

# Matriks Metalloproteinazların İnsan Full Term Plasentasındaki İmmünoreaktivitesi ve Doğumdaki Muhtemel Rollerini

## IMMUNOREACTIVITY OF MATRIX METALLOPROTEINASES IN HUMAN FULL-TERM PLACENTA AND THEIR POSSIBLE ROLES DURING DELIVERY

Ayşe Yasemin DEMİR\*

\*Dr., Maastricht Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Bölümü, Maastricht, HOLLANDA

### Özet

Maternal dokuların invazyonu esnasında fetal trofoblast hücreleri tümör matrikslerine benzeyen bir matriks (matriks-tip fibrinoidi) salgılar. Bu matrikste bulunan matriks metalloproteinazlarının (MMP) trofoblast invazyonu esnasında önemli roller oynadıkları düşünülmektedir. Bu çalışmanın amacı maternal ve fetal dokular tarafından plasentasyon esnasında üretilen diğer matriksler ile trofoblast matriksi arasındaki farklılıkların ortaya konmasıdır. Özellikle bu çalışmada MMP'lerinin dağılımlarına odaklanılmıştır. Fetomaternal ilişkiyi sağlayan insan term plasentasının farklı bölgelerinden doku örnekleri toplandı ve biyokimyasal yöntemler kullanılarak, bu dokulardaki matriks elemanları çok basamaklı bir protokol ile ekstrakte edildi. MMP (MMP-2, -3, -9) aktiviteleri immünohistokimyasal ve jelatin substratlı SDS-PAGE (zimografi) yöntemleri ile gösterildi. Elde edilen sinyaller dansitometrik ölçümler olarak tarandı ve değerlendirildi. Hemen hemen çalışılan tüm örnek dokularda farklı MMP'na ait reaktivite ve aktiviteler saptanmıştır. Bu moleküller değişen oranlarda ve beraber ekstrakte edilebilmişlerdir. MMP-2 için en güçlü reaksiyonlar özellikle trofoblastların, maternal dokuları invaze ettikleri bölgelerde bulunmuştur. Ayrıca MMP-9'un verdiği en yüksek enzimatik aktiviteler fetal ve maternal dokuların temas noktalarında belirlenmiştir. Bu MMP'in doğum esnasında plasentanın uterus duvarından ayrılmasındaki rolüne işaret etmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Plasenta, Ekstravillöz trofoblast, Gebelik, Ekstrasellüler matriks, Metalloproteinaz

T Klin Tıp Bilimleri 2002, 22:354-361

### Summary

During the invasion process, trophoblast cells secrete a tumor-like matrix (matrix-type fibrinoid). Matrix metalloproteinases (MMP) that are present in this matrix, seem to play an important role during trophoblast invasion. The aim of the present study was to analyze the differences between the other types of matrices produced by maternal and fetal tissues and the tumor-like matrix produced by trophoblast. The main concern was focused on the distribution of MMP in the extracellular matrices. Tissue samples were collected from different sites of human term placenta by using biochemistry methods, the expression of MMP were determined. Besides, matrix components of these tissues were extracted with a multi-step extraction protocol. The presence of activities of MMP (MMP-2, -3, -9) were demonstrated by immunohistochemistry and gelatin-substrated SDS-PAGE (zymography). The signals from immunoreactivities and enzymatic activities were detected by scanalytics system. In nearly all tissues reactivities and activities for MMPases were determined. These molecules were co-extracted from all tissues in variable degrees. Strongest reactivities for strongest enzymatic activity for MMP-2 was found, in particular, in areas where invasive fetal trophoblast cells invade maternal tissues. MMP-9 was found to have the highest enzymatic activity in the deepest part of human placenta at the contact region of fetal and maternal part, suggesting the importance of MMP-9 in the separation of placenta from uterine wall during the labor.

**Key Words:** Placenta, Extravillous trophoblast, Pregnancy, Extracellular matrix, Metalloproteinase

T Klin J Med Sci 2002, 22:354-361

### Fetomaternal İlişkiyi Sağlayan Temel Elemanlar

Fetomaternal ilişkiyi sağlayan ve gebelik boyunca hayati önemi olan plasenta ve onun gelişmesi, trofoblastın endometriyum etkileşmesi ve sonuçta invazyonu ile plasentasyon gerçekleşmektedir. Fetal membranların uterus mukozasına tutunması, stabil kontaklar kurarak endometriyumda gelişimine devam etmesi gebelik süreci için önemlidir. Plasenta ve bağlı fetal membranların gelişmesi ya da az gelişmesi gebelik sürecini direkt etkilediği kadar, bu membran yapılarındaki moleküller kompozisyona da etkili olmaktadır (1). Bilindiği üzere

plasental gelişim sırasında, fetal membranlar, ağaç benzeri olan plasental villusları saran disk benzeri membranöz bir kese oluşturur. Bu kesenin kalınlaşması ile termdeki plasentanın diskoidal, villöz ve hemokoriyal yapıları oluşur.

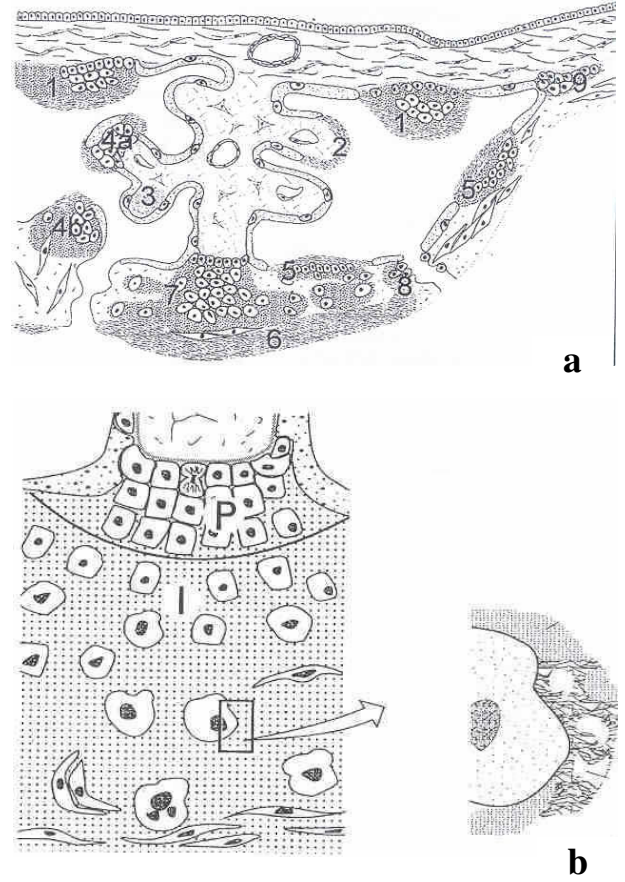
Doğumda spontan olan plasentanın temel öğeleri incelendiğinde, birçok hücre topluluklarının yanısıra term plasentasının klasik rutin kesitlerine bakıldığında, amniyon, koryon leve, koryonik plak, farklı villus tipleri, farklı bölgelerdeki fibrinoid birikimleri, rudimenter hücre kolonlarını içeren rudimenter çapa villuslar (anchoring

villi), hücre adaları, plasental septa, bazal plak ve anne plasentasını oluşturan desidua belirlenir.

Koryonik plak ve koryon leve üzerinde, amniyotik kaviteye doğru yer alıp, tek katlı küboidal veya prizmatik epitelden oluşan amniyon, fetal membranların başında yer alır. Koryonik plak ve koryon levede bulunan trofoblast hücreleri, değişik matrislerle birbirlerinden ayrılırlar. Bu hücreler tarafından salgılanıp içine gömüldükleri bu matrisler matris-tip ve fibrin-tip fibrinoidi olarak adlandırılmaktadırlar (Şekil 1). Maternofetal ve fetomaternal alışverişte (örn. Gaz transferi, ekskretuar, sekretuar, rezorptif, metabolik, katabolik, immünolojik ve hematopoietik değişimler) plasental villuslar en önemli rolü oynarlarken bazı fetal membranların (amniyon ve koryon leve) bu fonksiyonlara katkısı oldukça sınırlıdır (2). Fonksiyon gereği değişik tipte villuslar (stem, çapa, immatür, matür ve terminal) oluşmuştur (3). Diğer taraftan, villus formasyonunda görev almayan trofoblast hücreleri, ekstrasvillöz trofoblast hücreleri (EVT) olarak adlandırılır. Bu hücreler, plasentanın diğer bölümlerinin oluşumu ve gelişmesinde görev alır. Reseptörler, integrinler ve matris molekülleri üzerine yapılmış çalışmalar villus sinsiyumunun tabanını oluşturan sitotrofoblast hücreleri ile EVT kök hücreleri arasında bir fark ortaya koymamaktadır (4). Trofoblastik kök hücreleri buldukları yerde maternal kanla karşılaştıkları zaman sinsisyal bir değişime uğrarlar ve villus sinsisyotrofoblastını oluştururlar. Ancak, bu kök hücreler fibrin veya diğer ekstrasvillöz molekülleri ile karşılaştıkları zaman EVT hücrelerini oluştururlar ve invazif bir fenotip kazanırlar (4).

Koryonik villus ağacının gövdelerini bazal plağa veya hücre kolonları aracılığı ile plasental septaya bağlayan yapılar çapa villuslar veya demirleyici villuslar olarak adlandırılır. Hücre kolonları ise çok tabakalı sitotrofoblastlardan oluşmuş ve kesintili bir sinsisyotrofoblast tabakasıyla çevrelenmiş hücre topluluklarıdır. Koryonik villus ağacından doğarak koryonik plağına tutunmuş hücre kolonları olarak düşünülebilir. Tıpkı hücre kolonlarındaki gibi EVT burada da matris-tip fibrinoidine gömülmüşlerdir.

Fetal plasenta ile maternal dokunun karşı karşıya geldiği birim bazal plaktır, intervillöz boşluğun tabanını oluşturur. EVT, çeşitli endometriyal stroma hücreleri, desidua hücreleri ve uteroplental damarların bir karışımı gibidir. Bazal plağın dip tabakası, Nitabuch'un fibrinoidi olarak adlandırılan, uteroplental fibrinoiddir. Yapıda yer alan fibrinojen, hücrelerin sekresyon ve dejenerasyon ürünleri ile heparansülfat proteoglikanlardan oluşmuştur (5). Bazı fetal membranların (amniyon ve koryon leve) tutunmuş olduğu desidua tabakası, büyük çoğunlukla pariyetal desiduedan türer. Fetal plasentayı, plasental yataktan ayıran bölgede desidua hücreleri, endometriyal stromanın diğer bileşenleri ve trofoblastik elemanların bir karışımı bulunmaktadır.



**Şekil 1.** MMP'lerin analizleri için kullanılan süpernatantların elde edildiği plasental bölgeler ve buralarda yerleşik matris dağılımını gösteren çizim. Plasental bölgenin özelliğine göre isimlendirilmesi yapıldı. a) 1-Koryon plağı ve Langhans çizgisi, 2-Yüzen villus ve perivillöz matris, 3-İntervillöz matris, 4a-Hücre adacığı ve matrisi, 4b-Plasental septa ve septal matrisi, 5-Hücre kolonları ve Rohr çizgisi, 6-Bazal plak ve Nitabuch fibrinoidi, 7-Çapa villusun devamı ve hücre kolonu matrisi, 8-İntramural matrisi, 9-Koryon leve matrisi, b) Şekil (a) da 7 numara ile gösterilen hücre kolonları bölgesinin büyütülmüş çizimi. Bazal plağa invaze olmuş ekstrasvillöz trofoblastın salgıladığı matris tipinin temsili gösterilmesi (Kaufmann ve ark., 1997, Huppertz ve ark. 1998'den değiştirilerek).

Plasentayı fetusa bağlayan göbek kordonu amniyotik epitel ile çevrelenmiş olup merkezdeki bağ dokusuna sıkıca yapıştığı için fetal membranlardan kolaylıkla ayrılamaz. Bağ dokusu (Wharton'un jeli) açık zincir polisakkaridlerden (hiyaluronik asit, glikozil ve mannozil grupları içeren karbonhidrat grupları) ve farklı matris moleküllerinden oluşmuştur (1).

### Matriks Metalloproteinazları (MMP) ve Bunların Doku İnhibitörleri (TIMP)

Son derece invazif tümörlere olan benzerliği ve penetran tabiatı nedeni ile hemokoryal plasentasyonda önemli rolü oynayan normal trofoblast hücreleri psödomalign olarak adlandırılmıştır (6,7). Normal

hamileliklerde trofoblast göçü, ekstrasellüler matrikse siklik tutunma ve ayrılma ile kontrollü bir şekilde yönetilir (8). Bu sürecin elemanlarından biri olarak proteoliz, trofoblast tutunması ve göçü göz önüne alındığı zaman çok sıkı bir şekilde kontrol edilir (7-9).

Sistein ve aspartat proteazları, proteinleri asit pH'da parçalarken intrasellüler proteolitik aktiviteden sorumludurlar. Diğer taraftan serin proteazları ve metalloproteinazlar nötral pH'da aktivite gösterirler ve ekstrasellüler sindirimden sorumludurlar (10). Proteolizin işçileri arasında yer alan metalloproteinaz ailesinin elemanları (Tablo 1), plasental gelişim sırasında trofoblast migrasyonu, trofoblast invazyonu ve doku düzenlenmesinde de rol oynarlar (4,6,11).

MMP olarak domeynlerden oluşmuştur ve kollejanazlar, jelatinazlar, stromelizinler, elastazlar, RXKR membran tipi ve RXKR salgı tipi olmak üzere altı ana gruba ayrılırlar (9,10,12) (Tablo 1). Aktif merkezdeki bir çinko atomu katalitik aktivitelerinden sorumludur. Bu metal, propeptiddeki eşleşmiş sistein rezidüsünü koordine eder. Her enzim amino terminalindeki propeptidde beraber salgılanır ve aktif hale bu bölgenin proteolizi sonucu gelir. Bozulan sistein-çinko ilişkisi sonucu çinko aktif merkezde açıkta kalarak substratlardaki duyarlı bağları hidrolize eder

(9,12,13). Bu proses "cystein switch" olarak adlandırılmaktadır (14).

Son derece potent olan bu endopeptidazların regülasyonunda çeşitli sitokinler, büyüme hormonları, perisellüler ortam, hücre matriks ilişkisi ve ekstrasellüler matriks rol oynar (9). Bu enzimlerin ekstrasellüler aktivasyonlarının kontrolünde endojen inhibitörlerle olan inaktivasyon da oldukça önemlidir. Spesifik doku inhibitörleri olan bu inhibitörler (TIMP-1, -2, -3, -4) metalloproteinazların aktif ve inaktif formlarına sıkı bir şekilde, 1:1 oranında bağlanırlar (9,13,15). TIMP'ların desidual hücreler tarafından in vitro ve in vivo (16) salgılandıkları gösterilmiştir. İnsan EVT hücrelerinin de in vivo TIMP'ları salgıladıkları rapor edilmiştir (17). Huppertz ve ark. (6) matriks metalloproteinazlarının ve inhibitörlerinin EVT hücrelerince salgılandıklarını ve farklılaşma rotaları boyunca ekstrasellüler matriks ile spesifik ilişkilerinin olduğunu göstermişlerdir. Matriks-tip fibrinoidindeki bazal lamina benzeri yamaların MMP-1, -3, -9 ve TIMP-1 ile reaktivite verdikleri; amorf madde benzeri yamaların TIMP-1, -2 ve MMP-9 ile pozitif oldukları bildirilmiştir. İnce fibriller ağimsı yamalarda ise MMP-2, -3 ve -9 immünopozitivite vermiş, MMP-2 ve -3 reaktivitesinin onkofetal ve sellüler fibronektinlerce pozitif

**Tablo 1.** Değişik tarihlerde klonlanmış, genetik şifreleri çözülmüş bilinen bazı MMP ailesini toplu halde gösteren tablo. Substratı bilinmeyenler (?) ile, kolonlanması tartışılanlar da (\*) ile belirtildi.

Subgrup	İsmlendirme	Substrat
Kollajenazlar	-MMP-1 (interstisyel kollajenaz, vertebra kollajenazi, fibroblast kollajenazi) -MMP-8 (PMN kollajenazi) -MMP-13 (kollajenaz-3) Tümör ilintili kollajenaz*	-Çoğunlukla fibriler kollajenler I, II, III, VII, X, jelatin -Kollajen, I, II, III, aggregan kor proteini -Kollajen I -?
Jelatinazlar	-MMP-2 (jelatinaz A, 72kD tip IV kollajenaz, tip IV kollajenaz) MMP-9 (jelatinaz B, 92kD tip IV kollajenaz, tip V kollajenaz)	-Jelatin I, II, III, kollajen IV**, V, VII, X, fibronektin, entaktin Jelatin I & V, kollajen IV & V
Stromelizin	MMP-3 (stromelizin-1, transin, proteoglikonaz, prokollajenaz aktivatörü) MMP-10 (stromelizin-2, transin-2) MMP-7 (matrilizin)	-Fibronektin, laminin, entaktin (?), kollajen III, IV, V, IX, jelatin I, III, IV, V, proteoglikan bağlayıcı protein, MMP-1 ve -9 proformları, prokollajen peptidi -Kollajen III, IV, V, jelatin, I, III, IV, V, fibronektin, proteoglikan Jelatin I, III, IV, V, fibronektin, proteoglikan, prokollajenaz
Elastazlar	MMP-12 (metalloelastaz***)	Entaktin
RXKR membrana bağlanan	MT-MMP-1 (MMP-14) MT-MMP-2, MT-MMP-3****	-MMP-2 proformu -?, -?
RXKR salgılanan	MMP-11 (stromelysin-3)	Alfa-1-antitripsin

fibronektinlere sınırlı olduğu gösterilmiştir. Fibrin-tip fibrinoidinin ise sadece MMP-3 ve -9 ile pozitif oldukları yine aynı çalışmada bildirilmiştir (6).

### Amaç

Bu çalışmada bir tümör matriksi olan ve EVT hücrelerince salgılanan matriks-tip fibrinoidi ile fetal ve maternal kökenli diğer plasental matriksler arasındaki farkların ortaya konması amaçlandı. Bu farklar; trofoblast migrasyonu ve farklılaşmasındaki muhtemel rolleri nedeniyle trofoblast invazyonu esnasında matriks düzenlenmesinde yine muhtemel rolleri nedeniyle matriks metalloproteinazları (MMP-2, MMP-3, MMP-9) ile sınırlandı. Bu proteinlerin biyokimyasal izolasyonları ve pürifikasyonlarında kullanılan yöntemler sonucu elde edilen verilerin anlamlılıkları spesifite açısından tartışılarak, literatürde rapor edilen sonuçların gerçeği ne ölçüde yansıttıkları yorumlandı.

### Materyal ve Metodlar

#### Dokuların Hazırlanması

Vajinal doğum veya sezaryanla sona ermiş hamileliklerden elde edilen plasentalar (n=12) kullanıldı. Buz üzerinde laboratuvara transfer edilen organdan 5-10 g'lık doku örnekleri farklı bölgelerden alındı (Şekil 1a, b). Dokuların bir kısmı immünohistokimyasal reaksiyonlar için parafin ve kriyostat kesitler için uygun rutin protokoller takip edilerek hazırlanırken, bir kısmı da biyokimyasal analizler için ayrıldı ve uygun metodolojik protokoller uygulandı (18). Biyokimyasal analizler için ayrılan doku örnekleri daha sonra tampon içerisinde (PBS,

pH 7.4, %5 sükröz) sıvı nitrojende dondurularak deneylerin başlangıcına kadar -35°C'de saklandı.

#### Ekstraksiyonlar

Plasental doku örneklerinden matriks komponentlerinin ekstraksiyonu buz üzerinde ve diyaliz aşamasına kadar proteaz inhibitörlerinin varlığında uygulandı. Protokolün işleyişi Tablo 2'de verilmiştir.

Birbirini izleyen ekstraksiyon basamakları sayesinde aktif MMP'lerin polimerize durumdaki matriks komponentleri ekstrakte edilebildi. Farklı tamponlar sayesinde farklı özellikler taşıyan proteinler birbirinden ayrılabilir. Farklı tampon solüsyonlarının işlem basamakları Tablo 2'de belirtilmiştir. Protein tayini, jelatin-agaroz kolonu, sodyum dodesil sülfat (SDS)-poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ve Western-Blot, Jelatin substratlı natürel SDS-PAGE (Zimografi) teknikleri uygulandı (18).

### Sonuçlar

Farklı plasental bölgelerde hazırlanmış seri kesitler farklı antikörlerle matriks metalloproteinazlarına (MMP-2, -3, -9) karşı antikörlerle boyanarak reaksiyonlar belirlendi. Ayrıca, bu deneylerin reaksiyon derecelerini ifade eden semikantitatif sonuçlar toplu olarak Tablo 3'de gösterildi.

#### Matriks Metalloproteinazları (MMP-2 ve MMP-9'nun proaktif ve aktif formları)

MMP'nın aktivitesi elde edilen süpernatantlarda zimografi yardımı ile belirlendi. İlk üç ile beş süpernatant belirgin metalloproteinaz aktivitesi gösterirken, son basamakta elde edilen süpernatant daha farklı bir sonuç verdi. Sonuç olarak farklı moleküler ağırlığa sahip olan pro

**Tablo 2.** Farklı fetal membranlar ile plasental dokuların ekstraksiyonu sırasında uygulanan aşamaları gösteren işlemler çizelgesi

Basamaklar	Solüsyonlar	Koşullar
Doku örneklerinin çözülmesi	PBS, pH 7.4, %5 sükröz	Oda sıcaklığı
Santrifügasyon		1000 xg, 15 dakika, 40C
Komple homojenizasyon	Lizis tamponu	5 ml/g pellet
Santrifügasyon		20000 xg, 1 saat, 40C
Peletin resüpsansiyonu	Yıkama tamponu	6-10 ml/g pellet
Santrifügasyon		20000 xg, 1 saat, 40C
Berrak bir süpernatant elde edilinceye kadar son iki basamağın tekrarı		
Pelletin resüpsansiyonu	Lizis tamponu	4-8 ml/g pellet
Santrifügasyon		20000 xg, 30 dakika, 40C
Pelletin resüpsansiyonu	Ekstraksiyon tamponu	6-10 ml/g pellet
İnkübasyon		10 dakika, oda sıcaklığı
Santrifügasyon		50000 xg, 90 dakika, 40C
Süpernatantların dializi	PBS, pH 7.4 (sadece son basamaktan elde edilen süpernatant PBS, pH 7.4, 2M üre, 5mM DTT, 1mM PMSF'de diyalize edildi)	Gece boyunca, 40C
Lizis tamponu:	100mM Tris-maleik asid, pH 6.8, 5mM EDTA, 5mM DTT	
Yıkama tamponu:	Lizis tamponuna ek olarak %2 Triton X-100	
Ekstraksiyon tamponu:	5mM EDTA, 5mM DTT, 10mM etilmaleimid	

Tüm süpernatantlar santrifügasyon basamağından sonra toplandı ve -35°C'de saklandı.

**Tablo 3.** Farklı plasental bölgelere uygulanan MMP-1, MMP-2, MMP-3 ve MMP-9 antikorlarla elde edilen immünoreaktivitelerin semikantitatif olarak belirlenmesi. Değerlendirme işlem: +/-: zayıf reaksiyon, +: pozitif reaksiyon, ++: belirgin reaksiyon, ~: düzensiz reaktivite, \*: belirlenmedi olarak yapıldı. A: amniyon (e: epitel, bm: bazal membran, m: mezenkim), Bp: bazal plak (D: desidua, ET: EVT), Kp: koryonik plak (m: mezenkim, ET: EVT), KI-ET: koryon levedeki ekstrasvillöz trofoblastlar, Ha-ET: hücre adalarındaki EVT, Hk-ET: hücre kolonlarındaki EVT, V: değişik tipteki villuslar (Çv: çapa villuslar, kç: küçük kalibrasyondaki villuslar, by: büyük kalibrasyondaki villuslar, s: stroma, tk: trofoblastik kabuk, bya: büyük arter duvarları).

Antikor	Farklı plasental bölgeler														
	A			Bp		Kp		KI ET	Ha ET	Hk ET	V				
	e	bm	m	D	ET	m	ET				Çv	kç	by		
													s	tk	bya
MMP-1	+/-	*	+/-	+	+	++	+	+	+	*	*	*	+	+	+
MMP-2	+/-	*	+/-	+	+	++	+	+	+	*	*	*	+	+	+
MMP-3	+/-	*	++	+	+	++	+	+	+	*	*	*	+	*	+
MMP-9	+/-	*	++	+	+	++	+	+	+	*	*	*	+	+	*

ve aktif formlar birbirlerinden ayrılarak analiz edilebilmektedir.

Dansitometrik analizler esnasındaki hesaplamalar tüm ekstraktlarda MMP-2'in aktif formunun ve MMP-9'un proformunun belirgin bir şekilde tespit edilebildiğini, diğer taraftan MMP-2'nin proformunun ve MMP-9'un aktif formunun daha zor gözlenebildiğini ortaya koydu. Dolayısıyla kıyaslamalar MMP-2'nin aktif formu ve MMP-9'un pro formu dikkate alınarak yapıldı.

#### **Farklı Plasental Bölgelerde Belirlenen Matriks Metalloproteinazları**

Farklı bölgelerden izole edilmiş MMP'nı karşılaştırabilmek için tüm ekstraksiyonların ilk süpernatantı bir jele uygulandı ve bu jel üzerinde ortak olarak değerlendirildi. Zimogramlardaki metalloproteinaz aktivitesi (Şekil 2A-C); jeldeki jelatinin enzimatik olarak sindirilmesi ve bu bölgelerdeki jelin boya ile görüntülenmesi esnasında boya almayan bölgeler olarak kendisini göstermesi ile belirlendi. Hesaplanan değerlerin ters çevrilmesi ile pozitif yoğunlukların ortalaması elde edilmiş olup bu değerler direkt olarak jeldeki MMP aktivitesi korele idi (Tablo 4).

MMP-2'nin aktif formunun verdiği yoğunluklar en yüksek olarak koryon leve ve desiduada tespit edildi. Bazal plak, Nitabuch'un fibrinoidi ve villus dokusunda ise ekstrakte edilebilen MMP-2 içeriği az önce belirtilen bölgelerle kıyaslanınca oldukça kısır bulundu (Tablo 4).

MMP-9'in proformu Nitabuch'un fibrinoidinde diğer bölgelerle kıyasla en yüksek değerde saptandı. Nitabuch'un fibrinoidinde tespit edilen yoğunluk maksimal değer olup %100'e çevrildiğinde diğer bölgelerden tespit edilen değerler %20'nin altında ve birbirlerine oldukça yakın değerlerde seyrettiler (Tablo 4). Bu analizlerin istisnası göbek kordonu olup hemen hemen hiç MMP-9 aktivitesi tespit edilemedi.

#### **Aynı Plasental Bölgeden Elde Edilen Farklı Süpernatantlardaki Matriks Metalloproteinazların (MMP-2 ve MMP-9) Aktivitesi**

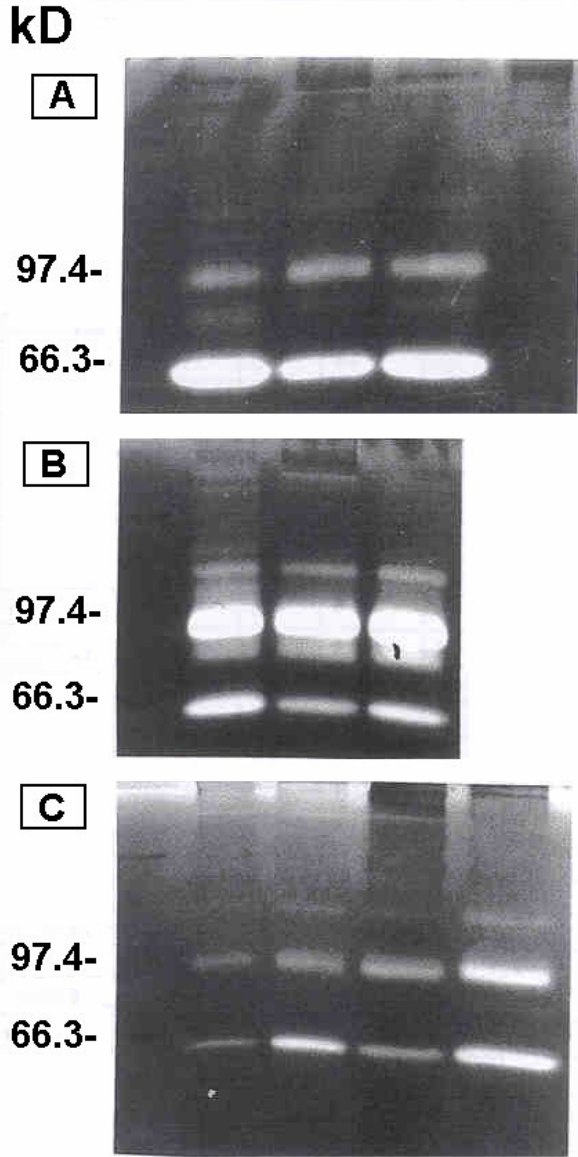
Bu deneylerde bir ekstraksiyon esnasındaki farklı süpernatantlar aynı jel üzerinde ayrıldı ve kıyaslamalar bu jel üzerinde yapıldı. Elde edilen değerler yoğunluk hesaplamalarındaki farklılıklar nedeni ile birbiri aralarında kıyaslanamamaktadır. MMP-2'nin aktif formu farklı oranlarda ekstrakte edilebildi. Örneğin, koryon levede her üç süpernatantta hemen hemen aynı miktarda iken (Şekil 2A), Nitabuch'un fibrinoidinde ilk süpernatantta en fazla aktivite gözlemlendi. Villus dokusundan yapılan ekstraksiyon sırasında daha farklı bir tablo gözlemlendi.

MMP-9'un proformunda her üç bölgede uygulanan ekstraksiyon aşamalarında benzer bir eğilim gözlemlendi; ilk süpernatantlar en az miktardaki enzim aktivitesi süpernatant sayısının artmasına paralel olarak arttı. Bu eğilim, koryon leve (Şekil 2A), Nitabuch'un fibrinoidi (Şekil 2B) ama özellikle villus dokusundan (Şekil 2C) elde edilen ekstraktlar için geçerli idi.

#### **Tartışma**

Hamilelik sırasında endometriyumda meydana gelen büyük miktarlardaki bağ dokusu degradasyonu ve anjiyogenez derecesi, metalloproteinazları ve inhibitörleri arasındaki dengenin değişmesine bağlıdır. Özellikle MMP'nin trofoblast büyümesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (19). Trofoblast hücrelerinin metalloproteinazları sekrete ettikleri bilinmektedir; MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MT-MMP-1 (20-22).

Amniyon epitelinin ve mezoderminin MMP-2, -3 ve -9 ile immünreaktif olduklarını gösteren bu çalışmanın sonuçları daha önceki çalışmalarla paraleldir (23). Amniyon ekstraktlarındaki aktif MMP-2 ve pro-MMP-9



**Şekil 2.** Aynı plasental bölgelerden yapılan ekstraksiyon sırasında farklı süpernatantlardaki sırasıyla MMP-2'nin aktif formunun ve MMP-9'un proformunun jelatinolitik aktivitesinin gösterimi (A): koryon leve, (B): Nitabuch'un fibrinoidi, (C): Villus dokusu.

varlığı zimogramlarda belirlenmiştir. Doğum sonrası fetal membranlardan hazırlanan ekstraktlarda MMP-2 ve MMP-9 aktivitesinin olduğu ve doğumla beraber bu proteinin arttığını göstermişlerdir (18). Ayrıca, amniyonik mezenkim hücrelerinin TIMP-1 için primer kaynak olduğu (23) ve amniyonik epitel ile beraber mezenkim hücrelerinin potansiyel olarak TIMP-2 ürettikleri rapor edilmiştir (23). Tüm bu kaynak bilgiler kadar bu çalışmanın sonuçları da MMP'nin doğum esnasında amniyonda degradatif yolların aktivasyonunda önemli roller oynadıklarını ortaya koymaktadır.

Bazal plakta plasentanın tutunmasına katkı yapan çapa villusların stroması, trofoblastik hücre kolonları, daha derin bölgelerdeki EVT ve desidua hücreleri MMP-2, -3 ve -9 antikorları ile pozitif reaksiyon vermiştir. Ayrıca, bazal plak ekstraktlarında diğer ekstraktlara kıyasla aktif MMP-2 ve pro-MMP-9 zayıf sinyaller halinde belirlenmiştir.

Ayrıca Huppertz ve ark. (6) termdeki plasentalarda, hücre kolonlarındaki ve EVT'nin çevresindeki matriks ile beraber MMP-2, MMP-3 ve MMP-9 antikorları ile immünoreaktif olduğunu ve MMP-2 reaktivitesinin desidua hücrelerinde de olduğunu göstermişlerdir.

Ayrıca, diğer bazı çalışmalarda, MMP-2 ve MMP-9 ve MT-MMP-1 (pro-MMP-2 aktivatörü) hücre kolonlarındaki EVT'nde ve erken hamilelikteki plasental yatak desidua hücrelerinde de in situ hibridizasyon ve immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir (11,20). Ancak, MMP-2 ve MT-MMP-1 ekspresyonu, desidua'daki invazif EVT'nde terme kadar sürerken, MMP-9 ile yapılan deneyler yukarıda belirtilen kaynak bilgileri desteklemektedir. Ayrıca, TIMP-1, TIMP-2 ve TIMP-3 maternal desidua hücrelerce de sekrete edildikleri gösterilmiştir. Özellikle TIMP-1 mRNA'sı desidua hücrelerinde 3. trimesterde, 1. trimestere kıyasla, daha fazla miktarlarda bulunmuştur (11,16,17). Desidua hücrelerinin yanı sıra EVT'de TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 sekrete etmektedir (6).

Koryonik mezoderm ve koryonik plaktaki EVT'de yapılan immünohistokimya da her üç MMP antikorunu (MMP-2, -3, -9) ile pozitif sonuç vermiştir. Özellikle EVT'nin sitoplazmaları ve ekstrasellüler matrikslerinde immünoreaktivite belirgin olup, daha önceki bulgularla uyumludur (6,11,20).

Koryonik plak ekstraktlarından yapılan zimografilerde aktif MMP-2 oldukça belirgin olup, pro-MMP-9 az çok görülebilir durumda idi. Bu sonuçlardan yola çıkarak immünohistokimyada bulunan reaktivitelerin MMP-2'nin aktif formu ile MMP-9'un proformuna aittir. MMP-3'ün aktif ve proformları hakkında spekülasyon yapmak negatif kazein zimografileri nedeni ile oldukça zordur.

Desidua hücreleri MMP-2, -3 ve -9'un pro ve aktif formları ile immünoreaktivite vermekte ve hamile endometriyumunun MMP-2, -3 ve -9 ürettiğini göstermektedir (20). Buna karşın Qin ve ark. (23) fetal membranlardaki desiduanın MMP-3 ile pozitif olmadığını rapor etmişlerdir. Çalışmamızda hazırlanan desidua ekstraktlarında hem aktif MMP-2 hem de pro-MMP-9 belirlenmiştir. Pro-MMP-2 ve aktif MMP-9 daha düşük seviyelerde idi.

Diğer taraftan, desidua TIMP'lerin dağılımı ve görevleri tartışılmıştır (11,23,24). Daha özel olarak TIMP-2 ve TIMP-3 (16) desidua'da lokalize olurlarken, TIMP-

**Tablo 4.** Farklı ekstraktlardan yapılan farklı süpernatantlardaki MMP-2 (aktif formu) ve MMP-9 (proform) aktivitesinin kıyaslanması. Süpernatantların hepsi (L veya Y-1 veya Y-2) aynı zimogramda ayrıştırıldığı için hesap edilen değerlerin birbirleri ile kıyaslanması mümkün olmaktadır. Bu taloda dikey olarak değerleri kıyaslamak mümkündür. Değerler triple ölçümler sonucunda elde edilmiş ortalamalardır. Süpernatantların elde edilmesinde kullanılan tamponlar şöyledir; L: Lizis tamponu ile elde edilmiş süpernatant, Y: Yıkama tamponu ile elde edilmiş süpernatantlar, L\*: Yıkama tamponundan sonra tekrar lizis tamponu ile yapılan uygulamadan elde edilen süpernatant.

	MMP-2'nin aktif formu			MMP-9'un proformu		
	L	Y-1	Y-2	L	Y-1	Y-2
Amniyon	4.58	7.87	3.69	0.83	1.35	0.58
Bazal plak	3.24	1.68	3.11	1.20	1.27	3.19
Koryonik plak	3.57	7.21	12.95	1.18	1.84	3.35
Desidua	9.22	10.26	17.86	2.15	3.44	3.38
Koryon leve	7.22	8.74	18.93	0.93	2.09	3.25
Nitabuch'un fibrinoidi	3.96	2.99	3.84	8.42	17.82	36.25
Göbek kordonu	4.27	7.19	16.19	0.01	0.01	0.01
Villus dokusu	0.63	2.80	1.89	0.71	0.97	1.32

1'in belirlenemeyecek ölçülerde olduğu ileri sürülmüştür (23). Son raporun tersi olarak bazı araştırmacılar (24) TIMP-1'in term desiduada dramatik olarak arttığını göstermişlerdir. Desidual hücrelerce metalloproteinazların ve inhibitörlerinin eksprese edilip salgılanması bu hücreler ile EVT arasında muhtemel bir kooperasyon olduğunu göstermektedir. Sadece invazyon gösteren trofoblast hücrelerinin değil de invaze edilen dokunun da metalloproteinazları eksprese ettiği paradoksal görünse de placentasyonda anahtar rol oynadığı bilinmektedir (25).

Aktif doğum esnasında doğumdan hemen önce MMP-3 ve MMP-9 gen seviyelerinin belirgin bir şekilde yükseldiği, spontan doğumun hemen ardından tPA ve TIMP-1 mRNA'sının belirgin olarak arttığı ve koryon-desidua birleşim bölgesinde MMP-1 ve MMP-2 genlerinin marjinal olarak arttığı gösterilmiştir (25,26). Koryon leve trofoblastında MMP-9 mRNA'sı ve proteini, koryonik matrikste MMP-3 ve (23,27), TIMP-1 ile immünoreaktiviteler bildirilmiştir.

Ekstraktlarımızda koryon levede yapılan zimogramlar aktif MMP-2 belirgin bir şekilde gösterilebilirken, pro-MMP-9 ve aktif-MMP-9 daha düşük seviyelerde belirlenebilmiştir. Bu sonuçlarımız önce bildirilenlerle aynı paralellikte değildir.

Huppertz ve ark. (6) Nitabuch'un fibrinoidinin MMP-3 ve MMP-9 antikoru ile immünoreaktif olduğunu göstermiştir. Diğer taraftan sitotrofoblastça MMP-9 sentezini gelişimsel olarak regüle edildiği ve hamilelik sırasında azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca zimogramlardan elde edilen sonuçlar aktif-MMP-2 aktivitesinin çok dominant olduğunu gösterirken, MMP-9 aktivitesi ekstratlarda tespit edilememiştir.

Matriks metalloproteinazları (MMP-2, -3, -9) ve inhibitörlerinin (TIMP-1, -2, -3) hem yüzen hem de kök villide varlığı bildirilmiştir (11). Polette ve ark. (20) ve Nawrocki ve ark. (11) 3. trimester yüzen (floating) villide MMP-2 ve MMP-9'un yanısıra TIMP-1, -2, -3 ekspresyonunu rapor etmişlerdir. Bu araştırmalara göre, MMP-2, TIMP-1 ve TIMP-3 villusların stromal komponentlerinde lokalize olmuşlarken, TIMP-2 villuslardaki trofoblast hücrelerinde yaygındır. Ayrıca, yine bu çalışmalarda, 1. trimesterdeki yüzen villi trofoblast hücrelerinde MMP-9 sinyali belirlenebilirken, 3. trimester trofoblast hücrelerinde bu ekspresyonun ortadan kalktığı bildirilmiştir.

Sunulan çalışmanın sonuçlarında, villus stromasında önceki raporlara paralel olarak MMP-2, -3, -9 reaktiviteleri belirlenmiştir. Ancak, termdeki villuslarda MMP-9 varlığı bizim çalışmamızda gösterilememiştir. Benzer şekilde, villuslardan hazırlanan ekstraksiyonlarda da aktif MMP-2 ve pro MMP-9 aktivitesi düşük sinyaller vermiştir. Bu sonuçlarımızla yukarıda belirtilen verileri aynı paralellik içinde paylaşmak pek mümkün görünmemektedir.

Bunlara ek olarak, daha önceki çalışmalar, villus sinsisyotrofoblastında diğer matriks metalloproteinaz ailesi üyelerinin (MMP-1, MMP-11) ve serin proteaz sisteminin (uPA, PAI-1 ve -2) varlığını göstermiştir (19). Ayrıca, metalloproteinazlarla birlikte, maternal ve fetal kan değişimi sırasında solute transferini azaltacak olan aşırı düzeylerde perivillöz fibrin depolanmasının engellenmesinde de muhtemelen rol oynayabileceği kanaatini vermektedir.

Bu araştırmanın sonuçları, MMP'lerin TIMP'ler ile birlikte villus organizasyonunda, gelişmesinde,

matürasyonunda ve ekstrasellüler matris düzenlenmesinde önemli roller oynadığını ortaya koymaktadır.

### KAYNAKLAR

1. Benirschke K, Kaufmann P. Pathology of the human placenta, 3rd ed. New York: Springer, 1995.
2. Kaufmann and Scheffen I. Placental development: in neonatal and fetal medicine-physiology and pathophysiology. Polin R, Fox W, eds. Saunders, Orlando, FL, 1997: 1:45-55.
3. Demir R, Kosanke G, Kohnen G, Kertschanska S, Kaufmann P. Classification of human placental stem villi: structural and functional aspects-a review. *Microsc Res Tech* 1997; 38:29-41.
4. Kaufmann P, Castellucci M. Extravillous trophoblast in the human placenta. *Trophob Res* 1997; 10:21-65.
5. Sutcliffe RG, Davies M, Hunter JB, Waters JJ, Parry JE. The protein composition of the fibrinoid material at the human uteroplacental interface. *Placenta* 1982; 3:297-308.
6. Huppertz B, Kertschanska S, Demir AY, Frank HG, Kaufmann P. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. *Cell Tissue Res* 1998; 291:133-48.
7. Strickland S and Richard WG. Invasion of the trophoblast. *Cell* 1992; 71:355-7.
8. Damsky CH, Librach C, Lim KH, Fitzgerald ML, McMaster MT, Janatpour M, Zhou Y, Logan SK, Fisher SJ. Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development* 1994; 120:3657-66.
9. Ray JM, Stetler-Stevenson: The role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J* 1994; 7:2062-72.
10. Cawston TE. Proteinases and inhibitors. *Br Med Bull* 1995; 51:385-401.
11. Nawrocki B, Polette M, Marchand V, Maquoi E, Birembaut P. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during human placental development. *Trophob Res* 1997; 10:97-113.
12. Stetler-Stevenson WG. Dynamics of matrix turnover during pathological remodelling of the extracellular matrix. *Am J Pathol* 1996; 148(5):1345-50.
13. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5:891-7.
14. Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4:197-250.
15. Bigg HF, Shi YE, Liu YE, Steffensen B, Overall CM. Specific, high affinity binding of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) to the COOH-terminal hemopexin-like domain of human gelatinase A. TIMP-4 binds progelatinase A and the COOH-terminal domain in a similar manner to TIMP-2. *J Biol Chem* 1997; 272:15496-500.
16. Marzusch K, Ruck P, Dietl JA, Horny HP, Kaiserling E. Immunohistochemical localization of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) in first trimester human placental decidua. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996; 68:105-7.
17. Ruck P, Marzusch K, Horny HP, Dietl J, Kaiserling E. The distribution of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) in the human placenta. *Placenta* 1996; 17:263-6.
18. Demir-Weusten AY. Extrazelluläre Matrices in der reifen menschlichen Placenta: Verteilung von Fibronectin-Isoformen und Matrixmetalloproteinasen (Ph.D. Thesis). RWTH Universität, Medizin Fakultät, Aachen, Germany, Juni, 1999.
19. Maquoi E, Polette M, Nawrocki B, Bischof P, Noel A, Pintiaux A, Santavica, Schaaps JP, Pijnenborg R, Birembaut P, Foidart JM. Expression of stromelysin-3 in the human placenta and placental bed. *Placenta* 1997; 18:277-85.
20. Polette M, Nawrocki B, Pintiaux A, Massenet C, Maquoi E, Volders L, Schaaps JP, Birembaut P, Foidart JM. Expression of gelatinases A and B and the tissue inhibitors by cells of early and term human placenta and gestational endometrium. *Labor Invest* 1994; 71:838-46.
21. Brenner CA, Adler RR, Rappolee DA, Pedersen RA, Werb Z. Genes for extracellular matrix-degrading metalloproteinases and their inhibitor, TIMP, are expressed during early mammalian development. *Genes Dev* 1989; 3:848-59.
22. Behrendtsen O, Werb Z. Metalloproteinases regulate parietal endoderm differentiating and migrating in cultured mouse embryos. *Dev Dyn* 1997; 208:255-65.
23. Qin X, Chua PK, Ohira RH, Bryant-Greenwood GD. An autocrine/paracrine role of human decidual relaxin II. Stromelysin-1 (MMP-3) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1). *Biol Reprod* 1997; 56:812-20.
24. Lala PK, Hamilton GS. Growth factors, proteases and protease inhibitors in the materno-fetal dialogue 1996; 17:545-55.
25. Graham CH, McCrea KR, Lala PK. Molecular mechanisms controlling trophoblast invasion of the uterus. *Trophoblast Res* 1993; 7:237-50.
26. Bryant-Greenwood GD, Yamamoto SY. Control of peripartal collagenolysis in the human chorion-decidua. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172:63-70.
27. Qin X, Garibay-Tupas J, Chua PK, Cachola L, Bryant-Greenwood GD. An autocrine/paracrine role of human decidual relaxin I. Interstitial collagenase (MMP-1) and tissue plasminogen inhibitor. *Biol Reprod* 1997; 56:800-11.

**Yazışma Adresi:** Dr. Ayşe Yasemin DEMİR-WEUSTEN  
Maastricht Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Kadın Hastalıkları ve Doğum Bölümü  
Maastricht, HOLLANDA