

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**PREEKLAMPTİK GEBELERDE SERUM NİTRİK OKSİT,
ASİMETRİK DİMETİLARJİNİN (ADMA), HOMOSİSTEİN
DÜZEYLERİ VE PROTEİN OKSİDASYONU İLİŞKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. M. ULAŞ GÜRAKAN**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. AYSEL ARICIOĞLU**

**ANKARA
MART 2011**

TEŞEKKÜRLER

Uzmanlık eğitimim boyunca bana destek olan ve yönlendiren danışman hocam Prof. Dr. Aysel ARICIOĞLU' na

Tez aşamasında çoğu kez yardımına başvurduğum Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Hatice PAŞAOĞLU' na,

Bu süreç boyunca bilgi ve deneyimlerinden sıkça faydalandığım Tıbbi Biyokimya AD. Öğretim üyelerine,

Kadın Doğum Hastalıkları AD. öğretim üyelerinden Doç. Dr. Aydan BİRİ, Araş. Gör. Dr. Tünay EFETÜRK ve Araş. Gör. Dr. Ayşen YÜCETÜRK' e

Beraber çalışmaktan mutluluk ve huzur duyduğum Uzm. Dr. Uğur ERÇİN, Araş. Gör. Dr. Zahid ÇIRACI ve Vet. Dr. Ahmet HÜSEYİN' e

Bu süreçte daima yanımda olup beni teşvik eden annem, babam ve abime ve de hoşgörüsü için yeğenime,

TEŞEKKÜRLER

İÇİNDEKİLER	I
Şekil, Tablo ve Grafikler	IV
Simgeler ve Kısaltmalar	VII
İçindekiler	
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Gebelikte Hipertansif Hastalıklar	4
2.1.1. Gestasyonel Hipertansiyon	4
2.1.2. Kronik Hipertansiyon	5
2.1.3. Kronik Hipertansiyon Zemininde Gelişen Preeklampsi	5
2.1.4. Eklampsi	6
2.1.5. Preeklampsi	6
2.1.5.1. Preeklampsi Patofizyolojisi	7
2.1.5.2. Preeklampsi Risk Faktörleri	20
2.1.5.3. Preeklampsi Komplikasyonları	21
2.2. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller	21
2.2.1. Serbest Radikallerin Oluşumu ve Kaynakları	22
2.2.2. Serbest Radikal Türleri	24
2.2.3. Reaktif Oksijen Türleri	25
2.2.4. Serbest Radikallerin Biyomoleküllere Etkileri	28
2.2.5. Lipid Peroksidasyonu	29
2.2.6. Protein Oksidasyonu	30
2.2.6.1. Protein Oksidasyonunun Sınıflandırılması	32

2.2.6.2. Global Modifikasyonla Karbonil Gruplarının Oluşumu	33
2.2.6.3. Okside Proteinlerin Birikimi	34
2.2.7. Antioksidanlar	35
2.2.8. Preeklampsi ve Serbest Radikaller	37
2.2.9. Preeklampside Antioksidan Sistem	40
2.3. Nitrik Oksit (NO)	40
2.3.1. Nitrik Oksit Regülasyonu	45
2.3.2. Nitrik Oksit ve Preeklampsi	46
2.4. Asimetrik Dimetilarjinin (ADMA)	48
2.4.1. ADMA' nın Metabolizması	49
2.4.2. ADMA' nın Gebelikte Değişimi	52
2.4.3. ADMA ve NO İlişkisi	53
2.4.4. Preeklampsi ve ADMA	54
2.5. Homosistein	54
2.5.1. Hiperhomosisteinemi ve Gebelik	57
2.5.2. Hiperhomosisteinemi ve Etkileri	57
2.5.3. Hiperhomosisteinemi ve Nedenleri	58
2.5.4. Homosistein ve Preeklampsi İlişkisi	58
2.5.5. Homosistein, ADMA ve NO' nun Birbirleriyle Olan Metabolik Etkileşimleri.....	60
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	63
3.1. Çalışmaya Katılacak Grupların Belirlenmesi	63
3.2. Hastaların Çalışmaya Alınmama Kriterleri	64

3.3. Kan Alma ve Serum Hazırlama	64
3.4. DENEYLER	65
3.4.1. Deneylerde Kullanılan Gereçler.....	65
3.4.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler	65
3.4.3. Deneylerde Uygulanan Yöntemler	66
3.4.3.1. Protein Miktarının Ölçümü	66
3.4.3.2. Serum Protein Karbonil Grubu Düzeylerinin Tayini	67
3.4.3.3. Serum NO Düzeylerinin Ölçümü	70
3.4.3.4. Serum ADMA Düzeylerinin Ölçümü	72
3.4.3.5. Serum Homosistein Düzeylerinin Ölçümü	75
4.BULGULAR.....	77
4.1. Spearman Korelasyon Analizi	81
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	85
6.KAYNAKLAR.....	98
7.ÖZET.....	131
8.SUMMARY.....	133
9.ÖZGEÇMİŞ.....	135

ŞEKİLLERİN VE TABLOLARIN DİZİNİ

Şekiller

Şekil 2.1. Gebeliğe bağlı hipertansif bozuklukların gelişmesinde patofizyolojik hususlar	9
Şekil 2.2. Preeklampsia patofizyolojisinde VEGF ve PlGF' nin rolü	12
Şekil 2.3. Endotelial disfonksiyonun potansiyel mekanizması	13
Şekil 2.4. Preeklampsia patofizyolojisinde rol oynayan mekanizmaların topluca gösterimi	14
Şekil 2.5. Lipidler, DNA, RNA ve proteinlerin oksijen/nitrojen bağımlı modifikasyonları	22
Şekil 2.6. Memeli hücrelerinde ROT ve RNT' nin oluşumu	24
Şekil 2.7. Proteinlerde oksidasyona bağımlı karbonil gruplarının oluşumu	31
Şekil 2.8. Prooksidan, antioksidan ve proteolitik aktiviteler arasındaki dengeye bağımlı olarak oksitlenmiş proteinlerin birikimi	35
Şekil 2.9. Preeklampsinin patogeneğinde oksidatif stresin rolü	39
Şekil 2. 10. Nitrik oksit sentezi	42
Şekil 2.11. Endotelial hücrelerde NO üretimi	43
Şekil 2.12. NO sentezi ve sentezde rol alan moleküller	44
Şekil 2.13. Preeklampside L-arjinin-nitrik oksit yolağı	48
Şekil 2.14. Homosistein-ADMA etkileşimi	50
Şekil 2.15. Metillenmiş arjinin türevlerinin metabolizmaları	52
Şekil 2.16. Homosistein metabolizması	55
Şekil 2.17. Homosistein ve ADMA arasındaki metabolik ilişki	56

Şekil 2.18. Homosistein, ADMA ve NO' nun endotel fonksiyon bozukluğundaki rolleri	61
Şekil 2.19. L-arjinin, NO ve Homosistein yolağı arasındaki etkileşim.....	62

Tablolar

Tablo 2.1. NOS izoformları	41
Tablo 3.1. Lowry deneyin yapılışı	67
Tablo 3.2. ADMA kitinin bileşenleri	72
Tablo 3.3. ADMA için HPLC sistemi parametreleri	72
Tablo 3.4 ADMA çalışma prosedürü	73
Tablo 3.5. Homosistein çalışma prosedürü	75
Tablo 3.6. Homosistein için HPLC sistemi parametreleri	75
Tablo 4.1. Serum NO, ADMA, SDMA, Protein karbonil ve Homosistein düzeyleri (ortalama±standart hata)	77
Tablo 4.2. Spearman korelasyon analizi sonuçları	81

Grafikler

Grafik 3.1. 280 nm' deki BSA protein standart eğrisi	69
Grafik 3.2 540 nm' deki nitrat standart eğrisi	71
Grafik 3.3. ADMA' ya ait kromatogramın görüntüsü.....	74
Grafik 3.4. Homosisteine ait kromatogramın görüntüsü.....	76
Grafik 4.1. Serum NO düzeylerinin gruplar arasındaki farkı (ortalama±standarthata)	78

Grafik 4.2. Serum ADMA düzeylerinin gruplar arasındaki farkı (ortalama±standart hata)	78
Grafik 4.3. Serum SDMA düzeylerinin gruplar arasındaki farkı (ortalama±standart hata)	79
Grafik 4.4. Serum Protein karbonil düzeylerinin gruplar arasındaki farkı (ortalama±standart hata)	79
Grafik 4.5. Serum Homosistein düzeylerinin gruplar arasındaki farkı (ortalama±standart hata)	80
Grafik 4.6. Serum ADMA ile SDMA düzeyleri ile arasındaki güçlü pozitif korelasyon grafiği	82
Grafik 4.7. Serum ADMA ile Homosistein düzeyleri ile arasındaki güçlü pozitif korelasyon grafiği	83
Grafik 4.8. Serum SDMA ile Homosistein düzeyleri ile arasındaki güçlü pozitif korelasyon grafiği	84

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADMA: Asimetrik Dimetilarjinin

AT2: Anjiyotensin 2

BH₄: Tetrahidrobiopterin

BSA: Bovin Serum Albumin

CAT: Katalaz

CaM: Kalmodülin

cGMP: Siklik Guanozin Monofosfat

D-AA: D-Amino Asit

DDAH: Dimetilarjinin Dimetilaminohidrolaz

DM: Diabetes Mellitus

eNOS: Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz

FAD: Flavin Adenin Dinükleotit

FMN: Flavin Adenin Mononükleotit

Flt1: Fms-Like Tirozin Kinaz 1

GST: Glutasyon Transferaz

GPx: Glutasyon Peroksidaz

HELLP: Hemoliz, Karaciger Enzimlerinde Yükselme, Düşük Platelet Sayısı

HNE: 4-Hidroksi-2-Nonenal

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

H₂O[•]: Perhidroksil Radikali

HOB_r: Hipobromöz Asit

HOCl: Hipoklorik Asit

IUGR: İntrauterin Gelişme Geriliği

iNOS: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz

L[•]: Lipid Radikali

L-NMMA: N-Monometil-L-Arjinin

LOO[•]: Lipid Peroksil Radikali

LOOH[•]: Lipid Hidroperoksil Radikali

MDA: Malondialdehit

MSR: Metiyonin Sülfoksit Redüktaz

MPO: Myeloperoksidaz

MTHFR: Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz

NADP: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat

NO: Nitrik Oksit

NO[•]: Nitrik Oksit Radikali

N₂O: Nitröz Oksit

NO₂[•]: Nitrojen Dioksit Radikali

NOS: Nitrik Oksit Sentaz

nNOS: Nöronal Nitrik Oksit Sentaz

O₂^{•-}: Süperoksit radikali

OH[•]: Hidroksil radikali

ONOO[•]: Peroksinitrit

PCO: Protein Karbonil

PDGF: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü

PRMT: Protein Arjinin Metiltransferaz

R[•] : Alkil Radikali
RNT: Reaktif Nitrojen Türleri
RO[•] : Alkoksil Radikali
ROO[•] : Peroksil Radikali
ROOH[•] :Hidroperoksit Radikali
RS[•] : Till Radikali
ROT: Reaktif Oksijen Türleri
SAM: S-Adenozil Metiyonin
SAH: S- Adenozil Homosistein
SDMA: Simetrik Dimetilarjinin
SOD: Süperoksit Dismutaz
SOR: Serbest Oksijen Radikalleri
VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
vWF: Von Willebrand Faktör
XO: Ksantin Oksidaz

1.GİRİŞ

Preeklampsi; gebeliğin 20. haftasından sonra ortaya çıkan hipertansiyona ödem ve proteinürinin eklenmesidir (1).

Preeklampsi, gebeliği komplike eden, maternal morbidite ve mortaliteyi artıran, etyolojisi tam olarak aydınlatılamamış önemli bir sorundur. Damar endotel hasarı ve vazospazmın preeklampsi patofizyolojisinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (2).

Oksidan/antioksidan sistem preeklampsi patofizyolojisinde sorumlu olduğu düşünülen faktörlerin başında gelmektedir. Fakat tek başına hastalığın ortaya çıkmasında etkinliği henüz tartışmalı olup diğer birçok faktörle ilişkisi araştırılmaktadır (3).

Preeklampsideki oksidatif stresin varlığı çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir (4). Reaktif oksijen türlerinin (ROT) hücrese seviyeleri antioksidan kapasiteyi aştığı zaman oksidatif stres meydana gelmekte ve preeklampsi patogeneğinde etkili olabilmektedir (5).

Vasküler yapının ve tonusun devam ettirilmesinde endotel çok önemli rol oynar. Endotel fonksiyonu, endotel kaynaklı vazodilatatör ve vazokonstrüktör faktörler tarafından düzenlenmektedir. Bu faktörler arasında endotel fonksiyonunun düzenlenmesinde anahtar rolü olan molekülün nitrik oksit (NO) olduğu düşünülmektedir. Ortamda NO azaldığında, endotel homeostazı vazokonstrüksiyon lehine bozulmakta ve endotel disfonksiyonu başlamaktadır (6).

Asimetrik dimetilarjinin (ADMA), NO sentezinin anahtar enzimi olan Nitrik oksit sentazın (NOS) endojen kompetitif bir inhibitörü olarak tanımlanmaktadır (7,8). L-arjinin hücre içi metil transferazlarla metillenerek metillenmiş L-arjinin metaboliti ADMA' ya dönüşür (9).

ADMA' nın, preeklampsi gelişen kadınlardaki endotelial disfonksiyonla ilişkili olduğu düşünülmektedir (10).

ADMA konsantrasyonları ve oksidatif stres arasındaki ilişki birçok çalışmada araştırılmıştır (11,12). Vasküler yapıdaki oksidatif stres ADMA üretimini stimüle ederek ya da yıkımını inhibe ederek endojen NOS aktivitesini önemli oranda inhibe edebilmektedir. NO vasküler ve kardiyak fonksiyonların önemli bir düzenleyicisidir. NO sentezinin ADMA düzeylerindeki yükseklik nedeniyle inhibe edilmesi preeklampsi dahil çeşitli hastalıkların vasküler patofizyolojisine katkıda bulunabilmektedir (8,13,14,15).

Preeklampsi patofizyolojisinde endotel hasarının önemli rol oynaması nedeniyle, son zamanlarda homosistein ile preeklampsi ilişkisini araştıran çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda, preeklampşik gebelerde plazma homosistein düzeyinin yüksek olduğu ve artmış homosistein düzeyinin, preeklampsi riskini arttırdığı saptanmıştır (16).

Yapılan çalışmalarda homosisteinin, oksidatif stres ve endotelial disfonksiyona neden olarak preeklampşik değişikliklerden sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir (17,18). Ayrıca, vit B6, vit B12 ve folik asit alımıyla

homosistein plazma konsantrasyonunun düştüğü ve bunların erken gebelikte kullanılmasıyla, preeklamps riskinin azaltılabileceği ifade edilmektedir (1).

Yaptığımız çalışmada, preeklampsili gebelerden alınan venöz kandan;

- 1-) NO miktar tayini,
- 2-) ADMA ve SDMA miktar tayini,
- 3-) Homosistein miktar tayini,
- 4-) Oksidatif stresin göstergesi olarak protein karbonil miktar tayini yapılmıştır.

Literatürde, bu parametrelerin bir ya da ikisinin birlikte incelendiği çalışmalar olmasına rağmen, preeklampsili gebelerde bu üç parametrenin (NO, ADMA, homosistein) protein karbonil düzeyleriyle birlikte değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bu çalışmanın amacı; preeklamps patofizyolojisinde sorumlu olduğu ileri sürülen NO, ADMA ve homosistein düzeylerinin, hastalığın ortaya çıkışındaki rolünü ve hastalığın gelişiminde etkin rol aldığı düşünölen oksidatif stresle (protein karbonil düzeyleri) ilişkisini incelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gebelikte Hipertansif Hastalıklar

Gebelikte hipertansif hastalıklar sık görülmekte olup, hemoraji ve infeksiyonla birlikte gebeliğe bağlı maternal mortalite ve morbiditenin çoğundan sorumlu ölümcül üçlüden birisidir (19).

Gebelikte hipertansiyon konusunda terminolojik farklılıklar ve karışıklıklar olması üzerine, Ulusal Yüksek Kan Basıncı Eğitim Programı Çalışma Grubu (Çalışma grubu) (2000) gebelerde görülen hipertansiyonu 5 gruba ayırmıştır (20):

1. Gestasyonel hipertansiyon
2. Kronik hipertansiyon
3. Kronik hipertansiyon zemininde gelişen preeklampsi (Süperimpoze preeklampsi)
4. Eklampsi
5. Preeklampsi

2.1.1. Gestasyonel Hipertansiyon

Gestasyonel hipertansiyon tanısı;

Kan basıncının, 140/90 mmHg ya da daha fazla değere ilk defa gebelik sırasında yükselmesi, proteinürinin eşlik etmemesi ve postpartum 12. haftaya kadar kan basıncı değerlerinin, normal değerine dönmesi ile konur. Bu yüzden

gestasyonel hipertansiyon tanısı koymak, ancak doğumdan sonra mümkün olmaktadır (6).

2.1.2. Kronik Hipertansiyon

Kronik hipertansiyon tanısı;

Gebelikten önce, kan basıncının 140/90 mmHg ve üzerinde olması, 20. gebelik haftasından önce kan basıncının 140/90 mmHg ve üzerinde ölçülmesi ve postpartum 6. haftadan sonra, kan basıncının 140/90 mmHg ve üzerinde devam etmesi ile konur (1).

Hasta 20. gebelik haftasına kadar görülmemişse kronik hipertansiyon tanısı koymak zorlaşır. Kan basıncı gebelikte, özellikle 2.trimester ve 3.trimester başlarında düşmekte ve daha sonra tekrar yükselmektedir. Bu yüzden preeklampsi ve kronik hipertansiyon ayırımı yapılamaz. Ancak doğum sonrası hipertansiyonun devam etmesi ile ayırıcı tanı yapılabilir (21).

2.1.3. Kronik Hipertansiyon Zemininde Gelişen Preeklampsi

Kronik hipertansiyon tanısı konmuş bir gebede, 20. gebelik haftasından sonra kan basıncının yükselmesi ve buna proteinürinin eklenmesidir. Kronik hipertansif bir gebede preeklampsi gelişmesi, gebe için önemli bir tehlikedir. Kronik hipertansiyonu olan gebeler tipik olarak 24. gebelik haftasından sonra daha da kötüleşir ve kronik hipertansiyon olmadan preeklampsi gelişen gebelere göre daha ağır seyreder (1).

2.1.4. Eklampsi

Preeklampitik kadında, yeni başlamış grand mal konvülsiyonların varlığı eklampsi olarak tanımlanır (22). Doğumdan 48-72 saat sonra hastada ilk defa görülen grand mal konvülsiyonda, tanı büyük olasılıkla eklampsidir. Konvülsiyon ve komanın başka nedenleri dışlanmalıdır (1).

2.1.5. Preeklampsi

Preeklampsi, endotel disfonksiyonu ve vazospazma sekonder, azalmış organ perfüzyonu ile seyreden gebeliğe özgü bir durumdur (1).

Preeklampsi tanısı (22);

Daha önce normal kan basıncı ölçüleri olan kadında, 20 gebelik haftasından sonra sistolik kan basıncının 140 mmHg ve üzeri ve/veya diyastolik kan basıncının 90 mmHg ve üzerinde ölçülmesi,

24 saatlik idrarda 300 mg ve üzerinde protein atılımı veya en az 6 saat aralıklarla alınan iki spot idrar örneğinde dipstik ile en az +1 ve üzeri proteinüri saptanmasıyla konur.

Preeklampside hipertansiyon, olguların erken ve kesin bulgusudur. Çalışma gurubuna göre diyastolik kan basıncı sesin kaybolduğu değerdir (Korotkof faz 5). Yanlış ölçümleri önlemek için uygun kaf kullanılmalıdır (üst kol çevresinin 1,5 katı). Kan basıncı hastanın 10 dakika veya daha fazla dinlenmesini takiben oturur pozisyonda alınmalı ve kan basıncı ölçümünden 30 dakika öncesine kadar sigara ve kahve içilmemiş olmalıdır (20).

Proteinüri, glomerüler hasarın göstergesidir (22). Yapılan çalışmalarda dipstik ile tespit edilen protein düzeyi ve 24 saatlik idrardaki protein miktarı arasında zayıf bir korelasyon saptanmıştır. Bu nedenle 24 saatlik idrarda protein miktarı, proteinüri için ana belirleyici test olmalıdır (20). Preeklampsisi zaman zaman renal damarlardaki spazm ile karakterize bir durum olduğu için farklı idrar örneklerinde değişen miktarlarda protein bulunur.

İdrardaki protein miktarı kan, bakteri, vajinal sekresyon ve amnion sıvısı kontaminasyonu ile değişebilir. Dansitenin 1010' nun altında ya da 1030' un üstünde olması, pH' ın 8' in üzerinde olması, egzersiz ve postür de proteinüri miktarını değiştirebilir (23).

Ödem, serum kolloid onkotik basıncının düşmesi ve kapiller permeabilitenin artmasıyla oluşur (24). Preeklampitik hastalarda, hem proteinüri hem de vasküler endotel hasarı nedeniyle permeabilitenin artması ödem oluşturmaktadır.

Bazı çalışmalarda hafif ve orta derecede ödemin %80 oranında görüldüğünün gösterilmesi, ödemin tanıdaki yerinin sorgulanmasına neden olmuştur. Ödem, birçok normal gebe kadında da görüldüğü için günümüzde tanısal kriter olmaktan çıkartılmıştır (1).

2.1.5.1. Preeklampsisi Patofizyolojisi

Preeklampsisi patofizyolojisi için genel olarak kabul edilen görüş, uterin spiral arterlerin yetersiz trofoblastik invazyonunun; plasental iskemi, oksidatif

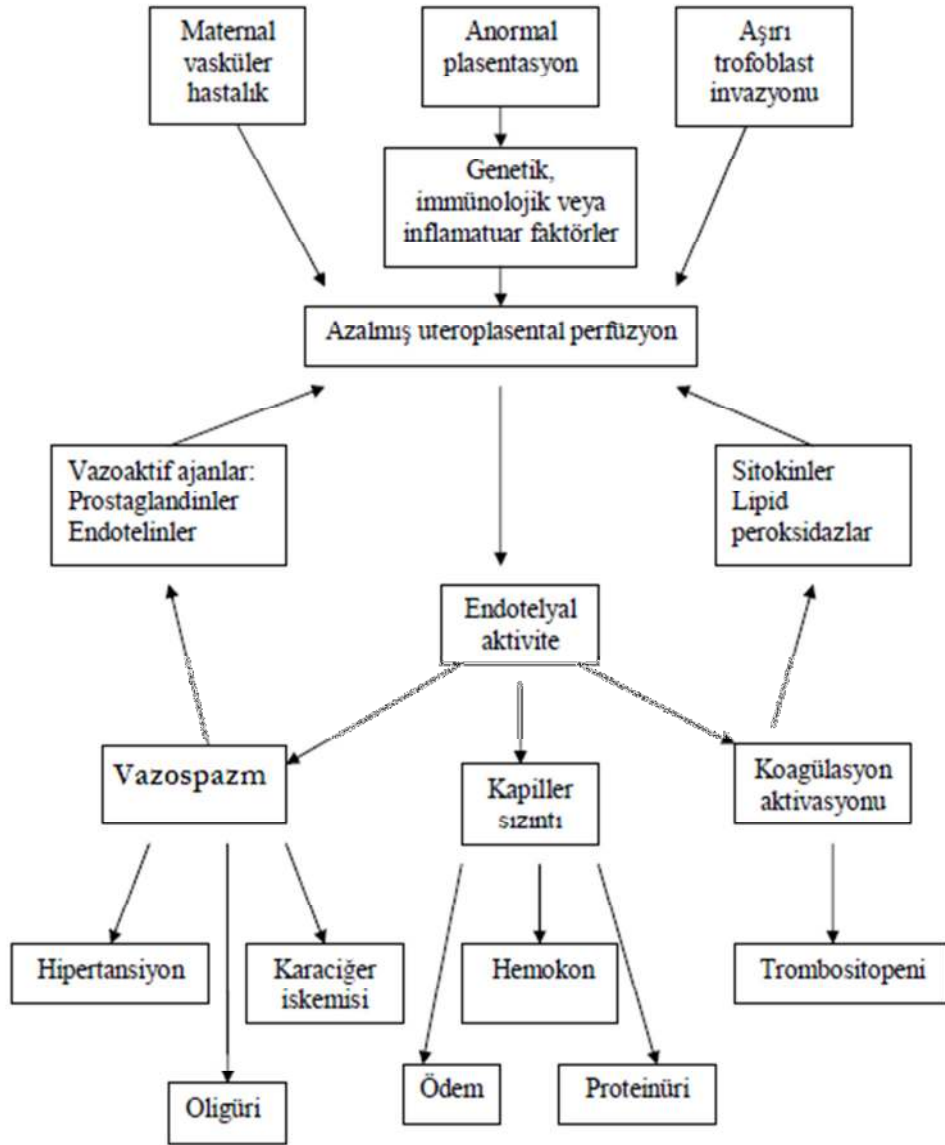
stres, inflamasyon ve sonuç olarak maternal endotelial hücre disfonksiyonuna yol açtığıdır (25).

Damar endoteli; yapısal, metabolik ve endokrin fonksiyonları olan aktif bir organdır. Endotel damar tonusunu düzenlemek için prostaglandin I_2 (PGI_2), NO ve prostaglandin E (PGE) gibi vazodilatör maddeler salgılar (26). Endotel hasarından dolayı vazodilatör maddelerin salınımı azalırken, endotelin ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) gibi vazokonstriktör maddelerin salınımı ise artmaktadır. Bunun sonucunda da vazospazm meydana gelmekte ve birçok organın kan akımında azalma görülmektedir (27).

Preeklampsi-eklampsi patofizyolojisinin temeli vazospazmdır. Bu görüş ilk kez Valhard (1918) tarafından öne sürülmüş ve Hinselmann (1924), Landesman ve ark. (1954) bunu doğrulayan gözlemler yapmışlardır (1). Günümüzde, damar endotel hasarı ve vazospazmın preeklampsi patofizyolojisinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Vazospazm, kan akımına karşı direnç ve arter basıncında artış oluşturmaktadır. Damar endotel hasarı ve vazospazm oluşumunda; artmış presör cevap, prostoglandinler, NO, endotelin, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), genetik predispozisyon, immüolojik ve inflamatuvar faktörler ve bu faktörlerin oluşturduğu endotelial hücre disfonksiyonu arasında, yakın ilişki olduğu gösterilmiştir (22).

Gebelikte, fetus ve plasentanin oksijen ve besin ihtiyacının karşılanması için uterin kan akımı yaklaşık 10 kat artar. Bunun oluşabilmesi için spiral

arterlerin fizyolojik değişimi gereklidir. Spiral arterlerin uteroplasental arterlere dönüşümü, fizyolojik değişiklik olarak adlandırılmaktadır (28).



Şekil 2.1. Gebeliğe bağlı hipertansif bozuklukların gelişmesinde patofizyolojik hususlar (1)

Preeklampside meydana gelen bu fizyolojik olaylar sadece arterin desidua da seyreden kısmında sınırlıdır. Myometrium içindeki damarların invazyonu ve dilatasyonu oluşamaz. Bu nedenle, gebeliğin ilerleyen dönemlerinde fetoplasental

kan akımında artış olmayacak ve preeklampitik gebelerde görülen fetal gelişme geriliği ortaya çıkacaktır (29,30,31).

Bu değişimi oluşturan, trofoblastik hücrelerin damarları invaze etmesidir. İnvazyon sırasında trofoblastik hücrelerin bir kısmı NO gibi vazodilatatör ajanlar salgırlar ve trofoblastların spiral arterleri invaze etmelerinden önce, bu arterler üzerine etki ederek invazyon için uygun bir ortam sağlarlar (32). Bu şekilde trofoblastlar spiral arterlerin lümenlerini invaze edip hem bu damarları esnetir hem de çaplarını genişletirler (33).

Bu değişimlere bağlı olarak, spiral arterlerin çapı 15-20 mikrondan 300-500 mikrona çıkmaktadır. Böylece, intervillöz mesafedeki akım direnci azaltılarak yüksek akımlı hale getirilmekte ve anne ile fetus arasındaki alışveriş arttırılmaktadır (28).

Preeklampside asıl problem trofoblastların invazyonundaki bozukluktur (34). Bu bozukluk sonucunda, spiral arterler yüksek rezistanslı damarlar olarak kalırlar (35).

Nitrik oksit, trofoblastik hücrelerin invazyonunda önemli bir rol oynamaktadır (36). Bu nedenle, NO sentezinde ya da yarılanma ömründeki bir azalma, trofoblast invazyonu ve damar gelişiminde bozuklukların görülmesine yol açabilmektedir (33).

Normal gebelerde epitelyal hücreler (trofoblastlar) endotelyal hücrelere dönüşmektedir. Normal farklılaşma sırasında, invaze olan trofoblastlar adezyon

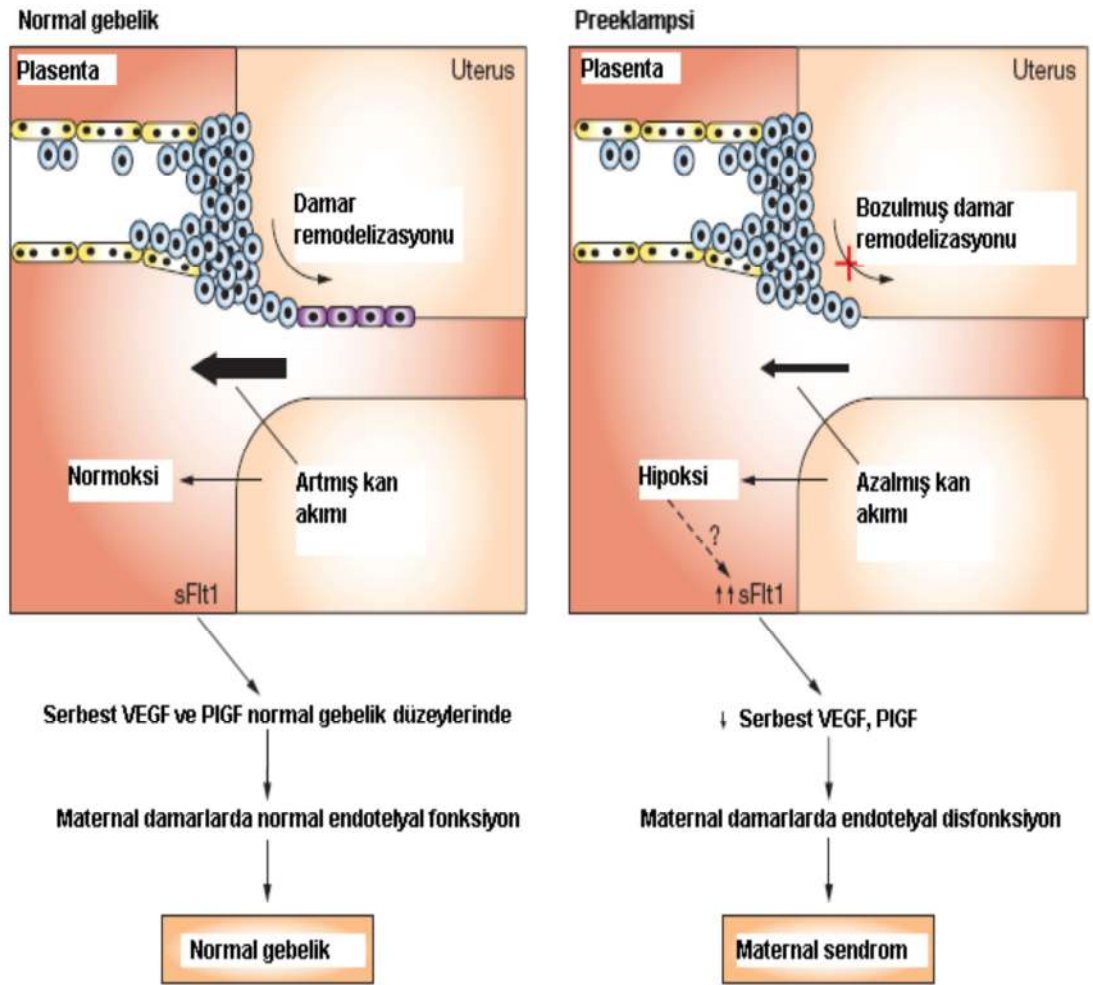
molekülleri ekspresyonunda değişiklik yaparak, epitele özgü adezyon molekülleri yerine, endotele özgü adezyon moleküllerini eksprese etmeye başlarlar (35,37). Preeklampitik kadınlardan elde edilen trofoblastlarda ise, endotele özgü adezyon molekülü ekspresyon gösterilememiştir (35). Bunun sonucunda, sitotrofoblastların invazyon ve farklılaşması bozulmaktadır.

Sitotrofoblastların farklılaşmasını sağlayan faktörler arasında VEGF ve plasental büyüme faktörü (PIGF) bulunmaktadır. VEGF, Vaskülogenez ve vasküler permeabilite kontrolünde önemlidir (1). Trofoblastlarda bulunan VEGF reseptörü “Fms-like tirozin kinaz 1” (Flt1)’ dir. VEGF-Flt1 etkileşimi ise NO salınımına yol açmaktadır (38). Yapılan çalışmalarda VEGF ve Flt1’ in preeklampsililer de düşük düzeylerde olduğu bulunmuştur (39). Flt1’ in başka bir formu olan soluble Flt1 (sFlt1) ise, preeklampsili hastalarda yüksek düzeylerde bulunmakta ve VEGF’ nin Flt1 reseptörlerine bağlanmasını önleyerek sitotrofoblastların invazyon ve farklılaşmasını bozabilmektedir (40).

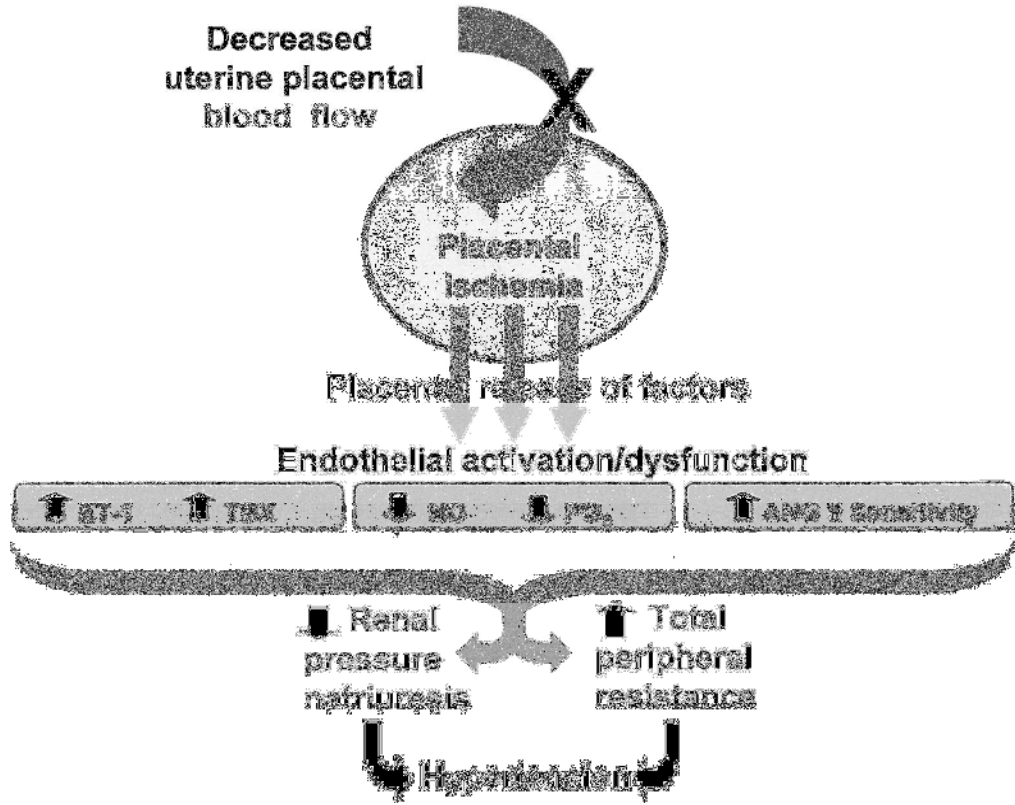
Preeklampside, arginaz II enzim aktivitesinin arttığı da gösterilmiştir (41). Bu durum, NO’ nun prekürsörü olan arjininin yıkılmasıyla sonuçlanmakta ve NO düzeylerini azaltmaktadır. NO düzeylerindeki azalma ise, vazodilatasyonda azalmaya ve relatif olarak vazokonstriksiyonda artmaya yol açmaktadır (3).

Normal gebeler infüze edilen vazopresörlerden kolay etkilenmez. Preeklampitik gebelerin ise, özellikle anjiotensine karşı artmış vasküler duyarlılığı olduğu gösterilmiştir (1). Cunningham ve ark.(1975), Gant ve ark. (1974)

körelmiş presör cevap gelişiminin, prostoglandin ve benzeri maddelerin vasküler endotelyal sentezi ile ilişkili olduğunu düşündüren çalışmalar yapmışlardır (1).



Şekil 2.2. Preeklampsi patofizyolojisinde VEGF ve PlGF' nin rolü (33)



Şekil 2.3. Endotelyal disfonksiyonun potansiyel mekanizması (42)

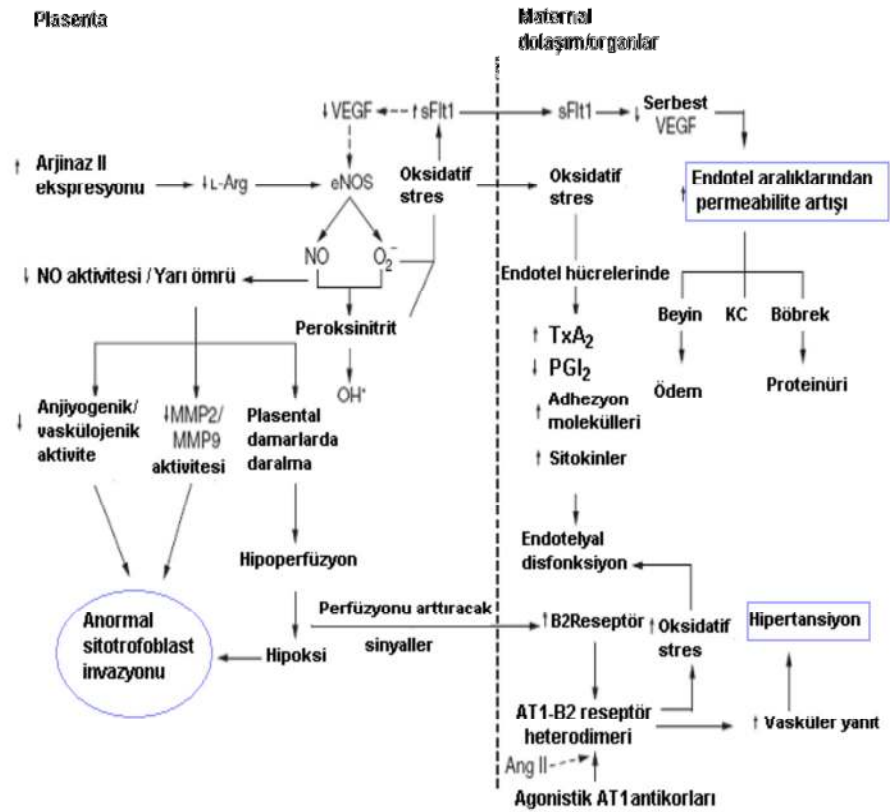
Şekilde gösterildiği gibi uteroplazental perfüzyondaki kronik bir azalma hipertansiyona yol açmaktadır.

Normal gebelikte artmış prostaglandin üretimi; vasküler tonus, kan basıncı ve sodyum dengesinde merkezi bir rol oynayabilmektedir (1).

Prostaglandin ve benzeri maddelerin hangi mekanizma ile gebelikte vasküler reaktiviteyi yönlendirdikleri tam olarak bilinmemektedir. Ancak birçok çalışmada, normal gebelerde antiagregan ve vazodilatatör PGI_2 'nin arttığı, vazokonstrüktör ve agregan tromboksan A_2 (TxA_2)'nin azaldığı gösterilmiştir (1).

Normal gebelikle kıyaslandığında preeklampside, PGI_2 düzeyinin anlamlı olarak azaldığı, TxA_2 'nin anlamlı olarak yükseldiği ve sonuçta vazokonstriksiyonun geliştiği gösterilmiştir (43). Ayrıca TxA_2 düzeyi ile preeklampsi şiddetinin doğru orantılı olduğu da saptanmıştır (43,44).

Endotel vazodilatör maddeler salgıladığı gibi endotelin denilen çok güçlü bir vazokonstriktör madde de salgılar (1,43). Bazı çalışmalarda endotelin miktarının normal ve preeklampsik gebelerde farklılığı gösterilememişken (1) başka bir çalışmada, gebelik hipertansiyonu olan hastalarda amniotik sıvıda endotelin 1 düzeyinin arttığı gösterilmiştir (45).



Şekil 2.4. Preeklampsi patofizyolojisinde rol oynayan mekanizmaların topluca gösterimi (33)

Şekilde görüldüğü gibi, kan basıncını düzeltmek amacıyla sayıları artan bradikinin B₂ reseptörleri, anjiyotensin 2 tip1 reseptörleri ile dimer yapmaktadır. Oluşan bu dimer anjiyotensin 2' ye oldukça duyarlıdır ve maternal tansiyonun yükselmesine sebep olmaktadır (33).

Preeklampsi patogenezinde önemli olabilen diğer bir faktör ise genetik predizpozisyonudur. Preeklampsi ve eklampsinin kalıtsal olabileceği yönünde çalışmalar vardır. Anne ve kız kardeşle preeklampsi varlığında görülme riski artar. Killpatrick ve ark. (1989), multifaktöriyel kalıtımın rolünü göstermiş; ancak Hayvard ve ark.(1992) bunu doğrulamamıştır (1).

Preeklampside immünolojik faktörler de önemli rol oynamaktadır. Krause ve ark (1987) normal gebelerde lökositlerin kemotaksisinin ve yapışma fonksiyonlarının 2. trimesterden başlayarak giderek azaldığını göstermişlerdir (1). Gebe kadınlardaki bu immünolojik baskılanma, bazı kadınlarda otoimmün hastalıklardaki düzelmeyi ve enfeksiyonlara daha kolay yakalanmayı kısmen açıklayabilir. Preeklampside ise blokan antikorlar azalmakta, sitokinler ve nötrofiller aktive olmaktadır (1).

Gebeliğe bağlı hipertansif bozukluklar açısından risk, plasentadaki antijenik bölgeleri bloke eden antikorların oluşumunda bir bozukluk söz konusu olursa, fark edilecek düzeyde artar. Bu durum, ilk gebelikte olduğu gibi bir önceki gebeliğin efektif bir immünizasyon gerçekleştirilmede yetersiz kaldığı koşullarda da ortaya çıkabilir (46).

Nulliparlarda daha sık izlenmesi, partner değiştirenlerde sıklığının azalması immünolojik görüşü desteklemektedir (1).

Hayashi (2003), sistemik sitokin dengesizliği ve sistemik immün maladaptasyonun preeklampsi patogenezindeki önemini göstermiştir (47). Faas ve ark. (2000), Gervasi ve ark. (2001) preeklampsinin dolaşımdaki lökositlere bağlı olduğunu düşünmüşlerdir (1). Desidua’ da aktive olduğunda zararlı maddeler salgılayabilecek bol miktarda hücre mevcuttur ve bunlar daha sonra endotelial hücre hasarına neden olan mediatörler olarak işlev görebilmektedirler (1).

Gebeligin erken dönemlerinde plasental vaskülarizasyon gelişimindeki anormallikler, plasental hipoksiye neden olmaktadır. Plasental hipoksi sonucu maternal sirkülasyona salınan immünolojik ve inflamatuvar faktörler (AT2 tip1 reseptör otoantikor, TNF, IL-6, IL-8 gibi sitokinler) ve antianjiogenik faktörler (soluble Flt1, soluble endoglin) (48,49,50) gibi bir kısım faktörlerin, maternal endotelial disfonksiyona neden olarak, hipertansiyon ve hastalığın diğer belirtilerinin gelişimine yol açtığı ileri sürülmektedir (51).

Preeklampitik kadınlarda, generalize endotelial disfonksiyonun birçok laboratuvar kanıtı mevcuttur. Dolaşımdaki hücrel fibronektin, faktör 8 antijen ve trombomodulin konsantrasyonlarının artışı endotelial disfonksiyonu destekleyici bulgulardır. Ayrıca koagülasyon kaskadına ait bir faktör olan von Willebrand faktör (vWf) de endotel zedelenmesinin belirteci olup, preeklampside arttığı gösterilmiştir (52,53). Bozulmuş akım aracılı vazodilatasyon (54,55), endotelial kaynaklı vazodilatatörlerin (NO, PGI₂) üretiminin azalması ve yine

endotelial kaynaklı vazokonstriktörlerin (endotelin, TxA_2) üretiminin artması, AT_2 ’ ye artmış duyarlılık (56) endotelial disfonksiyonu destekleyen diğer laboratuvar kanıtlarıdır. İn vitro yapılan bir çalışmada, preeklampsik kadınlardan alınan serumların, insan umbilikal ven endotel hücre kültürlerinde, endotelial aktivasyona neden olduğu gösterilmiştir (57).

NO, endotel hücrelerinde NOS tarafından L-arjininden sentezlenen vazodilatör bir maddedir. Gebeliğe bağlı hipertansif hastalıklarda, NO’ nun yokluğu veya azalmış konsantrasyonunun rol oynadığı düşünülmektedir. Conrad ve Vernier (1989) NO geri çekilmesinin, gebe hayvanlarda preeklampsiye benzer bir klinik tablo oluşturduğunu göstermişlerdir. NO yıkım ürünlerinin, preeklampsik kadınlarda arttığı ve bunun uteroplazental üniteadaki azalmış kan akımı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. NO inhibisyonu ile ortalama arter basıncında artma, kalp hızında azalma olduğu ve bazı hayvanlarda gebeliğin indüklediği vazopressör duyarsızlığın geri döndüğü gösterilmiştir. NO, fetoplazental perfüzyonun karakteristiği olan düşük basınçlı vazodilate durumu koruyor gibi gözükmektedir (46).

Bir endojen NOS inhibitörü olan ADMA, vasküler hastalık ve endotelial disfonksiyonun oluşumunda yeni bir risk faktörü olarak öne sürülmektedir. Hipertansiyon, ateroskleroz, hiperkolesterolemi ve diyabetik hastalarda yüksek plazma ADMA düzeyleri gözlemlenmiştir (10).

Birçok çalışmada ADMA’ nın preeklampside arttığı gösterilmiştir. Gönüllü insanlarda ADMA infüzyonunun endotel vazodilatasyonunu bozduğu, sistemik ve

renal vasküler rezistansı artırdığı ve kardiyak output' u azalttığı belirlenmiştir. Bu veriler ADMA' nın kronik olarak yüksekliğinin, vasküler hastalığa yol açabileceğini düşündürmektedir (10).

Normal hamilelik sırasında ADMA düzeyi azalırken, preeklampside artmaktadır (10). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda preeklampsi gelişmeden önce ADMA seviyelerinin yükseldiği gözlemlenmiştir. Bu nedenle yüksek risk altındaki kadınların erken dönemde belirlenmesinde, ADMA yeni bir risk belirteci olarak ortaya çıkabilir (58).

Endotelial disfonksiyonun, myometrial spiral arterlerin yetersiz remodelizasyonuna (yeniden şekillenme) bağlı gelişen hipoksi veya hipoksi/reperfüzyon sonucu oluşan oksidatif strese kaynaklanabileceğine dair güçlü kanıtlar vardır (59).

Gebelik, plasental mitokondrial aktivitenin arttığı, özellikle süperoksit anyonları olmak üzere reaktif oksijen türlerinin artışının izlendiği oksidatif stres durumudur. Preeklampsi ise ROT' lar da aşırı artışın olduğu bir hastalık tablosudur (60).

Gebelikte, oksidatif stres patlamasıyla ilk trimesterde intervillöz sahaya kan akımı sağlanmaktadır. Preeklampside ise, geç gebelik döneminde etkin antioksidan defansın yetersizliği görülmüş ve bunun trofoblast apoptozisine ve plasental vasküler reaktivitede değişikliğe yol açtığı düşünülmüştür. Preeklampsi

ve fetal gelişme geriliği gibi durumlarda SOR' un daha fazla üretildiği de gösterilmiştir (60).

Preeklampitik kadınlarda artmış oksidatif stres ve azalmış antioksidan aktivite, preeklampsinin önceden tahmin edilmesinde protein karboniller gibi oksidatif stres belirteçlerinin faydalı olma olasılığını artırmıştır.

Oksidatif stresin etkilerini gösteren çalışmalar gebeliğe bağlı hipertansif hastalıkları önlemede, antioksidan tedaviye olan ilgiyi artırmış ve vit E, vit C ve β -karoten ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (1).

Preeklampsi patogenezinde, hiperhomosisteinemi de yer almaktadır. Hayvan modelleri ve insanlarda yapılan birçok çalışmada, hiperhomosisteineminin endotel disfonksiyona neden olduğu gösterilmiştir (61,62). Homosisteinin sülfidril grubunun oksidasyonu sırasında ortaya çıkan serbest radikallere bağlı gelişen oksidatif stresin, endotel hücrelerine zarar verdiği ileri sürülmektedir. Yapılan bir çalışmada, preeklampitik hastalarda plazma serbest/oksitlenmiş homosistein oranı, antepartum ve postpartum dönemde, kontrol grubuna göre düşük bulunarak, homosisteinle oksidatif stres ilişkisi gösterilmiştir (63). Hiperhomosisteineminin endotel kaynaklı NO aracılı vazodilatasyonda bozulmaya yol açtığı ileri sürülmektedir (61). Hiperhomosisteineminin NO' nun hızlanmış oksidatif inaktivasyonu gibi alternatif mekanizmalar aracılığı ile NO' nun biyoyararlanımını azaltması da olasıdır (62). Hiperhomosisteinemi sırasındaki endotel disfonksiyonunun bir diğer potansiyel mekanizması, NO üretiminin ADMA tarafından inhibisyonudur (64).

ADMA düzeyindeki artışın sebebi, ADMA' yı sitrülline ve dimetilamine hidrolize eden dimetilarjinin dimetilaminohidrolaz (DDAH) katabolizmasında azalma olmasıdır. Yapılan bir çalışmada, metiyonin yüklemesi yapılan insanlarda, plazma ADMA düzeylerinin arttığı ve buna bağlı olarak endotelial kökenli vazodilatasyonun bozulduğu gösterilmiştir (64).

Homosistein endoplazmik retikulum stresini uyarır, proinflamatuvar yanıtları stimüle eder ve Ras gibi regülatuar proteinlerin metilasyonunu değiştirir. Bu etkilerin her biri endotel hücre hasarına neden olan yolların aktivasyonuna sebep olabilmektedir (65).

Sonuç olarak bugünkü bilgiler ışığında endotel hücre aktivasyonu preeklampsi patogenezinde temel noktadır. Hayman ve ark. çalışmalarında, endotel hücre fonksiyonlarındaki değişiklikler sonucu preeklampsideki klinik bulguların ortaya çıktığını göstermişlerdir (1).

2.1.5.2. Preeklampsi için Risk Faktörleri (22)

- 1- Daha önceki gebeliğinde preeklampsi veya eklampsi hikayesi
- 2- Nulliparite (hiç doğum yapmamış olmak)
- 3- İleri anne yaşı (40 yaş üstü)
- 4- Çoğul gebelik
- 5- Kronik hipertansiyon
- 6- Kronik renal hastalık
- 7- Genetik (anne ve/veya kız kardeşte preeklampsi öyküsü varsa risk artar)

8- DM

9- Antifosfolipid sendromu

10- Non-immun hidrops fetalis

11- Gestasyonel trofoblastik hastalık

2.1.5.3. Preeklampsi Komplikasyonları (66)

1-Fetal Komplikasyonlar: Fetal gelişme geriliği, perinatal ölüm (plasenta dekolmanına bağlı), erken doğum, oligohidroamnios, fetal asfiksi.

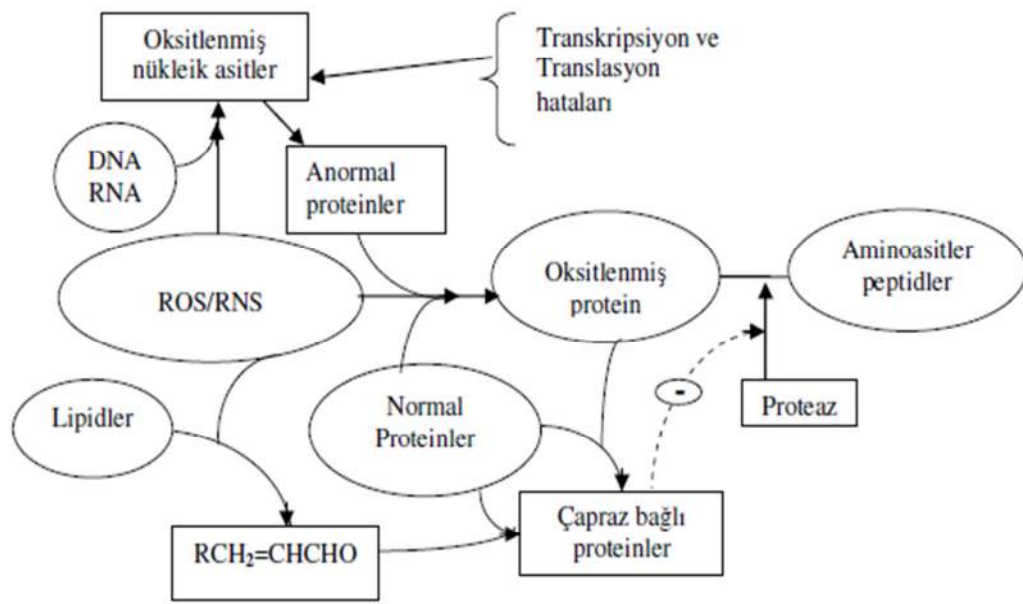
2-Maternal Komplikasyonlar: Konvülsiyonlar, akut böbrek yetmezliği, kalp yetmezliği, pulmoner ödem, intrakranyal kanama, körlük, karaciğer subkapsüler hematomu ve rüptürü, trombositopeni, dissemine intravasküler koagülasyon, HELLP sendromu.

2.2. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller

Vücudumuzda dengede olan oksidan ve antioksidan sistemler arasındaki düzenlemenin oksidan sistem lehine bozulmasına “oksidatif stres” denilmektedir.

Serbest radikal ise, dış orbitalinde bir veya daha fazla paylaşılmamış elektron bulunduran, kararsız halde olan atom veya atom gruplarıdır. Kararlı hale gelmek için diğer moleküllerle reaksiyona girme eğilimindedirler (67,68,69,70). Organizmada artan serbest radikaller; DNA, lipid, protein ve karbonhidratlar gibi makromolekülleri etkileyerek hücre aktivitelerini bozar (71,72,73,74,75). SOR'un neden olduğu hücre hasarının, birçok kronik hastalığın komplikasyonlarına

katkıda bulunduğu düşünölmektedir. DM, ateroskleroz, amfizem/bronşit, preeklampsi, alkolik karaciğer hastalığı, yaşlanma, serebrovasküler bozukluklar, iskemi/reperfüzyon hasarı gibi durumlarda SOR' un neden olduğu hücre hasarı söz konusudur (76).

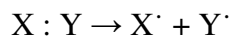


Şekil 2.5. Lipidler, DNA, RNA ve proteinlerin oksijen/nitrojen bağımlı modifikasyonları (77)

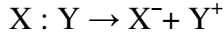
2.2.1. Serbest Radikallerin Oluşumu ve Kaynakları

Bir serbest radikal 3 yolla ortaya çıkabilir (78,79,80);

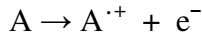
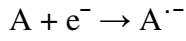
1- Kovalent bağı taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu her bir parçada ortak elektronlardan birinin kalmasıyla,



2- Bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile kovalent bağı oluşturan her iki elektronun atomlardan birisinde kalmasıyla,



3- Ya da normal bir moleküle bir elektronun eklenmesi veya molekülün bir elektron kaybetmesi ile oluşabilirler.

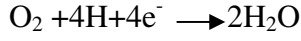


Serbest radikaller hücrenin tüm bölümlerinde oluşabilme özelliğindedirler (110,111). Radikal oluşumu hücre tiplerine göre değişiklik göstermesine rağmen, tüm aerobik hücrelerde belirli düzeylerde üretilirler (67,81,82,83,84). Normal metabolizma sırasında ortaya çıkabilecekleri gibi ekzojen kaynaklar aracılığıyla da oluşabilirler (67,68,85,86,87).

Endojen Kaynaklar; mitokondriyal elektron transport zinciri, mikrozomal elektron transport zinciri, fagositik hücreler, ksantin oksidaz gibi oksidan sistemler, iskemi/reperfüzyon gibi oksidatif stres yapıcı durumlar, oto oksidasyon reaksiyonlardır (67,88).

Ekzojen Kaynaklar; iyonize radyasyon, sigara ve hava kirliliği, alkol, ilaçlar, aşırı demir ve bakır alımı gibi diyetsetel nedenler, asbest, güneş ışığı, ısı şoku, strestir (90,91).

Normal koşullarda oksijenin %98 'i mitokondride bulunan “sitokrom oksidaz” tarafından indirgenir ve 4 elektron alarak H₂O oluşturur (93).

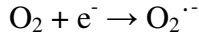


Bir kısım oksijen ise toksik reaktif türlere dönüşür (97,98,99).       oksijen ortamda çok bulunan, elektrofilik ataklara açık bir moleküldür (93,94).

2.2.3. Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Süperoksit radikali (O₂[ ]) :

Oksijenin tek bir elektron alarak indirgenmesi ile kararsız bir yapı olan süperoksit radikali (O₂[ ]) oluşur.



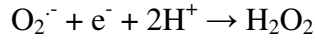
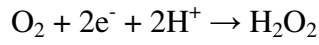
Süperoksit, metabolik yolda enzim veya geçiş metalleri katalizörlüğünde diğer bileşiklerle etkileşerek sekonder ROT' a dönüşebilir (68,69,88).

Ksantin oksidaz' ın ksantin veya hipoksantini indirgemesi, NADPH' ın NADPH oksidaz ile oksidasyonu, mitokondriyal elektron transport sistemi O₂[ ] radikalini oluşturan başlıca mekanizmalardır (68,100,101).

Süperoksit dismutaz, O₂[ ] nin H₂O₂' e dönüşümünü dismutasyonla katalizleyen enzimdir (102).

Hidrojen Peroksit (H₂O₂):

Oksijenin 2 elektron alıp redüklenmesi ve yapıya iki hidrojen atomunun eklenmesi veya süperoksitin bir elektron alıp redüklenmesi ve yapıya iki hidrojen atomunun eklenmesi ile oluşur (69,102).

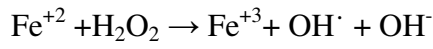
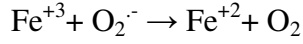


Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal olarak kabul edilmez, fakat Fe ve Cu gibi geçiş metal iyonlarının varlığında kolaylıkla yıkılıp en reaktif radikal olan OH[·] oluşturur (69,91). Sitotoksik H₂O₂ potansiyel oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerden katalaz ve peroksidaz enzimleri ile uzaklaştırılır (91).

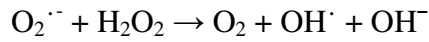
Hidroksil Radikali (OH[·]):

Hidroksil radikali hidroksil iyonunun nötral formudur. Biyolojik sistemlerde üretilen güçlü bir oksidan olduğundan kuvvetli hasarlar oluşturur (69,101). Hidroksil radikalının başlıca tepkimeleri; elektron transfer tepkimeleri, hidrojen çıkarma ve katılma tepkimeleridir (91). DNA' da serbest radikal zincir reaksiyonları ve kimyasal baz değişiklikleri yaparak mutasyonlara ve onkogenik aktivitenin artmasına neden olur (68,103,104).

Toksik OH[·] oluşumunda Fe, Cu gibi bazı metal iyonları da rol alabilir. Fe⁺³ 'ün O₂^{·-} yi indirgemesiyle oluşan Fe⁺², H₂O₂ ile reaksiyona girerek OH[·] ı oluşturabilir, bu durum“Fenton Reaksiyonu” olarak adlandırılır (105).

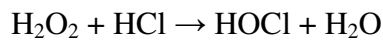


Demir tarafından katalizlenen diğer bir reaksiyonda Haber Weis reaksiyonudur. Bu reaksiyonda ferrik demir katalizörlüğünde süperoksit radikalinin, hidrojen peroksitle etkileşmesi hidroksil radikalini oluşturur (68,69,106).



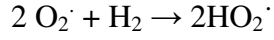
Hipoklorik Asit (HOCl):

Hem içeren myeloperoksidaz enzimi, fagositik hücrelerin sitoplazmasında H₂O₂ ve Cl⁻ iyonlarından HOCl oluşturur (94,107).



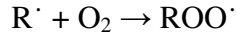
Perhidroksil Radikali (HO₂[·]):

Perhidroksil radikali süperoksitten daha kuvvetli oksidandır ve O₂^{·-} nin protonlanması ile oluşur (69,96). Bu radikal, LOOH varlığında ya da bağımsız olarak, yağ asidi peroksidasyonunu başlatır (108).



Peroksil radikali (ROO[·]):

Lipid, nükleik asit, karbohidrat, protein gibi biyolojik moleküllerin OH[·] ile reaksiyonu sonucu karbon merkezli radikaller (alkil radikali (R[·])) oluşur. Bunlar oksijen ile reaksiyona girerek ROO[·]’ yu oluşturur. ROO[·], Lipid peroksidasyonunu başlatır ve çok uzun ömürlüdür (69,109).

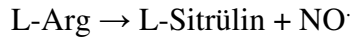


ROO[·]’ dan bir oksijen atomunun çıkarılması sonucu RO[·]radikali oluşur (69).

Till radikali (RS[·]):

RS[·] merkezinde sülfür atomu içerir ve OH[·]’ ın, tiyollerle reaksiyonundan proton koparması sonucu oluşur (69).

Nitrik oksit ve NO₂[·] çiftleşmemiş elektronlara sahip olduğundan serbest radikallerdir. Nitroz oksit ise serbest radikal değildir.



2.2.4. Serbest Radikallerin Biyomoleküllere Etkileri

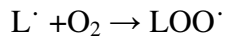
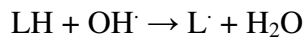
Serbest radikaller oldukça reaktif moleküllerdir. Hücrenin çeşitli bileşenleri ve hücre dışı makromoleküllerle etkileşerek hücrede yapısal ve

fonksiyonel bozukluğa neden olurlar (96). Serbest radikaller hücrede ilk olarak membran lipid komponentleriyle karşılaşır ve lipid peroksidasyonu başlatırlar (110).

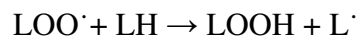
2.2.5. Lipid Peroksidasyonu

Hücre membranında bol bulunan çoklu doymamış yağ asitleri, serbest radikallere oldukça duyarlıdır (94). Bu yağ asitlerinin oksidatif hasara uğraması ile lipid peroksidasyonu başlar (68).

Lipid peroksidasyonu, yağ asitlerinin yapısındaki hidrojen atomunun zincir başlatıcı radikale (R[•]) veya OH[•] gibi kararsız yapılara transferi sonucunda, karbon merkezli lipid radikalının oluşması ile başlar. Karbon merkezli lipid radikali (L[•]) moleküler oksijenle tepkimeye girer ve lipid peroksil radikali (LOO[•]) oluşur (69,111).



LOO[•], membran yapısındaki diğer poliansature yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna neden olabilir ya da yapısına bir hidrojen atomu alarak lipid hidroperoksite (LOOH[•]) dönüşür (69,111).



Lipid peroksidasyonu; lipid peroksitlerinin, hidrokarbon gazları ve aldehitlerin en önemlisi olan MDA gibi ürünlere dönüşmesi ile sona ermektedir (68,69,112). Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanmasına ve polimerizasyonuna neden olmakta ve bunun sonucunda da; deformasyon, iyon transportunda bozulma, enzim aktivitesinde azalma ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi membran özelliklerinde değişimlere yol açmaktadır. Aldehitler diğer moleküllerle (amino asitler, proteinler, nükleik asitlerin bazıları) reaksiyona girerek hücrede; sitotoksik, hepatotoksik, mutajenik, genotoksik hatta proliferatif etki gösterebilirler (71,96,113,114). Lipid peroksidasyonu membran permeabilitesi ve mikroviskozitesini önemli ölçüde etkiler (67). Serbest radikallerin lipid peroksidasyonuna yol açarak çeşitli hastalıkların oluşmasında rol oynadığını gösteren çok sayıda çalışma vardır (96).

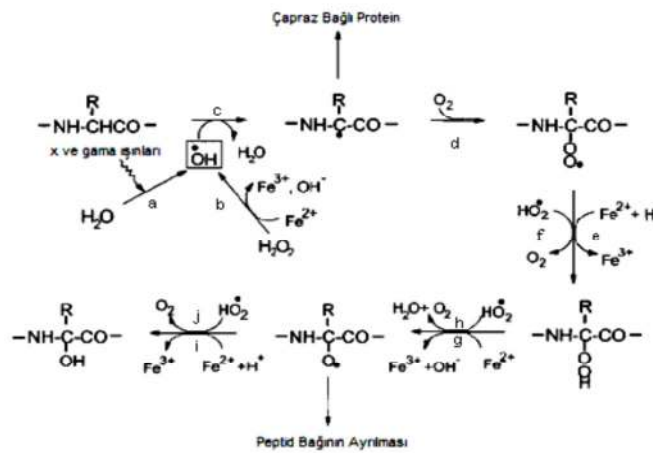
2.2.6. Protein Oksidasyonu

Protein oksidasyonu, ROT veya diğer oksidan metabolitler ile proteinlerin kovalent modifikasyonu sonucu oluşmaktadır (115,116).

Proteinlerde yapısal değişikliğe yol açan başlıca mekanizmalar; protein karbonyl gruplarının oluşumu, metal katalizli protein oksidasyonu, protein tiyol gruplarının kaybı, nitrotirozin ve ileri protein oksidasyon ürünlerinin oluşumudur (117).

Araştırmacılar protein oksidasyonuna yol açan ana mekanizmaların, polipeptid omurgasındaki çeşitli amino asitlerin α -karbon atomlarından $\text{OH}^\bullet$ radikalinin etkisiyle hidrojen atomunun çıkarılması sonucunda başladığını saptamışlardır. Protein oksidasyonu esas olarak $\text{OH}^\bullet$ ile başlar. Diğer taraftan oksidasyon sürecinde O_2 ile birlikte $\text{O}_2^\bullet$ ve onun protonlanmış formu olan $\text{HO}_2^\bullet$ 'nin varlığı da gereklidir. Adı geçen bu reaktif oksijen bileşikleri amino asitlerin yan zincirlerinin oksidasyonuna, protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna ve protein omurgasının oksidasyonu yolu ile proteinlerin parçalanmasına neden olur (115,118,119).

Şekil 2.7.'de görüldüğü gibi x ve gama ışınlarıyla suyun radyolizisinden veya H_2O_2 'nin metal katalizli yıkımından açığa çıkan (reaksiyon a ve b) $\text{OH}^\bullet$ radikali polipeptid omurgasındaki α -karbon atomundan α -hidrojen atomunun uzaklaştırılmasına neden olur. Peptid zincirindeki α -hidrojen atomunu kaybetmiş olan amino asit kalıntısı karbon merkezli radikal haline dönüşür.



Şekil 2.7. Proteinlerde oksidasyona bağlı karbonil gruplarının oluşumu (119,120)

Oluşan karbon merkezli radikal moleküler, oksijen ile hızlı bir şekilde reaksiyona girer (reaksiyon d) ve daha sonra alkil hidroperoksiti verecek olan alkil peroksil radikal ara ürününü oluşturur. Alkil hidroperoksit, alkoksil radikali (reaksiyon h) üzerinden hidroksi protein türevini verir (reaksiyon j). Reaksiyon basamaklarının pek çoğunda Fe^{+2} ve Cu^{+} varlığında $HO_2^{\cdot}$ ile etkileşim önem taşır (reaksiyon e,g,i). Bu metabolik yolda oluşan alkil, alkil peroksil ve alkoksil radikal ara ürünleri aynı veya farklı protein moleküllerindeki amino asitlerin R yan zincirleri ile etkileşerek yeni karbon merkezli radikallerin oluşumuna yol açar. Oluşan bu yeni karbon merkezli radikaller ile yukarıdaki reaksiyonlar tekrarlanır. Oksijen yokluğunda reaksiyon d gerçekleşmez. Oluşan karbon merkezli radikal diğer bir karbon merkezli radikal ile etkileşerek protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna yol açar (121).

Protein oksidasyonunun sonuçları; enzim aktivitesinde azalma, protein fonksiyonlarının ve proteaz inhibitör aktivitenin kaybı, protein agregasyonu, proteolize artmış ya da azalmış yatkinlık, reseptör aracılı endositozun bozulması, gen transkripsiyonundaki değişimler ve immünojen aktivitedeki artış olarak sıralanabilir (115,122).

2.2.6.1. Protein Oksidasyonunun Sınıflandırılması

Proteinler birçok mekanizma ile okside olabildikleri için birden fazla protein oksidasyon türü vardır (115). Proteinlerin oksidatif modifikasyonu, oksitlenen rezidü ile oluşan ürün özelliğine göre 2 gruba ayrılabilir (123).

1. *Global Modifikasyon:* Birden çok rezidünün değiştiği ve birden çok ürünün olduğu (karbonil gruplarının oluşumu gibi) modifikasyonlardır.
2. *Spesifik Modifikasyon:* Hem oksitlenen rezidünün, hem de oluşan ürünün oldukça spesifik olduğu modifikasyonlardır.

Protein oksidatif modifikasyonunun, farklı tipleri için bir tek belirteç yoktur (115). Fakat PCO grupları oksidatif kaynaklı hücresel hasarın en genel belirteçlerinden biri olarak kabul edilmekte ve yaygın olarak kullanılmaktadır (115,119,123,124). Bu durumun başlıca nedenleri; PCO gruplarının birçok farklı mekanizma ile ortaya çıkabilmesi, stabil olması ve basit ama duyarlı yöntemlerle ölçülebilmesi olarak sayılabilir (125).

2.2.6.2. Global Modifikasyonla Karbonil Gruplarının Oluşumu

Karbonhidrat ve lipidlerden türeyen ve organizmada biriken reaktif karbonil bileşiklerinin öncelikle proteinler olmak üzere, biyomoleküller üzerinde oluşturduğu geri dönüşümsüz nonenzimatik modifikasyonların tümüne “karbonil stres” denilmektedir (126).

Glutamil oksidasyonu, proteinlerin α -amidasyon metabolik yoluyla bölünmesi veya lizin, arjinin, prolin ve treonin amino asitlerinin doğrudan oksidasyonu sonucu PCO türevleri oluşur. Aynı zamanda proteinlerdeki lizin gruplarının lipid peroksidasyon metabolitleri (4-hidroksi-2-nonenal, malondialdehit), indirgen karbohidratlar yada bunların oksidasyon ürünleri veya

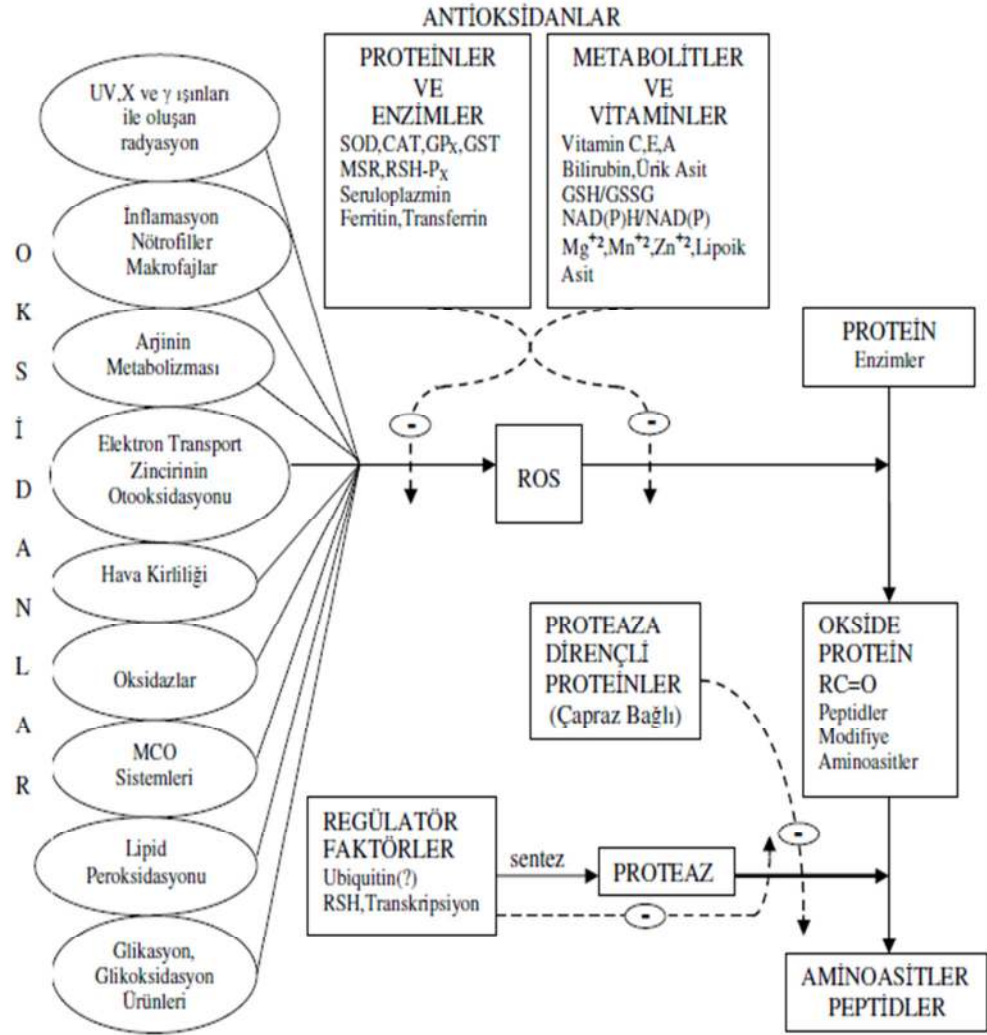
diğer reaktif karbonil türevleri ile reaksiyonu sonucu da PCO türevleri oluşabilir (119).

2.2.6.3. Okside Proteinlerin Birikimi

Oksidatif hasara uğrayan proteinler onarılamaz ve bu nedenle, proteazlarla yıkılırlar (127). Okside protein düzeyi, protein oksidasyon oranı ile okside protein yıkım oranı arasındaki dengeye bağlıdır (116).

Okside proteinlerin birikimi, biyomoleküllerin katalitik ve yapısal bütünlüğünün kaybına ve metabolik düzenleyici yolları kesintiye uğratarak hücresel fonksiyonların bozulmasına neden olmaktadır (127).

Protein karbonil türevleri, oksidatif protein hasarının belirlenmesinde en çok kullanılan belirteçlerden birisidir ve lipid peroksidasyon ürünleri ile kıyaslandığında bazı yönlerden daha avantajlıdır. Çünkü protein oksidasyonunun yaygın bir türüdür, erken oluşurlar ve daha uzun süre dolaşımda stabil halde bulunurlar. Hücreler de okside olmuş proteinler, saatler veya günler içinde yıkılırken (131,132,133) lipid peroksidasyon ürünleri ise dakikalar içerisinde detoksifiye edilebilir (134). Protein karbonillerin kimyasal stabilitesi laboratuvar ölçümleri ve saklanmaları için daha kullanışlıdır (135).



Şekil 2.8. Prooksidan, antioksidan ve proteolitik aktiviteler arasındaki dengeye bağlı olarak oksitlenmiş proteinlerin birikimi (130)

*(MSR: metionin sülfoksid redüktaz, GPX: glutasyon peroksidaz, CAT: katalaz, RSH-PX: tiyol spesifik peroksidaz, GST: glutasyon transferaz)

2.2.7. Antioksidanlar

Antioksidanlar, oksidatif hasara karşı moleküllerin oksidasyonunu geciktiren veya engelleyen moleküller olarak tanımlanmaktadır (91,136,137,138).

Serbest radikallerin ve antioksidanların düzeyleri arasındaki dengenin korunamadığı durumlarda, hücre hasarı ve ölümüne kadar giden birçok patolojik değişiklik meydana gelmektedir (136,137,139).

Organizmada antioksidan mekanizmalar pro-oksidan maddelere karşı koruyucu olarak bulunmaktadır. Bunlar zararlı oksidanları ortadan kaldırır veya in vivo olarak ROT tarafından oluşturulan hasarı onarırlar (140).

Antioksidanlar etki mekanizmalarına göre 4 gruba ayrılırlar (139,140):

1. **Süpürücü etki gösterenler;** yeni radikal oluşumunu engeller ve oluşan radikalleri daha az zararlı hale getirirler. SOD, GPx, ferritin ve seruloplazmin gibi metal bağlayıcı proteinler bu tür etkiye örnektir.
2. **Giderici etki gösterenler;** Oksidanlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini inhibe ederler. β karoten, vit C ve vit E bu tür etkiye örnektir.
3. **Zincir kırıcı etki gösterenler;** Zincirleme olarak devam etmekte olan reaksiyonları belli aşamalarda kırarak, oksidan etkiyi durdururlar. Bunlara örnek olarak, ürik asit, bilirubin ve albumin verilebilir.
4. **Onarıcı etki gösterenler;** Bu gruptaki antioksidanlara örnek olarak; DNA tamir enzimleri ve metiyonin sülfoksit redüktaz sayılabilir.

2.2.8. Preeklampsi ve Serbest Radikaller

Preeklampsi oluşumunda, potansiyel hücre ya da doku hasarına yol açan oksidan maddeler ve bunları önleyici etki gösteren antioksidan maddeler arasında dengenin bozulmasıyla karakterize oksidatif stresin, önemli rolü olduğuna ilişkin çeşitli görüşler bulunmaktadır (142,143).

Preeklampside yetersiz trofoblast invazyonu ve bozulmuş uterin arter remodelingi nedeniyle uteroplental kan akımı azalmakta ve plasental iskemi gelişmektedir. Uteroplental dokuların yetersiz perfüzyonu ise hem plasenta hemde desidua bazaliste kontrolsüz serbest radikal üretimini uyarabilmektedir (144).

İntervillöz boşluklarda hipoksi–reperfüzyon fenomeninin bir varyantı geliştiğinde, plasentada bir oksidatif stres durumu olduğu öngörülmektedir (145).

Normal gebelik sırasındaki plasental oksidatif stresin etkisi; SOD, katalaz, GPx ve tiyoredoksin sistemini içeren endojen antioksidan proteinlerin yanı sıra protein bazlı olmayan C ve E vitamini, selenyum bileşikleri, lipoik asit ve ubikinon gibi antioksidanlar aracılığıyla durdurmak, modifiye etmek ve tahrip etmek suretiyle kontrol edilmektedir (5).

Preeklampside ise antioksidan kapasitenin azaldığı birçok çalışmada gösterilmiştir.

Preeklampsinin özeliği olan artmış oksidatif stres seviyelerinin kontrolünde, antioksidan sistemlerin normal gebelikteki up regülasyonun yetersizliği, hastalık için olası bir neden olarak ileri sürülmektedir (5).

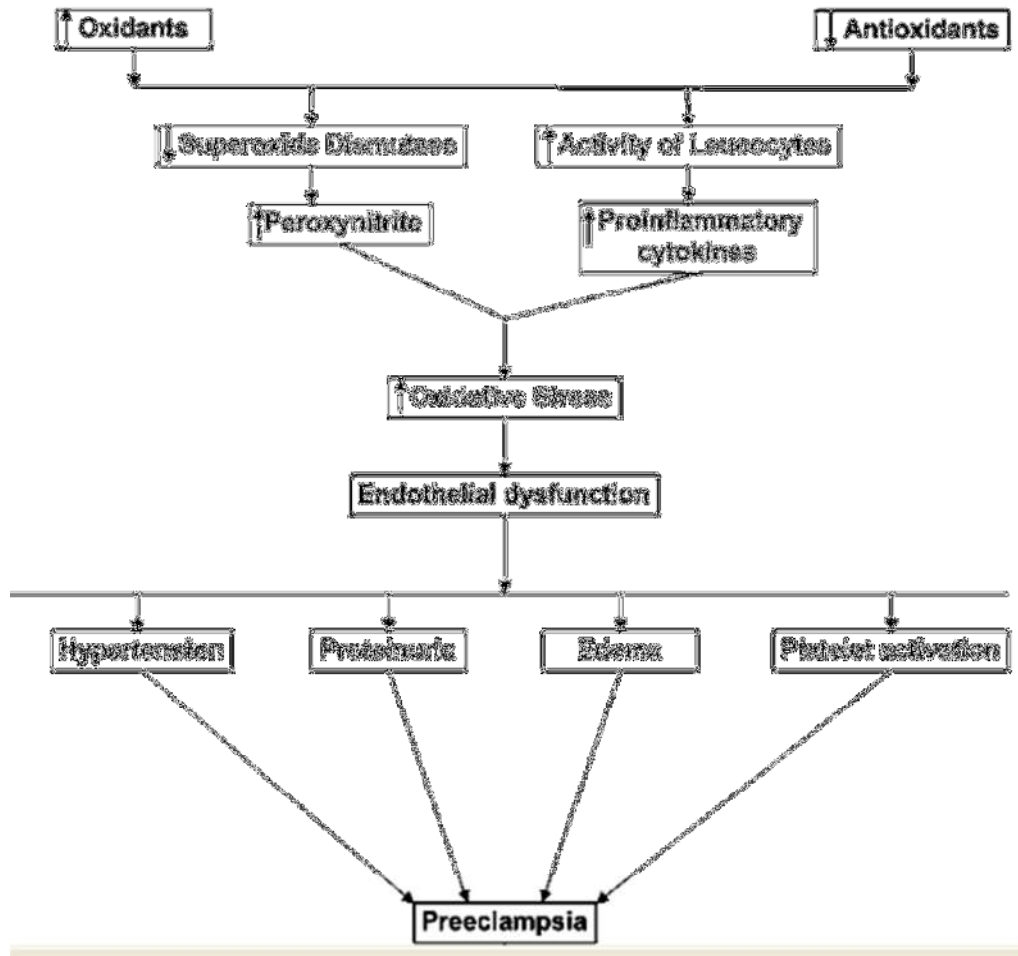
Preeklampitik hastalarda gözlenen serum antioksidan seviyelerindeki azalma büyük olasılıkla artmış lipid ve protein oksidasyonundan dolayı antioksidan kullanımının artmış olmasından kaynaklanmaktadır (146). Antioksidan sistemdeki bu yetersizlik ise, endotelyal disfonksiyona neden olan diğer bir faktör olabilmektedir (146).

Birkaç çalışmada, preeklampitik plasentada lipid hidroperoksit, PCO ve nitrotirozin rezidülerinin ölçümünü içeren aşırı hücresel oksidasyon ürünleri incelenmiştir (5). Bu çalışmaların büyük çoğunluğunda preeklampitik plasentada lipid ve protein oksidasyon seviyelerinin arttığı gösterilmiş ve preeklampitik kadınların plasentasında ROT' un aşırı üretildiği konusunda, bu alandaki araştırmacılar arasında görüş birliği sağlanmıştır (5).

Oksidatif stres altında lipidler kadar proteinlerde ROT' un ana hedefi olup (146), ROT aracılı hasar için PCO' lar oldukça duyarlı belirteçlerdir (147).

Zusterzeel ve arkadaşları preeklampitik gebelerde, sağlıklı gebelere göre yüksek plazma karbonil seviyelerini göstermişlerdir (146). Zusterzeel ve arkadaşlarının yaptıkları daha güncel bir çalışmada ise, preeklampitik gebelerin plasental ve desidual dokularında PCO seviyelerinin yüksek olduğunu rapor

etmişler ve araştırmacılar bu veriler ışığında, preeklampside plasental ve desidual dokuların ROT üretimine destek sağladığı sonucuna ulaşmışlardır (146).



Şekil 2.9. Preeklampsinin patogenezinde oksidatif stresin rolü (144)

Yayınlanmış çalışmalar oksidatif protein hasarı belirteci olan yükselmiş PCO seviyelerinin bir dizi hastalıkla ilişkili olduğunu göstermesine rağmen preeklampside protein oksidasyonunu araştıran sınırlı sayıda çalışma mevcuttur.

2.2.9. Preeklampside Antioksidan Sistem

Preeklampside artmış $O_2^{\cdot -}$ üretimi, lipid peroksid artışı, oksitlenmiş proteinler ve DNA söz konusudur (148). Preeklampsideki oksidatif stresi azaltmak amacıyla Vit C ve E efektif antioksidanlardır. Gebelik ve preeklampsideki kullanımları da araştırılmaktadır. Eksojen antioksidanların kullanımı kolay olsa da transport sırasında tükenmeleri, doğru hücrel kompartmanı hedefleyememeleri ve geri dönüşlü olmamaları sınırlayıcı etkenlerdir (152).

2.3. Nitrik Oksit (NO)

Endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) olarak da bilinen nitrik oksit eşleşmemiş bir elektron taşıyan yüksüz bir moleküldür. NO' nun bu özelliği onu eşsiz bir mesajcı yapar. Yüksüz olduğu için membranlardan kolayca geçer ve eşleşmemiş bir elektrona sahip olması nedeni ile diğer moleküllerle hızlıca reaksiyona girer (149). Serbest radikal olan NO' nun yarılanma ömrü kısa olup, hızla nitrit ve nitrata dönüşür. Bu yüzden serum nitrit ve nitrat düzeyleri, nitrik oksit oluşumunun göstergesi olarak in vitro ve in vivo olarak kullanılabilirler (150).

Nitrik oksit vücutta bulunan bir amino asit olan L-arjininden sentezlenmektedir. Bu metabolik yolda görev yapan enzim NOS dur. Bu enzimin 3 çeşit izoformu bulunmaktadır. Bu izoformlar; indüklenbilir NOS (iNOS),

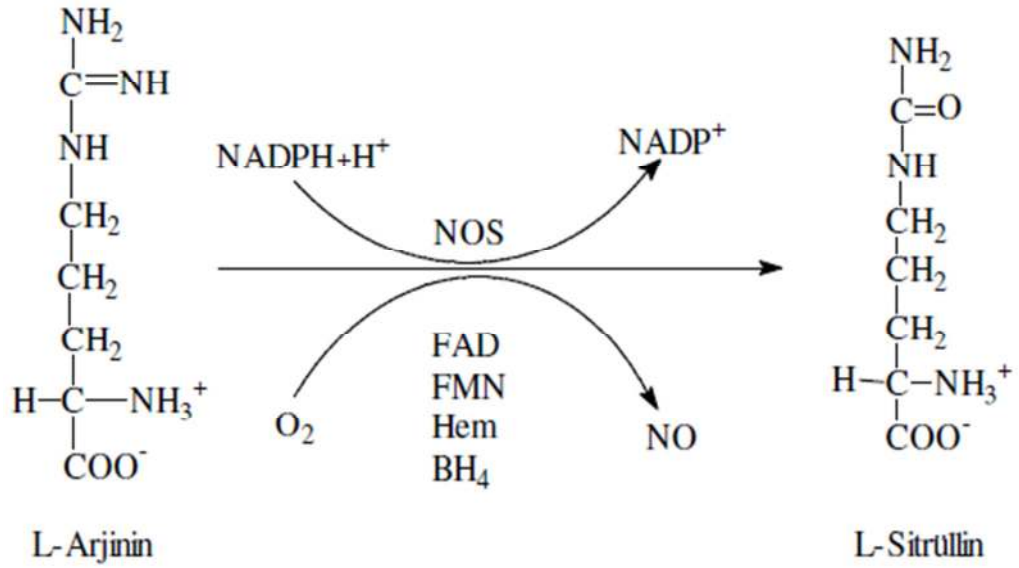
nöronal NOS (nNOS) ve endotelial NOS (eNOS) olarak isimlendirilmektedirler (151).

Tablo 2.1. NOS izoformları (153)

NOS İzoform	Diğer adı	Salmım	Kaynak	Regülasyon	NO	Kromozom
Tip 1	nNOS	Devamlı	Sinir hücreleri	Ca^{++} a bağımlı	Düşük	12
Tip 2	iNOS	İndüklen -diğinde	Makrofaj, damar düz kası, damar endoteli, miyokard, endokard, immun hücreler, hepatosit	Sitokinler, endotoksin ve oksidanlarla indüklenme	yüksek	17
Tip 3	eNOS	Devamlı	Vasküler endotel hücreleri, trombositler, miyokard, endokard, mast hücreleri, nötrofiller	Ca^{++} a bağımlı	yüksek	17

Her üç izoformun da NO sentezleyebilmesi için kalsiyum regülatör protein olan kalmoduline ihtiyacı vardır. eNOS ve nNOS' un kalmodüline bağlanabilmesi için ortamda artmış kalsiyuma ihtiyacı varken, ortamda düşük konsantrasyonda kalsiyum bulunması durumunda bile iNOS kalmodüline bağlanabilmektedir. Dolayısıyla intraselüler kalsiyum miktarı ile esas olarak eNOS ve nNOS aktivitesi regüle edilmektedir (154).

Nitrik oksitin arjininden sentezi NOS enzimi ile iki basamakta gerçekleşir. Tepkimenin ilk basamağında L-arjinin amino asiti guanidin-nitrojen terminalinden NOS enzimi tarafından hidroksillenir. Enzime sıkı bağlı olan stabil ara ürün ise, ikinci aşamada sitrülün ve NO' ya çevrilir (9).



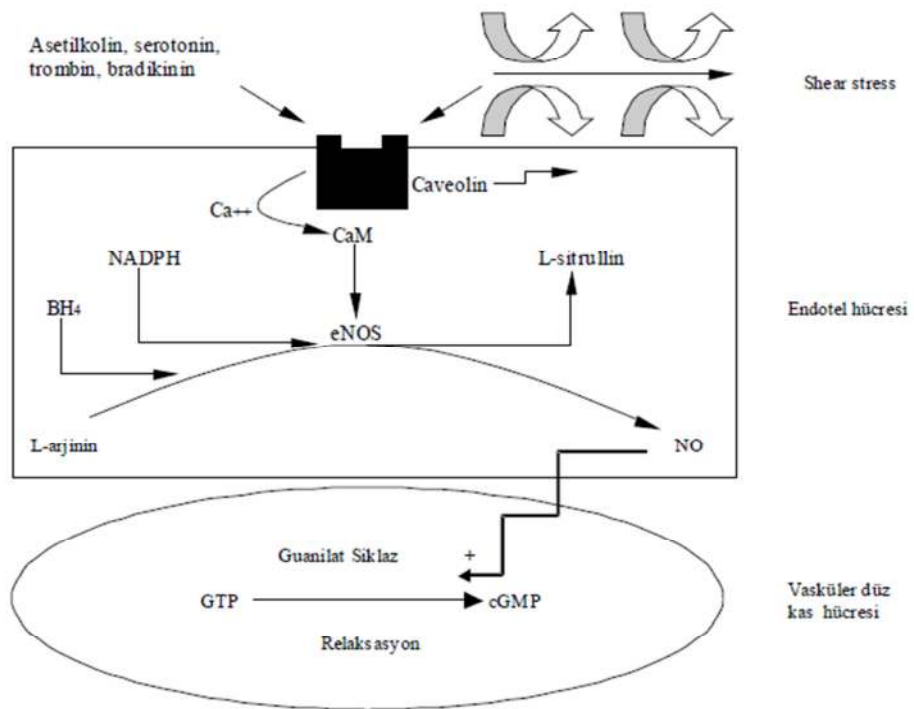
Şekil 2. 10. Nitrik oksit sentezi (155)

NO' nun sentezlendiği reaksiyonda kofaktör olarak flavin mono nükleotit (FMN), flavin adenindinükleotit (FAD), kalmodulin (CaM), tetrahidrobiopterin (BH₄), kosubstrat olarak ise nikotinamid adenin dinükleotit' in indirgenmiş şekli (NADPH) ve oksijen kullanılmaktadır. Reaksiyon sırasında oluşan sitrülünün, endotel hücre kültüründe yapılan çalışmalar sonucunda üreden gelen bir azot atomunun eklenmesiyle arjinine geri dönüştüğü gösterilmiştir (154).

Kan damarlarındaki kanın akış hızının artması, endotel hücreleri üzerinde mekanik bir kuvvet (shear stres) oluşturarak NO' nun sentez ve salınımını artırır (155). Shear stres potasyum kanallarının aktivasyonuna neden olarak hiperpolarizasyona yol açar. Hiperpolarizasyon ise hücreye Ca⁺² girişine neden olarak NO sentezini artırır. Ayrıca epinefrin, norepinefrin, histamin, vazopressin,

asetilkolin, bradikinin, ADP, ATP, trombin, insülin, endotelin ve 5-hidroksitriptamin gibi moleküller, endotel hücre reseptörlerine bağlanıp fosfolipaz C enzimini aktive ederek, Ca^{+2} aracılığıyla eNOS enzim aktivasyonuna yol açarlar (157,158).

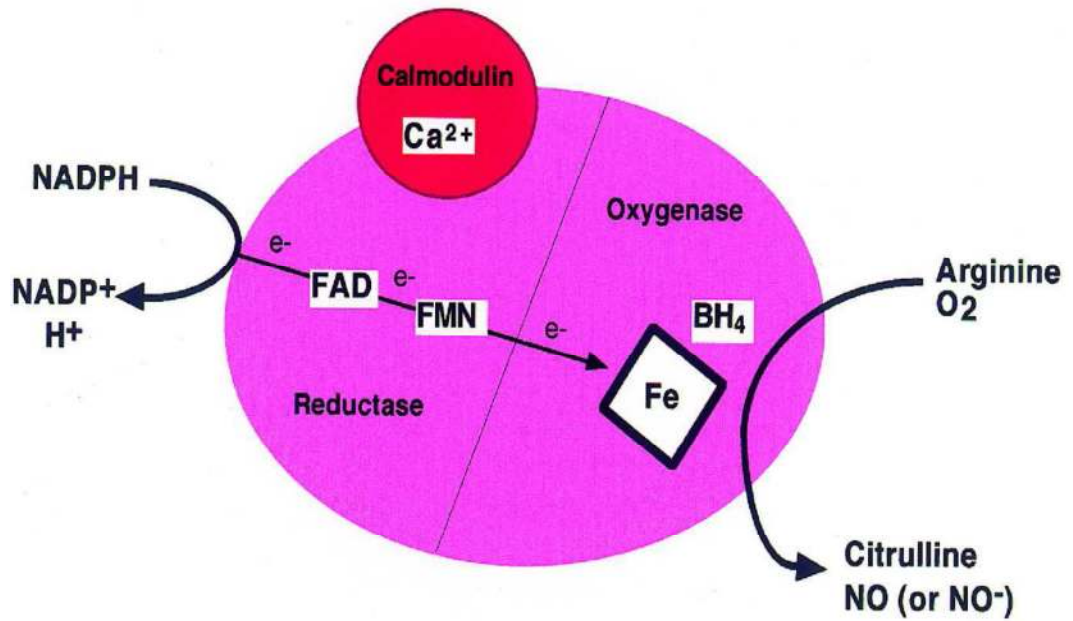
Nitrik oksit; endotel hücrelerinde caveolae' da (hücre membranındaki invajinasyonlar) lokalize endotelial NOS' un, enzimatik etkisiyle prekürsörü olan L-arjininden sentezlenir. Caveolin-1, calmoduline bağlanır ve eNOS aktivitesini inhibe eder. Kalsiyumun calmoduline bağlanması Caveolin-1' i ayırır ve eNOS' u aktive ederek NO üretimine yol açar (156).



Şekil 2.11. Endotelial hücrelerde NO üretimi (159)

* (GTP: Guanozin trifosfat, cGMP: siklik guanozin monofosfat)

Aşağıdaki şekilde görüldüğü gibi eNOS, 2 globuler protein modülünden oluşmaktadır (redüktaz ve oksijenaz segmentleri), bu iki segment esnek protein yapı ile birbirine bağlanmıştır. Redüktaz segmenti, NO sentezi için NADPH' a bağlanarak dehidrojenasyonu katalize etmek için gerekli olan elektronları üretir. Elektronlar esnek protein yapıdan oksijenaz segmentine transfer edilir. Bu elektron transferi, calmodulin' in enzime bağlanmasıyla aktive edilir. Oksijenaz segmenti ise, NO üretimi için gerekli olan katalitik merkezden oluşur ve hem, L- arjinin, BH₄' ü bağlar (160).



Şekil 2.12. NO sentezi ve sentezde rol alan moleküller (154)

Endotel hücresi tarafından sentezlenen NO, difüzyonla düz kas hücrelerine geçerek guanilat siklazı aktive edip cGMP seviyesini artırır. cGMP düz kas hücresi içindeki cGMP bağımlı protein kinazı aktive eder. Bunun sonucunda potasyum kanalları fosforile, Ca⁺² kanalları hiperpolarize olur. Hücre içi Ca⁺² miktarı azalır ve bu da düz kas hücresinde gevşemeye yol açar. NO, cGMP

yolundan başka sodyum ve potasyum kanallarını doğrudan aktive ederek de vazodilatasyona katkıda bulunur (161).

2.3.1. Nitrik Oksit Reğölasyonu

Tetrahidrobiopterin, eNOS aktivitesini düzenleyen bir kofaktördür. Sağlıklı insanlarda bu kofaktörün uygulanması herhangi bir etki oluşturmaz, fakat hiperkolesterolemik veya sigara içen kişilerde bozulmuş olan NO aktivitesini düzeltebildiğı gösterilmiştir. NOS substratı olan L-arjinin ve BH₄ yetmezliğı, eNOS' un ayrışmasına yol açmaktadır. Reaksiyon NO yerine O₂' üretimiyle sonuçlanmakta ve bu etki NOS uncoupling' i olarak adlandırılmaktadır (156, 158).

NO aktivitesinin en önemli düzenleyicilerinden biri O₂' anyonudur. O₂' anyonları çoğunlukla NADPH oksidaz ile sentezlenmekte ve NO' nun kararsızlığına neden olmaktadır. O₂' ve NO unstabil moleküllerdir ve reaksiyona girerek ONOO⁻ bileşimini oluştururlar. Peroksinitrit, proteinlerdeki tirozin rezidülerinin nitrasyonuna neden olduğu gibi lipid peroksidasyonunu uyarıcı etkiye de sahiptir (162). Peroksinitritten diğler SOR türleri (OH') oluşur. NO, bu durumdan antioksidan özellikteki endotele bağılı süperoksid dismutaz enzimi ile korunmaktadır. Normal metabolizmanın bir ürünü olarak tüm hücrelerde devamlı sentezlenen süperoksit anyonu, diğler serbest radikallerle reaksiyona girebilir veya SOD tarafından hidrojen peroksit ve oksijene dönüştürülebilir (156,157,158).

2.3.2. NO ve Preeklampsi

Nitrik oksit, hamilelikte kan akımı ve kan basıncının düzenlenmesinde önemli rol oynayan potent bir vazodilatatördür. Yapılan çalışmalarda preeklampside NO düzeyinin azaldığı saptanmış olup, bunun preeklampsideki endotelial disfonksiyon ile ilgili olabileceği düşüncesine varılmıştır.

Nitrik oksit, gebelikte güçlü bir vazodilatatör olarak fetoplasental dolaşımın düzenlenmesinde önemli rol oynar. Yapılan çalışmalarda insan plasental villuslarında NOS varlığı gösterilmiştir (163).

Plasental NOS' un endotelial tipte olduğu ve trofoblastların plasental eNOS' un esas kaynağı olduğu enzimatik ve immünohistokimyasal metotlar kullanılarak kanıtlanmıştır. eNOS tarafından meydana getirilen NO' nun bazal vasküler tonusun sağlanması, trombosit aktivasyonun önlenmesi ve endotele lökosit adezyonunun sınırlandırılmasında önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (163).

Bir hayvan modelinde endojen NO sentezinin inhibe edilmesi ateroskleroz gelişimine yol açmıştır. Bunun tersine, L-arjinin verilmesi ise hastalık ilerlemesini durdurmuş ve ateroskleroz sürecini tersine çevirebilmiştir (10). Eksojen L-arjinin verilmesi, şu 3 etkiden dolayı bu duruma yol açabilmektedir (3).

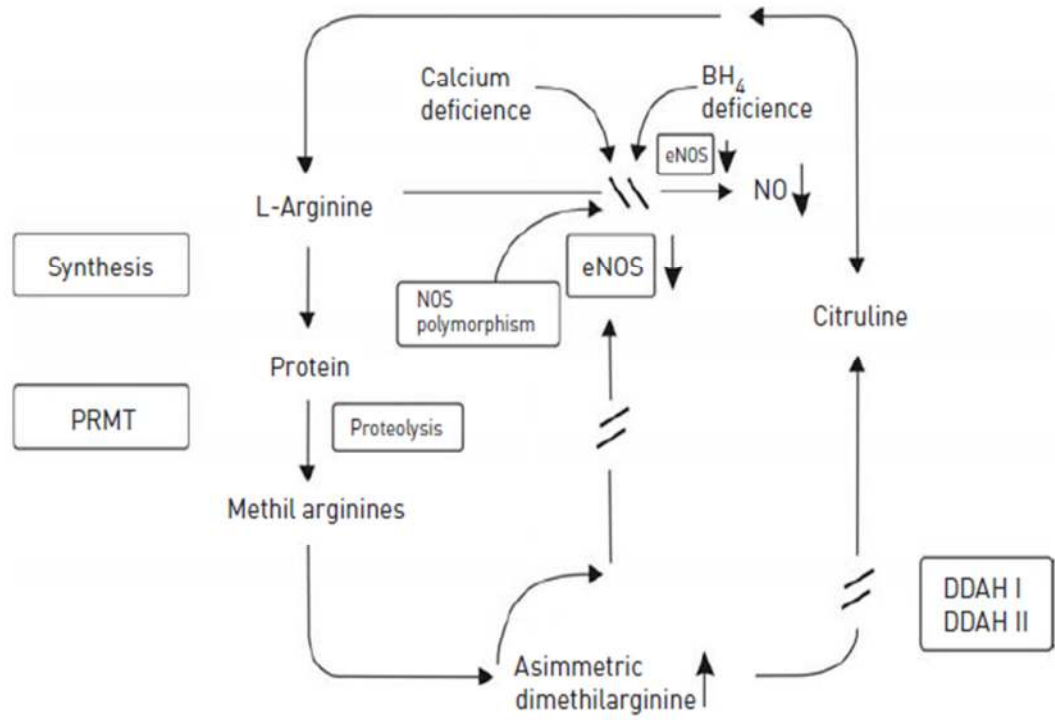
- 1) eNOS aracılı NO üretiminin ADMA ile inhibisyonunun aşılması,
- 2) y+ transport sisteminde ADMA ile yarışma,
- 3) Antioksidan olarak hareket edip süperoksiti ortadan kaldırma.

Seligman ve arkadaşları preeklampsisi patogeneğinde NO' nun rolünü araştırmak amacıyla, 26' sını normotansif toplam 52 gebede yaptıkları çalışmada, NO' nun metabolitleri olan nitrit ve nitratın konsantrasyonlarını ölçmüşler ve şiddetli preeklampşik grupta bu maddelerin düzeyini sağlıklı gebelere göre anlamlı derecede düşük bulmuşlardır (164).

Li ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da, bu maddelere ek olarak NO için ikinci haberci olan cGMP düzeyleri ölçülmüş ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında nitrit, nitrat ve cGMP düzeylerinin preeklampşiklerde anlamlı şekilde düşük olduğu gösterilmiştir (164).

NO düzeyi düşük olan preeklampsili hastalarda;

- 1-) Substrat olan L- arjinin eksikliği veya transportundaki bozukluk,
- 2-) İyonik kalsiyum gibi eNOS' un normal aktivitesi için gerekli olan kofaktörlerin yetersizliği,
- 3-) eNOS' un endojen inhibitörü olan ADMA' nın yükselmesi,
- 4-) Düşük enzimatik aktiviteye neden olan eNOS' da polimorfik değişikliklerin varlığı gibi, L-arjinin-NO metabolizmasına ait bazı değişiklikler tanımlanmıştır (25).



Şekil 2.13. Preeklampside L-arjinin-nitrik oksit yolağı (25)

2.4. Asimetrik Dimetil Arjinin (ADMA)

Nitrik oksit vasküler ve kardiyak fonksiyonların önemli bir düzenleyicisidir. NO sentezinin ADMA düzeylerindeki yükseklik nedeniyle inhibe edilmesi pek çok hastalığın vasküler patofizyolojisine katkıda bulunabilmektedir (165).

ADMA, nükleoproteinlerde bulunan arjinin rezidülerine, protein arjinin metiltransferaz (PRMT) enzimi tarafından metil gruplarının sentez sonrası düzenleme ile eklenmesi ve bu proteinlerin yıkılması sonucunda meydana gelen metillenmiş bir arjinin türevidir. Vücutta daha farklı metillenmiş arjinin bileşikleri de bulunmaktadır. Bu bileşikler bir ya da 2 metil grubunun arjinine eklenmesi

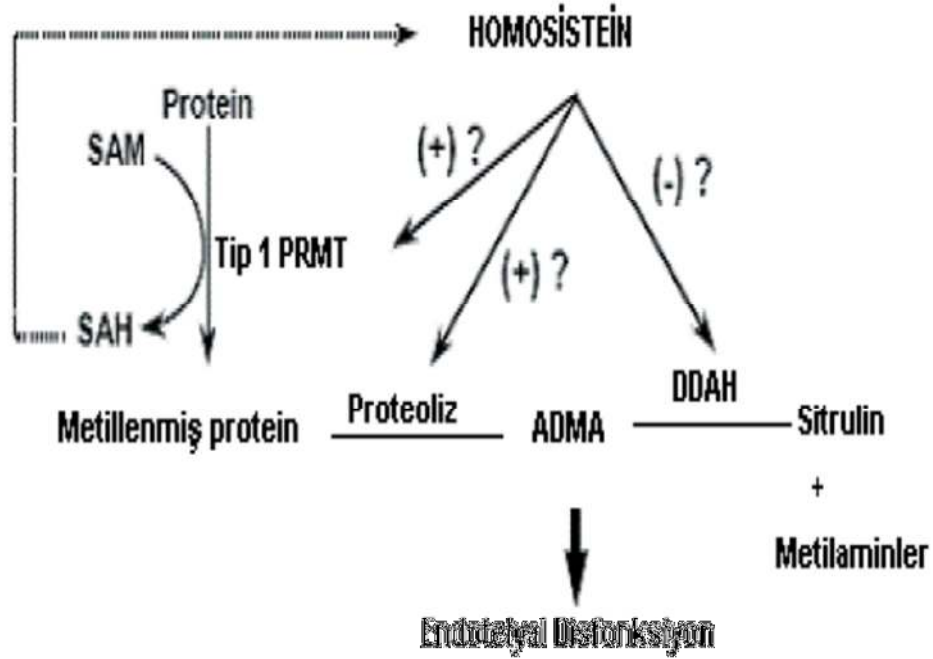
sonucunda meydana gelmektedirler. ADMA ve simetrik dimetil arjinin (SDMA) iki metil grubunun eklenmesiyle ve N-monometil-L-arjinin (L-NMMA) ise bir metil grubunun eklenmesiyle oluşan arjinin türevleridir (166).

2.4.1. ADMA' nın Metabolizması

Metillenmiş arjinin bileşikleri hücre içerisinde başlıca PRMT enzimi tarafından sentezlenmektedir. PRMT' nin başlıca iki tipi vardır: PRMT1 ve PRMT2. PRMT1 hücrede daha çok çekirdekte bulunurken (173), PRMT2 ise sitozolde bulunmaktadır (168).

Bu enzimler, proteinlerin yapısında bulunan arjininlerin guanidino grubundaki azotlara metil grubu eklemektedirler. Tip1 guanidino grubundaki azotlardan sadece birini metillerken, tip 2 ise 2 azotu da metillemektedir. Bu nedenle, PRMT1 ADMA ve L-NMMA' yı sentezlerken, PRMT2 ise SDMA' nın sentezlenmesini sağlar (166).

PRMT enzimi S-adenozil metiyonini (SAM) metil donörü olarak kullanmakta ve sonuçta ADMA' nın yanında S-adenozil homosistein (SAH)' de ortaya çıkmaktadır. PRMT aktiviteleri SAM ve SAH' ın hücre içi konsantrasyonu ile düzenlenmektedir. Hiperhomosisteinemi güncel kardiyovasküler risk faktörlerinden biridir ve bu sentez yolağında ADMA düzeylerindeki artışla ilişkili olabilmektedir (15).



Şekil 2.14. Homosistein-ADMA etkileşimi (58)

L-NMMA, NOS enzimini ADMA ile aynı güçte inhibe eder fakat plazma konsantrasyonu ADMA' dan 10 kat daha düşüktür. SDMA' nın plazma konsantrasyonu ADMA ile eşit seviyededir ancak NOS üzerine inhibitör bir etkisi yoktur (154).

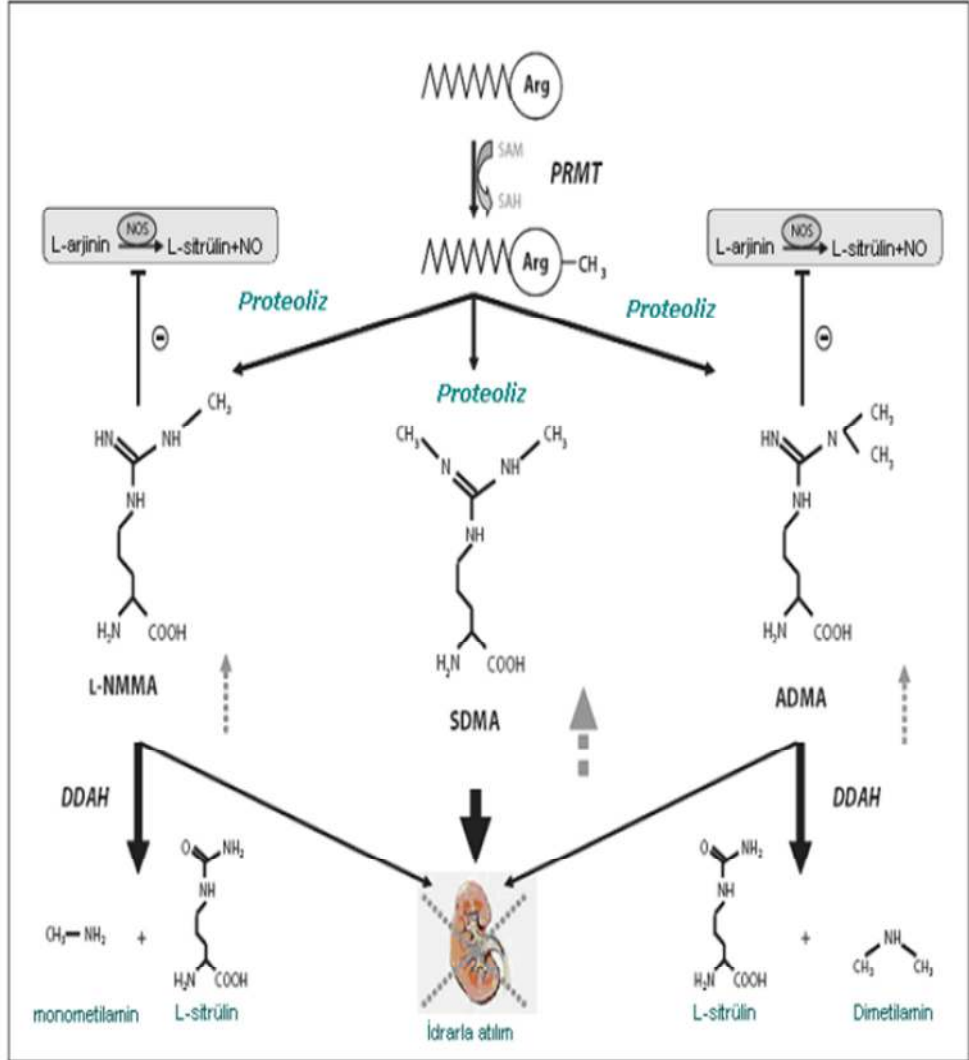
ADMA' nın hücre içi miktarları; protein metilasyonu, protein yıkım hızı ve ADMA' nın dimetilarjinin dimetilaminohidrolaz (DDAH) tarafından yıkılma hızına bağlıdır. Hücre içerisinde oluşan ADMA daha sonra dolaşıma verilmektedir. Protein yıkımının arttığı iskemik kalp hastalığı, diyabet gibi bazı durumlarda hücre içerisinde fazlaca oluşan ADMA dolaşıma verilmekte ve dolaşımdaki düzeyi artmaktadır (169,170).

Metilarjinin türevleri (ADMA, SDMA ve L-NMMA) y^+ taşıyıcı protein adı verilen katyonik amino asit taşıyıcıları aracılığıyla endotel hücrelerinin içine girerler. Metilarjininler birbirleriyle ve arjinin ile hücre içine giriş için yarışır. Yüksek konsantrasyondaki ADMA; izole edilmiş kan damarlarında, kültüre edilmiş makrofajlarda ve endotel hücrelerinde L-arjininin hücre içine transportunu engeller (171).

ADMA oldukça stabil bir molekül olup, hücreler arasında rahatça dolaşabilmekte ve etkisini serbest olarak gösterebilmektedir (172).

ADMA' nın %10' luk kısmı böbrekler yoluyla uzaklaştırılırken, geriye kalan % 90 kadarlık kısım ise DDAH tarafından metabolize edilmektedir. Bir başka metillenmiş arjinin olan SDMA' nın ise tamamı renal yolla atılmaktadır (7). Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar SDMA' nın da hepatik yolla metabolize edildiğine dair kanıtlar sunmaktadır (173).

DDAH enzimi sitoplazmik lokalizasyonludur ve 2 tipi bulunmaktadır. Tip 1 DDAH aktivitesi böbrekte ve beyinde fazlayken, Tip 2 DDAH aktivitesi kalp, plasenta ve böbrekte daha yoğun olarak bulunmaktadır. DDAH enziminin, NO' ile ilişkisinin gösterilmesi bakımından önemli bir nokta da, DDAH-1' in daha çok nNOS eksprese eden hücrelerde bulunması, DDAH-2' in ise çoğunlukla eNOS eksprese eden dokularda bulunmasıdır (170). ADMA' nın DDAH tarafından metabolize edilmesi sonucunda sitrülün ve dimetilamin oluşmaktadır (174).



Şekil 2.15. Metillenmiş arjinin türevlerinin metabolizmaları (174)

2.4.2. ADMA' nın Gebelikteki Değişimi

Gebelik sırasında annenin sistemik vasküler fonksiyonları değişmektedir. NO sentezinin artışı, gebelikteki vasküler adaptasyonun önemli bir kısmından sorumludur (175,176).

Gebelikte ADMA seviyesindeki düşüklük, normotansif gebelerdeki vasküler dilatasyondan ve kan basıncı değişikliklerinden özellikle sorumludur. ADMA konsantrasyonları normal gebelik sırasında düşer ve 1. trimesterin sonunda minimuma ulaşır, sonra gebelik yaşıyla birlikte düzeyleri artar (177). Ancak, gebelikte düşük olduğu fakat gebelik haftaları arasında fark olmadığı yönünde yayınlar da vardır (178). ADMA' nın esas eliminasyon şekli DDAH tarafından yıkılmasıdır ancak renal hiperfiltrasyon gebelik sırasındaki düşük ADMA konsantrasyonlarından sorumlu olabilir. Çünkü DDAH enzimi böbrek glomerüllerinde ve tübüllerinde oldukça yüksek düzeylerde bulunur ve bu da renal hiperfiltrasyonla böbreklere gelen ADMA' nın düzeylerinde azalmaya neden olabilir (179).

2.4.3. ADMA ve NO İlişkisi

ADMA' nın temel etkisi vasküler NO sentezini eNOS enzimi üzerinden inhibe etmesidir (8). ADMA bu majör etkisinin yanı sıra eNOS' un aktivitesini bu enzimin ayrışmasına neden olarak da bozabilmektedir. Böylece eNOS' un 2 segmenti arasındaki olağan elektron akışı bozulmakta ve enzim NO yerine süperoksit radikalleri üretmeye başlamaktadır (180). Bu durum enzimin kofaktörü BH₄ veya substratı arjinin eksikliğinde de görülür (181). Yüksek ADMA düzeyi varlığında bloke olan bir diğer mekanizma ise substrat arjininin hücre içine alımıdır (182).

2.4.4. Preeklampsi ve ADMA

Preeklampsi, ADMA ilişkisini ilk Fickling ve ark. göstermişler ve preeklampsili hastalardaki ADMA konsantrasyonlarının, sağlıklı gebe kadınlara göre anlamlı miktarda yüksek olduğunu bildirmişlerdir (183).

Pettersson ve arkadaşları, preeklampitik ve normotansif gebe kadınlarda hem plazma ADMA hemde plazma arjinin konsantrasyonlarını ölçmüşler ve preeklampitik kadınlarla, normotansif kontrol grubu arasında, arjinin düzeyleri açısından bir fark olmadığını ve plazma arjinin/ADMA oranının preeklampsi grubunda düşük olduğunu göstermişlerdir (184).

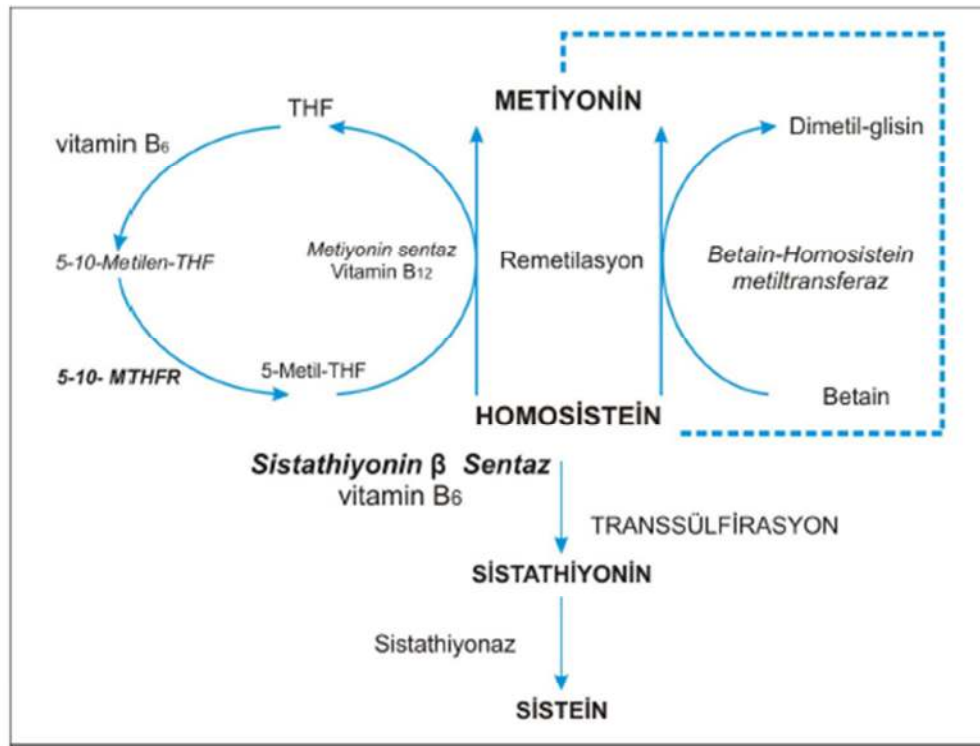
Preeklampside klinik belirtiler gelişmeden önce, gebeliğin 23. haftasında ADMA düzeylerinin arttığı rapor edilmiştir (185). Bu durum, ADMA' nın yüksek riskli gebelerin teşhis edilmesinde yeni bir belirteç olabileceğini düşündürmektedir (10).

2.5. Homosistein

Homosistein sülfür içeren bir amino asittir. Hayvansal proteinlerde bol miktarda bulunan metiyoninin demetilasyonu sonucu oluşur. Metiyonin, diyetle alınmakta veya endojen proteinlerin bozulması ya da homosisteinin remetilasyonu ile oluşmaktadır. Metiyonin yeni sentezlenen proteinlerin yapısına katıldığı gibi ATP yardımı ile enzimatik olarak bir sülfonyum bileşiği olan S-adenozil metiyonine de dönüşebilir (186,187). SAM' ın metil grubu DNA metiltransferaz aracılığıyla koparılarak, S-adenozil homosisteine dönüştürülür.

Bunun adenoil kısmının hidrolitik olarak parçalanmasıyla da homosistein oluşur (186).

Homosistein transsülfürasyon veya remetilasyon yollarından birini kullanarak metabolize olur. Transsülfürasyon yolunda Vit B6 bağımlı olan sistatyonin β sentetaz enzimi (CBS) (187); remetilasyonun kısa yolunda betain homosistein metil transferaz (BHMT) enzimi; uzun yolunda ise metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi etkilidir (188).

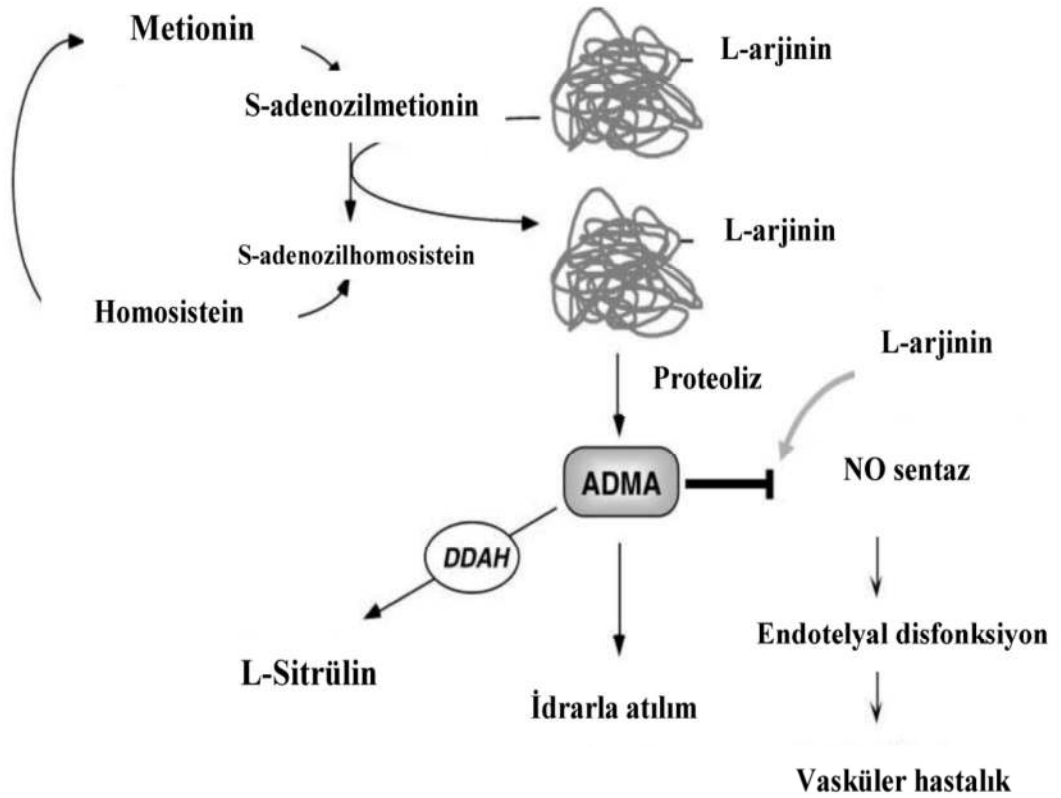


Şekil 2.16. Homosistein Metabolizması (189)

Plazma homosistein konsantrasyonu yaş ve cinsiyetle yakından ilişkilidir. Yaşa bağlı olarak plazma homosistein seviyesi hafif artma eğilimi gösterir.

Östrojen, total homosistein konsantrasyonunu beslenme ve kas kitlesinden bağımsız olarak düşürdüğü için, erkeklerde homosistein kadınlara göre 1 $\mu\text{mol/L}$ daha yüksek olabilir (190).

Metiyonin metabolizması, birçok yolağın birleşme noktasında anahtar bir ara üründür. Birçok dokuda metiyonin, SAM oluşturmak için ATP ile aktive edilir. Oluşan SAM, PRMT gibi birçok metil transferaza metilarjinin sentezi için metil grubunu verir (182).



Şekil 2.17. Homosistein ve ADMA arasındaki metabolik ilişki (13)

2.5.1. Hiperhomosisteinemi ve Gebelik

Plazma homosistein konsantrasyonu gebelikte azalmaktadır (191). Homosistein konsantrasyonundaki bu azalmadan sorumlu mekanizma tam olarak bilinmemekle birlikte fetus tarafından metiyoninin artmış kullanımı olduğu düşünülmektedir (192). Son yıllarda in vivo olarak ratlarda yapılan çalışmalarda; östrojen ve kortizol tedavisinin homosistein konsantrasyonunda azalmaya neden olduğu görülmüştür (193). Bu hormonların gebelikte artması, homosistein konsantrasyonunda ki azalmayı açıklayabilir. Bu etkilerin dışında, plazma hacmindeki artış nedeniyle gelişen, fizyolojik gebelik hemodilüsyonu da homosistein seviyesindeki düşmeye neden olabilmektedir (194).

2.5.2. Hiperhomosisteinemi ve Etkileri

Mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber, homosisteinin çeşitli düzeylerde damar endotel disfonksiyonuna neden olduğu kabul edilmektedir (21).

Homosisteinin etkilerini oksidatif hasar yaratarak gösterdiğini ortaya koyan kanıtlar giderek artmaktadır. Homosistein, plazmada okside olurken reaktif oksijen ürünleri oluşmakta ve lipid peroksidasyonunu başlatmaktadır (195). Normal endotel hücreleri, homosisteinin toksik etkilerini ortadan kaldırmak için NO salgılar. NO' nun bu koruyucu etkisi, endotelin uzun dönemli hiperhomosisteinemiye maruz kalması sonucunda bozulur. Bu bozukluğun nedeni homosisteinin, lipid peroksidasyonuna yol açarak endotelyal NOS salınımını azaltmasıdır. NOS salınımının azalması da endotel hücrelerini, homosistein kökenli

oksidatif hasara maruz bırakır ve endotelial fonksiyon bozukluğu ortaya çıkar (196).

2.5.3. Hiperhomosisteinemi ve Nedenleri

Plazma homosistein düzeyi standardize edilememiş olmakla birlikte, normal değerler 5-15 $\mu\text{mol/L}$ olarak kabul edilmekte, 16 $\mu\text{mol/L}$ üzerindeki değerler hiperhomosisteinemi olarak değerlendirilmektedir (197). Homosisteinin yüksekliği; trombozis, inme, miyokard infarktüsü ve kronik renal yetersizlik için önemli bir risk faktörüdür (187,198,199).

Homosistein düzeylerini etkileyen çok sayıda faktör mevcuttur. Bunlar (21):

- 1) Metabolizmadaki genetik bozukluklar (sistationin beta sentaz eksikliği, MTHFR eksikliği, metiyonin sentaz eksikliği)
- 2) Kronik hastalıklar (kronik böbrek yetmezliği, akut lenfoblastik lösemi, DM)
- 3) Vitamin yetersizliği ve beslenme bozuklukları (Vit B12, folat, Vit B6)
- 4) Kişisel özellikler (ileri yaş, erkek cinsiyet, sigara kullanımı, fiziksel inaktivite, menapoz)
- 5) İlaçlar (metotreksat, fenitoin ve karbamazepin) olarak sıralanabilir.

2.5.4. Homosistein ve Preeklampsi ilişkisi

Preeklampsinin nedeni hala bilinmemesine rağmen endotelial hücre disfonksiyonu en temel özelliktir ve vasküler reaktivitede değişikliğe ve vasküler bütünlüğün kaybına neden olmaktadır. Plazma homosistein yüksekliğinde

endovasküler hücre hasarı meydana gelmektedir. Homosistein bu etkisini, iki şekilde oluşturabilmektedir. İlki, homosisteinin oksidasyonu ile oluşan serbest radikallerin damar endoteli üzerine toksik etkide bulunması, ikincisi ise homosisteinin pıhtılaşma mekanizması üzerine yaptığı bozucu etki nedeniyle normalde antitrombotik etkisi daha baskın olan damar endotelini daha trombotik hale getirmesi ve böylece damar içinde pıhtı oluşma eğilimini arttırması şeklindedir (200).

Hiperhomositeinemili hastalardaki endotel disfonksiyonu artmış oksidatif stresle açıklanmaktadır. Yapılan bir çalışmada, artmış oksidatif stres belirteci olan 8-izoprostoglandin $F_2\alpha'$ 'nın hiperhomosisteinemili kişilerde yüksek düzeylerde bulunduğu gösterilmiştir (201).

Preeklampitik kadınlarda homosistein düzeyinin normal gebelere göre daha yüksek olduğu birçok araştırmada kanıtlanmıştır (202,203). Erken gebelikte hafif ve ciddi preeklampsinin normotansif gebelerle karşılaştırıldığı bir çalışmada, artmış maternal serum homosistein seviyeleri hafif preeklampsisi gelişme riskini yaklaşık 4 kat, ciddi preeklampsisi gelişme riskini ise yaklaşık 3 kat arttırdığı ileri sürülmüştür (204,205).

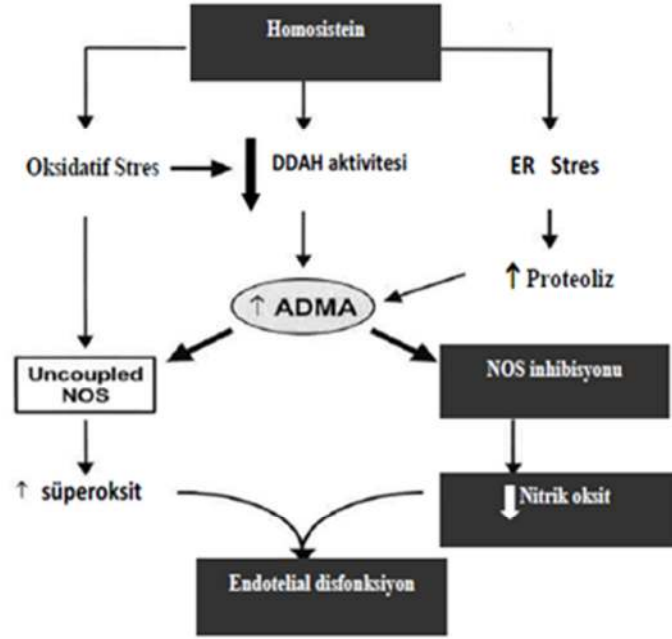
20 preeklampitik hasta ve 20 sağlıklı gebeyi içeren bir çalışmada ise, plazma homosistein düzeylerinin preeklampsinin şiddeti ile ilişkili olduğu belirtilmiş olup (72) hafif preeklampitiklerin kontrol grubuna göre ve

eklamptiklerin de ağır preeklampatik gruba göre homosistein düzeylerinin daha yüksek olduğu bulunmuştur (21).

Dekker ve ark. (206) ile Onalan ve ark. (207), serum homosistein düzeyinin preeklampsili hastalarda anlamlı derecede daha yüksek olduğunu ve homosisteinin preeklampsisi öngörüsünde kullanılabileceğini ifade etmişlerdir.

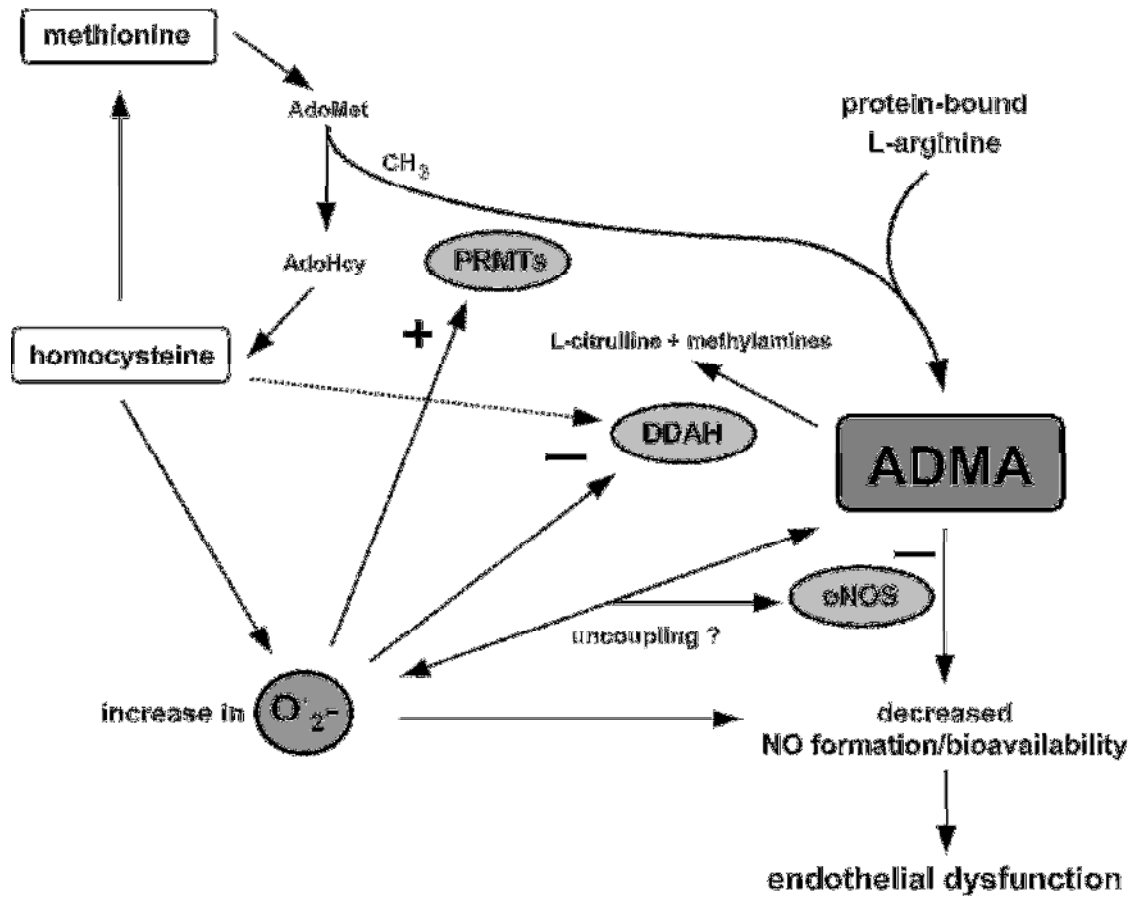
2.5.5. Homosistein, ADMA ve NO' nun birbirleriyle olan metabolik etkileşimleri

Son 15 yılda, insanlarda ve hayvanlarda yapılan birçok çalışma hiperhomosistineminin endotel fonksiyon bozukluğuna, ADMA seviyesini arttırarak ve NO biyoyararlanımını azaltarak yol açabileceğini göstermiştir. Hiperhomosistinemide azalmış NO biyoyararlanımına sebep olan muhtemel mekanizmalar; hücrel stres yollarının aktive olması ve eNOS' un ADMA tarafından inhibe edilmesidir. ADMA, hiperhomosisteinemide vasküler fonksiyon bozukluğuna yol açan ana mediyatördür hipotezi; homosistein ve ADMA arasındaki yakın metabolik bağ ve de birçok klinik çalışma ve hayvan deneyinde gözlemlenen plazma tHcy, plazma ADMA ve endotel fonksiyon bozukluğu arasındaki ilişkiyle desteklenmektedir (13,181,208,209).



Şekil 2.18. Homosistein, ADMA ve NO' nun endotel fonksiyon bozukluğundaki rolleri (208)

Homosisteinin, ADMA' yı sitriline metabolize eden DDAH enzimini inhibe ederek veya endoplazmik retikulum üzerindeki stresi ve apoptozu arttırarak (proteinlerin artmış proteolizi yoluyla) ADMA' yı yükseltebileceği belirtilmiştir. ADMA' nın endotel hücrelerinde birikimi ise, eNOS' u inhibe ederek NO' nun azalmış yapımına ve dolayısıyla endotel fonksiyon bozukluğuna yol açmaktadır. ADMA veya ONOO^- gibi oksidanların yol açtığı eNOS' un yapısındaki değişiklikler, süperoksit oluşumunu artırmakta ve NO' nun biyoyararlanımını daha da azaltmaktadır (15,209).



Şekil 2.19. L-arjinin, NO ve Homosistein yolağı arasındaki etkileşim (197)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum servisinde yatan hastalardan ve kontrol grubundan alınan serum numuneleri Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında çalışıldı. Çalışma için Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Yerel Etik Kurulundan bilimsel araştırma izni alındı.

Katılımcılardan, etik kurul tarafından kabul edilen, çalışmaya kendi rızalarıyla katıldıklarını gösteren onam formları kullanılarak imzaları alındı.

3.1. Çalışmaya Katılacak Grupların Belirlenmesi

Çalışma süresi boyunca preeklampsi tanısı alarak kadın doğum servisine yatırılan hastalar çalışmaya dahil edildi. Preeklampsi tanısı için Ulusal Yüksek Kan Basıncı Eğitim Programı Çalışma Grubu (2000) kriterleri esas alındı.

Preeklampsi tanısı:

En az 6 saat arayla yapılan iki ölçümde, sistolik kan basıncının 140 mm/Hg ve üzerinde ve/veya diastolik kan basıncının 90 mm/Hg ve üzerinde olması,

24 saatlik idrarda 300 mg ve üzerinde proteinüri veya en az 6 saat aralıklarla alınan iki spot idrar örneğinde dipstik ile en az +1 ve üzeri proteinüri varlığı ile konulmuştur.

Kontrol grubuna, obstetrik anemnezinde, daha önceki ve şimdiki gebeliğinde önemli bir hastalığı (preeklampsi, İUGR, plasenta dekolmanı vb.) olmayan gebeler dahil edilmiştir

3.2. Hastaların Çalışmaya Alınmama Kriterleri

Kronik hastalığı (kronik hipertansiyon, DM, kollajen doku hastalığı, kronik böbrek yetmezliği vb.) olan, sigara-alkol kullanan, multivitamin (folik asit, vit B6, vit B12) takviye edilen, son zamanlarda geçirilmiş enfeksiyon kanıtı olan gebeler ve çoğul gebeler çalışma dışı bırakılmıştır.

Bu çalışma, 30 preeklampsik gebe ve gestasyonel diyabet taraması için 50 gr' lık glukoz yükleme testi yapılan ve test sonucu negatif çıkan 30 sağlıklı gebe olmak üzere toplam 60 gebe üzerinde yapılmıştır.

3.3. Kan Alma ve Serum Hazırlama

Bu çalışmada, preeklampsi tanısı ile tedavi altına alınan hastalardan ve kontrol grubundaki katılımcılardan biyokimya tüpüne alınan yaklaşık 7cc venöz kan kullanıldı. Tüpler 3800 rpm' de 5 dakika santrifüj edildikten sonra serumları ayrılarak ependorflara konup etiketlendi. Daha sonra tüm ölçümler için serum örnekleri -80 °C' de analiz zamanına kadar muhafaza edildi.

3.4. DENEYLER

3.4.1. Deneylerde kullanılan araçlar:

- ✓ Santrifüj (Sigma)
- ✓ Soğutmalı santrifüj (Rotanta)
- ✓ Vorteks (Reamix)
- ✓ Derin dondurucu (Sanyo)
- ✓ pH metre (Hanna)
- ✓ Hassas terazi (Precisa)
- ✓ Floresan dedektörlü yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC-Shimadzu)
- ✓ Spektrofotometre (Hitachi)
- ✓ Plate okuyucu (Biotek Elx800)

Araştırma laboratuvarında mevcut bulunan ve biyokimyasal tetkikler için gerekli olan diğer malzemeler kullanıldı.

3.4.2. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler

Trikloroasetik asit (TCA), hidroklorik asit (HCl), 2,4- dinitrofenilhidrazin (2,4-DNPH), etanol, etil asetat, guanidin HCl, potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), sodyum karbonat (Na_2CO_3), sodyum hidroksit (NaOH), sodyum-potasyum tartarat ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), bakır sülfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), folin ciocalteu' s, bovin serum albumin (BSA), vanadium klorür (VCl_3), sodyum nitrat (NaNO_3), N-(1-naftil) etilendiamin dihidroklorit (NEDD), sülfanilamid, çinko sülfat (ZnSO_4) kullanıldı.

3.4.3. Deneylerde Uygulanan Yöntemler

3.4.3.1. Protein Miktarının Tayini:

Serum protein tayini, Lowry (211) ve ark.'nın metoduna göre yapıldı. (Tablo15).

Reaktifler:

- ✓ A reaktifi: %2 Na₂CO₃ (0,1 M NaOH içerisinde çözündürülür.)
- ✓ B1 reaktifi: %2 Na-K tartarat
- ✓ B2 reaktifi: %1CuSO₄. 5H₂O
- ✓ Folin ciocalteu's Fenol: Distile su ile 1/1 oranında dilüe edildi.
- ✓ Standart: 1mg/ml bovin serum albumin (BSA)

Deneyin Yapılışı:

C Reaktifi; 33 kısım A reaktifi, 1 kısım B1 reaktifi ve 1 kısım B2 reaktifi olacak şekilde B1, B2, A sırasıyla karıştırılmak suretiyle elde edildi.

Tablo 3.1. Lowry deneyin yapılışı (211)

Tüpler	BSA	Numune	Distile su	C solüsyonu		Folin	
Kör	-	-	100 µl	2 ml	Tüpler vortekslenerek 20 dakika oda ısısında karanlıkta bekletilir.	Tüm tüplere	Tüpler vortekslenerek 1 saat oda ısısında karanlıkta bekletilir.
Standart	10 µl	-	90 µl	2 ml		200 µl	
Numune	-	10 µl	90 µl	2 ml		ilave edilir.	

Numuneler ve standartlar köre karşı 750 nm’ de spektrofotometrede okutuldu.

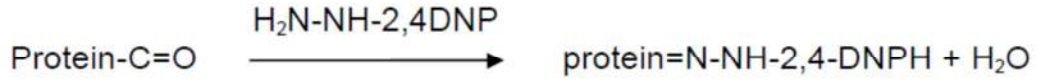
Hesaplama:

Protein miktarının hesaplanması için 0,1-1mg/ml arasındaki BSA standartları hazırlandı.

Protein miktarı = (AbsNumune/AbsStandart) × Standart konsantrasyonu (mg/ml)
olacak şekilde hesaplandı.

3.4.3.2. Serum Protein Karbonil Grubu Düzeylerinin Tayini

Protein karbonil grubu düzeyleri Reznick ve ark.’nın (212) karbonil gruplarının 2,4-dinitrofenilhidrazin ile reaksiyonu sonucu 2,4-dinitrofenilhidrazon oluşturması prensibine dayanarak spektrofotometrik olarak ölçüldü.



Reaktifler:

- ✓ %20 TCA
- ✓ 2M HCl
- ✓ 10mM 2,4 DNPH (2M HCl' de hazırlandı.)
- ✓ Etanol/Etil asetat (1/1)
- ✓ 6M Guanidin HCl (20mM KH₂PO₄ tamponunda hazırlandı ve HCl ile pH=2,3' e ayarlandı).

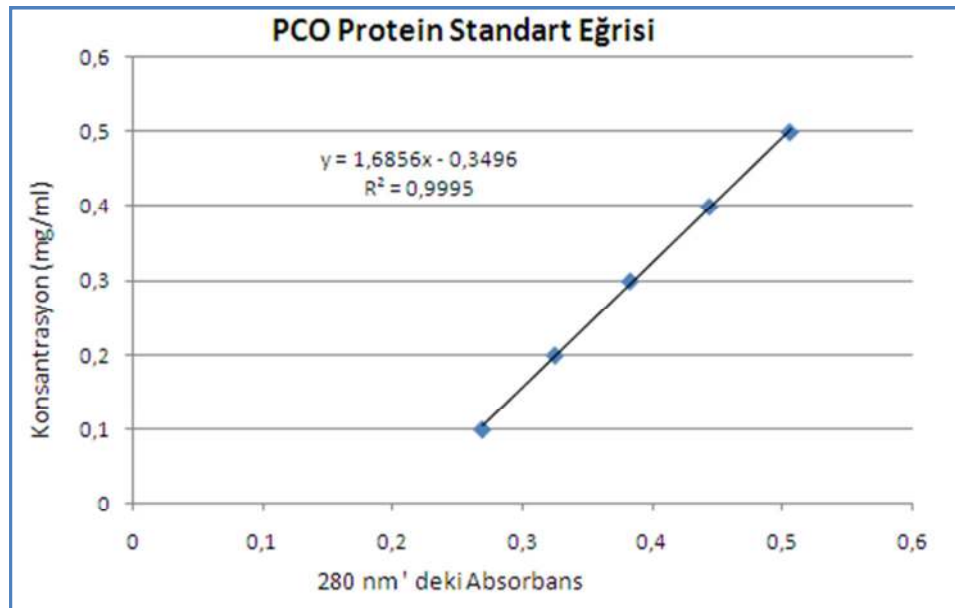
Deneyin Yapılışı:

Numunelerin, Lowry metoduna (211) göre protein değerleri belirlenerek 1mg/ml olacak şekilde dilüsyonlar hazırlandı. Analiz sırasında her bir numune için iki ayrı ependorf tüpü kullanıldı. Tüplerden birine 0,5ml numune ve 0,5ml 10mM DNPH; diğerine 0,5ml numune ve 0,5ml 2M HCl eklenerek, inkübasyon için 1 saat boyunca oda ısısında bekletildi ve her 5-10 dakikada bir iyice vortekslendi. Daha sonra her bir tüpe 0,5ml % 20' lik TCA ilave edildi. 3400xg' de 10 dakika oda ısısında santrifüj edilerek proteinler çöktürüldü. Elde edilen pelletler, üzerine 1,5ml 1/1 etanol/etil asetat eklendikten sonra 3400xg' de 10 dakika santrifüj edilerek 3 kez yıkandı. Bu aşamadan sonra pelletlerin üzerine 1,25ml guanidin HCl eklenerek çözünene kadar vortekslendi. Önce kör tüplerinin

280 nm' de absorbansları ölçüldü. Daha sonra numuneler 370 nm' de, her bir numunenin 2M HCl ilave edilerek hazırlanan ikinci tüpüne karşı okutuldu.

Hesaplama:

280 nm' deki protein miktarının hesabı: 6M guanidin HCl içinde hazırlanan 0,1- 0,5 mg/ml arasındaki BSA standartları ile elde edilen standart eğri kullanılarak yapıldı.



Grafik 3.1. 280 nm' deki BSA protein standart eğrisi

Protein karbonil düzeyinin hesaplanması:

Hesaplamalar sırasında 2,4-dinitrofenilhidrazin için 370 nm' de molar absorbsiyon katsayısı $\epsilon = 22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ alındı.

PCO konsantrasyonu: $\Delta A_{370}(\text{DNPH}_{370} - \text{HCl}_{370}) / 22,000/10^6 = \text{nmol/ml}$ olarak hesaplandı.

Sonuçlar protein miktarlarına bölünerek nmol/mg protein olarak ifade edildi.

Protein karbonil (nmol/mg protein)=Karbonil (nmol/ml)/Protein (mg/ml)

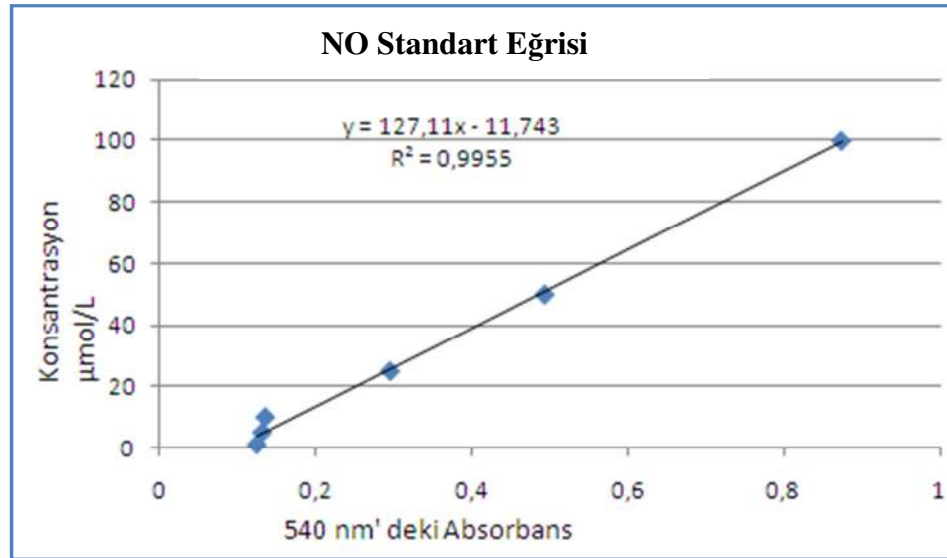
3.4.3.3. Serum NO Düzeylerinin Ölçümü

Serum NO seviyelerinin ölçümü; Miranda ve arkadaşlarının (213), vanadium (III) tarafından nitratın redüksiyonu ve asidik griess reaktifi (Sulfanilamid ve N- naftiletilendiamin-dihidroklorit) ile etkileşimi sonucu, renkli diazonyum ürününün oluşumu prensibine dayanmaktadır.

Reaktifler:

- ✓ 0,3M NaOH
- ✓ %10 ZnSO₄
- ✓ 1M HCl
- ✓ %5 HCl
- ✓ %0,8 V₂O₅ (1M HCl ile içinde hazırlandı.)
- ✓ %2 Sulfanilamid (%5' lik HCl içinde hazırlandı.)
- ✓ % 0,1 N-(1-naftil) etilendiamin dihidroklorit
- ✓ Sodyum nitrat standartı (10mM)
- ✓ 10mM' lik stok standart solüsyonundan 1, 5, 10, 25, 50 ve 100µmol' lük standartlar elde edildi.

Serum NO tayini için standart, kör ve numune tüpleri hazırlandı. 150µl olacak şekilde standart, kör (distile su) ve numuneler tüplere konuldu. Üzerlerine 150µl 0,3M NaOH eklendi ve 5 dakika oda ısısında inkübe edildi. Daha sonra 150µl %10' luk ZnSO₄ eklenerek vortekslendi ve 14000 rpm' de proteinleri çöktürmek için santrifüj edildi. Çalışmaya bu aşamadan sonra kolorometrik plate kullanılarak devam edildi. Elde edilen süpernatantlardan 100µl alınarak kuyucuklara yerleştirildi. Devamında sırasıyla 100µl %0,8 VaCl₃, 50µl %2 sülfanilamid ve 50µl NEDD konuldu ve 37 derecede 30 dakika inkübe edilerek 540 nm' de okutuldu.



Grafik 3.2. 540 nm' deki nitrat standart eğrisi

Serum NO hesabı için, sodyum nitrat standartlarından elde edilen standart grafik kullanıldı ve örnek sonuçları µmol/L' cinsinden ifade edildi.

3.4.3.4. Serum ADMA Düzeylerinin Ölçümü

ADMA ve SDMA düzeyleri, HPLC yöntemiyle floresans dedektör kullanılarak Erureka ADMA kiti ile belirlendi.

Tablo 3.2. ADMA kitinin bileşenleri

Reaktif A : conditioning (koşullanma) solüsyonu N° 1, 1X100 ml
Reaktif B : koşullanma solüsyonu N° 2, 1X100 ml
Reaktif C : koşullanma solüsyonu N° 3, 1X100 ml
Reaktif D : dilüsyon solüsyonu, 1x100 ml
Reaktif E : yıkama solüsyonu N° 1, 1X100 ml
Reaktif F : yıkama solüsyonu N° 2, 1X100 ml
Reaktif I : ayrıştırma solüsyonu 1X 100 ml
Reaktif J : başlama solüsyonu 1X 5 ml
Reaktif L :derivatization (türevlendirme) solüsyonu, 1 X 4,6 mg
Reaktif N : tampon solüsyonu N° 1, 1X 20 ml
Reaktif O : tampon solüsyonu N° 2, 1X 15 ml
Reaktif M : mobil faz, 8 X 500 ml
Reaktif P : ADMA için kimyasal standart kalibratör , 1 X 5 ml
Reaktif Q : SDMA için kimyasal standart kalibratör , 1 X 5 ml
Reaktif R : Arjinin için kimyasal standart kalibratör , 1 X 5 ml

Tablo 3.3. ADMA için HPLC sistemi parametreleri

Kolon	C18 10µm
Kolon boyutları	125mm x 4mm
Akış hızı	0,8ml/dk
Floresans dedektör	Eksitasyon 420 nm-Emisyon 483 nm
Voltaj	Orta
Çalışma zamanı	25 dakika
İnjesiyon hacmi	100µl
Basınç	Yaklaşık 120 bar

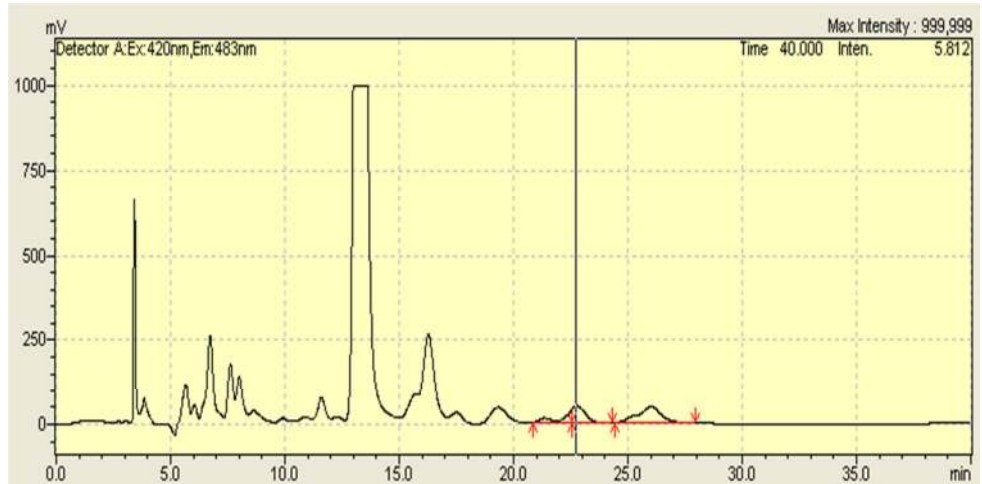
Deneyin Yapılışı:

Tablo 3.4. ADMA çalışma prosedürü

BASAMAK 1	Standart	Numuneler
Reaktif D - solüsyonu seyreltildi	1000 µl	1000 µl
Reaktif P - kimyasal standart solüsyonu seyreltildi	400 µl	/
Örnekler	/	400 µl
10 ml'lik plastik tüplere kimyasal standart kalibratör ve numuneler konur.		
BASAMAK 2	Kimyasal standart kalibratör ve örneklerden 1,4 ml önceden hazırlanmış temizleme kolonuna konur.	
BASAMAK 3	Temizleme kolonlarına 1,0 ml reaktif E - yıkama solüsyonu N ⁰ 1 konur, sıvı süzülerek boşalır. 1,0 ml reaktif F - yıkama solüsyonu N ⁰ 2 konur, sıvı süzülerek boşalır ve kurulanır.	
BASAMAK 4	Temizleme kolonlarına 1,0 ml Reaktif I - derişimi azaltma solüsyonu eklenir.	
BASAMAK 5 (Türevlendirme prosedürü)	200 µl eluate (purifikasyon basamağından) 200 µl reaktif N - tampon solüsyonu 150 µl reaktif O - tampon solüsyonu 30 µl reaktif J - başlama solüsyonu 30 µl reaktif L - türevlendirme solüsyonu (rekonstitüsyondan sonra) 1,5 ml'lik tüplere pipetlenir ve vortekslenir.	
BASAMAK 6	30 dakika 20 °C de inkübasyon	
BASAMAK 7	150 µl HPLC grade dH ₂ O eklenir ve 5 saniye vortekslenir. Basamak 5'te hazırlanan solüsyondan 100 µl sisteme enjekte edilir. Bu basamaktan sonra örnekler 2-8 °C'de 24 saat bekleyebilir.	

Bu işlemlerden sonra, önce bilgisayar açıldı. Sonra sırasıyla HPLC cihazının güç düğmesi, sistemindeki pompa, otosampler, kolon fırını, dedektör ve daha sonra da sistem kontrolör (SCL) güç düğmesi açıldı. Bilgisayarla bağlantı kuruldu ve ADMA metodu seçilerek program çalıştırıldı. Hasta listesi hazırlandı. Numune çalışmaya başlanmadan önce sistem % 20' lik metanol ile 15-20 dakika yıkandı. Daha sonra pompa durdurularak ADMA mobil fazı verildi ve sistem mobil fazla dolunca, ADMA kolonu takılarak 0,8ml/dk' lık akış hızında 15-20 dakika mobil faz atığa atıldı. İnjesiyon hacmi 100µl olacak şekilde kalibratör, normal ve anormal kontroller çalışıldı. Daha sonra numuneler çalışılmaya başlandı. Çalışma bittikten sonra pompa durduruldu. Kolon çıkartıldı ve mobil faz yerine % 20' lik metanol takılıp sistem tekrar yıkanarak cihaz kapatıldı.

ADMA kolonu takılı iken çalışma esnasında çıkan ADMA pikinin öncesinde hazırlanan yöntemeye uygun olarak (uygun dilüsyon oranları ile) arjinin ve SDMA pikleri de gözlenebilmektedir.



Grafik 3.3. ADMA' ya ait kromatogramın görüntüsü

3.4.3.5. Serum Homosisteinin Düzeylerinin Ölçümü

Serum homosistein düzeyi, HPLC yöntemiyle floresans dedektör kullanılarak Immunochrom homosistein kiti ile belirlendi.

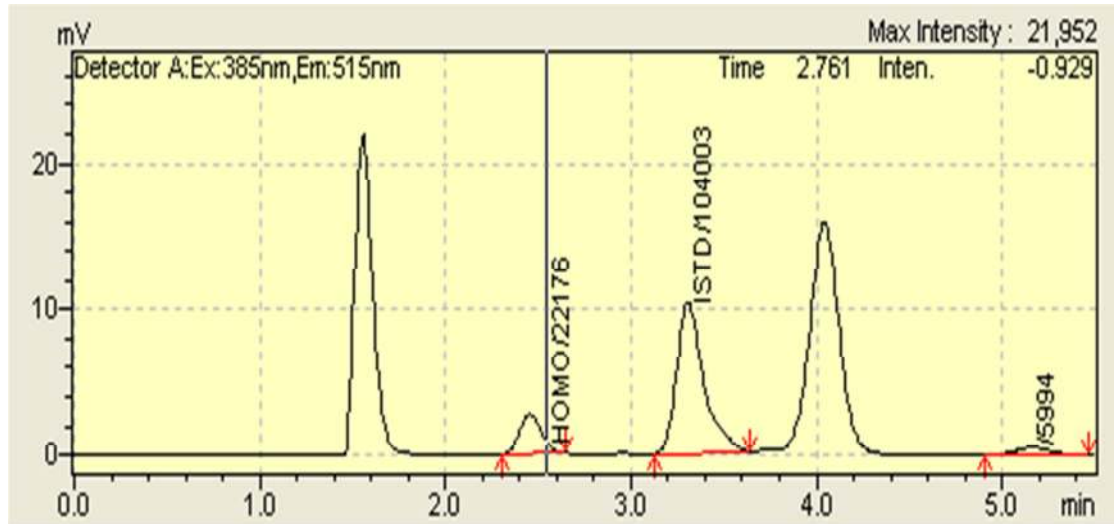
Tablo 3.5. Homosistein çalışma prosedürü

Numune, kalibratör veya kontrol	50 µl
İnternal standart	50 µl
Ayırma reaktifi	20 µl
Türevlendirme	100 µl Konularak 5-6 sn vortekslenir
10 dakika 60°C'de İnkübasyon için bekletilir. Sonra hemen buzdolabında soğutulur.	
Çökeltme	100 µl eklenerek 5-6 sn vortekslenir
2-8°C'de 5 dakika inkübasyon için beklenir. 5 dakika 10000g'de santrifüj yapılır	

Tablo 3.6. Homosistein için HPLC sistemi parametreleri

Kolon	C18 10µm
Kolon boyutları	125mm x 4mm
Akış hızı	1,0ml/dk
Floresans dedektör	Eksitasyon 385 nm-Emisyon 515 nm
Voltaj	Orta
Çalışma zamanı	5 dakika
İnjesiyon hacmi	20µl
Basınç	Yaklaşık 100 bar

Bu işlemlerden sonra, önce bilgisayar açıldı. Sonra sırasıyla HPLC cihazının güç düğmesi, sistemdeki pompa, otosampler, kolon fırını, dedektör ve daha sonra da sistem kontrolör (SCL) güç düğmeleri açıldı. Bilgisayarla bağlantı kuruldu ve homosistein metodu seçilerek program çalıştırıldı. Hasta listesi hazırlandı. Numuneler çalışmaya başlanmadan önce sistem % 20' lik metanol ile 15-20 dakika yıkandı. Daha sonra pompa durdurularak homosistein mobil fazı verildi ve sistem mobil fazla dolunca homosistein kolonu takılarak 1,0' ml/dk' lık akış hızında 15-20 dakika mobil faz atığa atıldı. İnjektasyon hacmi 20 µl olacak şekilde kalibratör, normal ve anormal kontroller çalışıldı. Bu işlemlerden sonra numuneler çalışılmaya başlandı. Çalışma bittikten sonra pompa durduruldu. Kolon çıkartıldı ve daha sonra mobil faz yerine % 20' lik metanol takılıp sistem tekrar yıkanarak cihaz kapatıldı.



Grafik 3.4. Homosisteine ait kromatogramın görüntüsü

4. BULGULAR

İstatistiksel hesaplamalar ve grafiklerin çiziminde istatistik paket programı SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, for windows 15.0) ile Microsoft Excel (for windows XP) programları kullanıldı. Değerlendirmede, gruplar arasındaki farklılığı tespit etmek için Mann-Whitney U testi ve parametreler arasındaki korelasyonu belirlemek için ise Spearman korelasyon analizi kullanıldı. $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

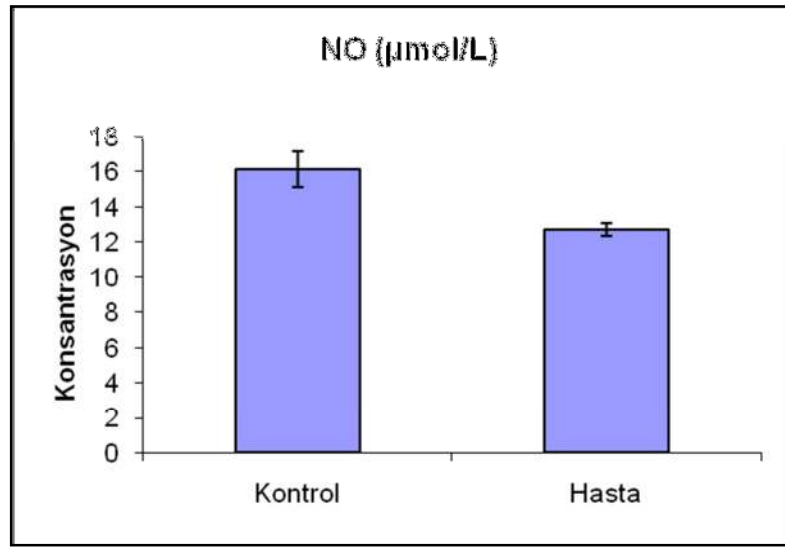
Çalışmadaki kontrol ve hasta gruplarına ait NO, ADMA, SDMA, protein karbonil ve homosistein düzeyleriyle ilişkili istatistiksel sonuçlar tablo 4.1.' de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Serum NO, ADMA, SDMA, Protein karbonil ve Homosistein düzeyleri (ortalama±standart hata)

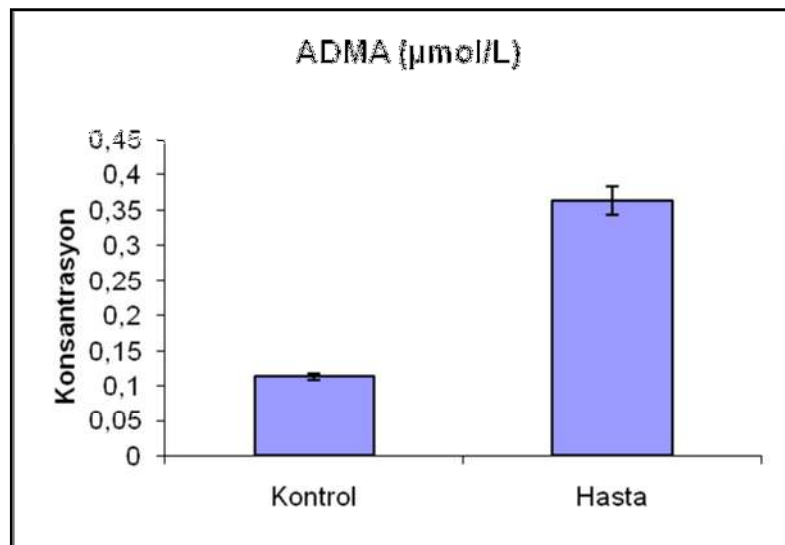
	Gruplar	
Biyokimyasal Parametreler	Kontrol	Hasta
NO ($\mu\text{mol/L}$)	16,1 $\pm$ 0,999	12,7 $\pm$ 0,363 ^a
ADMA ($\mu\text{mol/L}$)	0,11 $\pm$ 0,003	0,36 $\pm$ 0,020 ^a
SDMA ($\mu\text{mol/L}$)	0,15 $\pm$ 0,006	0,52 $\pm$ 0,003 ^a
Protein Karbonil (nmol/mg)	0,86 $\pm$ 0,047	1,25 $\pm$ 0,104 ^a
Homosistein ($\mu\text{mol/L}$)	6,14 $\pm$ 0,154	8,98 $\pm$ 0,413 ^a

a: $p<0,05$

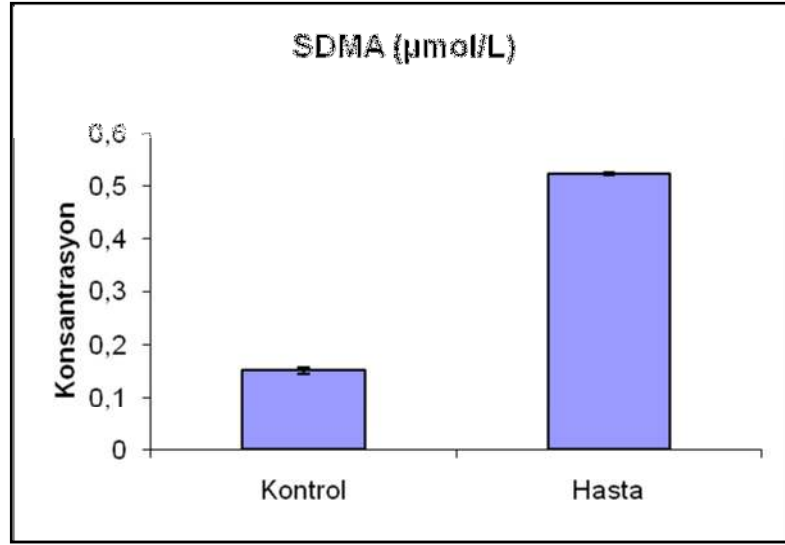
Serum NO, ADMA, SDMA, protein karbonil ve homosistein düzeylerinin gruplar arasındaki farkı (ortalama±standart hata) grafiksel olarak grafik 1,2,3,4,5' de gösterilmiştir.



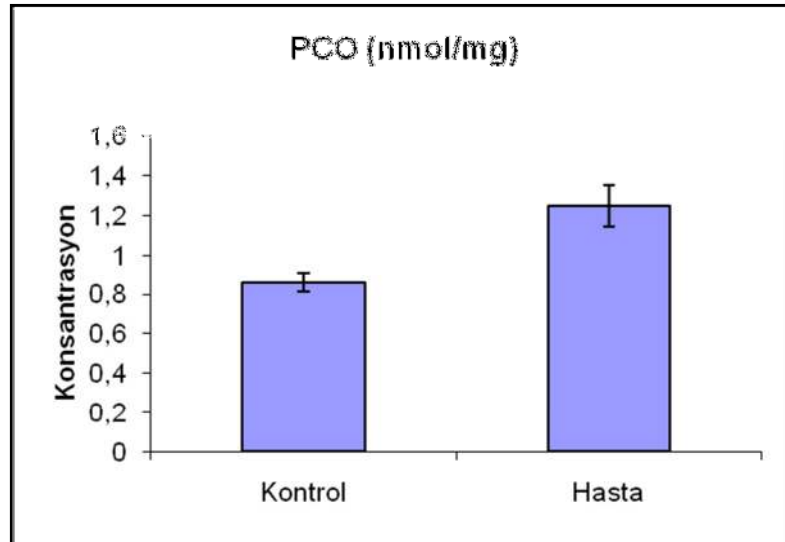
Grafik 4.1. Serum NO düzeylerinin gruplar arasındaki farkı (ortalama±standart hata)



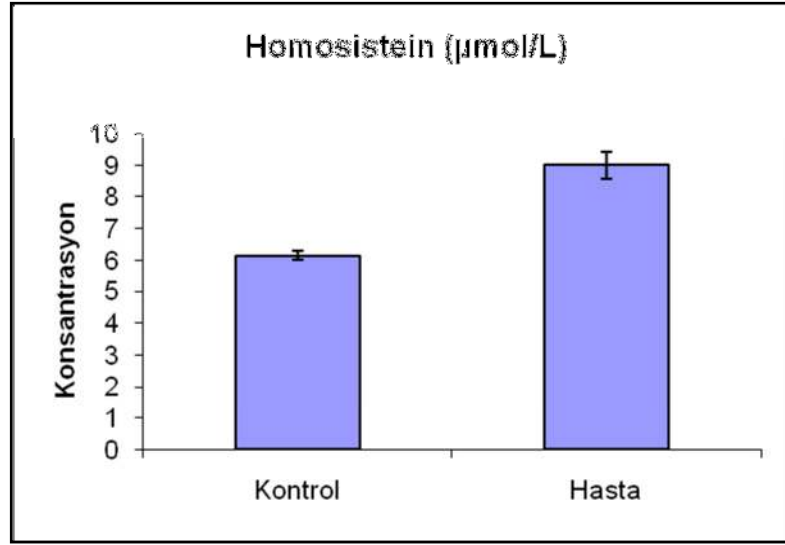
Grafik 4.2. Serum ADMA düzeylerinin gruplar arasındaki farkı (ortalama±standart hata)



Grafik 4.3. Serum SDMA düzeylerinin gruplar arasındaki farkı (ortalama $\pm$ standart hata)



Grafik 4.4. Serum Protein karbonil düzeylerinin gruplar arasındaki farkı (ortalama $\pm$ standart hata)



Grafik 4.5. Serum Homosistein düzeylerinin gruplar arasındaki farkı (ortalama±standart hata)

4.1. Spearman Korelasyon Analizi

Parametreler arasındaki korelasyonu incelemek amacıyla yapılan spearman korelasyon analizi tablo 4.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Spearman korelasyon analizi sonuçları

	NO	ADMA	SDMA	PCO	HOMOSİSTEİN
NO	---	r=-0,284 p=0,028*	r=-0,267 p=0,039*	r=-0,166 p=0,205	r=-0,236 p=0,069
ADMA	r=-0,284 p=0,028*	---	r=0,781 p=0,000**	r=0,317 p=0,013*	r=0,629 p=0,000**
SDMA	r=-0,267 p=0,039*	r=0,781 p=0,000**	---	r=0,269 p=0,038*	r=0,720 p=0,000**
PCO	r=-0,166 p=0,205	r=0,317 p=0,013*	r=0,269 p=0,038*	---	r=0,225 p=0,084
HOMOSİSTEİN	r=-0,236 p=0,069	r=0,629 p=0,000**	r=0,720 p=0,000**	r=0,225 p=0,084	---

**** güçlü korelasyon**

*** zayıf korelasyon**

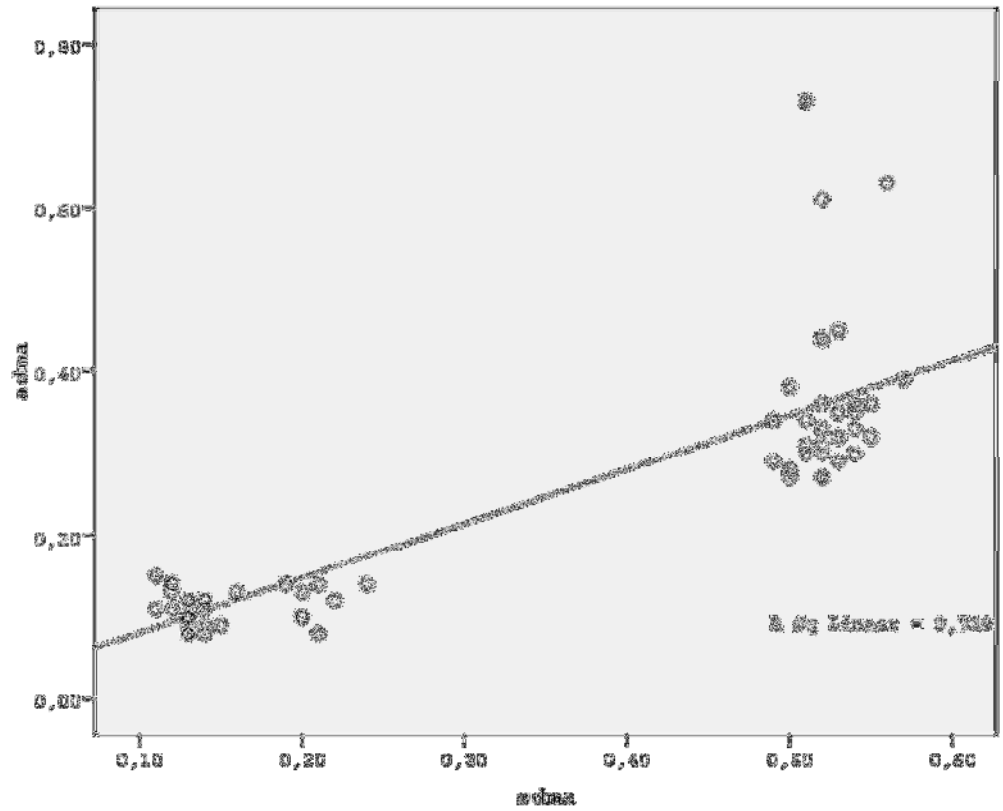
Spearman korelasyon analizi sonuçlarına göre :

Çalışmanın istatistiksel değerlendirmesi sonucunda serum NO ile ADMA düzeyleri ile arasında zayıf negatif korelasyon (**r = -0,284; p = 0,028***), NO ile

SDMA arasında zayıf negatif korelasyon ($r = -0,267$; $p = 0,039^*$), ADMA ile PCO arasında zayıf pozitif korelasyon ($r = 0,317$; $p = 0,013^*$), SDMA ile PCO arasında zayıf pozitif korelasyon ($r = 0,269$; $p = 0,038^*$) olduğu gözlenmiştir.

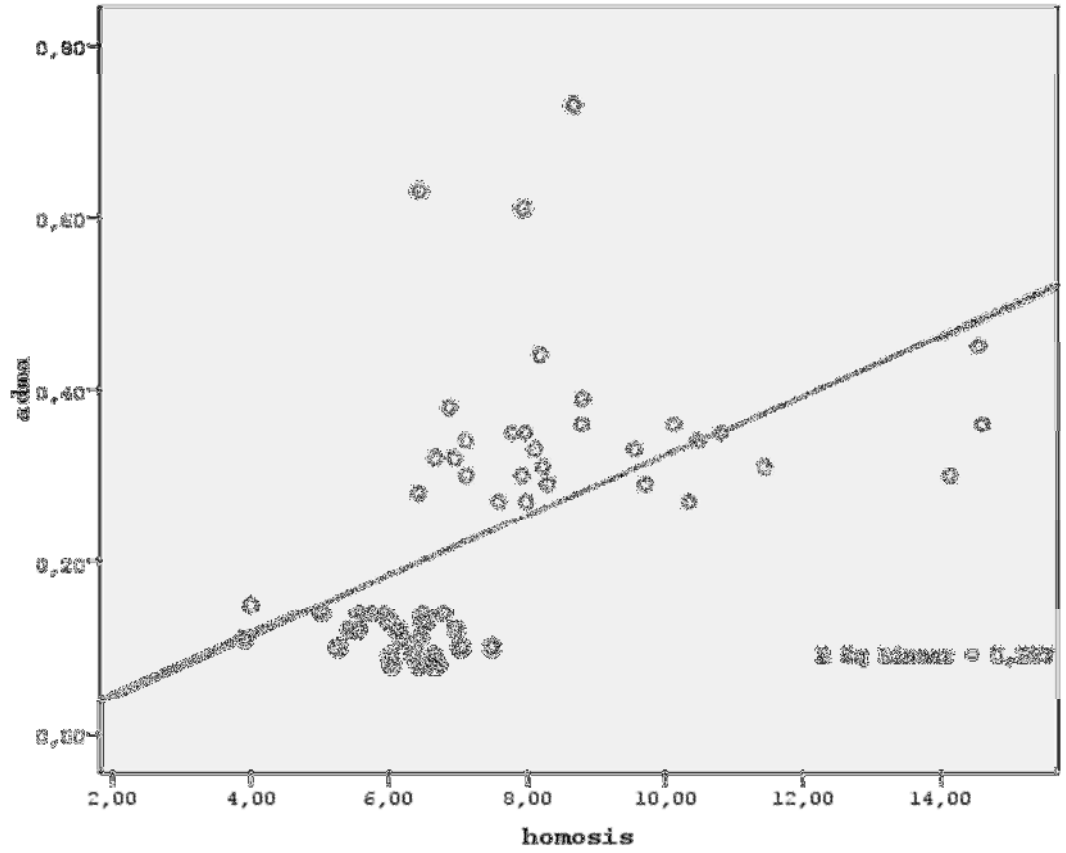
Çalışmamız dahilinde güçlü korele olan parametrelerin korelasyon grafikleri ise grafik 6,7,8' de gösterilmiştir.

Serum ADMA ile SDMA düzeyleri ile arasında güçlü pozitif korelasyon bulunmuştur. Serum ADMA düzeyi artarken SDMA düzeyleri de artmıştır ($r = 0,781$; $p = 0,000^{**}$)



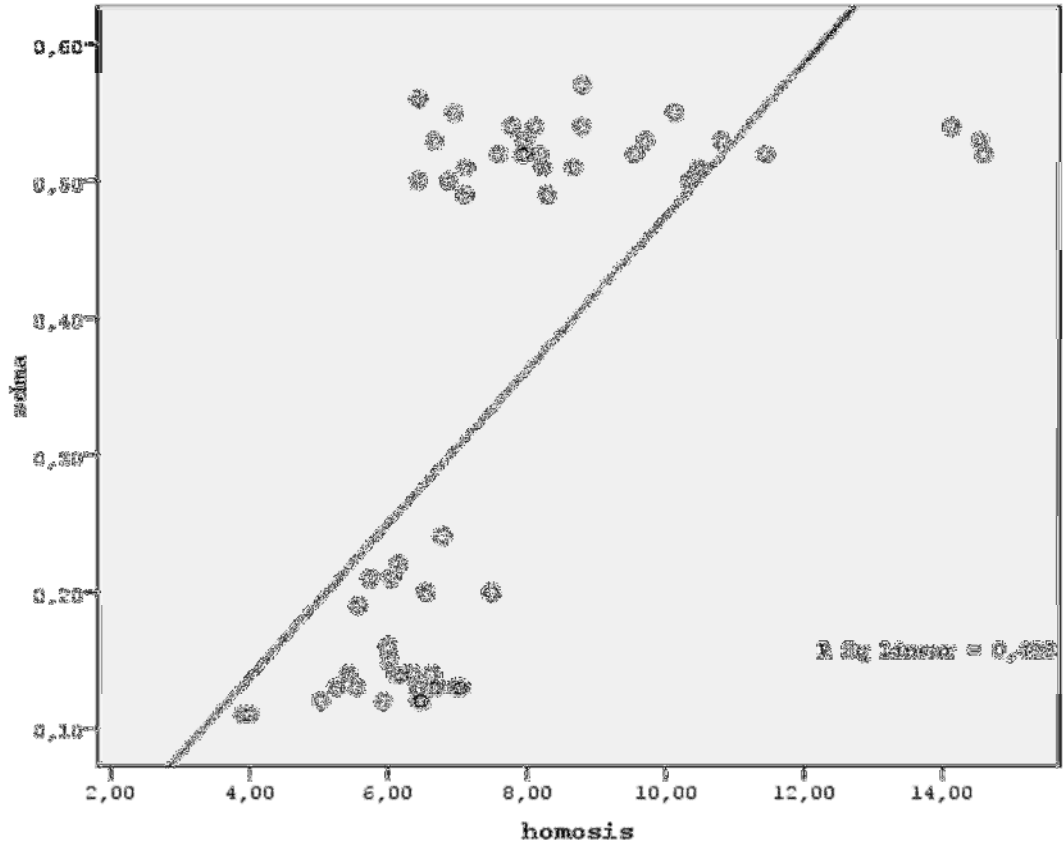
Grafik 4.6. Serum ADMA ile SDMA düzeyleri ile arasındaki güçlü pozitif korelasyon grafiği

Serum ADMA ile Homosistein düzeyleri ile arasında güçlü pozitif korelasyon bulunmuştur. Serum ADMA düzeyi artarken Homosistein düzeyleri de artmıştır ($r = 0,629$; $p = 0,000^{**}$).



Grafik 4.7. Serum ADMA ile Homosistein düzeyleri arasındaki güçlü pozitif korelasyon grafiği

Serum SDMA ile Homosistein düzeyleri ile arasında güçlü pozitif korelasyon bulunmuştur. Serum SDMA düzeyi artarken Homosistein düzeyleri de artmıştır ($r = 0,720$; $p = 0,000^{**}$).



Grafik 4.8. Serum SDMA ile Homosistein düzeyleri ile arasındaki güçlü pozitif korelasyon grafiği

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Gebelik artmış periferel vazodilatasyon ile önemli hemodinamik değışikliklerin muhafaza edildiğı fizyolojik bir durumdur (214). Gebelik sürecindeki hemodinamik adaptasyonları açıklamakta, vasküler endoteldeki NO üretiminin artışı ve NO' nun normal bir biyoaktiviteye sahip olması hayati mekanizmalar olarak düşünölmektedir (25). Anumba ve ark. yaptıkları bir çalışmada, normal gebelik sırasında periferel damarlarda NO aktivitesinin arttığını göstermişlerdir (215).

Preeklampsideki en karakteristik değışim ise generalize periferel vazokonstrüksiyon olup endotelyal NO üretimindeki bir değışimin preeklampsideki vazokonstrüksiyona neden olabileceğı ileri sürölmektedir (25).

Biz de yaptığımız çalışmada, preklampsinin gelişimiyle bağlantılı olduğı düşünölen L-arjinin-NO yolağındaki değışimleri incelemek için, NO ve kompetitif inhibitörü olan ADMA düzeylerini ve bu yolakla yakın ilişki içerisinde bulunan homosistein ve oksidatif stres belirteçlerinden biri olan protein karbonil düzeylerini ölçtük. Elde ettiğimiz bulgular; hastalık sürecinde, güçlü bir vazodilatatör olan NO düzeyinin azaldığını, endotelyal disfonksiyon belirtici olarak değerdendirilen ADMA ve homosisteinin konsantrasyonlarının ve ortamdaki oksidatif stres yükünün arttığını göstermekte olup, bu parametrelerin preeklampsinin gelişimiyle ilişkili olduğunu düşöndürmektedir.

Bizim sonuçlarımızı destekler şekilde Dongwei ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, preeklampitik (hem hafif hemde şiddetli) kadınlarda kontrol grubuna göre plazma homosistein ve ADMA düzeylerinin önemli derecede arttığı gözlenmişken, NO düzeyinin önemli derecede azaldığı saptanmıştır. Ayrıca şiddetli preeklampsili hastalarla, hafif preeklampsili hastalar arasındaki farklar da anlamlı bulunmuştur. Homosistein, ADMA ile önemli derecede pozitif korele iken her ikisinin de NO ile önemli derecede negatif korele olduğunu gözlemişlerdir. Araştırmacılara göre bu veriler, Homosistein, ADMA, NO' nun preeklampsisi etyolojisinde, en azından kısmi olarak sorumlu olabileceğini ve bunların hastalık derecesinin belirlenmesinde belirteç olarak kabul edilebileceğini düşündürmektedir (217).

Valeria ve ark. 58 sağlıklı kadın ve 45 preeklampitik hastayla yaptıkları çalışmada, tam kan ve plazma nitrit düzeylerini ölçmüşler ve preeklampitik hastalarda kontrol grubuna göre nitrit düzeylerini belirgin şekilde düşük olarak saptamışlardır (218).

Preeklampsideki oksidatif stres, NO' nun hızlı yıkılım nedeni olarak rapor edilmektedir (25). Ayrıca, endotelial hücre membranlarının oksidasyonu protein kaçığına neden olmakta ve ödem, proteinüri gibi preeklampsisi semptomlarını açıklayabilmektedir (216). Var ve ark. yaptıkları bir çalışmada, bizim bulgularımızla uyumlu olarak preeklampitik kadınlarda NO seviyelerini belirgin şekilde düşük olarak saptamışlar ve bunun nedenini preeklampside NO' nun peroksinitrit oluşturmak üzere süperoksit ile reaksiyona girerek yıkılması

olduğunu ifade etmişlerdir. Araştırmacılara göre artmış ROT' lar 2 şekilde preeklampsi gelişimini etkilemektedir. Birincisi, hücre hasarı ve ateroskleroz ile sonuçlanan hücre ve hücre membranları üzerine direkt etki, ikincisi ise NO' nun yıkımının artması ile damarlarda vazokonstriksiyon oluşumu ve plasental yatakta artmış iskemidir. Aynı çalışmada, homosistein düzeyinin kontrollere göre preeklampitik hastalarda belirgin şekilde yüksek olduğu saptanmış olup, yükselmiş homosisteinin seviyelerinin endotelial hasarı uyardığı ayrıca, oksijenin varlığında S- nitrozohomosistein oluşturmak üzere NO ile reaksiyona girdiği ve NO' nun biyoaktivitesini azalttığı gösterilmiştir (219).

İptisam ve ark. yaptıkları bir çalışmada sağlıklı kadınlarda ve preeklampitik hastalarda serum NO düzeyini ölçmüşler ve preeklampitik hastalarda kontrol grubuna göre NO düzeyini istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulmuşlardır ($p < 0,05$) (164).

Kim ve ark. ise yaptıkları bir çalışmada, L-arjinin seviyelerinin preeklampitik kadınlarda normal gebe kadınlara göre belirgin şekilde düşük olduğunu göstermişler ve azalmış arjinin seviyelerinin preeklampsi gelişimine katkıda bulunabileceği ifade etmişlerdir (220).

McCord ve ark. yaptıkları bir çalışmada mononükleer kan hücreleri içine arjinin alımını sağlayan y^+ taşıyıcı sistemi kodlayan CAT-2 gen mRNA ekspresyonunun, preeklampitik kadınlarda artışı ancak hücreye spesifik NO üretiminde normal gebelere ve gebe olmayan kadınlara göre preeklampitik grupta farklılık olmadığını saptamışlardır. Araştırmacılara göre, CAT-2 gen ekspresyonu

artmasına rağmen beraberinde NO üretiminin artmaması, göreceli bir arjinin eksikliği olduğunu ve bu durumun hücrelerde NOS enzimi üzerinden süperoksit ve peroksinitrit oluşumu yönünde bir eğilim oluşturarak preeklampsideki oksidatif ve nitrozatif strese katkıda bulunabildiğini düşündürmektedir (221).

Birkaç çalışmada, preeklampsideki endotelial disfonksiyonu incelemek için brakiyal arter reaktivite metodu kullanılmıştır. Yapılan bir vaka kontrol çalışmasında, öncesinde preeklampsi olan kadınlarda brakiyal arter reaktivitesinin bozulduğu bulunmuş ve bu durumun askorbik asit uygulanması ile düzetilebildiği bildirilmiştir. Yoshida ve ark. ise preeklamptik kadınlarda akım aracılı vazodilatasyonun, normal gebeliği olan kadınlardan belirgin derecede düşük olduğunu saptamışlardır (222).

Vanderlelie ve ark. ise sıçanlara L-nitroarjinin metil ester (L-NAME) vererek NOS inhibisyonu gerçekleştirmiş ve bunun hamile sıçanlardaki biyokimyasal ve fizyolojik değişiklikler üzerine olan etkisini araştırmışlardır. L-NAME grubunda protein ve lipid oksidasyon ürünleri ve enzim aktivitelerinde (SOD, GSH-Px ve tiyoredoksin redüktaz) bir değişiklik olmadığı bulunmuştur. Araştırmacılar L-NAME verilmesinin iyi bir preeklampsi modeli oluşturduğu, fakat oksidatif stres oluşturmadığı sonucuna ulaşmışlardır (223). Bu çalışmanın sebep sonuç ilişkileri yönünden bizim çalışmamızdan farklı yönleri vardır. Biz preeklampsinin, ADMA ile ilişkili olabileceğini belirterek hasta ve kontrol grubundaki gebelerin serum ADMA düzeylerini ölçtük ve bu düzeyleri artmış olarak bulduk. Bu araştırmacılar ise, başka bir ekzojen NOS inhibitörü olan L-

NAME kullanarak preeklampsi modeli oluşturmışlar ve bu durumdaki oksidatif stres parametrelerini araştırmışlardır. Mevcut bulgularla, ADMA' nın da deneysel preeklampsi modeli için bir araç olabileceği öngörüsü ileri sürülebilir.

Birçok hastalık tablosunda aktive edilmiş nötrofillerdeki ROT üretiminin önemli düzeyde endotelyal hücre hasarıyla sonuçlandığı gösterilmiştir. Preeklampside, nötrofil kaynaklı ROT' un endotelyal hücre disfonksiyonu üzerindeki rolünü araştırmak üzere gebe olmayan, normal gebe ve preeklampitik kadınlarda yapılan bir çalışmada, aktive nötrofillerden süperoksit salınımının preeklampsi de diğer 2 gruba kıyasla belirgin derecede arttığı, nötrofillerden nitrit salınımının normal gebelerle karşılaştırıldığında azaldığı ve nötrofil aracılı endotelyal hücre hasarının preeklampsili kadınlarda diğer 2 gruba kıyasla daha fazla olduğu saptanmıştır (224).

Preeklampside en çok araştırılan konulardan birisi de, NOS enziminin polimorfizmidir. Norma ve ark. endotelyal NOS gen polimorfizminin preeklampsi için bir risk oluşturup oluşturmadığını inceledikleri bir çalışmada, 298. kodundaki glutamatın yerine aspartatın geçtiği Glu298Asp polimorfizmi için homozigot Asp298 aleline sahip olan kadınların daha yüksek preeklampsi geliştirme riskine sahip olduklarını belirtmişlerdir (225). Christina ve ark. tarafından yapılan benzer bir çalışmada ise, endotelyal NOS' un Asp298 varyantının, NOS' u artmış proteolitik yıkıma duyarlı hale getirdiği ve düşük NO üretimine katkıda bulunabildiği belirtilmiştir. Araştırmacılar son zamanlarda, preeklampsi gibi düşük kardeş rekürrensine sahip olan kompleks hastalıkların, hastalığın insidansı

üzerine yüksek etkiye sahip birkaç aday genden ziyade düşük ve orta etkili birkaç gen etkisiyle geliştiğini düşünmekte ve bu durumun genetik duyarlılığı açıklamak için daha muhtemel bir model oluşturduğunu vurgulamaktadırlar (226).

Rat türleri arasındaki genetik çeşitliliğe benzer şekilde insan popülasyonundaki çeşitlilik, NO konsantrasyonlarındaki farklılıklardan sorumlu tutulabilir. Bazı hastalarda işlevsel bir NO yolağı ile kompanzasyon sağlanırken NO sisteminde genetik bir disfonksiyonun varlığında ise NO salınımı değiştirilemeyecek hatta azalacaktır (227).

Literatürdeki çalışmaların büyük bölümüne ve bizim sonuçlarımıza zıt olarak Shaamash ve ark.'nın 31 preeklampatik hasta ile 32 sağlıklı gebeyi karşılaştırdıkları çalışmalarında, maternal ve fetal serum NO seviyelerinin preeklampatik ve eklampatik grupta normal gebelerden daha yüksek olduğu ve bu durumun, maternal ve fetal dolaşımında koruyucu bir rol üstleniyor olabileceği savunulmuştur (164).

Normal gebelik ve preeklampsi bir hastalık süreci ve bir sistemin kıyaslanması olarak değerlendirildiğinde, tablo en düşük serbest enerji noktasından (gebe olmayan) diğer sabit duruma (normal gebelik) ve olası istikrarsızlığın olduğu aşık preeklampsiye kadar değişmektedir. Bu modelin ışığında NO yolağı, istikrarsızlığa yol açan herhangi bir yeni durumu kompanse etmek için ve biyolojik sistemleri adapte etmek için çalışan olası bir tampondur. Bu değişim için NO'ya ne kadar ve hangi yönde ihtiyaç duyulduğu organizmanın genetik predispozisyonu kadar diğer vazoaktif mediatörlerin durumuna da bağlıdır

(227). Böylece vasküler tonusun modülasyonunda farklı yollar arasında bir sinerjizm söz konusu olabilmektedir (214) Bu durum, belkide bugüne kadarki preeklampitik kadınların kan ve idrarındaki metabolitlere dair değişik çalışmalar arasındaki tutarsızlıkları açıklayabilmektedir (227).

Chamy ve ark.'nın 44 preeklampsili (19' u hafif ve 25 şiddetli) ve 30 normal gebe kadında yaptıkları bir çalışmada, normal gebe kadınlara kıyasla her iki preeklampitik grupta antioksidan enzim aktivitesinin (SOD, GPx ve total antioksidan kapasite) belirgin şekilde azaldığı lipid peroksidasyonunun (MDA) ise belirgin şekilde arttığı görülmüştür. Ayrıca tüm biyokimyasal belirteçler için hafif ve şiddetli preeklampitik gruplar arasında istatistiksel olarak belirgin farklılıklar saptanmıştır. Bu sonuçlar ışığında araştırmacılar bu patolojinin klinik şiddeti ile oksidatif stresin derecesi arasında yakın bir ilişki olduğunu vurgulamışlardır (228).

Zusterzeel ve ark. yaptıkları bir çalışmada, bizim sonuçlarımıza paralel olarak preeklampitik kadınlarda ortalama protein karbonil seviyelerini, gebe ve gebe olmayanlara göre belirgin derecede yüksek olarak bulmuşlardır. Sağlıklı gebeler ve gebe olmayanlar karşılaştırıldığında ise düzeyler yine anlamlı oranda yüksek olarak saptanmıştır. Araştırmacılar, komplike olmayan gebeliklerde ROT ve lipid peroksidasyon ürünlerinin arttığını ancak bu durumun artmış antioksidan aktivite ile dengelendiğini belirtmişlerdir. Preeklampside ise belli antioksidan sistemlerin mevcudiyetine rağmen değişmiş oksidatif stresin bir ürünü olarak ROT ve lipid peroksidasyon metabolitleri yüksek seviyelerde bulunmakta; hücre

memran hasarı ve diğer hücrel hasarlara neden olarak endotelial disfonksiyona yol açmaktadır (147).

Serdar ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada, bir lipid peroksidasyon ürünü olan MDA ve protein oksidasyonunun tahmininde kullanılan protein karbonilleri, hafif ve şiddetli preeklampatik grupta kontrol grubuna göre belirgin derecede yüksek bulmuşlardır. Aynı zamanda bahsedilen parametrelerin, şiddetli preeklampside hafif preeklampsie göre anlamlı derecede yüksek olduğu da bulunmuştur. Antioksidan sistemi değerlendirmek için bakılan vitamin E/total kolesterol ve total karotenoid/ total kolesterol oranları ise preeklampatik grupta belirgin şekilde düşük olarak bulunmuştur (146).

Birkaç çalışma, preeklampsinin normal gebeliklerle kıyaslandığında, dolaşımdaki artmış peroksitlerle ilişkili olduğunu ileri sürmektedir. Buna rağmen preeklampside dolaşımdaki antioksidan aktivitenin değişip değişmediği tartışmalı gibi gözükmemektedir. Bir çalışmada preeklampatik kadınlarda serum antioksidan aktivitenin azaldığı bulunmuşken diğerlerinde ise orta şiddetli preeklampsinin aksine sadece şiddetli preeklampside askorbik asit, vit E ve β -karoten düzeyleri azalmış olarak bulunmuştur. Rumbold ve ark.'nın gerçekleştirdiği 6082 katılımcının bulunduğu 7 çalışmayı kapsayan sistematik bir derlemede, gebelik sırasında herhangi bir antioksidan verilmesinin kontrol yada plasebo grubuna kıyasla preeklampsie gelişme veya gebelik yaşına göre küçük infantla sahip olma riskini azalttığı bulunmuştur (25). Loverro ve arkadaşları ise, preeklampatik

hastaları normal kontrollerle kıyaslandığında dolaşımdaki antioksidan enzim aktivitesinde bir farklılık bulamamışlardır (227).

Preklampsi için birkaç nedensel faktör önerilmesine rağmen bu hususta bir görüş birliği sağlanamamıştır. Bu konuda geçerli olabilecek mekanizmalardan biriside, NOS' un endojen inhibitörlerinin konsantrasyonlarında artış olabileceğidir. Yapılan bir çalışmada bizim bulgularımıza benzer şekilde preeklampitik hastalarda normotansif kadınlara kıyasla endojen NO inhibitörü ADMA' nın dolaşımdaki konsantrasyonu yüksek bulunmuştur. Ek olarak normotansif gebelerde gebe olmayanlara göre serum ADMA konsantrasyonunun önemli derecede düşük olduğu gösterilmiştir (3).

SDMA, ADMA' nın inaktif yapısal bir izomeridir ve ADMA' nın aksine NOS inhibisyonu yapmaz. L-arjinin, ADMA ve SDMA hücre içine giriş için ortak yolları kullanırlar. Yüksek plazma SDMA konsantrasyonu, L-arjininin ile yarışarak dolaylı olarak NO üretimini azaltabilir (229). Ueda ve ark.' nın yaptıkları bir çalışmada, SDMA' nın NOS üzerinde inhibitör etkisinin olmadığı fakat arjinin ve ADMA' nın hücreye giriş yolunu etkileyerek NO üretim hızına dolaylı yoldan etki ettiği ifade edilmektedir (230). Bizim çalışmamızda da SDMA düzeylerinde hasta grubunda kontrol grubuna oranla anlamlı derecede yükselme gözlenmiştir ($p<0,05$). Ayrıca SDMA ile ADMA ve homosisteinin güçlü pozitif korelasyon gösterdiği de saptanmıştır. Preeklampitik grupta saptadığımız düşük NO düzeyinin nedenlerinden biriside, artmış SDMA nedeniyle L-arjinin' in hücre içine alınımındaki azalma olabilir.

Yapılan bir çalışmada ADMA düzeyi, preeklampsili gebeliklerden elde edilen kord kanında sağlıklı gebelere göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Diğer amino asitler olan sitrülün ve arjinin düzeylerinde ise anlamlı bir değişiklik tespit edilememiştir (3).

Oksidan/antioksidan sistemle ADMA arasındaki yakın ilişkiyi gösteren çalışmaların sayısı giderek artmaktadır. Oksidatif stresin ADMA' nın hem yapımındaki hem de yıkımındaki enzim aktivitelerini değiştirerek etki ettiğine dair kanıtlar vardır. Bizim çalışmamızda bulduğumuz sonuçlara göre yüksek PCO düzeyleri ortamdaki oksidatif stres yükünün arttığını göstermektedir. Bu da DDAH aktivitesini azaltarak ya da PRMT1 enzim aktivitesini arttırarak ADMA düzeylerinde artışa yol açmış olabilir.

Böger ve ark. metiyonin vererek akut hiperhomosisteinemiği indüklemişler ve sağlıklı bireylerde ADMA seviyelerinin arttığını, brakial arterin akım aracılı vazodilatasyonunun bozulduğunu gözlemlemişlerdir. Homosistein ve ADMA metabolizması arasında 2 olası bağlantı vardır. Birincisi, metilasyon ile ilişkilidir (SAM; homosistein metabolizmasındaki bir ara üründür.) ve ADMA sentezi metilasyonla oluşur. İkincisi, homosisteinin kendisi ADMA' nın yıkımıyla belirgin olarak ilişkili olan DDAH aktivitesini inhibe edebilmektedir (231). Biz de kendi çalışmamızda, ADMA ile homosisteinin arasında güçlü pozitif bir korelasyon olduğunu saptadık.

ADMA ve homosistein ilişkisinin araştırıldığı bir derlemede, hiperhomosisteineminin uyardığı endotelial disfonksiyonun altında yatan esas

fonksiyonel bozukluğun, endotel kaynaklı NO biyoyararlanımının azalmasıyla ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Hiperhomosisteinemi sırasındaki endotel disfonksiyonu için bir mekanizma da, NO' nun oksidatif inaktivasyonu (süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali ile) olabilmektedir.

Artmış SAM bağımlı protein metilasyonu hem ADMA' nın artmış üretimi hem de artmış homosistein oluşumuyla sonuçlanabilmektedir. Yüksek metiyoninli bir diyet intraselüler SAM seviyelerini artırabilmekte ve böylece SAM bağımlı PMRT aktivitesini artırarak ADMA üretimini yükseltebilmektedir. Bu hipotezi metiyoninden zengin, folik asitten fakir hiperhomosisteinematik bir diyet ile beslenen maymunlarda ADMA' nın yükselmiş plazma seviyeleri desteklemektedir. Bu diyetle hem homosistein hem de ADMA düzeylerinde yaklaşık 3 katlık bir artış gözlenmiştir. Hiperhomosisteinemide ADMA yüksekliğinin diğer olası mekanizması ise azalmış renal atılım ve azalmış DDAH aktivitesini içermektedir. Enzimin aktif sistein bölgeleriyle oksidatif etkileşim sonucu homosisteinin, DDAH aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, hiperhomosisteinematik farelerde DDAH-1 ve DDAH-2 enzimlerinin mRNA seviyeleri azalmış olarak bulunmuştur. Bu durum, homosisteinin DDAH aktivitesi kadar DDAH ekspresyonunu da regüle edebildiğini düşündürmektedir. Araştırmacılara göre bu gözlemler, hiperhomosisteinemideki vasküler disfonksiyon için yükselmiş ADMA düzeyinin birleştirici bir mekanizma olabileceğini düşündürmektedir (194).

Preeklampsinin gelişiminde en çok üzerinde durulan mekanizmalardan birisi de hiperhomosisteineminin hastalığın gelişimine olası katkısıdır.

Lopez-Quesada ve ark, 32 preeklampitik ve 64 sağlıklı kontrol grubunu içeren çalışmalarında, 3. trimester homosistein düzeylerini ölçmüşler ve preeklampitik grupta homosistein düzeylerini anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır (232).

Rajkovich ve ark, Kumru ve ark ile Gürbüz ve ark' nın homosistein düzeylerini değerlendirdikleri çalışmalarda, preeklampitik gebelerde homosistein düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır (233).

Middeldorp ve ark. ise, preeklampsıyla homosistein konsantrasyonunun ilişkisiz olduğunu hatta hiperhomosisteineminin preeklampsı riskini azalttığını iddia etmişlerdir (234). Bu çalışma bizim ve literatürdeki birçok çalışmanın aksine sonuç vermiştir.

Yapılan bir çalışmada, gebeliğinin ilk üç ayında folat desteği almamış kadınlarda serum homosistein seviyeleri, folat desteği almış kadınlara göre anlamlı derecede yüksek saptanmıştır. Araştırmacılara göre bu bulgu, gebeliğin ilk üç ayında folat desteği verilmesinin, hem homosistein düzeylerinin düşürülmesi hem de buna bağlı olarak ortaya çıkabilecek komplikasyonların önlenmesi açısından yararlı olabileceğini desteklemektedir (235).

Leeda ve ark., preeklampsı öyküsü olan 207 hastanın 35' inde hiperhomosisteinemi saptamışlar ve bu hastalara folik asit ve vit B12 takviyesi

yaptıktan sonra metiyonin yükleme testinde düzelme olduğunu göstermişlerdir. Bu hastalardan 14' ü tekrar gebe kaldığında, bu gebelerin yarısında tekrar preeklampsi geliştiği fakat sonuçlarının, bir önceki hastalığına göre daha iyi olduğu gösterilmiştir. Kanada' da yapılan retrospektif bir çalışmada ise, mevcut çalışma sonuçlarından farklı olarak folik asitle güçlendirilmiş bir diyetle beslenmenin preeklampsi insidansını düşürmediği gösterilmiştir (236).

Birbiriyle çelişen bu çalışma sonuçlarının, çalışmalara dahil edilme kriterleri arasındaki farklılıklardan sonuçların değerlendirilmesindeki farklılıklara kadar pek çok değişken tarafından etkilenebilmesi muhtemeldir. Yinede literatürdeki çalışmaların birçoğu sonuçlarımızı destekler nitelikte olup bu parametrelerin preeklampside tanısal ve prognostik değere sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Preeklampside klinik bulgular, 3. trimesterde ortaya çıkmasına rağmen patofizyolojik bozukluklar daha erken dönemlerde gelişmektedir. Dolayısıyla bu parametrelerin klinik kullanıma girmesinin, erken tanı ve girişimlere olanak sağlayarak preeklampsi gibi yüksek morbidite ve mortaliteye sahip bir hastalık tablosuyla baş etmede yardımcı olabileceğini düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

- 1- Cunningham FG, Mac Donald PC, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap LJ, Hanks GDV. *Williams Obstetrics*. 21nd ed. Connecticut: the McGraw-Hill, 2001; 567-609.
- 2- Dekker G, Sibai B. Primary, secondary, and tertiary prevention of preeclampsia. *Lancet* 2001; 357(9251): 209-15.
- 3- Alaçam H. *Preeklampside asimetric dimetilarjinin (ADMA) ve oksidan/antioksidan sistemin rolü. Uzmanlık Tezi. Ankara: Hacettepe Üniversitesi, 2008.*
- 4- Bernardi F, Guolo F, Bortolin T, Petronilho F, Dal-Pizzol F. Oxidative stress and inflammatory markers in normal pregnancy and preeclampsia. *J. Obstet. Gynaecol. Res* 2008; 34(6): 948–951.
- 5- Vanderlelie J, Venardosa K, Clifton VL, Gudec NM, Clarke FM, Perkins AV, *Increased biological oxidation and reduced anti-oxidant enzyme activity in pre-eclamptic placentae. Placenta* 2005; 26: 53-58.
- 6- Endemann DH, Schiffrin E. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1983-92.
- 7- Tran CT, Leiper JM, Vallance P. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler Suppl* 2003; 4(4): 33-40.

- 8- Böger RH. *The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. Cardiovasc Res* 2003; 59(4): 824-33.
- 9- Erdoğan F. *Metabolik sendromda endotel disfonksiyonu ve ateroskleroz riski arasındaki ilişkinin oksidatif stres ve nitrik oksit metabolizması üzerinden değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi. Ankara: Fatih Üniversitesi, 2007.*
- 10- Mao D, Che J, Li K, Han S, Yue Q, Zhu L, et al. *Association of homocysteine, asymmetric dimethylarginine, and nitric oxide with preeclampsia. Arch Gynecol Obstet* 2009; doi: 10. 1007/s00404-009-1234-6.
- 11- Wang D, Strandgaard S, Iversen JS, Wilcox CS. *Asymmetric dimethylarginine, oxidative stress and vascular nitric oxide synthase in essential hypertension. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 295: 1152-56.
- 12- Böger RH, Schwedhelm E, Maas R, Quispe-Bravo S, Skamira C. *ADMA and oxidative stress may relate to the progression of renal disease: rationale and design of the VIVALDI study. Vasc Med* 2005; 10: 97-102.
- 13- Böger RH. *Asymmetric dimethylarginine (ADMA): A novel risk marker in cardiovascular medicine and beyond. Annals of medicine* 2006; 38: 126-136.
- 14- Paiva H, Laakso J, Ruukonen I, Luomala M, et al. *Plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA), nitrate and the indices of low-density lipoprotein oxidation. Clin Chim Acta* 2006; 371: 97-101.

- 15- Lentz AR, Rodionov RN, Dayal S. Hyperhomocysteinemia, endothelial dysfunction, and cardiovascular risk: the potential role of ADMA. *Atheroscler Suppl* 2003; 4: 61-65.
- 16- Ray JG, Laskin CA. Folic acid and homocyst(e)ine metabolic defects and the risk of placental abruption, pre-eclampsia and spontaneous pregnancy loss: A systematic review. *Placenta* 1999; 20: 519-529.
- 17- Raijmakers MT, Zusterzeel PL, Steegers EA, Peters W. Hyperhomocysteinaemia: A risk factor for preeclampsia? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 95: 226-8.
- 18- Powers R, Evans R, Majors AK, Ojimba JI, Ness RB, Crombleholme WR. Plasma homocysteine concentration is increased in preeclampsia and is associated with evidence of endothelial activation. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 1605–11.
- 19- Cunningham FG, Leveno JK, Bloom LS, Hauth CJ, Gilstrap III CL, Wenstrom DK. *Williams Obstetrics*. 22nd ed. Newyork, 2005; 761-809.
- 20- Report of the National High Blood Preesure Education Program Working Group on High blood pressure in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: 1-22.
- 21- Kireçci H. Ağır preeklampside plazma homosisteinin yeri. *Uzmanlık Tezi. İstanbul: İstanbul Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi*, 2005.

- 22- American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG), *Practice Bulletin no. 33. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Obstet. Gynecol.* 2002; 99: 159.
- 23- Kaya E. *Gebelik hipertansiyonu, preeklampsi ve eklampsi. Nobel Kitabevi* 2001; 660-670.
- 24- Cunningham FG, Mac Donald PC, Gant NF, Leveno kKJ, Gilstrap LJ, Hankins GDV, Clark SL. *Williams Obstetrics. 21nd ed. Connecticut: the McGraw-Hill*, 2001; 174-178.
- 25- López-Jaramillo P, Arenas WD, García RG, Rincon MY, López M. *The role of the L-arginine-nitric oxide pathway in preeclampsia Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease* 2008; 2(4): 261–275.
- 26- Cruikshank DP, Wigton TR, Hays P. *Maternal physiology in pregnancy in: Gabbe SG, Niebly JR, Simpson JL (eds). Obstetrics normal & problem pregnancies. Churcill Livingstone* 1996; 91-109.
- 27- Basbug M, Aygen E, Tayyar M, Tutus A et al. *Correlation between maternal thyroid function tests and endothelin in preeclampsia-eclampsia. Obstet Gynecol* 1999; 94: 551-555.
- 28- Nicolaides KH, Rizzo G, Hecher K, *Plasental ve Fetal Doppler. 2nd ed. Parthenon publishing* 2002; 36-37.

- 29- Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod* Jul 2003; 69(1): 1-7.
- 30- Zygmunt M. Placental circulation: Clinical significance. *Early Pregnancy* Jan 2001; 5(1): 72-3.
- 31- Ong SS, Baker PN, Mayhev TM, Dunn WR. Remodeling of myometrial radial arteries in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192(2): 572-9.
- 32- Lyall F. Priming and remodelling of human placental bed spiral arteries during pregnancy- a review. *Placenta*. 2005; 26: 31-36.
- 33- Noris M, Perico N, Remuzzi G. Mechanisms of disease: Pre-eclampsia. *Nat Clin Pract Nephrol* 2005; 1: 98-114.
- 34- Pijnenborg R, Anthony J, Davey DA, Rees A, Tiltman A, Vercruysse L, van Assche A. Placental bed spiral arteries in the hypertensive disorders of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1991; 98: 648-655.
- 35- Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype: one cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin invest* 1997; 99: 2152-2164.

- 36- Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, et al. *Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion?* *J Clin Invest* 1997; 99: 2139-2151.
- 37- Karumanchi SA, Maynard SE, Stillman IE, Epstein FE, Sukhatme VP. *Preeclampsia: a renal perspective.* *Kidney Int* 2005; 67: 2101-13.
- 38- Papapetropoulos A, Garcia Cardena G, Madri JA, Sessa WC. *Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells* 1997; 100: 3131-3139.
- 39- Zhou Y, McMaster M, Woo K, Janatpour M, Perry J, Karpanen T, et al. *Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis elevated liver enzymes, and low platelets syndrome.* *Am J Pathol* 2002; 160: 1405-1423.
- 40- Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH et al. *Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia.* *N Eng J Med* 2004; 350: 672-683.
- 41- Noris M, Todeschini M, Casis P et al. *L-arginine depletion in preeclampsia orients nitric oxide synthase toward oxidant species.* *Hypertension* 2004; 43: 614-622.

- 42- Granger JP, Alexander BT, Llinas MT, Bennett WA, Khalil RA, Granger JP, et al. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia linking placental ischemia with endothelial dysfunction *Hypertension* 2001; 38: 718-722.
- 43-Fitzgerald DJ, Rock W. Tromboxane A2 synthesis in pregnancy induced hypertension. *Lancet* 1990; 335: 751.
- 44- Rocca B, Loeb AL, Strauss JF, Vezza R, Habib A, Li H, et al. Directed vascular expression of the thromboxane A2 receptor results in intrauterine growth retardation. *Nat Med* 2000; 6(2): 219-21.
- 45- Di Iorio R, Marinoni E, Anceschi MM, Emiliani S, Letizia C, Cosmi EV. Amniotic fluid endothelin-1 levels are increased in pregnancy-induced hypertension and intrauterine growth retardation. *Am J Reprod Immunol* 1996; 36(5): 260-3.
- 46- Cunningham FG, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap LC, Hauth JC, Wenstrom KD. *Williams Obstetrics*. 21st ed. McGRAW-HILL 2001; 584-8.
- 47- Hayashi M. Aetiology of pre-eclampsia and thrombophilic genetic mutations. *Clin Sci* 2003; 105(3): 269-71.
- 48- Yinon Y, Nevo O, Xu J. Severe intrauterine growth restriction pregnancies have increased placental endoglin levels. Hypoxic regulation via transforming growth factor- β . *Am J Pathol* 2008; 172: 77-85.

- 49- Rusterholz C, Hahn S, Holzgreve W. Role of placentally produced inflammatory and regulatory cytokines in pregnancy and the etiology of preeclampsia. *Semin Immunopathol* 2007; 29: 151-62.
- 50- Maynard S, Epstein FH, Karumanchi SA. Preeclampsia and angiogenic imbalance. *Annu Rev Med* 2008; 59: 61-78.
- 51- Dekker GA, Sibai BM. Pathogenesis and etiology of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 1359-75.
- 52- Poston L. Endothelial dysfunction in preeclampsia. *Pharmacological Reports* 2006; 58: 69-74.
- 53-Friedman SA, Schiff E, Emeis JJ. Biochemical corroboration of endothelial involvement in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172: 202-3.
- 54-McCarthy AL, Woolfson RG, Raju SK, Poston L. Abnormal endothelial cell function of resistance arteries from women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 168: 1323-30.
- 55-Cockell AP, Poston L. Flow-mediated vasodilatation is enhanced in normal pregnancy but reduced in preeclampsia. *Hypertension* 1997; 30: 247-51.
- 56- Granger JP, Alexander BT, Bennett WA, Khalil RA. Pathophysiology of pregnancy-induced hypertension. *Am J Hypertens* 2001; 14: 178-185.

- 57- Roberts JM, Edep ME, Goldfien A, Taylor RN. Sera from preeclamptic women specifically activate human umbilical vein endothelial cells in vitro: morphological and biochemical evidence. *Am J Reprod Immunol* 1992; 27: 101-8.
- 58- Erdem S, ÜNLÜ A. Asimetrik dimetilarjinin ve klinik önemi *Selçuk Tıp Derg* 2009; 25(2): 107-115.
- 59- Poston L, Raijmakers MT. Trophoblast oxidative stress, antioxidants and pregnancy outcome- a review. *Placenta* 2004; 25: 72–78.
- 60- Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol* 2004; 122(4): 369-82.
- 61- Lentz SR. Does homocysteine promote atherosclerosis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1385-6.
- 62- Faraci FM, Lentz SR. Hyperhomocysteinemia, oxidative stres, and cerebral vascular dysfunction. *Stroke* 2004; 35: 345-347.
- 63- Raijmakers MT, Roes EM, Poston L, Steegers EA, Peters WH. The transient increase of oxidative stress during normal pregnancy is higher and persists after delivery in women with preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008; 138(1): 39-44.
- 64- Böger RH, Lentz SR, Bode-Böger SM, Knapp HR, Haynes WG. Elevation of asymmetric dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inemia in humans. *Clin Sci* 2001; 100: 161–167.

- 65- Austin RC, Lentz SR, Werstuek GH. Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease. *Celi Death and Differentiation* 2004; 11; 56-64.
- 66- Steegers EAP. *Textbook of perinatal medicine*. London, 1998;1889.
- 67- Akkuş I. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *Mimoza Yayınları: Konya* 1995; 1-84, 106-111, 723.
- 68- Başağa HS. Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol* 1990; 68: 989-998.
- 69- Cheeseman KH, Slater T, et al. An Introduction to free radical biochemistry. *Brit. Med. Bulletin* 1993; 149: 481-93.
- 70- Maher P, Schubert D, et al. Signaling by reactive oxygen species in the nervous system. *cell. Mol. Life Sci* 2000; 57: 1287-1305.
- 71- Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med* 1991; 91: 14-22.
- 72- Park J.R, Tappel A.L, et al. Protein damage and lipid peroxidation; effects of diethyl maleate, bromotrichloromethane and vitamin E on ammonia, urea and enzymes involved in ammonia metabolism. *Toxicology Letters* 1991; 58: 29-36.

73- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160(1): 1-40.

74-Liu J, Wang X, Shigenaga Mk, Yeo Hc, Mori A, et al. Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein and DNA in the brain of the rats. *Faseb J*.1996; 10: 1532-1538.

75- Wolff S. Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods Enzymol* 1994; 233: 182-189.

76-Altınışık M. Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar. cited 2010 dec 19. Aviable from: URL: <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01s.pdf>.

77- Grune T, Reinheckel T, Joshi M, Davies K.J.A. Biology of nitric oxide signaling. *J. Biol. Chem* 1995; 270: 2344-2351.

78- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology Medicine*, Third Edition, Oxford Science Publications 2001; 22-24.

79- Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci C. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology & Medicine* 2005; 39: 841-852.

80- Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 2001; 54: 176-180.

- 81- Bland J.S. *Oxidants and antioxidants in clinical medicine: past, present and future potential. journal of nutritional & Enviromental Medicine*, 1995; 5: 255-281.
- 82- Dreher D, Junod A.F, et al. *Role of oxygen free radicals in cancer development. Eur J Cancer* 1996; 32: 30-38.
- 83- Konukoğlu D. *serbest radikaller ve önemleri. Aile Hek Derg* 1997; 1: 197-200.
- 84- Uysal M. *Serbest radikaller, lipit peroksitleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. Klinik Gelişim* 1998; 11: 336-341.
- 85- Fang YZ, Yang S, Wu G, et al. *Free radicals, antioxidants and nutrition* 2002; 18: 872-879.
- 86- De Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, Vermeulen NPE, et al. *Biomarkers of free radical damage aplications in experimental animals and in humans. Free Radical Biology & Medicine* 1999; 26: 202-226.
- 87- Podrez EA, Abu-Soud HM, Hazen SL, et al. *Myeloperoxidase generated oxidants and atherosclerosis. Free Radical Biology & Medicine* 2000; 28: 1717-1725.
- 88- Valko M, Morris H, Cronin Mt, et al. *Metals, toxicity and oxidative stress. curr Med Chem* 2005; 12(10): 1161-208.

- 89- Halliwell B, Gutteridge J.Mc, et al. *Free radical in biology and medicine. 3nd ed. Oxford University Pres: Oxford 2000; 160-165.*
- 90- Podda M, Traber Mg, Weber C, Yan Lj, Pakcer L, et al. *Uv-irradiation deplets antioxidants and causes, damage in a model human skin. Free. Radic. Biol. Med 1998; 92: 5259-5265.*
- 91- Kılınç K, Kılınç A. *Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. Hacettepe Tıp Dergisi 2002; 33(2): 110-118.*
- 92- Miller D, Buettner G, Aust S. *Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. Free Radic Biol Med 1990; 8(1): 95-108.*
- 93- Bingöl F, Aydın S, Açıkgöz S. *Serbest radikaller. Ankara Hastanesi Tıp Dergisi 1993; 28:2.*
- 94- Gutteridge J.M.C, *Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem 1995; 41: 1819-1828.*
- 95- Cooper Ce, Vollaard Nbj, Choueiri T, Wilson Mt, et al. *Exercise, free radicals and oxidative stress. Biochem Soc Trans 2002; 30: 280-285.*
- 96- Freeman B.A, Crapo J.D, et al. *Biology of disease: free radicals and tissue injury. Lab Invest 1982; 47: 412-426.*
- 97- Dormandy TL, Approach A, et al. *To free radicals. Lancet 1983; 2: 1010-1014.*

- 98- Halliwell B, Gutteridge J.M, et al. *Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. Lancet 1984; 1: 1396-1397.*
- 99-Harman D. *Free radicals in aging. Mol Cell Biochem 1988; 84: 155-161.*
- 100- Uchida K. *4-Hydroxy-2-Nonenal: a product and mediator of oxidative stres. Progr. Lip 2003; 1-26.*
- 101- Lucas D, Menez Jf, Berthou F, Pennec Y, Floch Hh, et al. *Determination of free acetaldehyde in blood as the dinitrophenylhydrazone derivative by high-performance liquid chromatography, J. Chromatogr 1986; 382: 57-66.*
- 102- Pryor W.A. *Free radicals in biology. Academic Pres: London 1976; 1.*
- 103- Pastor N, Weinstein H, Jamison E, Brenowitz M, et al. *A detailed interpretation of oh radical footprints in a Tbp-Dna complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. J Mol Biol 2000 17; 304(1): 55-68.*
- 104- Halliwell B. *Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. Br J Exp Path 1989; 70: 737-757.*
- 105- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes Cj, Telser J, et al. *Role of oxygen radicals in Dna damage and cancer incidence. Mol Cell Biochem 2004; 266(1-2): 37-56.*

- 106- Liochev S, Fridovich I, et al. *The Haber-Weiss cycle-70 years later: an alternative view. Redox Rep* 2002; 7(1): 55-7.
- 107- Moslen M.T. *Reactive oxygen species in normal physiology, cell, injury and phagocytosis. Adv Exp Med Biol* 1994; 366: 17-27.
- 108- Aikens J, Dix Ta, et al. *Perhydroxyl radical (Hoo.) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. J Biol Chem Aug* 1991; 266(23): 15091-8.
- 109- Meral A, Tuncel P, Surmen-Gur E, Ozbek R, Ozturk E, Gunay UC, et al. *Lipid peroxidation and antioxidant status in beta-thalassemia, Pediat. Hematol. Oncol* 2000; 17: 687-693.
- 110- Gutteridge JM, Halliwell B, et al. *The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. Trends Biochem Sci.* 1990; 15(4): 129-35.
- 111- Berthrong M, Fajardo LF, et al. *Radiation injury in surgical pathology. Part II. Alimentary Tract. Am J Surg Pathol* 1981; 5: 153-178.
- 112- Uchida K. *Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. Free Radical Biology & Medicine* 2000; 28: 1685-1696.
- 113- Halliwell B, Chirico S, et al. *Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. Am J Clin Nutr* 1993; 57: 715-725.

- 114- Halliwell B. *Oxidative stress, nutrition and health, experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. Free Rad Pres* 1996; 25: 57-74.
- 115- Shacter E. *Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. Drug Metab Rev* 2000; 32: 307-326.
- 116- Shacter E. *Protein oxidative damage. Methods Enzymol.* 2000; 319: 428-36.
- 117- Halliwell B. *What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo. FEBS Lett* 1997; 411: 157-160.
- 118- Kayalı R, Çakatay U. *Protein oksidasyonunun ana mekanizmaları. Cerrahpaşa J Med* 2004; 35: 83-9.
- 119- Berlett BS, Stadtman ER. *Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J Biol Chem* 1997; 272(33): 20313-6.
- 120- Stadtman E.R, Levine R.L. *Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. Amino Acids* 2003; 25: 207-218.
- 121- Maron BJ. *Hypertrophic cardiomyopathy. Lancet* 1997; 350: 127-33.
- 122- Davies MJ, Fu S, Wang H, Dean RT, et al. *Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. Free Radic Biol Med.* 1999; 27(11-12): 1151-63.

- 123- Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 790 -796.
- 124- Chevion M, Berenshtein E, Stadtman ER, et al. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res* 2000; 33: 99-108.
- 125- Shan X, Aw Ty, Jones DP, et al. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmac Ther* 1990; 47: 61-71.
- 126- Baynes JW, Thorpe SR, et al. Role of oxidative stress in daibetic complications. *Diabetes* 1999; 48: 1- 8.
- 127- Stadtman ER, Levine RL, et al. Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 899: 191-208.
- 128- Stadtman ER. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences. *Free. Rad. Biol. Med* 1990; 9: 315-325.
- 129- Friguet B, Szweda L, Stadtman ER. Susceptibility of glucose-6-phosphate dehydrogenase oxidation to proteolysis by the multicatalytic protease. *Arch. Biochem. Biophys* 1994; 311: 168-173.
- 130- Rivett AJ. Regulation of intracellular protein turnover: Covalent modification as a mechanism of marking. *Curr. Top. Cell. Regul* 1986; 28: 291-337.

- 131- Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A, et al. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med*. 2003; 9(4): 169-76.
- 132- Grune T, Reinheckel T, Davies KJA, et al. Degradation of oxidized proteins in K562 human hematopoietic cells by proteasome. *J Biol Chem* 1996; 271: 15504-9.
- 133- Grune T, Reinheckel T, Josh M, Davies KJA, et al. Proteolysis in cultured liver epithelial cells during oxidative stress-role of the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *J Biol Chem* 1995; 270: 23514-23521.
- 134- Siems WG, Zollner H, Grune T, Esterbauer H, et al. Metabolic fate of 4-hydroxynonenal in hepatocytes: 14-dihydroxynonene is not the main product. *J Lipid Res*, 1997; 38: 612-622.
- 135- Griffiths HR. Antioxidant and protein oxidation. *Free Radic Res*, 2000; 33: 47-58.
- 136- Seven A, Candan G. Antioksidan savunma sistemleri. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 1996; 27: 41-50.
- 137- Southorn P.A, Powis G, et al. Free radicals in medicine. I. chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 1988; 63: 381-390.
- 138- Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun* 1990; 9(1): 1-32.

- 139- Boyunağa H, Çelik C. Serbest radikaller ve hücresel denge. *Bilim Teknik Dergisi*, 1996; 347: 98-100.
- 140- Chapple ILC. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 287-296.
- 141- Burcombe R, Wilson GD, Dowsett M, Khan I, Richman PI, Daley F, et al. Evaluation of Ki- 67 proliferation and apoptotic index before, during and after neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer. *Breast Cancer Res* 2006; 8: 3-31.
- 142- Cheseeman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49: 481-493.
- 143- Wir JJ. Lipid peroxidation in preeclamptic and eclamptic pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Repro Biol* 1996; 64: 51-54.
- 144- Siddiqui IA, Jaleel A, Tamimi W, Hanan M. Kadri FA. Role of oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Arch. Gynecol Obstet* 2010; doi: 10.1007/s00404-010-1538-6.
- 145- Llurba E, Gratacós E, Martín-Gallán P, Cabero L, Dominguez C. A Comprehensive study of oxidative stress and antioxidant status in preeclampsia and normal pregnancy. *Free Radical Biology & Medicine* 2004; 37(4): 557-570.

146- Serdar Z, Gur E, Colakodullary M, Develiodlu O, Sarandol E. Lipid and protein oxidation and antioxidant function in women with mild and severe preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet* 2003; 268: 19-25.

147- Zusterzeel PLM, Mulder TPJ, Peters WHM, Wiseman SA, Apsteegers E, Plasma protein carbonyl in nonpregnant, healthy pregnant and preeclamptic women. *Free Rad. Res* 2000; 33: 471-476.

148- Burton GJ, Jauniaux E. Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig* 2004; 11: 342-352.

149- Akcakoyun M. Koroner arter hastalığı olgularında koroner risk faktörleri ile endotel fonksiyonları arasındaki ilişki. *Uzmanlık Tezi. İstanbul: Koşuyolu Kalp Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2004.*

150- Irmak S. Kardiyovasküler sistem hastalıklarında oksidatif stres ve lipid profillerinin incelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi, 2008.*

151-Dökmeci İ. Farmakoloji temel kavramlar. *İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi 2000; 305-314.*

152- Anthony V. Perkins. Endogenous anti-oxidants in pregnancy and preeclampsia. *Australian and New Zealand journal of Obstetrics and gynecology* 2006; 46: 77-83.

153- Özkan M, Yüksekol İ. Nitrik oksit ve akciğerler. *Toraks Dergisi* 2003; 4(1): 63, 88-94.

154- Türksever A. *Deneyisel olarak oluşturulmuş meme tümörlerinde plazma asimetrik dimetilarjinin düzeyleri üzerine C ve E Vitaminlerinin etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Edirne: Trakya Üniversitesi, 2009.*

155- Nathan C. *Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FA SEB J 1992; 6: 3051-3064.*

156- Behrendt D, Ganz P *Endothelial function: from vascular biology to clinical applications. Am J Cardiol 2002; 90(1): 40-48.*

157- Kılınç A, Kılınç K. *Nitrik oksit biyolojik fonksiyonları ve toksik etkileri. Palme yayıncılık 2003.*

158- Lüscher TF, Barton M. *Biology of the endotelium. Clin Cardiol 1997; 20(2): 3-10.*

159- Ross R. *Atherosclerosis: an inflammatory disease. N Engl J Med 1999; 340: 115-126.*

160- Esertaş K. *Subklinik hipotiroidili olgularda simvastatin ve levotiroksin replasman tedavisinin endotel disfonksiyonu üzerindeki etkilerinin araştırılması. Uzmanlık Tezi. İstanbul: Hadarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2004.*

161- Dökmeci D. *Farmakoloji Temel Kavramlar. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2000; 305-314.*

- 162- Bhagavan NV. *Medical Biochemistry 4nd ed. Harcourt/Academic Pres: Massachusetts, 2002; 345-347.*
- 163- Mutlu C, Koyutürk M, Karpuz V. *Preeklampsik ve Normal Plasentada endotelial nitrik oksit sentetaz immünoreaktivitesinin İncelenmesi. Cerrahpaşa J Med 2005; 36: 109-115.*
- 164- Muderris II, Özçelik B, Muhtaroglu S. *Preeklampsia ve eklampside maternal serum nitrik oksit ve total antioksidan aktivite seviyelerinin önemi. T Klin Obst 2002; 12: 25-29.*
- 165- Böger RH, Bode-Böger SM. *Asymmetrical dimethyl arginine, derangements of the endothelial nitric oxide synthase pathway, and cardiovascular diseases. Semin Thromb Hemost 2000; 26: 539-545.*
- 166- Vallance P, Leiper J. *Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine: dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004; 24: 1023-1030.*
- 167- Tang J, Gray JD, Clarke S, Herschman HR. *PRMT3, a type I protein arginine Nmethyltransferase that differs from PRMT1 in its oligomerization, subcellular localization, substrate specificity and regulation. J Biol Chem 1998; 273: 16935-16945.*

168- Yildirim AO, Bulau P, Zakrzewicz D et al. Increased protein arginine methylation in chronic hypoxia. Role of protein arginine methyltransferases. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 35: 436-443.

169- Goldberg AL, St John AC. Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells: part 2. *Annu Rev Biochem* 1976; 45: 747-803.

170- Leiper JM, Santa Maria J, Chubb A, MacAllister RJ, Charles IG, Whitley GS, et al. Identification of two dimethylarginine dimethylamino hydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deaminases. *Biochem J* 1999; 343: 209-214.

171- Yüksel E. Ağır sepsis veya septik şok tanısı konan hastalarda asimetrik dimetilarjinin ve nitrik oksit düzeylerinin araştırılması. Ankara: Gazi Üniversitesi, 2010.

172- Fickling SA, Holden DP, Cartwright JE, Nussey SS, Vallance P, Whitley G. Regulation of macrophage nitric oxide synthesis by endothelial cells: a role for NG, NG dimethylarginine. *Acta Physiol Scand* 1999; 167: 145-150.

173- Siroen MP, van der Sijp JR, Teerlink T, van Schaik C, Nijveldt RJ, van Leeuwen PA. The human liver clears both asymmetric and symmetric dimethyl arginine. *Hepatolog* 2005; 41: 559-565.

174- Jacobi J, Tsao PS. Asymmetrical dimethylarginine in renal disease: limits of variation or variation of limits? *Am J of Nephrol* 2008; 28: 224-237.

175- Sladek SM, Magness RR, Conrad KP. Nitric oxide and pregnancy. *Am J Physiol* 1997; 272: 441-463.

176- Williams DJ, Vallance PJ, Neild GH, Spencer JA, Imms FJ. Nitric oxide-mediated vasodilation in human pregnancy. *Am J Physiol* 1997; 272: 748-752.

177- Holden DP, Fickling SA, Whitley GS, Nussey SS. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine, a natural inhibitor of nitric oxide synthase, in normal pregnancy and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178: 551-556.

178- Maeda T, Yoshimura T, Okamura H. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, in maternal and fetal circulation. *J Soc Gynecol Investig* 2003; 10: 2-4.

179- Fliser D. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): the silent transition from an "uraemic toxin" to a global cardiovascular risk molecule. *Eur J Clin Invest* 2005; 35: 71-79.

180- Pritchard KA Jr, Groszek L, Smalley DM, Sessa WC, Wu M, Villalon P, et al. Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. *Circ Res* 1995; 77: 510-8.

181- Sydow K, Munzel T. ADMA and oxidative stress. *Atherosclerosis* 2003; 174(4): 41-51.

182- Emeksiz HC. Antiepileptik kullanan çocuklarda plazma homosistein, asimetrik dimetilarjinin ve nitrik oksit düzeyleri. Ankara: Gazi Üniversitesi, 2009.

183- Fickling SA, Williams D, Vallance P, Nussey SS, Whitley GS. Plasma concentrations of endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in normal pregnancy and preeclampsia. *Lancet* 1993; 342: 242-243.

184- Pettersson A, Hedner T, Milsom I. Increased circulating concentrations of asymmetric dimethylarginine (ADMA), an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis, in preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998; 77: 808-813.

185- Savvidou MD, Hingorani AD, Tsikas D, Frölich JC, Vallance P, Nicolaidis KH. Endothelial dysfunction and raised plasma concentration of asymmetric dimethylarginine in pregnant woman who subsequently develop preeclampsia. *Lancet* 2003; 361: 1511-1517.

186- Dekou V, Whincup P, Papacost O, et al. The effect of C677T and A1298C polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene on homocysteine levels in elderly men and women from the British region heart study. *Atherosclerosis* 2001; 154: 659-66.

187- Engbersen AMT, Franken DG, Boers GHJ, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 142-50.

188- Nelen WLD, Blom HJ, Thomas CMG, Steegers EAP, Boers GHJ, Eskes TKAB. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism affects the change in homocysteine and folate concentrations resulting from low dose folic acid

supplementation in women with unexplained recurrent miscarriages. Nutrition Org 1998; 128: 1336.

189- Ünver PB. *Obezitede nitrik oksit, homosistein, leptin ve myoglobulin düzeylerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Malatya: İnönü Üniversitesi, 2009.*

190- Sucu M, Karadere A, Toprak N. *Homosistein ve kardiyovasküler hastalıklar. Turk Kardiyol Dern Arş 2001; 29: 181-90.*

191- Walker MC, Smith GN, Perkins SL, Keely EJ, et al. *Changes in homocysteine levels during normal pregnancy. Am J Obstet Gynecol. 1999; 180: 660-664.*

192- Malinow MR, Rajkovic A, Duell PB, Hess DL, et al. *The relationship between maternal and neonatal umbilical cord plasma homocyst(e)ine suggests a potential role for maternal homocyst(e)ine in fetal metabolism. Am J Obstet Gynecol 1998; 178: 228-233.*

193- Kim MH, Kim E, Passen EL, Meyer J, et al. *Cortisol and estradiol: nongenetic factors for hyperhomocyst(e)inemia. Metabolism. 1997; 46: 247-249.*

194- Dayal S, Lentz SR. *ADMA and hyperhomocysteinemia. Vasc Med 2005; 10(1): 27-33.*

195- Boger RH, Bode-Boger SM, Sydow K, Heistad DD, Lentz SR. *Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20(6): 1557-64.*

196- Siekmeier R, Grammer T, Marz W. Role of Oxidants, Nitric Oxide and Asymmetric Dimethylarginine in Endothelial Function. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2008; 13(4): 279-97.

197-Utku U, Celik Y. Serebrovaskuler hastalıklar. In: Balkan S, ed. Ankara: Guneş Kitapevi Ltd Şti: 2002; 49-61.

198- Reis RP, Azinheira J, Reis HP, et al. Homocysteinaemia after methionine overload as a coronary artery disease risk factor: Importance of age and homocysteine levels. *Coronary Artery Disease* 1995; 6: 851-6.

199- Fattal-Valevski A, Bassan H, Korman SH, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency: Importance of early diagnosis. *J Child Neuro* 1999; 15: 39-543.

200- Kaymaz C. Serum homosistein seviyeleri ve uterin arter doppler ultrason ölçümleri ile anormal plasentasyonun ilişkisi. Uzmanlık Tezi. İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi, 2007.

201- Farber JM, Levine RL, et al. Sequence of a peptide susceptible to mixed-function oxidation: probable cation binding site in glutamine synthetase. *J Biol Chem* 1986; 261: 4575-4578.

202- Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, et al. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med* 1999; 340: 9-13.

203-Dekker GA, de Vries JI, Doelitzsch PM, Huijgens PC, et al. Underlying disorders associated with severe early-onset preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 1042-1048.

204- Burke G, Robinson K, Refsum H, Stuart B, et al. Intrauterine growth retardation, perinatal death, and maternal homocysteine levels. *N Engl J Med* 1992; 326: 69-70.

205- Cotter AM, Molloy AM, Scott JM, Daly SF. Elevated plasma homocysteine in early pregnancy: a risk factor for the development of nonsevere preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189: 391-394.

206-Einarsson JI, Sangi-Haghpeykar H, Gardner MO. Sperm exposure and development of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2003; 188: 1241-3.

207-Gleicher N. Why much of the pathophysiology of preeclampsia-eclampsia must be of an autoimmune nature. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;196: 5-7.

208- Hanratty CG, Mcgrath LT, Mcauley DF, et al. The effects of oral methionine and homocysteine on endothelial function. *Heart* 2001; 85: 326-30.

209- Arsene E, Refsum H, Bona KH. Serum total homocysteine and coronary heart disease. *Int J Epidemiol* 1995; 24(4): 704-9.

210- Cleophas TJ, Hornstra N, Hoogstraten B, Der Meulen J. Homocysteine a risk factor for coronary artery disease or not? A meta-analysis. *Am J Cardiol* 2000; 86(9): 1005-9.

211- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 19: 265-75.

212- Reznick AZ, Packer L, et al. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994; 233: 357-363.

213- Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, sample spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide: Biol and Chem* 2001; 5(1): 62-71.

214- Seligman SP, Buyon JP, Clancy RM, Young BK, Abramson SB. The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia. *J Obstet Gynecol* 1994; 171: 944-8.

215- Anumba DOC, Robson SC, Boys RJ, Ford GA. Nitric oxide activity in the peripheral vasculature during normotensive and preeclamptic pregnancy. *J Physiol Heart Circ Physiol* 1999; 277: 848-854.

216. Scott W. Walsh. What Causes Endothelial Cell Activation in Preeclamptic Women? *The American Journal of Pathology* 2006; 169: 4.

217- Dongwei M, Jianhua C, Keshen L, Shiyu HQ, Yue LZ, Wei ZLL. Association of homocysteine, asymmetric dimethylarginine, and nitric oxide with preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet* DOI 10. 1007/s00404-009-1234-6.

218- Sandrim VC, Palei ACT, Metzger IF, Gomes VA, Cavalli RC and Tanus-Santos JE. Nitric Oxide Formation Is Inversely Related to Serum Levels of Antiangiogenic Factors Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase-1 and Soluble Endogline in Preeclampsia. *Hypertension* 2008; 52; 402-407.

219- Var A, Yildirim Y, Onura E, Kuscu NK, Uyanik BS, Goktalay K. Increased Homocysteine and Decreased Nitric Oxide Levels Endothelial Dysfunction in Preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest* 2003; 56: 221–224.

220- Kima YJ, Parkc HS, Leed HY, Hac EH, Suhe SH, Ohf SK. Yoog reduced L-arginine level and decreased placental eNOS activity in preeclampsia. *Placenta* 2006; 27; 438-444.

221- McCord N, Ayuk P, McMahonv M, Boyd RCA, Sargent I and Redman C. System y+ arginine transport and NO production in peripheral blood mononuclear cells in pregnancy and preeclampsia *Hypertension* 2006; 47; 109-115.

222- Blum A, Shenhav M, Baruch R, Hoffman M. Endothelial dysfunction in preeclampsia and eclampsia: current etiology and future non-invasive assessment. *IMAJ* 2003; 5: 724-726.

223- Vanderlelie JJ, Perkins AV. Chronic nitric oxide synthase inhibition in pregnant rats does not result in placental oxidative stress. *Hypertens Pregnancy*. 2006; 25: 103-14.

224- Tsukimori K, Fukushima K, Tsushima A and Nakano H. Generation of reactive oxygen species by neutrophils and endothelial cell injury in normal and preeclamptic pregnancies *Hypertension* 2005; 46; 696-700.

225- Serrano NC, Casas JP, Díaz LA, Páez C, Mesa CM, Cifuentes R. Endothelial NO synthase genotype and risk of preeclampsia: a multicenter case-control study *Hypertension* 2004; 44; 702-707.

226- Yu CKH, Casas CP, Savvidou MD, Sahemey MK, Nicolaides KH and Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (Glu298Asp) and development of pre-eclampsia: a case-control study and a meta-analysis *BMC Pregnancy and Childbirth* 2006; 6: 7.

227- Buhimschi IA, Saade GR, Chwalisz K and Garfield RE. *The nitric oxide pathway in pre-eclampsia: pathophysiological implications Human Reproduction Update* 1998; 4(1): 25–42.

228- Chamy VM, Lepe J, Catalan A, Retamal D, Escobar JA, Madrid EM. *Oxidative stress is closely related to clinical severity of pre-eclampsia. Biol Res* 2006; 39: 229-236.

229- Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. *Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. Lancet* 1992; 339(8793): 572-5.

230- Cooke JP: *Does ADMA cause endothelial dysfunction? Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2032-2037.

231- Böger RH. *Association of asymmetric dimethylarginine and endothelial dysfunction. Clin Chem Lab Med* 2003; 41(11); 1467-1472.

232- Lopez-Quesada E, Vilaseca MA, Lailla JM. *Plasma total homocysteine in uncomplicated pregnancy and in preeclampsia. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 108: 45-49.

233- Rajkovic A, Makinov MR. Plasma homocysteine concentrations in eclamptic and preeclamptic african women postpartum. *Obstet Gynecol* 1999; 94: 355-63.

234- Middeldorp S, van de Poel MH, Bank I, Hamulyak K, Libourel EJ, Koopman MM. Unselected women with elevated levels of factor VIII: C or homocysteine are not at increased risk for obstetric complications. *Thromb Haemost* 2004; 92: 787-790.

235- Lopez-Quesada E, Vilaseca MA, Gonzalez S. Homocisteina y gestacion [homocysteine and pregnancy]. *Med Clin* 2000; 115: 352-356.

236- Bozkurt Ş. Homosisteinin vasküler düz kas fonksiyonları üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, 2006.

7.ÖZET

Preeklampsi, bozulmuş NO metabolizmasının olduğu bir tabloyu yansıtabilmektedir. Patofizyolojik mekanizma ise, normal gebeliğin karakteristiği olan ve en azından kısmen NO ile regüle edilen vazodilatasyonun ve azalmış vasküler reaktivitenin yetersizliğidir. Preeklampsinin patogenezinde rol oynayan faktörlerden birinin de endotelial disfonksiyon olduğu düşünülmektedir. Ancak mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Klinik ve deneysel çalışmalar endotelial disfonksiyonu, artmış serbest radikal üretimiyle ilişkilendirmektedir. Ayrıca, ADMA NOS aktivitesini inhibe ettiğinden dolayı NO düzeylerinde bir azalmaya yol açmakta, bunun sonucu olarak da endotel disfonksiyonunun gelişebileceği ifade edilmektedir. Nitrik oksit fonksiyonlarındaki azalmada önemli mekanizmalardan biride, homosisteinin ootoksidasyonu sonucu oluşan reaktif oksijen radikallerinin oksidan sistemi aktive etmesi ve NO biyoyararlanımını azaltmasıdır.

Biz bu çalışmada, preeklampitik kadınlarda vasküler hemeostaziste önemli bir rol oynadığı düşünülen NO düzeyini, endotelial disfonksiyon belirteci olarak değerlendirilen ADMA ve homosistein düzeylerini ve oksidatif stresin bir göstergesi olarak da protein karbonil düzeylerini ölçtük.

30 preeklampitik ve 30 sağlıklı gebe üzerinde gerçekleştirilen bu çalışmada, serum ADMA, SDMA ve homosistein düzeyleri HPLC yöntemiyle, serum protein karbonil düzeyleri spektrofotometrik olarak ve NO düzeyleri ise Griess yöntemi ile kolorimetrik olarak ölçüldü.

Sonuçlarımız bize, preeklampitik hasta grubunda kontrol grubuna göre serum ADMA, SDMA ve homosistein düzeylerinin anlamlı olarak yüksek ($P<0,05$), NO düzeylerinin ise anlamlı olarak düşük olduğunu ($P<0,05$) göstermiştir. Çalışmanın istatistiksel değerlendirmesi sonucunda serum NO ile ADMA ve SDMA düzeyleri ile arasında zayıf negatif korelasyon, PCO ile ADMA ve SDMA arasında zayıf pozitif korelasyon olduğu gözlenmiştir. Ayrıca Serum ADMA ile SDMA, ADMA ile Homosistein ve SDMA ile Homosistein düzeyleri arasında güçlü pozitif korelasyon olduğu saptanmıştır.

Yapılacak daha geniş çaplı çalışmalarla, preeklampsinin erken tanısı ve prognozunun belirlenmesinde bu parametrelerin yeni belirteçler olarak ortaya çıkmasının, hem olası komplikasyonların önlenmesinde hem de yeni tedavi yaklaşımların geliştirilmesinde önemli olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Preeklampsi, NO, ADMA, Homosistein, Protein karbonil.

8. SUMMARY

Preeclampsia may reflected a damaged NO metabolism table. Pathophysiologic mechanism that is characteristic of normal pregnancy and at least partially regulated with NO vasodilatation's defficiency and decreased vascular reactivity insufficiency. It is thought that one of the factors that play role in the preeclampsia pathogenesis is endothelial dysfunction. But it's mechanism has not been exactly enlightened. Clinical and experimental studies is related the endothelial dysfunction with increased free radical production. Also, because of the inhibition of NOS activity with ADMA leads to a decrease in NO levels, it is expressed that endothelial dysfunction may develop as a result of this. One of the most important mechanisms in the reduction of nitric oxide function- as a result of homocysteine otooxidation- is the activation of oxidant system by production of reactive oxygen radicals and reduces NO bioavailability.

We, in this study, in preeclampsia women, it is thought that play an important role in vascular homeostasis; NO level, evaluated as an endothelial dysfunction marker; ADMA and homocysteine levels and as an oxidative stres marker; protein carbonil levels measured.

We did this study on 30 preeclampsia and 30 healty pregnant women, serum ADMA, SDMA and homocysteine levels were measured with HPLC method, serum protein carbonyl levels spectrophotometrically and NO levels were measured by Griess method with colorimetry.

Our results showed us, in preeclampsia patient group according to control group serum ADMA, SDMA and homocysteine levels are significantly high ($P<0.05$). NO levels are significantly low ($P<0.05$). In consequence of statistical analyzes of the study serum NO with ADMA and between SDMA levels weak negative correlation, between ADMA and SDMA with PCO weak positive correlation were observed. Furthermore, between serum ADMA with SDMA and ADMA with homocysteine and SDMA with homocysteine levels strong positive correlation were determined.

To do more large scale studies, in determination of the early diagnosis and prognosis of preeclampsia, we think that may be important when these parameters appear as new markers, both in prevention of probable complications and developing in new therapy approach.

Key words: Preeclampsia, NO, ADMA, homocysteine, Protein carbonyl

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı : M. Ulaş
Soyadı : GÜRAKAN
Doğum Yeri ve Tarihi : ANKARA, 16.13.1978
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitimi:

2007- : Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD. (Araştırma
Görevlisi Doktor) ANKARA
1998-2005 : Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi ANKARA
1992-1995 : Ömer Seyfettin Lisesi Çankaya/ANKARA

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:

Türk Klinik Biyokimya Derneği
Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği