



**T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**



**Hemodiyaliz Sürelerinin Serum Asimetrik Dimetil
Arjinin Düzeyleri ve Endotelial Markırlar Üzerine Etkisi**

TIPTA UZMANLIK TEZİ
Arş. Gör. Dr. Alper YAMAN
DANIŞMAN
Prof. Dr. Tülay KÖKEN
TIBBİ BİYOKİMYA A.D.
AFYONKARAHİSAR
2010

**Hemodiyaliz Sürelerinin Serum Asimetrik Dimetil
Arjinin Düzeyleri ve Endotelial Markırlar Üzerine Etkisi**

TIPTA UZMANLIK TEZİ
Arş.Gör.Dr. Alper YAMAN

DANIŞMAN
Prof. Dr. Tülay KÖKEN

AFYONKARAHİSAR 2010

İşbu çalışma jürimiz tarafından TIBBİ BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul
edilmiştir.

BAŞKAN

ÜYE

ÜYE

ONAY

DEKAN

I

TEŐEKKÖR

Eğitimim ve çalıőmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren sayın hocam Prof.Dr. Tülay KÖKEN' e yine Anabilim Dalımızda görevli tüm hocalarıma, tez çalıőmalarımda bana her türlü yardımı gösteren değerli arkadaşım Arş.Gör. Funda KARABAĞ' a ve bugünlere gelmemde her türlü fedakarlığı gösteren aileme sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

II

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|----|
| I.GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| II. GENEL BİLGİLER | 4 |
| 2.1. KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİ | 4 |
| 2.2. ATEROSKLEROZ | 6 |
| 2.2.1. YAĞLI ÇIZGI GELİŞİMİ | 6 |
| 2.2.2. FİBRÖZ PLAK | 7 |
| 2.2.3. KOMPLİKE LEZYON | 7 |
| 2.3. NİTRİK OKSİT | 8 |
| 2.3.1. NİTRİK OKSİTİN BİYOSENTEZİ | 9 |
| 2.3.2. NİTRİK OKSİT SENTAZ İZOENZİMLERİ | 10 |
| 2.3.3. NİTRİK OKSİTİN BİYOLOJİK ETKİLERİ | 10 |
| 2.3.4. ENDOTEL HÜCRESİ VE NİTRİK OKSİT | 11 |
| 2.3.5. NİTRİK OKSİT SENTEZİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER | 12 |
| 2.4. METİL ARJİNİNLER | 13 |
| 2.4.1. METİL ARJİNİNLERİN OLUŞUMU VE ÇEŞİTLERİ | 13 |
| 2.4.2. ASİMETRİK DİMETİL ARJİNİN | 15 |
| 2.4.2.1. ADMA METABOLİZMASI | 16 |
| 2.4.2.2. ADMA İLE İLİŞKİLİ HASTALIKLAR | 17 |
| 2.4.2.2.1. RENAL HASTALIKLAR | 17 |
| 2.4.2.2.2. DİYABET | 18 |
| 2.4.2.2.3.KARDİYOVASKÜLER HASTALIKLAR | 18 |
| 2.5. HÜCRE ADEZYON MOLEKÜLLERİ | 19 |
| 2.5.1. KADERİNLER | 20 |
| 2.5.2. İNTEGRİNLER | 20 |
| 2.5.3. SELEKTİNLER | 21 |
| 2.5.4. İMMÜNOGLOBULİN SÜPERAİLESİ | 22 |

| | |
|---|----|
| 2.5.4.1. İNTERSELLÜLER (I) CAM | 23 |
| 2.5.4.2. VASKÜLER (V)-CAM-1 | 25 |
| 2.5.4.3. LÖKOSİTLERİN DAMAR DIŞINA GÖÇÜ | 26 |
| III. GEREÇ VE YÖNTEM | 28 |
| IV. İSTATİSTİKSEL ANALİZ | 36 |
| V. BULGULAR | 37 |
| VI. TARTIŞMA | 42 |
| VII. SONUÇ | 48 |
| VIII. ÖZET | 49 |
| IX. SUMMARY | 51 |
| X. KAYNAKLAR | 53 |

III

TABLolar ÇİZELGESİ

| | |
|--|----|
| Tablo 2.1. Kronik böbrek hastalığı evreleri, Glomerüler filtrasyon hızı | 4 |
| Tablo 3.4.7. Mobil fazların akış şeması | 32 |
| Tablo 5.1. ADMA düzeyleri | 37 |
| Tablo 5.2. ARJİNİN/ADMA düzeyleri | 38 |
| Tablo 5.3. NO düzeyleri | 39 |
| Tablo 5.4. VCAM-1 düzeyleri | 40 |
| Tablo 5.5. ICAM düzeyleri | 41 |

IV

ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

| | |
|---|----|
| Şekil 2.1. Böbrek yetmezliği ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisi | 5 |
| Şekil 2.2. . Endotel disfonksiyonu | 8 |
| Şekil 2.3.1. Nitrik oksit biyosentezi | 10 |
| Şekil 2.3.3. . Nitrik oksitin etkileri | 11 |
| Şekil 2.3.4. . NO nun endotelden salınımı | 12 |
| Şekil 2.3.5. . NO biyoyararlanımının azalmasına sebep olabilen faktörler | 13 |
| Şekil 2.4.1. Arjinin ve metil arjinin türevleri ve oluşumları | 14 |
| Şekil 2.4.2.1. ADMA metabolizması | 17 |
| Şekil 2.5.4.3. . Adezyon kaskadı | 27 |
| Şekil 5.1. ADMA düzeyleri | 37 |
| Şekil 5.2. ARJİNİN/ADMA düzeyleri | 38 |
| Şekil 5.3. NO düzeyleri | 39 |
| Şekil 5.4. VCAM düzeyleri | 40 |
| Şekil 5.5. ICAMdüzeyleri | 41 |

V

KISALTMALAR

KBY ; Kronik böbrek yetmezliği
KVH ; Kardiyovasküler hastalıklar
SDBY; Son dönem böbrek yetmezlikli
HT; Hipertansiyon
ADMA; Asimetrik dimetilarginin
SDMA; Simetrik dimetilarginin
NO; Nitrik oksit
NOS; Nitrik oksit sentaz
VCAM1; Vasküler hücre adezyon molekülü 1
ICAM 1; İntersellüler adezyon molekülü 1
SDBY; Son dönem böbrek yetmezliği
RRT; Renal replasman tedavisi
ELAM-1; Endotel orijinli lökosit adezyon molekülü
VLA-4 integrin; Çok geç aktive olan antijen-4
EDRF; Endotel kaynaklı serbestleştirici faktör
MI; Myokart enfarktüsü
PGF; Fibroblast büyüme faktörü
TGF; Transforming büyüme faktörü
M-CSF; Monosit koloni stimülan faktör
GM-CSF; Granülosit monosit koloni stimülan faktör
IL-1; İnterlökin 1
TNF; Tümör nekroz faktör
EDRF; Endotel kaynaklı serbestleştirici faktör
tPA; Doku plazminojen aktivatörü
L-NMMA; N monometil L-arjinindir
BH₄ ; Tetrahidrobiopterin
PRMT; Protein arjinin metil transferazlar
SAM; S-Adenozil Metionin
SAH; S-Adenozil homosistein
DDAH; Dimetilarjinin dimetil amino hidrolaz
LPAM-1; Lenfosit-peyer plak adezyon molekülü-1
LFA-1; Lökosit fonksiyon antijen-1
CRP; C-reaktif protein
MIP-1 β ; Makrofaj inflamatuvar protein

Hemodiyaliz Sürelerinin Serum Asimetrik Dimetil Arjinin Düzeyleri ve Endotelial Markırlar Üzerine Etkisi

I. GİRİŞ

Kronik böbrek yetmezliği (KBY); primer renal veya sistemik hastalıklara bağlı olarak böbrek fonksiyonlarının irreversibl kaybı ile karakterize olan sistemik bir hastalıktır (1).

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH) renal replasman tedavisi altında olan hastalarda en önemli mortalite ve morbidite nedeni olup, tüm ölümlerin yaklaşık %50'sinden ve toplam yatışların %20'sinden sorumludur. Günümüzde renal replasman tedavisindeki gelişmelere rağmen son dönem böbrek yetmezlikli (SDBY) hastalarda, KVH riski genel popülasyonla karşılaştırıldığında yaklaşık 10 ila 20 kat daha fazladır. Kronik böbrek yetmezliği bir çok sistemi etkilemekte olup bu etkilerden belki de en önemli olanı erken ateroskleroz gelişimidir. Aynı zamanda hastaların yaklaşık yarısının ölüm sebebi aterosklerotik kalp hastalığıdır (2,3).

Bilinen başlıca risk faktörleri (yaş, sigara, HT vb.) yanı sıra KBY oluşumu ile ortaya çıkan hastalığa özgü risk faktörleri de KVH sıklığının daha belirgin artmasına neden olmaktadır. Bu risk faktörleri: sıvı fazlalığı, anemi, proteinüri, hiperparatiroidizm, kalsiyum-fosfor metabolizmasındaki bozukluklar, malnutrisyon, inflamasyon, oksidatif stres, dislipidemi, hiperhomosisteinemi ve üremik toksinler şeklinde sıralanabilir (4,5). Fakat tüm bunlar bu hasta popülasyonundaki artmış kardiyovasküler riskin ancak bir kısmını izah edebilmektedir.

Son dönem böbrek yetmezlikli hastalarda, bilinen klasik kardiyovasküler risk faktörleri erken ateroskleroz gelişimini açıklamakta yetersiz kalmaktadır. SDBY'li hastalarda değiştirilebilir risk faktörlerinin etkin tedavisi ile KVH'ya bağlı morbidite ve mortalitede azalma sağlanabilir. Bu nedenle bu kişilerde erken ateroskleroz gelişimine etki eden faktörlerin ortaya konması ve tedavi edilmesi gerekmektedir.

Normal endotel bütün damar düz kaslarında bulunan, damar duvarını kaplayan ince bir squamoz epitel tabakasıdır (6). Endotelin birçok hastalıkdaki önemi 1980’de Furchgott ve Zawadzki’nin endotel kaynaklı bir vazodilatatör faktör olduğunu keşfetmesiyle anlaşıldı (7). Endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) ismindeki bu faktörün daha sonraları nitrik oksit (NO) olduğu gösterildi (8).

Hücrel adhezyon molekülleri (CAM), hücre yüzeyinde bulunan, hücrelerin birbirlerine ve ekstrasellüler matrikse bağlanmasını sağlayan protein moleküllüdür. Etkilerini reseptörleri üzerinden gerçekleştirirler (9). Vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM) 1 ve intersellüler adezyon molekülü (ICAM) 1 immünglobulin gen ailesinin üyeleridir ve endotel hücrelerinde bulunurlar. İnsan aterosklerozunda endotel hücreleri VCAM-1 ve ICAM-1 salgırlar. Aterogeneizde endotel hücrelerince yapılan VCAM-1 ve ICAM-1 belirmesi muhtemelen monosit kemotaksisinin önemli bir komponentidir. VCAM-1 ayrıca aterosklerozdaki immün reaksiyonda da rol oynar (10).

Asimetrik dimetilarginin (ADMA), esas olarak endojen nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörüdür. ADMA, nitrik oksit oluşum hızını düzenler. Vasküler tonus ve yapısının sürdürülmesinde temel rolü oynadığına dair çok miktarda kanıt bulunmaktadır. ‘Endojen anti-aterosklerotik molekül’ olarak bilinen nitrik oksit, major endotel kaynaklı vazodilatatör mediatörüdür. Dolayısıyla ADMA’nın endotel disfonksiyonu ile ilgili anahtar rolü oynayabileceği düşünülmektedir. Son yıllarda plazmada ADMA ‘nın artışı, hipertansiyon, hiperkolesterolemi, diabetes mellitus, sigara gibi koroner arter risk belirteçlerinden kabul edilmektedir (11,12).

NOS’un vücuttaki fonksiyonu, L-Arginin’den nitrik oksit sentezinin sağlanmasıdır (13). Vasküler endotelde gerçekleşen bu reaksiyonda ADMA, NOS aktivitesini inhibe ederek L-Argininin hücre içine alınımını engeller. Güçlü vazodilatatör etkisi olan nitrik oksit (NO); platelet agregasyonu, hücrel adhezyon, lökosit migrasyonu ve vasküler düz kas proliferasyonunu inhibe eder (14,15). NO’nun fonksiyonu; vasküler homeostazın sağlanmasıdır. Ortamda NO azaldığında, endotelial homeostaz vazokonstriksiyon lehine bozulur ve endotelial disfonksiyon başlar (16).

Çalışmamız, hemodiyaliz tedavisi gören hastaların yüksek koroner arter hastalığı riskine sahip olmasından yola çıkarak, hemodiyaliz tedavi süresinin buna etkisini araştırmak üzere planlanmıştır. Bu amaçla ateroskleroz morfolojisinde rol oynadığı gösterilmiş adezyon moleküllerinden İCAM-1 ve VCAM-1 düzeyleri ve endotelyal disfonksiyonun bir göstergesi olarak kabul edilen ADMA düzeyleri ile NO düzeyleri farklı sürelerde hemodiyaliz tedavisi alan hastalarda ölçüldü.

II. GENEL BİLGİLER

2.1. KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİ

Kronik böbrek yetersizliği ilerleyici bir böbrek hastalığı varlığında, böbreğin metabolik ve endokrin fonksiyonlarının kalıcı kaybı olarak tanımlanabilir (17). Üremik sendrom; kronik böbrek yetmezliğinin neden olduğu tüm klinik (kardiyovasküler, hemopoetik sistem, gastrointestinal, sinir sistemi, endokrin ve immün sisteme toksik etkileri) ve biyokimyasal anormallikler içeren bir deyimdir (18). Böbrek yetmezliğinin değişik evreleri tablo 2.1’de özetlenmiştir.

| Evre | Tanım | GFH (ml/dak./1.73 m ²) |
|------|--|------------------------------------|
| 1. | Normal veya ↑ GFH ile böbrek hasarı | ≥90 |
| 2. | Hafif ↓ GFH ile birlikte böbrek hasarı | 60-89 |
| 3. | Orta derecede ↓ GFH | 30-59 |
| 4. | Ağır derecede ↓ GFH | 15-29 |
| 5. | Böbrek yetmezliği (son dönem) | <15 |

Tablo 2.1. Kronik böbrek hastalığı evreleri, Glomerüler filtrasyon hızı (GFH).

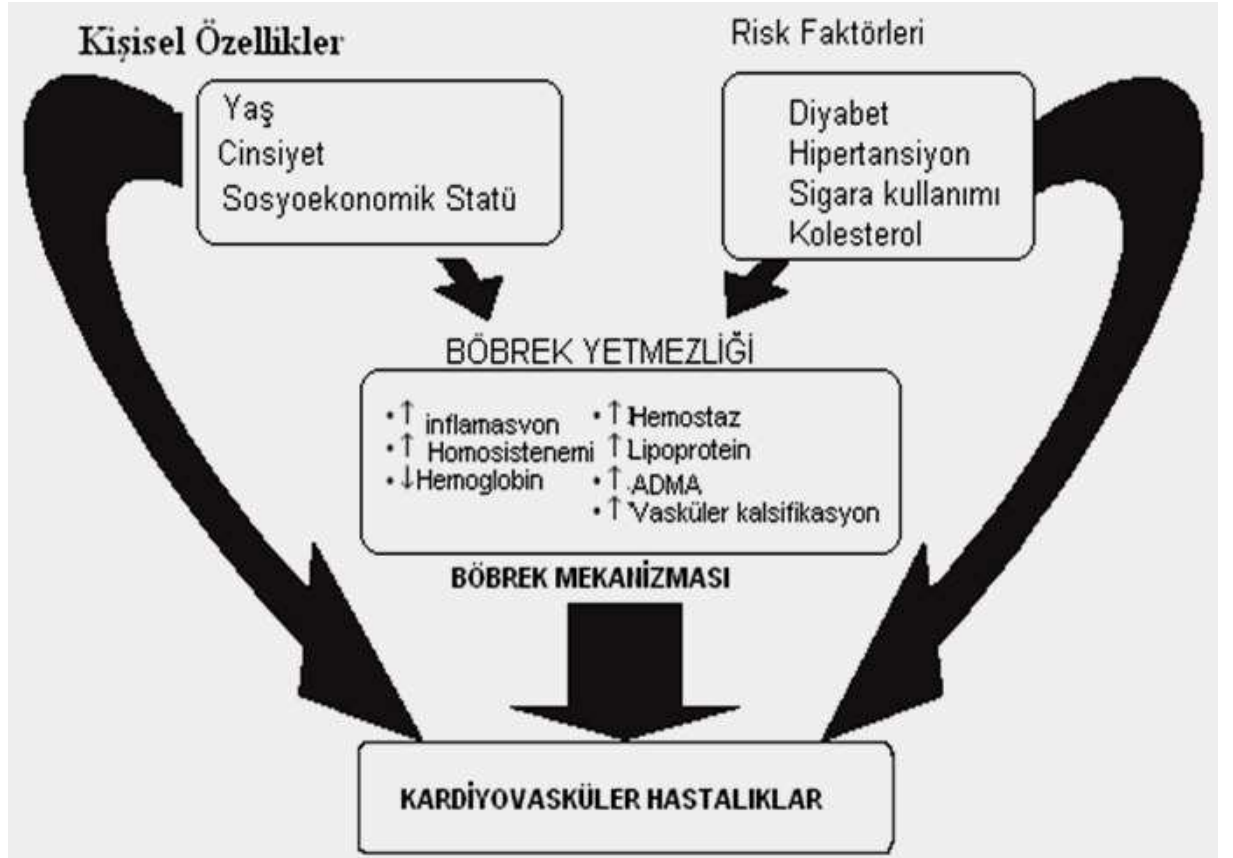
Son dönem böbrek yetmezliği ise böbrek fonksiyonlarının geriye dönüşümsüz kaybı ile karakterize ve hayatı tehdit eden üremiden korunmak için hastaya devamlı olarak diyaliz ve transplantasyon gibi renal replasman tedavilerinin (RRT) uygulandığı klinik bir tablodur.

KBY’nin henüz erken dönemlerinden itibaren miyokard infarktüsü (MI) sıklığı normal popülasyona göre yüksektir. Diyaliz öncesi kalp yetmezliği, koroner arter hastalığı (KAH) ve MI öyküsü olanlarda diyaliz tedavisi altındaki süreçte mortalite 2-3 kat artmaktadır. Bütün bu bulgular aslında KBY’li hastalarda erken evrelerden itibaren kardiyovasküler hastalık riskinin bulunduğunu ve renal replasman tedavileri ile de bu riskin devam ettiğini göstermektedir (19-21).

Bilinen başlıca risk faktörleri (yaş, sigara, HT vb.) yanı sıra KBY oluşumu ile ortaya çıkan hastalığa özgü risk faktörleri de KVH sıklığının daha belirgin artmasına neden olur. Bu risk faktörleri: sıvı fazlalığı, proteinüri, anemi,

hiperparatiroidizm, kalsiyum-fosfor metabolizmasındaki bozukluklar, oksidatif stres, malnutrisyon, inflamasyon, lipid metabolizma bozuklukları, hiperhomosisteinemi, üremik toksinler ve damar kalsifikasyonu şeklinde sıralanabilir (4,22). Fakat tüm bunlar bu hasta popülasyonundaki artmış kardiyovasküler riskin ancak bir kısmını izah edebilmektedir.

Son dönem böbrek yetmezlikli hastalarda, bilinen klasik kardiyovasküler risk faktörleri erken ateroskleroz gelişiminin izahında yetersiz kalmaktadır. SDBY'li hastalarda erken ateroskleroz gelişimine etki eden diğer faktörlerin ortaya konması gerekmektedir.



Şekil 2.1. Böbrek yetmezliği ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisi [23].

2.2. ATEROSKLEROZ

Ateroskleroz yaygın bir hastalık olup bütün orta ve büyük boy arterleri tutabilir. Günümüz bilgilerine göre, ateroskleroz belli genetik yapı ve riske sahip kişilerde çevresel risk faktörlerinin etkisiyle ortaya çıkan bir hastalıktır.

Son yirmi yılda yapılan çok sayıda epidemiyolojik çalışma ateroskleroza yol açan etkenleri tanımlamıştır. Bu risk faktörleri yaş, cinsiyet, hipertansiyon, sigara içimi diyabetes mellitus, obezite, hiperkolesterolemi, yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) kolesterolün düşük olması ve aile öyküsüdür. Gelişen aterosklerozda bu risk faktörleri dışında minör risk faktörleri adı altında toplanan ancak önemi major faktörler kadar kuvvetli kanıtlara dayandırılmayan faktörler de vardır. Bu faktörlerin asıl etkilerinin major faktörlere eğilim sağlayarak olduğu sanılmaktadır. Bu faktörler aktivite azlığı, hipertrigliseritemi ve stresli kişilik yapısı sayılabilir. Son zamanlarda yeni risk faktörleri arasında hiperhomosisteinemi, lipoprotein (a) yüksekliği, faktör VII yüksekliği ve enfeksiyöz ajanlar sayılmaktadır (24).

Çevresel ve genetik faktörlerin etkisiyle oluşan ateroskleroz gelişiminde üç evre vardır;

1. yağlı çizgi
2. fibröz plak
3. komplike lezyon

2.2.1. YAĞLI ÇİZGİ GELİŞİMİ

Bütün risk faktörlerinin etkilerini vasküler endotel üzerinden yaptıkları bilinmektedir. Vasküler endotel tüm damarların içini kaplayan tek sıra halinde kana geçirgen olmayan bir tabakadan oluşur. Endotel hücreleri son derece aktif bir organ olup, damar tonusu ve pıhtılaşmaya eğilim fonksiyonunu düzenleyici bir rol oynar.

Yapılan çalışmalar, hiperkolesterolemi, hiperhomosisteinemi, sigara yan ürünleri, biyomekanik güçlerde değişim ve hatta bazı enfeksiyonların endotel özelliklerini değiştirdikleri gözlenmiştir. Bütün bu dış etkenler endotel hücrelerinde bazı genleri aktive ederek bir inflamatuvar süreç başlatır. Endotel hücrelerinden bazı adezyon molekülleri [VCAM-1, ICAM-1, endotel orijinli

lökosit adezyon molekülü (ELAM-1) ve selektinler], büyüme faktörleri [PDGF, fibroblast büyüme faktörü (PGF), transforming büyüme faktörü (TGF), monosit koloni stimulan faktör (M-CSF), granülosit monosit koloni stimulan faktör (GM-CSF)] ile sitokinlerden interlökin 1 (IL-1), tümör nekroz faktör (TNF) 'ün ekspresyonu artar.

Bu salınan maddelerin etkisiyle, mononükleer hücreler endotele yapışır. Mononükleer hücrelerin üzerindeki çok geç aktive olan antijen-4 (VLA-4 integrin), VCAM-1'e bağlanınca adezyon sağlanır. Özellikle okside LDL ile yüklü monositler subendotelial bölgeye geçerek lipitten zengin aktive makrofajları oluştururlar. Aterosklerozun ilk lezyonu bu köpük hücrelerinden zengin yapı olup yağlı çizgi adını alır. Bu erken lezyon on yaşındaki çocukların otopsilerinde bile görülmüştür (24).

2.2.2. FİBRÖZ PLAK

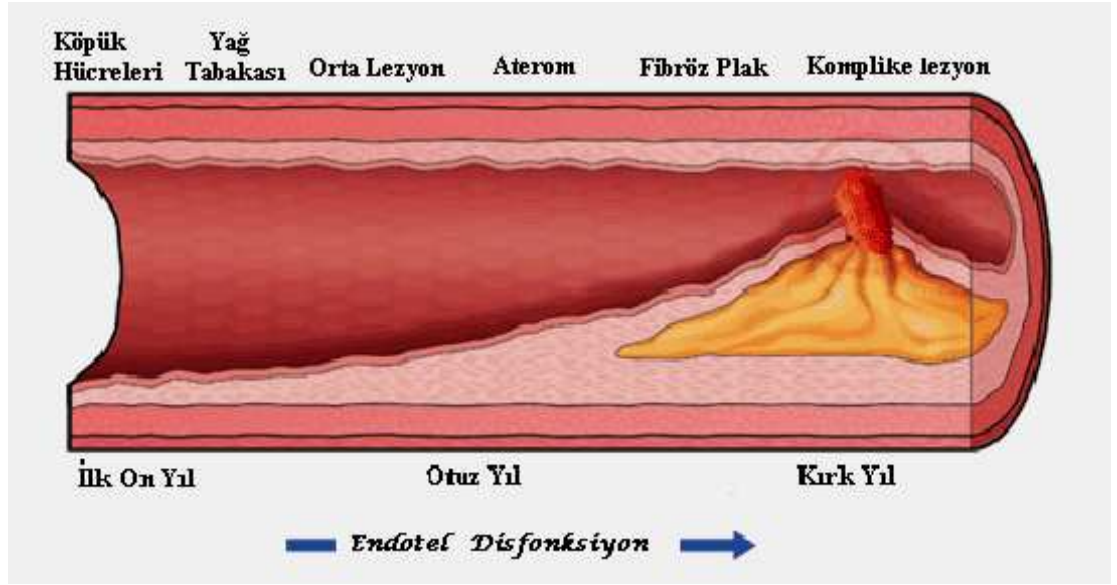
Zaman içerisinde risk faktörlerinin de devam etmesi ile bu subendotelial depolanma giderek artar. Kolesterolde zengin hale gelip büyüyen erken lezyona düz kas hücreleri de katılır. Normalde sağlıklı düz kas hücreleri kontraktıl özellik taşıır. Halbuki buradaki düz kas hücreleri sentezleyici özelliğe sahiptir.

Giderek artan bir ekstrasellüler matriks ve artan düz kas hücre ve lipid depolanması ile lezyon giderek büyür. Arter lümenini kısmen tıkamaya ve klinik olarak semptomların gelişmesine yol açmaya başlar. Asıl klinik olaylar bu aterosklerotik plağın rüptüre olması ile oluşur (24).

2.2.3. KOMPLİKE LEZYON

Aterosklerotik plak bir yandan dıştan mekanik stres ve risk faktörlerinin devam etmesi ile yıpranırken, öte yandan içten de yıpranır. Devam eden inflamatuvar süreç nedeniyle plak içi makrofajlar bazı matriks metaloproteinazlardan kollojenaz ve diğerleri plağın fibröz çatısını giderek yıpratırlar. Plağın fissüre veya rüptüre olması ile klinik olaylar ortaya çıkar. Plağın üstündeki endotel ayrılınca, subendotelial doku kan ile temasa geçer. Subendotelial doku, faktör VII ve lipoprotein(a) dan zengin olup trombojenik özelliktedir. Bu şekilde trombus oluşumu için bir uyarı ve trombüs gelişimi olur.

Oluşan trombüsün damar lümenini parsiyel veya tam olarak tıkaması ile de akut koroner sendromlar meydana gelir. Aterosklerotik lezyonların klinik olaylara yol açma potansiyeli plak içeriğine bağlıdır. Eğer plak lipidden zengin, inflamatuvar komponenti fazla ve düz kas çatısı ince ise rüptüre olmaya ve klinik olaylara yol açma eğilimi fazladır. Yoğun olarak risk faktörlerine sahip kişilerde genellikle plak içeriği bu tehlikeli özellikleri taşır (24).



Şekil 2.2. Endotel disfonksiyonu (25).

2.3. NİTRİK OKSİT

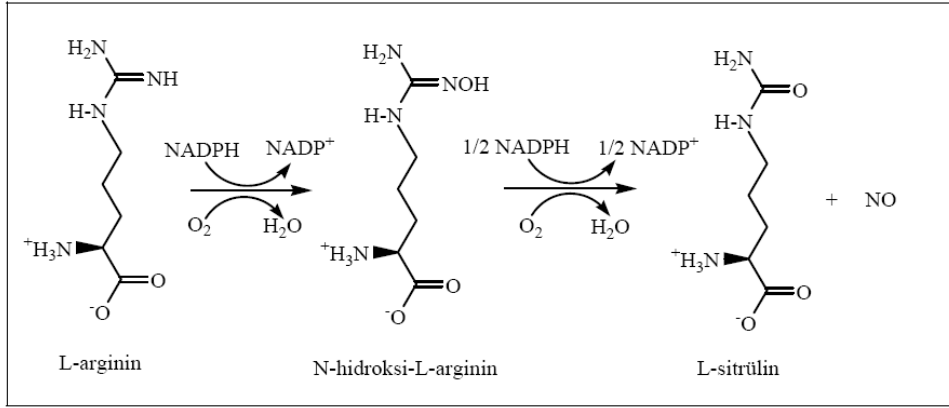
NO organizmanın büyük ve komplike enzimlerinden biri olan Nitrik oksit sentaz (NOS, EC 1.14.13.39) enziminin sentezlenmektedir (26). L-arjininin guanido grubundaki nitrojenin hidroksilasyonu ile sentez başlatılır. Sağlam damar endoteli, bazal bir hız ile sürekli NO oluşturur. Bu arada fizyolojik bir stimulus agonist olarak yanıtı artırabilir. Agonist etkisi ile intrasellüler Ca^{+2} artışı nitrik oksit sentazı (NOS) aktive eder ve L-Arjinin aminoasidinden sitrüllin ile birlikte sentezlenen NO, endotel hücrelerinden düz kas hücrelerine difüze olur. Düz kaslarda NO çözünür guanilat siklazı aktive ederek cGMP' yi artırır. Endotel Kaynaklı Serbestleştirici Faktör (EDRF) ile yapılan çalışmalarda, bu maddenin cGMP üzerindeki etkisinin NO' e benzer şekilde ortaya çıktığını vurgulamaktadır. Bu benzerlikler arasında EDRF'nin farmakolojik davranışı ve asidifiye NO_2 ' den NO üretilmesi EDRF'nin NO olabileceğini düşündürmüştür (27).

Bugün için EDRF'nin tam olarak tanımlanamayan birçok vasodilatör madde içerdiği, bunlardan predominant olanın NO olduğu bilinmektedir. Nitrik oksit için tek kaynak endotel değildir, intimada nötrofil ve monositler tarafından da üretildiği bilinmektedir. Nitrik oksit oldukça toksik bir madde olup sitotoksik özelliği de vardır. Hücreler için toksik olan bu maddenin hücre tarafından üretildiği, dokularda NO tayinleri yapılarak kanıtlanmıştır. NO'in organizmada düzenleyici bir molekül olarak görev yapmasına ek olarak, bir dizi patolojik olayda da rolü vardır. Yani NO, hem sitoprotektif hem de sitotoksik etkilidir (28,29).

2.3.1. NİTRİK OKSİTİN BİYOSENTEZİ

Nitrik oksit, sitokrom P-450 redüktaz homologu ve nitrik oksit sentaz olarak adlandırılan enzimlerce arjininin substrat olarak kullanıldığı reaksiyon sonucu meydana gelir. Sitokrom P-450 benzeri enzim, muhtemelen sisteinin aksiyel ferrik ligandı olduğu demir protoporfirin 9 içerir. L-arjininden NO oluşturan enzimler NOS izoenzimleri olarak bilinmektedir (30).

Reaksiyon sonucu oluşan NO gaz yapısında olduğu için hızla çevre hücrelere diffüze olabilir ve etkisini yok edilene kadar sürdürebilir. Fazla miktarda oluşumu dokular için toksik olduğundan hızla etkisiz hale getirilir. Kan içine salınan NO'nun büyük kısmı esas olarak eritrositler tarafından metabolize edilir. Hemoglobin ve myoglobine bağlanan NO nitrit(NO₂) ve nitrat (NO₃) olarak atılır (31,32). NO'nun yarı ömrü büyük değişiklik göstermektedir. Bu değişkenlik, dokuların taşıdığı oksijenli bileşiklerin oranındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. NO'in gerçekleştirdiği bu reaksiyonlara bağlı olarak yarı ömrü yaklaşık 10-30 sn'dir (33).



Şekil 2.3.1. Nitrik oksit biyosentezi (34)

2.3.2. NİTRİK OKSİT SENTAZ İZOENZİMLERİ

Nitrik oksit sentazın üç farklı izoenzimi bulunmaktadır:

a) Nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS): İlk olarak sinir dokusunda bulunmuştur. Yapısal olarak tanımlanabilmiştir ve kalsiyuma bağımlıdır.

b) Endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS): İlk olarak vasküler endotel hücrelerinde tanımlanmıştır yapısal olarak kalsiyuma bağımlıdır.

c) İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS): İlk olarak endotoksinler ve sitotoksinler aracılığıyla karaciğer hücreleri ve makrofajlarda uyarılan bir enzim olarak tanımlanmıştır. Bu izoform fizyolojik şartlarda kalsiyuma bağlı değildir. Nedeni ise kalmoduline çok sıkı bağlanmış olmasıdır.

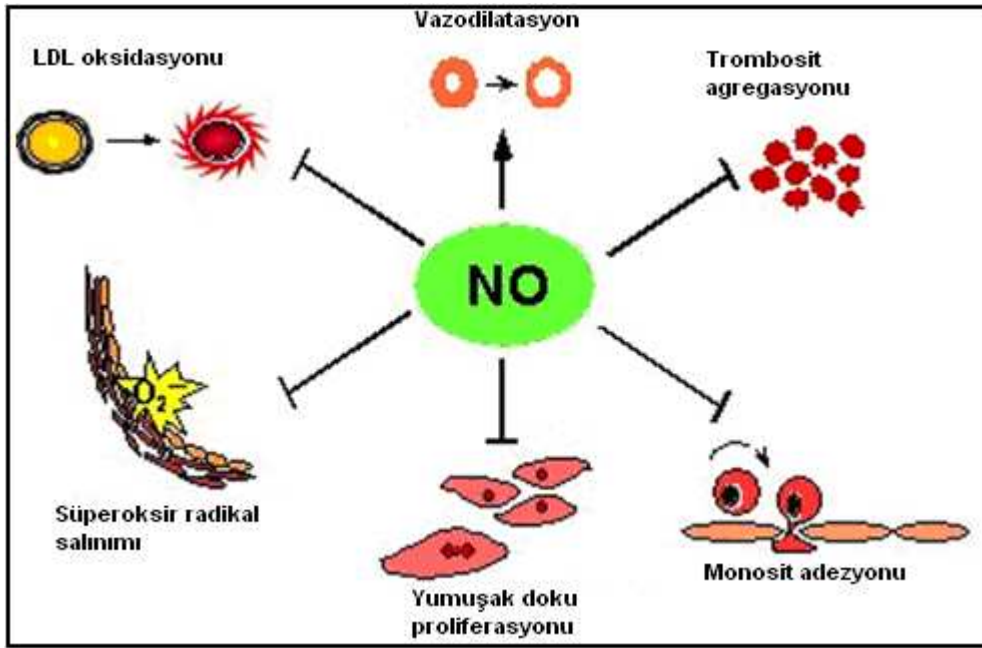
Son zamanlarda her üç izoenzimin değişik hücrelerde bulunabildiği ve uyarılabildiği gösterilmiştir. Örneğin; eNOS endotel hücreleri, nöronlar, barsak interstisyel hücrelerinde bulunabilir. eNOS ve nNOS aktivasyonu Ca²⁺ / kalmodulin bağımlıdır, iNOS aktivasyonu ise transkripsiyonel indüksiyon yolu ile etkilidir (35).

2.3.3. NİTRİK OKSİTİN BİYOLOJİK ETKİLERİ

Biyolojik yarı ömrü saniyeler düzeyinde olan NO, insan fizyolojisi ve fizyopatolojisinde önemli bir yere sahiptir ve rol oynadığı olaylardan bazıları aşağıda özetlenmiştir;

- Trombosit adezyon ve agregasyonunda inhibisyon
- Vasküler düz kas relaksasyonu ile vasodilatasyon
- Santral sinir sistemi ve periferik sinir sisteminde nörotransmitter

- Endotel hücresi ve vasküler düz kas hücresinde antiproliferatif etki
- doku plazminojen aktivatörü (tPA) artışı ve fibrinolizis
- Düşük konsantrasyonda eritrosit deformasyonunda artış
- İmmunomodülatör
- NADPH oksidaz inhibisyonu ile lökosit adezyon inhibisyonu
- Makrofaj aracılı nonspesifik immun yanıt
- Antimikrobiyal (sitotoksik)
- Antitümör (35).

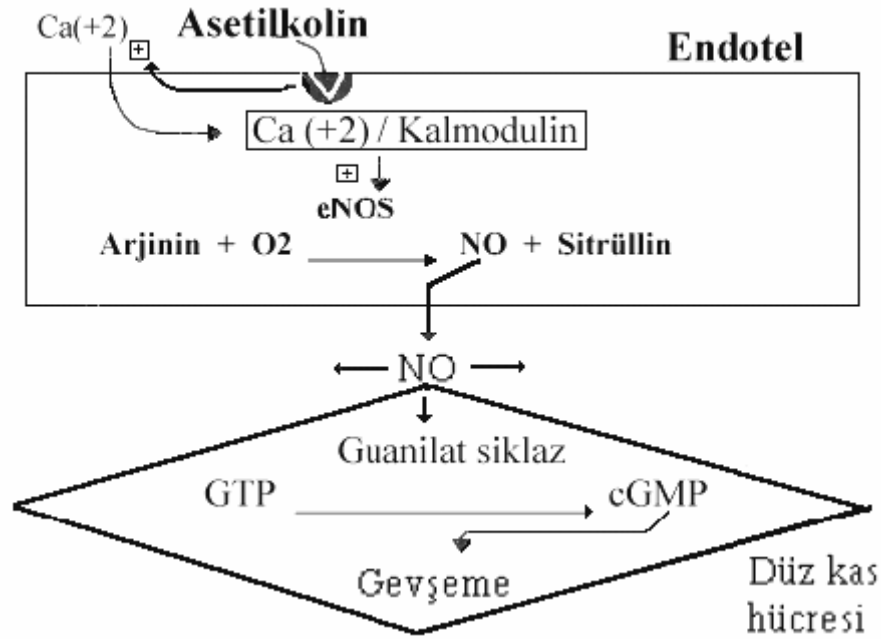


Şekil 2.3.3. Nitrik oksitin etkileri (36).

2.3.4. ENDOTEL HÜCRESİ VE NİTRİK OKSİT

NO'nun sağlam kan damarlarında fiziksel, kimyasal ve hormonal uyarıcılara karşı EDRF aracılıklı vazodilatasyon oluşturarak vasküler tonus regülatörü olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (37). Asetilkolin, bradikinin, 5-hidroksitriptamin ve ayrıca hipoksi gibi etkenler, Ca^{+2} / kalmodulin sistemi aracılığı ile endoteldeki NOS'u uyararak NO oluştururlar. Endotelde oluşan NO, diffüzyon yolu ile düz kas hücresine geçer ve sitoplazmik guanilat siklaz enzimini uyararak GTP'den cGMP oluşturur. Oluşan cGMP kalsiyum düzeylerini azaltarak düz kaslarda relaksasyon ile vazodilatasyona neden olur (38).

NO; trombositler, makrofajlar ve düz kas hücrelerinde de üretilebilirse de lokal olarak başlıca endotelyumda ve sinir hücrelerinde üretilmektedir. Sonuç olarak; endotelyumun yalnızca kan ile dokular arasında madde alışverişinin yapıldığı nontrombojenik bir bariyer olmayıp aynı zamanda güçlü vazoaaktif, antikoagülan ve fibrinolitik maddeler üreten, vücudun en büyük ve en aktif parakrin organı olduğu anlaşılmıştır. Bugün endotelyumun yapısal ve işlevsel bozukluklarının koroner damar hastalıklarını da kapsamak üzere birçok vasküler hastalığın patogenezinde önemli roller oynadığına inanılmaktadır (38).



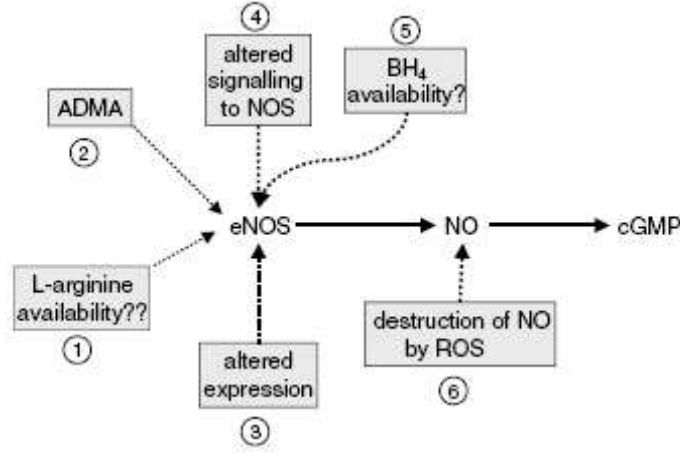
Şekil 2.3.4. NO nun endotelden salınımı (39).

2.3.5. NİTRİK OKSİT SENTEZİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Arjinin NO sentezinde substrat olarak kullanıldığından dolayı arjinin plazma konsantrasyonlarının yeterli düzeyde olması optimal enzim aktivitesi için gereklidir. Arjinden NO oluşumu çeşitli arjinin analogları tarafından inhibe edilir. Bu analoglar artmış trombüs formasyonu ve aterogenezden sorumludur.

ADMA ve Nmonometil L-Arjinin (L-NMMA) en önemli iki arjinin analogudur. ADMA proteinlerdeki arjininlerin metilasyonu sonucu meydana gelir ve hipertansiyon ve hiperkolesterolemi gibi akut koroner olaylar için güçlü bir prediktördür. BH_4 NOS'un kofaktörüdür, eNOS ve normal endotel fonksiyonu için gereklidir. Yapılan çalışmalara göre BH_4 azlığı endotel fonksiyonunda

bozulmalara yol açar, kısa dönem BH₄ tedavisi sonrası fonksiyonlar normale döner. Ayrıca serbest oksijen radikalleri NO'nun yapısında bozulmalara neden olarak fonksiyon görmesine engel olabilir (40).



Şekil 2.3.5. NO biyoyararlanımının azalmasına sebep olabilen faktörler (40).

2.4. METİL ARJİNİNLER

2.4.1. METİL ARJİNİNLERİN OLUŞUMU VE ÇEŞİTLERİ

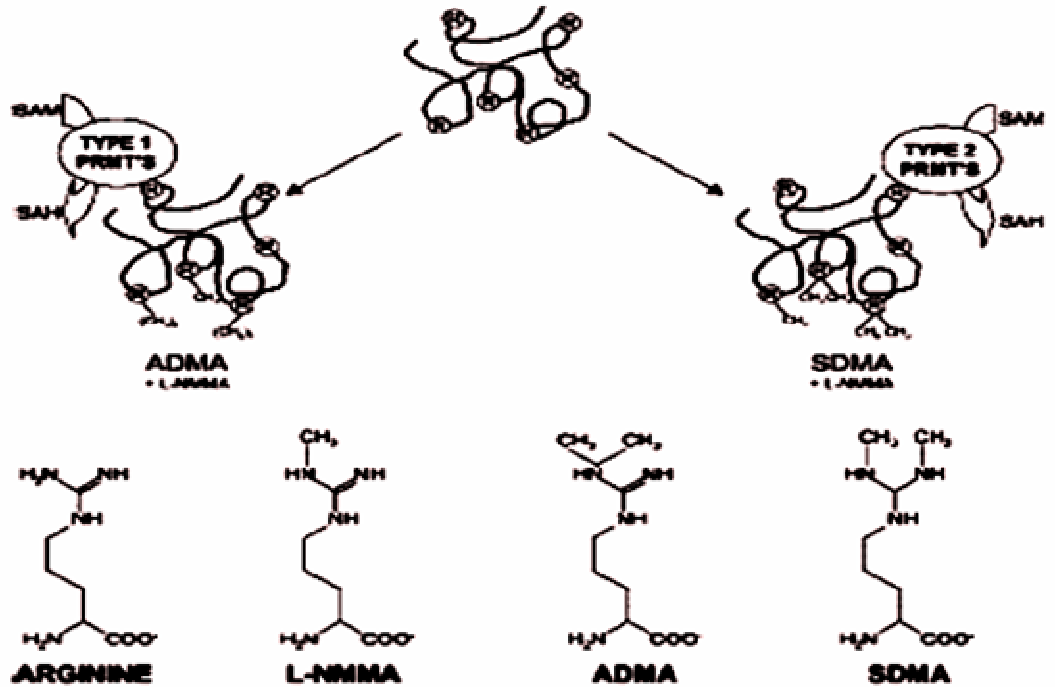
Metil arjininler, proteinlerde bulunan arjinin rezidülerinin metilasyonu sonucu oluşurlar. Bu proteinler yaygın olarak nükleusta bulunurlar. Protein-arjinin metilasyonu, proteinlerin içindeki arjininin guanidino azotuna 1 veya 2 metil gruplarını aktaran bir posttranslasyonel modifikasyondur (40,41).

İnsanlarda protein-arjinin metilasyonu protein arjinin metil transferazlar (PRMT) tarafından gerçekleştirilir. PRMT'nin iki geniş tipi vardır, insanlarda PRMT aktivitesi gösteren 9 adet PRMT vardır. PRMT 5,7,9 PRMT II olarak diğer PRMT'ler PRMT I olarak bilinir (42). Tip I PRMT en çok rastlanan PRMT'dir, çok sayıda proteine spesifik farklı tipleri vardır. Kardiovasküler sistemde kalp, düz kas hücreleri ve endotel hücrelerde ekspresyon edilir. Ekspresyon paterni hakkında ayrıntılı bilgi olmamakla birlikte PRMT I'in bütün tipleri (1,3,4 ve 6) vasküler hücrelerde ekspresyon edilir. PRMT I ekspresyonu LDL ile artırılmaktadır. Tip I PRMT aktivitesi sonucu oluşan ürün asimetrik dimetil arjinin ve N-monometil L-Arjinindir. NOS'u inhibe edebilme özelliği vardır. Artan LDL ile birlikte artmış tip I PRMT ekspresyonu ile ADMA düzeylerinin LDL ile

pozitif korelasyonu olduğu gözlemlenmiştir. Endotelial hücre kültürlerinde LDL, oxLDL konsantrasyonu artışı PRMT gen ekspresyonu artışına neden olur (43).

Tip II PRMT simetrik dimetilarjinin (SDMA) oluşumunda rol oynar. SDMA'nın NOS'u inhibe etme özelliği yoktur. Proteinler hidrolize uğradığında onların metillenmiş arjinin rezidüleri serbest kalır, metillenmiş arjininler idrarla atılır. Renal yetmezlik hastalarında metillenmiş arjininler idrarla atılamaz seviyeleri yükselir. Metil arjininler böbrekte dimetilarjinin metil transferaz, karaciğerde asetilasyonla metabolize edilir.

PRMT'ler protein metilasyonunda metil vericisi olarak S-Adenozil Metionini (SAM) kullanır. SAM artışı PRMT aktivasyonunu artırırken, S-Adenozil Homosistein (SAH) artışı PRMT'yi inhibe eder (44). PRMT'ler yoluyla proteinlerin metilasyonu ve oluşan metil arjinin türevleri şekil 2.4.1'de gösterilmektedir.



Şekil 2.4.1. Arjinin ve metil arjinin türevleri ve oluşumları (43).

ADMA metillenmiş arjinin rezidüleri içeren proteinlerin katabolizması sonucu meydana gelir. Hücrel proteinlerin arjinin metilasyonu PRMT'ler tarafından katalize edilir (45).

2.4.2. ASİMETRİK DİMETİL ARJİNİN

Asimetrik N_G, N_G dimetilarjinin, L-Arjininin guanidino analogu; endojen olarak sentezlenen, proteinlerdeki arjinin rezidülerinin protein arjinin metil transferazlarıyla (PRMT I) metillenmesiyle meydana gelen bir türev aminoasittir. ADMA NOS'un endojen inhibitörü iken SDMA'nın NOS enzimi üzerine inaktive edici etkisi yoktur fakat arjinin ve ADMA ile hücre giriş yolunu etkileyerek NO üretim hızında dolaylı yoldan etkisi vardır (46). 3 adet metilarjinin (ADMA, SDMA ve L-NMMA) Y taşıyıcı protein adı verilen katyonik aminoasit taşıyıcıları aracılığıyla endotel hücrelerin içine girerler. Metil arjininler birbirleriyle ve arjinin aminoasidi ile hücre içine giriş için yarışır. Yüksek konsantrasyondaki ADMA, L- Arjininin hücre içine transportunu engeller. Sonuç olarak NO sentezi azalır (46).

ADMA kan basıncını yükseltir, vazokonstrüksiyona neden olur, endotel bağımlı relaksasyonu bozar, endotel hücre adhezivitesini artırır. Kardiyak outputu azalır. Uzamış NOS inhibisyonu sonucu olarak sol ventrikül hipertrofi gelişir. Böbrek yetmezliğinde ADMA birikimi olur. Plazma ADMA seviyeleri ile endotel disfonksiyonu arasında ilişki vardır. Hemodiyaliz hastalarında gelişen endotel disfonksiyon kardiyovasküler olaylar ve mortaliteden sorumlu faktörlerden biriside ADMA dır (46).

Endotel kaynaklı NO endotel fonksiyonlarının sürdürülmesinde önemlidir. NO'nun vazodilatasyon, antitrombotik proses ve inflamasyonun kontrolünde kritik rolleri vardır. NO biosentezinin bozulması endotel fonksiyonunun bozulmasıyla beraber çok sayıda vasküler hadiseyle birlikte. ADMA arjininden NO sentezini kompetitif olarak inhibe eder. ADMA endotel fonksiyon bozukluğundan sorumlu faktörlerden birisidir. ADMA yüksekliği ve endotel fonksiyon bozukluğu ile seyreden çeşitli klinik durumlar; konjestif kalp yetmezliği, diyabet, insulin rezistansı, hipertansiyon, hiperhomosisteinemi, son

dönem böbrek yetmezliği olup bu hastalıklarda akut vasküler olaylar sonucu ölüm sık görülür (46).

2.4.2.1. ADMA METABOLİZMASI

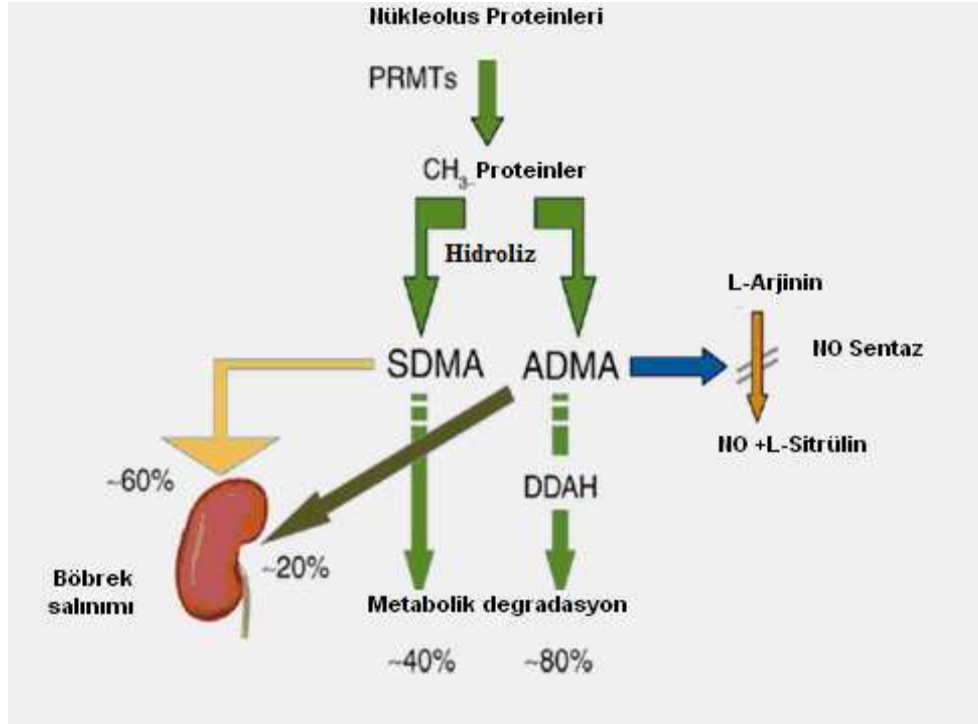
Metilarjininlerin bir kısmı renal yolla atılır. Bununla birlikte SDMA tamamıyla renal yolla atılır fakat ADMA ve L-NMMA yaygın olarak metabolize edilir. En önemli metabolik yol dimetilarjinin dimetil amino hidrolaz (DDAH) enzimiyle sitrülün ve dimetilamine yıkılmasıdır (47,48).

DDAH, ADMA seviyelerini regüle etmede önemli rol oynar. SDMA intravenöz olarak enjekte edilirse %60 oranında idrara çıkar, fakat ADMA intravenöz olarak enjekte edildikten sonra %5 oranında idrara çıkar. Bu nedenle renal yetmezlikte SDMA ADMA'ya göre plazmada çok daha yüksek seviyelerde bulunur. Yapılan araştırmalar ADMA'nın DDAH için substrat olduğunu, SDMA'nın olmadığını göstermiştir. ADMA'nın SDMA'ya göre yaygın bir metabolizmasının olduğu gösterilmiştir (13).

DDAH iki izofomdan oluşur her ikisi de vasküler endotelyumdan eksprese edilir. İnsanları da kapsayan gelişmiş organizmalarda DDAH enziminin 2 izoformu tanımlanmıştır. DDAH 1'i kodlayan gen 1. kromozomda lokalize olmuş iken DDAH 2'yi kodlayan gen 6. kromozomda lokalizedir. Bu izoformlar farklı doku dağılımları göstermelerine rağmen aktiviteleri benzerdir. DDAH 1 ekspresyonu ile nöral NOS arasında, DDAH 2 ile endotelyal NOS (eNOS) arasında ilişki vardır fakat NOS eksprese eden doku ve hücrelerde DDAH'lar fazlaca eksprese edilmesine rağmen bu doku ve hücrelerle sınırlı değildir. Her iki izoform da kardiovasküler sistemde identifiye edilmesine rağmen muhtemelen DDAH 2 ekspresyonu çok daha fazladır (49,50).

Bazı araştırmacılar çalışmalarında hipoksiye maruz bırakılan domuzlarda DDAH aktivitesinin baskılandığını göstermişlerdir. DDAH 1 ve DDAH 2 farklı doku dağılımları göstermektedir. DDAH 2 aktivitesi ve ekspresyonu yeni doğanların primer pulmoner hipertansiyonunda azalmıştır. Bu da bu hastalarda NOS aktivitesinin azalmasını ve ADMA seviyelerinin yükselmesini açıklamaktadır (51).

Endotelial hücre kültürlerinde DDAH'ın selektif inhibisyonu nitrik oksit sentezinde azalmaya yol açar. Ortamın arjinin muhtevasının artırılması bu durumu tersine çevirebilir (52). PRMT'ler yoluyla ADMA oluşumu ve atılım yolları şekil 2.4.2.1'de gösterilmektedir.



Şekil 2.4.2.1. ADMA metabolizması (53).

2.4.2.2. ADMA İLE İLİŞKİLİ HASTALIKLAR

2.4.2.2.1. RENAL HASTALIKLAR

Son dönem böbrek yetmezliği olan hastalarda yapılan çalışmalarda ADMA düzeyleri yüksek olarak bulunmuştur. Böbrek yetmezliği olan hastalarda biriken ADMA miktarı ile gelişen endotel disfonksiyonu arasında ilişki gösterilmiştir. Plazma ADMA konsantrasyonlarının, renal hastalığın erken dönemlerinde arttığı bulunmuştur ve böbreğin kendisi ADMA metabolizmasında önemli bir organ gibi görünmektedir (54-56). Aynı zamanda kandaki artmış ADMA seviyesinin kronik böbrek hastalığının ilerlemesine katkıda bulunduğu önerilmiş, fakat şimdiye kadar sadece deneysel verilerin varlığı bu hipotezi desteklemiştir (57).

İnsanlarda günde yaklaşık 300 µmol ADMA oluşturulmakta, bunun da yaklaşık 250 µmol'ü DDAH tarafından metabolize edilmekte ve çok az kısmı da böbrekler tarafından değiştirilmeden atılmaktadır (58). DDAH ve NOS' un renal tübüler hücrelerde ve glomeruluslardaki endotelial hücrelerde ko-lokalle olduğu bulgusu intrasellüler ADMA konsantrasyonunun böbreklerdeki NO oluşturan endotelial hücreler tarafından regüle edildiği hipotezini desteklemektedir (55).

Bu nedenle DDAH-zengin renal dokunun hasarı ADMA degradasyonunu bozabilir. Yapılan çalışmalarda ADMA'nın dolaşımdan major uzaklaştırıcı bölgenin böbrekler olduğu gösterilmiştir.

Hemodiyaliz hastalarında gelişen endotel disfonksiyonu, kardiyovasküler olaylar ve mortalitede ADMA'nın sorumlu faktörlerden birisi olabileceği ileri sürülmektedir. Hemodiyaliz ile ADMA'nın vücuttan uzaklaştırılabildiği fakat hemodiyaliz sonrası hemen yüksek değerlere geri döndüğü gösterilmiştir (46).

2.4.2.2.2. DİYABET

Tip 1 ve Tip 2 diyabette yapılan hayvan çalışmalarında ve aşikar Tip 2 diyabetli veya insulin rezistansı olan hastalarda yükselmiş ADMA seviyeleri bulunmuştur (59,60). Kronik vasküler komplikasyonlar diyabetli hastalarda ana morbidite ve mortalite sebeplerindedir. Artan kanıtlar göstermiştir ki NOS inhibitörü ADMA diyabetle yakından ilişkilidir. Ayrıca serum ADMA düzeyi yükselişi makroanjyopatisi olan hastalarda olmayanlara göre çok daha belirgin olarak bulunmuştur (61). Yapılan çalışmalarda insulin rezistansı ile ADMA seviyeleri arasında kuvvetli bir ilişki olabileceği gösterilmiştir (62). Yine yapılan çalışmalarda glukozun kendisinin DDAH aktivitesini baskılayabileceği sonucuna varılmıştır (63).

2.4.2.2.3. KARDİYOVASKÜLER HASTALIKLAR

Arjininden NO oluşumu ADMA gibi çeşitli arjinin analogları tarafından inhibe edilir. Bu analoglar trombüs oluşumu ve ateroskleroza sebep olabilir. Akut koroner sendromlu olgularda yapılan çalışmalarda ADMA seviyeleri yüksek olarak bulunmuştur, bu hastaların medikal tedavi sonrası ADMA seviyelerinin azaldığı gözlenmiştir (64).

ADMA seviyeleri kalp yetmezliği olan hastalarda da artar. ADMA'nın ventrikül kontraksiyonu ve kalp hızını azaltma kapasitesi vardır. ADMA'nın kardiyak fonksiyondaki rolü ve kalp yetmezliğindeki endotel fonksiyonundaki rolü tam aydınlatılamamıştır (46).

Yüksek ADMA düzeylerinin kardiyovasküler olay insidansının artması yanında konsantrik sol ventriküler hipertrofi ve güçlü kardiyovasküler risk markırı olan karotid arter intima media kalınlığının artması ile de kuvvetli bir ilişki gösterdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (65,66). Plazma ADMA konsantrasyonları klinik aşıkar aterosklerozu olanlarda olmayanlara göre yüksek olarak bulunmuştur (67).

Kardiyovasküler patolojinin bir tedavi yoluda artmış ADMA'nın etkilerini ortadan kaldırmak veya ADMA seviyelerini azaltmaktır. Teorik olarak arjinin ADMA'nın yerini alabilir, NOS aktivitesini tamir edebilir. Arjininin hiperkolesterolemili hastalarda endotel disfonksiyonunu ve periferel vasküler hastalığı olan hastalarda yürüme zorluğunu düzelttiği gözlenmiştir. Bu hastalarda ADMA düzeylerini azaltmada diğer bir alternatif yol ise DDAH ekspresyonunu veya aktivitesini artırmaktır (68).

2.5. HÜCRE ADEZYON MOLEKÜLLERİ

Adezyon molekülleri, hücrelerin özgül olarak dokulara yönlennemelerinde, birbirlerini tanımalarında, embriyogenez, hücre büyümesi, hücre farklılaşması ve inflamasyon gibi olguların düzenlenmesinde görev alırlar(69,70). Hücre adezyon molekülleri (Cell adhesion molecules- CAM), bir hücrenin başka bir hücre veya ekstrasellüler matriksle ilişkisini sağlayan membran bağımlı proteinlerdir. Bu proteinler, hücrede transmembranöz olarak yer alırlar. Adezyon sırasında moleküllerin sayısı veya afiniteleri artar. Adezyon molekülleri ya hücre içinde granüller halinde depo edilip gerektiği zaman hızlıca hücre membranında yerini alır veya hücreler tarafından yeni baştan sentezlenirler. Bu moleküller kanser gelişmesinde, lökosit migrasyonunda, embriyonal gelişimde, endotel hasarında ve enflamasyonda da rol oynarlar (71,72).

Hücre adezyon molekülleri dört ana grupta incelenir. Bunlar Kaderinler, İntegrinler, selektinler ve İmmünglobulin Süper ailesidir. Bu moleküllerin hemen

hepsi transmembran glikoproteinleridir. Kaderinler, integrinler ve selektinler Ca^{+2} bağımlı sisteme dahil moleküllerdir. İmmunglobülin süperaillesinden olanlar ise Ca^{+2} bağımsız sisteme dahildirler (73).

2.5.1. KADERİNLER

Kaderinler, moleküler ağırlıkları 120-140 kDa arasında değişen yapı ve fonksiyonları açısından Ca^{+2} 'a bağımlı transmembran proteinlerdir (74). Kaderinler, herbirinde 1 ile 3 arasında Ca^{+2} bağlama alanları içeren 3-5 homolog polipeptit tekrarları içerirler ve sadece kendine benzer moleküllerle yani homofilik olarak bağlanırlar(73).

Ca^{+2} bağımlı sisteme dahil, hücre-hücre adezyonunda yer alan, embriyoda doku farklılaşmasından erişkinde seçici hücre tanınmasından ve tüm yaşam boyunca normal doku mimarisinden sorumlu transmembran glikoproteinleridir (75). Kaderinler, E- kaderin, P-kaderin ve N-kaderin olmak üzere üç alt gruba ayrılır. E-kaderin epitel hücreleri üzerinde bulunur, bunların kaybolması normal hücre-hücre bütünlüğünün bozulmasına sebep olur. P- kaderin plasenta ve epitelde, N-kaderin ise nöronlarda ve lenste bulunur. Nöronların gelişiminde rol oynarlar.

2.5.2. İNTEGRİNLER

Bir hücrenin ekstrasellüler matrikse ve bazal membrana bağlanabilmesi için hücre iskeletini buraya bağlayacak moleküllere ihtiyacı vardır. İntegrinler ekstrasellüler matriks proteinlerinden olan fibronektin, laminin ve kollajene bağlanan bu transmembran proteinleridir (76). İntegrinler de Ca^{+2} bağımlı sisteme dahildirler. Hücrelerin bazal membran ve ekstrasellüler matrikse bağlanmasında ve migrasyonlarında hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerine aracılık eden adezyon moleküllerindedir. İntegrinler insan vücudunda ki hemen tüm hücrelerde bulunurlar ve embriyo gelişmesinden savunma mekanizmalarına kadar birçok fizyolojik olayda rol alırlar (77).

İntegrinlerin birçok alt tipi vardır. Birbirine non-kovalent bağlarla bağlı α ve β alt ünitelerinden oluşmuş heterodimerik yapıda plazma membran glikoproteinleridir. α alt ünitesi, birbirinden farklı α_1 ve α_2 alt ünitelerinin disülfid

köprüleriyle birbirlerine bağlı ağır ve hafif zincirlerinden oluşur (73). Yirmiye yakın α ve ondan fazla β alt tipi tanımlanmıştır ve bunların değişik kombinasyonlarla oluşturduğu yirmiden fazla çeşide ayrılırlar (73).

β -integrinler; kollajen, fibronektin, laminin, vitronektin, von Willebrand faktör ve trombospondin gibi ekstrasellüler matriks proteinleri için birer reseptör yani bağlanma noktalarıdır ve geç aktive olurlar. Yine bir başka bir integrin very late antijen-4 (VLA-4) ve lenfosit-peyer plak adezyon molekülü-1 (LPAM-1) integrinleri bir başka hücredeki VCAM-1 için; lökosit fonksiyon antijen-1 (LFA-1) ve Mac1-integrinler de ICAM-1-3 için ligand görevi görürler ve çeşitli hücrelerin endotele yapışmasına aracılık eder. β 2-integrinler lökosit integrinleridir. β 3-integrinler endotel hücrelerindeki vitronektin ve trombositlerdeki reseptörleri oluşturular. Bazı tümör tiplerinin invazyonunda integrinlerin bir kısmının azaldığının görülmesi, tümör invazyonunda da rolleri olabileceğini düşündürmüştür. İntegrinlerin önemli bir özelliği de inaktif olarak kalabilmeleri ve gerektiğinde aktifleşebilmeleridir (78).

Kaderinler, homofilik bağlantılarla sadece kaderinlerle bağlanmalarına karşı, integrinler heterofilik bağlantılar yaparlar. Dolaşımdaki lökositlerin damar endoteline tutunup yapışmasına ve inflamasyon alanlarına göçüne aracılık ederler. Timusta progenitör T hücrelerinin yuvalanmasını, kemik iliğinde ise T ve B hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlarlar. Ayrıca, ekstrasellüler sinyallerle haberleşmeye de katkıda bulunurlar.

Hücreler büyümek ve farklılaşmak için bir substrata bağlanmaya ihtiyaç duyarlar, bağlanamazlarsa apoptozise giderler. Bu bağlanmada ana rolü integrinler üstlenmektedir (69).

2.5.3. SELEKTİNLER

Selektinler lektin-benzeri küçük bir adezyon molekül ailesidir (79). Selektinler üç bölge içerir; en dışta N-terminal Ca^{+2} bağımlı karbonhidrat tanıma bölgesi, epidermal büyüme faktörü (EGF) benzeri bir bölge ve C-reaktif protein (CRP) benzeri bir bölge (75). Diğer adezyon molekülleri proteinlere bağlanmasına rağmen; selektinler, lökositlerin ve endotel hücrelerinin üzerindeki karbonhidrat olan ligandlarıyla birleşirler. Heterofilik bağlantı kurarlar ve hücre-

hücre adezyonunda rol alırlar (79). İntegrinlerle bağlantı kurarlar. Selektinler glikolipidler ve glikoproteinler üzerindeki oligosakkaritlere bağlanırken, integrinler spesifik proteinlere bağlanırlar.

Selektinler integrinlere göre daha zayıf bağlantı yaparlar. Bu da lökositlerin kan akımıyla yuvarlanmasına neden olur. Bu yuvarlanma integrinler ve İmmüoglobulin süperailisi ile karşılaşınca kadar devam eder. Bunlarla karşılaştığında güçlü adezyon olduğu için artık damar dışına çıkmaya başlarlar (76).

Vasküler ve hematolojik sistemde kan hücreleriyle endotel hücreleri arasındaki bağlantılarda yer alırlar. Damar duvarına tutunma ve yuvarlanma sırasında inflamatuvar hücrelerin vasküler endotele adezyonunda ve lenfositlerin yüksek endotelli venüller boyunca yuvarlanmasına katkıda bulunurlar (80).

Bu küçük ailenin üç üyesi vardır. Bunlar Endoteliyal (E)-selektin, Lökosit (L)-selektin ve Platelet (P)-selektin'dir. Selektinlerin her üç elemanı da lökositlerin endotele zayıf olarak yapışmasına ve yuvarlanmasına neden olarak onların damar dışına çıkması için ilk şartı yerine getirmiş olurlar. Kardiyak iskemide yapılan çalışmalarda, selektinlere özel monoklonal antikolarla bu moleküllerin baskılanması sonucu nekrozun önlendiği görülmüştür (81). Sonuç olarak, iske mi ve reperfüzyonda oluşan doku hasarı, endotel hücreleriyle lökositlerin ilişkisinin kesilerek lökositlerin migrasyonu engellendiğinde en aza indirilmektedir (69).

2.5.4. İMMÜNOGLOBULİN SÜPERAİLESİ

İmmüoglobulin süperailisinin ismi, ekstrasellüler kısmında bulunan amino asit dizilerinin bir veya daha fazla bir bölümü immüoglobulinlerin ağır ve hafif zincirlerinin aminoasit dizilerine benzedikleri için verilmiştir. Ayrıca, fonksiyon olarak da benzedikleri söylenebilir (82). Bu immüoglobulin benzeri ünitelerin her biri 70-110 aa uzunluğunda ve birbirlerine β zincirleri arasındaki disülfid köprüleriyle bağlıdır. Diğer üç grup adezyon moleküllerinin aksine, bu grup Ca^{+2} bağımsız sisteme dahildir (83).

Bu ailenin üyeleri tipik olarak büyük bir aminoterminal ekstrasellüler domain, tek bir transmembran helikal segment ve sitoplazmik bir uç içerirler.

immünglobulin domainleri V, C₁ ve C₂ gibi tiplere ayrılır. V ve C₁ tipleri genelde immün sistemde rol alırken, C₂ tipi daha çok hücre adezyon moleküllerinde bulunur (84). Yine bu ailenin bazı üyeleri immunoglobulin domainlerinin altına bağlı fibronektin tip III tekrarları içerir (75). Transmembran bölümü ise membranla glikan fosfotidilinositol aracılığı ile iletişim içindedir. Çok geniş ve farklı hücre tipleri üzerinde bulunurlar ve birçok farklı biyolojik olaya eşlik ederler (79). Immünoglobulin ailesi için belirtilecek belki de en önemli şey; bu ailenin gelişen sinir sisteminde aksona yol gösteren ve nöral bağlantıları kuran, bunların bakım ve devamını sağlayan birçok farklı üyesinin olmasıdır (79). Bu ailenin üyelerinin birçok bakımdan benzeşmesi ortak prekürsör bir genden evrimleştiklerini düşündürmektedir. immünoglobulin süperailisinin üyeleri işlev gördükleri yere ve eksprese oldukları hücrelere göre isimlendirilirler. Bunlar Nöral-CAM (N-CAM), intersellüler-CAM (ICAM), Vasküler-CAM (VCAM), Platelet-Endotel-CAM (PE-CAM), Mukozal Adressin-CAM (Mad-CAM), CD2 (LFA-2) ve CD58 (LFA-3)'dür.

Homofilik veya heterofilik bağlantı yapabilirler. N-CAM ve PECAM gibi immünoglobülin süperailisine dahil bazı adezyon molekülleri; hem homofilik, hem de heterofilik bağlantı yapabilirken, I-CAM ve VCAM-1 gibi bazıları ise sadece heterofilik bağlantılar yapabilmektedir (76,82,84).

2.5.4.1. İNTERSELLÜLER (I) CAM

İntersellüler adezyon molekülleri, vücutta endotel ve lökositleri de içeren bir çok hücrede sentezlenir. Genellikle inflamasyona cevaben lökositlerin endotelden geçerek inflamasyon alanına göçlerinde rol alırlar. Kendi aralarında üç gruba ayrılırlar; ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 (82).

ICAM-1 damar endotel hücreleri ve lökositler tarafından eksprese edilen Ig süper ailesinin bir üyesidir (85). Değişik hücrelerde yapısal olarak bulunmakla birlikte, iltihabi dokularda interferon γ (IFN γ), interlökin 1 (IL-1) ve tümör nekrozis faktör (TNF α) gibi parainflamatuvar sitokinlerin uyarısıyla hücre yüzeyinde yoğunluğu artmaktadır. Uyarı sonucu, ICAM-1'in hücre yüzeyinde belirmesi, 2-4 saatte başlar ve 12-16 saat süreyle plato çizer. Ortamda sitokin varlığında ise, 24-72 saat kadar devam eder. ICAM-1 molekülleri eozinofiller,

T lenfositler ve nötrofillerin göçünde önemlidirler (86). Ayrıca ICAM-1, $\beta 2$ integrinlerden, LFA-1(lenfosit fonksiyon düzenleyen protein) ve Mac-1'in karşı hücrede bağlandığı ligandır.

Bu moleküller monoklonal antikorlarla bloke edilecek olursa, bu hücrelerin endotele yapışmadığı ve inflamasyon bölgesinde birikmediği görülmüştür (86). ICAM-1'in fonksiyonu; antijen sunan hücreler ve T hücreleri arasındaki ilişkilerde önemli bir sinyal mekanizmasını oluşturmaktadır. Bu nedenle ICAM-1'in karşıt ligandı LFA-1 ile ilişkisi allerjik astım, artrit, nefrit ve pnömoni gibi çok sayıda inflamatuvar hastalıklarda önemlidir (85).

ICAM-III'e CD50 de denilmektedir. 120 kDa ağırlığındaki molekülün (87) ergin formu 518 aminoasit uzunluktadır. Bunun 456 aminoasitlik kısmı ekstraselüler segmentte, 25 aminoasitlik kısmı transmembran bölgesinde, 37 aminoasitlik kısmı ise sitoplazmik kısımda bulunur. İntrinsik tirozin kinaz aktivitesi olmamasına rağmen, sitoplazmik tirozin kinazlarla bağlantı kurabilme yeteneğine sahiptirler (88). ICAM-III için, $\beta 2$ integrinlerden LFA-1 ve $\alpha D\beta 2$ ligand olarak bilinmektedir (88,89). LFA-1 molekülü, T hücreleri, B hücreleri, nötrofiller ve monositlerde bulunurken, $\alpha D\beta 2$ molekülü; aktif granülositler, makrofajlar ve monositlerde bulunmaktadır (89,90). ICAM-III'ün, fonksiyonel olarak erken T hücre etkileşimlerinde, özellikle dinlenmekte olan T hücrelerinde önemli roller oynadığı bilinmektedir (91).

ICAM'ların moleküler yapısı incelendiğinde, tüm moleküllerin aynı karaktere sahip olduğu görülür. Her üçünde genel yapı özelliği olarak bir N terminal ucu bir de C terminal ucu bulunmasına rağmen bazı farklılıklara rastlanılmaktadır. ICAM-2 molekülünün domain sayısı ICAM-1 ve ICAM-3'den farklıdır. ICAM-I ve ICAM-3'ün 5 Ig domain bölgesi bulunurken ICAM-II'nin 2 Ig domain bölgesi bulunmaktadır. ICAM-I'in 3. Ig domaininde Mac-1 bağlanma bölgesi yer alırken ICAM- 3'de bu domainde Mac-1 bağlanma bölgesi yoktur. Her üçünde de LFA-1'in bağlandığı domain bölgeleri birinci ve ikinci domainlerdir. ICAM-III ve ICAM-I birbiriyle aynı yapıdadır

ICAM-1'in bir de çözünür formu (sICAM-1) vardır ki; bunların alternatif splicing ile oluştuğunu düşündüren çalışmalar vardır. Yani, ICAM-1 ile sICAM-1 farklı mekanizmalarla sentezlenmektedir Bunlar göstermiştir ki; TNF- α 'nın

indüklediği çözünür-ICAM-1 5 saatte oluşmakta ve 12 saat yüksek kalmaktadır. Membrana bağlı ICAM-1 bozukluğu olan ve TNF- α ile stimüle edilen farelerde yapılan bir çalışmada sICAM-1 seviyelerinin anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir (92).

2.5.4.2. VASKÜLER (V)-CAM-1

Vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM) , ICAM-1'in aksine çok az hücrede görülmektedirler. Endotel hücresi, makrofaj ve kemik iliği stromal hücresi yüzeyinde görülür (93). VCAM-1 7 tane Ig-benzeri yapı içerir ve ligandıyla (VLA-4) ilk domainde yer alan NH₂ terminaliyle bağlanır (94).

Endotel yüzeyinde bulunan VCAM-1, inflamasyon bölgesinde lenfosit yüzeyindeki LPAM-1 ve nötrofil dışındaki lökositlerin yüzeyinde bulunan VLA-4 integrinlerle heterofilik olarak bağlanır (95). VCAM-1'in tek bir geni vardır. Birkaç değişik integrin bağlanma alanı oluşumu ise, alternatif splicing ile olur. VCAM-1 de ICAM-1 gibi sağlıklı insanda normal damar düz kas hücre yüzeyinde bulunmamasına rağmen, aterosklerotik lezyonlu damarlarda düz kas hücrelerinde eksprese edildiği görülmüştür (82). Transform olmuş endotel hücreleri ve tümör hücrelerinde, hem ICAM-1 hem de VCAM-1 ekspresyonu olabilmesine rağmen; normal endotel hücrelerinde TNF- α , IL-1 α , IL-1 β ve IL-4 gibi inflamatuvar mediatörlerle yapımları uyarılmaktadır (82). Ama IFN- γ , IL-10 ve TGF- β ile değişmemektedir (96). Değişik kaynaklardan elde edilen endotel hücreleriyle yapılan hücre kültür çalışmalarında, VCAM-1 ve ICAM-1 ekspresyonlarının farklı olduğu görülmüştür (96). Nötrofilin damar dışına çıkması sırasında endotele ilk bağlanmada (tethering) selektinler en önemli rolü oynarken, lenfosit bağlanmasında VCAM-1 en önemli rolü oynamaktadır. IL-4 de VCAM-1 ekspresyonuna ve dolayısıyla mononükleer hücre göçüne sebep olmaktadır (97).

TNF- α ve IL-1 β 'nin ortama verilmesini takiben 24 saat içinde VCAM-1 ekspresyonu artar ve 72 saat yüksek seviyede kalır (96).

Primer biliyer siroz ve primer sklerozan kolanjitiste ICAM-1 seviyeleri normale göre çok artarken, VCAM-1'in kontrol grubundan farklı olmadığı görülmüştür (98).

VCAM-1'in de çözünür formu vardır. Bazı inflamatuvar hastalıklarda çözünür VCAM-1'in hastalığın aktivitesiyle korole olduğu görülmüştür (94). Örneğin, romatoid artritli hastaların sinoviasında bol olarak bulunması hastalığın patogenezinde rol aldığını göstermektedir (69). Bu çözünür formlar, lokal inflamasyon alanları veya dolaşım boyunca dağılarak inflamasyona uzak alanlardaki hücrelerin aktivasyonunda önemli rol oynarlar (94).

2.5.4.3. LÖKOSİTLERİN DAMAR DIŞINA GÖÇÜ

Vücudun herhangi bir bölgesinde oluşan inflamasyon ve açığa çıkan sitokinler; bu bölgeye damarlar vasıtasıyla savunma hücrelerinin gelmesini ve bu hücrelerin damar duvarından çıkarak inflamasyon alanına gitmesini, bir başka deyişle lökositlerin inflamasyon alanına migrasyonunu sağlar. Hücrelerin damar dışına çıkması bir kaç aşamada olur.

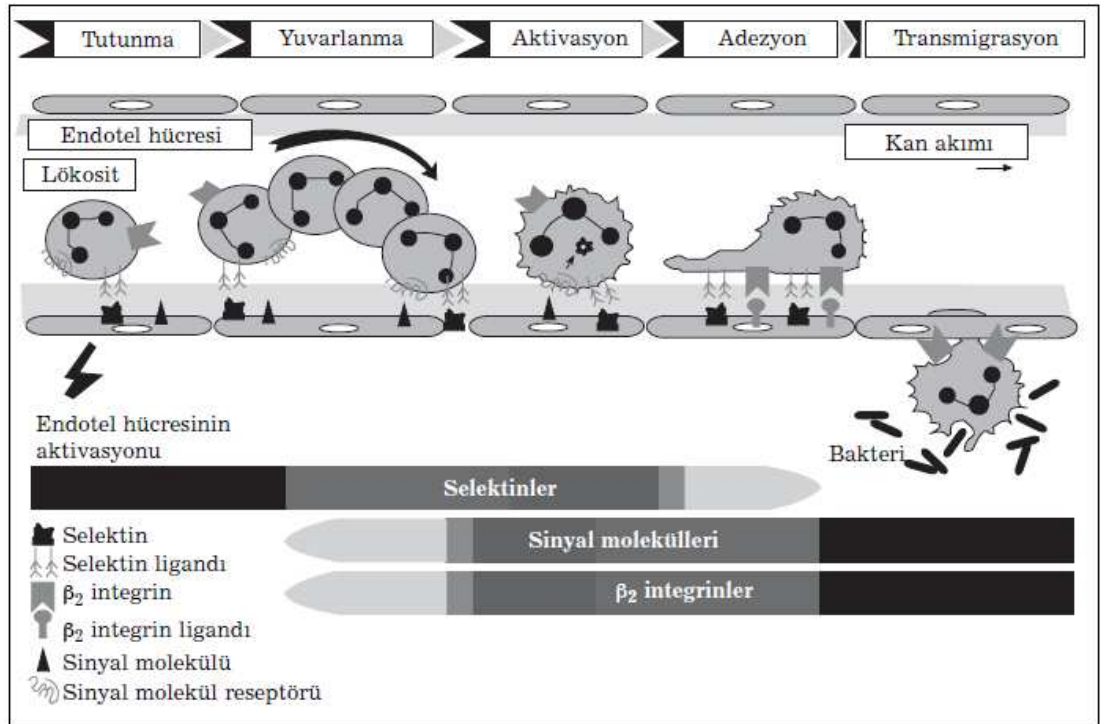
Bağlanma (tethering); ilk aşama bağlanmadır. Bu safhada normalde dolaşımında serbestçe sürüklenen ve endotele yapışmayan lökositler, üzerlerinde bulunan L-selektin ile post-kapiller venüllerin duvarındaki endotel hücrelerinin membranında bulunan P-selektin yardımıyla zayıfça yakalanırlar (96).

Yuvarlanma (rolling); ikinci aşamadır. Yakalanan lökositlerin endotel hücreleriyle oluşturdukları zayıf bağlar kan akımının da etkisiyle ayrılır. Ancak biraz ileride tekrar yakalanırlar ve bu olay bir süre devam ederek lökositin iyice yavaşlamasına kadar devam eder. Bu aşamada L-selektin ve P-selektinin yanı sıra endotel membranında bulunan E-selektin de olaya katılır. Yine sICAM-1 ve sVCAM-1 de bu olayda görev alır (99). Ayrıca lökositlerin yuvarlanması, üzerlerindeki sitokin reseptörleriyle inflamasyon bölgesinden gelen sitokin ve kimokinlerin etkileşimini artırır (100). Bu maddelerin lökositlerle etkileşimi lökosit membranı üzerindeki integrinlerin aktivasyonunu sağlar (95).

Sıkı bağlantı (tight adhesion); iyice yavaşlayan ve membranlarındaki integrinler aktive olan lökositler endotel üzerinde bulunan immunoglobulin süperaillesinden bazı üyelerle sıkıca bağlanarak oldukları yerde kalırlar. İmmunoglobulin süperaillesinden ICAM-1, LFA-1 ve Mac-1 integrinlerle; VCAM-1 ise VLA-4 ve LPAM-1 ile bağlanır (82,100).

Göç (transmigration); bu son aşamada ise inflamasyon alanına gitmek üzere lökositler endoteli geçerler. Bu geçiş PECAM, ICAM-1 ve VCAM-1 yardımıyla olur (99). Bu olaylar zinciri bir takım birlikteliklerle uyarılırlar. Örneğin IL-8, E-selektin ve ICAM-1 sentezleri nötrofillerin damar dışına çıkmasını tetiklerken; VCAM-1, ICAM-1 ve MIP-1 β (makrofaj inflamatuvar protein) kemokininin oluşumu daha çok lenfositlerin damar dışına çıkmasını tetikler (97).

Adezyon moleküllerinin sentezinin fazla olması doku hasarlarına sebep olabilir. Burada ön plana çıkan nötrofiller özellikle iskemi ve reperfüzyon ile oluşan yaralanmalarda önemli ve iyi bilinen bir role sahiptirler. P-selektin veya L-selektine karşı antikörlerin verilmesi ile oluşturulan selektin inhibisyonu deneysel bir kardiyak iskemi modelinde nötrofillerle oluşan nekroze karşı koruyucu olmuştur (101).



Şekil 2.5.4.3. Adezyon kaskadı (102)

III. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. VAKALARIN OLUŞTURULMASI VE GRUPLANDIRMA

Çalışma kapsamına Afyon Özel Diyaliz Merkezi'nde hemodiyaliz tedavisi alan 35 kadın , 40 erkek 75 kronik böbrek yetmezliği hastası alındı. Kontrol grubu çalışılan parametreleri etkileyecek sistemik bir hastalığı olmayan, rutin biyokimyasal tetkikleri normal sınırlarda bulunan; 8 erkek 7 bayan 15 bireyden oluşturuldu. Çalışma Afyon Kocatepe Üni. Tıp Fak. Tıbbi Etik Kurulu tarafından onaylanmış olup, çalışmaya katılan hasta ve gönüllülerden yazılı onam alındı (2008/6-66). Çalışma Afyon Kocatepe Üni. Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklendi. Hastalar haftada üç seans hemodiyaliz (HD) tedavisi almaktaydılar. Hastalara HD sırasında diyaliz solüsyonu olarak bikarbonatlı diyalizat ve polisülfon membran kullanılmaktaydı.

ADMA, Arjinin, NO, ICAM-1 ve VCAM için hastalar oturur pozisyonda iken iki ayrı düz tüpe aç karnına HD den önce venöz kan örnekleri alındı. ADMA ve arjinin örnekleri hemen soğuk zincire riayet edilerek soğutmalı santrifüj ile +4 °C de 2000 x g devirde 5 dakika santrifüj edildikten sonra serumları ayrıldı.

Ayrılan serumların bir kısmı sülfosalisilik asit ile uygulanan deproteinizasyon işleminden sonra ADMA ve arjinin çalışmaları için, bir kısımda NO, ICAM-1 ve VCAM-1 için ependorf tüplere aktarılıp -80 °C de çalışma gününe kadar muhafaza edildi.

Hastalar HD sürelerine göre beş gruba ayrıldı.

I. grup 0-2 yıldır HD tedavisi alanlardan (n=15 yaş ort. 50.6 ± 18.6), II. grup 3-4 yıldır HD tedavisi alanlardan (n=15 yaş ort. 52 ± 10.8), III. grup 5-6 yıldır HD tedavisi alanlardan (n=15 yaş ort. 52.4 ± 14), IV. grup 7-8 yıldır HD tedavisi alanlardan (n=15 yaş ort. 51.9 ± 18.5), V. grup 9-10 yıldır HD tedavisi alanlardan (n=15 yaş ort. 55 ± 10.7) oluşturuldu.

3.2. KULLANILAN REAKTİF VE ÇÖZELTİLER

- 1) ADMA Standart (Calbiochem, Lot: 311204, US)
- 2) Arjinin Standart (Merck, 519- K 538944, Darmstadt Germany)
- 3) HCL (Merck, K 25039614-814 Darmstadt Germany)

- 4) Metanol (Merck, K 26301108-914 Darmstadt Germany)
- 5) Sodyum Asetat ($\text{CH}_3\text{COONa}(\text{H}_2\text{O})_3$, Merck, 9023840A Darmstadt Germany)
- 6) Tetrahidrofur (Merck, K 34870914 529 Darmstadt Germany)
- 7) Sülfosalisilik Asit (Merck 53656684 Darmstadt Germany)
- 8) o-Fitaldialdehit (Merck S 30064448 Darmstadt Germany)
- 9) Borik Asit (Sigma, B 7660)
- 10) 2-Merkaptoetanol (Merck, Schuchardt)
- 11) Potasyum Hidroksit (Sigma, 97H08531 Steinheim Germany)
- 12) Nitrit-Nitrat Analiz Kiti (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA)
- 13) sICAM-1 Analiz Kiti (Bender Med, BMS201 Vienna, Austria)
- 14) sVCAM-1 Analiz Kiti (Bender Med, BMS232 Vienna, Austria)

3.3. KULLANILAN CİHAZLAR

- 1) Santrifüj
- 2) pH Metre
- 3) Nuçe Erleni
- 4) Magnetik karıştırıcı, magnetik bar
- 5) Su trombu
- 6) Filtre (Millex Millipore GP 0.22 μ , 25mm diameter Z35, 990-4)
- 7) Agilent 1100 serisi HPLC cihazı Floresans dedektör
- 8) Analitik Kolon; 250x4,6mm C18 Supelcosil 5 μ m kolon
- 9) Elisa Okuyucu Trinity Biotech

3.4. ADMA, ARJİNİN ANALİZİ

3.4.1. MOBİL FAZ SOLÜSYONLARININ HAZIRLANMASI

ADMA ve arjinin düzeyleri gradient pompa kullanılarak analiz edildi. Gradient mobil fazları olarak Mobil faz A ve B hazırlandı.

3.4.1.1. MOBİL FAZ A'NİN HAZIRLANMASI (82:17:1)

1) 5,57 gr sodyum asetat bir miktar distile su içinde çözülerek pH 6,8'e ayarlandıktan sonra distile su ile son hacim 820ml'ye tamamlandı.

2) 170 ml metanol ilave edildi.

3) 10 ml tetrahidrofuran (THF) eklenerek son hacim 1 lt'ye tamamlanmış oldu.

3.4.1.2. MOBİL FAZ B'NİN HAZIRLANMASI (22:77:1)

1) 1,49 gr sodyum asetat bir miktar distile su içinde çözülerek pH 6,8'e ayarlandıktan sonra distile su ile son hacim 220 ml'ye tamamlandı.

2) 770 ml metanol ilave edildi.

3) 10ml THF eklenerek son hacim 1lt'ye tamamlanmış oldu.

3.4.2. MOBİL FAZLARIN FİLTREASYONU VE DEGAZE EDİLMESİ

Hazırlanan mobil faz 0.45µ filtreler kullanılarak filtre edildi. Degaze işlemi su trombu ile sağlandı. Musluğa bağlı olan su trombu bir hortum vasıtasıyla nuçe erlenine bağlandı. Nuçe erleni magnetik karıştırıcının üzerine yerleştirildi, magnetik bar mobil fazın içine kondu ve nuçe erleninin ağzı tıpa ile kapatılarak etrafı parafilmle sıkıca sarılarak hava girişi engellenmiş oldu. Musluk hafifçe açılıp, magnetik bar düşük devirde çevrilirken, 1-2 dakika içinde kabarcıklar görülmeye başlandı. Kabarcıklar kaybolunca musluk daha fazla açıldı ve karıştırıcının devri artırıldı, hiç kabarcık oluşmayana kadar işleme devam edildi, daha sonra çıkarılarak çalkalamadan cihazda uygun pompalara hortumlar vasıtasıyla bağlandı.

3.4.3. ADMA STANDART HAZIRLANMASI

ADMA stok standart solüsyonu (0.5mM) 0.1 M HCl içinde hazırlanıp buzdolabında saklandı. Stok solüsyonunun 0.1 M HCl ile dilüsyonuyla standart solüsyonu (50µM) hazırlandı. Hazırlanan 50µM standart solüsyondan 0,1M HCl ile dilüsyonlarla sırasıyla 25µM, 12.5µM, 6.25µM, 3.1µM, 1.56µM, 0.78µM olmak üzere standart çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan standartlar derivatizasyon işleminden sonra otomatik örnekleme cihazına konularak 10 µl enjekte edildi. Alınan pik alanlarıyla ADMA standart grafiği oluşturuldu.

3.4.4. ARJİNİN STANDART HAZIRLANMASI

Arjinin stok standart solüsyonu (1 mM) 0.1 M HCl içinde hazırlanıp buzdolabında saklandı. Stok solüsyonunun 0.1 M HCl ile dilüsyonuyla standart solüsyonu (500µM) hazırlandı. Hazırlanan 500 µM standart solüsyondan 0,1M HCl ile dilüsyonla sırasıyla 250 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, olmak üzere standart çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan standartlar derivatizasyon işleminden sonra otomatik örnekleme cihazına konularak 10 µl enjekte edildi. Alınan pik alanlarıyla arjinin standart grafiği oluşturuldu

3.4.5. NUMUNE HAZIRLANMASI

Hastalardan düz tüplere alınan kanlar bekletilmeden 2000 x g devirde 4 °C'de 5 dakika santrifüj edildi. Ayrılan serumdan 1 ml alınıp 20 mg sülfosalisilik asit ilave edilip 10 dakika buz banyosunda bekletildi. Tekrar 2000 x g devirde 4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi. Deproteinizasyon işleminden sonra üstte kalan süpernatanttan ADMA ve arjinin analizi yapıldı. Süpernatantlar 0.22µm çaplı enjektör filtrelerden süzülerek sisteme verildi.

3.4.6. DERİVATİZASYON

Standart ve numuneler o-fitaldialdehid (OPA) kullanılarak derivatize edildi. Derivatizasyon için 10 mg OPA, 0.5 ml metanol ve 2 ml 0.4 M borat tamponunda (pH=10) çözüldü. Hazırlanan solüsyona 30 µL merkaptotanol eklendi. Hazırlanan derivatizasyon solüsyonunun stabilitesi 2 gün olduğundan her analiz öncesi taze olarak hazırlandı. 10 µL numune süpernatantı 100 µL OPA ile karıştırılıp 3 dk oda ısısında bekletilip analiz için cihaza enjekte edildi. Bulunan alan yardımıyla standart grafiğinden faydalanılarak örneklerin ADMA ve arjinin değerleri hesaplandı (100).

3.4.7. POMPA

Gradyent mobil faz kullanıldı. Mobil faz A ve B aşağıda gösterildiği şekilde dakikada 1 ml olacak şekilde sisteme pompalandı.

| ZAMAN (dk) | A (%) | B (%) |
|------------|-------|-------|
| 0 | 95 | 5 |
| 6 | 88 | 12 |
| 16 | 60 | 40 |
| 28 | 25 | 75 |
| 32 | 0 | 100 |
| 34 | 0 | 100 |
| 35 | 95 | 5 |

Tablo 3.4.7. Mobil fazların akış şeması.

3.4.8. DETEKSİYON

Floresans dedektör eksitasyon için 338 nm. ve emisyon için 425 nm'ye ayarlandı. Agilent 1100 serisi HPLC cihazı, 250 x 4.6 mm C₁₈ Supelcosil 5µm kolon ve floresans dedektör kullanıldı. Toplam analiz süresi 35 dk. olacak şekilde ayarlandı.

3.5. NİTRİT VE NİTRAT DÜZEYLERİ ÖLÇÜMÜ

Nitrit / Nitrat düzeyleri Cayman marka ticari kit kullanılarak kolorimetrik metotla ölçüldü (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA).

3.5.1. REAKTİFLERİN HAZIRLANMASI

- 1) Assay Buffer: 100 ml distile suda çözülerek hazırlandı.
- 2) Nitrat Redüktaz: 1,2 ml assay buffer ile sulandırıldı. Kullanım esnasında buzda tutuldu.
- 3) Enzim Kofaktörleri: 1,2 ml assay buffer ile sulandırıldı. Kullanım esnasında buzda tutuldu.
- 4) Nitrat Standart: 1ml assay buffer ile sulandırıldı.
- 5) Nitrit Standart: 1ml assay buffer ile sulandırıldı.
- 6) Griess Reaktifleri R1, R2: Bu reaktifler kullanıma hazır durumdaydı, sulandırılmadı.

3.5.2. STANDART HAZIRLANMASI

0,9 ml. Assay buffer üzerine 0,1 ml. Nitrat standart eklenip vortekslendi. Böylece 200 µM stok standart hazırlanmış olur. Stok standart solüsyondan sırasıyla 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 25 µM, 30 µM ve 35 µM olmak üzere standartlar hazırlandı.

3.5.3. ÇALIŞMA PRENSİBİ

1) Kör kuyucuklarına 200 µl assay buffer pipetlendi. Başka herhangi bir şey ilave edilmedi.

2) 80 µl numune ilgili kuyucuklara pipetlendi.

3) Kör kuyucuğu hariç bütün kuyucuklara 10 µl enzim kofaktörleri ilave edildi.

4) Kör kuyucuğu hariç bütün kuyucuklara 10 µl nitrat redüktaz ilave edildi.

5) Plate kapatılarak 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.

6) İnkübasyondan sonra 50 µl Griess reagent R₁ kör kuyucuğu hariç bütün kuyucuklara ilave edildi.

7) Bekletilmeden 50 µl Griess reagent R₂ kör kuyucuğu hariç bütün kuyucuklara ilave edildi.

8) 10 dakika süreyle renk değişimi beklendikten sonra 490 nm'de okutuldu.

3.6. sVCAM-1 DÜZEYLERİ ÖLÇÜMÜ

sVCAM-1 düzeyleri Bender Med (BMS232 Vienna, Austria) marka ticari kit kullanılarak ELİSA yöntemiyle ölçüldü.

3.6.1. REAKTİFLERİN HAZIRLANMASI

1) Assay Buffer: 100 ml distile suda çözülerek hazırlandı.

2) Konjugat Karışımı: 1:100 Assay buffer ile dilüe edilerek hazırlandı.

3) Wash Buffer: 20 kat distile su ile dilüe edilerek son hacim 1000 ml olacak şekilde hazırlandı.

4) sVCAM-1 Standart: 1ml distile su ilave edilerek hazırlandı.

3.6.2. STANDART HAZIRLANMASI

1 ml distile su sVCAM-1 standartına eklenip karıştırıldı. Böylece 200 ng/ml stok standart hazırlanmış olur. Stok standart solüsyondan sırasıyla 100 ng/ml, 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12.5 ng/ml, 6.3 ng/ml, 3.1 ng/ml olmak üzere standartlar hazırlandı.

3.6.3. ÇALIŞMA PRENSİBİ

- 1) Numuneler Assay buffer ile 1:50 oranında dilüe edildi.
- 2) Plak wash buffer ile iki kez yıkandı.
- 3) 50 µl konjugat karışımı kör kuyucuğuda dahil olmak üzere bütün kuyucuklara pipetlendi.
- 4) Hazırlanan standartlardan 100 er µl standart kuyucuklarına pipetlendi.
- 5) Kör kuyucuğuna 100 µl assay buffer pipetlendi.
- 6) 100 µl dilüe edilen numuneler pipetlendi
- 7) Oda ısısında 2 saat inkübe edildikten sonra plak üç kez yıkandı.
- 8) 100 µl TMB substrat solüsyonu eklendi ve 10 dakika inkübe edildi
- 9) 100 µl stop solüsyonu eklendikten sonra 450 nm'de okutuldu.

3.7. sICAM-1 DÜZEYLERİ ÖLÇÜMÜ

sICAM-1 düzeyleri Bender Med (BMS201 Vienna, Austria) marka ticari kit kullanılarak ELİSA yöntemiyle ölçüldü.

3.7.1. REAKTİFLERİN HAZIRLANMASI

- 1) Assay Buffer: 100 ml distile suda çözülerek hazırlandı.
- 2) HRP- Konjugatı: Assay buffer ile 100 kat dilüe edilerek hazırlanır ve hazırlandıktan sonra 30 dakika içinde kullanılması gerekir.
- 3) Wash Buffer: 20 kat distile su ile dilüe edilerek son hacim 1000 ml olacak şekilde hazırlandı.

3.7.2. STANDART HAZIRLANMASI

100 ng/ml stok standart solüsyonundan sample dilüent ile seri dilüsyon yapılarak sırasıyla 100 ng/ml, 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12.5 ng/ml, 6.3 ng/ml olmak üzere standartlar hazırlandı.

3.7.3. ÇALIŞMA PRENSİBİ

- 1) Plak wash buffer ile iki kez yıkandı.
- 2) Hazırlanan standart solüsyonlarından 100 er μ l kuyucuklara pipetlendi.
- 3) K r kuyucuğuna 100 μ l sample diluent pipetlendi.
- 4) 90 μ l sample diluent numune kuyucuklarına pipetlendikten sonra bu kuyucuklara 10 μ l numune pipetlendi.
- 5) 50 μ l HRP-Konjugat bütün kuyucuklara pipetlenir ve 1 saat oda ısısında inkübe edilir.
- 6) Plaklar üç kez wash buffer ile yıkanır.
- 7) 100 μ l TMB substrat solüsyonu pipetlendikten sonra 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.
- 8) 100 μ l stop solüsyonu pipetlendikten sonra 450 nm' de okutuldu.

IV. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analiz SPSS (Statistical Package for the Social Sciences ver.13.0, SPSS Inc, Chicago Illinois,USA) programı kullanılarak yapıldı. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verildi. Grup içi ve gruplar arası karşılaştırmada ANOVA ve Tukey testi kullanıldı. $P<0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

V. BULGULAR

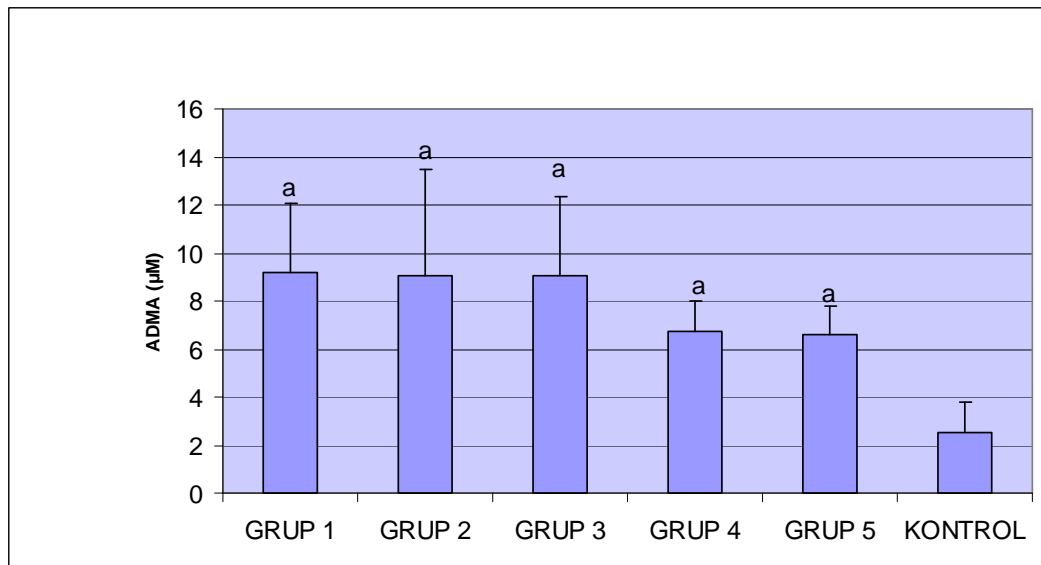
0-2 yıldır hemodializ gören 15 (grup 1), 3-4 yıldır hemodializ gören 15 (grup 2), 5-6 yıldır hemodializ gören 15 (grup 3), 7-8 yıldır hemodializ gören 15 (grup 4) ve 9-10 yıldır hemodializ gören 15 hasta (grup 5) ile herhangi bir sağlık sorunu olmayan 15 kişiden oluşan kontrol grubunun (grup 6) serum ADMA, Arginin, NO, İCAM-1 ve VCAM-1 düzeyleri çalışıldı. Hasta grupları kendi aralarında ve aynı zamanda kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

5.1. HASTA VE KONTROL GRUBU ADMA SONUÇLARI

Serum ADMA, değerleri ortalama \pm SD olarak tablo 5.1 ve şekil 5.1. de gösterilmektedir. Serum ADMA değerleri bütün gruplarda kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$).

| | GRUP 1 | GRUP 2 | GRUP 3 | GRUP 4 | GRUP 5 | KONTROL |
|----------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------|
| ADMA(μ M) | 9.21 \pm 2.87 ^a | 9.03 \pm 4.43 ^a | 9.07 \pm 3.28 ^a | 6.76 \pm 1.24 ^a | 6.62 \pm 1.17 ^a | 2.53 \pm 1.28 |

Tablo 5.1. ADMA düzeyleri
a $P < 0,05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında



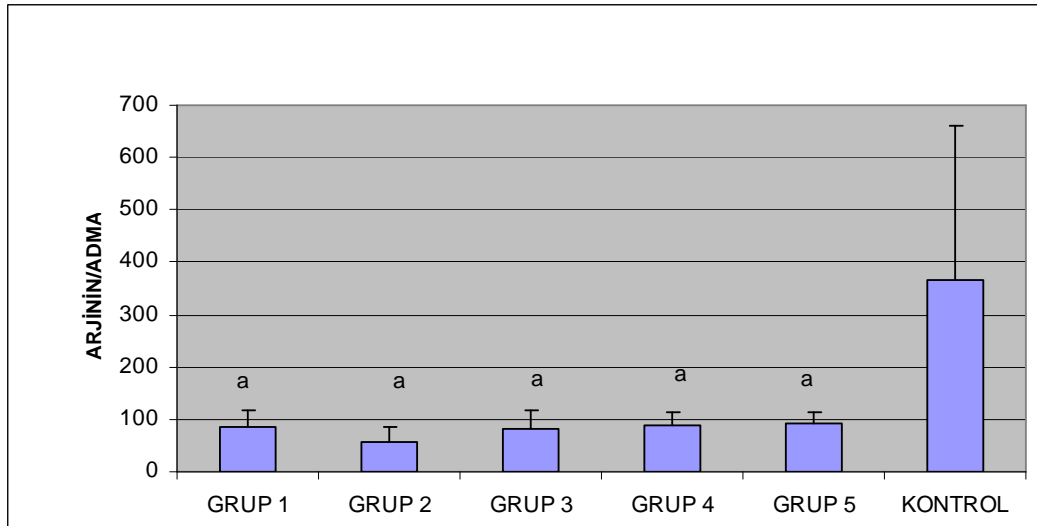
Şekil 5.1. ADMA düzeyleri
a $P < 0,05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

5.2. HASTA VE KONTROL GRUBU ARJİNİN/ADMA SONUÇLARI

Serum ARJİNİN/ADMA, değerleri ortalama \pm SD olarak tablo 5.2 ve şekil 5.2. de gösterilmektedir. Serum ARJİNİN/ADMA değerleri bütün gruplarda kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p < 0,05$)

| | ARJININ/ADMA |
|---------|--------------------------------|
| GRUP 1 | 85.25 \pm 30.43 ^a |
| GRUP 2 | 55.62 \pm 28.1 ^a |
| GRUP 3 | 82.69 \pm 35.9 ^a |
| GRUP 4 | 89.73 \pm 22.7 ^a |
| GRUP 5 | 93.99 \pm 18.0 ^a |
| KONTROL | 364.35 \pm 294.95 |

Tablo 5.2. ARJİNİN/ADMA düzeyleri
a $P < 0,05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında



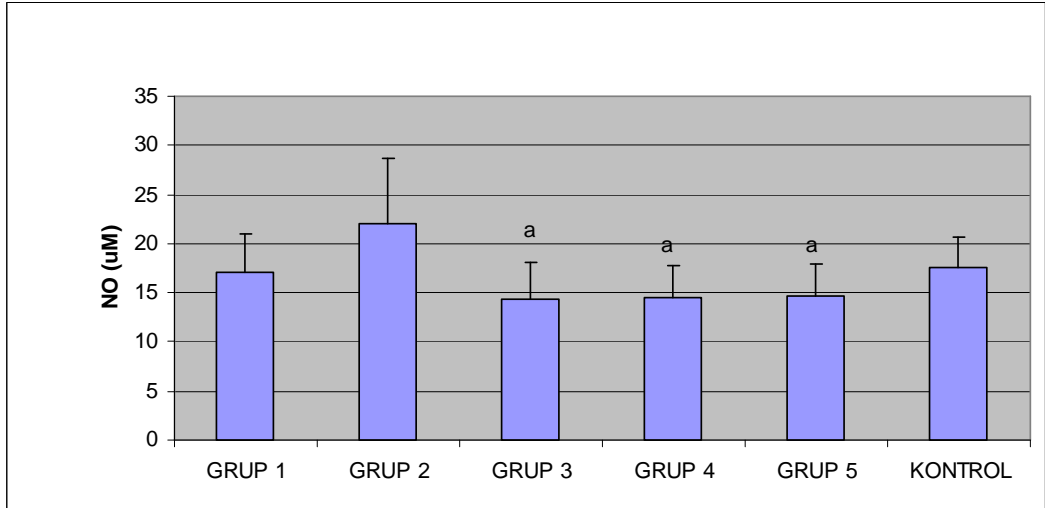
Şekil 5.2. ARJİNİN/ADMA düzeyleri
a $P < 0,05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

5.3. HASTA VE KONTROL GRUBU NO SONUÇLARI

Serum NO, değerleri ortalama \pm SD olarak tablo 5.3 ve şekil 5.3. de gösterilmektedir. Serum NO değerleri Grup 1 ve Grup 2 dışında bütün gruplarda kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0,05$).

| | GRUP 1 | GRUP 2 | GRUP 3 | GRUP 4 | GRUP 5 | KONTROL |
|--------------|------------------|------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------|
| NO(μ M) | 17.04 \pm 4.01 | 22.08 \pm 6.60 | 14.28 \pm 3.87 ^a | 14.50 \pm 3.24 ^a | 14.71 \pm 3.21 ^a | 17.65 \pm 3.09 |

Tablo 5.3. NO düzeyleri
a $P<0,05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında



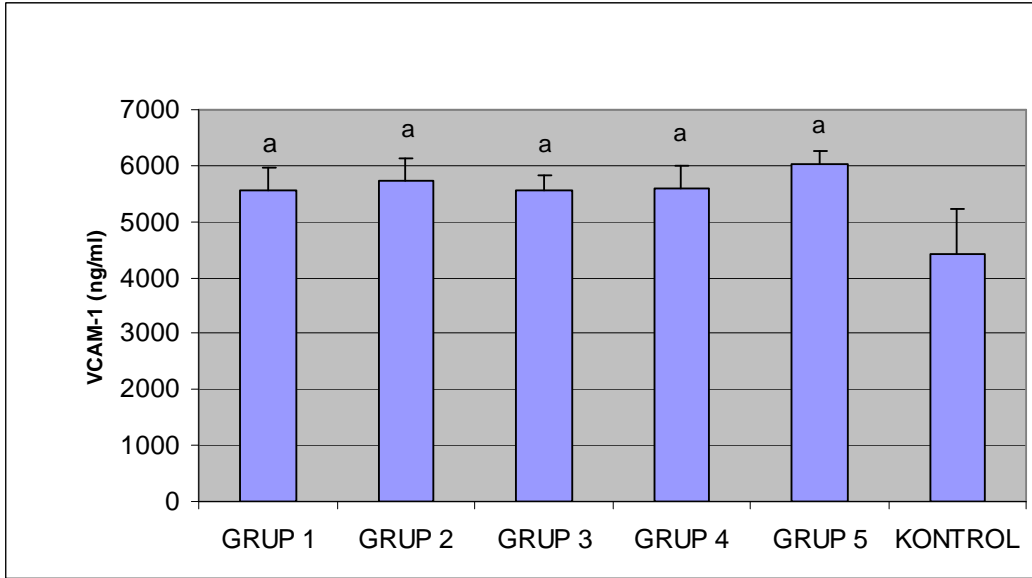
Şekil 5.3. NO düzeyleri
a $P<0,05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

5.4. HASTA VE KONTROL GRUBU VCAM-1 SONUÇLARI

Serum VCAM-1, değerleri ortalama \pm SD olarak tablo 5.4 ve şekil 5.4. de gösterilmektedir. Serum VCAM-1 değerleri bütün gruplarda kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$).

| | GRUP 1 | GRUP 2 | GRUP 3 | GRUP 4 | GRUP 5 | KONTROL |
|---------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------|
| VCAM1 (ng/ml) | 5572 \pm 395 ^a | 5723 \pm 411 ^a | 5576 \pm 261 ^a | 5600 \pm 410 ^a | 6035 \pm 232 ^a | 4435 \pm 780 |

Tablo 5.4. VCAM-1 düzeyleri
a $P < 0,05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında



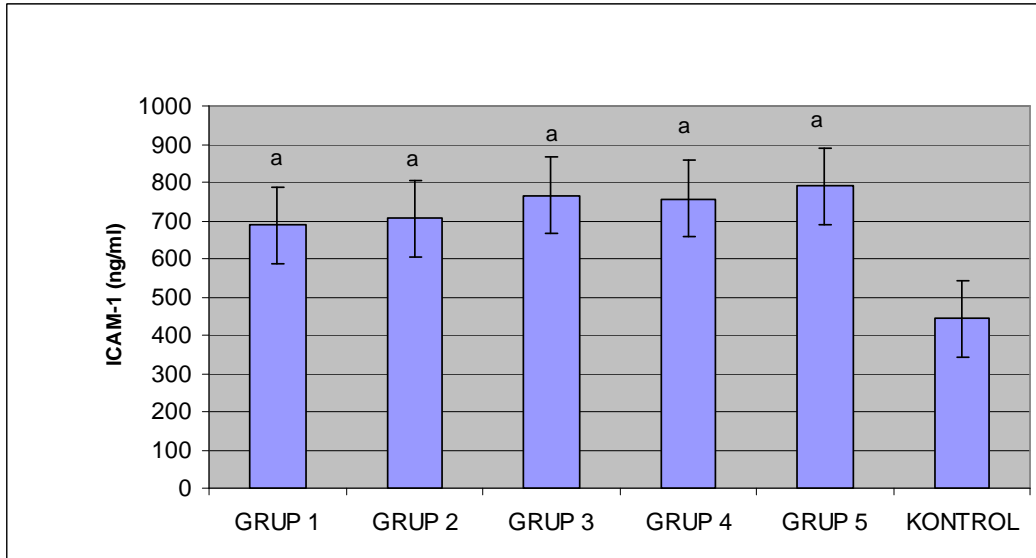
Şekil . 5.4. VCAM düzeyleri
a $P < 0,05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

5.5. HASTA VE KONTROL GRUBU ICAM-1 SONUÇLARI

Serum ICAM, değerleri ortalama \pm SD olarak tablo 5.5 ve şekil 5.5. de gösterilmektedir. Serum ICAM değerleri bütün gruplarda kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$).

| | GRUP 1 | GRUP 2 | GRUP 3 | GRUP 4 | GRUP 5 | KONTROL |
|---------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------|
| ICAM1 (ng/ml) | 687,86 \pm 181,47 ^a | 705,97 \pm 226,75 ^a | 765,53 \pm 250,72 ^a | 757,39 \pm 163,2 ^a | 791,03 \pm 320,02 ^a | 442,87 \pm 118,126 |

Tablo 5.5. ICAM düzeyleri
a $P < 0,05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında



Şekil 5.5. ICAM düzeyleri
a $P < 0,05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

VI. TARTIŞMA

Kardiyovasküler hastalıkların renal replasman tedavisi altında olan hastalarda en önemli mortalite ve morbidite nedeni olduğu bilinmektedir. Kardiyovasküler hastalık riski bu grupta normal popülasyon ile karşılaştırıldığında 10 ila 20 kat daha fazladır. Kuzey Amerika ve Avrupa diyaliz kayıtları, hemodiyaliz hastaları için en önemli ölüm nedenlerinin kardiyovasküler olaylar olduğunu ortaya koymaktadır (103). Kronik böbrek yetmezliği organizmada bir çok sistemi etkilemekte olup bunlar içinde belkide en önemlisi erken ateroskleroz gelişimidir. Kronik böbrek yetmezlikli hastaların yaklaşık yarısının ölüm sebebi aterosklerotik kalp hastalığıdır (2,3).

Aterojen faktörlerin başında dislipidemi, homosistein, lipoprotein(a) ve fibrinojen düzeylerinde artış gelmektedir (104,105). Üremide mikroinflamatuvar durum, malnütrisyon ve ateroskleroz arasındaki ilişki dikkat çekicidir (106). Son yıllarda koroner arter hastalığı için bağımsız prediktörler arasına enflamasyon markerleride girmiştir. Büyük ölçekli epidemiyolojik çalışmalar 'highly sensitive' C reaktif protein (CRP) plazma düzeylerinin MI, inme ve periferik arter hastalıkları için kuvvetli prediktör olduğunu ortaya koymuştur. Aterogenezde yer alan CRP, adezyon moleküllerinin ekspresyonunu tetikler.

ADMA, endotelial hücrelerden sentezlenen, idrar, plazma ve dokularda bulunan, L-arginin aminoasidinin guanido analogudur. Nitrik oksit sentazın endojen kompetitif inhibitörüdür. ADMA yüksekliği nedeniyle inhibe olan NOS, nitrik oksit sentezinin azalmasına neden olmaktadır. Azalan NO' ya bağlı olarak meydana gelen endotelial disfonksiyon, aterosklerotik hastalıklarda erken indikatör olarak kabul edilmektedir

Kronik böbrek yetmezlikli hastalarda serum ADMA, NO değerlerine dair pek çok çalışma mevcuttur. Aynı zamanda KBY li hastalarda serum İCAM-1, VCAM-1 düzeylerine bakılan çalışmalarda mevcuttur. Ancak biz çalışmamızda hemodiyaliz tedavisi gören hastalarda, bugün artık koroner arter hastalığı için bağımsız bir risk faktörü olarak kabul edilen serum ADMA düzeyleri ve gene aterosklerozun morfolojisinde rol aldığı düşünülen adezyon molekülleri

düzelelerine birlikte bakarak bunların birbirleriyle olan ilişkisini ve hemodiyaliz sürelerinin bu ilişkiindeki yerini ortaya koymaya çalıştık.

Francis ve ark. 1980 yılında yaptıkları çalışmada uzun süre hemodiyaliz tedavisi gören hastalarda görülen ölümlerin % 20,5' inde nedenin koroner arter hastalığı olduğunu belirtmişlerdir. Hemodiyaliz programında olup da kalp hastalığı saptanan hastalarda ise ölümlerin % 50–65' inin kardiyak nedenlere bağlı olduğu bildirilmiştir (107).

Kronik böbrek yetmezliğinde bütün nitrik oksit ürünleri azalmaktadır. Buda kardiovasküler olayları ve böbrek hasarının progresyonunu arttırmaktadır. KBY de NO eksikliğinin birçok nedeni vardır. Bunlar; 1. Substratın (L-Arjinin) elde edilebilirliğinin azalması ki bunun nedeni böbreklerde L-Arjinin sentezinin bozulması, endotel hücrelerine arjinin transportunun azalması ve arjinaz gibi NOS ile yarışan metabolik yollar nedeniyle olabilir. 2. ADMA gibi endojen NOS inhibitörlerinin dolaşımdaki seviyelerinin artması. Proteinlerin artmış metilasyonu ve bunlardan ADMA açığa çıkmasının katkısının yanında asıl suçlu muhtemelen ADMA yı katabolize eden enzim olan dimetil arginin dimetil aminohidrolazın azalmasıdır. Çeşitli NO üretim yollarını hedefleyerek NO üretimini düzeltmek KBY hastalarda kardiovasküler komplikasyonları azaltarak progresyonu yavaşlatabilir (108).

NO sentezini regüle eden NOS enziminin aktivitesi ise endojen bir inhibitör olan asimetrik dimetilarjinin (ADMA) molekülü ile düzenlenir. ADMA'nın, NO'in endojen inhibitörü olduğu gösterilmiştir (46).

ADMA proteinlerin posttranslasyonel metilasyonu sonucu oluşur. Renal yolla da atılmasına rağmen başlıca metabolik yolu DDAH enzimiyle sitrulin ve dimetilamine yıkılımdır. Son dönemlerde yapılan çalışmalar NOS aktivitesinde ADMA'nın önemli bir rolünün olduğunu ortaya koymuştur. NOS aktivitesinin ADMA ile inhibisyonu sonucu vazodilatatör etkili NO sentezi olamamaktadır. Çok sayıda çalışma ADMA seviyelerinde hafif artışların bile kardiyovasküler olay oranında artışa sebep olduğunu göstermiştir (46).

ADMA yüksekliği, artmış monosit adhezyonu, plateletlerin agregasyonunu ve bozulmuş endotel bağımlı vasodilatasyonun klinik endotel disfonksiyonuna sebep olduğu' da gösterilmiştir (109,110).

Böbrek yetmezliği olan hastalarda yapılan çalışmalarda uygulanan hemodiyaliz tedavisi ile ADMA seviyelerinde düşüş gözlenmiştir. Ancak, ADMA miktarı sağlıklı bireylerdeki seviyelere gerilememektedir. ADMA seviyesindeki yükselmeye birlikte inhibe olan NO'nun vasküler dokudaki işlevlerini yerine getirememesi ve vasküler düz kasların gevşeyememesi nedeni ile endotelyal disfonksiyonun geliştiği ve kardiyovasküler hastalıkların tetiklendiği ileri sürülmektedir (111). Vallance ve ark.'nın hipotezine görede, böbrek yetmezliği görülen hastalarda ADMA'nın artışı vasküler NO oluşumu üzerinde inhibitör etki göstermektedir. Bu inhibitör etki ise koroner ateroskleroz gibi kardiyovasküler hastalıklar için tetikleyici rol oynamaktadır (112).

Kari ve ark. ise böbrek yetmezliği görülen hastalarda NO' e bağımlı vazodilatasyon meydana gelmediğini belirtmişlerdir (113). Hand ve ark. son dönem böbrek yetmezliği olan hastalarda hemodiyaliz öncesi ve sonrasında endotelyuma bağılı vazodilatasyonda kayıp olduğunu göstermişlerdir (114).

Çalışmamızda, serum ADMA seviyelerinin kontrol grubu ile kıyaslandığında hemodializ tedavisi gören kronik böbrek yetmezlikli hastalarda anlamlı olarak yüksek olduğunu tesbit ettik. Aynı zamanda dializ tedavi sürelerine göre gruplandırılan hastalar arasında serum ADMA seviyeleri bakımından anlamlı bir fark bulunamamıştır. Buradan kronik böbrek yetmezliğinde serum ADMA düzeylerinin yükseldiğini ancak hemodiyaliz tedavi süreleri ile bu yükseklik arasında korelasyon olmadığı sonucuna vardık. Aynı şekilde serum NO düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hasta gruplarında anlamlı şekilde düşük bulundu. Bu da ADMA ile NO arasındaki ilişkiyi desteklemekteydi. Serum ADMA düzeylerinde olduğu gibi NO düzeylerinde hasta grupları arasında anlamlı fark bulamadık.

Kielstein ve Schmidt hemodiyaliz hastalarında ADMA seviyelerini HPLC cihazı ile ölçmüşlerdir. Yaptıkları çalışmada, hemodiyaliz hastalarının serumlarındaki ADMA seviyelerinin kontrol grubuna göre 4-6 kat daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir (67,115). Yaptığımız çalışmada da serum ADMA seviyeleri hasta grubunda kontrol grubuna göre 3-5 kat daha yüksek bulduk.

Kronik böbrek yetmezliğinde artan ADMA seviyesi ile kardiyovasküler mortalite arasındaki ilişkiyi gösteren pek çok çalışma yapılmıştır. Bizim

çalışmamızın bu çalışmalardan farkı hastaların almış olduğu hemodiyaliz tedavisi sürelerinin ADMA üzerine etkisini ortaya koymak olmuştur. Alınan sonuçlar, hastaların hemodiyaliz tedavisini 2 yıl da alsalar 10 yıl da alsalar ADMA düzeyleri üzerine etki etmediğini göstermiştir.

Zoccali tarafından yapılan çalışmada, son dönem böbrek yetmezliği görülen hastalarda ADMA ve kardiyovasküler mortalite arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bu çalışmanın bulgularına göre, KBY görülen hastalarda ADMA seviyesi kardiyovasküler olaylar sonucunda oluşabilecek mortalitenin güçlü bir belirteci olarak bildirilmiştir (116). Busch ve ark. tarafından KBY'li hastalarda kardiyovasküler hastalıklar açısından potansiyel risk faktörleri olarak görülen ADMA ve SDMA seviyeleri araştırılmıştır. HD hastalarında görülen ADMA seviyelerinin yüksekliği, koroner arter hastalarında da benzer yükseklikte bulunmuştur (117). Soveri ve ark. yaptıkları çalışmada, hemodiyaliz tedavisi gören hastalarda ADMA seviyesindeki artışın kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisini araştırmış ve hemodiyaliz tedavisi gören kişilerde kardiyovasküler hastalıklara bağlı olarak meydana gelen mortalitenin, sağlıklı kişilere göre 10-20 kat yüksek olduğunu vurgulamışlardır (118).

Csiky tarafından 2008 yılında yapılan araştırmada, son dönem böbrek yetmezliği görülen hastalarda hemodiyaliz tedavisinin ADMA üzerine etkisi araştırılmıştır. Hemodializ tedavisi ile ADMA seviyelerinde önemli düşüş gözlenmiş, ancak diyaliz sonrası veriler ile karşılaştırıldığında ADMA seviyesinin dializ öncesine göre az olmakla birlikte yine de yüksek olduğu görülmüştür (119). Bizde çalışmamızda hemodializ öncesi aldığımız kan örneklerini sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırdık ve benzer şekilde hasta grubunda yüksek ADMA seviyelerini tesbit ettik.

Adezyon molekülleri, bir hücrenin diğer bir hücreye veya ekstrasellüler matrikse adezyonunu sağlayan ligant veya reseptörlerden oluşan heterojen bir molekül grubudur (II-1). İlk kez 1980 yılında tanımlanan adezyon molekülleri; immünolojik yanıt, inflamasyon, hemostaz, yara iyileşmesi, morfogenez, aterogenez, tümör metastazı ve dokuların bütünlüğünün devamında görev alan, yaşamın yapıştırıcısı olarak tanımlanan moleküllerdir (71).

ICAM-1 ve VCAM-1 adezyon molekülleri, immunoglobulin süper ailesinin üyeleridir. Endotel hücrelerinde sentezlenir. İnflame olan dokuların postkapiller venüllerinin içinde lökositlerin yuvarlanmasına ve sıkı yapışmasına aracılık ederler. Ama yuvarlanmadan daha çok sıkı bağlanarak migrasyona ve mikrovasküler permeabilite artışına sebep olurlar (92). Endotel yüzeyindeki ICAM-1 lökosit yüzeyindeki Lökosit Fonksiyon Antijen-1 (LFA-1) ve Mac 1-integrinlerle heterofilik bağlantı yaparlar (93).

Adezyon moleküllerinin aterosklerozun morfolojisinde rol aldığı ve koroner arter hastalığı gelişimine neden olduğuna dair çok sayıda çalışma mevcuttur. Hemodializ hastalarında koroner arter hastalığı insidansının yüksek olması bu moleküllere olan ilgiyi arttırmaktadır. Solubl adezyon moleküllerinin dialize girmeyen KBY li hastalarda da, periton dializi yada hemodializ gören hastalarda olduğu gibi konsantrasyonlarının arttığı daha önce yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (120-122). Solubl adezyon moleküllerinin KBY li hastalarda artışı muhtemelen multifaktöryel olup tam olarak açıklanamamıştır. Bonomini ve arkadaşları böbrek fonksiyonlarındaki progresif düşüşle adezyon moleküllerindeki artışı göstermişlerdir (121). Bununla birlikte Peter Stenvinkel ve arkadaşları yaptıkları çalışmada rezidüel renal fonksiyonla adezyon molekülleri arasında anlamlı ilişki bulamamışlardır. Ancak bu çalışmaya alınan hasta sayısının azlığından kaynaklanabileceği gibi KBY lilerde adezyon moleküllerinin serumdaki artışına bu hastalarda sentez ve salınımının artmasının neden olabileceğini ileri sürmüşlerdir (123).

Bugün artık dializ hastalarında arteriyel hasarda inflamasyonun primer rol oynadığı bilindiği halde bu inflamasyondan tam olarak neyin sorumlu olduğu açıklanamamıştır. Hafif enfeksiyonlar, tekrarlayan dializ filtrelerine maruz kalma ve oksidasyon ürünleri bu hastalarda inflamasyona sebep olarak düşünülmüştür. Bunlara ek olarak sempatik hiperaktivite, dislipidemi, hiperfosfatemi/hiperparatiroidi, diabet, sigara gibi geleneksel ve geleneksel olmayan risk faktörleride son dönem böbrek yetmezliğinde inflamasyonu a greve edebilir (124).

Kronik inflamatuvar durumlarda adezyon molekülleri upregüle olur (125). Bu upregülasyonun endotel disfonksiyonun bir göstergesi olduğu düşünülmüştür. KBY li hastalarda yaygın bir fenomen olan proinflamatuvar sitokinlerin endotel hücrelerinden adezyon molekülünü ekspresyonunu arttırdıklarında tekrar tekrar gösterilmiştir (125,126). Peter Stenvinkel ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kardiovasküler hastalığı bulunan KBY li hastalarda anlamlı derecede yüksek sICAM-1 düzeyleri bulmuşlardır (123).

Endotel hücreleri tarafından sentezlenen nitrik oksit, sitokinlerin arttırdığı ICAM-1 ve VCAM-1 üzerinde azaltıcı bir etkiye sahiptir. Aterosklerozun başlangıç safhalarında, nitrik oksitin azalmasına eş olarak ICAM-1 ve VCAM-1 ekspresyonunda artışın etkisiyle aterosklerozda artma olduğu görülmüştür (82).

Sonuç olarak pek çok araştırmacı adezyon moleküllerinin trombotik etki, lökosit infiltrasyonu, düz kas proliferasyonu ve hücre migrasyonu ile kardiovasküler hastalık gelişiminde önemli rol oynadığını göstermiştir (127,128). Erkek ve kadın koroner arter hastalarında yapılan çalışmalarda adezyon moleküllerinin yükseldiği gösterilmiş olup (129,132), yüksek sICAM1 seviyelerinin gelecekteki kardiovasküler olaylar için prognostik bir risk faktörü olduğu ileri sürülmüştür.

Bütün bu bulgular ile KBY ve hemodiyaliz kronik inflamatuvar bir süreç olduğu ve enflamasyona bağlı salınan çeşitli sitokinlerin adezyon molekülünü sentez ve salınımını arttırdığı sonucuna varılabilir. Bizde çalışmamızda daha önce yapılan çalışmalarla benzer şekilde hemodializ tedavisi gören hasta grubunda sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek ICAM1 ve VCAM1 düzeyleri bulduk. Ancak dialize girilen süreler göz önüne alınarak yapılan gruplandırmada adezyon molekülleri açısından dializ süresinin etkili olmadığını gördük. Buda bize ICAM-1 ve VCAM-1 düzeylerindeki artışın sadece hemodiyalize bağlı olmadığını, diğer araştırmacıların ileri sürdüğü gibi multifaktöriyel olabileceğini düşündürmüştür.

VII. SONUÇ

Kronik böbrek yetmezliği hastalarında kardiyovasküler olaylara bağlı mortalite ve morbiditenin yüksek olduğu bilinmektedir. Bizde alışmamızda kronik böbrek yetmezliği olup hemodiyaliz tedavisi gören hastalarda, koroner arter hastalığı için bağımsız bir risk faktörü olan ADMA düzeylerini değerlendirdik. Bulgularımız daha önce yapılan çalışmaları destekler nitelikte olup hemodiyaliz tedavisi gören hastalarda kontrol grubuna göre yüksekti.

Bizim çalışmamızın daha önce yapılan çalışmalardan farkı hemodiyaliz tedavi süresinin ADMA, NO üzerine etkisinin olup olmadığını araştırmaktı. Sonuçlarımız hemodiyaliz tedavisi gören kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda serum ADMA düzeylerinin yükseldiğini ancak hemodiyaliz tedavi süresinin ilişkili olmadığını göstermiştir.

Çalışmamızda aynı zamanda aterogenez morfolojisinde rol oynayan adezyon moleküllerinden sICAM-1 ve sVCAM-1 düzeyleride değerlendirildi. ADMA düzeylerine benzer şekilde bu parametrelerde'de yüksek değerler gözlemlendi.

VIII. ÖZET

Son dönem böbrek yetmezliği tanı ve tedavideki ilerlemelere rağmen morbidite ve mortalitesi yüksek olması nedeni ile halen önemini korumaktadır. Son dönem böbrek yetersizliği olan hastalarda en önemli ölüm nedeni kardiyovasküler hastalıklardır.

Asimetrik dimetil arginin (ADMA) endojen Nitrik Oksit sentaz inhibitörüdür. Lokal Nitrik Oksit (NO) sentezini engelleyerek vazospazma ve endotel disfonksiyonuna neden olmakta ve koroner arter hastalık gelişimi için risk faktörü olarak kabul edilmektedir.

Ateroskleroz gelişim süreci kompleks bir süreçtir ve multifaktöryel nedenlere dayanmaktadır. Bunların içinde en önemli rolü endotelyal disfonksiyon oynamaktadır. Ateroskleroz morfolojisinde rol alan faktörlerden biriside adezyon molekülleridir. Adezyon molekülleri ekstraselüler matriks veya diğer hücreler arasındaki adezyonu sağlayan ligand veya reseptörlerden oluşan heterojen bir gruptur. İCAM-1 ve VCAM-1 de immünoglobülin süper ailesinden adezyon molekülleridir.

Bu çalışmanın amacı hemodiyaliz tedavisi gören hastalarda, ADMA, NO, İCAM-1 ve VCAM-1 düzeylerine bakmak ve hemodiyaliz tedavi sürelerinin bu markerlar üzerine etkisini incelemektir.

Çalışmamızda 75 hemodiyaliz tedavisi alan son dönem böbrek yetmezlikli hasta (0-2 yıl, 3-4 yıl, 5-6 yıl, 7-8 yıl, 9-10 yıl tedavi gören) ve kontrol grubu içinde görünürde sağlıklı 15 kişiden oluşturuldu. ADMA ve arjinin düzeyleri HPLC metoduyla floresans dedektörde ölçüldü. Serum Nitrit/Nitrat, İCAM-1 ve VCAM-1 konsantrasyonları ticari ELİSA kiti ile ölçüldü.

Hemodiyaliz hastalarında ADMA seviyeleri kontrol grubuna kıyasla yüksek olarak bulundu. NO seviyeleri ise 5-6, 7-8, 9-10 yıldır tedavi gören grupta kontrol ile karşılaştırıldığında düşüktü. Serum İCAM-1 ve VCAM-1 düzeyleri hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksekti. Hemodiyaliz tedavisi görülen süreye göre hasta grupları karşılaştırıldığında, hiçbir parametrede gruplar arasında anlamlı fark görülmedi.

Sonuç olarak; hemodiyaliz hastalarında serum ADMA, ICAM-1 ve VCAM-1 düzeylerinin arttığı ancak bu artışın hemodiyaliz tedavi süresi ile ilişkili olmadığı saptanmıştır.

IX. SUMMARY

End stage renal disease is still an important healthcare problem despite the new advances in diagnosis and treatment because of its high morbidity and mortality. Cardiovascular diseases are the leading cause of death among patients with end-stage renal disease.

Asymmetric Dimethyl Arginine (ADMA) is an endogenous inhibitor of nitric oxide (NO) synthase and causes local vasospasm and endothelial dysfunction by inhibiting local NO production. Therefore ADMA is evaluated as a secondary risk factor for coronary artery disease. Atherosclerosis development is a complex process and endothelial dysfunction plays a crucial role in patients with coronary atherosclerosis. Adhesion molecules plays an important role in atherosclerosis morphology. Adhesion molecules are a heterogeneous class of ligands/receptors that mediate cell adhesion either to other cells or to the extracellular matrix. ICAM-1 and VCAM-1 are the members of immunoglobulin superfamily of adhesion molecules.

The goal of this study was to examine the levels of serum ADMA, NO, ICAM-1 and VCAM-1 in patients with chronic renal failure (CRF) who treated with hemodialysis. We investigated the effects of hemodialysis treatment duration to these markers.

Seventyfive CRF subjects (0-2 years, 3-4 years, 5-6 years, 7-8 years, 9-10 years) participated in this study. To be selected patients had to have no other diseases. The control group was formed by fifteen apparently healthy people. ADMA and arginine levels were measured by HPLC with fluorescence detection. Serum Nitrite/Nitrate, ICAM-1 and VCAM-1 concentrations were determined using a commercial ELISA kit. Statistical analyses were done by using SPSS 13.0 for Windows One-Way ANOVA multiplied comparison.

Patients of CRF had significant higher values of ADMA compared to control group. NO levels were lower in three groups who treated 5-6, 7-8, 9,10 years compared to control group. Serum ICAM-1 and VCAM-1 levels were significantly higher than control group. No significant difference was observed

when the patient (subject) groups were compared in terms of hemodialysis treatment periods.

Consequently, our investigation have shown that the levels of serum ADMA, ICAM-1 and VCAM-1 levels increased although this increase was not affected by the period in which hemodialysis treatment was applied.

X. KAYNAKLAR

- 1) NKFK/DOQI Guidelines 2002.
- 2) Collins AJ. Cardiovascular mortality in end-stage renal disease. *Am J Med Sci.* 2003 Apr; 325(4): 163-167. Review.
- 3) Paparello J, Kshirsagar A, Battle D. Comorbidity and cardiovascular risk factors in patients with chronic kidney disease. *Semin Nephrol.* 2002 Nov;22(6): 494-506.
- 4) Tammy Keough-Ryan, MD, Tom Hutchinson, MB, BCh, Brenda MacGibbon, PhD Martin Senecal, MSc. Studies of prognostic factors in end-stage renal disease: an epidemiological and statistical critique. *Am J Kidney Dis.*2002; 39: 1196-1205.
- 5) Jaradad MI, Molitoris BA. Cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *Semin Nephrol.* 2002 Nov; 22(6): 459-473.
- 6) Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions on the vascular endothelium. *N Eng J Med* 1990; 323: 27-36.
- 7) Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; 288: 273-276.
- 8) Furchgott RF, The Discovery of Endotheliumderived relaxing factor and its importance in the identification of nitric oxide.*J Am Med Assn.* 1996; 276: 1186-1188.
- 9) C. S. Atabekoğlu, Y. Engin, Y. Üstün. R, Aytaç, Üreme Fizyolojisi ve Adhezyon Molekülleri. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* 2002; Cilt 55, Say 1: 85-92
- 10) Libby P, Li H. Vascular cell adhesion molecule-1 and smooth muscle cell activation during atherogenesis. *J Clin Invest* 1993; 92: 538-539.
- 11) Mugge A, Hanefeld C, Boger RH: Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine and the risk of coronary heart disease: rationale and design of the multicenter Cardiac study. *Atheroscler Suppl* 2003; 4: 29-32.
- 12) Leiper JM , Vallance P: The synthesis and metabolism of asymmetric dimethylarginine (ADMA) . *Eur J Clin Pharmacol* 2005; 8: 1-6.

- 13) Cooke JP: Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 2032-2037.
- 14) Jiang J, Tang Y, Li N, Deng H, Li Y: Effect of simvastatin on endothelium-dependent vasorelaxation and endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *Acta Pharmacol* 2004; 25: 893-901.
- 15) Sela BA: ADMA (Asymmetric dimethylarginine) the inhibitor of nitric oxide (NO) Synthesis: a new marker for vascular pathology. *Harefuah* 2005; 144 : 655-9
- 16) Endemann DH, Schiffrin E: Endothelial Dysfunction. *J Am Soc. Nephrol* 2004; 15: 1983-1992.
- 17) El Nahas M. Chronic renal failure and the uremic syndrome. Progression of chronic renal failure. Johnson Rj, Freehally J (8eds). In: *Comprehensive Clinical Nephrology*. Mosby (Elsevier limited) 2nd edition Philadelphia, Pennsylvania, USA: 843-856.
- 18) Posthuma N, Ter Wee PM, Donker AJM, Assessment of the effectiveness, and biocompatibility of icodextrin in automated peritoneal dialysis 2000; *Perit Dial Int* 200, 20 (suppl.2): 106-113.
- 19) Menso J. Nube. The acute phase response in chronic haemodialysis patients: a marker of cardiovascular disease ?. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17(Suppl 3): 19-23.
- 20) Culleton BF, Larson MG, Wilson PW, Evans JC, Parfrey PS, Levy D. Cardiovascular disease and mortality in a community-based cohort with mild renal insufficiency. *Kidney Int.* 1999 Dec; 56(6): 2214-2219.
- 21) Garg AX, Clark WF, Haynes RB, House AA. Moderate renal insufficiency and the risk of cardiovascular mortality: results from the NHANES I. *Kidney Int.* 2002 Apr; 61(4): 1486-1494.
- 22) Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD. Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis *N Engl J Med.* 2000; 342: 1478-1483
- 23) Gorenflo M., Zheng, C., Werle, E., Fiehn, W., Ulmer HE., Plasma levels of asymmetrical dimethyl-L-arginine in patients with congenital heart disease and pulmonary hypertension, *J. Cardiovasc. Pharmacol* 2001; 37: 489-492.

- 24) Tokgözüoğlu L. Ateroskleroz patogenezi. istanbul ARGOS iletişim ve yayıncılık, 2001; 21-29
- 25) Michael, E.W., Noyan, G., Keaney, J.F., and Joseph, A.V. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 42: 1149-1160 (2203).
- 26) Marletta MA. Nitric oxide synthase: aspects, concerning structure and catalysis. *Cell* 1994; 78: 927-30.
- 27) Furcghott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376.
- 28) Cooke JP, Tsao PS. Cytoprotective effects of nitric oxide. *Circulation* 1993; 88: 2451-2454.
- 29) Bergmann L, Kröncke K-D, Suschek C, Kolb H, Kolb-Bachofen V. Cytotoxic action of IL-1 β against pancreatic islets is mediated via nitric oxide formation and is inhibited by Nmonomethyl-L-arginine. *FEBS Lett* 1992; 299: 103-106.
- 30) Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 1992; 26: 1898-1902.
- 31) Anggard E. Nitric oxide Mediator, murder, and medicine. *Lancet* 1994; 343: 1199 -1206.
- 32) Darley-Usmar V, Halliwell B. Blood radicals-Reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system. *Pharmacol Res* 1996; 13: 649-662.
- 33) Kerwin JF Jr, Lancaster JR Jr, Feldman PL. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J Med Chem* 1995; 38: 4343-4362.
- 34) Schmidt HHW, Walter U. NO at work. *Cell* 1994; 78: 919-925
- 35) Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992; 6: 3051-3064.
- 36) Böger, R.H. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc. Res* 2003; 34: 14781-14787
- 37) Haverkate F, Thompson SG. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. *The Lancet* 1997; 349: 462-466.
- 38) Bayındır O. Nitric oksidin reaktivitesi, sentezi ve analiz metodları. EÜTF Yayınları 1996; 83: 14-21.

- 39) Moncada S, Palmer R, M.J, Higgs A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharm. Rev* 1991; 43: 109-141
- 40) Naseem KM. The Role of Nitric Oxide In Cardiovascular Disease Molecular Aspects of Medicine 2005; 26: 33-65.
- 40) Clarke S. Protein methylation. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5: 977–983.
- 41) McBride AE, Silver PA. State of the Arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell* 2001;106: 5–8.56
- 42) Krause CD, Yang ZH, Kim YS, Lee JH, Cook JR, Pestka S. Protein arginine methyltransferases: Evolution and assessment of their pharmacological and therapeutic potential. *Pharmacol Ther* 2006.
- 43) Boger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, Tsikas D, Bode-Boger SM. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res.* 2000; 87: 99–105.
- 44) Lentz SR, Rodionov RN, Dayal S. Hyperhomocysteinemia, endothelial dysfunction and cardiovascular risk: the potential role of ADMA. *Atherosclerosis Supplements* 2003; 4: 61-65.
- 45) Yıldırım AO, Bulau P, Zakrzewicz D, Kitowska KE, Weissmann N, Grimminger F, Morty RE, Eickelberg O. Increased Protein Arginine Methylation in Chronic Hypoxia: Role of Protein Arginine Methyltransferases. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006; 35: 436-443.
- 46) Vallance P, Leiper J. Cardiovascular Biology of the Asymmetric Dimethylarginine: Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase Pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 1023-1030.
- 47) Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Purification and properties of a new enzyme. NG,Ngdimethylarginine dimethylaminohydrolase from rat kidney. *J Biol Chem.* 1989; 264: 10205–10209.
- 48) Kimoto M, Whitley GS, Tsuji H, Ogawa T. Detection of NG, NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase in human tissues using a monoclonal antibody. *J Biochem.* 1995; 117: 237–238.

- 49) Tran Cam TL, Fox MF, Vallance P, Leiper J. Chromosomal localization, gene structure and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins. *Genomics* 2000; 68: 101–105.
- 50) Leiper J, MacAllister R, Whitley G, Santa Maria J, Chubb A, Charles I, Vallance P. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology to microbial arginine deiminases. *Biochem J.* 1999; 343: 209–214.
- 51) Arrigoni FI, Vallance P, Haworth SG, Leiper JM. *Circulation.* 2003; 107: 1195-1201.
- 52) MacAllister RJ, Parry H, Kimoto M, Ogawa T, Russell RJ, Hodson H, et al. Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Br J Pharmacol* 1996; 119: 1533–1540.
- 53) Zeiher, A.M., Schachinger, V., Minners, J. Long term cigarette smoking impairs endothelium dependent coronary arterial vasodilator function. *Circulation* 1995; 92: 1094-1100.
- 54) Kielstein JT, Boger RH, Bode-Boger SM, Frolich JC, Haller H, Ritz E, Fliser D. Marked increase of asymmetric dimethylarginine in patients with incipient primary chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 170–176.
- 55) Tojo A, Welch WJ, Bremer V, Kimoto M, Kimura K, Omata M, Ogawa T, Vallance P, Wilcox CS: Colocalization of demethylating enzymes and NOS and functional effects of methylarginines in rat kidney. *Kidney Int* 1997; 52: 1593–1601.
- 56) Nijveldt RJ, Van Leeuwen PA, Van Guldener C, Stehouwer CD, Rauwerda JA, Teerlink T. Net renal extraction of asymmetrical (ADMA) and symmetrical (SDMA) dimethylarginine in fasting humans. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 1999–2002.
- 57) Wagner L, Riggleman A, Erdely A, Couser W, Baylis C. Reduced nitric oxide synthase activity in rats with chronic renal disease due to glomerulonephritis. *Kidney Int* 2002; 62: 532–536.

- 58) Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, MacAllister R, Vallance P. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1455–1459.
- 59) Xiong Y, Fu YF, Fu SH, Zhou HH. Elevated levels of the serum endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and metabolic control in rats with streptozotocin induced diabetes. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003; 42: 91–196.
- 60) Paiva H, Lehtimäki T, Laakso J, Ruukonen I, Rantalaiho V, Wirta O, Pasternack A, Laaksonen R. Plasma concentrations of asymmetric-dimethylarginine in type 2 diabetes associate with glycemic control and glomerular filtration rate but not with risk factors of vasculopathy. *Metabolism* 2003; 52: 303–307.
- 61) Yan Xiong T, Leib M, Fua S, Fua Y. Effect of diabetic duration on serum concentrations of endogenous inhibitor of nitric oxide synthase in patients and rats with diabetes. *Life Sciences* 2005; 77: 149–159.
- 62) Stuhlinger MC, Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin TL, Cooke JP, Reaven GM, Tsao PS. Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *JAMA* 2002; 287: 1420–1426.
- 63) Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Tsuji H, Reaven GM, Cooke JP. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 2002; 106: 987-992.
- 64) Won Bae S, Stühlinger MC, Yoo HS, Hyun KY, Park HK. Plasma Asymmetric Dimethylarginine Concentrations in Newly Diagnosed Patients With Acute Myocardial Infarction or Unstable Angina Pectoris During Two Weeks of Medical Treatment *Am J Cardiol* 2005; 95: 729–733.
- 65) Zoccali C, Mallamaci F, and Tripepi G. Novel Cardiovascular Risk Factors in End-Stage Renal Disease *Journal of the American Society of Nephrology* 2004; 15: 77–80.
- 66) Hodis HN, Mack WJ, Labree L et al. The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events. *Ann Intern Med* 1998; 128: 262–269.

- 67) Kielstein JT, Böger RH, Bode-Böger SM. Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: Relationship to treatment method and atherosclerotic disease. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 594–600.
- 68) Böger RH, Bode-Böger SM, Heistad DD, Lentz SR. Elevated plasma concentration of asymmetric dimethylarginine (ADMA), an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, in monkeys with hyperhomocysteinemia. *Circulation* 1998; 98: I-733.
- 69) Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules-part I. *N Engl J Med* 1996; 334: 1527-1529.
- 70) Holtfreter J. Significance of the cell membrane in embryonic processes. *Ann NY Acad Sci* 1948; 49: 709-760.
- 71) Feldmann M. Intercellular adhesion molecules, Eds; Roitt I, Brastaffl J, Male D. *Immunology*. Barcelona Mosby; 1996; 143-145.
- 72) Haznedaroğlu IC, Benekli M. Adezyon molekülleri. *Türk Hematoloji-Onkoloji Dergisi* 1998; 4(8): 252-254.
- 73) Loster K., Kannicht C. Enzymatic quantification of cell-matrix and cell-cell adhesion. *Micron* 2000; 31: 41-53.
- 74) Behrens J. Cadherins as determinants of tissue morphology and suppressors of invasion. *Acta Anat (Basel)* 1994 ; 149 : 165-169.
- 75) Hyafil F, Babinet C, Jacop F. Cell-cell interactions in early embryogenesis: a molecular approach to the role of calcium. *Cell* 1981 ; 26 : 447-454.
- 76) Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of The Cell*. 4th Ed. New York 2002; Chapter: 19. p. 1065-1126.
- 77) Luscinca F.W, Lawler J. Integrins as dynamic regulators of vascular function. *FASEBJ* 1994; 8: 929-938.
- 78) Filiz S. Hücre adezyon moleküllerinden N-CAM ve PAN-Kaderin immünreaktivitesinin erişkin sıçan dokularında dağılımının immünohistokimyasal yöntemle incelenmesi. KOÜ Tıp Fakültesi. Uzmanlık Tezi. Kocaeli 2000.

- 79) Aplin A.E, Howe A, Alahari S.K, Juliano R.L. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol. Rev.* 1998; 50: 197-263.
- 80) Springer T.A. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu. Rev. Physiol* 1995; 57: 827.
- 81) Kansas G.S. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 1996; 88: 3259-3287.
- 82) Hope S.A, Meredith IT. Cellular adhesion molecules and cardiovascular disease. Part I. Their expression and role in atherogenesis. *Intern. Med. J.* 2003; 33: 380-386.
- 83) Syrigos K.N, Harrington K.J, Pignatelli M. Role of adhesion molecules in bladder cancer: an important part of the jigsaw. *Urology* 1999; 53: 428-434.
- 84) Williams A.F. A year in the life of the immunoglobulin superfamily. *Immunol. Today* 1987; 8: 298-303.
- 85) Tanaka S, Sakata Y, Morimoto K, Tambe Y, Watanabe Y, Honda G, Tabata M, Oshima T, Masuda T, Umezawa T, Shimada M, Nagakura N, Kamisako W, Kashiwadw Y, Ikeshiro Y. Influence of natural and synthetic compounds on cell surface expression of cell adhesion molecules, ICAM-1 and VCAM-1: *Planta Med* 2001; 67.
- 86) Crockard AD, Boylan MT. Corticosteroids Effects on Neutrophil Adhesion Molecules. *Int J Clin Laboratuvar Res* 1998; 28: 110-115.
- 87) Fawcett J, Holness CL, Needham LA, Turley H, Gatter KcMason DY, Simmons DL. Molecular Cloning of ICAM-3, a third ligand for LFA-1, constitutively expressed on resting leukocytes. *Nature* 1992; 3: 360(6403): 481-484.
- 88) Skubitz KM, Ahmed K, Campbell KD, Skubitz AP. CD50 (ICAM-3) is phosphorylated on tyrosine and is associated with tyrosine kinase activity in human neutrophils. *J Immunol* 1995; 15; 154 (6): 2888-2895.
- 89) Van der Vieren M, Le Trong, H, Wood CL, Moore PF, St John T, Staunton DE, Gallatin WM. A novel leukointegrin, alpha d beta 2, binds preferentially to ICAM-3. *Immunity* 1995; 3(6): 683-690.

- 90) Hynes RO. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 3; 69(1): 11-25.
- 91) Hernandez-Caselles T, Rubio G, Campanero MR, delPazo MA, Muro M, Sanchez Madrid F, Aparicio P. ICAM-3, the third LFA-1 counterreceptor, is costimulatory molecule for both resting and activated T lymphocytes. *Eur Jour Immunol* 1993; 23(11): 2799-806.
- 92) Eppihimer M.J., Russel J., Langley R., Vallien G., Anderson D.C., Grandeur D.N. Differential expression of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) in murine tissues. *Microcirculation* 1998; 5:179-188.
- 93) Desmet VJ. Adhesion molecules. *Hepato-Gastroenterology* 1996; 43: 1099-1102.
- 94) Etzioni A. Adhesion molecules: their role in health and disease. *Pediatric Research* 1996; 39: 191-198.
- 95) Abbas K.A., Lichtman A.H. *Cellular and Molecular Immunology*. 5th Ed. California 2003; Chapter: 6. p.:105-127, Chapter: 11. p.:243-275, Chapter: 12. p.: 275-298.
- 96) Kelly K. A., Natarajan S., Ruther P., Wisse A., Chang M.H., Ault K.A. Chlamydia trachomatis infection induces mucosal addressin cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1, providing an immunologic link between the fallopian tube and other mucosal tissues. *J. Infect. Dis* 2001; 184: 885-891.
- 97) Fisher N., Afford S., Adams D.H. Adhesion molecules and alcoholic liver disease. *Hepatogastroenterology* 1996; 43: 1113-1116.
- 98) Broome U., Hauzenberger D., Klominek J. Adhesion molecules in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Hepatogastroenterology* 1996; 43: 1109-1112.
- 99) Steinhoff G., Brandt M. Adhesion molecules in liver transplantation. *Hepatogastroenterology* 1996; 43: 1117-1123.
- 100) Figarella-Branger D., Civatte M., Bartoli C, Pellissier J.F. Cytokines, chemokines, and cell adhesion molecules in Inflammatory myopathies. *Muscle Nerve* 2003; 28: 659-682.

- 101) Frenette P.S, Wagner D.D. Adhesion molecules-Part IIN. Eng. J. Med 1996-
b; 335 :43-45.
- 102) C. Aytekin, A. İkinciöğulları Astım Allerji İmmünoloji 2004; 2(3): 157-166
- 103) Fliser D, Kronenberg F, Kielstein J.T, Morath C, Bode-Böger S.M, Haller H,
Ritz E. Asymmetric dimethylarginine and progression of chronic kidney disease:
The mild to moderate kidney disease study. J. Am. Soc. Nephrol 2005; 16: 2456–
2461.
- 104) Huysmans K, Lins RL, Daelemans R. Hypertension and accelerated
atherosclerosis in end-stage renal disease. J Nephrol 1998; 11: 185-195.
- 105) Shemin D, Lapane KL, Bausserman L. Plazma total homocysteine and
hemodialysis access thrombosis: a prospective study. J Am Soc Nephrol 1999; 10:
1095-1099.
- 106) Schomig M, eisenhardt A, Ritz E. The microinflammatory state of uremia.
Blood Purif 2000; 18: 327-332.
- 107) Francis G.S, Sharma B, Collins A.L, Helseth H.K, Comty C.M. Coronary
artery surgery in patients with end stage renal disease. Ann.Intern. Med 1980 92
(4): 499-503.
- 108) Chris Baylis, Am J Physiol Renal Physiol 2008; 294: F1–F9, First published
October 10, 2007; doi: 10.1152/ajprenal.00424.2007.
- 109) Desjardins F, Balligand JL. Nitric oxide–dependent endothelial function and
cardiovascular disease. Acta Clin Belg 2006; 61: 326-334.
- 110) Szuba A, Podgorski M. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) a novel
cardiovascular risk factor evidence from epidemiological and prospective clinical
trials. Pharmacol Rep 2006; 58: 16-20.
- 111) Panichi V, Mantuano E, Paoletti S, Santi S, Rizza G.M, Cutrupi S, Pizzini P,
Spoto B, Tripepi G, Zoccali C. Effect of simvastatin on plasma asymmetric
dimethylarginine concentration in patients with chronic kidney disease. J. Nephrol
2008; 21: 38-44.
- 112) Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an
endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. Lancet
1992; 339: 572–575.

- 113) Kari J.A, Donald A.E, Vallance D.T, Bruckdorfer K.R, Leone A, Mullen M.J, Bunce T, Dorado B, Deanfield J.E, Rees L. Physiology and biochemistry of endothelial function in children with chronic renal failure. *Kidney Int* 1997; 52: 468–472.
- 114) Hand M.F, Haynes W.G, Webb D.J, Hemodialysis and L-arginine, but not D-arginine, correct renal failure-associated endothelial dysfunction 1998; *Kidney Int* 53: 1068–1077.
- 115) Schmidt R.J, Domico J, Samsell L.S, Yokota S, Tracy T.S, Sorkin M.I, Engels K, Baylis C. Indices of activity of the nitric oxide system in hemodialysis patients. *Am. J. Kidney Dis* 1999; 34: 228-234.
- 116) Zoccali C, Bode-Böger S, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino L, Cataliotti A, Bellanuova I, Fermo I, Frölich J, Böger R. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: A prospective study. *Lancet* 2001; 358 (9299): 2113-2117.
- 117) Busch M, Fleck C, Wolf G, Stein G. Asymmetrical (ADMA) and symmetrical dimethylarginine (SDMA) as potential risk factors for cardiovascular and renal outcome in chronic kidney disease- possible candidates for paradoxical epidemiology? *Amino Acid* 2006; 30: 225-232.
- 118) Soveri I, Lind L, Wikström B, Zilmer M, Zilmer K, Fellström B. Improvement in central arterial pressure waveform during hemodialysis is related to a reduction in asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels *Nephron. Clin. Pract* 2007; 106: 180-186.
- 119) Csiky B, Sulyok E, Lakatos O, Wittmann I, Martens- Lobenhoffer J, Bode-Boger SM. Response of asymmetric dimethyl arginine to hemodialysis-associated hypotension in end stage renal disease patients. *Nephron. Clin. Pract* 2008; 108(2): 127-134.
- 120) Rabb H, Calderon E, Bittle PA, Ramirez G. Alterations in soluble intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 1996; 27: 239-243.
- 121) Bonomini M, Reale M, Santarelli P, Stuard S, Settefrati N, Albertazzi A. Serum levels of soluble adhesion molecules in chronic renal failure and dialysis patients. *Nephron* 1998; 79: 399-407.

- 122) Alcade G, Merino J, Sanz S. Circulating adhesion molecules during kidney allograft rejection. *Transplantation* 1995; 59: 1695-1699.
- 123) Stenvinkel P, Lindholm B, Heimbürger M, Heimbürger O. Elevated serum levels of soluble adhesion molecules predict death in predialysis patients: association with malnutrition, inflammation, and cardiovascular disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2000; 15: 1624-1630.
- 124) Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G. Inflammation and atherosclerosis in end stage renal disease. *Blood Purif* 2003; 21: 29–36.
- 125) Pober JS, Cotran RS: Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev* 1990; 70: 427–451.
- 126) Pigott R, Dillon LP, Hemingway IH, Gearing AJ. Soluble forms of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 are present in the supernatant of cytokine activated cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 187: 584-589
- 127) Hillis GS, Flapan AD. Cell adhesion molecules in cardiovascular disease: a clinical perspective. *Heart* 1999; 81: 101-102.
- 128) De Catarina R, Basta G, Lazzarini G. Soluble vascular adhesion molecule-1 as a biohumoral correlate of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1646-2654.
- 129) Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentrations of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risk of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* 1998; 351: 88-92.
- 130) Hwang S-J, Ballantyne CM, Sharrett AR. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation* 1997; 96: 4219-4225.
- 131) Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and ather markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000; 342: 836-843.
- 132) Zeitler H, Ko Y, Zimmermann C. Elevated serum concentrations of soluble adhesion molecules in coronary artery disease and acute myocardial infarction. *Eur J Med Res* 1997; 2: 389-394.