

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi  
Doç. Dr. Hakan ERBAŞ

**DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULMUŞ MEME  
TÜMÖRLERİNDE PLAZMA ASİMETRİK  
DİMETİLARGİNİN DÜZEYLERİ ÜZERİNE C VE E  
VİTAMİNLERİNİN ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Aylin TÜRKSEVER**

EDİRNE-2009

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi  
Doç. Dr. Hakan ERBAŞ

**DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULMUŞ MEME  
TÜMÖRLERİNDE PLAZMA ASİMETRİK  
DİMETİLARGİNİN DÜZEYLERİ ÜZERİNE C VE E  
VİTAMİNLERİNİN ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Aylin TÜRKSEVER**

**Destekleyen Kurum : TÜBAP 2008/53**

**Tez No :**

EDİRNE-2009

## **TEŞEKKÜR**

Yüksek lisans eğitimimde ve tez çalışmalarımnda değerli katkıları olan danışmanım Doç. Dr. Hakan ERBAŞ başta olmak üzere, Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Erol ÇAKIR'a, Prof.Dr. Selma SÜER GÖKMEN'e, Doç. Dr.Sevgi ESKİOCAK'a, bu çalışmada benden yardımlarını esirgemeyen Ezgi KÜRKCÜ ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
MEME KANSERİ.....	3
SAĞLIKLI ENDOTELİN YAPI VE FONKSİYONU.....	9
ENDOTEL DİSFONKSİYONU.....	9
NİTRİK OKSİT.....	11
ASİMETRİK DİMETİLARGİNİN (ADMA).....	15
GEREÇ VE YÖNTEMLER .....	24
İSTATİSTİKSEL ANALİZLER .....	30
BULGULAR.....	31
TARTIŞMA .....	42
SONUÇLAR .....	48
TÜRKÇE ÖZET .....	49
İNGİLİZCE ÖZET.....	51
KAYNAKLAR .....	53
RESİMLEMELER LİSTESİ .....	62
ÖZGEÇMİŞ .....	64
EKLER .....	65

## **SİMGE VE KISALTMALAR**

- ADMA** : Asimetrik Dimetilarginin
- DNA** : Deoksiribonükleik asit
- DDAH** : Dimetilarginin Dimetilaminohidrolaz
- cGMP** : Siklik Guanozin Monofosfat
- GTP** : Guanozin Trifosfat
- HCC** : Hepato Cellular Carcinoma (Hepatoselüler Karsinom)
- HIV** : Human İmmunodeficiency Virus
- HPLC** : High Performance Liquid Chromotography (Yüksek Performans Likit Kromotografisi)
- IS** : İnternal Standart
- MMA** : Monometil Arginin
- NADP** : Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
- NO** : Nitrik Oksit
- NOS** : Nitrik Oksit Sentaz
- eNOS** : Endotelyal Nitrik Oksit
- iNOS** : İndüklenebilir Nitrik Oksit
- nNOS** : Nöronal Nitrik Oksit
- OPA** : Ortofitaldialdehid
- PRMAT**: Protein Arginin Metil Transferaz
- SDMA** : Simetrik Dimetilarginin
- VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü)

## GİRİŞ VE AMAÇ

Meme tümörü dünyada ve Türkiye’de kadınlar arasında en sık görülen tümör olup kadınlarda görülen tüm kanser tiplerinin yaklaşık %30’unu oluşturmaktadır (1). Aynı zamanda meme kanseri, kadınlardaki kanser ölüm nedenleri arasında dünyada ve Türkiye’de ilk sırada bulunmaktadır. Günümüzde tüm kanserlerin %32’si, kansere bağlı ölümlerin ise % 18’i meme kanserine bağlıdır (2-4).

Bu nedenle meme kanseri çok önemli bir sağlık sorunu olma özelliğini halen sürdürmektedir (5). Kanserle savaşta etiyolojik faktörler, kanser öncesi lezyonlar, kanser öncüllerini bilmenin yanı sıra, önemli bir başka faktör de teşhisinin erken ve doğru konabilmesidir (6). Metastazların erken dönemde belirlenmesi yapılacak tedavinin planlanması ve başarısı açısından aynı derecede önemlidir (7). Erken dönemde metastaz bulunan hastaların çoğunluğunun belirti göstermemesi ve görüntüleme yöntemlerinin bu dönemde yalancı negatif sonuçlar verebilmesi, bazı biyokimyasal belirteçlerin bu konudaki önemini gündeme getirmektedir (7,8). Kanser hastaları üzerinde yapılan araştırmalar kanserin bu hastaların karbonhidrat, lipit ve protein metabolizmalarında bir takım bozukluklara neden olduğunu göstermiştir (9).

Asimetrik Dimetilarginin (ADMA), metillenmiş arginin aminoasididir ve protein arginin metiltransferaz tip-1 (PRMT-1) etkisiyle oluşur. İnsan vücudunda günde 300 mikromol ADMA üretimi olmaktadır. ADMA nitrik oksit sentaz (NOS) enziminin kompetitif inhibitörüdür (10). NOS enzimini inhibe ederek, nitrik oksit (NO) salınımını azaltır (11).

Nitrik oksit’in pek çok hayati önem taşıyan görevi vardır. En önemli rollerinden birisi de endotel fonksiyonunun devamını sağlamaktır. Ortamda NO azaldığında, endotel homeostaz vazokonstriksiyon lehine bozulur ve endotel disfonksiyon başlar (12). Bu yolak üzerinde en etkin molekül ADMA’dır. Kanser hastalarındaki en büyük problemlerden biri olan endotelial

disfonksiyonlar ADMA düzeylerinde artışa neden olurlar. ADMA, NO'yu inhibe ederek damar kompliyansını azaltmakta, damar direncini artırmakta ve kan akımını sınırlandırmaktadır (13).

C ve E vitaminleri antioksidan özellikteki vitaminlerdir, serbest oksijen radikallerini azaltarak kanseri önleyici etkileri bilinmektedir (14,15). Amerika'da yapılmış bir çalışmada meme kanseri oluşumu ve E vitamini ile olan ilişkisi araştırılmış, 6 hafta E vitamini alan grupta tümörün anlamlı olarak küçüldüğü rapor edilmiştir (16).

Yıllar içerisinde yapılan pek çok araştırmada, C vitamininin etkili bir anti-kanser ajanı olabileceği gösterilmiştir. Çevrede bulunan pek çok toksik atık ve kirlilik etkenleri, karsinojenik ve mutajenik etkilere neden olabilir. Bir başka çalışma da C vitamininin mutajenlerin oluşmasını engellediği gösterilmiştir. C vitamini, immun sistemin kanser hücrelerini tanımasına da yardımcı bir rol oynamaktadır (17). Ayrıca C vitamininin nitratlardan, karsinojen bir maddeye dönüşebilen nitrozamin oluşumunu anlamlı bir biçimde engellediği bulunmuştur (17). Yapılan başka bir araştırmada ise C vitamininin gastrik kanser gelişme riskini % 30-60 oranında azalttığı öne sürülmüştür (18).

C ve E vitaminlerinin sinerjik etki gösterdikleri de gösterilmiştir (19). Serbest radikallerin etkilerini önleyen ve diyetimizde sıkça bulunması gereken C ve E vitaminlerinin, kanser gibi toplumda erken ölümlere yol açan hastalıkların oluşumunu önledikleri ileri sürülmüştür (16).

Bu çalışmada deneysel olarak meme tümörü oluşturulmuş farelerde C ve E vitaminlerinin ADMA düzeyleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Tümör oluşumu nedeniyle artması beklenen ADMA düzeylerinin, antioksidan vitaminler olan C ve E vitaminleri verilerek kontrol altına alınması ve bu vitaminlerin kanser oluşumu yönünde bu mekanizma üzerinden oluşabilecek, olası olumlu etkilerinin araştırılması planlanmıştır.

## GENEL BİLGİLER

### MEME KANSERİ

Kanser, günümüzün en önemli sağlık problemlerinden biridir. Gelişmiş ülkelerde olduğu gibi Türkiye’de de bütün yaş gruplarına göre kardiovasküler hastalıklardan sonra en sık ikinci ölüm sebebi kanser olmuştur (Tablo 1) (20-22).

**Tablo 1. Türkiye’de 1995 yılında bütün yaş gruplarında en sık ölüm sebepleri (22)**

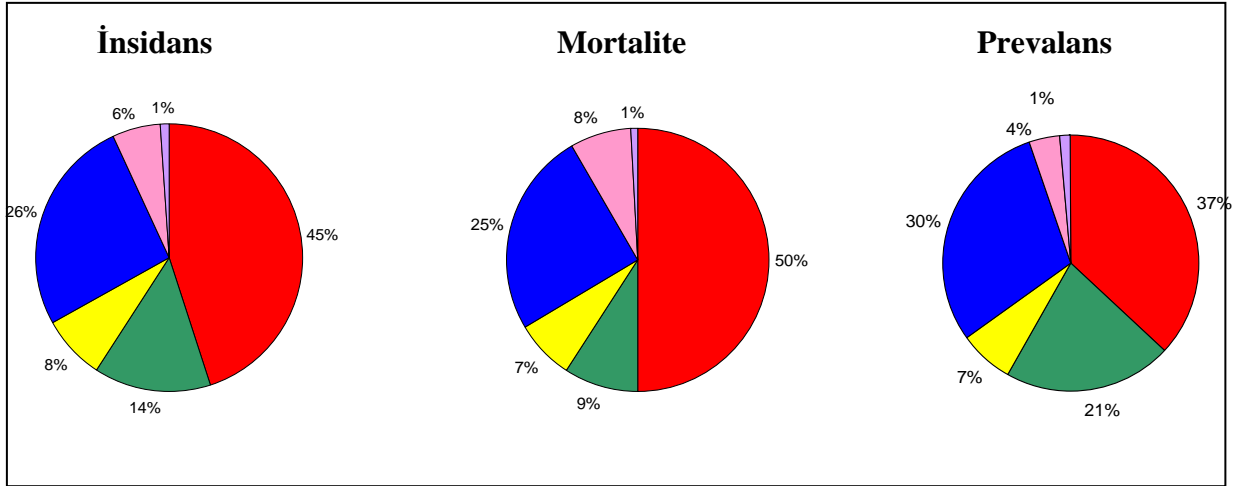
<u>Ölüm sebebi</u>	<u>%</u>
Kardiovasküler hastalıklar	36
Kanser	11
Serebrovasküler hastalıklar	7
İnfeksiyon hastalıklar	7
Kalaazar	4
Diğer sebepler	3

2002 yılında, varolan insidans ve mortalite verilerine dayanarak, dünyada 10,9 milyon yeni vaka, 6,7 milyon ölü vaka ve 24,6 milyon yaşayan kanser hastası olduğu tahmin edilmektedir. Dünyada en yaygın teşhis edilen kanserler sırası ile akciğer (1,35 milyon), meme (1,15 milyon) ve kolon-rektum (1 milyon) kanserleridir (1).

Meme kanseri görülme sıklığı dünyada ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir (Şekil 1). İnsidansı, Japonya hariç sosyoekonomik olarak iyi gelişmiş olan Kuzey ve Batı Avrupa ülkelerinde, Amerika Birleşik Devletleri’nde yüksektir. Kaliforniya, USA ve Kanada yılda



yüz binde 80–90 görülme sıklığı ile ilk sıralarda yer alırken, aynı değer Japonya’da sadece yüz binde 12–15 arasındadır (23,24). Avrupa ülkelerinde ise görülme sıklığı kuzey ülkelerinden güneye ve batı ülkelerinden doğuya doğru azalmaktadır (25). Buna karşın meme kanseri görülme sıklığının, sosyoekonomik düzeyi düşük toplumlarda, yüksek toplumlara göre daha belirgin bir artış göstermesi, yıllar içinde batı ülkelerinde yaşayan kadınlarla, doğu ülkelerinde yaşayan kadınlar arasındaki meme kanseri görülme sıklığı farkının kapanacağını göstermektedir (25,26).



**Şekil 1. 2002 yılı dünya çapında kanser verileri (1):** Kırmızı: Asya; Sarı: Latin Amerika; Pembe: Afrika; Yeşil: Güney Amerika; Mavi: Avrupa; Mor: Okyanusya’yı temsil etmektedir.

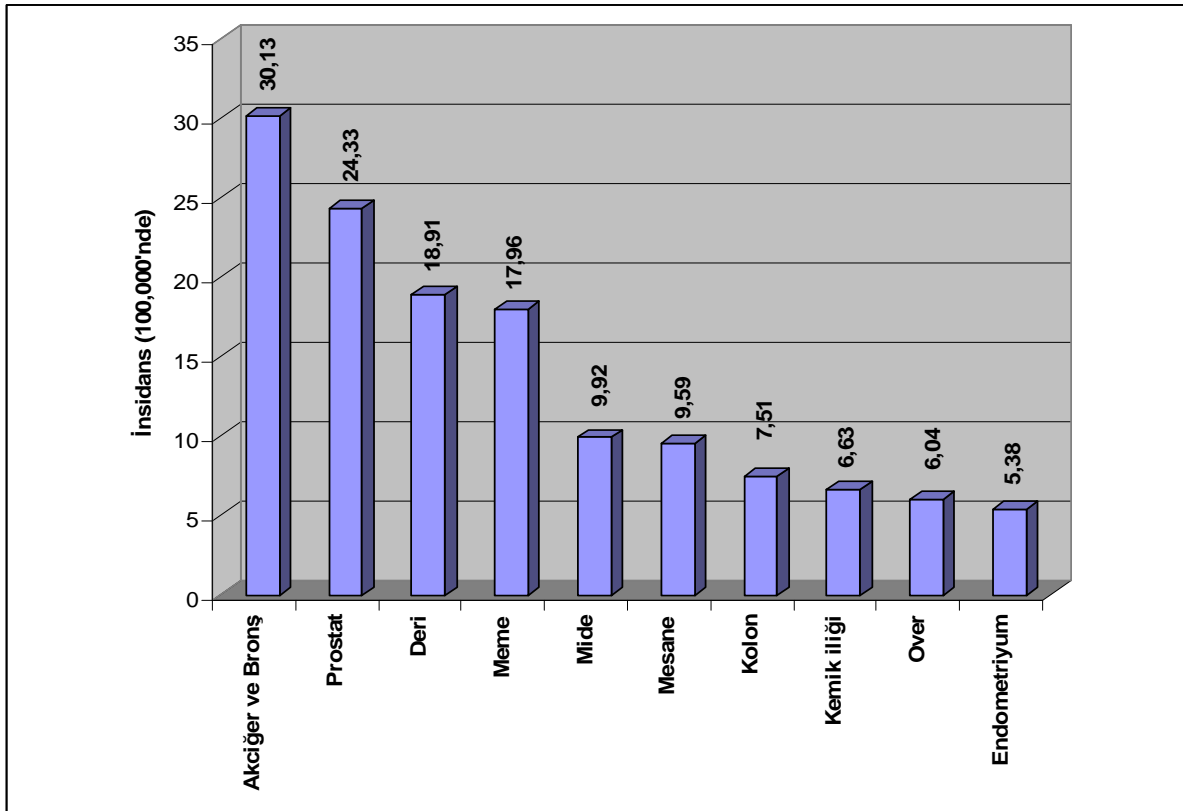
2002 yılı verilerine dayanarak, cinsiyete göre dünyada kanser görülme sıklığına bakıldığında, erkeklerde en sık akciğer ve mide, kadınlarda ise meme ve kolorektal kanserlerin başta geldiği gözlenmektedir. Her iki cins için kanser görülme sıklığı sırasıyla akciğer, meme ve kolorektal kanserleri şeklindedir. 2002 yılı verileri, 1995 yılı verileriyle karşılaştırıldığında her iki cinste kanser görülme sıklığında 3. sırada yer alan meme kanserinin, mide kanserleriyle yer değiştirerek 2. sıraya yükseldiği gözlenmiştir (Tablo 2) (1,22).

**Tablo 2. 1995 yılı verilerine göre dünyada kanser görülme sıklığı (22)**

Sıra	Erkek	Kadın	Her İki Cins
1	Akciğer	Meme	Akciğer
2	Mide	Kolorektal	Mide
3	Kolorektal	Serviks uteri	Meme
4	Prostat	Mide	Kolorektal
5	Karaciğer	Akciğer	Karaciğer
6	Ağız/Farinks	Over	Prostat
7	Özefagus	Korpus uteri	Serviks uteri

Kanserden ölüm sebepleri arasında dünyada en yaygın olanları sırası ile; akciğer (1,18 milyon), mide (700,000) ve karaciğer (598,000) kanserleridir. Meme kanseri göreceli olarak olumlu prognoza sahip olduğundan, ölüm sebebi olarak sıralamada 5. sırada yer almaktadır (1). Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanser çeşidi olup, kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. Dünya çapında mortalitesinin insidansa oranı %35'dir. Yaşayan 4,4 milyon kanser hastası ile meme kanseri dünyada prevalansı en yüksek kanser tipidir (1,23).

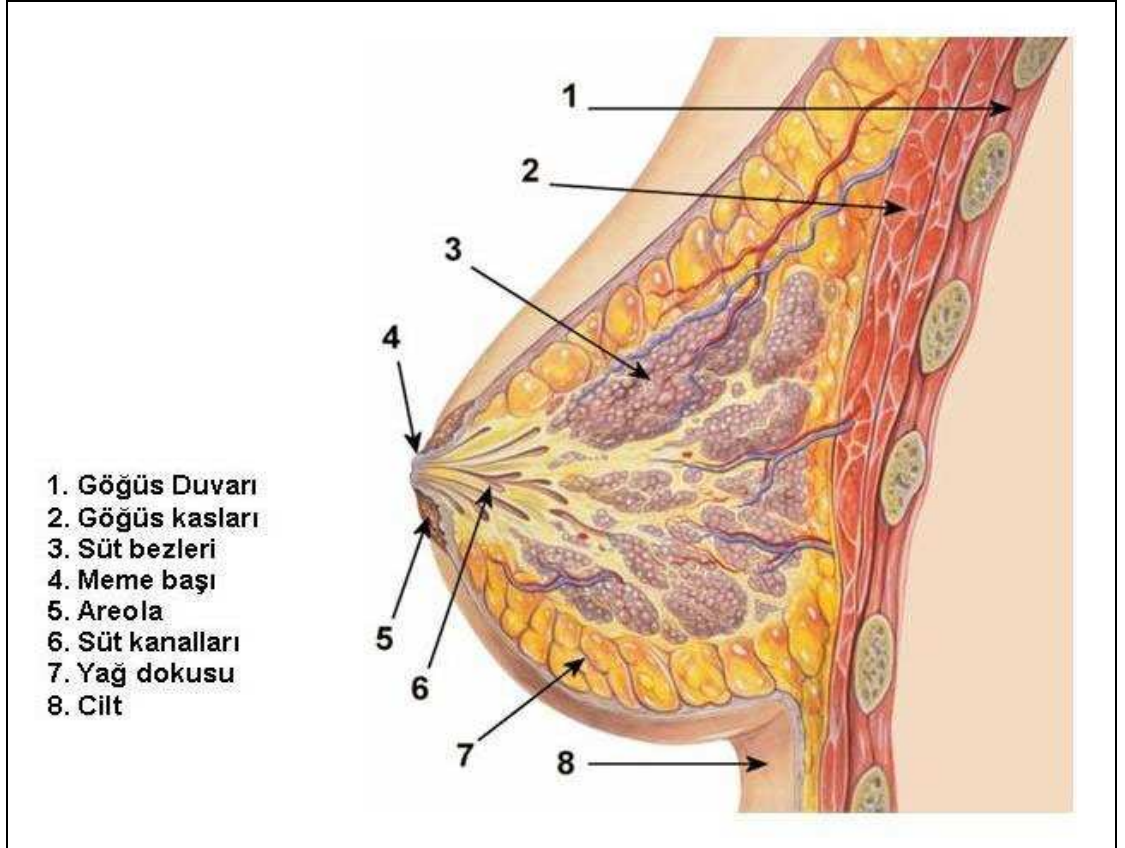
Ülkemizde mevcut kayıt sisteminin yeterli olmaması nedeniyle kanser insidansı hakkında yeterli bilgi yoktur. Sağlık Bakanlığı kanser kayıt merkezine bildirilen kanser oranı yüz binde 35-40 civarındadır (27). Ancak bu oranın gerçekte yüz binde 150-200 civarında olduğu ve bu oran dikkate alındığında ülkemizde yılda yüz bin civarında yeni kanser olgusunun ortaya çıktığı tahmin edilmektedir (22). Türkiye'de Sağlık Bakanlığının 2005 yılı verilerine göre, tüm kanserler arasında meme kanseri görülme oranı % 17.96 olarak bulunmuştur (Tablo 3) (28).



Şekil 2. 2005 yılı Türkiye'de en çok görülen kanser vakaları (28)

### Memenin Anatomik Yapısı

Meme, sayısı yaklaşık 20 kadar olan ve lob diye adlandırılan bölümden oluşmuştur. Her lob kendi içinde daha küçük bölümler olan lobüllere ayrılır (Şekil 2). Lobüller süt üretimini yapan yapılardır. Her bir lobülün süt salgısının akmasını sağlayan bir süt kanalı (duktus) vardır. Her lobülün süt kanalları birleşerek meme başına kadar uzanan ana süt kanalını oluşturur. Süt kanallarının ve lobüllerin çevresi yağ dokusu ile sarılıdır (29,30).

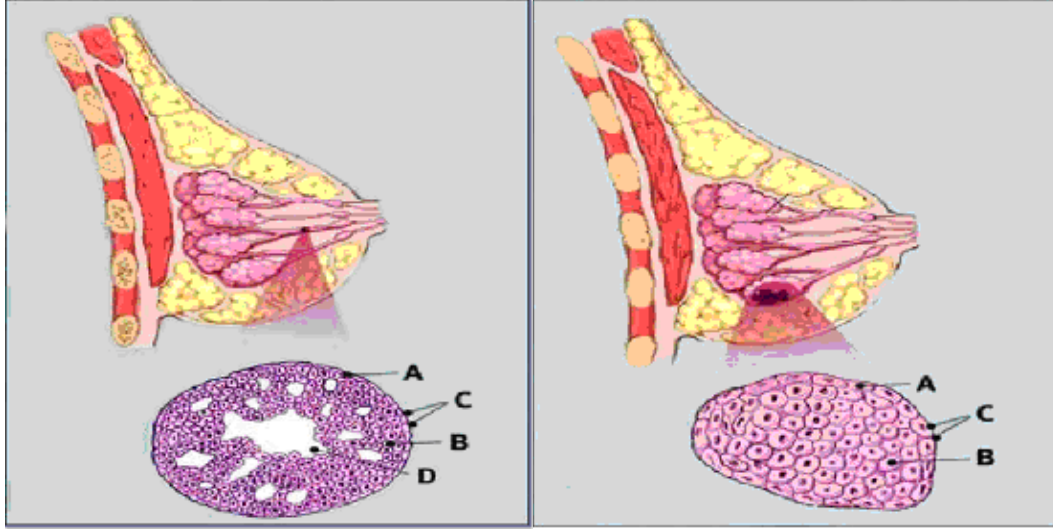


Şekil 3. Memenin anatomik yapısı (30)

Meme dokusu içinde normal kan damarlarının yanı sıra lenf damarları da vardır. Lenf damarları, vücudun belirli bölgelerinde gruplar halinde bulunan mercimek şeklindeki lenf düğümlerine ulaşırlar. Meme içindeki lenf damarları, memenin orta ve alt kenarı, koltuk altı ve köprücük kemiği boyunca dizilmiş lenf düğümü gruplarına ulaşırlar. Memedeki lenf akımının yaklaşık %75'i koltuk altındaki lenf düğümü gruplarına doğru olur (31).

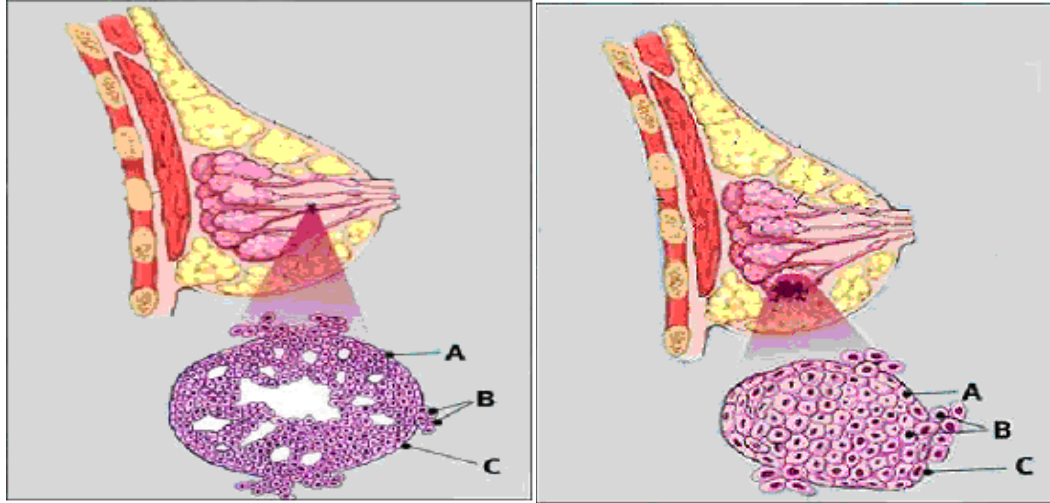
Meme kanseri iki ana tipe ayrılmaktadır: Duktal karsinom (infiltratif duktal karsinom ve non-infiltratif duktal karsinom) ve lobüler karsinom (infiltratif lobüler karsinom ve non-infiltratif lobüler karsinom) (Şekil 3) (32). Memede en sık olarak süt kanallarından kaynaklanan duktal kanser görülür. Daha az sıklıkla süt üreten keseciklerinden kaynaklanan lobular kanser gelişebilir. Diğer meme kanseri türleri ise oldukça nadir görülmektedir (33).

Memenin tarifi yapılırken 5 farklı alandan sözedilebilir: Üst dış kadran, üst iç kadran, alt dış kadran, alt iç kadran, merkez alan. Meme dokusu en fazla üst dış kadranda bulunur. Bu nedenle kanserler de en sık burada görülür (31,34).



Non-invaziv duktal kanser

Non-invaziv lobuler kanser



İnvaziv duktal kanser

İnvaziv lobuler kanser

**Şekil 4. Meme kanseri tipleri (30):** A: Normal duktus hücreleri; B: Kanser hücreleri; C: Bazal membran; D: Lümen.

İnsanlarda meme kanserinin nedeni bilinmemektedir. Genetik, çevresel, hormonal ve psikolojik etkenlerin oluşumunda rol aldığı kabul edilmekle birlikte, meme kanserli kadınların %70-80'i bu risk faktörlerine sahip değildir. Meme kanserinin oluşmasında rol oynayan kesin ve olası risk faktörleri aşağıdaki gibi sıralanabilir (Tablo 3) (35-41).

**Tablo 3. Meme kanseri gelişimindeki kesin ve olası risk faktörleri (35-41)**

<b>Faktör</b>	<b>Rölatif risk</b>	<b>Yüksek risk grubu</b>
Yaş	<b>&gt;10</b>	50 yaş ve üzeri
Cinsiyet		Meme kanserlerinin %99'u kadınlarda
Coğrafi lokalizasyon	<b>5</b>	Gelişmiş ülkelerde
Menarş yaşı	<b>3</b>	12 yaşından önce menarş
Menapoz yaşı	<b>2</b>	55 yaşından sonra menapoz
Birinci çocuk doğurma yaşı	<b>3</b>	Birinci çocuğunu 30 yaşından sonra doğurma
Aile hikayesi	<b>3=2</b>	Anne ve/veya kız kardeşte meme kanseri, BRCA-1, BRCA-2 ve P53 genlerinde Mutasyon
Önceden varolan benign hastalık	<b>2-6</b>	Atipik hiperplazi
Diğer memede kanser	<b>&gt;4</b>	
Sosyo ekonomik grup	<b>2</b>	I. ve II. Gruplar
Diyet	<b>1.5</b>	Yüksek doymuş yağ alımı
Vücut ağırlığı:		
Premenopozal	<b>0.7</b>	Vücut kitle indeksi >35
Postmenopozal	<b>2</b>	Vücut kitle indeksi >35
Alkol tüketimi	<b>1.3</b>	Aşırı alınması
Radyasyona maruziyet	<b>3</b>	Özellikle 30 yaş altında ve puberteden önce
Ekzojen alım:		
Oral kontraseptif	<b>1.24</b>	Erken veya uzun süreli oral kontraseptif kullanımı
Hormon replasman tedavisi	<b>1.35</b>	10 yıldan fazla kullanım

## SAĞLIKLI ENDOTELİN YAPISI VE FONKSİYONU

Endotel kan damarlarının iç yüzeyini döşeyen, tek tabaka halinde dizilmiş hücrelerden meydana gelen bir organdır. Bu organ yaklaşık olarak 1 kg ağırlığında olup, 1 trilyon hücre içermekte ve 5000 m<sup>2</sup> yer kaplamaktadır (42, 43).

Vazodilatör ve vazokonstrüktör substratların yapımında etkili olarak, vasküler hemostazın sağlanmasında temel rol oynar. Son yapılan çalışmalarda başta ateroskleroz olmak üzere birçok hastalıkta endotelin rolü ortaya çıktıkça “endotel ateroskleroza karşı en önemli savunma sistemidir” denmektedir (44). Normal endotel kan akımına karşı hem trombozezistans bir yüzey görevi görürken hem de kan ve damar duvarı arasında makromoleküler bir bariyer vazifesi yapar. Endotel hücreleri morfolojik yapıları ve stratejik pozisyonları dolayısıyla vasküler düz kas hücreleri ile kan dolaşımının komponentleri arasında selektif permeabl bir bariyer oluşturur. Bunun için endotel hücreleri luminal yüzeyde dolaşım için nonadheziv bir yapıda bulunmalıdır. Bu görevi yanında endotel hücreleri damar tonusunun düzenlenmesi, koagülasyon, hücre büyümesi ve ölümü, lökosit migrasyonu ve çeşitli vazoaktif maddelerin yapılması gibi çeşitli olaylarda rol oynar (45).

19.Yüzyılın başında endotelin sadece kan ile organlar arasında bir bariyer olduğu düşünülmekteydi (46). Ancak, 1976’da Moncada ve arkadaşları endotel kaynaklı vazodilatör ve antiagregan özellikleri olan prostasiklini keşfetmişlerdir (47). 1980 yılında ise Furchgott ve Zawadzki asetilkolinin yalnızca sağlam endotele sahip arterlerde vazodilatasyon yaptığını ve burada “Endotel kaynaklı gevşetici faktör” olarak isimlendirdikleri bir faktörün rol oynadığını söylemişlerdir. Moncada ve arkadaşları tarafından bu maddenin nitrik oksit olduğu 1987’de gösterilmiştir (47). Endotelden önemli rollere sahip farklı maddeler de salgılanmaktadır (Tablo 4).

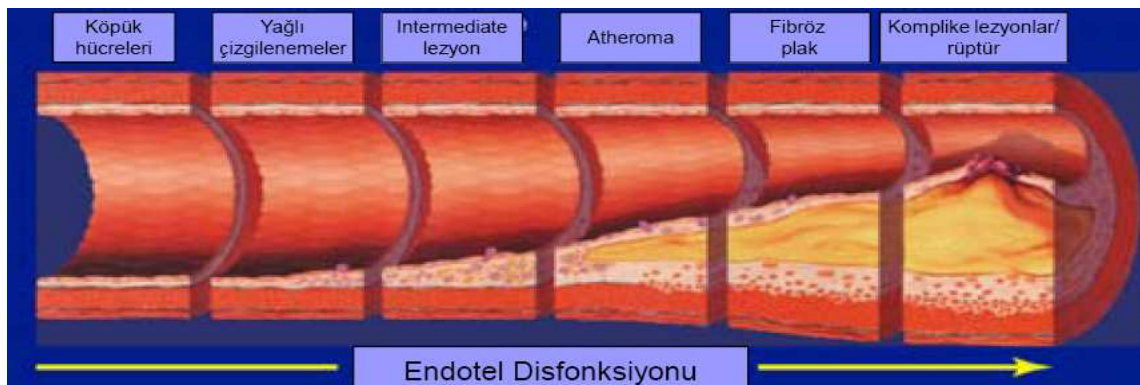
## ENDOTEL DİSFONKSİYONU

Vasküler tonusun belirlenmesi, hemostazın aktif olarak kontrol edilmesi, endotel geçirgenliğinin kontrolü ve vasküler düz kasın büyümesinin kontrolü, endotelin en önemli fonksiyonel özellikleridir (45). Endotel disfonksiyonu; endotelin fonksiyonel özelliklerinin bozulması olarak tanımlanmaktadır. Endotelial disfonksiyonda ilk görülen, NO aracılığı ile olan endotel bağımlı vazodilatasyonun bozulmasıdır (46). NO üretimi veya aktivitesindeki bozukluğun, endotelial disfonksiyonun ana mekanizması olduğu ve ateroskleroza tetiklediği öne sürülmektedir (42-47). Sağlıklı endotelde, asetilkolin, endotel bağımlı NO aracılığı ile

**Tablo 4. Endotel hücrelerinden salgılanan maddeler (43).**

<b>1- Vazokonstriktörler</b> -Angiotensin dönüştürücü enzim (ACE) -Endotelinler (ET-1, ET-2, ET-3) -Angiotensin II -Tromboksan A <sub>2</sub> -Asetilkolin, araşidonik asit, PGH <sub>2</sub> , trombin, nikotin	<b>2- Vazodilatörler</b> -Nitrik oksit (NO=EDRF) -Adrenomedüllin -Endotel kaynaklı hiperpolarizan faktörler -Prostasiklin (PGI <sub>2</sub> ) -Bradikinin, asetilkolin, serotonin, histamin, P maddesi
<b>3- Büyüme modülatör / mediyatörleri</b> <b>a) Büyüme uyarıcıları</b> PDGF Basic FGF IGF-1 IL-1 Endotelin A-II <b>b) Büyüme inhibitörleri</b> Heparin sülfat TGF $\beta$ NO Bradikinin Prostasiklin	<b>4- İnflamatuvar mediyatörler</b> -Adezyon molekülleri; Endotelyal Lökosit Adezyon Molekülü (ELAM) -İntraselüler Adezyon Molekülü (ICAM) -Vasküler Hücre Adezyon Molekülleri (VCAM) -Antijenler ; Major histokompatibilite kompleks 2 (MHCII)
<b>5- Antitrombotik (homeostaz) Maddeler</b> -Trombomodülin -Plazminojen aktivatör inhibitör tip I (PAI-1)	<b>6-Redoksisite</b>

vazodilatasyon meydana gelir. Sağlıksız endotelde ise NO'nun etkisi azalmıştır ve karşılıksız muskarinik düz kas hücrelerinin aktivasyonu vazokonstrüksiyona yol açar (Şekil 5).



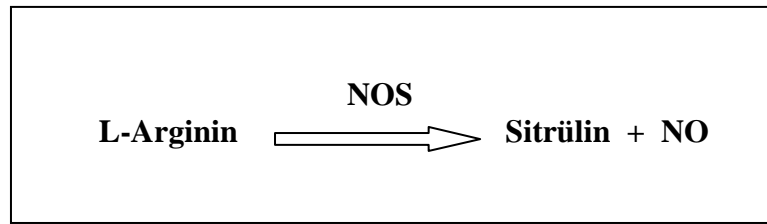
**Şekil 5. Endotel disfonksiyonu**

## NİTRİK OKSİT

Nitrik oksit uzun yıllar arabaların egzoz gazında, fosil yakıtlarının dumanında ve sigara dumanında bulunan ve ozon tabakasının azalmasından sorumlu tutulan zararlı bir çevre kirleticisi olarak görülmekteydi. Ancak, iki atomlu bu basit molekülün fizyolojik rolüne yönelik ilgi, 1980 yılında Furchgot ve Zawadskinin bulduğu endotel kökenli gevşetici faktörün, 1987 yılında NO olduğunun gösterilmesinden sonra artmıştır. NO, 1992 yılında Science dergisi tarafından yılın molekülü seçilmiştir. 1998 yılında Furchgot, Zawadski, Louis, Ignora ve Ferid Murada'nın NO'nun kardiyovasküler sistemde sinyal molekülü olmasıyla ilgili keşifleri Nobel fizyoloji ödülü kazanmasına neden olmuştur.

Nitrik oksit, depolanmayan ve etki bölgesine serbestçe difüze olan bağla bağlı 2 atomlu bir gazdır. Yarılanma süresi sadece 3-5 saniyedir. NO endotelden sentezlendikten sonra vasküler düz kas tabakasında difüze olur. Burada guanilat siklazın hem içeriğine bağlanarak bu enzimi aktif hale getirir. Aktif hale gelmiş guanilat siklaz, guanozin 5-trifosfat (GTP) molekülünden siklik guanozin monofosfat (cGMP) oluşumunu sağlar. cGMP hücre içi kalsiyum miktarını düşürerek vasküler düz kasın gevşemesine (vazodilatasyon) neden olur.

Nitrik oksit vücutta bulunan bir aminoasit olan L-argininden sentezlenmektedir. Bu metabolik yolda rol alan enzim ise nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimi olup bu enzimin 3 çeşit izoformu bulunmaktadır. Bu izoformlar indüklenebilir NO sentaz (iNOS), nöronal NO sentaz (nNOS), ve endotelyal NO sentaz (eNOS) olarak isimlendirilmektedirler (Tablo 5) (48).



**Şekil 6. NO sentezi**

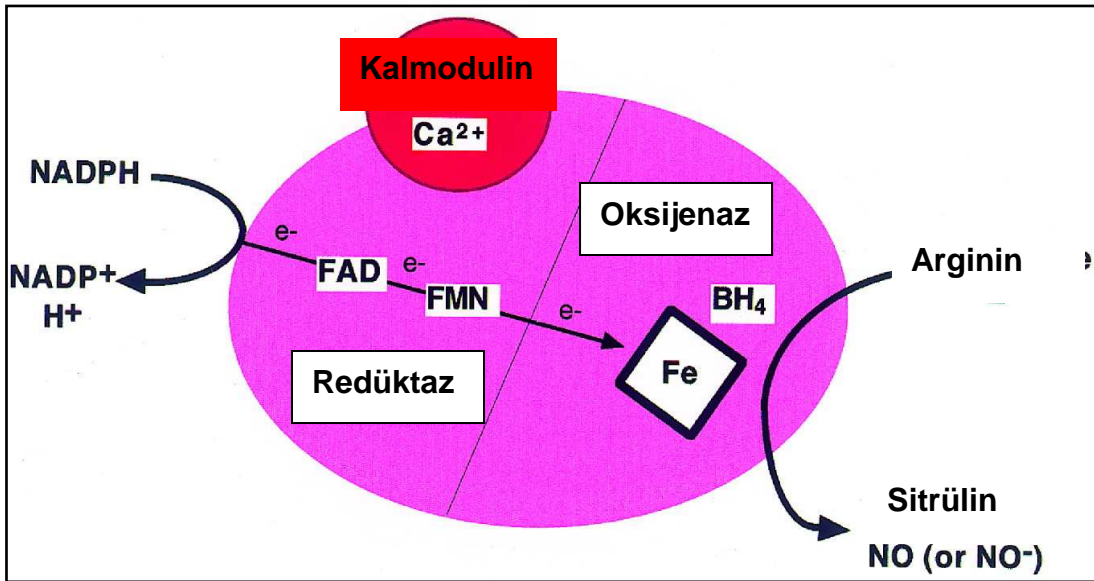
Nitrik oksit sentaz'ın katalizlediği reaksiyonda arginin terminal guanido nitrojeni oksidasyona uğramakta, reaksiyonun sonunda ise NO ve sitrülin meydana gelmektedir. NO'nun sentezlendiği reaksiyonda kofaktör olarak flavin mono nükleotit (FMN), flavin adenindinükleotit (FAD), kalmodulin (CAM), tetrahidrobiopterin (BH<sub>4</sub>), kosubstrat olarak ise nikotinamid adenin dinükleotit indirgenmiş şekli (NADPH) ve oksijen kullanılmaktadır. Reaksiyon sırasında oluşan sitrulin, endotel hücre kültüründe yapılan çalışmalar sonucunda üreden gelen bir azot atomunu eklenmesiyle arginine geri dönüşmektedir. Bu her üç



izoformun da NO sentezleyebilmesi için kalsiyum regülatör protein olan kalmoduline ihtiyacı vardır. eNOS ve nNOS'un kalmodüline bağlanabilmesi için ortamda artmış kalsiyuma ihtiyacı varken, ortamda düşük konsantrasyonda kalsiyum bulunması durumunda bile iNOS kalmodüline bağlanabilmektedir. Dolayısıyla intraselüler kalsiyum miktarı eNOS ve nNOS aktivitesini regüle etmektedir.

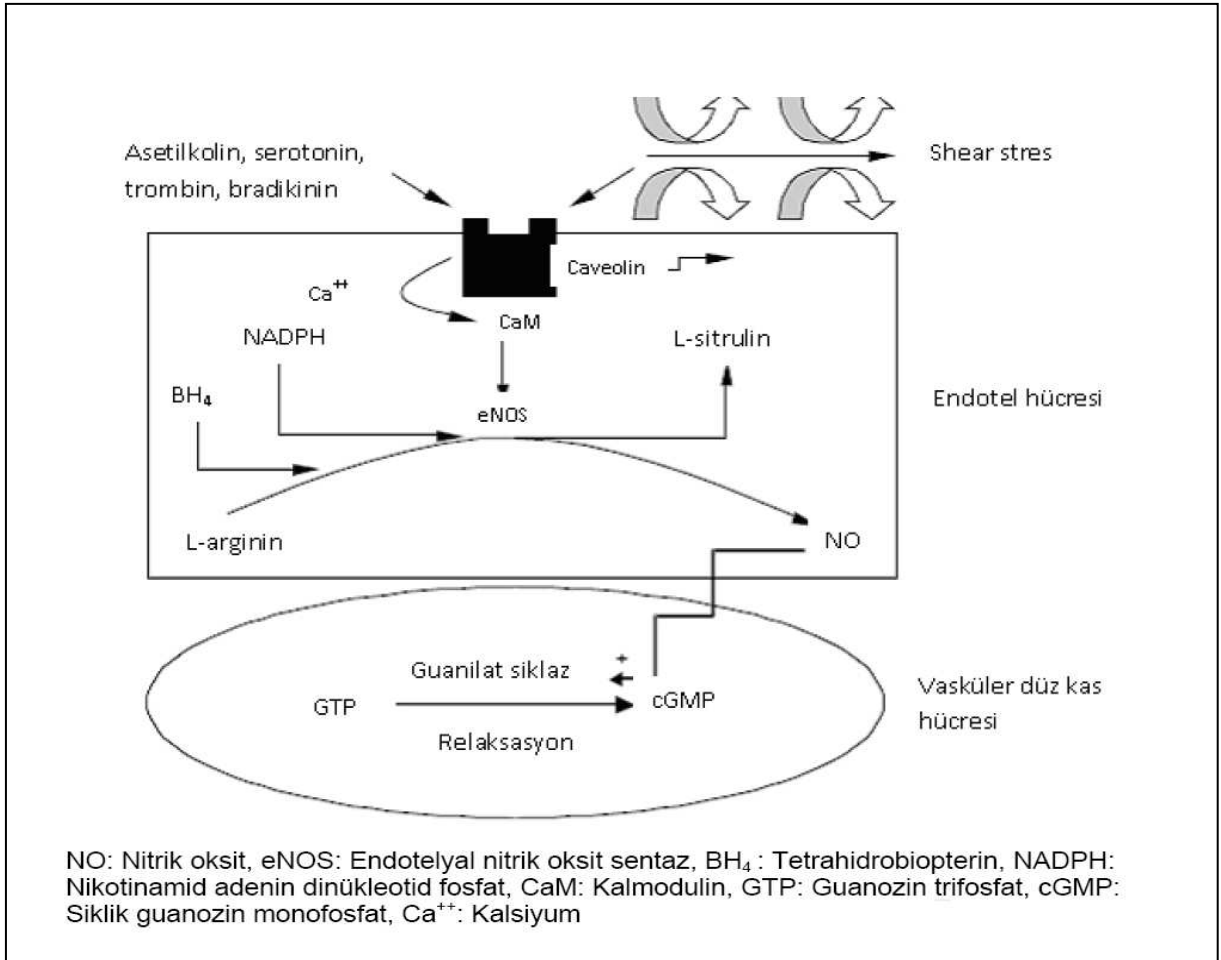
**Tablo 5. NOS izoformları (49)**

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



**Şekil 7. NO sentezi ve sentezde rol alan moleküller**

eNOS, hücre zarının invajinasyonu ile oluşan ve içinde transmembran protein olan kaveolinin bulunduğu kaveola diye isimlendirilen yerde bulunmaktadır (49). Kaveola endotel hücre zarının en önemli özelliğini taşımaktadır. Aynı yapı kalp miyozitlerinde ve birçok hücrede bulunmaktadır. Normalde kaveolin eNOS'un görev yapmasını engellemektedir, fakat bu etkiyi kalsiyum kalmodulin kompleksi ortadan kaldırmaktadır. Endotele dışardan uyarı geldiğinde hücre içi kalsiyum yoğunluğu artmakta, kalsiyum ile kalmodulin kompleksi oluşturularak eNOS'a bağlanarak suretiyle bu etkiyi ortadan kaldırmaktadır. NO sentezi ortamda kalsiyum miktarı düşünceye kadar devam etmektedir. Kalsiyum belli bir değere ulaştıktan sonra kalmodulin-eNOS ayrılmakta ve eNOS ile kaveolin tekrar kompleks oluşturmaktadır.



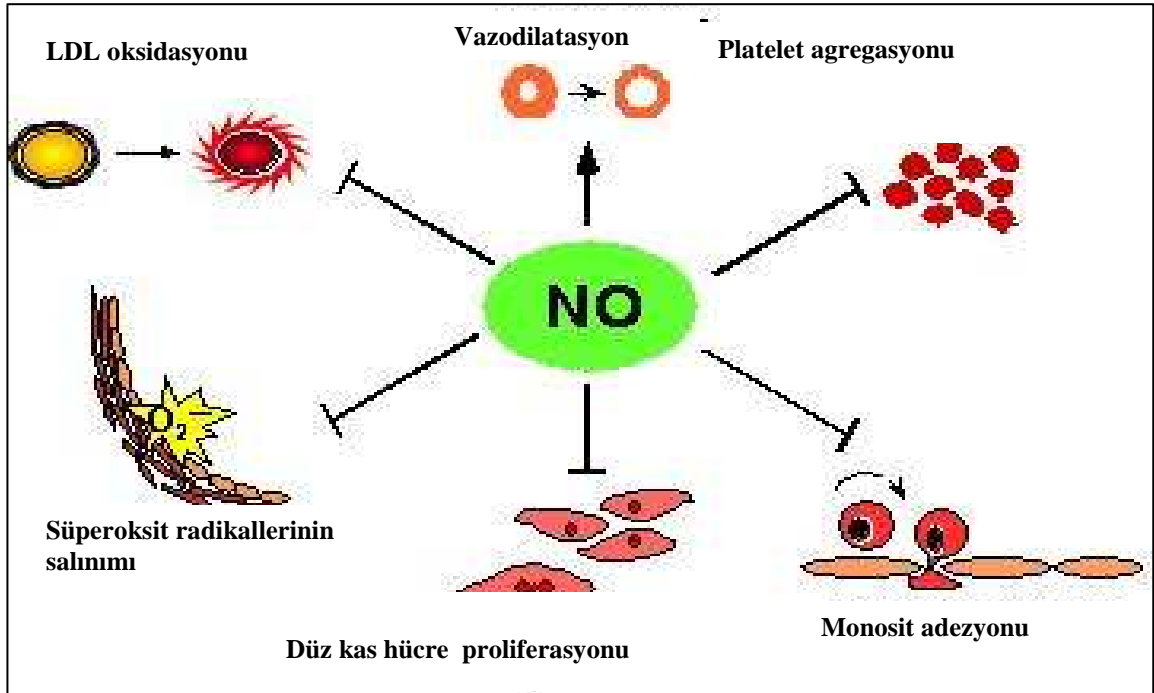
**Şekil 8. Endotel hücreleri tarafından nitrik oksit üretimi**

Nitrik oksit'in vasküler tonusun belirlenmesindeki rolünün yanında başka etkileri de bulunmaktadır. Trombositlerin damar duvarına yapışması ve birikmesini engellemesi ve lökositlerin endoteline yapışmasını engelleyerek antiadheziv ve antiaterosklerotik özellik göstermesi bunlardan bazılarıdır (Şekil 9).

Nitrik oksit'in kalp damar sistemi, beyin, periferik sinir sistemi ve immun sistem üzerinde önemli etkileri mevcuttur (Tablo 6).

**Tablo 6. NO'nun sistemler üzerine etkileri**

Sistem	NO'nun fonksiyonu
Kalp damar sistemi	Tonik vazodilatasyon, damar duvarına hücre adezyonunun engellenmesi, trombosit aktivasyonunun inhibisyonu, ateroskleroz oluşumunun geciktirilmesi, anjiyogenez stimülasyonu
Beyin	Nörotransmisyon
Periferik sinir sistemi	Ağrı oluşumunun regülasyonu, barsak ve damarlarda nonadrenerjik, nonkolinerjik transmisyon
İmmun sistem	Sitotoksiste, immun hücre fonksiyonunun regülasyonu

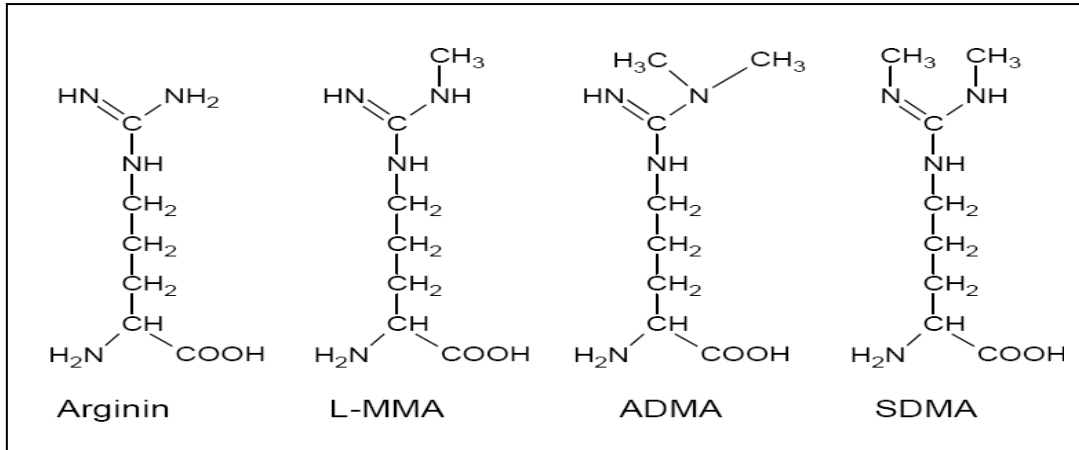


**Şekil 9. Nitrik oksitin önemli rolleri (50)**

## ASİMETRİK DİMETİLARGİNİN (ADMA)

Asimetrik dimetilarginin (ADMA) ilk olarak 1922 yılında Londra’da Patrick Vallance ve arkadaşları tarafından, insan plazma ve idrarında NOS’un endojen inhibitörü olarak tanımlanmıştır (51).

Asimetrik dimetilarginin translasyon sırasında proteinlerin yapısına giren arginin’in, postranslasyonel modifikasyonla metillenmesi esnasında sentezlenir. ADMA’nın yanı sıra simetrik dimetilarginin (SDMA) ve N-monometil L-arginin (L-NMMA) de sentezlenir (Şekil 10). Hepsi, protein arginin metil transferaz (PRMT) enzimi tarafından sentezlenir (Şekil 11). L-NMMA, NOS enzimini ADMA ile aynı güçte inhibe eder fakat plazma konsantrasyonu ADMA’dan 10 kat daha düşüktür. SDMA’nın plazma konsantrasyonu ADMA ile eşit seviyededir ancak NOS üzerine bir etkisi yoktur. ADMA, SDMA ve L-NMMA, PRMT enzimi tarafından sentezlenir. Bu enzim sistemi, S-adenozilmetiyoninden (SAM) bir metil grubunu S-adenozilhomosistein (SAH) oluşturmak üzere arginine transfer eder ve homosisteine hidrolize olur.



Şekil 10. Metilenmiş arginin türevleri (L-MMA, ADMA, SDMA).

### Asimetrik dimetilarginin sentez ve metabolizması

Asimetrik dimetilarginin sentezinde rol alan PRMT enziminin 2 farklı tipi tanımlanmıştır. Bunlar PRMT-1 (Protein Arginin Metiltransferaz-1) ve PRMT-2 (Protein Arginin Metiltransferaz-2) dir. PRMT-1 histon ve RNA binding proteini metiller ve ADMA ve L-NMMA oluşturur. PRMT-2 ise sadece miyelin basic proteini metiller ve SDMA ve L-NMMA oluşturur. ADMA ve L-NMMA, dimetilarginin dimetil aminohidrolaz (DDAH) ile

sitrülin ve dimetilamin ya da monometilamine indirgenir (Şekil 10). DDAH'ın 2 formu bulunmaktadır. DDAH-1 daha çok nNOS içeren dokularda, DDAH-2 ise eNOS ya da iNOS içeren dokularda bulunur. Biyokimyasal olarak DDAH'ın inhibisyonu ADMA'yı artırırken NO üretimini azaltmaktadır. DDAH başlıca, endotel hücreleri, beyin, pankreas gibi pek çok organda bulunur. ADMA metabolizmasından sorumlu başlıca organlar karaciğer ve böbreklerdir. ADMA, NOS'un üç üç formunun da kompetitif inhibitörüdür.

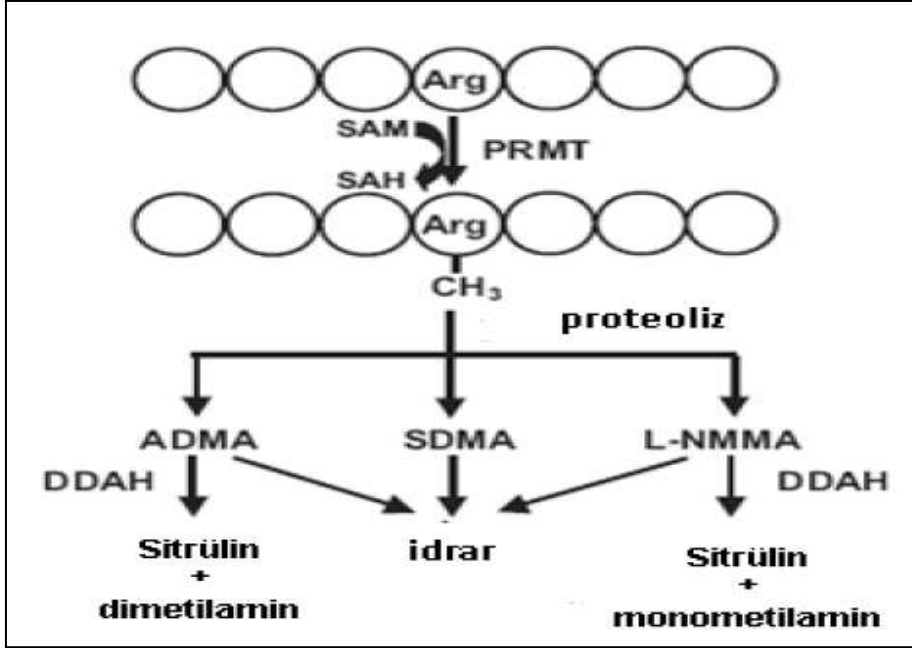
ADMA düzeylerindeki artışı 4 teorik mekanizmayla açıklayabiliriz

- PRMT tarafından artmış protein metilasyonu
- Bozulmuş renal atılım
- DDAH'ın bozulmuş metabolizması
- Uzamış proteoliz ve önceden oluşturulmuş metilarginin salınımı

Protein arginin metiltransferaz regülasyonu hakkında pek az şey bilinmektedir. Shear stresin PRMT ekspresyonunu ve aktivitesini artırdığı ve endotel hücrelerinde transkripsiyon faktörü nükleer faktör kappa-B'yi aktive ederek ADMA üretimini stimüle ettiği bilinmektedir. Shear stres, böbrek yetmezliği, koroner arter hastalığı, yüksek tuz içeren diyet gibi durumlarda ADMA düzeylerinde artışa sebep olabilir (52,53).

Asimetrik dimetilarginin birikimine öncülük eden mekanizma bozulmuş DDAH metabolizmasıdır. Pek çok çalışmada ADMA birikimi, azalmış DDAH aktivitesi ile birlikte bulunur. Sisteinden indirgenen sülfhidril (SH) grubu DDAH aktivitesi için önemlidir. Bu enzim de oksidatif strese duyarlıdır. Oksidatif stresin ADMA oluşumunu, endotel hücrelerinde artmış PRMT-1 ekspresyonuyla serbest oksijen türleri açığa çıkararak stimüle edebildiği açıklanmaktadır. Ayrıca DDAH inaktivasyonu, SH grubunun nitrozilasyonu, iNOS tarafından aşırı miktarda NO üretimi olduğunda meydana gelebilir. iNOS tarafından proinflamatuvar sitokinler oluşturulduğunda NO üretimi sınırlanabilir bu da ADMA birikimine sebep olabilir. DDAH aktivitesindeki artış ise NO sentezini daha da artırır bu da ADMA sentezinde azalmaya neden olur (54).

Asimetrik dimetilarginin'in endotel disfonksiyonu için yeni bir risk faktörü olabileceği ileri sürülmektedir. Ateroskleroz, konjestif kalp yetmezliği, hipertansiyon, preeklampsi, erektil disfonksiyon ve pek çok kardiyovasküler hastalıklarda plazma ADMA düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (55-59).



**Şekil 11. ADMA sentez ve metabolizması**

**Tablo 7. ADMA'nın yükseldiği durumlar**

1. Kardiyovasküler sistem hastalıkları (hipertansiyon, Hiperkolesterolemi v.b)
2. Diabetes mellitus
3. Multiple organ yetmezlikleri
4. Hipertroidizm
5. Kronik böbrek yetmezliği
6. İnsülin rezistansı ve metabolik sendrom
7. Preeklampsi
8. Erektile disfonksiyon

### **Diabetes mellitus ve ADMA**

Tip 1, Tip 2 ve gestasyonel diyabette ADMA'nın arttığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda diabetes mellitus'da bozulan nitrik oksit sentaz yolu incelenmiştir. Streptozotosinle indüklenen diyabetik ratlarda, plazma ADMA, diyabetik olan ratlardan daha yüksek bulunmuştur. Yüksek glukozaya maruz bırakılmış hücre kültürlerinde diyabetik ratlardaki DDAH aktivitesinin normalden daha yüksek olduğu, vasküler düz kas ve insan

endotelial hücrelerinde polietilen glikol ile kombine süperoksid dismutaz eklendiğinde DDAH aktivitesi ve ADMA birikiminin geri döndüğü gösterilmiştir (58).

### **Obesite ve ADMA**

Obesite, sigara gibi ciddi kardiyovasküler hastalık risk faktörleri ile plazma ADMA düzeyleri arasında ilişki gösterilmiştir. Gastroplastik cerrahi sonrası morbid obezlerde yapılan çalışmada kilo vermeden önce ve kontrollere göre plazma ADMA düzeyleri arasında kuvvetli ilişki gösterilmiştir. Yüksek karbonhidratlı diyet ve alkol alan gruba göre plazma ADMA düzeyleri düşük bulunmuştur (59).

### **Periferel arteriyel hastalık ve ADMA**

Periferel arteriyel hastalık ve kronik hiperhomosisteinemili hastalarda endotel disfonksiyonunda ADMA'nın potansiyel rolünün araştırıldığı bir çalışmada, ADMA, total kolesterol, diabetes mellitus, sigara, sistolik kan basıncı arasındaki ilişki bulunmuştur. Ayrıca akım bağımlı dilatasyon ile regresyonu yapıldığında anlamlı ilişki bulunmuştur. ACE inhibitörleri ve anjiyotensin reseptör blokörlerinin ADMA ve arginin/ADMA oranını azalttığı gösterilmiştir (60).

### **Böbrek yetmezliği ve ADMA**

Yapılan çalışmalarda böbrek yetmezliği olan hastalarda plazma ADMA düzeylerinin arttığı görülmüştür, ancak bu artışın kardiyovasküler olay gelişimi ile pozitif ilişkili olmadığı düşünülmüştür. Ayrıca ADMA'nın C-reaktif protein ve beta-natriüretik peptit ile birlikte aterosklerotik komplikasyonların önlenmesi ve saptanmasında kullanılabileceği düşünülmüştür (52).

### **Yaşlılar ve ADMA**

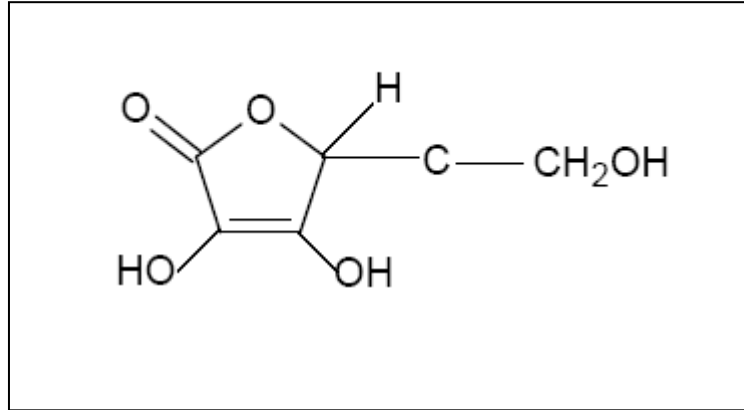
Yaşlılarla ilgili, aterosklerotik hastalıkların ciddiyeti ile ADMA arasında bir ilişki gösterilemese de, artmış kardiyovasküler mortalite ile ilişkisi gösterilmiştir. Yaşlanmanın renal hemodinamiklerin değişimine eşlik ettiği post glomerüler damarların zayıflaması ile renovasküler tonusunun artışı sonucu, yaşlılarda NO'nun azalması kan basıncı artışı ve renovasküler dirence neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda yaşlanan bireylerde ADMA'nın arttığı gösterilmiştir (61).

## VİTAMİN C (ASKORBİK ASİT)

Askorbik asit, suda çözünen vitaminler arasında yer alır. Kimyasal yapı bakımından gulonik asidin endiol laktonudur. Suda çözünen vitaminler arasında en az stabil olma özelliğine sahiptir ve özellikle ısıya karşı dayanıksızdır (62).

Askorbik asit memelilerde karaciğerde glukronik asit üzerinden sentezlenir. İnsanlarda sentezi yoktur. Çünkü C vitamini sentezinde görevli alfa gulonolakton enzimi insanlarda bulunmamaktadır. Diğer primatlarda ve kobaylarda da esansiyeldir. Askorbik asit ince bağırsaklardan kolayca emilir. Hücre zarını geçmesi lipide çözünebilir dehidroaskorbik asit şeklinde olur. Dehidroaskorbik asit hücre içine girdikten sonra askorbik asit şekline indirgenir.

İnsanda kan plazmasındaki askorbik asit oranı %1 mg kadardır. Eğer fazla miktarda askorbik asit alınırsa %1.5 mg olan böbrek eşiğini aşabilir. Oral yolla 9 g askorbik asit alınmasından sonra idrarla atılan oksalik asit iki katına çıkar. Askorbik asit insanda oksalata çevrilebilir ve idrarla atılan oksalatın kalsiyum tuzu böbrek taşları oluşturabilir.



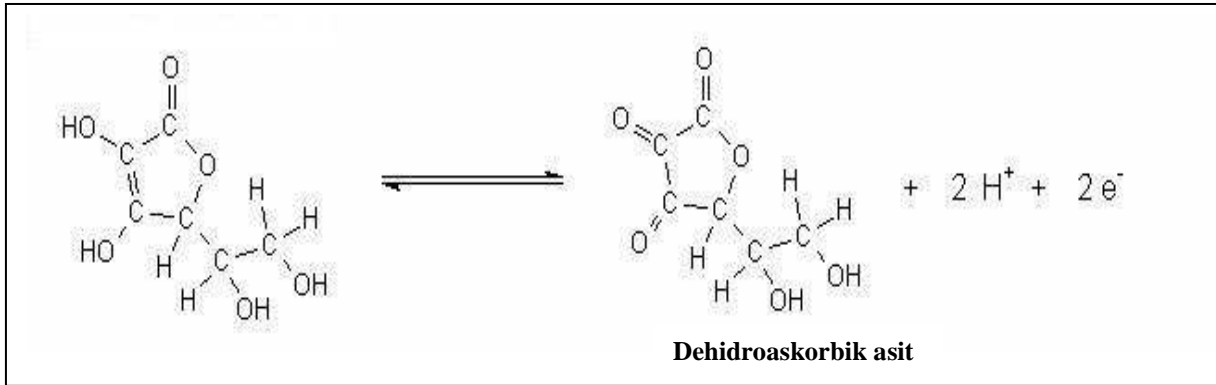
**Şekil 12. Askorbik Asidin kimyasal yapısı**

Askorbik asit, demirin ince barsaklardan emilimini ve depolardan mobilizasyonunu artırır. Glukozdan glikojen oluşumunda önemli rol oyandığı bildirilmiştir. Ayrıca antienfeksiyöz etkisinden de söz edilmektedir. İnsanlarda günlük askorbik asit ihtiyacının 30-40 mg olduğu kabul edilmektedir. En önemli askorbik asit kaynakları; yeşil sebzeler turunçgiller ve domatestir. Eksikliğinde skorbüt hastalığı meydana gelebilir. Bu hastalık yaralar, süngerimsi diş etleri, diş kaybı, kan damarlarının kolayca zedelenmesi ve anemiyle karakterizedir. Bu belirtilerin çoğu bağ dokusunda zayıflıkla sonuçlanan kollajenin hidroksilasyonundaki eksiklikle açıklanabilir.



C vitamini, antioksidanlar olarak bilinen ve E vitamini ve beta karoteni içeren bir grubun üyesidir. Bu bileşiklerin besinlerle fazla alınması, koroner kalp hastalığı ve bazı kanserler gibi kronik hastalıkların görülme sıklığını azaltır. Vitamin C, E ve beta karoten'in başlıca kimyasal özellikleri, toksik oksijen serbest radikallerini inaktive etme yetenekleridir. Serbest radikallerin lipid membranlara, proteinlere ve hücre DNA'sına zarar verdiği bilinmektedir. Ayrıca serbest radikallerin kanserde, akciğer ve kalp hastalıklarında ve yaşlılıkta rol aldığı düşünülmektedir. Askorbik asidin toksisitesi gözlenmemiştir. Fakat askorbik asidin okside olmuş şekli olan dehidroaskorbik asit toksik etkiye sahiptir. Bu sebeple yüksek dozda C vitamini alınması, dehidroaskorbata askorbata tekrar okside eden enzim sisteminde eksiklik olan kişilerde, dehidroaskorbikasit birikimine yol açabilir.

Askorbik asidin katıldığı biyokimyasal reaksiyonlar; kollajen sentezi, tirozinin yıkılımı, tirozinden epinefrin sentezi, safra asidi sentezi, adrenal korteks steroidlerinin sentezi, demirin barsaklardan absorpsiyonu, sindirim esnasında nitrozamin oluşumunun önlenmesidir.



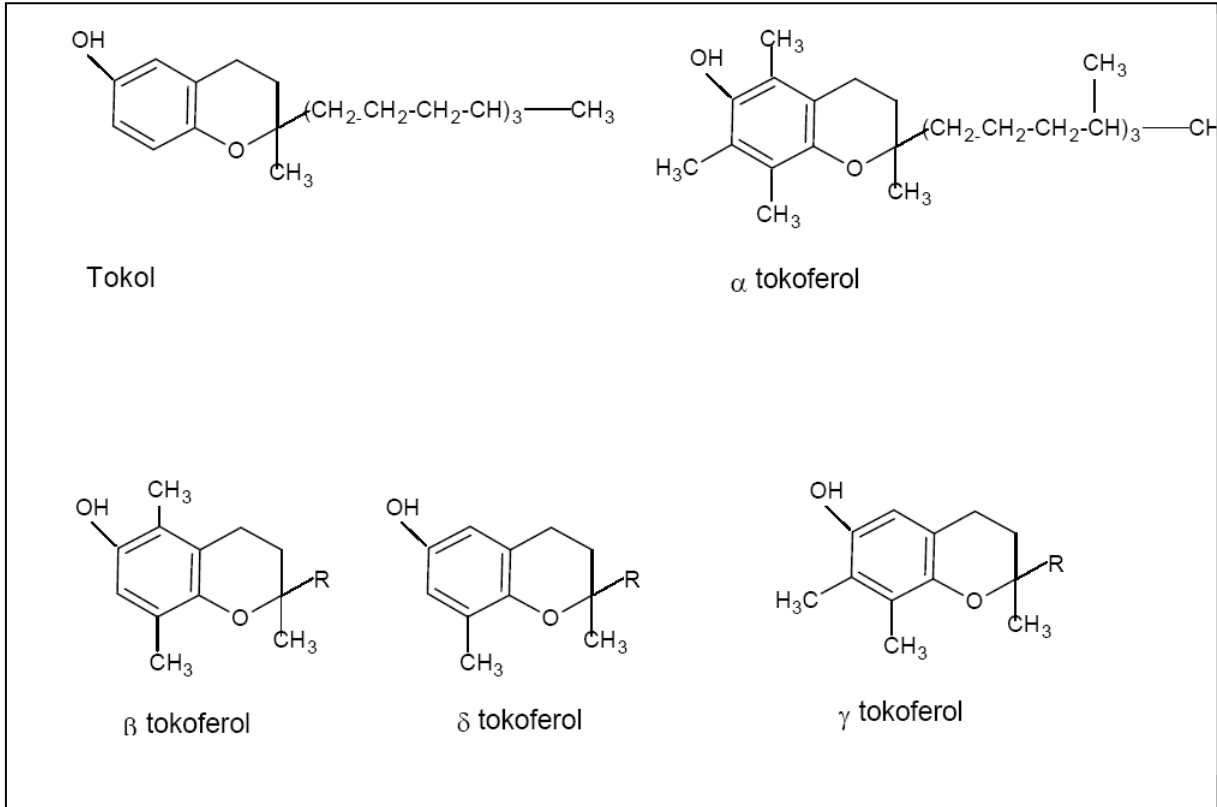
**Şekil 13. Dehidroaskorbik asidin kimyasal yapısı**

## VİTAMİN E

Doğal olarak bulunan, E vitamini olarak adlandırılan 8 farklı tokoferolden biyolojik olarak aktif olanı  $\alpha$ -tokoferoldür. Vitamin E'nin başlıca fonksiyonu, hücre bileşenlerinin moleküler oksijen ve serbest radikaller tarafından enzimatik olmayan oksidasyonundan korumada bir antioksidan olmasıdır (62).

Tokoferoller sarımsı yağlardır; suda çözünmezler, yağda çözünürler, oksitlenmeye karşı duyarlıdırlar, oksijensiz ısıya 200 °C'ye kadar dayanırlar, UV ışıktta yıkılırlar. Çeşitli tokoferollerin biyolojik etkinlikleri arasında farklar bulunmaktadır. Doğada en yaygın olarak bulunan ve en büyük biyolojik aktiviteye sahip olan tokoferol,  $\alpha$ -tokoferoldür. Tokoferoller, yağda çözünen vitaminler olarak lipidlerle birlikte dışarıdan besinlerle alınırlar.  $\alpha$ -tokoferol

ince barsaktan kolayca emilir, şilomikronlar içinde karaciğere ve buradan periferik dokulara lipoproteinler içinde taşınır. Bitkisel yağlar vitamin E'den zengindir. Karaciğer ve yumurta orta derecede E vitamini içerir.  $\alpha$ -tokoferol için önerilen günlük gereksinim erkeklerde 10 mg, kadınlarda 8 mg'dır. Çoklu doymamış yağ asidi alımı arttığında E vitamini gereksinimi de artar.



#### Şekil 14. Tokoferollerin kimyasal yapıları

Vitamin E eksikliği hemen hemen tamamen prematür yeni doğan bebeklere özgüdür. Yetişkinlerde genellikle kusurlu lipid emilimi ve taşınmasıyla birlikte. İnsanlarda E vitamini eksikliği belirtileri, eritrositlerin peroksitlere karşı duyarlılığı ve anormal hücre membranlarının oluşmasıdır. E vitamini kalp hastalığı gelişmesine karşı koruyucu etki gösteriyor gibi görünmektedir. İki yıldan daha uzun süre günde 400 IU vitamin E takviyesi en fazla korumayı sağlar. Takviye yapılmayanlarla kıyaslandığında kalp krizi sıklığında %40 azalma gözlenmektedir. E vitamininin antioksidan fonksiyonu, LDL oksidasyonunu engellemektedir. Okside LDL'nin kalp hastalığını ilerlettiği düşünülmektedir. Vitamin E, Vitamin C ve beta karoten, birlikte katarakt başlangıcını geciktirmede işlev görmektedir.

Vitamin E, yağda çözünen vitaminlerin en az toksik olanıdır. 300 mg/gün dozlarda toksisite gözlenmemiştir.

### **Vitamin C ve vitamin E'nin kanser üzerine etkileri**

C ve E vitaminleri antioksidan etki gösteren vitaminlerdir, özellikle vitamin E güçlü bir antioksidan madde olarak öne çıkmaktadır (63,64). Karbontetraklorür, etanol, trikloretilen, metanol (65), krom ve kromat gibi pek çok çevresel zararlı maddenin hücre üzerinde oluşturduğu kromozom hasarı ve diğer lezyonların önlenmesinde,  $\alpha$ -tokoferol bir antioksidan olarak etkilidir (66).

C ve E vitaminlerinin kanseri önlemedeki rolü halen tartışmalı olsa da, hayvan ve insanlarda yapılan birçok çalışma, tokoferollerin deri (67), mide, mesane, kolon, karaciğer (68), akciğer (69), meme ve prostat (70) kanseri gibi deneysel olarak oluşturulan veya spontan meydana gelen tümörlerin gelişmesini geciktirici, hatta iyileştirici bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Henning ve ark (71) oksidatif stres oluşturulan ratlarda kanser gelişimi ve başta  $\alpha$ -tokoferol olmak üzere tüm antioksidanlarda yetmezlik gözlediklerini bildirmişlerdir. Squali Houssaini ve arkadaşlarına (72) göre, özellikle  $\alpha$ -tokoferolün antioksidan aktivitesi kanserle negatif korelasyon göstermektedir. Kanserli organizmalarda azalan antioksidan kapasite, kansere bağlı olarak bozulan metabolizma, periferik beslenme düzensizliği ve inflamasyon işlevleriyle ilişkilendirilmektedir.

Epidemiyolojik çalışmalarda diyetdeki C vitamini ile kanser riski arasında ters bir ilişki gösterilmiştir (73). Yapılan bir çalışmada askorbik asidin, akciğer kanserlerinde kemoterapötik ajanlara karşı kazanılmış direnci değiştirebildiği bildirilmiştir (74). Farelerde yapılan deneysel çalışmalarda apex heterozigot mutant hücrelerin oksidatif stres artışına anormal sensitif olduğu ve serumdaki oksidatif stres belirteçlerinin yükseldiği ve antioksidan verilmesiyle bu düzeylerin normale indiği gözlenmiştir (75).

### **Vitamin C ve vitamin E'nin plazma ADMA düzeyleri üzerine etkileri**

Antioksidan ajanlar ADMA yıkılımını hızlandırmaktadır. Medikal tedavide ADMA'yı azaltan ajanlar olarak; L-arginin, folik asit, vitamin B<sub>6</sub> ve B<sub>12</sub> kullanılmaktadır (76). Ayrıca oksidan stresi azaltan egzersiz gibi diğer durumların da ADMA'yı azalttığı düşünülmektedir. Sıçanlarda, E vitamini ile yapılan ön tedavi (100 mg/gün 5 gün süreyle), LDL enjeksiyonuyla oluşturulan ADMA düzeylerinin artışını önlemektedir.

Yapılan bir çalışmada ise E vitamininin kronik renal yetmezliği olan hastalarda ADMA düzeyini anlamlı olarak düşürdüğü bulunmuştur (77).

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma; yerel etik kurul onayı alındıktan sonra (Ek 1) Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

### **Deneklerin Özellikleri ve Çalışma Gruplarına Ayrılması**

Çalışmada toplam 50 adet, 8–10 haftalık (25 g), erkek Balb/c albino fare kullanılmıştır. Bu fareler Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarından temin edildi. Denekler rastgele seçilerek, 10'ar fareden oluşan beş grup oluşturuldu. Tüm fareler deneyin sonuna kadar ayrı kafeslerde, %50-60 nem oranı, 22±1 °C ısıda, 12 saat gece-12 saat gündüz ışık periyodu olan ortamda tutuldu. Beş gruba da standart fare yemi günlük olarak verildi. C vitamini tedavi grubunda 10. ve 11. günde ölen, E vitamini tedavi grubunda 14. ve 16. günde ölen, C+E vitamini tedavi grubunda 3. ve 14. günde ölen ve tümör kontrol grubunda 14. ve 15. günde ölen fareler çalışma dışı bırakılmıştır.

Meme kanseri oluşturulacak olan grup 2, 3, 4 ve 5'deki farelerin sol ayak iç bölgesine 0.2 ml Erhlich asit tümör hücresi enjekte edildi. 7. günde tümör çapı yaklaşık olarak 1 cm olduğunda gruplara göre serum fizyolojik, C vitamini, E vitamini yada C+E vitamini intraperitoneal olarak verilmeye başlandı.

1. Grup (n=10): Sağlıklı kontrol grubu olarak kabul edildi. Bu gruba 15 gün boyunca her hangi bir tedavi uygulanmadı.

2. Grup (n=8): Meme kanseri kontrol grubu olarak kabul edildi. Bu gruba 15 gün boyunca hergün aynı saatte 0.2 ml intraperitoneal olarak serum fizyolojik enjekte edildi.

3. Grup (n=8): Meme kanseri + C vitamini tedavi grubu olarak kabul edildi. 15 gün boyunca hergün aynı saatte 200 mg/kg/gün intraperitoneal olarak C vitamini enjekte edildi.

4. Grup (n=8): Meme kanseri + E vitamini tedavi grubu olarak kabul edildi. 15 gün boyunca hergün aynı saatte 300 mg/kg/gün intraperitoneal olarak E vitamini enjekte edildi.

5. Grup (n=8): Meme kanseri + C + E vitamini tedavi grubu olarak kabul edildi. 15 gün boyunca hergün aynı saatte 200 mg/kg/gün C vitamini ve 300 mg/kg/gün E vitamini intraperitoneal olarak enjekte edildi.

Deney hayvanlarından intrakardiyak kan alındı ve kanser dokusu çıkarıldı. Sakrifikasyon öncesi, ksilazin (10 mg/kg), ketamin (60 mg/kg) im olarak anestezi amaçlı verildi. Alınan kanların plazmaları ayrıldı ve -80 °C’de deneyin yapılacağı güne kadar saklandı. Daha sonra meme tümör dokuları çıkarıldı ve % 0.9’luk soğuk serum fizyolojik ile yıkanıp -80 °C’de deneyin yapılacağı güne kadar saklandı.

### **Kullanılan Kimyasal Malzemeler**

Amonyak	(Merck&Co., Inc., Darmstadt, Almanya)
Asimetrik dimetilarginin	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seenheim, Almanya)
Asetonitril	(Merck&Co., Inc., Darmstadt, Almanya)
Homoarginin	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seenheim, Almanya)
3-Merkaptopropionik asit	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seenheim, Almanya)
Metanol	(Merck&Co., Inc., Darmstadt, Almanya)
Monometilarginin	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seenheim, Almanya)
Ortofitaldialdehit	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seenheim, Almanya)
Simetrik dimetilarginin	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seenheim, Almanya)
Sodyum asetat	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seenheim, Almanya)

### **Alet ve Malzemeler**

Cam malzemeler	: Deney tüpleri, balon jojeler, beherler v.b.	
Distile su cihazı	: Millipore	(France)
Elektronik tartı	: Metler PE 200	(Zurich)
Guard kolon	: Waters 3.9x20 mm	(ABD)
Homojenizatör	: DIAX 900	(ABD)
HPLC cihazı	: Waters 2690 Alliance, Separations Module	(ABD)
Manyetik karıştırıcı	: DAIHAN Scientific	(Almanya)
Otomatik pipetler	: Finnpiette, Eppendorf	
pH metre	: pH level 1	(Inolab WTW, Weilheim-Almanya)

Soğutmalı santrifüj	: Multifuge 3 S-R Heraeus	(Almanya)
Su banyosu	: GFL 1083	(Almanya)
UV detektör	: Waters 2487 dual $\lambda$ absorbance detector	(ABD)
Vorteks	: Elektro-mag M-16	(Türkiye)

### **Doku Örneklerinin Homojenize Edilmesi**

Tüm gruplardan elde edilen meme tümör dokularının homojenizasyonunda PBS (Phosphate Buffered Saline) kullanıldı. Derin dondurucudan çıkarılan dokular DIAX 900 model oto homojenizatör kullanılarak ağırlıklarının 4 katı soğuk PBS (pH: 7) ile homojenize edildi. Homojenize edilen doku örnekleri 5000xg'de 4°C'de 20 dakika süre ile santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi.

### **YÖNTEMLER**

#### **Meme Dokusu Protein Düzeyinin Lowry Yöntemi İle Ölçülmesi**

Doku protein düzeyleri Lowry yöntemi ile saptandı. Bu yöntem alkali bakır tartarat ayırıcının peptit bağları ile kompleks yapması prensibine dayanmaktadır. Fenol ayırıcı; alkali bakır tartarat ayırıcı ile muamele edilmiş karışıma ilave edildiğinde mavi-mor renk oluşur. Bu rengin şiddeti 660 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür.

#### **Gerekli Ayıraçlar**

Fenol ayırıcı: 2N folin ayırıcından 2.5 ml alınarak distile su ile 45 ml'ye tamamlanır. Bu ayıraç her kullanım için taze olarak hazırlanmalıdır.

Alkali bakır tartarat ayırıcı: 10 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.25 g Na-K tartarat, 0.05 g CuSO<sub>4</sub>; ayrı ayrı tartılarak 0.5 N NaOH çözeltisi içinde balon jodede çözülür ve çözelti 0.5 N NaOH çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlanır. Bu çözelti 4°C'de 1 ay saklanabilir.

%5 mg'lık Albümin standartı: %5 mg'lık albümin standartı hazırlamak için mevcut 5g/dl'lik albümin standartı kullanılmıştır. Albümin solüsyonundan 0.1 ml alınarak ve distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak %5 mg'lık albümin standart çözeltisi elde edilmiş olur. Deneyde kullanılacak standart protein konsantrasyonu %2 mg olarak, stok protein standart çözeltisinin sulandırılması ile elde edilir.

#### **İşlemler**

Doku süpernatantları 1/10 oranında serum fizyolojik ile sulandırılıp vorteks yardımı ile iyice karıştırılarak protein ölçümü için elverişli hale getirildi. Numaralandırılmış deney, kör ve standart tüpleri hazırlandı. Deney tüpüne 1/10 oranında sulandırılmış olan

süpernatanttan 0.25 ml, standart tüpüne %2 mg'lık standart çözeltisinden 0.25 ml ve kör tüpüne de 0.25 ml distile su konuldu. Ardından her tüpe 0.25 ml alkali bakır ayırıcı ilave edildi. Oda ısısında 10 dakika bekletildikten sonra her tüpe 1 ml fenol ayırıcı eklendi ve tekrar vortekslendi. 30 dakika 37 °C'de su banyosunda bekletildikten sonra; tüplerin köre karşı absorpsanları 660 nm dalga boyunda spektrofotometre ile okundu.

### Protein Düzeyinin Hesaplanması

Deneyde ölçülen absorpsan değerleri daha sonra aşağıdaki formülde yerine konarak protein düzeyi hesaplandı.

$$\text{Protein miktarı (\% mg protein)} = \frac{\text{Deney absorpsansı} \times 10 \times 2 \times 2}{\text{Standart protein çözeltisi absorpsansı}}$$

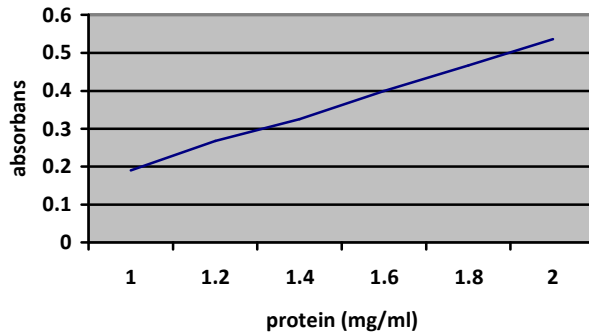
10 : Süpernatantın serum fizyolojik ile sulandırılma katsayısı

2 : Süpernatantın 1 ml'ye tamamlanma katsayısı

2 : Protein standart çözeltisinin konsantrasyonu

0.536 : Standart protein çözeltisi absorpsansı

Protein miktarı (% mg protein) = Deney Absorpsansı x 74.62 olarak formüle edilmiştir. Elde edilen % mg protein, 100 ml'deki protein değeridir. Sonuç 100'e bölünerek protein miktarı mg/ml olarak hesaplandı.



Şekil 15. Protein standart çalışması regresyon grafiği

### HPLC yöntemi ile ADMA ölçümü

ADMA, HPLC yöntemi ile Teerlink tarafından geliştirilen bir metod ile ölçüldü (78).



**Ekipman:** ADMA düzeyleri Waters Alliance 2690 XE Separation Module ve Model 474 fluorescence dedektör ve Millennium 32 Software kullanılarak ölçüldü. Örneklere katı faz ekstraksiyonu (20 kolon kapasiteli vakum manifoldlu SPE, Waters) uygulandı.

### **Solüsyonlar**

Arginin: (MA: 174.20 g), 174 mg arginin 10ml HCl (10 mM) içinde çözündürüldü ve 100 mM stok çözelti elde edildi. Bu çözelti 1:100 dilüe edilerek 1 mM'lük çözelti elde edildi.

Homoarginin: (MA: 224.69 g), 225 mg homoarginin 10 ml HCl (10 mM) içinde çözündürüldü ve 100 mM stok çözelti elde edildi. Bu solüsyon 1:100 dilüe edilerek 1 mM'lük çözelti elde edildi.

ADMA: (MA: 275.18 g), 50 mg ADMA 18.17 ml HCl (10 mM) içinde çözündürüldü ve 10 mM stok çözelti elde edildi. Bu çözelti 10 kez dilüe edilerek 1 mM'lük çözelti elde edildi.

SDMA: (MA: 758.82 g), 25 mg SDMA 33 ml HCl (10 mM) içinde çözündürüldü ve 1mM stok çözelti elde edildi.

MMA: (MA: 248.28 g), 5 mg MMA 20.1 ml HCl (10 mM) içinde çözüldü, 1 mM stok çözelti elde edildi. Stok çözüldüden 50 adet eppendorf tüpüne her birine 50 mikrolitre alınarak pipetlendi, kalanı (17.5 ml) bir tüp içinde saklandı (Her yığın çalışmada 1 eppendorf alınıp üzerine 1200 mikrolitre PBS eklenerek 40 µM final konsantrasyon elde edildi, artan solüsyon saklanmadı; hergün taze hazırlandı).

PBS: 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 9 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 137 mM NaCl hazırlandı. pH değeri, 1M NaOH ve HCl ile 7'ye ayarlandı.

Potasyum Borat Buffer: 200 mM konsantrasyonda 50 ml borik asit içinde hazırlandı. 3 M KOH eklenerek pH 9.5'e getirildi ve 100 ml'ye tamamlandı.

OPA Stok (Derivatizasyon Reageni): (MA: 134.13 g), 10 mg orto-ftaldialdehid (OPA) 0.2 ml metanol içinde çözündürüldü. 1.8 ml 200 mM Potasyum Borat Buffer (pH:9.5) eklendi. Daha sonra 10 µl 3-merkaptopropionik asit eklendi. Böylece 0.2 ml'de 10 mg OPA içeren stok solüsyon elde edildi.

OPA Çözeltisi : OPA stok türevlendirmeden hemen önce borat buffer ile 5 kez dilüe edildi ve böylece OPA final solüsyonu elde edilmiş oldu. Solüsyon 48 saat içinde kullanıldı.

Mobil Faz A: 6.8 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 980 ml suda çözündürüldü. 3 M KOH ile pH 6.5'e ayarlandı, filtreden süzülerek ve hacim 1 L'ye tamamlandı. Hazırlanan tampona 95.3 ml asetonitril eklendi ve ultrasonik banyoda 30 dakika bekletildi.

**Mobil Faz B:** Su ve asetonitrilin hacimce yarı yarıya (50/50) karıştırılmasıyla elde edildi.

**Kromatografi:** Ayırım için Symmetry C<sub>18</sub> kolon (3.9 x 150 mm; 5µm partikül büyüklüğü; 100 Å pore büyüklüğü) ve 3.9 x 20 mm Sentry Symmetry C<sub>18</sub> guard kolon kullanıldı. Mobil faz A %8.7 asetonitril içeren 50 mM potasyum fosfat tampon (pH: 6.5); mobil faz B ise asetonitril/su (50/50, v/v) olarak, seperasyon izokratik koşullarda, %100 mobil faz A ile, 1.1 ml/dak hız ve 30 °C kolon sıcaklığı değerlerinde yapıldı. Son analitin çıkışından sonra güçlü bir şekilde retansiyona uğrayan bileşikler güçlü solvent akımı (%50 B mobil faz, 20-22 dakikalar arası) ile elüe edildi, 22. ve 23. dakikalar arasında gradient başlangıç değerlerine döndürülerek kolon 7 dakika daha dengelenmeye bırakıldı. Böylece her bir örnek için toplam çalışma süresi 30 dakika olarak gerçekleşti. Enjeksiyon hacmi 20µl olarak uygulandı. Floresans eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 340 ve 455 nm olarak ayarlandı. Elde edilen pikler, pik alanlarına göre değerlendirildi.

**Kalibrasyon:** Metod validasyonu için kalibrasyon 9 kombine kalibrasyon standardı kullanılarak (konsantrasyon aralığı arjinin için 1-200 µM; ADMA, SDMA için 0.1-20 µM) yapıldı. İnternal standardın eklenmesinden sonra standartlara SPE, derivatizasyon ve kromatografi uygulanarak bunlara ait pikler alındı. Plazma örneklerinin ölçümü için 100 µM arjinin ve 10 µM homoarjinin, ADMA ve SDMA ile tek-nokta kalibrasyonu yapıldı.

**Tablo 8. Mobil faz gradient tablosu**

Zaman (dakika)	Akış hızı (ml/dk)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0	1.1	100	0
18 <sup>a</sup>	1.1	100	0
19	1.1	50	50
22	1.1	50	50
23	1.1	100	0
30 <sup>b</sup>	1.1	100	0
35	1.1	100	0
36	1.1	0	100
50	1.1	0	100

<sup>a</sup>18-23. dakikalar arasında güçlü solvent akışı, kalan bileşiklerin çıkarılması için kullanıldı. <sup>b</sup>30. dakikada bir sonraki enjeksiyona geçildi. Tüm analizler yapıldıktan sonra kolonu temizlemek için 30. dakikadan sonraki kısım uygulandı.

### **Örnek Saflaştırma ve Türevlendirme**

0.2 ml örnek (veya standart) + 0.1 ml internal Standart 4 + 0.7 ml PBS cam tüpe konuldu ve vortekslendi. Oasis MCX SPE (vakum altında, 1 ml/dak hızda) den geçirildi. Daha sonra sırasıyla 1 ml 100 mM HCl ve 1 ml metanol Oasis MCX SPE'den geçirildi ve atıldı. Daha sonra temiz tüpler konuldu ve 1 ml konsantre amonyak/su/metanol (10/40/50) karışımı Oasis MCX SPE'den geçirildi. Tüpteki solvent 60-80 °C sıcaklıkta nitrojen ile uçuruldu. Sonra 0.1 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (200 mM) eklenerek vortekslendi. Son olarak 0.1 ml OPA reaktifi konularak vorteksleme işlemi tekrarlandı. 3 dakika beklenerek tekrar vortekslendi ve örnekler viyallere konup HPLC kompartmanına yerleştirildi (4 °C).

### **İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME**

Çalışmamızda sağlanan verilerin istatistiksel analizi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'na kayıtlı STATISTICA 7.0 (Lisans no: 31N6YUCV38) istatistiksel paket programı kullanılarak yapıldı.

Tümör kontrol ve tedavi grupları arasındaki Arginin, ADMA ve SDMA düzeyleri arasındaki farklılıklar nonparametrik bir test olan, Mann Whitney-U testi ile değerlendirildi. Elde edilen 'p' değerleri 0.05'den küçük olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

Çalışmamızda tümör ve tedavi gruplarındaki farelerin plazma meme kanseri dokusundaki arginin, ADMA ve SDMA düzeyleri araştırıldı. Grupların arginin, ADMA ve SDMA düzeyleri, ortalama ve standart sapma değerleri ile birlikte Tablo 9,12,13 ve Şekil 18-22’de gösterilmiştir.

**Tablo 9. Plazma ve doku ortalama arginin, ADMA, SDMA düzeyleri (ort±std)**

GRUP	Arginin µmol/L	ADMA µmol/L	SDMA µmol/L	Arginin µmol/mg pr.	ADMA µmol/mg pr.	SDMA µmol/mg pr.
	Plazma			Doku		
<b>Kontrol</b>	100±42.2	0.97±0.2	0.21±0.05			
<b>Tümör</b>	52.2±22.8	1.38±1.2	0.45±0.49	6.2 ±2.6	1.54±0.78	0.25±0.12
<b>C vit</b>	48.4±23.7	1.23±0.3	0.36±0.09	6.4±1.3	2.15±0.65	0.32±0.10
<b>E vit</b>	53.0±19.4	1.11±0.2	0.30±0.06	7.9±6.7	2.12±0.78	0.29±0.10
<b>C+E vit</b>	35.9±19.0	1.12±0.2	0.31±0.07	6.7±2.8	1.73±0.53	0.27±0.09

**Tablo 10. Plazma arginin, ADMA ve SDMA değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması**

GRUPLAR	Arginin		ADMA		SDMA	
	z	p	z	p	z	P
<b>Kontrol/Kanser</b>	-2.557	0.009	-0.089	0.965	-2.357	0.016
<b>Kanser/C vit</b>	-0.420	0.721	-0.840	0.442	-1.050	0.328
<b>Kanser/E vit</b>	-0.105	0.959	-0.735	0.505	-0.158	0.878
<b>Kanser/C+E vit</b>	-1.680	0.105	-0.840	0.442	-0.630	0.574

Meme kanseri oluşturulan grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, plazma arginin düzeylerin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düştüğü saptandı. SDMA düzeyleri ise kanser oluşturulan grupta anlamlı olarak yüksek bulundu. Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 10).

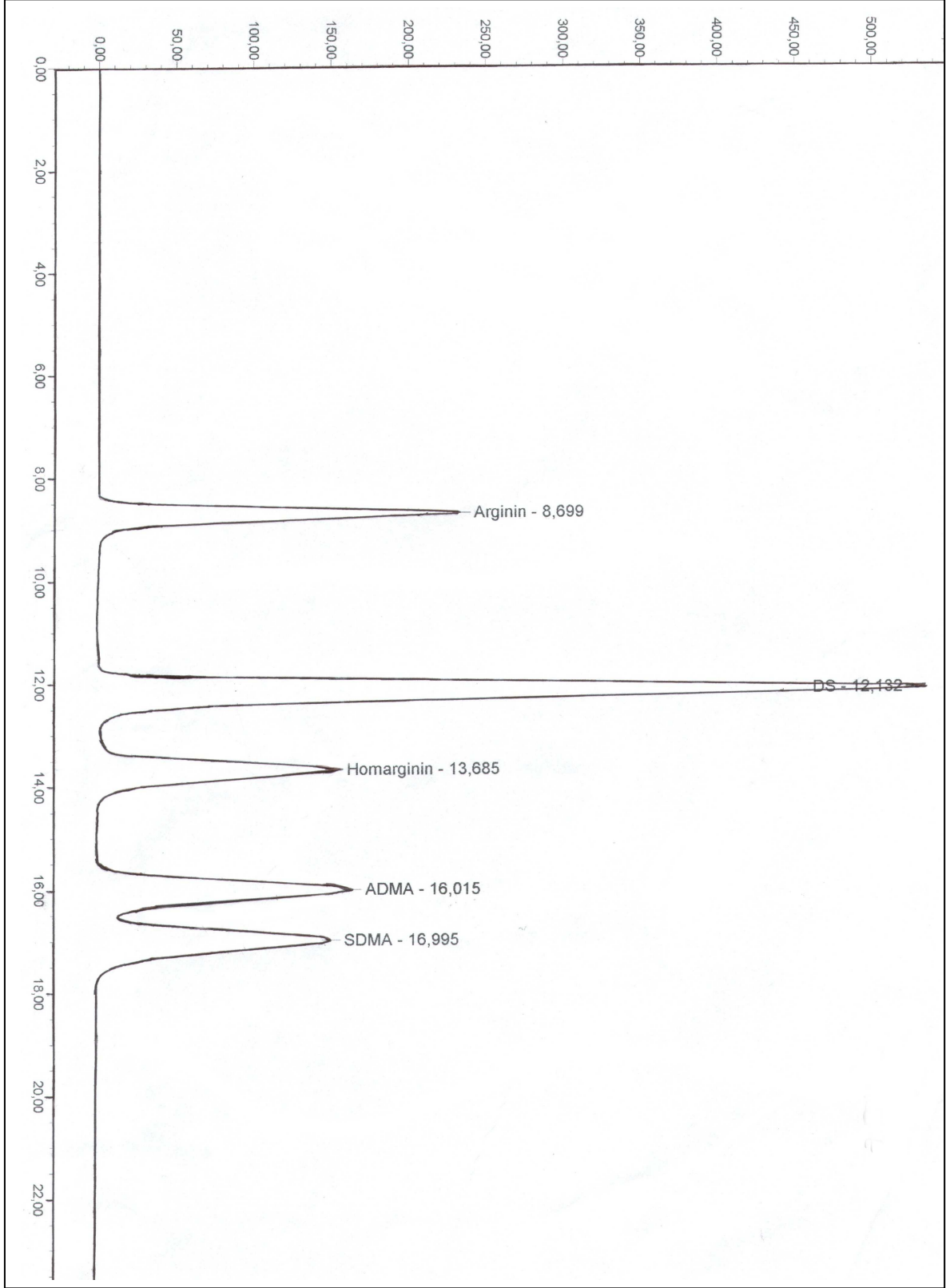
**Tablo 11. Doku arginin, ADMA ve SDMA değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması**

GRUPLAR	Arginin		ADMA		SDMA	
	z	p	z	p	z	P
<b>Kanser/C vit</b>	-0.420	0.721	-1.365	0.195	-1.470	0.161
<b>Kanser/E vit</b>	-0.105	0.959	-1.050	0.328	-0.631	0.574
<b>Kanser/C+E vit</b>	-0.525	0.645	-0.525	0.645	-0.420	0.721

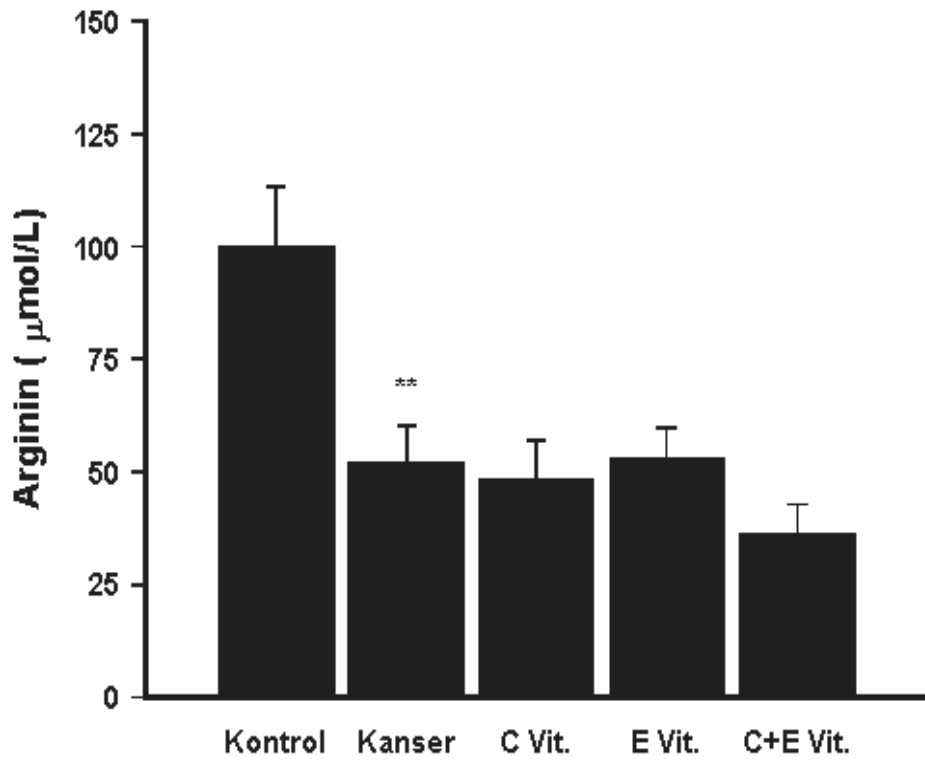
Gruplar arası doku arginin, ADMA ve SDMA düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunamadı (Tablo 11).

Arginin, internal standart, ADMA ve SDMA standartları verildiğinde alınan tipik kalibrasyon eğrisi Şekil 16'da gösterilmiştir. Diğer yandan gruplara ait bireysel veriler Tablo 12 ve 13'de gösterilmiştir.

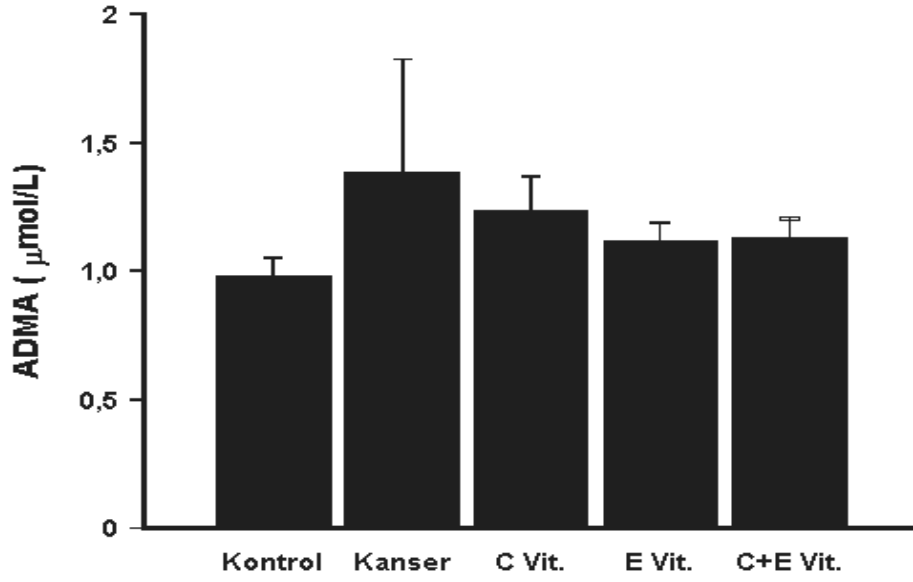
## Floresans



Şekil 16. Arginin, ADMA ve SDMA için standart HPLC grafiği

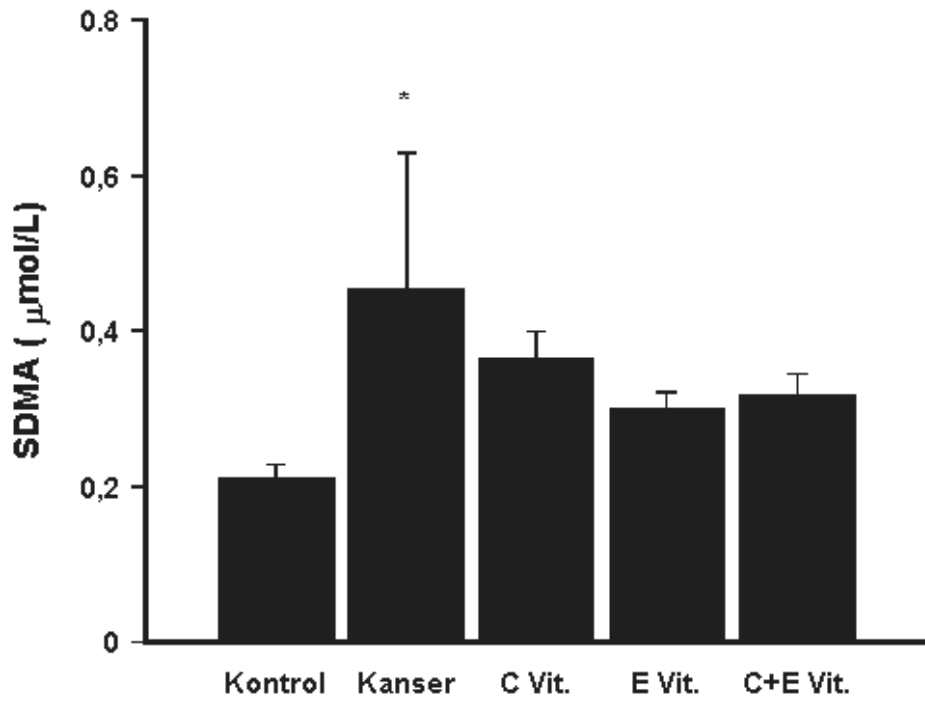


Şekil 17. Plazma arginin düzeyleri. Hata çizgileri mean±SEM'i ifade etmektedir.  
\*\*p<0.01

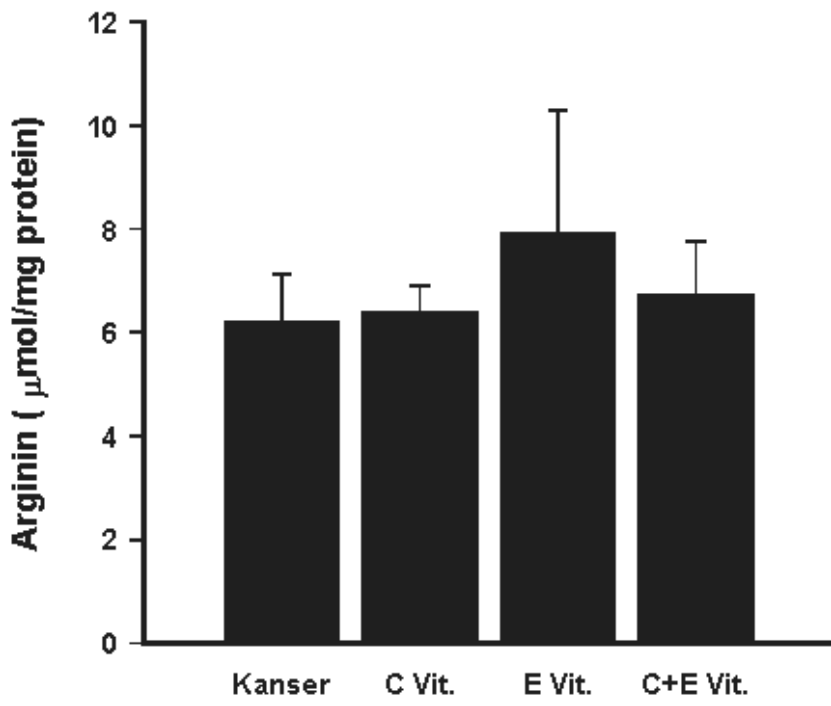


Şekil 18. Plazma ADMA düzeyleri. Hata çizgileri mean±SEM'i ifade etmektedir

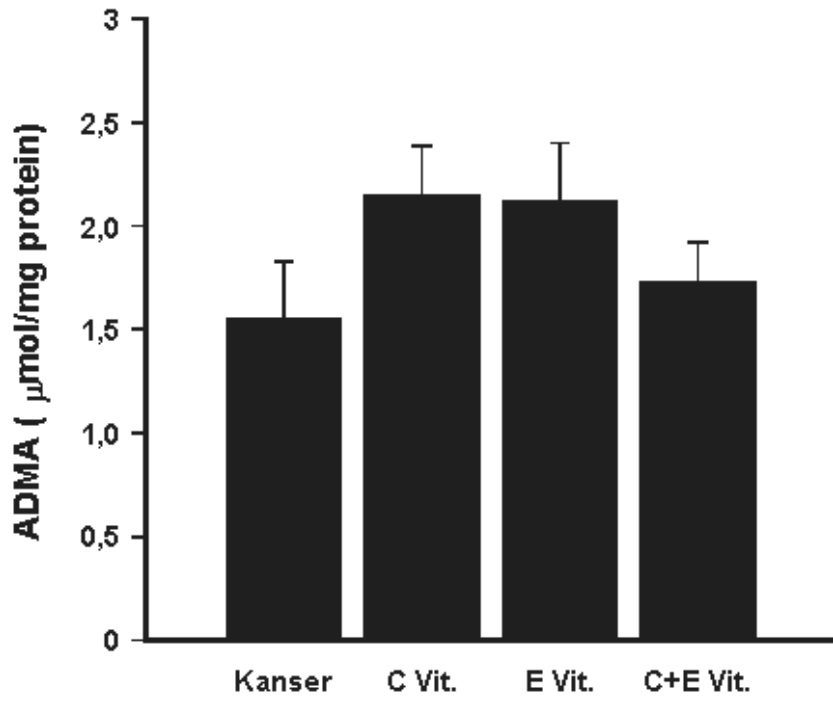




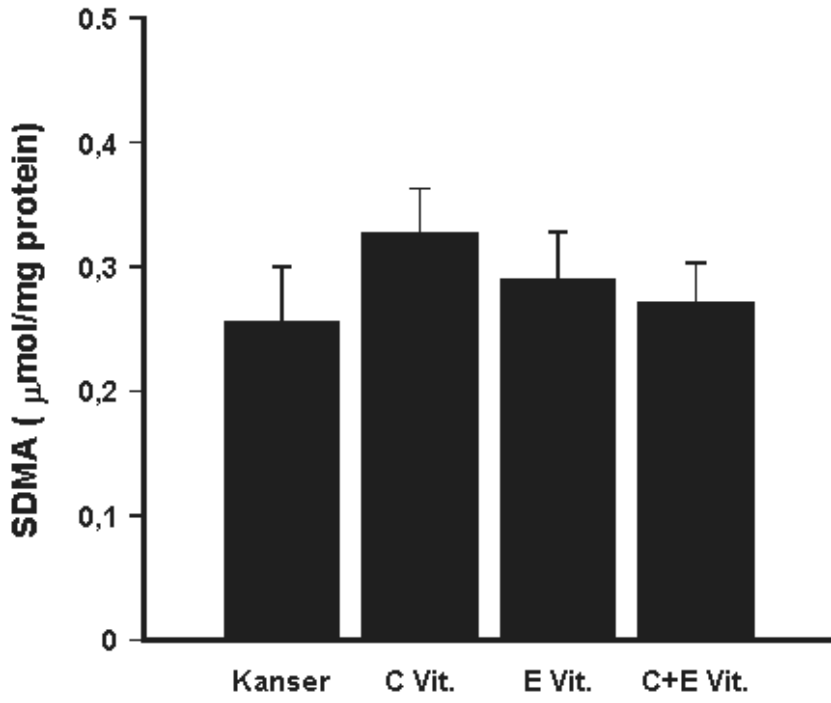
Şekil 19. Plazma SDMA düzeyleri. Hata çizgileri mean±SEM'i ifade etmektedir. \*p<0.05



Şekil 20. Doku arginin düzeyleri. Hata çizgileri  $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 'i ifade etmektedir



Şekil 21. Doku ADMA düzeyleri. Hata çizgileri mean±SEM'i ifade etmektedir



Şekil 22. Doku SDMA düzeyleri. Hata çizgileri mean±SEM'i ifade etmektedir

**Tablo 12. Plazma arginin ( $\mu\text{mol/L}$ ), ADMA ( $\mu\text{mol/L}$ ) ve SDMA ( $\mu\text{mol/L}$ ) düzeyleri**

<b>GRUP</b>	<b>ARGİNİN</b>	<b>ADMA</b>	<b>SDMA</b>
<b>1.GRUP</b> (Sağlıklı Kontrol)	167,11	1.12	0.26
	17,56	0.72	0.15
	115,56	1.32	0.25
	118,61	1.11	0.24
	68,96	1.20	0.26
	71,46	0.66	0.16
	104,17	0.98	0.19
	147,52	1.08	0.25
	89,82	0.73	0.17
	99,39	0.81	0.13
<b>2.GRUP</b> (Tümör)	63.57	4.40	1.66
	66.06	1.05	0.31
	50.84	0.94	0.27
	37.76	1.10	0.32
	5.37	0.72	0.27
	47.50	0.66	0.15
	72.69	0.86	0.22
	74.29	1.34	0.40
<b>3.GRUP</b> (C Vitamini)	15.19	0.85	0.30
	46.93	1.73	0.51
	59.79	0.95	0.30
	36.39	1.12	0.38
	21.44	0.84	0.23
	50.47	1.17	0.34
	75.96	1.84	0.48
	81.25	1.33	0.34
<b>4.GRUP</b> (E Vitamini)	31.04	0.79	0.18
	83.72	1.46	0.33
	28.38	1.02	0.31
	57.23	0.97	0.23
	76.67	1.11	0.30
	50.19	1.03	0.31
	49.39	1.19	0.34
	47.52	1.31	0.37
<b>5.GRUP</b> (C+E Vitamini)	46.48	1.37	0.32
	11.71	1.30	0.45
	30.03	1.11	0.32
	44.57	0.70	0.18
	70.90	1.22	0.30
	41.64	1.0	0.28
	16.87	1.26	0.36
	25.74	1.01	0.31

**Tablo 13. Doku arginin, ADMA, ve SDMA, düzeyleri**

<b>GRUP</b>	<b>Arginin (µmol/mg protein)</b>	<b>ADMA(µmol/mg protein)</b>	<b>SDMA (µmol/mg protein)</b>
<b>2.GRUP (Tümör)</b>	4.09	0.45	0.09
	5.66	1.56	0.21
	5.96	1.19	0.19
	8.85	2.52	0.45
	2.76	0.55	0.12
	10.77	1.57	0.22
	4.61	2.16	0.35
	6.97	2.36	0.37
<b>3.GRUP (C Vitamini)</b>	5.93	2.07	0.33
	7.30	1.39	0.23
	6.53	2.20	0.29
	7.47	1.78	0.24
	5.52	2.60	0.46
	6.24	1.93	0.30
	8.37	3.51	0.50
	3.99	1.72	0.24
<b>4.GRUP (E Vitamini)</b>	6.72	1.46	0.19
	6.80	3.19	0.35
	2.68	1.20	0.17
	8.66	2.11	0.36
	5.47	1.79	0.23
	23.87	2.12	0.29
	5.49	3.39	0.48
	3.59	1.68	0.21
<b>5.GRUP (C+E Vitamini)</b>	10.14	2.60	0.40
	8.17	2.11	0.33
	3.08	1.08	0.15
	4.62	1.84	0.25
	9.81	1.70	0.30
	2.81	0.96	0.12
	7.65	1.63	0.29
	7.66	1.91	0.30

## TARTIŞMA

Asimetrik dimetilarginin, endojen NOS inhibitörüdür. NOS'un vücuttaki fonksiyonu, L-Arginin'den NO sentezinin sağlanmasıdır (79). Vasküler endotelde gerçekleşen bu reaksiyonda ADMA, NOS aktivitesini inhibe ederek L-Argininin hücre içine alımını engeller. Güçlü vazodilatör etkisi olan NO; platelet agregasyonu, lökosit migrasyonu, hücrel adezyon ve vasküler düz kas proliferasyonunu inhibe eder (80-81). Vasküler tonus ve yapının sürdürülmesinde temel rolü oynadığına dair pekçok kanıt bulunmaktadır. Ortamda NO azaldığında endotel hemeostaz vazokonstrüksiyon lehine bozulur ve endotelial disfonksiyon başlar (12). NO major endotel kaynaklı vazoaktif mediatördür ve hayati önem taşıyan antiaterosklerotik etkileri de bilinmektedir. Dolayısıyla NO sentezini inhibe eden ADMA'nın endotel disfonksiyonuyla ilgili anahtar rolü oynayabileceği düşünülmektedir.

Son yıllarda ADMA'nın artışı, hipertansiyon, hiperkolesterolemi, diabetes mellitus, sigara gibi koroner arter risk belirteçlerinden kabul edilmektedir. 1.75 µmol/L plazma ADMA düzeyinin üzeri eşik değer olarak belirlenmiştir. Plazma ADMA düzeyinin 2.35 katı yükselmesi ise koroner arter hastalığı açısından yüksek risk düşündürmektedir (82).

Asimetrik dimetilarginin argininin posttranslasyonel metilasyonunun ardından hidrolize uğramasıyla oluşur. Klirensi ise böbrekler kanalı ile yapılır. Böbrek yetmezliğinde, ADMA klirensinin azalmasıyla endotel vazodilatör disfonksiyonun başladığı gösterilmiştir (11). ADMA'nın stereoizomeri olan SDMA eşit miktarlarda olsa bile NO oluşum reaksiyonunu engellememektedir. DDAH enzimi ADMA'nın klirensinde görevlidir. DDAH ile ADMA, L-Sitrülin ve dimetilamine hidrolize olur (83). Farklı renal hücrelerde NOS ile beraber gösterilmiştir. İnvitro hiperglisemide bu enzimin aktivitesinin azalması, vasküler düz kas tonusu ve endoteli bozarak ADMA düzeylerinin artışına yol açmıştır (84).

Nitrik oksit sentaz enzimi, L-arginini NO ve sitriline parçalayan enzimdir. NOS, arginaz enzimiyle aynı substratı kullanmaktadır. Kanserde arttığı bilinen NOS ve arginaz enzimi, arginini tüketmek için birbirleriyle yarışmaktadırlar. NOS enziminin L-arginin için Km değeri 1-20  $\mu$ M olup, bu değer arginaz için 2-20 mM'dir. Fakat arginaz enziminin fizyolojik pH'da Vmax değeri, NOS enziminden 1000 kat daha fazla olduğundan bu iki enzimin, düşük L argininin konsantrasyonlarında bile, onu rahatlıkla kullanabileceğini ortaya koymaktadır (85).

Bu çalışmada, meme kanserli farelerde azalan plazma arginin düzeyleri bu teorileri desteklemektedir. Kanserli hayvanlarda bir şekilde plazma arginin düzeyi düşmektedir. Daha önce birçok çalışmada, argininin ornitine dönüşmesinde etkili olan arginaz enzim aktivitesinin meme kanserinde olduğu gibi bir çok farklı kanser türünde arttığı bulunmuştur (86-87). Erbaş ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda, meme kanseri oluşturulmuş farelerde ve meme kanseri gelişimi yönünden yüksek risk grubundaki kadınlarda, arginaz enzim aktivitesinin yüksek bulunduğu gösterilmiştir (87-88).

Yapılan bir çalışmada, kanserli hayvanlarda arginaz enzim aktivitesi artarken, NO düzeylerinin azaldığı bulunmuş, bunun NOS inhibisyonu ile birlikte yolağın ornitin üretimine ve dolayısıyla kanser metabolizmasında etkili olduğu düşünülen, poliamin sentezindeki artışa neden olabileceği vurgulanmıştır (89). Bu çalışmada da meme kanserli hayvanlarda istatistiksel olarak gösterilen düşük arginin düzeyi bu teoriyi destekler niteliktedir ve arginaz enzim aktivitesine bağlı olarak plazmadaki argininin hızla tüketildiğinin bir göstergesidir. Mekanizmanın diğer bir tarafı ise NOS'un inhibisyonudur. Bu sayede pozitif etkileri gösterilen NO üretimi azalmaktadır.

Son yıllarda özellikle popüler bir belirteç olma yolunda önemli adımlar atan ADMA'nın bir çok hastalıkla ilişkisi ortaya konmuştur. İnsülin bağımlı, bağımsız ve gestasyonel diyabette ADMA'nın arttığı Lin ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmaya göre diabetes mellitus'ta bozulan NOS yolu incelenmiş ve streptozotosinle indüklenen diyabetik ratlarda, plazma ADMA, diyabetik olmayan ratlardan daha yüksek bulunmuştur. Yüksek glukoza maruz bırakılmış hücre kültürlerinde diyabetik ratlardaki DDAH aktivitesinin normalden daha yüksek olduğu, vasküler düz kas ve insan endotelial hücrelerinde DDAH aktivitesinin bozulduğu ve ADMA akümüasyonu olduğu gösterilmiştir. İnsan endotelial hücrelerinde polietilen glikol ile kombine süperoksit dismutaz eklendiğinde DDAH aktivitesi ve ADMA birikiminin geri döndüğü gösterilmiştir (90). Ayrıca diyabetik hastalarda serum TNF- $\alpha$  ve VEGF'nin yanı sıra ADMA düzeylerinin de yükseldiğini gösteren çalışmalar vardır (91,92). Bu tip hastalardaki ortak nokta hepsinde



endotelial disfonksiyonların görülmesidir. Kanser hastalarının da en önemli problemlerinden biri olan endotelial disfonksiyonlar, yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Bir çok çalışmada endotel disfonksiyonu, artmış ADMA düzeyleriyle ilişkili bulunmuştur (55-59).

Periferik arteriyel hastalık ve kronik hiperhomosisteinemi 76 hastada yapılan bir çalışmada ADMA'nın endotel disfonksiyonunda ki rolü araştırılmış ve plazma total homosistein, ADMA ve total kolesterol, DM, sigara, sistolik kan basıncı arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada akım bağımlı dilatasyon ile regresyonu yapıldığında anlamlı bir ilişki saptanmıştır (93). Bir başka çalışmada ise ACE inhibitörleri ve AT1 reseptör blokörlerinin ADMA düzeylerini ve arginin/ADMA oranını azalttığı gösterilmiştir.

Yılmaz ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada transplantasyonun ardından ADMA düzeylerinin düştüğü ve endotel fonksiyonlarının düzeldiği gösterilmiştir (94). ADMA'nın kronik böbrek yetmezliğinde arttığına dair çalışmalar mevcuttur. Kanser ve kronik böbrek yetmezliği gibi endotel hasarı görülen hastalıklarda, transplantasyon veya tedavi edici ajanlarla endotelde iyileşme görülmekte ve ADMA düzeylerinde düşüş gözlenmektedir (55).

Obesite, sigara gibi ciddi kardiyovasküler hastalık risk faktörleri ile plazma ADMA düzeyleri arasında ilişki gösterilmiştir (95). Dolaşımdaki metilargininlerin artışı ile insülin direncinde protein turnover artması arasında ilişki olabileceğine dair hipotezle, obez ve yaşlılarda bu etkinin şiddetlendiğini düşünen araştırmacılar, dolaşımda ADMA, SDMA ve NMMA düzeylerinin obez ve yaşlılarda artışını göstermişlerdir (96).

Asimetrik dimetilarginin'in kanserle olan ilişkisi konusunda ise mevcut literatürde çok fazla kaynak bulunmamaktadır. Szuba ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada lösemili hastalarda ADMA düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir (97). ADMA'nın güçlü bir NOS inhibitörü olduğu bilindiğinden yukarıda sözü edilen mekanizma üzerinde kendine önemli bir yer edinmektedir. Öyle ki kanserde artabilecek bir ADMA sentezi, NOS'un inhibisyonuna neden olabileceğinden NO üretimini düşürebilecektir. Diğer yandan yolağın arginaz artışına bağlı olarak, ornitin üretimine kaydırılması, akabinde poliamin üretiminin artarak, kansere gidiş yönünde önemli bir aşamanın sağlanması söz konusu olabilir.

Bu çalışmada da bu görüşler doğrultusunda kanserli hayvanlarda ADMA değerlerinin, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da arttığı saptanmıştır. ADMA kadar etkisi olmasa da, aynı grupta istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artan SDMA oranlarının bu iki molekülün hemen hemen eşit oranda buldukları bilgisi ile birlikte, ADMA düzeylerindeki artışın anlamlı olabileceği fikrini güçlendirmektedir. Artan bu ADMA düzeylerinin tekrar normal sınırlara

çekilmesi kanserde koruyucu bir faktör olabilir mi? Bu etkiyi elde etmek üzere hangi ajanlar kullanılabilir?

Kanser konusunda antioksidan aktivite gösteren vitaminler dikkat çekicidir. Bu vitaminlerin bir antikanser veya kansere karşı koruyucu bir ajan olarak kullanımı halen tartışmalı olsa da, antioksidan özellikteki C ve E vitaminleri bunlardan bazılarıdır. Bugün vitamin E'nin radikal giderme, baskılama, onarma ve endojen savunmayı artırma mekanizmalarının tümünü kullanabildiği, bu nedenle çok hızlı ve geniş bir antioksidan etki kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir (98). Vitamin E katkılı yemle beslenen ratlarda intraselüler antioksidan enzimler olan Süperoksit dismutaz (99) ve katalaz (100) düzeylerinin arttığı gösterilmiş, bu yolla vitamin E'nin endojen antioksidan savunma performansını yükselttiği ileri sürülmüştür. Tokoferolün antioksidan aktivitesi, birçok antioksidan savunma elemanının yetersiz kaldığı, oksijenin yüksek konsantrasyonlarında bile etkilidir. Eritrositler ve alveolar membranlar bu durumu açıklayan önemli örnekler olarak gösterilmiştir (100). Yapılan pek çok çalışmada E vitamininin meme, prostat ve akciğer kanserinde tümörün gelişimini geciktirici hatta iyileştirici bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (67-70). Güneş ışınları ile yoğun olarak karşı karşıya kalınması, lipid oksidasyonu düzeyini artırarak erken yaşlanma, kanser, kalp hastalığı riskini arttırmaktadır. Güneş ışınları ve diğer ışık kaynakları ile ozonun bu tip sakıncalı tesirlerine karşı vitamin E önemli bir antioksidan olarak kabul edilmeye başlanmıştır (101). Havuç, domates ve konsantre portakal suyu ile beslenen hayvanlarında karsinogenez sıklığının kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı ortaya konmuştur (68).

Bir çalışmada, serum askorbik asit düzeyleri ve çeşitli kanser tipleri arasındaki olası ilişki araştırılmış ve serum askorbik asit düzeyleri akciğer kanserli hastalarda, sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Ayrıca akciğer kanserli olgularda, serum askorbik asit düzeyini yükseltecek vitamin C desteklerinin, antioksidan savunma mekanizmalarını güçlendirerek tedaviye katkıda bulunabileceği gösterilmiştir (102). Fontes ve ekibinin yaptığı bir çalışmada, tümör taşıyan farelere C vitamini enjekte edilmiş ve kontrol grubuna göre hayatta kalma süresinin daha uzun olduğu, ayrıca C vitamini verilen grupta kanser hücrelerinin çoğalmasının yavaşladığı gösterilmiştir (103). Diğer bir araştırmada; damardan verilen yüksek doz C vitamininin son dönem kanser hastalarının yaşam kalitesini bariz bir şekilde artırdığı bildirilmiştir (104). Cameron ve Pauling, terminal dönemdeki kanserli hastalara 10 gün süreyle damardan, ölünceye kadar da ağızdan C vitamini verdiklerinde, bu hastaların yaşam sürelerinin uzadığını göstermişlerdir (105-107). Casciari ve arkadaşları yaptıkları araştırmada, vitamin C kan seviyesi 11.2 µmol/l iken hastaların

%42.9'unda tümör hücresi apoptozu, %24.4'ünde ise tümör hücresi nekrozu saptayarak, kan C vitamini düzeyi 37.7  $\mu\text{mol/l}$ 'ye yükseldiğinde, bu oranların sırasıyla %57.6 ile %33.1'e yükseldiği gösterilmiştir (107). C vitaminin kollajen sentezini artırarak kanser hücrelerinin büyümesini önleyebileceği öne sürülmüştür (108). C vitamini enfeksiyona karşı savaşan hücrelerin sayısını ve alfa-interferon düzeyini arttırabilir. Böylece kanser hücrelerinin ortadan kaldırılmasına yardımcı olabilir (109). Yapılan bir çalışmada, C vitamininin enerjyi arttırarak kişinin kendini iyi hissetmesini sağladığı gösterilmiştir (110). Porto Rico Üniversitesinde yapılan bir araştırmada, yüksek dozda C vitamini yaklaşık 30 yıl kanserli hastalarda kullanılmış ve bariz bir komplikasyonla karşılaşmamıştır (111).

Diğer yandan, antioksidanların ADMA yıkılımını hızlandırdığı gösterilmiştir. ADMA'yı azaltan ajanlar olarak; L-Arginin, folik asit, vitamin B<sub>6</sub> ve B<sub>12</sub> kullanılmaktadır. Ayrıca oksidan stresi azaltan egzersiz gibi diğer durumların da ADMA'yı azalttığı düşünülmektedir (112). Dolayısı ile bu çalışmada ADMA üretimi üzerinde potansiyel inhibe edici etkileri bulunan C ve E vitaminleri kullanılmıştır. Ancak çalışma sonunda C ve E vitaminlerinin bu modelde gerek ADMA gerekse arginin ve SDMA düzeyleri üzerinde anlamlı bir fark oluşturmadığı gözlenmiştir.

Yukarıda da belirtildiği üzere; halen kanserdeki tam etkisi tartışmalı olan C ve E vitaminlerinin, bazı araştırmalarda saptanan olumlu etkilerinin ADMA sentezinin inhibisyonu üzerinden olmayabileceği söylenebilir. Eğer bu vitaminlerin kansere karşı olası bir koruyucu etkileri varsa, bu etki farklı mekanizmalar üzerinden oluşabilir.

Bu çalışma daha önceki çalışmalara paralel olarak ve meme kanseri gelişim mekanizması içerisindeki bir boşluğu daha doldurmuştur. Kanserde artan arginaz aktivesi ile birlikte ornitin üzerinden poliamin sentezinin hızlandığı, bunun da kanser oluşumu yönünde önemli bir etken olabileceği daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir. Aynı zamanda artan arginaz enzim aktivitesi ile birlikte yolağın bu yöne ilerlediği, dolayısı ile NO sentezinin azaldığı, bunun da yine kanser gelişimi yönünde olumsuz bir faktör olabileceği vurgulanmıştır. Bu aşamada argininden NO oluşumunda görev yapan NOS enziminin kanserli hastalarda inhibisyonunu söz konusu olabileceği akla gelmektedir. Bu inhibisyonda önemli bir etken olan ADMA'nın kanserli hastalarda artmış olarak bulunması yine kanser gelişimi yönünde yukarıda özetlenen mekanizmayı destekler niteliktedir. Artan ADMA düzeyi ile birlikte NOS inhibisyonu olabilecek, bu da NO sentezinin azalmasına neden olabilecektir.

Bu bulgular ışığında; kanserde artan ADMA düzeylerinin ileri çalışmalarla daha ayrıntılı olarak incelenmesi yararlı olacaktır. ADMA'nın kanserde anahtar bir rol oynayabileceği fikrinden hareketle, bu maddenin inhibe edilerek söz konusu inhibisyonun

ortadan kaldırılması, kanser için koruyucu ve/veya tedavi edici yeni ajanların geliştirilmesine temel olabilecek, bu konu kanser araştırmalarında yeni bir yol açabilecektir.

## SONUÇLAR

Antioksidan ve antikanser özelliği ortaya konmuş olan C ve E vitaminlerinin, deneysel olarak meme kanseri geliştirilmiş farelerde ADMA düzeylerine etkisinin araştırılması amaçlanan bu çalışma sonucunda;

- 1) Plazma arginin düzeyleri, tümör grubunda sağlıklı gruba göre anlamlı olarak düşük bulundu.
- 2) Plazma ADMA düzeylerinde, tümör grubunda yükselme olsa bile bu yükselmenin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi.
- 3) Plazma SDMA düzeyleri tümör grubunda anlamlı olarak yüksek bulundu.
- 4) Tedavinin gerek plazma gerekse doku arginin, ADMA ve SDMA düzeylerine istatistiksel olarak anlamlı bir etki yapmadığı bulundu.

Kanserde artan arginaz aktivesi ile birlikte ornitin üzerinden poliamin sentezinin hızlandığı, bunun da kanser oluşumu yönünde önemli bir etken olabileceği daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir. Bunun sonucu olarak NO sentezinin azaldığı, bunun da yine kanser gelişimi yönünde olumsuz bir faktör olabileceği vurgulanmıştır. Önemli bir NOS inhibitörü olan ADMA düzeylerinin kanserli hastalarda artmış olarak bulunması önceki çalışmaları destekler niteliktedir. ADMA'nın kanserde anahtar bir rol oynayabileceği fikrinden hareketle, bu maddenin inhibe edilerek NO inhibisyonun ortadan kaldırılması, kanser için koruyucu ve/veya tedavi edici yeni ajanların geliştirilmesine temel olabilecek, bu nokta kanser araştırmalarında yeni bir yolun açılmasını sağlayabilecektir.

## ÖZET

Meme kanseri, dünyada kadınlar arasında en sık görülen malign tümör olup kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. Asimetrik dimetilarginin (ADMA) nitrik oksit sentaz (NOS) enziminin endojen inhibitörüdür. Nitrik oksit (NO) sentezini yarışmalı olarak inhibe eder. ADMA düzeylerinin kanserde ve endotel hasarı görülen diğer hastalıklarda arttığı bildirilmiştir. Bu çalışmada meme kanseri oluşturulmuş farelerde antioksidan olarak bilinen ve antikanser etkileri gösterilmiş C ve E vitaminlerinin, ADMA düzeyleri üzerine etkileri araştırılmıştır.

Balb/c cinsi farelerin sol ayak iç bölgesine 0.2 ml erhlich asit tümör hücresi enjekte edildi. Denekler rasgele seçilerek 10'ar fareden oluşan 5 grup oluşturuldu. Gruplardan birine C vitamini 200 mg/kg/gün, diğerine E vitamini 300 mg/kg/gün, diğer bir gruba ise C+E vitaminleri intraperitoneal olarak enjekte edildi.

Tümörlü hayvanların plazmalarında arginin düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış, SDMA düzeyleri ise artmış olarak bulundu. ADMA düzeyleri ise kanserli hayvanların plazmalarında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da yükselmiş olarak bulundu. Gerek plazma, gerekse doku örneklerinde tedavi olarak verilen C ve E vitaminlerinin araştırılan parametreler üzerine anlamlı bir etki yapmadığı gözlemlendi.

Kanserde artan arginaz aktivesi ile birlikte ornitin üzerinden poliamin sentezinin hızlandığı, bunun da kanser oluşumu yönünde önemli bir unsur olabileceği daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir. Bunun sonucu olarak NO sentezinin azaldığı, bunun da yine kanser gelişimi yönünde olumsuz bir faktör olabileceği vurgulanmıştır. Önemli bir NOS inhibitörü olan ADMA'nın kanserli hastalarda artmış olarak bulunması önceki çalışmaları destekler niteliktedir. ADMA'nın kanserde anahtar bir rol oynayabileceği fikrinden hareketle, bu maddenin inhibe edilerek NO inhibisyonun ortadan kaldırılması, kanser için koruyucu

ve/veya tedavi edici yeni ajanların geliştirilmesine temel olabilecek, bu nokta kanser araştırmalarında yeni bir yolun açılmasına neden olabilecektir.

**Anahtar kelimeler:** Meme kanseri, ADMA, SDMA, arginin C vitamini, E vitamini.

**EFFECT OF VITAMIN C AND E ON PLASMA ASYMMETRIC  
DIMETHYLARGININE LEVELS IN BREAST CANCER INDUCED MICES**

**Aylin TÜRKSEVER**

**SUMMARY**

Breast cancer is the most common malignity in women and constitutes about 30 % of all women cancers. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) is an endogenous inhibitor of the nitric oxide synthase (NOS). It inhibits nitric oxide (NO) synthesis competatively. It has been reported that ADMA levels increases either in the cancers or diseases that associated with endotelial disfunction. In this study, we have tried to evaluate the effects of vitamin C and E in which it has been shown their antioxidant and anticancer effects, on ADMA levels in breast cancer induced mices.

0.2 ml Ehrlich acid tumor cells were injected to the left medial side of food of Balb/c mices. Five groups were randomly formed and every group consisted of 10 mices. Vitamin C, 200 mg/kg/day, vitamin E, 300 mg/kg/day and vitamin C+E intraperitoneally applied.

While plasma arginine levels were significantly decreased, symmetric dimethylarginine (SDMA) levels were significantltly increased in tomour group. There was an increase in ADMA levels in the animals with tumour, but this was not statistically significant. There was no statistically significant difference on plasma and tissue arginine, ADMA and SDMA levels for the treatment groups.

It has been shown that the arginase enzyme activity increases in cancer patiens and this leads to the formation of polyamines through ornithine which may be important for cancer development. As a result of this mechanism, NO level decreases and this mechanism also may play a role in cancer development. Finding of increased level of ADMA as a important NOS inhibitor in animals with cancer is supporting the previous studies. As an idea



that ADMA may have a role in cancer development, it would be important to inhibit ADMA synthesis and therefore removing of NO inhibition. This stage may have a starting point to develop possible new agents for the cancer prevention or treatment and open a new line for the cancer research.

**Key words:** Breast cancer, ADMA, SDMA, Vitamin C, Vitamin E.

## KAYNAKLAR

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55:74-108.
2. Semiglazov VF, Sagaidak VN, Moiseyenko VM, EA Mikhailov. Study of the role of breast self-examination in the reduction of mortality from breast cancer: the Russian Federation/World Health Organization study. *Eur J Cancer* 1993; 29(14):2039-46.
3. Koçak S. Kimler meme kanseri olur? *Klinik Bilimler ve Doktor* 2000; 6:68-72.
4. Tuncer S. Jinekolojik kanserlerde tarama. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2000; 31:113-20.
5. Williams M, Williamson J. Combining argumentation and bayesian nets for breast cancer prognosis. *Cancer Res* 2005; 18:1-23.
6. Bernstein JL, Langholz B, Haile RW, Bernstein L, Thomas DC, Stovall M, et al. Study design: Evaluating gene–environment interactions in the etiology of breast cancer the WECARE study. *Breast Cancer Res* 2004; 6:199-214.
7. Hendrix MJC, Seftor EA, Kirschmann DA, Seftor REB. Molecular biology of breast metastasis: Molecular expression of vascular markers by aggressive breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2000; 2:417-22.
8. Simmons RM, Rubin E, Pisch J. Breast cancer. In: Harvey JC, Beattle EJ (Eds.). *Cancer surgery*. New York: W.B. Saunders Company; 1996: p.525-61.
9. Heber D, Byerley LO, Chlebowski RT. Metabolic abnormalities in the cancer patient. *Cancer* 1985; 5:225-9.
10. De Gennaro, Colonna V, Bianchi M, Pascale V, Ferrario P, Morelli F, Pascale W, Tomasoni L, Turiel M. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and a novel cardiovascular risk molecule. 2009; 15(4):91-101.

11. Wang Z, Tang WH, Cho L, Brennan DM, Hazan SL. Targeted metabolomic evaluation of arginine methylation and cardiovascular risks: potential mechanisms beyond nitric oxide synthase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29(9):1383-91.
12. Endemann DH, Schiffrin E: Endothelial Dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:1983-92.
13. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339:572-5.
14. Ekström AM, Sefarini M, Nyren O, Hansson LE, Ye W, Wolk A. Dietary antioxidant intake and the risk of cardia cancer and noncardia cancer of the intestinal and diffuse types: a population-based case-control study in Sweden. *Int J Cancer* 2000; 87 (1):133-40.
15. Kundak A, Erbaş H, Gülen Ş, Dökmeci G, Çelik H, Özcan T. C ve E Vitaminlerinin Kronik Olarak Alkolle Beslenen Sıçanlarda Beyin Dokusu Arginaz Aktivitesi, Ornitin ve Üre Düzeylerine Etkisi. *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2007; 24(1):49-55.
16. Cameron IL, Munoz J, Barnes CJ, Hardman WE. High dietary level of synthetic vitamin E on lipid peroxidation, membrane fatty acid composition and cytotoxicity in breast cancer xenograft and in mouse host tissue. *Cancer Cell Int* 2003; 12; 3 (1):3.
17. Tannenbaum SR, Wishnok JS, Leaf CD. inhibition of nitrosamine formation by ascorbic acid. *American Journal Of Clinical Nutrition* 1991;53(1 Suppl):247S-250S.
18. Tuncer İ, Noyan T, Mercan R, Balahoroğlu R, Uygan İ, Türkdöğün K. İleri Evre Gastrik Adenokarsinomlu Olguların Serum Ve Mide Sıvısında Vitamin B<sub>12</sub>, Folik Asit ve Vitamin C düzeyleri. *Van Tıp Dergisi* 2005; 12(2): 160-163.
19. Niki E. Lipid antioxidants: How they act in biological systems. *Br J Cancer* 1987; 55 (suppl VIII):153-7.
20. Fırat D. Cancer mortality in Turkey and in the world 1980-1981. Ankara: Turkish Association For Cancer Research and Control, 1983.
21. Fırat D, Hayran M. Cancer statistics in Turkey and in the world 1990-1992. Turkish Association For The Cancer Research and Control. Ankara: İz Matbaacılık, 1995: p.26.
22. Özet A. Türkiye ve dünyada kanser epidemiyolojisi. 2000.  
[http://www.gata.edu.tr/dahilibilimler/onkoloji/kanser\\_epidemiyolojisi.htm](http://www.gata.edu.tr/dahilibilimler/onkoloji/kanser_epidemiyolojisi.htm).
23. Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet* 2001; 2:533-43.
24. Muir C, Waterhouse J, Mack T. Cancer incidence in five continents. Lyon International Agency for Cancer Research 1987; 88:790-5.

25. Veronesi U, Goldhirsch A, Yarnold J. Breast cancer. In: Peckham M, Pinedo H, Veronesi U. Oxford textbook of oncology. Oxford: Oxford University Press 1995. p.1243-89.
26. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. CA Cancer J Clin 2000; 50:7-33.
27. Fırat D, Çelik İ. Cancer statistics in Turkey and in the world 1993-1995. Turkish Association For Cancer Research and Control. Ankara: İz Matbaacılık; 1998: p.55.
28. Tuncer M. Ulusal Kanser Programı 2009-2015. T.C. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı, Bakanlık Yayın No: 760, 2009.
29. D. T. Ramsay DT, Kent JC, Hartmann R.A, Hartmann P.E. Anatomy of the lactating human breast redefined with ultrasound imaging. J Anat 2005; 206:525-32.
30. Can G. Meme kanserinde yayılım korunma ve erken tanı. [www.saglik.gov.tr/extras/birimler/ksdb/kkme/MK\\_Bel\\_Yay\\_Kor\\_ET-2.ppt](http://www.saglik.gov.tr/extras/birimler/ksdb/kkme/MK_Bel_Yay_Kor_ET-2.ppt)
31. Martin RCG, Chagpar A, Scoggins CR, Edwards MJ, Hagendoorn L, Stromberg AJ. Clinicopathologic factors associated with false-negative sentinel lymph-nod biopsy in breast cancer. Ann Surg 2005; 241:1005-15.
32. Vestey SB, Sen C, Calder CJ, Perks CM, Pignatelli M, Winters ZE. p14ARF expression in invasive breast cancers and ductal carcinoma in situ relationships to p53 and Hdm2. Breast Cancer Res 2004; 6:571-85.
33. Gatalica Z, Bing Z. Syk tyrosine kinase expression during multistep mammary carcinogenesis. Croat Med J 2005; 46(3):372-6.
34. Barça N, Aydın U, Ercan Ö, Araz L. Hematolojik kökenli meme kitleleri. Türk Tanısal ve Girişimsel Radyoloji Dergisi 2002; 8:228-30.
35. Topuz E, Aydın A, Karadeniz AN. Klinik onkoloji. İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları 2000: s.70-81.
36. McPherson KS, Dixon CM. ABC of breast diseases. Breast cancer epidemiology, risk factors and genetics. BMJ 2000; 321:624-8.
37. Tebit EV, Gohrke SV, Claude JC. CYP17 5'-UTR MspA1 polymorphism and the risk of premenopausal breast cancer in a German population based case-control study. Breast Cancer Res 2005; 7:455-64.
38. Nkondjock A, Robidoux A, Paredes Y, Narod SA, Ghadirian P. Diet, lifestyle and BRCA-related breast cancer risk among French-Canadians. Breast Cancer Res Treat 2006; 98(3):285-94.

39. Tsakountakis N, Sanidas E, Stathopoulos E, Kafousi M, Anogiannaki N, Georgoulas V. Correlation of breast cancer risk factors with HER-2/neu protein overexpression according to menopausal and estrogen receptor status. *BMC Women's Health* 2005; 5:1-9.
40. Chang JH, Gertig DM, Chen X, Dite GS, Jenkins MA, Milne RL, et al. CYP17 genetic polymorphism, breast cancer, and breast cancer risk factors: Australian Breast Cancer Family Study. *Breast Cancer Res* 2005; 7:513-21.
41. Gross RE. Breast cancer: Risk factors, screening and prevention. *Semin Oncol Nurs* 2000; 16(3):176-84.
42. Zoghi M, Nalbantgil İ. Hipertansiyon ve Endotel Fonksiyon Bozukluğu. *Ana Kar Der* 2002; 2:142-7.
43. Torun E, Bayram F. Endokrin bir organ olarak endotel ve endotelinin hipertansiyondaki rolü. *Erciyes Tıp Dergisi* 2004; 26(3):126-131.
44. Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial Function A Critical Determinant in atherosclerosis. *Circulation* 2004; 109 (suppl II).II-27-II-33).
45. Lüscher TF, Barton M. Biology of the endothelium. *Clin Cardiol* 1997; 20(11Suppl 2):3-10.
46. By Douglas B. Cines, Eleanor S, Clayton A. Buck, Joseph Loscalzo, Guy A. Zimmerman, Rodger P. McEver et al. Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders. *Blood* 1998; 10(15): 3527-3561.
47. S. Moncada. Adventures in vascular biology: a tale of two mediators. *Phil Trans R Soc* 2006; 361:735-759.
48. Dökmeçi İ. Farmakoloji Temel Kavramlar. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2000; 305-314.
49. Özkan M, Yüksekol İ. Nitrik oksit ve Akciğerler. *Toraks Dergisi*, 2003; 4(1):88-94.63
50. Victor J Dzau. Tissue Angiotensin and Pathobiology of Vascular Disease: A Unifying Hypothesis. *Hypertension* 2001; 37:1047-52.
51. Rainer H, Böger RH, Eyal S. L-Arginine Improves Vascular Function by Overcoming the Deleterious Effects of ADMA, a Novel Cardiovascular Risk Factor. *Alternative Medicine Review* 2005; 10(1):14-23.
52. Yılmaz M, Sağlam M, Çakır E, Sönmez A, Özgürtaş T. The determinants of endothelial dysfunction in CKD: oxidative stress and asymmetric dimethylarginine. *Am J Kidney Dis* 2006; 47 (1):42-50.

53. Mugge A, Hanefeld R, Böger RH. Plasma concentration of ADMA and the risk of coronary heart disease: rationale and design of the multicenter cardiac study. *Atherosclerosis* 2003; 4:29-32.
54. Betowski J, Kêdra A. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a target for pharmacotherapy. *Pharmacological Reports* 2006; 58:159-178.
55. Mallamaci F, Tripepi G, Cutrupi S, Malotino LS, Zoccali C: Prognostic value of combined use of biomarkers of inflammation, endothelial dysfunction, and myocardial pathology in patients with ESRD. *Kidney Int* 2005; 67:2330-7.
56. Tomiyama H, Yamada J, Koji Y, Shiina K, Yoshida M, Yamashina A. Effect of telmisartan on forearm postischemic hyperemia and serum asymmetric dimethylarginine levels. *Hypertension* 2007; 20 (12):1305-11.
57. Heutling D, Schulz H, Nickel I. Asymmetrical dimethylarginine, inflammatory and metabolic parameters in women with polycystic ovary syndrome before and after metformin treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:82-90.
58. Tarnow L, Hovind P, Teerlink T, Stehouwer CDA, Parving H: Elevated plasma Asymmetric Dimethylarginine as a marker of cardiovascular morbidity in early diabetic nephropathy in Type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27 (3):765-9.
59. Kryzuzanowska K, Mittermayer F, Kopp HP, Wolzt M, Schernthaner G. Weight loss reduces circulating asymmetrical dimethylarginine concentrations in morbidly obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:277-81.
60. Holven KB, Haugstad TS, Holm T, Aurust P, Ose L, Nenseter M. Folic acid treatment reduces elevated plasma levels of asymmetric dimethylarginine in hyperhomocysteinaemic subjects. *Br J Nutr* 2003; 89:359-63.
61. Kielstein JT, Stefanie Mb, Frölich JC, Ritz E, Haller H, Fliser D. Asymmetric Dimethylarginine, blood pressure and renal perfusion in elderly subjects. *Circulation* 2003; 107:1891-99.
62. Champe PC, Harvey RA (Çeviri: E. Gür). *Lippincott's Illustrated reviews seriesinden: Biyokimya*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 1997:5.
63. Chiang CD, Song EJ, Yang VC. Ascorbic acid increases drug accumulation and reverses vincristine resistance of human non-small-cell lung-cancer cells. *Biochem J* 1994; 30: 759-64.
64. Combs GF, Noguchi T, Scott ML. Mechanisms of action of selenium and vitamin E protection of biological membranes. *Fed Proc* 1975; 34: 2090-5.

65. Frikke-Schmidt H, Lykkesfeldt J. Role of marginal vitamin C deficiency in atherogenesis: in vivo models and clinical studies. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2009; 104 (6): 419-33.
66. Saran R, Novak JE, Desai A, Abdulhayoğlu E, Warren JS, Bustami R, et al. Impact of vitamin E on plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) in chronic kidney disease (CKD): a pilot study. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18 (11): 2415-20.
67. Skrzydlewska E, Fabriszewski R. Antioxidant status of liver, erythrocytes and blood serum of rats in acute methanol intoxication. *Alcohol* 1997; 14: 431-7.
68. Augustin W, Wiswedel I, Noack H, Reinheckel T, Reichelt O. Role of endogenous and exogenous antioxidants in the defence against functional damage and lipid peroxidation in rat liver mitochondria. *Mol Cell Biochem* 1997; 174: 199-205.
69. Morreale M, Livrea MA. Synergistic effect of glycolic acid on the antioxidant activity of alpha-tocopherol and melatonin in lipid bilayers and in human skin. *Biochem Mol Biol Int* 1997; 42:1093-102.
70. Blankenship LJ, Carlise DL, Wise LP, Orenstein LM, Dye LE, Patierno SR. Induction of apoptotic cell death by particulate lead chromate: Differential effects of vitamins C and E on genotoxicity and survival. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 146:270-80.
71. Morreale M, Livrea MA. Synergistic effect of glycolic acid on the antioxidant activity of alpha-tocopherol and melatonin in lipid bilayers and in human skin. *Biochem Mol Biol Int* 1997; 42:1093-102.
72. He Y, Root MM, Parker RS, Campbell TC. Effects of carotenoid-rich food extracts on the development of preneoplastic lesions in rat liver antioxidant status. *Nutr Cancer* 1997; 27:238-44.
73. Money LA. Contribution of genetic and nutritional factors to DNA damage in heavy smokers. *Carcinogenesis* 1997; 18:503-9.
74. Sigounas G, Anagnostou A, Steiner M. alpha-tocopherol induces apoptosis in erythrocytosis, prostate and breast cancer cells. *Nutr Cancer* 1997; 28:30-5.
75. Henning SM, Swendseid ME, Ivandic BT, Liao F. Vitamins C, E and A heme oxygenase in rats fed methyl/folate deficient diets. *Free Radic Biol Med* 1997; 23:936-42.
76. Houssaini FZ, Arnaud J, Richard MJ, Renversez JC, Favier A. Evaluation of oxidative stress and antioxidant defences in malnourished Moroccan children. *Ann Nutr Metab* 1997; 41:149-59.
77. Virtamo J. Vitamins and lung cancer *Proc. Nutr Soc* 1999; 58 (2):329-33.

78. Teerlink T, Nijvelt R, Jong S, L. Determination of arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in human plasma and other biological samples by high performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* 2002; 303: 131-137.
79. Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:2032-37.
80. Jiang J, Tang Y, Li N, Deng H, Li Y. Effect of simvastatin on endothelium-dependent vasorelaxation and endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *Acta Pharmacol* 2004; 25: 893-901.
81. Sela BA. ADMA (Asymmetric dimethylarginine) the inhibitor of nitric oxide (NO) synthesis: a new marker for vascular pathology. *Harefuah* 2005; 144:655-9.
82. Lepier JM, Vallance P. The synthesis and metabolism of asymmetric dimethylarginine (ADMA). *Eur J Clin Pharmacol* 2005; 8:1-6.
83. Gornik HL, Creager MA. Arginine, endothelial and vascular health. *J Nutr* 2004; 134: 288-87.
84. Chauhan A, More RS, Mullins PA. Aging-associated endothelial dysfunction in humans is reversed by L-Arginine. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28:1796-1804.
85. Singh R, Pervin S, Karimi A, Cederbaum S, Chaudhuri G. Arginase activity in human breast cancer cell lines: N<sup>ω</sup>-Hydroxy-L-arginine selectively inhibits cell proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-468 cells. *Cancer Research* 2000; 60: 3305–3312.
86. Poremska Z, Luboinski G, Chrzanowska A, Mielczarek M, Magnuska J, Baranczyk-Kuzma A. Arginase in patients with breast cancer. *Clin Chim Acta* 2003; 328 (1-2).
87. Erbaş H, Erten O, Dağlar A, İrfanoğlu M. Meme Kist Sıvısı Arginaz Aktivitesi, Ornitin ve Üre Düzeyleri. *Türk Biyokimya Dergisi* 2006; 31(3); 129-134.
88. Erbaş H, Aydoğdu N, Usta U, Erten O. Protective role of carnitine in breast cancer via decreasing arginase activity and increasing nitric oxide. *Cell Biology Int* 2007; 31: 1414-1419.
89. Kürkçü E. Deneysel Olarak Oluşturulmuş Meme Tümörlerinde Curcuminin Arginaz Enzim Aktivitesi, Ornitin ve Nitrik Oksit Düzeylerine Etkisi (tez). Edirne: TÜ Tıp Fak; 2008.
90. Lin KY, Ito A, Asagami S, Kimoto M, Tsuji H, Reaven GM, Cooke JP. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus. *Circulation* 2002; 106:987-92.



91. Makino N, Maeda T, Sugano M, Watanabe R, Abe N. High serum TNF-alpha level in Type 2 diabetic patients with microangiopathy is associated with eNOS down-regulation and apoptosis in endothelial cells. *J Diabetes Complications* 2005; 19:347-55.
92. Xiong Y, Lei M, Fu S, Fu Y. Effect of diabetic duration on serum concentrations of endogenous inhibitor of nitric oxide synthase in patients and rats with diabetes. *Life Sci* 2005; 77:149-59.
93. Sydow K, Hornig B, Arakawa N, Bode-Boger SM, Tsikas D, Munzel T, Boger RH. Endothelial dysfunction in patients with peripheral arterial disease and chronic hyperhomocysteinemia: potential role of ADMA. *Vasc Med* 2004; 9:93-101.
94. Yılmaz MI, Sağlam M, Caglar K, Cakır E, Ozgurtas T, Sonmez A, Eyileten T, Yenicesu M, Acikel C, Oguz Y, Ozcan O, Bozlar U, Erbil K, Aslan I, Vural A. Endothelial functions improve with decrease in asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels after renal transplantation. *Transplantation* 2005; 80:1660-66.
95. Eid HM, Arnesen H, Hjerkin EM, Lyberg T, Seljeflat I. Relationship between obesity, smoking and the endogen nitric oxide synthase inhibitor, ADMA. *Metabolism* 2004; 53: 1574-9.
96. Marliss EB, Chevalier S, Gougeon R, Morais JA, Lamarche M, Adegoke OA, Wu G. Elevations of plasma methylarginines in obesity and ageing are related to insulin ensitivity and rates of protein turnover. *Diabetologia* 2005; 21:1-9.
97. Szuba A, Chachaj A, Wrobel T, Dzietczenia J, Mazur G, Antonowicz J, Kuliczowski K, Andrzejak R. Asymmetric Dimethylarginine in hematological malignancies: a preliminary study. *Circulation* 2008; 49 (12):2316-20.
98. Stratton SP, Liebler DC. Determination of singled oxygen-specific versus radical-mediated lipid peroxidation in photosensitized oxidation of lipid bilayers: Effect of beta-carotene and alpha-tocopherol. *Biochemistry* 1997; 36:12911-20.
99. Smith KL, Hogan JS, WP. Dietary vitamin E and selenium affect mastitis and milk quality. *J Anim Sci.* 1997; 75(6):1659-65.
100. Evelson P, Ordonez CP, Llesuy S, Boveris A. Oxidative stres and in vivo chemiluminescence in mouse skin exposed to UVA radiation. *J Photobiol B* 1997; 38:215-9.
101. Steiner M. Vitamin E: More than antioxidant. *Clin Cardiol* 1993; 16:16-8.
102. Atay A, Barsal G, Kılıç S, Erciyas F, Ertuğrul G, Halilçolar H. Akciğer kanserli hastalarda serum askorbik asit düzeyinin araştırılması. *İzmir Göğüs Hastanesi Dergisi* 2002; 16(2):65.

103. Belin S, Kaya F, Duisit G, Giacometti S, Ciccolini J, Fontes M. Antiproliferative effect of ascorbic is associated with the inhibition of genes necessary to cell cycle progression. *Biochem J* 2009; 4(2):4409-89.
104. Yeom CH, Jung GC, Song KJ. Changes of terminal cancer patients health-related quality of life after high dose vitamin C administration. *J Korean Med Sci* 2007; 22(1):7-11.
105. Cameron E, Pauling L, Leibovitz B. Ascorbic acid and cancer: a review. *Cancer Res* 1979; 39(3):663-81.
106. Cameron E, Pauling L. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: reevaluation of prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75:4538-42.
107. Casciari JJ, Riordan NH, Schmidt TL, Meng XL, Jackson JA, Riordan HD. Cytotoxicity of ascorbate, lipoic acid, and other antioxidants in hollow fibre in vitro tumours. *Br J Cancer* 2001; 84:1544-1550.
108. Henson DE, Block G, Levine M. Ascorbic acid: biologic functions and relation to cancer. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83:547-550.
109. Cameron E, Pauling L. Vitamin C and the immune system. In : *Cancer and vitamin C*. 2nd ed. Philadelphia. Camino Book; 1990; 108-111.
110. Luo G, Xie ZZ, Liu FY, Zhang GB. Effect of vitamin C on mitochondrial function and ATP content in hypoxic rats. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1998; 19:351-355.
111. Gonzales MJ, Miranda-Massari JR, Mora EM, Guzman A, Riordan NH, Ripordan HD, Casciari JJ, Lackson JA, Roman-Franco A. Orthomolecular oncology review: ascorbic acid and cancer 25 years later. *Integr Cancer Ther* 2005; 4 (1):32-44.
112. Sydow K, Schwedhelm E, Arakawa N, Bode-Boger SM, Tsikas D, Hornig B, Frolich JC, Boger RH. ADMA and oxidative stress are responsible for endothelial dysfunction in hyperhomocysteinemia: effects of L-arginine and B vitamins. *Cardiovascular Res* 2003; 57: 244-52.

## RESİMLEMELER LİSTESİ

<b>ŞEKİLLER</b>	<b>Sayfa No</b>
Şekil 1. 2002 yılı dünya çapında kanser verileri	4
Şekil 2. 2004 yılı Türkiye’de en çok görülen kanser türleri	5
Şekil 3. Memenin anatomik yapısı	6
Şekil 4. Meme kanseri tipleri	7
Şekil 5. Endotel disfonksiyon	10
Şekil 6. Nitrik oksit sentezi	11
Şekil 7. Nitrik oksit sentezinde rol alan moleküller	12
Şekil 8. Endotel hücreleri tarafından nitrik oksit üretimi	13
Şekil 9. Nitrik oksidin Görevleri	14
Şekil 10. Metillenmiş arginin türevleri	15
Şekil 11. ADMA sentez ve metabolizması	16
Şekil 12. Askorbik asidin kimyasal yapısı	19
Şeki 13. Dehidroaskorbik asidin kimyasal yapısı	20
Şekil 14. Tokoferollerin kimyasal yapıları	21
Şekil 15. Protein standart çalışması regresyon grafiği	27
Şekil 16. Arginin, ADMA ve SDMA için standart HPLC grafiği	33
Şekil 17. Plazma arginin düzeyleri grafiği	34
Şekil 18. Plazma ADMA düzeyleri grafiği	35
Şekil 19. Plazma SDMA düzeyleri grafiği	36
Şekil 20. Doku arginin düzeyleri grafiği	37
Şekil 21. Doku ADMA düzeyleri grafiği	38
Şekil 22. Doku SDMA düzeyleri grafiği	39

## **TABLolar**

Tablo 1. Türkiye’de 1995 yılında tüm yaş gruplarına göre en sık ölüm sebepleri	3
Tablo 2. 1995 yılı verilerine göre dünyada kanser görülme sıklığı	4
Tablo 3. Meme kanseri gelişimindeki kesin ve olası risk faktörler	8
Tablo 4. Endotel hücrelerinden salgılanan maddeler	10
Tablo 5. NOS izoformları	12
Tablo 6. NO’ nun sistemler üzerine etkileri	14
Tablo 7. ADMA’nın yükseldiği durumlar	16
Tablo 8. Mobil faz gradient tablosu	29
Tablo 9. Plazma ve doku ortalama arginin, ADMA ve SDMA düzeyleri	31
Tablo 10. Plazma arginin, ADMA ve SDMA düzeylerinin istatistiksel karşılaştırması	31
Tablo 11. Doku arginin, ADMA ve SDMA düzeylerinin istatistiksel karşılaştırması	32
Tablo 12. Plazma arginin, ADMA ve SDMA düzeyleri	40
Tablo 13. Doku arginin, ADMA ve SDMA düzeyleri	41

## ÖZGEÇMİŞ

13.06.1982 tarihinde İstanbul'da doğdum. İlköğrenimimi Tekirdağ Mehmet Akif Ersoy İlköğretim Okulu'nda, ortaöğrenimimi Tekirdağ Namık Kemal Lisesi'nde, üniversite öğrenimimi 2004 yılında Trakya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde tamamladım. Daha sonra 2006 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Biyoloji Öğretmenliği Tezsiz Yüksek Lisans Programı'nı tamamladım. Halen Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim.

## **EKLER**