

Preeklampitik ve Normotansif Gebelerde Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü ve Solubl FMS Benzeri Tirozin Kinaz-1 Düzeylerinin İncelenmesi

The Evaluation of the Levels of Vascular Endothelial Growth Factor and Soluble FMS Like Tyrosine Kinase-1 in Preeclamptic and Normotensive Pregnant Women

Dr. Fatma TUNCAY ÖZGÜNEN,^a
Dr. Necdet ÖZBİLEN,^a
Dr. Selim BÜYÜKKURT,^a
Dr. Cüneyt EVRÜKE,^a
Dr. Cansun DEMİR,^a
Dr. Oktay KADAYIÇI^a

^aKadın Hastalıkları ve Doğum AD,
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Adana

Geliş Tarihi/Received: 05.08.2008
Kabul Tarihi/Accepted: 28.11.2008

*Bu çalışma Türkiye Jinekoloji ve
Obstetrik Derneği'nin VI. Ulusal
Kongresi'nde sunulmuş ve 8'incilik ödülü
almıştır.*

Yazışma Adresi/Correspondence:

Dr. Selim BÜYÜKKURT
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Kadın Hastalıkları ve Doğum AD, Adana
TÜRKİYE/TURKEY
selimbuyukkurt@gmail.com

ÖZET Giriş: Preeklampside trofoblastların uterusun spiral arteriyollerine yeterince invazyon yapmaması, damarlarda düşük kapasite ve yüksek direnç yol açmaktadır. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) hipoksi ile tetiklenen anjiyogenezisten sorumlu bir moleküldür. Solubl FMS benzeri tirozin kinaz-1 (sFlt-1) ise VEGF etkisini antagonize eder. **Gereç ve Yöntemler:** Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Bölümüne başvuran normotansif ve preeklampitik gebelerden alınan kan örneklerinde serbest VEGF ve sFlt-1 düzeyleri incelendi. Serum örnekleri ELISA yöntemiyle değerlendirildi. **Bulgular:** Çalışma ve kontrol gruplarında 60 hasta vardı. Preeklampitik gebelerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plazma serbest VEGF düzeyleri belirgin olarak düşük (4-11 pg/mL'ye karşılık 9-24 pg/mL; p= 0.002) iken plazma sFlt-1 düzeyleri ise belirgin olarak yüksekti (4899-9962 pg/mL'ye karşılık 900-3954 pg/mL; p= 0.002). Sistolik ve diyastolik kan basıncı ile plazma sFlt-1 düzeyi arasında pozitif bir ilişki, plazma serbest VEGF düzeyi ile sistolik ve diyastolik kan basıncı arasında negatif bir ilişki mevcuttu. **Sonuç:** VEGF yeni damar oluşumunu tetikleyen, endotel hücrelerine özgü bir büyüme faktörüdür. sFlt-1 ise VEGF reseptörüne bağlanarak onu etkisiz hale getiren bir proteindir. Deney hayvanlarına sFlt-1 verilmesiyle preeklampsisi benzeri bir klinik tablo ve böbreklerde glomerüler endoteliozis oluşturulmuştur. Yaptığımız çalışmada, preeklampitik hastalarda plazma serbest VEGF düzeyleri azalma, sFlt-1 düzeyleri ise artma göstermektedir. Bu bulgular preeklampsisi patogenezinde anjiyogenezisin yetersizliğine bağlı hipoksi gelişiminde sFlt-1'in etkili bir rolü olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Preeklampsisi; vasküler endotelial büyüme faktörü

ABSTRACT Objective: The incomplete invasion of the trophoblasts in the spiral arteries is the cause of the low vascular capacity and increased resistance in preeclampsia. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a molecule which is responsible of the hypoxia triggered angiogenesis. On the other hand; soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) inhibits the effect of the VEGF. **Material and Methods:** In this study serum free VEGF and sFlt-1 levels of the preeclamptic and normotensive women who admitted to the Obstetric and Gynecology Unit Faculty of Medicine of the Cukurova University are examined. The samples are measured by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** The study and control group contained 60 patients. Preeclamptic women had significantly low levels of free VEGF comparing to the normotensive women (4-11 pg/mL versus 9-24 pg/mL; p= 0.002); while sFlt-1 levels were considerably increased (4899-9962 pg/mL versus 900-3954 pg/mL; p= 0.002). Systolic and diastolic blood pressure had a positive correlation with the sFlt-1 levels and negative association with the VEGF. **Conclusion:** VEGF is an endotel specific factor which stimulates the production of the new vessels. On the other hand sFlt-1 binds to the VEGF receptor and inhibits its effect. The clinical features of the preeclampsia and renal glomerular endotheliosis were observed when sFlt-1 is given to the animals. Our study showed a significant decrease on the levels of the free VEGF and increase on the levels of the sFlt-1. We thought that sFlt-1 had an important role in the hypoxia due to the angiogenic insufficiency.

Key Words: Pre-eclampsia; vascular endothelial growth factors

Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst 2009;19(1):21-4

Preeklampsisi tüm gebeliklerin % 5-6'sını etkileyen, anne ve yenidoğanda mortalite ve morbidite yaratabilen bir durumdur. Hipokrat'tan beri bilinen bir durum olmasına rağmen etiyojisi kesin olarak aydınlatılamamıştır. Ancak plasenta kaynaklı bir hastalık olduğu, plasentadan anne dolaşımına geçen bazı maddelerin annede endotel hasarı oluşturması üzerine hipertansiyon ve proteinürinin meydana geldiği bilinmektedir.^{1,2}

Preeklampsiyi tetikleyen maddelerin plasentadan salınımının başlangıcını ise vaskülogenezisin kusurlu olmasına bağlı plasenta iskemisinin meydana getirdiği düşünülmektedir. Salınan maddelerin oluşturduğu sistemik endotel hasarı da annede renal, serebral, hepatik ve kardiyovasküler iskemi yaratarak preeklampsinin bilinen semptomlarını oluşturmaktadır.

Preeklampsinin etiyojisi ile ilgili rol alan bu maddelerin en önemlileri vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve solubl FMS benzeri tirozin kinaz-1 (sFlt-1)'dir. VEGF, FMS-benzeri tirozin kinaz-1 reseptörüne (ya da VEGF reseptörü-1) ve kinaz bölgesi reseptörüne (ya da VEGF reseptörü-2) yüksek bir afiniteyle bağlanır.^{3,4} sFlt-1 ise Flt-1'e çok yakından benzerdir ve sadece transmembran ve sitoplazmik kısımları eksiktir. Bu nedenle, bu çok benzer yapı VEGF'yi bağlayarak, etkisini ortadan kaldırır ve güçlü bir VEGF antagonisti etki oluşturur.⁵

VEGF'nin bilinen en önemli iki özelliği, damar geçirgenliğini artırması ve pıhtılaşmayı tetiklemesidir. Daha da önemlisi, yapılan in vitro çalışmalarda, aynı preeklampitik kadınların plazması verildiğinde olduğu gibi, endotele bağlı düz kas gevşemesinin kısıtlandığı izlenmiştir.^{2,6}

Bu çalışmada, preeklampitik ve normotansif kadınlarda VEGF ve sFlt-1 düzeylerini inceleyerek bu maddelerin preeklampsisi fizyopatolojisindeki rolünü aydınlatmayı hedefledik.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamız 01 Eylül 2006-01 Eylül 2007 tarihleri arasında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Servisine başvuran 20-35. gebelik haftaları arasındaki 60 preeklampitik

hasta ve bu hastaların her birini takip ederek doğumhaneye başvuran 60 normotansif gebeden alınan serum örnekleriyle yapıldı.

20.-35. gebelik haftalarında olan 60 preeklampitik gebe ile aynı gebelik haftalarında olan aynı sayıdaki sağlıklı gebe çalışmaya alındı. Olgulardan alınan kan örnekleri 5000 devirde 5 dakika süre ile santrifüj edildikten sonra plazmaları alındı ve laboratuvarında çalışılncaya kadar -70°C'de saklandı. Preeklampitik gebeler seçilirken daha önceden hipertansiyon veya renal hastalık öyküsü olmayan, mevcut gebeliğinde 24 saatlik idrarda 300 mg'ın üzerinde proteinüri ile birlikte persiste tansiyon yüksekliği (> 140/90 mmHg) olan gebeler çalışmaya alındı. Kontrol grubu olarak seçilen gebelerde hipertansiyon, proteinüri veya ödem bulunmamasına dikkat edildi. Çalışma grubundan alınacak kan örnekleri preeklampsiye ait klinik tablo yerleştikten sonra ve tedaviye başlamadan önce alındı. Plazma VEGF ve sFlt-1 düzeyleri, ELISA yöntemi ile 1 pg/mL'lik duyarlılık ve %100'e yakın özgüllük ile incelendi (Bender Medsystems, Viyana, Avusturya). Ölçümler esnasında herhangi bir çapraz reaksiyon ile karşılaşılma. Tüm değerler ortalama ± SS olarak ifade edildi.

Çalışma ve kontrol grubundaki hastaların tümü aydınlatılmış onam belgesini imzaladıktan sonra çalışmaya dahil edildiler. Bu çalışma protokolü aynı zamanda Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından da onaylanmıştır.

Toplanan verilerin analizinde SPSS 15,0 Evaluation Version (Statistical Package for Social Sciences Chicago, ABD) kullanıldı. Elde edilen sonuçlar Pearson ki-kare, Spearman korelasyon testi ve Student t-testi kullanılarak değerlendirildi. Anlamlılık için p değerinin 0.05'ten küçük olması arandı.

BULGULAR

Örnek alınma anında her iki gruptaki kadınlarda anne yaşı, gebelik haftası ve parite açısından istatistiksel olarak fark bulunmadı.

Preeklampitik hastalarda, tahmin edileceği üzere sistolik ve diyastolik tansiyon değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek

bulundu (sistolik 165 ± 14.1 ; 124 ± 3.1 ; $p < 0.05$ ve diyastolik 118 ± 7.6 ; 76 ± 3.9 ; $p < 0.05$) (Tablo 1). Preeklampatik hastalarda serbest VEGF düzeyi daha düşük saptanırken (6.15 ± 1.9 pg/mL; 14.9 ± 6.1 pg/mL; $p < 0.05$), sFlt-1 yüksek düzeyde (6.89 ± 2.4 pg/mL; 1.84 ± 1.3 pg/mL; $p < 0.05$) bulunmuştur (Tablo 2).

TARTIŞMA

VEGF endotele özgü bir büyüme faktörü olup; endotelde büyüme, kemotaksis ve yeni damar oluşumunun uyarılmasından sorumludur. VEGF'nin ayrıca damar geçirgenliğini artırıcı, pıhtılaşmayı uyarıcı etkisi olduğu da bilinmektedir.² Bugüne kadar preeklampatik kadınlarda yapılmış olan çalışmalarda serum toplam VEGF düzeylerinde artış saptanmış olmasına rağmen, serbest VEGF düzeylerinin belirgin şekilde azaldığı bulunmuştur. Bu farklılık, VEGF düzeyini ölçerken kullanılan laboratuvar yöntemine bağlıdır. ELISA yöntemini kullanan çalışmalar VEGF'yi azalmış bulurken, radyoimmünassay yöntemiyle yapılan çalışmalar VEGF'nin arttığını belirtmektedir.⁷⁻¹⁰

Dolaşımdaki VEGF için iki ana depolanma noktası vardır: $\alpha 2$ -makroglobulin ($\alpha 2$ -M) ve sFlt-1 olarak bilinen plazma proteinleri ile trombositlerdir. sFlt-1 ise Flt-1'e çok yakından benzemektedir ve sadece transmembran ve sitoplazmik kısımları

eksiktir. Bu nedenle, bu çok benzer yapı VEGF'yi bağlayarak etkisini ortadan kaldırır ve güçlü bir VEGF antagonisti etki oluşturur.⁵ Preeklampatik kadınlarda yapılan bir başka çalışmada da, plasental Flt-1 m-RNA üretiminin uyarıldığı ve doğumdan sonra düşüş gösteren sFlt-1 düzeylerinin altında yatan nedenin de bu olduğu gösterilmiştir.² VEGF'nin etkisinin engellenmesinin preeklampsi fizyopatolojisindeki yerini gösteren başka çalışma modelleri de vardır. Gebe olmayan hayvanlara anti-VEGF faktörlerinin verilmesinin hipertansiyon ve proteinüriye neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca gebe hayvanlara sFlt-1 verilmesi hipertansiyon, proteinüri ve glomerüler endotelyozis gibi preeklampsi bulgularının belirmesine neden olmuştur.⁵

Bazı deneysel çalışmalar, VEGF ve sFlt-1'in endotel üzerine etkisini gösterme konusunda önemli ipuçları vermektedir. Normotansif gebeden elde edilen serumun endotel hücrelerinde tübüler bir yapı oluşmasını sağlayıcı etki göstermesinin yanı sıra, bu etki sFlt-1'in eklenmesiyle ortadan kaldırılmıştır. Preeklampatik gebelerden elde edilen serum örneğinin ise endotel hücrelerinde tübüler bir yapı oluşumunu engelleyici etki gösterdiği ve bu etkinin doğumdan sonra ortadan kalktığı da gösterilmiştir.^{2,5}

Serbest VEGF derişimindeki azalmanın endotel ömrü ve işlevlerini azaltmasının yanında, VEGF'nin preeklampsideki endotel işlevlerini düzenlemede rolü olduğunu gösteren dolaylı bulgular da bulunmaktadır. Bir in vitro çalışmada, VEGF'nin derişime bağımlı şekilde prostasiklin üretimini uyardığı gösterilmiştir. Prostasiklin üretimindeki bu artış, preeklampatik gebelerin serumunun verilmesiyle elde edilen artışa benzerlik göstermekte ve anti-VEGF antikoru verildiğinde de ortadan kalkmaktaydı. Ayrıca VEGF'nin insan endotelinde nitrik oksit (NO) üretimini artırdığı da bildirilmiştir.^{11,12}

Sonuç olarak bu çalışma, preeklampatik kadınlarda dolaşımdaki sFlt-1 düzeylerinin arttığını ve serbest VEGF düzeylerinin ise azaldığını göstermektedir. Bu bulgu, preeklampsinin fizyopatolojisinde VEGF ve onun solubl reseptörünün önemli bir role sahip olduğunu düşündürse de, diğer moleküller ve onların reseptörleriyle olan ilişkilerini ortaya koyacak çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

TABLO 1: Preeklampatik ve normotansif hasta grupları arasındaki sistolik ve diastolik kan basıncı düzeyleri.

	n	Min.	Maks.	Ortalama	SS	p
Sistolik	Preeklampatik	60	141	184	165.21	14.1 < 0.05
	Normotansif	60	119	129	124.41	3.1
Diyastolik	Preeklampatik	60	100	127	118.1	7.6 < 0.05
	Normotansif	60	70	82	76.1	3.9

TABLO 2: Preeklampatik ve normotansif hasta grupları arasındaki serbest VEGF ve sFlt-1 düzeyleri.

	n	Ortalama	SS	p
Serbest VEGF	Preeklampatik	60	6.15	1.9 < 0.05
	Normotansif	60	14.9	6.1
sFlt-1	Preeklampatik	60	6.89	2.4 < 0.05
	Normotansif	60	1.84	1.3

KAYNAKLAR

1. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 2004;350(7):672-83.
2. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 2003;111(5):649-58.
3. Jelkmann W. Pitfalls in the measurement of circulating vascular endothelial growth factor. *Clin Chem* 2001;47(4):617-23.
4. Sugimoto H, Hamano Y, Charytan D, Cosgrove D, Kieran M, Sudhakar A, et al. Neutralization of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) by anti-VEGF antibodies and soluble VEGF receptor 1 induces proteinuria. *J Biol Chem* 2003;278(15):12605-8.
5. Chaiworapongsa T, Romero R, Espinoza J, Bujold E, Mee Kim Y, Goncalves LF, et al. Evidence supporting a role for blockade of the vascular endothelial growth factor system in the pathophysiology of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190(6):1541-50.
6. Brockelsby JC, Hayman R, Ahmed A, Warren A, Johnson I, Baker P. VEGF via VEGF receptor-1 (Flt-1) mimics preeclamptic plasma in inhibiting uterine blood vessel relaxation in pregnancy: implications in the pathogenesis of preeclampsia. *Lab Invest* 1999;79(9):1101-11.
7. Lyall F, Greer IA, Boswell F, Fleming R. Suppression of serum vascular endothelial growth factor immunoreactivity in normal pregnancy and in preeclampsia. *Br J Obstet Gynecol* 1997;104(2):223-8.
8. Reuvekamp A, Velsing-Aarts FV, Poulina IEJ, Capello JJ, Duits AJ. Selective deficit of angiogenic growth factor characterizes pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynecol* 1999;106(10):1019-22.
9. Baker PN, Krasnow J, Roberts JM, Yeo KT. Elevated serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1995;86(5):815-21.
10. Sharkey AM, Cooper JC, Balmforth JR, McLaren J, Clark DE, Charnock-Jones DS, et al. Maternal plasma levels of vascular endothelial growth factor in normotensive pregnancies and pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Eur J Clin Invest* 1996;26(12):1182-5.
11. Brockelsby JC, Anthony FW, Johnson IR, Baker PN. The effects of vascular endothelial growth factor on endothelial cells: A potential role in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182(1 Pt 1):176-83.
12. Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, Granger HJ. VEGF up regulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am J Physiol* 1998;274(3 Pt 2):1054-8.