

**DOĞU ANADOLU BÖLGESİNDE ERKEN BAŞLANGIÇLI  
İSKEMİK İNME VAKALARI İÇİN BİR RİSK FAKTÖRÜ  
OLARAK ASİMETRİK DİMETİL ARGİNİN,  
NİTRİK OKSİT VE ENDOTELYAL NİTRİK OKSİT  
SENTAZİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Aydın Şükrü BENGÜ**

**Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. M. Sait KELEŞ**

**Doktora Tezi -2014**

T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOĞU ANADOLU BÖLGESİNDE ERKEN BAŞLANGIÇLI  
İSKEMİK İNME VAKALARI İÇİN BİR RİSK FAKTÖRÜ  
OLARAK ASİMETRİK DİMETİL ARGİNİN, NİTRİK  
OKSİT VE ENDOTELYAL NİTRİK OKSİT SENTAZİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Aydın Şükrü BENGÜ

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı  
Doktora Tezi

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Mevlüt Sait KELEŞ

**ERZURUM**  
2014

T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİMDALI

**DOĞU ANADOLU BÖLGESİNDE ERKEN BAŞLANGIÇLI  
İSKEMİK İNME (STROKE) VAKALARI İÇİN BİR RİSK  
FAKTÖRÜ OLARAK ASİMETRİK DİMETİL ARGİNİN, NİTRİK  
OKSİT VE ENDOTELYAL NİTRİK OKSİT SENTAZİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Aydın Şükrü BENGÜ

**Tez Savunma Tarihi** : 11.04.2014

**Tez Danışmanı** : Prof. Dr. Mevlüt Sait KELEŞ (Atatürk Üniversitesi)

**Jüri Üyesi** : Prof. Dr. Eşref Edip KEHA (Karadeniz Teknik Üniversitesi)

**Jüri Üyesi** : Prof. Dr. Abdulkadir YILDIRIM (Atatürk Üniversitesi)

**Jüri Üyesi** : Doç. Dr. Serap YILDIRIM (Atatürk Üniversitesi)

**Jüri Üyesi** : Yrd. Doç. Dr. Nurinnisa ÖZTÜRK (Atatürk Üniversitesi)

**Onay**

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

  
**Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM**  
Enstitü Müdürü

**Doktora Tezi**  
**ERZURUM - 2014**

# İÇİNDEKİLER

<b>TEŞEKKÜR.....</b>	<b>III</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>V</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....</b>	<b>VI</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ .....</b>	<b>VIII</b>
<b>TABLolar DİZİNİ .....</b>	<b>IX</b>
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>5</b>
2.1. İnme .....	5
2.1.1. İnmenin Sınıflandırması.....	6
2.1.2. İskemik İnme.....	7
2.1.3. İnme Biyobelirteçlerinin Gerekliği.....	8
2.1.4. İnmenin Risk Tahmini Ve Tanısı İçin Biyobelirteçler .....	9
2.1.4.1. Fosfolipaz A2 İle Bağlantılı Lipoprotein.....	9
2.1.4.2. Matriks Metaloproteinler 9.....	11
2.1.4.3. Glial Fibriller Asidik Protein.....	13
2.1.4.4. PARK7.....	15
2.1.4.5. Nükleosid Difosfat Kinaz A.....	16
2.1.4.6. Asimetrik Dimetilarginin (ADMA).....	16
2.2. Nitrik Oksit (NO).....	17
2.2.1. NO'nun Sentez ve İnhibisyonu.....	18
2.2.2. NO'nun Fizyolojik ve Fizyopatolojik Etkileri.....	25
2.3. Metilargininler ve Metabolizmaları.....	29
2.4. ADMA .....	30
2.4.1. ADMA'nın Biyolojik Yolları .....	36
2.4.2. ADMA ile İlgili Hastalıklar.....	40
2.4.2.1. Hipertansiyon .....	40
2.4.2.2. Hiperlipidemi .....	41
2.4.2.3. Obezite .....	41
2.4.2.4. Diabetes Mellitus .....	42
2.4.2.5. Metabolik Sendrom .....	43
2.4.2.6. Polikistik Over Sendromu .....	43
2.4.2.7. Hipopitüitarizm.....	43

2.4.2.8. Tiroid Disfonksiyonu.....	44
2.4.2.9. Homosistein.....	44
2.4.2.10. Kardiyovasküler hastalıklar.....	44
2.4.2.11. Multiple Skleroz .....	45
2.4.2.12. Allerjik Hastalıklar.....	45
2.5. Analiz Yöntemleri .....	46
2.5.1. ELISA Yöntemi .....	46
2.5.2. HPLC Yöntemi .....	52
<b>3. MATERYAL VE METOT.....</b>	<b>59</b>
3.1. Materyal.....	59
3.1.1. Vakaların Oluşturulması ve Gruplandırma.....	59
3.1.2. Numunelerin Toplanması.....	59
3.1.3. Kullanılan Cihazlar.....	60
3.2. Metot.....	60
3.2.1. NO Analizi .....	60
3.2.1.1 Reaktiflerin Hazırlanması.....	61
3.2.1.2 Numunelerin Hazırlanması.....	62
3.2.1.3 Standartların Hazırlanması.....	62
3.2.1.4 Çalışma Prensibi.....	62
3.2.2 eNOS Analizi .....	63
3.2.2.1 Reaktiflerin Hazırlanması.....	63
3.2.2.2 Numunelerin Hazırlanması.....	64
3.2.2.3 Analiz İşlemi.....	65
3.2.2.4. Çalışma Prensibi.....	65
3.2.3 ADMA Analizi .....	66
3.3 İstatistiksel Analiz .....	67
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>68</b>
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>80</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>97</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>99</b>
<b>EK-1. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>125</b>
<b>EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU .....</b>	<b>126</b>

## TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmada ve eğitimim boyunca bilgi ve tecrubesinden yararlandığım tez hocam sayın Prof. Dr. Mevlüt Sait KELEŞ'e saygı ve sevgilerimi sunarım.

Ayrıca eğitimim boyunca yakın ilgi ve desteklerini gördüğüm Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ebubekir BAKAN'a, Prof. Dr. Yaşar Nuri ŐAHİN'e, Prof. Dr. Nuri BAKAN'a, Prof. Dr. Fatih AKÇAY'a, Prof. Dr. Hülya AKSOY'a, Prof. Dr. Fatma Zuhul UMUDUM'a, Prof. Dr. Ahmet KIZILTUNÇ'a, Prof. Dr. Abdulkadir YILDIRIM'a ve Yrd. Doç. Dr. Nurunnisa ÖZTÜRK'e; Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilimdalından Yrd. Doç. Dr. İbrahim KAPLAN'a ve Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilimdalından Yrd. Doç. Dr. Hamit Hakan ALP'e, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilimdalından Prof. Dr. EŞref Edip KEHA'ya; tez çalışmam esnasında yardımlarını esirgemeyen bölümdeki tüm asistan, doktora ve yüksek lisans öğrencilerine, bu çalışmayı **134-128-2013 BAP** proje numarası ile destekleyen Bingöl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne ve eğitim hayatım boyunca bana destek olan ailemin tüm fertlerine teŐekkürü bir borç bilirim.

**Aydın Şükrü BENGÜ**

## ÖZET

### **Doğu Anadolu Bölgesinde Erken Başlangıçlı İskemik İnme Vakaları İçin Bir Risk Faktörü Olarak Asimetrik Dimetil Arginin, Nitrik Oksit ve Endotelyal Nitrik Oksit Sentazın Değerlendirilmesi**

**Amaç:** İnme, batı dünyasında iskemik kalp ve kanser hastalığından sonra morbiditenin ve mortalitenin üçüncü nedenidir. Sağ kalan beş hastanın biri daha sonraki 5 yıl içinde tekrar inme geçirmektedir. Bu da sağlık sistemini ve ekonomiyi yoğun bir yüke sokmaktadır. NO, NOS enziminin katalizlediği bir reaksiyon ile sentezlenir. eNOS, NOS enzim ailesinin endotelyal kökenli bir izoenzimidir ve endotel disfonksiyonu ile ilişkisi bilinmektedir. ADMA, insanda NO biyosentezinin majör inhibitörüdür. Bu çalışmanın amacı Doğu Anadolu bölgesinde erken başlangıçlı iskemik inme vakaları için NO, eNOS ve ADMA'nın bir risk faktörü olarak değerlendirilme ihtimallerinin araştırılmasıdır.

**Materyal ve Metot:** Bu çalışma 81 akut iskemik inme hastası ve 50 sağlıklı kontrol grubu üzerinde yürütüldü. Plazma NO ve eNOS analizleri ticari kit kullanılarak ELISA yöntemi ile ADMA analizleri de HPLC yöntemi ile yapıldı.

**Bulgular:** Plazma ADMA ve eNOS düzeyleri iskemik inme hastalarında kontrol grubuna göre daha yüksek, NO düzeyleri daha düşük tespit edildi. İstatistiksel olarak fark sadece eNOS ve NO'da tespit edildi. Hasta ve kontrol grubunda, sırasıyla, eNOS düzeyleri 568.29 pg/mL ve 335.51 pg/mL, NO düzeyleri 58.46 µmol ve 61.22 µmol, ADMA düzeyleri 596.8 nmol/L ve 517.6 nmol/L olarak tespit edildi.

**Sonuç:** Akut iskemik inmeli hastalar daha yüksek plazma ADMA ve eNOS, daha düşük NO düzeylerine sahip olmalarına rağmen, NO düzeyleri ile hastalık arasında anlamlı ilişki tespit edilememiştir.

**Anahtar Kelimeler:** ADMA, ELISA, eNOS, HPLC, İnme, NO

## ABSTRACT

### **Evaluation of Asymmetric Dimethylarginine, Endothelial Nitric Oxide Synthase and Nitric Oxide As a Risk Factor for Early-Onset Ischemic Stroke Cases In Eastern Anatolia Region**

**Aim:** In the western countries stroke is the third leading cause of mortality and morbidity after ischemic heart and cancer. One of the five surviving patients undergoes stroke in the next five years and this brings forth a heavy load on the health system and the economy. NO is synthesized by a reaction catalyzed by the NOS. eNOS is an endothelial isoenzyme of NOS enzyme family and its relation with endothelium dysfunction is well-known. ADMA is the major inhibitor of NO biosynthesis in human beings. The aim of this study is to evaluate ADMA, eNOS and NO as a probable risk factor for early-onset ischemic stroke cases in eastern Anatolia region.

**Material and Method:** This study is carried out with 81 individuals with early-onset ischemic cases and 50 healthy control group. NO and eNOS analysis were done with the ELISA technique and ADMA analysis with the HPLC technique. Commercial kits were used in all of the analyses.

**Results:** Plasma ADMA and eNOS levels were found to be higher in patients with respect to control group, whereas NO levels were lower. Statistically significant difference was only obtained in eNOS and NO levels. For patients and control group eNOS levels were 568.29 pg/mL and 335.51 pg/mL, NO levels were 58.46  $\mu$ mol and 61.22  $\mu$ mol and ADMA levels were 596.8 nmol/L and 517.6 nmol/L, respectively.

**Conclusion:** Although the patients with early-onset ischemic stroke were seen to have a higher plasma ADMA and eNOS and a lower plasma NO level, no significant correlation was found between the disease and NO.

**Key Words:** ADMA, ELISA, eNOS, NO, Stroke



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ADMA</b>	: Asimetrik dimetil arginin
<b>APC-PCI</b>	: Aktive protein C-protein C inhibitör kompleksi
<b>BH4</b>	: Tetrahidriyopterin
<b>BOS</b>	: Beyin omurilik sıvısı
<b>BT</b>	: Bilgisayarlı tomografi
<b>CaM</b>	: Kalmodulin
<b>DDAH</b>	: Dimetilarginin dimetil aminohidrolaz
<b>DHT</b>	: Dipper hipertansiyon
<b>EIA</b>	: Enzyme immuno assay
<b>ELISA</b>	: Enzyme linked immunosorbent assay
<b>eNOS (NOS<sub>3</sub>)</b>	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
<b>EPR</b>	: Elektron paramayetik rezonans
<b>GC-MS</b>	: Gaz kromatografi kütle spektrometresi
<b>GC-MS/MS</b>	: Gaz kromatografi tandem kütle spektrometresi
<b>GFAP</b>	: Glial fibriller asidik protein
<b>GİA</b>	: Geçici iskemik atak
<b>HPLC</b>	: High performance liquid chromatograph
<b>Hsp 90</b>	: Isı şok proteini 90
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	: İnterferon- $\gamma$
<b>IF</b>	: Immuno floresan
<b>iNOS (NOS<sub>2</sub>)</b>	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
<b>İSK</b>	: İntraserebral kanama
<b>LC-MS/MS</b>	: Sıvı kromatografi tandem kütle spektrometresi
<b>L-NAME</b>	: L-nitroarginin metilesteri
<b>L-NMMA</b>	: L-N-monometil arginin
<b>Lp-PLA2</b>	: Fosfalipaz A2 ile bağlantılı lipoprotein
<b>MMA</b>	: Monometil arginin
<b>MMP</b>	: Matriks metalloproteinazlar
<b>MRG</b>	: Manyetik rezonans görüntüleme
<b>NANC</b>	: Nonadrenerjik nonkolinerjik
<b>NDHT</b>	: Nondipper hipertansiyon

<b>NDKA</b>	: Nükloesid difosfat kinaz A
<b>NED</b>	: N- (1-naftil) etilendiamin hidroklorit
<b>NIHHS</b>	: National institutes of health stroke scale
<b>NMDA</b>	: N-methyl-D-aspartate
<b>NSE</b>	: Nöron spesifik enolaz
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>NOS</b>	: Nitrik oksit sentaz
<b>nNOS(NOS<sub>1</sub>)</b>	: Nöronal nitrik oksit sentaz
<b>NR2Ab</b>	: NMDA reseptör antibadi
<b>PRMT</b>	: Protein arginin metil transferaz
<b>RIA</b>	: Radio immuno assay
<b>rtPA</b>	: Recombinant tissue plasminogen activator
<b>SAH</b>	: S-adenozilhomosistein
<b>SAK</b>	: Subaraknoid kanama
<b>SAM</b>	: S-adenozilmetiyonin
<b>SDMA</b>	: Simetrik dimetil arginin
<b>Peek</b>	: Polietiletilketon
<b>SDS-PAGE</b>	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid gel elektroforez

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. NO'ın L-Argininden sentezinin basamakları .....	20
Şekil 2.2. NO sentezinin kofaktörleri.....	21
Şekil 2.3. Endotel hücrelerde NO sentezi .....	22
Şekil 2.4. eNOS (NOS <sub>3</sub> ) sinyalizasyonu .....	23
Şekil 2.5. Arginin ve metilargininler .....	31
Şekil 2.6. ADMA üretimi .....	32
Şekil 2.7. ADMA'nın biyokimyasal yolları .....	38
Şekil 3.1. Griess reaksiyonu ile NO ölçümü .....	61
Şekil 4.1. Plazma NO sonuçları.....	68
Şekil 4.2. Plazma NO sonuçlarının iskemik inme hastası gruptaki dağılımı.....	69
Şekil 4.3. Plazma NO sonuçlarının kontrol grubundaki dağılımı .....	70
Şekil 4.4. Plazma eNOS sonuçları .....	71
Şekil 4.5. Plazma eNOS sonuçlarının iskemik inme hastası gruptaki dağılımı.....	72
Şekil 4.6. Plazma eNOS sonuçlarının kontrol grubundaki dağılımı .....	73
Şekil 4.7. Plazma ADMA sonuçları .....	74
Şekil 4.8. Plazma ADMA sonuçlarının iskemik inme hastası gruptaki dağılımı....	75
Şekil 4.9. Plazma ADMA sonuçlarının kontrol grubundaki dağılımı .....	76

## TABLULAR DİZİNİ

<b><u>Tablo No</u></b>	<b><u>Sayfa No</u></b>
<b>Tablo 2.1.</b> İnmeyi taklit eden klinik durumlar .....	7
<b>Tablo 2.2.</b> NO salımına yol açan sebepler .....	25
<b>Tablo 2.3.</b> ADMA düzeyleri çalışılmış çeşitli hastalıklar .....	35
<b>Tablo 2.4.</b> Farklı ELISA protokolleri .....	50
<b>Tablo 3.1.</b> Kullanılan cihaz ve aletlerin markası ile ilgili firma ve/veya ülke .....	59
<b>Tablo 4.1.</b> Hasta ve kontrol grubundaki NO, eNOS ve ADMA sonuçlarının toplu halde gösterimi .....	77
<b>Tablo 4.2.</b> Gruplara ait güven aralıkları .....	77
<b>Tablo 4.3.</b> Gruplar da Yaş Ortalaması ve HDL, LDL, Glukoz, Toplam Protein, Kreatinin Düzeylerinin tablo halinde gösterimi .....	78
<b>Tablo 4.4.</b> ADMA, eNOS, NO seviyelerinin gruplararası korelasyon dağılımı.....	79

# 1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü inme terimini “ ani gelişen, 24 saat veya daha uzun süren, ölüme yol açabilen damarsal kökenli, fokal veya global serebral fonksiyon bozukluğu ile oluşan klinik bulgular olarak tanımlamıştır”. Travma, enfeksiyon, tümör gibi nedenlere bağlı infarkt veya kanama, serebral iskemiye bağlı geçici ataklar tanımlama dışında bırakılmıştır. Tüm inmelerin %80-85’ini serebral infarkt, %10-15’ini intraserebral hematoma, %6-8’ini subaraknoid kanama oluşturur. İnmede temel özellik nörolojik bulguların ani başlamasıdır.

İnme insidansı; belirli bir zaman periyodunda, bir popülasyonda ortaya çıkan yeni inme olgularının risk altındaki nüfusa bölünmesi ile elde edilen hızdır. İnsidans çalışmalarında ideal sonuçlar elde etmek için; inmenin tanımı iyi yapılmalı, geçici iskemik atak (GİA) dışlanmalı, popülasyon sınırlama yapılmaksızın incelenmeli, ilk atak olmalı, yaşlara göre insidans incelenmeli ve inceleme kayıtları iyi tutulmalıdır.

Yaşlara göre yıllık inme insidansı 55-64 yaş arasında 1.7/1000, 65-74 yaş arasında 4.9-8.9/1000, 75 yaş ve üzerinde 13.5-17.9/1000’dir. Kırk beş yaş öncesi gelişen inmeler tüm inmelerin %3-5’ini oluşturdukları için inme insidansını tahmin etmek güçtür. Erkeklerde 55-64 yaş arasında inme insidansı kadınlara göre 2-3 kat fazla iken ileri yaşlarda bu fark azalmaktadır. Kış aylarında inmenin arttığı görülmektedir.

İnme prevalansı; belirli bir zamanda bir popülasyondaki eski ve yeni olgu sayısının risk altındaki nüfusa bölünmesiyle elde edilen bir orandır. İnme insidansına ve yaşayabilen hastalara bağlı olan bu oran yaşla birlikte artmaktadır. Batı toplumunda inme prevalansı 8/1000 olarak bildirilmiştir. Henüz bizim ülkemizde sağlıklı veriler yoktur. Son on yılda yapılan çalışmalarda batı ülkelerinde inmeye bağlı ölüm oranının azaldığı ifade edilmektedir. İnmeye bağlı ölümlerin azalması ortalama yaşam süresinin uzamasına ve inme, insidansının azalmasına bağlanmaktadır.

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar inme sonrası yaşam oranında yükselme olduğunu göstermektedir. Ancak iskemik inmelere oranla intraserebral kanamalar sonrasında yaşam oranı daha yüksektir. Bu nedenle iskemik inmelerde öncelikle risk faktörlerinin belirlenmesi ve korunmaya yönelik çalışmalara gerek duyulmaktadır.

İnme, tüm dünyada, morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenlerindedir. Doğu ve Batı Avrupa arasında inme sıklık, yaygınlık ve mortalitesi bakımından büyük farklar saptanmıştır. Bu, risk faktörlerindeki farklılığa bağlanmaktadır. Doğu Avrupa'da hipertansiyon ve diğer risk faktörlerine daha fazla rastlanması daha ağır inme tablolarına yol açmaktadır. Batı Avrupa'nın içinde de belirgin bölgesel farklılıklar yer almaktadır. İnme, Avrupa'daki morbidite ve uzun vadeli özürülüğün en önemli sebebi olup, demografik değişiklikler, hem sıklık, hem de yaygınlıkta artışla sonuçlanacaktır. İnme aynı zamanda yaşlılardaki epilepsinin, demansın ve depresyonun da en sık nedenleri arasında gösterilmektedir.

Geniş çaplı şekilde inme, iskemik veya hemorajik tipler olarak sınıflandırılır ve iskemik strok total oranın %85'ini oluşturur.

Endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) olarak da bilinen nitrik oksit (NO) eşleşmemiş bir elektron taşıyan yüksüz bir moleküldür. NO' in bu özelliği onu eşsiz bir mesajcı yapar. Yani yüksüz olduğu için membranlardan kolayca geçer, eşleşmemiş bir elektrona sahip olması nedeni ile hızlı reaksiyona girer. Yarı ömrü saniyelerle ölçülür ve çok kısadır. Endotelyal gevşetici faktör varlığı ilk olarak 1980 yılında tavşan aort halkasında sağlam bir endotel varlığında asetilkoline gevşeme şeklinde yanıt verilmesiyle fark edilmiştir. NO, nitrik oksit sentaz (NOS) enziminin katalizlediği bir reaksiyon ile L-argininden sentezlenir.

Memelilerde NO sentezleyen üç değişik NOS vardır. Nitrik oksit sentaz enzimleri, yapısal nitrik oksit sentaz (cNOS), endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ve indüklenbilir nitrik oksit sentaz (iNOS) olmak üzere üç ana gruba ayrılır.

NO'in vasküler düz kas proliferasyonuna, trombosit agregasyonu ve vasküler süperoksit üretimine olumlu etkileri olduğu gibi antiaterosklerotik özellikleri de vardır.

Arginin ve asimetrik dimetil arginin (ADMA), nitrik oksit sentezinin kontrolünde önemli rol oynarlar. Nitrik oksit vasküler tonusun düzenlenmesinde platelet adezyon ve agregasyonunda rol oynar. Simetrik dimetilargin (SDMA)'nin NOS enzimi üzerine inaktive edici etkisi yoktur, fakat arginin ve ADMA ile hücre giriş yolunu etkileyerek NO üretim hızında dolaylı yoldan etkisi vardır. ADMA, SDMA ve L-NMMA (L-N-Monometil arginin), Y taşıyıcı protein adı verilen katyonik aminoasit taşıyıcıları aracılığıyla endotelial hücrelerin içine girerler. Metilargininler birbirleriyle ve arginin aminoasidi ile hücre içine giriş için yarışır. Yüksek konsantrasyondaki ADMA, NOS inhibisyonu yanı sıra L- Argininin hücre içine transportunu engelleyerek de NO sentezi azaltır

L-NMMA ve ADMA olmak üzere iki tip endojen NO sentetaz inhibitörü vardır. Dolaşan konsantrasyonu L-NMMA'dan 10 kat fazla olan ADMA, insanda NO biyosentezinin major inhibitörüdür. ADMA metillenmiş nükleer proteinlerin proteolizi sırasında ortaya çıkan aktif bir moleküldür. SDMA ise biyolojik olarak inaktiftir. ADMA esas olarak böbrek yoluyla atılır ve ADMA birikimi ilk olarak renal yetmezlikli hastalarda bildirilmiştir.

Buna ilaveten plazma ADMA düzeyleri ile hiperlipidemi, hipertansiyon, obezite, diabetes mellitus, metabolik sendrom, polikistik over sendromu, Hipopitüitarizm, tiroid disfonksiyonu ile ilişkili olduğuna dair bir çok çalışma mevcuttur. Hatta beslenme, sigara, egzersiz gibi etkenlerle de ilişkisi son dönemde ilgi görmektedir.

Bu doktora tez çalışmasında önemli bir morbidite oranına sahip akut iskemik inmede plazma ADMA ile beraber NO ve eNOS düzeylerinin bir risk faktörü olup olmayacağı araştırılmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 İnme

Dünya Sağlık Örgütü inme terimini “ ani gelişen, 24 saat veya daha uzun süren, ölüme yol açabilen damarsal kökenli, fokal veya global serebral fonksiyon bozukluğu ile oluşan klinik bulgular olarak tanımlamıştır”.<sup>1</sup>

İnme, tüm dünyada, morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenlerindedir.<sup>2</sup> Doğu ve Batı Avrupa arasında inme sıklık, yaygınlık ve mortalitesi bakımından büyük farklar saptanmıştır. Bu, risk faktörlerindeki farklılığa bağlanmaktadır.<sup>3</sup>

Doğu Avrupa’da hipertansiyon ve diğer risk faktörlerine daha fazla rastlanması daha ağır inme tablolarına yol açmaktadır. Batı Avrupa’nın içinde de belirgin bölgesel farklılıklar yer almaktadır. İnme, Avrupa’daki morbidite ve uzun vadeli özürülüğün en önemli sebebi olup, demografik değişiklikler, hem sıklık, hem de yaygınlıkta artışla sonuçlanacaktır. İnme aynı zamanda yaşlılardaki epilepsinin en sık nedeni olup, demansın ikinci en sık, depresyonun da sık nedenleri arasındadır.<sup>4-6</sup>

İnme, batı dünyasında iskemik kalp, kanser hastalığından sonra morbiditenin ve mortalitenin önde gelen üçüncü nedenidir. Global olarak 50 milyondan fazla inme ve geçici iskemik atak (GİA) vardır. Sağ kalan her beş hastadan biri daha sonraki 5 yıl içinde tekrar inme geçirmektedir, bu da sağlık sistemini ve ekonomiyi yoğun bir yüke sokmaktadır.<sup>7</sup>

En son yapılan tahminler inmenin dünya çapındaki direk ve indirek ekonomik maliyetini yaklaşık 70 milyon dolar olarak göstermektedir.<sup>8</sup> Tek başına ABD’de 5-6 milyon inme sağkalanının olduğu tahmin edilmektedir. Ancak bunların maliyeti tahmin edilenlerden çok daha fazladır. İnme sağ kalanlarının % 15-30 arasında sürekli sakatlık varken, kurbanların % 20’si inme sonrası 3 ay boyunca klinik bakımına ihtiyaç duymaktadır.<sup>8-9</sup> Popülasyondaki bütün yaşlar inme açısından risk altındadır ve hastalık

yaşlıların hastalığı olarak sınırlandırılmamalıdır, çünkü kurbanların üçte biri 65 yaşının altındadır. İnme açısından siyahlar beyazlara göre 2 kat, kadınlarda erkeklere göre daha fazla risk altındadırlar. ABD’de 2005 yılında inmeye bağlı ölümlerin %60.6’sını kadınlar oluşturmakta idi; insidansdaki artışın birincil nedeni uzamış yaşam süresidir.<sup>8</sup> Bununla birlikte, miyokardial enfarktüs, koagulopatiler, periferik vasküler hastalık, hipertansiyon, atrial fibrilasyon veya diabetes mellitusu içeren vasküler ve inflamatuvar risk faktörleri eğer hastada daha önceden veya aynı anda varsa, bu hasta aynı zamanda inme açısından da risk altındadır.<sup>8-10</sup>

Son yirmi yılda yapılan çalışmalarda batı ülkelerinde inmeye bağlı ölüm oranının azaldığı ifade edilmektedir. İnmeye bağlı ölümlerin azalması ortalama yaşam süresinin uzamasına katkıda bulunmaktadır.<sup>11</sup>

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar inme sonrası yaşam oranında yükselme olduğunu göstermektedir. Ancak iskemik inmelere oranla intraserebral kanamalar sonrasında yaşam oranı daha yüksektir. Bu nedenle iskemik inmelerde öncelikle risk faktörlerinin belirlenmesi ve korunmaya yönelik çalışmalara gerek duyulmaktadır.<sup>12</sup>

Sigarasız, düşük-normal beden kitle endeksi, düzenli egzersiz ve sağlıklı diyeti içeren bir yaşam tarzı iskemik inmede azalmaya sebep olur.<sup>7</sup>

### **2.1.1. İnmenin Sınıflandırılması**

İnme terminolojisi tromboz, emboli ve hemorajiyi içeren fizyopatolojik durumların yaygın bir kompozisyonudur. Geniş çaplı şekilde inme, iskemik veya hemorajik tipler olarak sınıflandırılır ve iskemik inme total oranın %85’ini oluşturur.<sup>8-10</sup>

### 2.1.2. İskemik İnme

İskemik İnme, primer olarak ya intrakranial tromboz veya ekstrakranial tromboz ile oluşur.

İntrakranial tromboz; büyük oranda ateroskleroz nedeni ile olurken, ekstrakranial emboli genellikle ya ekstrakranial arterlerden yada aynı anda hastada olan miyokardial enfarktüslü miyokardiumdan, mitral stenozdan, endokarditten, atrial fibrillasyondan, dilate kardiyomiyopatiden veya konjestif kalp yetmezliğinden kaynaklanmaktadır. Hemorajik inme ya intraserebral kanama (İSK) ya da subaraknoid kanama (SAK) olarak sınıflandırılabilir. İSK yırtılmış ve parenkimal serebral boşluk içinde lokalize hematom oluşturan zayıflamış damarlardan kaynaklanır. SAK'da kanama beynin dışına olur ve BOS (Beyin omurilik sıvısı) içine salınır. Hem İSK hem de SAK için genel nedenler benzerdir ve bunlar hipertansiyon, travma, ilaç kullanımı veya vasküler malformasyonları içerir.

**Tablo 2.1.** İnmeyi taklit eden klinik durumlar<sup>10</sup>

---

---

Nöbet
Hipoglisemi
Hiponatremi
Migren
Beyin Tümörü
Subdural hematom

---

---

GİA, “mini inme” olarak da bilinir, iskemik inmeye benzeyen fokal nörolojik defisitlere neden olabilir ama süreç olarak 24 saatten kısa sürmesi ile tanımlanmaktadır.<sup>12</sup> Bununla birlikte, GİA’ların çoğu bir saat içinde çözülür ve % 90’ını dört saat sonra tamamen düzelir.<sup>13, 14</sup> Bu yüzden, the ‘American Heart Association’ GİA’yı zamandan ziyade, enfarkt oluşmadan santral sinir sistemi doku iskemisinin geçici epizoduna göre GİA tanımlanmasını önermiştir. GİA’lar tam iskemik inme, kardiyovasküler olaylar ve ölüm için kısa dönem risklerin kuvvetli bir öngörücüsü olduğu için, bu tanımlama tartışmalı olmasına rağmen GİA’nın hızlı ve doğru tanısı değerlidir. Bu risk trombolitik terapilerin erkenden başlanması ile azaltılabilir.<sup>12-14</sup>

Sonuç olarak “inmenin taklitleri” inmenin semptom ve bulgularını taklit eden anomaliler için kullanılabilir (Tablo 2.1). En sık inmeyi taklit eden durumlar, hipoglisemi ve nöbettir, bu iki klinik durumla acilde sık karşılaşılır. İnme kurbanlarında optimal sonuçlarını elde etmek için, gerekli olan hızlı tanı ve tedavi, inme taklitçileri nedeni ile zorlaşmaktadır.<sup>7</sup>

### **2.1.3. İnme Biyobelirteçlerinin Gerekliği**

Serebral enfarkt biyobelirteçleri özellikle nörogörüntüleme bulguları normal veya benzer olan zor inme olgularında inmenin prediksyonunu ve ayırıcı tanısında potansiyel olarak uyarıcı veya kolaylaştırıcıdır. Biyobelirteç keşfetmedeki zorluklar, inme veya travmatik yaralanmadan sonra kan-beyin bariyerini geçen glial veya nöronal proteinlerin yavaş salınımı etrafında dönmektedir. Ayrıca, serebral iskemi belirteçlerinin tanısal spesifiteleri azalır ve inmeyi taklit eden durumlarda da artmaktadırlar. İdeal inme biyobelirteçleri tanısal olarak enfarkta sensitif ve spesifik olmalı, iskemi ve hemoraji arasında ayırımı yapabilmeli, erken dönemde salınmalı ve enfarktan hemen sonra stabil olarak salınmalı, öngörülebilir bir klirensi olmalı, risk

değerlendirme potansiyeli olmalı, terapilere kılavuzluk etmeli ve uygun maliyetli metotlar tarafından kantitatif olarak ve hızlıca ölçülebilmelidir. Akut inme açısından hasta sonuçlarının düzelmesi için inmenin hızlı ve doğru tanısı yapılmalıdır ve inmenin hem önceden tahmininde hem de tanısında inme biyobelirteçleri potansiyel olarak yardımcı olabilirler.<sup>7</sup>

## **2.1.4. İnmenin Risk Tahmini Ve Tanısı İçin Biyobelirteçler**

### **2.1.4.1. Fosfolipaz A2 İle Bağlantılı Lipoprotein**

Fosfolipaz A2 ile bağlantılı lipoprotein (Lp-PLA2) okside fosfolipidleri hidrolize ederek okside yağ asitlerini ve proinflatuar lizofosfatidilkolini salan bir 50-kDa'luk kalsiyum-bağımsız serin lipazdır.<sup>15</sup> Lp-PLA2; LDL'ye bağlanır ve bununla sirküle olur ve özellikle küçük dansiteli LDL parçacıklarına bağlanır. Lp-PLA2; glikolizasyonun yaygınlığına bağlı olarak ayrıca küçük dansiteli HDL partiküllerine de bağlanabilir ve bu sayede antiaterojenik olduğu düşünülmektedir. Lp-PLA2 makrofaj zengin aterosklerotik lezyonlarda üretilip, eksprese edilmektedir ve ilerlemiş koroner lezyonlarda oldukça fazla oranda upregüle edilmektedir. Amerika Gıda ve İlaç Bakanlığı (FDA); koroner kalp hastalığı ve inmede uzun dönem prognostik risk açısından Lp-PLA2 kullanımını onaylamıştır, bu inme oluşumunda iki kat artışı ve nüks durumlarında ise artış oranı 2.54'ü göstermektedir.<sup>16, 17</sup> Lp-PLA2 çeşitli büyük klinik çalışmaların sonuçlarına dayanan iskemik inme olaylarının bağımsız prediktörü ve kardiyovasküler riskin bağımsız inflamatuar belirteçi olarak ortaya çıkmıştır. Plazma Lp-PLA2 konsantrasyonu ve iskemik inme riski arasındaki pozitif birliktelik 55 yaşın üzerindeki 8000 erkek ve kadından oluşan bir retrospektif prospektif çalışma olan Rotterdam çalışmasında gösterilmiştir. Bu kohortta, iskemik inme 6.4 yıllık ortalama takip süresi boyunca 110 hastada olmuştur ve yaş/cinsiyet düzeltilmiş tehlike oranı Lp-

PLA2 aktivitesinin ilk ve 4. çeyreklerinde 2.0 olarak tespit edilmiştir.<sup>17</sup> Alternatif lipid parametreleri (total kolesterol ve non-HDL kolesterol) kontrol ve inme hastalarında benzer bulunmuştur. Benzer düzenleme ile The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) çalışmasında 6 yıllık takip sırasında inme ve kontrol grupları arasında önemli derecede temel plazma Lp-PLA2 farkları olan (sırası ile 443 ve 374 µg/L, p<0.001) toplam 194 iskemik vaka tanımlanmıştır. Lp-PLA2 ve C-reaktif protein (CRP) konsantrasyonları bu çalışmada inme riskinin tanımlanmasında tamamlayıcı rolleri vardı. Üçüncü sıradaki Lp-PLA2'li (yaklaşık 422 µg/L) ve CRP >3 mg/L hastalarda iskemik inme riski Lp-PLA2'si ilk sıradaki (<310 µg/L) ve CRP <1mg/L'lı hastalardan 1 kat çok daha fazla idi. LDL kolesterolün konsantrasyonuna bakılmaksızın, Lp-PLA2 inmeyi bağımsız şekilde predikte etmiştir, bu da her ne kadar Lp- PLA2'nin LDL partiküllerince taşınsa bile bunların bulunmasının tek başına LDL'den daha farklı bir risk taşıdığını düşündürmektedir.<sup>18</sup>

Kadın Sağlığı Girişimi'nin (WHI) çalışması ABD'de yapılan 40 değişik klinik merkezde düşük riskli postmenopozal kadınlarda iskemik inmenin prospektif riskini değerlendirmiştir.<sup>19</sup> Gerçekten de bu populasyonda, rastlantısal inme riski artmış Lp-PLA2'li kontroller (929 inmeye karşı 935 eşleşmiş kontroller, P<0.003) ile karşılaştırıldığında daha fazla olduğu tespit edilmiştir.<sup>20</sup> Bununla birlikte, iskemik inmenin riskinde her bir standart hata için relatif risk oranı 1.07 olarak bulunmuştur. Ayrıca, diğer çalışmaların aksine, inme riski ile artmış CRP konsantrasyonu arasında herhangi bir ilişki yoktu. Lp-PLA2 ölçümleri ne kitleyi ne de aktiviteyi ölçer ve çalışmalarda hangi ölçümün kullanıldığı ile ilgili çok az birliktelik vardır. Şu anda tek bir şirket Lp-PLA2 için FDA onaylı kitini satmaktadır ve bütün aktivite kitleri sadece araştırma amaçlı olarak kullanılmaktadır. Lp-PLA2; kit ile ve aktivite ile tam olarak olmasa da ilişkili olup, bu muhtemelen aktivite kitlerinde kullanılan substratlardaki

değişkenliği nedeniyledir. Aktivite kitlerindeki sonuçlar substrata bağlıdır ve kullanılan substrat ile diğer plazma fosfolipazlarının karşılıklı etkileşimi açık değildir; potansiyel analitik değişkenin bu kaynağı çok iyi tanımlanmamıştır. Ancak, Lp-PLA2 kitle kitinin kendi analitik sorunlarının olabileceğini belirtmekte fayda vardır. Belki de günümüzdeki üçüncü kuşak kitlerin bilinmeyen instabilitesiyle bağlantılı olarak, kit ile ölçümlerini kullanan çalışmalar değişik sonuçlar çıkarmıştır. Eğer Darapladib gibi oral inhibitörleri kullanarak Lp-PLA2'yi azaltma stratejilerinin, inme ve kardiyovasküler risk azalmasında faydalı olduğu kanıtlanır ise kitle ve aktivite kitlerinin standartizasyonunun gerçekleşmesi kritik olacaktır. Her ne kadar full analitik karakterizasyon Lp-PLA2'yi optimal klinik kullanıma getirmek için gerekli ise de, mevcut kanıtlar inme riskinin predikasyonu için potansiyel olarak önemli bir belirteçi göstermektedir.<sup>7</sup>

#### **2.1.4.2. Matriks Metalloproteinler 9**

Matriks metalloproteinazlar (MMPler) ekstraselüler matriks proteinlerinin turnover ve yıkımından sorumlu çinko ve kalsiyum bağımlı endopeptidazların bir ailesidir. Doku yeni modellenmesi, inflamasyonda, anjiogenesizde ve tümör hücresi metastazında MMP aktivitesinin regülasyonu önemlidir.<sup>21, 22</sup> Zimojen olarak sekrete olunan (pro-MMPler) MMP'ler değişik proteinazlar tarafından aktive olunurlar ve bunların aktivitesi metalloproteinazların doku inhibitörleri ve  $\alpha$  2-makroglobulinin karşılıklı etkileşimi ile regüle edilirler. MMP-9'un serebral doku ekspresyonu normal olarak tespit edilemeyecek kadar minimaldir, ama MMP-9'da artış iskemik beyin dokusunda 16 yıl önce keşif edilmiştir.<sup>23, 24</sup> MMP-9'un up regülasyonu yaralanmaya cevap olarak beyinde gerçekleşir ve hemostazı devam ettirebilmek için gerekli olan ekstraselüler matriks proteinlerinin yıkılması ile inmede santral patolojik rol oynadığı

tahmin edilmektedir. İnmenin gerçekleşmesinden sonra, kontrolsüz MMP ekspresyonu ve aktivitesi proteolize ve bu da kan beyin bariyerinin sızdırmasına ve hücre ölümüne neden olduğu sanılmaktadır.<sup>25-28</sup>

MMP-9'un salınım şekli tam olarak ortaya konmamıştır ama bundaki artışlar acil servise başvurduktan sonra sağlıklı kişilerle karşılaştırıldığında hem iskemik hem de hemorajik inmede görülmektedir bu da salınımdan tespitine kadar göreceli olarak kısa bir zaman periyodunun (saatler) olduğunu düşündürmektedir.<sup>29, 30</sup> Akut MMP-9 konsantrasyonları enfarktın boyutu, kötü nörolojik sonuç ve hemoraji transformasyon komplikasyonları ile bağlantılı olduğu değerlendirilmektedir.<sup>29, 31, 32</sup> Hastaneye kabulde değerlendirilen MMP-9 konsantrasyonları difüzyon-ağırlıklı MRG ile ölçülen enfarkt hacminin bir prediktörü olarak tanımlanmıştır ve biyobelirteç inme lezyonun büyümesi hatta trombolitik terapinin daha fazla uygulanması ile daha fazla korele olduğu tespit edilmiştir.<sup>33, 34</sup> Ayrıca, hipotermi gibi diğer terapilerle başlangıç çalışmasının karşılaştırılması, MMP-9 konsantrasyonunun rtPA(recombinant tissue Plasminogen Activator) alan hastalarda arttığını düşündürmüştü bu da muhtemel "washout" (yıkama) fenomeni düşündürmüştür.<sup>35</sup> Yeni olarak yapılan bir çalışma rtPA ile tedavi edilen inme hastalarında kan MMP-9 konsantrasyonunun bu tedaviyi almayanlara göre oldukça arttığını teyit etmiştir.<sup>36</sup> İskemik inme sırasında zararlı MMP'nin etkilerinin hipotezi ile uyumlu olarak, hiperakut MMP-9 kan konsantrasyonu rtPA uygulamasından sonra daha fazla hemorajik komplikasyonların bir prediktörü olarak ortaya çıkmıştır.<sup>33</sup> Teknik olarak bütün MMP-9 kitleri standartize olmamış enzim immünoassaydir; bu yüzden cut off'lar ve analiz karakteristikleri bir çalışmadan diğerine farklılık gösterebilmektedir.

İnme patogeneğinde MMP-9'un muhtemelen ikili rolü vardır, bunlardan birincisi inme sonrası kan-beyin bariyerinin bozulması, nöronal hücre ölümü ve hemoraji, ikincisi ise doku tamiri fazından sonraki nörovasküler remodelling ve beyin



rejenerasyonu sırasındaki iyileşme rolüdür. Deneysel ve klinik veriler MMP'lerin ilerde işe yarayabileceğini ve edip etmediğini değerlendirilmiştir. Sadece 25 hastanın NR2Ab (NMDA receptor antibody) preoperatif konsantrasyonu yaklaşık 2.0 µg/L idi, ama 25 hastanın 24'ünde postoperatif olarak 48 saat içinde nörolojik komplikasyon gelişmiştir. Bu yüzden, NR2Ab yüksek riskli kişilerde nörolojik olayların predikasyonu için kullanışlı olabilir. Otoantikörlerin prodüksiyonu için *in vivo* belli bir zamana ihtiyaç vardır ve inme semptomlarının başlamasından sonra potansiyel olarak serum NR2Ab ölçümünün hemen değerlendirilmesini sınırlandırmaktadır. Bu nedenle, NR2 peptid fragmanları iskemik olay sonrası fragmanlar hemen oluştuğu için daha uygun bir hedef olabilirler. NMDA reseptör kitleri ilerde inme biyobelirteçleri için önde gelenlerdendir ve çalışmanın çoğaltılması daha büyük fazla sayıda çalışma ile sonuçlanacaktır ve bu da potansiyel önyargıların eliminasyonu için gereklidir.<sup>7</sup>

#### **2.1.4.3. Glial Fibriller Asidik Protein**

Glial fibriller asidik protein (GFAP) beyin astrositlerine spesifik monomerik bir filament proteindir.<sup>37</sup> Her ne kadar GFAP'nin tam olarak rolü bilinmese de, değişik nöronal hücresel işlemlerde görevlidir ve kısmen kan-beyin bariyerinde nöronal fonksiyonlardan sorumludur. GFAP ile ilgili ilk başlangıç çalışmaları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında pik konsantrasyonun semptomların başlamasından sonra iki ile dördüncü günlerde olduğunu ve iskemik stroklu hastalarda serum konsantrasyonlarında artış tespit edilmiştir.<sup>38-40</sup> GFAP'nin uzamış sensitivitesi ve spesifitesi inme ayırıcı tanısında bunun kullanımının mümkün olabileceğini düşündürmüştür, İSK başlaması tipik olarak hızlı olduğu için, herhangi bir parenkimal yaralanma astroglial hücrelerden GFAP'nin salınımı ile sonuçlanır.

Foerch ve arkadaşları tarafından yapılmış olan bir prospektif çalışma inme semptomlarının başlamasından 6 saat içinde hastaneye kabul edilen 135 hastada yapılmıştır. Kan örnekleri hastaneye gelir gelmez alınmış ve hastaların MRG ve bilgisayarlı tomografi (BT) görüntülerine göre iskemik veya hemorajik inme tanıları konmuş. Otomatik enzim immünoassay kullanarak, serum GFAP İSK'lı hastaların %81 inde tespit edilirken iskemik inmeli hastaların sadece %5 inde tespit edilmiştir. Ek olarak, serum GFAP konsantrasyonları İSK hastalarında çok daha fazla olduğu ve ortalama kayıtlı edilen değer iskemik stroklu hastalar için 111.6 ng/L ye karşı 0.4 ng/L idi ( $p<0.001$ ). 2.9 ng/L'lik cutoff'da, İSK ve iskemik inme ayırımı için GFAP'nin tanısal sensitivitesi %79 iken spesifitesi %98 olarak bulunmuştur ( $p<0.001$ ).<sup>37</sup> Aynı grupta daha sonra yapılan bir çalışmada, GFAP için fırsat penceresi İSK ve iskemik inme arasında ayırımı yapmak için inme semptomlarının başlamasından sonraki 2-6 saat arasında olması gerektiği tespit edilmiştir.<sup>38</sup> Bu zaman çerçevesinde tanısal doğruluk %83-%88 arası idi. GFAP semptomların başlamasından 0-2 saat arasındaki tanısal değerinin düşük olduğu gösterilmiştir, ancak hastaların küçük bir oranı bu zaman diliminde hastaneye kabul edildi veya triaj edildi. S100 $\beta$ , nöronspesifik enolaz (NSE), GFAP ve aktive protein C-protein C inhibitör kompleksi(APC-PCI)'nin 97 inme hastasından oluşan kohort çok merkezli değerlendirilmesi GFAP'nin iskemik inmeden İSK'yı ayırabileceğini gösterilmiştir ( $p=0.005$ ) ve bununla ilgili herhangi bir sonuç S100 $\beta$  ( $P=0.13$ ) ile NSE ( $P=0.67$ ) ile veya APC-PCI ile ( $P=0.84$ ) gözlemlenmemiştir. GFAP ile APC-PCI'nin NIHSS skoru ile kombinasyonu tanısal bir sensitivite ve %100'lük negatif prediktif değer sağlamıştır ve bu da İSK'nin hızlıca dışlanması ve potansiyel olarak erken dönemde rtPA'nin başlamasını sağlamaktadır.

GFAP için mevcut olan tek kit enzim immünoassayler olup bunlar da şimdilik standardize edilmemişlerdir. GFAP ilginç ön klinik gözlemler göstermiştir ve bu da bunun hemorajik inmede bir belirteç olabileceği savını kuvvetlendirmektedir.<sup>7</sup>

#### **2.1.4.4. PARK7**

PARK7 (DJ-1 olarakta bilinir) protein ilk olarak bir onkojen olarak tanımlanmıştır ve daha sonra Parkinson hastalığı ile bağlantılı otozomal resessif gen olarak tanımlanmıştır.<sup>41, 42</sup> PARK7'nin mekanistik karışıklığı bilinmemektedir ama günümüzdeki hipotezler bunun nörolojik oksidatif stres hasarında ve işlemlerdeki tamir rolünde etkin olacağı şeklindedir. Lescuyer ve arkadaşları PARK7 geninin ölüm öncesine göre karşılaştırıldığında artmış olan ölüm sonrası BOS proteinin kohortunda tanımlamıştır.<sup>43</sup> ELİSA tekniği kullanılarak plazma PARK7 konsantrasyonlarının analizi, semptomların başlamasından sonraki 30 dakika ile 3 saat arasındaki herhangi bir yerde olan artmış konsantrasyonu ile inme hastalarında kontrolle karşılaştırıldığında önemli derecede artış tespit edilmiştir ( $p < 0.001$ ). 14.1 µg/L lik bir PARK7 cut off kullanarak tanısal sensitivitesi %54, spesifitesi %90 olan sonuç elde edilmiştir. Fakat PARK7'nin artması inme tiplerini ayırmada yeterli olamamaktadır (iskemik, hemorajik veya GİA); böylelikle artmış bir sonuç İSK tanısını görüntüleme ile daha fazla dışlamadan rtPA'nin hızlı şekilde başlanmasına izin vermemektedir. Akut klinik açısından PARK7'nin performansını optimize ve analiz edecek daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.<sup>7</sup>

#### **2.1.4.5. Nükleosid Difosfat Kinaz A**

Nükleosid difosfat kinaz A (NDKA) enzimleri değişik nükleosid difosfatlar arasındaki fosfatların değişimini katalize eder. NDKA nöronlarda eksprese edilir ve inme sonrası iskemik kaskadda görev aldıklarına inanılır. NDKA, PARK7 ile birlikte tanımlanmış ve çalışılmıştır, benzer araştırma grubunca ELİSA ile analiz edilmiştir.<sup>44</sup> PARK7'ye benzer şekilde, plazma NDKA konsantrasyonları semptomların başlamasından sonra artmıştır. NDKA'nın bildirilen tanısal sensitivitesi PARK7 ile karşılaştırıldığında hafifçe düzelmiştir (%67). Yukarıda anılan diğer biyobelirteçlere benzer şekilde, tanısal sensitivitesinin eksikliği inme hastalarında NDKA'nın kullanımı zorlaştırmaktadır; bununla birlikte NDKA'nın mükemmel spesifitesi bir multibelirteç paneli yapılacak çalışmalarla desteklenebilir.<sup>7</sup>

#### **2.1.4.6. Asimetrik Dimetilarginin (ADMA)**

Metilargininler, L-argininin posttranslasyon metilasyonu ile sentez edilirler ve proteoliz sonrası dimetilargininler olarak salınırlar. Asimetrik dimetilarginin (ADMA) ve simetrik dimetilarginin (SDMA) kan, idrar ve BOS'da tespit edilebilir.<sup>7</sup>

SDMA; inaktif iken, ADMA geniş çaplı olarak endotelial disfonksiyona neden olan nitrik oksit sentazın potent bir inhibitörüdür. Bu yüzden, artmış plazma ADMA'nın inme riskinin predikasyonu için bir belirteç olduğu düşünülmekte ve hipertansiyon,<sup>45-47</sup> diyabet,<sup>48</sup> hiperhomosisteinemi,<sup>49, 50</sup> sol ventriküler hipertrofi ve hiperkolesterolemiyi içeren klasik diğer kardiyovasküler risk faktörleri ile ilişkilidir. ADMA düzeyleri; ELİSA veya HPLC, LC-MS/MS ile diğer yapısal izomerlerden ADMA'nın ayrılmasını sağlayan metotlar ile hassas şekilde analiz edilebilmektedir. Birçok klinik çalışmalar, plazma ADMA'nın inme riski ile korele olduğunu göstermektedir. Yoo ve Lee, 52 inme hastası ve 36 sağlıklı kontrolü değerlendirmiş, sonuçta da nüks inme (ortalama: 2.28

$\mu\text{mol/L}$ ), başlangıç inme (ortalama:  $1.46 \mu\text{mol/L}$ ) ve kontrol arasında ADMA konsantrasyonlarında önemli farklılıklar saptamışlardır. Kontrol grubunun 90. persentilinin ( $>1.43 \mu\text{mol/L}$ ) üzerine çıkması çalışılan yaşlı populasyonda inme riskini artırmıştır.<sup>51</sup> Göteburgda 880 kadın hastada yapılan bir populasyon çalışması yapılmış ve 24 saat boyunca ADMA'da hafif bir artış ( $0.15 \mu\text{mol/L}$ ), miyokardial ve inmede %30 artışa eşlik ettiği ve üstteki beşlik dilim değer ADMA konsantrasyonları (yaklaşık  $0.71 \mu\text{mol/L}$ ) en büyük relatif risk (RR) ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir.<sup>52</sup> Bununla birlikte The Framingham Offspring çalışması aynı anda nörogörüntüleme çalışması bulunan 1013 hastada plazma ADMA konsantrasyonlarını değerlendirmiştir. ADMA bağımsız olarak MRG anormalliklerin artmış prevalansı ve inme için önemli bir risk oluşturan klinik semptomların yokluğundaki lezyonlar ile birlikte tespit edilmiştir.<sup>7</sup>

Sonuç olarak, ADMA kardiyovasküler mortalite, endotelial disfonksiyon ve inme riski ile ilişkili yeni bir biyobelirteç olacak gibi gözükmemektedir ancak bunun klinik kullanımda geçerli olması için daha fazla çalışmaya ve metodun geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

ADMA; günümüzde ELİSA, HPLC, GC-MS/MS ve LC-MS/MS gibi çeşitli analitik metodlarla yüksek hassasiyette analiz edilebilmektedir.<sup>53</sup>

Bu doktora tez çalışmasında ADMA ölçümü için ticari kit eşliğinde ters faz HPLC metodu kullanıldı.

## **2.2. Nitrik Oksit (NO)**

1980'de Furchgott ve Zawadzki, endotel hücrelerinde asetilkolin uyarısı ile sentezlenen ve damar düz kaslarında gevşemeye yol açan bir maddenin varlığını gösterdiler. Bu madde endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) olarak adlandırıldı.<sup>54</sup> 1987 yılında Palmer ve arkadaşları vasküler endotel hücrelerden nitrik oksit (NO) adlı

gevşemeye yol açan bir madde salındığını, bu maddenin etkilerinin EDRF'den farklı olmadığını bildirdiler.<sup>55</sup> Günümüzde EDRF ve nitrik oksit aynı madde olarak kabul edilmektedir. Son dönemlere kadar fizyolojik bir ileti molekülü olarak bilinen NO'nın artık sinir sistemi, kardiovasküler sistem ve immün sistemde major bir düzenleyici molekül olduğu bilinmektedir. Normal fonksiyonları dışında septik şok, hipertansiyon, inme ve nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisinde de rol oynadığı kanıtlanmıştır.<sup>56</sup>

Bu şekilde başlayan NO ile ilgili araştırmalarda 1991'den sonra aşırı derecede artış oldu. Bu çalışmalar sonucunda, fizyolojik ve patolojik olaylardaki rolü hakkında daha fazla bilgi edinilen NO, 1992 yılında yılın molekülü seçildi.<sup>57</sup>

Lipid ve suda çözünen serbest radikal bir gaz olan nitrik oksit (NO), nitrojen dioksit ( $\text{NO}_2 \cdot$ ) gibi diğer radikaller, nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) gibi orta derecede stabil anyonlar, nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) gibi dayanıklı anyonların yanında, dinitrojen trioksit ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) gibi dayanıksız oksitler ve peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) gibi dayanıksız peroksitler oluşturur. Düşük pH'da biriken nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) proton kazanarak nitroz aside ( $\text{HNO}_2$ ) ve daha sonra dismutasyonla NO'ye dönüşür. NO, tiollerle reaksiyona girerek RSNO gibi depo formlar oluşturur. Bu depo formların bir elektron kaybetmesiyle sülfhidrifilik reaktanlar, nitrosonium ( $\text{NO}^+$ ) oluşur. Bu formların birçoğu biyolojik olarak bir kaç saniye gibi kısa bir sürede oluşmaktadır.<sup>58</sup>

### 2.2.1. NO'nun Sentez ve İnhibisyonu

Paramanyetik serbest bir radikal olan NO, nitrik oksit sentaz (NOS) denilen enzim ailesi tarafından, bir aminoasit olan L-arginin'in terminal guanidin grubunun NO'ye çevrilmesiyle üretilir ( $\text{L-arginin} \rightarrow \text{NO} + \text{L-sitrulin}$ ). Bu oluşum esnasında moleküler oksijen ile, kofaktör olarak, nikotinamid adenin dinükleotid (NADPH), flavin

adenin dinükleotid, flavin mononükleotid ve tetrahidrobiopterin (BH4)'e ihtiyaç vardır (Şekil 2.1, 2.2 ve 2.3).<sup>59</sup>

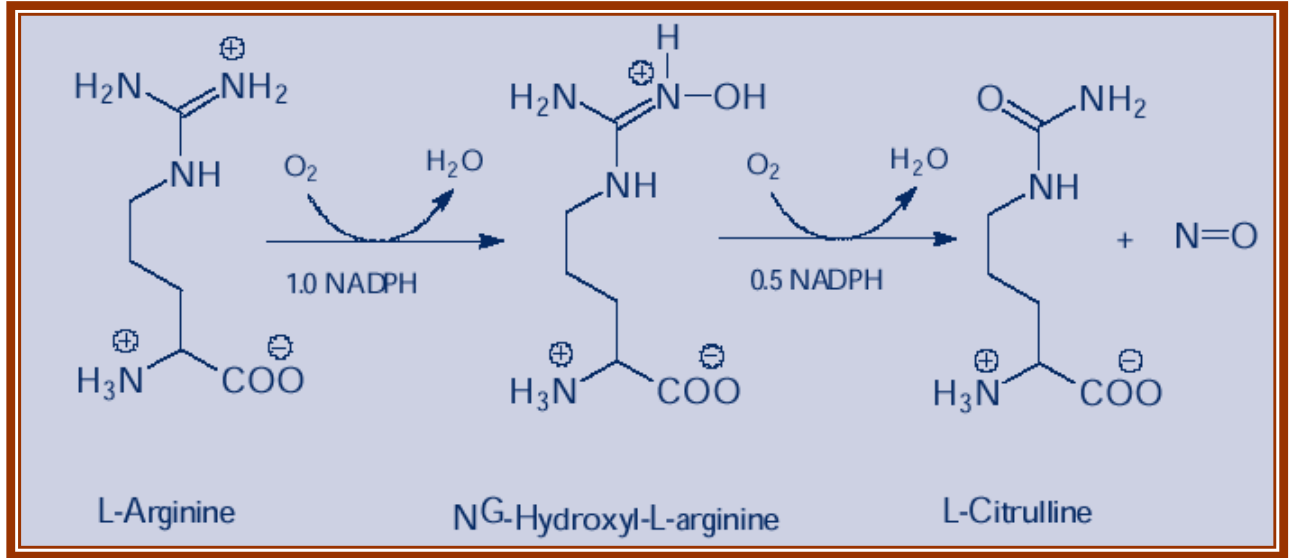
Bu şekilde üretilen ve işlevini yerine getiren NO, hızla hemoglobin, metilen mavisi ve süperoksit anyonu tarafından nötralize edilir veya 10 saniye içinde nitrat veya nitritlere dönüştürülür.<sup>60</sup>

NOS, fizikokimyasal ve kinetik özelliklerine göre iki gruba (yapısal ve uyarılabilen) ayrılır. NOS'ları sentezleyen 3 gen bulunur ve bu genlerden herbiri bir NOS izoformunu oluşturur (NOS<sub>1</sub>, NOS<sub>2</sub>, NOS<sub>3</sub>).<sup>61, 62</sup>

Sırasıyla kromozom 12 ve 16 tarafından kodlanan, NOS<sub>1</sub> ve NOS<sub>3</sub> fizyolojik şartlarda ilgili reseptörlerin uyarılmasına cevap olarak aktif hale geçerler. Nöronal (nNOS) ve endotelial (eNOS) olarak ta bilinen NOS<sub>1</sub> ve NOS<sub>3</sub>, aktif hale gelmek için Ca<sup>+2</sup>'a ihtiyaç duyar ve bu nedenle yapısal NOS olarak adlandırılırlar. "Nöronlardan ve endotelial hücrelerden izole edilen yapısal NOS'in sentez süresi kısa ve üretilen NO miktarı çok düşüktür. Bunun sebebi, hücre içi iyonize kalsiyum konsantrasyonu azalmaya başladığı anda enzimin inaktif duruma geçmesidir.<sup>63, 64</sup>

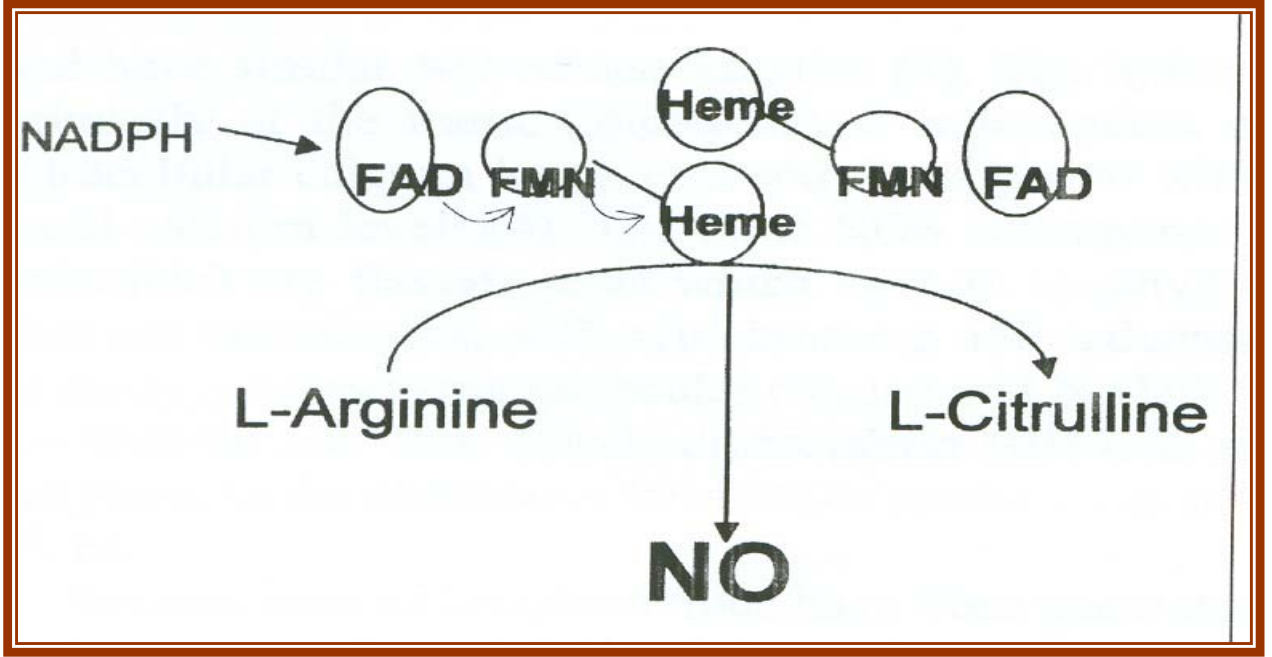
Diğerlerinin aksine, hücre içinde bulunmayan NOS<sub>2</sub>, kromozom 7 tarafından kodlanır. Endotoksin ve/veya değişik sitokinlere cevap olarak makrofajlar ve diğer hücre tiplerinin uyarılmasıyla Ca<sup>+2</sup>'dan bağımsız olarak salgılanan ve normal şartlarda gösterilemeyen NOS<sub>2</sub>'ye indüklenebilen veya uyarılabilen NOS (iNOS) adı verilir. Bu izoforma ayrıca immunolojik NOS da denilmektedir. Özellikle bakteri lipopolisakkaritleri ve interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) ile uyarılan makrofajlar bol miktarda NO üretirler. Bu şekilde iNOS'le üretilen NO sentezi saatlerce hatta günlerce devam edebilir.<sup>65,73,76</sup> NO'nun üretilmesi için gerekli olan L-arginin / NO yolu L-NMMA, L-NA, L-NAA, 7-NI, L-NIO gibi L-arginin analogları ve L-argininin guanidium kısmına benzeyen, bir çok amino asit türevleri tarafından inhibe edilebilir. NOS'i inhibe eden bir

diğer madde grubu da glukokortikoidlerdir. Tüm izoformlara etki gösteren bu inhibitörlerin izoformlar arasında, kısmen de olsa, bir seçicilikleri vardır.<sup>65-67</sup>

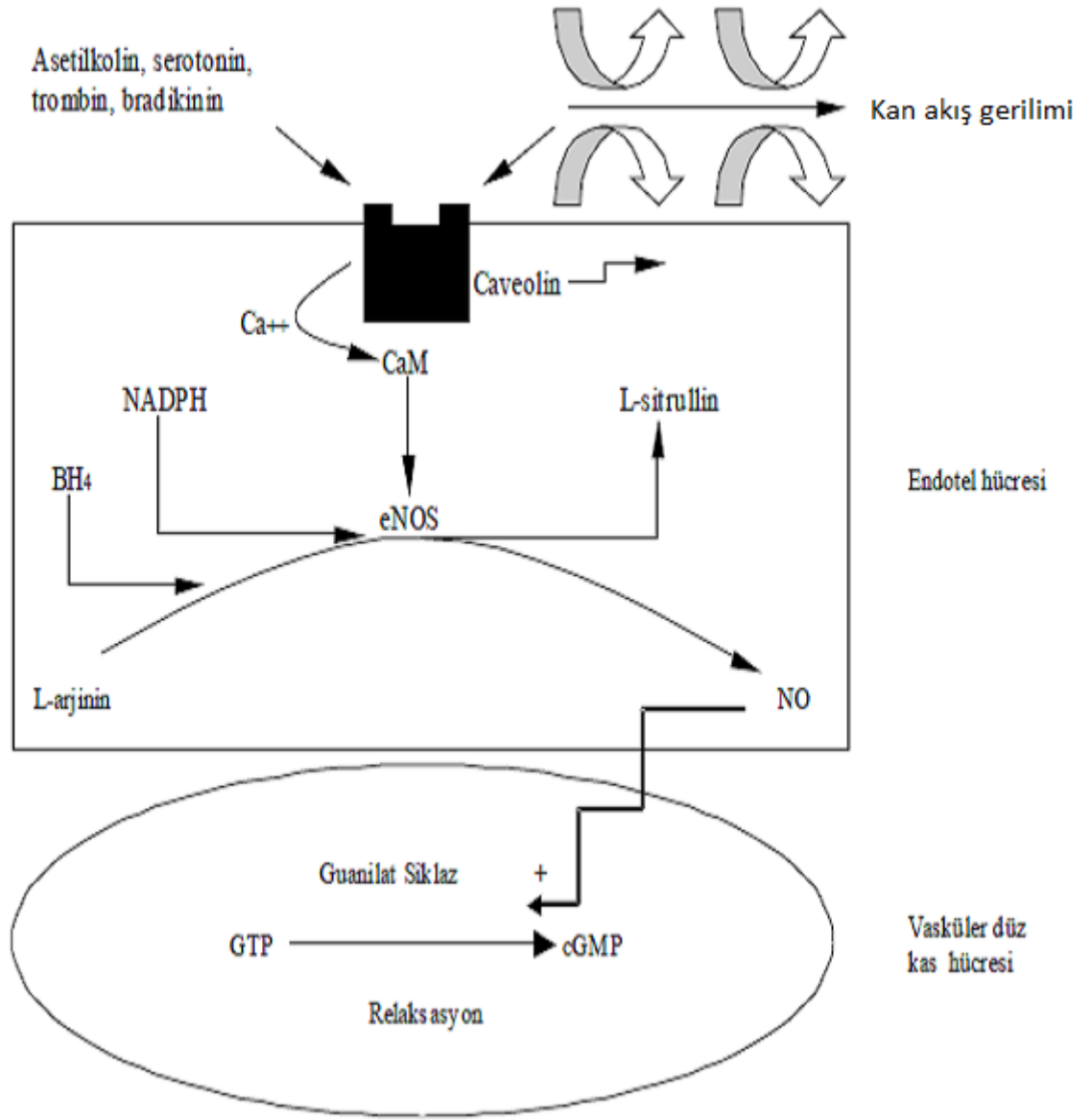


Şekil 2.1. NO'nin L-Argininden sentezinin basamakları.<sup>68</sup>

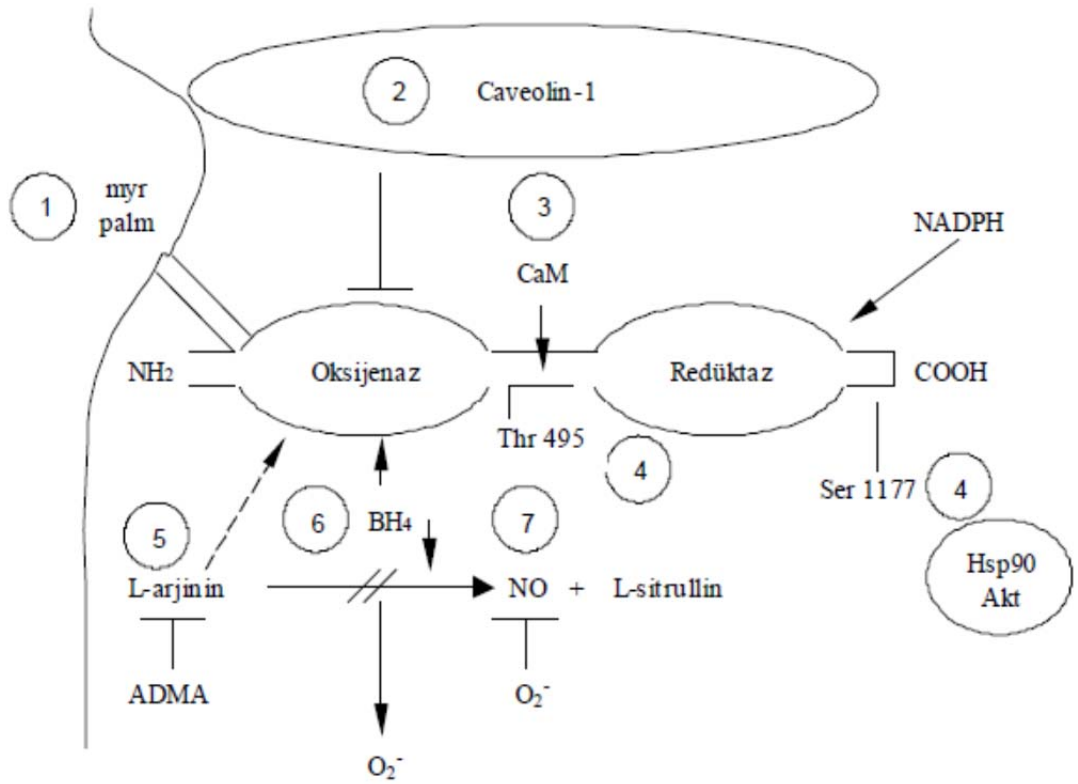




Şekil 2.2. NO sentezinin kofaktörleri



**Şekil 2.3.** Endotelial hücrelerde NO sentezi.<sup>69</sup>



Şekil 2.4. eNOS (NOS<sub>3</sub>) sinyalizasyonu.<sup>69</sup>

Şekil 2.4'de görülmekte olan optimal NO üretiminin gerçekleşmesi için gerekli olan süreç aşağıdaki basamaklardan oluşmaktadır:

1. eNOS'un caveolae'ya (hücre membranındaki invajinasyonlar) lokalizasyonu, etkili NO sentezi için gereklidir ve miristoylasyon (myr) kotranslasyonuna gerek duyduğu gibi, eNOS'un posttranslasyonel palmitoylasyonuna da (palm) gerek duyar.
2. Caveolae'nın major dış proteini olan Caveolin-1, eNOS ile birleşerek eNOS'un inhibisyonuna neden olabilir. Bu inhibitör bağlanmanın engellenmesi eNOS aktivasyonu için gereklidir.

3. Kalmodulin (CaM), eNOS'un temel allosterik aktivatörüdür. CaM'in spesifik bölgesine bağlanması, eNOS'un redüktaz segmentinden katalitik merkezine olan elektron transfer hızını artırır.
4. eNOS aktivitesi, serin 1177 (ser 1177) parçasının fosforilasyonu ile regüle edilir. Fosforilasyonun aktivasyonu kinaz Akt ve ısı şok proteini 90 (Hsp 90)'a ihtiyaç duyar. Hsp 90, eNOS ve Akt arasında köprü vazifesi görür.
5. Substrat L-argininin eNOS'un katalitik bölgesine bağlanması kompetitif antagonisti olan asimetrik dimetil arginin tarafından inhibe edilir.
6. NO sentezi için BH4 kofaktör olarak gereklidir. BH4'ün azalması; eNOS'un ayrışmasına yol açar, buda eNOS tarafından oluşturulan NO yerine süperoksit (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) üretimiyle sonuçlanır.
7. NO düzenli bir şekilde oluşturulsa dahi devamında oluşan süperoksit anyonu tarafından inaktive edilir (özellikle yüksek oksidan stres durumlarında).

Kan akış gerilimi, eNOS ekspresyonunu artırır. ADMA, NO'ı inhibe eder, artmış ADMA seviyeleride endotel disfonksiyonu ve ateroskleroz ile ilişkilidir. Kolesterol sentez yolunda bir ara faktör olan, isoprenoid geranilgeranil pirofosfat eNOS sentezini inhibe eder. eNOS'un farmakolojik inhibitörleri ise; L-arginin analogları olan L-N-monometil arginin (L-NMMA) ve L-nitroarginin metilesterdir (L-NAME) .<sup>69</sup>

**Tablo 2.2.1.1.** NO salımına yol açan sebepler.<sup>67,70</sup>

---

Nörotransmitterler (Asetilkolin ve Noradrenalin)

Trombositlerden salınan maddeler (Serotonin, Adenozin di fosfat)

Koagülasyon sırasında oluşan maddeler (Trombin)

Damar duvarında oluşan otakoidler (Histamin, Bradikinin ve Endotelin)

Pulsatil stres ve akımın shear stresi (kan akış gerilimi)

---

### **2.2.2. NO'in Fizyolojik ve Fizyopatolojik Etkileri**

Temel haberci moleküllerden biri olan NO hücre membranını geçerek demir ve/veya sülfür içeren proteinlere bağlanır.<sup>70</sup> Özellikle nöronlarda ve damar düz kas hücre membranında bulunan guanilat siklazı aktive eden NO, damar dilatasyonu, sinirlerden uyarı geçişi gibi fonksiyonları gerçekleştirir.<sup>71</sup>

eNOS (NOS<sub>3</sub>) tarafından sentezlenen endotel kaynaklı NO, bazal vasküler tonusun önemli bir belirleyicisidir. Bu şekilde sistemik dolaşımı regüle eden NO, kalp, karaciğer, beyin gibi organların lokal dolaşımlarının düzenlenmesine de katkıda bulunur.<sup>72</sup> eNOS eksikliği hipertansiyona sebep olur. Bu ilişki deneysel çalışmalarla gösterilmiştir. Gerek NOS inhibitörlerinin kullanıldığı, gerekse eNOS genlerinin inaktive edildiği deneylerde, ratlarda hipertansiyon geliştirilmiştir. Kronik böbrek yetmezliklerinde dimetilarginin'in plazma konsantrasyonlarının arttığı, bunun NOS'in aktivasyonunu inhibe ederek hipertansiyona neden olduğu tespit edilmiştir.<sup>73</sup> Endotel

kaynaklı NO'nun damar bütünlüğünün korunması, lökositlerin endotel hücrelerine yapışmasının ve düz kas hücre proliferasyonunun önlenmesi gibi etkilerinin yanında trombosit adezyonu ve agregasyonunu inhibe etme etkileri de vardır. Bu yüzden kardiyovasküler hemostazda, kritik rolü olan endotel kaynaklı NO'nun aterogenezi inhibe ettiği söylenebilir. NO bu etkisini, prostasiklinle sinerjistik bir etkileşimle sağlar.<sup>74</sup> Gerçekten de hipertansiyon, hiperlipidemi, sigara içme ve diyabet gibi ateroskleroza zemin hazırlayan faktörlerin tümü, anormal endotel fonksiyonları ve biyoaktif NO seviyelerinde azalma ile birlikte. Bu, molekülün gerçek eksikliğine veya oksijen türevi gerçek radikallerle reaksiyona girerek inaktive olmasına bağlıdır. Trombositler de ayrıca NO sentez ederek, trombosit aktivasyonunun kontrolüne katkıda bulunurlar.<sup>75-77</sup>

Sinir sisteminde major izoform olan nNOS tarafından sentez edilen ve merkezi ve periferik sinir sisteminde de aracı madde olarak görev yapan NO, nörokimyasal sistemin önemli bir parçasıdır. NO, merkezi sinir sisteminde hafıza oluşumu, sinirsel aktiviteler, serebral kan akımının koordinasyonu ve ağrının hafifletilmesi gibi birçok fizyolojik fonksiyonda aracı madde olarak rol alır. Ayrıca hafıza ve öğrenme fonksiyonuyla da ilgili olduğuna dair birçok kanıt vardır.<sup>78, 79</sup> Bunun dışında koku alma ve görme işlevinde de rol aldığı tespit edilmiştir.<sup>80</sup> Endokrin sistem üzerine yapılan birçok çalışma, NO'nun hipotalamik-pitüiter aks'ta hormon salınımını düzenlediğini göstermiştir.<sup>81</sup>

Günümüzde artık nörojenik vazodilatasyonun bazı formlarına aracılık eden, belirli gastrointestinal ve genitoüriner fonksiyonları düzenleyen ve önceden nonadrenerjik nonkolinerjik (NANC) olarak bilinen, periferik sinir sisteminde yaygın olarak yerleşmiş bazı sinir ağlarının (Nitretik sinirler), NO salgıladıkları bilinmektedir.<sup>82</sup>

NOS, gastrointestinal sistemde mezenterik pleksustaki nöronlarda bulunmaktadır.<sup>83</sup> NO hayvanlarda mide içi basınca karşı mideyi dilate ederek, yeni duruma uyumu sağlamakta ayrıca gastrointestinal sistemin sfinkterlerinde gevşemeye yol açarak, bu organların fizyolojik fonksiyonlarının düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır.<sup>84</sup> NOS'un pelvik pleksus, kavernosol sinir, derin kavernosol arterlerin adventisyası ve penis sinüzoidlerinde yüksek konsantrasyonlarda olduğu, NO'nun penis ereksiyonu sağlayan dokularda NANC nörotransmitter olarak görev yaptığı tespit edilmiştir. Bu yüzden erektil impotans tedavisinde NO'in penis ereksiyon yapıcı etkisinden yararlanılmaktadır.<sup>85</sup> Son çalışmalar, serebral kan akımını düzenleyen NO'in hem endotel hücrelerde, hem de adventisya içindeki otonomik sinirlerden salgılandığını göstermiştir.<sup>86</sup>

Sinir sisteminde, nNOS'in yanı sıra, enfektif ve toksik etkilere karşı oluşan glial aktivasyon durumunda oluşan iNOS'un ürettiği NO'nun enfeksiyon ajanlarına karşı mücadelede önemli bir fizyolojik rol oynadığı tespit edilmiştir. Bu şekilde oluşan NOS aktivasyonuna bağlı olarak oluşan NO'nun ayrıca, Parkinson, Alzheimer hastalığı ve multipl sklerozun (MS) patogenezinde rol oynayabildiği düşünülmektedir. Yine menenjitte artan NO üretiminin, bu şekilde nörolojik sekellere katkıda bulunduğu tahmin edilmektedir.<sup>87, 88</sup>

Düşük konsantrasyonun aksine, yüksek konsantrasyondaki NO, nörotoksik bir döngüyü başlatır.<sup>89, 90</sup> Fokal iskemide, inmede, Alzheimer ve Huntington gibi nörodejeneratif hastalıklarda, NO'in N-methyl-D-aspartate (NMDA) reseptörlerini etkileyerek ortaya çıkardığı aşırı miktarda glutamat'ın hücre ölümünde etkili olduğunu gösteren kuvvetli deliller vardır. NMDA'nın aktivasyonu muhtemelen intrasellüler kalsiyumda artışa neden olmakta, bu da glutamat nörotoksitesini başlatmaktadır.<sup>91</sup> NO,

bu tür nörotoksisitenin dışında, merkezi sinir sisteminde oksijen nörotoksisitesi, AIDS demansındaki gibi başka tür nörotoksisitelere de kısmen aracılık edebilmektedir.<sup>92, 93</sup>

Ayrıca, NO'nun miyelin üreten oligodendrositlere de direkt toksik etki yaparak, merkezi sinir sisteminin inflamatuvar rahatsızlıklarında rol oynadığı söylenmektedir. NO'nun bu etkilerine karşı NOS inhibitörlerinin koruyucu etki yaptığı gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada migrenlilerin NO'ya aşırı derecede hassas olduğu gösterilmiştir.<sup>94</sup>

<sup>95</sup> iNOS vasıtasıyla üretilen makrofaj kaynaklı NO bakterisi, parazit ve tümör hücreleri üzerine sitotoksik etki yaparken, DNA ve RNA virüslerinin bazılarının yayılmasını önler. NO bu etkilerini, bazı enzimlerdeki duyarlı demir gruplarına bağlanarak, çoğalmayı sağlayan anahtar metabolik yolların blokajına yol açarak ve oksijen ile birleşip, güçlü hücrel toksinler olan hidroksil radikali ve antioksidanları ortaya çıkararak gösterir. Hücrelerin doğrudan öldürülmesini sağlayan ve intrasellüler viral replikasyonu inhibe edebilen önemli bir aracı madde olması nedeniyle NO'yu doğrudan birincil savunma sistemi olarak kabul edilebilir.<sup>96-99</sup> Retikuloendotelial sistemle birlikte dolaşımın immünolojik filtreleri gibi görev yapan, karaciğer ve akciğer hücrelerinde de, makrofaj aktivasyonu ve NO sentezi ile doğrudan bağlantılı ve kansere karşı direnci arttıran nonspesifik immün olaylar mevcuttur.<sup>58, 96</sup>

Yapılan çeşitli araştırma sonuçlarına göre, NO'nun serebral iskemide dual bir rolü olduğu anlaşılmaktadır. eNOS enzimi tarafından iskeminin akut fazında salınan NO, serebral kan akımının devamlılığını sağlamaya yönelik, dolayısı ile koruyucu bir rol oynar. Yine hemen hemen aynı dönemde salınan nNOS kaynaklı NO ve saatler sonra salınan iNOS kaynaklı NO ise nörotoksik etki gösterir.<sup>100-103</sup>

Yapısında çiftleşmemiş bir elektron bulunduran NO bir serbest radikal olarak kabul edilebilir.<sup>104</sup> NO'nun en iyi bilinen biyolojik hedefleri; oksijen geçiş metalleri, demir sülfür içeren proteinler ve hem içeren proteinlerdir. NO'nun, yapısında bu



maddeleri içeren enzimlerle reaksiyona girerek, mitokondriyal solunumu inhibe edip hücre içi enerji üretimini bozarak hücre ölümüne yol açtığı iddia edilmektedir.<sup>103, 105</sup>

Değişik otoimmün bozukluklar üzerine yapılan araştırmalarda, lupus, romatoid artrit, osteoartrit gibi vaskülit ve romatizmal hastalıklarda da, NO'in aşırı miktarda üretildiği saptanmıştır.<sup>105</sup>

Artmış NO aktivitesi ile ilişkili olan bazı hastalıklar şunlardır: Septik şok, reperfüzyon hasarı, gastroözofageal reflü, ülseratif kolit, diabetes mellitus, graft versus host reaksiyonu ve allograft rejeksiyon.<sup>106</sup> Öte yandan, iskemik hasar, hipertansiyon, ateroskleroz ve vaskülopatiler, akalazya, doğuştan pilor stenozu ve Hirschsprung hastalığında da NO aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir.<sup>67</sup>

### **2.3. Metilargininler ve Metabolizmaları**

ADMA, L-NMMA ve SDMA başlıca metil arginin türevleridir. Metilargininler proteindeki arginin rezidülerinin posttranslasyonel modifikasyon ile metillenmesi sonucu oluşan türevlerdir. Bu metilasyonu protein arginin metil transferaz (PRMT) enzimi katalizler ve proteinlerin içindeki argininin guanido azotuna 1 veya 2 metil grubu aktarımı gerçekleştirir. Reaksiyonda metil grubu vericisi olarak S- adenzil metiyonin kullanılır.<sup>107, 108</sup>

PRMT enzimlerinin bilinen iki alt grubu vardır (Tip1 ve Tip2). PRMT reaksiyonları sonucu monometilasyon yada dimetilasyon vuku bulur. Dimetilasyon neticesinde Tip1 PRMT kullanılarak ADMA, Tip2 PRMT kullanılarak SDMA ve monometilasyon sonucu L-NMMA oluşur. Metillenmiş proteinler hidrolizlenerek, sitozolde serbest metilarginin oluşumu sağlanır.<sup>109</sup>

Tip1 PRMT en çok rastlanılan tipidir ve kardiovasküler sistemde kalp, düz kas hücreleri ve endotelial hücrelerde bulunduğu gösterilmiştir.<sup>73, 109, 110</sup> Artan LDL ile

birlikte artmış Tip1 PRMT ekspresyonu ile ADMA düzeylerinin LDL ile pozitif korelasyonu olduğu gözlemlenmiştir. Endotelyal hücre kültürlerinde LDL, oxLDL konsantrasyonu artışı PRMT gen ekspresyonu artışına neden olur. Bu etki ADMA oluşumundaki değişikliklerle korele gözükmemektedir. Tip1 PRMT aktivitesi sonucu oluşan ürünlerin NOS'u inhibe edebilme özelliği vardır.<sup>111</sup>

Tip2 PRMT, SDMA oluşumunda rol oynar. SDMA'nın NOS'u inhibe etme özelliği yoktur. Tip2 PRMT'lerin akciğerlerde fonksiyonel olduğu ve hipoksinin akciğerde PRMT 2 ekspresyonu ve akciğer ADMA konsantrasyonlarında düzenleyici olduğu gösterilmiştir.<sup>112</sup>

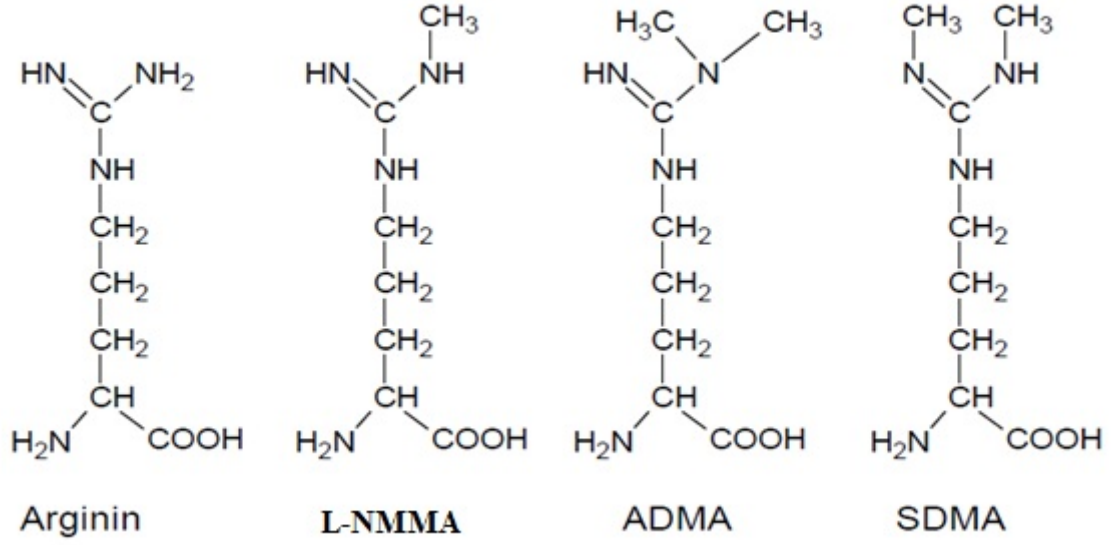
Metilargininlerin bir kısmı renal yolla atılır. SDMA tamamıyla renal yolla atılırken ADMA'nın yıkımı dimetilarginin dimetil aminohidrolaz (DDAH) enzimiyle sitrülün ve dimetilamine yıkılması şeklindedir.<sup>113, 114</sup>

#### **2.4. ADMA**

1992 yılında Vallance ve arkadaşları ADMA'yı ilk olarak insan plazma ve idrarında NO sentazın endojen inhibitörü olarak tanımlamışlardır.<sup>73</sup>

ADMA, arginin rezidülerinin metillenmesi esnasında PRMT enzimi tarafından sentezlenir. ADMA'dan başka SDMA ve L-NMMA'da sentezlenir (Şekil 2.4.5 ve 2.4.6).

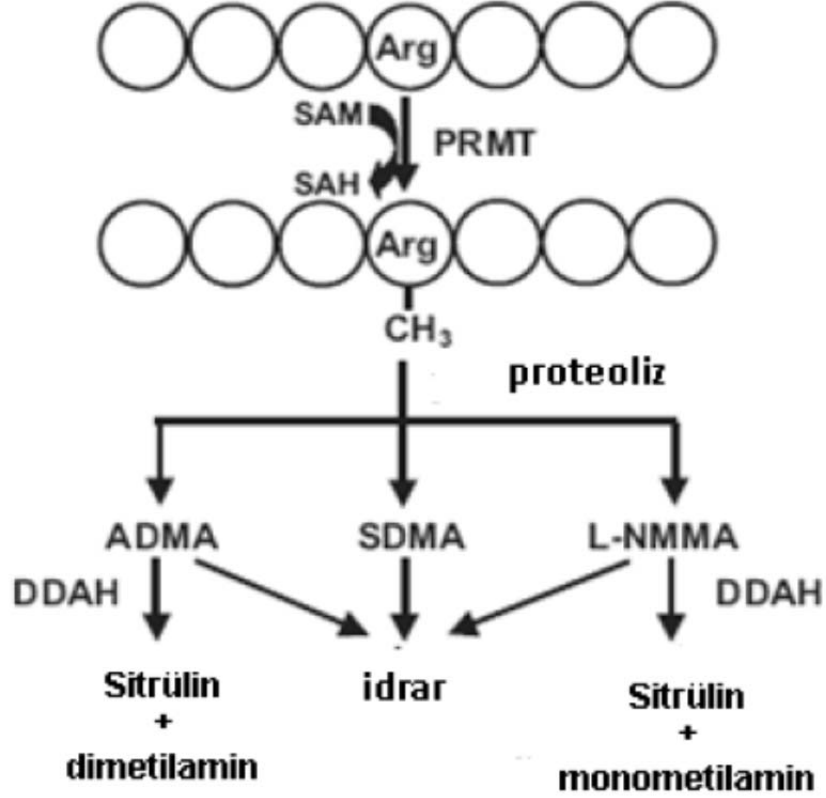
ADMA kadar güçlü olan L-NMMA'nın plazmadaki konsantrasyonları ADMA'dan 10 kat daha düşüktür. SDMA'nın plazmadaki konsantrasyonları ADMA kadar olsa da, NOS üzerinde herhangi bir etkisi yoktur.<sup>73</sup>



**Şekil 2.5.** Arginin ve metilargininler <sup>115</sup>

ADMA, SDMA ve L-NMMA'nın üçü de PRMT enzimleri tarafından sentezlenir. Bu enzim sistemi, S-adenozilmetiyoninden (SAM) bir metil grubunu S-adenozilhomosistein (SAH) oluşturmak üzere arginine transfer eder. Daha sonra da homosisteine hidrolize olur.

PRMT enziminin 2 tipi tanımlanmıştır. PRMT-1 (protein arginin metil transferaz-1) histon, RNA binding proteini metillerken ADMA ve L-NMMA oluşturur, oysa PRMT-2 (protein arginin metiltransferaz-2) sadece miyelin basic proteini metiller ve SDMA ve L-NMMA oluşturur. Şekil 2.6'da da görüldüğü gibi ADMA ve L-NMMA, DDAH (dimetil aminohidrolaz) ile sitrülün ve dimetilamin ya da monometilamine indirgenir. DDAH'ın 2 formu vardır. DDAH-1 çoğunlukla nNOS içeren dokularda, DDAH-2 ise eNOS ya da iNOS içeren dokularda bulunur. Farmakolojik olarak DDAH'ın inhibisyonu ADMA'yı artırırken NO üretimini azaltır. DDAH, endotel hücreleri, beyin, pankreas gibi birçok organda bulunurken, ADMA metabolizmasından sorumlu başlıca organlar karaciğer ve böbreklerdir. <sup>111</sup>



Şekil 2.6. ADMA üretimi <sup>115</sup>

ADMA, NOS'un üç formunun da kompetitif inhibitörüdür ve yüksek L-arginin konsantrasyonlarında geri dönüşmektedir.

ADMA düzeylerindeki artışı 4 teorik mekanizmayla açıklayabiliriz.

1. PRMT tarafından artmış protein metilasyonu
2. Uzamış proteoliz ve önceden oluşturulmuş metilarginin salınımı
3. Bozulmuş renal atılım
4. DDAH'ın bozulmuş metabolizması

PRMT regülasyonu tam olarak aydınlatılamamıştır. Gene de kan akış geriliminin PRMT ekspresyon ve aktivitesini artırdığı ve kültüre edilen endotel hücrelerinde transkripsiyon faktörü “nükleer faktör ( $\kappa$ -B)”ü aktive ederek ADMA üretimini stimüle ettiği bilinmektedir. Kan akış gerilimi, kalp, böbrek yetmezliği, yüksek tuz içeren diyet gibi hipervolemik şartlarda ADMA düzeylerinde artışa eşlik edebilir. Artan proteoliz, endotoksemi, hipertiroidizm, musküler distrofi gibi hiperkatabolik durumlar da ADMA artışına eşlik edebilir.<sup>116</sup>

ADMA birikimine öncülük eden mekanizma bozulmuş DDAH metabolizmasıdır. Birçok deneysel çalışmada ADMA birikimi azalmış DDAH aktivitesi ile birlikte bulunur. Sisteinden indirgenen sülfhidril (-SH) grubu DDAH aktivitesi için önemli olup, bu enzim de oksidatif strese duyarlıdır. Oksidatif stres ayrıca, ADMA oluşumunu, endotel hücrelerinde artmış PRMT-1 ekspresyonuyla aşırı serbest oksijen türleri açığa çıkararak stimüle edebildiğini açıklamaktadır. Ayrıca DDAH, SH grubunun nitrozotiole nitrozilasyonu, iNOS tarafından aşırı miktarda NO üretimi olduğunda inaktive edilebilir. iNOS tarafından proinflamatuvar sitokinler oluşturulduğunda NO üretimini sınırlayabilir ve bu da ADMA'nın birikimine öncülük edebilir. DDAH aktivitesindeki artış, NO üretimini daha da artırır ki, bu da ADMA konsantrasyonunda azalmayla sonuçlanır.<sup>116, 117</sup>

ADMA'nın endotel disfonksiyonu için yeni bir risk faktörü olabileceği ileri sürülmektedir. ADMA, NOS'un kompetitif inhibitörüdür. Plazma ADMA düzeylerinin ateroskleroz, konjestif kalp yetmezliği v.b birçok kardiyovasküler rahatsızlıklarda yükseldiği gösterilmiştir. Plazma ADMA'nın 2.35 katı yükselmesi koroner arter hastalığı açısından yüksek riski düşündürmektedir.<sup>118</sup>

Artmış ADMA konsantrasyonları hiperkolesterolemi, hiperhomosisteinemi, diyabet, periferik arteriyel tıkalı hastalık, hipertansiyon, koroner arter hastalığı, kronik

kalp yetmezliği, preeklampsi, erektil disfonksiyon ve diğer klinik durumlarla ilişkilidir.<sup>111</sup>

Homosisteinin ateroskleroza neden olma mekanizmaları; artmış oksidatif stres, fibrinolitik aktivite ve koagülasyonun modülasyonu, damar düz kas hücre proliferasyonu ve endotelial disfonksiyonunu kapsayabilmektedir.<sup>111</sup>

Bu mekanizmalardan bazılarının, NOS'ın endojen inhibitörü olan ADMA'nın neden olduğu anormal NO üretimi aracılığı ile olduğu gösterilmiştir. Son zamanlarda ADMA oluşumunun homosistein metabolizması ile bağlantılı olabileceği bildirilmiştir; bundan dolayıdır ki hiperhomosisteinemi ADMA konsantrasyonlarında artışa neden olabilmektedir. Hiperhomosisteinemi ve artmış ADMA düzeyleri arasındaki bağ, hiperhomosisteinemi olan maymunlarda ve oral metiyonin yüklemesinden sonra insanlarda bildirilmiştir.<sup>119</sup>

ADMA hakkında bilinenler;

1. NOS'ın kompetitif inhibitörüdür.
2. Protein turnover ürünüdür.
3. DDAH tarafından metabolize edilir.
4. Böbreklerden atılır.
5. Doku kültüründe ve hayvan deneylerinde ekzojen ADMA verilmesi NO oluşumunu inhibe eder.
6. İnsan ön koluna intraarteriel ADMA infüzyonu, endotel bağımlı vazodilatasyonu inhibe eder.
7. İnsanlarda ADMA infüzyonu, kardiyak outputu azaltır, sistemik vasküler direnci artırır.
8. Plazma ADMA konsantrasyonu, endotelial disfonksiyon ve/veya azalmış NO üretimi ile ilişkili hastalıklarda artar.<sup>109, 117</sup>

Sağlıklı bir insanda günde 260-300 µmol ADMA üretimi olmaktadır. İnsanlarda ADMA yüksekliği, ilk kez böbrek yetmezliği olan bireylerde saptanmıştır. Bugün, pek çok hastalık durumunda ADMA düzeyi yüksekliği bilinmektedir. ADMA dislipidemi, ateroskleroz, hipertansiyon, kronik renal yetmezlik, diabetes mellitus, hiperhomosisteinemi, preeklampsi, erektil disfonksiyon, karaciğer yetmezliği ve konjestif kalp yetmezliği hastalarının plazmasında yükselir. Endotel bağımlı vazodilatasyon bozulmasıyla anlaşıldığı gibi, artan ADMA düzeyleri indirgenmiş NO sentaz ile ilişkilidir. Plazma ADMA konsantrasyonu, LDL kolesterolü düşüren statin tedavisinden etkilenmez. ACE inhibitörlerinin uzun dönem kullanımı ile ADMA seviyelerinde azalma, NOS'da artma, L-arginin/ADMA oranında artma, koroner mikrovasküler fonksiyonda düzelme, myokard iskemisinde azalma sağlamaktadır.<sup>120</sup>

**Tablo 2.3.** ADMA düzeyleri çalışılmış çeşitli hastalıklar.

Hastalığın adı	ADMA'da meydana gelen değişim
Hipertansiyon	Artış
Hiperlipidemi	Artış
Obezite	Artış
Diyabet	Artış
Metabolik sendrom	İnsülin direncine paralel
Polikistik over sendromu	Azalış
Tiroid disfonksiyonu	Artış
Homosisteinemi	Artış
Kardiyovasküler hastalıklar	Artış
Multiple skleroz	Artış
Alerjik hastalıklar	Değişmemiş

### 2.4.1. ADMA'nın Biyolojik Yolları

1970 yılında, insan idrarında metillenmiş argininler bulunmuştur. O zamandan beri, metillenmiş argininler hayvanların nöronlarında ve immün hücrelerinde ve insan endotel hücrelerinde tespit edilmiştir.<sup>121</sup> ADMA, L-argininin guanidin analoglarının bilinen üç endojen sirkülasyon ürününden biridir. ADMA ve L-NMMA, L-argininden NOS'un uzaklaştırılması yolu ile NO oluşumunu yarışmalı olarak inhibe edebilir.<sup>121, 122</sup>

ADMA, plazmadaki amino asit sirkülasyonunun doğal bir ürünüdür, doku ve hücrelerde bulunur ve idrar ile atılır.<sup>109, 123</sup> Özellikle kardiyovasküler sistemde NOS'ı inhibe eder. Yapılan birkaç çalışmada, ADMA konsantrasyonunun kardiyovasküler hastalıklar ve endotel disfonksiyonu riski için bir gösterge olduğu ileri sürülmüştür. İleri yaş, endotel disfonksiyonu ve yüksek plazma ADMA konsantrasyonu ile ilişkilidir.<sup>45, 111, 123</sup>

ADMA, proteinlerin arginin rezidülerinin, PRMT enzimi ile metillenmesi sırasında sentezlenir. Protein arginin metilasyonu, proteinlerdeki arginin guanidin nitrojenlerine 1 veya 2 metil grubunun eklenmesiyle oluşan post-translasyonel bir modifikasyondur.<sup>124, 125</sup> İki tip PRMT enzimi vardır. Serbest ADMA ve L-NMMA, PRMT-1 ile hidroliz sonucunda oluşur. PRMT-2 proteinleri metiller, hidroliziyle L-NMMA ve SMDA salınır. ADMA ve L-NMMA her ikisi de NOS'ın tüm izoformlarının yarışmalı inhibitörüdür. SMDA'nın inhibitör etkisi yoktur.<sup>51, 125</sup> PRMT-1 için substrat proteinlerin dağılımı çok geniştir, enzim ve substratları tüm vücutta bulunur. Protein arginin metilasyonunun rolü açık değildir fakat bu süreç RNA bağlarının regülasyonu, DNA onarımı, transkripsiyonel regülasyon, protein lokalizasyonu, protein-protein etkileşimi, sinyal iletimi, reseptörlerin desensitizasyonu veya yeniden yapılandırılması ile ilişkilidir. Bugüne kadar serbest metil arginininden ADMA sentezinin direkt yolu

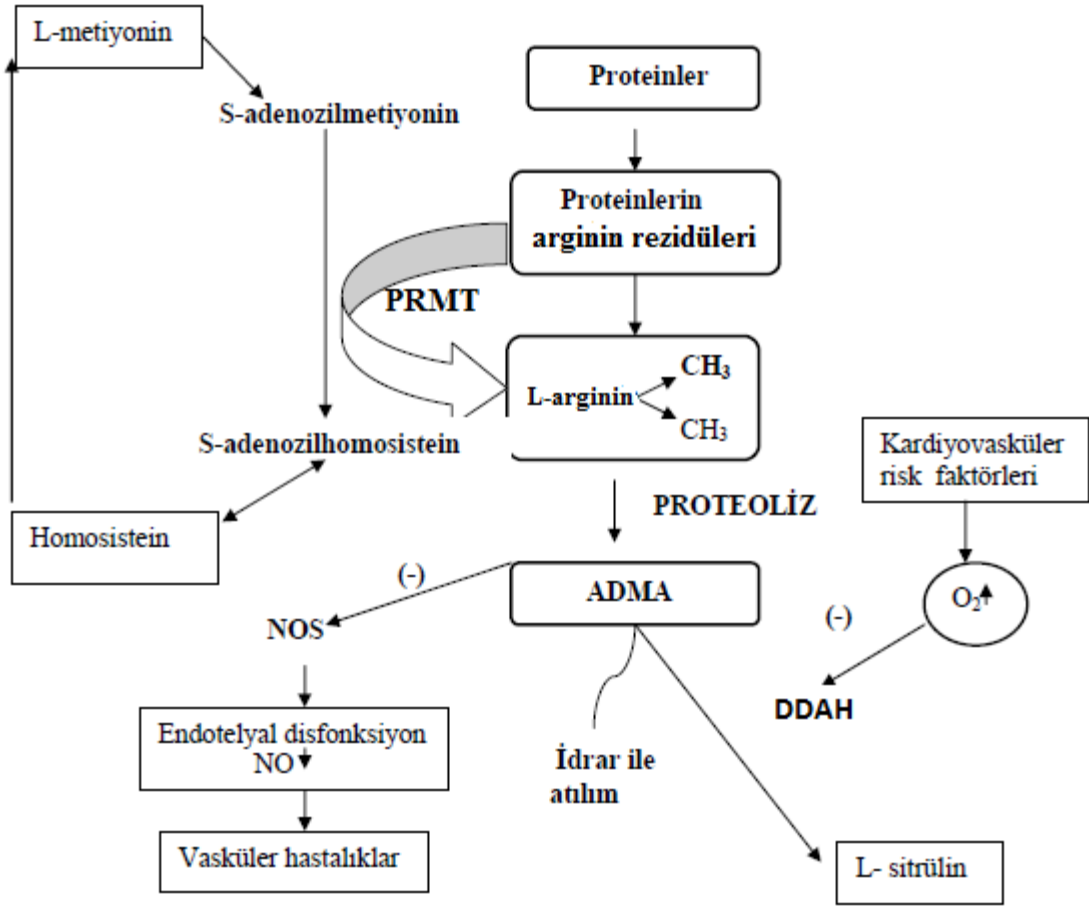


tanımlanmamıştır. Böylece, hücre içindeki toplam ADMA miktarı, protein turnover hızına ve proteinlerdeki arginin metilasyonunun miktarına bağlıdır.<sup>125, 126</sup>

ADMA ve SDMA vücuttan yalnızca renal yol ile atılır. Bir kısım ADMA'da DDAH enzimi ile parçalanır.<sup>124, 127</sup> ADMA ve L-NMMA'nın bu enzim ile hidrolizi sonucunda, sırasıyla L-sitrülin ve dimetilamin veya monometilamin oluşur. DDAH, ADMA için spesifik etkilidir ancak SMDA üzerine spesifik etkisi yoktur.<sup>125, 126</sup> 1999 yılında Leiper ve arkadaşları DDAH 1 ve DDAH 2 olarak iki farklı izoform tanımlamışlardır.<sup>128</sup> Yüksek DDAH 1 salınımı beyin ve böbrekte, DDAH 2 salınımı ise kalp, plasenta ve böbrekte gözlemlenmiştir. ADMA'nın %90'dan fazlası DDAH ile metabolize edilir (şekil 2.7). Böylece, DDAH'ın disregülasyonuna yol açan renal disfonksiyon ve hiperkolesterolemi ADMA seviyesinin artışı için potansiyel bir sebep olabilir. DDAH ile NOS'un düzenlenmesinin insan vaskülaritesindeki homeostaziste önemli bir role sahip olduğunu ilk kez 1996 yılında Mc Allister ve arkadaşları göstermiştir.<sup>129</sup>

Trombolitik olaylar ve aterosklerotik süreci içeren aterotrombotik inmenin patogenezindeki çeşitli mekanizmalar, L-arginin-NO yollarıyla bağlantılı olabilir. Hayvan modellerinde, endojen NOS'un inhibisyonu ateroskleroz gelişimine yol açar. Bir endojen NOS inhibitörü olan ADMA'nın artmış plazma konsantrasyonu, iskemik inme riskinde artıştan sorumlu olabilir.<sup>40</sup> Yoo ve arkadaşları 52 hasta ile yaptıkları bir çalışmada, yaşlı hastalardaki serebral infarkt ile ADMA arasında anlamlı bir ilişki bulmuşlardır.<sup>51</sup>

İnsan hemoglobini ve plazmanın major proteinleri olan albumin ve globulinin ADMA rezidüleri taşımadığı GC-MS/MS tekniği ile tespit edilmiştir.<sup>130</sup>



Şekil 2.7. ADMA'nın biyokimyasal yolları.<sup>125</sup>

## **2.4.2. ADMA ile İlgili Hastalıklar**

### **2.4.2.1. Hipertansiyon**

Hipertansif hastalarda yapılan çalışmalarda normotansif sağlıklı kontrollere göre yüksek plazma ADMA ve L-arginin düzeyleri ve ADMA ile brakial arter kan akımı artışı arasında kuvvetli ve negatif bir ilişki rapor edilmiştir.<sup>131</sup> Sonuç olarak araştırmacılar ADMA ve L-argininin endotel fonksiyonu ile ters ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır. Ülkemizde yapılan bir çalışmada ise hipertansiyonu olan 34 hastada normotansif bireylere göre artmış ADMA ve azalmış NO düzeyleri saptanmıştır.<sup>132</sup> Achan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada sağlıklı bireylere düşük dozda intravenöz ADMA verildiğinde kalp hızında azalma, kardiyak outputta ve kan basıncında artma gözlemlenmiştir.<sup>45</sup> Başka bir çalışmada da 75 esansiyel hipertansiyonlu hasta üzerinde yapılmış ve plazma ADMA düzeylerinin endotel bağımlı brakial arter vazodilatasyonunun tek ve bağımsız bir göstergesi olduğu bildirilmiştir.<sup>133</sup>

Güngör ve arkadaşları, 88 hipertansif hastayı organ hasarı açısından inceleyebilmek amacıyla dipper hipertansiyonlu (DHT) ve nondipper hipertansiyonlu (NDHT) olarak sınıflandırmışlar. DHT'li 42 hastada (K=29, E=13), plazma ADMA  $1.29 \pm 0.17 \mu\text{M/L}$  ve NDHT'li 46 hastada (K=30, E=15),  $1.27 \pm 0.13 \mu\text{M/L}$  olarak tespit edilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p=0.575$ ).<sup>134</sup>

### **2.4.2.2. Hiperlipidemi**

Hiperkolesterolemili hastalarda yapılan çalışmalarda artmış ADMA düzeyleri saptanmıştır. Bunlardan birinde hiperkolesterolemili bireylerde metionin yüklenmesi sonucu gelişen hiperhomosisteinematik ortamda ADMA düzeyinin ortalama  $2.03 \mu\text{mol/L}$  arttığı ve ADMA'nın endotel disfonksiyonu ile anlamlı derecede ilişkili olduğu rapor

edilmiştir. Bu hastalarda ADMA artışının sebebi olarak metiltransferaz aktivitesinin LDL kolesterol aracılığı ile artması öne sürülmektedir.<sup>111</sup> Ayrıca endotel hücrelerde yapılan in vitro bir çalışmada da okside LDL komponentlerinden birinin DDAH aktivitesini azaltarak ADMA düzeyini artırabileceği belirtilmektedir.<sup>135</sup>

#### **2.4.2.3. Obezite**

Obez bireylerde yapılan çalışmalar ADMA artışının obezite ile kuvvetli bağlantısını işaret etmektedir.<sup>136</sup> Eid ve arkadaşlarının 563 yaşlı ve kardiyovasküler hastalık açısından yüksek riskli erkek bireylerde yaptığı bir çalışmada obez erkeklerde plazma ADMA düzeyleri ile vücut kitle indeksi (VKİ) arasında kuvvetli bir ilişki saptanmıştır.<sup>137</sup> McLaughlin ve arkadaşlarının çalışmasında insülin rezistans sendromu olan obez kadınların insülin rezistansı olmayan obezlere göre yüksek ADMA düzeylerine sahip olduğu bildirilmiştir.<sup>138</sup> Ülkemizden bir çalışmada ise plazma ADMA düzeyi morbid obez hastalarda anlamlı şekilde yüksek bulunmuş ve gastrik bant operasyonu sonrası gelişen kilo verimiyle anlamlı düşüşler bildirilmiştir.<sup>139</sup>

#### **2.4.2.4. Diabetes Mellitus**

Endotel disfonksiyonunun insülin direnci ile ilişkisi bilinmekle birlikte patofizyolojik temeli çok net değildir. Bu konuda ADMA artışının insülin direnci gelişimine katkıda bulunabileceği yönünde görüşler mevcuttur.<sup>126</sup>

Tip 2 diabetes mellituslu hastalarda plazma ADMA düzeyi üzerine yapılan çalışmalarda çarpıcı sonuçlar saptanmıştır. Örneğin, Krzyzanowska ve arkadaşları tip 2 diabetli hastalarda artmış ADMA düzeyleri rapor ederken, başka bir çalışmada ise Pavia ve arkadaşları tip 2 diabetli hastalarda azalmış ADMA düzeyleri saptamışlardır ve bu sonucun hastalarındaki artmış glomerüler filtrasyon hızı ve kötü glisemik kontrole bağlı

olabileceğini savunmuşlardır.<sup>140, 141</sup> Bunun yanında sonraki yıllarda yayınlanan yeni bir makalede ise tip 2 diabetli hastalarda artmış ADMA düzeyinin miyokard enfarktüsü, serebrovasküler olay ve tüm nedenlerden ölüm gibi kardiyovasküler olaylar açısından güçlü bir gösterge olduğu ortaya koyulmuştur.<sup>142</sup> Diabetik komplikasyonlar açısından da makrovasküler ve retinopati gibi mikrovasküler komplikasyonlarla ADMA arasında kuvvetli ilişki saptanmıştır.<sup>140, 143</sup> ADMA düzeyleri tip 1 diabetli hastalarda da incelenmiştir. Bu konuda tip 1 diabetli hastalarda artmış ADMA düzeyleri ve ADMA'nın VKİ, açlık kan şekeri, LDL kolesterol ve HDL kolesterol ile ilişkisi ortaya konmuştur.<sup>144</sup> Komplikasyonlar açısından ise Tarnow ve arkadaşları erken diabetik nefropatili tip 1 diabetik hastalarda yüksek ADMA düzeyleri ve bunun glomerüler filtrasyon hızı ile negatif korelasyonunu bildirmişlerdir.<sup>145</sup> Hipergliseminin ADMA artışına nasıl yol açabileceği tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu konuda hipergliseminin oksidatif stresi uyarıp ADMA'yı metabolize eden DDAH enzim aktivitesini bozduğu ve oksidatif stresin ADMA'yı sentez eden arginin metiltransferaz ekspresyonunu etkilediği yönünde görüşler ortaya konmuştur.<sup>127</sup>

#### **2.4.2.5. Metabolik Sendrom**

İnsülin direcinin temel mekanizma olduğu metabolik sendromda, ADMA artışının metabolik sendrom komponentleriyle olan yakın ilişkisi ADMA'nın insülin rezistans sendromu patogenezinde önemli bir nokta olduğu görüşünü akla getirmektedir.<sup>126</sup> Fakat metabolik sendromlu hastalarda yapılan daha yeni bir çalışmada ADMA'nın metabolik sendrom patofizyolojisinde rolünün olmadığı fakat bu sonucun çalışma popülasyonunun etnik ve çevresel özelliklerine bağlı olabileceği bildirilmiştir.<sup>146</sup>

#### **2.4.2.6. Polikistik Over Sendromu**

Polikistik over sendromlu hastalarda ADMA düzeyini inceleyen az sayıda çalışma vardır. Bunlardan birinde polikistik over sendromu olan adolesanlarda kontrole göre benzer ADMA düzeyleri saptanmışken, başka bir çalışmada da hormon tedavisi ile insülin direncinden bağımsız olarak ADMA düzeylerinde azalma olduğu bildirilmiştir.<sup>136, 147</sup>

#### **2.4.2.7. Hipopitüitarizm**

Hipopitüitarizmi olan hastalarda yapılan tek bir çalışma vardır. Bu çalışmada yüksek ADMA düzeyleri saptanmış olup, ADMA konsantrasyonu glukoz tolerans testindeki 2. saat glukoz düzeyi ile bağlantılı bulunmuştur.<sup>136, 148</sup>

#### **2.4.2.8. Tiroid Disfonksiyonu**

Tiroid disfonksiyonunda ADMA düzeyleri incelenmiştir. Hem hipertiroidili hem de hipotiroidili hastaları içeren bir makalede plazma ADMA düzeyleri her iki grupta da kontrole göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur.<sup>149</sup> Başka bir çalışmada ise ADMA düzeyleri hipotiroid hastalarda normalken hipertiroid hastalarda artmış olarak saptanmıştır.<sup>150</sup> Ayrıca bu çalışmada tüm hastalar değerlendirmeye alındığında ADMA ile serbest T4 arasında anlamlı korelasyon rapor edilmiştir. Sublinik hipotiroidide ise yüksek ADMA düzeyleri görüldüğü ve L-tiroksin tedavisi ile normale döndüğü bildirilmiştir.<sup>151</sup>

#### **2.4.2.9. Homosistein**

Homosistein, DDAH aktivitesini enzimin aktif bölgesindeki sistein rezidüsüyle etkileşimi sonucu inhibe eder. Homosistein metilasyonunda ADMA önemli rol oynar. Arginin metilasyonundaki metil vericisi S-adenozilmetiyonin, ADMA, metil argininler ve S-adenozil homosisteindir. S-adenozil homosistein daha sonra homosisteine çevrilir. Metiyonin döngüsünün yüksek olması homosistein seviyelerini arttırarak endotelial disfonksiyona sebep olur.<sup>152</sup>

Hiperhomosisteinemi de ADMA düzeylerinde artış tespit edilmiştir.<sup>118</sup>

#### **2.4.2.10. Kardiyovasküler Hastalıklar**

ADMA gibi çeşitli arginin analogları NO sentezini inhibe eder. Bu analoglar trombüs oluşumu ve ateroskleroza sebep olabilir. Yapılan çalışmalarda, akut koroner sendromlu olgularda ADMA seviyeleri yüksek bulunmuş ve tedavi sonrası ADMA seviyelerinin azaldığı gözlenmiştir.<sup>118</sup>

Kalp yetmezliği olan hastalarda ADMA seviyesi düşer. ADMA'nın ventrikül kontraksiyonu ve kalp hızını azaltma etkisi vardır.<sup>153</sup>

Kardiyovasküler hastalıklar için tedavi, artmış ADMA'nın etkilerini ortadan kaldırmak veya ADMA seviyelerini azaltmaktır. Teorik olarak arginin, ADMA'nın yerini alabilir ve NOS aktivitesini onarabilir.<sup>154</sup>

#### **2.4.2.11. Multiple Skleroz ( MS )**

Bu konuda sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Deneysel ortamda ratlar üzerinde yapılan Ljubisavljevic ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada arginaz ve metillenmiş argininlerin (ADMA ve SDMA) MS'in akut fazı esnasında sinir dokusunun hasarına bir cevap olarak oluştuğu tespit edilmiştir.<sup>155</sup>

#### **2.4.2.12. Alerjik Hastalıklar**

Bu konuda da kısıtlı çalışma mevcuttur. Tosun ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 29 alerjik rinit ve 21 nazal polipozis ve 30 sağlıklı kontrol grubu kullanılarak ve alerjik rinitli hastalarda serum ADMA  $0.52 \pm 0.10$   $\mu\text{mol/L}$ , nasal polipozisli hastalarda serum ADMA  $0.62 \pm 0.08$   $\mu\text{mol/L}$  ve kontrol grubunda serum ADMA  $0.67 \pm 0.09$   $\mu\text{mol/L}$  olarak tespit edilmiştir. Fakat kontrol grubundaki bu ADMA daki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p=0.069$ ).<sup>156</sup>

### **2.5. Analiz Yöntemleri**

#### **2.5.1. ELISA Tekniği**

Antijen antikor reaksiyonlarını gösterebilmek için enzim kullanılan tüm tekniklere genel olarak enzim immunotest (enzyme immunoassay, EIA) denir. Enzimle işaretli immuno reaktiflere dayalı bu testler, klinik ve araştırma laboratuvarlarında oldukça önemli bir yere sahiptir. Radyoimmünötestler (RIA) EIA'den daha önce kullanılmaya başlanmış, ancak işaretleme için  $I^{125}$  gibi kısa ömürlü izotopların kullanılması, toplum sağlığı ve çevreye zararlı radyoaktif madde kullanımı, RIA'in endokrinoloji laboratuvarlarında kullanımı ile sınırlı kalmasına neden olmuştur. Bu yüzden immünfloresan (IF) teknikleri RIA'dan daha yaygın bir kullanım alanı bulmuştur. Ancak IF tekniklerinin uygulanmasında iyi eğitilmiş eleman gereksinimi ve sonuçların yorumlanmasının subjektif olması bu tekniklerin de yaygın kullanımını engellemektedir.<sup>157</sup>

ELISA sistemleri 1960'larda radioimmunoassay yöntemlerine alternatif aranırken bulunmuştur. EIA'de kullanılan reaktiflere göre daha uzun ömürlü olmaları, atık maddeleri ile ilgili radyasyon tehlikesi olmaması, basit testler olması ve otomatize edilebilmesi diğer iki tekniğe olan üstünlükleridir. Daha önemlisi laboratuvarlara çok



fazla sayıda örnekle çalışma olanağı verdiği gibi analizlerin kısa sürede sonuçlanması gibi üstünlükleri de vardır.

EIA diye isimlendirilen yöntemler, homojen ve heterojen olmak üzere iki çeşittir. Homojen tekniklerde, enzim bir haptene ile konjuge haldedir. Tekniğin esası, bu konjugatın antikor ile reaksiyona girmesi halinde enzim aktivitesinin başlamasına dayanır. Ancak bu tekniğin düşük moleküler ağırlıklı maddeler kullanma zorunluluğunun bulunması, pahalı ve zahmetli olması gibi dezavantajları vardır. Bu nedenlerden dolayı fazla sık kullanılmazlar.<sup>158</sup>

Klinik laboratuvarlarında kullanılan enzim immünotestler heterojen yöntemlerdir. Heterojen EIA'de bağlı olan ve olmayan reaktifler birbirinden yıkama işlemi ile fiziksel olarak ayrılırlar. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), heterojen EIA'ye örnektir. ELISA'da bir enzimle konjuge edilmiş antikor (veya antijen), substratı ile reaksiyona girerek renkli bir ürün oluşturur.

ELISA testleri antijeni veya antikorunu (sınıfa özgül antikor da olabilir) ölçmek için kullanılabilir.<sup>159</sup>

ELISA kompleks bir teknik olmamasına rağmen bu teknikte birçok değişken kontrol edilmelidir. Katı faz, yıkama işlemleri, kullanılan enzim ve substratların seçimi ve etkinliği, reaksiyonların sonlandırılma zamanı, kontrol edilmesi gereken değişkenlerdir. Katı faz olarak çoğunlukla mikrotitrasyon plakları şeklinde plastik(plate) kullanılmaktadır. Polistren mikrotitrasyon çukurcuklarından başka, plastik boncuklar, ferröz boncuklar ve nitroselüloz membran da solid materyal olarak kullanılabilir.<sup>160</sup>

ELISA'da kullanılan enzimler kinetikleri ve konjuge edilme dereceleri açısından iyi tanımlanmış enzimlerdir. Bunlar peroksidaz, alkalen fosfataz, beta-galaktozidaz gibi substratları renkli ürünlere çevirebilme yeteneğinde olan enzimlerdir. Bu renkli ürünler standart spektrofotometrede okutulabilir. Beta-galaktozidaz kullanılmışsa florimetrede

okunmalıdır. Substratlar genellikle alkale fosfataz için nitrofenil fosfat, peroksidaz için ortofenilendiamindir.<sup>158, 160</sup>

Genel olarak 6 farklı ELISA protokolünden bahsedilebilir (Tablo 2.4).<sup>157</sup>

Yarışmacı olan (kompetitif) ve olmayan ELISA testleri vardır. Yarışmacı ELISA genellikle antijen varlığını göstermek için kullanılır. Aranılan antijene özgül antikor katı faza bağlanmıştır. Enzimle işaretli antijen ve test edilecek antijen (klinik örnek) katı fazdaki antikora aynı zamanda eklenir ve her iki antijenin de antikordaki bağlanma bölgeleri için yarışması amacıyla inkübe edilir. Inkübasyondan sonra yıkılarak bağlanmamış antijenler uzaklaştırılır ve enzim substratı konarak inkübe edilir. Bağlanmış enzim substratla reaksiyona girerek renk oluşturur, spektrofotometrede absorbans okunur. Substratın hidroliz miktarı, örnekteki antijen miktarı ile ters orantılıdır. Yani sonuçta renk değişikliği olmazsa bu klinik örnekte antijen varlığını gösterir.<sup>161</sup>

Yarışmacı olmayan ELISA sandviç tekniği antijeni saptar. Antikor katı faza bağlanmıştır. Bunun üzerine antijen içeren vücut sıvısı konur. Inkübasyon ve yıkama işleminden sonra enzimle işaretli antikor eklenir. Inkübasyon ve yıkama işleminden sonra özgül kromojenik enzim substratı eklenir. Bağlı enzim substratla reaksiyona girerek renk değişikliğine neden olur. Bu renk değişikliği antijen varlığının kanıtıdır.<sup>159,</sup>

<sup>161</sup> Yarışmacı olmayan ELISA antikor varlığını saptamak üzere de kullanılır. Bu yöntemde katı faza antijen bağlanmıştır. Test edilecek serum eklenir, serumda antijene özgül antikor varsa antijen antikor kompleksi oluşacaktır. Yıkamadan sonra enzimle işaretli antiglobulin konur. Inkübasyon ve yıkamadan sonra substrat eklenir. Özgül antikor varsa enzimle işaretli antiglobuline bağlanacak ve substrat hidrolize olacaktır. Her iki yöntemde de absorbans miktarı mevcut antijen veya antikorun miktarıyla doğru orantılıdır.<sup>159-161</sup>

ELISA yöntemlerinde de bazı modifikasyonlar yapılabilir. En çarpıcı olan "capture" yakalama testleridir. Yakalama testleri de antikor ve antijen saptanmasında kullanılır. Antijen saptama için kullanılan yakalama testinde katı faza poliklonal veya monoklonal antikor bağlanır. Enzimle işaretli antikorda poli veya monoklonal olabilir. Monoklonal antikorların sadece bir epitopa bağlandığı düşünülürse, poliklonal antikorlar antijenin farklı formlarını saptamada daha güvenilir antikorlardır.<sup>162, 163</sup>

ELISA plakları hazırlanırken, antijen aranacaksa antijene özgül antikor veya antikor aranacaksa antikora özgül antijen katı faza (plastik çukur veya boncuğa) bağlanmalıdır. Plakların kaplanma işlemi, 2 saat 37 °C'de ya da bir gece oda ısısında veya +4 °C'de bekletildikten sonra yıkama yapılarak gerçekleştirilir. Inkübasyonlar ise 1-2 saat 37 °C'de yapılır.<sup>164</sup>

Antijen ve antikor arama ayrı ayrı ele alınacak olursa, antijen arama için kullanılan yöntemler:

Direkt ELISA (sandviç yöntemi); araştırılacak antijene özgü antikor, solid faza bağlanır. Antijen araştırılacak materyal ile birlikte inkübe edilir. Üzerine enzim bağlanmış özgül antikor eklenir. İncelenmekte olan materyalde antijen var ise, katı faza bağlanmıştır. Buna bağlanmış olan enzimli antikorun enzimi, substrat eklenince kendi substratına etkili olarak renk oluşur.<sup>165</sup>

Direkt ELISA tek basamaklı sandviç yöntemi; direkt ELISA'dan farkı, katı fazda yapışık özgül antikorun üzerine aynı anda antijen aranmakta olan materyal ile enzim bağlantılı antikor eklenir.<sup>157, 159</sup>

İndirekt ELISA; katı faza yapışmış özgül antikora daha önce bir süre inkübe edilmiş antijen aranacak materyal ve özgül antikor karışımı eklenir. Ancak bu ikinci antikorun, katı fazda yapışık antikorun elde edilmiş olduğu hayvan türünden farklı bir hayvan türünden elde edilmiş olması gerekir. Eğer incelenen materyalde uygun antijen

varsa, bir yandan serbest antikora diğer yandan da katı fazdaki antikora bağlanır; eklenen enzimli antiglobulin yıkama ile gitmez. Enzime uygun kromojen substrat eklenince renk oluşur.<sup>157, 159</sup>

Kompetitif ELISA yöntemi, katı faza yapışmış özgöl antikorun üzerine antijen aranacak olan materyal eklenir. Inkübasyondan sonra, enzim bağlanmış özgöl antijen, takiben substrat eklenir. İncelenen materyalde antijen varsa, katı fazdaki antikora bağlanmıştır, enzimli antijen yapışamayacağı için, yıkama ile uzaklaşır; substrat eklenince renk oluşmaz.<sup>157, 159</sup>

Antikor arama amacıyla kullanılan yöntemler:

İndirekt yöntem (katı faz sandviç yöntemi); bilinen antijenin katı faza adsorbsiyonundan sonra, antikor aranan hasta serumu ile inkübe edilir. Antijen-antikor kompleksinin gösterilebilmesi için, enzim ile konjuge insan antiglobulini eklenir. Antikor bağlanmışsa enzimli antiglobulin de bağlanır; uygun enzim substratı eklenince renk oluşur.<sup>157, 159</sup>

Sandviç inhibisyon yöntemi; serbest antijen hasta serumu ile karıştırılıp bir süre inkübe edilir. Hasta serumunda antikor varsa antijene bağlanarak onu bloke edecektir. Bu karışım katı fazdaki özgöl antikorun üzerine eklenir. Inkübasyondan sonra sırasıyla, enzim bağlanmış özgöl antikor ve kromojen substrat eklenir. Hasta serumunda antikor varsa serbest antijen ile bloke olmuş olduğundan solid fazdaki antikora bağlanmaz. Bu durumda eklenen enzimli antikor da bağlanmayacağından substrattan renk oluşmaz.<sup>157,</sup>

160

Kompetitif ELISA yöntemi; katı faza bağlanmış antijenin üzerine önce antikor aranmakta olan hasta serumu, takiben enzimle işaretli özgöl antikorve kromojen substrat eklenir. Hasta serumunda antikor varsa, enzimle işaretli antikora göre daha aktif

olduğundan, yarışma sonucu solid fazdaki antijene bağlanmıştır. Enzimli antikor bağlanamayıp yıkama ile uzaklaştığı için substrat eklendiğinde renk oluşmaz.<sup>158, 160</sup>

**Tablo 2.4.** Farklı ELİSA protokolleri <sup>157</sup>

ELISA protokolü	Kullanımları	Gerekli Kimyasallar	Yorumlar
İndirekt	Antikor aramada	Antijen saf veya yarı saf: antikor içeren test solüsyonu; immünize örneklerde Ig'ı bağlayan enzim konjugatı	Önceden varolan spesifik antikorların kullanımına gerek duyulmaz; relatif olarak fazla miktarda antijen gerektirir.
Direkt kompetitif (yarışmacı)	Antijen aramada; çözünür antijeni saptamada	Antijen saf veya yarı saf; Antijen içeren test solüsyonu; spesifik antijen için enzim-antikor konjugatı	Sadece iki basamaktan oluşan hızlı test; antijenik çapraz reaksiyonu ölçmede çok kullanışlıdır.
Antikor-sandviç Yöntemi	Antijen aramada; çözünür antijeni saptamada	Antikor yakalama (capture) (saf veya yarı saf spesifik antikor); Antijen içeren test solüsyonu, antijen için spesifik enzim-antikor konjugatı	En hassas antijen testi; relatif olarak fazla miktarlarda saf veya yarı saf antikor gerektirir (antikor yakalama).
Çift antikor-sandviç yöntemi	Antikor arama	Antikor yakalama (capture) (immünize örneklerde Ig için spesifik); antijen içeren test solüsyonu, antijen için spesifik enzim-antikor konjugatı	Saflaştırılmış antijen gerektirmez; beş basamaklı relatif olarak uzun bir testtir.
Direkt hücresel yöntem	Antijen eksprese eden hücrelerin aranmasında; hücresel antijen ekspresyonunun ölçülmesi	İlgili antijeni eksprese eden hücreler; hücresel antijen için spesifik enzim-antikor konjugatı	Fazla miktarda taramalarda hassas bir testtir; heterojen karışık hücre gruplarında hassas değildir.
İndirekt hücresel yöntem	Hücresel antijenlere karşı oluşan antikorların aranmasında	İmmünizasyonda kullanılan hücreler; antikor içeren test solüsyonları; immünize örneklerde Ig bağlayan enzim konjugatı	Düşük miktarda eksprese edilen hücresel antijenler için spesifik antikorları saptamayabilir.

### 2.5.2. HPLC Yöntemi

Yüksek performans/basınç sıvı kromatografisi olarak Türkçeye çevrilen bu sistem gelişmiş ve güvenilir bir analitik metottur. Bu sistemin bileşenlerini kısaca tanıyalım;

Standart HPLC donanımı temel olarak 4 bileşenden oluşmaktadır. Bu bileşenler sırasıyla pompa, enjektör, kolon (sabit faz) ve dedektör'dür.<sup>166</sup>

Pompa: HPLC donanımında yer alan pompalama sistemleri, akış hızına göre, pompanın yapımında kullanılan malzemeye göre ve pompanın mobil fazı iletme mekanizmasına göre olmak üzere 3 farklı şekilde kategorize edilebilmektedir.

Akış hızına göre HPLC pompaları:

Microbore pompa sistemleri: İç çapı 2 mm'ye kadar olan kolonlar için kullanılır ve 1-250 µL/dak aralığında akış hızı sağlarlar.

Standart bore pompa sistemleri: Analitik HPLC uygulamalarında en sık kullanılan pompa sistemi olup 100 µL – 10 mL/dak aralığında akış hızı sağlarlar. Yarı preparatif HPLC uygulamalarında iç çapı 12 mm'ye kadar olan kolonlar için tercih edilirler.

Preparatif pompa sistemleri: Analitik HPLC uygulamalarının dışındaki çalışma alanlarında kullanılır ve 10 mL/dak'dan büyük akış hızı sağlarlar.<sup>167</sup>

Pompanın yapıldığı malzemeye göre HPLC pompaları:

Metalik pompalar: en çok tercih edilen metalik malzeme, mekanik dayanıklılığı, aşınma direnci ve iyi termal stabilitesi nedeniyle 316 paslanmaz çeliktir. Mobil fazın bileşenlerinden çok azı (örn. Hidroklorik asit) 316 paslanmaz çeliğe zarar verebilir. Bir diğer metalik malzeme alternatifi ise titanyum'dur. Mekanik dayanıklılık özellikleri 316

paslanmaz çeliğe benzemekle birlikte, aşınma direnci ve kimyasallara karşı inertliği daha fazladır. Titanyum ve çelik materyaller 6000 psi basınca kadar dayanıklıdırlar. Metalik materyallerin sakıncaları olarak ise yüksek maliyetleri, kuvvetli asidik ortamlara dayanıksızlık, biyolojik örneklerle geçimsizlik sayılabilir.

Ametalik pompalar: metalik pompaların bahsedilen sakıncaları sebebiyle ametalik materyaller de pompa imalinde kullanılmaktadır. Bu amaçla en çok polietilenketon (peek), politetrafloroetilen (teflon) ve seramik materyaller tercih edilmektedir. Teflon biyolojik örnekler ve asidik ortamlarla geçimli olmakla birlikte 2000 psi basıncın üzerisi için dayanıklı değildir. Peek ise 5000 psi basınca kadar dayanıklı olup 316 paslanmaz çeliğe zarar veren asidik çözeltilere dayanıklıdır. Ancak HPLC uygulamalarında kullanılan bir çok organik çözücülere dayanıksızdır. Seramik yapı materyali olarak safir 20 yılı aşkın süredir pompalarda özellikle piston parçalarının imalatında kullanılmaktadır. Bu tür malzemeler iyi kimyasal stabiliteye sahip olmakla beraber çok yüksek maliyetleri uygulamalarında kısıtlamalar getirmektedir.<sup>167</sup>

Mobil faz iletme mekanizmasına göre HPLC pompaları:

Şırınga Tip Pompalar: çok kullanılmamakla birlikte akış hızının 100µL/dak'dan daha az olduğu uygulamalarda (örn. Kapiller sıvı kromatografisi uygulamaları) tercih edilmektedirler. 10-50 mL hacminde bir şırıngaya pistonun elektrik motoruyla ittirilmesiyle akış sağlanmaktadır. Sağlanabilecek mobil faz akış süresi şırınganın hacmi ile sınırlı olup, yeniden dolun sırasında akış kesilmek zorundadır.

Piston Pompalar: modern HPLC donanımının standart parçasıdır. Yapısı 2 kısım hareketli parçadan oluşur. Bunlar, check valve'ler ve pistondur.



Enjektör: HPLC donanımını oluşturan enjektör örneğin sabit faz (kolon) öncesinde mobil faza enjekte edilmesi için kullanılır. Elle kumanda edilen manuel ve bilgisayar kumandalı oto-enjektörler olmak üzere 2 çeşidi bulunmaktadır.

Manuel Enjektörler: örneğin enjekte edilebilmesi için enjektör önce doldurma pozisyonuna getirilerek örnek, isteğe göre seçilebilen sabit hacimli, loop içerisine doldurulur. Loop'a doldurulan örnek hacmi loop sabit hacmini geçerse, fazla olan kısım dışarıya otomatik olarak atılır. Daha sonra enjektörün kolu enjeksiyon pozisyonuna getirilerek örnek mobil faz içerisine enjekte edilmiş olur. Kullanılan loop hacimleri çok değişken olup genellikle 5 µL – 5 mL aralığında değişir. Loop hacmi küçüldükçe tekrarlanabilirlik adına yapılan hata oranı da büyümektedir.

Oto-enjektörler: iki tip oto-enjektör mevcuttur. Bunlar XY tipi ve carousel tipidir. XY tipinde enjektör hareketli olup belirtilen koordinatlara giderek örneği şişesinden çekmekte ve loop vasıtasıyla mobil faza enjekte etmektedir. Bunun için seçilen örneklere ait bilgilerin, gerekli yazılım kullanılarak, önceden bilgi işlemciye girilmesi gerekmektedir. Carousel tipinde ise örnekler dönen, dairesel şekilli bir taşıyıcı vasıtasıyla sabit bir enjektörün altına taşınmaktadır. Oto-enjektörler hem kullanım kolaylığı hemde hata oranının çok az olması sebebiyle son yıllarda manuel enjektörlere kıyasla daha fazla kullanım alanı bulmuştur.<sup>167</sup>

Kolon: modern HPLC donanımının 4 temel yapı taşından birisi olan kolon, karmaşık örneklerde bileşenlerin birbirinden iyi çözünürlükle ayırımından sorumlu sabit fazdır. Kolon imalatında yapı materyali olarak 316 paslanmaz çelik, teflon, cam veya peek en sık tercih edilenlerdir. Kolonun ayırım gücü ve performansı yapıldığı materyalden çok, iç yüzeyine yapılan kaplamada kullanılan malzemenin kimyasal ve fiziksel özelliklerinden etkilenmektedir. Kullanılan bu tür kaplama malzemeleri çok

çeşitli olup, kullanılacak mobil fazın ve uygulanacak HPLC metodunun özelliklerine ve analizi yapılacak örneğin bilinen kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre seçilmelidir. Seçilecek kolonun HPLC uygulamasında kullanılacak akış hızı ve dolayısıyla oluşacak basınca dayanıklı olmasına dikkat edilmelidir. Birçok analitik kolonun iç çapı 2-5 mm aralığında değişmektedir. Kolon iç çapı arttıkça akış hızı ve iç doldurma hacmi artmakta ama oluşacak piklerin çözünürlüğü dolayısıyla duyarlılık azalmaktadır. Kolonların boyları (uzunluğu) çok çeşitli olup genellikle 30-300 mm aralığında değişmektedir. Kolon uzunluğu arttıkça örnek bileşenlerinin ayırımı daha iyi olmakta fakat analiz süresi uzadığı için daha fazla mobil faz harcanmaktadır. Kolon boyutlarının tanımlanmasına uluslararası standartlar getirilmiştir. Buna göre önce mm cinsinden uzunluk ve çap yazılmakta, bunu firma adı, sabit faz türü, A<sup>0</sup> türünden poroz yüzey çapı ve µm cinsinden partikül büyüklüğü izlemektedir.

Örneğin, 250/4.6 Nucleosil C18 100 – 5 yazıldığında, kolonun 250 mm uzunluk ve 4.6 mm iç çapa sahip olduğu anlaşılmaktadır. Kolonun firması (markası) Nucleosil olup, sabit faz türü normal fazda kullanılan bir tür olan C18 dir. Poroz yüzey çapı 100 A<sup>0</sup> olup, dolgu materyaline ait partikül büyüklüğü 5 µ'dur.

Dedektör: HPLC donanımında 4 temel bileşenden birisi olan dedektörler, örnek bileşenlerini tayin ederken ölçtükleri fiziksel özelliklere göre, 8 çeşittir:

Ultraviole / Görünür Bölge Dedektörü (UV/VIS): Absorbans ölçülür. Lambert-Beer yasası geçerlidir. Spektrum taraması yapmak, farklı dalga boyunda çalışmak veya dalga boyunu zamana karşı programlamak mümkündür.<sup>167</sup>

Fotodiyot Array Dedektörü (DAD): UV/VIS dedektörden farkı, 512 elementten oluşan bir yüzeyde, her elementin ayrı bir dalga boyundaki absorbansı eş zamanlı olarak

ölçebilmesidir. Bu sayede 3 boyutlu kromatogramlar almak ve istenilen her pikin çok hızlı spektrum taramasını görebilmek olasıdır. Ayrıca istenilen dalga boyu aralığında çalışılabilmesi bu dedektörün sağladığı bir diğer önemli avantajdır. Kullanılan ışık kaynağı döteryum veya tungsten lambadır.<sup>167</sup>

Floresans Dedektörü (FLD): Organik maddelerin yaklaşık %15'i floresans oluşturma yeteneğine sahiptir. Oluşan floresans ölçülmektedir. Kullanılan ışık kaynağı ksenon lamba olup, duyarlılığı UV/VIS dedektöre göre yaklaşık  $10^3$  kat fazladır.<sup>167</sup>

İletkenlik Dedektörü (CDD): İletkenlik ölçülür. Daha çok anyon ve katyon analizlerinde kullanılır. Sıcaklık kontrolü çok önemlidir bu sebeple kolon fırını içerisinde çalışmalıdır. Kullanılan mobil fazın iletkenliği ne denli düşük olursa oluşan gürültü de o denli düşük olur.<sup>167</sup>

Refraktif İndeks Dedektörü (RID): Kırılma indisi ölçülür. Sıcaklıktan etkilenir. Örnek bileşenlerinin bulunduğu ortamda yoğunluk artacağından gelen ışık kırılarak hücreyi terkeder. Işığın ölçülen kırılma oranından (kırılma indisi) kantitatif tayin yapılır.<sup>167</sup>

Elektrokimyasal Dedektör (ECD): Elektroaktif maddeler analizlenebilir. Yani bileşenler, belirli potansiyel değerlerinde yükseltgenebilir veya indirgenebilir olmalıdır. Ölçülen fiziksel özellik tayin sırasında oluşan elektrik akımıdır.<sup>166</sup>

Kütle Dedektörü (MS): Örnek bileşenlerine ait çok özgün kromatogramlar elde edilir, dolayısıyla özellikle kalitatif tayinlerde teşhis amaçlı kullanımlarda çok önemli bir dedektördür.<sup>166</sup>

Evaporatif Işık Dağıtıcı Dedektör (ELSD): adından da anlaşılacağı gibi, sürekli küçük damlacıklar halinde sütun taşıyıcı atomize bir sprey kullanılır. Bu damlacıklar atomize edici gaz içine süspansiyon halinde ince partikül madde olarak solutlar bırakarak buharlaşmasına izin verilir. Atomize edici gaz hava veya bir inert gaz olabilir.<sup>166, 167</sup>

HPLC Sistem Türleri: isokrotik, düşük basınçlı gradient ve yüksek basınçlı gradient sistem olmak üzere üç sınıfta incelenebilir. Şimdi bunların özelliklerini inceleyelim;

İsokrotik sistem: Tek solvent bir pompa yardımıyla kolona iletilir, solvent karışım olabilir, ayırım sınırlıdır. Karışım pompadan sonra gerçekleşir.

Düşük Basınçlı Gradient Sistem: Yine tek pompa yardımıyla maksimum dört farklı mobil faz kolona iletilir, bu sistemde mobil fazların karışımı (gradient) pompadan önce gerçekleşir. İzokrotik sistemde net ayrılamayan bileşikler bu sistemde rahatça ayrılabilir.

Yüksek Basınçlı Gradient Sistem: iki yada üç pompa yardımıyla iki yada üç farklı mobil faz kolona iletilir, bu sistemde mobil fazların karışımı (gradient) pompadan sonra gerçekleşir.

HPLC'de ayırma teknikleri deyince akla hemen normal faz veya ters faz teknikleri gelse, ters faz iyon çifti, iyon değişimi, kiral ayırım gibi teknikleri de kullanılabilir. Burada çok yaygın kullanım alanına sahip ilk iki teknikten bahsedilecektir.

Normal faz (NP): ilk geliştirilen tekniktir, bu sistemde kolon polar, mobil faz apolardır. Kullanılan kolonlar silica gel, siyano, amino, diol veya nitro kolonlardır.

Ters faz (RP): en sık kullanılan tekniktir, kolon apolar, mobil faz polardır, kullanılan kolonlar C18, C8, C4, fenil, TMS (trimetilmonoklorosilan), siyano'dur.<sup>167</sup>

HPLC kullanıcıları bilirler ki, kolon akış hızı, sıcaklık, mobil fazın polaritesi ve pH'sı, ayrıca yeni takılan kolonun şartlandırılması gibi faktörler analiz sonucuna önemli oranda etki etmektedir. İşte bu yüzden yaygın olarak yapılan analizler için ticari HPLC kitleri üretilmektedir. Bu ticari kitler kullanılmak suretiyle kullanıcı hataları en aza indirilebilmektedir.

HPLC sistemlerinin pompa basıncı artırılıp, kolon ve mobil faz akış hatları daha dayanıklı malzemeler kullanılarak ultra performanslı sıvı kromatografisi (UPLC) sistemleri geliştirilmiştir. Fakat henüz bu sistemler HPLC kadar yaygın kullanıma sahip değildir.

### **3. MATERİYAL VE METOT**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1 Olguların Seçilimi ve Gruplandırma**

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim dalına müracaat eden akut iskemik inmeli hastalardan antikoagülanlı cam tüpe kanları alındı. Hasta grubunda primer olarak hipertansiyon ve/veya Tıp 2 diyabet bulunmaktadır. Hastalar seçilirken nitrat türevi ilaç kullanmadıkları teyit edildi. Kontrol grubundaki sağlıklı olduğu bilinen kişilerden kanları yine aynı şekilde alındı.

##### **3.1.2. Numunelerin Toplanması**

Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünün 24.07.2012 tarih ve 2012.3.1/14 numaralı etik kurul izni Ek 2’de verilmiştir.

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim dalına müracaat eden 81 akut iskemik inmeli hastadan antikoagülanlı cam tüpe kanları alındı ve günlük olarak 2500 rpm ve 20 dakika santrifüj edilerek plazma elde edildi. Plazmalar gruplandırılarak (aliquotlama) çalışma zamanına kadar -80 C de muhafaza edildi. Aynı şekilde kontrol grubundaki sağlıklı 50 kişiden kanları alınarak plazma eldesi yapıldı ve çalışma vaktine kadar -80 °C’de muhafaza edildi.

### 3.1.3. Kullanılan Cihazlar

**Tablo 3.1.** Kullanılan cihaz ve aletlerin markası ile ilgili firma ve/veya ülke

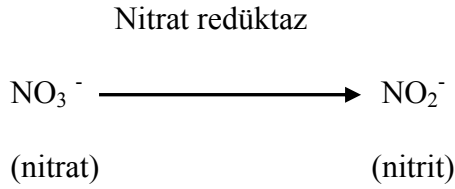
<b>Cihaz veya Alet</b>	<b>Firma veya Ülke Adı</b>
HPLC	Shimadzu LC-20AT, Japan
HPLC Floresan Dedektörü	Shimadzu RF-10AXL, Japan
ELİSA Reader	Biotek EL 50/ 800, USA
Otomatik Pipetler	Brand, Germany
Vorteks	İka MS 3, İtaly
Santrifüj	Hettich Universal 320 R, Germany
Hassas Terazı	Denver SI-234, U.S.A
Derin Dondurucu(-80 °C)	Nuaire NU-9483E, U.S.A
Ultra Saf Su Cihazı	Human Power I, Korea

### 3.2. Metot

#### 3.2.1. NO Analizi

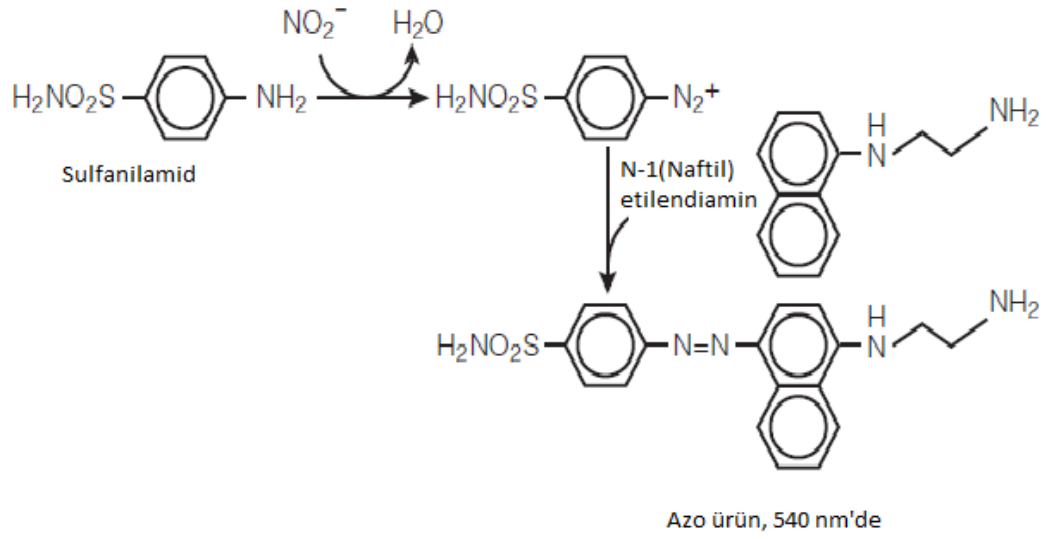
NO analizi için yaygın olarak tercih edilen ELİSA kiti (Cayman Chemical tarafından üretilen 780001 kodlu Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit ) kullanılmıştır. İki basamaklı işlemlerle total nitrit/nitrat konsantrasyonunu ölçmek için tasarlanmış bir kittir.

Birinci basamakta nitrat redüktaz kullanılarak nitrat, nitrite çevrilir.



İkinci basamakta nitrit koyu mor renkli azo bileşiğine çeviren Griess Reaktifi eklenir. 540 nm'deki absorbansın fotometrik ölçümü bu azo kromofor sayesinde  $\text{NO}_2^-$  konsantrasyonu doğru bir şekilde ölçülmüş olur (Şekil 3.1).





**Şekil 3.1.** Griess reaksiyonu ile NO ölçümü

### 3.2.1.1. Reaktiflerin Hazırlanması

1) Nitrat/ Nitrit Assay Buffer: içerik 100 mL ultrasaf su ile sulandırıldı. Bu Assay Buffer çalışmadan hemen önce hazırlandı. Bu buffer 4 °C 'de yaklaşık iki ay stabilitesini koruyabilir.

2) Nitrat Redüktaz Enziminin Hazırlanması: 1.2 mL Assay Buffer ile sulandırıldı. Çalışma esnasında buzda bekletilir. Kullanılmadığında -20 °C'de depolanır. Bu çözelti dondurulup çözüldükten sonra bir kez kullanılmalıdır.

3) Nitrat Redüktaz Kofaktörlerinin Hazırlanması: 1.2 mL Assay Buffer ile sulandırıldı. Çalışma esnasında buzda bekletilir. Kullanılmadığında -20 °C'de depolanır. Bu çözelti dondurulup çözüldükten sonra bir kez kullanılmalıdır.

4) Nitrat Standardının Hazırlanması: liyofilize halindeki standarda 1 mL Assay Buffer eklendi ve vortekslenerek iyice karıştırıldı. Kullanılmadığında 4 °C 'de korunur, kesinlikle dondurulmaz. Sulandırılmış standart 4 ay stabildir.

5) Nitrit Standardının Hazırlanması: liyofilize halindeki standarda 1 mL Assay Buffer eklendi ve vortekslenerek iyice karıştırıldı. Kullanılmadığında 4 °C 'de korunur, kesinlikle dondurulmaz. Sulandırılmış standart 4 ay stabildir.

6) R1 ve R2 Griess Reaktifleri: bu reaktifler hazır halde geldiğinden herhangi bir işleme tabi tutulmadı. Bu reaktiflerde 4 °C 'de korundu.

### **3.2.1.2. Numunelerin Hazırlanması**

Elde edilen plazmaların bu kit ile kullanılabilmesi için ticari olarak temin edilen ultra filtrelerden geçirilmesine ihtiyaç vardır. Bu ultra filtrelerde plazmadan hemen önce ultrasaf su geçirilmelidir. Ultrafiltrasyon hemoglobin varlığında background absorbansı düşürecektir ve Griess Reaktifleriyle renk oluşumunu arttıracaktır. Analiz için maksimum 40 µM filtrat kullanıldı.

### **3.2.1.3. Standartların Hazırlanması**

Temiz deney tüpü içerisine 0.9 mL Assay Buffer ve 0.1 mL nitrat standardından ilave edilerek iyice vortekslendi. Bu hazırlanan stok standardın konsantrasyonu 200 µM'dır. Stok standart sırasıyla 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 25 µM, 30 µM, 35 µM olacak şekilde Assay Buffer ile seyreltilerek hazırlandı.

### **3.2.1.4. Çalışma Prensibi**

1. Kör kuyucuklarına 200 µL Assay Buffer pipetlendi, başka hiçbir şey eklenmedi.
2. 80 µL seyreltilmiş numune ilgili kuyucuklara pipetlendi. Bu esnada hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi.
3. Tüm kuyucuklara 10 µL enzim kofaktörleri ilave edildi.
4. Tüm kuyucuklara 10 µL nitrat redüktaz ilave edildi.

5. Plate kapatılarak oda sıcaklığında bir saat inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyondan sonra 50 µL R1 Griess Reaktifi tüm kuyucuklara ilave edildi.
7. Bekletilmeden 50 µL R2 Griess Reaktifi tüm kuyucuklara ilave edildi.
8. Renk değişiminin gerçekleşmesi için oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.
9. Plate 540 nm’de okuma yapıldı.

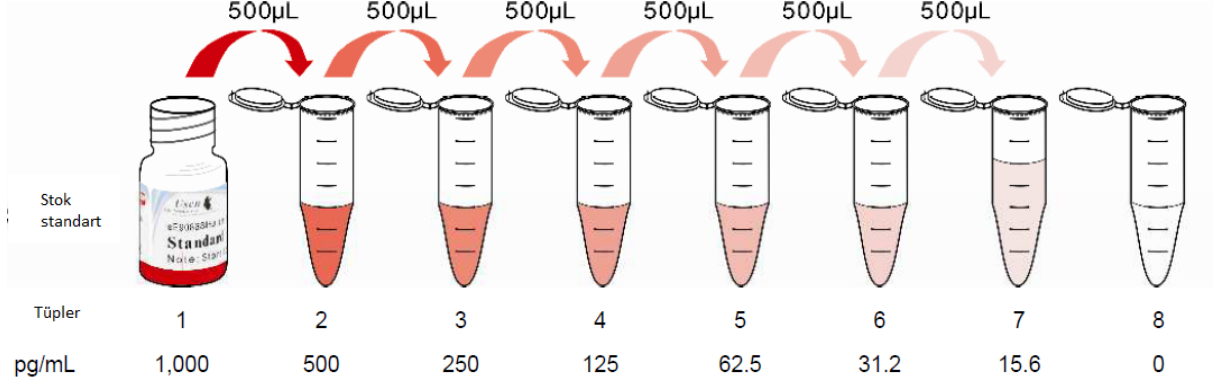
### **3.2.2. eNOS Analizi**

eNOS tayini için ticari olarak temin edilen ELİSA kiti (Uscn sE90868Hu) kullanıldı. Bu kit immunoassay sandwich enzim tekniğini kullanarak eNOS miktar tayini yapar. eNOS’a spesifik bir monoklonal antibody mikropate içinde kaplı halde bulunur. Standart ve örnekler mikropate kuyucuklara pipetlenir ve ortamda mevcut olan eNOS’lar immobilize antibody tarafından bağlanır. Daha sonra bağlanamayan substrat ortamdan uzaklaştırılır ve eNOS’a spesifik enzim bağlı poliklonal antikor kuyucuklara eklenir. Bağlanmamış antikorlar ortamdan uzaklaştırılmak için yıkanır ve sonrasında substrat çözeltisi eklenir, böylece ilk adımda bağlanmamış eNOS’un miktarı ile orantılı renk değişimi gözlenir. Bu enzim-substrat reaksiyonu sülfirik asit solüsyonu ilavesiyle durdurulur ve oluşan renkli kompleksin absorbansı 450 nm’de okunur. Örneklerdeki eNOS miktarı da standart grafik ile mukayese edilerek hesaplanır.

#### **3.2.2.1. Reaktiflerin Hazırlanması**

- 1) Tüm kit içeriği ve numuneler kullanmadan önce oda sıcaklığına getirildi.
- 2) Standartlar: standart, standart seyreltici ile 1 mL’ye seyreltildi. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve köpük oluşmadan nazikçe çalkalandı. Hazırladığımız bu standart stok çözeltinin konsantrasyonu 1,000 pg/mL’dir. Bu stok çözeltiden seri

dilüsyon yaparak sırasıyla 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62.5 pg/mL, 31.2 pg/mL, 15.6 pg/mL'lik standartlar hazırlandı. Son tüp boş bırakılarak kör yapıldı.



3) Assay diluent A ve B: 6 mL diluent A ve B'ye 6 şar mL ultra saf su ilave dilerek toplamda 12 şer mL diluent Assay A ve B elde edildi.

4) Detection Reaktif A ve B: stok detection reaktif A ve B kullanmadan önce santrifüjlendi. Assay diluent A ve B ile sırasıyla çalışma konsantrasyonuna seyreltildi.

5) Yıkama Çözeltisi: konsantre yıkama çözeltisinden 20 mL alınarak 580 mL ultra saf su ile seyrelerek, 600 mL kullanıma hazır yıkama çözeltisi elde edildi.

6) TMB (3,3',5,5' tetrametilbenzidin) substrat: sterilize edilmiş tipler ile çözeltinin gerekli dozajı aspire edildi.

### 3.2.2.2. Numunelerin Hazırlanması

1) Analizden önce numunelerin standart grafiğın içerisinde olduğundan emin olunmalı, aksi taktirde yanlış sonuçlar alınması kaçınılmazdır. Bunun için gerekirse numuneler yeteri kadar seyreltilebilir.

2) İşlem görmemiş numunelerin uzun süre depolanmaması tavsiye edilir. Aksi taktirde bu numunelerde protein degradasyonu ve denaturalizasyonu meydana gelebilir ve bu da yanlış analiz sonuçlarına sebep olabilir.

### 3.2.2.3. Analiz İşlemi

- 1) Numune, standart ve kör kuyucuklarını belirlendi. 7 kuyucuğa standart ve 1 kuyucuğa kör bırakıldı. Kuyucuklara 100 µL numune, standart veya körde hangisi konulacaksa pipetlendi ve plate kapatılarak 37 °C'de 2 saat inkubasyona bırakıldı.
- 2) Her bir kuyucuğun sıvısı uzaklaştırıldı, yıkamadan.
- 3) Her bir kuyucuğa detection reaktif A'dan 100 µL pipetlendi ve plate kapatılarak 37 °C'de 1 saat inkubasyona bırakıldı.
- 4) Solusyon aspire edildi ve her bir kuyucuk 350 µL yıkama çözeltisi ile yıkandı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.
- 5) Her bir kuyucuğa detection reaktif B'den 100 µL pipetlendi ve plate kapatılarak 37 °C'de yarım saat inkubasyona bırakıldı.
- 6) Aspirasyon/yıkama işlemi 4. Basamaktaki gibi 5 kez tekrarlandı.
- 7) Her bir kuyucuğa 90 µL substrat solusyonu eklenir, plate kapatılarak 37 °C'de 15-25 dakika inkübe edilir. Bu esnada ışıktan korunur. Solusyon ilavesiyle sıvı maviye dönecektir.
- 8) Her bir kuyucuğa 50 µL stop solusyonu eklenir. Bu ilaveyle renk sarıya dönecektir. Bunun için plate kenarlarından tutularak hafifçe çalkalanır.
- 9) Kabarcık kalmadığından emin olunduktan sonra hemen 450 nm'de okunur.

### 3.2.2.4. eNOS Çalışma Prensibi

1. standartlar ve örnekler eNOS'a spesifik bir biotinle kaplanmış antikor içeren mikropate kuyucuklara pipetlenir.

2. Avidinle birleşmiş Horseradish Peroksidaz (HRP) her bir mikroplate kuyucuğuna eklenir ve inkübe edilir.
3. TMB substrat solusyonunun ilavesinden sonra bu kuyucuklar sadece eNOS içerir, biotinle konjuge antikor ve enzimle konjuge avidin bir renk değişimi gösterecektir.
4. Enzim-substrat reaksiyonu sülfirik asit ilavesiyle sonlanır ve oluşan renk değişimi spektrofotometrik olarak 450 nm'de ölçülür.
5. Örneklerdeki eNOS miktarı da standart grafik ile mukayese edilerek hesaplanır.

### **3.2.3. ADMA Analizi**

ADMA analizi ters faz HPLC tekniğine dayalı ticari olarak temin edilen (Eureka code Z58010) kiti ile çalışıldı. Bu kit ile çalışırken önce plazma örnekleri kitte mevcut olan katı faz kolonu ile ekstrakte edildi. Sonra ekstraksiyondan elde edilen ekstrakte 200 µL reagent N (tampon çözelti), 150 µL reagent O (tampon çözelti), 30 µL reagent J (başlangıç çözeltisi), 30 µL reagent L (türevlendirme çözeltisi) ilave edildi. Vorteksledikten sonra 20 °C 'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. 150 µL HPLC saflığında su eklenerek HPLC sistemine verildi.

HPLC sisteminin kromatografik koşulları şöyledir;

Kolon akış hızı: 1 mL/ dk

Enjeksiyon hacmi: 100 µL

Fenil kolon: 250 mm x 4.6 mm x 6 µ

Floresans dedektör: 420 nm eksitasyon, 483 nm emisyon

Kolon basıncı: 90 ± 10 bar

Analiz süresi: 25 dakika

Kolon sıcaklığı: 20 °C

Kolonu şartlamak için; Dedektör bağlantısını keserek 1 mL/dakika akış hızıyla 30 mL su: asetonitril (50:50 v/v) ve peşinden 30 mL HPLC saflığında su geçirildi. Mobil faz vakum filtre düzeneğinden 0.22 µ'luk filtreden geçirildi. Kolondan 30 mL mobil faz 1 mL/dakika hızla geçirilerek şartlandırılır. İlk 30 mL tahliye edilir. Geri dönüşüm fazında da 30 dakika olacak şekilde kolon şartlandırılır. Son olarak türevlendirilmiş kimyasal standart enjekte edilir ve HPLC sisteminin çalışması test edilir.

Kolonu temizlemek için; dedektör bağlantısı kesilir. 30 mL su kolondan geçirilir. Su : asetonitril (40 : 60 v/v) karışımı 30 dakika akıtılır. Kolon yeniden kullanılmak istendiğinde mobil fazla şartlandırmadan önce 30 dakika su geçirilir.

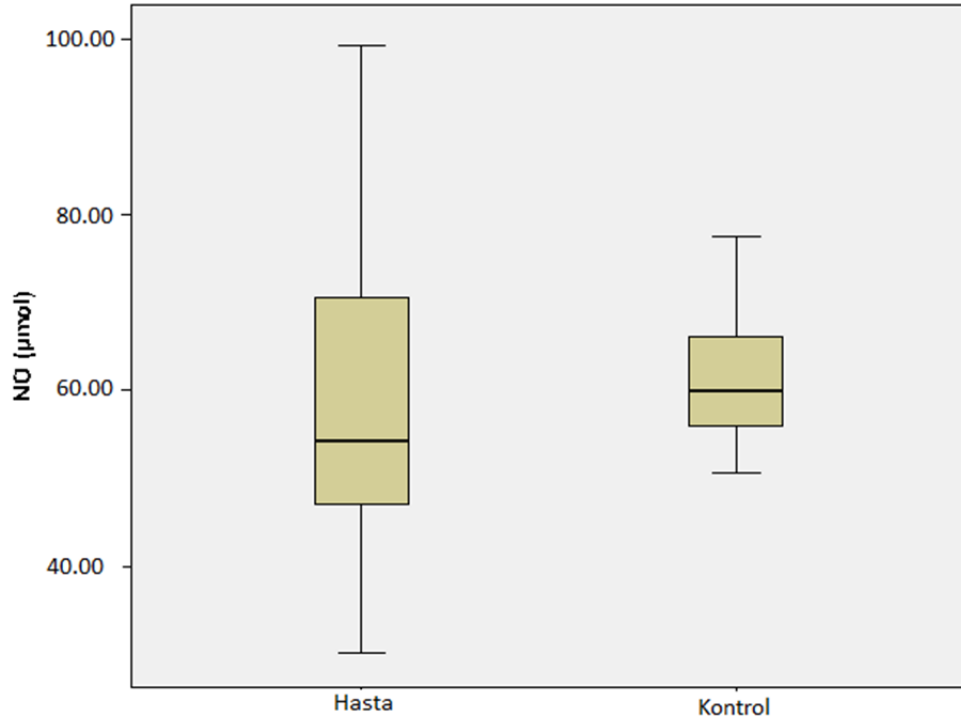
### **3.3. İstatistiksel Analiz**

Bu doktora tez çalışmasının sayısal verilerinin istatistiksel hesaplanmasında IBM SPSS 20.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois) paket programı kullanılarak gruplar arasındaki sayısal değişkenlerin farkını değerlendirmek için Student-t testi veya Mann-Whitney U testleri kullanılmıştır. Sayısal değişkenler ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde belirtilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Plazma NO sonuçları

Akut İskemik İnmeli hastalarda (81) NO düzeyleri  $58.46 \pm 1.92$   $\mu\text{mol}$  ve sağlıklı kontrol grubunda (50)  $61.22 \pm 0.95$   $\mu\text{mol}$  olarak tespit edildi ( $p=0.246$ ). Bu değerler şekil 4.1’de grafik olarak verilmiştir.



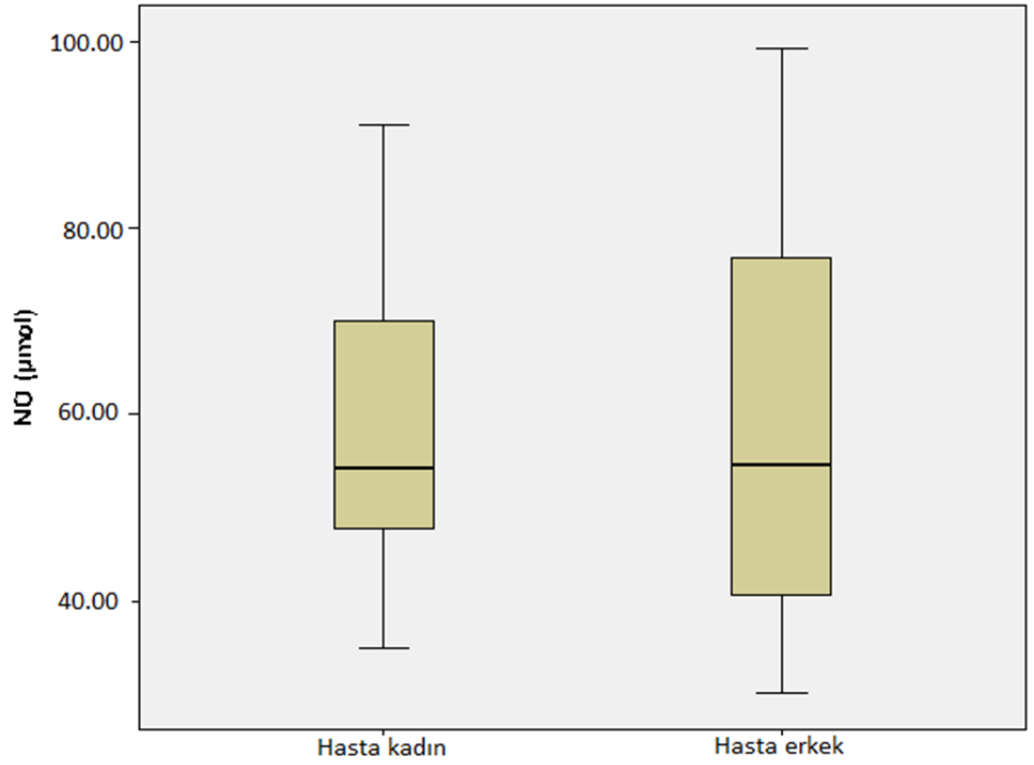
Şekil 4.1. Plazma NO sonuçları



#### 4.1.1. Plazma NO sonuçlarının grup içi dağılımı

##### 4.1.1.1. Plazma NO sonuçlarının iskemik inme hastası gruptaki dağılımı

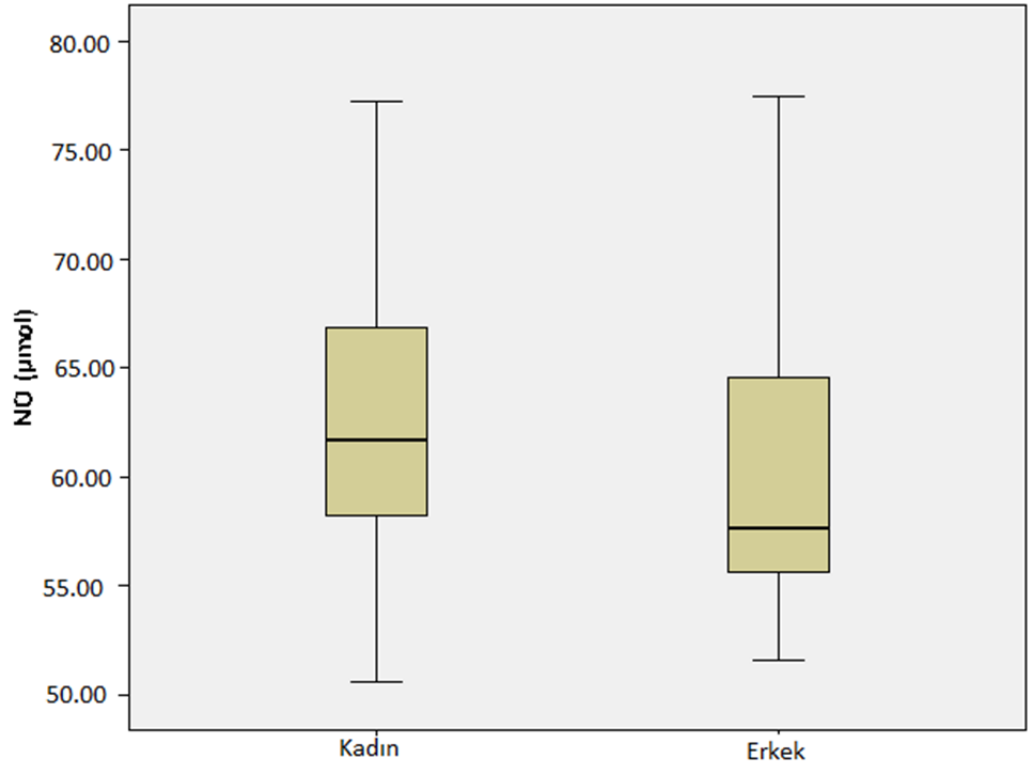
Akut İskemik İnme kadın (51) hastalarda NO düzeyleri  $58.34 \pm 2.21$   $\mu\text{mol}$  ve erkek hastalarda (30)  $58.65 \pm 3.61$   $\mu\text{mol}$  olarak tespit edildi ( $p=0.83$ ). Bu değerler şekil 4.2 'de grafik olarak verilmiştir.



Şekil 4.2. Plazma NO sonuçlarının iskemik inme hastası gruptaki dağılımı

#### 4.1.1.1.2. Plazma NO sonuçlarının kontrol grubundaki dağılımı

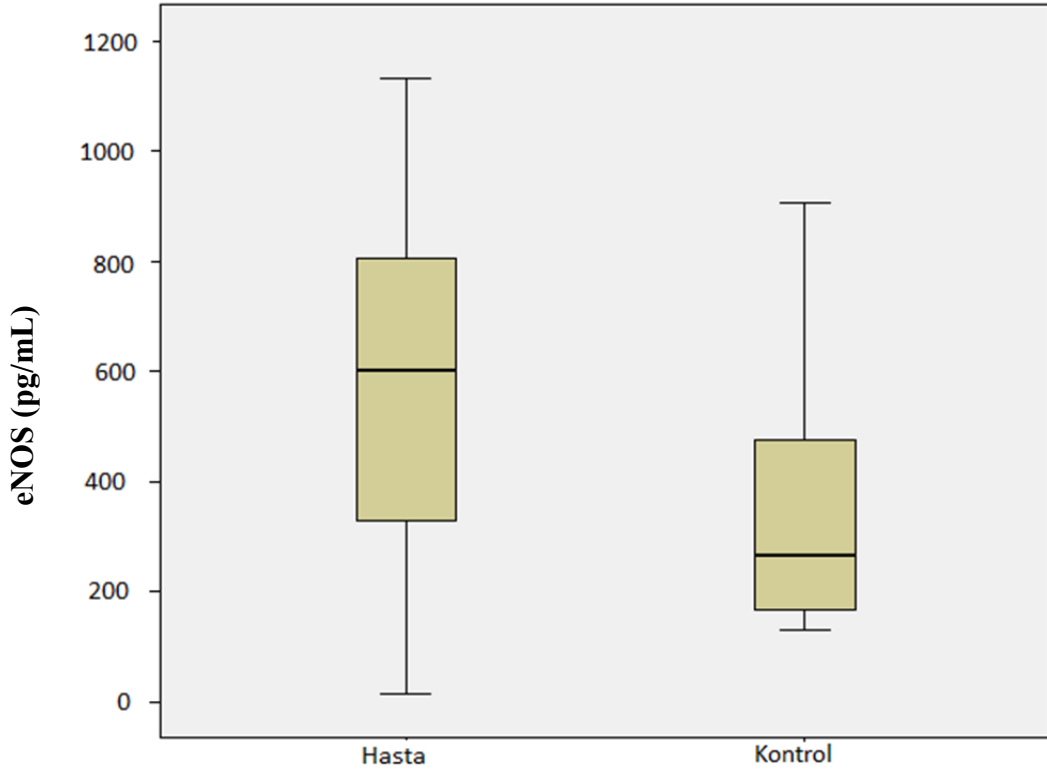
Kontrol grubu kadınlarda (33) NO düzeyleri  $62.54 \pm 1.39$   $\mu\text{mol}$  ve kontrol grubu (27) erkeklerde  $60.10 \pm 1.28$   $\mu\text{mol}$  olarak tespit edildi ( $p=0.122$ ). Bu değerler şekil 4.3’de grafik olarak verilmiştir.



Şekil 4.3. Plazma NO sonuçlarının kontrol grubundaki dağılımı

#### 4.2. Plazma eNOS sonuçları

Akut İskemik İnme hastalarında (81) eNOS düzeyleri  $568.29 \pm 33.51$  pg/mL ve sağlıklı kontrol grubunda (50)  $335.51 \pm 28.92$  pg/mL olarak tespit edildi ( $p < 0.001$ ). Bu değerler şekil 4.4’de grafik olarak verilmiştir.

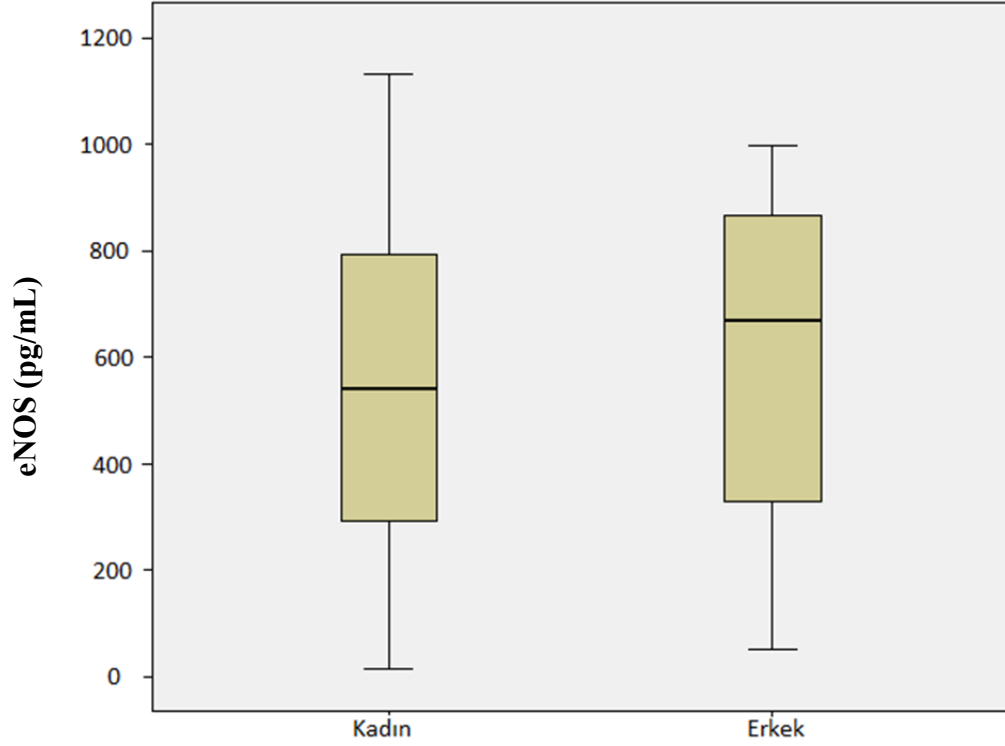


Şekil 4.4. Plazma eNOS sonuçları

#### 4.2.1. Plazma eNOS sonuçlarının grup içi dağılımı

##### 4.2.1.1. Plazma eNOS sonuçlarının iskemik inme hastası gruptaki dağılımı

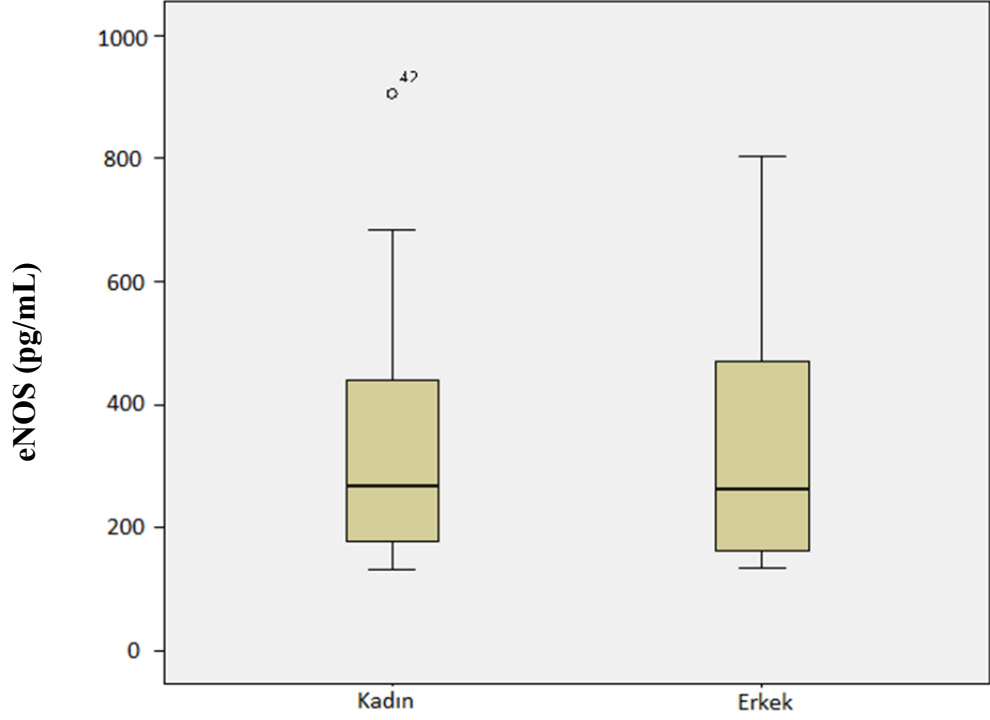
Akut İskemik İnme kadın (51) hastalarda eNOS düzeyleri  $547.90 \pm 42.84$  pg/mL ve erkek hastalarda (30)  $602.97 \pm 54.01$  pg/mL olarak tespit edildi ( $p=0.395$ ). Bu değerler Şekil 4.5’de grafik olarak verilmiştir.



Şekil 4.5. Plazma eNOS sonuçlarının iskemik inme hastası gruptaki dağılımı

#### 4.2.1.2. Plazma eNOS sonuçlarının kontrol grubundaki dağılımı

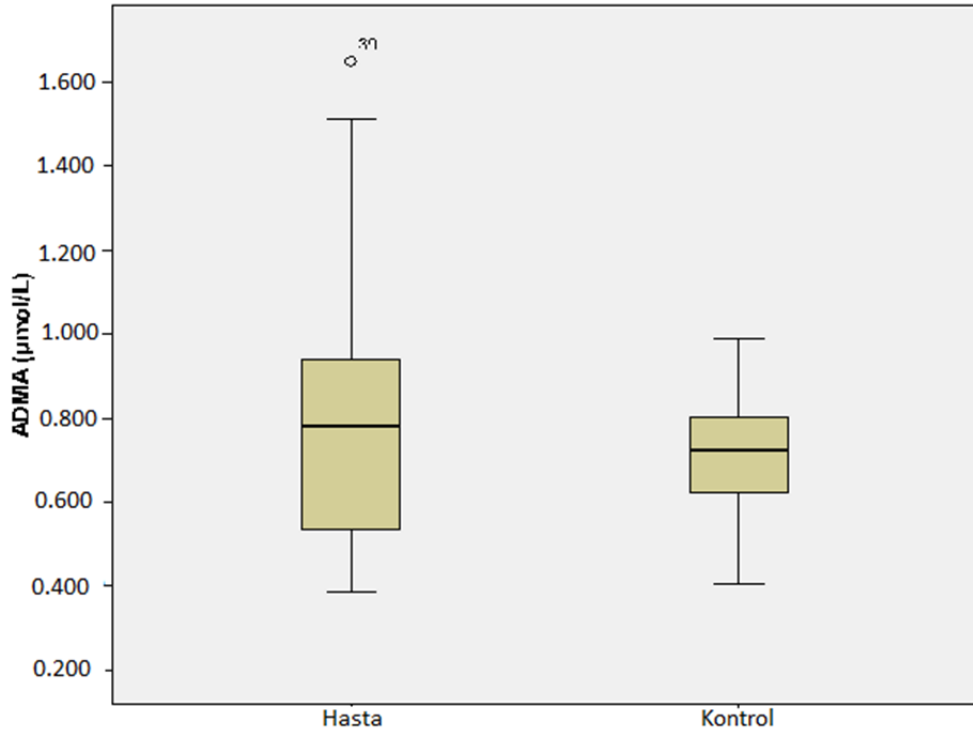
Kontrol grubu (23) kadınlarda eNOS düzeyleri  $335.91 \pm 42.24$  pg/mL ve kontrol grubu (27) erkeklerde  $335.17 \pm 40.40$  pg/mL olarak tespit edildi ( $p=0.793$ ). Bu değerler şekil 4.6'da grafik olarak verilmiştir.



Şekil 4.6. Plazma eNOS sonuçlarının kontrol grubundaki dağılımı

### 4.3. Plazma ADMA sonuçları

Akut İskemik İnme (81) hastalarda ADMA düzeyleri  $596.8 \pm 331.5$  nmol/L ve sağlıklı kontrol (50) grubunda  $517.6 \pm 171.1$  nmol/L olarak tespit edildi ( $p=0.013$ ). Bu değerler şekil 4.7’de grafik olarak verilmiştir.

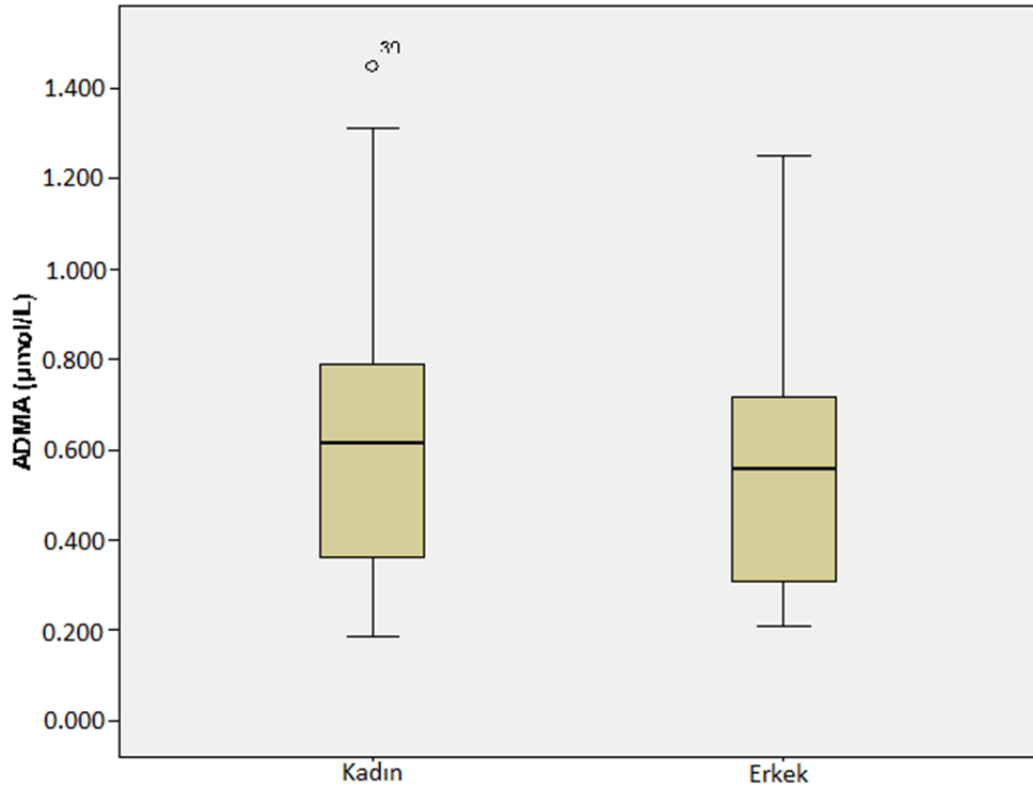


Şekil 4.7. Plazma ADMA sonuçları

### 4.3.1. Plazma ADMA sonuçlarının grup içi dağılımı

#### 4.3.1.1. Plazma ADMA sonuçlarının iskemik inme hastası gruptaki dağılımı

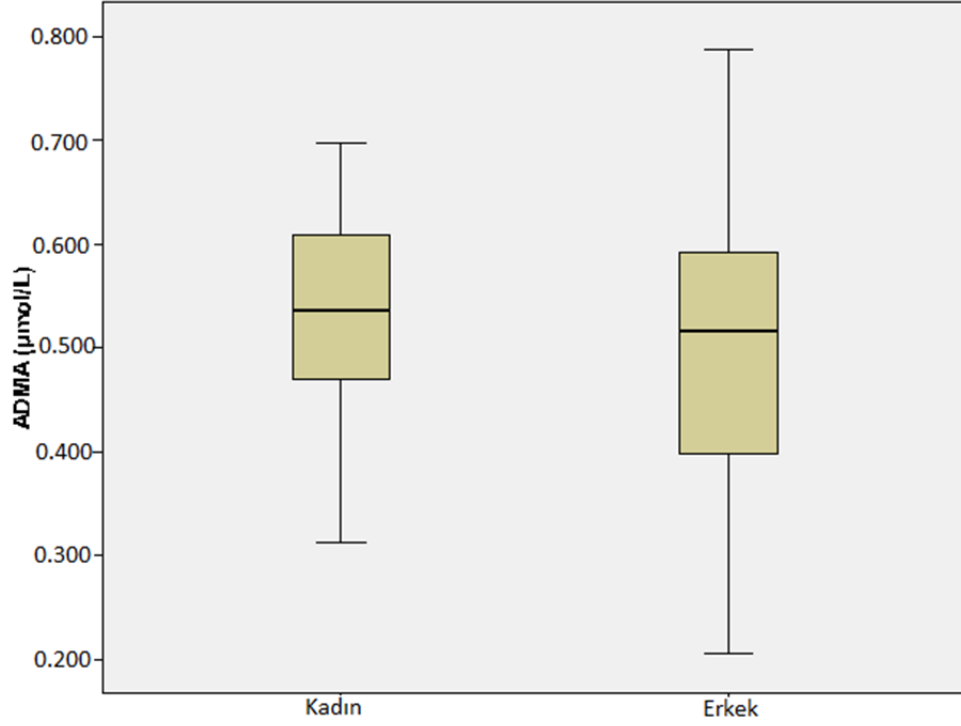
Akut iskemik inmeli kadın (51) hastalarda ADMA düzeyleri  $623.4 \pm 43.8$  nmol/L ve erkeklerde (30)  $551.5 \pm 49.3$  nmol/L olarak tespit edildi ( $p=0.409$ ). Bu değerler şekil 4.8’de grafik olarak verilmiştir.



Şekil 4.8. Plazma ADMA sonuçlarının iskemik inme hastası gruptaki dağılımı

#### 4.3.1.2. Plazma ADMA sonuçlarının kontrol grubundaki dağılımı

Kontrol grubu (23) kadınlarda ADMA düzeyleri  $532.4 \pm 23.5$  nmol/L ve kontrol grubu (27) erkeklerde  $505.0 \pm 24.9$  nmol/L olarak tespit edildi ( $p=0.436$ ). Bu değerler aşağıda grafik olarak verilmiştir.



Şekil 4.9. Plazma ADMA sonuçlarının kontrol grubundaki dağılımı



**Tablo 4.1.** Hasta ve kontrol grubundaki NO, eNOS ve ADMA sonuçlarının toplu halde gösterimi

Değişken	Hasta n=81	Kontrol n=50	P değeri
NO (µmol)	58.46±1.92	61.22±0.95	0.246
eNOS (pg/mL)	568.29±33.51	335.51±28.92	0.000
ADMA (nmol/L)	596.8±331.5	517.6±171.1	0.013

**Tablo 4.2.** Gruplara ait güven aralıkları

Değişken	Hasta için %95 GA		Kontrol için %95 GA	
	Düşük Değer	Yüksek Değer	Düşük Değer	Yüksek Değer
NO (µmol)	54.63	62.28	59.31	63.14
eNOS (pg/mL)	501.60	634.98	277.39	393.63
ADMA (nmol/L)	530.8	662.7	483.2	552.0

GA: Güven aralığı

### 4.3.1.3. Gruplar da Yaş Ortalaması ve HDL, LDL, Glukoz, Toplam Protein, Kreatinin Düzeyleri

Akut iskemik inmeli olan hasta grubumuzda yaş ortalaması  $63.48 \pm 18.08$  ve sağlıklı kontrol grubumuzda yaş ortalaması  $47.54 \pm 16.96$  olarak tespit edildi. Glukoz, toplam protein, kreatinin, HDL ve LDL düzeylerinin de iki grup arasındaki dağılımı aşağıdaki tabloda verilmiştir.

**Tablo 4.3.** Gruplar da Yaş Ortalaması ve HDL, LDL, Glukoz, Toplam Protein, Kreatinin Düzeylerinin tablo halinde gösterimi

Değişkenler	Hasta	Kontrol	p değeri
Yaş	$63.48 \pm 18.08$	$47.54 \pm 16.96$	0.000
Glukoz (mg/dL)	$116.28 \pm 4.54$	$107.34 \pm 4.94$	0.167
Toplam protein (g/dL)	$6.62 \pm 0.10$	$6.93 \pm 0.13$	0.058
Kreatinin (mg/dL)	$0.90 \pm 0.71$	$1.03 \pm 0.48$	0.000
HDL (mg/dL)	$38.53 \pm 0.69$	$43.61 \pm 1.08$	0.000
LDL (mg/dL)	$131.62 \pm 2.55$	$119.39 \pm 4.76$	0.004

**Tablo 4.3. ADMA, eNOS, NO seviyelerinin gruplararası korelasyon dağılımı**

Hasta		yaş	ADMA (nmol/L)	eNOS (pg/mL)	NO (µmol)
Yaş	r	1	0.128	0.236*	-0.219*
	p		0.256	0.034	0.049
	n	81	81	81	81
ADMA (nmol/L)	r	0.128	1	0.080	0.002
	p	0.256		0.477	0.987
	n	81	81	81	81
eNOS (pg/mL)	r	0.236*	0.080	1	-0.282*
	p	0.034	0.477		0.011
	n	81	81	81	81
NO (µmol)	r	-0.219*	0.002	-0.282*	1
	p	0.049	0.987	0.011	
	N	81	81	81	81

Kontrol		yaş	ADMA (nmol/L)	eNOS (pg/mL)	NO (µmol)
Yaş	r	1	-0.094	0.216	-0.285*
	p		0.515	0.132	0.045
	n	50	50	50	50
ADMA (nmol/L)	r	-0.094	1	0.050	0.154
	p	0.515		0.730	0.285
	n	50	50	50	50
eNOS (pg/mL)	r	0.216	0.050	1	-0.151
	p	0.132	0.730		0.296
	n	50	50	50	50
NO (µmol)	r	-0.285*	0.154	-0.151	1
	p	0.045	0.285	0.296	
	n	50	50	50	50

r= Pearson korelasyon katsayısı

\*p>0.05

n= örneklem sayısı

## 5. TARTIŞMA

İnme, batı dünyasında iskemik kalp, kanser hastalığı sonrası morbiditenin ve mortalitenin önde gelen üçüncü nedenidir. Global olarak 50 milyondan fazla inme ve geçici iskemik atak vardır. Sağ kalan her beş hastanın biri daha sonraki 5 yıl içinde tekrar inme geçirmektedir, buda sağlık sistemini ve ekonomiyi yoğun bir yüke sokmaktadır.<sup>7</sup>

2009'da güncellenen tahminler inmenin dünya çapındaki doğrudan ve dolaylı ekonomik maliyetini yaklaşık 70 milyon dolar olarak göstermektedir.<sup>8</sup> Tek başına ABD'de 5-6 milyon inme sağkalanın olduğu tahmin edilmektedir ancak bunların maliyeti tahmin edilenlerden çok daha fazladır. İnme sağ kalanlarının % 15-30 arasında sürekli sakatlık varken, inme geçirenlerin % 20'si inme sonrası 3 ay boyunca klinik bakımına ihtiyaç duymaktadır.<sup>8,9</sup> Popülasyonunu tümü inme açısından risk altındadır ve bu hastalığa yaşlıların hastalığı olarak bakılmamalıdır, çünkü inme geçirenlerin üçte biri 65 yaşının altındadır. İnme açısından siyahlar beyazlara göre 2 kat, kadınlar erkeklere göre daha fazla risk altındadırlar. ABD'de 2005 yılında inmeye bağlı ölümlerin %60.6'sını kadınlar oluşturmakta idi; bu insidansın artmasını birincil nedeni yaşam süresinin uzaması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.<sup>8</sup> Bununla birlikte, miyokardial enfarktüs, koagulopatiler, periferik vasküler hastalık, hipertansiyon, atrial fibrilasyon veya diabetes mellitusu içeren vasküler ve inflamatuvar risk faktörleri eğer hastada daha önceden veya aynı anda varsa, bu hasta aynı zamanda inme açısından da risk altındadır.<sup>8,9</sup>

Küçük molekül ağırlıklı ve heterodiatomik molekülü, zehirli bir gaz olan NO, daha önce endotel kaynaklı gevşeme faktörü olarak bildirilen maddenin NO olduğunun gösterilmesiyle bilimsel çalışmaların odağı haline geldi. Bu şekilde başlayan NO ile

ilgili araştırmalarda 1991'den sonra aşırı derecede artış oldu. Bu çalışmalar sonucunda, fizyolojik ve patolojik olaylardaki rolü hakkında daha fazla bilgi edinilen NO, 1992 yılında yılın molekülü seçildi ve sonrasında Nobel ödülüne layık görüldü.<sup>54, 55</sup>

Lipid ve suda çözünen serbest radikal bir gaz olan NO, NO<sub>2</sub> gibi diğer radikaller, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> gibi orta derecede stabil anyonlar, NO<sub>3</sub> gibi dayanıklı anyonların yanında, N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> gibi dayanıksız oksitler ve ONOO<sup>-</sup> gibi dayanıksız peroksitler oluşturur. Düşük pH'da biriken nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) proton kazanarak nitröz aside ve daha sonra dismutasyonla NO'e dönüşür. NO tiollerle reaksiyona girerek RSNO gibi depo formlar oluşturur. Bu depo formların bir elektron kaybetmesiyle sülfhidrifilik reaktanlar, nitrosonium (NO<sup>+</sup>) oluşur. Bu formların bir çoğu biyolojik olarak bir kaç saniye gibi kısa bir sürede oluşmaktadır.<sup>56, 57</sup>

eNOS tarafından sentezlenen endotel kaynaklı NO, bazal vasküler tonüsün önemli bir belirleyicisidir. Bu şekilde sistemik dolaşımı regüle eden NO, kalp, karaciğer, beyin gibi organların lokal dolaşımının düzenlenmesine de katkıda bulunur.<sup>72</sup> eNOS eksikliği hipertansiyona neden olur. Bu ilişki deneysel çalışmalarla gösterilmiştir. Gerek NOS inhibitörlerinin kullanıldığı, gerekse eNOS genlerinin inaktive edildiği deneylerde, ratlarda hipertansiyon geliştirilmiştir. Kronik böbrek yetmezliklerinde dimetilarginin'in plazma konsantrasyonlarının arttığı, bunun NOS'in aktivasyonunu inhibe ederek hipertansiyona neden olduğu tespit edilmiştir.<sup>73</sup> Endotel kaynaklı NO'in damar bütünlüğünün korunması, lökositlerin endotel hücrelerine yapışmasının ve düz kas hücre proliferasyonunun önlenmesi gibi etkilerinin yanında trombosit adezyonu ve agregasyonunu inhibe etme etkileri de vardır. Bu yüzden kardiyovasküler hemostazda, kritik rolü olan endotel kaynaklı NO'in aterogenezi inhibe ettiği söylenebilir. NO bu etkisini, prostasiklinle sinerjistik bir etkileşimle sağlar.<sup>74</sup> Gerçekten de hipertansiyon, hiperlipidemi, sigara içme ve diabet gibi ateroskleroza

zemin hazırlayan faktörlerin tümü, anormal endotel fonksiyonları ve biyoaktif NO seviyelerinde azalma ile birlikte.

NO'nin vaskuloprotektif rolleri hücre türüne göre değişmektedir; vasküler sistemdeki düz kas hücrelerinin proliferasyonunu ve migrasyonunu inhibe eder, endotelial hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu teşvik eder ve apoptosisi inhibe eder, trombosit agregasyonunu baskılar, endotele trombosit, lökosit ve monosit adhezyonunu inhibe eder ve bunların tümü vasküler hasarda intimal hiperplazi gelişimini engeller.<sup>168</sup>

Bu doktora tez çalışmasının önemli parametrelerinden NO ve eNOS, ELISA tekniği ile analiz edilmiştir. Biyokimyada NO ve NOS izoenzimlerine ELISA ile bakılması sıklıkla başvurulan ve güvenilir bir tekniktir.

NO, birçok sistemde önemli görevlere sahip ve bununla birlikte birçok hastalıkla ilişkilidir. Bu nedenle tanımlanması ve miktar tayini önemlidir. NO ölçüm yöntemleri değerlendirilen hastalıklar ve örnek çeşitlerine göre farklılık gösterir. NO'nin yarılanma ömrünün çok kısa olması, *in vivo* olarak çok düşük miktarlarda oluşması ve oluşuktan sonra hızla moleküler oksijen ile etkileşerek reaksiyona girmesi ölçümünü güçleştirmektedir. Bu yüzden NO ölçümünde standart bir yöntem olmamakla beraber çalışma konusuna göre güvenilir sonuç almak için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır.<sup>169</sup>

Bu yöntemleri çalışma prensibi ile kısaca aşağıda belirtelim;

NO Miktarının Kemilüminesans Yöntemle Belirlenmesi: Bu yöntemde prensip NO'nin O<sub>3</sub> ile etkileşmesi sonucunda açığa çıkan ışığın spektroskopik olarak ölçümüne dayanmaktadır. O<sub>3</sub>, NO ile tepkimesinde uyarılmış durumdaki nitrojen dioksit (NO<sub>2</sub><sup>·</sup>) oluşur. NO<sub>2</sub><sup>·</sup> in normal formuna dönerken yaydığı foton kemilüminesans yöntemiyle ölçülür.<sup>170</sup>

NO Miktarının Elektron Paramanyetik Rezonans Yöntemi ile Belirlenmesi: Işınlanan ürünün soğurduğu doz miktarı ve ışınlama sonucunda oluşan çiftlenmemiş elektrona sahip moleküler radikallerin miktarları, yapıları ve kararlılıkları elektron paramanyetik rezonans (EPR) spektroskopisi yardımıyla direkt ölçülebilir. Gaz, sıvı ve katı bir maddenin EPR tekniği ile incelenmesinde, atom veya molekülde eşlenmemiş bir elektronun manyetik momentinin yön değiştirmesi esas alınır. Burada temel nokta incelenecek atom veya molekülün paramanyetik özellik göstermesi gerektiğidir. Çünkü bir madde eşlenmemiş bir yada birkaç elektron içeriyorsa o madde paramanyettir.<sup>171</sup>

EPR spektrumundaki rezonans çizgilerin genişliği ve yapısından yararlanılarak eşlenmemiş elektronun yeri ve yapısı hakkında bilgi edinilebilir. Serbest radikal yapısında olan NO'nin nitronlar veya nitrozo bileşikleri gibi nitroksitler veya hemoglobin ile etkileşimi esnasında oluşan enerji miktarı ve manyetik alan şiddeti bu yöntemle ölçülebilir.<sup>172</sup>

NO Miktarının Methemoglobin Spektrofotometresi Yöntemi ile Belirlenmesi: Nitrik Oksitin, NO<sub>2</sub> · ve NO<sub>3</sub> · e okside olması NO metabolizmasının asıl yoludur. Plazma ve diğer fizyolojik sıvılarda veya tamponlarda NO tamamen nitrite okside olur ve saatlerce stabil olarak kalır. Bunun için NO, öncelikle moleküler O<sub>2</sub> ile reaksiyona girer. NO ve NO<sub>2</sub> · kanda hızla NO<sub>3</sub> · okside olur.<sup>173</sup>

NO, oksihemoglobin ile tepkimeye girerek nitrat ve methemoglobin oluşturur. Methemoglobin oluşumu spektrofotometre ile izlenir. Oksihemoglobin veya oksimiyoglobinin kullanılabildiği bu dolaylı yöntem, NO tayinlerinin standart yöntemlerinden biridir. Hemoglobin veya miyoglobin görünür alanda yaygın bir absorpsiyon spektrumuna ve farklı oksidasyon düzeylerindeki absorpsiyonları dalga boyuna bağlı olarak değişir. NO'nin deoksihemoglobin ile tepkimesiyle oluşan nitrozil hemoglobin, 560 nm'deki absorpsiyon azalması spektroskopik olarak izlenebilir. NO ve

Nitrik Oksitten kaynaklanan oksidanların oluşumu, ortamdaki hemoglobin ve miyoglobinin absorpsiyon izlenerek incelenebilir.<sup>174</sup>

NO Miktarının Elektrokimyasal Yöntemler ile Belirlenmesi: Elektrokimyasal yöntemler, spesifik elektrotlar üzerinde NO oksidasyonu sırasında oluşan akımın ölçülmesidir. Bu yöntemin ölçüm esası, NO'nun gaz geçirgen bir membrandan geçerek ince bir elektrolit tabakasından difüzyonu ve takiben ölçüm elektrotlarını okside etmesine dayalıdır. Bu oksidasyon membranın dışındaki NO'nun konsantrasyonu ile orantısal bir akım oluşturur. Biyolojik örneklerdeki NO'nun *in situ* olarak doğrudan ölçülmesini sağlar. Reaksiyon zamanı uzundur.<sup>175</sup>

NO Miktarının Kapiller Elektroforez Elektrokimyasal Yöntemi ile Belirlenmesi: Kapiller elektroforezde elektriksel bir alan altında ve bir iletken ortam altında yüklü parçacıkların yada moleküllerin hareketi yanında elektroosmotik hareketlilik denilen ikinci bir hareketlilik vardır. Elektriksel alan uygulandığı andan itibaren kapiller içerisindeki yüklü ve yüksüz parçacıklar elektroosmoz ve elektroforetik hareketliliğin etkisi altında kalırlar.<sup>176</sup>

Bu yöntem ile NO dolaylı ölçümlerinde nitrit ve nitrat tayini yapılmaktadır. Ters elektroosmotik akışla yüksek ayrılma sağlanarak nitrit ve nitrat ayrımı yapılan veya UV dedektörle nitrit ölçümü yapılan çalışmalar vardır. Örnek hacmi pikolitre ile nanolitre düzeyindedir.<sup>177</sup>

NO Miktarının Florometrik Yöntemi ile Belirlenmesi: NO miktarının florometrik yöntemlerle belirlenmesinde naftotriazololün floresansı 375 nm eksitasyon ve 415 nm emisyon özelliklerinde yararlanılarak ölçülür ve 10 nM derişimindeki NO'nun doğrudan tayinine imkan tanır.<sup>178</sup>

NO Miktarının Gaz Kromatografisi Yöntemi ile Belirlenmesi: Gaz halinde bir molekül olan NO'nun gaz kromatografisi ile ölçülmesi mümkündür. Ancak hassasiyetin



düşük olması ve maliyetin yüksek oluşu ile tercih edilmemektedir. NO'nun metabolitleri olan nitrit ve nitrat tayinlerinde kullanılan birçok analitik yöntemlere ek olarak kütle spektrometresi tabanlı, doğruluk bakımından hassas, özgüllüğü yüksek Gaz Kromatografi – Kütle Spektrometresi (GC-MS) kullanıldığı çalışmalarda bulunmaktadır.<sup>179</sup>

NO Miktarının HPLC Yöntemi ile Belirlenmesi: NO prekürsörü olan L- Arginin düzeyleri ve eNOS'un endojen yarışmalı inhibitörü olan ADMA'nın ölçümü ile indirek NO ölçümü HPLC ile yapılabilmektedir. Dedektör, kolon ve pompa seçimi önemlidir. Ölçümde floresan dedektör kullanılır.<sup>166, 180, 181</sup>

NO Miktarının Kolorimetrik Yöntem ile Belirlenmesi: NO'nun karakterize edilmiş en önemli hedef molekülleri: demir, kükürt ve oksijen türevi yapılarıdır. NO lipofilik yapıda olup, yüksek konsantrasyonlardaki NO oksijensiz ortamda oldukça stabildir ve suda çözünme özelliği gösterir. Düşük konsantrasyonlarda ise, ortamda oksijen varlığında dahi stabilitesini koruyabilir. Havadaki NO, kısa sürede oksijenle oksitlenerek NO<sub>2</sub> 'ye dönüşür. NO ve tekrar NO'e dönüşebilen nitrojen oksitleri (NO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> vb ), güçlü nitroze edici ajanlardır ve primer ile sekonder aminleri nitrözleyerek, nitrozaminleri oluştururlar.<sup>182</sup> Aerobik sulu çözeltilerde NO, hızla oksijen ile tepkimeye girerek reaktif türler oluştururlar. NO'nun bu reaktif ürünlerinin kimyasal bileşiklerle tepkimeleri, kolorimetrik indirek ölçüme olanak sağlar.<sup>183</sup>

Nitrit ölçümü için kullanılan kolorimetrik yöntemlerin çoğu azo boyalarının oluşumu temeline dayanmaktadır. Örneklerdeki nitrit ve nitrat miktarları iki aşamalı yöntem ile ölçülmektedir. Öncelikle nitrat enzimatik dönüşüm veya metalik kadmiyum ile nitrite indirgenir. Oluşan toplam nitrit ise hemen hemen her örnekte kullanılacak bir yöntem olan Griess yöntemi ile ölçülür. Griess yöntemi nitritin asidik ortamda primer bir aromatik amin ile (sülfanilamit) diazotizasyonu ve N- (1-naftil) etilendiamin hidroklorit (NED) ile mor renkli bir azo ürünü oluşturması esasına dayanır.<sup>184</sup>

NO ölçümü yapılırken özellikle nitrit ölçümü tercih edilse de NO metabolizması sonucu, biyolojik sistemlerde nitrit hem demiri içeren proteinler varlığında nitrata okside olur. Fizyolojik koşullarda NO yaklaşık 3:2 oranında nitrit ve nitrata okside olmaktadır. Oluşum oranları örneğe bağlı değişiklik gösterdiğinden, NO metabolizmasının derecesinin en iyi göstergesi olarak nitrit ve nitratın birlikte ölçülmesidir.<sup>184</sup>

Toplam nitrit ve nitrat miktarının ölçümü için çeşitli firmalar tarafından geliştirilen ELİSA kitleri bulunmaktadır. Bu ELİSA kitleri ile hızlı ve güvenilir sonuçlar elde edebilmek mümkündür.<sup>157</sup>

NO Miktarının Nitrik Oksit Sentaz Ekspresyonu ile Belirlenmesi: NO seviyesini belirlemede kullanılan diğer bir yöntemde NO sentezinden sorumlu NOS enzimlerinin ekspresyonlarının gösterilmesi ile NO'nun direk ölçülmesidir. Günümüzde NOS enzimlerinin yerleşiminin gösterilmesi için kullanılan yöntemler arasında immunohistokimyasal ve in situ hibridizasyon yöntemleri bulunmaktadır.<sup>185</sup>

NOS enzimlerinin mRNA ekspresyonu için kullanılan yöntemler arasında; ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu, Northern-blot ve ribonükleaz-koruma analizi gibi yöntemler kullanılmaktadır. NOS enzimlerinin protein ekspresyonu içinde en sık kullanılan yöntem Western-blot analizidir. Western blot, elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde göç ettirilen proteinlerin immunolojik yöntemlerle tespitidir. Blotlamadan önce, çalışılan numunedeki proteinler, elektriksel ortamda jel üzerinde göç ettirilir. Protein elektroforezi SDS-PAGE, proteinlerin ayrıştırılması ve saflaştırılmasında kullanılan temel biyokimyasal yöntemlerden biridir. Elektroforez işlemini takiben, jeldeki proteinlerin membrana transferleri (blotlama), spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz

proteinlerle kaplanması (bloklama), özgül antikorlarla tepkime ve en son adımda proteinlerin görüntülenme aşamasıdır.<sup>185</sup>

Sonuç olarak NO büyük ölçüde ve hızla NO<sub>2</sub>' ve NO<sub>3</sub>'e dönüştüğünden bu temele dayalı Griess reaktifiyle ölçüm diğer yöntemlere göre daha kolay, güvenilir, tekrarlanabilir ve daha ucuz olmasından dolayı tercih edilen yöntemdir.<sup>157, 169, 186</sup> Bu çalışmada yukarıda bahsi geçen üstün özelliklerinden dolayı bu yöntem tercih edilmiştir.

Artmış NO aktivitesi ile ilişkili olan bazı hastalıklar şunlardır: Septik şok, reperfüzyon hasarı, gastroözofageal reflü, ülseratif kolit, diabetes mellitus, graft versus host reaksiyonu ve allograft rejeksiyonu. Öte yandan, iskemik hasar, hipertansiyon, ateroskleroz ve vaskülopatiler, akalazya, doğuştan pılor stenozu ve Hirschsprung hastalığında da NO aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir.<sup>67</sup>

Bu doktora çalışmasının diğer önemli parametrelerinden biri olan ADMA da HPLC tekniği ile analiz edilmiştir ve kullanılan HPLC tekniği; C18 kolon ile ters faza dayalı olarak üretilen bir ticari kittir.

HPLC bütün analitik ayırma metodları arasında en çok tercih edilenidir. Bunun sebebi, bu metodun; hassas olması, sıcaklığa hassas maddelere bile uygulanabilmesi, doğruluk dereceleri ve kesinlikleri yüksek sonuçlar vermesidir.<sup>166</sup>

Protein rezidülerinin posttranslasyonel modifikasyonu sonucu oluşan dimetil argininlerden olan ADMA'nın tespitine yönelik çeşitli analitik teknikler geliştirilmiştir ve kullanılmıştır. Bu teknikler ve literatürde rastladığımız bazı kullanıcıları şöyledir;

Katı faz ekstraksiyonunu müteakip OPA (o-fitaldialdehit) ile türevlendirmek suretiyle HPLC de floresan dedektör kullanılan analizi Petterson ve arkadaşları, 1997, Boeger ve arkadaşları, 2001, Paiva ve arkadaşları, 2002, Teerlink ve arkadaşları, 2002,

Kielstein ve arkadaşları, 2003, Kielstein ve arkadaşları, 2003, Bae ve arkadaşları, 2005, Teerlink, 2005.

LC- MS/MS ile Vishwanathan ve arkadaşları, 2000, Martens-Lobenhoffer ve arkadaşları, 2004, Martens-Lobenhoffer ve arkadaşları, 2006.

LC- MS/MS'te izotop dilusyon tekniği ile Martens-Lobenhoffer ve arkadaşları, 2004 ,Martens-Lobenhoffer ve arkadaşları, 2006.

GC-MS/MS ile tri(N-penta-fluoro-propionyl) ile metil esteri halinde Tsikas ve arkadaşları 2003, Albsmeier ve arkadaşları, 2004.

ELİSA ile Schulze ve arkadaşları, 2005.

Bu metodların hassasiyetini daha iyi karşılaştırabilmek için birbirine özdeş grupların karşılaştırılmasına ihtiyaç vardır. Bu metodlar içerisinde Teerlink 2005'in kullandığı metodun hastanelerde rutin olarak kullanılmaya en uygun olduğu belirtilmiştir.<sup>187, 188</sup>

Valtonen ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada insan plazma ve serumunda ADMA analizi için ELİSA ile HPLC metodunu (Teerlink'e göre) karşılaştırmışlar ve HPLC'de ADMA analizinin ELİSA'ya kıyasla daha güvenilir olduğunu, ayrıca serum ADMA düzeyleri ile plazma ADMA düzeyleri arasında önemli bir fark olmadığını da tespit etmişlerdir.<sup>189</sup>

Teerlink 2007, biyolojik sıvılarda metilenmiş argininlerin ölçülebilecek alt limitlerini idrar ve plazma için 0.01-0.3  $\mu\text{M}$  ve BOS gibi daha kompleks matrikslerde ise daha düşük olduğunu belirtmiştir. L-NMMA ise ölçülemeyecek kadar az miktarda metabolizmada üretilmektedir.<sup>190</sup>

Ayrıca 50-75 yaşlarında 2311 kişinin katıldığı geniş ölçekli bir kohort çalışmasında ADMA ve SDMA, HPLC ile ölçülmüş ve bulunan ortalama değerler; ADMA için  $0.497 \pm 0.063 \mu\text{M}$  , % 95 GA ile  $0.39-0.63 \mu\text{M}$  ve SDMA için  $0.526 \pm 0.101$

$\mu\text{M}$ , % 95 GA ile 0.38-0.73  $\mu\text{M}$  olarak tespit edilmiştir. Ayrıca ADMA konsantrasyonunun kadınlarda erkeklere oranla daha fazla olduğunda belirtilen bilgiler arasındadır.<sup>190</sup>

Bu doktora çalışmasında da Teerlink 2005 ve 2007'nin metoduna göre üretilmiş ticari ters faz HPLC kiti kullanılmıştır.

ADMA serum veya plazmada çalışılabilir, plazma tercih edilecekse antikoagülan olarak EDTA veya heparin kullanılması, sitrat kullanılmaması tavsiye edilmektedir. Çünkü sitrat miktarsal olarak sonucu olumsuz etkilemektedir. Serum ile heparinli plazma örnekleri karşılaştırıldığında serumda ADMA %2, arginin % 58 daha fazla tespit edilmiştir. Bu yüzden örneklerin hemolizli olmamasına azami dikkat edilmesi gerekmektedir.

ADMA analizi yapılacak plazmanın saklanma koşullarında oldukça toleranslıdır. -20 ile -70  $^{\circ}\text{C}$  arasında yıllarca saklanabilir. Tekrar tekrar dondurulup çözülse bile ADMA ve SDMA miktarlarında değişme olmadığı hatta oda sıcaklığında 24 saat kaldığında bile olumsuz etkilenmediği gözlenmiştir.<sup>190</sup>

Nishiyima ve arkadaşları, 50 iskemik inme hastası ve 116 kontrol grubu ile yaptığı bir çalışmada ADMA miktarını iskemik inme hastalarında  $0.461 \pm 0.08 \mu\text{M/mL}$  (yaş ortalamaları  $60.8 \pm 6.5$  ve %44'ü kadın) ve kontrol grubunda  $0.433 \pm 0.06 \mu\text{M/mL}$  (yaş ortalamaları  $58 \pm 7.7$  ve %79.3'ü kadın) olarak tespit etmişlerdir. Bu sonuçlara göre iskemik inme hastalarındaki ADMA düzeyleri kontrol grubundan daha yüksektir ( $p=0.022$ ).<sup>191</sup>

Mamatha ve arkadaşları, 218 inme hastası (yaşları  $40.0 \pm 11.3$ ) ve 210 sağlıklı kontrol grubu (yaşları  $43.1 \pm 13.4$ ) üzerinde yaptığı bir çalışmada plazma ADMA düzeylerini inme hastalarında  $1.49 \pm 1.13 \mu\text{mol/L}$  ve kontrol grubunda  $0.97 \pm 0.43 \mu\text{mol/L}$  ( $p < 0.001$ ) olarak tespit etmişler. Ayrıca kadın ve erkekler arasında istatistiksel olarak

bir fark bulamamışlar. ADMA'nın orta yaş grubundaki insanlar açısından erken başlangıçlı inme için potansiyel bir biyomarker olabileceğini belirtmişlerdir.<sup>192</sup> Bu çalışmanın bizimle ortak yönü olduğu gibi bazı kromatografik şartlar bakımından farklılıkları da vardır. Kolon öncesi türevlendirmeyi takiben HPLC ve floresan dedektör kullanılmış olması bizim çalışmamızla ortak tercih edilen kolon (C 18, 150 mm x 3.9 x 5 µm) buna ilaveten kolon sıcaklığı 30 °C ve kolon akış hızı 1.1mL/dak olması farklılık göstermektedir. Bizim kullandığımız kitin geri kazanım oranı % 98'den fazla iken Mamatha ve arkadaşlarının bu çalışmasında bu değer % 82 ±5 olarak belirtilmiştir. Ayrıca bu doktora tez çalışmasında ADMA düzeylerini desteklemek amacıyla NO ve eNOS düzeylerine de bakılmıştır. Bu çalışma da bizim gibi inme hastalarında plazma ADMA düzeylerinde belirgin artış tespit etmiştir.

Yoo ve arkadaşları, yaşları 65 ile 85 arasında değişen 52 hasta ve 35 kontrol grubu üzerinde yapılan bir çalışmada ADMA'nın yaşlılıkta iskemik inme için bir risk olduğunu tespit etmişlerdir.<sup>193</sup>

Nishiyama ve arkadaşları, 60.8±6.5 yaş ortalamasına sahip 50 iskemik inmeli hasta üzerinde yaptığı bir çalışmada aynı yaş grubundaki 116 kişilik kontrol grubuna kıyasla daha yüksek plazma ADMA seviyeleri tespit etmişlerdir. Bu çalışmada plazma ADMA düzeyleri iskemik inmelilerde 0.461±0.076 µmol/mL ve kontrol grubunda 0.433±0.056 µmol/mL (p=0.022) olarak tespit edilmiştir.<sup>191</sup> Bu çalışma ile bizim sonuçlarımız birbirine benzemekle beraber, biz daha ADMA düzeylerinde daha belirgin bir artış tespit ettik (p=0.013). Bunun sebebi olarak çalışma grupları arasındaki yaş farkı ve analiz yöntemlerinin hassasiyet farkı olduğunu düşünmekteyiz. Bu çalışmadan farklı olarak bu tezde ADMA ile beraber NO ve eNOS düzeylerine de bakıldı.

Trocha ve arkadaşları reperfüzyon sonrası kısmi iskemide ADMA, DDAH ve NO nun yaş ile ilişkisini göstermek için ratlar üzerinde bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada 2-4 aylık ratlar (10-15 yaşlarındaki insanı temsilen) ile 12-14 aylık ratları (50 yaş ve üstünü temsilen) karşılaştırmıştır. Reperfüzyonun 15. dakikasından sonra ADMA'da gençlerde kontrol grubuna göre önemli bir artış ( $p<0.05$ ) fakat yaşlılarda kontrol grubuna göre düşüş ( $p<0.05$ ) tespit edilmiştir. 120. dakikasından sonra yaşlılarda hafif bir artış gözlenirken gençlerde hala belirgin artış devam etmekteydi. 240. dakikadan sonra tüm gruplarda ADMA da düşüş başlamış fakat gençlerde hala yüksekti, kontrol grubunda ise bir fark tespit edilememiştir.<sup>194</sup> Bu çalışma bize hastanın hastaneye intikalinde geçirilen sürenin dolayısıyla analiz için alınan venöz kanın ADMA mitarındaki etkisini göstermesi açısından ışık tutmalıdır. Tabii ki hayvan deneylerindeki sonuçların insanlarla birebir örtüşmesini beklemek de hata olacaktır.

Nishiyama ve arkadaşları Japon Halk Sağlığı Merkezinin modellediği risk tahminine göre 24-63 yaşlarında 769 çalışan erkek üzerinde yaptıkları bir çalışmada ADMA düzeylerinin inmede bir risk faktörü olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada yaş, vücut kütle indeksi, diastolik kan basıncı, HDL ve TG seviyeleri, hesaplanan glomerular filtrasyon hızı, diyabet, aşırı alkol alımı, ailedeki kardiyovasküler hastalık öyküsü, düzenli egzersiz ve sigara içimi gibi faktörler açısından gruplar oluşturulmuş ve bu grupların inmeye yatkınlığı arttıkça, ADMA düzeylerinin de arttığı tespit edilmiştir.<sup>195</sup> Bu prospektif çalışmanın sonuçları da bu tez çalışması ile uyumludur.

Yaşlılarda ADMA'da artış tespit edilmiştir ve bu artışın sorumlusu olarak; azalan DDAH aktivitesi ile beraber yaşlanan vasküler endoteldeki arginin transportundaki yetersizlik olduğu düşünülmektedir.<sup>196</sup>

Gençlerde ADMA'nın artışını ise premature endotel yaşlanmasının bir markeri olarak düşünmek mümkündür.<sup>197</sup>

Sandrim ve arkadaşları, preeklamsi hastaları üzerinde yapılan bir çalışmada ilk kez beyaz ve siyah ırkları arasında plazma ADMA düzeyleri arasında belirgin bir fark olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada plazma ADMA düzeyleri her ikisi de preeklamsi hastası siyahi grupta  $2.239 \pm 0.020$   $\mu\text{mol/L}$  ve beyaz grupta  $2.144 \pm 0.019$   $\mu\text{mol/L}$  ( $p < 0.05$ ) ve her ikisi sağlıklı hamile olan siyahi grupta  $2.172 \pm 0.025$   $\mu\text{mol/L}$  ve beyaz grupta  $2.077 \pm 0.018$   $\mu\text{mol/L}$  ( $p < 0.05$ ) olarak tespit edilmiştir.<sup>198</sup>

Plazma ADMA'nın normal aralığı  $0.225-0.485$   $\mu\text{mol/L}$  olarak değerlendirilmiştir.<sup>199, 200</sup>

Çalışmamızda  $63.48 \pm 18.08$  yaş ortalamasına sahip 81 iskemik inme hastası (51 kadın, 30 erkek) ve  $48.00 \pm 19.44$  yaş ortalamasına sahip 50 sağlıklı kontrol grubu (23 kadın, 27 erkek) kullanılmıştır. İskemik inme hastası grupta ADMA miktarı sağlıklı kontrol grubuna kıyasla artmış olarak tespit edilmiştir ( $p = 0.013$ ). Grupları kendi içinde cinsiyetlerine göre kıyaslayacak olursak; inme hastası kadınlar ve erkekler arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir ( $p = 0.409$ ), benzer şekilde kontrol grubu kadınlar ve erkekler arasında anlamlı bir fark görülememiştir ( $p = 0.436$ ).

NO havada bulunmakla birlikte, aynı zamanda kirli havada, egzoz gazında ve sigara dumanında bulunan bir bileşik olduğu bilinmektedir. Fakat bizim için önemli olan vücutta argininden sentezlenen nitrik oksittir. Sağlam bir damar endoteli, bazal bir hızla devamlı nitrik oksit oluşturur. Bu arada fizyolojik bir stimulus agonist olarak yanıtı artabilir. Agonist etkisi ile intasellüler  $\text{Ca}^{+2}$  artışı nitrik oksit sentazı aktive eder ve L-arginin aminoasidinden sitrülün ile sentezlenen NO düz kaslara difüze olduktan sonra guanilat siklazı aktive ederek cGMP'yi artırır. Endotel hücrede sentezlenen NO kan basıncının düzenlenmesine katkıda bulunur ve bunun yanı sıra merkezi sinir sisteminde NO bir nörotransmitter olarak görev alır. Ayrıca NO trombosit agregasyonun



kontrolü ve kardiyak kontraktilite düzenlenmesine katkı yapar ve bunları cGMP üzerinden gerçekleştirir.<sup>201</sup>

NO'nun insan vücudunda bilinen ve bilinmeyen birçok etkisinden dolayı hastalıkların oluşumunda ve/veya oluşuktan sonraki etkileri NO'yu önemli bir molekül yapmaktadır.

NO'nun ana kaynağı NOS olmasına rağmen, bazı özel durumlarda diğer mekanizmalarla da üretilebilir. NO, ksantin oksidaz yolağından veya non-enzimatik bir yolla hidrojen peroksit ve L-Arginin tarafından veya iskemik olaylarda asid ve indirgeyici şartlar altında nitritlerin indirgenmesiyle de üretilebilir.<sup>202</sup>

İskemik inmede NO'nun rolü komplekstir; NO kaynağına, lokal konsantrasyonuna ve redoks durumuna göre, ya nöroprotektif veya nörotoksik olabilir. Endotelial NOS tarafından üretilen vasküler NO yararlıdır. Fakat nNOS ve iNOS kökenli NO'nun etkileri nörotoksiktir.<sup>203</sup>

Plazma NO (nitrat/nitrit), kısmen eNOS tarafından sentezlenen NO'ya bağlıdır. Endotel kaynaklı NO, inme risk faktörlerinin (yaşlanma, hipertansiyon, hiperkolesterolemi ve sigara içimi vb. ) etkilerini azaltır. Bunun tersine, cerebral eNOS, iNOS ve nNOS 'un üretiminin herhangi birindeki artış, beyin ve plazmadaki NO artışı ile sonuçlanır. Bu yüzden plazma NO seviyeleri akut faz inme esnasında yüksek veya düşük olabilir tezinden yola çıkarak yapılan bir çalışmada Rashid ve arkadaşları, 38 kontrol, 228 iskemik inme ve 49 hemorajik inme hastasında plazma NO (nitrat/nitrit) düzeylerine bakılmış ve şu sonuçları bulunmuş; kontrol grubu  $64.0 \pm 36.3 \mu\text{mol/L}$ , iskemik inme  $49.9 \pm 26.1 \mu\text{mol/L}$ , hemorajik inme  $41.7 \pm 19.5 \mu\text{mol/L}$  ( $p < 0.001$ ).<sup>203</sup>

Moro ve arkadaşları, inme hastalarında kontrol grubuna göre, beyin omurilik sıvısı (BOS) ve serum NO düzeylerinin daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.<sup>203</sup>

Nandhagopal ve arkadaşları, 40 inme hastası üzerinde yaptıkları bir çalışmada serum NO seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla daha düşük tespit etmişler; inme hastası  $40.9 \pm 3.9 \mu\text{mol/L}$  ve kontrol grubu  $59.9 \pm 7.3 \mu\text{mol/L}$  ( $p < 0.026$ ) olarak tespit etmişler.<sup>204</sup> Bu çalışmanın sonuçları bu tez çalışmasının sonuçları ile uyumludur. Fakat bizim çalışmamızda sonuçlar arasında fark bu kadar anlamlı bulunamamıştır ( $p > 0.05$ ). Bunun nedeninin çalışma grupları arasındaki yaş farkı ve diğer faktörler olduğunu düşünmekteyiz.

İnme geçiren hastaların BT'de görünümüne göre lezyon büyüklükleri farklılık göstermektedir. Literatürde lezyon büyüklüğünün erken dönemde NO miktarında artışa sebep olduğunu bildiren çalışmalar olsa da, bunun tersini bildiren çalışmalarda mevcuttur.<sup>104</sup>

İnme gelişiminde, endojen NO üretiminin artışına bağlı iskemik serebrovasküler ve nöral hasarların oluştuğu birçok faktör görülmüştür. Her ne kadar inme esnasında kan beyin bariyerinin bütünlüğünün bozulduğuna dair veriler iyi bilinse de, NO'nin buradaki rolü çelişkilidir. Bazı raporlar; L-nitroarginin metilesteri (L-NAME) tarafından NOS aktivitesinin inhibisyonuna bağlı kan-beyin bariyerinin bozulması azaltılarak akut iskemik hasarın da azaldığını göstermiştir. Oysa diğerleri NO'nin substratı olan L-argininin, NO-bağımlı vazodilatasyon yolunu destekleyerek ve bölgesel serebral kan akışını arttırarak iskemik beyin hasarlarını azalttığını ortaya koymuşlardır. Başka bir grupta artan doku NO üretiminin iskemik hasarları uzattığına inanmaktadır. Bu uyuşmazlıkların sebepleri, iskemi ve reperfüzyon periyodu esnasında NO uyarıcı ve inhibitörlerinin arteriyel kan basıncı ve bölgesel serebral kan akışı üzerine farklı etkilere sahip olması ile ilişkili olabilir.<sup>205</sup>

Çalışmamızda plazma NO düzeyleri inme hastası grubumuzda ve sağlıklı kontrol grubuna kıyasla daha düşük tespit edildi fakat bu azalışın istatistiksel olarak

anlamli olmadigi goruldu ( $p=0.246$ ). Inme hastasi 51 kadinda NO duzeyleri ve 30 erkege kiyasla daha dusuk olarak tespit edildi fakat bu azalisin istatistiksel olarak anlamli olmadigi goruldu ( $p=0.83$ ). Kontrol grubundaki 23 kadinda ise 27 erkege kiyasla daha yuksek olarak tespit edildi fakat yine bu artisin istatistiksel acidan anlamli olmadigi goruldu ( $p=0.122$ ). Her ne kadar istatistiksel acidan anlamli gorunmese de NO'daki dususun uc sebebi olabilir; birincisi inme sonucu olusan endotel disfonksiyonuna bagli NO sentezinin azalmasi, ikincisi dusuk L-arginin seviyelerine bagli azalmis NO sentezinin gerceklesmesi, ucuncusu de son diyetle alinan protein icerigi ve miktaridir. Bu ucuncu ihtimal ozellikle oral yolla beslenemeyen hastalarda daha da onem kazanmaktadır.

Bu calismada NO duzeylerinin tespiti ELISA yontemiyle ticari kit kullanililarak yapilmistir. Bu yontemin hassasiyeti ve guvenirliligi yuksek oldugundan tercih edilmistir.<sup>169</sup>

NOS uc tane izoforma sahip buyuk bir enzimdir. Calismamizda uzerinde durdugumuz eNOS endotel hucrelerde NO olusumunu kataliz eden izoformudur. eNOS'taki herhangi bir hasar NO sentezinin artmasina veya azalmasına, buna bagli olarakta endotel hasari basta olmak uzere birçok hasara sebep olabilir, bunlara ilaveten oksidatif etki de olusturur.

Serebral iskemiyi takiben eNOS sentezi ve aktivitesi artar. eNOS iskemiden sonra yeterli doku perfuzyonunun sürdürülmesi ve serebral damarlarda immunoreaktivitesinin artmasi acısından önemlidir.<sup>204</sup>

İskemik serebral hasarın ilk dakikalarından itibaren eNOS aktivitesi artar, bu artış şartlara bagli olarak yarım saatle birkaç saat arasında olabilir. Daha sonra bu artış günler sonra bazal seviyelere iner.<sup>202</sup> Bu tez calismasının eNOS sonuclari da bu bilgilerle uyumludur.

eNOS knockout fareler üzerinde yapılan deneysel çalışmalar iskemik bölgeye kan akışı ne kadar azalırsa o oranda daha büyük serebral enfarktüse yol açtığını göstermiştir.<sup>206</sup>

Çalışmamızda inme hastası grupta eNOS miktarı, sağlıklı kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek olarak tespit edilmiştir ( $p < 0.001$ ). Bu sonuçları literatürle karşılaştırdığımızda mevcut bilgilerle uyumlu olduğunu görmekteyiz. Grupları kendi içinde cinsiyetlerine göre kıyaslayacak olursak; inme hastası kadınlar ile erkekleri kendi arasında kıyaslırsak anlamlı bir fark görülememiştir ( $p = 0.395$ ) ve kontrol grubu kadınlar ile erkekleri kendi içinde kıyaslırsak yine anlamlı bir fark görülememiştir ( $p = 0.793$ ).

İnme sonrası eNOS miktarındaki bu belirgin artışı enzimin Ser1177 rezidüsünün fosforilasyonla aktive edilmesinden kaynaklandığını ileri süren yayınlarda mevcuttur. Bu mekanizma şöyle işlemektedir; vasculer endotelyal büyüme faktörü, kalsiyum bağımlı kalmodulin ve proteinkinaz Akt'yi içeren bir yolağı başlatarak eNOS enziminin Ser1177 rezidüsünün fosforillenmesini sağlar.<sup>206</sup>

Korelasyon analizi verilerine göre; hasta grubunda ADMA ile NO düzeyleri arasında çok yüksek ve pozitif yönde ( $r = 0.987$ ) istatistiksel anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir. Kontrol grubunda ise plazma ADMA ve eNOS düzeyleri arasında yüksek ve pozitif yönde ( $r = 0.730$ ) ilişki ve plazma ADMA ile yaş arasında orta derecede ve pozitif yönde ( $r = 0.515$ ) ilişki tespit edilmiştir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Akut iskemik inme hastası grup ile sağlıklı kontrol grubu açısından plazma ADMA düzeylerinde hastaların lehine istatistiksel anlamlı bir artış tespit edildi. ADMA'daki bu artış PRMT tarafından artan protein metilasyonunu, DDAH aktivitesindeki azalmadan ve vasküler endoteldeki arginin transportundaki eksiklikten kaynaklanmış olabileceğini akla getirmektedir.
2. Plazma NO düzeylerinde anlamlı bir fark tespit edilemedi. Eski çalışmalarda inme sonrası NO miktarlarında artış olduğunu gösteren çalışmaların yanı sıra azaldığını gösteren çalışmalar da mevcuttur.
3. Plazma eNOS düzeylerinde ise yine hasta grubunun lehinde istatistiksel anlamlı bir artış tespit edildi. eNOS'taki bu artış vasküler endotel disfonksiyonundan kaynaklandığını düşündürmektedir. Ayrıca inmenin getirdiği ağır iskemik şartlar altında endotel hücre harabiyetinin plazmaya yansımaları sonucu eNOS miktarında ciddi bir artışa sebep olabileceğini düşünmekteyiz.
4. Metabolizmadaki NO, eNOS ve ADMA miktarlarını etkileyen fizyolojik birçok faktörün yanı sıra, kullanılan ilaçlar (özellikle nitrat ve türevlerini içeren) ve beslenme tarzı da özellikle son diyetdeki protein miktarı ve içeriği sonuçlara etki etmiş olabilir. NO'nun L-Arginin amino asidinden sentezlendiğini ve ADMA'nın bir protein turnover ürünü olduğunu da göz önünde bulundurarak bu durumun bertaraf edilebilmesi için gelecek çalışmalarda göz ardı edilmemesi gerektiğini düşünmekteyiz.
5. İnme sonrası geçirilen sürenin tüm bu parametreler üzerinde önemli oranda etkili olduğu göz önünde bulundurularak sonuçların buna göre değerlendirilmesi daha gerçekçi kararlar alınmasına yardımcı olacağını düşünmekteyiz.

6. NO, eNOS ve ADMA'nın akut iskemik inme biyomarkeri olarak kullanılabilmesi için daha geniş çaplı araştırmalara ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

1. NY. E. Akut İskemik İnmede, İnternal Karotis Arterin İntima-Media Kalınlığı ile CRP İlişkisi. T.C. Sağ. Bak Haydarpaşa Numune ve Eğitim Araştırma Hastanesi 1. Nöroloji kliniği. Uzmanlık Tezi, İstanbul 2005.
2. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, CJ. M. Global and Regional Burden of Disease and Risk Factors, Systematic Analysis of Population Health Data. *The Lancet*, 2006, 367: 1747-1757.
3. Brainin M, Bornstein N, Boysen G, V. D. Acute Neurological Stroke Care in Europe. Results of the European Stroke Care İventory. *European Journal of Neurology*, 2000, 7: 5-10.
4. Rothwell PM, Coull AJ, Silver LE, Fairhead JF, Giles MF, Lovelock CE, Redgrave JN, Bull LM, Welch SJ, Cuthbertson FC, Binney LE, Gutnikov SA, Anslow P, Banning AP, Mant D, Z. M. Population- Based Study of Event- Rate, İncidence, Case Fatality, and Mortality for all Acute Vascular Events in all Arterial Territories (Oxford Vascul ar Study). *The Lancet*, 2005 366.
5. O'Brien JT, Erkinjuntti T, Reisberg B, Roman G, Sawada T, Pantoni L, Bowler JV, Ballard C, DeCarli C, Gorelick PB, Rockwood K, Burns A, Gauthier S, ST. D. Vascular Cognitive İmpairment. *Lancet Neurology*, 2003, 2: 89-98.
6. Durukan A, Emre U, T. T. *İskemik İnmeye Yaklařım Rehberi* Baský. Finlandiya, 2008.
7. Saenger A. K, H. CR. Stroke Biomarkers: Progress and Challenges for Diagnosis, Prognosis, Differentiation and Treatment. *Clinical Chemistry*, 2010 56: 21–33.
8. Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, Flegal K. Heart disease and stroke statistics—2009 update: a report from the American

- Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*, 2009, 119: 21–181.
9. Asplund K, Stegmayr B, M. P. From Twentieth to the Twenty-first Century: A Public Health Perspective on Stroke. *Cerebrovascular Disease Pathophysiology, Diagnosis, and Management. Blackwell Science*, 1998, 2: 320-328.
  10. LH. K. Incidence Rates of Strokes of in the 80s. The End of the Decline in Stroke. *Stroke*, 1989, 20: 841-843.
  11. Easton JD, Saver JL, Albers GW, Alberts MJ, Chaturvedi S, E. F. Definition and Evaluation of Transient Ischemic Attack: A Scientific Statement for Healthcare Professionals from the American Heart Association / American Stroke Association Stroke Council; Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Cardiovascular radiology and Intervention; Council on Cardiovascular Nursing; and the Interdisciplinary Council on Peripheral Vascular Disease. The American Academy of Neurology Affirms the Value of This Statement as an Educational Tool for Neurologists. *Stroke*, 2009, 40: 2276-2293.
  12. Albers GW, Caplan LR, Easton JD, Fayad PB, Mohr JP, JL. S. Transient Ischemic Attack-Proposal for A New Definition. *The New England Journal of Medicine*, 2002, 347: 1713-1716.
  13. DE. L. How Transient are Transient Ischemic Attacks ? *Neurology*, 1988, 38: 674-677.
  14. Davidson MH, Corson MA, Alberts MJ, Anderson JL, Gorelick PB, Jones PH. Consensus Panel Recommendation for Incorporating Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Testing into Cardiovascular Disease Risk Assessment Guidelines. *American Journal of Cardiology*, 2008, 101: 51-57.



15. PB. G. Lipoprotein-associated Phospholipase A2 and Risk of Stroke. *American Journal of Cardiology*, 2008, 101: 34-40.
16. Oei HH, Van der Meer IM, Hofman A, Koudstaal PJ, Stijnen T, Breteler MMB, JCM. W. Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Activity is Associated with Risk of Coronary Heart Disease and Ischemic Stroke. The Rotterdam Study. *Circulation*, 2005, 111: 570-575.
17. Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Bang H, Coresh J, Folsom AR, Chambless LE. Lipoprotein-associated Phospholipase A2, High-Sensitivity C-Reactive Protein, and Risk for Incident Coronary Heart Disease in Middle-Aged Men and Women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Archives of Internal Medicine*, 2005, 165: 2479-2484.
18. Wassertheil – Smoller S, Hendrix SL, Limacher M, Heiss G, Kooperberg C, Baird A, et al. Effect of Estrogen Plus Progestin on Stroke in Postmenopausal Women: The Women's Health Initiative: A randomized Trial. *Journal of the American Medical Association*, 2003, 289: 2673-2684.
19. Parks WC, Wilson CL, YS. L-B. Matrix Metalloproteinases as Modulators of Inflammation and Innate Immunity. *Nature Review Immunology* 2004, 617: 617-629.
20. VW. Y. Metalloproteinases: Mediators of Pathology and Regeneration in the CNS. *Nature Review Neuroscience*, 2005, 6: 931-944.
21. Anthony DC, Ferguson B, Matyzak MK, Miler KM, Esiri MM, VH. P. Differential Matrix Metalloproteinases Expression in cases of Multiple Sclerosis and Stroke. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 1997, 23: 406-415.

22. Lo EH, Wang X, ML. C. Extracellular Proteolysis in Brain Injury and Inflammation: Role for Plasminogen Activators and Matrix Metalloproteinases. *Journal of Neuroscience Research*, 2002, 69: 1-9.
23. Rosenberg GA, Navrati LM, Barone F, G. F. Proteolytic Cascade Enzymes Increase in Focal Ischemic in Rat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1996, 16: 360-366.
24. GJ. DZ. Stroke and Neurovascular Protection. *The New England Journal of Medicine*, 2006, 354: 553-555.
25. Lo EH, Broderick JP, MA. M. tPA and Proteolysis in the Neurovascular unit. *Stroke*, 2004, 35: 354-356.
26. Montaner J, Alvarez-Sabi'n J, Molina C, Angle's A, Abilleira S, Arenillas J. Matrix Metalloproteinase Expression After Human Cardioembolic Stroke: Temporal Profile and Relation to Neurological Impairment. *Stroke*, 2001, 32: 1759-1766.
27. Alvarez-Sabi'n J, Delgado P, Abilleira S, Molina CA, Arenillas J, Ribo M, al. e. Temporal Profile of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors after Spontaneous Intracerebral Hemorrhage: Relationship to Clinical and Radiological Outcome. *Stroke*, 2004, 35: 1316-1322.
28. Vukasovic I, Tesija-Kuna A, Topic E, Supanc V, Demarin V, M. P. Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Different Acute Stroke Subtypes. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2006, 44: 428-434.
29. Montaner J, Alvarez-Sabi'n J, Molina CA, Angle's A, Abilleira S, Arenillas J, J. M. Matrix Metalloproteinase Expression is Related to Hemorrhagic Transformation after Cardioembolic Stroke. *Stroke*, 2001, 32: 2762-2767.

30. Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Abillera S, Arenillas JF, Ribo M, al. e. Matrix Metalloproteinase-9 Pretreatment Level Predicts Intracranial Hemorrhagic Complications after Thrombolysis in Human Stroke. *Circulation*, 2003, 107: 598-603.
31. Rosell A, Alvarez-Sabi'n J, Arenillas JF, Rovira A, Delgado P, Fernandez-Cadenas I, al. e. A matrix Metalloproteinase protein Array reveals a Strong Relation Between MMP-9 and MMP-13 with Diffusion-Weighted Image Lesion Increase in Human Stroke. *Stroke*, 2005, 36: 1415-1420.
32. Hortsman S, Kalb P, Koziol J, Gardner H, S. W. Profiles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors, and Laminin in Stroke Patients: Influence of Different Therapies. *Stroke*, 2003, 34: 2165-2170.
33. Ning M, Furie KL, Koroshetz WJ, Lee H, Baron M, Ledder M, al. e. Association Between Tpa Therapy and Raised Early Matrix metalloproteinase-9 in Acute Stroke. *Neurology*, 2006, 66: 1550-1555.
34. Eng LF, Ghirnikar RS, YL. L. Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP Thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical Research*, 2000, 25: 1439-1451.
35. Niebro'j-Dobosz I, Rafalowska J, Lukasiuk M, Pfeffer A, MJ. M. Immunochemical Analysis of Some Proteins in Cerebrospinal Fluid and Serum of patients with Ischemic Strokes. *Folia Neuropathologica*, 1994;, 32: 129-137.
36. Herrmann M, Vos P, Wunderlich MT, Brujin CH, KJ. L. Release of Glial Tissue-specific Proteins after Acute Stroke: A Comparative Analysis of Serum Concentrations of Protein S-100B and Glial Acidic Protein. *Stroke*, 2000, 31: 2670-2677.

37. Foerch C, Singer O, Neuman-Haefelin T, Raabe A, M. S. Utility of Serum GFAP in Monitoring Acute MCA Territorial Infarction. *Cerebrovascular Diseases*, 2003, 16: 45.
38. Foerch C, Curdt I, Yan B, Dvorak F, Hermans M, Berkefeld J. Serum Glial Fibrillary Acidic Protein as a Biomarker for Intrahemorrhage in Patients with Acute Stroke. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 2006, 77: 181-184.
39. Dvorak F, Haberer I, Sitzer M, C. F. Characterisation of the Diagnostic Window of Serum Glial Fibrillary Acidic Protein for the Differentiation of Intracerebral Haemorrhage and Ischemic Stroke. *Cerebrovascular Diseases*, 2009, 27: 37-41.
40. Uden J, Strandberg K, Malm J, Campell E, Rosengren L, Stenflo J. Explorative Investigation of Biomarkers of Brain Damage and Coagulation system Activation in Clinical Stroke Differentiation. *Journal of Neurology Research*, 2009, 256: 72-77.
41. Nagakubo D, Taira T, Kitaura H, Ikeda M, Tamai K, Iguchi-Ariga SM, H. A. DJ-1, a Novel Oncogene Which Transforms Mouse NIH3T3 Cells in Cooperation with ras. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 231: 509-513.
42. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E. Mutations in the DJ-1 Gene Associated with Autosomal Recessive Early-onset Parkinsonism. *Science*, 2003, 299: 256-259.
43. Lescuyer P, Allard L, Zimmermann-Ivol CG, Burgess JA, Hughes-Frutiger S, Burkhard PR. Identification of Post-mortem Cerebrospinal Fluid Proteins as Potential Biomarkers of Ischemia and Neurodegeneration. *Proteomics* 2004, 4: 2234-2241.

44. Allard L, Burkhard PR, Lescuyer P, Burgess JA, Walter N, Hochstrasser DF, JC. S. PARK7 and Nucleoside Diphosphate Kinase A as Plasma Markers for the Early Diagnosis of Stroke. *Clinical Chemistry*, 2005, 51: 2043-2051.
45. Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, MacAllister R, P. V. Asymmetric Dimethylarginine Causes Hypertension and Cardiac Dysfunction in Humans and actively metabolized by Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 2003, 23: 1455-1459.
46. Kielstein JT, Bode-Boger SM, Frolich JC, Ritz E, Haller H, D. F. Asymmetric Dimethylarginine, Blood Pressure, and Renal Perfusion in Elderly Subjects. *Circulation*, 2003, 107: 1891-1895.
47. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, T. I. Endogenous Nitric Oxide Synthase Inhibitor: A Novel Marker of Atherosclerosis. *Circulation*, 1999, 99: 1141-1146.
48. Masuda H, Goto M, Tamaoki S, H. A. Accelerated Intimal Hyperplasia and Increased Endogenous Inhibitors for NO Synthesis in Rabbits with Alloxan-Induced Hyperglycemia. *British Journal of Pharmacology*, 1999, 126: 211-218.
49. Boger RH, Lentz SR, Bode-Boger SM, Knapp HR, WG. H. Elevation of Asymmetrical Dimethylarginine May Mediate Endothelial Dysfunction during Experimental Hyperhomocysteinemia in Humans. *Clinical Science*, 2001, 100: 161-167.
50. Stuhlinger MC, Oka RK, Graf EE, Schmolzer I, Upson BM, Kapoor O. Endothelial Dysfunction Induced by Hyperhomocysteinemia: Role of Asymmetric Dimethylarginine. *Circulation*, 2003, 108: 933-938.

51. Yoo JH, SC. L. Elevated Levels of Plasma Homocysteine and Asymmetric Dimethylarginine in Elderly Patients with Stroke. *Atherosclerosis*, 2001, 158: 425-30.
52. Leong T, Zylberstein D, Graham I, Lisner L, Ward D, Fogarty J. Asymmetric Dimethylarginine Independently Predicts Fatal and Nonfatal Myocardial Infarction and Stroke in Women: 24-year follow-up of the Population Study of Women in Gothenberg. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2008,28:961–967.
53. T. T. HPLC Analysis of ADMA and Other Methylated L-arginine Analogs in Biological Fluids. *Journal of Chromatography B*, 2007, 851 21-29.
54. RF. F. Studies on Endothelium Dependent Vasodilation and the Endothelium-derived Relaxing Factor. *Acta Physiologica Scandinavica*, 1990, 139: 257-270.
55. Palmer RMJ, Ferrige AG, S. M. Nitric Oxide Release Account for the Biological Activity of Endothelium- Derived Relaxing Factor. *Nature Review Neuroscience*, 1987, 327: 524-526.
56. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, BA. F. Apparent Hydroxyl Radical production by Peroxynitrite; Implications for Endothelial Injury from Nitric Oxide and Superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87: 1620-1624.
57. RA. S. Nitric Oxide. *American Journal of Medical Science* 1993, 306: 348-358.
58. Moncada S, Palmer RMJ, A. H. Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacology Reviews*, 1991, 43 109-137.
59. Moncada S, A. H. The L-arginine- Nitric Oxide Pathway. *The New England Journal of Medicine*, 1993, 329: 2002-2012.

60. Buse R, Fleming I, VB. S. Nitric Oxide Formation in the Vascular Wall: Regulation and Functional Implications. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1995, 196: 7-18.
61. Nathan C, QW. X. Nitric Oxide Synthases: Roles, Tolls, Controls. *Cell*, 1994, 78: 915-918.
62. Nussler AK, TR. B. Inflammation, Immunoregulation and Inducible Nitric Oxide Synthase. *Journal of Leukocyte Biology*, 1993, 54: 171-178.
63. Bloch KD, Wolfram JR, Brown DM, Roberts JD Jr, Zapol DG, Lepore JJ, Filippov G, Thomas JE, Jacob HJ, DB. B. Three Members of the Nitric oxide Synthase II Gene Family Colocalize to Human Chromosome 17. *Genomic*, 1995, 27: 526-530.
64. MA. M. Approaches Toward Selective Inhibition of Nitric Oxide Synthase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1994, 37: 1899-1907.
65. Aladağ MA, Türköz Y, İH. Ö. Nitrik Oksit ve Nörofizyopatolojik etkileri. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri*, 2010, 20: 107-111.
66. Moncada S, A. H. The L-arginine- Nitric Oxide Pathway. *New England Journal of Medicine*, 1993, 329: 2002-2012.
67. Kuyumcu A, Polat Düzgün A, Özmen M M, T. BH. Travma ve Enfeksiyonda Nitrik Oksidin Rolü. *Ulusal Travma Dergisi*, 2004, 10: 149 -159.
68. DJ. S. Enzymes of the L-Arginine to Nitric Oxide Pathway. *The Journal of Nutrition*, 2004, 134: 2748-2751.
69. M. A. Koroner Arter Hastalığı Olgularında Koroner Risk Faktörleri İle Endotel Fonksiyonları Arasındaki İlişki. Kardiyoloji Uzmanlık Tezi, İstanbul: 2004.
70. LJ. I. Nitric oxide: A Novel Signal Transduction Mechanis for Transcellular Communication. *Hypertension*, 1990, 16: 477-483.

71. SH. S. Nitric oxide: First in A New Class of Neurotransmitters. *Science*, 1992, 257: 494-496.
72. Loscalzo J, G. W. Nitric oxide and its Role in the Cardiovascular System. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 1995, 38: 87-104.
73. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, S. M. Accumulation of an Endogenous Inhibitor of Nitric Oxide Synthesis in Chronic Renal Failure. *Lancet*, 1992, 339: 572-575.
74. Lloyd-Jones DM, KD. B. The Vascular Biology of Nitric Oxide and its Role in Atherogenesis. *Annual Review of Medicine*, 1996, 47: 365-375.
75. De Graaf JC, Banga JD, Moncada S, Palmer RM, de Groot PG, JJ. S. Nitric Oxide Functions as an Inhibitor of Platelet Adhesion under Flow Conditions. *Circulations*, 1992, 85.
76. Redomski MW, Palmer RMS, S. M. Endogenous Nitric Oxide Inhibits Human Platelet Adhesion to Vascular Endothelium. *Lancet*, 1987, 2: 1057-1058.
77. Redomski MW, Palmer RMS, S. M. Characterization of the L-arginine: Nitric Oxide Pathway in Human Platelets. *British Journal of Pharmacology*, 1990, 101: 325-328.
78. J. G. Glutamate Nitric Oxide and Cell-Cell Signalling in the Nervous System. *Trends in Neurosciences*, 1991, 14: 60-67.
79. Garthwaite J, CL. B. Nitric Oxide Signalling in the Central Nervous System. *Annual Review of Physiology*, 1995, 57: 683- 706.
80. Olesen J, Thomsen LL, H. I. Nitric Oxide is A Key Molecule in Migraine and Other Vascular Headaches. *Trends in Pharmacological Science*, 1994, 15: 149-153.



81. Moncada S, EA. H. *Nitric Oxide from L-arginine: A Bioregulatory System*. Baský. Amsterdam, Elsevier Science Publisher BV, 1990.
82. MJ. R. Nitregeric Transmission; Nitric Oxide as A Mediator of Non-adrenergic, Non-cholinergic Neuro-effector Transmission. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 1992, 19: 147-169.
83. Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi M, Hwang PM, SH. S. Nitric Oxide Synthase and Neuronal NADPH Diaphorase are Identical in Brain and Peripheral Tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88: 7797-7801.
84. Tottrup A, Glavihd EB, D. S. Involvement of the Larginine- Nitric Oxide Pathway in Internal Anal Sphincter Relaxation. *Gastroentology*, 1992, 102: 409-415.
85. Burnett AL, Lowenstein CJ, Bredt DS, Chang TS, SH. S. Nitric Oxide: A Physiologic Mediator of Penil Erection. *Sciene*, 1992, 257: 401-403.
86. Iadecola C, Pelligrino DA, Moskowitz MA, NA. L. Nitric Oxide Synthase, Inhibition and Cerebro-vascular Regulation. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1994, 14: 175-192.
87. Kong LY, Wilson BC, Mc Millian MK, Bing G, Hudson PM, JS. H. The Effects of the HIV-1 Envelope Protein gp120 on the Protein on the Production of Nitric Oxide and Proinflammatory Cytokines in Mixed Glial Cell Cultures. *Cell Immunology*, 1996, 172: 77-83.
88. Bo L, Dawson TM, Weselingh S, Mork S, Choi S, Kong PA, Hanley D, BD. T. Induction of Nitric Oxide Synthase in Demyelinating Region of Multiple Sclerosis Brains. *Annals of Neurology*, 1994, 36: 778-786.

89. Dawson TM, SH. S. Gases as Biological Messengers: Nitric Oxide and Carbon Monoxide in the Brain. *Journal of Neuroscience Research*, 1994, 14: 5147-5159.
90. Dawson TM, VL. D. Nitric Oxide: Actions and Pathological Roles. *Neuroscientist*, 1995, 1: 7-18.
91. Meldrum B, J. G. Excitatory Amino Acid Neurotoxicity and Neurodegenerative Disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 1990, 11: 379-387.
92. Dawson VL, Dawson TM, GR. U. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Coat Protein Neurotoxicity Mediated by Nitric Oxide in Primary Cortical Cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90: 3256-3259.
93. Oury TD, Ho YS, Piantadosi CA, JD. C. Extracellular Superoxide Dismutase, Nitric Oxide, and Central Nervous System O<sub>2</sub> Toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89: 9715-9719.
94. Merrill JE, Ignarro LJ, Sherman MP, Melinek J, TE. L. Microglial Cell Cytotoxicity of Oligodendrocytes is Mediated Through Nitric Oxide. *Journal of Immunology*, 1993, 151: 2132-2141.
95. Thomsen LL, Iversen HK, TA. B. Arterial Supersensitivity to Nitric Oxide (Nitroglycerin) in Migraine Sufferers. *Cephalalgia*, 1993, 13: 395-399.
96. Lowenstein CJ, Dinerman JL, SH. S. Nitric Oxide: a Physiologic Messenger. *Annals of Internal Medicine*, 1994, 120: 227-237.
97. R. K. The Macrophage Response to Infectious Agents; Mechanism of Macrophage Activation and Tumour Cell Killing. *Research in Immunology*, 1993, 144: 271-273.

98. Farias-Eisner R, Sherman MP, Aerberhard E, G. C. Nitric Oxide is An Important Mediator of Tumorocidal Activity in Vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91: 9407-9411.
99. Adler HJ, Beland JL, Del-Pan NC, Kobzik L, Brewer JP, Martin TR, U. R. Suppression of Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) Induced Pneumonia in Mice by Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS, NOS2). *The Journal of Experimental Medicine*, 1997, 185: 1533-1540.
100. Castillo J, Rama R, A. D. Nitric Oxide-Related Brain Damage in Acute Ischemic Stroke. *Stroke*, 2000, 31: 852-857.
101. PH. C. Role of Oxidants in Ischemic Brain Damage. *Stroke*, 1996, 27: 1124-1129.
102. C. I. Bright and Dark Sides of Nitric Oxide in Ischemic Brain Injury. *Trends in Neurosciences*, 1997, 20: 132-139.
103. Roland V, Rajapakse N, Robins G, Puskar M, K. S. Transient Focal Ischemia Increases Endothelial Nitric Oxide Synthase in Cerebral Blood Vessels. *Stroke*, 2002, 33: 2704-2713.
104. Ülker M, Doyan C, Hoşver Akgün Y, Bayar F, Altunkaynak E, B. A. İskemik Serebrovasküler Hastalıklarda Serum Nitrik Oksit Düzeylerinin İnme Alt Tipleri ve Lezyon Büyüklüğü ile İlişkisi. *Türk Serebrovasküler Hastalıklar Dergisi*, 2006, 12: 15-20.
105. Kader A, Frazzini VI, Solomon RA, RR. T. Nitric Oxide Production during Focal Cerebral Ischemia. *Stroke*, 1993, 24: 1709-1716.
106. Sarela AI, RT. M. The Role of Nitric Oxide in Surgical Practice. . *Surgery*, 1996, 14: 154-156.
107. S. C. Protein Methylation. *Current Opinion in Cell Biology*, 1993, 5: 977-983.

108. McBride AE, PA. S. State of the Arg: Protein Methylation at Arginine Comes of Age. *Cell*, 2001, 106: 5-8.
109. Vallance P, J. L. Cardiovascular Biology of the Asymmetric Dimethylarginine: Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase Pathway. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2004, 24: 1023-1030.
110. Ogawa T, Kimoto M, K. S. Purification and Properties of a New Enzyme. NG,NG-Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase from Rat Kidney. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264: 10205-10209.
111. Rainer H, Böger MD, S. E. L-Arginine Improves Vascular Function by Overcoming the Deleterious Effects of ADMA, a Novel Cardiovascular Risk Factor. *Alternative Medicine Review*, 2005, 10: 14-23.
112. Jerzy Betowski, Kedra. A. Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) as A Target for Pharmacotherapy. *Pharmalogical Reports*, 2006, 58: 159-178.
113. Boger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, al. e. LDL Cholesterol Upregulates Synthesis of Asymmetrical Dimethylarginine in Human Endothelial Cells: Involvement of S-adenosylmethionine-Dependent Methyltransferases. *Circulation Research*, 2000, 87: 99-105.
114. Erdem S, A. Ü. Asimetrik Dimetil Arjininin Klinik Önemi. *Selçuk Tıp Dergisi.*, 2009, 25: 107-115.
115. A. T. Normal Diyet Ve Metiyoninden Zengin Diyetle Beslenen Sıçanlarda Serum Asimetrik Dimetil Arginin (ADMA) Düzeyleri Üzerine Vitamin E, Vitamin C, Vitamin B6 Ve Folik Asidin Etkileri. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji ABD. Doktora tezi, Edirne Trakya Üniversitesi, 2008.
116. Betowski J, A. K. Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) as A Target for Pharmacotherapy. *Pharmalogical Reports*, 2006, 58: 159-178.

117. İ. İ. Akut Koroner Sendromlu Hastalarda Plasma Asimetrik Dimetil Arginin (ADMA) Düzeylerinin Mortalite Üzerine Etkisi. T.C. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi 3. İç hastalıkları Kliniği. Uzmanlık Tezi, İstanbul: 2008.
118. Buğdaycı G, E. S. Asimetrik Dimetilarginin (ADMA) *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 2005, 2: 36-41.
119. Kumagai H, Sakurai M, Takita T, Maruyama Y, Uno S, Ikegaya N, al. e. Association of Homocysteine and Asymmetric Dimethylarginine With Atherosclerosis and Cardiovascular Events in Maintenance Hemodialysis Patients. *American Journal of Kidney Diseases*, 2006, 48: 797-805.
120. Chauhan A, More RS, Mullins PA, Taylor G, Petch MC, PM. S. Aging-associated endothelial dysfunction in humans reserved by L-arginine. *J Am Coll Cardiol*, 1996, 28: 1796-1804.
121. Kakimoto Y, S. A. Isolation and Identification of NG, NG-, and NG, N'-G-dimethyl-Arginine, N-mono, di, and trimethyllysine, and Glucosylgalactosyl-, and Galactosyl- d-Hydroxylysine from Human Urine. *The Journal of Biological Chemistry*, 1970, 245.
122. Kimoto M, Tsuji H, Ogawa T, K. S. Detection of NG NG Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase in the Nitric Oxide Generating Systems of Rats using Monoclonal Antibody. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1993, 300: 657-662.
123. Işıklar ÖÖ, I. M. Asimetrik Dimetilarginin ve Klinik Önemi. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2010, 8: 75-89.
124. Valkonen VP, R. L. Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) and Acute Vascular Events. *Clinica Chimica Acta*, 2004, 348: 9-17.

125. F. S. Farklı Etyolojik Beyin Damar Hastalığı Alt Tiplerinde Serum ADMA ve Homosistein Düzeylerinin Klinik Ve İnfarkt Büyüklüğüne Olan Etkisinin Araştırılması. Tıp Fakültesi Nöroloji ABD. Uzmanlık Tezi, Edirne: Trakya Üniversitesi, 2008.
126. Chan NN, JC. C. Asymmetric Dimethylarginine (ADMA): A potential Link Between Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Diseases in Insulin Resistance Syndrome? *Diabetologia*, 2002, 45: 1609-1616.
127. Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, al. e. Impaired Nitric Oxide Synthase Pathway in Diabetes Mellitus: Role of Asymmetric Dimethylarginine and Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase. *Circulation*, 2002, 106: 987-992.
128. Leiper JM, Santa Maria J, Chubb A, MacAllister RJ, Charles IG, Whitley GS. Identification of Two Human Dimethylarginine Dimethylaminohydrolases with Distinct Tissue Distributions and Homology with Microbial Arginine Deiminases. *Journal of Biochem*, 1999, 343: 209-214.
129. MacAllister RJ, Parry H, Kimoto M, Ogawa T, Russell RJ, Hodson H. Regulation of Nitric Oxide Synthesis by Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase. *British Journal of Pharmacology*, 1996, 119: 1533-1540.
130. Böhmer A, Großkopf H, Jordan J, D. T. Human Hemoglobin does not Contain Asymmetric Dimethylarginine (ADMA). *Nitric Oxide*, 2012, 27: 72-74.
131. Perticone F, Sciacqua A, Maio R, al. e. Asymmetric Dimethylarginine, L-Arginine, and Endothelial Dysfunction in Essential Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, 2005, 46: 518-523.

132. Curgunlu A, Uzun H, Bavunoğlu I, Karter Y, Genç H, S. V. Increased Circulating Concentrations of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in White Coat Hypertension. *Journal of Human Hypertension*, 2005, 19: 629-633.
133. Takiuchi S, Fujii H, Kamide K, al. e. Plasma Asymmetric Dimethylarginine and Coronary and Peripheral Endothelial Dysfunction in Hypertensive Patients. *American Journal of Hypertension*, 2004, 17: 802-808.
134. Güngör A, Aydın Y, Celbek G, Başar C, Alemdar R, Ordu S H, Ak Yıldırım H, H. Ö. Dipper ve Nondipper Hipertansiyon Hastalarında Asimetrik Dimetil Arjinin Düzeyleri. *Dicle Tıp Dergisi*, 2010, 37: 332-338.
135. Jia SJ, Jiang DJ, Hu CP, Zhang XH, Deng HW, YJ. L. Lysophosphatidylcholine-Induced Elevation of Asymmetric Dimethylarginine Level by the NADPH Oxidase Pathway in Endothelial Cells. *Vascular Pharmacology*, 2006, 44: 143-148.
136. Altınova AE, M. A. Endokrin Hastalıklarda Asimetrik Dimetilarginin (ADMA) *Marmara Medical Journal*, 2009, 22: 080-084.
137. Eid HM, Arnesen H, Hjerkin EM, Lyberg T, I. S. Relationship Between Obesity, Smoking, and the Endogenous Nitric Oxide Synthase Inhibitor, Asymmetric Dimethylarginine. *Metabolism*, 2004, 53: 1574-1579.
138. McLaughlin T, Stühlinger M, Lamendola C, al. e. Plasma Asymmetric Dimethylarginine Concentrations are Elevated in Obese Insulin-Resistant Women and Fall with Weight Loss. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2006, 91: 1896-1900.
139. Konukoglu D, Uzun H, Firtina S, Cigdem Arica P, Kocael A, M. T. Plasma Adhesion and Inflammation Markers: Asymmetrical Dimethyl-Larginine and Secretary Phospholipase A2 Concentrations Before and After Laparoscopic

- Gastric Banding in Morbidly Obese Patients. *Obesity Surgery*, 2007, 17: 672-678.
140. Krzyzanowska K, Mittermayer F, Krugluger W, al. e. Asymmetric Dimethylarginine is Associated with Macrovascular Disease and Total Homocysteine in Patients with Type 2 diabetes. *Atherosclerosis*, 2006, 189: 236-240.
141. Paiva H, Lehtimaki T, Laakso J, al. e. Plasma Concentrations of Asymmetric-Dimethyl-Arginine in Type 2 Diabetes Associate with Glycemic Control and Glomerular Filtration Rate But Not with Risk Factors of Vasculopathy. *Metabolism*, 2003, 52: 303-307.
142. Krzyzanowska K, Mittermayer F, Wolzt M, G. S. Asymmetric Dimethylarginine Predicts Cardiovascular Events in Patients with Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 2007, 30: 1834-1839.
143. Malecki MT, Undas A, Cyganek K, al. e. Plasma Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) is Associated with Retinopathy in Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 2007, 30: 2899-2901.
144. Altinova AE, Arslan M, Sepici-Dincel A, Akturk M, Altan N, FB. T. Uncomplicated Type 1 Diabetes is Associated with Increased Asymmetric Dimethylarginine concentrations. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2007, 92: 1881-1885.
145. Tarnow L, Hovind P, Teerlink T, Stehouwer CD, HH. P. Elevated Plasma Asymmetric Dimethylarginine as A Marker of Cardiovascular Morbidity in Early Diabetic Nephropathy in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*, 2004, 27: 765-769.



146. Garcia RG, Perez M, Maas R, Schwedhelm E, Böger RH, P. L-J. Plasma Concentrations of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Metabolic Syndrome. *International Journal of Cardiology*, 2007, 122: 176-178.
147. Demirel F, Bideci A, Cinaz P, al. e. Serum Leptin, Oxidized Low Density Lipoprotein and Plasma Asymmetric Dimethylarginine Levels and Their Relationship with Dyslipidaemia in Adolescent Girls with Polycystic Ovary Syndrome. *Clinical Endocrinology*, 2007, 67: 129-134.
148. Krzyzanowska K, Mittermayer F, Schnack C, Hofer M, Wolzt M, G. S. Circulating ADMA Concentrations are Elevated in Hypopituitary Adults with and without Growth Hormone Deficiency. *European Journal of Clinical Investigation*, 2005, 35: 208-213.
149. Arıkan E, Karadag CH, S. G. Asymmetric Dimethylarginine Levels in Thyroid Diseases. *Journal of Endocrinological Investigation*, 2007, 30: 186-191.
150. Hermenegildo C, Medina P, Peiró M, al. e. Plasma Concentration of Asymmetric Dimethylarginine, An Endogenous Inhibitor of Nitric Oxide Synthase, is Elevated in Hyperthyroid Patients. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2002, 87: 5636-5640.
151. Ozcan O, Cakir E, Yaman H, al. e. The Effects of Thyroxine Replacement on the Levels of Serum Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) and other Biochemical Cardiovascular Risk Markers in Patients with Subclinical Hypothyroidism. *Clinical Endocrinology*, 2005, 63: 203-206.
152. FB. Ö. Hiper ve Hipo Troidli hastalarda Plazma Asimetrik Dimetil Arginin, Nitrik Oksit Seviyeleri ve Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Aktivitesinin Tayini,. Tıbbi Biyokimya ABD. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, 2011.

153. Mugge A, Hanefeld C, RH. B. Plasma Concentration of Asymmetric Dimethylarginine and the Risk of Coronary Heart Disease, Rationale and Design of the Multicenter Cardiac Study. *Atherosclerosis Supplements*, 2003, 4: 29-32.
154. Lenzen H, Tsikas D, RH. B. Asymmetric Dimehtylarginine (ADMA) and the Risk for Coronary Heart Disease, the Multicenter Cardiac Study. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2005, 8: 1-5.
155. Ljubisavljevic S, Stojanovic I, Pavlovic R, Sokolovic D , Pavlovic D, Cvetkovic T , I. S. Modulation of Nitric Oxide Synthase by Arginase and Methylated Arginines during the Acute Phase of Experimental Multiple Sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 2012, 318 106-111.
156. Tosun M, T. A. Asymmetric Dimethylarginine Levels in Allerjic Rhinitis and Nasal Polyposis. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 2013, 43: 455-458.
157. M. YÇ. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Elisa) Systems. *Türk Klinik Tıp Bilimleri*, 1999, 19: 242-248.
158. Babacan F, Topçu A, Söyletir G, M. D. *İnfeksiyon Hastalıklarının İmmüno serolojisi*. Baský. Ankara, Nobel Tıp Kitabevleri 1996.
159. H. B. *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. Baský. İzmir, Barış Yayınları Fakülteler Kitapevi, 1995.
160. Hendry RM, JE. H. Immobilization of Antibodies on Nylon for Use in Enzyme-Linked Immunoassay. *The Journal of Immunological Methods*, 1984, 67: 21.
161. Gülmezoğlu E, S. E. *İmmünoloji*. Baský. Ankara, Hacettepe Taş Kitapçılık, 1994.
162. Feit C, Bartal AH, Tauber G, Dymbort G, Y. H. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Detection of Monoclonal Antibodies

- Recognizing Antigens Expressed on Viable Cells. *The Journal of Immunological Methods*, 1983, 58: 301-308.
163. Macy E, Kemeny M, A. S. Enhanced ELISA. How to Measure Less than 10 Picograms of a Specific Protein (Immunoglobulin) in Less Than 8 Hours. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1988, 2: 3003-3009.
164. Jitsukawa T, Nakajima S, Sugawara I, H. W. Increased Coating Efficiency of Antigens and Preservation of Original Antigenic Structure after Coating in ELISA. *The Journal of Immunological Methods*, 1989, 4: 251-257.
165. Schots A, Van der Leede BJ, De Jong E, E. E. A Method for the Determination of Antibody Affinity Using a Direct ELISA. *The Journal of Immunological Methods*, 1988, 109: 225-233.
166. T. G. *İnstrümental Analiz, Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi*. Baskı. 2007.
167. Snyder LR, Glacjch JL, JJ. K. *Practical HPLC Method Development*. Baskı. 1988.
168. Lei J, Vodovotz Y, Tzeng E, TE. B. Nitric Oxide, A Protective Molecule in the Cardiovascular System. *Nitric Oxide*, 2013, 35: 175-185.
169. Balcı Fidancı Ş, L. TG. Nitrik Oksit Ölçüm Yöntemleri. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2011, 4: 22-29.
170. Ridnou LA, Sim JA, Hayward MA, Wink DA, Martin SM, Buettner GR, DR. S. A Spectrophotometric Method for the Direct Detection and Quantitation of Nitric Oxide, Nitrite and Nitrate in Cell Culture Media. *Analytical Biochemistry*, 2000, 281: 223-229.
171. Plenum Press. A Review of The EPR Spectroscopy of The Point Defects in Alpha-Quartz: The Decade 1982-1992 In The Physics and Chemistry of SiO<sub>2</sub> and the Si-SiO<sub>2</sub> interface, Baskı, 1993: 131-144.

172. N. H. Detection of Nitric Oxide by Electron Paramagnetic Resonance spectroscopy. *Free Radical Biology and Medicine*, 2010, 49: 122-129.
173. Hegesh E, J. S. Blood Nitrates and Infantile Methemoglobinemia. *Clinica Chimica Acta*, 1982, 125: 107-115.
174. Murphy ME, E. N. Nitric Oxide Assay Using Hemoglobin Method. *Methods in Enzymology*, 1994, 233: 241-249.
175. Hirst DG, T. R. Nitric Oxide Physiology and Pathology. *Methods in Molecular Biology*, 2011, 704: 1-13.
176. SFY. L. Capillary Electrophoresis-Principles, Practice and Applications.
177. Miyado T, Nagai H, Takeda S, Saito K, K. F. Development of A Novel Running Buffer fort The Simultaneous Determination of Nitrate and Nitrite in Human Serum by Capillary Zone Electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 2003, 1014: 189-195.
178. Abe S, Nakayabashi S, Murayama J, Sano Y, Ohno K, Maeda M, H. A. Development of A Novel Fluorometric Assay for Nitric Oxide Utilizing Sesamol and its Application to analysis of Nitric Oxide-Releasing Drugs. *Luminescence*, 2010, 25: 456-462.
179. D. T. Measurement of Nitric Oxide Synthase Activity in vivo and in vitro by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Methods in Molecular Biology*, 2004, 279: 81-103.
180. Leiper J, P. V. Biological Significance of Endogenous Methylarginines that Inhibit Nitric Oxide Synthases. *Cardiovascular Research*, 1999, 43: 542-548.
181. P. C. Asymmetrical Dimethylarginine: The Upper Marker? *Circulation*, 2004, 109: 1813-1818.

182. Knowles RG, S. M. Nitric Oxide Synthases in Mammals. *Biochemical Journal*, 1994, 298: 249-258.
183. S. A. Measurement of Nitric Oxide in Biological Models. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1993, 7: 349-360.
184. Ridnou LA, Sim JA, Hayward MA, Wink DA, Martin SM, Buettner GR, DR. S. A Spectrophotometric Method for The Direct Detection and Quantitation of Nitric Oxide, Nitrite and Nitrate in Cell Culture Media. *Analytical Biochemistry*, 2000, 281: 223-229.
185. Xia Y, JL. Z. Direct Measurement of Nitric Oxide Generation from Nitric Oxide Synthase. *Proceeding of the National Academy of Sciences of USA*, 1997, 94: 12705-12710.
186. Moshae H, Stegeman CA, PL. J. Determination of Nitrite and Nitrate in Stored Urine. *Clinical Chemistry*, 1998, 44: 1780-1781.
187. Z. K. İzole Koroner Arter Ektazisi Olan Hastalarda Plazma Asimetrik Dimetil Arginin Düzeyleri. Tıp Fakültesi Kardiyoloji Bölümü. Kardiyoloji Uzmanlık Tezi, Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi, 2009.
188. Meinitzer A, Puchinger M, Brigitte M, Rock E, Ribalta J, Roob J.M, Sundl I, Halwachs-Baumann G, W. M. Reference Values for Plasma Concentrations of Asymmetrical Dimethylarginine (ADMA) and Other Arginine Metabolites in Men After Validation of a Chromatographic Method. *Clinica Chimica Acta*, 2007, 384: 141-148.
189. Valtonen P, Karppi J, Nyssönen K, Valkonen V, Halonen T, K. P. Comparison of HPLC Method and Commercial ELISA Assay for Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) Determination in Human Serum. *Journal of Chromatography B*, 2005, 828: 97-102.

190. T. T. HPLC Analysis of ADMA and Other Methylated L-arginine Analogs in Biological Fluids. *Journal of Chromatography B*, 2007, 851 21-29.
191. Nishiyama Y, Ueda M , Katsura K, Otsuka T, Abe A , Nagayama H, Y. K. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a possible risk marker for ischemic stroke. *Journal of the Neurological Sciences*, 2010, 290: 12-15.
192. Mamatha SN, Nagaraja D, Philip M , R. C. Asymmetric Dimethylarginine as A Risk Marker for Early-Onset Ischemic Stroke in Indian Population. *Clinica Chimica Acta*, 2011, 412: 139-142.
193. Yoo JH, SC. L. Elevated Levels of Plasma Homocysteine and Asymmetric Dimethylarginine in Elderly Patients with Stroke. *Atherosclerosis*, 2001, 158: 425-430.
194. Trocha M, Merwid-Ląda A, Chlebda-Sieragowska E , Szuba A, Pieśniewska M , Fereniec-Gołębiowska L, J K, Szelağ A, Sozański. T. Age-Related Changes in ADMA-DDAH-NO Pathway in Rat Liver Subjected to Partial Ischemia Followed by Global Reperfusion. *Experimental Gerontology*, 2014, 50: 45-51.
195. Nishiyama Y, Otsuka T , Ueda M, Inagaki H , Muraga K, Abe A , Kawada T, Y. K. Asymmetric Dimethylarginine is Related to the Predicted Stroke Risk in Middle-Aged Japanese Men. *Journal of the Neurological Sciences*, 2014, 338: 87-91.
196. MF. M. Vascular Endothelium is the Organ Chiefly Responsible for the Catabolism of Plasma Asymmetric Dimethylarginine-an Explanation for the Elevation of Plasma ADMA in Disorders Characterized by Endothelial Dysfunction. *Medical Hypotheses*, 2004, 63: 699-708.

197. Pikula A, Böger RH, AS. B. Association of Plasma ADMA Levels with MRI Markers of Vascular Brain Injury: Framingham Offspring Study. *Stroke*, 2009, 40: 2959-2964.
198. Sandrim VC, Palei ACT, Metzger IF, Cavalli RC, Duarte G, JE. T-S. Interethnic Differences in ADMA Concentrations and Negative Association with Nitric Oxide Formation in Preeclampsia. *Clinica Chimica Acta*, 2010, 411: 1457-1460.
199. Mama M, Bonfigli AR, Testa R, Testa I, Gambini A, G. C. High-Performance Liquid Chromatographic Assay of Assymmetric Dimethylarginine, Symmetric Dimethylarginine and Arginine in Human Plasma by Derivatization with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde. *Analytical Biochemistry*, 2003, 318: 13-17.
202. Martes LJ, Krugo L, SM. B-B. Determination of Arginine and ADMA in Human Plasma by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry with the Isotope Dilution technique. *Journal of Mass Spectrometry*, 2004, 39: 1287-1294.
201. Yoon Y, Song J, Hong SH, JQ. K. Plasma Nitric Oxide Concentrations and Nitric Oxide Synthase Gene polymorphisms in Coronary Artery Disease. *Clinical Chemistry*, 2000, 46: 1626-1630.
202. Guix FX, Uribealago I, Coma M, FJ. M. The Physiology and Pathophysiology of Nitric Oxide in the Brain. *Progress in Neurobiology*, 2005, 76 126-152.
203. Moro MA, Cardenas A, Hurtado O, Leza JC, I. L. Role of Nitric Oxide after Brain Ischemia. *Cell Calcium*, 2004, 36 265-275.
204. Nandhagopal R, Krishnamoorthy SG, Vengamma B, Shyam S, Latheef SAA, G. S. Circulating Levels of Nitric Oxide in Stroke, Poster Abstracts, Sri Venkateswara Institute of Medical Sciences, 2005, Tirupati, India.

205. Mohammadi TM, Shid-Moosavi M, AG. D. Contribution of Nitric Oxide Synthase (NOS) in Blood-Brain Barrier Disruption during Acute Focal Cerebral Ischemia in Normal Rat. *Pathophysiology*, 2012, 19: 13-20.
206. Kolluru GK, Siamwala HJ, S. C. eNOS Phosphorylation in Health and Disease. *Biochimie*, 2010, 92 1186-1198.



## EKLER

### EK-1. ÖZGEÇMİŞ


Kişisel Bilgiler
<p><b>Adı Soyadı:</b> Aydın Şükrü BENGÜ <b>Doğum tarihi:</b> 02.08.1975 <b>Doğum yeri:</b> Erlenbenh <b>Medeni hali:</b> Evli, 2 çocuk <b>Uyruğu:</b> T.C. <b>Adres:</b> Bingöl Üniversitesi Merkezi Laboratuvarı, 12000 BİNGÖL <b>Tel:</b> 0426 216 00 12- 2813 (dahili) <b>Faks:</b> <b>E-mail:</b> abengu@bingol.edu.tr</p>
Eğitim
<p><b>Lise:</b> Antakya Merkez Lisesi (1992) <b>Lisans:</b> Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Ed. Fakültesi (1992-1996) <b>Yüksek lisans:</b> Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı (1996-2000) <b>Doktora:</b> Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı (2009-2014)</p>
Yabancı Dil Bilgisi
<p>İngilizce: Orta derecede (KPDS 61, Mayıs 2010)</p>
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
İlgi Alanları ve Hobiler
<p>Satranç antrenörlüğü</p>

## EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU

### "2012. 3.1/ 14 "SAĞLIK BİLİMLERİ ETİK KURUL KARARI 24.07.2012

3/1.14- Enstitümüz Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Aydın Şükrü BENGÜ' nün "Doğu Anadolu Bölgesinde Erken Başlangıçlı İskemik Strok Vakaları İçin Bir Risk Markeri Olarak Asimetrik Dimetil Arginin, NA, NOS ve eNOS' un Değerlendirilmesi" tez konusu görüşüldü;

İlgilinin tez konusunun etik değerlere uygun olduğu mevcudun oybirliği ile,

ADI SOYADI	GÖREVİ	İMZA
Prof. Dr. Funda BAYINDIR	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Başkanı	
Doç. Dr. Ayşe OKANLI	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Başkan Yardımcısı	
Prof. Dr. Samih DİYARBAKIR	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Prof.Dr.Yavuz Selim SAĞLAM	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Prof. Dr. H. İnci GÜL	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Doç.Dr. Ahmet YILDIZ	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Doç. Dr.Abdulkadir YILDIRIM	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Yrd.Doç.Dr.Engin SAYGIN	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	Katılmadı
Yrd. Doç. Dr. İlhan ŞEN	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi ve Raportör	