

Yenidoğan Ratlarda Nikotin İle Oluşturulan Miyokardiyal Hasarın Biyokimyasal ve Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi

The Biochemical and Histopathological Evaluation of Myocardial Damage Induced by Nicotine in Newborn Rats

Figen Narin* Selda Yavaşcan** Nazmi Narin** Hülya Akgün***
Ali Baykan** Kazım Üzümlü** Recep Saraymen*

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kayseri

*Biyokimya Anabilim Dalı, **Pediatri Anabilim Dalı, ***Patoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç: Çalışmada maternal nikotin kullanımı sonucu yavrularda oluşan miyokardiyal hasarı biyokimyasal ve patolojik parametreler kullanarak araştırmak amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışma ratlar üzerinde yapıldı. Ratlar üç gruba ayrıldı. Birinci grup: Yüksek doz nikotin uygulanan grup, İkinci grup: Düşük doz nikotin uygulanan grup ve kontrol grubu. Grup 1'deki ratlara 6 mg/kg/gün, grup 2' deki ratlara 1 mg/kg/gün dozunda nikotin uygulandı. Belirtilen dozlarda nikotin dört hafta uygulandıktan sonra ratlar çiftleştirildi. Ratlara gebelik ve laktasyon süresi boyunca toplam 11 hafta nikotin uygulandı.

Uygulama süresinin sonunda plazma malondialdehit ve nitrik oksit düzeyleri ile, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz aktiviteleri ölçüldü. Deney hayvanları sakrifiye edildikten sonra miyokardiyal malondialdehit, nitrikoksit, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz düzeyleri çalışıldı ve histopatolojik olarak miyokard dokusu Hemotoksilen-Eozin boyama ile değerlendirildi. Tüm istatistiksel analizler SPSS 10.0 paket programı kullanılarak yapıldı. İstatistiksel analizlerde P<0.05 değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular: Sadece nikotin verilen her iki grupta da plazma ve doku malondialdehit ile doku nitrikoksit değerlerinde artma, miyokardiyal glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz değerlerinde azalma ve histopatolojik olarak miyokard liflerinde şişme, interstisyel ödem, disorganizasyon ve nekrozdan oluşan ağır kardiyomiyopati tespit edildi.

Sonuç: Nikotine bağlı miyokardiyal hasarın patogeneğinde miyokardiyal antioksidan enzimlerde azalma, serbest radikallerde ve lipid peroksidasyon ürünlerinde artmanın rol oynayabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Nikotin, miyokardiyal hasar, oksidan, antioksidan

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate the effects of nicotine on myocardium of newborn rats whose mothers received nicotine during gestation and lactation, by using biochemical and

pathological parameters and to evaluate the role of antioxidant enzymes, free oxygen radicals, and lipid peroxidation products which have role in the etiopathogenesis of the nicotine induced injury.

Material and Methods: The experiment was carried out on rats of Sprague-Dawley type. The rats were divided into 3 groups. Group I: Low dose nicotine (1 mg/kg/day, n=10). Group II: high dose nicotine group (6 mg/kg/day, n=10). Group III: Control group (n=10). Nicotine was administered by subcutaneous way and control group received 0.2 cc subcutaneous saline. Four weeks later rats were mated. Nicotine was administered from the beginning to end of third week of lactation, (average 11 week, during pregnancy and lactation). Plasma malondialdehyde, nitric oxide, glutation peroxidase and superoxide dismutase levels were measured at the end of the study. After the sacrifice, the levels of myocardial malondialdehyde, nitric oxide, glutation peroxidase and superoxide dismutase levels were analyzed and histopathological examination of myocardial tissue was done by haematoxylin - eosin stain with light microscope.

Results: In group I and II the levels of plasma and tissue malondialdehyde and tissue nitric oxide were higher; whereas the levels of myocardial glutation peroxidase and superoxide dismutase were lower than group III (p<0.05). Heavy cardiomyopathy characterized by swelling in myocardial fibrils, interstitial edema, disorganization and necrosis was determined in Group I and II.

Conclusions: Our results demonstrate the destructive effects of nicotine on myocardium: decrease in myocardial antioxidant enzymes activities and increase in free radicals and lipid peroxidation products which have important roles in the pathogenesis of nicotine - induced myocardial injury.

Key Words: Nicotine, myocardial injury, oxidants, antioxidants

GİRİŞ

Sigara, insan bedine nine zarar verebilen binlerce bileşik içermektedir. Bunlar içerisinde en önemlisi nikotindir. Nikotin plasentayı geçer ve fetal dolaşıma karışır. Fetal dolaşımdaki nikotin konsantrasyonunun, anne serumundan %15, amniyotik sıvıdan %88 daha yüksek olduğu saptanmıştır (1). Maternal nikotin enjeksiyonunu takiben umbilikal vasküler rezistans artmakta, fetal kalp atımı ve umbilikal kan akımı azalmaktadır (2). Hayvan deneylerinde, nikotinin uterus arterlerinde kan akımını azalttığı, fetal oksijenizasyonu ve asid-baz dengesini olumsuz yönde etkilediği saptanmıştır (3,4). Nikotinin umbilikal dolaşımda ciddi vazokonstriksiyon yapan vazopressin salınımına neden olduğu sıçan ve insanlar üzerinde gösterilmiştir (5,6). Hayvan deneylerinde, maternal nikotin enjeksiyonunu takiben fetusta gözlenen hipoksi ve asidozun nikotinin uteroplasental dolaşım üzerine olan etkilerine bağlı olduğu saptanmıştır.

Nikotin, annede katekolamin salınımına yol açarak taşikardi ve periferel vazokonstriksiyon yapar ve plasental kan akımını azaltır. Nikotin akut etki olarak, intervillöz kan akımında azalmaya neden olup, utero-plasental perfüzyonu azaltır ve sonuçta fetal oksijeni-

zasyon ve beslenmenin bozulmasına yol açar (7).

Nikotinin, sigara içen annelerin sütlerine de geçtiği 1933 yılından beri bilinmektedir. Anne sütündeki nikotin konsantrasyonunun plazmanın 3 katına kadar ulaştığı gösterilmiştir. Anne sütü ile beslenen bebeklerin idrarla attıkları nikotinin miktarının kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur (8).

Bütün bu verilerin ışığında, gebelikte ve laktasyonda sigara içiminin bebeği doğrudan olarak etkilediği söylenebilir. Uzun süreden beri yapılan deneyler, kronik nikotin uygulaması sonucu ratların doku ve serumlarında serbest radikallerin ve lipid peroksidasyon ürünlerinin arttığını göstermektedir (9,10). Literatürde genellikle nikotin verilen ratların yavrularında hipoksiye sekonder verilen kardiyak yanıtlara ve çeşitli belirteçlere bakılarak bunun ani bebek ölümleri ile ilişkisi araştırılmıştır. Ancak anne ratların gebelik öncesi ve gebelikte farklı dozlarda sigara kullanımını sonucu bebek kalplerinde serbest oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonu ile ortaya çıkan hasarlanmayı inceleyen çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışmanın amacı farklı dozlarda nikotin alan anne ratların bebeklerinde serbest oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyon ürünleri ile ortaya çıkabileceği düşünülen myokard hasarını, biyokimyasal ve patolojik parametreler kullanarak araştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada ağırlıkları 170-220 gram olan 30 adet 3 aylık dişi Sprague-Dawley rat kullanıldı. Ratlar üç gruba ayrıldılar.

- I. Grup: D DN Grubu (Düşük doz nikotin uygulanan grup, n=10)
- II. Grup: YDN Grubu (Yüksek doz nikotin uygulanan grup, n=10)
- III. Grup: Kontrol Grubu (distile su uygulanan grup, n=10)

Dişi sıçanlar her kafeste bir dişi sıçan olacak şekilde ayrıldı. Steril serum fizyolojik içerisinde çözünmüş nikotin (Nicotine tartrate, Sigma Chemical Co), düşük doz nikotin gruplarına 1 mg/kg/gün ve yüksek doz nikotin gruplarına 6 mg/kg/gün olacak şekilde tuberkülin enjektörü ile 0.2 ml subkutan olarak enjekte edildi. Kontrol grubuna ise serum fizyolojik tuberkülin enjektörü ile 0.2 ml subkutan olarak enjekte edildi. Bu işlemin takibinde tüm gruplara 2 ml/gün çeşme suyu gavajla verildi. Yukardaki işlemlere 4 hafta boyunca devam edildikten sonra sıçanlar çiftleştirildi. YDN uygulaması: 4 hafta boyunca 6 mg/kg/gün nikotin verilen bu grubun nikotin uygulamasına, gebelik ve 3 haftalık laktasyon dönemi boyunca da devam edildi. DDN uygulaması: 4 hafta boyunca 1 mg/kg/gün nikotin verilen bu grubun nikotin uygulamasına, gebelik ve 3 haftalık laktasyon dönemi boyunca da devam edildi. Üç haftalık laktasyon dönemi sonunda 21 günlük yavru ratların, çalışma sonu plazma ve kalp dokusu glutasyon peroksidaz (GSH-Px), süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri, ile Malondialdehid (MDA) ve Nitrik oksit (NO) düzeyleri ölçüldü. Sakrifiye edilen hayvanların kardiyak dokuları histopatolojik olarak incelendi.

Plazma ve miyokardiyal GSH-Px aktivitesi; GSH-Px tarafından katalizlenen bir reaksiyonda H_2O_2 ile glutasyonun (GSH) oksidasyon hızının ölçülmesi esasına dayanan Paglia ve Valentine (11)'nin birleşik enzimatik yöntemi ile ölçüldü.

Plazma ve miyokardiyal doku SOD aktivitesi tayininde Sun ve ark. (12) tarafından geliştirilen "Süperoksit üreticisi olan ksantin oksidaz sisteminin kullanılması ve nitroblue tetrazoliumun (NBT) redüksiyonunun inhibe edilmesi" esasına dayanan metod kullanıldı. Miyokardiyal SOD aktivitesi Lowry metoduna göre hesaplanan (13) total proteine göre mikrogram protein başına (μg -protein) hesaplanarak spesifik aktivite olarak verildi.

Doku MDA tayini: Ohkawa ve ark. (14) tarafından geliştirilen metoda göre yapıldı. Standart eğriden belirlenen doku MDA düzeyleri Lowry metoduna göre tayin edilen, mikrogram protein başına (nmol MDA/ μg -protein) verildi. Plazma MDA aktivitesi tayini: Stocks (15) ve Dormandy (16) tarafından geliştirilen ve Jain (17) tarafından modifiye edilen metoda göre yapıldı.

Doku ve plazma NO Tayini: Dondurularak saklanan miyokardiyal doku homojenatından elde edilen süpernatantların 0.05 ml'si, Somogyi reaktifi (%10 $ZnSO_4$ ve 0.5 N NaOH) ile 1/4 (v/v) oranında seyreltilerek, deproteinizasyondan sonra, + 4°C'de 1500 rpm de 10 dk santrifüj edildi (18). Elde edilen deproteinize süpernatantlardan NO ($NO_2 + NO_3$) tayini yapıldı. Griess reaksiyonu, nitrat (NO_3) iyonlarına spesifik olmadığından süpernatantda bulunan nitrat (NO_3) önce nitrite (NO_2) redüklendi ve sonra nitrit üzerinden hazırlanan nitrat standart grafiğinden miktar tayini yapıldı (19).

Formol ile fikse edilen doku kesitleri, Hemotoksilen-Eozin (HE) histokimyasal boyama yöntemi ile boyandı. Hemotoksilen-Eozin ile boyanan preparatlar ışık mikroskopu ile incelendi. Histopatolojik değişikliklerin ağırlığına göre skorlama yapıldı.

Aşağıda belirtilen her histopatolojik değişiklik için 1 puan verildi (20,21). Miyokard liflerinde şişme ve intertisiyel ödem (+1), miyokard liflerinde disorganizasyonu (+1), miyokard liflerinde nekroz (+1), miyokard liflerinde vakuolizasyon (+1), miyokard liflerinde hiçbir değişiklik yoksa (+0).

Kardiyomiyopati derecesinin ağırlığı, toplam puana (0 ile 3) göre yapıldı:

Kardiyomiyopati yok (0 puan), hafif derecede kardiyomiyopati (1 puan), orta derecede kardiyomiyopati (2 puan), ağır derecede kardiyomiyopati. (3 puan).

İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler SPSS 10.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Tüm parametreler istatistiksel analizlerde nonparametrik testler kullanıldığı için ortanca (minimum-maksimum) olarak ifade edildi. Gruplar arası karşılaştırmada Mann-Whitney U testi kullanıldı. Patolojik bulguların değerlendirilmesinde Chi-square testi uygulandı. Tüm istatistiksel analizlerde $P < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (22).

BULGULAR

Plazma ve doku MDA düzeyleri

Plazma MDA düzeyleri diğer gruplarla karşılaştırıldığında; YDN ve DDN grupları plazma

MDA düzeylerinde, kontrol grubu plazma MDA düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı artış tesbit edildi ($p < 0.05$).

Grupların doku MDA düzeyleri karşılaştırıldığında; DDN ve YDN grupları doku MDA düzeylerinin, kontrol grubu doku MDA düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı oranda artmış olduğu tesbit edildi ($p < 0.05$) (Tablo 1).

Plazma ve doku NO düzeyleri

Plazma değerleri arasındaki fark anlamsızdı. Grupların doku NO düzeyleri karşılaştırıldığında ise DDN ve YDN grupları doku NO düzeylerinin, kontrol grubu doku NO düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı oranda artmış olduğu tesbit edildi ($p < 0.05$) (Tablo 2).

Plazma ve doku GSH-Px aktiviteleri

Grupların doku GSH-Px aktiviteleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında; DDN ve YDN grupları doku GSH-Px aktivitelerinin anlamlı oranda azaldığı tesbit edildi ($p < 0.05$).

Grupların plazma GSH-Px düzeyleri karşılaştırıldığında; gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo 3).

Plazma ve doku SOD aktiviteleri

Grupların plazma SOD aktiviteleri karşılaştırıldığında; kontrol grubu plazma SOD düzeyi ile diğer gruplar arasında anlamlı farklılık tesbit edilmedi.

Tablo 1. Grupların plazma ve doku MDA düzeyleri.

Grup	n	MDA (Plazma) ($\mu\text{mol/L}$) Ortanca (Min-Max)	MDA (Doku) ($\text{nmol}/\mu\text{gr protein}$) Ortanca (Min-Max)
DDN	10	0.59 (0.32 - 1.52) ^a	0.19 (0.16 - 0.49) ^a
YDN	10	0.81 (0.33 - 1.57) ^a	0.29 (0.20 - 0.40) ^a
Kontrol	10	0.35 (0.23 - 0.48)	0.11 (0.07 - 0.18)

^a $p < 0.05$ kontrol grubuyla kıyaslandığında, DDN: Düşük doz nikotin, YDN: Yüksek doz nikotin

Tablo 2. Grupların plazma ve doku NO düzeyleri.

Grup	n	NO (Plazma) ($\mu\text{mol/L}$) Ortanca (Min-Max)	NO (Doku) ($\mu\text{mol}10^{-3}/\mu\text{gr.prt}$) Ortanca (Min-Max)
DDN	10	186 (100.50 - 291.50)	2.52 (2.11 - 2.91) ^a
YDN	10	113.50 (77.50 - 257.50)	2.89 (2.09 - 4.10) ^a
Kontrol	10	133.50 (48.50 - 235.50)	1.47 (1 - 2.07)

^a $p < 0.05$ kontrol grubuyla kıyaslandığında.

Tablo 4. Grupların plazma ve doku SOD aktiviteleri.

Grup	n	SOD (Plazma)	SOD (Doku)
		(U/L) Ortanca (Min-Max)	(U/μgr.prt) Ortanca (Min-Max)
DDN	10	0.92 (0.66 - 1.96)	14.38 (8.32 - 18.72) ^a
YDN	10	1.05 (0.68 - 1.24)	12.63 (6.62 - 18.60) ^a
Kontrol	10	1.11 (0.87 - 1.47)	18.68 (11.69 - 21.61)

^a p<0.05 kontrol grubuna göre.

Tablo 5. Grupların histopatolojik kardiyomiyopati skorlaması.

Grup	n	Kardiyomiyopati skoru (1.2.3)		
		Hafif (%)	Orta (%)	Ağır (%)
DDN	10	30	0	70 ^a
YDN	10	0	30	70 ^a
Kontrol	10	20	0	0

^a p<0.05 kontrol grubuna göre.

Tablo 3. Grupların doku ve plazma GSH- Px aktiviteleri.

Grup	n	GSH-Px (Plazma) (U/ml)	GSH-Px (Doku) (mU/μgr.prt)
		Ortanca (Min-Max)	Ortanca (Min-Max)
DDN	10	0.16 (0.10 - 0.61)	0.16 (0.10 - 0.61) ^a
YDN	10	0.15 (0.10 - 0.96)	0.15 (0.10 - 0.96) ^a
Kontrol	10	0.25 (0.11 - 0.35)	0.25 (0.11 - 0.35)

^a p<0.05 kontrol grubuyla kıyaslandığında.

Grupların doku SOD aktiviteleri karşılaştırıldığında; DDN ve YDN grupları doku SOD aktivitelerinin, kontrol grubu doku SOD düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı oranda düşmüş olduğu tespit edildi (p<0.05) (Tablo 4).

Grupların histopatolojik bulguları karşılaştırıldığında YDN ve DDN grubu kardiyomiyopati skorunun kontrol grubu kardiyomiyopati skoruna göre anlamlı oranda yüksek olduğu tesbit edildi (p<0.05). DDN grubu YDN grubuyla karşılaştırıldığında, DDN grubu kardiyomiyopati skorunun YDN grubu kardiyomiyopati skoruna göre anlamlı oranda düşük olduğu tespit edildi (p<0.05) (Tablo 5).

TARTIŞMA

Dünyada sigara içen kadın sayısının fazla olması ve bu alışkanlıklarını gebelik ve emzirme döneminde de devam ettiriyor olmaları

nedeniyle, gebelikte sigara içiminin bebekte oluşturacağı zararlı etkileri araştırmaya yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Sigaraya bağlı toksisitenin oluşmasında deneysel çalışmalarda genelde sigaranın en önemli komponenti olan nikotin kullanılmıştır.

Gebelikte sigara içimi fetüsü kronik hipoksizde bırakmakta ve bu durum çeşitli organlarda hipoksik hasar oluşumuyla sonuçlanmaktadır (2,23-26). Postnatal dönemde ise emzirme yoluyla bebek sigaranın ve dolayısıyla nikotinin direk etkisine maruz kalmaktadır (8,23). Bu durumda sigara içen anne bebeklerinde oluşan miyokardiyal hasar, hem hipoksik hasara hem de nikotinin direk etkisine bağlı olabilir.

Nikotinle etkilenmenin sellüler oksidan-antioksidan sistemi değiştirerek hasar yaptığıyla ilgili kanıtlar giderek artmaktadır (27,28). Nikotin, ratlarda yapılan deneylerde lipid

peroksidasyonundaki artışla aterogenez oluşumu arasındaki bağlantıyı göstermektedir. (27). Literatürde nikotine bağlı organ hasarının patofizyolojisinden lipid peroksidasyonunun sorumlu olduğunu gösteren çok sayıda çalışma bildirilmiştir (29-31).

Şener ve ark. (32) nikotini 0.6 mg/kg dozunda ratlara 21 gün uygulamışlar, çalışma sonunda rat kalp ve aorta dokularında glutasyon düzeylerinde azalma ve MDA düzeylerinde artma saptamışlardır. Helen ve ark. (31) 90 gün sigara dumanına maruz bıraktıkları ratların karaciğer, akciğer ve kalp doku MDA düzeylerinin arttığını tespit etmişlerdir. Bulgularımız Şener, Helen ve ark.'nın bulgularıyla uyumludur. Plazma MDA düzeyleri ise doku MDA düzeylerini yansıtmamaktadır. Bu durum nikotine bağlı miyokardiyal hasarın belirlenmesinde plazma MDA düzeylerinin yeterli olmadığını düşündürmüştür.

Çalışmamızda kalp doku MDA düzeyi yüksek doz ve düşük doz nikotin verilen grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. Doku MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre yüksek bulunması, nikotine bağlı miyokardiyal hasarın patogenezinde lipid peroksidasyonunun rolü olduğu görüşünü desteklemiştir.

Kan basıncının düzenlenmesinde rolü olan NO'nin fizyolojik düzeylerinin kardiyomiyosit kontraktilesi ve kan akımı regülasyonunu sağlarken, artmış miktarlarda NO yapımının; kardiyomiyositlerin oksidatif hasarına, apopitoz ve/veya nekrozuna neden olabildiği bilinmektedir (33). Yüksek NO düzeyleri, süperoksit radikali varlığında oldukça sitotoksik bir radikal olan peroksinitrit oluşmasına ve ileri derecede hücre hasarına neden olmaktadır (34-36).

Bu çalışmada kalp doku NO düzeyi yüksek doz ve düşük doz nikotin verilen grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. Doku NO düzeylerinin kontrol grubuna göre yüksek bulunması, nikotine bağlı miyokardiyal hasarın patogene-

zinde NO'nin rolü olduğu görüşünü desteklemiştir. Plazma NO düzeyleri ise doku NO düzeylerini yansıtmamaktadır. Bu durum nikotine bağlı miyokardiyal hasarın belirlenmesinde plazma NO düzeylerinin yeterli olmadığını düşündürmüştür.

Antioksidan enzimler olan SOD ve GSH-Px'ın kalpte serbest oksijen radikallerinin detoksifikasyonunda etkin olarak rol oynadıkları öne sürülmektedir (135). Serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu hasara karşı korunmada SOD ilk basamak olmasına rağmen, süperoksit anyonunun H₂O₂'e dismutasyonunu katalizlediği için H₂O₂ seviyesini artırarak etki eder. H₂O₂ birikiminin major tehlikesi fizyolojik savunma sistemi olmayan oldukça reaktif OH⁻ radikali üretimidir. Katalaz ve GSH-Px, H₂O₂'i metabolize ettikleri için en önemli antioksidatif enzimler olarak ortaya çıkar (37). Ancak katalazın H₂O₂'e affinitesi daha azdır, bu yüzden GSH-Px kalpte H₂O₂ metabolizmasında major rol oynar (38).

Helen ve ark. (31), 90 gün sigara dumanına maruz bıraktıkları ratların kalp, karaciğer, akciğer doku SOD ve katalaz aktivitesinin azaldığını, GSH-Px ve glutasyon içeriğinin ise arttığını ve vit A uygulaması ile de tüm bu bulguların düzeldiğini tespit etmişlerdir. Baskaran ve ark. (39), 30 gün süreyle günde 30 dakika sigara dumanına maruz bıraktıkları ratların kontrol grubuna göre karaciğer, akciğer ve böbreklerinde SOD ve GSH-Px'ın aktivitesinin arttığını, kalp ve böbrekte değişmediğini saptamışlardır. Florek ve ark. (40), 21 gün süreyle sigara dumanına maruz bıraktıkları ratların kalp, karaciğer, plasenta ve böbrek dokularında SOD ve GSH-Px aktivitesinin azaldığını bulmuşlardır. Ayrıca sigara içimi sırasında intrauterin kronik hipoksiye maruz kalındığından dolayı bu da miyokardiyal doku antioksidan sistem üzerine etki eden bir diğer faktör olarak ortaya çıkmaktadır.

Çalışmamızda doku GSH-Px düzeyleri kontrol grubuna göre YDN ve DDN gruplarında düşük bulunması nikotinin ve kronik intrauterin hipoksinin miyokardiyal hasar patogenezin-

de GSH-Px'in azalmasının rolü olduğu görüşünü desteklemiştir. Bulgularımız, Florek ve ark. (40)'nin bulguları ile uyumlu diğer çalışmacıların sonuçları ile uyumsuzdur. Bu farklılıkların nikotinin uygulanma şekli ve süresi ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Plazma GSH-Px düzeyleri arasında ise gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır.

Çalışmamızda doku SOD düzeylerinin kontrol grubuna göre YDN ve DDN gruplarında düşük bulunması nikotinin ve kronik intrauterin hipoksinin miyokardiyal hasar patogeneğinde SOD aktivitesinin azalmasının rolü olduğu görüşünü desteklemiştir. Bulgularımız Helen ve ark. (31), Florek ve ark. (40)'nin, bulguları ile uyumlu, diğer çalışmacıların bulguları ile uyumlu değildi. Bu farklılıkların nikotinin verilmiş şekli ve süresi ile ilgili olabileceği düşünülmüştür.

Uzun süre sigara içimi kalp kasında önemli derecede metabolik ve morfolojik değişikliklere neden olur ve bu durum sigara kardiyomiyopatisi olarak bilinmektedir (25,41,42). Lough (43), domuzlarda yaptığı bir çalışmada; 12-15 hafta, haftada 5 gün, günlük 8 sigara dumanına maruz kalmalarını sağladıktan sonra sigara içen grubun kalp ağırlıklarında kontrol grubuna göre anlamlı oranda artış saptamış ve bu grubun kalp dokusunun histopatolojik incelemesinde ödem, mitokondrilerde artmış lipid ve otofagolizozomal aktivite hızlanmasıyla ilgili toksik değişiklikler tesbit etmiştir. Rajs ve ark. (44) annelilerin sigara içen ve ani bebek ölümü sendromu (SIDS) nedeniyle kaybedilen vakaların perikardiyal sıvılarında kotinin konsantrasyonlarını ölçtükleri bir çalışmada, perikardiyal sıvıda kotinin konsantrasyonu yüksek olan bebeklerin myokard incelemesinde fokal nekroz, ödem ve inflamatuvar değişiklikler rapor etmişlerdir. Yuon ve ark. (45), hipoksiye maruz bırakılmış köpek kalbinde myokard hücrelerinde ödem, disorganizasyon ve nekroz tesbit etmişlerdir.

Çalışmamızda sadece yüksek doz nikotin verilen grupta tüm ratlarda, düşük doz niko-

tin verilen grupta ise 7 ratta histopatolojik olarak miyokardiyal fibrillerde şişme ve interstisiyel ödem, disorganizasyon ve nekrozdan oluşan bulguların olması ile ağır kardiyomiyopati geliştiği saptanmıştır. İlgi çekici olarak YDN grubu kardiyomiyopati skoru DDN grubuna göre anlamlı oranda yüksek tesbit edilmiştir. Bu durum nikotine bağlı kardiyomiyopati şiddetinin doz bağımlı olduğunu düşündürmektedir. Bu bulgular literatürdeki bulgularla benzerlik göstermektedir. Çalışmamızda ilgi çekici olarak, düşük doz ve yüksek doz nikotin uygulamasının doku ve plazma biyokimya değerleri arasında önemli fark elde etmememize rağmen histopatolojik olarak yüksek doz nikotin uygulanan ratlarda daha anlamlı kardiyomiyopati tesbit ettik.

Sonuç olarak nikotin, yenidoğan ratlarda, gerek yüksek, gerekse düşük dozlarda lipid peroksidasyonu ve antioksidan sistem üzerinden kalbi etkilemektedir. Ancak etkilenme daha çok doku biyokimyasal değerlerine yansımaktadır. Farklı dozlarda nikotinin histopatolojik değerlere farklı yansımaları etkilenmenin düşük dozlarda daha az yüksek dozlarda daha fazla olduğunu açıkça göstermekte, ancak bu etkilenme biyokimyasal parametrelere aynı oranda yansımamaktadır. Çalışmanın sonuçları, annenin aldığı farklı dozlarda nikotinin yenidoğan rat kalbini farklı oranlarda etkilediğini, ancak bu konuda deneysel çalışmalara devam edilmesi gerektiğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Luck W, Nau H, Hansen R, Steldinger R. Extent of nicotine and cotinine transfer to the human fetus, placenta and amniotic fluid of smoking mothers. *Dev Pharmacol Ther* 1985; 8: 384-95.
2. Clark KE, Irion GL. Fetal hemodynamic response to maternal intravenous nicotine administration. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167: 1624-31.
3. Manning F, Walker D, Feyerabend C. The effect of nicotine on fetal breathing movements in conscious pregnant ewes. *B Obstet Gynecol* 1978; 52: 563-8.
4. Suzuki K, Minei LJ, Johnson EE. Effect of nicotine upon uterine blood flow in the pregnant rhesus monkey. *Am J Obstet Gynecol* 1980; 136: 1009-13.

5. Aubert JF, Burnier M, Waeber B, Nussberger J, Brunner HR. Nicotine-induced release of vasopressin in the conscious rat: role of opioid peptides and hemodynamic effects. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; 243: 681-5.
6. Waeber B, Schaller MD, Nussberger J, Bussien JP, Hofbauer KG, Brunner HR. Skin blood flow reduction induced by cigarette smoking: role of vasopressin. *Am J Physiol* 1984; 247: 895-901.
7. Lehtovirta P, Fors M. The acute effect of smoking on intervillous blood flow in the placenta. *Br J Obstet Gynaecol* 1978; 85: 729-31.
8. Labrecque M, Marcoux S, Weber JP, Fabia J, Ferron L. Feeding and urine cotinine values in babies whose mothers smoke. *Pediatrics* 1989; 83: 93-7.
9. Latha MS, Vijayammal PL, Kurup PA. Effect of nicotine administration on lipid metabolism in rats. *Indian J Med Res* 1993; 98: 44-9.
10. Ashakumary L, Vijayammal PL. Additive effect of alcohol and nicotine on LPO and antioxidant defence mechanism in rats. *J Appl Toxicol* 1996; 16: 305-8.
11. Paglia DE, Valentina WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-69.
12. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
13. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
14. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid relations. *Analytical Biochemistry* 1979; 95: 351-8.
15. Stocks J, Dormandy TL. The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Br J Haematol* 1971; 20: 95-111.
16. Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta* 1978; 90: 37-43.
17. Jain SK. Evidence for membrane lipid peroxidation during the in vivo aging of human erythrocytes. *Biochem Biophys Acta* 1988; 937: 205-10.
18. Davidge ST, Stranko CP, Roberts JM. Urine but not plasma nitric oxide metabolites are decreased in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174: 1008-13.
19. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem* 1995; 41: 892-96.
20. Billingham ME, Mason JW, Bristow MR, Daniels JR. Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. *Cancer Treat Rep* 1978; 62: 865-72.
21. Saad SY, Najjar TA, Al-Rikabi AC. The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats. *Pharmacol Res* 2001; 43: 211-8.
22. Hayran M, Özdemir O. Bilgisayar İstatistik ve Tıp (İkinci baskı), Hekimler Yayın Birliği, Ankara, 1996.
23. Oncken CA, Henry KM, Campbell WA, Kuhn CM, Slotkin TA, Kranzler HR. Effect of maternal smoking on fetal catecholamine concentrations at birth. *Pediatr Res* 2003; 53: 119-24.
24. Busacca M, Balconi G, Pietra A, Vergara-Dauden M, de Gaetano G, Dejana E. Maternal smoking and prostacyclin production by cultured endothelial cells from umbilical arteries. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 148: 1127-30.
25. Habek D, Habek JC, Jugovic D, Salihagic A. Intrauterine hypoxia and sudden infant death syndrome. *Acta Med Croatica* 2002; 56: 109-18.
26. Suzuki K, Minei LJ, Johnson EE. Effect of nicotine upon uterine blood flow in the pregnant rhesus monkey. *Am J Obstet Gynecol* 1980; 15: 136 (8): 1009-13.
27. Ashakumary L, Vijayammal PL. Additive effect of alcohol and nicotine on lipid peroxidation and antioxidant defence mechanism in rats. *J Appl Toxicol* 1996; 16: 305-8.
28. Wetscher GJ, Bagchi M, Bagchi D et al. Free radical production in nicotine treated pancreatic tissue. *Free Radic Biol Med* 1995; 18: 877-82.
29. Yıldız D, Liu YS, Ercal N, Armstrong DW. Comparison of pure nicotine and smokeless tobacco extract-induced toxicities and oxidative stress. *Arch Environ Contam Toxicol* 1999; 37: 434-9.
30. Yıldız D, Ercal N, Armstrong DW. Nicotine enantiomers and oxidative stress. *Toxicol* 1998; 130: 155-65.
31. Helen A, Vijayammal PL. Effect of vitamin A supplementation on cigarette smoke-induced lipid peroxidation. *Vet Hum Toxicol* 1997; 39: 18-21.
32. Şener G, Şehirli ÖA, İpçi Y et al. Taurine treatment protects against chronic nicotine-induced oxidative changes. *Blac Publis Fund Clin Phar* 2005; 1: 1-10.
33. Tuna R, Çağlayan GB. Nitrik Oksid-I. *Sendrom* 1995; Ağustos, 54-59.
34. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* 1994; 52: 253-65.
35. Blaise GA, Gauvin D, Gangal M, Authier S. Nitric oxide, cell signaling and cell death. *Toxicology* 2005; 208: 177-92.
36. Kendall HK, Marshall RI, Bartold PM. Nitric oxide and tissue destruction. *Oral Disease* 2001; 7: 2-10.
37. Lai CC, Huang WH, Askari A, Klevay LM, Chiu TH. Expression of glutathione peroxidase and catalase in copper-deficient rat liver and heart. *J Nutr Biochem* 1995; 6: 256-62.

38. Dieterich S, Bieliqk U, Beulich K, Hasenfuss G, Prestle J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation* 2000; 4-11; 101(1): 33-9.
39. Baskaran S, Lakshmi S, Prasad PR. Effect of cigarette smoke on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in albino rat. *Indian J Exp Biol* 1999; 37: 1196-200.
40. Florek E, Ignatowicz E, Piekoszewski W et al. Tobacco smoke effects the activity of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and total antioxidant status in pregnant and non-pregnant animals. *Przegl Lek* 2004; 61: 1104-8.
41. Gvozdjakova A, Bada V, Sany L, et al. Smoke cardiomyopathy: disturbance of oxidative processes in myocardial mitochondria. *Cardiovasc Res* 1984; 4: 229-32.
42. Gvozdjak J, Gvozdjakova A, Kucharska J, Bada V. The effect of smoking on myocardial metabolism. *Czech Med* 1987; 10: 47-53.
43. Lough J. Cardiomyopathy produced by cigarette smoke. Ultrastructural observations in guinea pigs. *Arch Pathol Lab Med* 1978; 102(7): 377-80.
44. Rajs J, Rasten-Almqvist P, Falck G, Eksborg S, Andersson BS. Sudden infant death syndrome: postmortem findings of nicotine and cotinine in pericardial fluid of infants in relation to morphological changes and position at death. *Pediatr Pathol Lab Med* 1997; 17(1): 83-97.
45. Yuan SM. cytochemistry and ultrastructure of canine myocardium undergoing global ischemia and reperfusion injury. *J Med Sci* 1999; 15: 1-7.

Yazışma adresi:

Dr. Figen Narin
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı, 38039 Kayseri
Tel: 0.352 437 49 10
E-posta: fnarin@erciyes.edu.tr
