, sırasıyla 125 ve 65 aminoasitlik bir *N*- ve *C-terminal domainine* sahiptirler. *N-terminal domaini* ayrı bir ünite olarak katlanır ve MMP’leri inhibe etme yeteneğine sahiptir. TIMP molekülünün şekli, MMP’nin aktif taraf yarığına, bir substratınkine benzer şekilde oturan bir kamaya benzer. Şekil 5’te MT1-MMP’nin *katalitik domaininin* ve TIMP-

2'nin yapıları ve birbirleriyle etkileşimleri gösterilmiştir. TIMP-2'nin *katalitik domain* ile esas etkileşim yerleri N-terminalin dört kalıntısı ve onlara komşu CD-loop bölgesidir. N-terminalin dört kalıntısı katalitik bölge yarığına, bir substratinkine benzer şekilde omurga temasları yaparak bağlanır (2).

TIMP-1, TIMP-2 ve TIMP-4 eriyebilir durumda salınırken TIMP-3 ESM ile ilişkilidir. TIMP'ler, MMP aktivitesinin inhibitörleri olmalarının dışında biyolojik etkilere de sahiptirler. TIMP-2, aynı zamanda MT1-MMP aracılığıyla MMP-2'nin aktivasyonunda da rol alır (1).

TIMP-1'in MT1-MMP'yi inhibe edememesi dışında TIMP'ler şimdiye kadar test edilen tüm MMP'leri inhibe ederler (60).

Kardiyovasküler hastalıklarda ve kanserde gen tedavisi ile ya da direkt protein uygulanması ile TIMP'lerin bir tedavi yöntemi olarak uygulanması ile ilgili çalışmalar henüz erken bir fazdadır (61). Bir ateroskleroz fare modelinde TIMP-1'in adenoviral aşırı salınımı lezyonda gerilemeye sebep olmuştur (62). Ratlarda oluşturulan bir anevrizma modelinde TIMP-1'in lokal salınımı anevrizma rüptürünü önlemiştir (63).

2.1.7. Metalloproteinazların Doku İnhibitörlerinin Biyolojik Fonksiyonları

Metalloproteinaz inhibe edici aktivitelerinin yanında TIMP'ler diğer biyolojik fonksiyonlara da sahiptirler. TIMP-1 ve TIMP-2'nin eritroid güçlendirici ve hücre büyümesini artırıcı aktiviteleri vardır (64-67). TIMP-1'in fibroblastların nukleusunda bulunduğu, meme karsinomu hücrelerinin yüzeyine bağlandığı ve nukleusuna göç ettiği gösterilmiştir (68, 69). Nefron morfogenezisi sırasında TIMP-2 metanefrik mezenkimal gelişimde ve üreter tomurcuğunun oluşumunda rol alır (70). TIMP-1, TIMP-2 ve TIMP-3'ün aşırı salınımı tümör büyümesini inhibe eder (71). TIMP-2, bazal fibroblast büyüme faktörünün sebep olduğu endotelial hücre gelişimini inhibe eder. Bu aktiviteler de MMP inhibisyonundan ayrıdır ve mekanizmaları büyük oranda açıklanmamıştır (2).

TIMP-3 muhtemelen TNF- α hücre reseptörü 1, Fas ve TNF- α ilişkili apoptozisin stabilizasyonu ile proapoptotik aktiviteye sahiptir (72, 73). Diğer yandan TIMP-1 ve TIMP-2 ise antiapoptotik aktiviteye sahiptir. Makuler dejenerasyona bağlı körlüğe neden olan otozomal dominant bir hastalık olan Sorsby'nin fundus

distrofisinde TIMP-3 mutasyonları saptanmıştır. Mutant TIMP-3 Bruch membranında birikmekte ve MMP inhibisyonunda azalma meydana gelmektedir; bunun da anjiyogenezisi artırdığı düşünülmektedir (74-76).

MMP'lerin özgül inhibitörlerinin yapılarının gelecekte açıklanması önemlidir. Bu inhibitörler yalnızca MMP'lerin biyolojik rollerine ışık tutmak için değil, aynı zamanda dengesiz ESM parçalanması ile ilgili hastalıklar için tedavi girişimlerinin geliştirilmesi için de yararlıdır (2).

2.2. Vasküler Yeniden Şekillenmede Matriks Metalloproteinazlar

“Vasküler yeniden şekillenme” kan damarlarının boyutunda ve/veya bileşimindeki kalıcı değişiklikleri tanımlamak için kullanılmakta olup, yalnızca kan damarlarının ortam koşullarına adapte olması ve daha sonra iyileşmesine olanak sağlamaz, aynı zamanda ateroskleroz ve restenoz gibi major kardiyovasküler hastalıkların da patogenezini açıklar. Fizyolojik ve patolojik yeniden şekillenme damar duvarının ESM iskeletinin yıkımını ve yeniden organizasyonunu gerektirir ve MMP'ler burada önemli rol oynarlar (18). Serum elastaz aktivitesinin artmasının ateroskleroz ve artmış kardiyovasküler hastalık riski ile, artmış MMP-2 ve MMP-9 aktivitesinin ise insanlarda ve hayvanlarda arterlerin elastik laminasının yıkılması ve anevrizma oluşumuyla ilişkisi gösterilmiştir (3). İmmünohistokimyasal olarak Marfan sendromunda aortada düz kas hücrelerinde MMP-2 salınımının artmış olduğu ve bu artışın düz kas hücre apoptozisi ve anevrizma ile ilişkisi gösterilmiştir (77).

Vasküler ve inflamatuvar hücrelerin MMP'leri ürettiği gösterilmiştir; ancak bazal olarak ve herhangi bir uyarıya yanıt olarak sekrete edilen MMP'lerin türleri farklıdır. Normal kan damarlarının, insan endotel hücrelerinin ve düz kas hücrelerinin major hücresel öğeleri esas olarak in vitro MMP-2, TIMP-1 ve TIMP-2 üretirler (18).

İmmünohistokimyasal çalışmalar göstermiştir ki; hastaliksız insan arterleri ve deneysel hayvan arterleri benzer şekilde, duvarı boyunca MMP-2 ve inhibitörleri olan TIMP-1 ve TIMP-2'yi salgırlar. Oysa in situ enzimatik aktivite belirlenememiştir, bu da zimojen çokluğunda MMP aktivitesinin sıkı kontrol altında olduğunu düşündürmektedir (78, 79). Diğer taraftan, hastalıklı insan arterlerinde bazı MMP'lerin fokal olarak artmış salınımı ve MMP aktivitesinin varlığı, deneysel ateroskleroz ve restenoz modellerinde de arteriyel morfolojik değişikliklerle

birlikteliği gözlenmiştir. Bu nedenle MMP'lerin patolojik durumlarda kan damarlarının yeniden şekillenmesini kolaylaştırdığı düşünülmüştür (18).

2.3. Vasküler Matriks Metalloproteinaz Salınımının ve Aktivitesinin Major Uyarıları

Vasküler yeniden şekillenmenin major etkenleri olan hemodinamikler, travma, enflamasyon ve oksidatif stres MMP salınımını ve aktivasyonunu düzenler (18). Bassiouny ve ark. (80) tavşan karotis arterlerinde düşük akım durumu ile balon hasarını kombine ettikleri çalışmalarında düşük kan akımının, arteriyel proMMP-2 salınımını düzenlemede hasarlanmadan daha önemli olduğunu öne sürmüşlerdir. Bir sıçan modelinde karotis arter akımının kesilmesi, MMP-9 salınımının önemli derecede erken artışı ve yaygın yeniden şekillenme ile sonuçlanmıştır (81). Tersine, rat arteriyovenöz fistülü bölgesinde selektif olmayan bir MMP inhibitörü yaygın yeniden şekillenmeyi inhibe etmiştir (82). Domuz arterlerinde transmural basıncın yükselmesi in vitro olarak MMP-2 ve MMP-9'un matriks yıkıcı aktivitesini artırmıştır ki bu MMP'lerin hipertansiyonda gözlenen erken vasküler yeniden şekillenmede rolü olabileceğini düşündürür (83).

Hemodinamik çevredeki değişikliklerin safen ven greftlerinin başarısızlığında çok önemli olduğu düşünülmektedir. MMP'lerin potansiyel rolü ile ilgili araştırmalar, domuz safen veninin karotis arter pozisyonuna yerleştirilmesi sonrasında MMP-2 ve MMP-9 üretiminin arttığını göstermiştir (84).

Kollajen birikimi ile birlikte NO yıkımının, balon hasarı sonrasında tavşan femoral arterlerinin konstriktif yeniden şekillenmesinden sorumlu olduğu düşünülmüştür (85). Tavşanda arteriyovenöz fistül ile oluşturulan akıma bağlı yeniden şekillenme çalışmaları, NO'nun etkisinin MMP salınımının modülasyonu sonucunda ortaya çıktığını düşündürmüştür (86). Hastalıklı damarlarda aktive vasküler hücreler ve infiltre olan inflamatuvar hücreler tarafından oluşturulan diğer reaktif türlerin varlığında ise NO'nun biyolojik etkilerinin modifiye edildiği gözlenmiştir (87). Örneğin; NO ve superoksidin eş zamanlı üretiminin, latent MMP'leri aktive ettiği ve TIMP-1'i parçaladığı bilinen peroksinitrit'i oluşturduğu gösterilmiştir (18). Böylece, normal koşullarda sağlıklı damarlarda NO üretimi MMP salınımını kontrol altında tutmaya yardım ederken, hastalıklı damarlarda NO

sekonder reaksiyonlarının ürünleri MMP/TIMP dengesini matriks degradasyonu lehine çevirebilir. Dismutazların etkisi ile superoksit'ten oluşturulabilen hidrojen peroksit gibi diğer reaktif türler MMP aktivitesini de module edebilir (18).

İnflamatuar hücreler, MMP'lerin ve vasküler matriksi yıkan katepsinler gibi diğer proteazların önemli bir kaynağıdır. Ayrıca aktive makrofajlar vasküler hücrelerde MMP gen ekspresyonunu artıran sitokinleri sekrete ederler (18).

2.4. Aterosklerozda Matriks Metalloproteinazlar ve Vasküler Yeniden Şekillenme

Aterosklerotik plaklarda yer alan makrofajların özelliği olan intraselüler lipid birikimi veya okside edilmiş lipoproteinlerle invitro olarak inkübasyon, makrofajlarda ve vasküler hücrelerde MMP ekspresyonunu artırır. Köpük hücresi makrofajların bulunması da reaktif oksijen türlerinin üretimini artırmak suretiyle oksidatif stresi artırır, böylece damar duvarında depolanmış olan latent MMP zimojenlerinin aktivasyonunu tetikleyebilir. Tüm bu etkiler matriksin proteolitik yıkımını kolaylaştırır ve yüksek köpük hücresi makrofaj içeriği olan plakların zayıflaması ile ilişkili olabilir. İn vitro olarak insan ateromunda, fibröz kapsül kollajeninin köpük hücresi makrofajların ürettiği MMP'ler tarafından fokal olarak yıkıldığı, tavşanda geliştirilen deneysel aterosklerotik lezyon modelinde ise in vivo plak rüptürü gösterilmiştir (18).

Aterosklerotik plak gelişimi, hastalıklı arterin intima tabakasında hücre, ESM ve lipid birikimine yol açan yapısal değişiklikler sonucunda olur. Aterosklerotik lezyonlarda intimal düz kas hücre sayısının artışına yol açan mekanizmalar tam olarak bilinmemekle birlikte medial düz kas hücrelerinin erken migrasyonu ve proliferasyonunun katkısı olduğu bilinmektedir (88). Deneysel modellerde arteriyel balon hasarı sonrasında görülen MMP ekspresyonu ve aktivitesindeki artış neointimal arteriyel lezyonların gelişimi ve düz kas hücre göçü ile birliktedir; MMP inhibisyonu ise düz kas hücresi migrasyonunu in vitro ve in situ olarak azaltır (18).

Aterosklerotik lezyonların gelişimine katkıda bulunan diğer bir major faktör, dolaşan inflammatuar hücrelerin, aktive endotel tarafından eksprese edilen adezyon molekülleri ile etkileşimler sonucunda toplanmasıdır. Adezyon olayından sonra endotel tabakasından ve bazal membrandan lökositlerin infiltrasyonunu sağlayan mekanizmalar büyük oranda bilinmemektedir. Son zamanlarda farelerde yapılan

çalışmalar MMP-2 ve MMP-9'un düz kas hücrelerinin migrasyonunda ve intimal hiperplazide rol aldıklarını göstermiştir (89, 90). Monositik hücrelerin formaldehit ile işleme edilmiş insan endotel hücre tabakası ile direkt etkileşiminin monosit MMP-9 üretimini birkaç kat artırdığı gösterilmiştir, fakat mekanizması açıklanamamıştır (91). İn vitro olarak T lenfositlerle endotel hücre tabakası arasındaki hücresel etkileşimin, T hücreleri tarafından bazal membranı parçalayan MMP-2 sekresyonunu tetiklediği gösterilmiştir. Bu sekresyon, endotel hücreleri tarafından VCAM-1'in ("vascular cell adhesion molecule-1"; vasküler hücre adezyon molekülü-1) salınımına bağlıdır (92). İnflamatuvar hücrelerin diapedezisi sırasında endotel hücre bazal membranının MMP tarafından yıkımı endotelin bariyer fonksiyonunda azalmaya ve böylece lipoproteinler de dahil plazma proteinlerinin geçişinde artışa katkıda bulunur (93). Damar duvarından infiltre olan hücreler ESM, okside olmuş lipidler ve birbirleriyle etkileşirler. Tüm bu etkileşimler makrofajlarda MMP üretimini artırır. Makrofajlar aynı zamanda komşu hücreler tarafından MMP üretimini ve sekrete edilmiş MMP zimojenlerinin aktivasyonunu da stimüle ederler. Gelişmekte olan aterosklerotik lezyonlardaki bu artmış MMP aktivitesi daha ileri yapısal değişiklikleri kolaylaştırır ve büyümelerine olanak sağlar (18).

Aynı zamanda MMP'lerin matriks yıkımına yol açarak aterosklerotik plakların zayıflamasına ve gevşemesine neden olmak suretiyle plak rüptürüne neden oldukları gösterilmiştir (1, 18). Akut koroner sendromlu hastalarda periferik kanda MMP-2 ve MMP-9 düzeylerinin artmış olabileceği bildirilmiş ve bu nedenle plak zedelenme olasılığının belirlenmesinde invazif olmayan test olarak kullanılabileceğini akla getirmiştir. İnsanlarda ve deneysel aterosklerotik lezyonlarda MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7 gibi MMP'lerin kaynağının stabil olmayan plakların karakteristik bir özelliği olan makrofaj kökenli köpük hücreleri olduğu belirlenmiştir. Deneysel olarak arterlere yapılan balon anjiyoplasti sonrasında artmış MMP ekspresyonu ve aktivasyonunun neointimal gelişim ile birlikte olduğu ve nonspesifik inhibitörlerinin kullanımının intimal kalınlaşmayı azalttığı ve dışarı doğru gelişen remodelingi sınırladığı saptanmıştır (18).

Balon anjiyoplasti sonrası gelişen restenozda da jelatinaz aktivitesindeki artışın ve buna bağlı kollajen kontentindeki azalma ve intimal kalınlaşmanın etkili olduğu bildirilmiştir (94). Rat karotis arter hasarı modelinde selektif olmayan bir

MMP inhibitörünün verilmesinin düz kas hücresi migrasyonunu ve neointimal kalınlaşmayı azaltması da MMP'lerin vasküler matriksin ve özellikle internal elastik laminanın yıkımında rol alarak dış tabakalarda düz kas hücrelerinin göçüne olanak sağladığını desteklemiştir (95, 96).

MMP aktivitesinde artışa yol açan çeşitli etkenler MMP/TIMP oranında dengesizliğe yol açarak ESM yıkımına neden olarak ateroskleroz ve vasküler yeniden şekillenme gelişimine katkıda bulunmaktadır. Bu nedenle MMP aktivitesinin veya MMP/TIMP dengesinin düzenlenmesinin aterosklerozun tedavisinde ve önlenmesinde yararlı olabileceği akla gelmektedir. Ancak deneysel balon hasarı sonrası arteriyel restenozun gelişmesini önlemek için çeşitli nonspesifik inhibitörlerinin kullanımı ile elde edilen sonuçlar çelişkilidir. Batimastat ve GM 6001 gibi selektif olmayan sentetik MMP inhibitörlerinin kullanıldığı bazı çalışmalarda düz kas hücresi göçünde ve intimal hiperplazide belirgin azalma olduğu bildirilirken (96-99), diğer çalışmalarda Batimastat ve onun ikinci kuşak oral türevi olan Marimastat'ın kullanımının konstriktif yeniden şekillenmede belirgin bir inhibitör etki göstermesine karşın neointima oluşumuna etki etmediği gözlenmiştir (100, 101). Bakteriyel protein sentezini inhibe ederek antibiyotik etki gösteren doksisisiklin ve diğer tetrasiklin türevlerinin güçlü MMP inhibitörleri olduğu gösterilmiştir. Doksisisiklin verilmesi, ratlarda karotis arterde oluşturulan balon hasarı sonrasında arteriyel duvarda MMP-2 ve MMP-9'un aktivitesini azaltmış ve intimal hiperplaziyi inhibe etmiştir (102). Selektif MMP inhibitörlerinin henüz var olmaması nedeniyle bireysel olarak MMP'lerin rolleri hakkındaki bilgiler son derece kısıtlıdır (18). İnsan safen ven organ kültürüne TIMP-1 ve TIMP-2'nin adenoviral transfeksiyonunun MMP-2 ve MMP-9 üretimini veya düz kas hücresi proliferasyonunu inhibe etmeksizin MMP-2 ve MMP-9 jelatinolitik aktivitesini inhibe ettiği ve neointimal kalınlaşmayı azalttığı gösterilmiştir (103). Yakın zamanda yeşil çay kateşinlerinin MMP'leri inhibe ettiği ve kateşinlerin fizyolojik konsantrasyonlarda matriks proteinleri aracılığıyla düz kas hücresi invazyonunu bloke ettiği gösterilmiştir (1).

2.5. Sistolik Hipertansiyonda MMP Düzeyleri

İzole sistolik hipertansiyonlu bireylerde ve daha genç, sağlıklı görünen bireylerde aortik katılığın, serum MMP-9 düzeyleri ve serum elastaz aktivitesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle MMP-9 da dahil olmak üzere elastazların

arteriyel katılık sürecinde ve izole sistolik hipertansiyonun gelişiminde etkili olabileceği, hızlı ve erken damar sertliği gelişen kişilerde MMP-9 inhibitörlerinin arteriyel katılığı ve dolayısıyla kardiyovasküler riski azaltmada yarar sağlayabileceği düşünülmüştür. (3).

Fare karotis arter organ kültürlerinde artmış intraluminal basınçla endotel ve düz kas hücrelerinde MMP-2 ve MMP-9 aktivitesinin arttığı ve vasküler yeniden şekillenmede önemli rollerinin olduğu, yüksek tuzlu diyet verilerek hipertansiyon modeli oluşturulmuş ratlarda sol ventrikül dilatasyonu gelişmeden önce MMP-2 ve MMP-9 aktivitesinin artmış olduğu ve sol ventrikül yeniden şekillenmesinde tetikleyici ve ilerletici rolü olduğu gösterilmiştir (4, 5). MMP aktivitelerinde daha ileri artışla birlikte sol ventrikül dilatasyonu, sol ventrikül sistolik disfonksiyonu ve pulmoner ödem oluştuğu, ACE inhibisyonunun doğrudan MMP'ler üzerine inhibitör etkisinin bulunduğu, bu şekilde sol ventrikül yeniden şekillenmesini ve disfonksiyonunu önlediği gösterilmiştir (5).

2.6. Kalpte Ekstraselüler Matriks ve Matriks Metalloproteinaz Sistemleri

Kalbin interstisyumu bağ dokusu, stroma, sinirler ve kan damarlarından oluşur. Bağ dokusu, esas olarak kollajenden, daha az miktarlarda da fibronektin, laminin ve elastinden oluşur. Fibriler kollajen matriksin organizasyonu, miyozitleri, miyofibrilleri, kas liflerini ve demetlerini çevreleyen, gruplandırır ve birleştiren çapraşık lif ağları olarak tanımlanmaktadır (104). Miyokardiyal liflerde bulunan kollajen tipleri kollajen I, III ve V'tir. Kalbin kontraktıl ünitleri ile yakın temasta olduğundan dolayı ESM, ventrikül boyutu ve şeklinin yanı sıra diyastolik ve sistolik fonksiyonlarını da etkileme yeteneğine sahiptir (104).

MMP'lerin matriks proteinlerini parçalama yetenekleri konusunda çakışmalar olmakla birlikte, koordine bir şekilde rol oynadıkları görülmektedir. Tipik olarak, kollajenazlar (MMP-1, MMP-8 ve MMP-13) nativ tip I, II ve III kollajenlerin her üç alfa zincirini tek bir spesifik noktada $\frac{3}{4}$ ve $\frac{1}{4}$ fragmanlarına ayırmak suretiyle yıkım sürecini başlatırlar. Fizyolojik sıcaklıklarda, ayrılan fragmanlar kendiliğinden helikal olmayan jelatin ürünlerine denatüre olurlar. Jelatinazlar (MMP-2 ve MMP-9) bu ürünleri, nonspesifik protezlar tarafından tekrar ayrıştırılacak olan daha küçük peptitlere dönüştürürler (104).

2.7. Miyokardiyal Yeniden Şekillenme

Miyokardiyal strete kardiyak hasara ve/veya ventriküler volüm veya basınçtaki kalıcı yükselmelere ikincil artış, miyokarddaki musküler, vasküler veya ESM komponentlerinde kompensatuvar bir yapısal yeniden şekillenmeyi başlatır. Bu yeniden şekillenme süreci, miyokardiyal komponentlerin relatif kompozisyonunun yanı sıra ventrikül duvarı ve kalp boşluklarının çaplarında ilerleyici değişikliklerden oluşur. Yükselmiş olan stresin büyüklüğüne ve süresine bağlı olmak üzere, var olan miyozitler genişler ve/veya sarkomer seri olarak eklenir ve ESM'nin fibriler kollajen konsantrasyonu, tipleri ve çapraz bağlanmasında değişiklikler oluşur. Bu sürecin sonucu olarak, strese maruz kalan ventrikül başlangıçta yeterli fonksiyon, normal şekil ve ventriküler kitle/volüm oranını korur. Ancak daha sonra kalbin kompensasyon yeteneğinin tükendiği bir noktaya gelinir ve kalp yetersizliği başlar. Bu safhada, ventriküler duvar kalınlığı, artmış boşluk çapına göre orantısız dercede azalmıştır ve ventrikül küresel şekil almaya başlar. ESM miyokardın tüm diğer komponentleriyle yakın temas halinde olduğundan dolayı, ventrikül şeklinin, boyutunun ve fonksiyonunun korunmasında çok önemli rol oynar. Matriks fibriler kollajen ağı ile yakın ilişkide bol miktarda latent MMP'ler vardır. Böylece, kollajen yıkımının kollajen sentezine üstün gelmesi için önemli miktarda MMP aktivasyonu olmalıdır. Son zamanlarda, MMP aktivasyonun ve bunun sonucunda gerçekleşen fibriler kollajen yıkımının istenmeyen ventriküler yeniden şekillenmeden sorumlu olduğuna ve kardiyak mast hücrelerinin bu sürecin başlatılmasında önemli bir rol oynadığına dair veriler toplanmaktadır (104).

2.8. Sol Ventrikül Yeniden Şekillenmesinde ve Kalp Yetersizliğinde Matriks Metalloproteinazların ve Doku İnhibitörlerinin Rolü

Hayvan deneylerinde MMP'lerle sol ventrikül yeniden şekillenme süreci arasında bir neden/sonuç ilişkisi olduğu açıkça gösterilmiştir. Ratlarda kronik hızlı pacing ile oluşturulan bir kalp yetersizliği modelinde miyokardiyal MMP'lerdeki artışın sol ventrikül yeniden şekillenmesi ve sonuç olarak da pompa disfonksiyonuna neden olduğu gösterilmiştir (105, 106). Kardiyomiyopatik hamster modelinde ise özellikle ciddi kardiyak yeniden şekillenmenin olduğu kardiyomiyopatik sol ventrikül örneklerinde artmış in vitro MMP aktivitesinin bulunduğu gösterilmiştir

(107). Spontan hipertansif kalp yetersizliği rat modelinde miyokardiyal MMP düzeylerindeki artışın kompanse sol ventrikül hipertrofisinden dekompanse dilate kardiyomiyopatiye dönüşüm aşamasında olduğu gözlenmiştir (108). Böylece, bazı hayvan modellerinde artmış MMP salınımı ve aktivitesi ile miyokardiyal yeniden şekillenme süreci ve yetersizliğe ilerleme arasında zamana bağımlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir.

Farelerde TIMP-1 delesyonu ile MMP'lerin inhibitör kontrolünün kaybının sol ventrikül dilatasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (109). Bazı hayvan modellerinde geniş spektrumlu MMP inhibisyonunun sol ventrikül yeniden şekillenme sürecini hafiflettiği gösterilmiştir (42).

Farelerde kronik volüm yüklenmesi sonucu meydana gelen bozulmuş kardiyak fonksiyonun MMP-9 aktivasyonuna yanıt olarak endokardiyal-endotelial apoptozis, kardiyak yeniden şekillenme ve endotel-miyozit ayrışması ile birlikte olduğu gösterilmiştir (110).

Kalp yetersizliğinde proMMP-2 ve proMMP-9 aktivite düzeylerinin ve TIMP-1 protein değerinin arttığı, TIMP-2 protein değerinin artmadığı, MMP konsantrasyonlarının NYHA'ya ("*New York Heart Association*") göre fonksiyonel kapasite sınıflaması ile korelasyon göstermediği, proMMP-2 düzeyi ile sol ventrikül volümü arasında pozitif korelasyon bulunduğu gösterilmiştir (111). Kalp yetersizliğinin klinik fazına bağımlı olmaksızın metalloproteinaz protein düzeylerinin yüksek bulunması, kalp yetersizliği olan hastalarda persistan ekstraselüler yeniden şekillenmenin varlığını düşündürmektedir (111). Yan ve ark. (112) ise kalp yetersizliği olan hastalarda plazma MMP-9 düzeylerinin yüksek olduğunu ve sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu (EF) ile negatif, end-sistolik volüm değerleri ile pozitif korelasyon gösterdiğini, zaman içerisinde sol ventrikül fonksiyonlarındaki kötüleşme ile birlikte MMP-9 düzeylerinin arttığını bildirmişlerdir (112). George ve ark. (113) da konjestif kalp yetersizliği olan 88 hastada serum MMP ve TIMP düzeylerini çalışmış ve MMP-2, MMP-9 ve TIMP-1 düzeylerini kontrol grubundan yüksek bulurken, MMP-3 düzeyleri yönünden fark bulamamışlardır. Araştırmacılar çalışma parametrelerinde yalnızca MMP-2 ve N-terminal pro-*brain* natriüretik peptid (NT-proBNP) düzeylerinin NYHA'ya göre fonksiyonel kapasite sınıflaması ile korelasyon gösterdiğini saptamışlardır. MMP-2 ile düzeyleri ise korelasyon

göstermemiştir. Serum MMP-2 düzeyi 352 ng/mL'nin üzerinde olan hastalarda mortalite ve kalp yetersizliğine bağlı hospitalizasyon oranının, bu eşik değerin altında olan hastalara göre artmış olduğunu bildirmişlerdir. MMP-2 ve 'nin 24 aylık izlem döneminde mortalitenin bağımsız belirleyicileri olduğu bulunmuştur. Yamazaki ve ark. (114) da konjestif kalp yetersizliği olan hastalarda kontrol grubuna göre serum MMP-2 düzeylerini yüksek bulmuşlardır. Wilson ve ark. (115) ise tersine konjestif kalp yetersizliği olan hastalarla kontrol grubu arasında plazma MMP-2 düzeyleri yönünden farklılık olmadığını, MMP-9 düzeyinde artma olduğunu göstermişlerdir.

Reinhardt ve ark. (116) kalp yetersizliği olan hastaların miyokardında MMP aktivitelerini çalışmışlar ve MMP-9 aktivitesinin hem koroner arter hastalığına bağlı, hem de idyopatik dilate kardiyomyopatiye bağlı kalp yetersizliği olan hastalarda yüksek olduğunu, MMP-2'nin ise yalnızca idyopatik dilate kardiyomyopati hastalarda artmış olduğunu, ancak transkripsiyonu gösteren MMP mRNA'sında herhangi bir artış olmadığını saptamışlardır. Bu nedenle artmış MMP aktivitesinin kaynağının yeni sentezdeki artıştan çok MMP'lerin latent formlarının aktivasyonu olduğu sonucuna varmışlardır. Ayrıca araştırmacılar bazı anjiyotensin konverting enzim inhibitörlerinin in vitro olarak MMP aktivitesini etkileyebildiklerini saptamışlardır.

Wang ve ark. (117) konjestif kalp yetersizliği olan hastalarda miyokardiyal MMP-2, MMP-3 ve MMP-9 salınımlarının, kalp yetersizliğinin ağırlık derecesi ile paralel olarak arttığını ve plazma TNF- α düzeyleri ile pozitif korelasyon gösterdiğini saptamışlar ve TNF- α değişikliklerinin MMP'lerin salınımını stimule ederek miyokardiyal yeniden şekillenmeye katkıda bulunduğunu ve konjestif kalp yetersizliğinin gelişmesine ve ilerlemesine yol açabileceğini bildirmişlerdir.

Mizon-Gerard ve ark. (118) tarafından sol ventrikül disfonksiyonu olan 444 erişkin hastada MMP gen polimorfizmleri çalışılmış ve MMP-3 5A/5A genotipi iskemik olmayan kalp yetersizliği olan hastalarda, MMP-9 polimorfizmi ise kalp yetersizliği etiyojisinden bağımsız olarak kardiyak mortalitenin belirleyicisi olarak bulunmuştur. Bu nedenle yazarlar MMP-3 ve MMP-9 polimorfizmlerinin çalışılmasının kalp yetersizliği olan hastalarda risk derecelendirmesinde önemli

olduğunu ve MMP inhibisyonundan yarar görecektir hastaları seçmede yardımcı olabileceğini bildirmişlerdir.

Çeşitli çalışmalarda kalp yetersizliği olan hastalarda sağlıklı kontrollere göre miyokardiyal TIMP-1 salınımının artmış, değişmemiş veya azalmış olduğu bildirilirken (119-122), plazma TIMP-1 düzeyleri genel olarak yüksek bulunmuştur (111, 123, 124). Framingham Kalp Çalışmasında bildirilen TIMP-1 ile sol ventrikül kılma fraksiyonu (KF) arasındaki ilişkinin aksine, Yan ve ark. (112) plazma TIMP-1 düzeyleri ile sol ventrikül yeniden şekillenmesinin göstergeleri arasında herhangi bir korelasyon gözlememişlerdir. TIMP-1'in daha çok kardiyak fibrozis, diyastolik disfonksiyon ve vasküler yeniden şekillenme için iyi bir marker olduğu akla yakın görünmektedir (125, 126).

2.9. Valvüler Kalp Lezyonlarında MMP'ler ve Doku İnhibitörleri

Soini ve ark. (11), endokarditli ve degeneratif valvüler hastalığı olan, cerrahi olarak çıkarılmış hastalıklı mitral ve aort kapaklarında MMP'lerin (MMP-2 ve MMP-9) ve MMP inhibitörlerinin (TIMP-1 ve TIMP-2) mRNA'larının sentezlendiğini göstermiş ve bunların valvüler hastalıkta matriks yeniden şekillenmesine katkıda bulunabileceğini düşünmüşlerdir.

Aort darlığı sol ventrikülde miyozit ve ESM yeniden şekillenmesine yol açar. Miyokardiyal renin-anjiyotensin sistemi aktive olur ve kollajen I, III ve fibronektin birikir. Fielitz ve ark. (127) aort darlığında kalpte görülen değişikliklerde kollajen döngüsünü kontrol eden enzimlerin rolünü araştırmak amacıyla elektif aort kapak replasmanı yapılan 19 hastadan alınan sol ventrikül doku örneklerinde MMP'leri ve TIMP'leri çalışmışlar ve kontrol grubu olarak sol ventrikül fonksiyonları normal olan 12 donör kalbi ile karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar, aort darlığında MMP-2 mRNA'sı, proteini ve aktivitesi düzeylerinin, MMP-3 proteini, EMMPRIN mRNA'sı ve proteini düzeylerinin arttığını, MMP-1 ve MMP-9 mRNA'sı, proteini ve aktivitesi düzeylerinin ise azaldığını, MMP-9 aktivitesinin sol ventrikül boyutu ile ters korelasyon gösterdiğini, TIMP-1 mRNA'sı ve proteini düzeylerinin azaldığını, TIMP-2 mRNA'sı, TIMP-3 mRNA'sı ve proteini düzeylerinin arttığını, TIMP-4 mRNA'sı düzeyinin ise değişmediğini, fakat TIMP-4 proteini düzeyinin arttığını saptamışlardır. Saptanan değişikliklerin, sol ventrikül EF normal ve bozulmuş olan aort darlığı hastalarında benzer olduğu belirlenmiş ve bu nedenle aort darlığında

miyokardiyal MMP'ler ve TIMP'lerde görülen disregülasyonun hastalığın erken döneminde, sol ventrikül fonksiyonları henüz normal iken başladığı sonucuna varılmıştır. Bazı MMP'lerde yükselme yerine MMP'lerle TIMP'ler arasındaki dengenin MMP inhibisyonu yönüne doğru kaydığı saptanmış ve bunun kollajen birikimine yol açabileceği bildirilmiştir.

2.10. Basınç Yüklenmesi Olan Kalpte Matriks Metalloproteinazlar ve Doku İnhibitörleri

Klinik kalp yetersizliğinin önemli bir sebebi sol ventrikül hipertrofisine ikincil gelişen diyastolik disfonksiyondur. Sol ventrikül hipertrofisi miyokard kompliyansının azalmasına neden olur ve bunun sonucunda da diyastolde yeterli dolumu engeller. ESM'nin yapı ve kompozisyonundaki anormalliklerin miyokardiyal kompliyansı ve dolayısıyla diyastolik fonksiyonu etkilediği gösterilmiştir. Azalmış miyokardiyal MMP aktivitesinin, hipertrofi gelişirken kollajen birikimini kolaylaştırdığı görüşünü destekleyen deliller mevcuttur (7, 8, 128).

Spontan hipertansif ratlarda kompanse hipertrofi gelişimi, artmış miyokardiyal TIMP düzeyleri ile birliktedir, bu da azalmış MMP aktivitesini göstermektedir (7). Spontan hipertansif rat modeli dekompanasyon ve sol ventrikül yetersizliğine ilerlediği için, miyokardiyal TIMP düzeyleri normalin altına düşer ki bu da MMP aktivitesi artışına yardımcı olacaktır (7, 8). Böylece basınç yüklenmesi hipertrofisinin gelişiminde miyokardiyal MMP aktivasyonunun zamana bağımlı değişimi söz konusudur ve tüm yeniden şekillenme sürecine katkıda bulunur.

Guinea domuzlarında oluşturulan uzun süreli sol ventrikül basınç yüklenmesi modelinde, basınç yüklenmesi ile oluşan hipertrofinin ilerlemesinin MMP aktivitesinde zamana bağımlı değişikliklerle birlikte olduğu gözlenmiştir (9). Kompanse sol ventrikül hipertrofisi döneminde MMP-2 aktivitesinin arttığı, bu dönemde yoğun interstisyel yıkımın mevcut olduğu ve bunun kısmen de olsa fibrozis gelişimi ve diyastolik disfonksiyonu önlediği belirlenmiştir. Daha sonraki dekompanse kalp yetersizliği dönemine geçildiğinde ise artan TIMP-2 konsantrasyonunun MMP-2 aktivitesini azalttığı, bunun ise interstisyel fibrozis artışı, ilerleyici diyastolik disfonksiyon ve sol ventrikül dilatasyonu ile birlikte olduğu bildirilmiştir (9).

Kronik basınç yüklenmesi olan insan kalbinde ise kontrollerle karşılaştırıldığında kardiyak TIMP-1 ve TIMP-2 ekspresyonunun belirgin olarak arttığı ve interstisyel fibrozisin derecesi ile ilişkili olduğu, MMP-1, MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunda ise kontrollere göre fark saptanmadığı bildirilmiştir (10).

Özetle, akut ve uzamış basınç yükü stimulusundan sonra miyokardiyal MMP düzeylerinde zamana bağımlı değişiklikler gösterilmiştir. Akut ve uzamış basınç yüklenmesi durumlarında miyokardiyal MMP ve TIMP ekspresyonundaki değişiklikler çalışmalar arasında farklılıklar göstermektedir.

2.11. Hipertrofik Kardiyomiyopatide Görülen Kardiyak Yeniden Şekillenmede Matriks Metalloproteinazların Rolü

Sistolik disfonksiyonu olan (KF %25'in altında olan) hipertrofik kardiyomiyopatili hastalarda, sistolik fonksiyonları korunmuş olan hipertrofik kardiyomiyopati hastalara ve kontrol grubuna göre plazma MMP-2 ve TIMP-2 düzeylerinin yüksek olduğu, hipertrofik kardiyomiyopati hastalarda fonksiyonel kapasite azaldıkça MMP-2 konsantrasyonunun arttığı gösterilmiştir. MMP-3 ve MMP-9 düzeyleri açısından ise gruplar arasında fark bulunmadığı bildirilmiştir. Ayrıca MMP-2 ve TIMP-2'nin KF ile negatif, sol ventrikül çapı ile pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Bu nedenle hipertrofik kardiyomiyopati hastalardaki kardiyak yeniden şekillenmeden sorumlu mekanizmalarla MMP-2 ve TIMP-2 salınımı ve aktivitesindeki değişikliklerin ilişkisi olabileceği öne sürülmüştür (129).

2.12. Dilate Kardiyomiyopati ve Miyokarditte Matriks Metalloproteinazların Aktivitesi

MMP aktivasyonunun ve bunun sonucunda ESM yıkımının kardiyomiyopatik ve yetersizliği olan kalpte görülen dilatasyon, küreleşme ve artmış kompliyansa katkıda bulunduğunu gösteren klinik bulgular toplanmaktadır. Gunja-Smith ve ark. (130) dilate kardiyomiyopatili hastalardan alınan kalplerde kollajenaz ve jelatinaz aktivitesinde 30 kat artış ve TIMP düzeyinde göz ardı edilebilecek düzeylere kadar düşüş olduğunu bildirmişlerdir. Daha sonra diğer bazı araştırmacılar da dilate kardiyomiyopatiye bağlı kalp yetersizliği olan hastalarda benzer şekilde MMP aktivitesinde artış ve TIMP düzeyinde azalma tespit etmişlerdir (119, 120, 131).

Kardiyomiyopatili doku örneklerinde, yetersizlik olmayan kontrol örneklerine göre TIMP-1 ve TIMP-3 düzeyleri azalmış iken, TIMP-2 düzeyleri değişmemiştir. Ayrıca hem iskemik, hem de iskemik olmayan kardiyomiyopatide MMP-1/TIMP-1 kompleks oluşumunda mutlak bir azalma gözlenmiştir (121).

Cheung ve ark. (132) koksakivirus B3 miyokarditi oluşturulan farelerde kalp dokusunda MMP-2, MMP-9 ve MMP-12 transkripsiyonunun ve translasyonunun, MMP-2 ve MMP-9 aktivasyonunun arttığını, TIMP-3 ve TIMP-4 salınımının azaldığını, TIMP-1 ve TIMP-2'de ise değişiklik olmadığını, bunlara paralel olarak enfeksiyonun akut döneminde total kollajen miktarında artış görülürken daha sonraki dönemlerde ise fibriler yapının bozulduğunu bildirmişlerdir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Kardiyoloji Bilim Dalında Mart 2007-Ağustos 2009 tarihleri arasında yapıldı. Çalışmaya sol ventrikülde basınç yüklenmesine yol açan aort darlığı ve aort koarktasyonu tanılarını alan 23 olgu ve sağ ventrikülde basınç yüklenmesine yol açan pulmoner darlık tanısı alan 16 olgu alındı. Hastaların yaşları 3-192 ay arasında değişmekte olup ($88,2 \pm 9,6$ ay; ortalama \pm SEM), 12'si kız, 27'si erkek, toplam 39 olgudan oluşmaktaydı.

Kontrol grubu ise yaşları 3-216 ay arasında değişen ($78,4 \pm 8,3$ ay) 21'i kız, 26'sı erkek, toplam 47 sağlıklı çocuktan oluşuyordu. Kontrol grubu masum üfürüm nedeniyle başvuran çocuklardan oluşturulmuştu. Çalışma için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan 2007/124 sayılı yazı ile onay alındı.

Hasta ve kontrol grubundaki çocukların tam bir fizik muayeneleri yapıldı; telekardiyogram ve elektrokardiyogramları değerlendirildi. Herbir hastaya ve kontrol grubundaki çocuklara tanısal bir transtorasik ekokardiyografik inceleme yapıldıktan sonra MMP ve TIMP düzeyleri ile ilişkileri araştırılacak olan ekokardiyografik ölçümler gerçekleştirildi.

Çalışma grubundaki hastalar;

Grup 1: Sol ventrikülde basınç yüklenmesine yol açan DKH (aort darlığı ya da aort koarktasyonu) olan 23 hasta,

Grup 2: Sağ ventrikülde basınç yüklenmesine yol açan DKH (pulmoner darlık) olan 16 hastadan oluşan iki gruba ayrılarak incelendi.

Sol ventrikülde ve sağ ventrikülde basınç yüklenmesi olan hastalar (Grup 1 ve 2) birbirleri ile ve kontrol grubu ile MMP ve TIMP düzeyleri yönünden karşılaştırılarak MMP ve TIMP'lerin sağ ve sol ventrikül yeniden şekillenmesindeki rolleri araştırıldı. Ayrıca MMP'ler ile TIMP'ler arasında var olan dengedeki bozulmayı araştırmak amacıyla MMP/TIMP oranları hesaplanarak gruplar bu açıdan da incelendi.

Hasta gruplarında MMP ve TIMP düzeylerinin sağ ve sol ventrikül sistolik ve diyastolik fonksiyonları ile ve kalp kateterizasyonu yapılan hastalarda (Grup 1'de 9 olgu, Grup 2'de 6 olgu) hemodinamik parametreler (atriyum ortalama basınçları, basınç yüklenmesi olan taraftaki ventrikülün sistolik ve diyastolik basınçları,

pulmoner arter ya da aorta sistolik, diyastolik ve ortalama basınçları, kapak darlığı ya da koarktasyon düzeyindeki basınç gradyenti) ile korelasyonları araştırıldı.

3.1. Ekokardiyografik Değerlendirmeler

Ekokardiyografik çalışmalar Hewlet Packard Sonos 5500 ekokardiyografi cihazı ile 4- veya 8-MHz broad-band prob kullanılarak yapıldı. Standart görüntü ve teknikler kullanılarak ekokardiyografik olarak tam bir tanısal çalışma yapıldıktan sonra sol ventrikül sistolik fonksiyonları parasternal uzun eksen konumunda, M-mod papiller kas düzeyinden geçirilerek değerlendirildi. Sol ventrikül sistolik fonksiyon ölçümleri EF (ejeksiyon fraksiyonu), KF, LVIDd (left ventricular internal dimension at end diastole; sol ventrikül diyastol sonu iç çapı), LVIDs (left ventricular internal dimension at end systole; sol ventrikül sistol sonu iç çapı), LV kitlesi-d (sol ventrikül diyastolik kitlesi) ve LV kitlesi-s (sol ventrikül sistolik kitlesi) değerlerini içermekteydi.

Sol ventrikül diyastolik fonksiyonları ise pulsed-wave Doppler metodu kullanılarak mitral erken (E) ve ikinci (A) akım pik hızlarının, E/A oranının, deselerasyon zamanının (DZ) ve izovolumetrik relaksasyon zamanının (İVRZ) hesaplanması ile ölçüldü.

Doku Doppler yöntemi ile sol ventrikülün ve sağ ventrikülün, eş zamanlı sistolik ve diastolik pik akım hızları körsür lateral mitral anulus ve lateral triküspit anulus bölgelerine yerleştirilmek suretiyle sistol sırasında ventrikül ejeksiyonu (mitral için S_m , triküspid için S_t), diyastol sırasında da hızlı pasif ventrikül dolumu (mitral için E_m , triküspid için E_t) ve atriyum kasılması ile oluşan ventrikül dolumu (mitral için A_m , triküspid için A_t) pik akım hızları kaydedilerek değerlendirildi. Herbir ventrikül için doku Doppler yöntemi ile de izovolumetrik kontraksiyon zamanı (İKZ) ve İVRZ ölçüldü. Ayrıca Tei ve ark. nın (133) tarif ettikleri yöntemle doku Doppler yöntemiyle heriki ventrikül için miyokard performans indeksi (MPI) hesaplandı. Çalışılan ekokardiyografik parametrelerle MMP ve TIMP değerleri arasındaki korelasyonlar değerlendirildi.

3.2. Biyokimyasal Analizler

Çalışma ve kontrol gruplarından MMP-2, MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 düzeylerinin çalışılması için alınan venöz kan örneklerinin serumu ayrılarak

çalışılncaya kadar -70°C 'de deepfreeze'de saklandı. Bu örneklerde serum MMP-2, MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 düzeyleri, RayBiotech Kitleri (RayBiotech, Inc. Norcross, GA, USA) kullanılarak *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) yöntemi ile çalışıldı.

3.3. İstatistiksel Değerlendirmeler

İstatistiksel değerlendirmeler, SPSS 16.0 for Windows paket programı ile yapıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren parametreler için iki grup arasındaki karşılaştırmalar t-testi ile, çoklu karşılaştırmalar ANOVA testi ile yapıldıktan sonra ANOVA testinde fark bulunan durumlarda hangi gruplar arasında fark olduğunun değerlendirilmesinde Posthoc testler (Tukey ya da Tamhan testi) kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen parametreler için ise iki grup arasındaki karşılaştırmalar Mann Whitney-U testi ile, çoklu karşılaştırmalar Kruskal Wallis testi ile yapıldı. Çapraz tabloların analizinde ise X^2 testinden yararlanıldı. Korelasyonların değerlendirilmesinde normal dağılım gösteren parametreler için Pearson korelasyon testi, normal dağılım göstermeyen parametreler için ise Spearman testi kullanıldı. $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

4. BULGULAR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Kardiyoloji Bilim Dalında aort darlığı, aort koarktasyonu ve pulmoner darlık tanısı alan ve kalpte basınç yüklenmesine yol açan 39 DKH olgusu çalışmaya alındı. Kontrol grubu ise 47 sağlıklı çocuktan oluşuyordu. Gruplara göre hastaların yaş ve cinsiyet dağılımları Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Gruplar arasında yaş ve cinsiyet açısından istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.1. Çalışma ve Kontrol Gruplarının Yaş ve Cinsiyete Göre Dağılımları*.

Gruplar	n	Cinsiyet (Kız/Erkek)	Yaş (Ay)	
			Ortalama±SEM	Alt-Üst Sınırlar
LV’de Basınç Yüklenmesi (Grup 1)	23	7/16	96±13,4	3-192
RV’de Volüm Yüklenmesi (Grup 2)	16	5/11	76,8±13,4	3-180
Kontrol	47	21/26	78,4±8,3	3-216

* Tüm gruplar için $p>0,05$

LV: sol ventrikül, RV: sağ ventrikül

“Sol ventrikülde basınç yüklenmesi” ya da “sağ ventrikülde basınç yüklenmesi” olan hastalardan oluşan gruplara ayrılarak incelenen çalışma grubundaki hastaların tanıları Tablo 4.2’de özetlenmiştir. Aort darlığı olgularında aort kapak düzeyinde ölçülen sistolik gradyent 15-73 mmHg arasında ($37,5±4,8$ mmHg), aort koarktasyonu olgularında koarktasyon düzeyindeki sistolik basınç gradyenti 31-86 mmHg arasında ($52,9±5$ mmHg), pulmoner darlık olgularında pulmoner kapak düzeyinde ölçülen sistolik gradyent ise 21-138 mmHg arasında ($55,4±9,2$ mmHg) idi.

Tablo 4.2. Çalışma gruplarındaki hastaların tanıları.

Gruplar	Tanı	n
LV'de Basınç Yüklenmesi (Grup 1)	Aort darlığı	14
	Aort koarktasyonu	9
RV'de Basınç Yüklenmesi (Grup 2)	Pulmoner darlık	16

LV: sol ventrikül, RV: sağ ventrikül

4.1. Sol Ventrikülde ve Sağ Ventrikülde Basınç Yüklenmesi Olan Doğumsal Kalp Hastalıklarında Serum Matriks Metalloproteinaz ve Doku İnhibitörlerinin Düzeyleri

Sol ventrikülde ve sağ ventrikülde basınç yüklenmesi olan çalışma gruplarının ve kontrol grubunun serum MMP ve TIMP düzeyi ortalamaları Tablo 4.3'te gösterilmiştir. Serum MMP-2 düzeyleri sol ventrikülde basınç yüklenmesi olan hastalarda sağ ventrikülde basınç yüklenmesi olan hastalardan ve kontrol grubundan düşük, sağ ventrikülde basınç yüklenmesi olan hastalarda ise sol ventrikülde basınç yüklenmesi olan hastalardan ve kontrol grubundan yüksek bulunmakla birlikte gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Serum MMP-9 düzeyleri de sol ventrikülde basınç yüklenmesi olan grupta sağ ventrikülde basınç yüklenmesi olan gruptan ve kontrol grubundan düşük bulunmakla birlikte gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$).

Sol ventrikülde basınç yüklenmesi ve sağ ventrikülde basınç yüklenmesi olan gruplardaki TIMP-1 ve TIMP-2 düzeyleri kontrol grubundan düşük bulunurken sağ ventrikülde basınç yüklenmesi olan hastalardaki serum TIMP-1 ve TIMP-2 düzeyleri aynı zamanda sol ventrikülde basınç yüklenmesi olan gruptan da düşük bulundu, ancak gruplar arasındaki bu farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$).

MMP'ler ve TIMP'ler arasındaki dengenin kalpte basınç yüklenmesine neden olan DKH'larında nasıl bir değişim gösterdiğini araştırmak amacı ile MMP'lerin TIMP'lere oranları incelendiğinde de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamakla birlikte gruplar arasındaki farklar şöyle idi: Ortalama MMP-2/TIMP-1 oranı her iki çalışma grubunda kontrol grubundan düşük, çalışma

gruplarında ise birbirine benzer düzeylerdeydi ($p>0,05$). Ortalama MMP-2/TIMP-2 oranı sol ventrikülde ve sağ ventrikülde basınç yüklenmesi olan gruplarda kontrol grubuna göre bir miktar yüksek idi ($p>0,05$). MMP-9/TIMP-1 oranı ortalaması sağ ventrikülde basınç yüklenmesi olan grupta sol ventrikülde basınç yüklenmesi olan gruptan ve kontrol grubundan bir miktar düşük, sol ventrikülde basınç yüklenmesi olan grupta ise kontrol grubu ile benzer düzeylerde bulundu ($p>0,05$). MMP-9/TIMP-2 oranı yönünden ise gruplar arasında önemli bir farklılık yoktu ($p>0,05$).

Tablo 4.3. Basınç yüklenmesi olan hastaların ve kontrol grubunun serum MMP, TIMP düzeyleri (pg/ml) ve MMP/TIMP oranları (Ortalama \pm SEM) yönünden karşılaştırılmaları*.

	LV'de Basınç Yüklenmesi (Grup 1)	RV'de Basınç Yüklenmesi (Grup 2)	Kontrol
n	23	16	47
MMP2	2177,1 \pm 193,0	2686,1 \pm 291,5	2477 \pm 215,9
MMP9	669,0 \pm 89,1	739,8 \pm 96,4	723,8 \pm 62,9
TIMP1	257,8 \pm 113,4	189,6 \pm 66,3	344,1 \pm 76,3
TIMP2	93,5 \pm 21,7	71,6 \pm 8,0	125,5 \pm 20,6
MMP2/TIMP1	113,7 \pm 51,5	118,1 \pm 46,8	140,2 \pm 41,5
MMP2/TIMP2	41,5 \pm 5,6	44,4 \pm 5,9	35,2 \pm 3,8
MMP9/TIMP1	33,7 \pm 18,9	25,0 \pm 7,8	31,5 \pm 8,6
MMP9/TIMP2	12,0 \pm 2,0	11,6 \pm 1,6	10,3 \pm 1,1

* Tüm gruplar arasında $p>0,05$

LV: sol ventrikül, RV: sağ ventrikül

4.2. Matris Metalloproteinaz ve Doku İnhibitörlerinin Düzeylerinin Ekokardiyografik ve Hemodinamik Parametrelerle Korelasyonları

Çalışma gruplarının herbirinde serum MMP ve TIMP düzeylerinin ekokardiyografik ve hemodinamik parametrelerle korelasyonları Tablo 4.4'te özetlenmiştir.

Tablo 4.4. Hasta gruplarında serum MMP, TIMP düzeylerinin ekokardiyografik ölçümler ve hemodinamik parametrelerle korelasyonları[†].

Grup 1 (LV'de basınç yüklenmesi olan DKH):

Ekokardiyografik parametreler:

MMP-2 ile RV İKZ: -0,645**

MMP-9 ile LV kitlesi-s: 0,472*, A_m: 0,483*, E/A_m: -0,495*, RV İKZ: -0,578**

TIMP-2 ile RV İVRZ: -0,511*

Hemodinamik parametreler:

MMP-9 ile AoP (d): 0,829*, AoP (ort): 0,829*

Grup 2 (RV'de basınç yüklenmesi olan DKH):

Ekokardiyografik parametreler:

MMP-2 ile RV İKZ: 0,507*

TIMP-1 ile EF: -0,526*, E/A_m: 0,571*, E_t: -0,582*

Hemodinamik parametreler:

Korelasyon gözlenmedi.

[†] Yalnızca korelasyon saptanan parametreler tabloda gösterilmiştir; diğer parametreler arasında korelasyon bulunmamıştır. Tabloda verilen değerler r değerleridir.

* p<0,05; **p<0,01

LV: sol ventrikül, RV: sağ ventrikül, LV kitlesi-s: sol ventrikül sistolik kitlesi, EF: ejeksiyon fraksiyonu, A_m: doku Doppler yöntemi ile ölçülen diyastolik atriyum kasılması ile oluşan ventrikül dolumu pik akım hızı (mitral için), E/A_m: doku Doppler ile ölçülen mitral erken (E) ve ikinci (A) akım pik hızlarının oranı, E_t: doku Doppler yöntemi ile ölçülen diyastolik hızlı pasif ventrikül dolumu ile oluşan pik akım hızı (triküspid için), RV İKZ: doku Doppler ile ölçülen sağ ventrikül izovolumetrik kontraksiyon zamanı, RV İVRZ: doku Doppler ile ölçülen sağ ventrikül izovolumetrik relaksasyon zamanı, AoP (d): aorta diyastolik basıncı, AoP (ort): aorta ortalama basıncı

Grup 1 (Sol ventrikülde basınç yüklenmesine yol açan DKH): MMP-2 düzeyleri ekokardiyografik parametrelerden doku Doppler yöntemi ile ölçülen RV İKZ ile negatif korelasyon göstermekteydi. MMP-9 düzeyleri LV sistolik kitlesi ile pozitif, doku Doppler yöntemi ile ölçülen A_m ile pozitif, E/A_m ve RV İKZ ile negatif korelasyon gösteriyordu. TIMP-2 düzeyleri ise doku Doppler ile ölçülen RV İVRZ değerleri ile negatif korele idi.

MMP-9 düzeyleri hemodinamik parametrelerden aorta diyastolik ve ortalama basınçları ile pozitif korelasyon göstermekteydi.

Grup 2 (Sağ ventrikülde basınç yüklenmesine yol açan DKH): MMP-2 düzeyleri ekokardiyografik parametrelerden yalnızca doku Doppler yöntemi ile ölçülen RV İKZ ile pozitif korelasyon göstermekteydi. TIMP-1 düzeyleri ise EF ve doku Doppler ile ölçülen E_t değerleri ile negatif, E/A_m değerleri ile pozitif korelasyon gösteriyordu.

Çalışılan parametrelerden hiçbiri ile hemodinamik ölçümler arasında korelasyon saptanmadı.

5. TARTIŞMA

Çeşitli hastalık durumlarında hastaların değerlendirilmesinde dokudaki lokal MMP ve TIMP aktivitelerinin çalışılması kullanılabilir bir yöntem değildir ve dolaşımdaki MMP ve TIMP düzeyleri miyokardiyal MMP veya TIMP aktivitesini yansıtabilir. Serum MMP düzeylerinin yüksek olması, miyokarda yüksek olduklarının gösterildiği dönemde miyokard dokusundan dökülmesine bağlı olabilir (42); ya da konjestif kalp yetersizliği olan hastalarda devreye girdiği düşünülen ve MMP sekresyonuna katkıda bulunabilen inflamatuvar ve nörohormonal mekanizmaların aktivasyonuna bağlı olabilir.

ESM yıkımında fonksiyon gören bir grup çinko-bağımlı enzim olan MMP'ler, konjestif kalp yetersizliği ve kardiyomiyopatisi olan insanlarda ve hayvan modellerinde miyokardiyal yeniden şekillenmeye katkıda bulunmakla da suçlanmaktadır (105, 130, 134). İnsanlar ve kemiriciler birçok MMP tiplerine sahip olmakla birlikte kollajenazlar (MMP-1, MMP-8 ve MMP-13), stromelizinler (MMP-3 ve MMP-10) ve jelatinazların (MMP-2 ve MMP-9) özellikle miyokardiyal yeniden şekillenme ile ilgili oldukları kabul edilmektedir (134). Bu nedenle, MMP inhibitörleri kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde potansiyel bir terapötik yaklaşım olarak öne sürülmektedir (108, 135-139).

5.1. Sol Ventrikülde Basınç Yüklenmesi Olan Doğumsal Kalp Hastalıklarında Matriks Metalloproteinazlar ve Doku İnhibitörleri

Ventrikül ard yükünün artırılması miyozit boyutu ve dizilimindeki belirgin değişikliklerle birlikte ve zaman içerisinde ventrikül geometrisi ve fonksiyonunun değişimi ile sonuçlanacaktır. Yaygın olarak “ventriküler yeniden şekillenme” diye tanımlanan bu yapısal değişiklikler esas olarak ekstraselüler kollajen matriksin kompozisyonundaki değişikliklere bağlıdır. Miyokardiyal kollajen ile temas halinde bulunan bu ekstraselüler destek sistemindeki değişiklikler, MMP'lerin ekspresyonları ve aktiviteleri ile onların doğal inhibitörleri arasındaki dengenin değişmesi ile başlatılır. Artmış MMP aktivitesi, kollajen, fibronektin ve laminin gibi birçok ana ESM bileşenlerinin yıkımında artış ile sonuçlanır; bu da destek yapısının daha da zayıflaması sonucunda ventrikül dilatasyonu ve sol ventrikül fonksiyonunda bozulmaya yol açar. Geniş serileri kapsayan hayvan modellerinde yapılan ilk

çalışmalar sol ventrikül yeniden şekillenmesinde MMP'lerin rolü olduğunu göstermesine rağmen, in vitro zimografik ölçümler MMP artışı ile doğrudan bir korelasyonun ve sorumlu MMP türlerinin belirlenmesine olanak sağlamamıştır (140).

Nagatomo ve ark. (13) köpeklerde aort darlığı ile oluşturulan akut (6 saat) ve uzamış (10 gün) basınç yüklenmesinden sonra sol ventrikül MMP aktivitesini ve TIMP miktarını değerlendirmişlerdir. Hem akut, hem de kronik basınç yüklenmesinde total MMP zimografik aktivitesi kontrol grubundakinden farklı bulunmamıştır. MMP-9 miktarı değişmemesine rağmen MMP-9 aktivitesinin, basınç yüklenmesinin 6. saatinden sonra 3 kattan fazla arttığı, fakat 10. günden sonra normale döndüğü gözlenmiştir. Uzamış basınç yüklenmesi grubunda MMP-1 ve MMP-2 miktarları kontrol grubuna göre önemli derecede azalırken MMP-3 miktarı artmıştır. Yazarlar MMP miktarlarındaki bu azalmaların, onların aktivasyonu ve daha sonra da yıkımına bağlı olabileceği hipotezini öne sürmüşlerdir. Endojen MMP inhibitör miktarında ise değişiklik olmamıştır.

Tozzi ve ark. (9) torasik inen aortaya *banding* yaparak sol ventrikülde basınç yüklenmesi oluşturdukları Guinea domuzlarında yaptıkları çalışmada basınç yüklenmesinin kompanze fazında artmış MMP-2 aktivasyonu ve yoğun interstisyel yıkımın görüldüğünü, kalp yetersizliğinin klinik bulguları ortaya çıktıktan sonra ise tersine, TIMP-2 konsantrasyonunda artışla birlikte MMP aktivitesinin azaldığını ve kollajen depolanmasının arttığını saptamışlardır. Kompanze sol ventrikül hipertrofisi fazında görülen yoğun interstisyel yıkımın, fibrozis ve diyastolik disfonksiyon gelişimine karşı koymada rol oynadığı, kalp yetersizliğinin geliştiği hastalığın geç döneminde ise artmış TIMP konsantrasyonunun MMP aktivitesini düşürdüğü ve interstisyel fibrozis artışı, ilerleyici diyastolik disfonksiyon ve sol ventrikül dilatasyonuna yol açtığı ifade edilmiştir. Yazarlar, kompanze fazda ESM komponentlerinin yıkımında rol oynayan MMP aktivitesinde artışın, kalp yetersizliğine dönüşümün meydana geldiği dönemde ortaya çıkan miyozit kayması sürecini ve ventrikül dilatasyonunu kolaylaştırdığı şeklinde spekülasyonda bulunmuşlardır.

Takimoto ve ark. (12) ise vahşi tip farelerde transvers aortik konstriksiyona bağlı 3-9 haftalık basınç yüklenmesinin bir sonucu olarak sol ventrikül dilatasyonu ile birlikte miyokardiyal MMP-2 ve MMP-9 aktivitelerinin önemli düzeyde arttığını

bildirmişlerdir. Heymans ve ark. (141) çalışmalarında MMP aktivitesini değerlendirmemekle birlikte, TIMP-1 gen transferi yapılan farelerde vahşi tip farelerin aksine transvers aortik konstriksiyonun 7. haftasında kardiyomiyozit hipertrofinin orta derecede olduğunu, fibrozis veya dilatasyon olmadığını ve sistolik fonksiyonun korunduğunu saptamışlardır. MMP-9'dan yoksun farelerde de önemli derecede fibrozis ve kardiyomiyozit hipertrofisine rağmen normal sistolik fonksiyonların bulunduğunu ve dilatasyonun olmadığını bildirmişlerdir.

Peterson ve ark. (108) spontan hipertansif kalp yetersizliği olan ratlarda 9-13. aylarda MMP aktivitesinde önemli yükselmeler olduğunu bildirmişlerdir. Bu süre içerisinde konjestif kalp yetersizliğinin klinik bulguları ortaya çıkmakta, kalp fonksiyonları baskılanarak belirgin olarak genişlemekte ve kompliyansı anormal derecede artmaktadır. Bu çalışmada, 9. ayda başlanan geniş spektrumlu bir MMP inhibitörü ile tedavinin, dekompanze duruma dönüşümü tam olarak önlediği bildirilmiştir. Sakata ve ark. (5) tuza duyarlı ratlarda basınç yüklenmesi ve kalp yetersizliği modelinde benzer gözlemler edinmişlerdir. Araştırmacılar, 23. haftada MMP-2 ve MMP-9 jelatinaz aktivitesinde artış olduğunu rapor etmişlerdir. MMP aktivitesindeki bu artış, 26. haftada meydana gelen sol ventrikül dilatasyonu ve kalp yetersizliğinin başlangıcına öncülük etmiştir. Ancak burada görülen artmış zimografik sonuçlar MMP-2 ve MMP-9'un zimojen veya inaktif formları ile uyumlu olduğundan dolayı bu sonuçlar dikkatle irdelenmelidir. Aktif MMP-2 ve MMP-9 bantlarına ait sonuçlar verilmemiştir. Ayrıca 23-26. haftalar arasında kollajen sentezinin kollajen yıkımını aştığını gösterecek şekilde 26. haftada fibrozis miktarında önemli artış saptanmıştır.

Görüldüğü gibi Takimoto ve ark. (12), Peterson ve ark. (108) ve Sakata ve ark. nın (5) çalışmalarında basınç yüklenmesinin geç döneminde MMP aktivitelerinde artış bildirilirken Tozzi ve ark. nın (9) çalışmasında erken dönemde MMP-2 aktivitesinde artış olmasına karşın geç dönemde MMP aktivitesinde azalma ve TIMP-2 aktivitesinde artış olduğu rapor edilmiştir. Nagatomo ve ark. nın (13) çalışmasında ise erken dönemde MMP-9 aktivitesinin arttığı, geç dönemde normale döndüğü, MMP-1 ve MMP-2 miktarlarının ise uzamış basınç yüklenmesi durumunda azalmış olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızdaki aort darlığı ve aort koarktasyonu olgularında ise sol ventrikülde uzun süreli bir basınç yüklenmesi söz konusu olup, bu

hastalarda Takimoto ve ark. (12), Peterson ve ark. (108) ve Sakata ve ark. nın (5) çalışmasının aksine, Tozzi ve ark. (9) ve Nagatomo ve ark. nın (13) çalışmaları ile benzer şekilde MMP-2 ve MMP-9 düzeylerinde sağlıklı kontrol grubuna göre azalma saptanmıştır. TIMP-1 ve TIMP-2 düzeylerinde ise Tozzi ve ark. nın (9) çalışmasının aksine kontrol grubuna göre azalma olduğu gözlenmiştir. Ancak gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli değildir.

Bazı araştırmacılar aort kapak replasmanı cerrahisi yapılan basınç yüklenmesi olan insan kalplerinde MMP protein ve aktivite düzeylerini ve TIMP protein düzeylerini değerlendirmişlerdir. Polyakova ve ark. (14) izole aort kapak darlığı nedeniyle basınç yüklenmesi olan insan kalplerinde artmış MMP (MMP-1, -3, -9, -13 ve -14) aktivitesini göstermişlerdir. MMP-2 zimografik aktivitesi, cerrahi öncesi EF >%50, %30-%50 ve <%30 olan hasta gruplarında kontrol grubundan sırasıyla 1,2 kat, 1,5 kat ve 1,6 kat fazla bulunmuştur. TIMP-1 ve TIMP-2 düzeyleri kontrol grubundan yüksek bulunurken TIMP-4 düzeyi düşük bulunmuştur. Fielitz ve ark. da (127) basınç yüklenmesi olan benzer bir hasta grubunda benzer şekilde MMP-2 ve MMP-3 artışı olduğunu saptamışlardır. Ancak Fielitz ve ark. (127), Polyakova ve ark. dan (14) farklı olarak aort darlığı olan hastalarda kontrol grubuna göre MMP-1, MMP-9 ve TIMP-1 düzeylerinin azaldığını, TIMP-4 düzeylerinin ise arttığını bildirmişlerdir. Heymans ve ark. (10) ise aort kapak replasmanı yapılan izole aort darlığı olan 36 hastayı ve sol ventrikül hipertrofisi olmayan koroner arter by-pass cerrahisi uygulanan 29 kontrol olgusunu kapsayan çalışmalarında, aort darlığı olgularında kollajen depolanmasının kontrol olgularından daha fazla olduğunu ve bunun ciddi diyastolik disfonksiyonu olan aort darlığı olgularında daha belirgin olduğunu saptamışlardır. Yazarlar, aort darlığı olgularında kardiyak TIMP-1 ve TIMP-2 mRNA ekspresyonlarının ve TIMP-1/MMP-2, TIMP-2/MMP-2 ve TIMP-2/MMP-9 oranlarının kontrollere göre önemli derecede artmış olduğunu, MMP-1, MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonları açısından ise gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadığını, MMP-2 ve MMP-9 zimografik aktivitesinin ise azaldığını bildirmişlerdir. Aort darlığı olan hastalarda kardiyak TIMP-1 ve TIMP-2 ekspresyonlarının interstisyel fibrozisin derecesi ile ilişkili olduğunu ve diyastolik disfonksiyon ile orantılı olduğunu saptamışlardır. Aort darlığı hastalarında görülen miyokardiyal kollajen fazlalığının, sol ventrikül biyopsilerinde kontrollere göre

kollajen sentezinde görevli olan enzimlerin ve kollajen düzeylerinin artması ve azalmış MMP aktivitesi ile işaret edildiği gibi, kollajen yıkımı ile kollajen sentezi arasındaki dengenin kollajen sentezi lehine bozulmasının sonucu olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Düşük konsantrasyonda TIMP-2, MMP-2 için reseptör olarak rol oynar ve böylece MT1-MMP tarafından proMMP-2'nin aktivasyonunu artırır; yüksek konsantrasyonda ise MT1-MMP'yi nötralize eder ve MMP-2 aktivasyonunu önler (10). Yani, MMP-2'nin yüksek düzeylerdeki TIMP-2 tarafından inhibisyonu, interstisyel fibrozisi kolaylaştırıyor olabilir.

Kaden ve ark. (15) aort kapak replasmanı yapılan kalsifik aort darlığı bulunan 19 hastanın ve kontrol grubu olarak aort kapak hastalığı bulunmayan 8 otopsi olgusunun kapak dokularında çalışmışlar ve stenotik kapaklarda lökosit infiltrasyonu ve aynı bölgelerde güçlü TNF- α ve MMP-1 ekspresyonu bulunduğunu, TIMP-1 ekspresyonu yönünden ise kontrollere göre değişiklik bulunmadığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, TNF- α sekresyonu tarafından aktive edilen lökositlerin valvüler miyofibroblastları, prolifer olmaları ve MMP'leri salgılamak üzere uyardıklarını ve böylece kalsifik aort darlığında görülen matriks yeniden şekillenmesini aktif olarak regüle ettiklerini düşünmüşlerdir. TIMP-1'de artış olmaksızın MMP-1'de artış görülmesinin MMP-1 aktivitesinde artış olduğunu düşündüğünü belirtmişlerdir.

Satta ve ark. nın (16) benzer çalışmasında kalsifik aort kapaklarında MMP-9 mRNA ekspresyonunun ve aktivasyonunun artmış olduğu, MMP-2 mRNA üretiminin ise nadir olduğu, fakat proMMP-2 proteininin tüm kapaklarda belirlendiği bildirilmiştir. Stenotik kapaklarda *revers* zimografide sadece soluk bir TIMP-1 bandı görülmüş, TIMP-2 bandı ise görülmemiştir. Yani, aort darlığında MMP'lerle doku inhibitörlerinin regülasyonunun resiprokal olduğu görülmüştür. Yazarlar, aort stenozunun gelişiminde, MMP-9 ve doku inhibitörleri arasındaki orantısızlığın, persistan bir MMP aktivasyonuna neden olarak valvüler yeniden şekillenme sürecine katkıda bulunabileceği sonucuna varmışlardır.

Fondard ve ark. da (142) aort darlığı (n=49) ve aort yetersizliği (n=23) olan hastaların ve kontrol grubunun (n=8) kapak dokularında histolojik analiz ve biyokimyasal MMP ve TIMP analizi yapmışlardır. Esas olarak aort darlığı olan kapaklarda gözlenen kalsifikasyon, inflamatuvar hücreler ve yeni kapiller oluşumu

gibi doku anormalliklerinin, aort yetersizliği olan kapak dokularında daha hafif olduğu veya bulunmadığı gözlenmiştir. Oysa heriki kapak patolojisini gösteren grupta ESM yeniden şekillenmesine ait benzer histolojik bulgular görülmüştür. Satta ve ark. nın (16) bulgularını destekler şekilde MMP-2 aktivitesi yönünden patolojik kapaklar ile kontrol grubu kapakları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Patolojik kapaklarda görülen MMP-9 ve MMP-3 artışı bu kapaklarda gözlenen inflamatuvar durumu desteklemekteydi. MMP-9 aktivitesi, aort darlığı olan kapaklarda aort yetersizliği olan kapaklara göre daha fazla artmıştı ve aort darlığı olan kapaklarda aort yetersizliği olan kapaklara göre daha yüksek derecede inflamasyon mevcut olduğunu desteklemekteydi. Aort stenozu ve yetersizliği olan kapaklarda TIMP-1, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede artmıştı, TIMP-2 yönünden ise anlamlı bir fark görülmemişti. TIMP-1’de gözlenen artış ise Kaden ve ark. nın (15) sonuçları ile çelişmekteydi.

Görüldüğü gibi basınç yüklenmesi durumlarında kardiyak dokuda MMP ve TIMP ekspresyonunun ya da aktivitesinin çalışıldığı hem insan, hem de deneysel hayvan çalışmaları, basınç yüklenmesi olan kalpte kompanze durumdan dekompanze duruma geçişten sorumlu olan ventriküler yeniden şekillenme sürecinde açıkça MMP’lerin ve doku inhibitörlerinin tutulumuna işaret etmektedir, ancak çeşitli çalışmalarda çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Bu farklılıkların sebepleri açık olmamakla birlikte metodoloji, ilaç tedavisi ya da doku örnekleme yerinin lokalizasyonu ile ilişkili olabilir. Ancak insanlardaki çalışmaların tümünde, dejeneratif valvüler hastalığı olan ileri yaşılarıdaki hastalarda çalışılmıştır. Yaptığımız literatür araştırmasında doğumsal kalp hastalıklarına bağlı sol ventrikülde basınç yüklenmesi olan hastalarda sol ventrikül yeniden şekillenmesinde önemli rolleri olan MMP ve TIMP düzeylerinin çalışıldığı herhangi bir çalışmaya ise rastlayamadık. Bizim çalışmamızda sol ventrikülde basınç yüklenmesi olan DKH’da Heymans ve ark. (10), Satta ve ark. (16) ve Fondard ve ark. nın (142) çalışmalarını destekler şekilde MMP-2 düzeylerinde kontrol grubuna göre bir miktar azalma gözlenmekle birlikte bu azalma istatistiksel açıdan önemli değildir. Bu bulgumuz Polyakova ve ark. (14) ve Fielitz ve ark. nın (127) çalışmaları ile ise çelişmektedir. Hastalarımızda MMP-9 düzeylerinin kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber düşük bulunması, Fielitz ve ark. nın (127) ve Heymans ve ark. nın (10)

çalışmaları ile aynı doğrultuda olup, Polyakova ve ark. (14), Satta ve ark. (16) ve Fondard ve ark. nın (142) sonuçları ile ise ters yöndedir. Çalışmamızda TIMP-1 düzeyleri kontrol grubundan düşük bulunmakla birlikte aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir. Bu bulgumuz da TIMP-1 düzeylerinin kontrol grubundan farksız ya da düşük bulunduğu Fielitz ve ark. (127), Kaden ve ark. (15) ve Satta ve ark. nın (16) çalışmalarını desteklemekte olup, TIMP-1 düzeylerinin yüksek bulunduğu Polyakova ve ark. (14), Heymans ve ark. (10) ve Fondard ve ark. nın (142) sonuçları ile ise çelişmektedir. Hastalarımızda TIMP-2 düzeyleri de kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte düşük bulunmuştur. Bu bulgumuz da TIMP-2 ekspresyonunun görülmediği Satta ve ark. nın (16) ve TIMP-2 aktivitesi yönünden kontrol grubu ile anlamlı bir fark gözlenmeyen Fondard ve ark. nın (142) çalışmaları ile aynı doğrultudadır; TIMP-2 mRNA ekspresyonunun ya da protein düzeyinin kontrol grubundan yüksek olduğunu belirten Heymans ve ark. nın (10) ve Polyakova ve ark. nın (14) sonuçları ile ise çelişmektedir. Ayrıca Heymans ve ark. da (10) bizim çalışmamızdaki gibi MMP/TIMP oranlarını da değerlendirmişlerdir. MMP-2/TIMP-1 oranlarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa bile azalma bulmamız Heymans ve ark. nın (10) çalışmasını destekler niteliktedir, MMP-2/TIMP-2 oranında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış bulmamız, MMP-9/TIMP-2 oranında ise kontrol grubuna göre anlamlı bir fark bulmamamız ise bu oranlarda da azalma bulan Heymans ve ark. nın (10) sonuçları ile çelişmektedir.

Liu ve ark. (143) dejeneratif aort darlığı olan ileri yaşlardaki 30 hastada serum MMP-9, MMP-3 ve TIMP-1 düzeylerinin kontrol grubundan yüksek bulunduğunu ve invazif olarak ölçülen *pulse wave velosite* (PWV) değerleri ile korelasyon gösterdiklerini bildirmişlerdir. Yazarlar ayrıca aort darlığı hastalarında artmış PWV ile 2-boyutlu EKO ile belirlenen aort kapağının kalsifikasyon skorlaması arasında da bir birliktelik olduğunu saptamışlar ve sonuç olarak, dejeneratif süreç boyunca kalsiyum depolanmasının, sadece aort kapakta değil, aortada da yeniden şekillenme oluşturmada önemli bir rol oynadığını öne sürmüşlerdir. Bu çalışmadaki hastalarda artmış PWV, diabetes mellitus ve sistemik hipertansiyonun varlığının, ciddi aort darlığı gelişimi için bağımsız risk faktörleri olduğu belirlenmiştir. Bizim çalışmamızdaki gibi MMP ve TIMP düzeylerinin

serumda çalışıldığı tek çalışma, Liu ve ark. nın (143) çalışmasıdır. Bu çalışmada dejeneratif aort darlığı olan hastalarda, bizim aort darlığı ve aort koarktasyonu hastalarından oluşan sol ventrikülde basınç yüklenmesi grubumuzdakinin aksine serum MMP-9 ve TIMP-1 düzeyleri kontrol grubundan yüksek bulunmuştur.

Bilindiği üzere romatizmal olmayan kalsifik aort darlığı, kapak yaprakçıklarının masif fibröz kalınlaşması ve yoğun fokal kalsifikasyon ile karakterizedir ve kalsifik aort kapaklarında kronik inflamasyonun bulunduğu daha önce gösterilmiştir (15). Liu ve ark. nın (143) çalışmasında da belirtildiği gibi dejeneratif aort darlığı olan yaşlı hastalarda ileri derecede ateroskleroz da mevcuttur. Ayrıca olguların çoğunda MMP ve TIMP düzeylerini etkileyebilecek hipertansiyon ve diabetes mellitus gibi hastalıklar da eşlik etmektedir. Bu nedenle bu çalışmalarda MMP ve TIMP düzeylerinde ya da doku ekspresyonunda görülen değişikliklerin yalnızca aort darlığının meydana getirdiği ventriküler ya da kapak dokusundaki yeniden şekillenme ile ilişkili olduğu düşünülemez. Bizim çalışmamızda ise hastalarımızın pediatrik yaş grubunda olmasından dolayı aort darlığı olgularımızın hiçbirinde bu tür hastalıklar mevcut değildi. Polyakova ve ark. nın (14) çalışmasında aort darlığı olan hastaların kalplerinde MMP ve TIMP artışı saptanan bölgeler, fibrozis olan bölgelerle uyumlu idi. Kompanze hipertrofi görülen grupta belirgin artış gösteren TIMP-2 ve artma eğiliminde olan TIMP-1, yetersizlikte olan kalplerde en yüksek düzeylerde idi. Fibrotik değişikliklerin derecesi de MMP'ler, TIMP-1 ve TIMP-2'deki artış ile ve TIMP-4'teki azalma ile korelasyon göstermekteydi. Bu bulgular, bu enzimlerin ESM yeniden şekillenmesine ve klinik olarak kalp yetersizliğinin gelişimine katkıda bulunduğunu göstermektedir. Hipertrofinin farklı derecelerinde TIMP-1 ve TIMP-2 artışına rağmen MMP'lerde de artış görülmesi inhibitör mekanizmalarda bir yetersizlik olduğunu düşündürmüştür. Ayrıca araştırmacılar aort darlığı hastalarının miyokardında MMP'lerin ve TIMP'lerin ana hücrel kaynağının fibroblastlar olduğunu göstermişlerdir.

Soini ve ark. (11), endokarditli ve degeneratif valvüler hastalığı olan, cerrahi olarak çıkarılmış hastalıklı mitral ve aort kapaklarında MMP'lerin mRNA'larını araştırmışlar ve MMP-2 mRNA'sının özellikle endokarditte, fakat bazen de dejeneratif valvüler hastalıkta sentezlendiğini, MMP-9 mRNA'sı sentezinin ise heriki durumda belirlendiğini saptamışlardır. Yazarlar, TIMP-2 mRNA ekspresyonunun

sadece üç endokarditli olguda bulunmasına karşın, TIMP-1 mRNA ekspresyonunun hem endokarditli hem de dejeneratif valvüler hastalıklı kapaklarda sıklıkla bulunduğunu bildirmişlerdir. Bilindiği gibi dejeneratif valvüler kalp hastalığı dejenerasyon, fibrozis ve kalsifikasyon ile karakterize ve kapaklarda darlık ve/veya yetersizliğe yol açan heterojen etiyojiye sahip bir hastalık grubudur (144). Endokardit ise kapaklarda rüptür, deformasyon veya kalsifikasyon gibi ciddi kardiyovasküler komplikasyonlara yol açabilen bir durumdur. Valvüler hastalıkların klinik ve histopatolojik bulguları, matriks yıkımının ve yeniden şekillenmesinin önemli rolü olduğunu düşündürmektedir (11).

Peterson ve ark. nın (108) yaptıkları çalışmada spontan hipertansif kalp yetersizliği ratlarının MMP inhibitörü PD 166793 ile tedavisi, kontrollere göre kardiyak dilatasyonu önlemiş, kontraktileti korumuş ve miyokardiyal fibrozisi azaltmıştır. Bu bulgular, MMP inhibisyonunun kardiyak yeniden şekillenmeyi sınırlandırarak kalp yetersizliğine gidişi yavaşlatmak suretiyle faydalı etkileri olduğunu düşündürmektedir. Rhode ve ark. (138) ise aksine CP-471,474 ile MMP inhibisyonunun deneysel miyokard infarktüsü oluşturulan farelerde erken ventriküler dilatasyonda değişken bir azalmaya yol açtığını bildirmişlerdir. Bu çalışmalardaki çelişkili sonuçlardan sorumlu olan bir faktör, kullanılan hayvan modellerinde doğal olarak bulunan miyokardiyal hasar ve disfonksiyonun farklı derecelerde olması olabilir. Ancak tüm bu çalışmalar göz önüne alındığında MMP inhibisyonunun istenmeyen miyokardiyal yeniden şekillenmeyi sınırlamada önemli bir potansiyele sahip olduğu düşünülebilir.

5.2. Sağ Ventrikülde Basınç Yüklenmesi Olan Doğumsal Kalp Hastalıklarında Matriks Metalloproteinazlar ve Doku İnhibitörleri

Gerek hayvan modelleri oluşturularak, gerekse dejeneratif aort darlığı olan insanlarda yapılan birçok çalışmada, sol ventrikül basınç yüklenmesine bağlı olarak meydana gelen sol ventrikül yeniden şekillenmesi ve MMP'ler ve TIMP'lerde görülen değişiklikler araştırılmasına rağmen yaptığımız literatür taramasında sağ ventrikülde basınç yüklenmesine bağlı gelişebilecek sağ ventrikül yeniden şekillenmesini ve bu süreçte MMP ve TIMP'lerin rolünü araştıran herhangi bir çalışmaya rastlayamadık. Doğrudan bu konu ile ilgili olmayan ancak TIMP-1 mRNA düzeylerinin çalışıldığı tek çalışmada Schäfer ve ark. (17) fosfodiesteraz 5 (PDE5)

inhibitörü sildenafil'in pulmoner hipertansiyon tedavisindeki etki mekanizmasını araştırmak amacıyla monocrotaline verilerek pulmoner hipertansiyon oluşturulmak suretiyle ya da cerrahi olarak pulmoner arteriyel *banding* uygulanarak sağ ventrikül basıncı yüklenmesi oluşturdukları ratlarda çalışmışlardır. Her iki grupta sağ ventrikül sistolik basıncının arttığını, hipertrofi ve fibrozis ile ilgili belirteçlerin artmasınan yanı sıra sağ ventrikülde TIMP-1 mRNA ekspresyonunun da arttığını saptamışlardır. Daha sonra bu iki gruptaki ratlara sildenafil tedavisi vermişler ve monocrotaline ile pulmoner hipertansiyon oluşturulan grupta sildenafil'in pulmoner basıncı düşürdüğünü, sağ ventrikül hipertrofisini azalttığını ve fibrozis belirteçlerinin artmasınan önlediğini, buna karşın pulmoner arteriyel *banding* yapılan grupta sildenafil'in sağ ventrikül fonksiyonel parametrelerini ve sağ ventrikül hipertrofisini etkilemediğini, tersine miyokardiyal yeniden şekillenme belirteçlerini ve sağ ventriküler miyozit çapını arttırdığını saptamışlardır. Çalışmalarının sonucunda sildenafil'in pulmoner hipertansiyonda sağ ventrikül yeniden şekillenmesini önleyici etkisini, sağ ventrikül üzerindeki basıncı yükünü kaldırmak suretiyle önlediğini, basıncı yüklenmesi sabit kaldığı sürece yeniden şekillenmeye doğrudan düzeltici bir etkisinin olmadığını göstermişlerdir. Bu çalışmada bizim çalıştığımız parametrelerden yalnızca TIMP-1 çalışılmış olduğu için sağ ventrikül basıncı yüklenmesi durumunda MMP/TIMP dengesinde ne gibi değişikliklerin olduğu konusunda yorum yapmak pek mümkün görünmemektedir.

Literatürde sağ ventrikülde basıncı yüklenmesine neden olan DKH'da MMP ve TIMP düzeyleri ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlayamadık. Bizim çalışmamızda Schäfer ve ark. nın (17) çalışmasında pulmoner artere band konularak sağ ventrikülde basıncı yüklenmesi oluşturulan ratlarda görülen TIMP-1 artışına ters düşecek şekilde, pulmoner darlığa bağlı sağ ventrikülde basıncı yüklenmesi olan hastalarımızda serum TIMP-1 düzeylerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte azalma mevcuttu.

5.3. Matriks Metalloproteinazlar ve Doku İnhibitörlerinin Serum Düzeyleri ile Ekokardiyografik ve Hemodinamik Parametrelerin Korelasyonları

Sol ventrikülde basıncı yüklenmesi olan hastalarda MMP-9 düzeylerinin LV sistolik kitlesi değerleri ile pozitif korelasyon göstermesi dikkat çekiciydi. Ayrıca MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri doku Doppler ile ölçülen sağ ventrikül İKZ ve TIMP-2

düzeyleri doku Doppler ile ölçülen sağ ventrikül İVRZ gibi sağ ventrikül zaman intervalleri ile negatif korelasyon göstermekteydi. Daha önce yapılan bazı çalışmalarda hipertrofik kardiyomiyopati hastalarda yalnızca sol ventrikül fonksiyonlarında değil, sağ ventrikülün de sistolik ve diyastolik fonksiyonlarında ekokardiyografik olarak tespit edilen bozukluk olduğu ve sağ ventrikül İKZ ve İVRZ ölçümlerinde uzama olduğu bildirilmiştir (145, 146). Bizim çalışmamızda saptanan bu negatif korelasyonlar, sol ventrikülde basınç yüklenmesi olan hastalarda da hipertrofik kardiyomiyopati hastalardakine benzer şekilde sol ventrikül fonksiyon bozukluğuna sağ ventrikül fonksiyon bozukluğunun da eşlik ettiğini düşündürmektedir. Sol ventrikülde basınç yüklenmesi olan hastalarımızda serum MMP-2, MMP-9 ve TIMP-2 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte kontrol grubuna göre azalma olduğu dikkate alınır, belirlenen negatif korelasyonlar, sağ ventrikülde fonksiyon bozukluğu geliştikçe MMP-2, MMP-9 ve TIMP-2 düzeylerinin azaldığını göstermekteydi.

Sol ventrikülde basınç yüklenmesi olan hastalarda MMP-9 düzeylerinin aorta diyastolik ve ortalama basınçları ile pozitif korelasyon göstermesi de, bu grupta serum MMP-9 düzeylerinin kontrol grubuna göre düşük bulunduğu dikkate alındığında, aorta basıncı düştükçe, yani darlık derecesi arttıkça MMP-9'daki düşmenin arttığı anlamını taşıyabilir.

Sağ ventrikülde basınç yüklenmesi olan hastalarda ise MMP-2 düzeyleri doku Doppler ile ölçülen sağ ventrikül İKZ değerleri ile pozitif korelasyon göstermekteydi. Bu grupta MMP-2 düzeylerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu göz önüne alındığında sağ ventrikül İKZ uzadıkça, yani sağ ventrikül fonksiyon bozukluğu arttıkça MMP-2 düzeyinin de artacağı şeklinde yorumlanabilir.

5.4. Matriks Metalloproteinazlar ve Doku İnhibitörleri ile İlgili Gelecekteki Tedavi Yaklaşımları

“Geniş spektrumlu” olarak adlandırılan selektif olmayan MMP inhibitörleri geliştirilmiş ve doku düzeyinde MMP inhibisyonunu sağladıkları gösterilmiştir. Bu şekilde MMP aktivitesinin düzenlenmesi sol ventrikül yeniden şekillenmesinin ve konjestif kalp yetersizliğinin tedavisinde gelecek için bir terapötik hedef oluşturmaktadır. Ancak geniş spektrumlu MMP inhibitörlerinin kullanımı bazı problemleri beraberinde getirmektedir. Birincisi, tüm MMP türlerinin uzun süreli

olarak inhibisyonu normal doku yeniden şekillenmesini ve ekstraselüler protein döngüsünü de önleyecektir. İkincisi, tümör metastazı olan hastalarda geniş spektrumlu MMP inhibitörleri ile ilk klinik deneyimler, istenmeyen bazı sistemik yan etkilerinin olduğunu göstermiştir (42). Gelişmekte olan konjestif kalp yetersizliğindeki patolojik miyokardiyal yeniden şekillenmeye katkısı olan belirli MMP türlerini hedef alan selektif inhibitörler, gelecek için daha önemli bir terapötik hedefi oluşturmaktadır. Ayrıca çeşitli klinik tabloların farklı dönemlerinde MMP düzeylerinin ve aktivasyonunun farklılıklar gösterebilmesinden dolayı miyokardiyal ESM'yi modüle etmeyi hedefleyen tedavi stratejileri hastalığa ve hastalığın dönemine özgül olmalıdır.

Genetik olarak modifiye edilen farelerden elde edilen gözlem sonuçları, kardiyovasküler hastalığı olan hastaların kullanımına nasıl aktarılacaktır? Bunu sağlayacak yaklaşımlardan biri, MMP-TIMP ailesinin özgül komponentlerinin kalbe veya hasarlı damar bölgesine, doğrudan intrakoronar veya intramiyokardiyal enjeksiyonlar veya “*gen-eluting stent*” teknolojisi kullanılarak gen transferinin sağlanması ve bazal koşullarda ve kan damarlarında bölgesel hasar veya kalbe basınç ve volüm yüklenmesi gibi ilgili stres durumlarında gelişen fenotipik değişiklikleri incelemek olacaktır.

Gittikçe sayıları artan MMP'lerin substrat özgüllüklerinin ve inhibitörlerinin daha iyi anlaşılması faydalı olacaktır. MMP ve TIMP'lerin kardiyovasküler hastalıklardaki patofizyolojik rollerinin daha iyi bilinmesi, kalp-damar hastalıklarının önlenmesine ve istenmeyen miyokardiyal yeniden şekillenmesinin sınırlandırılmasına yönelik en uygun tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesini kolaylaştıracaktır.

Özetle; literatürde ilk kez sol ventrikülde ve sağ ventrikülde basınç yüklenmesine neden olan DKH'da MMP ve TIMP'lerde meydana gelen değişiklikleri araştıran çalışmamızda, sol ventrikülde basınç yüklenmesi olan hastalarda serum MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 düzeyleri ve ortalama MMP-2/TIMP-1 oranı kontrol grubundan düşük, MMP-2/TIMP-2 oranı kontrol grubundan yüksek, sağ ventrikülde basınç yüklenmesi olan hastalarda ise serum MMP-2 düzeyleri kontrol grubundan yüksek, TIMP-1, TIMP-2 düzeyleri ve ortalama MMP-

2/TIMP-1 ve MMP-9/TIMP-1 oranları kontrol grubundan düşük, MMP-2/TIMP-2 oranı kontrol grubundan yüksek bulunmakla birlikte gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi. Sonuç olarak; kalpte basınç yüklenmesine neden olan çeşitli DKH'da serum MMP ve TIMP düzeylerinde değişimler olduğu gözlenmiş, dolayısıyla bu hastalıklarda görülen kardiyak yeniden şekillenmede MMP ve TIMP'lerin rolü olduğu düşünülmüştür, ancak bu değişikliklerin çoğunluğu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu nedenle, sonuçlarımızın daha geniş kapsamlı çalışmalarla desteklenmesine gereksinim vardır. Kalpte basınç yüklenmesine yol açan DKH'da görülen miyokardiyal yeniden şekillenmede MMP sistemindeki ve MMP/TIMP dengesindeki değişikliklerin daha iyi anlaşılması bu hastalıkların izlem ve tedavisinde yeni hedeflerin ve stratejilerin geliştirilmesine katkıda bulunacaktır.

6. SONUÇLAR

Çocuklarda sol ventrikülde basınç yüklenmesine neden olan aort darlığı ve aort koarktasyonu ve sağ ventrikülde basınç yüklenmesine neden olan pulmoner darlık olgularından oluşan DKH'da serum MMP-2, MMP-9, TIMP-1, ve TIMP-2 düzeylerini ve bu hastalıklarda MMP ve TIMP düzeylerinin sağ ve sol ventrikül sistolik ve diyastolik fonksiyonları ve çeşitli hemodinamik parametreler ile ilişkilerini değerlendirerek MMP'lerin ve doku inhibitörlerinin bu hastalıklarının patofizyolojisindeki rollerini araştırmayı amaçlayarak yapılan çalışmada aşağıdaki sonuçlara varıldı:

1. Serum MMP-2 düzeyleri sol ventrikülde basınç yüklenmesi olan hastalarda sağ ventrikülde basınç yüklenmesi olan hastalardan ve kontrol grubundan düşük, sağ ventrikülde basınç yüklenmesi olan hastalarda ise sol ventrikülde basınç yüklenmesi olan hastalardan ve kontrol grubundan yüksek bulunmakla birlikte gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$).

2. Serum MMP-9 düzeyleri sol ventrikülde basınç yüklenmesi olan grupta sağ ventrikülde basınç yüklenmesi olan gruptan ve kontrol grubundan düşük bulunmakla birlikte gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$).

3. Sol ventrikülde basınç yüklenmesi olan ve sağ ventrikülde basınç yüklenmesi olan gruplardaki TIMP-1 ve TIMP-2 düzeyleri kontrol grubundan düşük bulunurken sağ ventrikülde basınç yüklenmesi olan hastalardaki serum TIMP-1 ve TIMP-2 düzeyleri aynı zamanda sol ventrikülde basınç yüklenmesi olan gruptan da düşük bulundu, ancak gruplar arasındaki bu farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$).

4. Ortalama MMP-2/TIMP-1 oranı heriki çalışma grubunda kontrol grubundan düşük, heriki çalışma grubunda birbirine benzer düzeylerdeydi ($p>0,05$). Ortalama MMP-2/TIMP-2 oranı sol ventrikülde ve sağ ventrikülde basınç yüklenmesi olan gruplarda kontrol grubuna göre bir miktar yüksek idi ($p>0,05$). MMP-9/TIMP-1 oranı ortalaması sağ ventrikülde basınç yüklenmesi olan grupta sol ventrikülde basınç yüklenmesi olan gruptan ve kontrol grubundan bir miktar düşük, sol ventrikülde basınç yüklenmesi olan grupta ise kontrol grubu ile benzer

düzeylerde bulundu ($p>0,05$). MMP-9/TIMP-2 oranı yönünden ise gruplar arasında önemli bir farklılık yoktu ($p>0,05$).

5. Sol ventrikülde basınç yüklenmesine yol açan DKH grubunda MMP-2 düzeyleri ekokardiyografik parametrelerden doku Doppler yöntemi ile ölçülen sağ ventrikül İKZ ile negatif korelasyon göstermekteydi ($p<0,01$). MMP-9 düzeyleri LV sistolik kitlesi ile pozitif ($p<0,05$), doku Doppler yöntemi ile ölçülen A_m ile pozitif ($p<0,05$), E/A_m ve sağ ventrikül İKZ ile negatif (sırasıyla $p<0,05$ ve $p<0,01$) korelasyon gösteriyordu. TIMP-2 düzeyleri ise doku Doppler ile ölçülen sağ ventrikül İVRZ değerleri ile negatif korele idi ($p<0,01$). MMP-9 düzeyleri hemodinamik parametrelerden aorta diyastolik ve ortalama basınçları ile pozitif korelasyon göstermekteydi ($p<0,05$).

6. Sağ ventrikülde basınç yüklenmesine yol açan DKH grubunda MMP-2 düzeyleri ekokardiyografik parametrelerden yalnızca doku Doppler yöntemi ile ölçülen sağ ventrikül İKZ ile pozitif korelasyon göstermekteydi ($p<0,05$). TIMP-1 düzeyleri ise EF ve doku Doppler ile ölçülen E_t değerleri ile negatif, E/A_m değerleri ile pozitif korelasyon gösteriyordu ($p<0,05$). Bu grupta, çalışılan parametrelerden hiçbiri ile hemodinamik ölçümler arasında korelasyon saptanmadı.

KAYNAKLAR

1. Kuzuya M, Iguchi A. Role of matrix metalloproteinases in vascular remodelling. *J Atheroscler Thromb* 2003; 10: 275-282.
2. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92: 827-839.
3. Wallace YS, McEniery CM, Dakham Z, Pusalkar P, Maki-Petaja K, Ashby MJ, Cockcroft JR, Wilkinson IB. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 372-378.
4. Lehoux S, Lemarié CA, Esposito B, Lijnen HR, Tedgui A. Pressure-induced matrix metalloproteinase-9 contributes to early hypertensive remodelling. *Circulation* 2004; 109: 1041-1047.
5. Sakata Y, Yamamoto K, Mano T, Nishikawa N, Yoshida J, Hori M, Miwa T, Masuyama T. Activation of matrix metalloproteinases precedes left ventricular remodelling in hypertensive heart failure rats. *Circulation* 2004; 109: 2143-2149.
6. Nagatomo Y, Carabello BA, Coker ML, McDermott PJ, Nemoto S, Hamawaki M, Spinale FG. Differential effects of pressure or volume overload on myocardial MMP levels and inhibitory control. *Am J Physiol* 2000; 278: H151-H161.
7. Li H, Simon H, Bocan TMA, Peterson JT. MMP/TIMP expression in spontaneously hypertensive heart failure rats: the effect of ACE- and MMP-inhibition. *Cardiovasc Res* 2000;298-306.
8. Mujumdar VS, Tyagi SC. Temporal regulation of extracellular matrix components in transition from compensatory hypertrophy to decompensatory heart failure. *J Hypertens* 1999;17:261-270.
9. Tozzi R, Palladini G, Fallarini S, Nano R, Gatti C, Presotto C, Schiavone A, Micheletti R, Ferrari P, Fogari R, Perlini S. Matrix metalloproteinase activity is

enhanced in the compensated but not in the decompensated phase of pressure overload hypertrophy. *Am J Hypertens* 2007;20:663-669.

10. Heymans S, Schroen B, Vermeersch P, Milting H, Gao F, Kassner A, Gillijns H, Herijgers P, Flameng W, Carmeliet P, Van de Werf F, Pinto YM, Janssens S. Increased cardiac expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 is related to cardiac fibrosis and dysfunction in the chronic pressure-overloaded human heart. *Circulation* 2005;112:1136-1144.
11. Soini Y, Satta J, Maatta M, Autio-Harminen H. Expression of MMP-2, MMP-9, MT1-MMP, TIMP-1, and TIMP-2 mRNA in vascular lesions of the heart. *J Pathol* 2001; 194: 225-231.
12. Takimoto E, Champion HC, Li M, Ren S, Rodriguez ER, Tavazzi B, et al. Oxidant stress from nitric oxide synthase-3 uncoupling stimulates cardiac pathologic remodeling from chronic pressure overload. *J Clin Invest* 2005; 115: 1221-1231.
13. Nagatomo Y, Carabello BA, Coker ML, McDermott PJ, Nemoto S, Hamawaki M, Spinale FG. Differential effects of pressure or volume overload on myocardial MMP levels and inhibitory control. *Am J Physiol* 2000; 278: H151-H161.
14. Polyakova V, Hein S, Kostin S, Ziegeelhofer T, Schaper J. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in pressure overloaded human myocardium during heart failure progression. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1609-1618.
15. Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, Fischer CS, Vocke DC, Kılıç R, Sarıkoç A, Piñol R, Hagl S, Lang S, Brueckmann M, Borggrefe M. Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis. *Cardiovasc Pathol* 2005;14:80-87.
16. Satta J, Oiva J, Salo T, Eriksen H, Ohtonen P, Biancari F, Juvonen TS, Soini Y. Evidence for an altered balance between matrix metalloproteinase-9 and its inhibitors in calcific aortic stenosis. *Ann Thorac Surg* 2003;76:681-688.

17. Schäfer S, Ellinghaus P, Janssen W, Kramer F, Lustig K, Milting H, Kast R, Klein M. Chronic inhibition of phosphodiesterase 5 does not prevent pressure-overload-induced right-ventricular remodelling. *Cardiovasc Res* 2009;82:30-39.
18. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis. The good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002; 90: 251-262.
19. Brauer PR. Matrix metalloproteinase type-2 expression during early neural crest cell migration. <http://bifl1.creighton.edu/faculty/brauer.html#Cai>.
20. Spinale FG, Coker ML, Bond BR, Zellner JL. Myocardial matrix degeneration and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target. *Cardiovasc Res* 2000; 46: 225-238.
21. Stetler WG. Matrix metalloproteinases in angiogenesis; a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest* 1999; 103: 1237-1241.
22. Martignetti JA, Aqeel AA, Sewairi WA, Boumah CE, Kambouris M, Mayouf SA, Sheth KV, Eid WA, Dowling O, Harris J, Glucksman MJ, Bahabri S, Meyer BF, Desnick RJ. Mutation of matrix metalloproteinase 2 gene (MMP2) causes a multicentric osteolysis and arthritis syndrome. *Nat Genet* 2001; 28: 261-265.
23. Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest* 2002; 110: 625-632.
24. Allaire E, Hasenstab D, Kenagy RD, Starcher B, Clowes MM, Clowes AW. Prevention of aneurysm development and rupture by local overexpression of plasminogen activator inhibitor-1. *Circulation* 1998; 98: 249-255.
25. Blakenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, Meyer J, Cambien F, Tiret L; AtheroGene Investigators. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* 2003; 107: 1579-1585.
26. Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Abilleira S, Arenillas JF, Ribo M, Quintana M, Alvarez-Sabin J. Matrix metalloproteinase-9 pretreatment levels predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation* 2003; 107: 598-603.

27. Suzuki K, Enghild JJ, Morodomi T, Salvesen G, Nagase H, Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry* 1990; 29: 10261-10270.
28. Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix molecules. *J Biol Chem* 1997; 272: 2446-2451.
29. Pepper MS. Extracellular proteolysis and angiogenesis. *Thromb Haemost* 2001; 86: 346-355.
30. Sekine-Aizawa H, Iwata N, Saido TC. Matrix metalloproteinase (MMP) system in brain: identification and characterization of brain-specific MMP highly expressed in cerebellum. *Eur J Neurosci* 2001; 13: 935-948.
31. Velasco G, Cal S, Merlos-Suárez A, Ferrando AA, Alvarez S, Nakano A, Arribas J, Lopéz-Otín C. Human MT6-matrix metalloproteinase: identification, progelatinase A activation, and expression in brain tumors. *Cancer Res* 2000; 60: 877-882.
32. Pei D. Leukolysin/MMP25/MT6-MMP: a novel matrix metalloproteinase specifically expressed in the leukocyte lineage. *Cell Res* 1999; 9: 291-303.
33. Shapiro SD, Kobayashi DK, Ley TJ. Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *J Biol Chem* 1993; 268: 23824-23829.
34. Shipley JM, Wesselschmidt RL, Kobayashi DK, Ley TJ, Shapiro SD. Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93: 3942-3946.
35. Péndas AM, Knäuper V, Puente XS, Llano E, Mattei MG, Apte S, Murphy G, Lopéz-Otín C. Identification and characterization of a novel human matrix metalloproteinase with unique structural characteristics, chromosomal location, and tissue distribution. *J Biol Chem* 1997; 272: 4281-4286.
36. Kolb C, Mauch S, Peter HH, Kranwinkel U, Sedlacek R. The matrix metalloproteinase RASI-1 is expressed in synovial blood vessels of a rhotoid arthritis patient. *Immunol Lett* 1997; 57: 83-88.

37. Li W, Gibson CW, Abrams WR, Andrews DW, DenBesten PK. Reduced hydrolysis of amelogenin may result in X-linked amelogenesis imperfect. *Matrix Biol* 2001; 19: 755-760.
38. Pei D, Kang T, Qi H. Cystein array matrix metalloproteinase (CAMMP)/MMP-23 is a type II transmembrane matrix metalloproteinase regulated by a single cleavage for both secretion and activation. *J Biol Chem* 2000; 275: 33988-33997.
39. Marchenko GN, Strongin AY. MMP-28, a new human matrix metalloproteinase with an unusual cystein-switch sequence is widely expressed in tumors. *Gene* 2001; 265: 87-93.
40. Lohi J, Wilson CL, Roby JD, Parks WC. Epilysin, a new human matrix metalloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes and in response to injury. *J Biol Chem* 2001; 276: 10134-10144.
41. Saarialho-Kere U, Kerkela E, Jahkola T, Suomela S, Keski-Oja J, Lohi J. Epilysin (MMP-28) expression is associated with cell proliferation during epithelial repair. *J Invest Dermatol* 2002; 119: 14-21.
42. Spinale FG. Matrix metalloproteinases: Regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* 2002; 90: 520-530.
43. Briknarova K, Gehrman M, Bányai L, Tordai H, Patthy L, Llians M. Gelatin-binding region of human matrix metalloproteinase-2: solution structure, dynamics, and function of the COL-23 two-domain construct. *J Biol Chem* 2001; 276: 27613-27621.
44. Olson MW, Gervasi DC, Mohashery S, Fridman R. Kinetic analysis of the binding of human matrix metalloproteinase-2 and -9 to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2. *J Biol Chem* 1997; 272: 29975-29983.
45. Roeb E, Schleinkofer K, Kernebeck T, Potsch S, Jansen B, Behrmann I, Matern S, Grotzinger J. The matrix metalloproteinase 9 (mmp-9) hemopexin domain is a novel gelatin binding domain and acts an antagonist. *Biol Chem* 2002; 277: 50326-50332.

46. Van Wart HE, Birdekal-Hansen H. The cystein-switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87: 5578-5582.
47. Chen LC, Noelken ME, Nagase H. Disruption of the cystein-75 and zinc ion coordination is not sufficient to activate the precursor of human matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1). *Biochemistry* 1993; 32: 10289-10295.
48. Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, Lipton SA. S-Nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science.* 2002; 297: 1186-1190.
49. Nagase H, Enghild JJ, Suzuki K, Salvesen G. Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminophenyl) mercuric acetate. *Biochemistry* 1990; 29: 5783-5789.
50. Lijnen HR. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost* 2001; 86: 324-333.
51. Suzuki K, Kan CC, Hung W, Gehring MR, Brew K, Nagase H. Expression of human pro-matrix metalloproteinase 3 that lacks the N-terminal 34 residues in *Escherichia coli*: autoactivation and interaction with tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1). *Biol Chem* 1998; 379: 185-191.
52. Pei D, Weiss SJ. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin 3 zymogen. *Nature* 1995; 375: 244-247.
53. Holliday LS, Welgus HG, Fliszar CJ, Veith GM, Jeffrey JJ, Gluck SL. Initiation of osteoclast bone resorption by interstitial collagenase. *J Biol Chem* 1997; 272: 22053-22058.
54. Pilcher BK, Dumin JA, Sudbeck BD, Krane SM, Welgus HG, Parks WC. The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *J Cell Biol* 1997; 137: 1445-1457.
55. Lei H, Furth EE, Kalluri R, Chiou T, Tilly KI, Tilly JL, Elkon KB, Jeffrey JJ, Strauss JF III. A program of cell death and extracellular matrix degradation is

- activated in the amnion before the onset of labor. *J Clin Invest* 1996; 98: 1971-1978.
56. Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V. Induction of cell migration by matrix metalloproteinase-2 cleavage of laminin-5. *Science* 1997; 277: 225-228.
 57. Koshikawa N, Giannelli G, Cirulli V, Miyazaki K, Quaranta V. Role of cell surface metalloproteinase MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. *J Cell Biol* 2000; 148: 615-624.
 58. Krekoski CA, Neubauer D, Graham JB, Muir D. Metalloproteinase-dependent predegeneration in vitro enhances axonal regeneration within acellular peripheral nerve grafts. *J Neurosci* 2002; 22: 10408-10415.
 59. Stamenkovic I. Extracellular matrix remodeling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 2003; 200: 448-464.
 60. Will H, Atkinson SJ, Butler GS, Smith B, Murphy G. The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation: regulation by TIMP-2 and TIMP-3. *J Biol Chem* 1996; 271: 17119-17123.
 61. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002; 115: 3719-3727.
 62. Rouis M, Adamy C, Duverger N, Lesnik P, Horellou P, Moreau M, Emmanuel F, Caillaud JM, Laplaud PM, Datchet C, Chapman MJ. Adenovirus-mediated overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 reduces atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 1999; 100: 533-540.
 63. Allaire E, Forough R, Clowes M, Starcher B, Clowes AW. Local overexpression of TIMP-1 prevents aortic aneurysm degeneration and rupture in a rat model. *J Clin Invest* 1998; 102: 1413-1420.
 64. Gasson JC, Golde DW, Kaufman SE, Westbrook CA, Hewick RM, Kaufman RJ, Wong GG, Temple PA, Leary AC, Brown EL, et al. Molecular

- characterization and expression of the gene encoding human erythroid-potentiating activity. *Nature* 1985; 315: 768-771.
65. Stetler-Stevenson WG, Bersch N, Golde DW. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) has erythroid-potentiating activity. *FEBS Lett* 1992; 296: 231-234.
 66. Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E, Iwata K. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells: a possible new growth factor in serum. *FEBS Lett* 1992; 298: 29-32.
 67. Hayakawa T, Yamashita K, Ohuchi E, Shinagawa A. Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J Cell Sci* 1994; 107: 2373-2379.
 68. Zhao WQ, Li H, Yamashita K, Guo XK, Hoshino T, Yoshida S, Shinya T, Hayakawa T. Cell cycle-associated accumulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in the nuclei of human gingival fibroblasts. *J Cell Sci* 1998; 111: 1147-1153.
 69. Ritter LM, Garfield SH, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) binds to the cell surface and translocates to the nucleus of human MCF-7 breast carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257: 494-499.
 70. Barasch J, Yang J, Qiao J, Tempst P, Erdjument-Bromage H, Leung W, Oliver JA. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 stimulates mesenchymal growth and regulates epithelial branching during morphogenesis of the rat metanephros. *J Clin Invest* 1999; 103: 1299-1307.
 71. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997; 74: 111-122.
 72. Bond M, Murphy G, Bennett MR, Newby AC, Baker AH. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 induces a Fas-associated death domain-dependent type II apoptotic pathway. *J Biol Chem* 2002; 277: 13787-13795.

73. Ahonen M, Poukkula M, Baker AH, Kashiwagi M, Nagase H, Erikson JE, Kähäri VM. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 induces apoptosis in melanoma cells by stabilization of death receptors. *Oncogene* 2003; 22: 2121-2134.
74. Weber BH, Vogt G, Pruett RC, Stohr H, Felbor U. Mutations in the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) in patients with Sorby's fundus dystrophy. *Nat Genet* 1994; 8: 352-356.
75. Tabata Y, Isashiki Y, Kamimura K, Nakao K, Ohba N. A novel splice site mutation in the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene in Sorby's fundus dystrophy with unusual clinical features. *Hum Genet* 1998; 103: 179-182.
76. Qi JH, Ebrahem Q, Yeow K, Edwards DR, Fox PL, Anand-Apte B. Expression of Sorby's fundus dystrophy mutations in human retinal pigment epithelial cells reduces matrix metalloproteinase inhibition and may promote angiogenesis. *J Biol Chem* 2002; 277: 13394-13400.
77. Nataatmadja M, West M, West J, Summers K, Walker P, Nagata M, Watanabe T. Abnormal extracellular matrix protein transport associated with increased apoptosis of vascular smooth muscle cells in Marfan syndrome and bicuspid aortic valve thoracic aortic aneurysm. *Circulation* 2003; 108 (Suppl II): II-329-II-334.
78. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994; 94: 2493-2503.
79. Galis Z, Sukhova G, Libby P. Microscopic localization of active proteases by in situ zymography: detection of matrix metalloproteinase activity in vascular tissue. *FASEB J* 1995; 9: 974-980.
80. Bassiouny HS, Song RH, Hong XF, Singh A, Kocharyan H, Glagov S. Flow regulation of 72-kD collagenase IV (MMP-2) after experimental arterial injury. *Circulation* 1998; 98: 157-163.

81. Godin D, Ivan E, Johnson C, Magid R, Galis ZS. Remodeling of carotid artery is associated with increased expression of matrix metalloproteinases in mouse blood flow cessation model. *Circulation* 2000; 102: 2861-2866.
82. Abbruzzese TA, Guzman RJ, Martin RL, Yee C, Zarins CK, Dalman RL. Matrix metalloproteinase inhibition limits arterial enlargements in a rodent arteriovenous fistula model. *Surgery* 1998; 124: 328-335.
83. Chesler N, Ku D, Galis ZS. Transmural pressure induces matrix-degrading activity in porcine arteries ex vivo. *Am J Physiol* 1999; 277: H2002-H2009.
84. Southgate KM, Mehta D, Izzat MB, Newby AC, Angelini GD. Increased secretion of basement membrane-degrading metalloproteinases in pig saphenous vein into carotid artery interposition grafts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1640-1649.
85. Lafont A, Durand E, Samuel JL, Besse B, Addad F, Levy BI, Desnos M, Guerot C, Boulanger CM. Endothelial dysfunction and collagen accumulation: two independent factors for restenosis and constrictive remodeling after experimental angioplasty. *Circulation* 1999; 100: 1109-1115.
86. Tronc F, Mallat Z, Lehoux S, Wassef M, Esposito B, Tedgui A. Role of matrix metalloproteinases in blood flow-induced arterial enlargement: Interaction with NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: e120-e126.
87. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87: 840-844.
88. Schwartz SM. Perspective series. Cell adhesion in vascular biology: smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis. *J Clin Invest* 1997;99:2814-2816.
89. Cho A, Reidy MA. Matrix metalloproteinase-9 is necessary for the regulation of smooth muscle cell replication and migration after arterial injury. *Circ Res* 2002; 91: 845-851.
90. Kuzuya M, Kanda S, Sasaki T, Tamaya-Mori N, Cheng XW, Itoh T, Itohara S, Iguchi A. Deficiency of gelatinase A suppresses smooth muscle cell invasion

- and development of experimental intimal hyperplasia. *Circulation* 2003; 108: 1375-1381.
91. Amorino GP, Hoover RL. Interactions of monocytic cells with human endothelial cells stimulate monocytic metalloproteinase production. *Am J Pathol* 1998; 152: 199-207.
 92. Romanic AM, Madri JA, The induction of 72-kD gelatinase in T cells upon adhesion to endothelial cells is VCAM-1 dependent. *J Cell Biol* 1994; 125: 1165-1178.
 93. Rosenberg GA, Estrada GA, Dencoff JE. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke* 1998; 29: 2189-2195.
 94. Coats WD Jr, Whittaker P, Cheung DT, Currier JW, Han B, Faxon DP. Collagen content is significantly lower in restenotic versus nonrestenotic vessels after balloon angioplasty in the atherosclerotic rabbit model. *Circulation* 1997; 95: 1293-1300.
 95. Bendeck MP, Zempo N, Clowes AW, Galardy RE, Reidy MA. Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. *Circ Res* 1994; 75: 539-545.
 96. Bendeck MP, Irvin C, Reidy MA. Inhibition of matrix metalloproteinase activity inhibits smooth muscle cell migration but not neointimal thickening after arterial injury. *Circ Res* 1996; 78: 38-43.
 97. Zempo N, Koyama N, Kenagy RD, Lea HJ, Clowes AW. Regulation of vascular smooth muscle cell migration and proliferation in vitro and in injured rat arteries by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 28-33.
 98. Margolin L, Fishbein I, Banai S, Golomb G, Reich R, Perez LS, Gertz SD. Metalloproteinase inhibitor attenuates neointima formation and constrictive remodeling after angioplasty in rats: augmentative effect of $\alpha_v\beta_3$ receptor blockade. *Atherosclerosis* 2002; 163: 269-277.

99. Li C, Cantor WJ, Nili N, Robinson R, Fenkell L, Tran YL, Whittingham HA, Tsui W, Cheema AN, Sparkes JD, Pritzker K, Levy DE, Strauss BH. Arterial repair after stenting and the effects of GM6001, a matrix metalloproteinase inhibitor. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 1852-1858.
100. de Smet BJ, de Kleijn D, Hanemaaijer R, Verheijen JH, Robertus L, van Der Helm YJ, Borst C, Post MJ. Metalloproteinase inhibition reduces constrictive arterial remodeling after balloon angioplasty: a study in the atherosclerotic Yucatan micropig. *Circulation* 2000; 101: 2962-2967.
101. Sierevogel MJ, Pasterkamp G, Velema E, de Jaegere PP, de Smet BJ, Verheijen JH, de Kleijn DP, Borst C. Oral matrix metalloproteinase inhibition and arterial remodeling after balloon dilation: An intravascular ultrasound study in the pig. *Circulation* 2001; 103: 302-307.
102. Bendeck MP, Conte M, Zhang M, Nili N, Strauss BH, Farwell SM. Doxycycline modulates smooth muscle cell growth, migration, and matrix remodeling after arterial injury. *Am J Pathol* 2002; 160: 1089-1095.
103. George SJ, Baker AH, Angelini GD, Newby AC. Gene transfer of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 inhibits metalloproteinase activity and neointima formation in human saphenous veins. *Gene Ther* 1998; 5: 1552-1560.
104. Janicki JS, Brower GL, Gardner JD, Forman MF, Stewart Jr. JA, Murray DB, Chancey AL. Cardiac mast cell regulation of matrix metalloproteinase-related ventricular remodeling in chronic pressure or volume overload. *Cardiovasc Res* 2006; 69: 657-665.
105. Spinale FG, Coker ML, Thomas CV, Walker JD, Mukherjee R, Hebbar L. Time-dependent changes in matrix metalloproteinase activity and expression during the progression of congestive heart failure: relation to ventricular and myocyte function. *Circ Res* 1998; 82: 482-495.
106. Coker ML, Thomas CV, Clair MJ, Hendrick JW, Krombach RS, Galis ZS, Spinale FG. Myocardial matrix metalloproteinase activity and abundance with congestive heart failure. *Am J Physiol* 1998; 274: H1516-H1523.

107. Dixon IMC, Ju H, Reid NL, Scammell-La Fleur T, Werner JP, Jasmin G. Cardiac collagen remodeling in the cardiomyopathic Syrian hamster and the effect of losartan. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 1837-1850.
108. Peterson JT, Hallak H, Johnson L, Li H, O'Brien PM, Sliskovich DR, Bocan TM, Coker ML, Etoh T, Spinale FG. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates left ventricular remodeling and dysfunction in a rat model of progressive heart failure. *Circulation* 2001; 103: 2303-2309.
109. Roten L, Nemoto S, Simsic J, Coker ML, Rao V, Baicu S, Defreyte G, Soloway PJ, Zile MR, Spinale FG. Effects of gene deletion of the tissue inhibitor of the matrix metalloproteinase-type 1 (TIMP-1) on left ventricular geometry and function in mice. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32: 109-120.
110. Ovechkin AV, Tyagi N, Rodriguez WE, Hayden MR, Moshal KS, Tyagi SC. Role of matrix metalloproteinase-9 in endothelial apoptosis in chronic heart failure in mice. *J Appl Physiol* 2005; 99: 2398-2405.
111. Altieri P, Brunelli C, Garibaldi S, Nicolino A, Ubaldi S, Spallarossa P, Olivotti L, Rossettin P, Barsotti A, Ghigliotti G. Metalloproteinases 2 and 9 are increased in plasma of patients with heart failure. *Eur J Clin Invest* 2003; 33: 648-656.
112. Yan AT, Yan RT, Spinale FG, Afzal R, Gunasinghe HR, Arnold M, Demers C, McKelvie RS, Liu PP. Plasma matrix metalloproteinase-9 level is correlated with left ventricular volumes and ejection fraction in patients with heart failure. *J Cardiac Failure* 2006; 12: 514-519.
113. George J, Patal S, Wexler D, Roth A, Sheps D, Keren G. Circulating matrix metalloproteinase-2 but not matrix metalloproteinase-3, matrix metalloproteinase-9, or tissue inhibitor of metalloproteinase-1 predicts outcome in patients with congestive heart failure. *Am Heart J* 2005; 150: 484-487.
114. Yamazaki T, Lee JD, Shimizu H, Uzui H, Ueda T. Circulating matrix metalloproteinase-2 is elevated in patients with congestive heart failure. *Eur J Heart Fail* 2004; 6: 41-45.

115. Wilson EM, Gunasinghe HR, Coker ML, Sprunger P, Lee-Jackson D, Bozkurt B, Deswal A, Mann DL, Spinale FG. Plasma matrix metalloproteinase and inhibitor profiles in patients with heart failure. *J Card Fail* 2002; 8: 390-398.
116. Reinhardt D, Sigusch HH, Henße J, Tyagi SC, Körker R, Figulla HR. Cardiac remodelling in end stage heart failure: upregulation of matrix metalloproteinase (MMP) irrespective of the underlying disease, and evidence for a direct inhibitory effect of ACE inhibitors on MMP. *Heart* 2002; 88: 525-530.
117. Wang XM, Yang LX, Zhu SJ, Yang YJ, Guo CM, Qi F, Wei L, Shi YK, Wang Y, Ren L. Tumor necrosis factor alpha and myocardial matrix metalloproteinases in left ventricular remodeling. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2004; 43: 828-831 (Abstract).
118. Mizon-Gerard F, de Groote P, Lamblin N, Hermant X, Dallongeville J, Amouyel P, Bauters C, Helbecque N. Prognostic impact of matrix metalloproteinase gene polymorphisms in patients with heart failure according to the aetiology of left ventricular systolic dysfunction. *Eur Heart J* 2004; 25: 631-633.
119. Thomas CV, Coker ML, Zellner JL, Handy JR, Crumbley AJ, Spinale FG. Increased matrix metalloproteinase activity and selective upregulation in LV myocardium from patients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1998; 97: 1708-1715.
120. Li YY, Feldman AM, Sun Y, McTiernan CF. Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in the failing human heart. *Circulation* 1998; 98: 1728-1734.
121. Spinale FG, Coker ML, Heung LJ, Bond BR, Gunasinghe HR, Etoh T, Goldberg AT, Zellner JL, Crumbley AJ. A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure. *Circulation* 2000; 102: 1944-1949.
122. Kai H, Ikeda H, Yasukawa H, Kai M, Seki Y, Kuwahara F, Ueno T, Sugi K, Imaizumi T. Peripheral blood levels of matrix metalloproteinase-2 and -9 are

- elevated in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 368-372.
123. Wilson EM, Gunasinghe HR, Coker ML, Sprunger P, Lee-Jackson D, Bozkurt B, Deswal A, Mann DL, Spinale FG. Plasma matrix metalloproteinase and inhibitor profiles in patients with heart failure. *J Card Fail* 2002; 8: 390-398.
124. Squire IB, Evans J, Ng LL, Loftus IM, Thompson MM. Plasma MMP-9 and MMP-2 following acute myocardial infarction in man: correlation with echocardiographic and neurohumoral parameters of left ventricular dysfunction. *J Card Fail* 2004; 10: 328-333.
125. Li YY, Feng Y, McTiernan CF, Pei W, Moravec CS, Wang P, Rosenblum W, Kormos RL, Feldman AM. Downregulation of matrix metalloproteinases and reduction in collagen damage in the failing human heart after support with left ventricular assist devices. *Circulation* 2001; 104: 1147-1152.
126. Sundstrom J, Evans JC, Benjamin EJ, Levy D, Larson MG, Sawyer DB, Siwik DA, Colucci WS, Wilson PW, Vasan RS. Relations of plasma total TIMP-1 levels to cardiovascular risk factors and echocardiographic measures: the Framingham heart study. *Eur Heart J* 2004; 25: 1509-1516.
127. Fielitz J, Leuschner M, Zurbrugg HR, Hannack B, Pregla R, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Regulation of matrix metalloproteinases in the left ventricular myocardium of patients with aortic stenosis. *J Mol Med* 2004;82:809-820.
128. Seccia TM, Bettini E, Vulpis V, Quartaroli M, Trist DG, Gaviraghi G, Pirrelli A. Extracellular matrix gene expression in the left ventricular tissue of spontaneously hypertensive rats. *Blood Press* 1999;8:57-64.
129. Noji Y, Shimizu M, Ino H, Higashikata T, Yamaguchi M, Nohara A, Horita H, Shimizu K, Ito Y, Matsuda T, Namura M, Mabuchi H. Increased matrix metalloproteinase-2 in patients with hypertrophic cardiomyopathy with systolic dysfunction. *Circ J* 2004; 68: 355-360.
130. Gunja-Smith Z, Morales AR, Romanelli R, Woessner Jr JF. Remodeling of human myocardial collagen in idiopathic dilated cardiomyopathy-Role of

- metalloproteinases and pyridinoline cross-links. *Am J Pathol* 1996; 148: 1639-1648.
131. Reddy HK, Tjahja IE, Campbell SE, Janicki JS, Hayden MR, Tyagi SC. Expression of matrix metalloproteinase activity in idiopathic dilated cardiomyopathy: a marker of cardiac dilatation. *Mol Cell Biochem* 2004; 264: 183-191.
132. Cheung C, Luo H, Yanagawa B, Leong HS, Samarasekera D, Lai JCK, Suarez A, Zhang J, McManus BM. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in coxsackievirus-induced myocarditis. *Cardiovasc Pathol* 2006; 15: 63-74.
133. Tei C, Ling LH, Hodge DO, Bailey KR, Oh JK, Rodeheffer RJ, Tajik AJ, Seward JB. New index of combined systolic and diastolic myocardial performance: a simple and reproducible measure of cardiac function – a study in normals and dilated cardiomyopathy. *J Cardiol* 1995; 26: 357-366.
134. Mann DL, Spinale FG. Activation of matrix metalloproteinases in the failing human heart: breaking the tie that binds. *Circulation* 1998; 98: 1699-1702.
135. Spinale FG, Coker M, Krombach S, Mukherjee R, Hallak H, Houck WV, Clair MJ, Kribbs SB, Johnson LL, Peterson JT, Zile MR. Matrix metalloproteinase inhibition during the development of congestive heart failure: effects on left ventricular dimensions and function. *Circ Res* 1999; 85: 364-376.
136. Karwowski JK, Markezich A, Whitson J, Abbruzzese TA, Zarins CK, Dalman RL. Dose-dependent limitation of arterial enlargement by the matrix metalloproteinase inhibitor RS-113,456. *J Surg Res* 1999; 87: 122-129.
137. Celentano DC, Frishman WH. Matrix metalloproteinases and coronary artery disease: a novel therapeutic target. *J Clin Pharmacol* 1997; 37: 991-1000.
138. Rhode LE, Ducharme A, Arroyo LH, Aikawa M, Sukhova GH, Lopez-Anaya A, McClure KF, Mitchell PG, Libby P, Lee RT. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation* 1999; 99: 3063-3070.

139. Abbruzzese TA, Guzman RJ, Martin RL, [Yee C](#), [Zarins CK](#), [Dalman RL](#). Matrix metalloproteinase inhibition limits arterial enlargements in a rodent arteriovenous fistula model. *Surgery* 1998; 124: 328-334.
140. Janssens S, Lijnen HR. What has been learned about the cardiovascular effects of matrix metalloproteinases from Mouse models? *Cardiovasc Res* 2000;46:585-594.
141. Heymans S, Lupu F, Terclavers S, Vanwetswinkel B, Herbert JM, Baker A, Collen D, Carmeliet P, Moons L. Los sor inhibition of uPA or MMP-9 attenuates LV remodeling and dysfunction after acute pressure overload in mice. *Am J Pathol* 2005;166:15-25.
142. Fondard O, Detaint D, Iung B, Choqueux C, Adle-Biasette H, Jarraya M, Hvass U, Couetil JP, Henin D, Michel JB, Vahanian A, Jacob MP. Extracellular matrix remodelling in human aortic valve disease: the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors. *Eur Heart J* 2005;26:1333-1341.
143. Liu PY, Tsai WC, Lin CC, Hsu CH, Haung YY, Chen JH. Invasive measurements of pulse wave velocity correlate with the degree of aortic valve calcification and severity associated with matrix metalloproteinases in elderly patients with aortic valve stenosis. *Clin Sci* 2004;107:415-422.
144. Dare AJ, Veinot JP, Edwards WD, Tazelaar HD, Schaff HV. New observations on the etiology of aortic valve disease: a surgical pathologic study of 236 cases from 1990. *Hum Pathol* 1993;24:1330-1338.
145. Mörner S, Lindqvist P, Waldenström A, Kazzam E. Right ventricular dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy as evidenced by the myocardial performance index. *Int J Cardiol* 2008;124:57-63.
146. Efthimiadis GK, Parharidis GE, Karvounis HI, Gemitzis KD, Styliadis IH, Louridas GE. Doppler echocardiographic evaluation of right ventricular diastolic function in hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Echocardiography* 2002;3:143-148.