T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA DOĞUM ZAMANINI BELİRLEMEK İÇİN SERVİKS MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-2 (MMP-2), MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-8 (MMP-8) VE MATRİKS METALLOPROTEİNAZ DOKU İNHİBİTÖRÜ-1 (TIMP-1) ENZİMLERİNİN GEN EKSPRESYONLARININ TOPOGRAFİK OLARAK QF-PCR İLE İNCELENMESİ

Göksu ŞENER

TIBBİ BİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI
Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ

ADANA-2025

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA DOĞUM ZAMANINI BELİRLEMEK İÇİN SERVİKS MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-2 (MMP-2), MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-8 (MMP-8) VE MATRİKS METALLOPROTEİNAZ DOKU İNHİBİTÖRÜ-1 (TIMP-1) ENZİMLERİNİN GEN EKSPRESYONLARININ TOPOGRAFİK OLARAK QF-PCR İLE İNCELENMESİ

Göksu ŞENER

TIBBİ BİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI
Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından TYL-2024-16603 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

ADANA-2025

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim sürecimde bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren danışman hocalarım Sayın Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI'na ve Sayın Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ'a sabrı, destekleri ve yardımları için sonsuz şükranlarımı arz ederim.

Yüksek lisans eğitimime katkıda bulunan Ç.Ü Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nın saygıdeğer öğretim üyeleri Prof. Dr. Davut ALPTEKİN'e, Prof. Dr. Osman DEMİRHAN'a, Prof. Dr. Ümit LÜLEYAP'a, Öğr. Gör. Dr. Sabriye KOCATÜRK SEL'e ve bütün anabilim dalı çalışanlarına, aktardıkları bilgi birikimi ve değerli yönlendirmeleri için minnettarım.

Yüksek lisans eğitim sürecimde maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, tezimin gerçekleşmesi için sürecin en başından sonuna dek her türlü imkan ve desteği sağlayan, Ç.Ü Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nın kıymetli öğretim üyesi, Sayın Prof. Dr. Selim BÜYÜKKURT'a en derin saygılarımı sunuyorum.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana rehberlik eden, mesleki duruşlarıyla örnek aldığım Arş. Gör. Dr. Nermin Seda ILGAZ'a ve Dr. Hale ÖKSÜZ'e ve deneyim ve desteklerini esirgemeyen Doktora öğrencisi Gamze GİZİR, Buket KALFA ve arakadaşım Ezgi Damla YILMAZ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez sonuçlarımın analizi aşamasında desteğini esirgemeyen Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesinin değerli öğretim üyesi, Dr.Öğr. Üyesi Lütfiye ÖZPAK'a çok teşekkür ederim.

Yüksek Lisans eğitimim boyunca her zaman yanımda olan çok değerli aileme ve dostlarıma, en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
ÇİZELGELER DİZİNİ v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ vi
ÖZET vii
ABSTRACT viii
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 5
2.1. Dişi Üreme Sisteminde Serviks 5
2.2. Ekstrasellüler Matriks (ESM) 9
2.2.1. Glikozaminoglikanlar (GAG) 9
2.2.1.1. Sülfatlanmış Glikozaminoglikanlar 10
2.2.1.1.1. Proteoglikanlar 10
2.2.1.2. Sülfatlanmamış Glikozaminoglikan 11
2.2.2. Fibröz proteinler 11
2.2.2.1. Kolajen 11
2.2.2.1.1. Kolajen Metabolizması 13
2.2.2.2. Elastin 14
2.2.3. ESM'nin Yeniden Düzenlenmesi 14
2.3. Matriks Metalloproteinazlar (MMP) 15
2.3.1. Matriks Metalloproteinzların Moleküler Yapısı 16
2.3.2. Kolajenazlar 18
2.3.2.1. Matriks Metalloproteinaz 8 (MMP-8) 18
2.3.2. Stromelizinler 18
2.3.3. Jelatinazlar 19
2.3.3.1. Matriks Metalloproteinaz-2 (MMP-2) 19
2.3.4. Membran Tip Matriks Metalloproteinazlar 21
2.3.5. Sınıflandırılmayan Matriks Metalloproteinazlar 21
2.3.6. Matriks Metalloproteinaz Enzimlerinin Düzenlenmesi 21

2.3.6.1. Transkripsiyonla Düzenleme 21
2.3.6.2. Proenzimin Aktif Hale Getirilmesiyle Düzenleme 22
2.4. Gebelikte Serviksin Yeniden Şekillenme Süreci 25
2.5. Prematür Servikal Olgunlaşma 28
3. GEREÇ VE YÖNTEM 29
3.1. Sıçan Servikslerinin Temini ve Gruplandırılması 29
3.2. Serviks Dokularından RNA İzolasyonu 32
3.3. cDNA (Komplementer DNA Zincir) Sentezi 33
3.4. Gerçek Zamanlı Kantitaif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) 34
3.5. İstatistiksel Analiz 35
4. BULGULAR 36
4.1. Serviks Matriks Metalloproteinaz – 2 (MMP-2) Geninin Topografik Gen Ekspresyon Düzeyi 38
4.2. Serviks Matriks Metalloproteinaz –8 (MMP-8) Geninin Topografik Olarak Gen Ekspresyon Düzeyi 39
4.3. Serviks Mariks Metalloproteinaz Doku İnhibitörü – 1 (TIMP-1) Geninin Topografik Olarak Gen Ekspresyon Düzeyi 40
5. TARTIŞMA 42
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 47
KAYNAKLAR 48

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No **Sayfa**

Şekil 1. Üreme sisteminde serviksin anatomik konumu [26] 5
Şekil 2. Serviks anatomisi 6
Şekil 3. Türler arasında serviks ve uterusun anatomik yapısının şematik gösterimi..... 7
Şekil 4. Hematoksilen ve eozinle boyanmış normal insan serviks kesiti.. 8
Şekil 5. Proteoglikanların lokasyon ve bağlanma bölgelerinin gösterimi [14]..... 10
Şekil 6. Tip IV Kolajen Protomer Yapısı [21]..... 12
Şekil 7. Kolajen fibrillerinin oluşumu [63]..... 12
Şekil 8. İnsan serviksinde kolajen fibril dağılımının şematik gösterimi [26] 13
Şekil 9. Kolajenaz tarafından kolajenin yıkımı [28]..... 14
Şekil 10. MMP bölgelerinin şematik gösterimi [39] 17
Şekil 11. MMP-1'nin katalitik bölgesi 17
Şekil 12. ProMMP-2'nin Yapısı. 20
Şekil 13. ProMMP-2'nin aktivasyonu 20
Şekil 14. TIMP-1'in yapısı ve metalloproteinaz etkileşim bölgeleri 23
Şekil 15. Serviksin Dilatasyonu [3] 25
Şekil 16. Gebelikte servikal kolajen çapraz bağların değişimi [9]..... 27
Şekil 17. Gebeliğin 15. gününde olan sıçan 30
Şekil 18. Gebeliğin 20. gününde olan sıçan 30
Şekil 19. Uterus boynuzunun yukarı mesanenin aşağı çekilmesiyle serviks dokusunun tespiti 31
Şekil 20. Serviksin diseksiyonu. 31
Şekil 21. Serviksin eksternal ve internal yönü tespit edilerek simetrik iki eş parçaya ayrılması 32
Şekil 22. Onbeşinci gün Portio Supravaginalis, 20. gün Portio Vaginalis ve 20. gün Portio Supravaginalis bölgelerinde MMP-2 geninin ekspresyon seviyesinin katlı değişimi.. 39
Şekil 23. Onbeşinci gün Portio Supravaginalis, 20. gün Portio Vaginalis ve 20. gün Portio Supravaginalis bölgelerinde MMP-8 geninin ekspresyon seviyesinin katlı değişimi.. 40
Şekil 24. Onbeşinci gün Portio Supravaginalis, 20. gün Portio Vaginalis ve 20. gün Portio Supravaginalis bölgelerinde TIMP-1 geninin ekspresyon seviyesinin katlı değişimi. 41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge No **Sayfa**

Çizelge 1. cDNA sentez karışım içeriği ve bir örnek için kullanılan hacim miktarları . 33
Çizelge 2. cDNA ısı döngüleri ve süreleri 34
Çizelge 3. RT-PCR reaksiyon bileşenleri ve bir örnek için kullanılan hacim miktarları 34
Çizelge 4. RT-PCR ısı döngüleri ve süreleri 34
Çizelge 5. Primer Listesi 35
Çizelge 6. RNA konsantrasyon ve absorbans değerleri 36
Çizelge 7. Tüm gruplara ait ortalama Ct değerleri 38
Çizelge 8. Tüm gruplara ait standart sapma değerleri 38

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µg: Mikro gram

µL: Mikro litre

cDNA: Komplementer DNA

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

EO: Eksternal Os

ESM: Ekstrasellüler Matriks

GAG: Glikozoaminoglikan

GPI: Glikozilfosfotidil inozitol

HA: Hyalüronik Asit

Ig: İmmünoglobulin

IO: İnternal Os

LOX: Lizil Oksidaz

MMP: Matriks Metalloproteinaz

mRNA: Mesajcı RNA

MT-MMP: Membran Tip Matriks Metalloproteinaz

nG: Nano gram

PG: Proteoglikan

PLOD: Lizil hidroksilaz

PS: Portio Supravaginalis

PV: Portio Vaginalis

RT-PCR: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

THBS2: Trombospondin 2

TIMP: Matriks Metalloproteinaz Doku İnhibitörü

TNC: Tenascin C

ÖZET

Sıçanlarda Doğum Zamanını Belirlemek İçin Serviks Matriks Metalloproteinaz-2 (MMP-2), Matriks Metalloproteinaz-8 (MMP-8) ve Matriks Metalloproteinaz Doku İnhibitörü-1 (TIMP-1) Enzimlerinin Gen Ekspresyonlarının Topografik Olarak QF-PCR ile İncelenmesi

Doğumun zamanında gerçekleşmesi, gebelik sürecinde üreme sistemindeki bütün organlarda meydana gelen fizyolojik değişimlerin normal sürecinde ve koordinasyonlu ilerlemesiyle olmaktadır. Bu fizyolojik değişimlerin anormal gelişmesi preterm veya postterm doğumların meydana gelmesi ile sonuçlanabilmektedir.

Serviks, doğuma dek kapalı kalarak fetüsün anne rahminde tutulmasına destek olurken, aynı zamanda doğumun gerçekleşebilmesi için yeniden şekillenme süreci geçirmelidir. Serviks dokusu, hücrelerden ve daha çok bağ doku elemanlarından oluşan heterojen yapıdadır. Servikal ekstraselüler matrikste (ESM) en çok bulunan protein olan kolajenin gebelik süresince metabolik aktivitesinin anlaşılması doğum zamanının belirlenmesinde önemli olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada daha önce deneye girmemiş ve çiftleşmemiş, 90 günlük, ortalama ağırlıkları 200-250g olan Rattus norvecigus türü, wistar albino cinsi, 10 adet gebeliğin 15. gününde, 10 adet gebeliğin 20. gününde olmak üzere toplamda 20 adet sıçan kullanılmıştır. Elde edilen serviks örneklerinin bölgesel olarak araştırmak üzere her örnek Portio Vaginalis ve Portio Supravaginalis bölgelerine ayrılarak deney grupları oluşturuldu. Her örneğin, MMP-2, MMP-8, TIMP-1 ve ACTB genlerinin ekpresyon düzeyleri QF-PCR ile belirlenerek istatiksel analizi yapıldı.

Sonuç olarak, MMP-2 gen ekspresyon seviyesi 15. gün Portio Vaginalis bölgesine kıyasla, 20. gün Portio Vaginalis bölgesinde 4,63 kat artarak istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,024). Bu çalışmadan elde edilen bulgular gebelik sürecinde MMP-2 geninin servikal yeniden şekillenme sürecinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Gebelik, Serviks, Matriks Metalloproteinaz-2 (MMP-2), Matriks Metalloproteinaz-8 (MMP-8), Matriks Metalloproteinaz Doku İnhibitörü-1 (TIMP-1)

ABSTRACT

Topographic Analysis of Gene Expression for Cervical Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2), Matrix Metalloproteinase-8 (MMP-8), and Matrix Metalloproteinase Tissue Inhibitor-1 (TIMP-1) Enzymes by QF-PCR to Determine the Timing of Parturition in Rats

Delivery at term arises from the orderly, coordinated progression of physiological adaptations that occur across the reproductive system during gestation. Deviations in the development or timing of these adaptations can precipitate preterm birth or, conversely, prolong gestation into the postterm period.

The cervix maintains pregnancy by remaining functionally closed and providing mechanical support for fetal retention; however, it must undergo extensive remodeling—encompassing softening, ripening, effacement, and dilation—for birth to occur. Cervical tissue is heterogeneous, comprising sparsely distributed stromal and immune cells within an extracellular matrix (ECM) dominated by connective tissue components. Because collagen (predominantly types I and III) is the most abundant ECM protein in the cervix, elucidating its turnover, cross-linking, and fibrillar organization across gestation is central to understanding the biomechanical transitions that govern the timing of parturition.

In this study, twenty 90 day old, experimentally naïve female Wistar albino rats (*Rattus norvegicus*; 200–250 g) were included. Ten animals were examined at gestational day (GD) 15 and ten at GD20. For regional (topographical) analysis of the cervix, each specimen was dissected into the Portio Vaginalis and Portio Supravaginalis, which were analyzed as separate experimental regions. Expression levels of MMP 2, MMP 8, TIMP 1, and ACTB were quantified by quantitative fluorescence PCR (QF PCR), followed by statistical analysis.

Relative MMP 2 expression in the Portio Vaginalis was 4.63 fold higher on gestational day 20 than on day 15 ($p = 0.024$), indicating statistically significant upregulation. These findings support a contributory role for MMP 2 in pregnancy associated cervical remodeling.

Keywords: Pregnancy, Cervix, Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2), Matrix Metalloproteinase-8 (MMP-8), Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-1 (TIMP-1)

1. GİRİŞ

İnsanda dişi üreme sistemi over (yumurtalık), ovidukt (fallopi kanalı), uterus (rahim), serviks (rahim ağzı) ve vajinadan oluşur. Serviks, uterusun alt bölgesinde, rektum ve mesanenin arasında konumlanır. Vajinaya uzanan alt bölümü Portio Vaginalis olarak, uterusa açılan üst bölümü ise Portio Supravaginalis olarak adlandırılır. Vajina lümenine açılan açıklık eksternal os, uterus boşluğuna açılan açıklık ise internal os olarak tanımlanır. Bu iki açıklık arasında uzanan kanala endorservikal kanal denir. Gebeliğin ilerlemesiyle, fetal membranlarda programlı bir kolajenolitik yeniden yapılanma süreci gerçekleşir.

Normal gebelik sürecinde serviksin anatomik şeklini koruması önemlidir fakat gebelik süresince kademeli bir yeniden yapılanma sürecine geçmelidir. Doğum öncesi servikal yeniden yapılanma süreci yumuşama olgunlaşma ve dilatasyon olarak 3 aşamada gerçekleşir. Doğumdan sonra ise serviks eski formuna dönmek için post partum onarım aşamasına uğrar.

Servikal yumuşama doku özellikleri ve kompozisyonundaki değişiklikler açısından tanımlanırken, servikal olgunlaşma, serviksin yapısal fonksiyonunun kaybı olarak tanımlanır. Servikal yapıdaki anormal değişimlerin ve bunun sonucunda serviksin mekanik özelliklerinin bozulması yapılan araştırmalar sonucunda erken doğumla ilişkilendirilmiştir.

Servikste meydana gelen yapısal değişiklikler dokunun ve ekstraselüler matriks elemanlarının biyokimyasal içeriğindeki ve lokalizasyonlarındaki değişimler ile meydana gelir. Servikal ekstraselüler matriks (ESM), dokunun mekanik özelliklerinin belirlenmesinde önemlidir. Servikal ESM'nin en önemli bileşeni en fazla miktarda bulunan fibriler kolajendir. Kolajen fibrilleri serviks içinde rastgele bir şekilde bulunmazlar. Gebe olmayanlarda kollajen servikal kuru ağırlığın en az %54 – 77'sini oluşturur. Gebelikte 10. gebelik haftasından itibaren kolajenin çözünürlüğü artar. Gebeliğin üçüncü trimesterinde servikal kolajenin konsantrasyonu hamile olmayan değerlere göre yaklaşık %50 oranında düşer. Yapılan araştırmalar sonucunda artan kolajen çözünürlüğü hem insan hem de kemirgen servikal dokusunda servikal olgunlaşma ile ilişkilendirilmiştir. Servikal ESM'nin diğer bileşenleri arasında hücreler, kas lifleri, proteoglikanlar, hyaluronan, elastin ve su yer alır.

Ekstraselüler matriksin yeniden şekillenmesi, matriks metalloproteinazlar (MMP) ve doku inhibitörleri olan TIMP'ler tarafından düzenlenmektedir. Matriksinler olarak da adlandırılan MMP'ler, proteinazların 5 alt sınıfından biri olan bir enzim ailesidir. MMP'ler, çinko içeren endopeptidazlardır. İlk defa 1962 yılında Jerome Gross ve Charles Lapiere tarafından tanımlanmıştır. Şu ana kadar bilinen omurgalılarda MMP'lere ait 28 ilgili enzim bulunmaktadır ve bunların 24'ü insanlarda bulunmaktadır. Endotel hücreler, vasküler düz kas hücreleri, kan hücreleri, bağ dokusu hücreleri ve makrofajlar tarafından sentezlenirler. MMP ekspresyon seviyesi herhangi bir doku onarımı ve yenilenmesi esnasında artar. Normal, dinlenme halindeki dokularda eksprese edilemezler ya da çok az eksprese edilirler.

Yapılarına ve substrat özgüllüklerine göre; Kolajenazlar, Stromelisinler, Jelatinazlar, Memran tipi MMPler ve Sınıflandırılamayan MMPler olmak üzere 5 alt grupta incelenirler. Kolajenazlar (MMP-1,8,13,18), interstisyel kollajen tip I, II ve III'ün yıkımından sorumludurlar. Ayrıca bir dizi başka ESM ve ESM olmayan molekülleri de yıkıma uğratabilirler. Jelatinazlar (MMP-2,9), denatüre kolajenin ve bazal membranın yıkımından sorumludurlar. Ayrıca, endotelial, epitelial, yağ, kas, periferal sinir hücrelerinin ekstraselüler maktriksinin yıkımından sorumludurlar. Stromelizinler (MMP-3,10,11), proteoglikanlar, fibronektin ve laminini kapsayan çoğu ESM proteinlerini parçalar. MMP-3, MMP-1'in aktivasyonu için önemlidir. MT-MMP'ler (MT-MMP-14,15,16,17,24,25) diğer matriks proteinleri gibi sekrete edilmezler, hücre yüzeyinde bulunurlar. ESM'yi yıkıma uğratırlar.

Yapısal olarak ise; Sinyal peptit, Propeptit, Çinko bağlayıcı bölge içeren katalizör kısım, hemopeksin benzeri kısım ve prolinden zengin bölge olmak üzere 5 ana kısımdan oluşurlar. MMP-2 ve MMP-9, çinko bağlama dizisinden önce dahil edilen fibronektin tip II tekrarlarına sahip oldukları için diğer MMP'lerden farklıdırlar.

MMP'lerin endojen inhibitörleri genel dolaşımda alfa-2 makroglobulin, dokuda bulunan inhibitör proteinleri ise TIMP'lerdir. a2-Makroglobulin genellikle TIMP'ler eksik olduğunda işlev görür. TIMP seviyelerindeki değişikliklerin, MMP aktivitesinin seviyesini doğrudan etkilemesi nedeniyle önemli olduğu düşünülmektedir. MMP inhibisyonuna ek olarak TIMP'ler, mitojenik ve hücre büyümesini indükleme aktivitesinde rol oynarlar. TIMP-1 ve TIMP-2 bazı tümör hücreleri için büyüme faktörleridir. Omurgalılarda dört tip TIMP (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 ve TIMP-4)

tanımlanmıştır. MMP'ler gibi aynı hücre türleri tarafından sentez edilirler ve ekspresyonları, gelişim ve doku yeniden yapılanması sırasında düzenlenir. Yapılan çalışmalar, TIMP-1 ve -2'nin pro-MMP-2 ve pro-MMP-9'a bağlandığını göstermiştir. TIMP-3 ekstraselüler matrikse bağlıdır. TNF-alfa dönüştürücü enzimi inhibe eder ve apoptozu indükler. TIMP-4 ekstraselüler matriksin hemostazisini ve apoptozun stimülasyonunu sağlar.

Gebelikte MMP ekspresyonlarının belirlenmesine ilişkin yapılan çalışmalar, MMP ve doku inhibitörleri olan TIMP'lerin gebeliğin şekillenmesi ve devamında önemli olduğunu göstermektedir. İnsanda plasenta gelişiminde jelatinazlardan MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin etkinlik gösterdiği ve birinci trimesterin erken dönemlerinde trofoblastlardan MMP-2'nin üretilip salgılandığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Kolajen ve ekstraselüler matriksin diğer bileşenleri omurgalılarda yüksek oranda korunduğu için hayvan deneyi çalışmalarında model olarak sıçanlarla çalışmak insanda bu sürecin daha iyi anlaşılmasıyla klinikte yeni tanı ve tedavi yöntemlerinin gelişmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir. 26-37 gebelik haftası arasında preterm prematür membran rüptürü tanısı konan 8 hasta ve 8 kontrol ile yapılan bir çalışmada, doğum gerçekleştikten sonra amniyon zarlarından servikal bölge, midzon bölge ve periplasental bölge olmak üzere üç farklı bölgeden doku örnekleri alınmış, ELISA yöntemiyle MMP-9 miktarları ölçülmüş. MMP-9 aktivitesinin hasta grubun servikal bölgesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulunmuş. Enfeksiyon dışı nedenlerde görülen preterm prematür membran rüptürü tanılarında MMP aktivitesinin deneylerle daha fazla çalışılması gerektiği sonuç ve önerilerde vurgulanmıştır. Serviksin biyokimyasını anlamak, istenmeyen servikal değişikliklerin önlenmesinde ve tedavilerin gelişmesinde önemli bir araştırma alanı olacaktır.

Normal doğum sürecinde servikste meydana gelen değişimlerin daha iyi anlaşılması, prematüre doğum riski taşıyan gebeliklerin teşhisi için klinik araçların ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

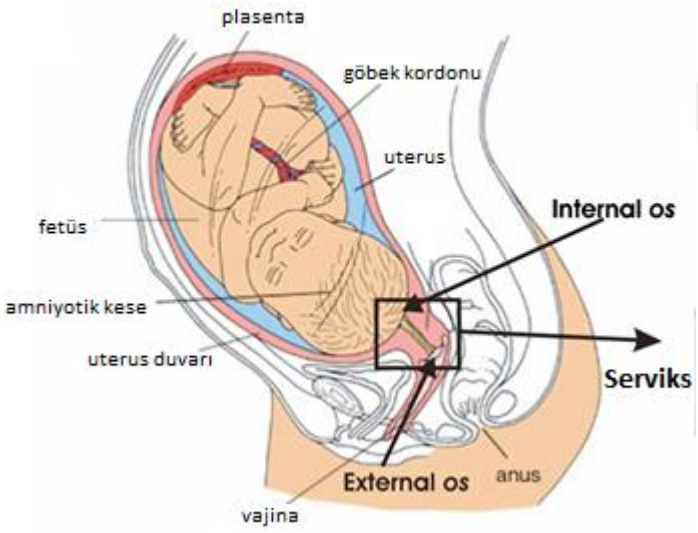
Bu çalışmada farklı gebelik günlerine ait sıçan serviks dokusu örneklerinde, serviks kolajen metabolizmasıyla ilişkili Matriks Metalloproteinaz-2 (MMP-2), Matriks Metalloproteinaz-8 (MMP-8) ve Matriks Metolloproteinaz Doku İnhibitörü-1 (TIMP-1) enzimlerinin gen ekspresyon seviyelerini topografik olarak QF-PCR yöntemini kullanarak araştırmayı amaçladık.

Araştırmamızda, daha önce deneye girmemiş ve çiftleşmemiş, 90 günlük, ortalama ağırlıkları 200-250g olan *Rattus norvecigus* türü, Wistar albino, 10 adet gebeliğin 15. gününde, 10 adet gebeliğin 20. gününde olmak üzere toplamda 20 adet sıçan kullanıldı. Sıçanlardan alınan serviks dokuları Portio Vaginalis ve Portio Supravaginalis bölgelerine ayrılarak deney grupları oluşturuldu. MMP-2, MMP-8, TIMP-1 ve ACTB genlerinin ekpresyon düzeyleri QF-PCR ile belirlendi.

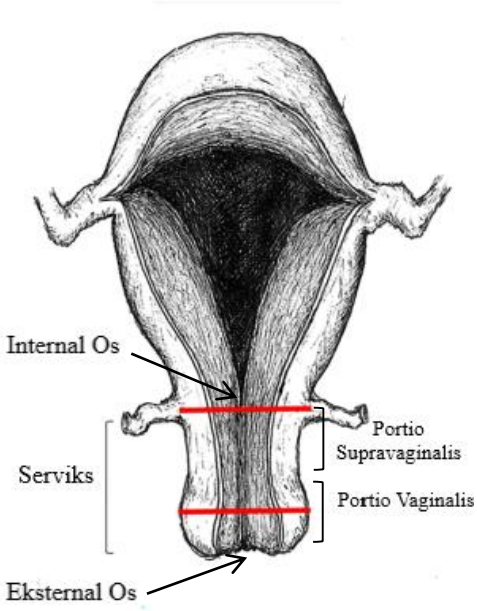
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dişi Üreme Sisteminde Serviks

İnsan dişi üreme sisteminde internal organlar; çift olarak bulunan ovaryum, ovidukt, uterus, serviks ve vajinadan oluşmaktadır. Serviks, pelvis boşluğunda, uterusun alt bölgesinde, rektum ve mesanenin arasında konumlanır (Şekil 1) [26]. Vajinaya uzanan alt bölümü Portio Vaginalis, uterusa açılan üst bölümü ise Portio Supravaginalis olarak adlandırılır. Vajina lümenine açılan açıklık eksternal os, uterus boşluğuna açılan açıklık ise internal os olarak tanımlanır. Bu iki açıklık arasında uzanan kanala endoservikal kanal denir. Ektoserviks olarak adlandırılan kısım eksternal osun yüzeyini oluşturur ve spekulum ile muayene esnasında görülebilir. Gebe olmayan normal bir insan serviksi yaklaşık 2,5-3 cm uzunluğunda ve 2-2,5 cm çapındadır. Şekil olarak silindire benzer (Şekil 2) [1].



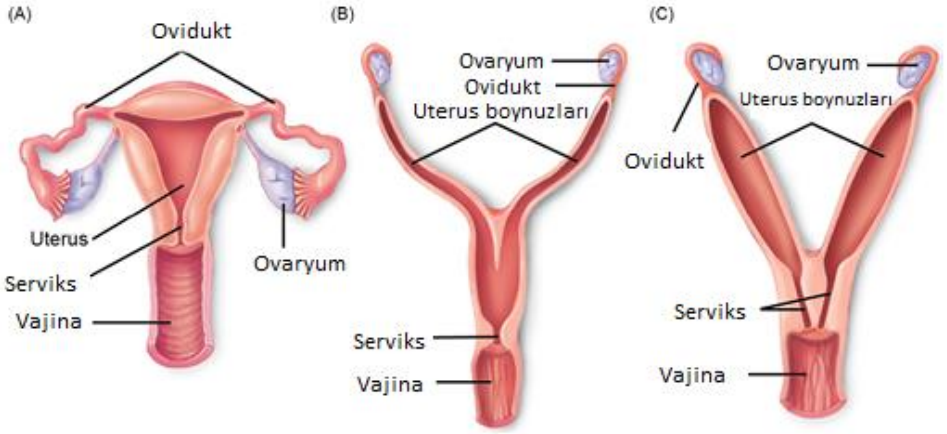
Şekil 1. Üreme sisteminde serviksin anatomik konumu [26]



Şekil 2. Serviks anatomisi

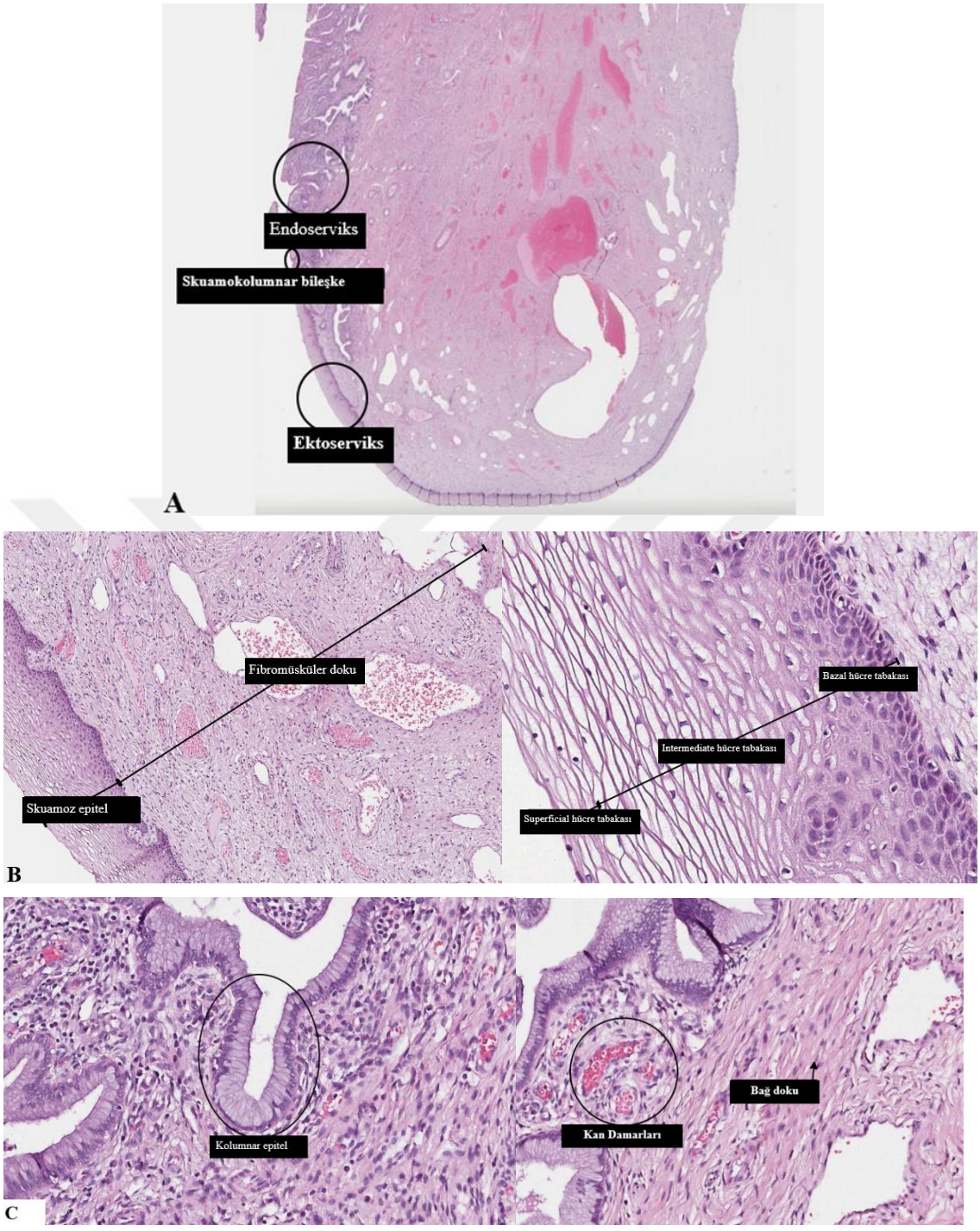
Boyutu ve şekli, gebelik zamanına, doğum sayısına, yaşa, adet döngüsüne ve hormonal duruma bağlı olarak değişir [2]. Gebe olmayanlarda serviks sert bir dokuya sahiptir. Birden fazla gebelik geçirmiş bir insan (multipar) serviksi ise hiç doğum yapmamış bir insan (nullipar) serviksine göre daha geniştir ve eksternal os enine açıktır [3].

Kemirgen serviks ve uterusu histolojik olarak insanlarla benzerdir fakat anatomik olarak farklıdır (Şekil 3). Fare ve sıçanlarda, bir servikste birleşen iki uterus boynuzunu bulunur (Şekil 3 -B). Tavşanlarda ise iki uterus iki ayrı serviksle birleşmiştir (Şekil 3-C). Sıçanlar gebelikte hormonal düzenleme açısından insanlara benzerdir. Örneğin; gebe sıçanlarda da dolaşımda progesteron seviyesi yükselmektedir (Şekil 3) [4].



Şekil 3. Türler arasında serviks ve uterusun anatomik yapısının şematik gösterimi
A. İnsan serviksi, B. Fare,sıçan serviksi, C.Tavşan serviksi

Serviks stroması çok katlı skuamoz epitel ve glandüler epitel olarak da adlandırılan kolumnar epitel hücreleri olmak üzere iki tip epitel hücresi ile kaplıdır. Ektoserviksin geniş bir kısmı skuamoz epitel ile kaplıdır. Endoservikal kanal kolumnar epitel ile kaplıdır. Kolumnar epitel hücreleri internal os'ta endometrial epitel ile birleşir. Eksternal os'ta ise sukamoz epiteli ile birleşir. İki epitel tipinin birleştiği bu nokta skuamo-kolumnar bileşke olarak adlandırılır. Kolumnar hücreler servikal mukus salgılar (Şekil 4). Adet döngüsünün evresine bağlı olarak servikal mukus sperm hücrelerinin geçişi için uygun ortamı sağlar veya sperm hücrelerinin geçişini engellemek için bariyer görevi görür [5]. Epitel hücrelerinin ve mukusun görevi memeli türleri arasında benzerdir. Epitel doku, altında yer alan çeşitli hücre tipleri ve bağ dokusu elemanlarının bulunduğu stromayı çevreleyerek bariyer görevi görür. İnsan dahil yüksek primatlarda gebelikte salgılanan mukus endoservikal kanalı kaplayarak bir tıkaç görevi görür [6,9].



Şekil 4. Hematoksilen ve eozinle boyanmış normal insan serviks kesiti. https://www.proteinatlas.org/learn/dictionary/normal/cervix adresinden düzenlenerek alınmıştır.

Epitel hücrelerinin altında yer alan serviks stroması, fibroblastlar, düz kas hücreleri ve elastik bağ dokudan oluşan fibromüsküler bir yapıdadır [2, 7]. Stroma içerisinde serviks düz kas hücreleri internal os bölgesinde yaklaşık %50-60 oranında ve

düzenli bir yapıda bulunur. Eksternal os bölgesinde düz kas hücrelerinin oranı yaklaşık %10' dur ve stroma içerisinde düzensiz olarak dağılırlar [8].

Fibroblast ve düz kas hücrelerinin yanı sıra bağışıklık hücreleri de serviks stromasında bulunarak gebelik sürecinde rol alırlar [9]. Serviks stromasında bulunan hücrelerin hücre dışına salgıladığı fibriller kolajen, elastin gibi proteinler ve glikozaminoglikanların bir araya gelmesiyle kompleks yapıda ekstraselüler matriks oluşturur (ESM).

2.2. Ekstrasellüler Matriks (ESM)

Dokular özelleşmiş hücre gruplarından ve bu hücrelerin arasında bulunan ekstrasellüler matriksten (ESM) oluşmaktadır. Bazı hücreler tarafından üretilip salgılanan proteinler, polisakkaritler ve su belirli bir alanda hücreler arasını doldurarak ESM'nin genel yapısını oluşturur. ESM üç boyutlu yapısı sayesinde hücrelere mekanik destek sağlamakla birlikte, embriyonik gelişimde, hücre yüzey reseptörleri ile etkileşime girerek hücreler arası sinyal iletiminde, hücrelerin farklılaşması ve çoğalmasında da görevlidir [10]. ESM'nin moleküler yapısı ve miktarı doku tipleri arasında farklılık gösterir. Her hücre topluluğu kendine özgü miktarda ve çeşitlilikte ESM oluşturur [11].

ESM'yi oluşturan iki temel makromolekül glikozoaminoglikanlar (GAG) ve fibröz proteinlerdir [12].

2.2.1. Glikozaminoglikanlar (GAG)

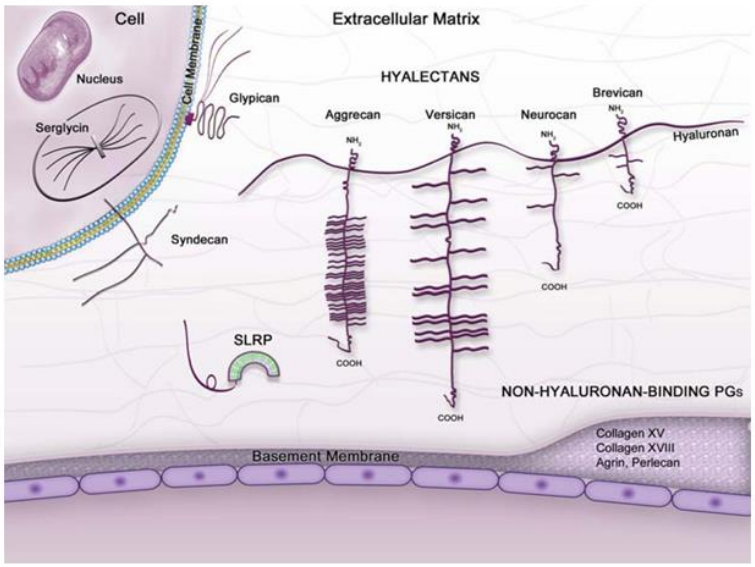
GAG disakkarit tekrarlarından oluşan polisakkaritlerdir. GAG'lar sülfatlanmış ve sülfatlanmamış olarak iki gruba ayrılır. Sülfatlanmamış GAG hyalüronik asittir. Hyalüronik asit haricinde diğer GAG'lar bir proteine kovalent olarak bağlanarak proteoglikanları (PG) oluştururlar [13].

2.2.1.1. Sülfatlanmış Glikozaminoglikanlar

Tekrarlayan disakkarit dizilerinden oluşan sülfatlanmış GAG'lardır. Bir proteine bağlanarak proteoglikanları (PG) oluşturular. Bunlar; Heparan sülfat, heparin, kondroitin sülfat, dermatan sülfat ve keratan sülfattır [14].

2.2.1.1.1. Proteoglikanlar

Proteoglikanlar, daha çok ESM'de bulunmakla birlikte hücre içinde ve hücre zarına bağlı olarak bulunabilirler. GAG'lara kovalent olarak bağlanarak negatif yük kazanırlar. Kolajen fibrillerine, büyüme faktörlerine ve hyalüronik asite bağlanarak ESM organizasyonunda görev alırlar [14,15] (Şekil 5).



Şekil 5. Proteoglikanların lokasyon ve bağlanma bölgelerinin gösterimi [14]

İnsan serviksinde bulunan glikozaminoglikanlar; dermatan sülfat, kondroitin sülfat, keratan sülfat ve hyalüronik asittir. Konsantrasyonları ve doku içersindeki dağımları gebelikte değişir. Hyalüronik asit miktarı gebelikte artarak dokunun hidrasyonunu artırır [16].

2.2.1.2. Sülfatlanmamış Glikozaminoglikan

Sülfatlanmamış tek glikozaminoglikan molekülü hyalüronik asittir (Hyalüronan, HA). HA negatif yüklü, yüksek molekül ağırlıklı bir polisakkarittir. Fibroblastlar tarafından sentezlenir. Su tutma özelliği sayesinde doku hidrasyonunda önemli rol oynamaktadır [17].

Doğumun yaklaşmasıyla servikste hyaluronan oranı %71'e çıkar [64].

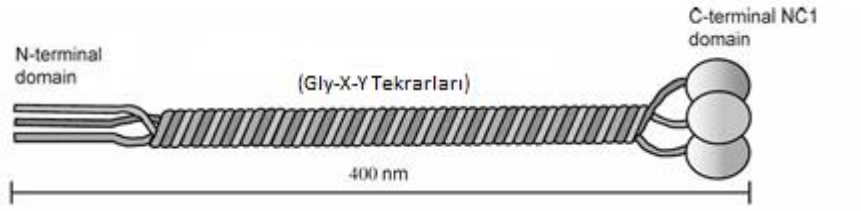
2.2.2. Fibröz proteinler

ESM'nin ana yapısını oluşturan diğer moleküller fibröz proteinlerdir. Fibröz proteinler, dokunun gerilme özelliğinde, hücre adezyonunda, hücre-çevre arası iletişimde ve doku gelişiminde görevlidir. Elastik bağ dokuyu oluşturan iki önemli protein elastin ve kolajendir [18]. Elastinin konsantrasyon değeri uterus ve servikste yaklaşık olarak aynı iken, gebe olmayanda kolajen yaklaşık %80 oranında servikste daha fazladır [19]. Kuru serviksteki konsantrasyon oranları ise yaklaşık %1.4 elastin, %64.3 - %72.4 kolajen olarak saptanmıştır [7, 20].

ESM'de yaygın bulunan diğer fibröz proteinler ise fibronektin, laminin ve integrinlerdir. Fibronektinler hücre göçünde ve embriyonezde rol alırlar. Patolojik olarak tümör metastazı ile de ilgilidir. Integrinlerle bağlantılıdırlar. Transmembran proteini olan integrinler hücre içi iskeleti ve ESM arasında bağlantı sağlayarak sinyal iletiminde görev alır [12,62].

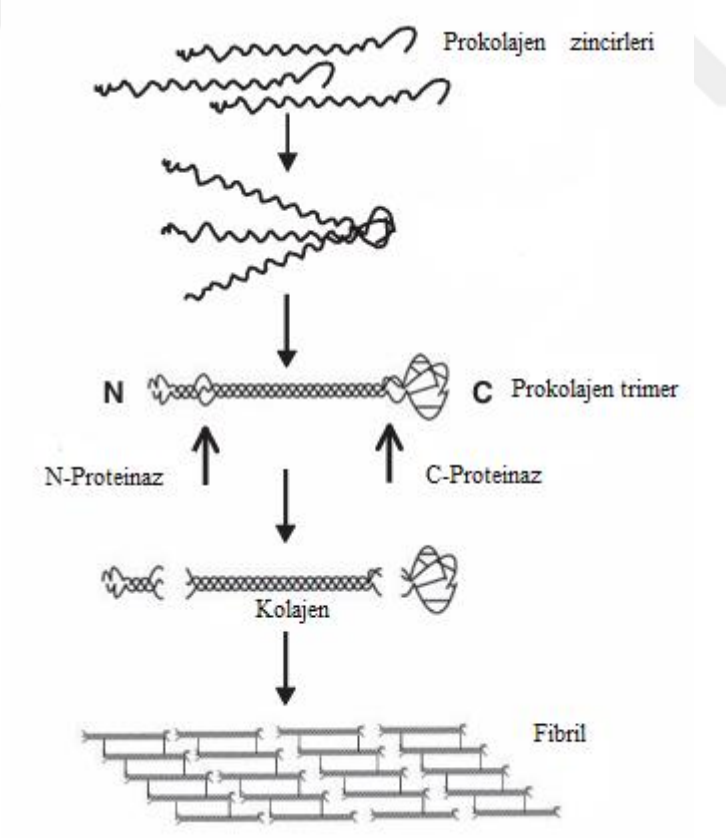
2.2.2.1. Kolajen

Kolajen, fibroblast gibi bağ dokusu hücreleri tarafından hücre dışına sentezlenerek ESM'de en fazla miktarda bulunan proteindir. Memelilerde toplam proteinin yaklaşık %30'u kolajenden oluşmaktadır [12]. Kolajenler, fibriler ve fibriler olmayan olarak ayrılır. Kolajen fibrilleri bir araya gelmiş tropokolajen birimlerinden oluşur. Tropokolajen, uzunluğu 280 nm genişliği 1,5 nm olan uzamış üçlü sarmal yapıda bulunan moleküldür (Şekil 6).



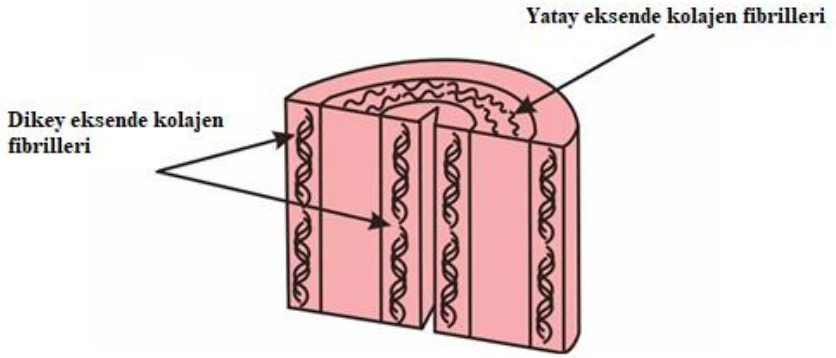
Şekil 6. Tip IV Kolajen Protomer Yapısı [21]

Kolajen amino asit dizisi üçlü Gly-X-Y'nin tekrarlarından oluşur. Gly, glisin, X ve Y ise genel olarak prolin, hidroksiprolin veya hidroksilizindir [15,22]. Kolajen fibrilleri birbirlerine çapraz bağlar ile bağlanır. Kolajen fibrilleri arasındaki çapraz bağlar dokuya mekanik destek sağlamaktadır. Bu çapraz bağların oluşmasında başlıca görevli proteinler Plod2 ve Lizil Oksidaz (LOX)'dır. Ekstrasellüler matrikste lizil hidroksilaz prokolajendeki lizinlere hidroksil grupları ekler (Şekil 7) [15,63].



Şekil 7. Kolajen fibrillerinin oluşumu [63]

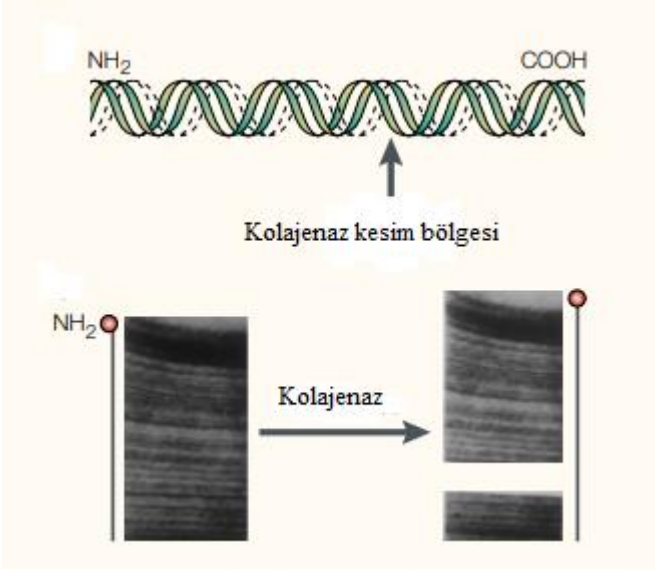
Günümüzde 28 farklı tip kolajen tanımlanmıştır. Kolajen tip 1, kıkırdak doku haricinde insan vücudunda en çok bulunan kolajen tipidir [22,23]. ESM'de kolajen tipleri heterojen bulunabilir fakat belirli bir dokuda bir kolajen tipi öne çıkar. Servikste baskın olarak bulunan kolajen tipleri 1 ve 3'tür [2,24]. Kolajen fiberleri, insan serviks stromasının dış ve iç kenarlarında endoservikal kanala paralel olarak dikey yönde uzanır. Stromanın orta bölgesinde ise yatay olarak organize olmuşlardır (Şekil 8) [25].



Şekil 8. İnsan serviksinde kolajen fibril dağılımının şematik gösterimi [26]

2.2.2.1.1. Kolajen Metabolizması

Prokolajenler endoplazmik retikulumda sentezlenerek şaperon proteinler tarafından üç boyutlu yapısını alır ve hücre dışına salgılanmak üzere golgiye geçerler [27]. Kolajenin parçalanması fibroblastlar tarafından salgılanan kolajenazlar aracılığıyla gerçekleşir. İnaktif olarak sentezlenen kolajenazlar, aktif hale geçtiğinde kolajenleri parçalayabilir. Literatürde kolajenaz olarak da adlandırılan MMP1, -8, -13 ve MT1-MMP, fibriller kolajen tip I'den IV'e ve ayrıca XI'ye parçalayabilir ve bu da 1/4 C-terminali ve 3/4 N-terminali oranlarında iki farklı uzunlukta kolajen fragmanının oluşumuna neden olur (Şekil 9).



Şekil 9. Kolajenaz tarafından kolajenin yıkımı [28]

Yetişkin fare fibroblastları tarafından kolajeni parçalayabilen altı tip MMP tanımlanmıştır. Bunlardan; dördü salgılanan MMP'ler ailesine aittir, yani MMP-13, MMP-8, MMP-2 ve MMP-9, diğer iki enzim ise membran tipi MMP alt grubunun üyeleridir, yani MMP-14 (MT1-MMP) ve MMP-16 (MT3-MMP) [28].

2.2.2.2. Elastin

ESM'deki bir diğer fibröz protein elastindir. 830 aminoasit dizisi içeren hidrofobik bir proteindir. Düz kas hücrelerinde ve fibroblastlarda sentezlenir. Elastin, kolajen fibrilleri ile etkileşim halindedir [29].

Gebelikte fetüsü uterusta tutmak için serviksin kapalı kalmasında ve doğumdan sonra serviksin eski şeklini yeniden kazanmasında elastin önemlidir. Kadınlarda elastin eksikliği servikal yetersizlikle ilişkilendirilmiştir [2,7.30].

2.2.3. ESM'nin Yeniden Düzenlenmesi

ESM, temel yapısını oluşturan polisakkaritler ve fibröz proteinlerin yanı sıra farklılaşma faktörleri, sitokinler, matris bozucu enzimler olan matriks metalloproteinazlar ve inhibitörleri gibi birçok molekülü de yapısında bulundurmaktadır. Tüm bu moleküllerin bir kompozisyonu olan ESM, dokular arasında

yapısal farklılık gösterek, dinamik ve yeniden modellenebilen bir molekül kompleksidir [10].

ESM içerisindeki makromoleküllerin proteolizi, sentezi ve reorganizasyonu ESM de değişikliklere yol açan ana sebeplerdendir. Her organın kendine özgü ESM yapısı, dokuya özgü mekanik kuvvet ve doku elastikiyeti de sağlar [11].

Gebelikte doku yenilenmesi esnasında gerçekleşen olaylardan birisi olan desidualizasyon, uterusta ESM'nin yıkımıdır. Desidualizasyon, uterus endometriyumun yıkılarak desidual dokuya dönüşümüdür. Bu süreç, blastosistin uterusa implantasyonu ve plasentasyon için önemlidir. Desidualizasyon esnasında, foliküler fazda bulunan endometriumun fibronektin, Tip I, III, V ve VI kolajen içeren intersitisyel tip ESM yıkılarak, laminin, heparan sulfat, perlekan ve tip IV kolajen içeren desidua dokusuna dönüşür [31].

Servikal ekstraselüler matriksin temel 5 içeriği; Fibriler kolajen, elastin lifleri, proteoglikanlar, hyaluronan ve matrisellüler proteinlerdir. Servikste bulunan ana yapısal protein kolajen tip 1 ve 3'tür. Serviks doku bütününde ciddi bir miktarda bulunan ESM serviks dokusunun elastikiyetinde önemli olacağı için gebelik süreci boyunca serviksin olgunlaşması olarak tanımlanan olayın aslında ESM moleküllerinin yeniden modellenmesi aracılığı ile gerçekleştiği düşünmekte bu moleküllerin seviksin olgunlaşmasında etkili olduğu düşünülmekte ve çalışmalarda araştırılmaktadır [2,24].

ECM ve bazal membran yıkımı başlıca dört grup enzim tarafından gerçekleştirilir. Bunlar; Sistein proteazlar, Aspartik proteazlar, Serin proteazlar ve Metalloproteizlardır Matriks metalloproteinazlar ise ESM nin tüm komponentlerini parçalayabildiği için önemlidir [32].

2.3. Matriks Metalloproteinazlar (MMP)

Proteinazlar, protein yapısındaki peptit bağlarını yıkarak proteolizi katalizleyen, proteinleri aktif veya inaktif formuna getiren enzim ailesidir. Proteinazlar 5 alt sınıfa ayrılır; metallo, serin, sistein, aspartik asit ve treonin proteinazlar. İnsanda 703 proteinaz tanımlanmıştır ve genomun yaklaşık %3'ünü oluştururlar [33].

1962 yılında J. Frederick Woessner sıçan uterusu ile yaptığı çalışmada, post partum evrede uterustaki kolajeni parçalayan proteinazların varlığı ile ilgili ilk

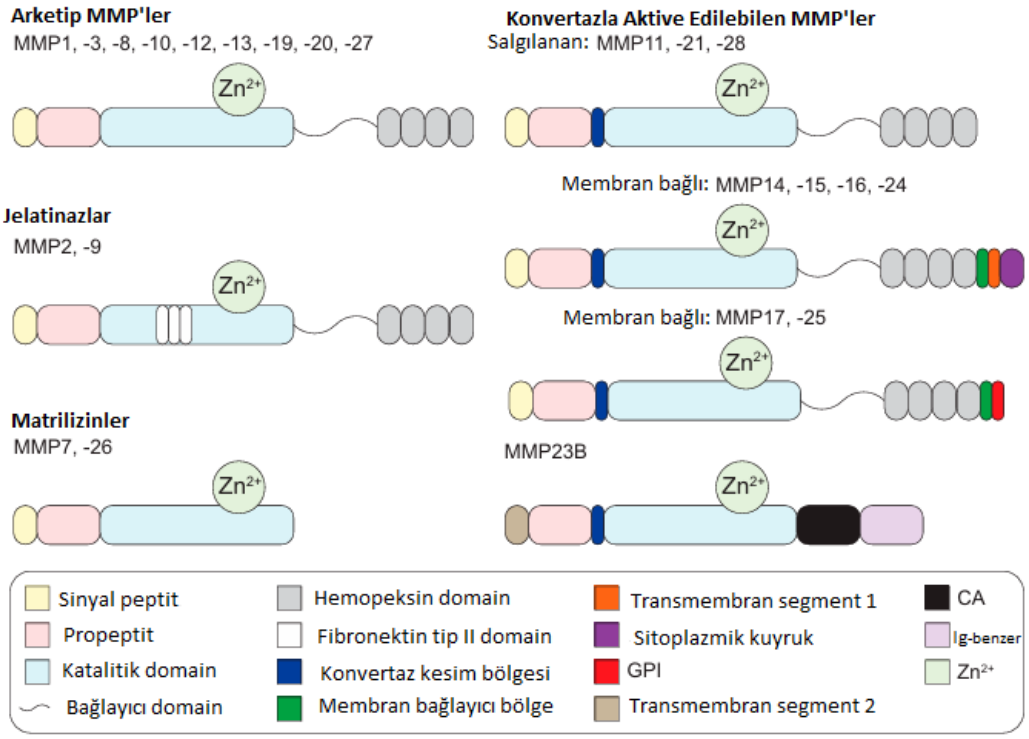
çalışmayı yayınlamıştır [34]. Amfibilerin metamorfoz sürecinde kolajenolitik aktivitenin araştırıldığı çalışmanın sonucunda ilk kolajenaz tanımlanmıştır [35].

ESM'nin tüm bileşenlerinin parçalanmasında matriks metalloproteinazlar merkezi rol oynamaktadır. ESM yıkımının yanı sıra dokuların yeniden yapılanmasında, kemiğin yeniden modellenmesinde, yara iyileşmesi, embriyonik gelişim, doku morfogenezi, apoptoz gibi fizyolojik olaylarda rol almaktadır. Aynı zamanda tümör hücresi invazyonu, anjiyogenezis ve metastaz gibi patolojik süreçlerde de rol alırlar. ESM komponentleri haricinde MMP substratları arasında, kemokinler, sitokinler, hücre yüzeyi reseptörleri, büyüme faktörleri, metabolik proteinler ve nükleer proteinler de bulunmaktadır [36].

Omurgalılarda MMP'lere ait tanımlı 28 enzim bulunmakta ve bunların 23 tanesi insanlarda sentezlenmektedir. Fibrosblastlar, Endotel hücreler, düz kas hücreleri, kan hücreleri ve çeşitli immün hücreler tarafından sentezlenirler. MMP'ler, sitoplazma, nükleus, hücre zarı ve hücre dışı ESM'de bulunabilirler [37].

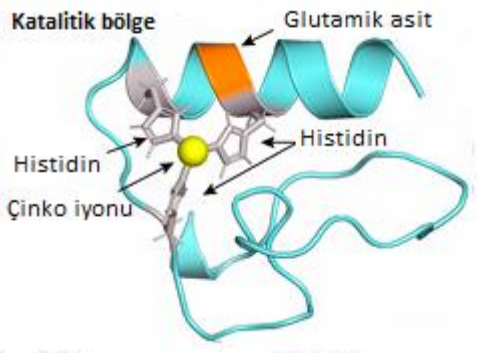
2.3.1. Matriks Metalloproteinzların Moleküler Yapısı

Matriks metalloproteinazlar veya diğer adıyla matriksinler, metallo sınıfına ait, ekstraselüler matriks komponentlerini parçalayabilen, çinko (Zn^{2+}) bağımlı endopeptidazlardır [38]. Aktif bölgelerinde metiyonin ve çinko iyonunu bulundurması ile metzincin proteinazlar olarak da adlandırılır. Yapılarındaki bazı spesifik lineer dizi farklılıklarına ve substrat özgüllüklerine göre; Kolajenazlar, Stromelisinler, Jelatinazlar, Memran tipi MMP'ler ve Sınıflandırılamayan MMP'ler olmak üzere 5 alt grupta incelenirler (Şekil 10) [39].



Şekil 10. MMP bölgelerinin şematik gösterimi [39]

MMP ailesini kodlayan 24 farklı gen bulunmaktadır. Bu genler; sinyal peptit, propeptit, çinko bağlayıcı bölge içeren katalizör domain, hemopeksin benzeri domain ve prolinden zengin bölge olmak üzere 5 farklı gen bölgesiyle kodlanmaktadır. Sinyal peptid, propeptid ve 5 β-plaka ve 3 α-heliks yapısı bulunduran katalitik bölge MMP ailesi arasında yüksek oranda korunmuştur [40]. Tüm MMP'ler katalitik bölgede HEXXHXXGXXH amino asit dizisi içerir (H; histidin, E; glutamik asit, G; glisin ve X değişken bir amino asit). Histidinler çinko ile bağ kurar (Şekil 11) [41].



Şekil 11. MMP-1'nin katalitik bölgesi

N-terminal uçta bulunan propeptid 80 amino asit içermektedir. Propeptit bölgesinde bulunan sistein rezidüsü MMP' lerin inaktif kalmasında kritik rol oynamaktadır. İnaktif formda olan MMP'ler Pro- ön eki alarak adlandırılır [42]. Bu bölge ve katalik bölge arasında bulunan çinko iyonuna bir molekül su eklenmesiyle MMP' ler aktif hale geçer [43]. Sinyal peptit ise hücreden salınımı kontrol etmektedir. Katalitik Bölge; yaklaşık 170 amino asitten oluşmaktadır. Hemopeksin benzeri bölge yaklaşık 210 amino asitten oluşmaktadır ve MMP'lerin integrinler, hücre yüzey reseptörleri ve doku inhibitörleri gibi diğer proteinlere bağlanmasını sağlamaktadır. MMP-7 ve MMP-26 MMP'lerin en basit yapısal alt sınıfı olan matrilizinlerdir. Bir sinyal peptid, bir propeptit ve çinko bağlayıcı bölgesi bulunan katalitik domainden oluşan üç bölge bulunmaktadır. Hemopeksin benzeri bölge bulundurmazlar. In vitro olarak kolajen ve jelatini parçalayabilirler [39].

2.3.2. Kolajenazlar

Matriks metalloproteinaz-1,8,13 ve 18 kolajenazlar olarak adlandırılan gruptadır. Kolajenazlar, sinyal peptid, propeptit ve çinko bağlayıcı bölgesi bulunan katalitik domain ve hemopeksin benzeri bölge bulundurur. Kolajen tip I, II, III, IV ve XI gibi fibriler kolajenin yıkımından sorumludurlar. Ayrıca proteoglikanlar gibi başka ESM ve ESM olmayan molekülleri de yıkıma uğratabilirler.

2.3.2.1. Matriks Metalloproteinaz 8 (MMP-8)

Nötrofil kolajeaz olarak da adlandırılır. Substrat özgüllüğünde katalitik bölgenin yanı sıra karboksili ucun da önemi vardır [44].

2.3.2. Stromelizinler

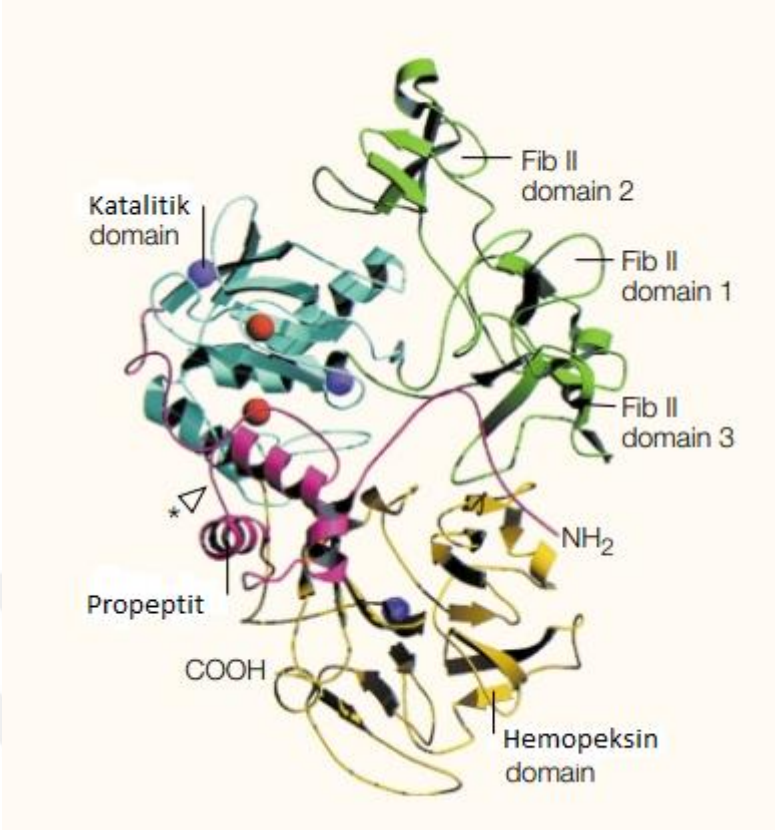
Matriks metalloproteinaz -3, -7, -10, -11, - 12 stromelizinler olarak adlandırılan gruptadır. Stromelizinler sinyal peptid, propeptit ve çinko bağlayıcı bölgesi bulunan katalitik domain ve hemopeksin benzeri bölge bulundurur. Stromelizinler, elastin, fibronektin, laminin ve kartilaj proteoglikanlar dahil birçok ESM komponentlerini yıkıma uğratabilmektedirler. MMP-3 ve -10 interstisyel kolajeni parçalayamaz. Proteoglikanaz olarak da tanımlanan MMP-3, MMP-1'in aktivasyonunda rol oynar [45].

2.3.3. Jelatinazlar

Jelatinazlar (MMP-2 ve - 9), denatüre kolajenin ve bazal membranın yıkımından sorumludurlar. MMP-2 72 kDa tip IV kolajenaz, MMP-9 ise 92 kDa tip IV kolajenaz olarak ta bilinirler. Jelatinazlarda sinyal peptid, propeptit, katalitik domain, hemopeksin benzeri bölge ve denatüre kolajene bağlanmayı sağlayan, çinko bağlama dizisinden önce 3 tekrarlı fibronektin tip II bölgesi bulunur. Denatüre kolajenin yanı sıra, endotel, epitel, yağ, kas, periferik sinir hücrelerinin ekstraselüler maktriksinin yıkımından sorumludurlar [46].

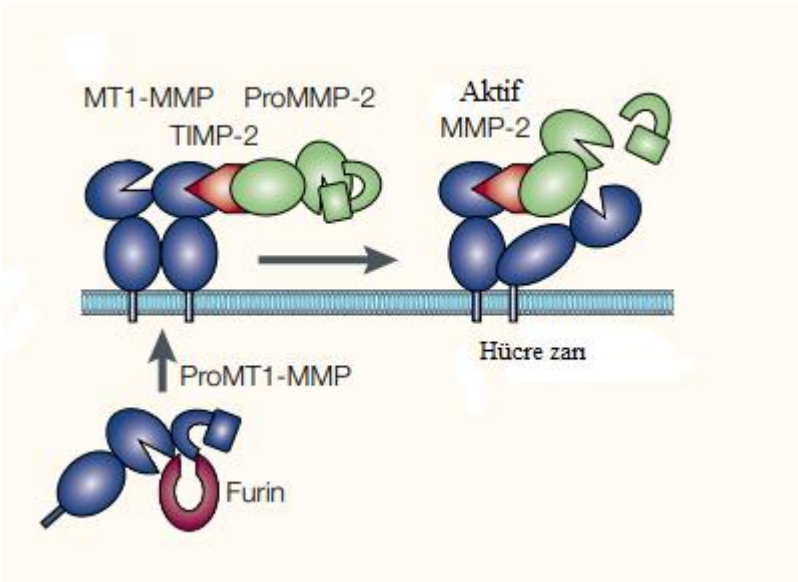
2.3.3.1. Matriks Metalloproteinaz-2 (MMP-2)

MMP-2 geni insanda 16. Kromozomun uzun kolundadır ve 17 ekzon bölgesi bulunur (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4313). Bu gen tarafından kodlanan protein, denatüre kolajeni (jelatin) parçalama yeteneğinden dolayı jelatinaz A veya 72-kDa tip IV kolajenaz olarak da adlandırılır [47]. Proteinler katalitik bölgede denatüre tip IV, V kolajen ve elastinin bağlanmasını sağlayan üç fibronektin tip II tekrarı içerir. Aynı zamanda katalitik bölgede çinko ve kalsiyum iyonu bulunur [48]. MMP ailesinin çoğu üyesinin aksine, bu proteinin aktivasyonu hücre zarında meydana gelebilir (Şekil 12 ve 13) [49].



Şekil 12. ProMMP-2'nin Yapısı.

* işaretli bölge MT1-MMP'nin kesim bölgesini göstermektedir.



Şekil 13. ProMMP-2'nin aktivasyonu

2.3.4. Membran Tip Matriks Metalloproteinazlar

MT-MMP-14,15,16,17,24 ve 25 membran tip matriks metalloproteinazlardır. Diğer matriks proteinleri gibi hücre dışına salınmazlar, hücre zarında bulunurlar. MT-MMP'ler karboksi terminal uçta hemopeksin benzeri bölgede kısa sitoplazmik kuyruğu olan, transmembran bölge bulundurur. MT-MMP' ler hücre yüzeyine bu transmembran bölge ile veya glikozilfosfotidil inozitol (GPI) bağlantısı ile bağlanırlar. Ayrıca MT-MMP'ler propeptid ve katalitik bölge arasında, furin-benzeri konvertazların etki ettiği bir bölge içermektedir. Furin bölgesinin proteolitik yıkımıyla intraselüler olarak aktive edilirler ve diğer MMP'lerin hücre zarında aktivasyonunu gerçekleştirirler. Bu bölge proenzimlerin intrasellüler aktivasyonundan sorumludur. MMP-17 (MT4-MMP) hariç diğerleri proMMP-2'yi aktive etme özelliğine sahiptir. Ekstraselüler matriksi yıkıma uğratırlar [32, 42, 46].

2.3.5. Sınıflandırılmayan Matriks Metalloproteinazlar

MMP-4, -5, -6, -19 ve -20 diğer 4 MMP sınıfına ait olmayan MMP'lerdir. MMP23 hemopeksin benzeri bölge bulundurmaz ve bir sistein dizisi (CA) ve immünoglobulin (Ig) benzeri bölge bulundurmasıyla diğer MMP'lerden ayrılır. Sistein dizisi ve Ig-benzeri bölgelerin görevleri literatürde henüz kesin değildir. MMP28 veya epilizin, katalitik bölgede treonin bulundurmasıyla diğer MMP'lerden farklı özellikler gösterir. Fare ve insanlarda eksprese olurlar [50].

2.3.6. Matriks Metalloproteinaz Enzimlerinin Düzenlenmesi

MMP'lerin ekspresyonu büyüme faktörleri, sitokinler ve hormonlar tarafından düzenlenir. Bu enzim ailesinin düzenlenmesi, gen ekspresyonu ile, inaktif zimojenlerle veya endojen inhibitörler yolu ile sağlanmaktadır. Endojen inhibitörler genel dolaşımda Alfa-2-makroglobulin iken dokuda MMP'lerin doku inhibitörleridir (TIMP).

2.3.6.1. Transkripsiyonla Düzenleme

MMP transkripsiyonu bağımsız olarak düzenlenir. Normal koşullarda MMP'ler üretilmez veya sadece düşük miktarlarda üretilir. Büyüme faktörleri, sitokinler (IL-1, TNF), hormonlar, kimyasal ajanlar veya hücresel stres gibi uyarana bağlı olarak MMP

genleri farklı hücrelerde farklı seviyelerde üretilebilir [51]. İnflamasyon veya tümör oluşumu MMP transkripsiyonunu ve/veya translasyonunu indükleyebilir.

2.3.6.2. Proenzimin Aktif Hale Getirilmesiyle Düzenleme

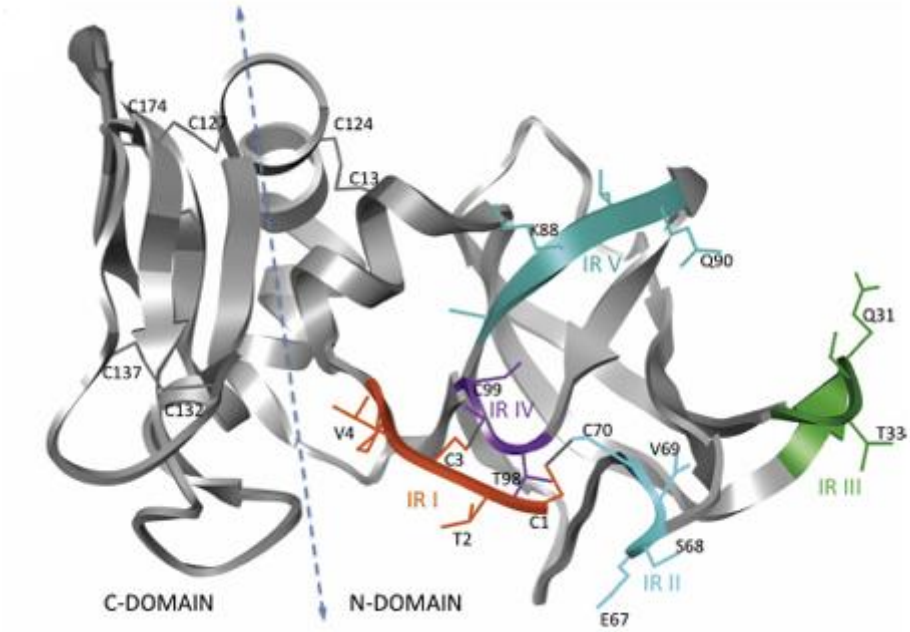
Hücreden salınan MMP' lerin çoğu inaktif moleküller olarak salınmaktadırlar. Propeptid içeren inaktif MMP'ler, otokataliz ile, doku veya plazma proteinazları ile, opportunistik bakterial proteinazlar ile ürokinaz plazminojen aktivatör/plazmin sistemi ile veya diğer MMP'lar ile hücre içinde veya hücre zarında aktifleşirler. İnaktif formda sentezlenen MMP'lerin propeptid bölgelerinde korunmuş olan Pro–Arg–Cys– Gly–X–Pro–Asp dizisi bulunmaktadır. İnaktif formda bu bölge içerisinde bulunan sistein, katalitik bölgede bulunan çinko ile bağlıdır. Bu bağın kırılması ile MMP aktif formuna geçer. Örneğin bazı hücrelerin yüzeylerinde proMMP-2'nin aktifleşmesi MT1-MMP tarafından gerçekleşmektedir. MT1-MMP aktivasyonu ise konvertaz olan furin proteinin ayrılması ile gerçekleşir. MMP 'lerin büyük kısmı ekstrasellüler olarak aktive edilmektedir. Fakat MMP-11, -14, -15, -16,- 17 ve -28 furin benzeri serin proteazlar ile intrasellüler olarak aktive edilebilmektedirler [39].

2.3.6.3. Doku İnhibitörleri ile Düzenleme

MMP'ler memelilerde doğal olarak bulunan doku inhibitör proteinleriyle (TIMP) inhibe edilmektedir. İnsanda genetik olarak 4 farklı TIMP bulunmaktadır. TIMP-1, -2, -3, -4 arasında % 40 sekans benzerliği bulunmaktadır. 4 TIMP molekülü bir araya geldiklerinde bilinen bütün MMP'leri inhibe edebilmektedir. Fakat belirli bir TIMP molekülü, bazı MMP'leri inhibe edebilmektedir.

TIMP-1, MT1-MMP dahil olmak üzere çoğu MT-MMP'yi inhibe edemez. MMP-7 ve MMP-19'u inhibe ettiği bilinmektedir. TIMP-2, MT1-MMP aracılığıyla MMP-2 ve MMP-9 inhibisyonunda rol alır. TIMP-4, MT1-MMP ile etkileşime girerek dolaylı olarak MMP-2 aktivitesini düzenlediği bilinmektedir [52,55].

TIMP' ler, MMP'ler ile koordineli olarak eksprese edilmektedirler. TIMP'lerin N-terminal bölgesi MMP'lerin katalitik bölgelerindeki çinko ile kompleks oluşturarak enzimi inaktif formda tutarlar veya aktif enzimi inhibe etme özelliğine sahiptir [53, 54]. C-terminal bölgesinin MMP'lerin hemopeksin benzeri ile etkileşime girmesi de MMP'leri inaktif etmektedir (Şekil 14) [55].



Şekil 14. TIMP-1'in yapısı ve metalloproteinaz etkileşim bölgeleri
*IRI – V metalloproteinaz etkileşim bölgelerini göstermektedir.

TIMP-2 kolajenaz aktivitesini inhibe etmektedir. TIMP-2, TIMP3 ve TIMP4 Pro-MMP2 ile etkileşime girebilir [54, 56] . TIMP1 ve TIMP3 Pro-jelatinaz B'nin (MMP-9) karboksi terminal alanı ile etkileşime girebilir [55, 57]. Bu şekilde ekstrasellüler matriks yıkımı kontrol altında tutulmaktadır. TIMP'lerin MMP inhibisyon aktivitesine ek olarak mitojenik ve hücre büyümesini indükleme aktivitesi de vardır. TIMP'lerin ekspresyonu çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinler tarafından, gelişim, yaralanma ve doku onarımı dahil olmak üzere çeşitli durumlarda indüklenebilir veya inhibe edilebilir. TIMP-1 ve TIMP-2 bazı tümör hücreleri için büyüme faktörleridir [58]. TIMP-3, ekstrasellüler matrikse sıkıca bağlıdır. TIMP-3 ayrıca TNF-alfa dönüştürücü enzimi inhibe eder ve apoptozisi indükler. TNF-alfa reseptörlerinin hücre yüzeyinde stabilizasyonunu sağlar. TIMP-4 ise ekstrasellüler matriksin hemostazisini ve apoptozisin stimülasyonunu sağlar [59].

Tüm MMP'ler prepo-enzim olarak sentezlenir ve genelde inaktif formda hücre dışına salgılanırlar. MMP'ler proteinazlar tarafından ve in vitro koşullarda bazı kimyasallar tarafından etkinleştirilebilirler. ProMMP'lerin çoğu hücre dışına salgılanır ve aktivasyonu hücre dışında gerçekleştirilir. MMP ekspresyon seviyesi herhangi bir

doku onarımı ve yenilenmesi esnasında artar. Normal, dinlenme halindeki dokularda eksprese edilemezler ya da çok az eksprese edilirler [36].

Çeşitli endojen MMP inhibitörlerinin, MMP'lerin işlevini hem hücre içinde hem de hücre dışında düzenlediği bilinmektedir [36, 46]. Örneğin proMMP-2'nin aktivasyonu hücre yüzeyinde gerçekleşir ve MT-MMP'ler aracılık eder. Bu aktivasyon sürecine TIMP-2 de katılır. MMP'lerin endojen inhibitörleri genel dolaşımda alfa-2 makroglobulin, dokuda bulunan inhibitör proteinleri ise TIMP'lerdir. a2-Makroglobulin genellikle TIMP'ler eksik olduğunda işlev görür. TIMP'lerin öncelikli görevinin metalloproteinaz aktivitesinin düzenlenmesi olduğu düşünülmektedir. TIMP seviyelerindeki değişikliklerin, MMP aktivitesinin seviyesini doğrudan etkilemesi nedeniyle önemli olduğu düşünülmektedir. MMP inhibisyonuna ek olarak TIMP'ler, mitojenik ve hücre büyümesini indükleme aktivitesinde rol oynarlar. TIMP-1 ve TIMP-2 bazı tümör hücreleri için büyüme faktörleridir. Omurgalılarda dört tip TIMP (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 ve TIMP-4) tanımlanmıştır. MMP'ler gibi aynı hücre türleri tarafından sentez edilirler ve ekspresyonları, gelişim ve doku yeniden yapılanması sırasında düzenlenir. Dört TIMP'nin, TIMP-1'in MT1-MMP'yi inhibe edememesi dışında, belirli bir MMP için çok az seçiciliği vardır [32, 36, 46]. Yapılan çalışmalar, TIMP-1 ve -2'nin pro-MMP-2 ve pro-MMP-9'a bağlandığını göstermiştir. TIMP-3 ekstraselüler matrikse bağlıdır. TNF-alfa dönüştürücü enzimi inhibe eder ve apoptozu indükler. TIMP-4 ekstraselüler matriksin hemostazisini ve apoptozun stimülasyonunu sağlar [36, 46].

2.3.7. Matriks Metalloproteinazların Fizyolojik ve Patolojik Fonksiyonları

Normal fizyolojik koşullarda, MMP' ler embriyonik büyüme, doku morfogenezisi ve büyümenin devamlılığı için bağ dokusunda üretilmektedir. Bu üretim, trofoblast implantasyonu, menstürel siklus, ovulasyon, doku hasarının tamiri ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik süreçlerde oldukça önem taşımaktadır.

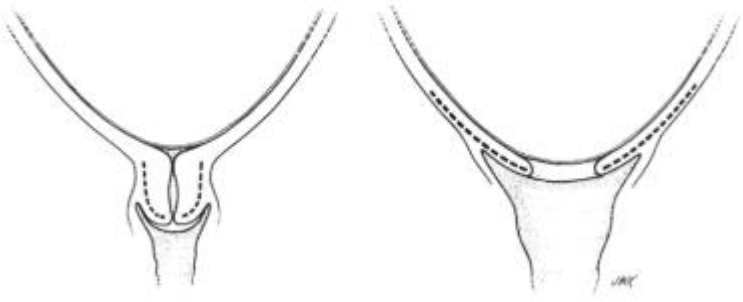
MMP' lerin dokuların yeniden yapılandırılmasındaki rollerini gösteren çalışmalar bildirilmiştir. MMP genlerinin, menstürel siklus, ovülasyon gibi reprodüktif durumlar ileuterus, meme ve prostat involusyonu sırasında yüksek düzeyde eksprese edildiği bildirilmiştir. Örneğin, kollojenaz 2 ve kollojenaz 3 postpartum uterus involusyonunda up-regüle olmaktadır. Ayrıca gonadotropinin indüklediği ovulasyonda

MMP genlerinde ekspresyon olduğu ve MMP' ların folliküler duvar yıkımına yol açtığı bildirilmiştir. MMP-2 ve MMP-3 pubertede meme bezlerinin morfogenezisini düzenlemektedir. MMP-2 ve MMP-9 adiposit differansiyasyonunu sağlayarak adipogeneziste rol almaktadır. MMP'lar aynı zamanda yara iyileşmesinde yara kenarlarındaki hasarlı yüzeyde reepitelizasyonu gerçekleştirmek için keratinosit migrasyonunu sağlar. Hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda MMP-1 in proteolitik aktivitesinin keratinosit migrasyonu için gerekli olduğunu göstermiştir.

MT1-MMP geni silinmiş fareler, gelişim aşamasında iskelet ve bağ dokusu gelişiminde anormal gelişim göstermiştir [60]. Bir göz hastalığı olan Sorsby's fundus distrofisi TIMP-3 geninde meydana gelen mutasyon sonucunda meydana gelip MMP'lerle ilişkilendirilen ilk genetik hastalıktır. Tip IV kolajeni parçalayabilen MMP-2 ve MMP-9'un tümör gelişimi ve metastazındaki rolü yapılan araştımalarla desteklenmektedir. İlaç şirketleri tarafından tümör yayılımını önlemeye yönelik çeşitli MMP inhibitörleri geliştirilmektedir.

2.4. Gebelikte Serviksin Yeniden Şekillenme Süreci

Gebelik sürecinde fetüsü uterusta tutmak için sıkı ve kapalı kalması gereken serviks, doğumun yaklaşması ile yumuşar ve olgunlaşır. İnsanda gebeliğin ortalarından doğuma dek serviks kısalır. Doğumun başlamasıyla uterus kasılmaları beraberinde serviks yaklaşık 10 cm açılarak genişler ve huni benzeri bir şekil alarak fetüsün geçişine izin verir. Serviksin dilatasyonu internal os bölgesinden başlar [3]. Uterus kasılmaları başlamadan serviksin dilatasyona uğraması servikal yetmezlik olarak adlandırılır ve bu durum erken doğum riski oluşturur (Şekil 15) [61].



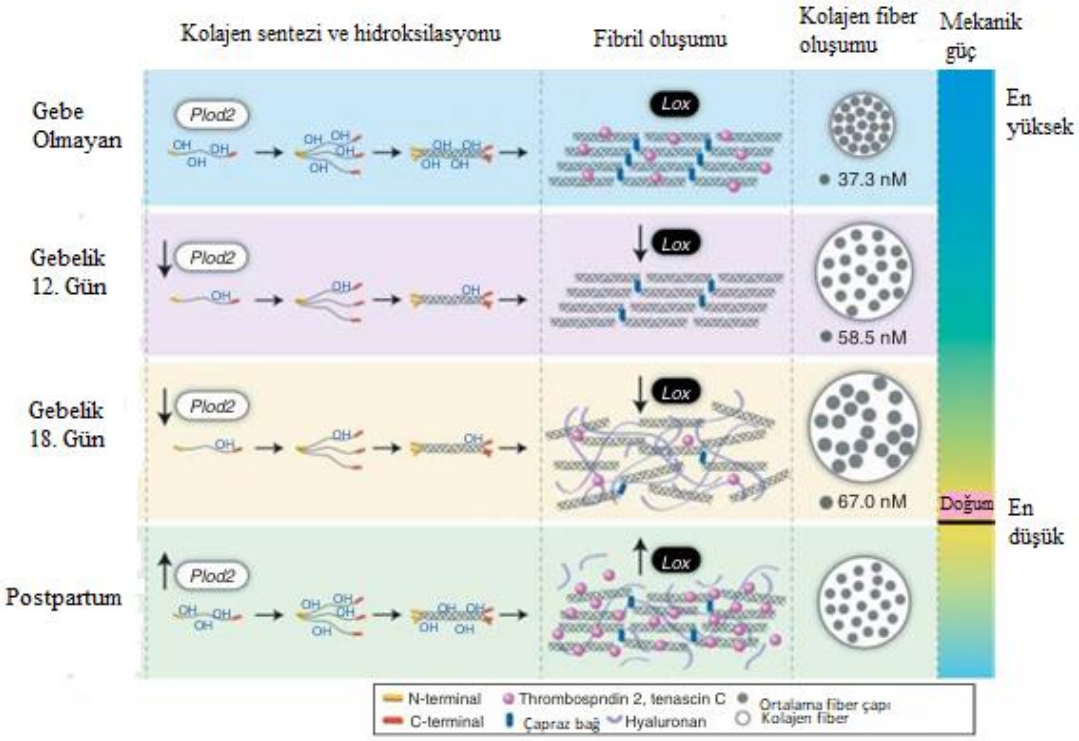
Şekil 15. Serviksin Dilatasyonu [3]

Gebelik süreci steroid hormonlar tarafından yönetilir. Hormon seviyelerindeki değişimler gebeliğin ve doğumun zamanlamasında etkilidir. Gebelikle birlikte progestoron seviyesi yükselirken östrojen seviyesi düşer. Gebelik sürecinde yüksek kalan progestoron seviyesi insanda gebeliğin son trimesterinde azalarak progestoron/östrojen oranı düşer. Bu durum farelerde doğumdan önceki birkaç gün içinde gerçekleşir. Doğuma yakın gerçekleşen hormon seviyesindeki bu değişim fetüsün serviksten geçişini sağlayacak servikal değişim sürecini de yönetir [9].

Uterus kasılmalarından önce servikste meydana gelen dinamik değişim, doğum eyleminin gerçekleşmesi için aktif rol oynar. Gebelik sürecinde doğumun başlangıcına kadar fetüsü anne rahminde tutmak için sıkı ve kapalı kalması gereken serviks, doğum başladığında fetüsün endoservikal kanaldan geçişine izin vermek için gebelik sürecinde sıralı ve zamanlı olarak bir takım dinamik aşamalardan geçerek esnek bir yapıya ve belirli bir açıklığa ulaşmalıdır. Gebelik sürecinde serviks dokusunun geçireceği bu değişimler, dokunun hücre oranına kıyasla daha fazla miktarda miktarda bulunan ekstraselüler matriks bileşenlerinin içeriğinde meydana gelen biyokimyasal ve moleküler değişimler ile mümkündür. Çalışmalar sonucunda bu değişimin en belirgin örneği servikal kolajende fibriller arası çapraz bağların azalmasıdır [19]. Doğum gerçekleştikten sonra ise eski formuna dönmek üzere serviks yeniden düzenlenmelidir. Bu aşamalar yumuşama, olgunlaşma, dilatasyon/silinme ve postpartum onarım olmak üzere dört aşamadır [18].

Yumuşama, serviks doku esnekliğinde ölçülebilen ilk artıştır. 1895 yılında Hegar tarafından tanımlanmıştır ve bu değişim koryonik gonodotropinin keşfine dek klinik olarak gebeliği teşhis etmek için kullanılmıştır. Bu aşama gebe fare ve sıçanların 12. gebelik gününde başlayarak artarak devam eder [18]. Servikal yumuşama aşaması, kolajen içeriği sabit kalırken, kolajen çapraz bağlarının azalmasıyla kolajen mikro mimarisinde ölçülebilir değişiklikler ve çözünür kolajen yüzdesinin artması ile karakterize edilir [18,65]. Kolajen tip I ve III servikste bulunan ana kolajenlerdir. Kolajen çapraz bağlarındaki azalma, gebeliğin erken zamanlarında başlayarak artarak devam eder. Yavaş ilerleyen bir süreçtir [2,66]. Kolajen çapraz bağlarının oluşumunda görevli iki protein lizil oksidaz (LOX) ve Lizil hidroksilaz (PLOD)'dır. Gebe farelerde LOX östrojen tarafından düzenlenir ve gebelik boyunca servikste azalır. Ayrıca farelerde gebeliğin ilerlemesiyle plod2 ve ekstrasellüler matriks proteinlerinden olan

Trombospondin 2 (THBS2) ve Tenascin C (TNC) mRNA ekspresyon seviyesinde bir azalma bildirilmiştir. Gebeliğin başlangıcında kolajen fibrilleri arasındaki çapraz bağların azalması ve kolajen fibril çapının artması, serviks dokusunun yumuşaması ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür (Şekil 16) [66,67]. Ekstraselüler matrikste yer alan glikoprotein olan trombospondin 2 geni silinmiş farelere erken servikal yumuşama ile ilişkilendirilmiştir [68].



Şekil 16. Gebelikte servikal kolajen çapraz bağların değişimi [9]

Servikal olgunlaşma olarak tanımlanan ikinci aşama ekstraselüler matriksin yeniden düzenlenmesi ile gerçekleşir. Olgunlaşma, hyaluronan içeriğinde ve kolajen çözünürlüğünün artması, enflamatuar hücrelerin dağılımındaki değişiklikler, artmış doku büyümesi ve hidrasyon ile serviks dokusunda elastikiyet kaybı ile karakterize edilir. Olgunlaşma aşaması yumuşamaya kıyasla daha geç bir evrede başlar ve hızlı gelişir. Farelerde 18. gebelik gününün sonunda servikal olgunlaşma gerçekleşir [65].

Doğum sonrasında serviksin eski haline dönmesi postpartum onarım aşamasıyla gerçekleşir. Yumuşama ve olgunlaşma evrelerinde meydana gelen biyokimyasal

değişimler ters yönde düzenlenir. Çapraz bağları yıkılarak daha gevşek bir formda olan kolajen fibrilleri arası çapraz bağlar yeniden sentezlenerek doku mekanik gücünü yeniden kazanır. Bu süre insanda yaklaşık 6 hafta kadardır [69].

2.5. Prematür Servikal Olgunlaşma

20. ve 37. gebelik haftası arasında gerçekleşen doğumlar erken doğum olarak tanımlanır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün verilerine göre 2020 yılında yaklaşık 13,4 milyon erken doğum gerçekleşmiştir. Erken doğum, 5 yaş altı ölümlerin ana nedeni olarak gösterilmektedir. 2019 yılında yaklaşık 900.000 çocuk erken doğuma bağlı nedenlerle hayatını kaybetmiştir. Hayatta kalanlarda ise yaşamı boyunca farklı sağlık problemleri görülmektedir. (Dünya Sağlık Örgütü, 10 Mayıs 2023)

Erken doğum, enfeksiyon, gebelikte beslenme ve stres, genetik faktörler ve servikal yetersizlik gibi çeşitli nedenlere bağlı olarak gerçekleşir. Erken doğumların çoğunun nedeni bilinmemekte ve spontan gerçekleşmektedir. Spontan erken doğumun belirtileri, servikste olgunlaşma, kısalma ve dilatasyon olaylarının vaktinden önce gerçekleşmesiyle sonuçlanır. Ultrason görüntüleri sonrasında serviks uzunluğunda kısalma olması ve iç ostan açılmanın başlamasıyla hunileşme denilen olayın oluşması erken doğum belirtileri olarak kabul edilmektedir. Kadın doğum hekimliğinde, doğumun vaktinde gerçekleşmesi için yapılan müdahaleler anneye progesteron takviyesi ve servikal serklaj yöntemleridir. Fakat günümüzde hala tek bir nedene bağlanamamakta ve servikste meydana gelen erken değişimlerin sebebi araştırılmaya devam etmektedir [73].

Gebelikte servikal bağ dokuda meydana gelen değişimlerin sırası ve zamanlaması doğumunda normal ve zamanında gerçekleşmesi için önemlidir**.** Servikste meydana gelen hücresel ve hücre dışı mekanizmaların araştırılması hem fizyolojik olarak bu sürecin daha iyi anlaşılmasına hem de erken servikal olgunlaşma sonucunda doğumun erken gerçekleşmesiyle preterm doğumların da altında yatan sebeplerin anlaşılmasına olanak tanıyacağı düşünülmektedir. Model hayvanlarla yapılacak deneysel çalışmalar bu mekanizmanın ayrıntılarını araştırmaktadır. Bu çalışma normal doğum sürecinin daha iyi anlaşılması ve erken doğum risk faktörlerinin tespit edilmesi açısından önemlidir [74].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Sıçan Servikslerinin Temini ve Gruplandırılması

Araştırmada daha önce deneye girmemiş ve çiftleşmemiş, 90 günlük, ortalama ağırlıkları 200-250g olan *Rattus norvecigus* türü, Wistar albino, 10 adet gebeliğin 15. gününde, 10 adet gebeliğin 20. gününde olmak üzere toplamda 20 adet sıçan kullanıldı. Deney hayvanları Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden (SABİDAM) temin edildi. Hayvanların üretimi ve deney gününe kadar gözlem ve bakımı SABİDAM tarafından gerçekleştirildi. Araştırma konusu, Çukurova Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 31 Ekim 2023 tarihli toplantının kararıyla bilimsel etik onayı almıştır.

Sıçanlar dişi/erkek oranı 3/1 olacak şekilde kafeslerde bırakıldı. Sıçanların gebe olduğuna vajinal tıkaç muayenesi yapılarak karar verildi. Vajinasında tıkaç görülen hayvan gebeliğin birinci gününde kabul edildi. Gebeliğinin 15. gününe ve 20. gününe ulaşan hayvanlardan serviks dokusunun çıkarılması SABİDAM ameliyathanesinde yapıldı. Hayvanlar 0.1 ml Basilazin (%2) ve 0.2 ml Ketasol (%10) karışımının intraperitoneal yolla enjekte edilmesiyle anestezi edildi. Anestezi altına giren hayvanın batın duvarı açılarak uterus ve embriyoları tespit edildi (Şekil 17 ve 18). Uterus boynuzları yukarı mesane aşağı gerdirilerek serviks dokusu tespit edildi (Şekil 19). Serviks dokusunun eksternal yüzeyi, yönü kaybetmemek amacıyla işaretlenerek çıkarıldı (Şekil 20). Çıkarılan serviks dokusu steril bir petri kabına alınarak, uterusa yakın yarısı (Portio Supravaginalis) ve vajinaya yakın yarısı (Portio Vaginalis) simetrik olarak iki eş parçaya ayrıldı (Şekil 21). Doku örnekleri steril ependorf tüpler içerisine alınarak sıvı azotta dondurulduu. Daha sonra örnekler sıvı azottan alınarak, RNA izolasyonuna kadar -80°C derin dondurucuda muhafaza edildi.

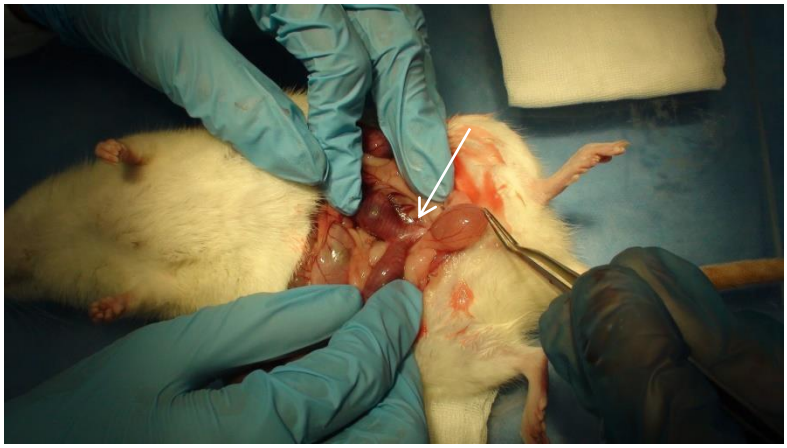
Onbeşinci güne ait 10 adet Portio Vaginalis ve 10 adet Porsiyo Supravaginalis; 20. güne ait 10 adet Portio Vaginalis ve Portio Supravaginalis olmak üzere toplamda 40 sıçan serviks doku örneği ile 4 deney grubu oluşturuldu.



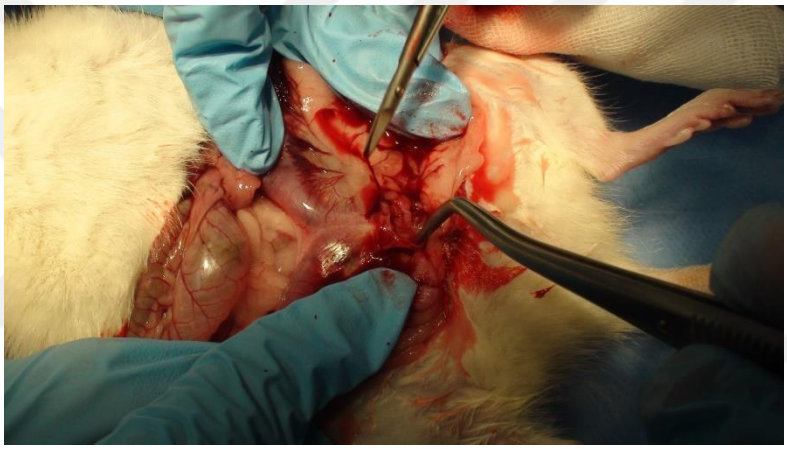
Şekil 17. Gebeliğin 15. gününde olan sıçan



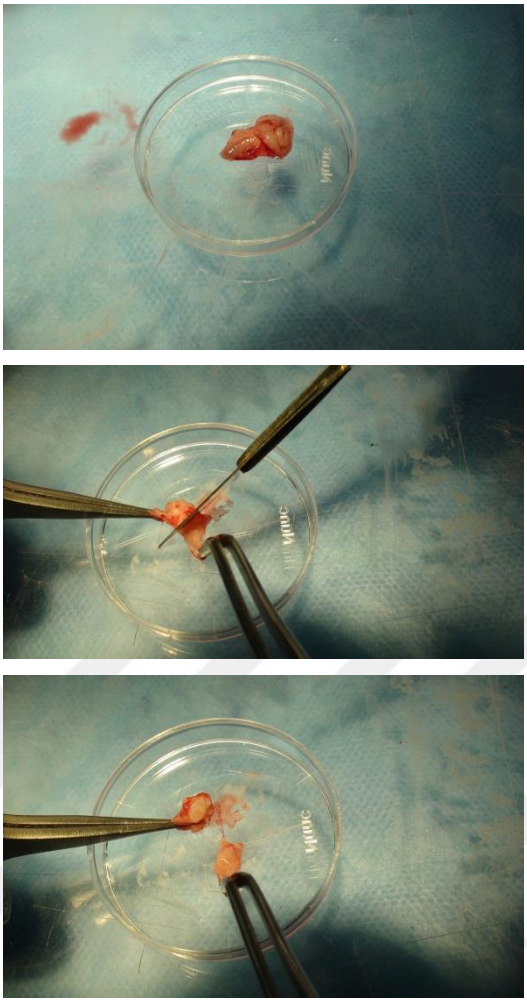
Şekil 18. Gebeliğin 20. gününde olan sıçan



Şekil 19. Uterus boynuzunun yukarı mesanenin aşağı çekilmesiyle serviks dokusunun tespiti



Şekil 20. Serviksin diseksiyonu.



Şekil 21. Serviksin eksternal ve internal yönü tespit edilerek simetrik iki eş parçaya ayrılması

3.2. Serviks Dokularından RNA İzolasyonu

Serviks dokuları soğuk blok üzerinde steril bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrıldı. RNA izolasyon kiti (DiaRex, HIzol Reaktifi, DİAGEN, katolog no: HT-8625-50) kullanılarak serviks dokularından total RNA izole edildi. RNA'ların konsatrasyon ve saflık ölçümü Implen NanoPhotometer cihazı kullanılarak yapıldı. Ölçüm sonuçları dikkate alınarak RNA'lar cDNA sentezi için kullanılmak üzere 250 ng /µl olacak şekilde dilue edildi. Kalan stok RNA'lar -80°C'de muhafaza edildi.

3.2.1. RNA İzolasyon Protokolü

1. Her tüpe 1ml HIzol eklendi. 5 dakika inkübasyon yapıldı.
2. 0.2 ml kloroform eklendi. 15 saniye vorteks yapıldı. 2-3 dakika inkübasyon yapıldı.
3. 15 dakika 12,000xg 4'de santrifüj yapıldı. Oluşan 3 fazdan RNA içeren en üst şeffaf faz yeni tüpe aktarıldı.
4. Yeni tüpe aktarılan örneklerin üzerine 500µl izopropanol eklendi.
5. 10 dk inkübasyon yapıldı.
6. 12000 g 4°C'de 10 dk santrifüj yapıldı.
7. Üst fazı uzaklaştırıldı.
8. Her örnek üzerine 1 ml %75 etanol eklendi.
9. Örnekler kısa vorteks yapılarak 7500g 4°C'de 5 dk santrifüj yapıldı.
1. 10.Üst faz uzaklaştırıldı. RNA pelleti 5-10 dk kurumaya bırakıldı.
10. Pellet DEPC su ile çözdürüldü.

3.3. cDNA (Komplementer DNA Zincir) Sentezi

Serviks doku örneklerinden elde edilen total RNA'lardan cDNA sentez kiti (One®Script Plus cDNA Synthesis Kit, katalog numarası: G236) ile cDNA elde edildi. cDNA sentezinin eldesinde kullanılan karışım içeriği ve miktarı, ısı döngü ve süreleri tablolarda verilmiştir (Çizelge 1 ve 2).

Çizelge 1. cDNA sentez karışım içeriği ve bir örnek için kullanılan hacim miktarları

Komponent	**Hacim**
5X RT Buffer	4 µl
dNTP	1µl
Primers	1µl
Total RNA	Değişken (1 ng – 2 µg/reaksiyon)
One®Script Plus RTase	1 µl
Nükleazsız Su	20µl'ye tamamlanır

Çizelge 2. cDNA ısı döngüleri ve süreleri

Sıcaklık	Zaman	Döngü
50-55 °C	15 dakika	1
85°C	5 dakika	1

3.4. Gerçek Zamanlı Kantitaif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

RT-PCR işlemi (HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) 5X, by Solis BioDyne, Katalog Numara: 08-24-00001) qPCR kiti kulanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon işlemi için Azure Cielo Real-Time PCR cihazı kullanıldı. q-PCR reaksiyonu için kullanılan karışım miktarları, reaksiyonun gerçekleştiği ısı döngü ve süreleri, hedef genlerin forward ve reverse nükleotit dizileri aşağıdaki tablolarda belirtilmektedir (Çizelge 3,4 ve 5).

Çizelge 3. RT-PCR reaksiyon bileşenleri ve bir örnek için kullanılan hacim miktarları

Bileşen	Hacim
HOT FIREPol® qPCR Mix Plus (5x)	4µl
Forward Primer	0.16-0.5 µl
Reverse Primer	0.16-0.5 µl
DNA Template	1,5 µl
H_2O	20µl' ye tamamlanır
Total	20 µl

Çizelge 4. RT-PCR ısı döngüleri ve süreleri

Aşama	Sıcaklık	Zaman	Döngü
Intıal Activation	95°C	12 dk	1
Denatürasyon	95°C	15 saniye	40
Annealing	60°C	20 saniye	
Extension	72°C	20 saniye	

Çizelge 5. Primer Listesi

Gen Sembolü	Gen Adı	RefSeq	Dizi (5'-3')	Amplikon Boyutu (bp)
MMP-2 [81]	Matriks Metalloproteinaz-2	NM_031054.2	F: GTCTTCCCCTTCACTTTTCTG	248
			R: CGGAAGTTCTTGGTGTAGGTG	
MMP-8 [82]	Matriks Metalloproteinaz-8	NM_022221.2	F: GGATTCCCAAGGAGTGTCCA	151
			R: CTGGGAACACGCTTGCTATG	
TIMP-1 [83]	Matriks Metalloproteinaz Doku İnhibitörü-1	NM_053819.1	F: TCCCTGTTCAGCCATCCCTTG	96
			R: TCGCTCTGGTAGCCCTTCTC	
ACTB [84]	Aktin Beta	NM_031144.3	F: TGTCACCAACTGGGACGATA	165
			R: GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA	

3.5. İstatistiksel Analiz

Çalışmada yer alan genler arasında MMP2, MMP8, TIMP1 ve referans gen olarak ACTB yer almaktadır. RNA izolasyonu sonrası elde edilen örneklerden cDNA sentezi yapılmış ve reaksiyonlar Azure Cielo Real-Time PCR cihazında yürütülmüştür. Her bir örnek için çalışma iki kez tekrar edilmiş. Elde edilen Ct değerleri, RT² Profiler PCR Array Data Analysis Web Portal Version 3.5 yazılımı ile analiz edilmiştir. Gen ekspresyon düzeyleri 2^(-ΔΔCt) yöntemi ile hesaplanmıştır. Kontrol ve deney grupları arasındaki farkların istatistiksel analizi Student's t-testi uygulanarak anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Total RNA izolasyonu sonrası örneklere ait konsantrasyon ve absorbans değerleri çizelge 6'da verilmiştir.

Çizelge 6. RNA konsantrasyon ve absorbans değerleri

Örnek Sırası	Örnek Kimliği	RNA Konsantrasyon (ng/µl)	Absorbans (260/280)
1	15G_PV_H1	1646	1936
2	15G_PV_H2	406	1897
3	15G_PV_H3	468	1882
4	15G_PV_H4	1404	1887
5	15G_PV_H5	608	1888
6	15G_PV_H6	958	1871
7	15G_PV_H7	514	1904
8	15G_PV_H8	2406	1931
9	15G_PV_H9	1008	1938
10	15G_PV_H10	2026	1952
11	15G_PS_H1	472	1888
12	15G_PS_H2	400	1869
13	15G_PS_H3	502	1887
14	15G_PS_H4	174	1813
15	15G_PS_H5	1692	1923
16	15G_PS_H6	1260	1842
17	15G_PS_H7	984	1829
18	15G_PS_H8	1764	1674
19	15G_PS_H9	1710	1934
20	15G_PS_H10	1190	1889
21	20G_PV_H1	356	1914

22	20G_PV_H2	776	1902
23	20G_PV_H3	970	1902
24	20G_PV_H4	2112	1931
25	20G_PV_H5	868	1764
26	20G_PV_H6	1624	1518
27	20G_PV_H7	966	1894
28	20G_PV_H8	688	1830
29	20G_PV_H9	652	1906
30	20G_PV_H10	466	1991
31	20G_PS_H1	558	1898
32	20G_PS_H2	2732	1932
33	20G_PS_H3	582	1877
34	20G_PS_H4	610	1918
35	20G_PS_H5	892	1906
Örnek Sırası	**Örnek Kimliği**	**RNA Konsantrasyon (ng/µl)**	**Absorbans (260/280)**
36	20G_PS_H6	548	1864
37	20G_PS_H7	1532	1929
38	20G_PS_H8	968	1928
39	20G_PS_H9	626	1909
40	20G_PS_H10	612	1889

RT-PCR sonra tüm gruplara ait ortalama Ct ve standart sapma değerleri çizelge 7 ve 8'de verilmiştir.

Çizelge 7. Tüm gruplara ait ortalama Ct değerleri

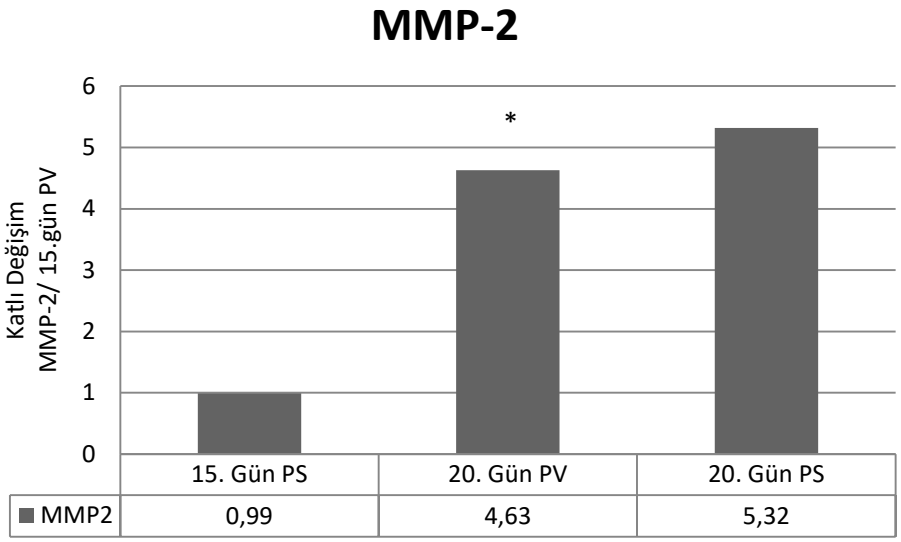
Genler	Ortalama Ct			
	15. gün PV	**15. gün PS**	**20. gün PV**	**20. gün PS**
ACTB	23.84	24.02	25.40	25.72
MMP2	29.97	30.16	29.31	29.43
MMP8	29.93	30.21	30.25	31.36
TIMP1	23.89	23.57	25.49	24.91

Çizelge 8. Tüm gruplara ait standart sapma değerleri

Genler	Standart Sapma			
	15. gün PV	**15. gün PS**	**20. gün PV**	**20. gün PS**
ACTB	0.463168	1.137356	0.391672	1.276738
MMP2	0.314432	0.104915	0.847144	0.357583
MMP8	0.431779	0.307501	0.614540	0.647533
TIMP1	0.508353	0.715333	0.695209	1.515179

4.1. Serviks Matriks Metalloproteinaz – 2 (MMP-2) Geninin Topografik Gen Ekspresyon Düzeyi

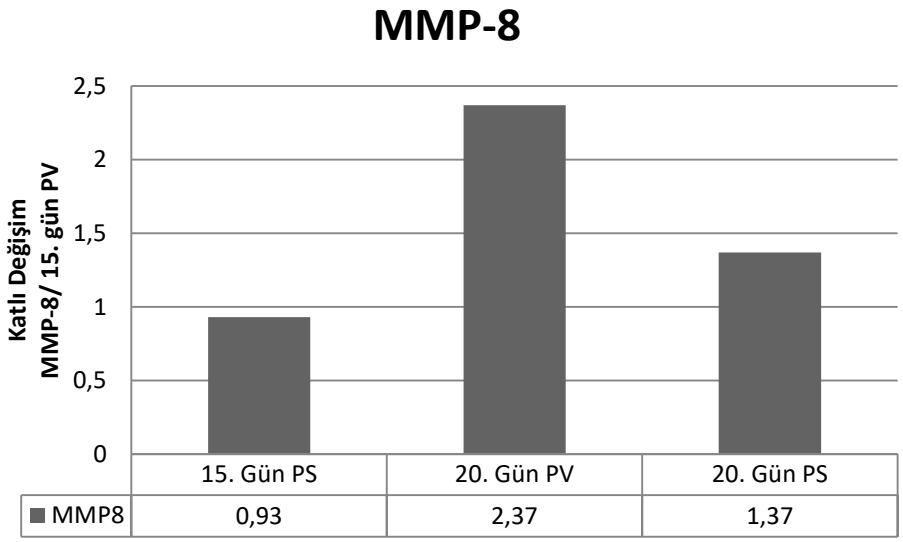
Gebeliğin 15. Ve 20. gününde olan sıçanlardan alınan serviks dokularının matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2) geninin ekspresyon düzeyi gerçek zamanlı polizeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile çalışıldı. Kontrol grubu olan 15. gün Portio Vaginalise göre serviksin diğer bölgelerindeki gen ekspresyon düzeyi Şekil 22'de verilmiştir. MMP-2 Geni ifade seviyesi, 20. gün Portio Vaginalis grubunda, 15. gün Portio Vaginalis grubuna 4,63 kat arttığı görüldü ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



Şekil 22. Onbeşinci gün Portio Supravaginalis, 20. gün Portio Vaginalis ve 20. gün Portio Supravaginalis bölgelerinde MMP-2 geninin ekspresyon seviyesinin katlı değişimi. İstatistiksel önem *<0,05 , **<0,01 , ***<0,001 şeklinde gösterilmişitir.

4.2. Serviks Matriks Metalloproteinaz –8 (MMP-8) Geninin Topografik Olarak Gen Ekspresyon Düzeyi

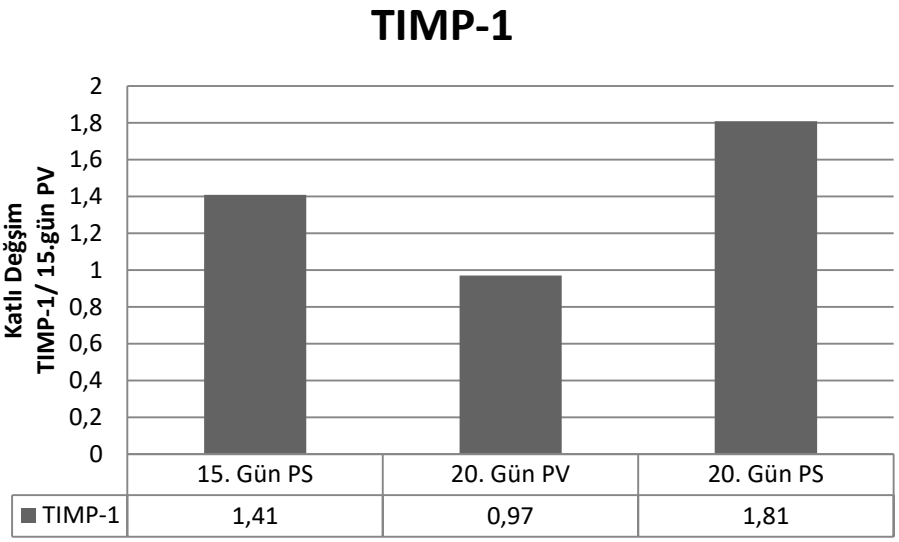
Gebeliğin 15. Ve 20. gününde olan sıçanlardan alınan serviks dokularının matriks metalloproteinaz-8 (MMP-8) geninin ekspresyon düzeyi gerçek zamanlı polizeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile çalışıldı. Kontrol grubu olan 15. gün Portio Vaginalise göre serviksin diğer bölgelerindeki gen ekspresyon düzeyi Şekil 23'te verilmiştir. MMP-8 Geni ekspresyon seviyesi, 20. gün Portio Vaginalis grubunda, 15. gün Portio Vaginalis grubuna kıyasla 2,37 kat arttığı görüldü.



Şekil 23. Onbeşinci gün Portio Supravaginalis, 20. gün Portio Vaginalis ve 20. gün Portio Supravaginalis bölgelerinde MMP-8 geninin ekspresyon seviyesinin katlı değişimi. İstatistiksel önem *<0,05 , **<0,01 , ***<0,001 şeklinde gösterilmişitir.

4.3. Serviks Mariks Metalloproteinaz Doku İnhibitörü – 1 (TIMP-1) Geninin Topografik Olarak Gen Ekspresyon Düzeyi

Gebeliğin 15. Ve 20. gününde olan sıçanlardan alınan serviks dokularının matriks metalloproteinaz doku inhibitörü-1 (TIMP-1) geninin ekspresyon düzeyi gerçek zamanlı polizeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile çalışıldı. Kontrol grubu olan 15. gün Portio Vaginalise göre serviksin diğer bölgelerindeki gen ekspresyon düzeyi Şekil 24'te verilmiştir. TIMP-1 Geni ekspresyon seviyesi, 20. gün Portio Supravaginalis grubunda, 15. gün Portio Vaginalis grubuna kıyasla 1,81 kat arttığı görüldü.



Şekil 24. Onbeşinci gün Portio Supravaginalis, 20. gün Portio Vaginalis ve 20. gün Portio Supravaginalis bölgelerinde TIMP-1 geninin ekspresyon seviyesinin katlı değişimi. İstatistiksel önem *<0,05 , **<0,01 , ***<0,001 şeklinde gösterilmişitir.

5. TARTIŞMA

Doğumun zamanında gerçekleşmesi, gebelik sürecinde üreme sistemindeki bütün organlarda meydana gelen fizyolojik değişimlerin normal sürecinde ve koordinasyonlu ilerlemesiyle olmaktadır. Bu fizyolojik değişimlerin anormal gelişmesi preterm veya postterm doğumların meydana gelmesi ile sonuçlanabilmektedir. Preterm doğum 37. gebelik haftasından önce gerçekleşen doğumları tanımlamaktadır. DSÖ 2020 yılında 13,4 milyon preterm doğumun gerçekleştiğini açıklamıştır. Preterm doğum 5 yaş altı çocuk ölümlerinin başlıca nedenlerinden biri olarak gösterilmekte ve yenidoğan sağlığı için risk oluşturmaktadır. Preterm ve term doğumda ortak gerçekleşen fizyolojik olaylardan biri servikal yeniden şekillenmedir. Gebelik sürecinde servikste meydana gelen fizyolojik ve moleküler değişimlerin anlaşılması, preterm doğumların engellenebilmesi için etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Gebelik süresince kapalı kalan serviks, doğumun başlamasıyla fetüsün endoservikal kanaldan geçişini sağlayacak doku elastikiyetine ve açıklığına ulaşmalıdır. Servikal yeniden şekillenme süreci yumuşama, olgunlaşma, dilatasyon ve post partum onarım olmak üzere dört evrede gerçekleşir. Serviks dokusunda ölçülebilen ilk değişim, gebeliğin erken dönemlerinde gerçekleşen doku sertliğindeki azalmadır. Yumuşama olarak tanımlanan bu evre, gebe fare ve sıçanlarda 12. gebelik gününde başlar. Servikal olgunlaşma evresi, doku bütününe oranla stromada daha fazla miktarda bulunan ekstraselüler matriksin yeniden şekillenmesi ile gerçekleşir. Bu evre farelerde 18. gebelik gününde meydana gelir [18].

İnsan serviksinin yoğun olarak bağ dokudan oluştuğu, düz kas hücrelerinin ise yaklaşık %15 oranında bulunarak bağ dokuya oranla daha az miktarda bulunduğu 1947 yılında Danforth'un çalışması sonucunda gösterilmiş ve servikal dilatasyonda önemli bir etken olabileceği vurgulanmıştır [70]. Ekstraselüler matrikste önemli bir protein olan elastin ve elastik fiberlerin serviks stromasında dağılımı Leppert ve ark.'nın çalışmaları sonucunda gösterilmiştir [30]. Kolajen servikste baskın olan ESM proteinidir ve elastinle beraber servikal dokunun sertliğinde ve elastikiyetinde ana rol oynar. Yu ve ark. tarafından gebe sıçanlarda servikal kolajen dağılımı elektron mikroskobu ile incelenmiş ve çalışma sonucunda kolajenin düzensiz ve dağınık yapısının servikal yumuşama ile

ilgili olabileceği düşünülmüştür. Bu süreçte rol oynayabilecek proteolitik enzimlere dikkat çekilmiştir [71].

Farelerle yapılan bir çalışma, normal ve erken doğum hayvan modellerinde servikste kolajen yapılanmasında değişiklikler olduğunu göstermiştir. Fakat çalışma, erken doğum modelinde kolajen yapılanmasının farklı bir süreci olduğunu vurgulamaktadır [65] . Vink ve ark tarafından yapılan çalışma sonucunda ise servikste düz kas hücrelerinin internal os çevresinde yaklaşık %60 oranında ve düzenli bir yapı oluşturarak bulunduğu, bu oranın eksternal os da daha az miktarda olduğu bildirilmiştir [75]. Wu ve ark. güncel çalışmalarında normal ve erken doğum yapan kadınlardan alınan serviks örneklerinde hücre, kas ve kolajen dağılımını yeni MR görüntüleme yöntemi ile incelemiştir [76]. Günümüze uzanan tüm bu çalışmalar neticesinde serviksin heterojen bir doku yapısına sahip olduğu ve bağ doku ve hücre dağılımında bölgesel farklılıkların gebelik sürecinde ayrı fizyolojik değişimlere uğradığı düşünülmektedir.

ESM'de kolajen metabolizmasında görev alan bazı genlerdeki polimorfizm ve mutasyonlar servikal yetmezlik ile ilişkilendirilmiş ve spesifik gen kayıplarının anormal matris organizasyonuna sebep olmasından dolayı erken doğum için risk faktörü oluşturabileceği vurgulanmıştır. Doğum sırasında kolajen metabolizmasındaki değişikliklerin önemi, kolajen ve elastin sentezi veya düzenlemesinde kalıtsal kusurları olan kadınlarda servikal yetmezlik ve erken membran rüptürüne bağlı erken doğumun arttığına dair çok sayıda raporla desteklenmektedir (ör., Ehlers-Danlos ve Marfan sendromları). Plod2 geninde meydana gelen mutasyonlar Bruck sendromu hastalığı ile ilişkilendirilmiştir [68,72,80]. Yapılan çalışmalar sonucunda servikste meydana gelen değişimlerde ekstrasellüler matrikste meydana gelen değişimlerin başlıca etkili olduğu kabul edilmektedir ve araştırmalar bu alana yönelmiştir. Ekstrasellüler matriktse meydana gelen değişimlerde etkili olabileceği tahmin edilen genlerle ilgili çalışmalar mevcuttur. Akins ve ark. tarafından gebe farelerle yapılan çalışma sonucunda serviks ESM proteinlerinden THBS2 ve TNC proteinlerinin ekspresyon seviyelerinde azalma bildirilmiştir [66].

Bu çalışmada, gebe sıçan serviksinde MMP-2, MMP-8 ve TIMP-1 genlerinin gen ekspresyon değişimi topografik olarak RT-PCR yöntemiyle incelenmiştir. Araştırma konusu, gebeliğin 15. ve 20. günlerinde elde edilen bulguların karşılaştırılması yoluyla, hedef genlerin serviksin yeniden şekillenmesinde rollerini

araştırmayı amaçlamıştır. Literatürde MMP-2'nin gebelik süresince artan ekspresyonunu gösteren birçok çalışma olsa da, serviks dokusunu topografik olarak inceleyen çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada, sıçan serviksinin anatomik olarak ayrılmış iki bölgesinde (Portio Supravaginalis ve Portio Vaginalis) MMP-2 gen ekspresyonu RT-PCR ile değerlendirilmiştir

Gebeliğin 15. ve 20. günlerinde sıçanlardan alınan serviksleri iki ayrı anatomik bölgede Portio Supravaginalis (PS, üst yarı) ve Portio Vaginalis (PV, alt yarı) karşılaştırılmıştır. Kontrol grubu olan 15. gün PV'ye göre servikste 20. gün PV grubunda MMP-2 gen ekspresyonua 4,63 kat artış gözlemlenmiş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). 20. gün PS grubunda ise 5,32 katlık bir artış olmasına rağmen, bu fark istatistiksel analizde anlamlı bulunmamıştır. Sıçanların ortalama gebelik süresi 22 gündür. Doğum zamanı yaklaşan sıçanlarda 5 gün sonrasında MMP-2 seviyesindeki bu değişim, MMP-2 geninin serviksin yeniden modellenme ve olgunlaşma sürecinde önemli bir rol oynayacağını düşündürmektedir. Ultrason bulguları ve yapılan bazı çalışmalar doğumun başlamasıyla internal os bölgesinde açılmaya başlayan serviksin, yeniden modellenme sürecinde üst yarının önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. Bulgularımıza göre, MMP-2 gen ekspresyon seviyesindeki bölgesel farklılık, gebelikte servikal olgunlaşma sürecinin bölgesel olarak farklı yönetildiğini düşündürmektedir. Doğum yaklaştıkça artan MMP-2 seviyesi kolajen parçalanmasında rol alarak servikal olgunlaşmada dolaylı olarak etken gösteriyor olabilir. Lyons ve ark. sıçanlarla çalışmasında deney grupları arasında MMP-2, MMP-9, TIMP1 ve TIMP2 protein seviyeleri plazma, uterus ve servikste değerlendirilmiştir [77]. Servikste MMP-2 protein seviyesinin gebe olan gruplarda arttığı bulunmuştur. Benzer bir sonuç Staygar ve ark insan çalışmasında alınan serviks örneklerinde MMP-2 seviyesi immünohistokimyasal analizde ve RT-PCR sonuçlarında gebe olmayana kıyasla gebelikte MMP-2'nin arttığını göstermiştir [79]. Bu çalışmanın bulguları gebelik içerisinde de MMP-2 nin doğumun yaklaşması ile arttığı, transkripsiyonel düzeyde gösterilmiştir [77]. Clark ve ark.'nın çalışmasında 21. gün gebe sıçan serviksinde, 16. güne kıyasla MMP-2 protein seviyesinde artış bulmuştur [85].

Bu çalışmada, gebeliğin 15. ve 20. günlerinde sıçan serviksinden elde edilen dokularda MMP-8 gen ekspresyon düzeyleri RT-PCR yöntemi ile incelenmiştir. Bulgular, 20. gün PV grubunda MMP-8 gen ekspresyonunun, 15. gün PV grubuna

kıyasla 2,37 kat artış gösterdiğini ortaya koymuştur. MMP-8, özellikle nötrofil kaynaklı kolajenaz olarak bilinir ve başta tip I kollajen olmak üzere birçok bağ doku bileşeninin parçalanmasında rol alır. Doğum sürecinde nötrofil infiltrasyonunun arttığı, bunun sonucunda da MMP-8 gibi enzimlerin aktive olduğu gösterilmiştir. Bu bağlamda, servikal dokuda gebeliğin ilerlemesiyle birlikte MMP-8 seviyesinde gözlenen bu artış, servikal inflamasyon ve doku yumuşaması süreçlerine paralel bir moleküler değişimi yansıtıyor olabilir. Literatürde, MMP-8'in gebeliğin sonlarına doğru servikal olgunlaşma sürecine katkı sağladığı, preterm doğum riski taşıyan olgularda da yükseldiği gösterilmiştir. Örneğin, Maymon ve ark. MMP-8'in amniyotik sıvıda doğum öncesi artış gösterdiğini ve bu artışın inflamatuar bir yanıtla ilişkili olabileceğini bildirmiştir [86]. Bu çalışmadaki 2,37 katlık artış, servikal bölgede inflamasyonla ilişkili ESM yeniden düzenlenmesinin başlamış olabileceğini düşündürmektedir. Ancak, bu artışın MMP-2 kadar yüksek seviyede olmaması, MMP-8'in daha çok doğum eylemine yakın veya inflamatuar süreçlerde ön plana çıktığını gösterebilir. Dolayısıyla, MMP-8'in servikal yeniden modellemede destekleyici ancak ikincil bir rol oynadığı düşünülebilir. Sennstrom ve ark. gebe, gebe olmayan, doğum sonrası ve erken doğum yapan kadınlardan alınan serviks örnekleri ile MMP-1,3,8 ve TIMP-1 ve 2 protein dağılımını immünohistokimyasal olarak incelemiş ve MMP-8'in doğum sonrasında arttığı gösterilmiştir [78].

MMP'lerin aktivitesi, TIMP'ler tarafından düzenlenir. TIMP'in ana rolü, doku yeniden yapılanması sırasında MMP'lerin ekstraselüler matriks üzerindeki etkisini düzenlemektir. Gebeliğin 15. ve 20. günlerinde olan sıçanlardan alınan serviks dokularında TIMP-1 geninin ekspresyon düzeyi RT-PCR yöntemiyle incelenmiştir. Kontrol grubu olan 15. gün PV bölgesine kıyasla, 20. gün PS grubunda TIMP-1 gen ekspresyon seviyesinin 1,81 kat arttığı gözlemlenmiştir. PV bölgesinde TIMP-1 ekspresyonu 0,97 kat olarak saptanmış ve anlamlı bir değişim göstermemiştir. Bu durum, doğuma yaklaşan sıçanlarda TIMP-1'in ekspresyon yanıtının anatomik olarak bölgesel özellik gösterdiğini düşündürmektedir. Lyons ve ark. çalışmasında insan serviksinde TIMP-1 protein seviyesi gebe olmayana kıyasla, gebelikte arttığı bulunmuştur [77]. Gebelikte artması, MMP'lerin aktivitesini dengeleyerek servikal dokunun aşırı yıkımını önleyebileceğini düşündürmektedir.

Sıçan serviksinde gebeliğin 20. gününde PV bölgesinde MMP-2 gen ekspresyonunun 4,63 kat artması ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı bulunması, bu genin servikal olgunlaşma sürecinde önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. MMP-2'nin doğuma hazırlık aşamasında ekstrasellüler matriksin parçalanmasına doğrudan katkı sağladığı bilinmektedir. Aynı bölgede MMP-8 gen ekspresyonunun 2,37 kat artması, bu genin de inflamatuar süreçlere bağlı olarak aktive olmaya başladığını göstermektedir. Ancak MMP-8 artışının istatistiksel olarak anlamlı olmaması, servikal olgunlaşma sürecinde bu genin MMP-2'ye kıyasla ikincil bir rol üstlenebileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, servikal olgunlaşma süreci bölgesel farklılıklar gösterebilen, zamana bağlı olarak değişen, dinamik bir süreçtir. MMP-2, bu süreçte önemli bir enzim olabilir ve MMP-8, inflamatuar yanıtın göstergesi olarak destekleyici rol oynayabilir. TIMP-1 ise serviks doku bütünlüğünün korunması için bu süreçleri kontrol altında tutarak dengeli bir şekilde ifade ediliyor olabilir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. MMP-2 gen ekspresyonu, 20. gün PV grubunda 15. gün PV grubuna göre 4,63 kat artmış ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu, MMP-2'nin doğum öncesi servikal yeniden yapılanmada önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir.
2. Bulgular, servikal olgunlaşmanın hem zamana hem de topografik olarak moleküler düzeyde düzenlendiğini göstermektedir.
3. Çalışmanın bir sonraki aşamasında daha geniş örneklem gruplarıyla ve farklı gebelik günlerini kapsayacak şekilde tekrarlanabilir.
4. Çalışmanın post-translasyon sonrası aşamada da değerlendirilmesi enzimlerin aktivasyonlarının değerlendirilmesi açısından uygun olacaktır.
5. Benzer analizlerin insan serviks doku örneklerinde de yapılması bulguların insanlarda da değerlendirilmesi açısından önemli olacaktır.
6. Benzer analizlerin insan serviks hücre hatlarında da yapılması ve sonuçlarımız ile karşılaştırılması önemli olacaktır.

KAYNAKLAR

1. **Barnum, Carrie E et al**. "The Non-pregnant and Pregnant Human Cervix: a Systematic Proteomic Analysis." *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)* vol. 29,5 **(2022)**: 1542-1559.

2. **Leppert, P C.** "Anatomy and physiology of cervical ripening." *Clinical obstetrics and gynecology* vol. 38,2 **(1995)**: 267-79.

3. **Danforth, D N.** "The morphology of the human cervix." *Clinical obstetrics and gynecology* vol. 26,1 **(1983)**: 7-13.

4. **Mala Mahendroo, Shanmugasundaram Nallasamy**, Cervix, Editor(s): Michael K. Skinner, Encyclopedia of Reproduction (Second Edition), Academic Press, **2018**, Pages 339-346, ISBN 9780128151457,

5. **Hafez, E S.** "Structural and ultrastructural parameters of the uterine cervix." *Obstetrical & gynecological survey* vol. 37,8 **(1982)**: 507-16.

6. **Becher, Naja et al.** "The cervical mucus plug: structured review of the literature." *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica* vol. 88,5 **(2009)**: 502-13.

7. **Leppert, P C, and S Y Yu.** "Three-dimensional structures of uterine elastic fibers: scanning electron microscopic studies." *Connective tissue research* vol. 27,1 **(1991)**: 15-31.

8. **Vink, Joy, and Helen Feltovich.** "Cervical etiology of spontaneous preterm birth." *Seminars in fetal & neonatal medicine* vol. 21,2 **(2016)**: 106-12.

9. **Mahendroo, Mala.** "Cervical remodeling in term and preterm birth: insights from an animal model." *Reproduction (Cambridge, England)* vol. 143,4 **(2012)**: 429-38.

10. **Hynes, Richard O.** "The extracellular matrix: not just pretty fibrils." *Science (New York, N.Y.)* vol. 326,5957 **(2009)**: 1216-9.

11. **Frantz, Christian et al.** "The extracellular matrix at a glance." *Journal of cell science* vol. 123,Pt 24 **(2010)**: 4195-200.

12. **Rozario, Tania, and Douglas W DeSimone.** "The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view." *Developmental biology* vol. 341,1 **(2010)**: 126-40.

13. **Scott, J E.** "Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, in vitro and in the tissues." *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* vol. 6,9 **(1992)**: 2639-45.

14. **Schaefer, Liliana, and Roland M Schaefer.** "Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules." *Cell and tissue research* vol. 339,1 **(2010)**: 237-46.

15. **Hynes, Richard O, and Alexandra Naba.** "Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* vol. 4,1 a004903. 1 Jan. **2012**.

16. **von Maillot, K et al.** "Changes in the glycosaminoglycans distribution pattern in the human uterine cervix during pregnancy and labor." *American journal of obstetrics and gynecology* vol. 135,4 **(1979)**: 503-6.

17. **Toole, B P.** "Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins." *Current opinion in cell biology* vol. 2,5 **(1990)**: 839-44.

18. **Read, Charles P et al**. "Cervical remodeling during pregnancy and parturition: molecular characterization of the softening phase in mice." *Reproduction (Cambridge, England)* vol. 134,2 **(2007)**: 327-40.

19. **Danforth, D N et al.** "The effect of pregnancy and labor on the human cervix: changes in collagen, glycoproteins, and glycosaminoglycans." *American journal of obstetrics and gynecology* vol. 120,5 **(1974)**: 641-51.

20. **House, Michael et al.** "Relationships between mechanical properties and extracellular matrix constituents of the cervical stroma during pregnancy." *Seminars in perinatology* vol. 33,5 **(2009)**: 300-7.

21. **LeBleu, Valerie S et al.** "Structure and function of basement membranes." *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* vol. 232,9 **(2007)**: 1121-9.

22. **Kadler, K E et al.** "Collagen fibril formation." *The Biochemical journal* vol. 316 (Pt 1),Pt 1 **(1996)**: 1-11.

23. **Wilusz, Rebecca E et al.** "The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage." *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* vol. 39 **(2014)**: 25-32.

24. **Word, R Ann et al.** "Dynamics of cervical remodeling during pregnancy and parturition: mechanisms and current concepts." *Seminars in reproductive medicine* vol. 25,1 **(2007)**: 69-79.

25. **Aspden, R M.** "Collagen organisation in the cervix and its relation to mechanical function." *Collagen and related research* vol. 8,2 **(1988)**: 103-12.

26. **Myers, Kristin M et al.** "A study of the anisotropy and tension/compression behavior of human cervical tissue." *Journal of biomechanical engineering* vol. 132,2 **(2010)**: 021003.

27. **Lamandé, S R, and J F Bateman.** "Procollagen folding and assembly: the role of endoplasmic reticulum enzymes and molecular chaperones." *Seminars in cell & developmental biology* vol. 10,5 **(1999)**: 455-64.

28. **Brinckerhoff, Constance E, and Lynn M Matrisian.** "Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince." *Nature reviews. Molecular cell biology* vol. 3,3 **(2002)**: 207-14.

29. **Debelle, L, and A M Tamburro.** "Elastin: molecular description and function." *The international journal of biochemistry & cell biology* vol. 31,2 **(1999)**: 261-72.

30. **Leppert, P C et al.** "Orientation of elastic fibers in the human cervix." *American journal of obstetrics and gynecology* vol. 155,1 **(1986)**: 219-24.

31. **Graham, C H, and P K Lala.** "Mechanisms of placental invasion of the uterus and their control." *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* vol. 70,10-11 **(1992)**: 867-74.

32. **Müfide Öncel**. Matriks Metalloproteinazlar ve Kanser. European Journal of Basic Medical Sciences **2012**;2(3): 91-100

33. **Rawlings, Neil D et al.** "The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database." *Nucleic acids research* vol. 46,D1 **(2018)**: D624-D632.

34. **WOESSNER, J F Jr.** "Catabolism of collagen and non-collagen protein in the rat uterus during post-partum involution." *The Biochemical journal* vol. 83,2 **(1962)**: 304-14.

35. **GROSS, J, and C M LAPIERE**. "Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 48,6 **(1962)**: 1014-22.

36. **Jale Öner, Hakan Öner.** Gebelikte Matriks Metalloproteinazlar (MMP) ve Matriks Metalloproteinaz Doku İnhibitörleri (TIMP). Selçuk Tıp Dergisi **2013**;29(2): 95-99

37. **Bassiouni, Wesam et al.** "Multifunctional intracellular matrix metalloproteinases: implications in disease." *The FEBS journal* vol. 288,24 **(2021)**: 7162-7182.

38. **Vu, T H, and Z Werb**. "Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology." *Genes & development* vol. 14,17 **(2000)**: 2123-33.

39. **de Almeida, Luiz G N et al.** "Matrix Metalloproteinases: From Molecular Mechanisms to Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology." *Pharmacological reviews* vol. 74,3 **(2022)**: 712-768.

40. **Lovejoy, B et al.** "Structure of the catalytic domain of fibroblast collagenase complexed with an inhibitor." *Science (New York, N.Y.)* vol. 263,5145 **(1994)**: 375-7.

41. **Maskos, Klaus.** "Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors." *Biochimie* vol. 87,3-4 **(2005)**: 249-63.

42. **Özlem Görüroğlu Öztürk.** Matriks Metalloproteinaz Enzim Ailesi. Archives Medical Review Journal **2013**; 22(2):209-220

43. **Jacobsen, Jennifer A et al**. "To bind zinc or not to bind zinc: an examination of innovative approaches to improved metalloproteinase inhibition." *Biochimica et biophysica acta* vol. 1803,1 **(2010)**: 72-94.

44. **Hirose, T et al.** "Structure-function relationship of human neutrophil collagenase: identification of regions responsible for substrate specificity and general proteinase activity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 90,7 **(1993)**: 2569-73.

45. **Nagase, Hideaki et al.** "Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs." *Cardiovascular research* vol. 69,3 **(2006)**: 562-73.

46. **Visse, Robert, and Hideaki Nagase.** "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry." *Circulation research* vol. 92,8 **(2003)**: 827-39.

47. **Collier, I E et al.** "H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen." *The Journal of biological chemistry* vol. 263,14 **(1988)**: 6579-87.

48. **Morgunova, E et al.** "Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed." *Science (New York, N.Y.)* vol. 284,5420 **(1999)**: 1667-70.

49. **Itoh, Y et al.** "Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion." *The EMBO journal* vol. 20,17 **(2001)**: 4782-93.

50. **Lohi, J et al.** "Epilysin, a novel human matrix metalloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes and in response to injury." *The Journal of biological chemistry* vol. 276,13 **(2001)**: 10134-44.

51. **Overall, Christopher Mark, and Carlos López-Otín**. "Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era." *Nature reviews. Cancer* vol. 2,9 **(2002)**: 657-72.

52. **Bigg, H F et al.** "Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 inhibits but does not support the activation of gelatinase A via efficient inhibition of membrane type 1-matrix metalloproteinase." *Cancer research* vol. 61,9 **(2001)**: 3610-8.

53. **Docherty, A J et al.** "Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity." *Nature* vol. 318,6041 **(1985)**: 66-9.

54. **DeClerck, Y A et al.** "Inhibition of autoproteolytic activation of interstitial procollagenase by recombinant metalloproteinase inhibitor MI/TIMP-2." *The Journal of biological chemistry* vol. 266,6 **(1991)**: 3893-9.

55. **Brew, Keith, and Hideaki Nagase.** "The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity." *Biochimica et biophysica acta* vol. 1803,1 **(2010)**: 55-71.

56. **Goldberg, G I et al**. "Human 72-kilodalton type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteases designated TIMP-2." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 86,21 **(1989)**: 8207-11.

57. **Goldberg, G I et al.** "Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin." *The Journal of biological chemistry* vol. 267,7 **(1992)**: 4583-91.

58. **Hayakawa, T et al.** "Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum." *FEBS letters* vol. 298,1 **(1992)**: 29-32.

59. **Masciantonio, Marcello G et al**. "The Balance Between Metalloproteinases and TIMPs: Critical Regulator of Microvascular Endothelial Cell Function in Health and Disease." *Progress in molecular biology and translational science* vol. 147 **(2017)**: 101-131.

60. **Holmbeck, K et al.** "MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover." *Cell* vol. 99,1 **(1999)**: 81-92.

61. **Vidaeff, Alex C, and Susan M Ramin.** "From concept to practice: the recent history of preterm delivery prevention. Part I: cervical competence." *American journal of perinatology* vol. 23,1 **(2006)**: 3-13.

62. **Wierzbicka-Patynowski, Iwona, and Jean E Schwarzbauer.** "The ins and outs of fibronectin matrix assembly." *Journal of cell science* vol. 116,Pt 16 **(2003)**: 3269-76.

63. **Canty, Elizabeth G, and Karl E Kadler.** "Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis." *Journal of cell science* vol. 118,Pt 7 **(2005)**: 1341-53.

64. **Akgul, Yucel et al.** "Dynamic changes in cervical glycosaminoglycan composition during normal pregnancy and preterm birth." *Endocrinology* vol. 153,7 **(2012)**: 3493-503.

65. **Akins, Meredith L et al.** "Second harmonic generation imaging as a potential tool for staging pregnancy and predicting preterm birth." *Journal of biomedical optics* vol. 15,2 **(2010)**: 026020.

66. **Akins, Meredith L et al.** "Cervical softening during pregnancy: regulated changes in collagen cross-linking and composition of matricellular proteins in the mouse." *Biology of reproduction* vol. 84,5 **(2011)**: 1053-62.

67. **Ozasa, H et al.** "Lysyl oxidase activity in the mouse uterine cervix is physiologically regulated by estrogen." *Endocrinology* vol. 109,2 **(1981)**: 618-21.

68. **Kokenyesi, Robert et al.** "Thrombospondin 2 deficiency in pregnant mice results in premature softening of the uterine cervix." *Biology of reproduction* vol. 70,2 **(2004)**: 385-90.

69. **Badir, Sabrina et al.** "Cervical softening occurs early in pregnancy: characterization of cervical stiffness in 100 healthy women using the aspiration technique." *Prenatal diagnosis* vol. 33,8 **(2013)**: 737-41.

70. **DANFORTH, D N.** "The fibrous nature of the human cervix, and its relation to the isthmic segment in gravid and nongravid uteri." *American journal of obstetrics and gynecology* vol. 53,4 **(1947)**: 541-60.

71. **Yu, S Y et al.** "Collagen changes in rat cervix in pregnancy--polarized light microscopic and electron microscopic studies." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* vol. 209,4 **(1995)**: 360-8.

72. **Anum, E A et al.** "Connective tissue and related disorders and preterm birth: clues to genes contributing to prematurity." *Placenta* vol. 30,3 **(2009)**: 207-15.

73. **Mancuso, Melissa S et al.** "Cervical funneling: effect on gestational length and ultrasound-indicated cerclage in high-risk women." *American journal of obstetrics and gynecology* vol. 203,3 **(2010)**: 259.e1-5.

74. **Fernandez, M et al.** "Investigating the mechanical function of the cervix during pregnancy using finite element models derived from high-resolution 3D MRI." *Computer methods in biomechanics and biomedical engineering* vol. 19,4 **(2016)**: 404-17.

75. **Vink, Joy Y et al.** "A new paradigm for the role of smooth muscle cells in the human cervix." *American journal of obstetrics and gynecology* vol. 215,4 **(2016)**: 478.e1-478.e11.

76. **Wu, Wenjie et al.** "Whole cervix imaging of collagen, muscle, and cellularity in term and preterm pregnancy." *Nature communications* vol. 15,1 5942. 19 Jul. **2024**.

77. **Lyons, Cecilia A et al.** "Regulation of matrix metalloproteinases (type IV collagenases) and their inhibitors in the virgin, timed pregnant, and postpartum rat uterus and cervix by prostaglandin E(2)-cyclic adenosine monophosphate." *American journal of obstetrics and gynecology* vol. 187,1 **(2002)**: 202-8.

78. **Sennström, Maria B et al.** "Matrix metalloproteinase-8 correlates with the cervical ripening process in humans." Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica vol. 82,10 **(2003)**: 904-11.

79. **Stygar, Denis et al.** "Increased level of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the ripening process of the human cervix." *Biology of reproduction* vol. 67,3 **(2002)**: 889-94.

80. **Kyriakides, T R et al.** "Mice that lack thrombospondin 2 display connective tissue abnormalities that are associated with disordered collagen fibrillogenesis, an increased vascular density, and a bleeding diathesis." *The Journal of cell biology* vol. 140,2 **(1998)**: 419-30.

81. **Furuichi, Kengo et al.** "Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and membrane-type 1 MMP (MT1-MMP) affect the remodeling of glomerulosclerosis in diabetic OLETF rats." Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association vol. 26,10 **(2011)**: 3124-31.

82. **Minematsu, Takeo et al.** "Altered expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in matured rat adipocytes in vitro." Biological research for nursing vol. 14,3 **(2012)**: 242-9.

83. **Hu, Peng-fei et al.** "Protective effects of berberine in an experimental rat osteoarthritis model." Phytotherapy research : PTR vol. 25,6 **(2011)**: 878-85.

84. **Bonefeld, Birgit Egeskov et al.** "Reference genes for normalization: a study of rat brain tissue." Synapse (New York, N.Y.) vol. 62,4 **(2008)**: 302-9.

85. **Clark, Kelley et al.** "Mifepristone-induced cervical ripening: structural, biomechanical, and molecular events." *American journal of obstetrics and gynecology* vol. 194,5 **(2006)**: 1391-8.

86. **Maymon, E et al.** "Human neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase 8) in parturition, premature rupture of the membranes, and intrauterine infection." *American journal of obstetrics and gynecology* vol. 183,1 **(2000)**: 94-9.

ÖZGEÇMİŞ

Göksu Şener. İlkokul eğitimini Feke'de, orta ve lise eğitimini Adana'da tamamladı. 2016 yılında İnönü Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. 2021 yılında lisans eğitimini tamamladı. 2022 yılında Çukurova Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2024 yılı Mayıs ayından itibaren Adana Şehir Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi'nde çalışmaya devam etmektedir.