

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI ve HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI

**RESPIRATUAR DİSTRESLİ PRETERM
YENİDOĞANLARDA METALLOPROTEİNAZ-2-8-9,
DOKU PROTEİNAZ İNHİBİTÖRÜ-2 VE ENDOTELİN-1'İN
PLAZMA DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Deniz KAHRAMAN

**DANIŞMAN
Yrd.Doç.Dr. Ayşegül BÜKÜLMEZ**

AFYONKARAHİSAR 2006

TEŐEKKÜR

Tez çalıŐmalarım ve uzmanlık eğitimim sũresince, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli tez danıŐmanım Yrd.Doç.Dr. AyŐegũl Bũkũlmez hocama yardımları için teŐekkũr ederim.

Anabilim Dalı Őyeleri değerli hocalarımız Yrd.Doç.Dr. Tolga Ően ve Yrd.Doç.Dr. ReŐit Kũken'e uzmanlık sũresince katkı ve desteklerinden dolayı teŐekkũr ederim.

Biyokimya Ana Bilimdalı BaŐkanı, değerli hocamız Doç.Dr. Tũlay Kũken'e, asistan ve teknisyen arkadaŐlarıma, gũler yũzleri ve titiz çalışmaları nedeniyle teŐekkũr ederim.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	V
TABLolar.....	VII
ŞEKİLLER.....	V
II. GENEL BİLGİLER.....	3
2. EKSTRASELÜLER MATRİKS	3
2. 1. Ekstraselüler Matriks ve Akciğer Gelişimi	3
2. 2. Akciğer Gelişiminin Morfolojisi	5
2. 3. ECM'nin Havayolu Dallanmasına Olan Etkisi	7
2. 4. ECM Sürfaktan Sentezi Üzerine Etkisi.....	9
2. 5. ECM Yapımına Hücrelerin Etkisi	10
2. 6. ECM'ye Endokrin Faktörlerin Etkisi	10
2. 7. ECM'ye Parakrin ve Otokrin Etmenlerin Etkisi.....	11
2. 8. Pulmoner Hasar Sonrası Hücre - ECM Etkileşimi.....	11
2. 9. Ekstraselüler Matriksin Komponentleri.....	12
2. 9. 1. Kollajen.....	12
2. 9. 2. Elastik Fibriller	15
2. 9. 3. Fibronektin.....	15
2. 9. 4. Laminin	16
2. 9. 5. Proteoglikanlar.....	16
3. MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR (MMPs)	17
3. 1. Metalloproteinazların Molekül Yapısı	18
3. 2. Metalloproteinazların Sınıflandırılması.....	20
3. 2. 1. Kollajenazlar	20
3. 2. 2. Jelatinazlar	21
3. 2. 3. Stromelizinler	22
3. 2. 4. Matrilizinler	22
3. 2. 5. Membran tip metalloproteinazlar	22
3. 3. Pro-MMP Aktivasyonu	22
3. 4. Metalloproteinazların Gen Ekspresyonunun Düzenlenmesi	23

4. MATRİKS METALLOPROTEİNAZLARIN SPESİFİK DOKU İNHİBİTÖRLERİ.....	24
5. ENDOTELİNLER.....	25
5. 1. Pulmoner Patolojilerde Endotelinler.....	25
5. 2. Endotelin ve Bronkopulmoner Etkileşim	26
5. 3. Endotelin-I	26
5. 4. Endotelin Etki Mekanizması.....	27
5. 5. Endotelin Salınımı ve Reseptörleri	27
6. RESPIRATUAR DİSTRES SENDROMU	30
6. 1. Epidemiyoloji	31
6. 2. Risk faktörleri.....	31
6. 3. Akut Akciğer Hasar Mekanizması.....	32
6. 3. 1. Hücresel Mediyatörler.....	32
6. 3. 2. Humoral Mediyatörler	33
III. MATERYAL ve METOD	35
3. İSTATİSTİK	37
IV. BULGULAR.....	38
4. 1. MMP-2 Düzeyleri.....	38
4. 2. MMP-8 Düzeyleri	39
4. 3. MMP-9 Düzeyleri	39
4. 4. TIMP-2 Düzeyleri.....	40
4. 5. Endotelin-1 Düzeyi	42
V. TARTIŞMA	43
VI. SONUÇLAR	51
VII. ÖZET.....	52
VIII. SUMMARY	54
IX. KAYNAKLAR.....	55

KISALTMALAR

Apgar	Yenidoğan deęerlendirme skoru
ARDS	Adult respiratuar distres sedromu
BAL	Bronkoalveolar lavaj
Ca	Kalsiyum
cAMP	Siklik adenzin monofosfat
DNA	Deoksi ribonükleik asit
ECM	Ekstraselüler matriks
ELİSA	Enzyme linked immunoabsorbant assay
EMR	Erken membran rüptürü
ET	Endotelin
ETA	Endotelin reseptör-A
ETB	Endotelin reseptör-B
ET-I	Endotelin-I
H	Hidrojen
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
ICAM-I	İnterselüler adezyon molekülü- I
IL-B	İnterlökin-B
IP3	İnositol trifosfat
IVH	İntraventriküler kanama
MMP-9	Jelatinaz-B
MM-MMP	Membran tipi metalloproteinazlar
MMP	Metalloproteinaz
MMP-2	Jelatinaz-A

MMP-I	Kollajenaz-I
Na	Sodyum
NO	Nitrik oksit
O ₂ ⁻	Süperoksit radikal anyon
PDGF	Trombosit düzenleyici büyüme faktörü
Pro-MMP	MMP öncülü
RDS	Respiratuar distres sendromu
RNA	Ribonükleik asit
SGA	Düşük doğum ağırlıklı bebek
SP	Sürfaktan ilişkili protein
TGF-B	Düzenleyici büyüme faktörü-B
TGF-B1	Düzenleyici büyüme faktörü-B1
TIMPs	Doku inhibitör matriks proteinazları
TNF-alfa	Tümör nekrozis faktör-alfa

TABLolar

Tablo I: Kollajen I-IV özellikleri.....	13
Tablo II: Vertebralılarda bulunan MMP'ler.	19
Tablo III: Endotelin Sentezini Düzenleyen Faktörler.	28
Tablo IV: Hasta Bebek Özellikleri.....	36
Tablo V: Sağlam Bebek Özellikleri.....	36

ŞEKİLLER

Şekil 1: Alveolar ve Kapiller ağın gelişimi	6
Şekil 2: Akut akciğer inflamasyonu	34
Şekil 3: Sağlam ve ikiz eşi olan prematür bebeklerde MMP-2 düzeyi.....	38
Şekil 4: Hasta ve kız prematür bebeklerde MMP-2 düzeyi.	39
Şekil 5: Sağlam ve EMR'si olmayan prematür bebeklerde MMP-9 düzeyi.	40
Şekil 6: Sağlıklı ve kız prematür bebeklerde TIMP-2 düzeyi.....	41
Şekil 7: RDS'li ve EMR'li prematür bebeklerde TIMP-2 düzeyi.....	41
Şekil 8: Hasta ve ikiz eşi prematür bebeklerde endotelin-1 düzeyi.....	42

I. GİRİŞ

Günümüzde prematür doğan bebeklerdeki en büyük sorun akciğerlerin tam olarak gelişmemesine, biyokimyasal etkileşimlerin tam dengelenememesine bağlı olarak respiratuar solunum stresi adı verilen bir klinik tablonun gelişmesidir. Etyoloji tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Metalloproteinlerle Respiratuar Distres Sendromu (RDS) arasındaki ilişki son üç dört yıldır gündeme gelmiştir. Metalloproteinazlar ekstraselüler matriksin ve bazal membranların yapısal ve fonksiyonel işlevlerinde rol oynamaktadır. Özellikle matriks yapısında ve bazal membranlarında bazı yapısal elemanların yıkımında görev alır. Metalloproteinaz inhibitörleri tarafından inhibe edilirler. Metalloproteinazların düzenlenmesinde aktive ediciler ile inhibitörler arasında çok hassas bir denge vardır. Bu denge bozulduğu zaman parankim yıkımına bağlı olarak Respiratuar distres, pulmoner fibrozis, bronşektazi ve astım ortaya çıkabilmektedir.

Ayrıca RDS gelişen bebeklerde takiben bronkopulmoner displazi adı verilen inflamasyon, artmış damar geçirgenliği ve sonuçta fibrozisin geliştiği kalıcı akciğer hasarı meydana gelebilmektedir. RDS'nin erken tedavisi ya da önlenmesi ile bebeklerin yaşaması ve yaşam kalitesi artırılmış olur.

Günümüzde sentetik metalloproteinaz inhibitörleri çalışma aşamasında kullanılmaktadır. Böylece hem matriks metaloproteinaz (MMP)'lerin yıkıcı etkisi, hem nötrofilleri aktive edici etkisi hem de sitokin salınımı dolaylı olarak önlenmiş olur.

Endotelin-1 oldukça güçlü endojen vazokonstriktör etkiye sahiptir. Endotrakeal düz kaslar üzerine oldukça etkilidir. Bunların yanında fibroblast ve makrofaj aktive edici etkisi de bulunmaktadır. Bu mekanizmalarla bronkopulmoner displazi gelişimine neden olduğu düşünülmektedir.

Henüz birkaç yıldır yapılan çalışmaların sonuçlarına göre, çalışma sayılarının az olduğu ve daha kapsamlı çalışmalarla sonuçların desteklenmesi gerektiği belirtilmektedir. Bu çalışmada RDS'li ve sağlam preterm infantlarda MMP-2, MMP-8, MMP-9, TIMP-2 ve endotelin-1 miktarlarını erken postnatal dönemde ölçmeyi amaçladık.

II. GENEL BİLGİLER

2. EKSTRASELÜLER MATRİKS

Ekstraselüler matriks (ECM); hücre dışında görülen, “hücre yatağını” oluşturan sekrete proteinler ile glikoproteinlerden oluşur. Hücre fonksiyonunda hayati rol oynar. Bu sistem sadece destek fonksiyonu görmeyip, dinamik bir sistem özelliğindedir. Hücre homeostazının sağlanması, hücreler arası sinyal iletimi, hücre büyümesi ve çoğalmasının regülasyonu ile nörotransmisyon gibi dinamik olaylarda ekstraselüler matriksin rolü büyüktür (1).

Dokunun fonksiyonel gereksinimlerine bağlı olarak ECM yapısında çeşitli farklılıklar görülür.

2. 1. Ekstraselüler Matriks ve Akciğer Gelişimi

Akciğer gelişimi sırasında ekstraselüler matriks; hücre büyümesini, göçünü ve farklılaşmasını düzenler.

Bununla beraber pulmoner hücrelerde saldıkları çeşitli peptitler ile ECM yapısını düzenlerler. Bu düzenlemeyi gen transkripsiyonuna, translasyonuna, ribonükleik asit (RNA) dizilerine ve posttranslasyonel protein yapılanmasına etki ederek yaparlar (2).

Bu düzenleme prenatal dönemde başlayıp postnatal dönemde devam etmektedir. Prenatal dönemde ağırlıklı olarak hava yollarının dallanması, postnatal dönemde ise alveolar septal yapıların düzenlenmesi meydana gelmektedir (2).

Havayollarının dallanmasında birçok etkenin yanında ECM proteinlerine, bir takım proteoglikanlara ve bu moleküller için hücrelerden sekrete edilen reseptörlere ihtiyaç vardır.

Ayrıca ECM'in akciğerlerin yapılanmasındaki fonksiyonu yanında akciğerlerin hasarlanması ve hasarlanma sonrası yeniden yapılanmasında oldukça önemli rolleri vardır (İnflamasyon).

Hasar sonrası akciğerde sayıları artan inflamatuvar hücreler birçok düzenleyici peptit salgılar. Bunların bir kısmı ECM yapılanmasında rol oynar.

Buradaki hücre - matriks etkileşimi oldukça önemlidir. Çünkü bu etkileşimin sonunda akciğerler normal yapısına kavuşabileceği gibi fibroze de gidebilir. Sonuç olarak akciğerin temel fonksiyonu olan gaz alışverişinde bozulma meydana gelir (2).

ECM akciğerin şekil, volüm ve sürekli değişiminde üç farklı yapısal zonda görev alır (3);

1. Proksimal hava yolları ve vaskülarizasyonu
2. Distal (gaz değişim alanı)
3. Arada kalan geçiş zonu (respiratuvar bronşiyoller)

Hava yolları gelişiminde ECM'de bulunan sert kartilaj (çoğunlukla proteoglikan ve kollajenlerden oluşur) ve esnek interstisyel doku, komşu epitel ve düz kas hücrelerine destek verir. ECM'nin bu esnekliği hava yollarının ve damar çapının yapılanmasında gereklidir. Sonuç olarak havayollarının kollabe olmasını engelleyen temel yapıdır.

ECM, respiratuvar zonda ekspiriyum ve inspiriyum sırasında alveolar volüme sürekli değişebilme yeteneği katar.

ECM'nin pulmoner asinuslardaki (terminal bronşiyollerin distalinde, gaz değişiminden sorumlu respiratuvar bronşiyol ve alveolar duktusları içeren yapı) rolü, bu yapılara güçlü bir genişleme yeteneği sağlamak ve alveolar epitel ile kapiller arasındaki aralığı inceltmektir.

Özetle ECM hem akciğer yapılanmasında, hem de akciğerin fonksiyonel yapılanmasında orkestra şefi gibi rol alır (3).

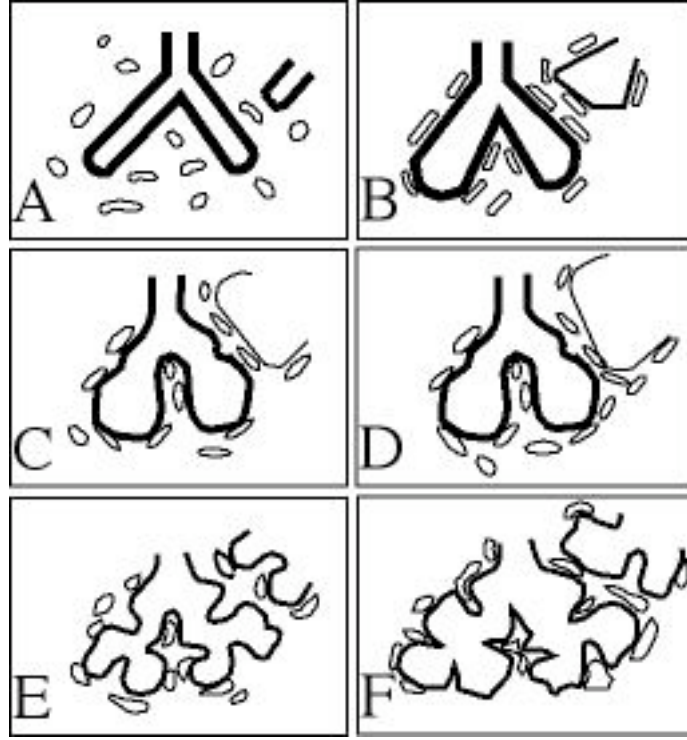
2. 2. Akciğer Gelişiminin Morfolojisi

Pulmoner anlageal 4. ve 6. faringeal arklardan gelişir. Pseudoglandüler evrede dallanmaya başlar. Bu periyod insanda 17. haftadaki embriyonik dönemde olur. Bu dönemdeki dallanmalara vasküler yapılarda artış eşlik eder. Bu zonu takiben kanaliküler evre başlar. Vasküler yapılar kökünü 6. aortik arkta alır. Bu iki yapı yer yer ECM ile birbirinden ayrılır (1).

Kanaliküler evre 3 aşamada meydana gelir;

1. Distal alveoler asinusların gelişimi
2. Pulmoner epitelin farklılaşma ve kan - hava bariyerinin oluşması
3. Sürfaktan sentezinin başlaması.

Terminal bronşiol seviyesindeki küboidal epitel (distal çıkıntıda) incelirken, sakkulus mezenkim içerisinde ilerlemeye devam eder. Kalan mezenkim doku içinde de yoğun vasküler ağ oluşumu sürer. Sonuç olarak kapiller yapılar epitel dokuyu çevreler. Daha sonra epitel hücreleri tip I ve tip II pnömositlere dönüşür ve sürfaktan sentezi başlar (şekil.1).



Şekil 1: Alveolar ve Kapiller ağın gelişimi

A) Pseudoglandüler evre: Kapillerler yoğun mezankim içinde rastgele dağılmaya başlar.

B) Kanaliküler evrenin başlaması: Kapiller epitelium, tüpün etrafında yayılmaya başlar ve beraberinde kanaliküllerde büyüme olur.

C) Kanaliküler evre: Kapiller epitelisi tüp ile yakın temas sağlar ve hava-kan bariyeri inceler.

D) Sakküler yapının oluşumu ile beraber epitel hücreleri tipl I ve tipl II hücrelere farklılaşır. İntersakküler duvar ile beraber iki tane kapiller ağ meydana gelir.

E) Alveolar evre: Sekonder septalar meydana gelir. İnterstisyel dokuda gittikçe azalma başlar.

F) Matür akciğer: Septalar uzar ve daralır. Tek bir kapiller ağ oluşur .

Kanaliküler evrenin tamamlanması ile havayolu dallanması sonlanır. Terminal sakkuler evrenin sonunda, kapiller yapıların düzenlenmesi, geniş bir hava alanı ve birbirine oldukça yakın hava-kan bariyeri şekillenmiş olur.

Elastin, ekstraselüler matriksin elastik yapısının temelini oluşturur. Alveolar duvar ve kan damarlarına genişleyebilme yeteneği sağlar.

Geç fetal hayatta elastin birikintileri en yüksek seviyededir. Bu noktadan sonra alveolar septa (sekonder krest) meydana gelecektir.

Doğumdan kısa bir süre sonra, hava-kan değişim yüzeyi daha da artar. Rudimenter terminal sakkulus bölünmeye (septa oluşumu) başlar. Alveolar duktus ve sakkulus şekillenir. Septasyon, sekonder krestin primer septadan tomurcuklanması ile başlar.

Septa merkezinde, fibroblast ve konnektif dokunun bulunduğu, etrafı kapiller ağ ile sarılmış olan yapı bulunur. Sekonder krestde fazla miktarda fibroblast proliferasyonu mevcuttur. Bu sayede alveolar kesenin parankim içerisine dikey uzaması sağlanır. Merkezde bulunan fibroblast çok hızlı bölünmez. Ancak bol miktarda elastin üretimi yapar. Septa boyunda artışla beraber, tip II hücreler içinde lameller cisimcikler birikmeye başlar. Bu birikintiler sürfaktanın bir göstergesidir (1).

Septal düzenlenme sonucu, septada incelme, uzama ve yoğun bir kapiller ağ meydana gelir.

2. 3. ECM'nin Havayolu Dallanmasına Olan Etkisi

ECM, akciğer gelişimi sırasında hücresel morfolojiyi psödoglandüler dallanma fazında etkiler. Havayollarının dallanmasını düzenler. Bu faz sürecinde havayollarının dallanması tamamlanır.

Dallanma, hücre-substrat adezyon molekülleri, ekstraselüler matriks ve hücreler arası adezyon moleküllerinin etkileşimi ile meydana gelir. Bu moleküllerin yapısal sınıflandırılması henüz yapılamamıştır. Çeşitli araştırmacılar ECM'nin epitel morfolojisi ve farklılaşması üzerine olan etkilerini, embriyonik akciğer kültürlerinde deneysel olarak göstermişlerdir (2). Ayrıca bu dallanma

olaylarında, epidermal büyüme faktörünün (EGF) etkili bir mediatör olabileceği belirtilmektedir (4). Distal akciğerdeki epitelyum, tip II hücrelere dönüşür. Mezenkim, bu hücrelerdeki lameller cisim ve sürfaktan birikimini etkiler (5). Bu mekanizma tam olarak gösterilememiştir. Ancak kollajen, laminin ve fibronektin sentezinden etkilendiği gösterilmiştir (3). Akciğer kültür modellerinde lamininin dallanma üzerindeki etkisi incelenmiştir (6). Laminin büyük bir trimerik glikoproteindir. Bazal membranın major komponentidir. Embriyonik akciğer kültürlerinde, anti-laminin antikollarının varlığı tüp oluşumunu azaltıp, dallanmayı sonlandırmaktadır. Bu etkinin antiserum ile ortadan kaldırılabileceği gösterilmiştir. Bu bilgiler lamininin, pulmoner dallanmada, temel düzenleyicilerden biri olabileceğini düşündürmektedir (7).

Havayolu dallanmasında etkili olan diğer bir protein ise, ekstraselüler glikoprotein olan fibronektindir. Birden fazla homolog tekrar eden peptit içerir. Birkaç tane fonksiyonel alandan meydana gelir. Bunlardan aminoterminal alan, fibrin oluşumu için esas alandır. Diğer üç alan; kollajen, heparan sülfat ve hücrelere bağlanmayı sağlayan alanlardır. Fibronektin, hücrelere tutunarak hücrel migrasyonu düzenler, serbest hücreler çoğalır ve distalde oluşan havayollarına göç eder.

Transforme edici büyüme faktörü-B1 (TGF-B1), fibronektinin çoğalmasını düzenler. Böylece indirekt olarak dallanmayı düzenlemiş olur (8).

Proteoglikanlar ve sindekan; tüp düzenlenmesini ve dallanmada epitel hareketlerini etkilemektedir. Sindekan, tüpler ya da duktuslarda epitelyal bütünlüğün devamı için gereklidir. Epitel migrasyonu sırasında, epitelyal sindekan salınımı azalır. Bu olay lens şekillenmesi sırasında gösterilmiştir. Lens yapılanması tamamlandıktan sonra, miktarı tekrar artmaktadır (9).

Havayolu dallanması sırasında, epitel hücreleri arasında etkileşim gerekmektedir. "Cadherin", bu etkileşimi regüle eden kalsiyum bağımlı moleküllerden biridir. Embriyonik fare akciğerlerinde E-Cadherin'e karşı oluşturulan monoklonal antikolar tüp düzenlenmesini ve dallanmasını bozar.

Ancak epitel hücrelerinin büyümesini etkilemez, aktin lifleri arasında iletişim sağlar.

2. 4. ECM'nin Sürfaktan Sentezi Üzerine Etkisi

Doğumda fonksiyonel respiratuar zonun oluşabilmesi sadece yeterli yapısal havayolunun varlığı ile değil, aynı zamanda alveollerde yeterli sürfaktanın bulunmasına bağlıdır. ECM'nin tip II hücreler aracılığı ile sürfaktan sentezine etkisi vardır (2). ECM içindeki tip II hücrelerde "timidin" miktarı artar.

Günümüzde sürfaktan yapımı ile ilgili bilgiler artmıştır. Sürfaktan ilişkili proteinlerden (SP-A-B-C) sorumlu genler ortaya konmuştur (10).

İnsanlarda fetal hayatın son haftalarında, farelerde ise fetal hayatın son 4 gününde sürfaktan ilişkili üç adet protein geninde ve fosfolipit sentezinde artış mevcuttur. Çeşitli hormonlar ve büyüme ile ilgili peptitler (glukokortikoidler, tiroid hormonları, epitelyal büyüme faktörleri) sürfaktan sentezine pozitif yönde etki eder (11).

Epitel hücreleri fibroblastlarla etkileşime girdiği zaman glukokortikoid aracılığı ile sürfaktan, fosfolipit ve apoprotein sentezinde artış meydana gelir. Bu etkileşimde çözünür fibroblast ürünleri (fibroblast pnömosit faktör) oluşur. Fibroblast hücre etkileşimi gap-junction veya indirekt ECM aracılığı ile olur (12).

Shannon ve arkadaşları (13) alveolar tip II hücrelerinde laminin, tip VI kollajen, heparan sülfat, proteoglikan ve entaktin ile sürfaktan ilişkili protein (SP) SP-A, SP-B ve SP-C mRNA sentezinde artış gösterilmiştir. Sonuçta ideal sürfaktan apoprotein gen ekspresyonu, hücre-matriks ve hücre-hücre etkileşimi gerektirir. Bu sırada ECM'den hücre çekirdeğine bilgi aktarımında hücre iskelet yapısı oldukça önem taşımaktadır.

2. 5. ECM Yapımına Hücrelerin Etkisi

Lokal hücresel faktörlerin, akciğer gelişimi sırasında, ECM yapılanmasında oldukça temel rolleri olduğu gösterilmiştir. Bununla beraber, akciğer gelişimi genetik olarak programlanmış birçok biyokimyasal, mekanik ve yapısal faktörü takip eder. Akciğerlerdeki bu oluşum kompleks bir olaydır. Hücre içi iletişim, hücreler arası iletişim ve hücre ile ekstraselüler matriks iletişimi söz konusudur. Bu karmaşık yapıdan dolayı, düzenleyici yapılar sadece herhangi bir ECM proteini ile açıklanamaz (1).

2. 6. ECM'ye Endokrin Faktörlerin Etkisi

İki haftalık ratlara uygulanan glukokortikoidler, alveolar septal düzenlenmeyi önemli ölçüde bozmaktadır. Alveolar interstisyel hacim ve alveolar yüzeyde azalma ile, alveolar septalarda kısalma meydana gelir. Bu etkiler özellikle hücre proliferasyonunun azaltılması ile meydana gelmektedir. Bu sırada DNA içeriğinde ve yeni DNA birikiminde azalma olmaktadır. Tip I pnömositler ve fibroblastlarda azalma olurken, Tip II pnömositlerde artış vardır. Kapiller endotel hücrelerinde azalma olmamaktadır (14). ECM'nin aselüler kısmında ise belirgin azalma meydana gelmektedir. Massoro ve arkadaşları (15), glukokortikoidlerin alveolar septal gelişimi sonlandıran sinyal olduğunu göstermişlerdir. Postnatal ilk 10 günde glukokortikoidler oldukça azalmakta, ancak takip eden günlerde artış meydana gelmektedir. Buna bağlı olarak, alveolar duvar kalınlığında incelme ve fibroblast büyümesinde azalma meydana gelir.

Tiroid hormonlarının, ratlarda alveolar septal düzenlenmeyi arttırdığı gösterilmiştir (38).

2. 7. ECM'ye Parakrin ve Otokrin Etkilerin Etkisi

Parakrin ve otokrin etkiler, günümüzde yeni anlaşılmaya başlanmıştır. Pulmoner interstisyumda bulunan hücreler, çeşitli peptit büyüme faktörleri salgılamaktadır. Alveolar interstisyumun major hücreleri; fibroblastlar, endotel hücreleri, tip I ve tip II epitel hücreleridir. Her bir hücre çeşitli büyüme faktörleri salgılar. Sonuçta ECM yapımında, hücrelerel sinyaller ve ECM'nin molekül sinyalleri gerekmektedir (1).

2. 8. Pulmoner Hasar Sonrası Hücre - ECM Etkileşimi

Hücre ve ECM etkileşimi, daha önceki başlıklarda anlatıldığı gibi, normal akciğer fonksiyonu ve yapısal gelişiminde düzenleyici role sahiptir. Bazı etkileşimler akciğer hasarı sonrasında, ECM'nin düzenlenmesinde temel role sahiptir. Moleküler seviyede akciğer ve ECM'nin normal gelişimi ile, onarım sürecini açıklamak bazı farklılıklar olmakla beraber mümkündür. Hücrelerel sinyaller, ECM yapılımasını başlatabilir ve devamlılığını sağlar (1).

Tamir ile gelişim arasındaki birinci fark; tamir evresi, devam eden inflamasyonu ve sonrasını kapsar. İnflamatuar süreç ise, tamir evresinin sonuçlandırılmasında ve hasarın başlatılmasında önemli rol oynar. Akut akciğer hasarında, özellikle alveolokapiller yüzeyde hasarlanma meydana gelir. Bu alan, makromoleküllerin difüzyonunu kontrol eden, oldukça dar bir bariyerdir. Bu süreçte su, solüt ve bazı makromoleküllerin geçişi düzenlenir. Bu bariyer bozulduğunda, plazma proteinleri (albumin, fibrinojen, pıhtılaşma faktörleri, plazminojen) alveolar alana geçer. Bu proteinler hasara karşı oluşan ilk savunma mekanizmaları olup, alveol içi fibrin depolanmasına katkıda bulunurlar (15).

Plazma proteinlerinin eksudasyonunda nötrofil, monosit ve lenfosit gibi hücreler, kandan alveoller içine hareket ederler. Bu durumda lenfosit makrofaj ağırlıklı hücre eksudasyonu meydana gelir. Alveolar makrofajlar, kanda ve interstisyel dokuda artar. İnflamatuar hücreler, bu sırada sekrete edilen sitokinler tarafından aktive edilirler. Bu sitokinler aynı zamanda, ECM moleküllerinin

sentezlenmesini ve depolanmasını başlatır. İnflamatuar yanıt bazen kendi kendini sınırlayabilirken bazen fibrozisle sonuçlanabilir. Sitokinler hem normal gelişim, hem de onarımda rol alır. Ancak bu iki olay sırasında ECM'nin uzaysal ve niceliksel yapılarında farklılıklar meydana gelir. T lenfosit ve diğer makrofaj kaynaklı sitokinler bu süreçte rol alır. Lezyonun geliştiği alanda TGF-B, fibroblast ve kollajen birikimi artar (16). Bu olay makrofajlardan salınan TGF-B'nin onarım ve fibrozisde önemli rol alabileceğini düşündürmektedir.

Normal gelişim ile fibrozis arasındaki diğer önemli bir fark kollajen yapılandırılmasındadır. Normal gelişim sırasında kollajen yapılandırılması bazı sinyaller ile sonlandırılırken fibrozisde aşırı yapım söz konusudur. En son çalışmalarda TGF-B metalloproteinaz salınımını azaltır, metalloproteinaz inhibitör aktivasyonunu arttırmaktadır (17).

2. 9. Ekstraselüler Matriksin Komponentleri

Ekstraselüler matriks fibriler ve nonfibriler komponentlerden oluşur. ECM üç temel biyomolekül grubu içerir. Birinci grup yapısal proteinler; kollajen ve elastin, ikinci grup özel proteinler; fibrilin, fibronektin ve laminin, üçüncü grup; proteoglikanlardır. Dokunun fonksiyonuna göre ekstraselüler matriksi oluşturan komponentlerin dağılımı değişmektedir (18). ECM sentezinde ve yıkımında herhangi bir defekt; kanser, artrit, amfizem ve osteoporoz gibi hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilir.

2. 9. 1. Kollajen

Vücudumuzda bulunan ve miktarı en fazla olan protein kollajendir. ECM'nin temel proteindir. En az 12 tip kollajen mevcuttur. Tip I, II, III en yaygın olan tiplerdir ve yapıları birbirine benzemektedir. Tip IV kollajen ise bazal membranlarda bulunan esas komponenttir. En fazla sentezlendiği yer fibroblastlardır. Ancak epitel hücreleri de bu proteinleri sentezleyebilmektedir (19). Tip I, Tip II, Tip III ve Tip IV kollajenin özellikleri tablo I' de verilmiştir.

Tablo I: Kollajen I-IV özellikleri.

Tip	Yapı	Yerleşim
I	Alfa 1, Alfa 2	Fibröz stromal matriks
II	Alfa 1	Kıkırdak, vitreus, korneal stroma
III	Alfa 1 (III)	Heterotipik fibriller
IV	Alfa 1 (IV), Alfa 2 (IV)	Bazal membranlar

Kollajen temelde Gly-X-Y şeklindedir. Gly; Glisin, X; sıklıkla prolin, Y; hidroksiprolindir. Glisin hidrojen bağları ile üç zincirin biraraya gelmesini sağlamaktadır. Kollajenin temel yapısını oluşturan bu peptit zincirine alfa-heliks adı verilmektedir. Bu üçlü yapı kollajene rijid olma özelliğini sağlamaktadır. Ayrıca bu yapı proteolizise oldukça dayanıklıdır (20).

Bazı kollajenler nonhelikal yapıya sahiptir. Bunlardan en önemlisi tip IV kollajen; özellikle bazal membranlarda bulunur ve non-helikal yapıdadır. Dokunun esnekliğini sağlar. Bu kollajen nonfibröz yapıdadır.

Kollajen sentezi oldukça karmaşık bir olaydır ve iki basamaktan oluşur. Temel adımlar:

- a) Ribozomlarda polipeptit zincir sentezi
- b) Prolin ve lizinin hidroksilasyonu
- c) Disülfid bağları ile çapraz bağlanma
- d) Heliks yapılanması
- e) Kollajen molekül sekresyonu
- f) Non helikal yapıların tamamlanması ve proteazlar ile ayrılması
- g) Ekstraselüler alanda çapraz bağların oluşması ve fibril yapılanması

Kollajen birçok dokuda fibroblastlardan sentezlenir. Bunlar kıkırdak dokuda kondrositler, kemik dokuda osteoblastlar, damar duvarında perisitlerdir. Tip IV kollajen epitel hücrelerinden ve kan damarlarındaki endotel hücrelerinden sentezlenir. Kollajen sentezi büyüme faktörleri, hormonlar ve sitokinler arasındaki etkileşimler ile düzenlenir. Örneğin, TGF-B ve Trombosit düzenleyici büyüme faktörü (PDGF) kollajen sentezini artırırken, glukokortikoidler sentez olayını inhibe ederler (20).

Kollajenin diğer fonksiyonları:

- a) Adezyon
- b) Büyüme
- c) Hücre farklılaşması
- d) Hücre motilitesi

Bütün proteinler yıkılır ve yeniden yapılırlar. Bu döngü dokuların büyümesi ve yeniden yapılanmasına izin verir. Örnek uterus involüsyonu

ECM proteinleri büyük oranda matriks metalloproteinazları ile yıkılırlar. Kollajenazlar fibröz kollajenlerdeki peptit zincirini kendilerine spesifik bölgeden bağlanarak yıkarlar. Heliks açıldıktan sonra diğer proteinazlar da yıkıma eşlik eder. Doğal heliks yıkıma oldukça dirençlidir. Çeşitli hastalıklarda bu yıkım olayı gözlenmektedir. Örneğin; kartilaj kollajeni romatoid artritte, kemik kollajeni osteoporoz sırasında yıkılmaktadır.

Kollajen genleri oldukça kompleks ve büyük miktarda ekson içermektedir. Pro-alfa I geni, 51 ekson içerir ve 18 kilobases büyüklüğündedir. Pro-alfa-2 geni 51 ekson içerir ve 40 kilobases büyüklüğündedir. Eksonlar helikal yapıyı kodlarlar (20).

2. 9. 2. Elastik Fibriller

Elastik fibriller dokularda yaygın olarak bulunurlar. Dokuların tekrar tekrar şekillenebilmesini sağlarlar. Elastik fibriller; merkezde elastin, elastini çevreleyen filament ve mikrofibrillerden oluşur. Mikrofibrillerin temel komponenti glikoproteindir (20).

Elastin büyük arter cidarında, tendonlarda, deride ve gevşek bağ dokusunda bulunur. Örnek; akciğer parankimi ve bronşlar (21).

Elastin başlangıçta çözünebilir monomer "tropoelastin" olarak sentezlenir ve hücreden sekrete edilir. Sekresyon sonrası monomerler arasında lizil oksidaz aktivitesi ile çapraz bağlar oluşur. Elastin çözünürlüğü oldukça düşük bir proteindir. İnsan elastin geni 36 ekson içermektedir ve tek gen ürünüdür (20).

Elastin döngüsü oldukça yavaştır. Elastin sentezi genel olarak organizmanın gelişimi ya da hasar sonrası döneminde olmaktadır. Hasar sonrası elastin ya yenilenir ya da nonfonksiyone fibriller meydana gelir (20).

Elastin birçok proteaza dirençlidir. Ancak elastaz adı verilen enzimlerce yıkılabilmektedir. Aşırı elastin yıkımı birkaç hastalıkta gözlenir. Örnek; amfizem ve ateroskleroz (22).

2. 9. 3. Fibronektin

Fibronektinin rolü hücrelerin ECM'ye tutunmalarını sağlamaktır. Özellikle laminin içeriği yüksek olan tip IV kollajen hariç diğer yapılara tutunur. Fibronektin birbirine benzer iki peptit zincirinden meydana gelir. Her bir zincir 60-70 nm uzunluğunda ve 2-3 nm kalınlığındadır.

Fibronektin ECM'nin temel yapıştırıcı proteinlerindedir. Ayrıca çeşitli biyolojik aktiviteleri mevcuttur. Örnek; tümör hücrelerinin adezyonu, proliferasyonu, hücre şekillenmesi ve organizasyonunda rol alır. Vücudumuzda akciğer, böbrek, dalak stroması ve kan damarlarında bulunur. Fibronektin doku rejenerasyonu, embriyonik farklılaşma ve hemostazda görev alır (20, 23, 24).

2. 9. 4. Laminin

Bütün bazal laminalar yaygın protein ve glikozaminoglikanlar içerir. Bunlar: tip IV kollajen, heparan sülfat, entaktin ve laminin'dir. Bütün bazal laminaların temelini tip IV kollajenler oluşturur. Laminin hücrelerin bazal laminaya tutunmasını sağlar (20, 18).

2. 9. 5. Proteoglikanlar

Yapısında %95 karbonhidrat, %5 protein içerir. Ekstraselüler matriksin önemli bir komponentidir. Altı çeşit glikozaminoglikan bulunmaktadır. Bunlar; kondroitin sülfat, dermatan sülfat, hyalüronik asit, 4-6 kondroitin sülfatlar, heparin, heparan ve keratan sülfatlarıdır.

Proteoglikanlar polianyoniktir. Bu yapıları sayesinde katyonlara bağlanıp büyük miktarda su tutabilmektedirler. Bu özellik kayganlığı sağlar ve hücreler için koruyucu bir ortam oluşturur.

ECM diğer elemanları ile sürekli ilişki içindedir. Bu sayede matriks fonksiyonlarının devamında önemli rol alır. (18, 25).

3. MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR (MMPs)

Matriks metalloproteinazları, yapısal benzerlik gösteren matriks proteinlerini parçalayan proteinazlardır. Aktiviteleri çinko bağımlı enzimlerdir. İnhibisyonları, spesifik inhibisyon yapan doku inhibitör matriks proteinazları (TIMPs) tarafından sağlanır. MMPs'ler hem fizyolojik, hem de patolojik süreçlerde rol alırlar. Hücre-matriks ilişkilerinin düzenlenmesi, çeşitli ekstraselüler matriks komponentlerinin hidrolizinden sorumlu proteolitik bir sistem aktivasyonu ile meydana gelir. Ekstraselüler matriksin, yapım, yıkım ve hasar sonrası tekrar yapımı dengeli olmalıdır. Çünkü kontrolsüz yıkım patolojik süreçlerin oluşmasına neden olur. MMP'ler ve TIMPs'ler arasındaki denge, hücre-matriks bütünlüğünün düzenlenmesinde temel role sahiptir (26, 27).

Fizyolojik olarak embriyonik gelişme, blastosit implantasyonu, organ morfogenez, sinir sistemi gelişimi, ovulasyon, servikal dilatasyon, postpartum uterin involüsyon, endometrial döngü, folikül döngüsü, kemiğin yeniden yapılandırılması, yara iyileşmesi, anjiyogenez ve apoptozisde rol alır (28).

Patolojik olarak artrit, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, nefrit, nörolojik hastalıklar, kan-beyin bariyerinin bozulması, periodental hastalıklar, cilt ülserleri, gastrik ülserler, korneal ülserler, karaciğer fibrozu, amfizem, fibrotik akciğer hastalığı gibi hastalıklarda aktif rol oynar. Normal yara iyileşmesinde MMP ve TIMP arası denge sağlanmalıdır. MMP'nin yüksek ve TIMPs'in düşük olması, kronik inflamasyona neden olmaktadır (26).

MMP'ler homojen bir enzim grubu olmakla beraber, yapıları, sahip oldukları ek bölgeye göre değişir. Ortak alanları, sinyal peptid bölgeleri, propeptid bölgeleri, katalitik bölge ve hemopeksin bölgesidir. MMPs'lerin aktive olabilmesi için, propeptid bölgesinin enzimlerce ayrılması gerekmektedir. Katalitik bölgenin aktivasyonu için çinko bağlanması gereklidir. Hemopeksin bölgesi ise, yapısal olarak hemopeksine benzediği için bu ismi almıştır. Bu bölge substrat özgüllüğünü sağlamaktadır (29).

MMPs'ler dört grup altında toplanabilir (30):

1. Kollajenazlar (MMP-3, MMP-8, MMP-13 ve MMP-18)
2. Jelatinazlar (MMP-2, MMP-9)
3. Stromyelizinler (MMP-3, MMP-7, MMP-10, MMP-11 ve MMP-12)
4. Membran tip metalloproteinazlar (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 ve MMP-25)

MMPs'ler hızlıca sentez edilip ekstraselüler matrikse salınır. İnflamatuvar hücreler bazı proteazları depolayabilir. MMP'lerin dokulardaki dağılımı oldukça değişkendir. Jelatinazlar sürekli sentezlenirken, kollajenazlar ise uyarı olduğunda sentezlenir (26, 28).

MMP'lerin aşırı proteazla doku hasarına neden olmalarını önlemek için proteolitik aktiviteleri çok iyi düzenlenmelidir. Büyüme faktörleri, onkojen ekspresyonu ve hücre-ekstraselüler matriks veya hücre-hücre teması ile proteinazları düzenlerler. MMP aktivasyonu üç temel aşamada kontrol edilir;

I. Basamak; gen transkripsiyon aşamasıdır.

II. Basamak; Enzimin proenzim formundan aktif enzim formuna dönüşmesidir.

III. Basamak;; matriks metalloproteinazlarının TIMP tarafından kontrolünü içerir.

3. 1. Metalloproteinazların Molekül Yapısı

Bütün MMP'ler preproenzim olarak sentezlenir. İnaktive pro-MMP olarak salınırlar. Tablo II'de vertebralılarda bulunan farklı yapıları içeren MMP'ler sıralanmıştır.

Tablo II: Vertebralılarda bulunan MMP'ler.

Protein	MMP
Kollajenaz-1	MMP-1
Jelatinaz-A	MMP-2
Stromelizin-1	MMP-3
Matrilizin	MMP-7
Kollajenaz-2	MMP-8
Jelatinaz-B	MMP-9
Stromelizin-2	MMP-10
Stromelizin-3	MMP-11
Makrofaj elastaz	MMP-12
Kollajenaz-3	MMP-13
MT1-MMP	MMP-14
MT2-MMP	MMP-15
MT3-MMP	MMP-16
MT4-MMP	MMP-17
Kollajenaz-4	MMP-18
Enamelizin	MMP-20
XMMP	MMP-21
CMMP	MMP-22
İsimsiz	MMP-23

Yaklaşık 80 çeşit aminoasit içeren propeptit PRGC (V/N) PD sekansını içerir. Bu sekans MMP-23 de yoktur. Sistein bu sekans içerisinde bulunur ve katalitik bölgede bulunan çinkoya bağlanarak, enzimin latent halde bulunan pro-MMP şeklinde devamlılığını sağlar. MMP-11, MMP-23 RX (K/R) R sekansını içerir. MMP-11 ve MMP-14 intraselüler ortamda furin tarafından aktive edilirler.

Katalitik bölge 170 amino asit içerir. Çinko içeren HEXXHXXGXXH sekansı ve korunmuş metiyonin içerir. Ayrıca bu yapıda 5 adet beta-tabaka, 3 adet alfa-heliks yapı ve aralarında oluşan köprüler vardır. Bunlara ek olarak yapısal bir

çinko iyonu ve 2-3 Ca iyonu mevcuttur. Bu etkileşimler enzim aktivitesinin stabil tutulmasında ve hücrelerden salınımında gereklidir. MMP-2 ve MMP-9'lar bu bölgede üç kez tekrar eden tip-II fibronektin bölgeleri içerir. Bu tekrarlar sayesinde jelatin ve kollajen arasında etkileşimde rol alırlar (31, 32, 33, 34).

C-terminal hemopeksin bölge yaklaşık 210 amino asit içerir ve disk şeklindedir. Kollajenazlar interstisyel kollajeni yıkmak için hemopeksin bölgeye ihtiyaç duyarlar. Bu bölge aynı zamanda pro-MMP-2'nin hücre yüzeyinde MMP-14 aracılığı ile aktivasyonu için gereklidir (35, 36, 37).

Prolinden zengin peptit bölge katalitik ve hemopeksin bölge arasında iletişim sağlamaktadır. Ancak bu iletişimin fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir.

MMP-23'ler hemopeksin yerine sistein, prolin ve IL-1 reseptör benzeri bölgeler içermektedir.

MT-MMP'ler hücre yüzeyine tutunmayı sağlayan bölgeler içermektedir (26).

3. 2. Metalloproteinazların Sınıflandırılması

Metalloproteinazlar molekül yapılarına ve susbtrat ilgilerine göre altı gruba ayrılırlar. Kollajenazlar, jelatinazlar, sitromelizinler, matrilizinler, membran tipi MMP ve diğerleri.

3. 2. 1. Kollajenazlar

Bu gruba ait üç aile tanımlanmıştır. Bunlar interstisyel kollajenaz (kollajenaz-I veya MMP-I), nötrofil kollajenaz (MMP-8) ve kollajenaz-3 (MMP-13)'dür. Bu enzimlerin ana özelliği nötral pH'ta kollajen heliksini parçalamaktır (39).

Kollajenaz-I (MMP-I): Keratinositler, fibroblastlar, makrofajlar, kondrositler ve düz kas hücreleri tarafından salınmaktadırlar. Tercihen tip III kollajene etkilidir.

Kollajenaz-II (MMP-8): Polimorfonükleer lökositler tarafından sentezlenir. Granüllerde depolanıp inflamasyon durumlarında salınırlar. Tip I kollajen yıkımında daha aktiftir.

Kollajenaz-III (MMP-13): Meme kanseri, osteoartrit, romatoid artrit gibi dejeneratif hastalıklarda sentezlenmektedir. Tip-II kollajen yıkımında daha aktiftir.

3. 2. 2. Jelatinazlar

Tip IV kollajenazlar olarak bilinirler. Bu grupta jelatinaz-A (MMP-2) ve jelatinaz B (MMP-9) olmak üzere iki enzim bulunur. Bu enzimler denatüre kollajenler, fibronektin, elastin ve jelatinleri parçalayabilir. Bu enzimler afinite ve primer yapılar açısından birbirine benzer. Ancak farklı genler tarafından kodlanır ve düzenlenmeleri farklılık gösterir. Bu enzimlerin katalitik bölgelerinde daha önce de belirttiğimiz gibi tip-II fibronektin benzeri bölge mevcuttur. Bu sayede kollajen ve jelatinler ile temas sağlarlar (28, 40, 41).

Jelatinaz-A (MMP-2): Vücudumuzda oldukça yaygın bir dağılıma sahiptir. Birçok hücre kültüründe, düz kas hücrelerinde, fibroblastlar, osteoblastlar ve endotel hücrelerinde sentezlenebilir (42).

Jelatinaz-B (MMP-9): Akciğer alveolar makrofajları, monositler, lenfositler, PNL ve keratinositler tarafından sentezlenirler. Makrofajlar dokulara tutunabilmek için bu enzimleri salarlar. MMP-9, tip IV ve tip V kollajeni parçalar. Tip II ve tip III kollajeni parçalayamaz. Çinko bağımlıdır ve kalsiyuma ihtiyaç duyar. Sitokinler (IL-1, TNF-alfa, INF-gama) MMP-9 aktivasyonunu artırır (43).

3. 2. 3. Stromelizinler

Güçlü proteoglikanazlardır. Fibronektin, laminin, kollajen tip IV-IX-X-XI parçalar. MMP-3 ve MMP-10 bu grup içindedir (44).

3. 2. 4. Matrilizinler

MMP-7 ve MMP-26 iki alt grubudur. Düşük molekül ağırlıklı metalloproteinazlardır. Oldukça geniş substrat afinitesi vardır (45).

3. 2. 5. Membran tipi metalloproteinazlar

Bu grupta bugüne kadar tanımlanmış altı MT-MMP vardır. MT-IV hariç hepsi pro-MMP'yi aktive eder. Membrana bağlı olduğu için hücrenin yakın çevresindeki yıkımdan sorumlu olabileceği düşünülmektedir. MMP-14 anjiyogenezde önemli bir role sahiptir. Membran tipi MMP-5 beyin dokusuna spesifiktir (46).

3. 3. Pro-MMP Aktivasyonu

Furin ile aktive edilen MMP-11 ve MMP-14 dışında MMP'ler inaktif zimojenler şeklinde salınırlar. Aktivasyonları için, propeptid bölgedeki sistein ile katalitik bölgedeki çinko arasında bulunan bağın bozulması gerekir (47). İn vitro ortamlarda proenzim aktivasyonu için civa ve reaktif ajanlar gerekmektedir. İn vivo ortamda ise doku ve plazma proteinazları ile fırsatçı bakterilerin proteinazları gereklidir. Proenzim aktivasyonu proteolizde önemli bir kontrol basamağıdır (48, 49).

Pro MMP-2 aktivasyonu ise hücre yüzeyinde meydana gelir. Bu aktivasyon için MMP-14 ve TIMP-2 bağlı MT1-MMP gerekmektedir. Endotel hücrelerindeki plazma membranlarına tutunmuş MT1-MMP'ler, anjiyogenezde önemli rol oynar (49).

3. 4. Metalloproteinazların Gen Ekspresyonunun Düzenlenmesi

Metalloproteinazları kodlayan genler indüklenebilir veya baskılanabilir. Büyüme faktörleri, sitokinler, bazı kimyasal ajanlar, fiziksel stres ve onkojenik dönüşümler indüksiyon yapabilir. TGF-B, retinoik asit ve steroidler baskılayıcı rol alabilir (50).

Sadece bu çözünebilir faktörler değil, hücre-matriks ve hücre-hücre etkileşimleri de gen ekspresyonu üzerinde etkilidir. Örnek; fibroblastlarda bulunan immünglobülin ailesinin bir üyesi olan transmembran glikoproteini EMMPRIN (M 6 antijeni), MMP-1, MMP-2 ve MMP-3'ün tümör hücrelerinden salınımını arttırmaktadır (51).

Lenfoma hücrelerinin endotel hücrelerine tutunması MMP-9 veTIMP-1 sentezini aktive eder. T lenfositlerin endotel hücrelerine tutunması MMP-9 salınımını artırır. T hücrelerinin monosit ve makrofajlar ile etkileşimi MMP-9 salınımını artırır (52, 53, 54).

4. MATRİKS METALLOPROTEİNAZLARIN SPESİFİK DOKU

İNİHİTÖRLERİ (TIMP'LER)

Spesifik doku inhibitörleri (TIMP'ler); dokularda bulunan MMP'lerin aktivitesini düzenleyen endojen major protein düzenleyicilerdir (55). Bu sayede, metalloproteinaz etkisi ile oluşan bazal membran ve ekstraselüler matriks yıkımı engellenmiş olur. Dört çeşit homolog (TIMP-1-2-3-4) mevcuttur. İnhibitör etkisi yanında pro-MMP aktivasyonu, hücre büyümesi, tümör hücre invazyonları, angiogenezis inhibisyonu ve apoptozisin indüklenmesi gibi etkileri mevcuttur (56, 57).

TIMP-1 ve TIMP-2, bazı hücreler üzerinde mitojenik aktivasyona neden olabilirken, fazla miktarda salınmaları, mitojenik aktivasyonda inhibisyona neden olabilmektedir. TIMP-3 ve TIMP-2 membran tipi MMP'leri inhibe edebilir. TIMP-1'in bu özelliği yoktur. TIMP-3, TNF-alfa düzenleyici enzim inhibisyonu yapmaktadır. TIMP-2'ler, MT-1MMP'ler aracılığı ile pro MMP-2'ye hücre yüzeyinde bağlanarak, aktivasyonunu sağlar. TIMP'lerin N-terminal bölgeleri ile MMP'lerin katalitik bölgelerine bağlanmaları, inhibisyonu gerçekleştirir (49).

TIMP'ler iki önemli molekülden meydana gelir. N terminal bölgesi 125 aminoasit içerir. Küçük C-terminal bölgesi 65 aminoasitten meydana gelir (26). Her biri üç adet disülfid bağı ile sabitleştirilir. N-terminal bölge, MMP'lere karşı inhibitör bölgedir. TIMP'lerin, ekstraselüler matriks metabolizmasının fizyolojik koşullarının devamı, inflamasyon sırasında yeniden düzenlenmesi ve yapısal bütünlüğünün devam edebilmesi için dengeli salınması gerekmektedir.

Aksi takdirde dengenin bozulması, artrit, kanser, nörolojik bozukluklar, fibrozis, nefrit ve RDS gibi çeşitli hastalıklarla sonuçlanabilir.

5. ENDOTELİNLER

Endotelinler (ET) yeni düzenleyici peptit ailesinin bir üyesidir. Son yıllarda yapılan çalışmalar endotelinlerin pulmoner fonksiyonlar üzerinde önemli etkilerinin olduğunu göstermiştir (57). ET'ler akciğer dokusunda, bronkoalveolar alanda ve pulmoner dolaşımda gösterilmiştir. Makrofajlar, endotel ve epitel hücrelerinden çeşitli kimyasal ve fiziksel etmenler aracılığıyla salınırlar. Transkripsiyon ve translasyon seviyelerine göre düzenlenirler. Spesifik endotelin reseptörleri havayollarında ve pulmoner vasküler yatakta gösterilmiştir. Oldukça güçlü bronkokonstrüksiyon etkisi mevcuttur. Pulmoner dolaşımda vazokonstrüksiyon ve vazodilatasyon gibi iki zıt etkiye sahiptir. Vasküler yapılarda geçirgenliği arttırmaktadır. ET'ler inflamatuvar hücrelerin aktivasyonunda rol almaktadır (58, 59, 60).

Artmış ET seviyeleri astım, bazı pulmoner tümörler, erişkin respiratuvar distress sendromu ile ilişkili şok ve pulmoner hipertansiyonda gösterilmiştir. Tüm bu bulgular endotelinlerin pulmoner yatak ve havayolu tonusu üzerinde, inflamatuvar hücre aktivasyonunda, hücre büyümesi ve farklılaşmasında etkili olduğunu, ayrıca pulmoner patolojilerde de önemli bir rol alabileceğini düşündürmektedir (58, 61).

5. 1. Pulmoner Patolojilerde Endotelinler

ET'ler intrapulmoner yapılardan salınırlar veya sistemik salınımdan sonra akciğer dokusunda artış gösterirler. İmmun reaktif ET-1'ler normal rat akciğerlerinde tespit edilmişlerdir (62). Sağlıklı gönüllü insanların ancak %10'unda tespit edilmiştir (63). Buna karşılık astmatik hastaların %60'ının akciğer epitelyumunda tespit edilmiştir. Hastalarda tedavi sonrası ET-1 seviyelerinde dramatik bir azalma meydana gelmiştir. Yine akut hipoksik akciğerlerde alveolar lavaj sıvısında ET-1 seviyelerinde yükselme gösterilmiştir. Bu yüksek ET-1 seviyeleri plazmada da tespit edilmiştir.

Güçlü ET-1 immunreaktivite artışı ve ET-1 mRNA miktarındaki artış pulmoner kanserlere komşu dokularda gösterilmiştir. Lenfoma ve sarkomlarda

bu artış gösterilememiştir. Bu bulgular pulmoner tümör gelişimi ve farklılaşmasında ET-1'lerin etkili olduğunu düşündürmektedir (64, 65).

5. 2. Endotelin ve Bronkopulmoner Etkileşim

İnvivo çalışmalarda, guinea domuzlarına ET'ler ve sarafatoksin (akreplerde bulunan nörotoksin) intravenöz yolla verilmiştir. Deneklerde doza bağımlı bronkokonstrüksiyon ve ortalama arter basınçlarında artış tespit edilmiştir. ET'ler, transpulmoner basınç ve pulmoner dirençte artışa, kompliyansda azalmaya neden olmuştur. ET'ler aerosol formda verildikleri zaman etkileri sadece akciğer üzerinde olup, ortalama arter basınçlarında değişiklik olmamıştır (66, 67, 69).

5. 3. Endotelin-I

Endotelin-I yapısı ve aktivitesi en iyi belirlenmiş ET formudur. Gen dizisi 1987 yılında tespit edilmiştir (30).

Bilinen en güçlü vazokonstrüktör maddedir. Endotelinler ET-1, ET-2 ve ET-3'den oluşan peptit ailesidir. İnsan genomunda 6. kromozomda kodlanmış prepro ET-I, endopeptidazlar ile pro ET-I e dönüşür (68). Daha sonra pro ET-I endotelin çevirici enzim ile ET-I'e dönüşür.

ET-I'in endotelin reseptör-A (ETA) ve endotelin reseptör-B (ETB) olmak üzere iki farklı reseptörü vardır. ET reseptörlerinin dokulardaki dağılımı ve yoğunluğu farklıdır. Endotel ve düz kas hücreesindeki ET aktivitesi birbirinden farklı reseptörler ile sağlanmaktadır. Düz kas hücrelerinde bulunan ETA reseptörleri vazokonstrüksiyona aracılık etmektedir. Endotel hücrelerinde bulunan ETB ise hem vazokonstrüksiyona hem de vazodilatasyona aracılık etmektedir (71).

5. 4. Endotelin Etki Mekanizması

Endotelinler parakrin ve otokrin etki gösterirler. Reseptörlerine bağlandıklarında hücre içi sinyal sistemleri harekete geçer, G proteinlerinin uyarılması ile fosfolipaz C aktive olur. Bu enzim inositol bifosfatı, inositol trifosfata (IP3) çevirir. IP3 intraselüler Ca salınımına neden olur. Aynı zamanda ekstraselüler Ca'nın hücre içine girişini kolaylaştırır. Hücre içi Ca artışı ve kalmodülin ile etkileşimi nörotransmitter salınımına neden olur. ET'ler hücre içi Na-H antipolar sistemini aktifleştirerek hücre içi pH'sını arttırırlar. Yükselen pH, Ca duyarlılığını arttırır. ET'nin reseptörlerine bağlanması ile iyon kanallarının geçirgenliği değişebilir. Buna bağlı olarak diğer bazı ikincil habercilerin aktivasyonuna ve nitrik oksit (NO) salınımına neden olur. NO'nun vasküler düz kaslarda ET'lerin neden olduğu vazokonstrüktör etkiyi antagonize edebildiği ve ET'lerin salınımını azalttığı gösterilmiştir (72, 73).

5. 5. Endotelin Salınımı ve Reseptörleri

Endotelin salınımında hipoksi oldukça önemli bir etkendir. Ortam pH'sı, obesite, glikoz, vazokonstrüktörler, büyüme faktörleri ve sitokinler de salınımda oldukça etkilidir. Uyarıdan sonra birkaç dakika içinde ET-1 salınımı başlar. Yarı ömrü dört-altı dakikadır (62). ET'lerin salınımını ve inhibisyonunu etkileyen faktörler Tablo III'de gösterilmiştir.

Tablo III: Endotelin Sentezini Düzenleyen Faktörler

STİMÜLATÖRLER			SUPRESÖRLER
Fiziksel	Hormonal	Diğer	
Akım Stresi	Vazopressin	Trombin	Nitrik Oksid
Hipoksi	Anjiotensin II	TGF	cGMP
	Tromboksan A ₂	LDL	ANF
	Epinefrin	Ca ⁺²	
	İnsülin	Forbol Esterleri	
	Glikokortikoidler	IL-1	
	Bradikinin		

Endotelin peptidler, biyolojik etkilerini çeşitli reseptörler ile etkileşerek meydana getirirler. Günümüzde bilinen üç reseptör tipi mevcuttur. Bu reseptörler rodopsin ailesi üyesidir. Yedi adet hidrofobik bölge ve G proteinleri mevcuttur. ET izoformlarının reseptör afiniteleri farklıdır. ETA reseptörü, ET-1 için spesifik iken, ETB reseptörü diğer ET'lere eşit derecede duyarlıdır. ETA reseptörü ET-l'in vazokonstrüksiyon gibi direkt etkilerinden sorumludur. ETB reseptörü ise prostaglandin, nitrik oksit ve tromboksan salınımı gibi indirekt etkilerinden sorumludur. ET reseptörleri farklı dokularda ve farklı yoğunlukta bulunur. ETB reseptörleri karaciğer, böbrek, uterus ve santral sinir sisteminde daha yaygın bulunur. ETA reseptörleri ise akciğer, kalp, barsak, adrenal bez ve gözde daha yoğun olarak bulunurlar.

ETA reseptörlerinin hipoksik doku faktörleri, siklik adozin monofosfat ve östrojen etkisi ile sayıları artarken, endotelinler ve anjiyotensinler ile sayıları

azalmaktadır. ETB reseptörlerinin sayısı C tipi natriüretik faktör ve anjiyotensin ile artarken, siklik adenosin monofosfat (cAMP) ve katekolaminler ile azalır (74, 75, 76).

6. RESPIRATUAR DİSTRES SENDROMU

Respiratuar distres sendromu ve komplikasyonları, prematür yenidoğanların en sık ve en önemli hastalığıdır. Aynı zamanda, yenidoğanlarda mortalite ve morbiditenin en önemli nedenidir. Hiyalen membran hastalığı olarak da adlandırılır. RDS, yenidoğanlarda (özellikle prematür bebeklerde) solunumun başlamasını takiben ilk birkaç saat içinde, pulmoner sürfaktan eksikliğine bağlı meydana gelen solunum sıkıntısı tablosudur (77). RDS'nin klinik ve radyolojik bulguları pulmoner sürfaktan içeriğine bağlıdır. Fetusta RDS'yi önleyecek sürfaktan miktarı, ancak 28-30 haftalarda sağlanabilir (78, 79). Patofizyoloji tamamen pulmoner immatürasyon ile ilgilidir. Etiyolojide; gaz değişimi için yeterli sürfaktan yapılamaması, alveolar epitel tabakalarının tam olgunlaşmaması, vasküler penetrasyonun tam gerçekleşmemesi, aşırı kompliyans nedeni ile göğüs duvarının stabilitesinin sağlanamaması ve inspirasyon sırasında yeterli ekspansiyonu sağlayacak negatif intratorasik basıncın oluşturulamaması etkindir. Bütün bunlara ek olarak, prematür akciğerlerinde, havayolu ve alveollerden yeterli sıvı klirensinin yapılamaması ve epitelyum ve endotel hücrelerinin yetersiz bariyer görevi yapmaları nedeni ile, pulmoner ödem geliştirme eğilimi mevcuttur. Ödeme bağlı yetersiz perfüzyon; foramen ovale ve duktus arteriozus ile sağlanan soldan sağa şantlar ve akciğer interstisyumundaki arteriyo-venöz şantlar ile kompanse edilmeye çalışılır. Ancak bütün bu faktörler, hipoksi, hiperkarbi ve surfaktan eksikliğine katkıda bulunur (80-81).

Bu hastalık gestasyonel yaş ile oldukça yakın ilişkilidir. Gestasyonel yaş küçüldükçe RDS riski artmaktadır. Eksojen sürfaktan ve prenatal steroid tedavisi prognozda ve akciğer grafisinde belirgin düzelme sağlayabilmektedir. En azından gerekli ventilasyon ihtiyacı azalmaktadır. Eğer bu periyot 2-3 haftadan daha uzun sürerse, bronkopulmoner displazi gelişebilir (82).

6. 1. Epidemiyoloji

Amerika birleşik devletlerinde yılda 60 bin ile 70 bin arasında RDS'li bebek doğduğu rapor edilmektedir. Geçen yıllara oranla RDS'li bebek sayısında belirgin artış mevcuttur. Her geçen gün gelişen resüsitasyon ve tıbbi bakım olanakları prematür bebeklerin yaşama oranını arttırmaktadır. Bu artışa paralel olarak RDS'li bebek sayısı da artmaktadır. Yılda 5 bin bebek RDS nedeni ile kaybedilmektedir. Yenidoğan döneminde ise ölümlerin %20'si RDS nedeni ile olmaktadır (82).

6. 2. Risk faktörleri

RDS'nin en önemli risk faktörü prematüredir. 37 haftadan küçük tüm bebeklerde meydana gelebilir. Ancak 36 haftalık bebeklerin tamamında surfaktan miktarının yeterli olduğu gösterilmiştir. RDS sıklığı ve buna bağlı mortalite ve morbidite erkeklerde daha sık görülmektedir. Bu durum erkeklerde testosteron yüksekliğine, kızlarda ise östrojen yüksekliğine bağlı olabilir. Dihidrotestosteronun insan fetal akciğerinde sürfaktan yapımını azalttığı, ratlarda yapılan çalışmalarda ise östrojenin fosfolipit sentezini arttırdığı gösterilmiştir. Daha önemlisi östrojen intrauterin dönemde sürfaktan gen induksiyonunu yapan katekolamin reseptörlerini arttırmaktadır (79).

Sezaryen ile doğan bebeklerde RDS görülme oranı artmaktadır. Normal doğumun sürfaktan yapımını arttırdığı bilinmektedir (83). Diyabetik anne çocuklarında da RDS riski yüksek bulunmaktadır. İnsülin intrauterin dönemde major büyüme faktörüdür. Hücresel bölünme ve çoğalmaya katkıda bulunur. Ancak akciğer gelişimi sırasında alveolar hücrelerin tip II hücrelere farklılaşmasını, kortizol ve sürfaktan ilişkili protein yapımını engellemektedir. Ayrıca hiperglisemi intraselüler surfaktan yapımını engellemektedir (84).

İkiz doğumlarda ikinci gelen bebekte akut strese bağlı RDS gelişme riski daha yüksektir. Kardeş öyküsü tam olarak anlaşılammış bir risk faktörüdür. Term bebeklerde akut perinatal asfiksi; hipoksi, asidoz ve hiperkarbi yolu ile sürfaktan yapımında azalmaya bağlı olarak RDS gelişimine yol açabilmektedir.

Kronik inrauterin stres ise steroid ve sürfaktan yapımında artış sağlayarak RDS gelişiminde negatif bir etki yapmaktadır.

Prenatal steroid uygulanması maternal toksemi, maternal hipertansiyon, kronik nefrit, kronik veya subakut ablasyo plasenta, intrauterin gelişme geriliği, vasküler hastalıklarla beraber maternal diyabet, uzamış membran rüptürü, narkotik madde kullanımı RDS riskini azaltan faktörlerdir.

6. 3. Akut Akciğer Hasar Mekanizması

Akciğerler anatomik ve fizyolojik bakımdan hasara açık bir yapıya sahiptir. Çünkü akciğerlerin epitel ile kaplı olan alanları diğer organlar ile karşılaştırıldığında oldukça geniş bir yüzeye sahiptir. Kalpten yüksek miktarda gelen kanı karşılayan ve kemik iliği dışında en büyük nötrofil rezervuarı olan kapiller ağa sahiptir. Alveoller içerisinde çeşitli mekanizmalar (spesifik hücre yüzey reseptörleri salınımı, mediyatör yapım ve salınımı) ile sayıları artan ve aktifleşen makrofajlar mevcuttur. Ek olarak epitel hücreleri, endotel hücreleri ve interstisyel hücrelerden proinflamatuvar mediyatörler salınmaktadır Akut akciğer hasar mekanizması (şekil:2)'de şematik olarak gösterilmiştir. (85).

6. 3. 1. Hücresel Mediyatörler

Akciğer hasarı akut inflamasyona yanıt olarak meydana gelmektedir. İnflamatuvar yanıt; makrofajların aktivasyonu ile salınan sitokinler, kemokinler, oksijen radikalleri ve araşidonik asit metabolitlerinin salınımı ile aktive olan lökositler ile meydana gelmektedir. İnflamatuvar sürecin başlaması ile endotel ve epitel bütünlüğünün bozulması, permeabilite artışı, mikrotrombüsler, pulmoner vazokonstrüksiyon ve ventilasyon-perfüzyon oranının bozulmasını takiben alveolar ödem, azalmış akciğer kompliyansı ve sonuçta refrakter hipoksemi meydana gelir.

Nötrofiller inflamasyonda oldukça önemli bir role sahiptir. Pulmoner ödem sıvısında, bronkoalveolar lavajda dominant hücreler olduğu gösterilmiştir. Nötrofillerin endotel hücrelerine tutunmalarında, lökosit yüzeyindeki B2 integrinler (CD11-CD18), endotel yüzeyindeki interselüler adezyon molekülü- I

(ICAM-I) ve interselüler adezyon molekülü- II (ICAM-II) kilit rol oynar. Bu moleküllerin salınımı ve aktivasyonu, adezyon ve ekstrasvazasyona neden olur.

İnflamasyonda nötrofillerden sonra en önemli iki hücre makrofaj ve trombositlerdir. Makrofajlar TNF-alfa, IL-1, profibrotik büyüme faktörü, trombosit büyüme faktörü (TGF- β), insülin-benzeri büyüme faktörü ve endotelin-1 (ET-1) salınımı yapar. Trombositler ise serotonin, tromboksan ve trombosit aktivasyon faktörü gibi vazoaaktif mediyatörler olarak vasküler hasara neden olmaktadır. Bu hücreler sadece inflamatuvar yanıtta rol almayıp inflamasyon sonrası dönemde fibroblast fonksiyonlarını düzenlemede de görev almaktadır (86, 87).

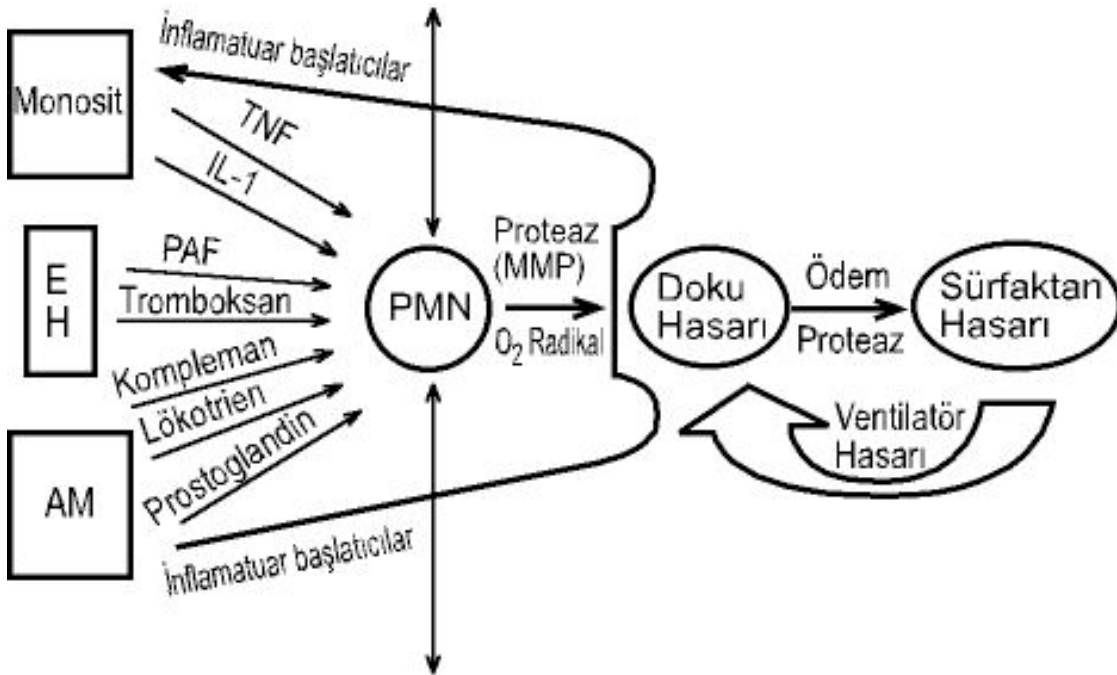
6. 3. 2. Humoral Mediyatörler

Sitokinler ve diğer proinflamatuvar mediyatörler inflamasyonun başlamasında ve devamında oldukça önemli moleküllerdir. Bunlardan en önemli iki sitokin makrofaj ve nötrofillerden salınan TNF-alfa ve IL-1'dir. Bu sitokinler sadece inflamatuvar hücrelerden salınmaz, aynı zamanda akciğer epitel ve fibroblast hücrelerinden de salınır. TNF-alfa, IL-1, vasküler geçirgenlik artışı ve nötrofil kemotaksisine bağlı olarak IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 gibi sitokinler ARDS'li ve ARDS riski taşıyan hastaların bronkoalveolar lavaj sıvısında (BAL) tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda proinflamatuvar ve antiinflamatuvar mediyatörler arasındaki denge, fizyolojik ve klinik açıdan bu mediyatörlerin miktarından daha büyük bir öneme sahiptir (90, 91).

Makrofaj, nötrofil ve diğer hücrelerden salınan oksijen ve nitrik oksit metabolitleri [hidrojen peroksit (H_2O_2) ve superoksit radikal anyon (O_2^-)] akciğer hasarında önemli bir role sahiptir. Bu metabolitler hücrelerin lipid, protein ve DNA gibi çeşitli yapıları ile etkileşime girmektedirler. Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz gibi enzimatik antioksidan sistem ve vitamin C, vitamin E gibi nonenzimatik antioksidan sistem bu radikalleri nötralize eder. Serbest radikaller akciğerdeki epitel ve endotel fonksiyonunda bozulmaya neden olur. Endotel ve epitel geçirgenliğindeki artış, alveol epitelinde sodyum iyon transportunu ve tip II alveolar epitel hücrelerinden sürfaktan sentezini inhibe

eder. Akciğer inflamasyonu olan hastalarda oksidan ürünlerin arttığı, beraberinde plazma antioksidan seviyesinin azaldığı gösterilmiştir (92, 93).

Koagülasyon ve fibrinolitik sistem arasındaki ilişki inflamatuvar yanıtın oluşumunda önemli rol oynar. İnflamatuvar akciğer hastalıklarında vazokonstrüktör olan tromboksan-B2 ve ET-1'in aşırı salınımı ile mikrotrombüs ve embolilere bağlı pulmoner hipertansiyon görülmektedir. Bu tip hastalarda sürfaktan yapısında bulunan fosfolipid ve protein yapılar etkilenmektedir. Etkilenmenin sonucunda sürfaktan disfonksiyonuna bağlı olarak alveolar kollaps, alveolar ödem ve gaz değişiminde bozulma meydana gelir (88, 89).



Şekil 2: Akut akciğer inflamasyonu.

EH: Endotel hücreleri, TNF: Tümör nekrozis faktör, IL-1: Interlökin-1, EH: Endotel hücreleri, PAF: Trombosit aktive edici faktör, AM: Alveolar makrofaj, PMN: Polimorfonükleer hücreler.

III. MATERYAL ve METOD

Çalışmaya Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Yenidoğan Ünitesi'nde takip ve tedavi edilen 45 prematür yenidoğan alındı. Prematür yenidoğan grubumuza gestasyonel yaşı 36 hafta ve altında olan bebekler kabul edildi. Bu bebeklerin 24 tanesi RDS'li (tablo IV) ,21 tanesi sağlıklı (tablo V) prematür bebek idi. Solunum sıkıntısı, takipne (>60dk), akciğer grafilerinde buzlu cam görünümü olan ve eşlik eden sorunları olmayan prematür yenidoğan bebekler RDS'li olarak kabul edildi. Hasta bebeklerin hiçbirinde entübasyon ve sürfaktan ihtiyacı olmadı. Gestasyonel yaşı 35 haftadan küçük bebeklere doğum öncesi profilaktik deksametazon tedavisi verildi. 35 hafta ve altında hiçbir sorunu olmayan prematür yenidoğanlar sağlam prematür olarak kabul edildi. Tüm bebeklerden ilk 48 saat içinde 2cc kan alındı. Alınan kanlar santrifüj edildi. Elde edilen 1cc plazma polipropilen tüplere konularak -20°C' de saklandı. MMP-2, MMP-8, MMP-9, TIMP-2 ve Endotelin-I Trinity biotech otoanalizatörü, enzim immünoassay yöntemi ve Qantikine immünoassay RD sistemi ile aynı zamanda çalışıldı.

Tablo IV: Hasta Bebek Özellikleri

Hasta Bebek Özellikleri	
Sayı (n)	24
Kız / erkek	9/15
Doğum haftası	31 ± 3
Doğum kilosu (gr)	1590 ± 41
EMR	5
İkiz	5
SGA	1
Sezaryen / NSVY	16 / 8
Apgar (1. dakika)	6 ± 1
Apgar (5. dakika)	8 ± 1

Tablo V: Sağlam Bebek Özellikleri

Sağlam Bebek Özellikleri	
Sayı (n)	21
Kız / erkek	11/10
Doğum haftası	32 ± 3
Doğum kilosu (gr)	1713 ± 41
EMR	3
İkiz	8
SGA	3
Sezaryen / NSVY	15 / 6
Apgar (1. dakika)	6 ± 2
Apgar (5. dakika)	9 ± 1

3. İSTATİSTİK

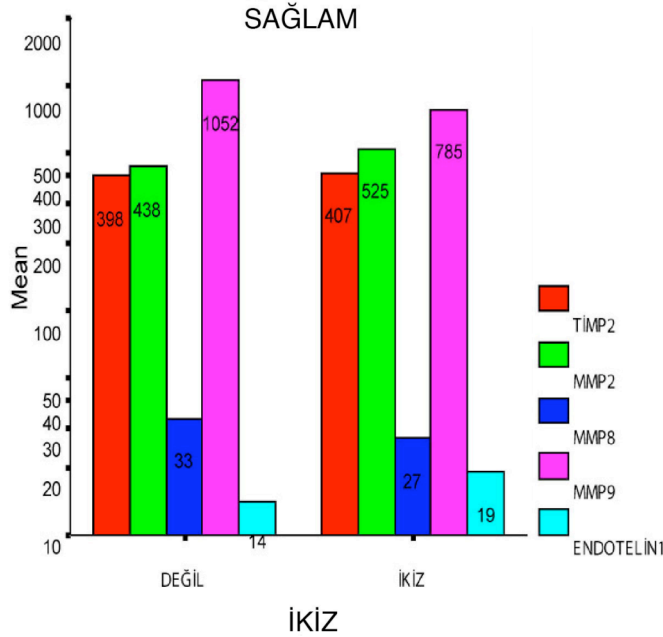
Sonuçlar ortalama standart sapma (SD) olarak verildi. Apgar ve doğum haftası ile TIMP-2, MMP-2, MMP-8, MMP-9 ve endotelin-1'in istatistiksel analizinde Anova (Varyans analizi), SGA ile TIMP-2, MMP-2, MMP-8, MMP-9 ve endotelin-1'in istatistiksel analizinde Mann-Whitney testi, ikiz eşi, cinsiyet, ağırlık, doğum şekli ve erken membran rüptürü ile TIMP-2, MMP-2, MMP-8, MMP-9 ve endotelin-1'in istatistiksel analizinde t testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık seviyesi olarak $p < 0.05$ seviyesi kabul edildi.

IV. BULGULAR

4. 1. MMP-2 Düzeyleri:

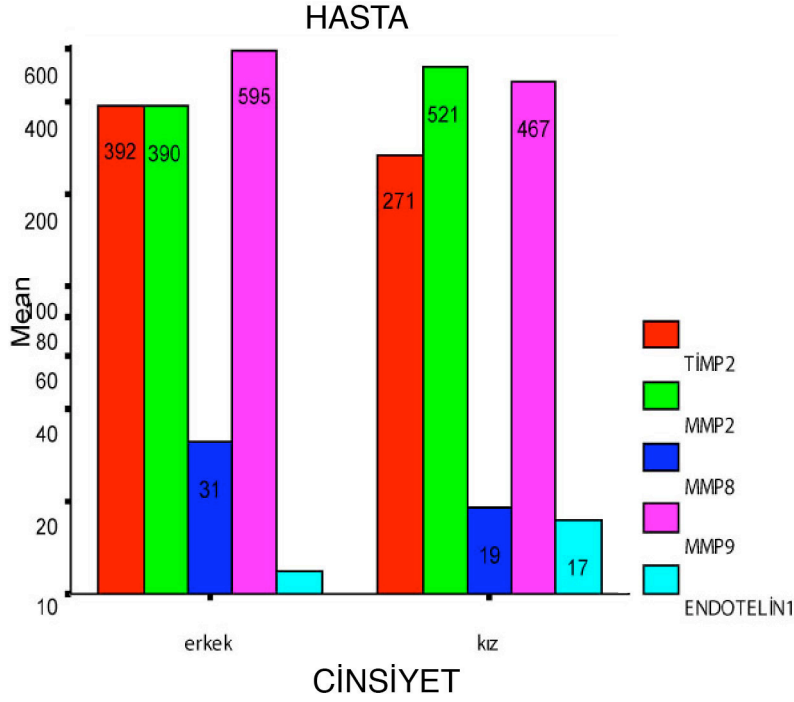
Toplanan kan örneklerinin tümünde MMP-2 tespit edildi. Sağlam bebeklerde MMP-2 düzeyi 471 ± 94 ng/ml idi. Sağlam bebeklerden elde edilen sonuçlarda apgar, düşük doğum ağırlığı (SGA), erken membran rüptürü (EMR), kilo, doğum haftası, doğum şekli ile istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Ancak sağlam ikizlerde MMP-2 düzeyi anlamlı olarak yüksek bulundu. (524 ± 87 ng/ml) ($P < 0.05$)

Hasta bebeklerde MMP-2 düzeyleri apgar, SGA, EMR, ikiz eşi, doğum haftası, cinsiyet ve doğum şekli ile istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. MMP-2 düzeyi 439 ± 19 ng/ml. Ancak kız bebelerde erkek bebeklere göre anlamlı oranda yüksek bulundu. (525 ± 132 ng/ml) ($p < 0.05$)



Şekil 3: Sağlam ve ikiz eşi olan prematür bebeklerde MMP-2 düzeyi

TIMP-2, MMP-2, MMP-8, MP-9, (ng/ml), Endotelin-1 (pg/ml)



Şekil 4: Hasta ve kız prematür bebeklerde MMP-2 düzeyi.

TİMP-2, MMP-2, MMP-8, MP-9, (ng/ml), Endotelin-1 (pg/ml).

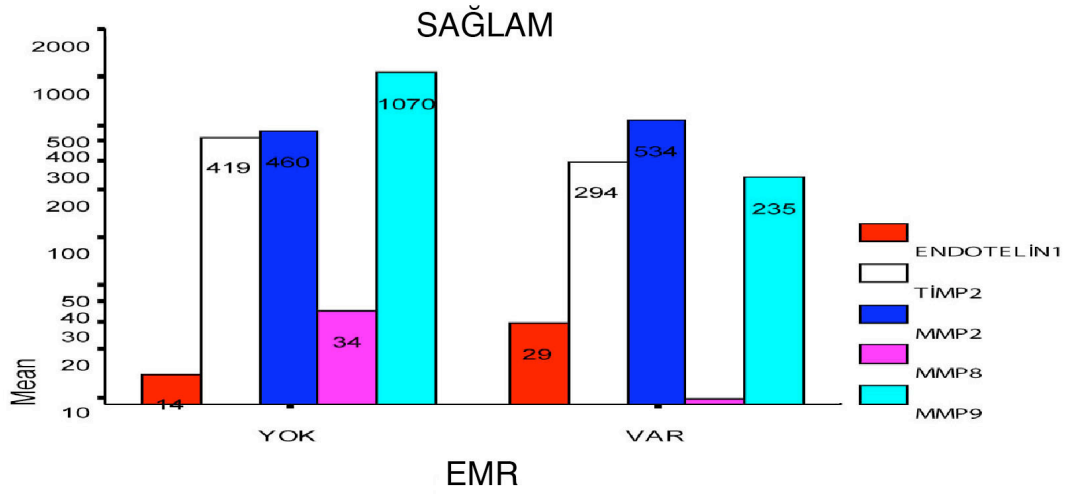
4. 2. MMP-8 Düzeyleri:

Toplanan kan örneklerinin tümünde MMP-8 tespit edildi. Sağlam ve hasta bebeklerde apgar, SGA, EMR, ikiz eşi, cinsiyet, doğum haftası, ağırlık ve doğum şekli ile istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. ($p > 0.05$)

4. 3. MMP-9 Düzeyleri:

Toplanan kan örneklerinin tümünde MMP-9 tespit edildi. bebeklerde, MMP-9 düzeyi 950 ± 68 ng/ml SGA, ikiz eşi, cinsiyet, doğum haftası, ağırlık ve doğum şekli ile istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.05$). Ancak sağlıklı EMR olmayan bebeklerde istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek bulundu (1069 ± 660 ng/ml) ($p < 0.05$).

Hasta bebeklerde SGA, EMR, apgar, ikiz eşi, cinsiyet, doğum haftası, ağırlık ve doğum şekli ile istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. ($p > 0.05$)



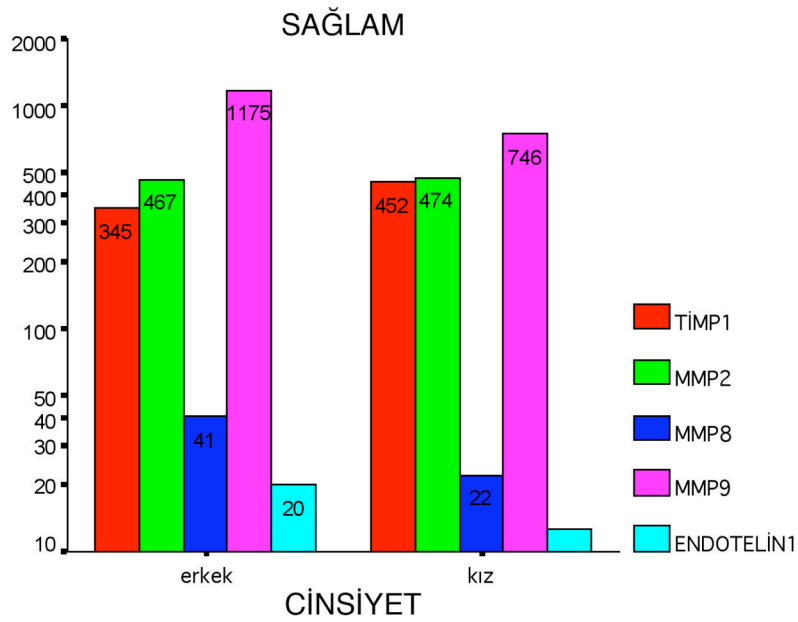
Şekil 5: Sağlam ve EMR'si olmayan prematür bebeklerde MMP-9 düzeyi.

TIMP-2, MMP-2, MMP-8, MP-9, (ng/ml), Endotelin-1 (pg/ml).

4. 4. TIMP-2 Düzeyleri:

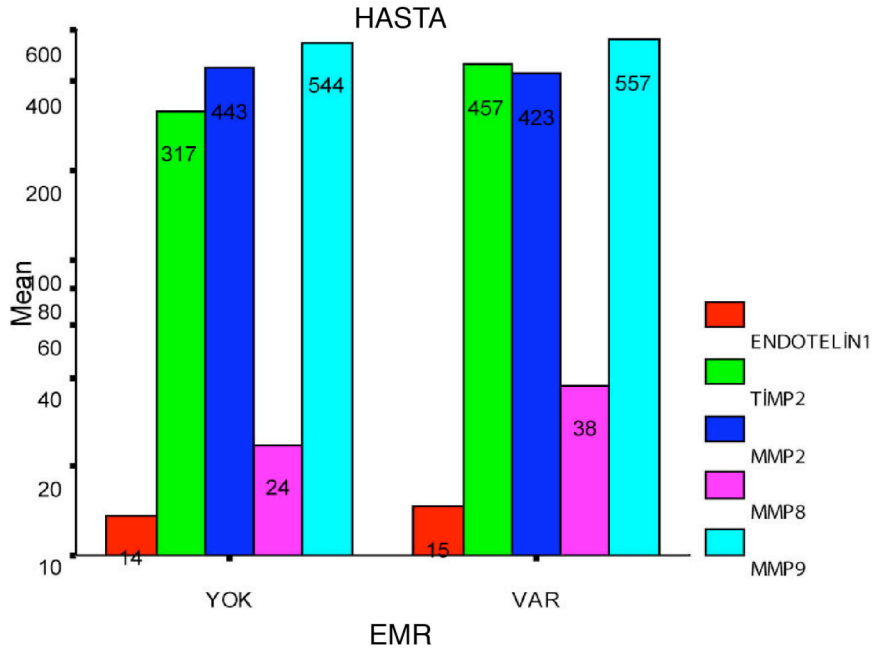
Toplanan kan örneklerinin tümünde TIMP-2 tespit edildi. Sağlam bebeklerde TIMP-2 düzeyi 401 ± 127 ng/ml. Sağlam bebeklerde, SGA, ikiz eşi, doğum haftası, ağırlık, EMR, apgar ve doğum şekli ile istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.05$). Ancak sağlıklı kız bebeklerde TIMP-2 düzeyi (452 ± 151 ng/ml) anlamlı oranda yüksek bulundu.

Hasta bebeklerde TIMP-2 düzeyi 346 ± 16 ng/ml'dir. SGA, apgar, ikiz eşi, cinsiyet, doğum haftası, ağırlık ve doğum şekli ile istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.05$). Ancak EMR li hasta bebeklerde anlamlı oranda yüksek bulundu (457 ± 126 ng/ml) ($p < 0.05$).



Şekil 6: Sağlıklı ve kız prematür bebeklerde TIMP-2 düzeyi

TİMP-2, MMP-2, MMP-8, MP-9, (ng/ml), Endotelin-1 (pg/ml)



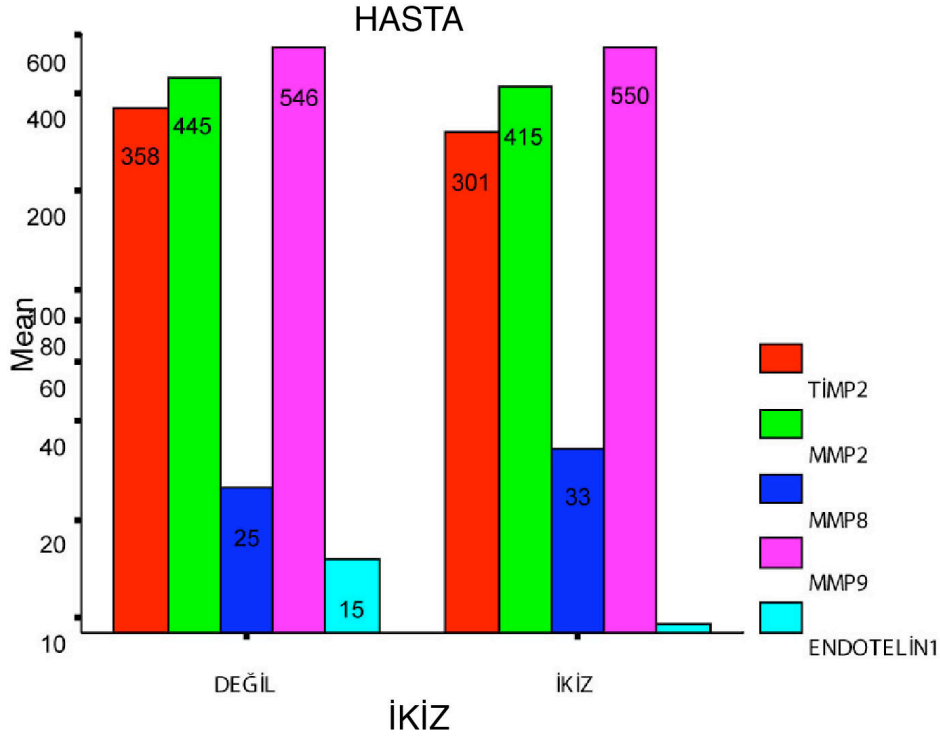
Şekil 7: RDS'li ve EMR'li prematür bebeklerde TIMP-2 düzeyi.

TİMP-2, MMP-2, MMP-8, MP-9, (ng/ml), Endotelin-1(pg/ml)

4. 5. Endotelin-1 Düzeyi:

Toplanan kan örneklerinin tümünde endotelin-1 tespit edildi. Sağlam bebeklerde, ET-1 düzeyi 16 ± 12 pg/ml idi. Sağlam ikiz eşi, cinsiyet, doğum haftası, ağırlık, EMR, SGA, apgar ve doğum şekli ile istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$).

Hasta bebeklerde ET-1 düzeyi 14 ± 10 pg/ml, SGA, apgar cinsiyet, doğum haftası, EMR, ağırlık ve doğum şekli ile istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$). Ancak ikiz eşi olmayan bebeklerde anlamlı olarak endotelin-1 düzeyi yüksek bulundu. (19 ± 11 pg/ml) ($p<0.05$)



Şekil 8: Hasta ve ikiz eşi prematür bebeklerde endotelin-1 düzeyi

TIMP-2, MMP-2, MMP-8, MP-9, (ng/ml), Endotelin-1 (pg/ml)

V. TARTIŞMA

Matriks metalloproteinazları (MMPs), yapısal ve fonksiyonel olarak birbirlerine benzerler. Ancak genetik kodlanması farklı, proteinazlar ailesinin üyesi enzimlerdir. Bu enzimler, ekstraselüler matriksin ve bazal membranın tekrar yapılandırılmasında (embriyogenez, yara iyileşmesi) ve yıkımda (inflamatuvar hastalıklar, tümör hücre invazyonu) rol alırlar. Günümüzde yaklaşık 20 MMP tanımlanmıştır. Aktiviteleri için çinko iyonuna, inhibisyonları için ise matriks metalloproteinaz inhibitörlerine (TIMPs) ihtiyaç duyarlar. MMP'ler latent proenzim olarak salınırlar. Ekstraselüler alanda ve hücre yüzeyinde oksidan maddeler, serin proteinazları ve otokatalitik sistemle aktive olurlar. MMP'ler indükleyicileri, aktivatörleri ve spesifik inhibitörleri ile düzenlenirler. Bu etkileşimde denge, aktivatörler lehine kayarsa matrikste yıkım başlar. Bu olaya en iyi örnek, respiratuvar distres sendromudur .

Çalışmada, RDS'li ve sağlam preterm infantlarda MMP-2, MMP-8, MMP-9, TIMP-2 ve endotelin-1'in erken postnatal dönemde, plazmadaki düzeylerini ölçmeyi amaçladık. RDS, akut akciğer inflamasyonu ile karakterize bir süreçtir ve genelde ilk üç gün içinde bu alevlenme geri dönebilmektedir (94). Eğer inflamasyon artarak devam ederse, bronkopulmoner displazi (BPD) gelişir. Watterberg ve arkadaşları (95), BPD'li hastalardan postnatal ilk haftada alınan bronkoalveolar lavaj (BAL) aspiratlarında, yüksek miktarda sitokin ve kemotaktik faktörleri göstermişlerdir (95). Saren P ve arkadaşları da, İL-1, TNF-alfa gibi mediyatörlerin, MMP-8 ve MMP-9 salınımını arttırdığı, buna karşın TIMPs'lerin, insan makrofaj ve endotel hücrelerinden salınımı azalttığını belirtmektedirler (25).

MMP-8 (kollojenaz-2), özellikle tip-I kollajeni parçalar. Bronşektazi ve kistik fibrozis gibi hastalıkların patogenezinde rol alır. Nötrofillerde depolanıp, aktivasyonları ile salınırlar. Çalışmamızda plazma MMP-8 düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmadı. Ancak Katarina ve arkadaşları (94), RDS'li preterm

bebeklerin BAL aspiratlarında yaptığı çalışmalarda MMP-8 seviyelerini yüksek buldular (94).

MMP-2 (jelatinaz-A) ve MMP-9 (jelatinaz-B) özellikle bazal membranları yıkar.

Christiana ve arkadaşları (97), BPD ve intraventricüler kanamalı (IVH) prematür yenidoğan ile sağlam yenidoğanlar arasında yaptıkları çalışmalarda, BPD ve IVH'li bebeklerde MMP-2 aktivitesini düşük, MMP-9 ve TIMP-I aktivitesini yüksek bulmuşlardır. Aynı çalışma grubunun yaptığı bir diğer çalışmada; ilk bir ay içinde, sağlam bebeklerde MMP-2 veTIMP-I seviyeleri değişmezken, MMP-9 seviyelerinde %50 azalma tespit edilmiş (97). Catariina ve arkadaşları (41) RDS'li bebeklerde MMP-2 düzeylerinin gestasyonel yaş ile arttığını,MMP-9'un gestasyonel yaş ve kilo ile azaldığını göstermişler. Çalışmamızda RDS'li kız bebeklerde RDS'li erkek bebeklere oranla. MMP-2 düzeyleri anlamlı oranda yüksek bulundu.

Fetoneonatal dönemde MMP'ler, doku gelişiminde ve morfogenezde, özellikle matriks parçalanmasında önemli role sahiptir. MMP'ler ECM yapısında değişiklik yaparak, hücrelerin yaşamsal alanlarını etkilerler. Anjiyogenezis sırasında, endotel hücrelerinin ECM de invazyon yapması gerekmektedir. Fisher ve arkadaşlarının (98) yaptığı invitro çalışmalarda, MMP'ler inhibe edildiğinde invazyonun gerçekleşmediği gösterilmiştir. MMP'lerin aktivasyonu ve inhibisyonu, çeşitli mediatörler ile proteolitik parçalanma yapılarak sağlanmaktadır.

TGF-B fetal gelişimde önemli rol oynar. İnvitro çalışmalarda TGF-B'nin, MMP-2 ve MMP-9 tarafından parçalandığı gösterilmiştir. Yu Q ve arkadaşları (99), MMP-9'ları nöronlarda göstermişlerdir. Ayrıca sinir sisteminin gelişiminde etkili olduğu, Chambaut- Guerin ve arkadaşları (100) tarafından gösterilmiştir. Blavier ve arkadaşları da, MMP-9 seviyelerinin encondral osifikasyon bölgesindeki osteoklastlarda yüksek olduğunu göstermişlerdir. Christiana ve arkadaşlarının (97) çalışmalarında, MMP-2 ve MMP-9 seviyelerinin 37 haftadan

önceki dönemde pik yaptığı tespit edilmiştir. Bu olay, prematür bebeklerde dokuların daha immatür olması ile büyüme ve morfogenezinin devam etmesine bağlı olabilir. İkinci olarak, TIMP-2 seviyelerinin term bebeklerde yüksek olduğu gösterilmiştir. Yüksek TIMP-2 seviyeleri, belki de yüksek MMP seviyelerine karşıt olarak yükselmiş ve MMP'lerin aktivitesini baskılamış olabilir. Çalışmamızda MMP-9 seviyeleri, sağlıklı ve annede erken membran rüptürü olan bebeklerde anlamlı oranda yüksek bulundu. Katariina ve arkadaşları (41) MMP-2-8-ve 9 düzeylerini RDS'li ve EMR'li prematür bebeklerde yüksek bulmuşlardır.

Postnatal dönemde MMP-2 ve MMP-9 plazma aktivitelerinde, TIMP-1 ve TIMP-2 plazma konsantrasyonlarında değişiklikler olmaktadır. 25-36 haftalık preterm yenidoğanların ilk ayın sonunda MMP-9 seviyelerinde %50 oranında azalma saptanmıştır, ancak mekanizma bilinmemektedir. Belki prematür bebeklerde antioksidan mekanizmaların zayıf olması nedeni ile, relatif olarak hipoksik intrauterin ortamdan, postnatal yüksek O₂ konsantrasyonu olan bir ortama geçen bebekte oksidatif strese bağlı olarak, MMP'lerde artış olabilir. Lemke ve arkadaşları (101), rat akciğerlerinde doğumu takiben yaptıkları çalışmalarda, yüksek oranda MMP-9 tespit etmişler. MMP-9'lar postnatal dönemde artan IL-1, IL-6 ve TNF-alfa gibi çeşitli mediatörler aracılığı ile, inflamatuvar hücrelerin uyarılmasına bağlı olarak salınırlar. Ancak Lemke ve arkadaşlarının (101) yaptığı çalışmalarda, MMP-2, plazma aktivitesi ve TIMP-1 ve TIMP-2 konsantrasyonlarında ilk bir ay içinde büyüme ve organ matürasyonu devam etmesine rağmen, artış gözlenmemiştir. Postnatal büyüme ve organ gelişimi sadece ilk bir ay değil, yıllar boyunca devam etmektedir. Bu nedenle, MMP ve TIMP'lerin postnatal büyüme ve gelişme dönemine olan etkileri hakkında daha fazla araştırma ve çalışmaya gerek vardır.

Patolojik durumlarda (RDS gibi), MMP-2 ve MMP-9 plazma aktivitesi ve TIMP-1 ve TIMP-2 seviyelerinde değişiklik olmaktadır.

Christian ve arkadaşlarının (97), pretermelerde metalloproteinazlar ve inhibitörlerinin, intraventriküler hemoraji ve bronkopulmoner displazi ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmaları mevcuttur. Bu çalışmada, düşük gestasyonel yaşı olan prematür bebeklerde MMP-2 seviyeleri daha düşük bulunmuş. Karşıt olarak, MMP-9 seviyeleri daha yüksek bulunmuş. Akciğer inflamasyonunda ilerleme, aşırı doku modifikasyonu ile sonuçlanabilir ve sonuçta BPD meydana gelebilir. Bu sırada MMP'lerin de katkısıyla, bazal membranlarda yırtılma, permeabilite artışı ve ödem meydana gelir. Ancak Ricou ve arkadaşları (102), bu hastaların bronkoalveolar lavaj sıvılarında MMP-2 ve MMP-9 aktivitelerini oldukça değişken bulmuştur. İntraventriküler hemoraji, prematürlerde oldukça yaygın bir komplikasyondur. Patolojide, vasküler lezyon ve trombosit disfonksiyonlarının, en az hipoksi ve reoksijenasyon kadar payı vardır.

MMP-2 ve MMP-9, ECM stabilizasyonu, vazomotor tonus ve trombosit agregasyonundan sorumludur. Sweet ve arkadaşları (103), düşük MMP-9/TIMP-1 oranlarının, ARDS'li hastalarda fibrozise gidişle korelasyon gösterdiğini belirtmektedir.

Ikechukwu ve arkadaşları (105), kronik akciğer hastalığı riski olan hastalarda, ilk bir hafta içinde TIMP-1 seviyesini düşük, MMP-9/TIMP-1 oranını yüksek, TIMP-2 ve MMP-2 seviyelerini düşük bulmuşlar. Çalışmamızda TIMP-2 seviyeleri, hasta ve EMR'si olan anne çocuklarında yüksek düzeyde bulundu. Katariina ve arkadaşları (41) TIMP-2 düzeyi ile EMR arasında ilişki olmadığını belirtmektedirler. Cederqvist ve arkadaşları (106), RDS'li bebeklerde TIMP -2 seviyelerini düşük bulmuşlar. MMP-9 ve TIMP-1 arasındaki dengesizlik, bronkopulmoner displazinin patogenezinde önemli role sahiptir. Bu bulgular, klinikte korunma ve tedavide önemli bir anlam ifade edebilir. Anti MMP ajanlar veya TIMP desteği ileride kullanıma sokulabilir. Kumagai ve arkadaşları (104) deneysel modellerde, astım ve diğer akciğer hasarlanmalarında ümit verici sonuçlar elde etmişlerdir.

Danan ve arkadaşları (107), prematür bebeklerde düşük MMP-2 aktivitelerinin, prognoz ve BPD ile ilişkili olabileceğini gösteren çalışmalar

yapmıştır. Ancak Ikechukwu ve arkadaşları (105), MMP-2/TIMP-2 oranında BPD'li hastalar ile kontrol grubu arasında önemli bir fark bulamamıştır.

Akciğer hasarlanmalarında, matriks yıkımını takiben, proteinazlar ile antiproteinazlar arasındaki dengeye bağlı olarak inflamasyon; iyileşme ya da fibrozisle sonuçlanabilir. Bruce ve arkadaşları (108) yaptıkları çalışmalarda, bronkopulmoner displazili hastaların BAL sıvılarında, ECM yıkımına bağlı fibronektin, elastin, laminin ve bunların parçalanmasına bağlı yıkım ürünlerini göstermişlerdir.

Willem ve arkadaşları (109), RDS'li bebeklerin 2-4. günlerinde BAL sıvısında MMP-9 aktivitesinde belirgin artış gözlerken, MMP-2 aktivitesinde RDS'li bebekler ile BPD'li bebekler arasında anlamlı fark gözlemlememişlerdir. Bu hastaların BAL sıvılarında, MMP-9'ların kaynağı olan nötrofil ve makrofajlar tespit edilmiştir. Ancak karşıt olarak, Cederqvist ve arkadaşları (106), RDS'li bebekler ile BPD'li hastaların MMP-9 aktiviteleri arasında fark bulamamışlardır. Willem ve arkadaşları (110), koryoamniyonitli doğan bebeklerde MMP-9 aktivitesinde anlamlı artış bulamazken, diğer bazı çalışmalarda farklı sonuçlar bulmuşlardır. Çalışmamızda MMP-9 düzeyi, EMR'si olmayan anne çocuklarında anlamlı oranda yüksek bulundu.

Curley ve arkadaşları (111) yaptıkları çalışmada, antenatal steroid kullanımının, MMP aktivitesini etkilemediğini göstermiştir. Çalışmamızda da olgularımızın hepsine antenatal dönemde steroid uygulanmasına rağmen, 24 hastamızda RDS gelişmiştir. Danan ve arkadaşları (107), SGA'lı bebeklerde ilk gün düşük MMP-9 aktivitesi tespit etmişken, Willem ve arkadaşları (109), MMP-9 seviyeleri ile gestasyonel yaş ve doğum kilosu arasında bir ilişki kuramamışlardır. Çalışmamızda, gestasyonel yaş ve SGA'lı bebekler ile normal doğum ağırlıklı bebekler arasında MMP'ler, TIMP-2 ve endotelin-1 düzeyleri arasında anlamlı bir fark gözlenmedi.

Endotelinler (ET), iki disülfid bağı içeren, 21 aminoasitli ve üç izoformu olan vazokonstrüktör bir peptid ailesidir (ET-1, ET-2, ET-3). Özellikle düz kaslarda

konstrüksiyon, yeniden yapılanma ve fibrozisde önemli rol alan fibroblast aktivasyonu, kemotaksis, epitel proliferasyonu ve inflamatuvar reaksiyonlarda rol aldığı gösterilmiştir (57-58-59).

ET-I, nitrik oksit, prostaglandin (PG), bradikinin ve diğer bazı hormonlar fetusda pulmoner vasküler tonusu düzenler. ET-I pulmoner damarlarda ETA reseptörleri aracılığı ile düz kas hücrelerine etki eder. ETA reseptörleri endotel hücrelerinde bulunur. ET-I'ler ETA aracılığı ile vazokonstrüksiyon yapar. ETB reseptörleri ile de vazodilatasyon meydana gelir.

Perreault ve arkadaşları (116) yaptıkları çalışmada umbilikal kordda ET-I seviyelerini yüksek bulmuştur. Bu sonuçlar ekstrauterin hayata adaptasyon ile ilgilidir. Bu nedenle normal yenidoğanlar ile RDS'li bebekler arasındaki ET-I seviyeleri arasında fark olmaması sürpriz değildir. Kord kanında ET-I seviyelerinin yüksek bulunması, arter ve vena aynı seviyede bulunmaları, plasentadan aktif bir geçiş olmadığını da düşündürmektedir.

Endo ve arkadaşları (113), term yenidoğan bebeklerde ilk bir saatte yüksek ET-I seviyeleri tespit etmişler. Ancak bir saat sonrasında ET-I seviyelerinde progresif bir azalma gözlemlemişler. Hipoksi, pulmoner stres, malformasyonlar ve prematürite; vazokonstrüktör ve vazodilatasyon yapıcı mediyatörler arasındaki dengeyi bozabilmektedir. Prociansy ve arkadaşları (112) RDS'li prematür bebeklerde ET-I seviyelerini yüksek bulmuşlar. Ancak ET-I seviyeleri ile ekokardiyografi ve klinik bulgularla tanı konan pulmoner HT arasında ilişki gösterilememiştir. ET-I'lerin vazokonstrüksiyon etkisi yanında mitojenik, inflamatuvar ve diğer inflamatuvar mediyatörler ile etkileşimi mevcuttur. Sonuçta vasküler dirençte artış, vasküler konjesyon, pulmoner hemoraji ve endotel hasarı meydana gelmektedir (112).

RDS'li yenidoğan bebeklerde yüksek ET-I seviyeleri, artmış sekresyon ve azalmış klirensle bağlı olabilir. Hashiguchi ve arkadaşları (114) hipoksinin ET-I seviyelerini artırdığını göstermişler. RDS'li yenidoğan bebeklerde artan hipoksi böylece ET-I yapımını arttırmaktadır. Bu çalışmamızda endotelin-1 seviyeleri

RDS'li ikiz eşi olmayan bebeklerde anlamlı olarak yüksek bulundu. Suture ve arkadaşları (58) ET-I düzeyi ile gestasyonel yaş, ağırlık, doğum öncesi steroid ve EMR arasında ilişki olmadığını göstermişlerdir. Erişkin akciğerlerinde dolaşımdaki ET-I'lerin %90'ı temizlenmektedir. Ancak yenidoğanlarda bu konuda çalışma yapılmamıştır. Lerman ve arkadaşları (115) erişkin ARDS'li hastalarda ET-I klirensinin azaldığını göstermişlerdir.

RDS'li bebeklerde doğumu takiben 40. saatte ET-I seviyelerinde azalma normal yenidoğan bebeklere göre daha yavaş olmaktadır. Bu bebeklerin yardımcı solunum desteği alanlarında ET-I seviyeleri ile hastalığın şiddeti arasında pozitif ilişki olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar bize ET-I'in RDS patogeneğinde rol alabileceğini düşündürmektedir. Niu ve arkadaşları (118) BPD gelişen bebeklerin trakeal aspirat sıvılarında yüksek seviyede ET-I tespit etmişlerdir. Benjamin ve arkadaşları (112) yaptıkları çalışmada umbilikal kord kanındaki ET-I seviyelerinde normal yenidoğan ile RDS'li bebekler arasında bir fark bulamamışlardır. Ancak doğum sonrası RDS gelişen bebeklerde ET-I seviyelerini diğerlerine göre yüksek bulmuşlardır (113).

Mededdu ve arkadaşları (117) eksojen endotelin verilen ratlara, takiben nifedipin verilmesi ile sistemik vazokonstriksiyonun önlendiğini göstermişlerdir.

RDS'nin inflamatuvar bir süreç olduğu bilinmektedir. Ancak bu konu ile ilgili çalışmamızda ve diğer çalışmalarda birbiri ile uyumlu olmayan sonuçlar elde edilmiştir.

Erkek bebeklerde RDS daha sık görülmesine rağmen çalışmamızda RDS'li kız bebeklerde erkek bebeklere oranla MMP-2 düzeyi anlamlı oranda yüksek bulundu. Annesinde EMR olan RDS'li bebeklerde TIMP-2 düzeyleri, annesinde EMR olmayan bebeklere oranla yüksek bulundu. RDS'li ikiz eşi olmayan bebeklerde ikiz eşi olan bebeklere oranla ET-1 düzeyi anlamlı oranda yüksek bulundu.

Çalışma sonuçlarımızdaki farklılıklar, plazmanın materyal olarak kullanılmasına ve hastalarımızın gestasyonel yaşlarının diğer çalışmalardaki bebeklere oranla daha büyük olmalarına (32-33 hafta) bağlanabilir. Bu konuda

bronkoalveolar lavaj ve plazmanın karşılaştırıldığı çok merkezli ve geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

VI. SONUÇLAR

1. Çalışmamızda sağlam ikiz eşi olan preterm bebeklerde, ikiz eşi olmayan sağlam bebeklere oranla MMP-2 düzeyi anlamlı olarak yüksek bulundu.

2. RDS'li kız bebeklerde RDS'li erkek bebeklere oranla. MMP-2 düzeyleri anlamlı oranda yüksek bulundu.

3. MMP-9 düzeyleri, annesinde EMR olmayan sağlam bebeklerde EMR olan sağlam bebeklere oranla anlamlı oranda yüksek bulundu.

4. Annesinde EMR olan RDS'li bebeklerde EMR olmayan RDS'li bebeklere oranla TIMP-2 düzeyi anlamlı olarak yüksek bulundu.

5. Sağlam kız bebeklerde, sağlam erkek bebeklere oranla TIMP-2 düzeyi anlamlı oranda yüksek bulundu.

6. RDS'li ikiz eşi olmayan bebeklerde, ikiz eşi olan RDS'li bebeklere oranla ET-1 anlamlı oranda yüksek bulundu.

7. Çalışmadaki amacımız inflamatuvar bir süreç olan RDS'li bebeklerde düşük MMP ve yüksek TIMP düzeylerini tespit etmek ve RDS'li bebeklerin tedavisinde TIMP'lerin kullanılabilirliğini desteklemektir, ancak sonuçların tamamı anlamlı değildi. Bu sonuçlara göre, günümüzde RDS'li prematür bebeklerde uygulanan sürfaktan tedavisine ek olarak, gebelerin prenatal takiplerinin düzenli yapılması ile prematür doğumlar engellenebilir. Dolaylı olarak RDS görülme sıklığı azaltılabilir.

VII. ÖZET

Matriks metalloproteinazları (MMP) yapısal benzerlik gösteren matriks proteinlerini parçalayan proteinazlardır. İnhibisyonları spesifik inhibisyon yapan doku inhibitör matriks proteinazlarınca (TIMP) sağlanır. MMP'ler tarafından kontrolsüz doku yıkımı patolojik süreçlerin oluşmasına neden olabilir. Endotelinler (ET) düzenleyici peptid ailesinin bir üyesidir. Oldukça güçlü, vasküler yapılarda geçirgenliği artırıcı etkileri mevcuttur. Ayrıca inflamatuvar hücrelerin aktivasyonunda da rol almaktadırlar. Respiratuvar distres sendromu (RDS) ve komplikasyonları prematür bebeklerin en önemli ve en sık hastalığıdır. Temelde sürfaktan eksikliğine bağlı inflamatuvar bir süreçtir. Biz bu çalışmada RDS'li ve sağlam preterm infantlarda MMP-2, MMP-8, MMP-9, TIMP-1 ve endotelin-1'in erken postnatal dönemde plazma düzeylerini ölçmeyi amaçladık.

Çalışmaya 21 RDS'li, 24 sağlam prematür bebek alındı. Hastalardan ilk 48 saat içinde 2 cc kan alındı. Enzim immunoassay (ELİSA) yöntemi ile çalışıldı.

Erkek bebeklerde RDS daha sık görülmesine rağmen çalışmamızda RDS'li kız bebeklerde erkek bebeklere oranla. MMP-2 düzeyleri anlamlı oranda yüksek bulundu.

RDS'li ve annesinde EMR olan bebekler ile sağlam kız bebeklerde TIMP-2 düzeyi anlamlı olarak yüksek bulundu. ET-1 düzeyide, RDS'li ikiz eşi olmayan bebeklerde anlamlı oranda yüksek bulundu.

RDS'nin inflamatuvar bir süreç olduğu bilinmektedir. Ancak bu konu ile ilgili çalışmamızda ve diğer çalışmalarda birbiri ile uyumlu olmayan sonuçlar elde edilmiştir.

Çalışma sonuçlarındaki bu farklılıklar diğer bir çok çalışmadan farklı olarak plazmanın materyal olarak kullanılmasına ve hastalarımızın gestasyonel yaşlarının diğer çalışmalardaki bebeklere oranla daha büyük olmalarına (32-33

hafta) bağlanabilir. Bu konuda bronkoalveolar lavaj ve plazmanın karşılaştırıldığı çok merkezli ve geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

VIII. SUMMARY

Matrix metalloproteinases (MMPs) have many structural similarities. They can also degrade different kinds of matrix proteins. MMPs are inhibited by specific tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs). Uncontrolled destruction of tissue by MMPs can cause the pathologic process to begin. Endothelin (ET) is the member of new regulatory peptide family. They increase permeability in strong vascular structures. They also take part in the activation of inflammation cells. Respiratory distress syndrome (RDS) is the leading cause of death in preterm infants. This syndrome is caused by developmental lack of surfactant. This study observed the levels of MMP-2, MMP-8, MMP-9, TIMP-1, and endothelin-1 in the plasma of both healthy preterm infants and preterm infants with RDS.

This study took 21 infants with RDS and 24 healthy premature infants. In first 48 hours, 2cc of blood was taken from the infants. The Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) technique was used.

This study found that female infants with RDS had a higher level of MMP-2 when compared to male infants, despite the fact that RDS is generally more common in male infants.

A higher level of TIMP-2 was found in female infants with RDS and mothers with EMR. Infants with RDS have higher levels of ET-1.

RDS is an inflammatory process. But, the results of this study could not be corroborated by other studies. Every study had different results.

The differences in the results can be explained by the plasma used in the study and that the gestational ages of the patients are older (32-33 weeks) than other studies. A more detailed study should be conducted, focusing on the relationship between Bronchoalveolar lavage (BAL) and plasma.

IX. KAYNAKLAR

1. G Fatih. Etanolün indüklediği karaciğer hasarında matrix metallo-proteinazların Rolü ve Antioksidanların Etkisi. AKÜ Tıp fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Yüksek lisans tezi 2005.
2. Stephen E McGowan. Extracellular matrix and the regulation of lung development and repair. Department of Veterans Affairs Research Service, Iowa City 52242, Iowa. *Fabes. J.* 1992. Aug; 6 (11): 2895-904
3. Albeda S. M., Edothelial and epitheial cell adhesion molecules. *Am J. Respir Cell Mol Biol.* (1991); 4: 195-203.
4. Warburton D. Epigenic autocrine and paracrine factors regulating lung morphogenesis. *Chest* (1991); 99: 15S-18S.
5. Hilfer S. R, Rayner R. M and Brown J M Mesenchymal control of branching pattern in the fetal mouse lung. *Tissue & Cell* (1985); 7: 523-538.
6. Spooner B S, Thompson-Pletscher H A, Stokes B and Bassett K E Extracellular matrix involvement in epithelial branching morphogenesis. In *Developmental Biology A Comprehensive* (1986); Vol 3: 225-260.
7. Schuger L, O'Shea S, Rheinheimer J and Varani J Laminin in lung development effects of anti-laminin antibody in murine lung morphogenesis. *Dev Biol* (1990); 137: 26-32.
8. Heine U I, Munoz E E, Flanders K C, Roberts A B and Sporn M B. Colocalization of TUF-beta I, collagen I and III, fibronectin and glycosaminoglycans during lung branching morphogenesis. *Development* (1990); 109: 29-36

9. Brauker J H, Trautman M S and Bernfield M Syn-decan, a cell surface proteoglycan, exhibits a molecular poly-morphism during lung development. *Dev. Biol* (1991); 147: 285-292.
10. Gross I. Regulation of fetal lung maturation. *Am J Physiol* (1990); 259: L337-L344.
11. Mendelson C R and Boggaram V Hormonal control of the surfactant system in fetal lung. *Anna Rev Physiol* (1991); 53: 415-440
12. Post M, Barsoumian A and Smith B T. The cellular mechanism of glucocorticoid acceleration of fetal lung maturation. *J Biol Chem* (1986); 261: 2179-2184
13. Shannon J M, Emrie A, Fisher J H, Kuroki Y, Jennings S D and Mason R J Effect of a reconstituted basement membrane on expression of surfactant apoproteins in cultured adult rat alveolar type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* (1990); 149-2:183-192
14. Massaro D and Massaro G D Dexamethasone accelerates postnatal alveolar wall thinning and alters wall composition. *Am j Physiol* (1986); 251: R218-R224
15. Crouch E Pathobiology of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol* (1990); 259: L159-L184.
16. Rouslahti E Proteoglycans in cell regulation. *J Biol Chem.* (1989); 264: 13369-13372.
17. Edwards D R, Murphy G, Reynolds J J, Whitham S E, Docherty A J P, Angel P and Heath J K Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J* (1987); 6: 1899-1904.

18. Muray RK, Granner DK, Mayes PA The Extracellular Matrix Harper Biochemistry. 25 ed. Stamford 2000: 695-714.
19. Michael W King, Ph. D / IU School of Medicine 1/ miking at iupui. Edu.
20. Michael W. King, Ph. D / IU School of Medicine 2/ miking at iupui. Edu.
21. Guner G.Ekstraselluler Matriks Yapısı ve Metabolizma Bozuklukları (ed). İnsan Biyokimyası (2002); 975 – 8624 – 20 - 02 İstanbul Palme Yayıncılık.
22. Starcher BC. Lung elastin and matrix. Chest 2000; 117 (5): 229S-234S.
23. Miyomata S, Katz BZ, Yamada KM.Fibronectin and integrins in cell adhesion, signaling and morphogenesis. Ann N Y Acad Sci 1999; 857: 119-129.
24. Ruoslahti E. Fibronectin and its integrin receptor in cancer Adv cancer Res 1999; 76: 1-20.
25. Elbein A, Kaushal GP. The Extracellular Matrix. Medical Biochemistry. Basildon Mosby; 1999: 333-43.
26. Hideaki Nagaseand, J Frederic. Matrix Metalloproteinases. The Journal of Biological Chemistry. Vol (1997); 274: 21491-21494.
27. Fini M E, Cook J,Mohan and Binckerhof C. Matrix Metalloproteinases 1998: 229-356 Academic Press, San Diego.
28. Steven D, Sphairo and Robert M Senior. Matrix Metalloproteinases Departments of Pediatrics Cell Biology and Medicine. Washington University School of Medicine. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1999: vol: 20, pp 1100 - 1102

29. Henning Birkedal-Hansen. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. National Institute of Dental Research. Bethesda, USA Current Pinnion in Cell Biology 1995; 7: 728-735.
30. M Corbel, E. Boichot and V.Lagente. Role of gelatinases MMP-2 and MMP-9 in tissue remodeling following acute lung injury. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 2000: 33; 749-754
31. Van Wart, H. E and Birkedal Hansen H. The cysteine switch a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinaz. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Jul; 87(14): 5578-82.
32. Becker J, Marey A, Rokoz R. Stromelysin-1: three-dimensional structure of the inhibited catalytic domain and of the C-truncated proenzyme Department of molecular desing and divercity. Merc Reserch laboratories, New Jersey 0765 USA 1999 October; 4 (10).
33. Bode W, Gomis-Rüth F X and Stöcher. Structure of astacin and implications for activation of astacins and zinc-ligation of collagenases. Nature 1992 Jul; 9; 358 (6382): 164-7. W 1993 FEBS lett. 331, 134-140.
34. Dhanaraj V, Johonson L, Hupe D, Humblent. X-ray structure of a hydroxamate inhibitor complex of stromelysin catalytic domain and its comparison with members of the zinc metalloproteinase superfamily. C Structure (1996); 4: 375-386.
35. Gomis-Rüth, F-X Gohelke U, Murpy G. The helping hand of collagenase 3 (MMP-13) J. Mol, Biol. 1996; 264, 556-566.
36. Murphy G, Willenbrock F, Cockett M, Eaton D, Docherty A J P. The C-terminal domain of 72 kDa gelatinase A is not required for catalysis, but is essential for membrane activation and modulates interactions with tissue inhibitors of metalloproteinases. Biochem J (1992); 283: 637-641.

37. Strongin A Y, Colliler I, Bannikow G, Marmer B, Grant G. A Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease *Biol Chem* (1995); 270: 5331-5338.
38. Massaro D, Teich N and Massaro G D Postnatal development of pulmonary alveoli: modulation in rats by thyroid hormones. (1996) *Am J Physiol.* 250, R51-55
39. Visse R., Nagase H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. *Circ Res* (2003); 92: 827-839.
40. Spley JM, Doyle Gar, Flizar CJ et al. The Structurel basis for the elastolytic activty of the 92-kda and 72-kda gelatinases, role of fibronectin type II-like repeats. *J Biol Chem* 1996; 271(8): 4335-41.
41. Katariina Cederqvist, Timo Sorsa, Karolina Reunanen, Patric Lassus. Matrix Metalloproteinases-2-8 and -9 and TIMP-2 in Tracheal Aspirates From Preterm Infants With Resprarory Distress. *Pediatrics* 2001; 108: 686-692.
42. Trocme C, Gaidin P, Berthir S et al. Human B Lymphocytes synthetise the 92 kDa gelatinase, matrix metalloproteinase-9. *J Biol Chem* 1993; 273 (32): 20677, 84.
43. Trygvason K, Höytha M, Pyka C. Type IV collagenases in invase tumors. *Breast Cancer Recerch and treatment* .1993; 24: 209-18.
44. Noel A, Santavicca M, Stoll S et al. Identification of structural determnants controlling human and mouse stromelysin-3 proteolytic activites. *J Biol Chem* 1995; 270: 22876 -72.
45. Imai Kyomoha H. Matrix Melloproteinase 7 from renal carcinoma cell. *J. Biol Chem* 1995; 270: 6691-7.

46. Belaaouaj A, Spihly JM, Kobayashi DK et al. Human macrophage metalloelastase. *J Biol Chem* 1995; 270 (24): 14568-75.
47. Fukuda Y, Ishizaki M, Kudoh S, Yamanaka N. Localization of Metalloproteinases-1, -2, and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in interstitial lung diseases. *Lab Invest* 78: 687-698, 1998.
48. Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, Drew A, Lupu F, Collen D. *Nat Genet* 1997; 17: 439-444.
49. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases *Biol Chem* 1997; 378: 151-160.
50. Nagase H. Zinc Metalloproteases in Heal and disease. 1996; 153-204 London.
51. Guo H, Zucher S, Gordon M K, Toole B P Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 24-27.
52. Xie B, Lauoar, Aand Huberman. Autocrine regulation of macrophage differentiation and 92-kDa gelatinase production by tumor necrosis factor-alpha via alpha 5 beta1 integrin in HL-60 cellsb. *J Biol Chem.* 1998; 273: 11576-11582.
53. Gilles C, Pollete M, Seike M, Birembaut P and Tomphson. E-W Implication of collagen type I-induced membrane-type 1-matrix metalloproteinase expression and matrix metalloproteinase-2 activation in the metastatic progression of breast carcinoma. 1997 *Lab. invest* 76: 651-660.

54. Malik N, Greenfield B, Wahl A F, Kiener P A J. Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases immunol. 1996; 156: 3952-3960.
55. Gomez D E, Alonso D F, Yoshiji H, Thorgeirsson U P. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. Eur J Cell Biol 1997; 74: 11-122.
56. Gomis R uth F X, Maskos K, Betz M, Bergner A, Huber R, Suziki K, Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. Nature.1997; 389: 77-81.
57. Tuuttila A, Morgunavo E, Bergman U, Lingvist Y, Maskos K, Schneider G. Three-dimensional structure of human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 at 2.1   resolution J Mol Biol 1998; 284: 1133-44.
58. Sture Anderson, T Allen Merritt, Arto Orpano, Lasse Viinika and Olavi Ylikorkala. High Endothelin-1 in the Airways of Preterm Infants Is Associated With Less Severe Respiratory Distress During the Early Postnatal Period pediatrics 1997; 99: 545-547.
59. T Kojima, Y  zdsaki, Fukada M, Takedatsu Y, Hirata and Kobayashi. Plasma endothelin -1 like immunoreactivity levels in neonates. Eur Journal of pediatr 1992; 151:913-915.
60. Stetler-Stevenson W Krutzsch HC TIMP-2: an endogenous inhibitor of angiogenesis. Journal of Biological Chemistry 1989; 264: 17374-17378.
61. Maartje de Vroomen, Robert H, Lopes Cardoza, Paul Steendijk, Jan Baan, Frank Van Bel. Endothelin-1 plasma concentration increases in the early phase of pulmonary hypertension development during respiratory distress syndrome: a study in newborn lambs Eur Human Development. 2001; 63: 9 - 21.

62. Janos G, Filep Minirview. Endothelin peptides Biological actions and pahophysiological significance in the lung. Life Sciences. Vol 52: 119-133.
63. K Kitamura, T Tanaka, J Kato, T Eto and K Tanaka. Chromatographic characterization of immunoreactive endothelin in rat lung Life. Sci. (1990); 46: 405 - 409
64. S Mattoli, M Soloperto, M Marini and Fasoli. Levels of endothelin in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with symptomatic asthma and reversible airflow obstruction. J Allergy Clin Immunol. (1991); 88: 376-384
65. A Nomura, Y Uchida, H Kameyama, M Saotome, K Oki and S Hasegawa. Effect of enkephalinase inhibitor on endothelin-1 induced bronchoconstriction in guinea pigs. Lacet (1989); 747-748
66. A N Payne and B J R Whittle. Potent cyclo-oxygenase-mediated bronchoconstrictor effects of endothelin in the guinea-pig in vivo. Eur J Pharmacol (1998); 158: 303 - 304
67. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature 1988 ; 332: 411 - 415.
68. M Yanagisawa, M Kurihara, S Kimura, Y Tomobe, M Kobayashi, Y Mitsui, Y Yazaki, K Goto and T Masaki. Nature(1980); 332:411-415
69. Y Klog, I Ambar, M Sokolovsky and Z Wollberg. Sarafotoxin a novel vasoconstrictor peptide phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain. Science (1988); 242: 268-270
70. Remuzzi G, Beningni A. Endothelins in control of cardiovascular and renal function. Lancet 1993; 342: 598-593.

71. H Hagiwara, T Nagasawa, K H Lodhi, M Kozuka, T Ito and S Hirose. Affinity chromatographic purification of bovine lung endothelin receptor using biotinylated endothelin and avidin-agarose. *J. Chromatography* (1992); 597: 331 - 334
72. K Oda, Y Fjitani, T Watanabe, T Inui, T Okada, Y Urade, E Okuda Ashitaka and S Ito. *Febs Lett.* (1992); 299: 187-191
73. M S Simonson and M J Dunn. Endothelin peptides and the kidney *Lab. Clin Med* (1992); 119: 622-639
74. Inoue A, Yanagisawa M, Takuwa Y, et al. The human preproendothelin-1 gene. *J Biol Chem.* 1989; 264: 14954-14959.
75. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H et al. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelial receptor. *Nature* 1990; 348: 730-732.
76. Sakurai T, Yanagisawa M, Masaki T. Molecular characterisation of the endothelin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1992; 13: 103-108.
77. Avery ME, Mead J. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *Am J Dis Child* 1959; 97: 517.
78. Ikegami M, Jobe A, Yamada T et al. Relationship between aivelar saturated phosphatidylcholine pool sizes and compliance of preterm rabbit lungs. *Am Rew Respir Dis* 1989; 139: 367.
79. Clements JA, Tooley WH. Kinetics of surface active material in the fetal lung. In: Hodson WA, ed. *Development of the lung*. New York: Larcel Dekker 1977; 349-346.
80. Jobe AH. Pathogenesis of respiratory failure in the preterm infant. *Ann Med* 1991; 23: 687.

81. Stark AR, Frantz 3rd ID Respiratory distress syndrome. *Pediatr Clin North Am* 1986; 33: 533.
82. Usher RH, Allen AC, McLean FH. Risk of respiratory distress syndrome related to gestational age, route of delivery and maternal diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 1971; 111: 826.
83. Fedrick J, Butler NR: Hyaline membrane disease. *Lancet* 1972; 2: 768.
84. Gluck L, Kulovich MV. Lecithin-sphingomyelin ratios amniotic fluid in normal and abnormal and abnormal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1973; 115: 539.
85. Ettore Crimi, Arthur S Slutsky. Inflammation and the acute respiratory distress syndrome. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology* 2004; Vol: 18: 477-492
86. Lee WL & Downey GP. Neutrophil activation and acute lung injury. *Current Opinion in Critical Care* 2001; 7: 1-7.
87. Weiland JE, Davis WB, Holter JF et al. Lung neutrophils in the adult respiratory distress syndrome. *American Review of Respiratory Disease* 1986; 133: 218-225.
88. Barnes P & Karin M. Nuclear factor- κ B-a pivotal transcription factor in chronic inflammation diseases. *New England Journal of Medicine* 1997; 337: 1066-1072.
89. Lewis JF. Surfactant and the acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Critical care rounds. Canadian Critical Care Society.* 2001; 2: 1-6.
90. Schutte H, Lohmeyer J, Rosseau S et al. Bronchoalveolar and systemic cytokine profiles in patient with ARDS. *European Respiratory Journal* 1996: 1858-1867.

91. Suter PM, Girardin E et al. High bronchoalveolar levels of tumor necrosis factor and its inhibitor interferon. *American review of Respiratory disease* 1992; 145 :1016-1022.
92. Fink MP. Role of reactive oxygen and nitrogen species in acute respiratory distress syndrome. *Current opinion in critical care* 2002; 8: 6-11.
93. Lang JD, McArdle PJ, O'Reilly PJ, Matolos S. Oxidant-antioxidant balance in acute lung injury. *Chest* 2002; 122: (supplement 6) 314S-320S.
94. Katariina Cederqvist, Timo Sorsa, Taina Tervaartiala, Pavi Maisi. Matrix Metalloproteinases-2,-9 and TIMP-2 in Tracheal Aspirates From Preterm Infants With Respiratory Distress. *pediatrics* 2001; 108: 686-692.
95. Watterberg KL, Demers LM, Murphy S. Chorioamnionitis and early lung inflammation in infant. *Pediatrics* 1996; 77: 210-215.
96. Saren P, Welgus HG, Kovanen PT. TNF - alpha and IL - 1 alpha selectively induce expression by human macrophages. *J Immunol* 1996 ; 156:4159 - 4165.
97. Christina G Schulz, Grzegorz Sawicki, Robert P Lemke. MMP-2 and MMP-9 and Their Tissue Inhibitors in the Plasma of Preterm and Term Neonates. *Pediatr res.* 2004; Vol:55 No 5.
98. Fisher C, Gilbertson – Beadling S, Powers EA, Petzold G, Poorman R, Mitchell MA. Interstitial collagenase is required for angiogenesis in vitro. *Dev Biol* 1994; 162:499-510.
99. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface- localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF Beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 2000; 14: 163-176.

100. Chambaut- Guerin AM, Herigault S, Rouet- Benzineb P, Rouher C, Lafuma C Induction of matrix metalloproteinase MMP-9 (92- kDa gelatinase) by retinoic acid in human neuroblastoma SKNBE cells; relevance to neuronal differentiation. *J Neurochem* 2000; 74: 508- 517.
101. Lemke RP, Zhang W, Balcerzak D, Kobayashi K, Schwingshackl A, Cheung PY, Dixon WT, Baracos VE, Greer JJ Expression and activity of MMP-2 and - 9 and their inhibitors in rat lungs during the perinatal period and in diaphragmatic hernia. *Exp Lung Res* 2003 ; 29 : 261 - 276.
102. Ricou B, Nicod L, Lacras S. Matrix metalloproteinases and TIMP in ARDS. *Am J Respir Crit Care Med* 1996 Aug; 154 (2 Pt 1): 346-52.
103. Sweet DG, Pizotti J, Wilbourn Mj. MMP-9 in the airways of infants at risk of developing chronic lung disease. *Eur Respir J* . 1999; 14: A 248.
104. Kumagai K, Ohno I, Okada S. Inhibition of matrix metalloproteinases prevents allergen induced airway inflammation in a murine model of asthma. *J Immunol*. 1999; 162: 4212- 4219.
105. Ikechukwu I Ekekezie, Donald W Thibeault, Stephen D Simon Low Level of Tissue Inhibitors of Metalloproteinases With a High Matrix MMP-9. *Pediatrics*. 2004; 113: 1709-1714.
106. Cderqvist K, Sorsa T, Tervahartiala T. Matrix Metalloproteinases 2, 8 and 9 and TIMP 2 in tracheal aspirates from preterm infants with respiratory distress. *Pediatrics* 2001;108;686-692
107. Danan C, Jarreau PH, Franco ML. Gelatinase activities in the airways of premature infants and development of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol lung Cell Mol Physiol* 2002 Nov; 283; L 1086-93

108. Bruce MC, Wedig KE, Jentoft N. Altered urinary excretion of elastin cross- links in premature infants who develop bronchopulmonary dysplasia. *Am Rev Respir Dis.* 1985 Apr; 131 (4): 568-72
109. Willem A DIK, Ronald R De Krijger, Lambert Bonekamp. Localization and potential Role of MMP-1 and Tissue inhibitors of Metalloproteinase- 1 and -2 in Different Phases of Bronchopulmonary Dysplasia. *Pediatric Research* 2001; Vol : 50 No 6
110. Willem A DIK, Anton H L C van Kaam, Tamara Dekker. Early increased levels of MMP-9 in neonates Recovering from RDS. *Biology of the neonate* 2006; 89: 6-14.
111. Curley AE, Sweet DG, Thornton CM, Warner JA: Chorioamnionitis and increased neonatal lung lavage fluid MMP-9 levels: implications for antenatal origins of chronic lung disease. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188:871-875.
112. A C W Benjamin, R C Silveira and RS Procianoy. Umbilical cord blood and neonatal endothelin-1 levels in preterm newborns with and without RDS. *Braz J Med Biol Res.* 2005; 38: 1417-1422.
113. Endo A, Ayusawa M, Minato M at al. Endogenous nitric oxid and endothelin-1 in persistent pulmonary hypertansion of the newborn. *European Journal of Pediatrics.* 2001; 160: 217-222.
114. Hashiguchi K, Takagi K, Nakabayashi M at al. Relationship between fetal hypoxia and endothelin-1 in fetal circulation. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1991; 17: 509-510.
115. Lerman A, Hildebrand FL, Margulies KB et al. Endothelin: a new cardiovascular regulatory peptide. *Mayo Clinic Proceedings* 1990; 65: 1441-1455.

116. Perreault T & Coceani F. Endothelin in the perinatal circulation. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 2003; 81: 644-653.
117. Madeddu P, Yang XP, Anania V, Troffa C. Efficacy of nifedipine to prevent systemic and renal vasoconstrictor effects of endothelin. *Am J Physiol.* (1990); 259: F304-311.
118. Niu JO, Munshi UK, Siddiq MM et al. Early increase in endothelin-1 in tracheal aspirates of preterm infants: correlation with bronchopulmonary dysplasia. *Journal of Pediatrics.* 1998; 132: 965-970.