

Rygestop i graviditeten, nyfødtes størrelse og NO-syntase-aktivitet i navlesnoren endotelceller

Cand.scient. Malene R. Andersen, professor Ulf Simonsen, professor Niels Ulbjerg, professor Christian Aalkjær & professor Steen Stender

SEKUNDÆR-PUBLIKATION

Gentofte Hospital, Klinisk-biokemisk Afdeling, Århus Universitetshospital, Skejby, Gynækologisk-Obstetriske Afdeling, og Aarhus Universitet, Farmakologisk Institut og Institut for Fysiologi og Biofysik

RESUME

Nyfødte af rygere har lavere vægt, mindre hovedomkreds og er kortere end nyfødte af ikkerygere og af eksrygere, som stopper med at ryge tidligt i graviditeten. Vi fandt, at aktiviteten og koncentrationen af enzymet, som danner det kardilaterende stof nitrogenoxid, var henholdsvis 36% og 47% lavere i endotelcelleskrab fra navlesnoren vene fra rygere sammenlignet med ikkerygere og eksrygere. Fundene tyder på, at rygning nedsætter dannelsen af nitrogenoxid i fosterets kargebet med nedsat blodtilførsel og dermed nedsat fostervæxt til følge.

Det er velkendt, at fødselsvægten falder med stigende cigaretforbrug under graviditeten, og at rygestop før 16. gestationsuge (GU) bevirker, at de nyfødte har samme fødselsvægt som nyfødte af ikkerygere [1]. En forklaring herpå kunne være, at rygning nedsætter blodgennemstrømningen i placenta og navlesnoren, således at fosteret i den rygende mor ernæres dårligere.

Teorien støttes af en række forsøg, der har vist, at rygere har nedsat endotelafhængig kardilatation i arteria brachialis som følge af nedsat dannelse af det kardilaterende molekyle nitrogenoxid (NO) [2]. NO dannes i endotelcellerne (EC) af enzymet endotelial NO-syntase (eNOS), der katalyserer omdannelsen af L-arginin til L-citrullin under frigørelse af NO.

Efter rygeophør tog det ~ 6 år at øge den endotelafhængige kardilatation med ~ 50% i raske unge voksne [2]. Det tyder på, at EC i eksrygere kun meget langsomt genopretter en NO-dannelse svarende til den i ikkerygerne. I nærværende undersøgelse sammenlignede vi eNOS i EC fra navlesnoren og placentas blodkar med den nyfødtes størrelse fra ikkerygende og rygende gravide samt fra kvinder, som stoppede med at ryge tidligt i graviditeten.

MATERIALER OG METODER

I studiet indgik 266 raske enkeltgravide, som gik til konsultation i ~ 12. GU på Århus Universitetshospital, Skejby, i perioden juni 2003 til april 2004. Undersøgelsen blev udført i overensstemmelse med Helsinki-deklarationen og var godkendt af Videnskabetisk Komité (1988/1349, 1991/2060, 20010077, 20030274) og Datatilsynet (2004-41-4001).

De 266 gravide fik taget blodprøver i henholdsvis ~ 12., ~ 20. og ~ 39. GU og fødte i perioden januar til oktober 2004. Føtale blodprøver blev taget fra navlesnoren lige efter fødslen.

Kliniske, sociodemografiske og livsstils karakteristika blev indsamlet via kvindens besvarelse af et spørgeskema og fra fødselsregistreringen.

Cotinin blev målt i moderens og den nyfødtes serum vha. et chemiluminescent immunoassay på IMMULITE 2500. Detektionsgrænsen for cotinin er 10 ng/ml.

EC fra navlesnoren og chorions blodkar blev isoleret og opbevaret, som tidligere beskrevet, og antallet af EC i prøven bestemt ved celletælling i Burkertürk-tællekammer [3, 4].

Aktiviteten af eNOS blev målt ved omdannelsen af ^{14}C -L-arginin til ^{14}C -L-citrullin [3, 4] og beregnet ud fra dannelsen af ^{14}C -L-citrullin/minut og antallet af EC i prøven (pmol L-citrullin/minut/ 10^6 EC).

Koncentrationen af eNOS blev målt med et humant eNOS *Quantikine Immunoassay*-kit [3] og beregnet ud fra ng eNOS og antallet af EC i prøven (ng eNOS/ 10^6 EC).

Data er median (5-95 percentiler) eller antal (%). Kontinuerlige data blev analyseret med Kruskal-Wallis-test efterfulgt af tre parvise sammenligninger af *mean ranks* med Bonferroni-korrektion og kategoriske data med χ^2 -test.

Multipel lineær regressionsanalyse blev anvendt til at undersøge for associationer mellem to variable efter korrektion for effekten af andre variable, og den partielle korrelationskoefficient blev estimeret.

RESULTATER

Af de 266 gravide rapporterede 182, at de ikke røg, og 84 at de røg før graviditeten. Af de sidstnævnte 84 rygere stoppede 41 med at ryge i ~ 5. GU (eksrygerne), mens de resterende 43 fortsatte med at ryge. Cotinin i serum fra gravide og nyfødte bekræftede de selvrapporterede rygevaner (Tabel 1) [5].

De tre grupper adskilte sig ikke mht. alder, *body mass index* (BMI), blodtryk, paritet og gestationsalder (GA). Ikkerygerne og eksrygerne var oftere samboende og havde en længere skolegang end rygerne. Der var flere studerende blandt ikkerygerne end blandt rygerne og flere arbejdsløse blandt rygerne

end blandt de to andre grupper. Rygerne havde et højere kaffeindtag end ikkerygerne og eksrygerne (Tabel 1).

Nyfødte af rygere havde lavere vægt, mindre hovedomkreds og var kortere end nyfødte af ikkerygere og eksrygere. Vægten af rygeres placenta var også lavere end vægten af placenta fra ikkerygerne og eksrygerne. Apgarscore, sexratio og pH i navlesnorsblod var ens for de tre grupper af nyfødte (Tabel 1).

eNOS-aktivitet og koncentration i vena (v.) umbilicalis var signifikant lavere hos rygeres nyfødte børn sammenlignet med ikkerygeres og eksrygeres børn (Tabel 1 og **Figur 1**). Den samme relation til rygestatus blev fundet i arterie umbilicalis og chori-onkar, om end de absolutte enzymaktiviteter og koncentrationer var betydeligt lavere i disse kar sammenlignet med v. umbilicalis (Tabel 1).

For samtlige gravide var cigaretforbruget pr. dag negativt associeret med eNOS-aktivitet ($r = -0,31$; $p < 0,001$) og koncentration ($r = -0,36$; $p < 0,001$). Associationen mellem eNOS-aktivitet og koncentration var positiv ($r = 0,35$; $p < 0,001$) også efter korrektion for rygning ($r = 0,20$; $p = 0,001$).

Regressionsanalyser viste, at i v. umbilicalis fra rygerne var aktiviteten af eNOS 36% lavere og koncentrationen af eNOS 47% lavere end fra ikkerygerne, mens niveauerne var ens i v. umbilicalis fra ikkerygere og eksrygere. Ca. 20% af reduktionen i eNOS-aktivitet mellem ikkerygere og rygere kunne forklares ved en forskel i eNOS-koncentration.

Aktiviteten af eNOS i v. umbilicalis var positivt associeret med fødselsvægt ($r = 0,26$; $p < 0,001$) også efter korrektion for BMI, paritet, GA og barnets køn ($r = 0,21$; $p = 0,001$) og næsten positivt associeret efter yderligere korrektion for rygning ($r = 0,12$; $p < 0,055$). Aktiviteten af eNOS i v. umbilicalis var også associeret med fødselsvægten hos nyfødte af ikkerygere ($r = 0,18$; $p = 0,018$).

Nyfødte af rygere havde en 364 g lavere vægt end nyfødte af ikkerygere. Efter korrektion for eNOS-aktivitet i v. umbilicalis, blev denne forskel reduceret til 279 g ($p = 0,001$). Dvs. at ~ 25% af de nyfødtes vægtreduktion fra ikkerygere til rygere kan forklares ved den forskel, der blev målt i eNOS-aktivitet. Yderligere korrektion for BMI, paritet, GA og barnets køn reducerede vægtforskellen til 242 g ($p = 0,002$).

DISKUSSION

Denne undersøgelses resultater bekræfter, at nyfødte af rygere har nedsat vægt, hovedomkreds og længde sammenlignet med nyfødte af ikkerygere og af eksrygere, som er stoppet med at ryge tidligt i graviditeten [1]. Undersøgelsen viser også, at aktiviteten af eNOS

TABEL 1

Kliniske, sociodemografiske og livsstils karakteristika for de 266 gravide og deres nyfødte. Data er median (5-95-percentiler) eller antal (%).

	Ikkerygere (n = 182)	Rygere (n = 43)	Eksrygere (n = 41)
Gravidens karakteristika			
Alder, år	30 (25-35)	30 (20-36)	29 (23-33)
BMI før graviditeten, kg/m ²	22 (18-29)	24 (19-32)	23 (18-31)
Systolisk BT, mmHg	116 (100-135)	120 (91-136)	120 (100-136)
Diastolisk BT, mmHg	70 (60-85)	71 (60-85)	70 (60-86)
<i>Cigaretter røget pr. dag</i>			
Før graviditeten	0	15 (5-29)	10 (2-20)***
Under graviditeten	0	7 (2-20)	0
Rygeophør, uge	–	–	5 (2-18)
<i>Cotininpositive prøver</i>			
~12. graviditetsuge	0 (0) (n = 176)	34 (92) (n = 37)	5 (14) (n = 35)
~20. graviditetsuge	0 (0) (n = 174)	33 (89) (n = 37)	0 (0) (n = 34)
~39. graviditetsuge	0 (0) (n = 26)	8 (100) (n = 8)	0 (0) (n = 12)
Paritet	1 (1-3)	1 (1-4)	1 (1-3)
Ikke samboende	0 (0)***	5 (12)	1 (2)**
Skolegang, år	16 (10-17)***	13 (9-16)	16 (11-17)*
<i>Beskæftigelse</i>			
I arbejde	119 (65)	25 (58)	31 (76)
Arbejdsløse	11 (6)***	14 (33)	3 (7)***
Studerende	52 (29)*	4 (9)	7 (17)
Koffein, mg/dag	100 (0-350)***	200 (0-795)	150 (0-400)*
Nyfødtes karakteristika			
Gestationsalder, dage	281 (267-295)	276 (261-294)	280 (265-295)
Vægt, kg	3,65 (3,01-4,50)***	3,30 (2,54-4,14)	3,60 (3,06-4,55)**
Længde, cm	52 (49-56)***	51 (45-54)	52 (49-57)**
Hovedomkreds, cm	36 (33-38)*	35 (33-37)	36 (33-38)*
Placentas vægt, g	698 (516-936)**	628 (463-854)	720 (531-913)*
Drengbørn	90 (49)	18 (42)	19 (46)
Cotininpositive prøver	0 (0) (n = 181)	38 (90) (n = 42)	2 (5) (n = 41)
<i>eNOS-aktivitet, pmol L-citrullin/ minut/10⁶ EC</i>			
Chorionvene	11 (3,9-26)***	4,6 (2,1-15)	12 (4,0-32)***
Vena umbilicalis	47 (25-92)***	30 (15-50)	56 (32-89)***
Arteria umbilicalis	7,8 (3,0-20)***	4,4 (1,5-13)	9,4 (3,6-23)***
Chorionarterie	12 (4,6-26)***	6,9 (2,9-12)	14 (4,4-31)***
<i>eNOS-koncentration, ng eNOS/10⁶ EC</i>			
Chorionvene	0,6 (0,2-1,2)***	0,2 (0,1-0,6)	0,5 (0,2-0,9)***
Vena umbilicalis	1,4 (0,7-3,8)***	0,8 (0,4-2,1)	1,6 (0,7-3,9)***
Arteria umbilicalis	1,0 (0,4-2,1)***	0,5 (0,2-1,1)	1,0 (0,6-2,4)***
Chorionarterie	0,9 (0,4-1,8)***	0,5 (0,2-0,9)	0,9 (0,3-1,8)***

BT = blodtryk; BMI = *body mass index*; EC = endotelceller; eNOS = endotelial NO-syntase.

*) $p < 0,05$; **) $p < 0,01$; ***) $p < 0,001$ vs. rygere.

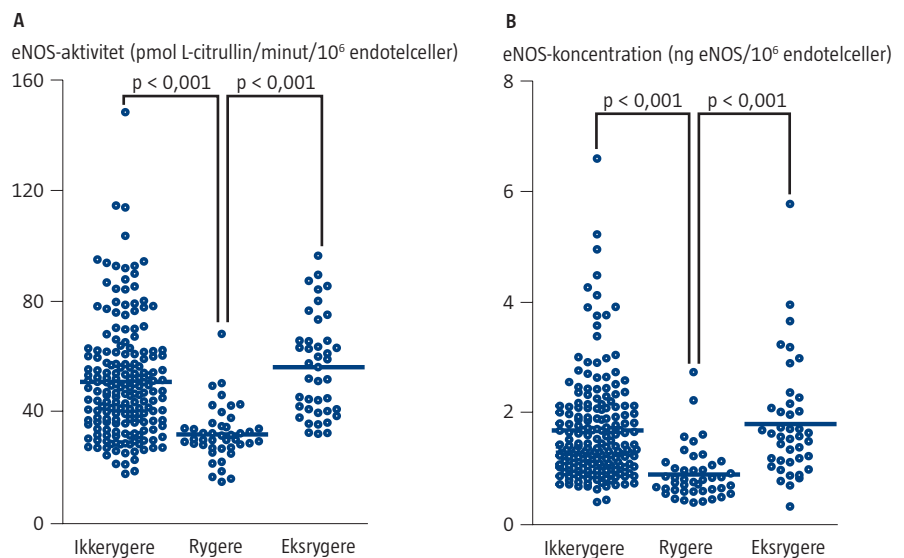
i føtale kar fra navlesnoren og chorion fra rygere er lavere end hos ikkerygere og eksrygere.

Fødselsvægten, eNOS-aktivitet og eNOS-koncentration var lavere hos nyfødte af rygere end af ikke-rygere og eksrygere selv efter korrektion for flere kli-

FIGUR 1

Endotelial NO-syntase-aktivitet (A) og endotelial NO-syntase-koncentration (B) i føtale endotelceller fra navlesnoren fra gravide ikkerygere (n = 182), rygere (n = 43) og eksrygere, som er stoppet med at ryge tidligt i graviditeten (n = 41). Aktiviteten og koncentrationen af endotelial NO-syntase var signifikant lavere i navlesnoren fra rygere end fra ikkerygere; en effekt der ved fødslen ikke var til stede efter rygeophør tidligt i graviditeten. De vandrette linjer angiver gennemsnittet for hver gruppe.

eNOS = endotelial NO-syntase



niske, socio-demografiske og livsstils karakteristika inklusive kaffeindtag [6]. I et observationelt studie som dette, er konfounding dog stadig mulig, eftersom rygerne ud over de målte karakteristika formodentlig også adskiller sig fra de andre grupper ved umålte eller ikke målbare karakteristika. I mangel af randomiserede studier til at afgøre om rygning er en markør eller aktør for nedsat fostervækst, så støtter fundet af samme eNOS-aktivitet og føtale mål hos eksrygere som ikkerygerne hypotesen om, at rygning er en direkte årsag til de fundne ændringer hos nyfødte af rygere.

At de tre grupper har samme specifikke eNOS-aktivitet (data ej vist) tyder på, at rygning til dels reducerer aktiviteten af eNOS ved en reduktion i eNOS-koncentrationen. Multipel regressionsanalyse indikerer, at 20% af reduktionen i den eNOS-aktivitet, der er associeret med rygning, kan forklares ved en reduceret eNOS-koncentration.

Nikotin er et af de stoffer i cigaretrøgen, der kan påvirke endotelfunktion i rygere. I et studie blev en akut hæmning i den endoteliale bioaktivitet af NO fundet i håndvener efter nikotinfusion svarende til den plasmakoncentration, der opnås efter rygning af én cigaret [7]. Det tyder på, at nikotin virker direkte på endotelet og fører til karkontraktion ved at hæmme aktiviteten af eNOS.

Rygning øger niveauet af carbonmonoxid (CO) i blodet, hvorved den iltbærende kapacitet sænkes. Pga. den lave føtale iltmætning har carboxyhæmoglobin-niveauet en alvorligere effekt på iltransporten i føtalt blod end i moderens blod. Når humane EC fra v. umbilicalis blev dyrket under hypoksiske forhold

($O_2 < 5\%$), var aktiviteten og koncentrationen af eNOS lavere sammenlignet med EC, der var dyrket under normoxia (21%) [8].

Ud over nikotin og CO indeholder cigaretrøg > 1.000 forskellige komponenter, hvis virkning på endotelcellefunktionen endnu er ukendt.

Blandt de 182 ikkerygere fandt vi en positiv association mellem eNOS-aktivitet og fødselsvægt. Det tyder på, at aktiviteten af eNOS er af betydning for den nyfødtes vægt. Men kun 25% af reduktionen i fødselsvægt blandt rygerne kunne forklares ved en lavere eNOS-aktivitet. Det betyder, at 75% af reduktionen i fødselsvægt skal forklares ved andre effekter af rygning end reduceret eNOS-aktivitet f.eks. en direkte effekt af nikotin, CO [9] og andre toksiske stoffer i cigaretrøgen på andre biologiske mekanismer, der ikke inkluderer dannelsen af NO.

Aktiviteten af eNOS måles in vitro i et substrat, hvor vi har forsøgt at optimere tilstedeværelsen af diverse kofaktorer. Det er derfor muligt, at rygning påvirker betydende kofaktorer under in vivo-forhold, således at vi undervurderer rygningens effekt på eNOS in vivo.

Det er endnu uvist, om fosterets EC præges for livstid af moderens rygning, som dermed ville disponere til iskæmisk hjertesygdom med symptomer mange år senere, eller om den nedsatte eNOS aktivitet ophæves kort efter fødslen.

KONKLUSION

Vores målinger viser, at rygning under graviditeten reducerer NO-syntase-aktiviteten i endotelceller i de føtale kargebeter, hvilket formodentlig nedsætter den

kardilatoriske kapacitet og fører til nedsat foster-vækst. Rygestop tidligt i graviditeten forhindrer denne effekt på den nyfødte.

KORRESPONDANCE: Malene R. Andersen, Klinisk-biokemisk Afdeling, Gentofte Hospital, DK-2900 Hellerup. E-mail: mardan01@geh.regionh.dk

ANTAGET: 24. februar 2009

INTERESSEKONFLIKTER: Ingen

This article is based on a study first reported in *Circulation* 2009;119:857-64.

LITTERATUR

1. Butler NR, Goldstein H, Ross EM. Cigarette smoking in pregnancy: its influence on birth weight and perinatal mortality. *BMJ* 1972;2:127-30.
2. Celemajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D et al. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation* 1993;88:2149-55.

3. Andersen MR, Walker LR, Stender S. Reduced endothelial nitric oxide synthase activity and concentration in fetal umbilical veins from maternal cigarette smokers. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:346-51.
4. Andersen MR, Stender S. Endothelial nitric oxide synthase activity in aorta of normocholesterolemic rabbits: regional variation and the effect of estrogen. *Cardiovasc Res* 2000;47:192-9.
5. Hegaard HK, Kjærgaard H, Møller LF et al. Determination of saliva cotinine cut-off to distinguish pregnant smokers from pregnant nonsmokers. *Acta Obstet Gynecol* 2007;86:401-6.
6. Bech BH, Obel C, Henriksen TB et al. Effect of reducing caffeine intake on birth weight and length of gestation: randomised controlled trial. *BMJ* 2007;334:409-14.
7. Chalou S, Moreno H, Beenowitz NL et al. Nicotine impairs endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo. *Clin Pharmacol Ther* 2000;67:391-7.
8. Østergaard L, Stankevicius E, Andersen MR et al. Diminished NO release in chronic hypoxic endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H2894-903.
9. Gomez C, Berlin I, Marquis P et al. Expired air carbon monoxide concentration in mothers and their spouses above 5 ppm is associated with decreased fetal growth. *Prev Med* 2005;40:10-5.

Hypertension

Forhøjet blodtryk er muligvis det vigtigste helbredsproblem i den vestlige verden. Det forekommer hyppigt, er ofte asymptomatisk og ubehandlet forbundet med betydelig kardiovaskulær risiko. Imidlertid kan sygdommen ofte behandles med godt resultat. Det er derfor ikke underligt, at hypertension er genstand for en intens forskningsaktivitet – et område, hvor også danske forskere har gjort sig gældende.

Inden for de senere år er der sket betydelige

fremskridt i forståelsen af forhøjet blodtryk og dets påvirkning af organismen i mange sammenhænge også inden for den antihypertensive behandling. Et stort antal danske læger og forskningsgrupper har taget imod opfordringen til at opdatere Ugeskriftets læsere om hypertension. Resultatet fremgår af dette og foregående nummer af Ugeskriftet. God læselyst.

Tonny Jensen, redaktør

Hypertension og obstruktiv søvnapnø

Læge Pia Holland Gjørup & overlæge Jan Hedner

Obstruktiv søvnapnø (OSA) er karakteriseret ved kraftig snorken afbrudt af gentagne episoder med kollaps af de øvre luftveje på trods af respiratorisk arbejde (**Figur 1**). Dette kan medføre intermitterende svær hypoksi helt ned til 60% og af og til CO₂-retention samt ændringer i det normale søvnmønster med talrige korte opvågninger eller overgang til mere overfladiske søvnstadier i forbindelse med apnøen (*arousals*). Den afbrudte nattesøvn medfører træthed og nedsat opmærksomhed i dagtiden og som følge heraf øget risiko for arbejds- og trafikulykker [1]. Herudover er der efterhånden betydelig evidens for at OSA er associeret med hypertension [2].

Der er en tæt relation mellem overvægt og OSA.

Antallet af obstruktive apnøer stiger med stigende vægt hos den enkelte, og andelen af patienter med OSA stiger med stigende vægt i befolkningen som helhed, men tilstanden er ikke sjælden hos normalvægtige. OSA er cirka dobbelt så hyppig hos mænd som hos kvinder, og hyppigheden stiger med alderen hos begge køn. Det skønnes, at mindst 4% af den voksne befolkning har symptomatisk OSA [3], og prævalensen er formentlig stigende, da overvægt og fedme ses med stigende prævalens i vestlige lande.

Behandlingen af OSA er *continuous positive airway pressure* (CPAP), som består af en maske, som dækker næsen (eller i få til fælde både næse og mund) fastholdt af stropper og tilkoblet en generator,

STATUSARTIKEL

Regionshospitalet
Holstebro, Medicinsk
Forskning og Medicinsk
Afdeling, og Sahlgrenska
Universitetssjukhuset,
Lungemedicin,
Sömnlaboratoriet