

**T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**Preeklampatik Gebelerde L-Arjinin ve ADMA
Düzeyleri ile eNOS Geninin Glu298Asp
Polimorfizmi Arasındaki İlişkisi**

DOKTORA TEZİ

FAHRİ TURAN

Elazığ-2009

ONAY SAYFASI

Prof.Dr. Emine ÜNSALDI
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr.Necip İLHAN
Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir

Prof. Dr.Necip İLHAN
Danışman

Yüksek Lisans/Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

.....
.....
.....
.....
.....

Çok Değerli Eşim ve

Çocuklarıma.....

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ve tez çalışmalarım sırasında benden gerekli her türlü desteği ve yardımı esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Necip İLHAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında ve eğitimim süresince yardım ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim, Anabilim Dalımızın değerli öğretim üyeleri; Prof. Dr. M. Ferit GÜRSU'ya, Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ'a, Prof. Dr. İhsan HALİFEOĞLU'na, Doç. Dr. Nevin İLHAN'a Doç. Dr. Nermin Kılıç'a, Yrd. Doç. Dr. Dilara SEÇKİN'e, Yrd. Doç. Dr. Süleyman AYDIN'a, teşekkür ederim. Çalışmalarım sırasında yardımını gördüğüm, değerli asistan arkadaşlarım Dr. Kadir ATEŞ ve Dr. Enver SANCAKDAR'a ayrıca Biyokimya Anabilim Dalında görevli diğer asistan arkadaşlarım ve bütün personele teşekkür ederim.

Doktora yaptığım süre boyunca bana destek olan Turgut Özal Tıp Merkezi Biyokimya Ana Bilim Dalındaki tüm değerli öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımda özellikle hasta toplamamda bana verdikleri destek için hastanemiz Kadın Doğum Ana Bilim Dalındaki tüm değerli öğretim üyelerine teşekkür ederim

Varlıklarıyla her zaman yanımda hissettiğim, bugüne kadar her konuda beni destekleyen başta eşim, annem, babam ve çocuklarım olmak üzere tüm aileme teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

KONULAR

Sayfa
No

TEŞEKKÜR

i

İÇİNDEKİLER

ii

TABLO DİZİNİ

iii

ŞEKİL DİZİNİ

iv

KISALTMALAR

v

1. ÖZET

1

2. ABSTRACT

2

3. GİRİŞ

4

3.1. Preeklampsi

5

3.1.1. Tanımı

5

3.1.2. Preeklampsi Fizyopatolojisi

6

3.1.3. Gebelik Ve Hipertansiyon

8

3.1.3.1. Gestasyonel Hipertansiyon

8

3.1.3.2. Kronik Hipertansiyon

9

3.1.3.3. Kronik Hipertansiyon Zemininde Gelişen Preeklampsi

9

3.1.3.4. Preeklampsi

10

3.1.3.5. Preeklampsi Tanı Kriterleri

10

3.1.3.6. Eklampsi

12

3.2. Nitrik Oksit

12

3.2.1. Nitrik Oksit ve Preeklampsi

16

3.3. Gen Analizleri için Kullanılan Örnekler

17

3.3.1. Deoksiribonükleik Asit (DNA)

17

3.4. Polimorfizm

19

3.5. Endotelial Nitrik Oksid Sentetaz(eNOS)

20

3.5.1. İnsanda eNOS Gen Polimorfizmleri

21

3.5.2. eNOS Gen Polimorfizmleri ve Preeklampsi

22

3.6. Asimetrik Dimetil Arjinin (ADMA)

22

3.6.1. ADMA ve Preeklampsi

24

3.6.2. ADMA ile İlişkili Hastalıklar ve fizyopatolojisi

26

3.6.2.1. Renal Hastalıklar

26

3.6.2.2. Diyabet

26

3.6.2.3. Kardiyovasküler Hastalıklar

27

3.6.2.4. Alzheimer

28

3.6.2.5. Karaciğer Yetmezliği ve Siroz

28

3.6.2.6. Hemorajik Şok

28

4. GEREÇ VE YÖNTEMLER

29

5. BULGULAR

39

6. TARTIŞMA

46

7. KAYNAKLAR

55

8. ÖZGEÇMİŞ

62

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Nitrik oksit sentezleyen enzimler.....	15
Tablo 2. Grupların Demografik ve Klinik Özellikleri.....	39
Tablo 3. Preeklampsili ve Normal Gebelerin ADMA, SDMA ve Arjinin Düzeyleri.....	40
Tablo 4. Preeklampsili ve Normal Gebelerde Glu298Asp genotip dağılımı ile G ve A allel sıklığı.....	46
Tablo 5. Preeklampsi ve Toplam Hamilelerde eNOS Gen Polimorfizmin Plazma ADMA, SDMA ve Arjinin Konsantrasyonu Üzerine Etkisi.....	46

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Nitrik oksidin NOS enzimi etkisiyle L-arginin aminoasidinden sentezlenmesi.....	13
Şekil 2. Nitrik oksit (NO) kaynakları ve oluşumu. Nitrik oksit sentezleyen enzim (iNOS).....	14
Şekil 3. DNA molekülünün yapısı.....	18
Şekil 4. Arjinin ve metil arjinin türevlerinin oluşumları.....	23
Şekil 5. Glu298Asp polimorfik bölgesine spesifik primerler kullanılarak elde edilen 248 bç'lik PZR ürününün ultraviyole transilluminatördeki görüntüsü.....	35
Şekil 6. Preeklampsili ve Normal gebelerin ADMA düzeylerinin değişimi.....	41
Şekil 7. Preeklampsili ve Normal gebelerin SDMA Düzeyleri.....	42
Şekil 8. Preeklampsili ve Normal gebelerin L-Arjinin Düzeyleri.....	42
Şekil 9. Preeklampsili ve Normal Gebelerin ADMA/SDMA ortalamalarının grafik ile gösterilmesi.....	43
Şekil 10. Preeklampsili ve Normal Gebelerin L-Arjinin/ADMA ortalamalarının grafik ile gösterilmesi.....	44
Şekil 11. PZR ürünlerinin kesimi ile elde edilen Glu298Asp genotipleri.....	44
Şekil 12. PZR ürünlerinin kesimi ile elde edilen Glu298Asp genotipleri.....	45

KISALTMALAR

ACE	: Anjiyotensin Konverting Enzim
ADMA	: Asimetrik dimetilarginin
Asp	: Aspartat
BH4	: Tetrahidrobiyopterin
CAL	: Kalmodulin
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
DDAH	: Dimetilarjinin dimetilaminohidrolaz
DKB	: Diyastolik kan basıncı
DMA	: Dimetilamin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
eNOS	: Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
FMN	: Flavin mononükleotid
GC	: Guanilat Siklaz
Glu	: Glutamat
HDL	: Yüksek dansiteli lipoprotein
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
L-NMMA	: NG-monometil L-arjinin
NADP+	: Nikotin amid adenin dinükleotid (Okside form)
NADPH	: Nikotin amid adenin dinükleotid (Redükte form)
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz
NOS	: Nitrik oksit sentaz
PIP2	: Fosfatidilinozitolbifosfat
PRMT	: Protein arjinin metil transferaz
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
SDMA	: Simetrik dimetil arjinin
SKB	: Sistolik kan basıncı
SLE	: Sistemik Lupus Eritematozus
VLDL	: Çok düşük dansiteli lipoprotein
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

1. ÖZET

Gebelik fizyolojik bir durum olup gebelik sırasında ortaya çıkan bazı hastalıklar hem anne hem de fetusta olumsuz etkilere yol açar. Bu olumsuz etkilerin en önemlisi preeklampsi olup obstetrik jinekolojinin önemli bir sağlık problemidir. Preeklampsi insidansı toplumlara göre % 2-10 arasında değişmektedir. Tedavisindeki temel problem, fizyopatolojisinin net olarak anlaşılammış olmasıdır. Bu durumun gelişiminde genetik faktörler ve nitrik oksit bağımlı vazodilatasyon önemli bir rol oynar. Bu çalışmada eNOS enzimidaki genetik polimorfizmin preeklampsi gelişiminde etkili olup olmadığı ve bu hipotezin ADMA birikimi ile ilişkisini araştırmak amaçlanmıştır. Araştırmamızda Glu298Asp varyantını kodlayan G/A polimorfizmi çalışılmıştır. Bu gendeki polimorfizm, protein yapısında değişikliğe neden olan ve NO sentezi ile ilişkili olan bir polimorfizmdir. Hamilelerde; Glu298Asp varyantı, ADMA, ve arjinin düzeyleri preeklampsili gebe grubu ve normal gebe grubu ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Çalışmada; 55 preeklampsili gebe ve 54 normal gebe incelendi. eNOS Glu298Asp genotip dağılımlarında ve allel sıklıklarında preeklampsili gebe ve normal gebe grupları arasında önemli bir farklılık görülmedi. ADMA, SDMA, Arjinin ve ADMA/SDMA değerleri preeklampsili gebe grubunda normal gebe grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.0001$). Normal gebelerdeki Arjinin/ADMA oranı preeklampsili gebelere göre daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Sonuç olarak; eNOS Glu298Asp polimorfizminin preeklampsi gelişme riski üzerine doğrudan bir etkisi bulunmamıştır. Preeklampsi'li gebelerde; ADMA, SDMA ve Arjinin ölçümlerinin preeklampsi gelişimini belirlemede faydalı olabileceği görülmektedir.

Anahtar kelimeler: ADMA, eNOS gen polimorfizmi, preeklampsi

2. ABSTRACT

Glu298Asp Polymorphism of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene and Plasma Concentrations of Asymmetric Dimethylarginine in Pre-eclampsia

Pregnancy is a physiological state same disorders occurring is pregnancy can pose negative effects to both mothers and fetus , the most prominent one of these negative effects is preeclampsia ,which is an important health problem of obstetric gynecology. Incidence of preeclampsia varies between 2 to 10 % in various nations since its pathophysiology is not well established this brings about the main difficulty in the treatment. Genetic factors nitric oxide (NO) dependent vasodilatation play an important role in its development. In the current research, it was aimed to investigate whether or not genetic polymorphism of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) can play a role in preeclampsia and to enlighten the correlation of Asymmetric dimethylarginine (ADMA) accumulation with this hypothesis. G/A polymorphism encoding Glu 298Asp variant was studied. Polymorphism of this gene causes alteration in protein structure and is related to NO synthesis . Glu 298Asp variants, ADMA and arginine levels were compared in pregnant women with and without preeclampsia. 55 women with preeclamptic pregnancy and 54 normal pregnant women were included in the study. The difference in eNOS Glu 298Asp genotype distribution and allele frequencies of preeclampsia and normal pregnant women were found to be statistically insignificant . ADMA, SDMA , arginine and ADMA /SDMA ratio were found to be significantly higher in preeclampsia pregnant women compared to women with normal pregnancy ($p < 0.0001$) . In women with normal pregnancy arginine /ADMA ratio was found to be increased compared to those with preeclamptic pregnancy , however this difference was statistically insignificant .

In conclusion , no direct effect of eNOS Glu 298Asp Polymorphism on preeclampsia risk was found .It appears that ADMA ,SDMA and arginine measurements could be beneficial in determining preeclampsia development .

Key words : ADMA, eNOS, gene polymorphism, preeclampsia

3.GİRİŞ

Gebelik fizyolojik bir durum olup gebelik sırasında ortaya çıkan bazı hastalıklar hem anne hem de fetusta olumsuz etkilere yol açar. Bu olumsuz etkilerin en önemlisi preeklampsi olup obstetrik jinekolojinin önemli bir sağlık problemidir. Preeklampsi özellikle doğum öncesi bakım hizmetlerinden yeterince faydalanamayan bölgelerde sık görülmektedir ve maternal ölüm nedenleri arasında önemli bir yer tutmaktadır (30,88). Gebeliklerin yaklaşık olarak %5-10'u hipertansiyon ile birlikte seyreder ve preeklampsi için yüksek risk grubunu; primigravida, çok genç veya ileri yaş, diabet veya hipertansiyon gibi sistemik hastalığı olanlar ile önceki gebelikte preeklampsi öyküsü olan kişiler oluşturmaktadır (38,95,96).

Preeklampsi; gebeliği komplike eden, maternal morbidite ve mortaliteyi artıran, etyolojisi tam olarak aydınlatılmamış önemli bir sağlık sorunudur. Damar endotel hasarının ve vazospazmın preeklampsi fizyopatolojisinde önemli bir rol oynadığı Chesley adlı araştırmacı tarafından tanımlanmıştır(20). Preeklampsi; etyolojisi tam olarak aydınlatılmadığı için günümüzde etkili bir primer korunma yöntemi de bulunmamaktadır. Son onyılda yapılan araştırmalar ile preeklampsi için bazı major risk faktörleri belirlenmiştir. Bu risk faktörlerinin manipülasyonu, preeklampsi sıklığını azaltabilir(28).Perinatal, neonatal ve maternal morbidite ve mortaliteyi artıran preeklampsinin önlenmesi, perinatal ve maternal sonuçları iyileştirebilir. Bu nedenle preeklampsinin erken saptanması uygun koruyucu önlemlerin alınmasına yardımcı olur (95). Preeklampsinin öngörülebilmesi hatta erken teşhisi için yeni tanı yöntemleri geliştirilmesi ve fizyopatolojik bozuklukların düzeltilmesi için yeni tedavi metodları bulunması gerekmektedir (29). Preeklampsi fizyopatolojisinde endotel hasarının önemli bir rol oynaması nedeniyle, son zamanlarda plazma ADMA seviyeleri ile preeklampsi ilişkisini araştıran çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda, artmış plazma ADMA düzeyi ile preeklampsi riskinin arttığı ve preeklampsi gebelerde plazma

ADMA düzeyinin yüksek olduğu saptanmıştır (70). ADMA düzeylerinin endotel disfonksiyonu ile seyreden okluziv vasküler hastalıklar ve aterosklerozis gibi durumlarda da yüksek bulunduğu bildirilmiştir (100).

Ellis ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada; normotensif hamile kontrollere göre orta ve şiddetli preeklampsili kişilerde plazma ADMA düzeylerinin arttığı bulunmuştur. Ayrıca; preeklampsinin klinik belirtileri gelişmeden önce gebeliğin 23.cü haftasından itibaren preeklampside artmış plazma ADMA düzeylerinin olduğu açıklanmıştır(32).Bu bulgular; plazma ADMA düzeylerinin preeklampsinin patogeneğinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

İnsanlarda eNOS geninin 3 değişik polimorfizm varyasyonu bulunmuştur. Promotor bölgede 3 tek nükleotid değişimi Thr786Cys, Ala922Gly ve Thr1468Ala. saptanmıştır.Bu polimorfizmlerin, transkripsiyonunun enzim düzeylerini değiştirebildiği gösterilmiştir. eNOS geninin Thr786Cys polimorfizmi miyokard enfarktüsü ve diyabet ile ilişkili bulunmuştur (71,112). Bulunan son polimorfizm ise ekson 7'nin açık okuma bölümünde, Glu298Asp değişimi olarak saptanmıştır. Bu polimorfizmin sonucunda proteinin primer yapısında ve fonksiyonunda değişim olur.Bazı çalışmalarda, bu polimorfizmin hipertansiyon, koroner arter hastalığı ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (68,72).Çalışmamızda, plazma ADMA düzeyi ve eNOS Gen polimorfizmlerinden Glu298Asp ile preeklampsi arasındaki ilişkiyi araştırmak amaçlanmıştır.

3.1. Preeklampsi

3.1.1.Tanımı

Gebelik, tansiyonu normal olan kadınlarda tansiyonu yükseltebilir, veya mevcut olan hipertansiyonu ağırlaştırabilir.Gebeliğin ortaya çıkardığı veya ağırlaştırdığı hipertansiyona proteinüri, ödem veya her ikisi eşlik edebilir. Preeklampsi insidansı toplumlara göre % 2-10 arasında değişmektedir (87). Preeklampsi sadece gebeliğe özgü bir bozukluktur ve gebeliğin sonlanmasıyla ortadan kalkmaktadır. Plasenta da dahil

olmak üzere birçok organda bozulmuş perfüzyonla seyreder. Maternal ve fetal morbidite ve mortalitenin önde gelen sebeplerinden biridir (87). Tedavisindeki temel problem, fizyopatolojisinin net olarak anlaşılammış olmasıdır.

Preeklampsi, gebelikte hipertansiyona eşlik eden proteinüri ve/veya ödem ile karakterize olup gebeliğin başlangıcında kan basıncı normal olan bir hastada 20.ci gebelik haftasından sonra kan basıncının 140/90mmHg ve daha yüksek olması ya da önceki değerlere göre sistolik basınçta 30 mmHg diyastolik basınçta ise 15 mmHg'lık bir artış hipertansiyon açısından tanı koydurucudur. Proteinüri ise, 6 saat arayla alınmış en az iki idrar örneğinde 300mg/dL ve daha fazla protein saptanmasıdır. Preeklampside ödem yaygın görülmekle beraber; özellikle el sırtında ve yüzde belirgindir (3).

Preeklampsi için bilinen risk faktörleri, nulliparite, 20 yaşından küçük veya 35 yaşından büyük olunması, çoğul gebelik, preeklampsi öyküsü, vasküler ve bağ doku hastalıkları, antifosfolipid sendromu, obezite ve Afrika ırkı kökenli olmaktır (26). Bunun yanında genetik ve çevresel etkenler de araştırılmaktadır. Genetik etkenler arasında ailesel trombofililer ön plana çıkmaktadır(88).

3.1.2. Preeklampsi Fizyopatolojisi:

Preeklampsi fizyopatolojisi ile ilgili her türlü teori, gebeliğe bağlı hipertansif bozukluklara karşı aşağıdaki özellikleri taşıyan kadınların daha hassas olduklarını gösteren gözlemleri dikkate almak zorundadır:

- 1- Koryon villusa ilk kez maruz kalanlar
 - 2- Koryon villusa ikiz gebelik veya mol hidatiformda olduğu gibi aşırı maruz kalanlar
 - 3- Daha önce varolan bir vasküler hastalığı olanlar
 - 4- Gebelikte hipertansiyon gelişmesi açısından genetik predispozisyonu olanlar
- (72).

Koryon villus yaşamsal olsa da, fetusu desteklemeye veya uterusun içinde yerleşmeye gereksinim duymaz. Preeklampsi-eklampsi fizyopatolojisinin temeli vazospazmdır. Bu görüş ilk olarak Volhard tarafından; tırnak yataklarında, okuler fundi'de ve bulbar konjunktivada direk gözlemlere dayanılarak geliştirilmiştir ve çeşitli etkilenmiş organlardaki histolojik değişikliklerden yola çıkılarak geçerliliği öne sürülmüştür(25).Vasküler daralma kan akımına karşı dirence yol açar ve arteriyel hipertansiyon gelişmesine olanak sağlar. Vazospazmın kendisinin de damar üzerine zarar verici bir etkisinin olduğu muhtemeldir. Bunun da ötesinde anjiotensin II, endotel hücrelerinde büzölmeye neden olur. Bu değişikliklerin endotel hücre hasarına yol açması olasıdır ve interendotelyal hücre trombosit ve fibrin dahil olmak üzere kan bileşenlerini sızdırmaya başlar ve subendotelyal depolanma gerçekleşir. Tüm bu vasküler değişiklikler, çevre dokulardaki lokal hipoksi ile birlikte olası bir hemoraji, nekroz ve ağır preeklampside bazen görüldüğü gibi fibrin depolanmasının önemi ortaya çıkmaktadır (72).

Preeklampsinin, gebelikte ortaya çıkan patogenezi derinlemesine anlayabilmek için, endotel hücre aktivasyonu temel nokta olarak gözükmektedir. Preeklampsi, fetoplasental hipoperfüzyonla sonuçlanan spiral arterlerin trofoblastik invazyonunun, immunolojik olarak yönlendirilen bir yetersizliğidir. Bunların sonucunda maternal dolaşıma faktör veya faktörlerin salınımı gerçekleşir. Endotel hücre fonksiyonunda yaygın değişiklikler sonucu, preeklampsi klinik sendromu ortaya çıkar. İntakt endotelin, antikoagulan özelliklere sahiptir ve vasküler düz kasların agonistlere yanıtını yumuşatır. Diğer yandan hasarlı bir endotel, koagulasyonu destekleyici yönde endotel hücrelerini aktive eder ve vazopressör ajanlara karşı duyarlılığı artırır. Preeklampside, endotelyal aktivasyonun sonraki kanıtları arasında, glomerüler kapiller endotel

morfolojisindeki karakteristik değişiklikler, artmış kapiller permeabilite ve böylesi bir aktivite ile ilişkili maddelerin artmış kan düzeyleri sayılabilir(26,27).

Preeklampsi, uteroplasental iskemi, endotelyal disfonksiyon ve aktive olmuş koagülasyon ile karakterize multifaktöryel bir patolojidir.

3.1.3.Gebelik Ve Hipertansiyon

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 7 farklı ülkede yapılan bir çalışmada Preeklampsili gebelerde diastolik hipertansiyon %5-33, proteinüri %0.9 -21, ödem ise %1- 38 gibi çok farklı oranlarda bulunmuştur (103,104).Gebelikte hipertansiyon konusunda terminolojik farklılıklar ve karışıklıklar olması üzerine National High Blood Pressure Education Program Working Group 2000 gebelerde görülen hipertansiyonu 5 gruba ayırmıştır (83):

- 1)Gestasyonel Hipertansiyon
- 2)Kronik Hipertansiyon
- 3)Kronik Hipertansiyon Zemininde Gelişen Preeklampsi
- 4)Preeklampsi
- 5)Eklampsi

3.1.3.1. Gestasyonel Hipertansiyon

Gestasyonel Hipertansiyon; önceleri gebeliğin indüklediği hipertansiyon veya geçici hipertansiyon olarak adlandırılıyordu. Gestasyonel hipertansiyon tanısı için kan basıncı 140/90 mmHg ya da daha fazla bir değere ilk defa gebelik sırasında yükselmiş olmalı, proteinüri eşlik etmemeli, ve postpartum 12. haftaya kadar kan basıncı değeri normal değerine dönmelidir. Bu yüzden gestasyonel hipertansiyon tanısı ancak doğumdan sonra mümkün olur. Preeklampsinin başağrısı, trombositopeni, epigastrik hassasiyet gibi bulguları eşlik edebilir. Bu bulgular eşlik ederse hastada preeklampsi gelişme riski daha yüksektir (27).

3.1.3.2. Kronik Hipertansiyon

Kronik hipertansiyon tanısı koyabilmek için; gebelikten önce de kan basıncının 140/90 mmHg üzerinde olması 20.ci gebelik haftasından önce de kan basıncının 140/90 mmHg üzerinde ölçülmesi (gestasyonel trofoblastik hastalık yokluğunda) ve Postpartum 6. hafta sonrasında da kan basıncının 140/90 mmHg üzerinde devam etmesi gerekmektedir (27).

Kronik hipertansiyon; genellikle multigravid, obez, 30 yaş üstü, diğer organ patolojileri (diabet, renal hastalık, SLE, v.b.) olan hastalarda siktir. Etiyolojisi multifaktöriyel olmasına karşın büyük bir kısmında hipertansiyon nedeni bilinmemektedir (Esansiyel Hipertansiyon). Hipertansiyonda güçlü bir aile hikayesi mevcuttur. Hasta gebe olsun veya olmasın kronik hipertansiyon ; ventriküler hipertrofi ve buna bağlı kardiovasküler yetersizlik, serebrovasküler olay ve böbrek hasarına neden olur ve bu durum önemli bir morbidite nedenidir (27).

Gebelikte kronik hipertansiyonu olan kadınlarda süperempoze preeklampsi, dekolman plasenta, fetal gelişme geriliği ve prematürite riski artmıştır (39). Eğer hasta 20.ci gebelik haftasına kadar görülmemişse kronik hipertansiyon tanısı koymak zorlaşır. Kan basıncı gebelikte özellikle 2. ci trimester ve 3 cü .trimester başlarında düşmekte ve daha sonra tekrar yükselmektedir. Bu yüzden preeklampsi ve kronik hipertansiyon ayırımı yapılamaz. Ancak postpartum hipertansiyonun devam etmesi ile ayırıcı tanı yapılabilir.(57).

3.1.3.3. Kronik Hipertansiyon Zemininde Gelişen Preeklampsi

Kronik hipertansiyon tanısı konmuş bir gebede 20.ci gebelik haftasından sonra kan basıncının yükselmesi ve buna proteinüri eklenmesi hastalığa tanı koymak için gereklidir. Kronik hipertansif bir gebede preeklampsi gelişmesi, gebe için önemli bir tehlikedir (41).

Kronik hipertansif gebelerin %25 ve fazlasında süperempoze preeklampsi görülür. Ayrıca bu hastalarda plasenta dekolmanı riski de belirgin olarak artmıştır (92). Kronik hipertansiyonu olan gebeler tipik olarak 24.cü gebelik haftasından sonra daha da kötüleşir ve kronik hipertansiyon olmadan preeklampsi gelişen gebelere göre daha ağır seyreder ve kronik hipertansiyon zemininde preeklampsi gelişen hastalarda fetal gelişme geriliği insidansı daha fazladır (27).

3.1.3.4. Preeklampsi

Preeklampsi gebeliğe özgü, endotel disfonksiyonu ve vazospazma sekonder azalmış organ perfüzyonu ile seyreden bir durumdur. Chesley proteinürinin preeklampsinin önemli bir bulgusu olduğunu tanımlamıştır (20,27).

3.1.3.5. Preeklampsi Tanı Kriterleri

Preeklampsi Tanı Kriterleri

a) 20.ci gebelik haftasından sonra daha önce normal kan basıncı ölçüleri olan kadında sistolik kan basıncının 140 mmHg ve üzeri ve/veya diastolik kan basıncının 90 mmHg ve üzerinde ölçülmesi.

b) 24 saatlik idrarda 300 mg/dL ve üzerinde protein atılımı (8).

Daha önceleri sistolik kan basıncının 30 mmHg diastolik kan basıncının 15mmHg ve üzerinde artışı preeklampsi tanısında kullanılan bir kriter olarak kabul edilmesine rağmen Levin ve arkadaşları bu değerlerin sonuçlar üzerinde etkili bir prognostik faktör olmadığını göstermişlerdir(60). Bunun üzerine Uluslararası Hipertansiyon Çalışma Grubu (National High Blood Pressure Education Program Working Group 2009) bu değerleri preeklampsi tanı kriterlerinden çıkarmış, ancak bu kadınların daha yakın takip edilmesini önermiştir (84). Kan basıncındaki günlük değişimler ve ikinci trimesterde kan basıncının düşüp sonradan yükselmesi, kronik hipertansif gebelerin yanlışlıkla preeklampsi olarak değerlendirilmesine yol açabilir (84). Preeklampside hipertansiyon, olguların erken ve kesin bulgusudur. Uluslararası Hipertansiyon Çalışma Grubuna göre

diastolik 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 alınmalıdır. Kan basıncı ölçümünden 30 dakika öncesine kadar, sigara veya kahve içilmemiş olmalıdır (84).

Proteinüri glomerüler hasarın göstergesidir. Proteinüri dipstik veya sülfosalisilik asit ile ölçülmektedir. 24 saatlik idrarda 300 mg/ dL ve üstü protein saptanması, 6 saatlik veya daha fazla ara ile alınan en az 2 idrar örneğinde 1+'den fazla proteinüri olması patolojik proteinüri tanısı için yeterlidir (8). Yapılan çalışmalarda dipstik ile tespit edilen protein düzeyi ve 24 saatlik idrardaki protein miktarı arasında zayıf bir ilişki vardır. O yüzden 24 saatlik idrarda protein miktarı proteinüri için ana belirleyici test olmalıdır (84).

Preeklampsi zaman zaman renal damarlardaki spazm ile karakterize bir durum olduğu için farklı idrar örneklerinde değişen miktarlarda protein bulunur. İdrardaki protein miktarı kan, bakteri, vaginal sekresyon ve amnion sıvısının kontaminasyonu ile değişebilir. Dansitenin 1010 altında ya da 1030 üstünde olması, pH'nın 8 üzerinde olması, egzersiz ve postür de proteinüri miktarını değiştirebilir (8). Ödem; serum kolloid onkotik basıncının düşmesi ve kapiller permeabilitenin artmasıyla oluşur (48). Preeklampsili hastalarda, hem proteinüri hem de vasküler endotel hasarı ile permeabilite artışı ve ödem oluşur. Bazı çalışmalarda hafif ve orta derecede ödemin %80 oranında görüldüğü'nün gösterilmesi, ödemin tanıdaki yerinin sorgulanmasına neden olmuştur (104). Ödem, birçok normal gebe kadında görüldüğü için günümüzde tanısal kriter olmaktan çıkmıştır (48).

3.1.3.6. Eklampsi

Preeklampsili kadında yeni başlamış grand mal konvulsiyonların varlığı eklampsi olarak tanımlanır (8). Doğumdan 48-72 saat sonra hastada ilk defa görülen grand mal konvulsiyonda tanı büyük olasılıkla eklampsidir. Konvulsiyon ve komanın başka nedenleri dışlanmalıdır. Önceki iki dekatta görülme sıklığı 1/700 iken günümüzde insidansı 1/2000-3250 arasındadır (27).

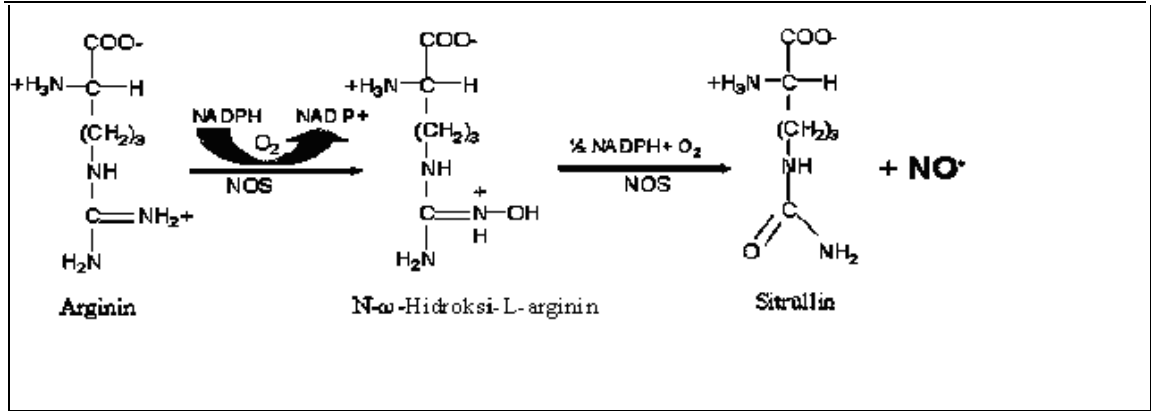
Eklampside konvulsiyonlar tonik- klonik tiptedir ve doğumdan önce, doğum sırasında ve doğumdan sonra görülebilir. Konvulsiyonlar en çok doğumdan 48 saat sonra ve nulliplarlarda görülmesine rağmen postpartum 10.cu güne kadar görülebilir (27). Eklampside mortalite oranı %14 civarında iken günümüzde azalmıştır. Mattar ve Sibai tarafından yapılan bir çalışmada, 399 eklampsili hasta değerlendirmiş ve major komplikasyonlar; %10 dekolman plasenta, %7 nörolojik defekt, %7 aspirasyon pnömonisi, %5 pulmoner ödem, %4 kardiovasküler arrest, %4 akut böbrek yetmezliği, %1 maternal ölüm olarak tespit edilmiştir (66,93).

3.2. Nitrik Oksit

Nitrik oksit (NO), molekül ağırlığı 30 kD olan, yağda çözünen, biyolojik membranlardan kolaylıkla geçebilen, 3-5 sn gibi çok kısa bir yarı ömre sahip, serbest radikal özelliğinde renksiz bir gazdır. Nitrojen oksit türevlerinden biri olan NO radikali endojen olarak sentezlenmektedir. NO sentezi bazı hücrelerde bir reseptöre bir stimülatörün bağlanması sonucunda veya nöronlarda sinir uyarısına cevap aşamasında oluşur. NO çeşitli reseptörlerin aktivasyonu sonucu L-arjinin ve oksijenden, nitrik oksit sentaz enzimi aracılığı ile sentezlenir (Şekil 1). NO sentezi sırasında moleküler oksijen ile kofaktör olarak nikotinamid adenin dinükleotidposfat, (NADPH), flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN) ve tetrahidrobiyopterin (BH₄)'e ihtiyaç duyulur (5,50).

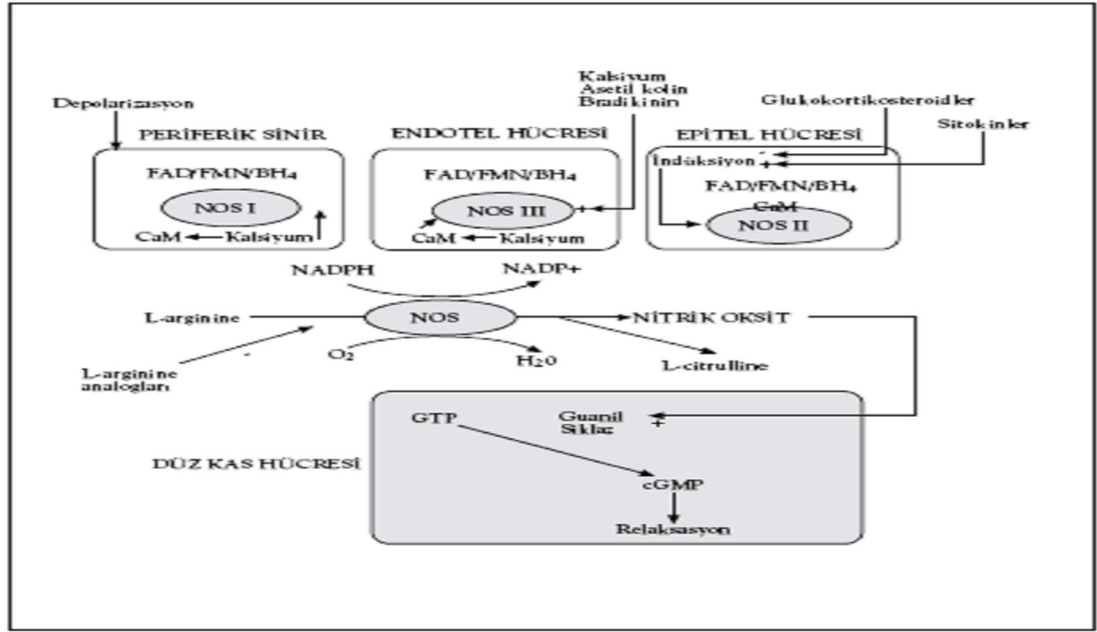
Nitrik oksit sentezi insanda vasküler tonüs düzenlenmesinde, kan basıncı ve böbrek fonksiyonunun kontrolünde kesin bir role sahiptir. NO vasküler endotel hücrelerde oluşan önemli bir vazodilatördür. NO, düz kas hücrelerine girerek 3',5'-siklik GMP (cGMP) oluşturmak üzere soluble (çözünabilir) (sGC) guanilat siklazı stimüle eder (31).

Hücrede cGMP konsantrasyonunun artmasıyla, cGMP bir veya daha fazla protein kinazı aktive eder. Aktive protein kinazlar düz kas relaksasyonu ve damar dilatasyonundan sorumludurlar (50,76).



Şekil 1: Nitrik oksidin NOS enzimi etkisiyle L-arginin aminoasidinden sentezlenmesi (74).

Diğer radikal türlerinden farklı olarak (oksijen ve karbon merkezli radikaller), nitrik oksit radikalinde paylaşılmamış elektron sadece nitrojen atomu üzerinde değil, nitrojen ve oksijen atomları üzerindedir. Bu özellikle nitrik oksit radikalinin reaktivitesi baskılanırken stabilitesini arttırmaktadır. Biyolojik şartlarda sentez yerinden uzak mesafelere difüzyonunu kolaylaştırır. Karbon merkezli radikaller ve oksit radikallerde, paylaşılmamış elektron tek atom üzerinde lokalize durumdadır. Bu türler son derece reaktif, kısa ömürlü ve difüzyonları kısıtlıdır (50,51).



Şekil 2: Nitrik oksit (NO) kaynakları ve oluşumu. Nitrik oksit sentezleyen enzim (iNOS) (76).

Endojen NO oluşturan tek kaynak nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleridir (Tablo1). NOS, fizikokimyasal ve kinetik özelliklerine göre iki gruba (konstitütif ve indüklenebilir) ayrılır. NOS'ları sentezleyen 3 gen bulunur ve bu genlerden herbiri bir NOS izoformunu oluşturur (NOS1, NOS2, NOS3) Bu enzimin izoformları nöronal (nNOS), endotelial (eNOS) ve indüklenebilir olmak üzere üç şekildedir. nNOS ve eNOS izoformları aktif hale gelmek için Ca^{+2} ye ihtiyaç duyduğundan konstitütif (yapısal) enzimler olarak adlandırılırlar. Bu enzimler tarafından üretilen düşük konsantrasyondaki NO sinir sistemi ve düz kaslarda hücre içi ve hücreler arası haberci olarak görev alır. Böylece sitoplazmik guanilat siklazı aktive eder ve hücrelerde cGMP derişimini arttırır. cGMP çeşitli enzimler aracılığı ile hücre içi kalsiyum derişiminin düzenlenmesini sağlar. Nöral NOS (nNOS) ve endotel kökenli NOS (eNOS) izoformlarının düşük miktarda sentezlenmesinin sebebi hücre içi iyonize kalsiyum konsantrasyonunun azalmasıyla enzimin inaktif duruma geçmesidir(1,18,50,76,). Enzimin indüklenebilir (iNOS) formu ilk önce fagositik lökositler olmak üzere endotoksin ve/veya değişik sitokinlere cevap olarak makrofajlar ve diğer hücre

tiplerinin uyarılmasıyla salgılanır. iNOS enziminin aktivitesi kalsiyumdan bağımsızdır. Ortamda arjinin olduğu sürece aktiftir. Bu durumda uzun süreli ve yüksek derişimde NO sentezini katalizleyebilir (9,18,50,76).

Tablo 1: Nitrik oksit sentezleyen enzimler (76)

NOS İzofrom	Diğer Adı	Salınım	Kaynak	Regülasyon	NO miktarı	Kromozom
Tip I	nNOS	Devamlı	Sinir hücreleri	Kalsiyuma bağımlı	Düşük (picomol)	12
Tip II	iNOS	İndüklendiğinde	Makrofaj, damar düz kası, damar endoteli, miyokard, eendokart, hepatosit, immün, hücreler, hava yolu epiteli	Sitokinler, endotoksin, veoksidanlar tarafından indüklenme	Yüksek (nanomol)	17
Tip III	eNOS	Devamlı	Vasküler endotel hücreleri, plateletler, miyokard ve endokart, mast hücreleri, nötrofiller	Kalsiyuma bağımlı	Düşük (picomol)	7

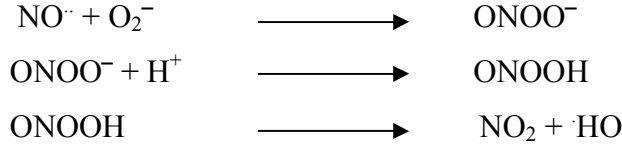
NO nitrik oksit, NOS nitrik oksit sentezleyen enzim, NNOS nöral NOS, iNOS indüklenebilen NOS, eNOS endotel kökenli NOS

Fizyolojik miktarda üretilen NO'nin aktivitesi, hem içeren proteinlerle özellikle oksihemoglobin metilen mavisi ve süperoksit anyonu tarafından nitrata (NO_3^-) ve/veya nitritlere (NO_2) oksitlenerek sonlandırılır. Nitrik oksiti ortamdaki uzaklaştıran özel bir enzim yoktur. NO metabolitleri böbrek yoluyla 5-8 saatte atılır. Aerobik ortamda NO stabil değildir. NO derişiminin artması sonucu oksidasyonu hızlanır. Bu nedenle ortamdaki derişimi ile ömrü arasında ters bir orantı vardır. iNOS enziminin indüksiyonuyla NO derişimi artar ve oksidasyonu da hızlanır. Bunun sonucunda çeşitli reaktif nitrojen oksit türleri oluşur. Bunlar hücre sel moleküllerin nitrozilasyonuna, nitrasyonuna, nitrozasyonuna ve protein/enzim inaktivasyonuna neden olabilirler (18,38,50,51).

Düşük reaktiviteli NO radikali, metal içeren merkezler ve radikallerle hızlı tepkimeye girer. Hücre zarında lipid radikalleri ile etkileşime girmesi NO'e antioksidan etki kazandırır. Süperoksit ve NO'nin tepkimesi sonucunda oluşan peroksinitrit (ONOO^-), hidroksil radikaliyle benzer aktiviteye sahiptir. ONOO^- ; güçlü bir oksidan olarak biyolojik sistemlerde membranlarda lipid peroksidasyonuna ve protein oksidasyonuna

neden olmakta ve ileri dekompozisyonla nitrojen dioksit ve hidroksil radikalının oluşumuna yol açmaktadır (9,12,30,42).

NO radikalının dekompozisyonuyla nitrojen dioksit ve hidroksil radikalının oluşumu



Biyolojik olarak HO[·]'in yıkıcı bir molekül olduğu bilinmektedir. Peroksinitrit ise tirozin gibi fenolik aminoasitleri nitrolayarak toksik nitro-türevlerinin (nitrotirozin) oluşumuna yol açmaktadır. Ayrıca DNA, enzim, protein, lipid ve tiyol gruplarını okside edip inaktifleştirebildiğinden yüksek toksisiteye sahiptir (12,49,59).

3.2.1. Nitrik Oksit ve Preeklampsi

Son çalışmalarda NO'nin insan uterusunda sentezlendiği ve uterusun vasküler ağının parakrin kontrolünde bir rol oynadığı ileri sürülmektedir (97). Gebelik, doğum, steroid hormonlar ve prostoglandinler NO'nin uterusdaki üretimini ve etkisini module eder (109). NO; gebelik sırasında plasenta, desidua ve miyometriyum tarafından üretilir ve uterusun hareketsizliğinin devamlılığında rol oynar (34,109). Gebe olmayan uterusda da NOS enzimi; miyometriyum ve endometriyumda tanımlanmıştır(97). İnsan uterusunda NO'nin potansiyel rolü spekülatifdir. Ancak implantasyondan önce ve gebelik sırasında uteroplental dolaşıma karışır, mensturasyon sırasında platelet aktivasyonunu inhibe eder ve gebelik sırasında miyometriyal kontraktiletiyi baskılar (74). NOS aktivitesi özellikle ilk trimesterde villöz trofoblastlarda nispeten yüksektir. Miyometriyal NOS tarafından üretilen total NO'e göre, villöz trofoblast tarafından daha az üretilen NO, parakrin bir etkiyle uterus hareketsizliğinin devamlılığında bir rol oynar (82). İnsanda indüklenebilir NOS izoformu endometriyum sekretorik fazda iken belirlenmesine rağmen, proliferatif ve inaktif endometriyumda saptanmamıştır(99).

Menstrasyon sırasında iNOS aktivitesi proliferasyon ve sekresyon fazındaki 6 katıdır. Oysa asıl NOS (eNOS, nNOS) aktivitesi değişmeden kalır(98). Gebelik sırasında östrojen, NO üretimini modüle eder ve NO konsantrasyonu ile metabolitleri olan nitrat ve nitritler, cGMP ve bunu sentezleyen enzimler (13,37) ve uterus arterlerinde eNOS aktivitesi artar (37). Ayrıca, NO uterusdaki patolojik olgularda da rol oynayabilir. Menstrasyon sırasında NO üretiminin artışı menorajiye neden olur. Gebelik sırasında NO üretimindeki bir değişim ise preeklampsi oluşturur (21,29).

3.3. Gen Analizleri için Kullanılan Örnekler

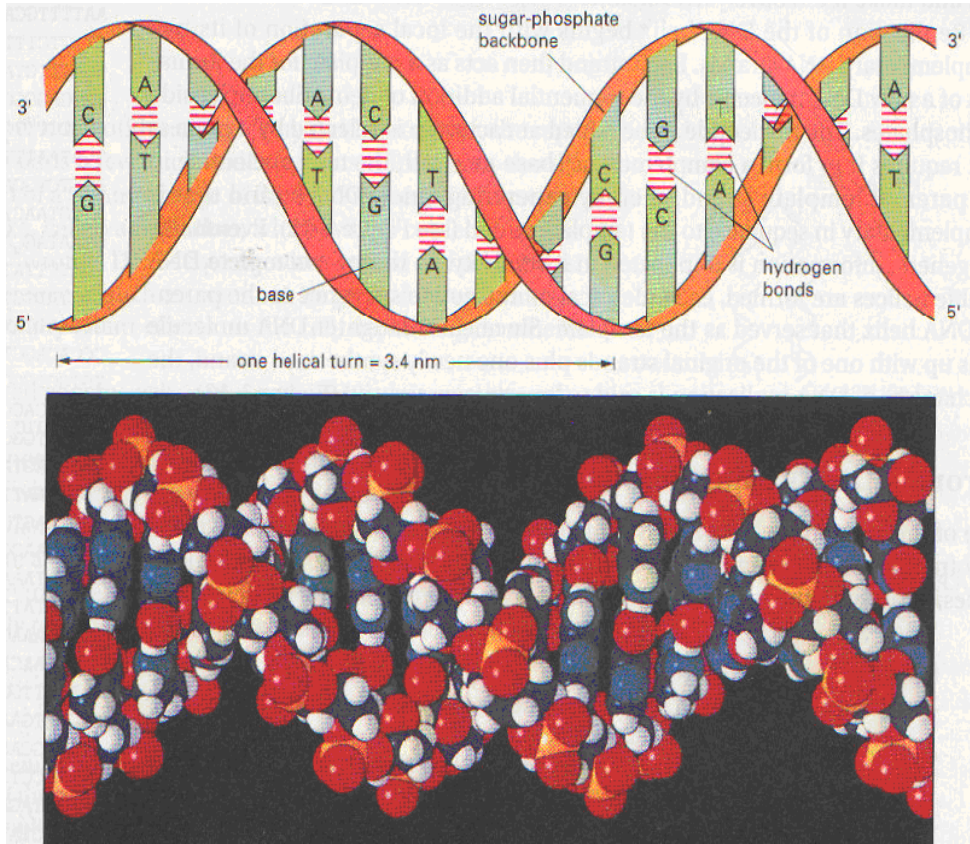
İnsanda gen analizleri için kan iyi bir örnektir çünkü alması ve çalışması diğer dokulara göre daha kolaydır. Kanda çekirdeği dolayısıyla kromozomları ve DNA'sı olan tek hücre lökositlerdir (47).

3.3.1. Deoksiribonükleik Asit (DNA)

Deoksiribonükleik asit (DNA), dünya üzerindeki bütün canlı organizmaların özelliklerini belirleyen bir kimyasal maddedir. Bir ağacın yapraklarının rengini, bir kurdun azı dişlerinin büyüklüğünü, bir zürafanın boyunu veya ayak parmaklarımızın şeklini DNA belirler. DNA bir organizmanın oluşumuna ilişkin bilgileri taşır. DNA molekülleri, hücre çekirdeğinde bulunurlar ve vücudumuzda bulunan tüm proteinler ile ilgili kodlanmış bilgileri içerir (103) Nükleik asitlerin iki türü olan deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) temelde aynı yapısal özelliklere sahiptir. Ayrıca DNA molekülü prokaryotlarda (bakteriler) kromozom dışı genetik sistem olan plazmidlerde, ökaryotik hücrelerde genetik materyalin kromozomlar (Nükleus) dışında temel olarak mitokondri (hayvan ve bitkilerde) ve kloroplastlarda (sadece bitkilerde ve alglerde) bulunduğu bilinmektedir(103).

DNA molekülü, heliks (sarmal) şeklinde kıvrılmış, iki kollu merdiven şeklindedir. Kollarını, yani merdivenin kenarlarını, şeker (deoksiriboz) ve fosfat molekülleri meydana getirir(103). Deoksiriboz ile fosfat grupları fosfodiester bağlarıyla

birbirlerine bağlanmıştır. DNA molekülünün iki kolu arasındaki merdiven basamaklarında gelişigüzel bir sıralanma yoktur; her zaman Guanin (G), Sitozin'in (C ya da S); Adenin (A), Timin'in (T) karşısına gelir. Pürin (G, A) molekülü ile pirimidin molekülü (C, T) arasındaki hidrojen bağları ve diğer bağlar, meydana gelen heliksin düzgün olmasını sağlar. Pürin ve pirimidin bazları, yandaki şekerlere (deoksiriboz), glikozidik bağlarla bağlanmıştır. Baz, şeker ve fosfat kombinasyonu, nükleus asitlerinin temel birimleri olan nükleotidleri meydana getirmiştir. Dört çeşit nükleotid vardır. Bunlar taşıdıkları bazlara göre isimlendirilirler (A,G,T,C) (103) DNA molekülü kendini oluşturan nukleotidlerin sayısına bağlı olarak, büyüklüğü türden türe değişen, uzun zincir şeklinde bir yapı gösterir. İnsanda bu zincirin uzunluğu açıldığında yaklaşık 2 metredir. Bütün halinde eldesi zincirin hassas ve kırılğan yapısından ötürü çok güçtür (79,80).



Şekil 3 : DNA molekülünün yapısı

3.4. POLİMORFİZM

DNA molekülündeki dizi farklılıklarının olduğu bulunduktan sonra Tıbbi genetik alanında birçok asama kaydedilmiştir. Bir toplumu oluşturan bireylerin kendi aralarında çiftleştiği bir popülasyonda, DNA dizilerinde görülen iki veya daha fazla farklı genetik sınıflarının bulunması polimorfizm olarak adlandırılmaktadır (32,39). Genetik polimorfizm, bir popülasyonda, farklı allellere bağlı olarak genetik olarak belirlenmiş iki veya daha çok alternatif fenotipin görülmesidir. Eğer bir lokustaki allel frekansı en az 0.01 ise ve bu alleli taşıyan heterozigotların frekansı %2'den büyükse bu gen lokusuna polimorfik denebilir. Proteinleri kodlayan insan gen lokuslarının en az 1/3'ünün polimorfik olduğu saptanmıştır (16, 59, 78).

Polimorfizm; gen lokusunda iki veya daha fazla allel yer alabilmesinde (genetik polimorfizm) tüm birey düzeyinde (fenotipik polimorfizm) proteinlerin ve kan grubu bileşiklerinin varyant formlarında (biyokimyasal polimorfizm), kromozomların morfolojik özelliklerinde (kromozomal polimorfizm) veya DNA düzeyinde nükleotid farklılıkları (DNA polimorfizmi) şeklinde görülebilir (77).

Burada yalnızca tekrarlayan mutasyonlarda en düşük sıklıkta görülen allel korunmaz. Bir gen lokusu, nadir alleller en az %1 frekansına sahip oldukları ve sonuçta bu alleller için heterozigotlar en az % 2 oranında görüldükleri takdirde polimorfik olarak tanımlanabilir (77).

Eğer belli bir allelin varlığı ya da yokluğu herhangi bir avantaj ya da dezavantaj sağlamıyorsa, polimorfizm doğal olarak kabul edilir. Bir polimorfizm popülasyon için yarar belirtebilir. Polimorfik bir popülasyonda genetik tek tip popülasyona kıyasla belirli çevre şartlarına ve değişikliklere daha iyi hazırlanmış bireylerin bulunma şansı vardır (77). Genellikle polimorfizm fenotipten anlaşılmaz. Daha çok laboratuvar yöntemleri ile saptanır. DNA'nın nükleotid baz dizilerindeki bireysel farklılık belirlenebilir.

Eğer dizideki bir değişiklik kodonda da bir değişikliğe neden oluyorsa, ilgili bölgeye farklı bir amino asit katılacaktır. Bu, gen ürünü incelenmesi ile gösterilebilir (77). Polimorfizm kimi zaman geçici olabilir, fakat kimi zamanda fenotipler kuşaklar boyu aynı sıklığı sürdürebilir; heterozigot üstünlüğünün de söz konusu olduğu bu durum dengeli polimorfizm olarak adlandırılır (8).

3.5. Endotelyal Nitrik Oksid Sentetaz (eNOS)

Endotelyal Nitrik Oksid Sentetaz (eNOS); 134 kD'luk iki benzer monomerdan oluşan bir dimerdir ve fonksiyonel olabilmesi için dimerik formda olması gerekir. Monomerleri kodlayan gen 7q35-36 kromozomu üzerinde bulunur ve 21 kb'lik 26 ekson taşır. Enzimin dimerik hale gelmesi, *hem* molekülünün bağlanması ile başlar; *hem'in* yokluğunda enzim monomer halde kalır. Dimerik hale geçince enzime tetrahydrobiopterin (BH₄) bağlanması mümkün olur ve dimer kararlı hale gelir. Kararlı hale geçiş aynı zamanda çinko iyonlarına da bağlıdır (5). Dimerin fonksiyonel aktivitesi, bağlanan BH₄ molekülünün sayısına bağlıdır. BH₄ bağlanmamış bir dimer O₂ üretebilirken, bir BH₄ molekülü bağlanmış eNOS dimeri hem O₂ hem de NO üretir. Yüksek düzeyde BH₄ varlığı ise doymuş bir dimer yaratarak sadece NO sentezleyen bir enzim oluşmasını sağlar. Monomerlerin fonksiyonel olarak farklı olan iki kısmı vardır; katalitik bölümü ihtiva eden N-terminal oksijenaz (amino asit 1-491) ve NADPH, FAD ve FMN bağlanma bölümlerinin bulunduğu redüktazdır (amino asit 492-1205). Enzimin hücre içindeki yeri net olarak belirsizdir. Golgi cisimciği, plazma membranı ve en çok da plazmalemmal kaveolada bulunduğu tespit edilmiştir. Kaveolada kaveolin adlı kaplayıcı proteinle sarılı olan eNOS inaktif haldedir. Hücre içi serbest kalsiyumun artması ile enzim bu proteinden ayrılır ve aktif hale gelir ve serbest kalsiyum düzeyi düşene kadar aktif kalır. Aktive olmuş enzim ortamdaki L-Arjinin, oksijen ve

NADPH'dan oldukça fazla NO üretimi yapar. Her ne kadar eNOS enzimi bazal bir düzeyde üretilse de hipoksi, östrojen gibi hormonlar, yükseltgenmiş düşük dansiteli lipoproteinler (LDL) ve mekanik güç gibi faktörler ekspresyonu artırabilir (111).

3.5.1. İnsanda eNOS Gen Polimorfizmleri

Bir gen veya DNA dizisinin alternatif formlarından (allel) birinin toplumda %1'den fazla bulunduğu durumlar polimorfizm olarak adlandırılmaktadır. İnsanlarda eNOS geninin 3 değişik polimorfizm varyasyonu bulunmuştur(24). Polimorfizmlerin; intron 18'de; Ala27Cys ve intron 23'de; Glu10Thr, tek nükleotid değişimi olduğu gösterilmiştir. Bunun yanında intron 4, 12 ve 23'de değişken tekrarları vardır. Bunların sonucunda normal fonksiyonel bir enzim oluşsa da polimorfizmler transkripsiyon ve işlev hızlarında değişime sebep olabilmektedir. İtron 13'de polimorfizmi olan bireylerde artmış koroner arter hastalığı riski olduğu, intron 4'de polimorfizmi olan bireylerde ise artmış diyabetik nefropati riski olduğu saptanmıştır(68,73,113). Promotor bölgede 3 tek nükleotid değişimi saptanmıştır; Thr786Cys, Ala922Gly ve Thr1468Ala. Bu polimorfizmlerin, transkripsiyonu ve dolayısıyla enzim düzeylerini değiştirebildiği gösterilmiştir. Thr786Cys polimorfizmi miyokard enfarktüsü ve diyabet ile ilişkili bulunmuştur (19,113).

Bulunan son polimorfizm ise ekson 7'nin açık okuma bölümünde, Glu298Asp değişimi olarak saptanmıştır. Bu polimorfizmin sonucunda proteinin primer yapısı bozularak, enzimde fonksiyonel değişiklikler oluşturmaktadır. eNOS geni 7. eksonunda Guanin (G) nükleotidinin Timin (T) ile yer değiştirmesi enzim yapısında 298 numaralı glutamat'ın (Glu) aspartat'a (Asp) dönüşmesine neden olmaktadır. Bu polimorfizm ile eNOS geninde 100 kDa ve 35 kDa ürünler ve sonuçta parçalanmaya eğilimli protein ürünleri oluşmaktadır. Yani bu polimorfizm eNOS proteininde fonksiyonel etki yapmaktadır (14,69).

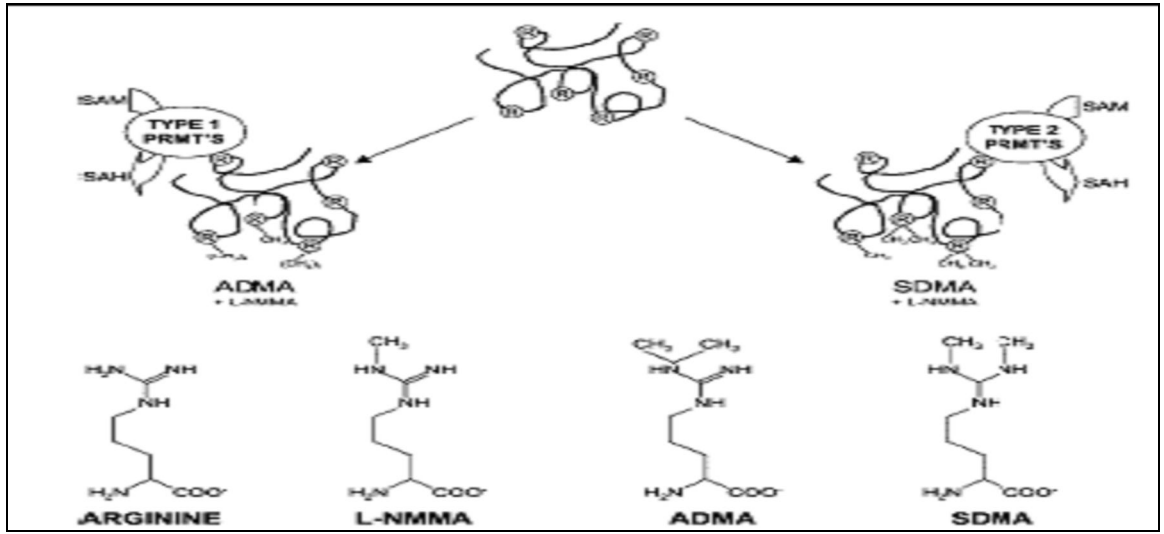
3.5.2. eNOS Gen Polimorfizmleri ve Preeklampsi

eNOS gen polimorfizmleri ile çeşitli hastalıklar arasında ilişki olup olmadığı farklı hasta gruplarında çalışılmıştır. NO'nun gebeliğin major vazodilatatörü olduğu, trombosit ve lökosit agregasyonunu da inhibe ettiği bilinmektedir (15). Normal plasenta villuslarını döşeyen sinsisyotrofoblast hücrelerinin eNOS kaynağı olduğu bildirilmiştir (87). Preeklampsilerde eNOS immün reaktivitesine ilişkin çok az sayıda ve farklı sonuçlar rapor edilmiştir (22). Plasenta; fetomaternal bir organ olup, fetal kısmı koryon tabakasından, maternal kısmı ise desidua bazalisten köken alır. Nitrik oksit, gebelikte güçlü bir vazodilatatör olarak fetoplasental dolaşımın düzenlenmesinde önemli rol oynar (11). Yapılan çalışmalarda insan plasental villuslarında NOS varlığı gösterilmiştir (6). Plasental NOS'ın endotelial tipte olduğu ve sinsisyotrofoblastların plasental eNOS tarafından meydana getirilen NO'in bazal vasküler tonusun sağlanması, trombosit aktivasyonunun önlenmesi ve endotele lökosit adezyonunun sınırlandırılmasında önemli rol oynadığı bildirilmiştir (62,87). Bu bilgiler preeklampside, eNOS dağılımının ve fonksiyonlarının değişebileceğini düşündürmektedir.

3.6. ASİMETRİK DİMETİL ARJİNİN (ADMA)

Asimetrik Dimetil Arjinin (ADMA); plazmada dolaşan, idrarla atılan, hücre ve dokularda bulunan doğal olarak oluşan bir aminoasit olup nitrik oksit sentaz (NOS)'ların endojen bir inhibitörüdür ve bu yönüyle de son zamanlarda ilgiyi üzerine çekmiştir (23). Proteinlerdeki arjinin kalıntılarının, Protein Arjinine Metiltransferaz (PRMT)'ların etkisi ile metillenmeleri sırasında ADMA sentez edilmektedir. NOS'ın üç izoformu, endojen metillenmiş arjininler olan asimetrik dimetil arjinin (ADMA) ve monometilarjinin (L-NMMA) tarafından inhibe edilirler (64). ADMA'nın bir stereoizomeri olan simetrik dimetilarjinin (SDMA), hemen hemen ADMA konsantrasyonlarına eşit miktarda mevcut olup; NOS'ı inhibe etmez .

Bu metilarjininler, proteinlerdeki arjinin rezidülerinin protein arjinin metiltransferazları (PRMT) tarafından metillenmesiyle sentezlenirler (67).



Şekil 4: Arjinin ve metil arjinin türevlerinin oluşumları (50).

ADMA sentezinde rol alan PRMT tip1 enzimi tarafından arjinindeki guanidin nitrojenlerinden birine iki metil grubunu eklemesiyle ADMA oluşturur. PRMT tip2 ise guanidin nitrojenlerinin her birine bir metil grubu eklemesiyle SDMA yı oluşturur. Her iki PRMT enzim tipinden biri tarafından monometil grubu eklenmesiyle de L-NMMA oluşur (64).

Proteinler hidrolize edildikleri için, serbest ADMA ve L-NMMA sitoplazmaya geçer ve NOS'ların substratı olan L-arjinin ile yarışarak NO üretiminin inhibisyonuna yol açarlar (71). SDMA sadece idrarla atılırken; ADMA ise hem DDAH tarafından yıkılarak hem de idrarla vücuttan atıldığı düşünülmektedir.

ADMA ve L-NMMA'nın temizlenmesinin başlıca yolu; dimetilarjinin dimetilaminohidrolazlar (DDAH) tarafından L-sitrullin ve metilaminlere hidrolizidir. Bu nedenle, Arjinin-NO-ADMA yolağında yer alan nitrit/nitrat, NOS aktiveleri, NOS ekspresyonları, arjinin, ADMA, SDMA, DDAH aktiveleri, DDAH ekspresyonlarının ölçümleri ve değerlendirilmeleri çok önem arz etmektedir. ADMA metabolizması

aydınlatıldıkça molekülün kaderinin tayininde böbreğin tek organ olmadığı iyice anlaşılmıştır. Sonuçta pek çok hastalıkta yükselmesinin olabileceğine dair çalışmaların yapılmasına neden olmuştur. Belirgin olarak tüm geleneksel risk faktörleri ve yeni risk faktörlerinin ise büyük çoğunluğu endotel disfonksiyonu ile ilişkili bulunmuştur (17). Endotel fonksiyonunun devamında en önemli yolak NOS aracılığı ile üretilen NO varlığı olarak kabul edilmektedir. Bu yolak üzerine ise en etkin molekül olarak ADMA gözlenmiştir (17,65).

Sonuçta tüm risk faktörleri ADMA artışı üzerinden anahtar role sahip endotel disfonksiyonuna yol açabilmektedirler. Bu durum ADMA'yı risk faktörlerinin etkilerinin kavşak noktası haline getirmektedir. ADMA tarafından üretimi belirgin olarak azaltılan NO sadece vazodilatör etkiye sahip değil aynı zamanda da vasküler hastalığın gelişiminde önemli olan lökosit adezyonu, platelet agregasyonu ve damar düz kas hücre proliferasyonunu da engellemektedir (17,53).

3.6.1. ADMA ve Preeklampsi

Hamilelik esnasında maternal sistemik vasküler fonksiyonlar değişir; uterin kan akımı ve kardiyak verim artarken periferel direnç ve kan basıncı düşer. Deneysel ve klinik çalışmalardan elde edilen kanıtlar kuvvetlice göstermektedir ki artmış NO sentezi, hamilelikte maternal vasküler adaptasyonun önemli bir bölümünden sorumludur (94,106). Pek çok çalışma normotensif hamileliklerde, ADMA düzeyleri ile kan basıncı değişimi arasında ilişki olduğunu gösterir. Hamile olmayan normotensif kontrollere kıyasla normal hamilelerde düşük ADMA düzeylerinin bulunması, normotensif hamileliklerde ADMA düzeylerindeki düşmenin, maternal vasküler dilatasyon ve kan basıncı değişimlerinden kısmen de olsa sorumlu olduğunu akla getirir.

Hamilelik sırasında ADMA'nın düşüşü için pek çok olası açıklama düşünülebilir. Vazodilasyon, normal gebeliklerde kardiyak çıkışı ve plazma hacminin artışı tetikleyen ilk ve çok önemli bir hemodinamik değişimdir (86).

Dolaşımdaki plazma hacminin artışından dolayı ADMA düzeylerinde fizyolojik azalma olası bir açıklama değildir. Tahminen günde 300 µmol ADMA üretilir, bunun 250 µmol'ü DDAH tarafından metabolize edilir, oysa çok az bir miktarı ise böbrekler tarafından atılır (36). ADMA için anahtar eliminasyonun renal ekstraksiyon olmamasına ve DDAH tarafından enzimatik degradasyon olmasına rağmen gebelik sırasında renal hiperfiltrasyon düşük bulunması ADMA düzeyleri için etken olabilir(34). DDAH, glomerulus ve renal damarlar içindeki endotelial hücrelerde bol miktarda ve renal tübüler hücrelerde kısmen bulunmaktadır. ADMA düzeylerinde azalma, renal tüplerde DDAH tarafından ADMA'nın bozulmasında artma nedeniyle olabilir. Artmış endotelial-hücre geçirgenliği ve platelet birimi gibi endotelial disfonksiyon veya uygunsuz endotelial-hücre aktivasyonu preeklampside çok genel klinik bulgulardır (102). Redman ve arkadaşları bu tür endotelial aktivasyonun, pıhtılaşma ve komplement sistem gibi intravasküler lökositleri de içeren daha genel inflamatuvar reaksiyonun bir bölümü olduğunu gösterdiler (83). Anahtar bir bulgu; bu maternal inflamatuvar cevap üçüncü trimestırda sağlıklı bir hamileliğin özelliğidir fakat preeklampsidekinden daha az şiddetlidir. Hatta hamilelik tipik olarak belirgin inflamatuvar cevap ile karakterizedir ve preeklampsi ile sağlıklı hamilelik arasındaki farklılıklar, sağlıklı hamile ve hamile olmayan kadınlar arasındakine göre daha az belirgindir (83).

1990'lı yıllarda yapılan çalışmalarda, nitrik oksit ve endojen NOS inhibitörlerinin rolü keşfedilmeye başlandı. İlk defa preeklampsili hamile kadınlarda artmış ADMA düzeyleri, Fickling ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir(35). Hamilelikle indüklenmiş hipertansiyonlu hastaların ADMA konsantrasyonlarının, sağlıklı hamile kadınlardaki ADMA konsantrasyonlarıyla aynı düzeyde olduğu ,fakat preeklampsili hastalarda ADMA konsantrasyonlarının önemli ölçüde yüksek olduğu bildirilmiştir. Fickling ve

arkadaşlarının bu (35) bulguları, Petterson ve arkadaşları (81), Holden ve arkadaşları (46) ile Ellis ve arkadaşları (32) tarafından yapılan çalışmalarla da gösterildi.

Preeklampsinin klinik belirtileri gelişmeden önce gebeliğin 23. haftasından itibaren Preeklampside artmış ADMA düzeyleri bildirilmiştir(90). Bu bulgular göstermektedir ki ADMA, preeklampsinin patogenezinde rol oynamaktadır. Erken gebelikte ADMA üzerine yapılan araştırmalar ile ADMA'nın preeklampsi için prediktif bir test olduğu gösterilmiştir(33). Preeklampside artmış ADMA düzeylerinin orijini henüz açık değildir. Plasental iskemi ve reperfüzyon sonrasında gelişen oksidatif stresin temel patojenik sebepler olduğu kabul edilmektedir (92).

3.6.2. ADMA ile İlişkili Hastalıklar ve Fiziopatolojisi

3.6.2.1. Renal Hastalıklar

Son dönem böbrek yetmezliği olan hastalarda yapılan çalışmalarda ADMA düzeyleri yüksek olarak bulunmuştur. Böbrek yetmezliği olan hastalarda biriken ADMA miktarı ile gelişen endotel disfonksiyonu arasında ilişki vardır. Hemodiyaliz hastalarında gelişen endotel disfonksiyonu, kardiyovasküler olaylar ve mortalitede ADMA sorumlu faktörlerden birisi olabilir. Hemodiyaliz ile ADMA vücuttan uzaklaştırılabilir fakat hemodiyaliz sonrası hemen yüksek değerlere geri döner (101).

3.6.2.2. Diyabet

Tip 1 ve Tip 2 diyabette yapılan hayvan çalışmalarında ve aşikar Tip 2 diyabetli veya insulin rezistansı olan hastalarda yükselmiş ADMA düzeyleri bulunmuştur (77,108). Kronik vasküler komplikasyonlar; diyabetli hastalarda ana morbidite ve mortalite sebeplerindedir. Artan kanıtlar; NOS inhibitörü ADMA'nın diyabetle yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca serum ADMA düzeyinin artışı makroanjyopatisi olan hastalarda olmayanlara göre çok daha belirgin olarak bulunmuştur (110). Yapılmış olan çalışmalarda insulin rezistansı ile ADMA düzeyleri

arasında kuvvetli bir ilişki olabileceği gösterilmiştir. Yine yapılan çalışmalarda glukozun kendisinin DDAH aktivitesini baskılayabileceği sonucuna varılmıştır (61).

3.6.2.3. Kardiyovasküler Hastalıklar

Arjininden NO oluşumu ADMA gibi çeşitli arjinin analogları tarafından inhibe edilir. Bu analoglar trombüs oluşumu ve ateroskleroza sebep olabilir. Akut koroner sendromlu olgularda yapılan çalışmalarda ADMA düzeyleri yüksek olarak bulunmuştur, Bu hastaların medikal tedavi sonrası ADMA düzeylerinin azaldığı gözlenmiştir (107). Azuma ve arkadaşları karotid arterlerine balon uygulanan tavşanların rejenere endoteliumunda sağlıklı olanlara göre düşük intraselüler arjinin ve yüksek ADMA düzeyleri bulmuşlardır. Bu bulgular rejenere endoteliumda DDAH aktivitesinin düşük olduğunu ve arjinin düzeyinin yetersiz olduğunu düşündürmektedir (10).

ADMA düzeyleri kalp yetmezliği olan hastalarda da artar. ADMA'nın ventrikül kontraksiyonu ve kalp hızını azaltma kapasitesi vardır. ADMA'nın kardiyak fonksiyondaki rolü ve kalp yetmezliğindeki endotel fonksiyonundaki rolü tam aydınlatılamamıştır (101). Yüksek ADMA düzeylerinin kardiyovasküler olay insidansının artması yanında konsantrik sol ventriküler hipertrofi ve karotid arter intima media kalınlığının artması ile de kuvvetli bir ilişki gösterdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (114). Karotid intima media kalınlığı güçlü kardiyovasküler risk belirteçidir (44). Plazma ADMA konsantrasyonları; klinik olarak belirgin ateroskleroza olanlarda olmayanlara göre daha yüksek olarak bulunmuştur (52).

Kardiyovasküler patoloji için tedavinin amacı artmış ADMA'nın etkilerini ortadan kaldırmak veya ADMA düzeylerini azaltmaktır. Teorik olarak arjinin ADMA'nın yerini alabilir, NOS aktivitesini tamir edebilir. Arjininin hiperkolesterolemili hastalarda endotel disfonksiyonunu ve periferik vasküler hastalığı olan hastalarda da yürüme zorluğunu düzelttiği gözlenmiştir.

Bu hastalarda ADMA düzeylerini azaltmada diğer bir alternatif yol DDAH ekspresyonunu veya aktivitesini artırmaktır (16).

3.6.2.4. Alzheimer

Bu hastalarda homosistein ve ADMA'nın düzeylerinin arttığı NO düzeylerinin ise azaldığı bulunmuştur. ADMA'nın etkisi ile NO düzeyleri azaldığı için serebral kan akımı bozulur. NO sitoprotektif genlerin ekspresyonunu artırdığı için nöroprotektif etkiye sahiptir ve öğrenme ile ezberleme üzerine etkilidir. L-Arjininin oral yolla alımı ile serebrovasküler hasarlı yaşlı hastaların kognitif fonksiyonlarında düzelme olabilir (54).

3.6.2.5. Karaciğer Yetmezliği ve Siroz

Multiple organ yetmezliği olan hastalarda ve son dönem karaciğer hastalarında bozulmuş karaciğer fonksiyonları ADMA düzeylerinin yükselmesine neden olabilir (114). Dekompanse dönemdeki hastalarda artmış ADMA konsantrasyonları hepatoselüler hasara cevabı yansıtabilir. DDAH'lar karaciğer dahil çok sayıda dokuda yaygın olarak dağılmıştır. ADMA dekompanse sirozlu hastalarda yükselirken SDMA için gruplar arasında farklılık bulunmamıştır. Mevcut sonuçlarda ADMA/SDMA oranının yükselmesinin gözlenmesi DDAH aktivitesinin azalmasına işaret eder (78).

3.6.2.7. Hemorajik Şok

ADMA üretiminin hipoksi gibi hücrel stres durumlarında arttığı düşünülmektedir(105). Doku hipoksisi ve oligüri şiddetli hemorajik şokun iki karakteristik bulgusu olup ADMA düzeylerinin hemorajik şokta yükseldiği görülmüştür. Şiddetli hemoraji durumunda oluşan oligüriden dolayı azalmış üriner atılım nedeniyle ADMA düzeyleri artar. ADMA birikimi nedeniyle Arjinin-NO yolağının bozulmasından dolayı akut hipovolemide sistemik kan basıncının sürdürülmesinde ADMA etkili olabilir (2).

4.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma; İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Klinigine 2007-2008 döneminde başvuran 25-39 gebelik haftaları arasında tek canlı gebeliği olan preeklampsi kriterlerine göre tanı konmuş 54 preeklampsili gebe ile 55 nonkomplike gebe üzerinde yapılmıştır.

Preeklampsi tanısı konulması için (National High Blood Pressure Education Program Working Group 2000) kriterleri' ne uygun olarak gebelik öncesinde hipertansiyon şikayeti olmaması ve bu gebelikte, altı saat ara ile yapılan en az iki ölçümde kan basınçları 140/90 mmHg veya üzerinde olması ve beraberinde eşlik eden 24 saatlik idrarda 300 mg/dL'nin üzerinde protein ya da yapılan en az iki idrar analizinde 1+ veya üzerinde protein olması şartları arandı.

Çalışma ve kontrol gruplarının her ikisinde de daha önce kronik hipertansiyon, tip I ve tip II diyabet, kronik böbrek hastalığı veya herhangi bir vasküler hastalık öyküsü olan, 40 yaş üstünde ve çoğul gebeliği olan kişiler çalışmaya dahil edilmemiştir .

Çalışmaya dahil edilen tüm gebelerin ayrıntılı anamnezleri alınarak obstetrik değerlendirilmeleri yapıldı. Gebelerin demografik özellikleri, gebelik haftaları, önceki gebelik öyküleri kaydedildi. Ayrıca hastaneye yatışta rutin olarak istenen kan biyokimyasal parametrelerinin (AST , ALT, LDH) düzeyleri ölçüldü.

Örneklerin Hazırlanması

Çalışmaya dahil edilen gebelerden normal rutin biyokimyasal analizler ve DNA izolasyonu için K₃EDTA içeren 2 ayrı tüpe 2'şer mL venöz kan örneği alındı. Biyokimyasal analizler için alınan kan örnekleri 3500 devirde 10 dakika (Heraeus Biofuge Stratos; Kendo Laboratory Products, Osterode-Germany). santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Plazma örneğinde rutin biyokimyasal testler çalışıldıktan sonra ADMA ,SDMA ve Arjinin düzeyleri çalışılıncaya kadar uygun koşullarda plazma

saklandı. Ayrıca; DNA izolasyonları yapabilmek için ise aynı hastalardan K₃EDTA içeren ayrı tüplere 2'şer mL venöz kan örnekleri toplanarak izolasyon yapılana kadar (-70) °C de saklandı.

DNA İzolasyonu ve Genotiplendirme

DNA İzolasyonu

Lökosit örneklerinden ticari bir DNA izolasyon kiti (QIAamp DNA Blood Mini kit QIAGEN Hilden , Germany) kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı.

1,5 mL 'lik eppendorf tüpüne 25 µL proteinaz K ve 200 µL serum eklendikten sonra üzerine 200 µL liziz tamponu eklenerek iyice karıştırılır (10-20 saniye) ve 70 °C ' de 10-15 dakika bekletildikten sonra 210 µL % 96-100 ' lük etanol eklenerek karıştırılır. Örneğin tamamı silika membran kolonuna (Nucleospin Blood column) aktararak 6.000 x g ' de 1 dakika santrifüj edilir. Eğer örnekler membrandan tamamen geçemiyorsa santrifüjün hızı artırılarak (14.000x g) bu aşama tekrarlanır. Silika membran kolonu çıkarılarak yeni bir eppendorf tüpe takılır ve üzerine 500 µL yıkama tamponu (Wash1 Buffer) eklenerek 1 dakika 14.000x g 'de santrifüj edilir. Silika membran kolonu yeni bir tüpe takılır, üzerine 600 µL (Wash2 Buffer) tamponu eklenerek 1 dakika 14.000x g 'de santrifüj edilir. Tekrar silika membran kolonu yeni bir tüpe takılır ve üzerine bir şey ekmeden 1 dakika 14.000x g 'de santrifüj edilir. Daha sonra silika membran kolonunu 1,5 mL 'lik eppendorf tüpüne yerleştirilir ve üzerine önceden ısıtılmış (70°C) Elüsyon tamponundan 100 µL eklenerek oda ısısında 1 dakika bekletildikten sonra 1 dakika 14.000x g 'de santrifüj edilir. Son olarak silika membran kolonu atılarak tüpte biriken sıvıdaki DNA kaynağının 10 µl'si PCR karışımında kalıp DNA olarak kullanılır.

**eNOS geni Glu298Asp polimorfizmi için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)
ve PZR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesimi**

Preeklamsili hastalarda eNOS geni Glu298Asp polimorfizmini çalışabilmek için kullanılan kimyasal maddelerin tümü analitik saflıkta(Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, ABD) olup bu maddelerin listesi aşağıda verilmiştir.

Primerler : Integrated DNA Technologies,

TaqDNA Polimeraz, 10X PCR buffer

MgCl₂,

Tris(Hydroxymethyl) Aminomethane

dNTP'ler (Larova GmbH, Teltow, Almanya)

Thermocycler (Bio-Rad Laboratories, ABD; Model: PTC-200)

Ultraviyole Transilluminatör (Bio-Rad Laboratories, ABD; Molecular Imager Gel Doc XR System)

Borik asit, EDTA.2H₂O (Merck, Darmstadt, Almanya)

Ethidium bromide (10mg/ml) (Dr.Zeydanlı Hayat Bilimleri, Ankara, Türkiye)

100 bp+1.5 kb DNA ladder, Agaroz (Bioron GmbH, Ludwigshafen, Almanya)

Ban II (New England Biolabs, Cambridge, İngiltere)

1 X TBE Tamponu: 21,8 gr Tris, 11.2 gr borik asit ve 1.66 gr EDTA.2H₂O 2 L distile suda çözülerek hazırlandı.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

eNOS geni Glu298Asp polimorfizmi ile ilgili bölgenin PZR ile çoğaltılması için kullanılan primer dizileri: **F-5' AAGGCAGGAGACAG TGGATGGA 3'** ve **R-5' CCCAGTCAATCCC TTTGGTGCTCA 3'dir.** (4)

2,5 mM lık dNTP karışımı hazırlanması

PZR reaksiyon karışımı için 10 mM lık 4 dNTP (dATP , dGTP , dCTP, dDTP) den 200 µL bir eppendorf tüpünde alınıp karıştırılarak PZR' da kullanmak üzere 2.5 mM lık dNTP karışımı aşağıdaki oranlarda kullanılarak hazırlanır

10 mM	dATP	200 µL
10 mM	dGTP	200 µL
10 mM	dCTP	200 µL
10 mM	dDTP	200 µL

Daha sonra PZR tamponu hazırlanır bunun içinde bir tüpe 10x taq buffer , 2.5 mM lık dNTP ,12.5 mM MgCl₂ çözeltisinin her birinden 200 µL alınıp aşağıdaki oranlarda distile su kullanılarak hazırlanır.

10x taq buffer	200 µL
2,5 mM dNTP	200 µL
12,5 mM MgCl ₂	200 µL
Distile su	400 µL

Primer Amplifikasyon Master Mix Hazırlanması

Aşağıda belirtilen oranlar kullanılarak karışım hazırlanır.

PZR Tamponu karışımından	25	µL x örnek sayısı
Primer 1	1	µL x örnek sayısı
Primer 2	1	µL x örnek sayısı
Taq plimeraz enzim (0,5U)	0,3	µL x örnek sayısı
Distile su	22,7	µL x örnek sayısı

Hazırlandıktan sonra her bir numune için 40 µL master mix ve 10 µL ekstraksiyon ürünü koyulup PZR için uygun hale getirilerek thermocyclerde amplifikasyona bırakıldı.

PZR UYGULAMASI

95° 4 dk 1 döngü ön denatürasyon

95° 1 dk 32 döngü denatürasyon

54° 1 dk 32 döngü bağlanma

72° 1 dk 32 döngü sentez

72° 5 dk 1 döngü uzama

Reaksiyon sonucu oluşan PZR ürünü 1X TBE tamponu içerisinde hazırlanmış % 2'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutulduktan sonra ethidium bromide (10 mg/ml) ile 30 dk süre ile boyandı ve Ultraviole (UV) transilluminatörde incelenerek sonuçlar gözlemlendi. Oluşan bantların moleküler ağırlığını saptamak amacıyla 100 bp 'lik DNA ladder kullanıldı.

BanII endonükleaz ile kesim reaksiyonu

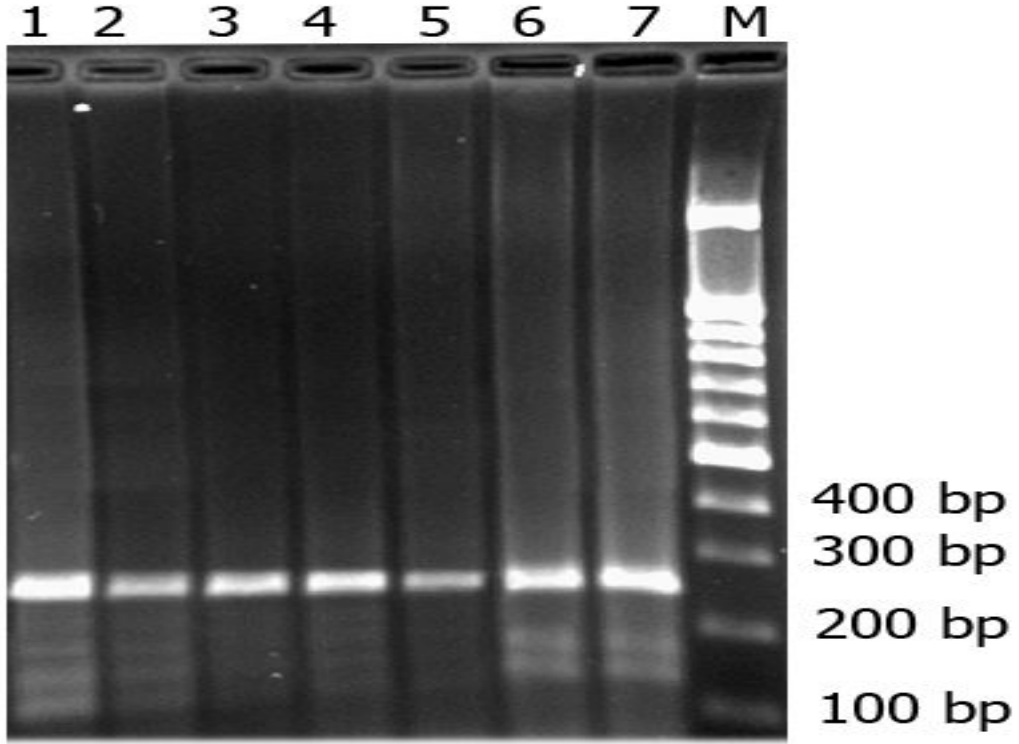
eNOS geni Glu298Asp polimorfizmi için 248 baz çiftlik PZR ürününün restriksiyon endonükleaz (RE) kesimini gerçekleştirmek amacıyla 10 µl PZR ürünü, her örnek için 1µl Ban II enzimi, 1,5 µl 10X NEB tamponu ve 2,5 µl steril distile su konularak iyice karıştırılıp 3-5 sn santrifüjlenerek 37 °C'de 2 saatlik inkubasyona bırakıldı. BanII enzimi için kesim bölgesi içeren homozigot bireylerde (GG)163 ve 85 baz-çiftlik iki ayrı bant gözlemlendi. Heterozigot bireylerde ise (GT) 248, 163 ve 85 baz çift uzunluğunda 3 bant gözlemlendi. BanII enzimi için kesim bölgesi içermeyen bireylerde (TT) sadece 248 baz çift uzunluğunda bant gözlemlendi. Restriksiyon endonükleaz işlemine

maruz bırakılan ürünler % 2'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutulduktan sonra boyanıp görüntülendi.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve RFLP ile Genotiplendirme Bulguları

Endotelyal nitrik oksid sentaz geni Glu298Asp genotiplerinin saptanması amacıyla 248 bç uzunluktaki PZR ürünlerinden oluşan DNA parçalarının uzunlukları Şekil 5' de verilmiştir. Ban II enzimi kesim bölgesinin bulunması 163 bç ve 85 bç' lik iki DNA parçasının oluşmasına neden olurken, kesim bölgesinin bulunmaması 248 bç' lik tek parçanın gözlenmesiyle sonuçlanır. Kesim ürünleri %3' lük agaroz jelde yürütülüp UV ışık altında polaroid film ile fotoğrafları çekildi.

Her örnek için kesim olup olmadığı, 100 bç DNA ladder moleküler ağırlık merdiveni standartına göre değerlendirildi. eNOS Glu298Asp genotipleri, restriksiyon bölgesinin her iki allelde de bulunmaması normal (Glu/Glu), restriksiyon bölgesinin her iki allelde de bulunması mutant (Asp/Asp), restriksiyon bölgesinin sadece bir allelde bulunması heterozigot (Glu/Asp) şeklinde açıklanır (Şekil 11, 12).



Şekil 5. Glu298Asp polimorfik bölgesine spesifik primerler kullanılarak elde edilen 248 bç'lik PZR ürününün ultraviyole transilluminatördeki görüntüsü. M: DNA ladder (100bp)

ADMA Düzeylerinin Ölçümü

L-Arjinin, SDMA VE ADMA ölçümleri HPLC (High Performance Liquid Chromatography) cihazında EUREKA (*Head Quarter: Via E. Fermi 25 60033 Chiaravalle (AN) ITALY*) kiti kullanılarak fluorescence dedektörüyle ölçülerek kromotogramlar analiz edilmiştir. Analiz Basamakları;

1. Basamak (Türevlendirme)

1,5 mL' lik cam veya plastik bir tüpe

200 µL Reagent H – Test Solution

200 µL Reagent O – Buffer Solution N° 2

30 µL Reagent J – Starter Solution

30 µL Reagent L – Derivatization Solution konularak 5 s karıştırılır.

Basamak 2

20 °C' de (oda ısısında) 20 dk bekletilir.

Basamak 3

Reagent Q – Stabilizing Solution ' dan 100 µL eklenir. Ve bu solüsyondan standartların kromatogramdaki yerlerinin belirlenmesi için 100 µL alınarak HPLC cihazına enjekte ettirilir.

Standartların Hazırlanması

Standartları üçünü birlikte tek kromatogramda görmek için; 100 µL ADMA ,100 µL Arjinin , 100 µL SDMA standartlarından alınır ve 700 µL distile su eklenerek karıştırılır. Her bir standartın konsantrasyonu 5 µmol/L dir.

Örneklerin Hazırlanması

Ön Kolonların Aktivasyonu kolonlardan sırasıyla 1 er mL reagent A,B,C geçirilir.

Reagent A – Conditioning Solution 1

Reagent B – Conditioning Solution 2

Reagent C – Conditioning Solution 3

Elüent' ler atılarak ön kolonlar aktive edilir.

Örneklerin Dilüsyonu: örneklerden (numune veya standart) 400 µL alınır, dilüsyon solüsyonundan (Reagent D – Dilution Solution) da 1000 µL alınarak karıtılır.

Örneklerin Ön kolonlara Aplikasyonu:Dilüsyon yapılan örneklerden 1 mL alınarak önkolondan geçirilir ve elüent atılır.

Ön kolonların Yıkanması

Ön kolonlardan sırasıyla 1 er mL E,F,G solüsyonları geçirilir.

1,0 mL of Reagent E – Wash Solution 1

1,0 mL of Reagent F – Wash Solution 2

1,0 mL of Reagent G – Wash Solution 3

Daha sonra ön kolonlar kurutulur. Toplanan ön kolonlar temiz tüplere yerleştirilir ve ön kolonlardan 1,0 mL Reagent I – Eluting Solution geçirilir, elüent toplanır ve 5 s karıştırılır.

Örneklerin Türevlendirilmesi:

1,5 mL' lik cam veya plastik bir tüpe

200 µL of elüent

200 µL of Reagent N – Buffer Solution N° 1

200 µL of Reagent O – Buffer Solution N° 2

30 µL of Reagent J – Starter Solution

30 µL of Reagent L – Derivatization Solüsyonlardan konularak 5 s karıştırılır ve

20 °C' de (oda ısısında) 20 dakika bekletilir. Daha sonra Reagent Q – Stabilizing Solution ' dan 100 µL eklenir ve 5 s karıştırılarak HPLC cihazında 100 µL enjeksiyon yapılarak kromotogramlar değerlendirilir.

Biyokimyasal Ölçümler

Örneklerin plazma , AST, ALT, LDH düzeyleri ve 24 saatlik idrar proteini Olympus AU 600 (Olympus Optical Co. Ltd, Tokyo-Japan) otoanalizöründe Olympus marka ticari kitler kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü.

İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmadan elde edilen sonuçların biyoistatistiksel değerlendirmesi için Turgut Özal Tıp Fakóltesi Hastanesi kütüphanesindeki SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 12.0 paket programı kullanıldı. Biyokimyasal parametrelerin kontrol ve hasta grupları arasında karşılaştırılmasında Student's t testi kullanılmış ve sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir. Genotipler arasındaki değişkenlerin değerlendirilmesi ise tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılmıştır. eNOS genotipleri ile allellerinin görölme sıklığının ve gruplar arası farklılıklarının değerlendirilmesinde χ^2 testi kullanılmıştır. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı olmayan sonuçlar ise tabloda Anlamlı değil (AD) olarak ifade edilmiştir.

5. BULGULAR

Çalışma grubu tamamen sağlıklı 54 normal gebe ve 55 preeklampitik gebe olmak üzere toplam 109 gebeden oluşturuldu. Normal gebelerin yaş ortalamaları (29.64±5.91) ve preeklampitik gebelerin yaş ortalamaları ise (32.00±6.57) olarak belirlendi. Normal gebelerde gebelik hafası ortalamaları (33.88±4.19) iken preeklampitik gebelerin gebelik haftası ortalamaları (33.47±4.10) olarak belirlendi.

Yaş ve gebelik haftasına göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (AD). Preeklampitik gebelerin sistolik ve diastolik kan basınçları ortalaması (164.00±10.00 mmHg- 106.00±9.00 mmHg) iken normal gebelerin sistolik ve diastolik kan basınçları ortalaması (121.00±9.00 mmHg-78.00±5.00 mmHg) olarak bulundu. Gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0,0001) .

Her iki grupta da AST, ALT ve LDH değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (p<0.0001). Proteinüri değerleri preeklampitik gebelerde bir tanı kriteri olduğundan normal gebelere oranla daha yüksek olarak bulundu(Tablo 2).

Tablo 2: Grupların Demografik ve Klinik Özellikleri

Parametre	Preeklampsi (n:55)	Normal Gebe (n:54)	P
Age (years)	32.00±6.57	29.64±5.91	AD
Gebelik haftası*	33.47±4.10	33.88±4.19	AD
Sistolik kan basıncı (mmHg)	164.00±10.00	121.00±9.00	<0.0001
Diastolik kan basıncı (mmHg)	106.00±9.00	78.00±5.00	<0.0001
Proteinüri (g/24 h idrar)	0.97±1.39	-	-
AST (U/L)	59.94±72.75	18.87±4.62	<0.0001
ALT (U/L)	47.36±58.51	14.29±5.51	<0.0001
LDH (U/L)	385.36±149.30	218.9±63.00	<0.0001

* Numunelerin toplandığı andaki gebelik haftası

* Anlamlı değil (AD)

Hasta ve Kontrol Grubu ADMA, SDMA ve Arjinin Düzeyleri

Plazma ADMA, SDMA, ADMA/SDMA , Arjinin ve Arjinin/ADMA düzeyleri ortalama \pm Standart Hata olarak tablo 3’de gösterilmektedir.

Tablo 3 : Preeklampsili ve Normal Gebelerin ADMA, SDMA ve Arjinin Düzeyleri

Parametre	Preeklampsi (n:55)	Normal Gebe (n:54)	P
ADMA ($\mu\text{mol/L}$)	3.25 \pm 1.42	1.24 \pm 0.20	<0.0001
SDMA ($\mu\text{mol/L}$)	2.03 \pm 0.93	0.92 \pm 0.27	<0.0001
L-Arjinin ($\mu\text{mol/L}$)	90.72 \pm 56.62	50.18 \pm 27.45	<0.0001
ADMA/SDMA oranı	2.12 \pm 1.72	1.51 \pm 0.77	<0.05
L-Arginin/ADMA oranı	37.33 \pm 39.86	40.53 \pm 21.21	AD

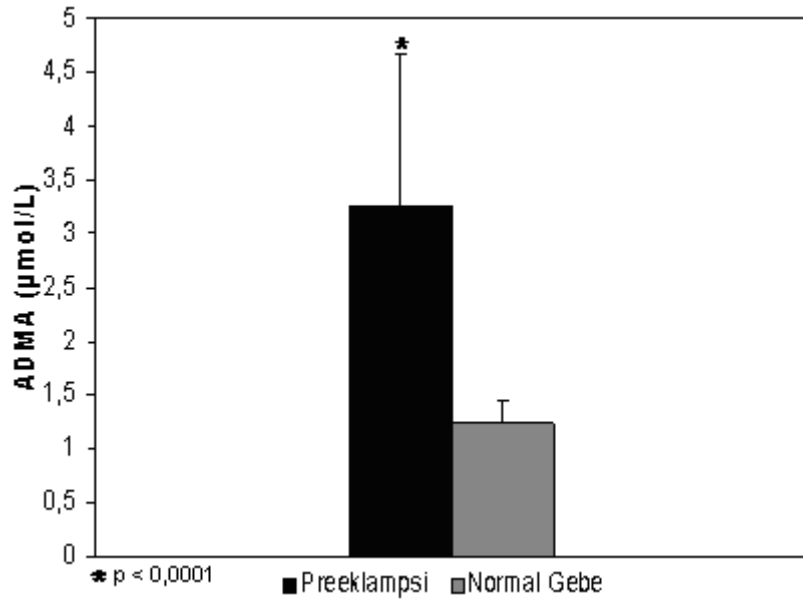
* Anlamli değil (AD)

Preeklampsili gebelerde ADMA ortalama değerleri 3.25 \pm 1.42 $\mu\text{mol/L}$ olarak bulunurken normal gebelerde bu değer 1.24 \pm 0.20 $\mu\text{mol/L}$ olarak bulundu. Preeklampsili hastalarda plazma ADMA düzeylerinde görülen artış normal gebelerin plazma ADMA düzeyleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.0001$). Aynı şekilde preeklampitik gebelerde SDMA ortalama değerleri 2.03 \pm 0.93 $\mu\text{mol/L}$ olarak bulunurken normal gebelerin SDMA ortalama değerleri 0.92 \pm 0.27 $\mu\text{mol/L}$ olarak bulundu. ADMA da olduğu gibi SDMA’ nın da preeklampitik gebelerdeki artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.0001$).

Normal gebelerdeki L-Arjinin ortalama değeri 50.18 \pm 27.45 $\mu\text{mol/L}$ iken preeklampitik gebelerde bu değer 90.72 \pm 56.62 $\mu\text{mol/L}$ olarak saptandı. Bu preeklampsili gebelerin L-Arjinin düzeylerinde görülen artış da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.0001$).

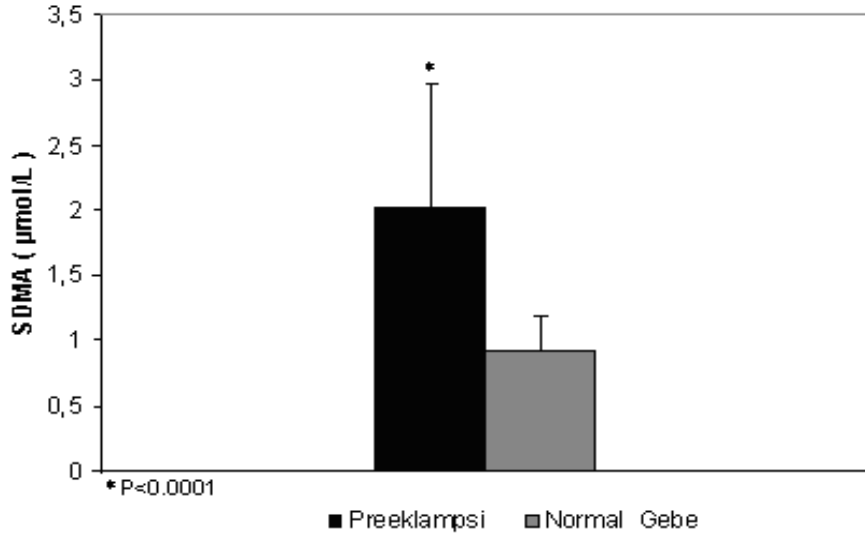
Preeklampsili gebe grubunda ADMA/SDMA oranı 2.12 \pm 1.72 olarak bulunurken, normal gebe grubunda bu oran 1.51 \pm 0.77 olarak tesbit edildi. Aynı şekilde

ADMA/SDMA oranı ise preeklampatik gebelerde 37.33 ± 39.86 ; normal gebelerde ise 40.53 ± 21.21 olarak bulundu. Normal gebelerin oranlarına göre; Preeklampsili gebelerdeki ADMA/SDMA oranındaki bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı iken ($p<0.05$), L-Arginin/ADMA oranındaki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Preeklampsili gebe grubunda; plazma ADMA düzeyleri normal gebe grubuna göre oldukça yüksek bulundu (3.25 ± 1.42 $\mu\text{mol/L}$ ve 1.24 ± 0.20 $\mu\text{mol/L}$). Plazma ADMA düzeylerinde görülen bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.0001$).



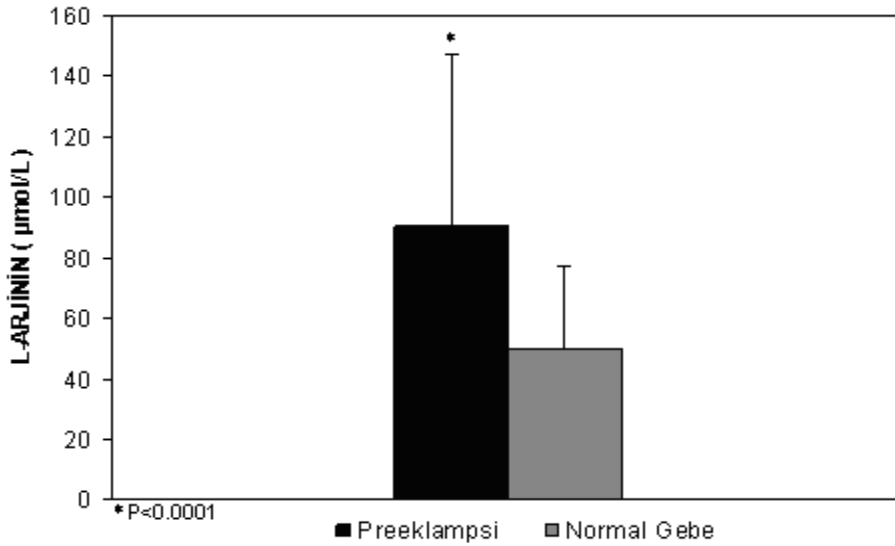
Şekil 6 : Preeklampsili ve Normal gebelerin ADMA düzeylerinin değişimi

Plazma SDMA düzeyleri; preeklampsili gebelerde; 2.03 ± 0.93 $\mu\text{mol/L}$ iken normal gebe grubunda 0.92 ± 0.27 $\mu\text{mol/L}$ olarak saptandı. SDMA düzeyleri arasındaki bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.0001$).



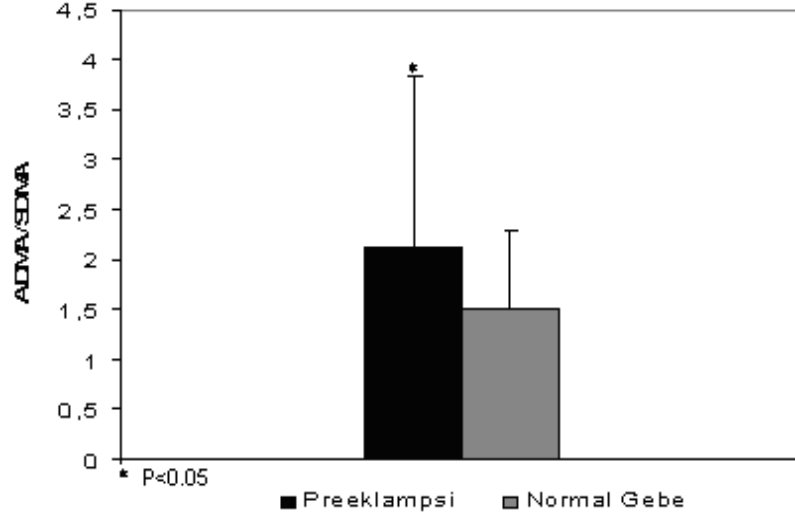
Şekil 7 : Preeklampsili ve Normal gebelerin SDMA Düzeyleri

Normal gebelerdeki plazma Arjinin düzeyleri 50.18 ± 27.45 µmol/L; preeklampsili gebelerde ise 90.72 ± 56.62 µmol/L olarak ölçüldü. Preeklampsili gebelerde arjinin düzeyleri açısından görülen farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$).



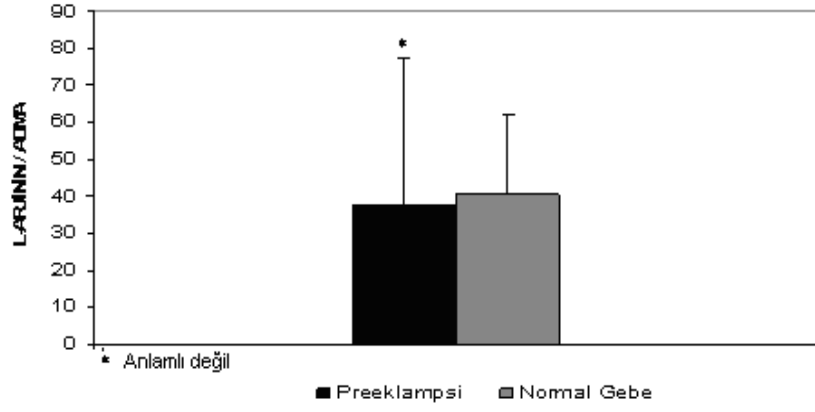
Şekil 8 : Preeklampsili ve Normal gebelerin L-Arjinin Düzeyleri

Preeklampsili gebe grubunda ADMA/SDMA ortalaması 2.12 ± 1.72 olarak bulunurken, normal gebe grubunda 1.51 ± 0.77 olarak saptandı. Preeklampsili gebelerde ADMA/SDMA oranındaki yükseklik istatistiksel yöndende anlamlı bulundu ($p < 0.05$).

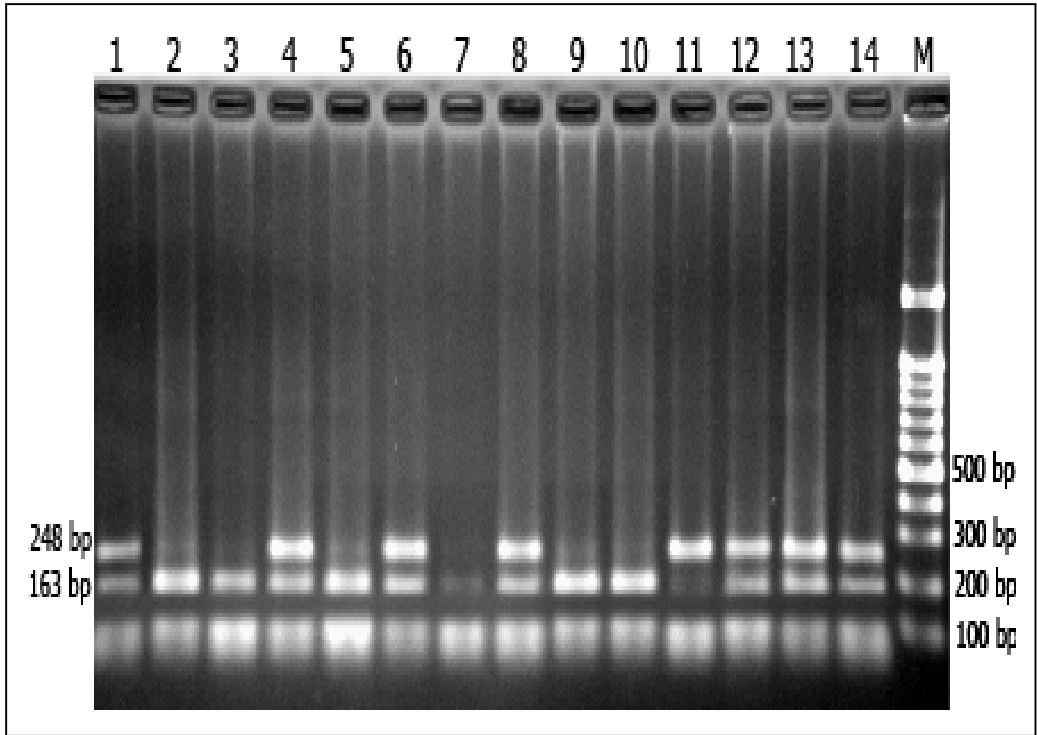


Şekil 9 : Preeklampsili ve normal Gebelerin ADMA/SDMA ortalamaları

Preeklampsili gebe grubunda Arjinin/ADMA ortalaması 37.33 ± 39.86 olarak bulunurken, normal gebe grubunda 40.53 ± 21.21 olarak bulundu. Normal gebelerdeki Arjinin/ADMA oranı preeklampsili gebelere göre daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

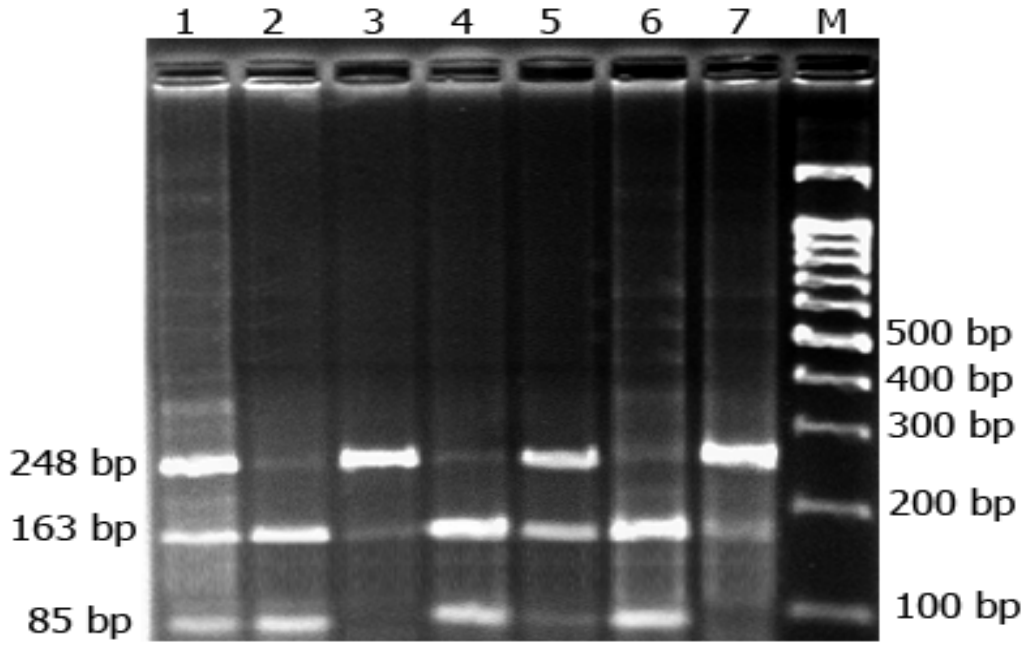


Şekil 10 : Preeklampsili ve normal Gebelerin L-Arjinin/ADMA ortalamaları



Şekil 11 : PZR ürünlerinin kesimi ile elde edilen Glu298Asp genotipleri

M: 100 bç DNA moleküler ağırlık merdiveni; 1, 4, 6, 8, 12, 13,14. kuyular Glu/Asp genotipi;2, 3,5,7,9,10, . kuyular Glu/Glu genotipi; 11. kuyu Asp/Asp genotipi



Şekil 12 : PZR ürünlerinin kesimi ile elde edilen Glu298Asp genotipleri

Glu298Asp genotipleri M: 100 bç DNA moleküler ağırlık merdiveni; 1,5. kuyular Glu/Asp genotipi; 2,4,6. kuyular Glu/Glu genotipi; 3,7. kuyular Asp/Asp genotipi.

Glu298Asp Genotip Dağılımı İle Glu298Asp Allel Sıklığının Preeklampitik Gebe ve Normal Gebelerdeki Dağılımları

Preeklampsili ve normal gebelerde Glu298Asp genotip dağılımı ile G ve A allel sıklığı tablo 4' de gösterilmiştir. Preeklampsili gebe grubunda GG, GA ve AA genotip sıklığı sırası ile % 52.7 ,% 41.8 ve % 5,5; normal gebe grubunda ise bu oranlar sırası ile % 63.0 ,% 37.0 ve % 0,0 olarak bulundu. Preeklampsili gebe ve normal gebe grupları eNOS gen sıklıkları açısından karşılaştırıldığında genotip dağılımlarının istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği saptandı ($\chi^2 = 3.59$, P =0.16).

Normal gebe grubunda G alleli % 81.5 , A alleli % 18.5 oranlarında bulunurken preeklampsili gebe grubunda G alleli % 73.6 , A alleli ise % 26.4 oranında bulundu. Her iki grupta da en sık bulunan allel G alleli olup A ve G allel sıklığı bakımından gruplar arasında önemli bir farklılık bulunmadı. ($\chi^2 = 1.92$, P =0.16).

Tablo 4: Preeklampsili ve Normal Gebelerde Glu298Asp genotip dağılımı ile G ve A allel sıklığı

Genotip	Preeklampsi (n:55)	Normal Gebe (n:54)	
<i>eNOS (genotip)</i>			
GG	29 (52.7%)	34 (63.0%)	$\chi^2=3.59$ P=0.16
GA	23 (41.8%)	20 (37.0%)	
AA	3 (5.5%)	0 (0%)	
<i>eNOS (Allel)</i>			
G allele	73,6%	81,5%	$\chi^2=1.92$ P=0.16 OR (%95 CI) 0.63 (0.33-1.21)
A allele	26,4%	18,5%	

Tablo 5:Preeklampsi ve Toplam Hamilelerde eNOS Gen Polimorfizmin Plazma ADMA, SDMA ve Arjinin Konsantrasyonu Üzerine Etkisi

	Preeklampsi (n:55)			Toplam hamile (n:109)		
	GG	GA	AA	GG	GA	AA
ADMA	3.26±1.11	3.13±1.77	4.18±1.25	2.18±1.25	2.23±1.61	4.18±1.25*
SDMA	2.10±.95	1.97±.91	1.8±1.21	1.49±.88	1.44±.88	1.83±1.21
Arjinin	85.55±54.57	99.18±62.43	75.74±20.92	64.69±45.51	78.97±54.17	75.74±20.92

*(P<0.05), Toplam popülasyondaki GG ve GA genotipleriyle ilişkilidir.

Total popülasyondaki genotip dağılımları karşılaştırıldığında AA genotipi GG ve GA genotip dağılımlarına göre daha fazla görülmekte olup istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (P<0.05).

6. TARTIŞMA

Preeklampsi, genellikle gebeliğin 20 ci.haftasından sonra ortaya çıkan, artan kan basıncına proteinürinin eşlik ettiği klinik bir tablodur. Günümüzde halen maternal mortalite, erken ve geç dönemde oluşan maternal morbidite, perinatal mortalite, doğum, intrauterin büyüme kısıtlılığı gibi komplikasyonların önde gelen sebeplerinden birisidir. İnsan gebeliğinin nedeni halen bilinmeyen bir multi sistem hastalığıdır. Sistemik vasküler direnç artışı, platelet agregasyonunda artış, koagülasyon sisteminin aktivasyonu ve endotel disfonksiyonunun görüldüğü plasentasyona karşı gelişen anormal cevap ile karakterizedir (92).

Preeklampsinin etyolojisi çok fazla araştırılmıştır. Normal hamilelikte maternal kardiyovasküler hemodinamikler açısından önemli bir değişim olmaktadır. Kan volümünde ve kardiyak atımdaki artışa rağmen, kan basıncı hamileliğin ilk yarısında düşer sistemik arteriolar vazodilatasyona bağlı bu düşme terme doğru hamilelik öncesindeki düzeylere geri döner. Bu vazodilatasyonda endotel nitrik oksit sentaz (eNOS) tarafından L-Arjininden yapılan endotel kökenli medyatör olan nitrik oksitin (NO) artmış sentezi önemli rol oynar (43,85). Preeklampsi patogenezinde NO' ın rolü çok tartışmalı olmasına rağmen bir çok çalışma hamileliğin hipertansif hastalıklarında NO' ın azalmış olduğunu desteklemektedir (106) .

Preeklampsinin önemli bir genetik yere sahip olduğu düşünülmektedir.(58,89) Bir çok çalışma preeklampsi ile değişik gen polimorfizimleri arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir(19,56). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda preeklampsi ile sık görülen eNOS gen Glu298Asp polimorfzmi taşıyıcılığı birbiriyle ilişkilendirilmiştir(91). Bu varyantın preeklampsi de bir risk faktörü olduğu ve hamilelikte azalmış endotel bağımlı vazodilatasyon ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (95).

Çalışmamızda preeklampsi gelişiminde eNOS gen polimorfizminin ve nitrik oksitin endojen bir inhibitörü olan asimetrik dimetil arjininin (ADMA)'ın potansiyel bir katkısının olup olmadığını araştırdık.

Bu çalışmada hamile Türk kadınları arasında preeklampsi gelişme riski ile eNOS Glu 298 Asp gen polimorfizmi arasında bir ilişkiyi araştırmak amaçlanmış olup çalışmamızda preeklampsili ve normal gebelerde Glu298Asp genotip dağılımı ile G ve A allel sıklığı saptandı. Preeklamptik gebe grubunda GG, GA ve AA genotip sıklığı sırası ile % 52.7 , % 41.8 ve % 5,5; normal gebe grubunda ise bu oranlar sırası ile %63.0 , % 37.0 ve % 0,0 olarak bulundu. preeklampsili gebe ve normal gebe grupları eNOS gen sıklıkları açısından karşılaştırıldığında genotip dağılımlarının istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği saptandı ($X^2 = 3.59$, $P = 0.16$).

Normal gebe grubunda G alleli % 81.5, A alleli % 18.5 oranlarında bulunurken preeklampsili gebe grubunda G alleli % 73.6, A alleli ise % 26.4 oranında bulundu. Her iki grupta da en sık bulunan allel G alleli olup A ve G allel sıklığı bakımından gruplar arasında önemli bir farklılık bulunmadı ($X^2 = 1.92$, $P = 0.16$).

eNOS Glu298Asp gen polimorfizmi ile ilgili olarak Yoshimura ve arkadaşlarının Japon popülasyonunda yaptığı bir çalışmada Asp alleli ciddi preeklampsili kadınlarda % 28.8 oranında bulunurken mevcut kontrol grubunda ise % 14.1 oranında bulunmuştur ($P < 0.01$) (112). Bizim çalışmamızda; preeklampsili gebe grubunda Asp alleli % 26.4 oranında bulunurken ,normal gebe grubunda Asp alleli % 18.5 oranlarında bulunmuştur. Bulgularımız; Yoshimura ve arkadaşlarının yapmış olduğu bu çalışmanın bulgularıyla uyumlu bulunurken, Serrano ve arkadaşlarının bulgularıyla uyumsuz bulundu (91,112). Bu polimorfizm; Japon popülasyonunda yapılan bir çalışmada ciddi preeklampsi gelişiminde artmış riskin bir belirleyicisi olarak bildirilmiştir (112).

Aynı araştırmacılar tarafından yapılan bir başka çalışmada da Japon kadınları arasında ayrılmış plasenta ve Asp298 alleli arasındaki ilişki gösterilmiştir. Bu Asp298 varyantının; plasental iskemi ve devamında ayrılma ile sonuçlanan arteriolar vazokonstriksiyona sebep olabileceği hipotezini’ de desteklemektedir (55).

Çalışmamızda Asp allel frekansı preeklampsili kadınlarda % 26.4 iken normal hamilerde %18.5 olarak bulundu. Sonuçlarımız; Japon araştırmacıların çalışma sonuçlarından farklı olmasına rağmen insidans, etiyoloji, gestasyonel hipertansiyon ve preeklampsi bulgularında etnik ve sosyo ekonomik farklılıkların önemi unutulmamalıdır. Ayrıca; preeklampsi fizyopatolojisinde; diyet, obezite, stres ve gebelik sırasındaki diğer sosyal öğeleri içeren çevresel risk faktörleri de etkili olabilir ve bu çevresel faktörler ırklar arasında tamamen farklılık gösterebilir(55).

Bu çalışmada; preeklampsi bulgularına bağlı olarak preeklampsi hafif ve ciddi olarak ayırt edilmemiş ancak Japon araştırmacılar tarafından yapılan bir çalışmada eNOS polimorfizimiyle hafif preeklampsi arasında bir ilişki görülmezken (112) diğer bir başka çalışmada ise eNOS polimorfizimiyle hafif preeklampsi arasında bir ilişki bulunmuştur (40). Yoshimura ve arkadaşları gelişmekte olan bir ülke olan Bangladeş’de yaptıkları çalışmada Japon olmayan bir popülasyonda preeklampsi ile Glu 298 Asp polimorfizmi arasında bir ilişki bulmamıştır. Bunun nedeni olarak ta gelişmekte olan bir ülkedeki preeklampsi insidansının çok yüksek olmasına bağlı olarak genetik ilişkilerin saptanmasının zor olması şeklinde açıklamıştır (112). Hakli ve arkadaşları tarafından Fin popülasyonunda yapılan bir çalışmada ise Asp 298 polimorfizmi ile preeklampsi arasındaki ilişki bulunmamıştır (40). Çalışmamızda da diğer bazı çalışmalarda olduğu gibi preeklampsi ile Glu 298 Asp polimorfizmi arasında kesin bir ilişki bulunmuştur.

1980-1990 yılları arasında yapılan çalışmalar preeklampsili kadınlarda prostasiklin ve tromboksan A₂ dengesizliğinin önemi üzerine odaklanmıştır.

Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda ise; nitrik oksit ve endojen NOS inhibitörlerinin rolü keşfedilmeye başlanmıştır. İlk defa preeklampsili gebelerde artmış ADMA seviyeleri, Fickling ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir(35). Hamilelikle indüklenmiş hipertansiyonlu hastalarda ADMA konsantrasyonları, sağlıklı hamile kadınlarla aynı, fakat preeklampsili hastalardaki değerden önemli ölçüde düşük olarak bulunmuştur. Fickling ve arkadaşlarının (35) bulguları; Petterson ve arkadaşları (81), Holden ve arkadaşları(45) ile Ellis ve arkadaşları(32) tarafından yapılan çalışmalar ile uyumlu olarak bulunmuştur.

Bu çalışmanın bulgularına zıt olarak Maas ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada normotensif kontrol grubuna kıyasla Kolombiyalı preeklampsili kadınlarda plazma ADMA konsantrasyonlarında önemli farklılıklar bulunmamıştır(63). Bu çalışma, preeklampsili kadınlar ve normotensif kontrollerin ADMA düzeyleri arasında fark olmadığını gösteren tek çalışmadır (63).

Yapılan çalışmalarda; nitrik oksitin endojen bir inhibitörü olan asimetrik dimetil arjininin(ADMA) konsantrasyonlarının preeklampsili hastalarda, normal hamilelere göre belirgin olarak yüksek olduğu gösterilmektedir (46). Holden ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada; normal hamilelik esnasında ADMA konsantrasyonunun azaldığını, ilk trimestırın sonunda minimum düzeylere düştüğü daha sonra hamilelik boyunca arttığı bildirilmiştir. Bu çalışmada; normal hamileliklerin tüm basamaklarında kandaki plazma ADMA konsantrasyonları ile kan basıncı arasında önemli bir ilişki olduğu bulunmuştur(45).

Çalışmamızda; ADMA düzeyleri, preeklampsili gebelerde 3.25 ± 1.42 $\mu\text{mol/L}$ normal gebelerde ise 1.24 ± 0.20 $\mu\text{mol/L}$ olarak bulundu. Bu sonuçlar Holden ve

arkadaşları tarafından yapılan çalışmanın sonuçları ile uyumlu bulundu (45). Preeklampsili kadınlarda plazma L-arjinin düzeyleriyle alakalı bazı çelişkili sonuçlar mevcuttur.

Pettersson ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada; plazma arjinin düzeylerinin preeklampsili ve normotensif kontrol hastalarında benzer düzeylerde bulunduğu ve plazma ADMA düzeylerinin normotensif hamile kadınlara oranla preeklampsili hastalarda yükseldiği bulunmuştur (81). Sonuçlarımıza göre normal gebelerdeki L-Arjinin düzeyleri 50.18 ± 27.45 $\mu\text{mol/L}$ iken preeklampsili gebelerde bu düzey 90.72 ± 56.62 $\mu\text{mol/L}$ olarak saptandı ve bu preeklampitik gebelerin L-Arjinin düzeylerinde görülen artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.0001$). Sonuçlarımız; Pettersson ve arkadaşları(81) tarafından yapılan çalışmanın sonuçları ile uyumluluk gösterirken Maas ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmanın sonuçlarıyla farklı bulundu (63). Preeklampsili kadınlardaki L-arjinin düzeyleri normal hamile kadınların düzeylerinden belirgin olarak daha yüksek bulundu. Maas ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada Preeklampsi gelişen kadınlarda L-arjinin konsantrasyonunun düşük olduğu belirtilmiştir (63).

Endotel nitrik oksit üretimi ve endotel disfonksiyonu etkileyen en önemli faktör ADMA veya L-arjinin konsantrasyonlarının net etkisinden ziyade ADMA konsantrasyonu ve L-arjinin konsantrasyonu arasındaki denge olabilir (62).

Preeklampside L-arjinin /ADMA oranının önemi diğer çalışmacılar tarafından yapılan çalışmalar ile de gösterilmiştir(7). Petterson ve arkadaşları, ADMA ve plazma arjinin konsantrasyonlarının her ikisini de preeklampsili ve normotensif hamile kadınlarda ölçmüştür. Arjinin düzeylerinin; preeklampsili kadınlar ve normotensif kontrol grubunda değişmediği plazma arjinin/ADMA oranlarının ise preeklampsili grupta azaldığı bildirilmiştir (81). Bu çalışmalardaki ADMA ve L-arjinin düzeylerinde görülen

uyumsuzluklar kan basıncı, etnik grup ve örnek analizi gibi birkaç nedene bağlı olabileceği düşünülmektedir(81).

Alexander ve arkadaşları tarafından yapılan bir deneysel fare modelinde hem gebe farelere hem de rahim kanama basıncında kronik bir azalma gösteren farelere L-arjinin ilavesi arteriyel basınçta azalma ile sonuçlanmıştır. Bu durum tüm fare vücudunun her yerinde NO üretimi artışı ile ilişkilendirilmiştir(7). Bu yüzden L-arjinin ilavesinin preeklampsi vakalarında hipertansiyonun hafiflemesi için faydalı olduğu kanıtlanırken, NO yolunun bozulmasında preeklampsi fizyopatolojisi ile ilişkilendirilmesinde önemli bir rol oynayacağını bildirmişlerdir (7).

Türk kadınlarında preeklampside plazma ADMA düzeylerine dair bir değerlendirme olmadığı için etnik grubun etkisi değerlendirilememiştir. ADMA molekülü bir NOS inhibitörü olmasına rağmen, SDMA molekülü inhibitör bir etkiye sahip olmayıp böbrekler yolu ile vücuttan atılmaktadır (90).

ADMA molekülü temel olarak iki dimetil arjinin dimetilaminotransferazlarla (DDAH I and II) metabolize edilir(90). Çalışmamızda plazma SDMA düzeyleri ile ADMA/ SDMA oranlarının normal hamile kontroller ve preeklampsi hastalar arasında önemli farklılıklar gösterdiği saptandı. Savvidou ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada: ADMA molekülünün; DDAH tarafından metabolize edildiği buna karşılık SDMA atılımının değişmeden kaldığı gösterilmiş ve yüksek ADMA/ SDMA oranının nedeni olarak DDAH aktivitesinin bozulması gösterilmiştir (90). Ellis ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada ise plazma ADMA düzeylerinin normal hamile kontrollere oranla hafif ve ciddi preeklampsi hastalarda yükseldiği bulunmuştur (32). İlginç olarak; normotensif kontrol gruplarına göre SDMA düzeylerinin, ADMA düzeylerinden daha çok artış göstermesi şiddetli preeklampsi olan 24-32 haftalık ve 36-40 haftalık gebelerde düşük ADMA/SDMA oranına neden

olur. ADMA/SDMA oranının renal eliminasyonunun 1/1 oranında olduğu kabul edilirse, düşük ADMA/SDMA oranı ADMA'nın düşük üretim oranına ve artmış metabolik temizlenmesine işaret eder (32). Savvidou ve arkadaşları yapmış olduğu bir çalışmada preeklampsinin klinik belirtileri gelişmeden önce gebeliğin 23 haftasından itibaren preeklampside artmış ADMA düzeylerinin varlığını göstermiştir(90). Bu bulgular ADMA'nın, preeklampsi patogenezinde önemli bir rol oynadığını ve erken gebeliklerde ADMA'nın preeklampsi için prediktif bir test olduğunu göstermiştir(90).

Çalışmamızdaki diğer ilginç bir bulguda preeklampsi ve toplam hamilelerde eNOS gen polimorfizminin ADMA konsantrasyonu üzerindeki etkisidir. AA genotipi; GG ve GA genotiplerine oranla daha yüksek ADMA düzeylerini göstermektedir. Özellikle bu durum belirgin olarak tüm popülasyonda farklı olarak bulunurken ($P<0,05$). eNOS genotipi ve plazma SDMA ve L-arjinin düzeyleri arasında herhangi bir ilişki bulunmamıştır. Çalışmamız; eNOS genotipi ile ADMA, SDMA ve arjinin düzeyleri arasındaki ilişkiyi araştıran ilk çalışmadır. İstatistiksel olarak anlamlı olmasına rağmen Asp allel frekansı normal hamilelere oranla preeklampitik gebelerde daha yüksek olarak saptanmıştır(%5,5 ve % 0,0). Asp allel frekansındaki bu farklılıklar eNOS genotipleri açısından ADMA düzeylerinin etkilenebileceği bulgusunu ortaya çıkarmıştır.

Çalışmamızda örnek sayılarının az olmasının nedenlerinden biri olarak preeklampsili gebelerde preeklampsinin düşük bir insidansının olması ve preeklampsinin kesin tanısındaki karmaşıklık söylenebilir.

Sonuç olarak bu çalışmada elde edilen bulgular eNOS gen polimorfizminin ADMA konsantrasyonunda belirgin değişimlere neden olduğunu göstermektedir. Ancak bu değişimlerin preeklampsi riski ve eNOS gen polimorfizmi ile ilişkisini veya preeklampsideki eNOS genotipinin rolünün açıklayabilmek için daha büyük popülasyon

alışmalarına veya bu bulguların meta-analiz ile teyid etme çalışmalarının yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır Bulgularımız; ADMA'nın preeklampsi patogeneğinde bir rol oynadığını ve erken gebeliklerde ADMA zerine ilave araştırmaların yapılmasının ADMA'nın preeklampsi için prediktif bir test olarak kullanılması yönünde katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. A.Vallance P., Collier J.(1994). Biology and clinical relevance of nitric oxide. *BMI*. 309:453-7,
2. Aneman A, Backman V, Snygg J, von Bothmer C, Fändriks L, Pettersson A.(1994).Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase during graded hemorrhagic shock. *Circ Shock* 44(3):111-4.
3. ACOG practice bulletin.(2002). Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number American College of Obstetricians and Gynecologists. *Int J Gynaecol Obstet* 2002; 77(1):67-75.
4. Afrasyap L, Ozturk G. (2004) .NO level and endothelial NO synthase gene polymorphism (Glu298Asp) in the patients with coronary artery disease from the Turkish population. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 36(10):661-666
5. Aladağ A., Türköz Y., Özerol İB.(2000). Nitrik oksit ve nörofizyopatolojik etkileri *Türkiye Klinikleri J Med Sci*. 20:107–111,
6. Albecht E, Stagemen C, Heeringa P, Henning RH, Van Goor H.(2003). Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol*. 199: 8-17
7. Alexander BT, Llinas MT, Kruckeberg WC, Granger JP.(2004). L-Arginine attenuates hypertension in pregnant rats with reduced uterine perfusion pressure. *Hypertension* 43:832-6.
8. American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG),(2002). Practice Bulletin no. 33. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. *Obstet. Gynecol*. 99, 159
9. Atalık KE., Doğan N.(1997). Nitrik oksit ve fizyolojik etkileri. *Genel Tıp Derg*. 7(3):167–169,
10. Azuma H, Sato J, Hamasaki H, Sugimoto A, Isotani E, andObayashi S.(1995). Accumulation of endogenous inhibitor for nitric oxide synthesis and decreased content of L-arginine in regenerated endothelial cells. *Br J Pharmacol* 115: 1001–1004
11. Basaran, N.,Tıbbi Genetik,7. Baskı,Günes ve Nobel Kitabevi. Bursa, 1999.
12. Berlett BS., Stadtman ER.(1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stres. Minireview: *The Journal Of Biological Chemistry*, 272(33):20313–20316
13. Biswas S, Kabir SN, Pal AK.(1998). The role of nitric oxide in the process of implantation in rats. *J. Reprod. Fertil* 114: 157-161.
14. Bivalacqua TJ, Usta MF, Champion HC, Leungwattanakij S, Dabisch P, Kadwitz PJ, Hellstrom WJG.(2004). Effect of combination of endothelial nitric oxide synthase gene therapy and sildenafil on erectile function on diabeticrats. *Int J Imp Res*. 16(1):2129.
15. Boccardo P, Soregaroli M, Aiello S, Noris M, Donadelli R, Lojacono A,et al.(1996). Systemic and fetalematalernal nitric oxide synthesis in normalpregnancy and preeclampsia. *Br J Obstet Gynecol* 103:879-86
16. . Böger RH, Bode-Böger SM, Heistad DD, Lentz SR.(1998). Elevated plasma concentration of asymmetric dimethylarginine (ADMA), an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, inmonkeys with hyperhomocysteinemia. *Circulation* 98:I-733.
17. Boger RH.(2003).Association of asymmetric dimethylarginine and endothelial dysfunction. *Clin Chem Lab Med*. 41:1467–1472.

18. Büyükaşar K. (2005). Nitrik oksidin fizyolojik ve fizyopatolojik olaylardaki rolü. *Türk Farmokoloji Derneği Nitrik Oksidin Farmokolojisi 27 Mayıs Mersin Seminer Özetleri*.
19. Cavalli Sforza L.L., Bodmer WF. (1971). The genetics of human populations. WH Freeman, San Francisco
20. Chesley LC (1985). Diagnosis of Preeclampsia. *ObstetGynecol* 65:423
21. Choi JW, Im MW, Pai SH.(2002). Nitric oxide production increases during normal pregnancy and decreases in preeclampsia. *Ann Clin Lab Sci* 32:257-63.
22. Conrad KP, Davis AK.(1995). Nitric oxide synthase activity in placenta from women with preeclampsia. *Placenta* 16:691-9.
23. Cooke JP.(2000). Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20:2032–2037.
24. Cooper G.M.(1997). The Cell. A Moleküler Approach., ASM Press, Washington D.C.
25. Cunningham FG, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap LC, Hauth JC, Wenstrom KD.(2001). Williams Obstetrics. 21th edition. McGRAW-HILL, 584-8.
26. Cunningham FG, Mac Donald PC, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap LC, Hankins GDV, Clark SL.(1997). Williams Obstetrics. 20th edition. Connecticut, Appleton & Lange 693-745.
27. Cunningham FG, Mac Donald PC, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap LJ, Hankins GDV, Clark SL.(2001).Williams Obstetrics. 21th edition Connecticut, the McGraw- Hill 567-609
28. Dekker G, Sibai B.(2001). Primary, secondary, and tertiary prevention of preeclampsia.*Lancet* Jan 20;357(9251):209-15
29. Dekker GA.(1989). Prediction and prevention of pregnancy induced hypertensive disorders: a clinical pathophysiologic study(thesis). Rotterdam:Erasmus university
30. Demiryürek Ş., Turan NN., Demiryürek AT.(2004). Peroksinitritin akciğerlerdeki etkileri ve akciğer hastalıklarındaki rolü. *Genel Tıp Derg.* 14(4):163–169
31. Dimmeler S, Zeiher AM.(1999). Nitric oxide-an endothelial cell survival factor. *Cell Death Differ* 6: 964-968.
32. Ellis J, Wennerholm UB, Bengtsson A, et al.(2001). Levels of dimethylarginines and cytokines in mild and severe preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 80: 602-608.
33. Femke Slaghekke, Gus Dekker, & Bill Jeffries.(2006). Endogenous inhibitors of nitric oxide and preeclampsia: A review *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* 19(8): 447–452
34. Fickling SA, Whitley GS, Nussey SS.(1998). Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine, a natural inhibitor of nitric oxide synthase, in normal pregnancy and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 178:551-556.
35. Fickling SA, Williams D, Vallance P, Nussey SS, Whitley GS.(1993). Plasma concentrations of endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in normal pregnancy and preeclampsia. *Lancet* 342:242–243.
36. Fliser D.(2005). Asymmetric dimethylarginine (ADMA): The silent transition from an ‘uraemic toxin’ to a global cardiovascular risk molecule. *Eur J Clin Invest* 35:71–79
37. Genoveva Duran-Reyes MO, Gomez Melendez MR, Hicks Gomez JJ. (1999). Nitric oxide as a regulator of hemodynamic changes in pregnancy. *Ginesol. Obstet Mex.* 67: 29-36.
38. Güray A., Samancı N., Ovalı F., Dağoğlu T.(1997). Nitric oxide: Physiology and clinical importance. *Turkiye Klinikleri J Med Sci.* 17: 115–119

39. Haddad B, Sibai BM.(1999). Chronic hypertension in pregnancy. *Ann Med* 31(4):246-52
40. Hakli T, Romppanen E-L, Hiltunen M, Helisalml S, Punnonen K, Heinonen S (2003). Endothelial nitric oxide synthase polymorphism in preeclampsia. *J Soc Gynecol Invest* 10:154 –157.
41. Hebisch G.(2003). Hypertension and pregnancy. *Schweiz Rundsch Med Prax* 92(50):2137-43
42. Hekimoğlu A.(2007). Terapötik gazlar: Oksijen, karbondioksit, nitrik oksit ve helyum. *Dicle Tıp Dergisi*, 34(1):61-69
43. Hingorani AD.(2003). Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 5:19 –25.
44. Hodis HN, Mack WJ, Labree L et al.(1998). The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events. *Ann Intern Med* 128:262–269
45. Holden DP, Fickling SA, Whitley GS, Nussey SS. (1998). Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine, a natural inhibitor of nitric oxide synthase, in normal pregnancy and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 178:551-556.
46. Holden DP, Fickling SA, Whitley GS, Nussey SS. (1998). Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine, a natural inhibitor of nitric oxide synthase, in normal pregnancy and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 178:551–556.
47. John S.W.M., Weitzner G., Rozen R., Scriver C.R., (1998). A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic acid research.*21: 351- 359
48. Kaya E. (2001). Gebelik Hipertansiyonu Preeklampsi-eklampsi. *Maternal-Fetal Tıp ve Perinatoloji*. Ankara, Medical Network. pp: 661-75
49. Kayalı R., Çakatay U.(2004). Protein oksidasyonunun ana mekanizmaları. *Cerrahpaşa J Med.* 35:83-89
50. Kılınç A, Kılınç K. (2003). Nitrik Oksit Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri. *PalmeYayıncılık*,1. Baskı, Ankara, 1-68
51. Kılınç K., Kılınç A. (2002). Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Temel Tıptan Kliniği. Hacettepe Tıp Derg.* 33(2):110-118
52. Kielstein JT, Böger RH, Bode-Böger SM et al. (1999). Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: Relationship to treatment method and atherosclerotic disease. *J Am Soc Nephrol* 10:594–600
53. Kielstein JT, Impraim B, Simmel S, Bode-Boger SM, Tsikas D, Frolich JC, Hoepfer MM, Haller H, Flisher D. (2004). Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation.* 109:172–177
54. Kielstein JT. (2005). Asymmetric Dimethylarginine: A Cardiovascular risk Factor and a Uremic Toxin coming age? *American Journal of Kidney Diseases.* 46: 2.
55. Kobashi G, Yamada H, Ohta K, Kato E, Ebina Y, Fujimoto S. (2001). Endothelial nitric oxide synthase gene (NOS3) variant and hypertension in pregnancy. *Am J Med Genet* 103:241–244.
56. Kosmas IP, Tatsioni A, Ioannidis JP. (2003). Association of Leiden mutation in factor V gene with hypertension in pregnancy and pre-eclampsia: a meta-analysis. *J Hypertens* 21:1221-8.
57. Krotz S, Fajardo J, Ghandi S, Patel A, Keith LG. (2002). Hypertensive disease in twin pregnancies: a review. *Twin Res* 5:8-14.

58. Kupferminc MJ, Fait G, Many A, Gordon D, Eldor A, Lessing JB.(2000). Severe preeclampsia and high frequency of genetic thrombophilic mutations. *Obstet Gynecol* 96:45-9.
59. Kurban S., Mehmetoğlu İ.(2005).Okside düşük dansiteli lipoprotein otoantikorları ve klinik önemi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci.* 25:73-84
60. Levin B. (2000). *Genes VII.* Oxford University Press, New York,
61. Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Tsuji H, Reaven GM, Cooke JP. (2002). Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus:role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation.*106:987–992.
62. Lowe DT. (2000). Nitric oxide dysfunction in the pathophysiology of preeclampsia. *Nitric oxide. Biol Chem* 4:441-58.
63. Maas R, Boger RH, Schweldhelm E. (2004). Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in Colombian women with preeclampsia. *JAMA* 291:823–824.
64. MacAllister RJ, Whitley GS, Vallance P. (1994). Effects of guanidino and uremic compounds on nitric oxide pathways. *Kidney Int.* 45:737–42
65. Mark F. McCarty. (2004). Plasma levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA), an endogenously produced competitive inhibitor of nitric oxide synthase (NOS). *Medical Hypotheses* 63: 699–708.
66. Mattar F, Sibai BM. (2000). Eclampsia.VIII- Risks factors for maternal mortality. *Am J Obstet Gynaecol* 182(2): 307 – 312.
67. McBride AE, Silver PA. (2001). State of the Arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell.*106:5–8
68. McDermott JR. (1976). Studies on the catabolism of Ng-methylarginine, Ng, Ng-dimethylarginine and Ng, Ng-dimethylarginine in the rabbit. *Biochem J.* 154:179–184.
69. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N (1998). Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 32: 3-8
70. Morgan L, Crawshaw S, Baker PN. (1999). Maternal and fetal angiotensinogen gene allele sharing in pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 106:244-251.
71. Murray-Rust J, Leiper J, McAlister M, Tilley S, Santa Maria J, Vallance P, McDonald N. (2001). Structural insights into the hydrolysis of cellular nitric oxide synthase inhibitors by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Nat Struct Biol.* 8:679–683.
72. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M. (2002). T(-786) C mutation in the 52 flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with myocardial infarction, especially without coronary artery stenosis. *Am J Cardiol.* 86: 628-634
73. Nassar BA, Bevin LD, Johnstone DE: (2001).Relationship of the Glu298Asp polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene and early-onset coronary artery disease. *Am Heart J.* 142 586-589
74. Norman JE, Cameron IT. (1996).Nitric oxide in the human uterus. *Rev Reprod* 1:61-8.
75. Özekin A., Değer O. (2001). LDL oksidasyonu ve etkileri *İbni Sina Tıp Dergisi,* 6:125-132
76. Özkan M., Yüksekol İ. (2003). Nitrik oksit ve akciğerler. *Toraks Dergisi,* 4(1):88-94

77. Paiva H, Lehtimäki T, Laakso J, Ruokonen I, Rantalaiho V, Wirta O, Pasternack A, Laaksonen R. (2003). Plasma concentrations of asymmetric-dimethylarginine in type 2 diabetes associate with glycemic control and glomerular filtration rate but not with risk factors of vasculopathy. *Metabolism*. 52:303–307.
78. Paloma L, Torondel B, Medina P, Segarra G, Olmo JA, Serra MA., Rodrigo JM. (2004). Plasma concentrations of nitric oxide and asymmetric dimethylarginine in human alcoholic cirrhosis. *Journal of Hepatology* 41-42
79. Passarge E. (2000). *Renkli Genetik Atlası*, Yüce Yayıncılık ve Nobel Tıp Kitabevi,
80. Passarge M., Passarge E. (1995). *Color Atlas of Genetics*. TMP, New York
81. Pettersson A, Hedner T, Milsom I. (1998). Increased circulating concentrations of asymmetric dimethyl arginine (ADMA), an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis, in preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 77:808–813.
82. Ramsey B, Sooranna SR, Johnson MR. (1996). Nitric oxide synthase activity in human myometrium and villous trophoblast throughout pregnancy. *Obstet Gynecol*. 87:249-79
83. Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. (1999). Preeclampsia: An excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 180:499–506.
84. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High blood pressure in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:1-22.
85. Robson SC, Hunter S, Boys RJ, Dunlop W. (1998). Serial study of factors influencing changes in cardiac output during human pregnancy. *Am J Physiol*. 256:1060–1065.
86. Rosenfeld CR. (2001). Mechanisms regulating angiotensin II responsiveness by the uteroplacental circulation. *Am J Physiol* 281:R1025–1040.
87. Rutherford RA, McCarthy A, Sullivan MH, Elder MG, Polar JM, Wharton J. (1995). Nitric oxide synthase in human placenta and umbilical cord from normal, intrauterine growth-retarded and preeclamptic pregnancies. *Br J Pharmacol* 116:3099-109.
88. Saftlas AF, Olson DR, Franks AC. (1990). Epidemiology of pre-eclampsia in United States 1979-1986. *Am J Obstet Gynecol* 163:460-5.
89. Salonen Ros H, Lichtenstein P, Lipworth L, Cnattingius S (2000). Genetic effects on the liability of developing pre-eclampsia and gestational hypertension. *Am J Med Genet* 91:256-60.
90. Savvidou MD, Hingorani AD, Tsikas D, Frolich JC, Vallance P, Nicolaides KH. (2003). Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia. *Lancet*. 361:1511-1517.
91. Serrano NC, Casas JP, Diaz LA, Paez C, Mesa CM, Cifuentes R, et al.(2004). Endothelial NO synthase genotype and risk of preeclampsia. *Hypertension* 44:702-7.
92. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. (2005). Pre-eclampsia. *Lancet* 365:785–799.
93. Sibai BM, Lindheimer M, Hauth J, Caritis S, et al.(1998). Risk factors for preeclampsia, abruptio placentae, and adverse neonatal outcomes among women with chronic hypertension. *N Eng J Med* 339:667
94. Sladek SM, Magness RR, Conrad KP. (1997). Nitric oxide and pregnancy. *Am J Physiol* 272:R441–463.
95. Smith GC, Pell JP, Walsh D (2001). Pregnancy complications and maternal risk of ischaemic heart disease: a retrospective cohort study of 129,290 births. *Lancet* 357:2002-6.

96. T.C. Sağlık Bakanlığı AÇSAP Genel Müdürlüğü:(1992). Ana Sağlığı Ankara 37-39
97. Tefler JF, Lyall F, Norman JE, Cameron IT. (1995). Identification of nitric oxide synthase in human uterus. *Hum Reprod.* 101:19-23.
98. Tschugguel W, Schneeberger C, Unfried G, Brautigam G, Stonek F, Wieser F, Vytiska-Binstorfer, Czerwenka K, Weninger W, Kaider A, Bruschi W, Breitschopf, Hubar JC.(1999). Elevation of inducible nitric oxide synthase activity in human endometrium during menstruation. *Biol Reprod* 60:297-304.
99. Tschugguel W, Schneeberger C, Unfried G, Czerwenka K, Weninger W, Mildner M, Bishop JR, Hubar JC. (1998). Induction of inducible nitric oxide synthase expression in human secretory endometrium. *Hum Reprod* 13: 1414. 47
100. Valkonen VP, Paiva H, Salonen JT, Lakka TA, Lehtimäki T, Laakso J, et al.(2001). Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* 358:2127-8
101. Vallance P, Leiper J. (2004). Cardiovascular Biology of the Asymmetric Dimethylarginine:Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase Pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:1023-1030.
102. Wang Y, Gu Y, Zhang Y, Lewis DF.(2004). Evidence of endothelial dysfunction in preeclampsia: Decreased endothelial nitric oxide synthase expression is associated with increased cell permeability in endothelial cells from preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 190:817–824.
103. Watson JD. (1968) .The double helix. New York: Athenum
104. WHO/MCH/MSM:(1992). Safe motherhood. Detecting preeclampsia: a practical guide, Geneva (3); 33-35
105. WHO/MCH: (1991).Hypertensive disorders of pregnancy, report of a WHO/MCH interregional collaborative study. Geneva 12-62
106. Williams DJ, Vallance PJT, Neild GH, Spencer JA, Imms FJ.(1997). Nitric oxide-mediated vasodilation in human pregnancy. *Am J Physiol.* 272:748–752.
107. Won Bae S, Stühlinger MC, Yoo HS, Hyun KY, Park HK et al.(2005). Plasma Asymmetric Dimethylarginine Concentrations in Newly Diagnosed Patients With Acute Myocardial Infarction or Unstable Angina Pectoris During Two Weeks of Medical Treatment *Am J Cardiol* 95:729–733.
108. Xiong Y, Fu YF, Fu SH, Zhou HH.(2003). Elevated levels of the serum endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and metabolic control in rats with streptozotocin induced diabetes. *J Cardiovasc Pharmacol.*42:191–196.
109. Yallampalli C, Dong YL, gangula PR, fang L. (1998). Role and regulation of nitric oxide in the uterus during pregnancy and parturition. *J Soc Gynecol Investig* 5:58-67.
110. Yan Xionga T, Leib M, Fua S, Fua Y. (2005). Effect of diabetic duration on serum concentrations of endogenous inhibitor of nitric oxide synthase in patients and rats with diabetes. *Life Sciences* 77: 149–159.
111. Yoo JH, Lee SC. (2001). Elevated levels of plasma homocysteine and asymmetric dimethylarginine in elderly patients with stroke. *Atherosclerosis* 158:425-30.
112. Yoshimura T, Yoshimura M, Tabata A, Yasue H, Okamura H. (2001). The missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene is strongly associated with placental abruption. *Hum Genet*108:181–183.
113. Zanchi A, Moczulski DK, Hana LS, Wantman L. (2000). Risk of advanced diabetic nephropathy in type 1 diabetes is associated with endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. *Kidney Int.* 57: 405-413

114. Zoccali C, Mallamaci F, and Tripepi G. (2004). Novel Cardiovascular Risk Factors in End-Stage Renal Disease *Journal of the American Society of Nephrology* 15: 77–80.

8. ÖZGEÇMİŞ

1966 yılında Şanlıurfa da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimim Şanlıurfa da tamamladıktan sonra 1987 yılında İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü kazandım ve 1991 yılında buradan mezun oldum. Daha sonra Turgut Özal Tıp Merkezinde Biyolog olarak göreve başladım. Ve aynı zamanda Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji bölümünde yüksek lisans yaptıktan sonra askerlik hizmetini yapmak için askere gittim. Askerlik sonrasında da Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Biyokimyada doktora başladım halen Turgut Özal Tıp Merkezinde Biyolog olarak çalışmaktayım.