

Preeklampitik Gebe Kadınlarda ve Bebeklerinin Kordon Kanında, Nitrik Oksit Metabolitleri Olan Nitrit Ve Nitratın Plazma Düzeylerinin Araştırılması

Aysun Bay Karabulut*, İ. Çetin Öztürk**, Nurzen Sezgin** Şeyma Hasçalık***
Ayşe Kafkaslı***

* İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya AD, Malatya

** İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD, Malatya

*** İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum AD, Malatya

Nitrik oksit damarlarda duvar tonusu üstünde belirgin gevşetici etkisi olan damar duvar endoteli kaynaklı bir vazodilatatördür. Preeklampitik gebelerde, disfonksiyonel endotel hücrelerinde, düşük düzeyde nitrik oksit üretiminin fizyopatolojide rolü olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada preeklampitik gebelerde ve bebeklerinde plazma nitrik oksit metabolitleri olan nitrit ve nitrat düzeyleri ölçülerek nitrik oksit üretimi konusunda fikir sahibi olunması amaçlandı. Bu amaçla hasta grubu olarak 14 preeklampitik gebe (PG) (n=14), kontrol grubu olarak 14 normal gebe kadın (KG) ve kord kanında çalışmak üzere preeklampitik gebelerin bebekleri (PB) (n=14) ve normal gebelerin bebekleri (KB) (n=14) seçildi. Nitrit ve nitrat tayin metodu olarak Griess (kinetik kadmiyum redüksiyonu) yöntemi kullanıldı.

Bulgularda, PG nitrat düzeyleri ($49.01 \pm 8.65 \mu\text{mol/L}$; ortalama \pm SD), KG nitrat düzeylerine göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($41.86 \pm 8.57 \mu\text{mol/L}$) ($p < 0.05$). Diğer parametrelerde kontrole göre anlamlı bir fark tesbit edilmedi. Bu sonuçlar azalmış endotelial hücre nitrik oksit üretiminin, preeklampsi fizyopatolojisinde etken olduğu hipotezini desteklememektedir. Tersine PG'lerdeki yüksek nitrat düzeyleri, bilinmeyen bir kaynaktan artmış nitrik oksit üretimini ya da idrar yolu ile itrah edilmesinde belirgin bir azalmayı düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Preeklampsi, Serbest Radikal, Nitrik Oksit

Investigation Of Plasma Nitric Oxide Metabolites, Nitrite And Nitrate Levels In Preclamptic Pregnant Women And Cord Blood Of The Babies

Nitric oxide (NO) is a vasodilator agent derived from vascular endothelium. It has been thought that decreased production of nitric oxide plays an important role in the pathogenesis of preclampsia. In this study, plasma nitric oxide metabolites, nitrate and nitrite levels were investigated among preclamptic pregnant women and their newborn infants, and compared with control groups. Plasma samples were collected from 14 preclamptic pregnant women and 14 control pregnant women besides cord blood of the newborn infants in both groups. Kinetic cadmium method was used as assay method for NO metabolites.

In results, only in preclamptic pregnant women, nitrate levels ($49.01 \pm 8.65 \mu\text{mol/L}$, mean \pm SD) were significantly higher than control ($41.86 \pm 8.57 \mu\text{mol/L}$) ($p < 0.05$). There was no statistically significant difference between control and other groups with respect to nitrite and nitrate levels. These results show that the decreased endothelial nitric oxide production does not play an important role on physiopathology of preclampsia. On contrary high nitrate levels of preclamptic pregnant women show the existence of increased nitric oxide production from an unknown source and the existence of a decreased urinary excretion.

Key words: Preclampsia, Free radical, Nitric oxide

Nitrik Oksit (NO) damar duvarı endotelinde üretilen ve damar tonusu üstünde vazodilatatör etkisi olan bir bileşiktir. Bu nedenle tıpta vazodilatatör ve antihipertansif amaçla kullanılmaktadır.¹

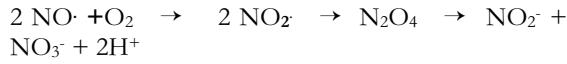
Atmosfer havasında düşük oranda bulunduğu halde, baca, egsoz gazı ve sigara dumanında yüksek oranda bulunduğu tesbit edilmiştir. Yüksek dozlarda oldukça toksik ve renksiz bir gaz olan NO· bir serbest radikal olduğundan yarı

ömürü çok kısadır. Düşük dozlarda toksik olmayıp önemli fizyolojik görevleri bulunan NO· memeli hücrelerinde bilinen en düşük ağırlıklı sekresyon ürünüdür.^{1,2}

Omurgalılarda NO sentetaz enzimi tarafından moleküler O₂ ve L-Arginin amino asitinden sentezlenir.



Su ve havadaki NO· kısa sürede oksijenle oksitlenerek nitrojen dioksit NO₂, nitrit (NO₂⁻) ve nitrat (NO₃⁻) anyonlarına dönüşür.



NO üstündeki ortaklanmış elektron N ve O atomları arası stabil bir rezonans gösterir. Elektriki yönden nötral olan NO membranlardan kolay diffüze olur. Reseptör aracılı endositoza gereksinim duymaz.^{1,2}

Oksidatif stresin endotel fonksiyon bozukluğuna ve dolayısıyla fonksiyonu bozulan endotelden NO gibi vazodilatatör ajanların salınımının azalması yolu ile hipertansiyon gelişmesine neden olduğu düşünülmektedir. Gebeliğin son aylarında gelişen ve gebelik toksikozu diye bilinen proteinüri, ödem, hipertansiyon ile karakterli preeklampsinin patogenezinde vasküler endotelden salınan NO üretimindeki azalmanın rolü olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmanın amacı preeklampitik gebelerin venöz kan örneklerinde ve onların bebeklerinden alınan kordon kanı örneklerinde NO metabolitleri olan nitrit ve nitrat anyonlarının düzeylerinin araştırılarak, preeklampsi fizyopatolojisindeki rollerinin anlaşılmasına katkıda bulunmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bireyler: 14 Preeklampitik gebe annenin venöz kan örneği ve onların bebeklerine ait 14 kord kanı örneği ile 14 sağlıklı annenin venöz kan örneği ve onların bebeklerine ait 14 kord kanı örneği heparinli tüplere alındı.

Örnekler: Heparinize kanlar 3500 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek plazma elde edildi. Örnekler somogyi reaktifi ile (2 ml 75 mmol/L ZnSO₄ 2,5 ml 55 mmol/l NaOH) deproteinize edildikten sonra nitrat, Cu-kaplı (2,5-3 gr) Cd ile pH'sı 9,7 olan glisin

tamponu ile nitrite indirgenir. Daha sonra nitrit düzeyi sulfanilamidin diazotizasyonu ve naphthyl-ethylene diamine ile birleşmesi yoluyla ölçülür.³

Standartlar: Nitratın nitrite indirgenmesinin hesaplanması için 10 µmol lük KNO₃ standardı ve Nitrit ölçümü için 10 µmol NaNO₂ (10 mmol/L Na₂B₄O₇ de çözülen) stok standart lar hazırlandı. Ve bunlardan seri dilüsyonlar yapılarak standartlar hazırlandı ve ay-nen numunelere uygulanan işlemler yapıldı ve standart eğrisi çizildi.

Cd granüllerinin Aktivasyonu: 0,1 mol/L lik H₂SO₄ de saklanan Cd granülleri 3 defa su ile yıkanır.1-2 dk CuSO₄ içinde çalkalayarak bekletildikten sonra 3 defa glisin tamponu ile yıkanıp kurulandıktan sonra 10 dakika içinde kullanıldı.

Deproteinizasyon: 0,5 ml plazma, 2 ml NaOH, 2,5 ml ZnSO₄ ilave edilip 10 dak bekletilip 4000 rpm 'de 10 dak santrifüj edildi.

Total nitrit (nitrat) ölçümü:1 ml Glycine-NaOH buffer; 1 ml deproteinize sample; 2,5 -3 gr aktive kadmiyum ilave edilir.ve 90' sonra nitrit ölçümü için 1 ml sulfanilamid;1 ml NNDA ilave edilip 45' sonra 545 nm de okunur.

Serbest Nitrit Ölçümü:Aktif Cd eklenmeden deproteinize sample 'dan 1 ml alınıp 1 ml NNDA ve 1 ml sulfanilamid ilave edilir ve 45' sonra 545 nm de okunur

Nitrat Aktivitesinin Hesaplanması: Total nitrit (nitrat+nitrit) değerleri, nitrat standardından elde edilen faktör ile çarpılıp hesaplandıktan sonra; dilüsyon katsayısıyla çarpılıp; (nitrat değeri)=(total nitrit)-(nitrit) olarak hesaplandı.

BULGULAR

Tablo 1'de görüldüğü gibi Preeklampitik anne nitratında, kontrol anne nitratına göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmasa da kontrol bebek nitratı ortalama değerleri preeklampitik bebek nitratına göre artmış bulunmuştur.

TARTIŞMA

Preeklampitik gebelerde NO düzeyleri saptamaya yönelik çalışmalardan birbiriyle çelişen sonuçlar ortaya konmuştur. Seligman ve ark⁴ preeklampsili hastalarda

Tablo 1 Preeklampitik gebe kadınlar ile bebeklerinde nitrit ve nitrat ortalama değerleri

PREEKLAMPİTİK (MEAN ±SD) (µmol/l)				KONTROL (MEAN ±SD) (µmol/l)			
GEBE		BEBEK		GEBE		BEBEK	
NİTRİT	NİTRAT*	NİTRİT	NİTRAT	NİTRİT	NİTRAT*	NİTRİT	NİTRAT
1,33 ± 0,81	49.01 ± 8,65	0,66 ± 0,46	27,50 ± 9,79	1,10 ± 0,55	41,86 ± 8,57	0,90 ± 0,13	32,57 ± 6,39

* = Preeklampitik gebe kadınlar ile kontrol gebe kadın nitratı arasında istatistiksel fark gözlemlendi. (p<0.05)

kan dolaşımında nitrit düzeylerinin azaldığını azalmış NO sentezinin preeklampside görülen fizyopatolojik değişimlere katkıda bulunduğu kavramını desteklediğini öne sürmüşlerdir. Ayrıca preeklampside fetoplazental dolaşımında NO sentezinin kan akımını iyileştirmeye yönelik olabileceği böylece trombosit adezyon ve agregasyonunu sınırlamada bir rolü olduğu düşünülmüştür.⁵ Silver ve ark⁶ 21 preeklampsili ve 21 normotensif primagravid gebeden alınan venöz kan örneklerinde nitrat redüksiyonu ve kemiluminesans kullanarak nitrit-nitrat düzeyleri preeklampside azalma olmadığı saptanmıştır. Bir başka çalışmada⁷ preeklampsili kadınlarda idrarda nitrik oksit metabolitlerinin düzeyinin azalmış olduğunu ancak plazmada azalmadığını yine Begum ve ark⁸ 12 preeklampitik hastada Greiss reaksiyonu ve nitratın nitrite enzimatik redüksiyonu sonrası spektrofotometrik metotla NO metabolitlerinin üriner düzeyinde azalma olduğunu tesbit etmişlerdir. Smarason ve ark⁹'nın yaptığı çalışmada⁹ 20 preeklampsili gebede serum nitrat düzeylerini önemli derecede yüksek buldular. Di Lorio ve ark¹⁰ 26 preeklampsili hasta ve 27 normotensif gebede maternal ve kord plazmasında, idrarda ve amnion sıvısında yaptıkları çalışmada Griess reaksiyonu ile NO metabolitlerinin düzeyini ölçerek preeklampitik hastalarda anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. Norris ve ark¹¹ ise preeklampside NO üretiminin uteroplazental, fetoplazental, ve periferik dolaşımında normotensif gebelerde yüksek olduğunu bulmuşlardır. Mutlu ve ark¹² preeklampitik hastalarda plazma NO metabolitlerinin düzeyinin azaldığını saptamışlardır. Pathak ve ark¹³ ise preeklampitik kadınlarda serum nitrit ve nitrat düzeylerini normotensiflerden anlamlı derecede yüksek bulmuşlar ve ayrıca nitrit-nitrat düzeyleri ile diastolik kanbasıncı ve proteinüri arasında (+) korelasyon olduğunu saptamışlardır. Yine bir başka çalışmada maternal serum nitrit düzeylerini preeklampside yüksek bulmuşlardır.¹⁴ Conrad ve ark¹⁵ NO sentezinin normal gebelikte arttığı preeklampside ise azaldığı hipotezini test etmişler, NO yönünden fakir bir diyetle beslenen normal gebe ve preeklampitik gebe kadınlarda plazma ve idrarda NO düzeylerini ölçerek artış olmadığını saptamışlardır.

Biz ise çalışmamızda preeklampitik gebelerde nitrat düzeyini kontrol gebelerine göre anlamlı derecede yüksek bulurken, diğer parametrelerde kontrole göre anlamlı fark tespit etmedik. Bizim bulduğumuz sonuçlar azalmış NO üretiminin preeklampsili fizyopatolojisinde rol oynadığını savunan hipotezi desteklememektedir. Tersine preeklampitik gebelerdeki yüksek nitrat düzeyleri bilinmeyen bir kaynaktan artmış nitrik oksit üretimini yada idrar yolu ile itrahi edilmesinde belirgin bir azalmayı ve bunların bir çeşit savunma mekanizması olarak rol oynadığını düşündürmektedir.

Görüldüğü gibi, bu konuda yapılan çalışmaların bir kısmı preeklampside NO düzeyinin azaldığını ve bu durumun preeklampsili fizyopatolojisinde rol oynadığını gösterirken, diğer bazı çalışmalar ise preeklampside NO düzeyinde normotensiflere göre anlamlı artış olduğunu ve bunun vazodilatör etkisi olduğu bilinen NO in preeklampsinin fizyopatolojisindeki rolünü tartışılır hale getirdiğini ve preeklampsili nedeni olmaktan çıkıp preeklampsinin bir sonucu olarak adeta bir savunma mekanizması şeklinde devreye girdiğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric Oxide. Physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmacol Reviews 1991; 43:109 -37
2. Lancaster J. Nitric Oxide, principles and actions. Copyright by Academic Press Inc. 1996 California - USA
3. Cortas NK, Wakid NB. De termination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. Clin. Chem. 1990; 36: 1440 -3
4. Seligman SP, Buyon JP, Clancy RM, Young BK, Abramson SB. The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia. Am J Obstet Gynecol. 1994; 171: 944 -8
5. Lyall F, Young A Greer Ia. Nitric oxide concentrations are increased in the fetal placental circulation in preeclampsia. Am J Obstet Gynecol. 1995; 173:714 -8
6. Silver RK, Kupferminc MJ, Russel TL, Adler L, Mullen TA, Caplan Ms. Evaluation of nitric oxide as a mediator of severe preeclampsia. Am J Obstet Gynecol. 1996; 175: 1013-7
7. Davidge ST, Stranko CP, Roberts JM. Urine but not plasma nitric oxide metabolites are decreased in women with preeclampsia. Am J Obstet Gynecol. 1996; 174: 1008-13
8. Begum S, Yamasaki M, Mochizuki M. The role of nitric oxide metabolites during pregnancy. Kobe J Med Sci. 1996; 42: 131 -41
9. Smarason AK, Allman KG, Young D, Redman CW. Elevated levels of serum nitrate, a stable end product of nitric oxide, in women with preeclampsia. Br J Obstet Gynaecol 1997; 104: 538 -43
10. Di lorio R, Marinoni E, Emiliani S, Villacio B, Cosmi EV. Nitric oxide in preeclampsia: lack of evidence for decreased production. Eur J Obstet Reprod Biol. 1998; 76: 65-70
11. Norris LA, Higgins JR, Darling MR, Walshe JJ, Bonnar J. Nitric oxide in the uteroplacental, and peripheral circulations in preeclampsia. Obstet Gynecol. 1999; 93: 958-63

Karabulut ve ark

12. Mutlu -Turkođlu U, Aykac-Toker G, Ibrahimoglu L, Ademođlu E, Uysal M. Plasma nitric oxide metabolites and lipid peroxide levels in preeclamptic pregnant women before and after delivery. *Gynecol Obstet Invest.* 1999; 48 :247-50
13. Paathak N, Sawhney H, Vasishtha K, Majumdar S. Estimation of oxidative products of nitric oxide (nitrates, nitrites) in preeclampsia. *Aust N Z J Obstet Gynecol.* 1999; 39: 484-7
14. Bartha JL, Comino-Delgado R, Bedoya FJ, Barahona M, Lubian D, Gacia-Benasach F. Maternal serum nitric oxide levels associated with biochemical and clinical parameters in hypertension in pregnancy. *Eur J Obstet Reprod Biol.* 1999; 82: 201-7
15. Conrad KP, Kerchner LJ, Mosher MD. Plasma and 24-h NO(x) and cGMP during normal pregnancy and preeclampsia in women on a reduced NO(x) diet. *Am J Physiol.* 1999; 277:F48-5

Yazışma Adresi:

Yrd. Doç. Dr. İ. Çetin Öztürk
İnönü Üniversitesi , Tıp Fakültesi
Biyokimya AD
44069 MALATYA