

# Respiratuar Distres Sendromlu Pretermelerde Serumda Metalloproteinaz-2-8-9, ve Doku Proteaz İnhibitör-2 Düzeylerinin Belirlenmesi

## Detection Of Metalloproteinase-2-8-9 And Tissue Protease Inhibitor Serum Levels In Preterm Babies With Respiratory Distress Syndrome

Ayşegül Bükülmez<sup>1</sup>, Deniz Kahraman<sup>2</sup>, Osman Öztekin<sup>3</sup>, Ahmet Afşin Kundak<sup>4</sup>, Tülay Köken<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Afyonkarahisar

<sup>2</sup> Sağlık Bakanlığı Metin Sabancı Baltalimanı Kemik Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul

<sup>3</sup> Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Antalya

<sup>4</sup> Sağlık Bakanlığı Dr.sami Ulus Kadın, Doğum Ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hastanesi, Ankara

<sup>5</sup> Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Afyonkarahisar

### Özet

**Amaç:** Son yıllarda preterm bebeklerde sıklıkla izlenen respiratuar distres sendromu'nun (RDS) patogeneğinde metalloproteinazların rolü üzerinde durulmaktadır. Metalloproteinazlar (MMP); ekstrasellüler matriks ve bazal membranın yapısal ve fonksiyonel işlevlerinde rol oynayarak bazı yapısal elemanların yıkımında görev alarak spesifik doku metalloproteinaz inhibitörü (TIMPs) tarafından inhibe edilirler. Önceki çalışmalarda RDS'li preterm hastaların BAL sıvılarında MMP 2-8-9 ve TIMP-2'nin düzeylerindeki değişiklikler gösterilmiştir. Bu çalışmadaki amacımız RDS'li preterm hastalardaki serum örneklerinde MMP 2-8-9 ve TIMP-2 düzeylerini belirlemektir.

**Gereç ve Yöntem:** Gestasyon yaşları yeni ballard skalasına göre 37 haftanın altında RDS tanısı alan 24 hasta çalışma grubunu, solunum sıkıntısı gelişmeyen ve ek sorunu olmayan 21 hasta ise kontrol grubunu oluşturdu. Çalışmaya alınan tüm bebeklerden ilk 48 saat içerisinde 2cc venöz kan örneği alınarak MMP-2, MMP-8, MMP-9 ve TIMP-2 düzeyleri çalışıldı. Çalışma ve kontrol grubunda serum MMP 2-8-9 ve TIMP-2 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

**Sonuç:** Hafif-orta düzey RDS'li hastalarda MMP ve TIMP düzeylerinde değişiklik olmadığını söyleyebilmek için başka çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Respiratuar distres sendromu, Metalloproteinazlar

**Başvuru Tarihi:** 12.03.2012 **Kabul Tarihi:** 12.05.2012

### Abstract

**Introduction and purpose:** Metalloproteinases (MMP) have an increasing attention in the pathogenesis of respiratory distress syndrome (RDS) that is frequently seen in preterm babies. MMPs are included in the structure and function of extracellular matrix and basal membrane and in the destruction of some structural elements. They are inhibited by specific tissue metalloproteinase inhibitor (TIMPs). In previous studies, changes in MMP 2-8-9 and TIMP-2 levels were reported. We aimed to detect MMP 2-8-9 and TIMP-2 levels in serum samples of preterm babies with RDS.

**Material and methods:** Study group was formed by 24 RDS patients under 37 weeks of gestational age according to the new Ballard scale. Twenty-one baby without respiratory distress and any additional problem was established as control group. MMP-2, MMP-8, MMP-9 and TIMP-2 levels were studied in 2 cc blood samples which were collected in the first 48 hours of delivery of all included babies.

**Results:** No significant difference was found between the levels of MMP 2-8-9 and TIMP-2 in study and control groups.

**Conclusion:** Further studies are needed to suggest that there is no difference of MMP and TIMP levels in mild-moderate grade RDS patients.

**Keywords:** respiratory distress syndrome, metalloproteinases

**Application:** 12.03.2012 **Accepted:** 12.05.2012

## Giriş

Preterm bebeklerde sıklıkla izlenen respiratuar distres sendromu'nun (RDS) patogenezi tam olarak aydınlatılabilmiş değildir. Son yıllarda patogenezi metalloproteinazların rolü üzerinde durulmaktadır. Metalloproteinazlar (MMP); ekstrasellüler matriks ve bazal membranın yapısal ve fonksiyonel işlevlerinde rol oynayarak bazı yapısal elemanların yıkımında görev alarak spesifik doku metalloproteinaz inhibitörü (TIMPs) tarafından inhibe edilirler. MMP fonksiyonlarının düzenlenmesinde aktivasyon-inhibisyon arasında hassas bir denge vardır. MMP'ler ve TIMP'ler arasındaki denge hücre matriks bütünlüğünün düzenlenmesinde temel role sahiptir. Bu denge bozulduğu zaman parankim yıkımına bağlı respiratuar distres sendromu başta olmak üzere pulmoner fibrozis, bronsektazi ve astım gibi patolojiler ortaya çıkabilmektedir<sup>1,2</sup>.

Respiratuar distres sendromu gibi akut akciğer hasarlanması sonrası oluşan patolojik durumlarda MMP ve TIMP düzeylerindeki değişikliklerin olduğu yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir. Bu konuda yapılan tüm çalışmalarda MMP ve TIMP düzeylerinin belirlenmesi için bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısı kullanılmakla birlikte bu hastaların hemen hepsi entübasyon gereken ağır RDS'li hastalardır. Entübasyon yada surfaktan ihtiyacı göstermeyen hafif ya da orta düzey RDS'li hastalar ayrıca incelenmemiştir. korioamnionit ve intraventriküler kanama gibi patolojilerde MMP ve TIMP düzeylerinin değişiklik göstermesi, olayın sadece akciğer ile sınırlı olmadığını ve sistemik etkilerinin de olabileceğini göstermektedir<sup>3,4</sup>. Tüm bu nedenlerle serumda MMP ve TIMP düzeyinin belirlenmesinin akciğer hasarının göstergesi olabileceği düşünülmüştür. Bununla birlikte BAL örneği için gerekli olan teknik ve kişisel becerilerden kaynaklanan hataları ve yanlış değerlendirmeleri engelleyebilir.

Önceki çalışmalarda RDS'li preterm hastaların BAL sıvılarında MMP 2-8-9 ve TIMP-2'nin düzeylerindeki değişiklikler gösterilmiştir. Ancak çalışmalardaki BAL örneklerinin dilüsyonel olması bir dezavantaj oluşturduğu bilinmektedir<sup>5</sup>. Bu nedenle bu çalışmayı yapmaktaki amacımız RDS'li preterm hasta grubunun serum örneklerinde MMP 2-8-9 ve TIMP-2 düzeylerinin yol gösterici olup ol-

madığını belirlemektir.

## Materyal ve Metod

Çalışmaya Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi yenidoğan yoğun bakım ünitesi'nde takip ve tedavi edilen, gestasyon yaşları yeni ballard skalasına göre 37 haftanın altındaki bebekler alındı. Çalışma için ailelere bilgi verilerek gönüllü onam formu ve üniversite etik kurulundan etik kurul onayı alındı. Gerekli maddi destek Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonundan sağlandı. Entübasyon gerektirecek kadar solunum sıkıntısı gelişen yada surfaktan alan hastalar, korioamnionitli anne bebekleri, major anomalisi olan bebekler, eşlik eden sistemik hastalığı yada enfeksiyonu olan bebekler değerlendirmeye alınmadı. Belirlenen kriterlere uyan 45 hasta çalışmaya alındı. RDS; inleme, subrasternal çekilme ve takipnesi (solunum sayısının 60/dk üzerinde olması) olan hastalarda akciğer grafi bulguları ile tanımlandı. RDS tanısı alan 24 hasta çalışma grubunu, solunum sıkıntısı gelişmeyen ve ek sorunu olmayan 21 hasta ise kontrol grubunu oluşturdu. Çalışmaya alınan tüm bebeklerden ilk 48 saat içerisinde 2cc venöz kan örneği alındı. Santrifüj edildikten sonra ortalama 1cc plazma elde edildi. Plazma polipropilen tüplerde -20 oC de saklandı. MMP-2, MMP-8, MMP-9 ve TIMP-2 trinity biotech otoanalizatörü kullanılarak enzim immünoassay yöntemi ile Qantikine immünoassay R&D sistemi ile aynı zamanda çalışıldı.

## İstatistik

Sonuçlar ortalama standart sapma (SD) olarak verildi. Grupların MMP 2-8-9 ve TIMP-2 düzeylerinin karşılaştırılmasında bağımsız örneklem t testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık seviyesi olarak p<0.05 seviyesi kabul edildi.

## Bulgular

Çalışma ve kontrol gruplarına alınan hastalar doğum kolları, doğum haftaları, doğum şekilleri, cinsiyetleri ve 1/5 dakika APGAR skorları açısından benzer özellikteydi. Çalışma ve kontrol grubunda serum MMP 2-8-9 ve TIMP-2 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (Tablo-1).

## Tartışma

Respiratuar distres sendromu ve komplikasyonları pre-matür yenidoğanların başlıca sorunu olup yenidoğanlarda mortalite ve morbiditenin de en önemli nedenidir. Yakın dönemde yapılan birçok çalışmada MMP'lerin RDS patogenezinde yer alan doku inflamasyonu ve akciğer hasarı gelişimindeki rolleri tanımlanmıştır.<sup>5-8</sup> Literatürde bronkopulmoner displazi gelişen prematurelerde yenidoğanlarda MMP-9 ve TIMP-1 düzeylerinin sadece BAL sıvısında değil umbilikal kord kanındaki düzeyinin de BPD ile ilişkili olabileceğini göstermişlerdir.

MMP yapı ve fonksiyonları birbirine benzemekle beraber genetik kodlanmaları farklılık gösterir. Günümüzde yaklaşık 20 MMP tanımlanmıştır. Aktiviteleri için çinko iyonuna, inhibisyonları için TIMP'e ihtiyaç duyarlar. Bu etkileşimde denge aktivatörler lehinde ise matrikste yıkım başlar ve bu sürecin en iyi örneklerinden birisi RDS' dir 9. MMPs'ler; kollagenazlar (MMP-3, MMP-8, MMP-13 ve MMP-18), Jelatinazlar (MMP-2, MMP-9), Stromyelizinerler (MMP-3, MMP-7, MMP-10, MMP-11 ve MMP-12) ve membran tip metalloproteinazlar (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 ve MMP-25) olmak üzere dört ana gruba ayrılırlar. Bazı MMP'ler sürekli sentezlenirken (jelatinazlar), bir kısmı ise yalnızca uyarı olduğu zaman sentezlenir (kollagenazlar). MMP'lerin aşırı proteaz etkisi ile doku hasarı oluşturabilmesi nedeni ile proteolitik aktivitelerinin çok iyi düzenlenmesi gerekmektedir.<sup>1,9,10</sup>

MMP-8; polimorfonükleer lökositler tarafından sentezlenir. Granüllerde depolanıp inflamasyon durumlarında salınırlar. Tip I kollagen yıkımında daha aktiftirler. MMP-2 ve MMP-9 ise denatüre kollagenler, fibronektin, elastin ve jelatinleri parçalayabilir. MMP-9 ayrıca Tip IV-V kollajeni de parçalayabilir. MMP-2 vücudumuzda oldukça yaygın bir dağılıma sahiptir. Bir çok hücre kültüründe, düz kas hücrelerinde, fibroblastlar, osteoblastlar ve endotel hücrelerinde sentezlenebilir<sup>11</sup>.

MMP'ları kodlayan genler indüklenebilir veya baskılanabilir. Büyüme faktörleri, sitokinler, bazı kimyasal ajanlar, fiziksel stres ve onkojenik dönüşümler indüksiyon; TGF-B, retinoik asit, steroidler inhibisyon yapabilir<sup>12</sup>.

Dört farklı türü (TIMP-1-2-3-4) içeren TIMPs'ler dokularda bulunan ve MMP'lerin inhibisyonunu düzenleyen en önemli proteinlerdir. Bu sayede MMP etkisi ile oluşan bazal membran ve ekstrasellüler matriks yıkımı engellenmiş olur<sup>13</sup>

Yapılan birçok çalışmada preterm bebeklerde ve akut akciğer hasarı gelişen hastalarda MMP-9 ve MMP-2 düzeylerinin arttığı gösterilmiştir<sup>14</sup> Cederqvist ve ark. surfaktan gerektiren ağır RDS'li bebeklerde MMP-8 düzeyinin yüksek, TIMP -2 düzeyinin düşük olduğunu göstermişlerdir. Bununla birlikte yüksek MMP-8 düzeyleri ile bronkopulmoner displazi gelişimi arasında yakın ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde Sweet ve ark. preterm RDS'li hastalarda MMP-9 düzeyini yüksek bulmuşlardır<sup>3,15</sup>

Schulz ve ark. MMP ve TIMP düzeylerinin preterm bebeklerde intraventriküler hemoraji ve bronkopulmoner displazi gelişimi ile ilişkili olduğunu ve MMP-2 ve MMP-9 düzeylerinin gestasyonel yaştan etkilendiğini bildirmişlerdir.<sup>4</sup>

Ekekezie ve ark. kronik akciğer hastalığı olma riski olan hastalarda ilk hafta içerisinde TIMP-1 seviyesinin düşük, MMP-9/TIMP-1 oranının, TIMP-2 ve MMP-2 seviyelerinin düşük olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte MMP-2/TIMP-2 oranında bronkopulmoner displazi gelişen hastalar ile kontrol grubu arasında önemli bir fark olmadığını belirtmişlerdir.<sup>16</sup>

Birçok çalışmada MMP ve TIMP düzeylerinin bronkopulmoner displazi ve RDS gelişimindeki rolleri araştırılmıştır. Tüm bu çalışmalar sonucunda oldukça farklı veriler ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte genel görüş RDS'li bebeklerde MMP düzeylerinde yükselme, TIMP düzeylerinde ise azalma olduğudur.

Önceki çalışmalarda BAL sıvısının materyal olarak kullanılması akciğer ile ilgili patolojileri daha spesifik göstermesi açısından değerlidir. Bununla birlikte entübasyon yada sürfaktan ihtiyacı olmayan hafif-orta düzey RDS'li hastalarda yapılmış bir çalışma yoktur. Bizim çalışmamız sonucunda hafif-orta düzeydeki RDS'li hastalarda serumda MMP 2-8-9 ve TIMP-2 düzeyleri kontrol grubuna göre

daha düşük bulunmakla birlikte istatistiksel fark saptanmadı. Bu sonuçlara göre bizim çalışmamızda önceki birçok çalışmada bildirilen RDS'li hastalarda MMP düzeylerinde artma ve TIMP düzeyinde azalma saptanmadı. Ağır RDS'li hastaların aksine hafif-orta düzeydeki RDS'li hastalarda MMP ve TIMP düzeylerinde belirgin değişiklik olmadığı söylenebilir. Bununla birlikte MMP 2-8-9 ve TIMP-2 düzeyinin önceki çalışmaların aksine BAL sıvısı yerine serumda belirlenmiş olması da bu sonuçların nedeni olabilir. Literatür taramasında önceki çalışmalarda hafif-orta düzeydeki RDS'li hastalarda BAL sıvısında ya da ağır RDS'li hastalarda serumda MMP 2-8-9 ve TIMP-2 düzeyi çalışmasına rastlanmadı. Bundan dolayı belirlenen MMP 2-8-9 ve TIMP-2 düzeyinin benzer çalışmalarla kıyaslaması yapılamadı. Çalışmamızda çalışma grubunu entübasyon yada surfaktan uygulaması gerektirmeyen düzeydeki RDS'li hastaların oluşturması ve MMP 2-8-9,

TIMP-2 düzeyi belirlenmesinde BAL yerine serum örneğinin kullanılmış olması ileriye dönük yapılacak çalışmalar açısından önemlidir.

RDS'nin inflamatuvar bir süreç olduğu bilinmektedir. Bu hastalarda MMP'lerin sağlam bebeklere oranla daha yüksek oranda olması beklenirken bizim çalışmamızda ve yapılmış diğer çalışmalarda bir biri ile uyumlu olmayan farklı sonuç elde edilmiştir.

Hafif-orta düzey RDS'li hastalarda MMP ve TIMP düzeylerinde değişiklik olmadığını söyleyebilmek için başka çalışmalara ihtiyaç vardır. Bununla birlikte örnek alınmasının getirdiği teknik nedenlerden kaynaklanabilecek hataların engellenmesi ve daha az invaziv olması açısından tanımlanan hasta grubunda BAL sıvısı yerine serum örneği alınmasının daha uygun olacağı kanaatindeyiz.

## Kaynaklar

1. Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999 30;274(31):21491-21494.
2. Fini ME, Cook JR, Mohan R, Brinckerhoff CE. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. In: W.C. Parks and R.P. Mecham, Editors, *Matrix Metalloproteinases*, Academic Press, San Diego, CA (1998), pp299-356
3. Cederqvist K, Sorsa T, Tervahartiala T, Maisi P, Reunanen K, Lassus P, Andersson S. Matrix metalloproteinases-2, -8, and -9 and TIMP-2 in tracheal aspirates from preterm infants with respiratory distress. *Pediatrics.* 2001;108(3):686-92
4. Schulz CG, Sawicki G, Lemke RP, Roeten BM, Schulz R, Cheung PY. MMP-2 and MMP-9 and their tissue inhibitors in the plasma of preterm and term neonates. *Pediatr Res* 2004;55(5):794-801
5. Fukunaga S, Ichiyama T, Maeba S, Okuda M, Nakata M, Sugino N, Furukawa S. MMP-9 and TIMP-1 in the cord blood of premature infants developing BPD. *Pediatr Pulmonol.* 2009 Mar;44(3):267-72.
6. Davies PL, Spiller OB, Beeton ML, Maxwell NC, Remold-O'Donnell E, Kotecha S. Relationship of proteinases and proteinase inhibitors with microbial presence in chronic lung disease of prematurity. *Thorax.* 2010 Mar;65(3):246-51.
7. Bry K, Hogmalm A, Bäckström E. Mechanisms of inflammatory lung injury in the neonate: lessons from a transgenic mouse model of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol.* 2010 Jun;34(3):211-21.
8. Hergueter AH, Nguyen K, Owen CA. Matrix metalloproteinases: all the RAGE in the acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2011 Apr;300(4):L512-5.
9. Corbel M, Boichot E, Lagente V. Role of gelatinases MMP-2 and MMP-9 in tissue remodeling following acute lung injury. *Braz J Med Biol Res.* 2000; 33 (7): 749-754
10. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003;92(8):827-39.
11. Trocmé C, Gaudin P, Berthier S, Barro C, Zaoui P, Morel F. Human B lymphocytes synthesize the 92-kDa gelatinase, matrix metalloproteinase-9. *J Biol Chem.* 1998;273(32):20677-84
12. Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med.* 2008 ;29(5):290-308
13. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol.* 1997 Oct;74(2):111-22.
14. Sweet DG, Curley AE, Chesshyre E, Pizzotti J, Wilbourn MS, Halliday HL, Warner JA. The role of matrix metalloproteinases -9 and -2 in development of neonatal chronic lung disease. *Acta Paediatr.* 2004;93(6):791-796
15. Sweet DG, Wilbourn MS, Warner JA, Howarth P, Halliday HL. Matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid from preterm infants at high risk of developing bronchopulmonary dysplasia. *Biol Neonat* 1998;74:43-56

16. Ekekezie II, Thibeault DW, Simon SD, Norberg M, Merrill JD, Ballard RA, Ballard PL, Truog WE. Low levels of tissue inhibitors of metalloproteinases with a high matrix metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio are present in tracheal aspirate fluids of infants who develop chronic lung disease. *Pediatrics*. 2004;113(6):1709-1714.