

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
MERAM TIP FAKÜLTESİ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**Prof. Dr. İdris MEHMETOĞLU**  
ANABİLİM DALI BAŞKANI

**KRONİK OBSTRÜKTİF AKCİĞER HASTALARINDA  
SERUM ADMA ve NİTRİK OKSİT DÜZEYLERİ**

UZMANLIK TEZİ  
**Dr. Said Sami ERDEM**

TEZ DANIŞMANI  
**Doç. Dr. Ali ÜNLÜ**

KONYA-2006

# İÇİNDEKİLER

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. KOAH

#### 2.1.1. Tanım

#### 2.1.2. Epidemiyoloji ve Prevalans

#### 2.1.3. Risk Faktörleri

#### 2.1.4. Patogenez

#### 2.1.5. Pulmoner Hipertansiyon ve Kor Pulmonale

##### 2.1.5.1. Etyoloji

##### 2.1.5.2. Patogenez

### 2.2. Nitrik Oksit

#### 2.2.1. Genel Bilgi

#### 2.2.2. Nitrik Oksidin Yapısı

#### 2.2.3. Nitrik Oksidin Biyosentezi

#### 2.2.4. Nitrik Oksit Sentaz İzoenzimleri

#### 2.2.5. Nitrik Oksitin Biyolojik Etkileri

#### 2.2.6. Endotel Hücreleri ve Nitrik Oksit

#### 2.2.7. Nitrik Oksitin Sentezini Etkileyen Faktörler

### 2.3. Metil Arjininler

#### 2.3.1. Metil Arjininlerin Oluşumu ve Çeşitleri

### 2.4. Asimetrik Dimetilarjinin

#### 2.4.1. ADMA Metabolizması

#### 2.4.2. ADMA ile İlişkili Hastalıklar ve Patofizyolojik Olaylar

##### 2.4.2.1. Renal Hastalıklar

##### 2.4.2.2. Diyabet

##### 2.4.2.3. Kardiyovasküler Hastalıklar

##### 2.4.2.4. Homosistein ve ADMA

##### 2.4.2.5. Alzheimer

##### 2.4.2.6. Preeklampsi

##### 2.4.2.7. Karaciğer Yetmezliği ve Siroz

- 2.4.2.8. Hemorajik Şok
- 2.4.3. Adma Düzeyini Azaltma Stratejileri

### **3. MATERYAL VE METOD**

#### **3.1. MATERYAL**

- 3.1.1. Vakaların Oluşturulması ve Gruplandırma
- 3.1.2. Numunelerin Toplanması
- 3.1.3. Kullanılan Reaktif ve Çözeltiler
- 3.1.4. Kullanılan Cihazlar

#### **3.2. METOD**

- 3.2.1. ADMA ve Arjinin Analizi
  - 3.2.1.1. Mobil Faz Solüsyonlarının Hazırlanması
  - 3.2.1.2. Mobil Faz A'nın Hazırlanması
  - 3.2.1.3. Mobil Faz B'nin Hazırlanması
  - 3.2.1.4. Mobil Fazların Filtrasyonu ve Degaze Edilmesi
  - 3.2.1.5. ADMA Standart Hazırlanması
  - 3.2.1.6. Arjinin Standart Hazırlanması
  - 3.2.1.7. Numune Hazırlanması
  - 3.2.1.8. Derivatizasyon
  - 3.2.1.9. Pompa
  - 3.2.1.10. Deteksiyon
  - 3.2.1.11. ADMA Standart Çalışmaları
  - 3.2.1.12. Arjinin Standart Çalışmaları
  - 3.2.1.13. ADMA ve Arjinin Tekrarlanılabilirlik Çalışmaları
    - 3.2.1.13.1. ADMA Tekrarlanılabilirlik
    - 3.2.1.13.2. Arjinin Tekrarlanılabilirlik
  - 3.2.1.14. ADMA Arjinin Geri Kazanım Çalışması (Recovery)
  - 3.2.1.15. Diğer L-Arjinin, ADMA, SDMA Ölçüm Yöntemleri

### 3.2.2. Nitrit ve Nitrat Düzeyleri Ölçümü

#### 3.2.2.1. Reaktiflerin Hazırlanması

#### 3.2.2.2. Standart Hazırlanması

#### 3.2.2.3. Çalışma Prensibi

### 3.3. İstatiksel Analiz

## 4. BULGULAR

4.1. Hasta ve Kontrol Grubu SFT, Yaş ve Kan Gazları Sonuçları

4.2. Hasta ve Kontrol Grubu ADMA, Arjinin ve Nitrik Oksit Sonuçları

4.3. Stabil KOAH, Atak KOAH, Kor Pulmonale ve Kontrol Gruplarının ADMA, Arjinin ve Nitrik Oksit Sonuçları

4.4. Korelasyon Çalışmaları

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

## 6. ÖZET

## 7. SUMMARY

## 8. KAYNAKLAR

## 9. ÖZGEÇMİŞ

## 10. TEŞEKKÜR

## KISALTMALAR

- ADMA: Asimetrik Dimetilarjinin  
SDMA: Simetrik Dimetilarjinin  
NO: Nitrik Oksit  
KOAHA: Kronik Obstruktif Akciğer Hastalığı  
SFT: Solunum Fonksiyon Testi  
AKG: Arteryel Kan Gazları  
PAB: Pulmoner Arter Basıncı  
PRMT: Protein Arjinin Metil Transferaz  
NOS: Nitrik Oksit Sentaz  
L-NMMA: N-Monometil L-arjinin  
DDAH: Dimetil Arjinin Dimetil Amino Hidrolaz  
eNOS: Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz  
SAM: S-Adenozil Metionin  
SAH: S-Adenozil Homosistein  
MTHFR: Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz  
THF: Tetrahidrofolat  
HCY: Homosistein  
ACE: Anjiotensin Converting Enzim  
NIDDM: Noninsülin Dependent Diabetes Mellitus  
HPLC: Yüksek Performans Likit Kromatografi  
CE-LIF: Floresansla İndüklenmiş Kapiller Elektroforez  
LC-MS: Likit kromatografi-Kütle spektrometrisi  
GC-MS: Gaz kromatografi-Kütle spektrometrisi  
EDRF: Endotel Kaynaklı Serbestleştirici Faktör  
EDNO: Endotel Kaynaklı Nitrik Oksit  
FEV<sub>1</sub> : Zorlu Expiratuar volümün 1. saniyedeki değeri  
FVC : Zorlu Vital Kapasite  
RV : Rezidüel Volüm  
TLC : Total Akciğer Kapasitesi  
VC : Vital Kapasite  
PaO<sub>2</sub> : Parsiyel Arteryel Oksijen Basıncı  
PaCO<sub>2</sub> : Parsiyel Arteryel Karbondioksit Basıncı  
OPA: o-Fitaldialdehid

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), tüm dünya ülkelerinde önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Hiperkapni, hipoksemi, kronik kor pulmonale ve kilo kaybı KOAH'ın geç görülen etkileri olup bunların varlığı hastalığın prognozu ile pozitif korelasyon gösterir. KOAH mortalite nedenlerinden en önemlilerinden birisi pulmoner hipertansiyondur. Pulmoner hipertansiyon gelişiminde kronik obstrüktif akciğer hastalığının önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Pulmoner hipertansiyon varlığı hastalığın mortalitesini önemli derecede arttırmaktadır. Pulmoner arter basınç artış nedenlerinden birisi de güçlü vazodilatatör etkili nitrik oksit (NO) etkinliğinin azalması olarak kabul edilmektedir. Kronik hipoksiye sekonder pulmoner hipertansiyon nitrik oksit sentaz (NOS) enzimlerinin artmış pulmoner ekspresyonu ile birlikte dir. Buna rağmen bu hastalıkta nitrik oksit pulmoner üretiminin azalmış olduğu gösterilmiştir. NO sentezini regüle eden NOS enziminin aktivitesi ise endojen bir inhibitör olan asimetrik dimetilarjinin (ADMA) molekülü ile düzenlenmektedir. ADMA'nın NO'nun endojen inhibitörü olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (1).

ADMA düzeylerindeki değişimler tespit edilerek KOAH hastalarında kor pulmonaleye gidişte ADMA'nın yükselmesinin etkili olup olmadığı konusunda aydınlatıcı ipuçlarına ulaşılabilir ve yine bu hastalarda NO mekanizmasının rolü konusunda fikir edinilebilir. KOAH'lı hastalarda asimetrik dimetilarjinin düzeyleri tespit edilerek bu hastalarda ateroskleroz gelişim riski belirlenebilir.

Çalışmamızın amacı kor pulmonale ile birlikte olan ve olmayan kronik obstrüktif akciğer hastalığı olan hastaların kan ADMA, NO ve arjinin düzeylerini ölçmektir. Asimetrik dimetilarjinin düzeylerindeki değişimlerin pulmoner hipertansiyon ya da klinik tablosu olan kor pulmonalenin oluşumunda katkısının olup olmadığını ve diagnostik bir belirteç olup olmayacağını araştırmaktır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAİ)**

#### **2.1.1. TANIM**

Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı, kronik bronşit ve amfizeme bağılı sık rastlanan kronik, irreversibl ve progresif hava akımı kısıtlanması olarak tanımlanmaktadır. Hava akımı kısıtlanması genellikle ilerleyicidir (2). Halen KOAH'ın herkes tarafından onaylanmış tarifinin olmamasına karşın en çok kullanılan tanımı American Thoracic Society (ATS)'nin KOAH tanı ve tedavisine ilişkin en son 1995 yılında yayınladığı "Tanı ve Tedavi Rehberi"nde önerdiği tanımlamalardır (3).

2003 yılında yayınlanan KOAH tanısı, tedavisi ve önlenmesi için küresel strateji NHLBI/WHO çalışma raporunda (GOLD; Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) KOAH şu şekilde tanımlanmaktadır: KOAH tam olarak geri dönüşlü olmayan hava akımı sınırlanması ile karakterize bir hastalık durumudur. Hava akımı sınırlanması genellikle ilerleyicidir ve zararlı partikül ve gazlara karşı akciğerlerde gelişen anormal inflamatuvar yanıtla ilişkilidir (4).

#### **2.1.2. Epidemiyoloji ve Prevalans**

KOAİ, tüm dünya ülkelerinde önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Önemli oranda sakatlığa, üretim kaybına ve yaşam kalitesinde azalmaya neden olur. Genel populasyon içinde KOAH'lıların yalnızca %25' inin tanı aldığı tahmin edilir (5).

Hastalık klinik olarak belirgin hale gelinceye ve orta derecede ilerleyene kadar genellikle teşhis edilememektedir. KOAH, tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu ve ekonomik yük olmaya devam etmekte, prevalansı ve buna bağılı mortalite giderek artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ve Dünya Bankası'nın desteğı ile yapılan Küresel Hastalık yükü çalışmasında 1990 yılında tüm dünyada KOAH prevalansı erkeklerde 9.34/1000, kadınlarda da 7.33/1000 olarak tahmin edilmiştir. KOAH prevalansı sigara içiminin çok yaygın olduğu ülkelerde en yüksek düzeyde iken sigara içiminin daha az olduğu ülkelerde en düşük düzeydedir (4).

Mevcut sınırlı verilere göre KOAH'a bağılı morbidite yaşla artmaktadır ve erkeklerde kadınlardan daha yüksektir. KOAH hekime başvurma, acil servise başvurma ve hastaneye yatışlardan önemli oranda sorumlu bir hastalıktır (4). KOAH halen dünyada en sık görülen

altıncı ölüm nedenidir ve önümüzdeki yıllarda hastalığın prevalansı ve mortalitesinin daha da artması beklenebilir (6).

### 2.1.3. Risk Faktörleri

KOAH'la ilgili risk faktörleri hem konakçı ile ilgili faktörleri hem de çevresel maruziyetleri içermektedir. Hastalık genellikle bu iki tip faktörün karşılıklı etkileşimi ile ortaya çıkmaktadır (4).

Tablo 1. KOAH'ta risk faktörleri

Kesinlik Derecesi	Çevre Faktörleri	Konakçı Faktörleri
Kesin	Sigara Mesleki maruziyet	Alfa-1 Antitripsin eksikliği
Büyük Olasılıkla	Hava kirliliği Sosyoekonomik durum Çocukluk solunum enfeksiyonları Alkol	Düşük doğum ağırlığı Atopi (IgE yüksekliği) Bronş hiperreaktivitesi Aile öyküsü
Tahmin Edilen	Adeno virüs enfeksiyonları Diyet	Genetik predispozisyon A grubu kan Non-sekretuar IgA

Tartışmasız en önemli risk faktörü sigara içimidir. Sigaranın KOAH gelişme riskinde %80-90 oranında sorumlu olduğu tahmin edilmektedir. Sigara içmeyenlerle karşılaştırıldığında, sigara içenlerde akciğer fonksiyon anormalliği ve solunum semptomları prevalansı daha yüksektir. Yıllık FEV<sub>1</sub> kaybı ve KOAH nedeniyle gerçekleşen ölüm hızları daha fazladır. Pipo ve puro içenlerde de sigara içmeyenlere göre KOAH'a bağlı morbidite ve mortalite oranları daha yüksektir. Ancak burada gözlenen farklılık sigara içenlerdekine göre daha düşük düzeydedir. Sigara içenlerin tümünde klinik olarak belirgin KOAH gelişmez. Bu durum, genetik faktörlerin her bir bireysel riski değiştirebileceğini düşündürmektedir. Sigara dumanına pasif maruziyet de, inhale edilen partikül ve gazların akciğerlerdeki toplam yükünü artırarak solunum semptomlarının ve KOAH'ın gelişiminde rol oynayabilir. Gebelik süresince sigara içimi, intrauterin akciğer gelişimini ve büyümesini ve olasılıkla da immun sistemin

olgunlaşmasını etkileyerek fetus için risk oluşturabilir (4). Mesleki tozlar ve kimyasallara (buharlar, iritanlar, gazlar) yeterli yoğunluk veya süre maruz kalındığında, sigara içmeden bağımsız olarak KOAH gelişebilir. Eş zamanlı sigara içimi varlığında ise hastalık gelişme riski artabilir. KOAH gelişme riskinin sosyo-ekonomik düzey ile ters yönde ilişkili olduğunu gösteren kanıtlar bulunmaktadır. Çocukluk döneminde şiddetli solunum yolu enfeksiyonu geçirme öyküsü, yetişkinlik döneminde akciğer fonksiyonlarında azalma ve solunum yolu semptomlarında artma ile ilişkilidir (4).

KOAH için genetik bir etki söz konusudur. Fakat Mendel tarzı geçiş olmadığından, tek bir geni sorumlu tutmak olanaksızdır (7). Bu güne kadar kesin olarak ispatlanmış tek genetik risk faktörü herediter  $\alpha_1$ -antitripsin yetmezliğidir. KOAH hastalarının tahminen sadece %1-2'sinde ciddi  $\alpha_1$ -antitripsin yetmezliği mevcuttur (8).

#### **2.1.4. Patogenez**

KOAH'daki patolojik tabloyu büyük hava yolları, küçük hava yolları ve akciğer parankiminde görülen inflamatuvar değişiklikler oluşturur. Hastalık ilerlediğinde pulmoner vasküler sistem, kalp ve solunum kasları etkilenir. KOAH hastalarının büyük hava yollarında çok sayıda morfolojik değişiklikler tanımlanmıştır. Kronik bronşitin temel özelliği olan aşırı mukus salgılanması büyük hava yollarından kaynaklanmaktadır. Sigara dumanı, sık geçirilen bakteriyel enfeksiyonlar ve diğer iritanların etkisi ile yüzey epitelinde, submukozal bezlerde ve kas dokusunda birçok değişiklikler olur. Epitelyal değişiklikler arasında; lokal squamöz metaplazi, atrofi, siliyalı hücrelerde sayısal olarak azalma ve siliya uzunluğunda kısalma görülür. Submukozal bez kütlelerinde (sayı ve büyüklüğünde) ve yüzey epitelindeki mukus salgılayan hücrelerin (goblet hücreleri) sayısında artış olur. Böylece aşırı mukus salgısına, mukosiliyer fonksiyon bozukluğu da eklenerek hava akımı kısıtlanmasına katkıda bulunur (9).

KOAH'da hava yolu direnci artışının en önemli nedeni küçük hava yollarında oluşan yapısal değişikliklerdir. Küçük hava yolları çapı 2 mm ve daha küçük olan membranöz bronşları ve bronşioelleri kapsar. KOAH hastalarının küçük hava yollarında histopatolojik olarak tespit edilen başlıca bulgular; bronş lümeninde mukus artışı ve tıkaçlar, goblet hücrelerinin sayısal olarak artışı, bronş duvarı inflamasyonu, fibrozis, düz kas hipertrofisi, bronşiol-alveol bağlarının kopması, bronşioellerde daralma ve bükülmelerdir (10).

KOAH'ta akciğer damarlarındaki değişiklikler hastalığın doğal gelişiminin erken dönemlerinde başlayan damar duvarı kalınlaşması ile karakterizedir. İntimadaki kalınlaşma ilk yapısal değişikliktir (4).

Alveolar hipoksi intraselüler kalsiyumu artırarak düz kas hücrelerinde kontraksiyona ve böylece pulmoner vazokonstrüksiyona neden olur. Hipoksik periyot uzarsa pulmoner vasküler sistemde yapısal değişiklikler meydana gelir. Pulmoner vasküler yapısal değişiklikler endotelial hücreler, medial düz kas hücreleri ve adventisyal fibroblastların proliferasyonunda artış ve nonmusküler küçük arterlerde muskularizasyon ile karakterizedir (11,12).

Kollajen ve mukopolisakkarit birikimi de intimal kalınlaşmayı artırır. Kronik hipoksi nedeniyle pulmoner hipertansiyon gelişen hastaların akciğer damarlarının endotelinde, güçlü bir endotelin-1 ekspresyonu söz konusudur ve KOAH vakalarının idrarında çıkan endotelin-1 miktarı artmıştır. Kronik hipoksili olgularda artan pulmoner arter basıncına bağlı olarak sağ ventrikülde dilatasyon ve hipertrofi gelişir. Bu bulgular kor pulmonale işaretleridir (12).

KOAH olgularında diyafragmada yapısal değişiklikler ve atrofi ortaya çıkabilir. KOAH hastalarında diyafragmanın kalınlığında ve özellikle müsküler tabakanın yüzey alanında azalma tespit edilmiştir (13). Diyafragmanın ağırlık ve volüm kaybı bu hastalarda sıklıkla gözlenen malnütrisyona ve kalıcı mekanik yük artışına bağlı olabilir (14).

### **2.1.5. Pulmoner Hipertansiyon ve Kor Pulmonale**

Kor pulmonale veya pulmoner kalp hastalığı; akciğerlerdeki primer hastalığa bağlı olarak veya akciğerin yapısı ve fonksiyonunu bozan hastalıklarla sağ ventrikülün tutulumudur. Kalbin sağ tarafının mekanik pompa gücünün bozulmasıdır. Bu tanım sol ventrikül yetmezliği yapan kalp hastalıkları ve atriyal valvüler kalp hastalığı sonucu olan sol ventrikül yetmezliklerine bağlı sağ yetmezlikleri içermez (15).

Kor pulmonalenin meydana gelişi ani (pulmoner tromboembolideki gibi) veya uzun sürede olabilir. Sağ kalp kavite basınçları ve pulmoner arter basıncı sağ kalp kateteriyle saptanır. Normal sağlıklı kişilerde:

Sistolik PAB; 22-30 mmHg,

Diastolik PAB; 9-12 mmHg

Ortalama PAB; 15-18 mmHg'dir.

Sistolik PAB' nin 30 mmHg , ortalama PAB' nin 18-20mmHg' nin üstünde olması durumunda pulmoner hipertansiyonun varlığından söz edilir. Pulmoner hipertansiyon bulunmasıyla sağ ventrikül yetmezlik bulgularının birlikte olmadığı durumda kompanse sağ kalp yetmezliğinden; pulmoner hipertansiyonla sağ kalp yetmezliği bulgularının varlığında da dekompanse sağ kalp yetmezliğinden söz edilir (15).

### **2.1.5.1. Etyoloji**

1- Kronik kor pulmonaleli olguların büyük bölümü (%80) kronik obstrüktif akciğer hastalarıdır. Özellikle kronik bronşit ve amfizemli olgulardır. Diğer bir ifadeyle KOAH'ın en önemli komplikasyonu kronik kor pulmonaledir.

2- Akciğer parankim hastalıkları özellikle intertisyel fibrozise yol açan yaygın parankim infiltrasyonu yapan hastalıklar, yaygın metastazlar.

3- Akciğerin vasküler hastalıkları: tromboemboliler, vaskülitler.

4- Plevra ve toraks deformiteleri

5- Akciğer rezeksiyonları (15).

### **2.1.5.2. Patogenez**

1- Sol atrium basıncının artması

2- Pulmoner kan akımının artması

3- Pulmoner vasküler direncin artması

Tüm bu koşullarda pulmoner vasküler rezistans artar, pulmoner hipertansiyon oluşur. Sağ kalbin iş yükü artar sağ ventrikül yetmezliği ve hipertrofisi oluşarak kronik kor pulmonale tablosu ortaya çıkar (15).

İnsan akciğerinde NOS izoformları damarlar, havayolu, parankimal doku kompartmanları tarafından üretilir. NOS ekspresyonu ve intravasküler NO üretimi pulmoner vasküler fonksiyonların regülasyonunda ve vasküler tonusun ayarlanmasında önemli rol oynar. Hipoksiye bağlı pulmoner vasküler rezistansı artmış hastalarda inhale NO tedavisinin faydaları olduğuna dair çok sayıda çalışma vardır. Eksojen NO inhalasyonunun sağ ventrikül disfonksiyonunu önlediği, pulmoner basıncı azalttığı gösterilmiştir. NO'nun vasküler fonksiyonlarının yanında akciğerlerde oluşan inflamatuvar olaylarda da faydaları vardır. Bunlara örnek olarak inflamatuvar olaylarda oluşan trombosit aktivasyon ve adezyonu ve lökosit adezyonu inhibisyonu verilebilir. Primer ve sekonder pulmoner hipertansiyonda vasküler endotelyumda NOS aktivitesinin inhibisyonu NO üretiminin azalmasıyla birlikte pulmoner vasküler tonusta önemli değişikliklere yol açabilir. Otopsi ve biyopsi spesimenleri primer ve sekonder pulmoner hipertansiyonda NOS aktivitesinin azaldığını ortaya koymuştur. NO üretiminin yetersizliği KOAH gibi sekonder pulmoner hipertansiyona neden olan bazı hastalıklarda gösterilmiştir. KOAH gibi oksidatif strese neden olan durumlar reaktif oksijen radikalleri oluşumuna neden olarak NO biyoyararlanımının bozulmasına neden olabilirler (16).

## 2.2. NİTRİK OKSİT

### 2.2.1. Genel Bilgi

Nitrik Oksit ortam havasında bulunmakla birlikte, aynı zamanda kirli havada, ekzos gazında, sigara dumanında bulunan bir bileşiktir. NO, reaktif nitrojen oksitleri üreterek çevre kirlenmesine neden olabilmektedir. NO organizmanın büyük ve komplike enzimlerinden biri olan Nitrik oksit sentaz (NOS, EC 1.14.13.39) enziminin sentezlenmektedir (17). 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. EDRF (Endotel Kaynaklı Serbestleştirici Faktör) 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<sub>2</sub>' den NO üretilmesi EDRF'nin NO olabileceğini düşündürmüştür (18).

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 (19,20).

Nitrik oksit endotel yüzeyinde antitrombotik etkinliğe sahiptir. Nitrik oksit sentaz aktivitesinin inhibisyonu, mikrovasküler permeabiliteyi artırarak lökositlerin migrasyonunu ve adezyonunu artırmaktadır (21).

Sonuç olarak NO, potent bir vasodilatör olmakla birlikte nörotransmitter, immunomodülatör, sitotoksik etkili ancak doku hasarı oluşturmayan bir otokoid olarak da görülmektedir.

Hipertansiyonun belli formlarında vazokonstriktör maddelerin arttığı bilinmektedir. Endojen vazodilatatör olan NO' nun boşalmasına bağlı olarak hipertansiyon meydana

gelmektedir. Ayrıca anjiotensin II' nin fizyolojik antagonisti olması ve renin salınımını düzenlemesi nedeniyle NO hipertansiyon üzerinde etkilidir (22).

Nitrik oksitin ayrıca bronkospazmın giderilmesinde, vücudun kansere karşı savunmasında, otoimmün reaksiyonlarda, nörotransmitter olarak beyin fonksiyonlarında ve ağrı oluşumunda önemli rol aldığı gösterilmiştir (22,23).

### 2.2.2. Nitrik Oksitin Yapısı

NO (Nitrik oksit); bir tane eşleşmemiş elektron içeren, renksiz, gaz şeklinde bulunan inorganik serbest bir radikaldir (24).

Eşleşmemiş elektron nitrojen ve oksijen atomu üzerinde yer değiştirerek rezonans stabilitesini sağlamaktadır (25).

Nitrik oksit lipofilik, kimyasal olarak stabil olmayan, reseptöre bağımlı olmadan kolayca diffüze olabilen ve bilinen en düşük moleküler ağırlıklı memeli hücrelerinin biyoaktif sekresyon ürünüdür (24).

Tablo 2: Nitrik oksit ile ilişkili nitrojen metabolitleri

Sembol	İsim	Etki
NO	Nitrik oksit	Serbest radikal (S – R)
NO <sub>2</sub>	Nitrojen dioksit	S-R, nitronize edici etken ajan
N <sub>2</sub> O	Nitröz oksit	Anestetik
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Dinitrojen trioksit	Nitronize edici etken ajan
N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Dinitrojen tetraoksit	Nitronize edici ajan
NO <sub>2</sub>	Nitrit	Asidik ortamda NO' oluşturur
NO <sub>3</sub>	Nitrat	Stabil anyon

### 2.2.3. Nitrik Oksitin Biyosentezi

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. L-arjininden NO sentezinde NADPH, NOS, kalmodulin, oksijen ve dört kofaktöre (hem, FMN, FAD, BH<sub>4</sub>) gereksinim duyduğu anlaşılmıştır (26).

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. Hemoglobine ve myoglobine bağlanan NO nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) ve nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) olarak atılır (27,28).

NO'nun yarı ömrü büyük değişiklik göstermektedir. Bu değişkenlik, dokuların taşıdığı oksijenli bileşiklerin oranındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. NO'nun gerçekleştirdiği bu reaksiyonlara bağlı olarak yarı ömrü yaklaşık 10-30 sn'dir (29).

#### **2.2.4. Nitrik Oksit Sentaz İzoenzimleri**

Nitrik oksit sentazın üç farklı izoenzimi bulunmaktadır:

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

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

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  $\text{Ca}^{+2}$  / kalmodulin bağımlıdır, iNOS aktivasyonu ise transkripsiyonel indüksiyon yolu ile etkilidir (24).

#### **2.2.5. Nitrik Oksitin Biyolojik Etkileri**

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

tPA artışı ve fibrinolizis

Düşük konsantrasyonda eritrosit deformasyonunda artış  
İmmunomodülatör  
NADPH oksidaz inhibisyonu ile lökosit adezyon inhibisyonu  
Makrofaj aracılı nonspesifik immün yanıt  
Antimikrobiyal (sitotoksik)  
Antitümör (sitotoksik) (24).

### **2.2.6. Endotel Hücresi ve Nitrik Oksit**

NO'nun sağlam kan damarlarında fiziksel, kimyasal ve hormonal uyarıcılara karşı EDRF aracılıklı vazodilatasyon oluşturarak vasküler tonus regülatörü olduğu çeşitli kaynaklarda gösterilmiştir (30).

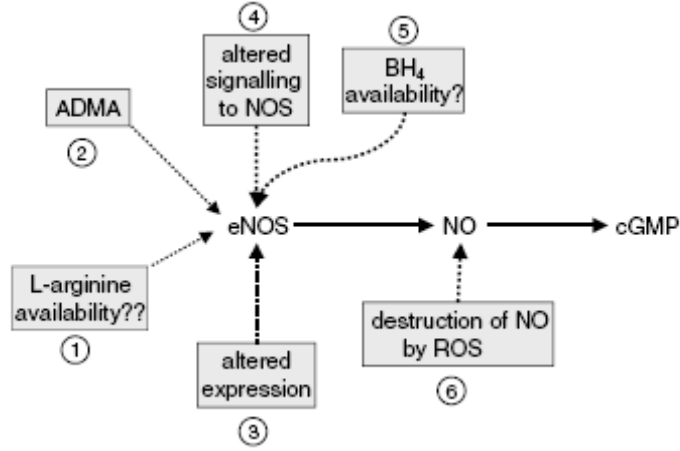
Asetilkolin, bradikinin, 5-hidroksitriptamin ve ayrıca hipoksi gibi etkenler,  $Ca^{+2}$  / kalmodulin sistemi aracılığı ile endoteldeki NOS'u uyararak NO oluştururlar. Endotelde oluşan NO, diffüzyon yolu ile düz kas hücrelerine geçer ve sitoplazmik guanilat siklaz enzimini uyararak GTP'den cGMP oluşturur. Oluşan cGMP kalsiyum düzeylerini azaltarak düz kaslarda relaksasyon ile vazodilatasyona neden olur (31).

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 vazodilatatif, 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 patogeneziinde önemli roller oynadığına inanılmaktadır.

### **2.2.7. Nitrik Oksitin Sentezini Etkileyen Faktörler**

Arjinin NO sentezinde substrat olarak kullanıldığından dolayı arjinin plazma konsantrasyonlarının yeterli düzeyde olması optimal enzim aktivitesi için gereklidir. Arjininden NO oluşumu çeşitli arjinin analogları tarafından inhibe edilir. Bu analoglar artmış trombüs formasyonu ve aterogeneze sorumlu. ADMA ve 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  $BH_4$

tedavisi sonrası fonksiyonlar normale döner. Ayrıca serbest oksijen radikalleri NO'nun yapısında bozulmalara neden olarak fonksiyon görmesine engel olabilir (32).



Şekil 1: NO biyoyararlanımının azalmasına sebep olabilen faktörler (32).

## 2.3. METİL ARJİNİNLER

### 2.3.1. Metil Arjininlerin Oluşumu ve Çeşitleri

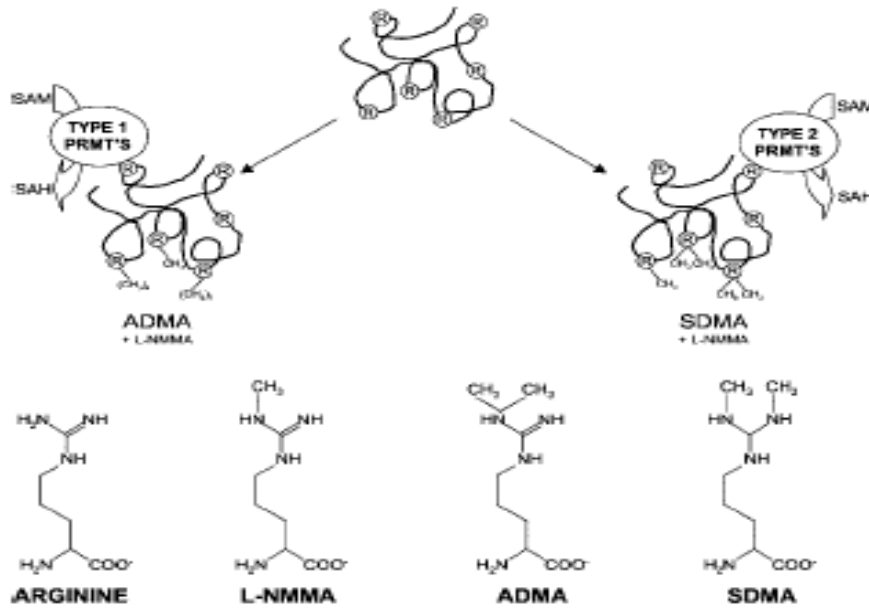
Metil arjininler, proteinlerde bulunan arjinin rezidülerinin metilasyonu sonucu oluşurlar. Bu proteinler yaygın olarak nükleusta bulunurlar. Protein-arjinin metilasyonu, proteinlerin içindeki arjininin guanidino azotuna 1 veya 2 metil gruplarını aktaran bir posttranslasyonel modifikasyondur (33,34). İnsanlarda protein-arjinin metilasyonu PRMT'ler (Protein Arjinin Metil Transferaz) 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 (35).

Tip I PRMT en çok rastlanan PRMT'dir, çok sayıda proteine spesifik farklı tipleri vardır. Kardiyovasküler sistemde kalp, düz kas hücreleri ve endotelial 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 dimetilarjinin 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 (36).

Tip II PRMT SDMA (simetrik dimetilarjinin) 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 (37). PRMT'ler yoluyla proteinlerin metilasyonu ve oluşan metil arjinin türevleri şekil 2'de gösterilmektedir.



Şekil 2: Arjinin ve metil arjinin türevleri ve oluşumları (36).

ADMA metillenmiş arjinin rezidüleri içeren proteinlerin katabolizması sonucu meydana gelir. Hücresel proteinlerin arjinin metilasyonu PRMT'ler tarafından katalize edilir. PRMT'ler başlıca alveolar ve bronşiyal epitelyumda yerleşmiştir. Hipoksi sonucu alveolar tip 2 hücrelerde PRMT 2 ekspresyonu artmaktadır. Yıldırım ve ark çalışmalarında PRMT'lerin akciğerlerde fonksiyonel olduğunu ve hipoksinin PRMT 2 ekspresyonu ve akciğer ADMA konsantrasyonlarında düzenleyici olduğunu göstermiştir. Hipoksi sonucu yapısal ve fonksiyonel değişiklikler ADMA metabolizması ile ilişkilidir (38).

## 2.4. ADMA

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 (39).

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 (39).

ADMA kan basıncını yükseltir, vazokonstriksiyona neden olur, endotel bağımlı relaksasyonu bozar, endotel hücre adhezivitesini artırır. Kardiyak outputu azaltır. Uzamış NOS inhibisyonu sonucu olarak sol ventriküler hipertrofi gelişir. Böbrek yetmezliğinde ADMA birikimi olur. Plazma ADMA seviyeleri ile endotel disfonksiyonu arasında ilişki vardır. Hemodiyaliz hastalarında gelişen endotel disfonksiyon kardiyovasküler olaylar ve mortalitede ADMA sorumlu faktörlerden birisidir (39). 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'nın endotel fonksiyon bozukluğundan sorumlu faktörlerden biri olduğuna dair kanıtlar vardır. Konjestif kalp yetmezliği, diyabet, insülin rezistansı, hipertansiyon, hiperhomosisteinemi, son dönem böbrek yetmezliği gibi durumlar ADMA yüksekliği ve endotel fonksiyon bozukluğu ile seyreden çeşitli klinik durumlardır. Bu hastalıklarda akut vasküler olaylar sonucu ölüm sık görülür (39).

### 2.4.1. ADMA Metabolizması

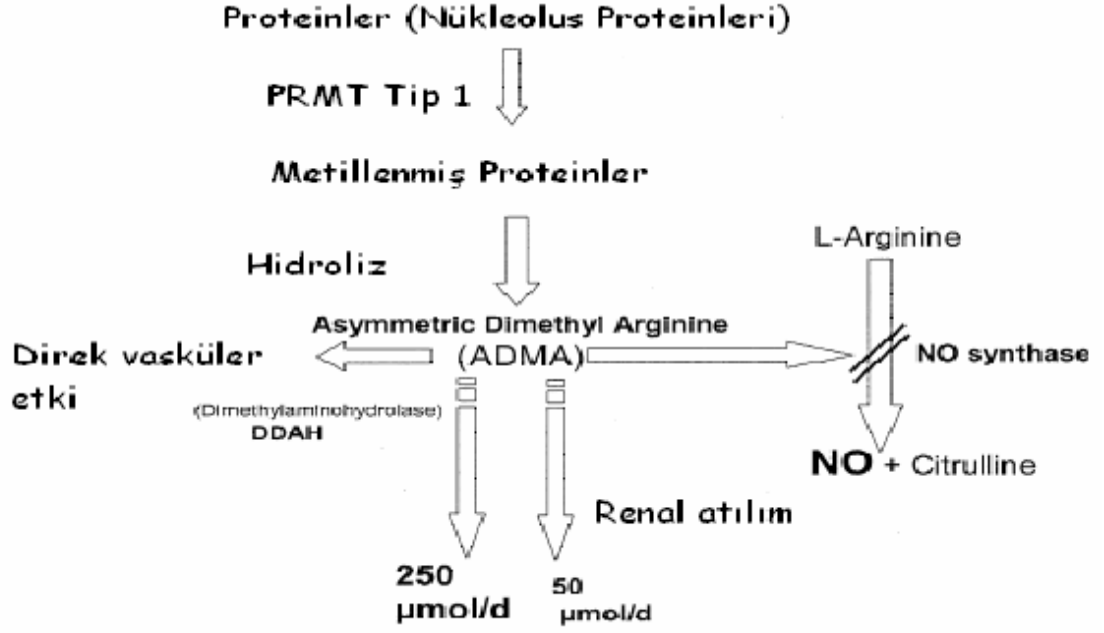
Metilarjininlerin bir kısmı renal yolla atılır. Bununla birlikte SDMA tamamıyla renal yolla atılır fakat ADMA ve L-NMMA yaygın olarak metabolize edilir. En önemli metabolik yol DDAH (Dimetilarjinin Dimetil Amino Hidrolaz) enzimiyle sitrülün ve dimetilamine yıkılmasıdır (40,41).

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 (42).

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 (43,44).

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 (45).

Endotelyal hücre kültürlerinde DDAH'ın selektif inhibisyonu nitrik oksit sentezinde azalmaya yol açar. Ortamın arjinin muhtevasının artırılması bu durumu tersine çevirebilir (46). PRMT'ler yoluyla ADMA oluşumu ve atılım yolları şekil 3'te gösterilmektedir.



Şekil 3: ADMA metabolizması.

## 2.4.2 Adma ile İlişkili Hastalıklar ve Patofizyolojik Olaylar

### 2.4.2.1. Renal Hastalıklar

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 vardır. Hemodiyaliz hastalarında gelişen endotel disfonksiyonu, kardiyovasküler olaylar ve mortalitede ADMA sorumlu faktörlerden birisi olabilir. Hemodiyaliz ile ADMA vücuttan uzaklaştırılabilir fakat hemodiyaliz sonrası hemen yüksek değerlere geri döner (39).

### 2.4.2.2. Diyabet

Tip 1 ve Tip 2 diyabette yapılan hayvan çalışmalarında ve aşikar Tip 2 diyabetli veya insulin rezistansı olan hastalarda yükselmiş ADMA seviyeleri bulunmuştur (47,48).

Kronik vasküler komplikasyonlar diyabetli hastalarda ana morbidite ve mortalite sebeplerindendir. 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 (49). Yapılmış olan çalışmalarda insulin rezistansı ile ADMA seviyeleri arasında kuvvetli bir ilişki olabileceği gösterilmiştir

(50). Yine yapılan çalışmalarda glukozun kendisinin DDAH aktivitesini baskılayabileceği sonucuna varılmıştır (51).

### **2.4.2.3. Kardiyovasküler Hastalıklar**

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 (52).

Azuma ve arkadaşları karotid arterlerine balon uygulanan tavşanların rejenere endotelyumunda sağlıklı olanlara göre düşük intraselüler arjinin ve yüksek ADMA seviyeleri bulmuşlardır. Bu bulgular rejenere endotelyumda DDAH aktivitesinin düşük olduğunu ve arjinin seviyesinin yetersiz olduğunu düşündürmektedir (53).

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 (39).

Yüksek ADMA düzeylerinin kardiyovasküler olay insidansının artması yanında konsantrik sol ventriküler hipertrofi ve karotid arter intima media kalınlığının artması ile de kuvvetli bir ilişki gösterdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (54). Karotid intima media kalınlığı güçlü kardiyovasküler risk markırıdır (55). Plazma ADMA konsantrasyonları klinik aşikar ateroskleroza olanlarda olmayanlara göre yüksek olarak bulunmuştur (56).

Kardiyovasküler patoloji için tedavinin amacı 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 DDAH ekspresyonunu veya aktivitesini artırmaktır (57).

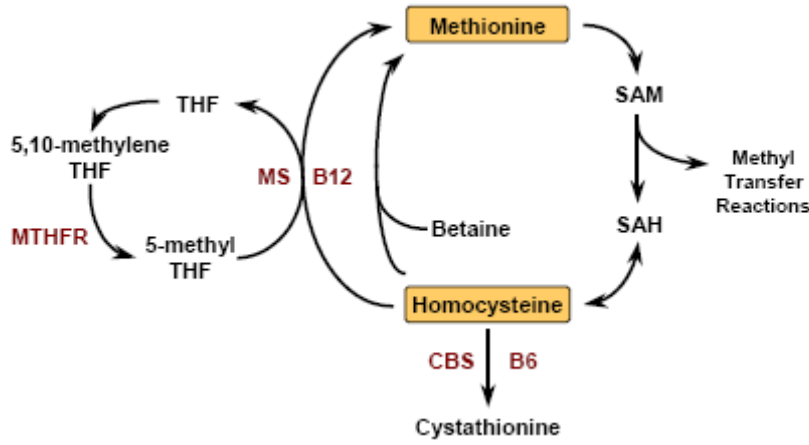
### **2.4.2.4. Homosistein ve ADMA**

ADMA ve homosistein arasındaki ilişki aralarında çok etkileşim olduğundan dolayı ilginçtir. Homosistein DDAH aktivitesini inhibe edebilir. Bu, enzimin aktif bölgesindeki sistein rezidüsüyle etkileşimi yoluyla olabilir. Homosistein metilasyonda anahtar rolü oynar. S-Adenozilmetiyonin arjinin metilasyonunda metil vericisidir ürünü S-adenozil homosisteindir bu da homosisteine çevrilir. Metiyonin döngüsünün yüksek olması homosistein seviyelerini artırır bu da endotelyal disfonksiyonla beraber seyreder. Sistein gibi

sülhidril bloke edici ajanlar DDAH enzimini inhibe ederler. Dithiothreitol gibi dithiol redükthanları bu inhibisyonu engelleyebilir veya tersine çevirebilir (53).

Cooke ve arkadaşları yaptıkları çalışmada homosisteinin endotel hücre kültüründe DDAH aktivitesini inhibe ederek ADMA düzeylerini yükselttiğini gözlemlemişlerdir (53).

Kalp hastalığı için homosistein yüksekliği önemli bir risk faktörüdür. Homosistein konsantrasyonunu 3µmol/L düşürmek; iskemik kalp hastalığı riskini %16, derin ven trombozunu %25, stroke riskini %24 azaltır (37).



Şekil 4: Homosistein metabolizması (37).

#### 2.4.2.5. Alzheimer

Bu hastalarda homosistein ve ADMA'nın arttığı NO'nun azaldığı bulunmuştur. NO'nun ADMA etkisiyle düzeyi azaldığı için serebral kan akımı bozulur. NO sitoprotektif genlerin ekspresyonunu artırdığı için nöroprotektiftir, öğrenme ve ezberlemede etkilidir. L-Arjininin oral yolla alımı ile, serebrovasküler hasarlı yaşlı hastaların kognitif fonksiyonlarında düzelme olabilir (58).

#### 2.4.2.6. Preeklampsi

ADMA seviyeleri normal gebelik esnasında azalmaktadır, fakat preeklampsili gebelerde yükselmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda preeklampsi gelişiminden önce ADMA seviyelerinin yükseldiği gözlenmiştir. Yüksek risk altındaki kadınların erken dönemde belirlenmesinde ADMA yeni bir risk markırı olarak ortaya çıkabilir. Gebelikte erken dönemde ADMA düzeyi yüksek olan kadınlarda ADMA seviyesi ile endotelial

disfonksiyon arasında ilişki vardır ama bu, kadınlarda sadece preeklampsi gelişimi olarak görülür (39).

#### **2.4.2.7. Karaciğer Yetmezliği ve Siroz**

Multiple organ yetmezliği olan hastalarda ve son dönem karaciğer hastalarında bozulmuş karaciğer fonksiyonları ADMA seviyelerinin yükselmesine neden olabilir (54).

Dekompanse dönemdeki hastalarda artmış ADMA konsantrasyonları hepatoselüler hasara cevabı yansıtabilir. DDAH'lar karaciğer dahil çok sayıda dokuda yaygın olarak dağılmıştır. ADMA dekompanse sirozlu hastalarda yükselirken SDMA için gruplar arasında farklılık bulunmamıştır. Mevcut sonuçlarda ADMA/SDMA oranının yükselmesinin gözlenmesi DDAH aktivitesinin azalmasına işaret eder (59).

#### **2.4.2.8. Hemorajik Şok**

ADMA üretiminin hipoksi gibi hücrel stres durumlarında arttığı düşünülmektedir (47). Doku hipoksisi ve oligüri şiddetli hemorajik şokun iki karakteristik bulgusudur ADMA düzeylerinin hemorajik şokta yükseldiği görülmüştür. Şiddetli hemoraji durumunda oluşan oligüriden dolayı azalmış üriner atılım nedeniyle ADMA seviyeleri artar. ADMA birikimi nedeniyle Arjinin-NO yolağının bozulmasından dolayı akut hipovolemide sistemik kan basıncının sürdürülmesinde ADMA etkili olabilir (60).

#### **2.4.3. Adma Düzeyini Azaltma Stratejileri**

Arjinin suplementasyonu

ACE inhibitörleri

Östrojenler

Metformin ve tiazolidinedionlar

Vitamin D

Folik Asit

All-transretinoik asit

Fenofibratlar

L-Arjinin: L- Arjinin takviyesi ADMA seviyesi ne olursa olsun endotel fonksiyonu, miyokard perfüzyonu, anjina, erektil disfonksiyon ve egzersiz toleransında düzelmeye neden olabilir. Kardiyovasküler disfonksiyonun tedavisinde arjinin suplementasyonu faydalı

bulunmuştur. L-Arjininin deneysel hipertansiyonun bazı tiplerinde sistemik kan basıncını düşürdüğü görülmüştür (56).

ACE inhibitörleri: ACE inhibitörleriyle tedavi edilen aterosklerozlu ve NIDDM'li hastalarda ADMA seviyeleri azalmıştır (56).

Metformin ve tiazolidinedionlar: ADMA düzeylerini azaltabilir bu ilaçların hangi mekanizma ile ADMA seviyesini azalttıkları aşikar değildir (39).

Östrojenler: Deneysel çalışmalarda DDAH ekspresyonunu artırarak ADMA düzeyini düşürdükleri gözlenmiştir (39).

Vitamin D: DDAH ekspresyonunu artırarak ADMA düzeyini azaltabilir.

Folik Asit: Hiperhomosisteinematik bireylerde hem ADMA, hem de arjinin seviyesini azaltabilir (37).

All-transretinoik asit: Endotelial hücrelerde DDAH 2 ekspresyonunu düzenlediğine dair kanıtlar vardır (53).

Fenofibratlar: Yang ve arkadaşlarının hipertrigliseridemik hastalar üzerinde yaptığı çalışmada fenofibrat tedavisinin ADMA ve MDA düzeylerini azalttığı görülmüştür. ADMA düzeylerinin azalması DDAH aktivitesinin düzelmesiyle oluşmuş olabilir (61).

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1 MATERYAL

##### 3.1.1. Vakaların Oluşturulması ve Gruplandırma

Çalışmaya Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları ve Tüberküloz Anabilim Dalı polikliniğine başvuran, GOLD'a (Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı için Global Girişim) göre Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH) tanısı almış 75 hasta ve bilinen herhangi bir hastalığı olmayan 25 kişi kontrol grubu olarak alındı. Hasta grubu 25 akut dönem KOAH'lı, sürekli ilaç kullanım raporu almak için polikliniğe başvuran 25 stabil dönem KOAH'lı ve kronik kor pulmonalesi olan 25 hastadan oluşturuldu. Hastaların bilinen başka bir ek hastalığı (pnömoni, diyabet, böbrek yetmezliği, akciğer kanseri, aterosklerotik kalp hastalığı, sol ventrikül yetmezliği v.b.) yoktu.

KOAH grubu hastalarda öksürük, dispne, göğüs ağrısı ve hırıltılı solunum olup olmadığı, sigara kullanıp kullanmadıkları, kullanmışlarsa süresi ve miktarı kayıt edildi. Hastaların fizik muayeneleri yapıldı.

İlk başvuru esnasında hastalara posteroanterior ve lateral akciğer grafileri çekildi. Bütün solunum fonksiyon testleri (SFT) hastaların göğüs hastalıkları kliniğine ilk başvuruları esnasında Vmax 2100 Sensormedics marka spirometri cihazı kullanılarak değerlendirildi. Zorlu ekspiryum manevrasıyla elde edilen üç testten en iyi değer solunum fonksiyon testi olarak kullanıldı. FEV<sub>1</sub>, FVC, FEV<sub>1</sub>/FVC, PEF, MEF, FEF<sub>25</sub>, FEF<sub>50</sub>, FEF<sub>75</sub>, RV, TLC, VC değerleri ölçüldü.

SFT'de hastaların FEV<sub>1</sub>, FVC düşüklük, FEV<sub>1</sub>/FVC < %70 (yaş, ağırlık ve ırka göre beklenenin) ile birlikte olup olmadığına göre hastalarda obstrüksiyon var ya da yok şeklinde sınıflandırıldı.

##### 3.1.2. Numunelerin Toplanması

ADMA, arjinin ve NO için hastalar oturur pozisyonda iken iki ayrı düz tüpe venöz kan örnekleri alındı. ADMA ve arjinin örnekleri hemen soğuk zincire riayet edilerek soğutmali santrifüj ile +4 °C de 2000 x g devirde 5 dakika santrifüj edildikten sonra serumları ayrıldı.

Ayrılan serumlar sülfosalisilik asit ile uygulanan deproteinizasyon işleminden sonra ADMA ve arjinin çalışmaları için ependorf tüplere aktarılıp  $-80^{\circ}\text{C}$  de çalışma gününe kadar muhafaza edildi. NO örnekleri  $2000 \times \text{g}$  devirde 5 dakika santrifüj edildi. Ayrılan serum örnekleri  $-80^{\circ}\text{C}$  de çalışma gününe kadar muhafaza edildi.

Tüm hastalar oda havası solurken heparinize enjektörlere 2 ml arter kan gazları örnekleri alındı. Kan gazı analizleri Bayer Rapidlab 1265 marka cihaz ile çalışıldı. Kan gazı örneklerinde  $\text{PaO}_2 < 80 \text{ mmHg}$ ,  $\text{PaCO}_2 > 45 \text{ mmHg}$  olanlar solunum yetmezliği olarak kabul edildi.

### **3.1.3. Kullanılan Reaktif ve Çözeltiler**

- 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-) Tetrahidrofuran (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)

### **3.1.4. Kullanılan Cihazlar**

- 1-) Santrifüj (Hettich Rotina 46R)
- 2-) PH Metre
- 3-) Nuçe Erlenii
- 4-) Magnetik karıştırıcı, magnetik bar
- 5-) Su trombu

- 6-) Filtre ( Millex Millipore GP 0.22 $\mu$ , 25mm diameter Z35, 990-4)
- 7-) Agilent 1100 serisi HPLC cihazı Floresans dedektör
- 8-) Analitik Kolon; 250x4,6mm C18 Supelcosil 5 $\mu$ m kolon
- 9-) Nitrit-Nitrat Analiz Kiti (Cayman Kat. No: 780001)
- 10-) Elisa Okuyucu LX 50A Automated Strip Reader

## **3.2. METOD**

### **3.2.1. ADMA, Arjinin Analizi**

#### **3.2.1.1. Mobil Faz Solüsyonlarının Hazırlanması**

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

#### **3.2.1.2. Mobil Faz A'nın Hazırlanması (82:17:1)**

1-) 5,57 gr sodyum asetat ( $\text{CH}_3\text{COONa} (\text{H}_2\text{O})_3$ ) 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 THF eklenerek son hacim 1 lt'ye tamamlanmış oldu.

#### **3.2.1.3. Mobil Faz B'nin Hazırlanması (22:77:1)**

1-) 1,49 gr sodyum asetat ( $\text{CH}_3\text{COONa} (\text{H}_2\text{O})_3$ ) 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.

#### **3.2.1.4. Mobil Fazların Filtrasyonu ve Degaze Edilmesi**

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.

#### **3.2.1.5. ADMA Standart Hazırlanması**

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 solusyondan 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.

#### **3.2.1.6. Arjinin Standart Hazırlanması**

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 solusyondan 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

#### **3.2.1.7. Numune Hazırlanması**

Hastalardan düz tüplere alınan kanlar bekletilmeden 2000 x g devirde 4<sup>0</sup> C'de 10 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<sup>0</sup> C'de 10 dakika santrifüj edildi.

Deproteinizasyon işleminden sonra üstte kalan süpernatanttan ADMA ve arjinin analizi yapıldı. Süpernatantlar 0.22µ çaplı enjektör filtrelerden süzülerek sisteme verildi.

### 3.2.1.8. Derivatizasyon

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 ısında bekletilip analiz için cihaza enjekte edildi. Bulunan alan yardımıyla standart grafiğinden faydalanılarak örneklerin ADMA ve arjinin değerleri hesaplandı (62).

### 3.2.1.9. Pompa

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

Tablo 3: Mobil fazların akış şeması.

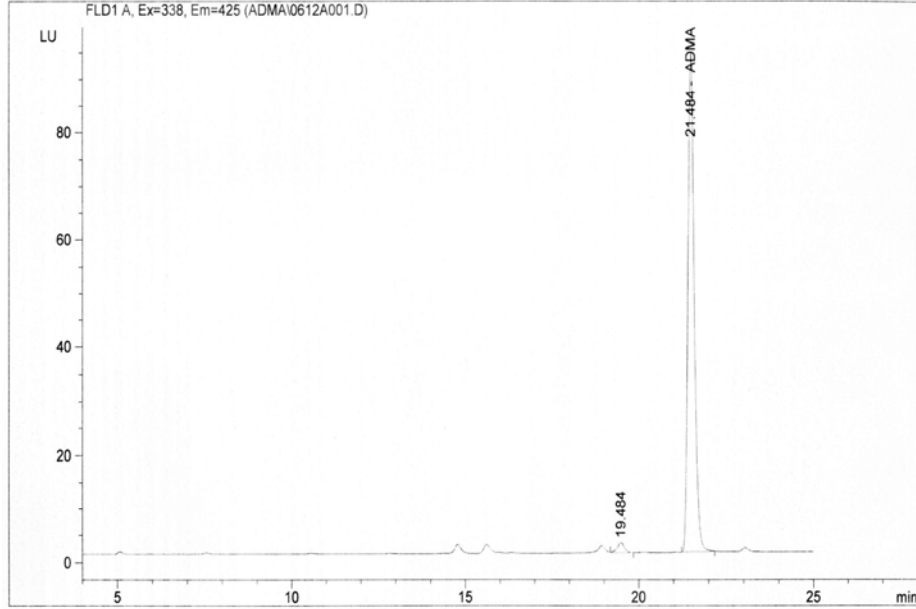
ZAMAN (dk)	A (%)	B (%)
0	95	5
6	88	12
16	60	40
28	25	75
32	0	100
34	0	100
35	95	5

### 3.2.1.10. Deteksiyon

Floresans dedektör eksitasyon için 338 nm. ve emisyon için 425 nm'ye ayarlandı. Agilent 1100 serisi HPLC cihazı, 250 x 4.6 mm C<sub>18</sub> Supelcosil 5µm kolon ve floresans dedektör kullanıldı (54). Toplam analiz süresi 35 dk. olacak şekilde ayarlandı.

### 3.2.1.11. ADMA Standart Çalışmaları

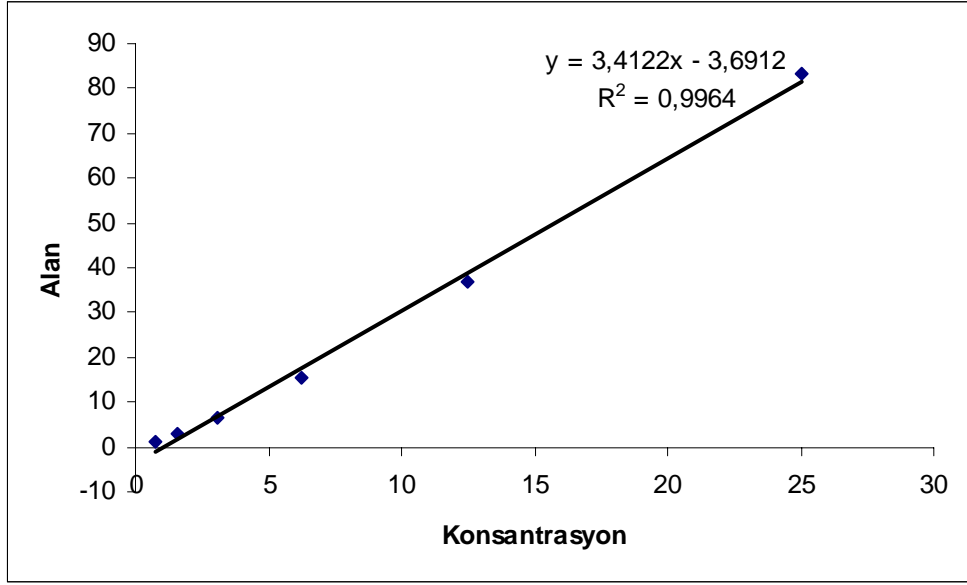
ADMA için retansiyon süresi 21.4 dakika olarak belirlendi. ADMA standart kromatogram örneği şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil 5: 50  $\mu$ M ADMA standardına ait örnek kromatogram

Tablo 4: ADMA konsantrasyonlarına karşılık bulunan alanlar.

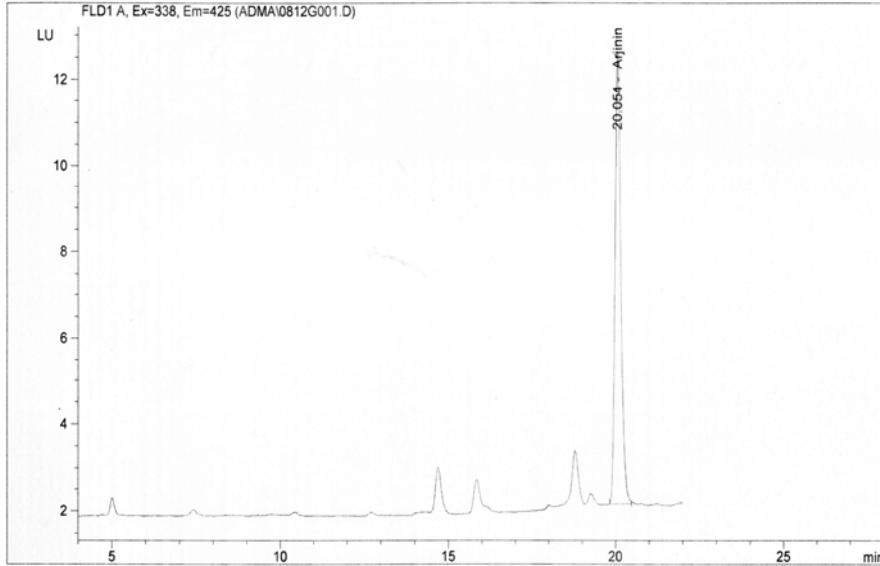
KONSANTRASYON ( $\mu$ M)	ALAN
0,78 $\mu$ M	1,1
1,56 $\mu$ M	2,8
3,1 $\mu$ M	6,4
6,25 $\mu$ M	15,5
12,5 $\mu$ M	36,7
25 $\mu$ M	83,2



Şekil 6: ADMA standart grafiği.

### 3.2.1.12. Arjinin Standart Çalışmaları

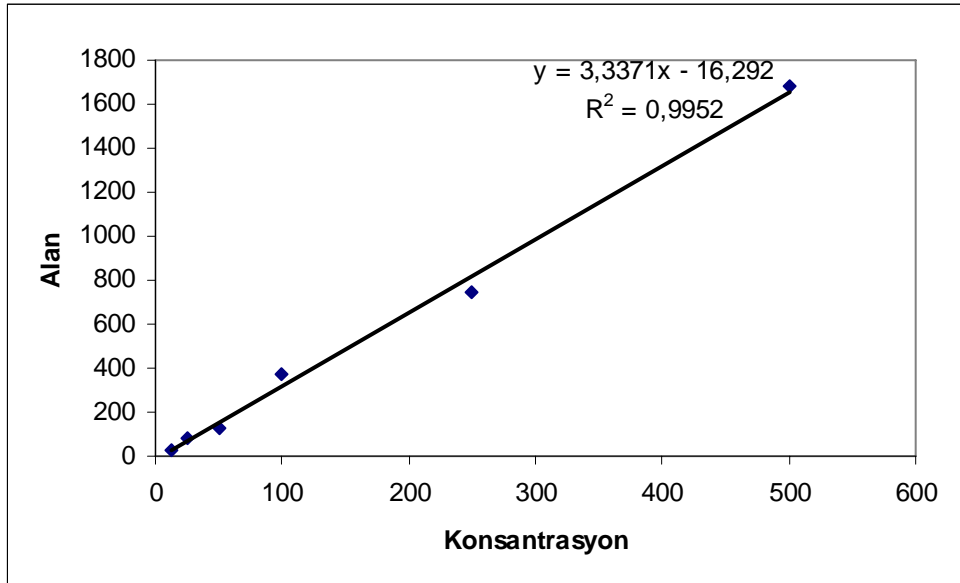
Arjinin için retansiyon süresi 20.0 dakika olarak belirlendi. Arjinin standart kromatogram örneği şekil 7’de gösterilmiştir.



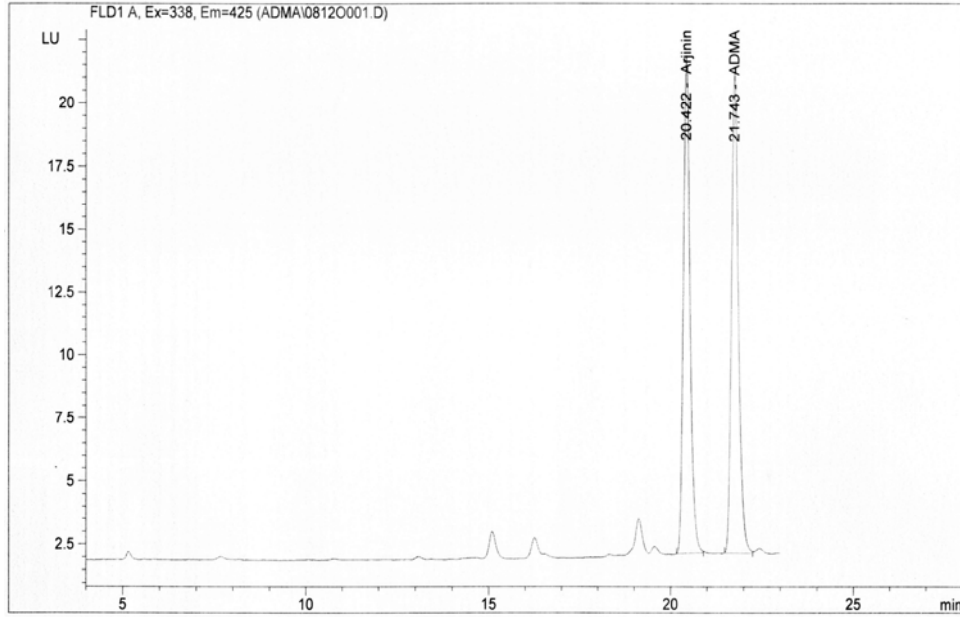
Şekil 7: 50 µM Arjinin standardına ait örnek kromatogram

Tablo 6: Arjinin konsantrasyonlarına karşılık bulunan alanlar.

KONSANTRASYON ( $\mu\text{M}$ )	ALAN
12,5 $\mu\text{M}$	27,8
25 $\mu\text{M}$	82
50 $\mu\text{M}$	127
100 $\mu\text{M}$	369
200 $\mu\text{M}$	745
500 $\mu\text{M}$	1680



Şekil 8: Arjinin standart grafiği.



Şekil 9: 50 µM ADMA ve Arjinin standartlarının karışımından oluşan örnek kromatogram

### 3.2.1.13. ADMA ve Arjinin Tekrarlanılabilirlik Çalışmaları

#### 3.2.1.13.1. ADMA Tekrarlanılabilirlik

Konsantrasyonu 3.1 ve 31.2 µM olan ADMA standartları aynı gün ve farklı günlerde 10 defa cihazda okutuldu.

Gün içi tekrarlanılabilirlik: Ortalama:  $3.04 \pm 0.114$  µM , CV: 3.75

Günler arası tekrarlanılabilirlik: Ortalama:  $3.06 \pm 0.167$  µM, CV: 5.45

Gün içi tekrarlanılabilirlik: Ortalama:  $33.96 \pm 2.01$  µM, CV: 5.91

Günler arası tekrarlanılabilirlik: Ortalama:  $33.5 \pm 1.90$  µM, CV: 5.67

#### 3.2.1.13.2. Arjinin Tekrarlanılabilirlik

Konsantrasyonu 12.5 ve 100 µM olan arjinin standartları aynı gün ve farklı günlerde 10 defa cihazda okutuldu.

Gün içi tekrarlanılabilirlik: Ortalama:  $12.44 \pm 0,98$  µM, CV: 7,9

Gün içi tekrarlanılabilirlik: Ortalama:  $101.4 \pm 4.82$  µM, CV: 4.75

Günler arası tekrarlanılabilirlik: Ortalama:  $12.6 \pm 1.17 \mu\text{M}$ , CV: 9.3

Günler arası tekrarlanılabilirlik: Ortalama:  $102.4 \pm 6.91 \mu\text{M}$ , CV: 6.74

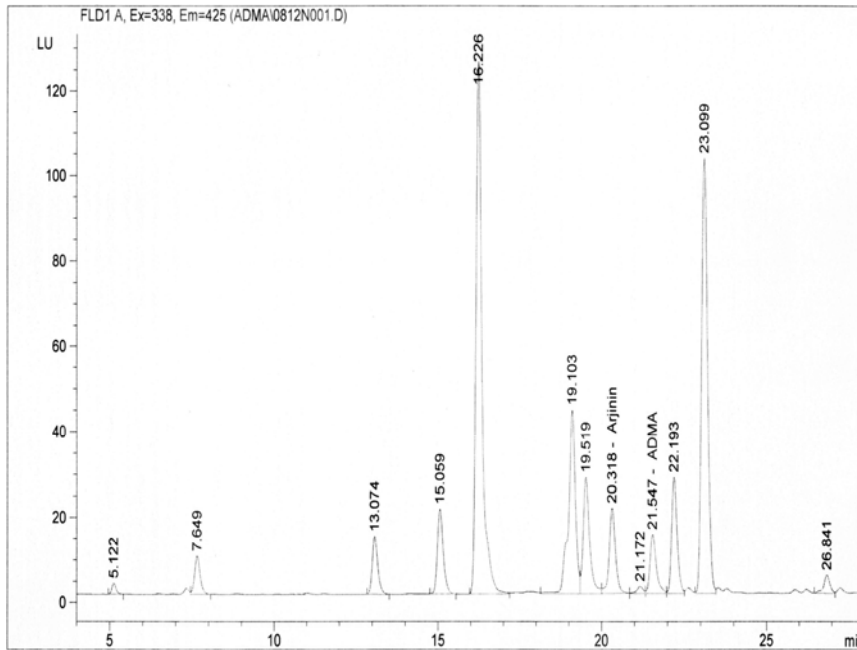
### 3.2.1.14. ADMA-Arjinin Geri Kazanım Çalışması (Recovery)

1-) Konsantrasyonu  $3.1 \mu\text{M}$  ve  $6.25 \mu\text{M}$  olan ADMA standartları eşit miktarlarda karıştırıldıktan sonra cihaza enjekte edildi. Yeni ADMA konsantrasyonu  $4.5 \mu\text{M}$  olarak bulundu. %96 geri kazanım elde edildi.

2-) Konsantrasyonu  $25 \mu\text{M}$  ve  $50 \mu\text{M}$  olan arjinin standartları eşit miktarlarda karıştırıldıktan sonra cihaza enjekte edildi. Yeni arjinin konsantrasyonu  $33.8 \mu\text{M}$  olarak bulundu. %90 geri kazanım elde edildi.

3-) Konsantrasyonu  $50 \mu\text{M}$  olan Arjinin ve  $3.1 \mu\text{M}$  olan ADMA standartları eşit miktarlarda karıştırıldıktan sonra cihaza enjekte edildi. Elde edilen karışımın Arjinin konsantrasyonu  $22.7 \mu\text{M}$ , ADMA konsantrasyonu  $1.42 \mu\text{M}$  olarak tesbit edildi. %90 ve %91 geri kazanım elde edildi.

ADMA ve arjinin için geri kazanım çalışma kromatogramları şekil 10'da gösterilmektedir.



Şekil 10: Hasta numunesine ADMA-Arjinin ilavesiyle elde edilen örnek kromatogram

### **3.2.1.15. Diğer L-Arjinin, ADMA, SDMA Ölçüm Yöntemleri**

CE-LIF (Floresansla indüklenmiş Kapiller elektroforez- Laser) (63).

LC-MS: Likit kromatografi-Kütle spektrometrisi (64).

GC-MS: Gaz kromatografi-Kütle spektrometrisi (65).

ELISA (66).

### **3.2.2. Nitrit ve Nitrat Düzeyleri Ölçümü**

Nitrit / Nitrat düzeyleri Cayman marka ticari kit kullanılarak kolorimetrik metotla ölçüldü ( Katalog No: 780001 ).

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

1) Assay Buffer: 100 ml distile suda çözülerek hazırlandı. Buffer 4<sup>0</sup> C’ de 2 ay stabildir.

2) Nitrat Redüktaz: 1,2 ml assay buffer ile sulandırıldı. Kullanım esnasında buzda tutulur. Kullanılmadığı zaman -20<sup>0</sup> C ‘de muhafaza edilir.

3) Enzim Kofaktörleri: 1,2 ml assay buffer ile sulandırıldı. Kullanım esnasında buzda tutulur. Kullanılmadığı zaman -20<sup>0</sup> C ‘de muhafaza edilir.

4) Nitrat Standart: 1ml assay buffer ile sulandırıldı. 4<sup>0</sup> C ‘de muhafaza edilir. Sulandırıldıktan sonra 4 ay stabildir.

5) Nitrit Standart: 1ml assay buffer ile sulandırıldı. 4<sup>0</sup> C ‘de muhafaza edilir. Sulandırıldıktan sonra 4 ay stabildir.

6) Griess Reaktifleri R1, R2: Bu reaktifler kullanıma hazır durumdaydı, sulandırılmaz. 4<sup>0</sup> C ‘de muhafaza edilir.

#### **3.2.2.2. Standart Hazırlanması**

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.

### 3.2.2.3. Çalışma Prensibi

- 1) K r kuyucuklarına 200 l assay buffer pipetlendi. Başka herhangi bir Őey ilave edilmedi.
- 2) 80  l numune ilgili kuyucuklara pipetlendi.
- 3) K r kuyucuğu hariç bütün kuyucuklara 10  l enzim kofaktörleri ilave edildi.
- 4) K r kuyucuğu hariç bütün kuyucuklara 10  l nitrat redüktaz ilave edildi.
- 5) Plate kapatılarak 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 6) İnkübasyondan sonra 50  l Griess reagent R<sub>1</sub> k r kuyucuğu hariç bütün kuyucuklara ilave edildi.
- 7) Bekletilmeden 50  l Griess reagent R<sub>2</sub> k r kuyucuğu hariç bütün kuyucuklara ilave edildi.
- 8) 10 dakika süreyle renk değişimi beklendikten sonra 490 nm' de okutuldu.

### 3.3. İstatistiksel Analiz

Veriler bilgisayar ortamına aktarılarak ‘‘SPSS 13,0 for Windows’’ programı yardımıyla istatistiksel analizler yapıldı. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma ve yüzde olarak özetlendi. Parametrelerin gruplar arası karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi yapıldı. Varyans analizinin anlamlı çıkması halinde gruplar arası karşılaştırma için Tamhane testinden yararlanıldı. Kategorik verilerin değerlendirilmesinde Ki-kare testi yapıldı. Korelasyon testleri için Pearson ve Spearman's korelasyon çalışmaları yapıldı. Anlamlılık seviyesi  $p < 0.05$  olarak alındı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Hasta ve Kontrol Grubu SFT, Yaş ve Kan Gazları Sonuçları

Çalışmamıza dahil edilen KOAH hasta ve kontrol grubunun yaş, solunum fonksiyon testleri, arteriyel kan gazları sonuçları Tablo 7’de gösterilmektedir. Hasta ve kontrol grubu arasında yaş açısından önemli bir farklılık bulunmamaktadır. Hasta grubu kendi içerisinde stabil, akut atak ve kor pulmonale şeklinde sınıflandırıldığında yaş açısından bu gruplar arasında bir fark yoktu.

Tablo 7: KOAH ve kontrol gruplarında SFT ve kan gazları parametrelerinin ortalama  $\pm$  SD (Standart Hata) değerleri.

	Tüm KOAH’lı olgular (n:75)	Stabil KOAH (n:25)	Atak KOAH (n:25)	Kor Pulmonale (n:25)	Kontrol (n:25)
Yaş	65.2 $\pm$ 7.0	63.6 $\pm$ 7.2	66.3 $\pm$ 5.9	65.8 $\pm$ 7.9	63.1 $\pm$ 4.0
SFT					
FEV <sub>1</sub> (% pred)	53.9 $\pm$ 18.3	65.0 $\pm$ 18.6	52.2 $\pm$ 16.6	44.9 $\pm$ 15.3	93.1 $\pm$ 8.6
FVC (% pred)	69.8 $\pm$ 18	79.0 $\pm$ 14.3	68.0 $\pm$ 20.3	62.8 $\pm$ 14.7	90.2 $\pm$ 4.7
FEV <sub>1</sub> / FVC	59.7 $\pm$ 14	63.8 $\pm$ 13.1	60.3 $\pm$ 13.9	54.6 $\pm$ 14.1	90.8 $\pm$ 5.5
FEF <sub>25-75</sub> (% pred)	33.4 $\pm$ 18.2	42.7 $\pm$ 20.3	33.2 $\pm$ 15.4	26.1 $\pm$ 16.8	94 $\pm$ 6.3
PEF(% pred)	49.4 $\pm$ 23	58.1 $\pm$ 26.9	51.5 $\pm$ 24.4	38.0 $\pm$ 9.9	95.8 $\pm$ 9.2
AKG					
pH	7.41 $\pm$ 0.07	7.41 $\pm$ 0.05	7.40 $\pm$ 0.09	7.42 $\pm$ 0.05	7.41 $\pm$ 0.07
PaO <sub>2</sub> mmHg	66.0 $\pm$ 11.6	61.0 $\pm$ 6.3	70.4 $\pm$ 10.2	66.6 $\pm$ 14.9	88.5 $\pm$ 4.1
PaCO <sub>2</sub> mmHg	43.9 $\pm$ 8.3	41.4 $\pm$ 6.2	42.6 $\pm$ 6.8	47.6 $\pm$ 10.3	36.6 $\pm$ 2.7
SaO <sub>2</sub>	90.4 $\pm$ 7.3	90.5 $\pm$ 2.8	91.2 $\pm$ 8.2	89.6 $\pm$ 9.3	94.5 $\pm$ 2.5

KOAH hasta grubu incelendiğinde solunum fonksiyon testleri parametrelerinin tamamen görünürde sağlıklı benzer yaş grubundaki bireylerden seçilen kontrol grubuna oranla belirgin şekilde düşük olduğu gözlemlendi. Bu düşüklük tüm parametrelerde istatistiksel olarak

anlamlıydı ( $p < 0.05$ ). Benzer şekilde arteriyel kan gazları parametreleri de pH dışında KOAH hasta grubu ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak farklılık göstermekteydi ( $p < 0.05$ ).

#### 4.2. Hasta ve Kontrol Grubu ADMA, Arjinin ve Nitrik Oksit Sonuçları

Serum ADMA, nitrik oksit, arjinin ve Arjinin/ADMA ortalama  $\pm$  SD değerleri tablo 8’de gösterilmektedir.

Tablo 8: KOAH ve kontrol gruplarında ADMA, NO, Arjinin ve Arjinin/ADMA parametrelerinin ortalama  $\pm$  SD değerleri.

	KOAH (n:75)	Kontrol (n:25)	P değeri
ADMA ( $\mu\text{M}$ )	$6.4 \pm 4.0$	$2.7 \pm 1.4$	0.000
ARJİNİN ( $\mu\text{M}$ )	$350.5 \pm 135.5$	$399.2 \pm 196.3$	0.266
ARJİNİN/ADMA	$110.6 \pm 95.8$	$216.2 \pm 185.3$	0.003
NO ( $\mu\text{M}$ )	$3.3 \pm 1.8$	$4.6 \pm 3.1$	0.077

KOAH hasta grubunda serum ADMA düzeyleri kontrol grubuna göre oldukça yüksek bulundu ( $6.4 \pm 4.0 \mu\text{M}$  ve  $2.7 \pm 1.4 \mu\text{M}$ ). Bu yükseklik istatistiksel açıdan anlamlıydı ( $p: 0.000$ ).

KOAH’lı hastalarda serum arjinin düzeyleri  $350.5 \pm 135.5 \mu\text{M}$  iken kontrol grubunda  $399.2 \pm 196.3 \mu\text{M}$  olarak tespit edildi. KOAH hasta grubunda arjinin düzeyindeki düşüklük istatistiki olarak anlamlı değildi ( $p > 0.05$ ).

KOAH hasta grubunda Arjinin/ADMA ortalaması  $110.6 \pm 95.8$  olarak bulunurken, kontrol grubunda  $216.2 \pm 185.3$  olarak bulundu. KOAH hasta grubunda Arjinin/ADMA oranındaki azalma istatistiki açıdan anlamlı olarak bulundu ( $p: 0.003$ ).

KOAH hasta grubunda serum NO düzeyleri ortalaması  $3.3 \pm 1.8 \mu\text{M}$  iken kontrol grubunda  $4.6 \pm 3.1 \mu\text{M}$  olarak gözlendi. KOAH’lı hastalarda serum NO düzeyi kontrol grubuna göre daha düşük olmasına rağmen bu düşüklük istatistiksel açıdan anlamlı değildi ( $p > 0.05$ ).

#### 4.3. Stabil KOAH, Atak KOAH, Kor Pulmonale ve Kontrol Gruplarının ADMA, Arjinin ve Nitrik Oksit Sonuçları

KOAH hasta grubunun kendi içinde sınıflandırıldıktan sonra elde edilen yeni grupların ve kontrol grubunun serum ADMA, nitrik oksit, arjinin, Arjinin/ADMA ortalama  $\pm$  SD değerleri Tablo 9’da gösterilmektedir. Tablo 9 incelendiğinde KOAH stabil ve KOAH atak grupları arasında serum ADMA, NO, arjinin düzeyleri ve Arjinin/ADMA oranları açısından anlamlı bir değişiklik yoktu.

Tablo 9: Tüm grupların ADMA, NO, Arjinin, Arjinin/ADMA değerleri.

	Stabil KOAH (n:25)	Atak KOAH (n:25)	Kor Pulmonale (n:25)	Kontrol (n:25)	P değeri
ADMA ( $\mu$ M)	5.0 $\pm$ 3.7 <sup>ab</sup>	5.8 $\pm$ 4.2 <sup>c</sup>	8.2 $\pm$ 3.6 <sup>d</sup>	2.7 $\pm$ 1.4	0.000
Arjinin ( $\mu$ M)	376.2 $\pm$ 144.7	412.7 $\pm$ 181.5 <sup>e</sup>	262.6 $\pm$ 77.8 <sup>f</sup>	399.2 $\pm$ 196.3	0.004
Arjinin/ADMA	132.0 $\pm$ 118.6	115.1 $\pm$ 86.8 <sup>h</sup>	44.8 $\pm$ 39.8 <sup>g</sup>	216.2 $\pm$ 185.3	0.001
NO ( $\mu$ M)	3.6 $\pm$ 2.2	2.2 $\pm$ 1.7	3.0 $\pm$ 1.3	4.6 $\pm$ 3.1	0.094

<sup>a</sup> Kontrol ile kıyaslandığında p: 0.030

<sup>b</sup> Kor Pulmonale ile kıyaslandığında p:0.018

<sup>c</sup> Kontrol ile kıyaslandığında p: 0.008

<sup>d</sup> Kontrol ile kıyaslandığında p: 0.000

<sup>e</sup> Kor Pulmonale ile kıyaslandığında p: 0.006

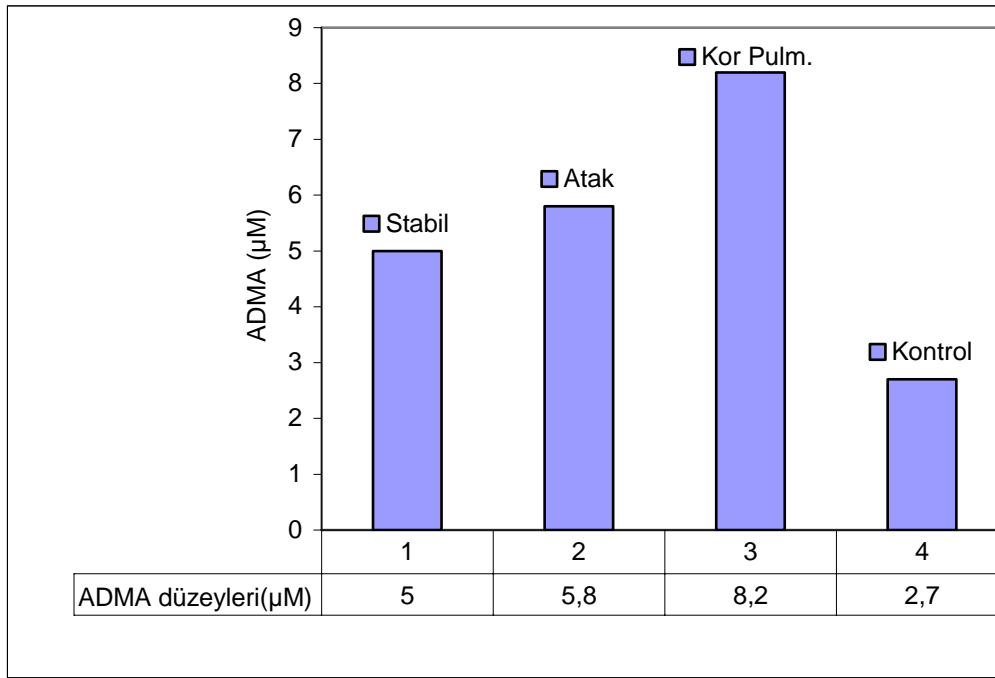
<sup>f</sup> Kontrol ile kıyaslandığında p: 0.016

<sup>g</sup> Kontrol ile kıyaslandığında p: 0.000

<sup>h</sup> Kontrol ile kıyaslandığında p: 0.004

KOAH stabil grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında serum ADMA düzeylerindeki yükseklik stabil KOAH grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p:0.030). Yine KOAH atak grubunda kontrol grubuna göre serum ADMA düzeyleri belirgin derecede yüksek olarak tespit edilmiştir (p:0.008). Kor pulmonale grubunda serum ADMA düzeyleri kontrol grubuna oranla belirgin şekilde yüksek olarak bulunmuştur, bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0.000). KOAH stabil ve KOAH atak grupları

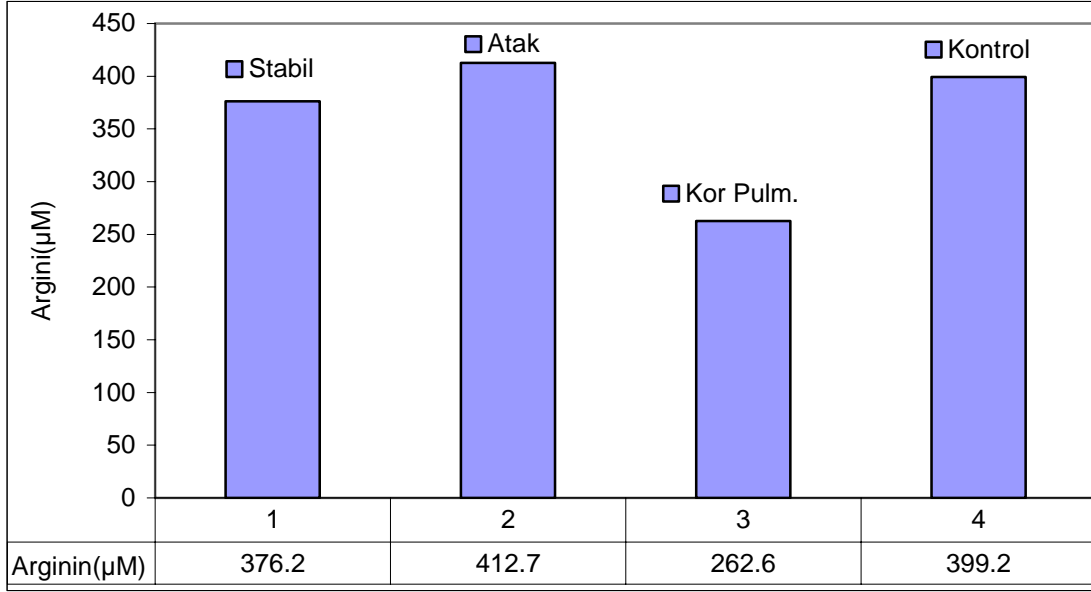
arasında serum ADMA düzeyleri açısından anlamlı bir değişiklik yoktu (Grafik 1). KOAH stabil grubu kor pulmonale grubu ile kıyaslandığında serum ADMA düzeyleri kor pulmonale grubunda stabil KOAH grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p:0.018). Kor pulmonale grubu ADMA düzeyleri atak KOAH hastalarından yüksek olmasına rağmen bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı değildi.



Grafik 1: Grupların ADMA düzeyleri

Gruplara ait ortalama ADMA değerleri grafik 1’ de gösterilmiştir. kor pulmonale grubunda serum ADMA düzeyleri en yüksek seviyede iken kontrol grubunda en düşük seviyelerdedir.

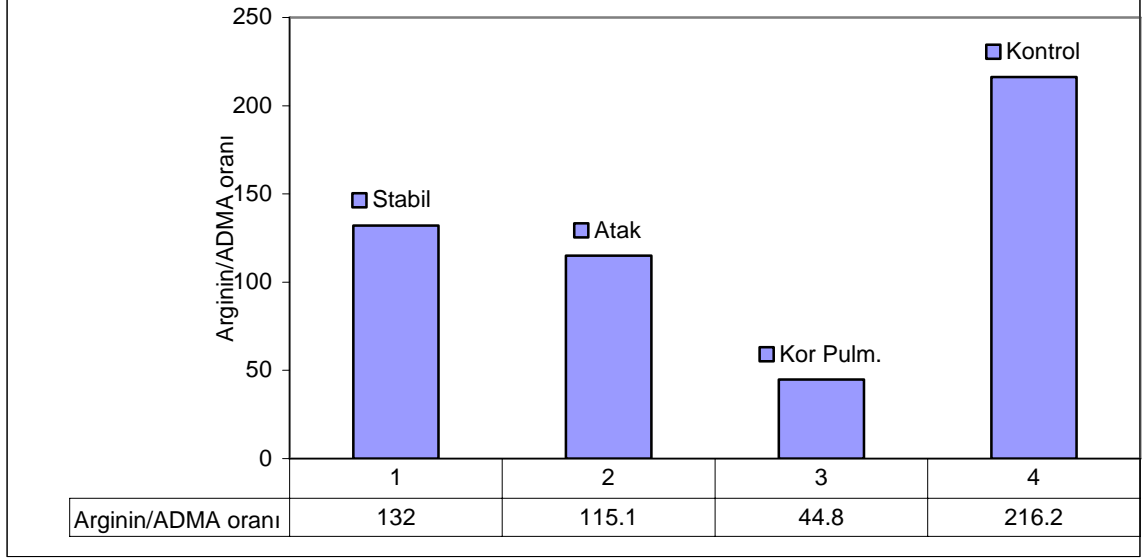
Serum arjinin düzeylerinde stabil, atak ve kontrol grupları arasında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (p>0.05). Serum arjinin düzeyleri kor pulmonale grubunda en düşük gözlenmiştir (Grafik 2). Serum arjinin düzeyleri kor pulmonale grubunda kontrol grubuna oranla oldukça düşük gözlemlenmiştir. Bu düşüklük istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p:0.016). Yine kor pulmonale grubundaki arjinin düzeyleri atak grubuna göre oldukça düşük gözlenmiştir. Bu düşüklük istatistiki açıdan önemlidir (p:0.006).



Grafik 2: Grupların arjinin düzeyleri

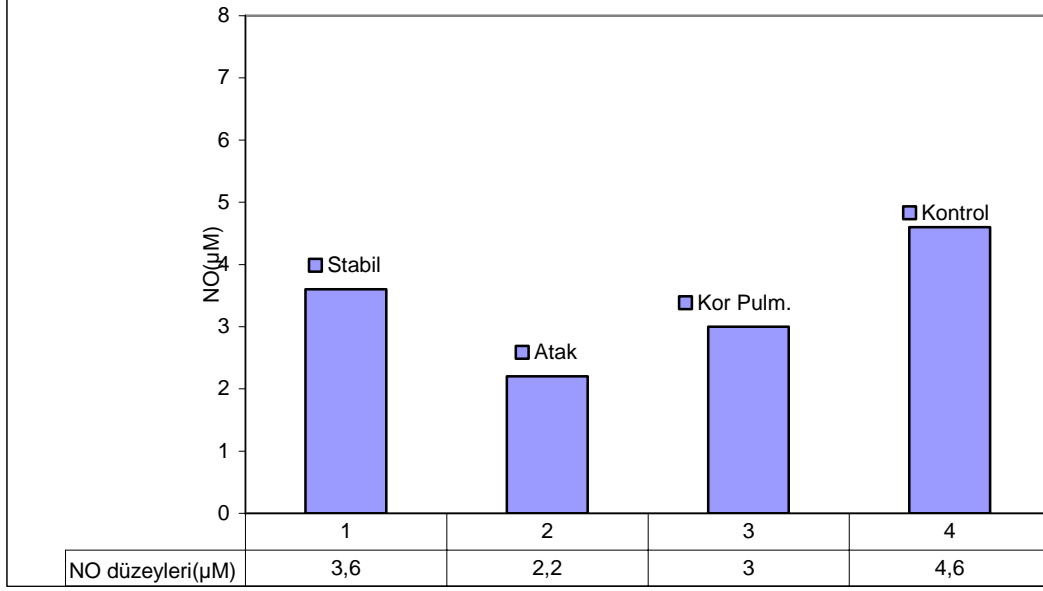
Gruplara ait ortalama arjinin değerleri grafik 2’ de gösterilmiştir. KOAH atak grubunda serum arjinin düzeyleri en yüksek seviyede iken kor pulmonale grubunda en düşük seviyelerdedir.

Arjinin/ADMA oranları açısından stabil ve atak KOAH grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadı. Stabil KOAH ve kontrol grubu arasında da istatistiksel açıdan önemli fark yoktu. Arjinin/ADMA değeri en düşük olarak kor pulmonale grubunda saptandı. Kor pulmonale grubunda bu oran atak ve stabil gruba göre daha düşük olmasına rağmen istatistiksel olarak farklılık göstermedi. Arjinin/ADMA oranları kor pulmonale ve atak KOAH gruplarında kontrol grubundan belirgin ölçüde düşüktü (p:0.000, p: 0.004). Gruplara ait Arjinin/ADMA oranları grafik 3’te gösterilmiştir.



Grafik 3: Grupların Arjinin/ADMA oranları

Serum NO düzeyleri stabil grupta kontrol grubuna oranla düşük olmasına rağmen bu düşüklük istatistiki açıdan anlamlı değildir ( $p>0.05$ ). KOAH atak grubu ile kor pulmonale grupları serum NO düzeyleri açısından karşılaştırıldığında iki grup arasında anlamlı bir değişiklik bulunmadı (grafik 4). Serum NO düzeyleri kor pulmonale grubunda kontrol grubuna göre düşük olarak tespit edilmiştir. Bu düşüklük istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). En düşük NO değerleri atak grubunda, en yüksek NO değerleri ise kontrol grubunda tespit edildi. Buna karşılık hem atak grubu hem de kontrol grubu NO değerleri diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bir fark göstermedi.

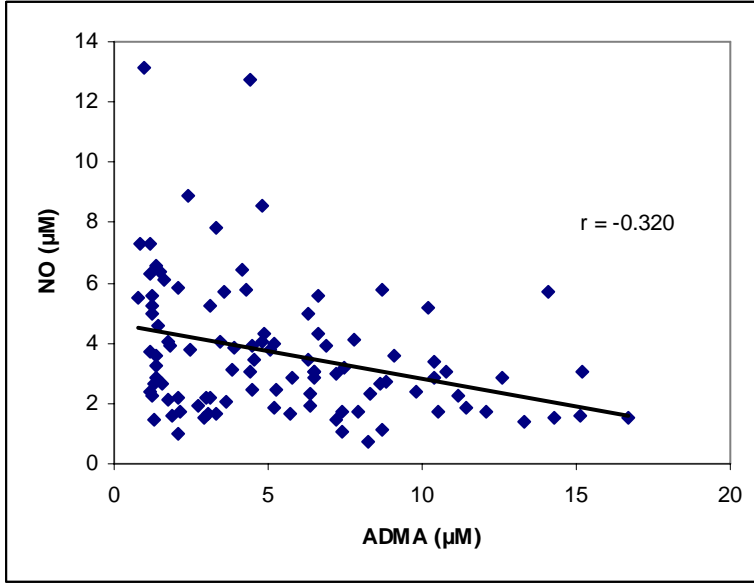


Grafik 4: Grupların NO düzeyleri

Gruplara ait ortalama NO değerleri grafik 4' de gösterilmiştir. Kontrol grubunda serum NO düzeyleri en yüksek seviyede iken KOAH atak grubunda en düşük seviyelerdedir.

#### 4.4. Korelasyon alışmaları

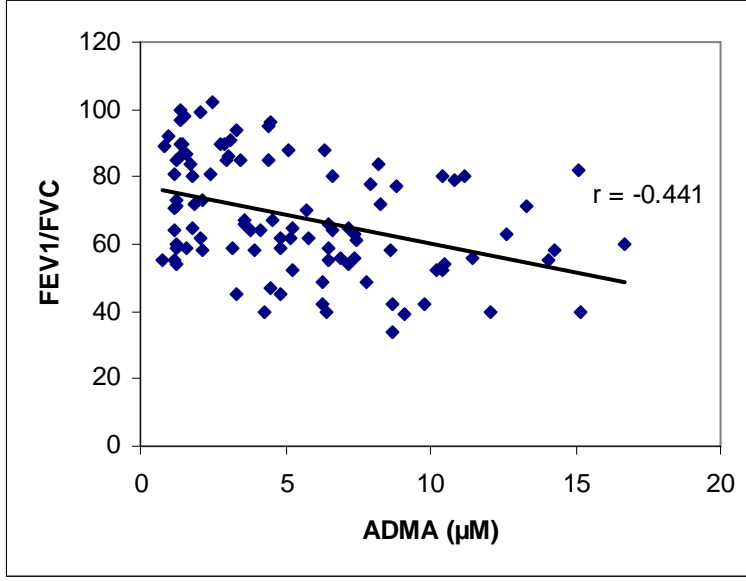
Serum ADMA ve NO düzeyleri arasında korelasyona bakıldığında negatif bir korelasyon tespit edildi ( $r = -0.320$ ) ( $p:0.001$ ). Artan ADMA düzeyleri ile NO değerlerinde hasta bazlı bakıldığında azalma gözlendi. KOAH gruplarında ADMA-NO arası korelasyon grafik 5'te gösterilmektedir.



Grafik 5: ADMA-NO korelasyon grafiği

Serum ADMA düzeyleri ile kan gazları arasında korelasyon testleri uygulamasında PaO<sub>2</sub> ile ADMA arasında negatif bir korelasyon tespit edildi ( $r = -0.299$ ,  $p:0.002$ ). Serum ADMA düzeyleri ile pH arasında anlamlı bir negatif korelasyon tespit edilmedi ( $r = -0.057$ ,  $p>0,05$ ). Serum ADMA düzeyleri ile PaCO<sub>2</sub> arasında pozitif korelasyon bulundu ( $r = 0.277$ ,  $p:0,005$ ). Serum ADMA düzeyleri ile SaO<sub>2</sub> arasında negatif bir ilişki gözlemlense de anlamlı bir ilişki bulunmadı ( $r = -0.162$ ,  $p>0,05$ ). Tüm parametrelerin ADMA ile korelasyonları tablo 10'da gösterilmektedir.

Serum ADMA düzeyleri ile solunum fonksiyon testleri arası korelasyona bakıldığında ADMA ile FEV<sub>1</sub> arasında anlamlı bir güçlü negatif korelasyon bulundu ( $r = -0.508$ ,  $p:0,000$ ). ADMA ile FVC arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir negatif korelasyon bulundu ( $r = -0.446$ ,  $p:0,000$ ). ADMA ile FEV<sub>1</sub>/FVC arasında negatif korelasyon bulundu ( $r = -0.441$ ,  $p:0,000$ ). KOAH gruplarında ADMA-FEV<sub>1</sub>/FVC arası korelasyon grafik 6'da gösterilmektedir. Yüksek ADMA değerlerinin azalmış solunum fonksiyon testlerine neden olduğu görülmüştür.



Grafik 6: ADMA-FEV1/FVC korelasyon grafiği.

Tablo 10: Parametrelerin ADMA ile korelasyonları

	r	p
NO	-0.320	0.001
FEV <sub>1</sub>	-0.508	0.000
FVC	-0.446	0.000
FEV1/FVC	-0.441	0.000
PH	-0.057	>0.05
PaO <sub>2</sub>	-0.299	0.002
SaO <sub>2</sub>	-0.162	>0.05
PaCO <sub>2</sub>	0.277	0.005

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kronik obstrüktif akciğer hastalığının (KOA) pulmoner hipertansiyon gelişiminde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Pulmoner hipertansiyon varlığı hastalığın mortalitesini önemli derecede arttırmaktadır. Kronik hipoksiye sekonder pulmoner hipertansiyon nitrik oksit sentaz (NOS) enzimlerinin artmış pulmoner ekspresyonu ile birlikte (1). Artmış pulmoner basınç ise güçlü vazodilatör etkili nitrik oksit (NO) mekanizmasını etkilemektedir. Bu hastalıkta nitrik oksit pulmoner üretiminin azalmış olduğu gösterilmiştir (1). NO sentezini regüle eden NOS enziminin aktivitesi ise endojen bir inhibitör olan asimetrik dimetilarginin (ADMA) molekülü ile düzenlenir. ADMA'nın, NO'in endojen inhibitörü olduğu gösterilmiştir (39).

ADMA proteinlerin posttranslasyonel metilasyonu yoluyla meydana gelir. Renal yolla da atılmakla beraber başlıca metabolik yol 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 vazodilatör etkili NO sentezi olamamakta ve bu da çeşitli klinik durumların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Çok sayıda çalışma ADMA seviyelerinde hafif artışların bile kardiyovasküler olay oranında artışa sebep olduğunu göstermiştir (39).

Pulmoner hipertansiyon; pulmoner kan basıncı artışı, küçük pulmoner arterlerin yeniden yapılanması ve sağ ventriküler hipertrofi ile karakterizedir. Pulmoner hipertansiyon patofizyolojisinde ilk olayın endotel disfonksiyonu olduğu düşünülmektedir. Bunda endotel kaynaklı nitrik oksit fonksiyonu tartışılmaktadır. Klinik çalışmalarda kısa dönemli inhale NO tedavisinin yararlı etkiler göstermesi NO bağımlı vazodilatasyonun pulmoner hipertansiyonda bozulduğunu göstermiştir. Çok sayıda çalışma kronik hipoksiye bağlı pulmoner hipertansiyonda paradoksik olarak eNOS'un pulmoner ekspresyonunun arttığını göstermiştir. Her ne kadar bazı çalışmalar NOS aktivitesinin arttığı ve bunun mediatörü olan cGMP'nin arttığını gösterse de çok sayıda çalışmada da bu hastalıkta NO üretiminin azaldığı gösterilmiştir. Bu yüzden pulmoner hipertansiyonda artmış NOS aktivitesi her zaman NO aktivitesinde artmayla korele değildir. Kompleks düzenleyici mekanizmaların varlığı söz konusu olabilir. NOS enzim aktivitesi metil arjininler (ADMA, L-NMMA) tarafından kompetitif olarak inhibe edilir. Her ikisi de doğal olarak meydana gelir. Serumda ADMA'nın miktarı L-NMMA miktarının 10 katıdır (1).

Bizim çalışmamızda KOAH'lı hastalarda (n=75) ADMA düzeyinin sağlıklı kontrol grubuna (n=25) oranla daha yüksek olduğunu saptadık. Literatürde benzer çalışmalara bakıp değerlendirdiğimizde, Kielstein ve ark. idiopatik pulmoner hipertansiyonu olan 57 hastada kardiyak kateterizasyon yoluyla kan alıp serum ADMA düzeylerini HPLC metoduyla ölçtüler. Serum ADMA düzeylerinin kontrol grubuna oranla önemli ölçüde yüksek olduğunu saptadılar. Çalışmalarında sağ atrium basıncı ve pulmoner vasküler basınç ile serum ADMA düzeyleri arasında pozitif korelasyon tespit ettiler. Mixed venöz oksijen saturasyonu ile serum ADMA düzeyleri arasında negatif korelasyon tespit ettiler. Yine aynı çalışmada 0,1 mg/kg/dk. ADMA'nın 40 dakika süreyle infüzyonu sonrası sağ atrium basıncı ve pulmoner vasküler rezistansı ölçtüler. Sağ atrium basıncı ve pulmoner vasküler rezistansın arttığını gözlemlediler. Bu çalışma ADMA'nın akut infüzyonunun pulmoner vasküler rezistansı artırıp kalp atım hacmini azalttığını göstermiştir (67).

DeneySEL pulmoner hipertansiyon oluşturulan çalışmalarda da (Pullamsetti ve ark.) ratlarda gerek serum gerekse de dokuda ADMA ve SDMA düzeylerini araştırdılar. Araştırmacılar doku ve serum ADMA ve SDMA düzeylerinin yükseldiğini göstermişlerdir. Aynı çalışmada DDAH ekspresyonundaki azalma ile ADMA artışını açıklamışlardır (68).

Yine Gorenflo ve ark. düşük ve yüksek basınçlı konjenital pulmoner hipertansiyon hastalarında ADMA düzeylerini araştırdılar. Çalışmalarında yüksek basınçlı konjenital pulmoner hipertansiyon hastalarında ADMA düzeylerini diğer gruba göre daha yüksek olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada yüksek ADMA düzeylerinin yüksek pulmoner basınç ile korele olduğu gözlenmektedir (69).

Arrigoni ve ark. yenidoğanların persistan pulmoner hipertansiyonunda DDAH 2 aktivitesini araştırmışlardır. Yenidoğanların persistan pulmoner hipertansiyonunda DDAH 2 aktivitesinin yetersiz olduğunu tespit etmişlerdir. Bu da NOS aktivitesinin azalmasını ve ADMA seviyelerinin yükselmesini açıklamaktadır (45).

İdiopatik pulmoner hipertansiyonun şiddetli formlarında hipoksi sonucu artmış oksidan stresin sonucu olarak DDAH aktivitesi azalabilir, bu da ADMA seviyelerinin artmasına ve durumun daha da ağırlaşmasına sebep olabilir. Bu bulgu birkaç çalışmayla pekiştirilmiştir. Ratlarda hipoksi sonucu oluşturulan pulmoner hipertansiyonun pulmoner DDAH ekspresyonunun azalması sonucu ADMA yükselişiyile meydana gelmiş olabileceği önerilmiştir (67).

Çalışmamızda örnek hasta grubu olarak seçtiğimiz KOAH hastalarında sık görülen hipoksinin de ADMA düzeyleri üzerine artıcı etkisi olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (1, 38, 60). Millat ve ark. 1 hafta süreyle hipoksiye maruz bırakılan ratlarda eNOS

ekspresyonundaki artışa rağmen ADMA düzeylerinin arttığını göstermişlerdir. Yine domuzların hipoksiye bırakıldığı bir çalışmada da DDAH aktivitesinin baskılandığını göstermişlerdir (1).

Anemon ve ark hemorajik şok yaptıkları hayvanlarda hemoraji öncesi ve sonrası ADMA düzeylerini araştırmışlardır. Hemorajik şok oluşturulan hayvanlarda meydana gelen hipoksi ve oligüri tablosu sonucu ADMA düzeylerini hemoraji öncesi değerlerine göre yüksek olarak bulmuşlardır (60).

Yıldırım ve ark. 3 hafta süreyle hipoksiye (%10 O<sub>2</sub>) maruz bırakılan ratlarda PRMT ekspresyonu ve PRMT izoformlarının ekspresyonundaki değişiklikleri ve doku ADMA miktarını araştırmışlardır. PRMT 2 mRNA ve protein düzeylerinde artış gözlemlenirken PRMT izoformlarının ekspresyonunda herhangi bir değişiklik gözlemlenmemişlerdir. ADMA miktarını hipoksik grupta normoksik gruba göre yüksek olarak bulmuşlardır. Bu çalışmayla hipoksi sonucu alveolar tip 2 hücrelerde PRMT 2 ekspresyonunun arttığını böylece protein metilasyonunda artışın gerçekleştiğini belirlemişlerdir (38).

Dong Y. ve ark. domuzlarda hipoksi sonucu koroner arter segmentlerinde eNOS mRNA ve protein seviyelerinin belirgin şekilde arttığını göstermişlerdir (70). Eskiocak S. ve ark. yine hipoksiye maruz bırakılan ratlarda beyin dokularında NO'nun arttığını göstermişlerdir (71).

Fesler P. ve ark. hipoksik köpeklerde hipoksik pulmoner vazokonstriksiyonun tedavisinde NO'nun sildenafilden daha etkili olduğunu tespit etmişlerdir (72).

Sandimo M. ve ark. pulmoner hipertansif tavuklardaki çalışmalarında NOS aktivitesini araştırmışlardır. Pulmoner hipertansif tavukların hipertansif olmayanlara göre daha düşük NOS aktivitesi gösterdiklerini bulmuşlardır (73).

Maziak ve ark. KOAH'lı hastalar üzerinde yaptıkları çalışmada stabil olmayan KOAH grubunda stabil KOAH grubuna göre exhale NO seviyelerini yüksek olarak bulmuşlardır. Bu araştırmacılar exhale NO düzeylerinin FEV<sub>1</sub> değerleriyle negatif korelasyon gösterdiğini tespit etmişlerdir (74).

Sung Won Bae ve ark. akut koroner sendromlu hastalarda yaptıkları çalışmada ADMA ve arjinin düzeylerini araştırdılar. ADMA düzeylerini kontrol grubuna göre belirgin derecede yüksek olarak tespit etmişlerdir. Hasta grubuyla kontrol grubu arasında arjinin düzeyleri açısından bir farklılık bulamamışlardır. Arjinin/ADMA oranlarını hasta grubunda düşük olarak buldular. Hasta grubunda 2 haftalık tedavi sonrası ADMA düzeylerinin belirgin derecede düştüğünü saptadılar (52).

Saitoh ve ark. konjestif kalp yetmezliği olan hastalarda yaptıkları çalışmada ADMA ve NO düzeylerini araştırdılar. Akut dönem konjestif kalp yetmezliği olan hastalarda kronik grup ve kontrol grubuna göre ADMA düzeylerini yüksek olarak buldular. NO seviyelerini kronik grupta akut ve kontrol grubuna göre yüksek olarak buldular. Kronik konjestif kalp yetmezliği grubunda NO düzeylerinin yüksek olmasının kompensatuar mekanizmalarla oluşmuş olabileceği sonucuna varmışlardır (75).

Çalışmamızda daha sonra KOAH grubunu akut dönem KOAH (n=25), stabil dönem KOAH (n=25) ve kor pulmonale (n=25) olmak üzere 3 gruba ayırdık. ADMA, arjinin, NO düzeylerini ve Arjinin/ADMA oranlarını bu gruplarda araştırdık. Bu grupları birbirleriyle ve kontrol grubuyla karşılaştırdık.

KOAH grubunda ADMA düzeylerinin kontrol grubuna göre belirgin şekilde yüksek olduğunu gözledik (p:0,000). Arjinin ve NO düzeyleri açısından KOAH grubu ile kontrol grubu arasında bir farklılık gözlemedik. Arjinin/ADMA oranlarını KOAH grubunda kontrol grubuna göre düşük olarak bulduk (p:0.003).

Her 3 KOAH grubunda ADMA seviyelerini kontrol grubuna göre yüksek tespit ettik (p<0.05). ADMA düzeyleri açısından atak ve stabil KOAH grupları arasında fark yoktu. Atak ve kor pulmonale grupları arasında da farklılık gözlenmedi. Kor pulmonale grubunda ADMA düzeylerini stabil gruba göre yüksek olarak bulduk (p:0.018).

Arjinin düzeyleri atak ve stabil gruplarında kontrol grubuna göre ve kendi aralarında farklılık göstermezken kor pulmonale grubunda kontrol grubuna göre düşük olarak gözlendi. Kor pulmonale grubuyla stabil grupları arasında arjinin düzeyleri açısından fark yokken akut gruptan anlamlı şekilde düşüktü (p:0.006).

KOAH atak ve stabil grupları arasında Arjinin/ADMA oranları açısından farklılık gözlemedik. Stabil KOAH grubunda kontrol grubuna oranla Arjinin/ADMA oranlarında istatistiksel farklılık gözlenmezken kor pulmonale ve atak KOAH gruplarında kontrol grubundan düşük Arjinin/ADMA oranı gözlendi (p:0.000, p:0.004).

Millat ve ark. hipoksiye maruz bırakılan ratlarda NOS substratı arjinin uygulamasının NO konsantrasyonlarında yükselme ve sağ ventriküler hipertrofide %50 oranında azalmaya sebep olmuştur (1).

L-Arjinin takviyesi ADMA seviyesi ne olursa olsun endotel fonksiyonu, miyokard perfüzyonu, anjina, erektil disfonksiyon ve egzersiz toleransında düzelmeye neden olabileceği öne sürülmüştür. Kardiyovasküler disfonksiyonun tedavisinde arjinin suplementasyonu faydalı bulunmuştur. Kontrol edilemeyen anjinası olan 10 hastanın 7'sinde 3 ay süreyle günlük 9 gram arjinin semptomlarda belirgin bir düzelme sağlamıştır. Hücre adezyon

moleküllerinde proinflamatuvar sitokinlerde önemli düşüşler gözlenmiştir. L-Arjininin deneysel hipertansiyonun bazı tiplerinde sistemik kan basıncını düşürdüğü görülmüştür (56).

Ratlarda pulmoner damarların düz kas hücrelerine eNOS gen transferi monocrotalin bağımlı pulmoner hipertansif ratlarda sağ ventriküler sistolik basınç ve sağ ventriküler hipertrofiyi azaltmıştır (1).

Pulmoner damarlara DDAH gen transferi, pulmoner hipertansiyonun önlenmesinde yeni bir tedavi yaklaşımı olabilir (1). DDAH aktivitesinde sağlanacak artış ile ADMA katabolizmasında artış sağlanabilir ve NO metabolizmasının daha az etkilenmesi sağlanabilir.

Çalışmamızda KOAH gruplarında NO düzeyleri kontrol grubundan düşük olarak tespit edilmesine rağmen istatistiksel açıdan bir farklılık gözlemlenemedi. NO oldukça labil bir molekül olup gerçek düzeylerin tespiti oldukça zor olmaktadır. Literatürlerde farklı NO düzeylerinin tespiti altında yatan en önemli nedenlerden birisi de metodolojik farklılıklardır. Aynı zamanda hem artan hem de azalan NO düzeylerinin her ikisinin de artmış hasara neden olabileceği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda KOAH grubu hastalarda NO düzeylerinin azalmış olmasına rağmen NO düzeylerinde istatistiksel anlamlı azalış bulunmamıştır. NO molekülünün labil olması ve ölçüm yöntemimizden kaynaklanan bir durum olabileceği gibi literatürlerde de belirtilen artmış NOS aktivitesinin yine artmış ADMA düzeyi ile baskılanması sonucu NO düzeyleri değişmemiş olabilir. NO'ya göre çok daha stabil bir molekül olan ADMA'nın ölçümü pulmoner hipertansiyon gelişimi açısından olası rolü konusunda bize daha güvenilir sonuçlar verebilmektedir. Bizim sonuçlarımız artmış ADMA oranının KOAH temelinde gelişen pulmoner hipertansiyon fizyopatolojisinde önemli rol oynadığını göstermektedir. Yine literatürde bulunan gerek hipoksi, gerekse pulmoner hipertansiyonlu olgularda gözlenenler ile paralellik oluşturmaktadır.

Gerek bizim çalışmamız gerekse de literatürdeki çalışmalar ADMA'nın önemli bir hedef molekül olabileceğini ve düzeyinin düşürülmesinin hastalığın ilerlemesi üzerinde önemli etkisi olabileceğini göstermektedir. Yine çalışmamız ADMA düzeyinin yüksekliğinin KOAH hastaları için kötü bir prognostik belirteç olduğunu göstermektedir. ADMA düzeyini azaltacak stratejiler hastalığın gerek tedavisinde gerekse de semptomlarının azaltılmasında yardımcı olabilir.

DDAH geninin polimorfik yapısının incelenmesi de ADMA katabolizmasını incelemek açısından önemli bir çalışma olabilir.

## 6. ÖZET

KOAH ilerleyici hava yolu obstrüksiyonu ve nötrofilik inflamasyonla karakterize, tüm dünyada önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir. Pulmoner arteryal hipertansiyon (PAH) sağ kalp yetmezliğine neden olarak ölüme neden olabilen şiddetli bir hastalıktır. PAH küçük pulmoner arterlerde endotelial hücre proliferasyonu, medial hipertrofi ve adventisyal kalınlaşmayla karakterizedir. PAH'ta endotelial vasküler disfonksiyonun mekanizması multifaktöryeldir ve nitrik oksit sistemindeki değişiklikleri de kapsar. NO endotelde NOS tarafından arjinin aminoasidinden sentezlenir. ADMA NOS'un endojen inhibitörüdür. Biz çalışmamızda stabil KOAH, akut atak KOAH ve kor pulmonale hastalarında serum ADMA, NO ve arjinin düzeylerini ve kor pulmonale gelişiminde ADMA düzeylerinin rolü olup olmadığını belirlemeyi amaçladık.

Çalışmamıza 75 KOAH (n=25 akut atak, n=25 stabil KOAH, n=25 kor pulmonale) hastası dahil edildi. Seçilen hastaların başka herhangi bir hastalığı yoktu. Kontrol grubu 25 görünürde sağlıklı kişiden oluşturuldu. ADMA ve arjinin düzeyleri HPLC metoduyla floresans dedektörde ölçüldü. Plasma Nitrit/Nitrat konsantrasyonları kolorimetrik metotla ölçüldü. SPSS 13,0 for Windows programı yardımıyla istatistiksel analizler yapıldı. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma ve yüzde olarak özetlendi. Parametrelerin gruplar arası karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi yapıldı. Varyans analizinin anlamlı çıkması halinde gruplar arası karşılaştırma için Tamhane testinden yararlanıldı. Çalışmamız için  $p < 0.05$  anlamlı kabul edildi.

KOAH hastalarında ADMA seviyeleri kontrol grubuna kıyasla yüksek olarak bulundu. Arjinin ve NO seviyeleri açısından iki grup arasında farklılık yokken, KOAH grubunda Arjinin/ADMA oranları kontrol grubundan önemli ölçüde farklıydı.

Stabil ve atak gruplarında ADMA değerleri açısından farklılık gözlenmedi. Kor pulmonale grubunda ADMA seviyeleri stabil gruba göre yüksek olarak saptandı. Kor pulmonale ve atak gruplarında ADMA değerleri açısından farklılık gözlenmedi. Kor pulmonale grubunda kontrol ve atak KOAH gruplarına göre düşük arjinin değerleri tespit edildi. Stabil ve kor pulmonale grupları arasında arjinin değerleri açısından farklılık yoktu. NO değerleri açısından gruplar arasında farklılık tespit edilmedi. Arjinin/ADMA oranları atak KOAH ve kor pulmonale grubunda kontrol grubuna göre önemli ölçüde düşüktü. Stabil ve atak KOAH grupları arasında Arjinin/ADMA oranları açısından farklılık gözlenmedi.

Sonuç olarak; bizim çalışmamız ADMA seviyelerinin KOAH hastalarında arttığını göstermiştir. KOAH'ın prognozunu belirlemede ADMA yeni bir belirteç olarak kullanılabilir.

ADMA KOAH hastalarında meydana gelen pulmoner hipertansiyonun patogeneğinde önemli bir rol oynayabilir. Bu yüzden pulmoner hipertansiyonun önlenmesi ve tedavisinde ADMA önemli bir hedef olabilir.

## 7. SUMMARY

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by progressive airflow obstruction and a neutrophilic inflammation. Chronic obstructive pulmonary disease is an important cause of morbidity and mortality throughout the world. Pulmonary arterial hypertension is a severe, disabling disease causing death due to right heart failure. It is characterized by endothelial cell proliferation, medial hypertrophy, and adventitial thickening of small pulmonary arteries. The mechanisms of endothelial vasodilator dysfunction in PAH are multifactorial and include changes of the nitric oxide system. NO is synthesized in the endothelium from the amino acid L- arginine by the action of NOS. ADMA is an endogenous competitive inhibitor of NOS. The aim of our study was to determine serum ADMA, NO and arginine in patients stable, acute attack and cor pulmonale and we investigated role of ADMA the progression of pulmonary hypertension in COPD patients

Seventy five COPD subjects (n=25 from acute attack, n=25 stable COPD, n=25 Cor Pulmonale) participated in this study. To be selected patients had to have no other diseases. The control group was formed by twenty five apparently healthy people. ADMA and arginine levels were measured by HPLC with fluorescence detection. Plasma Nitrite/Nitrate concentrations were determined using a commercial colorimetric assay. Statistical analyses were done by using SPSS 13.0 for Windows One-Way ANOVA multiplied comparison and Tamhane post hoc test were used. Values were presented as means  $\pm$  SD. Values of  $p < 0.05$  were accepted as significant.

Patients of COPD had significant higher values of ADMA compared to control group. There was no difference between groups for arginine and NO values but the Arginine/ADMA ratio of COPD group was significantly different compared to control group.

There was no difference between stable and attack groups for ADMA values. Cor pulmonale group had significant higher values of ADMA compared to stable group. There was no difference between cor pulmonale and attack groups for ADMA values. Cor pulmonale group had lower values arginine compared to control and attack groups. There was no difference between stable and cor pulmonale groups for arginine values. There was no difference between groups for NO values. Acute attack COPD and cor pulmonale group had significantly lower Arginine/ADMA ratio of compared to control group. There was no difference between stable and attack groups for Arginine/ADMA ratio.

Our study shows that plasma ADMA level is increased in the COPD patients. ADMA seems to be a possible new marker of prognosis of COPD. ADMA may play an important role

in the progression of pulmonary hypertension in COPD patients. ADMA may therefore represent a novel therapeutic target for the treatment and prevention of pulmonary hypertension.

## 8. KAYNAKLAR:

1. Milat LJ, Whitley J, Leiper JM, Jeimes LD, Siragy MH, Carey RM, Johns RA. Evidence for Dysregulation of Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase I in Chronic Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. *Circulation* 2003;108:1493-1498.
2. Kocabaş A. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı. Umut S, Erdiñ E (Editörler). Turgut yayıncılık;2000;1-24.
3. Bartolome R. American Thoracic Society. Standarts for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Am J Crit Care Med* 1995; 152: 77-120.
4. National Heart, Lung and Blood Institute. Morbidity and mortality: chartbook cardiovascular, lung and blood diseases. Bethesda, MD: US Departement, of health and Human Services, Public Health Services, : National Institute of Health: 2003.
5. Siafakas NM. European Respiratory Society. Consensus Statement. Optimal assesment and management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Eur Respir J* 1995;8:1398-1420.
6. Murray CJL, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997;349:1498-1504.
7. Joos L, Pare PD, Sandford AJ. Genetic risk factors of chronic obstructive pulmonary disease. *Swiss Med Wkly* 2002;132:27-37.
8. Silverman EK. Genetic Epidemiology of COPD. *Chest* 2002;121(Suppl 3):1-6.
9. O'Byrne P. M, Postma DS. The Many Faces of Airway Inflammation. Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 41–66.
10. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R and et al. The Nature of Small-Airway Obstruction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* 2004;350:2645-53.
11. Brij SO, Peacock AJ. Cellular responses to hypoxia in the pulmonary circulation. *Thorax* 1998;53:1075–1079.
12. Barbera` JA, Peinado VI, Santos S. Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 21: 892–905.
13. De Troyer A. Effect of hyperinflation on the diaphragm. *Eur Respir J* 1997; 10: 708–713.
14. Orozco-Levi M, Gea J, Lloreta JL et al. Subcellular adaptation of the human diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1999; 13: 371-378.
15. Numan Numanoğlu. Solunum Sistemi ve Hastalıkları, Antıp Yayınları 2001; 436-441.
16. Michael C. Hart. Nitric Oxide in Adult Lung Disease. *Chest*. 1999;115:1407-1417.

17. Marletta MA. Nitric oxide synthase: aspects, concerning structure and catalysis. *Cell* 1994;78:927-30.
18. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376.
19. Cooke JP, Tsao PS. Cytoprotective effects of nitric oxide. *Circulation* 1993;88:2451- 4.
20. Bergmann L, Kröncke K-D, Suschek C, Kolb H, Kolb-Bachofen V. Cytotoxic action of IL-1 $\beta$  against pancreatic islets is mediated via nitric oxide formation and is inhibited by N-monomethyl-L-arginine. *FEBS Lett* 1992;299:103-6.
21. Koşay S. Nitrik oksidin tanımı. EÜTF Yayınları 1996: 83, 1-6.
22. Soydan I. Nitric oksidin hastalıklardaki fizyopatolojik rolü. Nitrik oksidin patolojik olaylardaki rolü; Ege Üniversitesi Basımevi, 1996.
23. Kolb H, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: a pathogenic factor in a autoimmunity. *Immunol Tod.* 1992; 13:157.
24. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992; 6: 3051-3064.
25. Kharitonov VG. Kinetics of nitric oxide autoxidation in aqueous solution. *J Biol. Chem.* 1994; 269: 5881-5883.
26. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 1992; 26: 1898-1902.
27. Anggard E. Nitric oxide Mediator, murder, and medicine. *Lancet* 1994;343:1199 -1206.
28. 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.
29. Kerwin JF Jr, Lancaster JR Jr, Feldman PL. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J Med Chem* 1995;38:4343-62.
30. 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.
31. Bayındır O. Nitric oksidin reaktivitesi, sentezi ve analiz metodları. EÜTF Yayınları 1996; 83: 14-21.
32. Naseem KM. The Role of Nitric Oxide In Cardiovascular Disease Molecular Aspects of Medicine 2005; 26:33-65.
33. Clarke S. Protein methylation. *Curr Opin Cell Biol.* 1993;5:977–983.
34. McBride AE, Silver PA. State of the Arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell.* 2001;106:5–8.

35. 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.
36. 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.
37. Lentz SR, Rodionov RN, Dayal S. Hyperhomocysteinemia, endothelial dysfunction and cardiovascular risk: the potential role of ADMA. *Atherosclerosis Supplements* 2003; 4: 61–65.
38. 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: 436-43.
39. Vallance P, Leiper J. Cardiovascular Biology of the Asymmetric Dimethylarginine: Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase Pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1023-1030.
40. Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Purification and properties of a new enzyme. NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase from rat kidney. *J Biol Chem.* 1989;264:10205–10209.
41. 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.
42. Cooke JP. Does ADMA Cause Endothelial Dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2032-2037.
43. 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.
44. 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.
45. Arrigoni FI, Vallance P, Haworth SG, Leiper JM. *Circulation.* 2003;107;1195-1201.
46. 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;119:1533–40.
47. 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;42:191–196.

48. 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.
49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. Won Bae S, Stühlinger MC, Yoo HS, Hyun KY, Park HK et al. 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.
53. Mark F. McCarty. *Medical Hypotheses* 2004;63: 699–708.
54. 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.
55. Hodis HN, Mack WJ, Labree L et al. The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events. *Ann Intern Med* 128:262–269, 1998.
56. Kielstein JT, Böger RH, Bode-Böger SM et al. Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: Relationship to treatment method and atherosclerotic disease. *J Am Soc Nephrol* 10:594–600, 1999.
57. 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.
58. Kielstein JT. Asymmetric Dimethylarginine: A Cardiovascular risk Factor and a Uremic Toxin coming age? *American Journal of Kidney Diseases*. 2005; 46: 2.
59. Paloma L, Torondel B, Medina P, Segarra G, Olmo JA, Serra MA., Rodrigo JM. Plasma concentrations of nitric oxide and asymmetric dimethylarginine in human alcoholic cirrhosis. *Journal of Hepatology* 2004; 41.
60. Anemon A, Backman V, Snygg J, Von Bothmer C, Fandriks L, Petterson A. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase during graded hemorrhagic shock. *Circ Shock* 1994;44(3):111-4.

61. Yang TL, Chen MF et al. Effect of fenofibrate on the level of asymmetric dimethylarginine in individuals with hypertriglyceridemia. *Eur J Clin Pharmacol.* 2006;62:179-84
62. Chen BM, Xia LW, Zhao RQ. Determination of NG,NG dimethylarginine in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B.* 1997;692:467-471.
63. Causse E, Siri N, Arnal JF, Bayle C, Malatray P, Valdiguie P, Salvayre R, Couderc F. Determination of asymmetrical dimethylarginine by capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence. *J Chromatogr B.* 2000;741:77-83.
64. Vishwanathan K, Tackett RL, Stewart JT, Bartlett MG. Determination of arginine and methylated arginines in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2000;748:157-166.
65. Tsikas D, Schubert B, Gutzki FM, Sandmann J, Frölich JC. Quantitative determination of circulating and urinary asymmetric dimethylarginine (ADMA) in humans by gas chromatography- tandem mass spectrometry as methyl ester tri (Npentafluoropropionyl) derivative. *J Chromatogr B* 2003;798:87-99.
66. Schulze F, Wesemann R, Schwedhelm E, Sydow K, Albsmeier J, Cooke JP, Böger RH. Determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA) using a novel ELISA assay. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:1377-1383.
67. Kielstein JT, Stefanie M, Böger B, Hesse G, Lobenhoffer JM, Takacs A, Fliser D, Hoepfer MM. Asymmetrical Dimethylarginine in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1414-1418.
68. Pullamsetti S, Kiss L, Ghofrani HA, Voswinckel R, Haredza P et al. Increased levels and reduced catabolism asymmetric dimethylarginines in pulmonary hypertension. *The FASEB Journal* 2005;19: 1175-7.
69. Gorenflo M, Zheng C, Werle E, Fiehn W, Ulmer HE. Plasma levels of asymmetric dimethyl-L-Arginine in Patients with Congenital Heart Disease and pulmonary hypertension. *Journal of Pharmacology* 2001;37:489-492.
70. Dong Y, Thompson LP. Differential Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Coronary and Cardiac Tissue in Hypoxic Fetal Guinea Pig Hearts. *J Soc Gynecol Investig.* 2006;13:483-90.
71. Eskiocak S, Tutunculer F, Basaran UN, Taskiran A, Cakir E. The effect of melatonin on protein oxidation and nitric oxide in the brain tissue of hypoxic neonatal rats. *Brain Dev.* 2006 Jul.
72. Fesler P, Pagnamenta A, Rondelet B, Kerbaul F, Naeije R. Effects of sildenafil on hypoxic pulmonary vascular function in dogs. *J Appl Physiol.* 2006;101:1085-90.
73. Sandimo MM, Hernandez A. Pulmonary arteriole remodeling in hypoxic broilers expressing different amounts of endothelial nitric oxide synthase. *Poult Sci.* 2006;85:899-901.

74. Maziak W, Loukides S, Culpitt S, Sullivan P, Kharitonov SA., Barnes PJ. Exhaled Nitric Oxide Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Med.* 1998;157:998-1002.

75. Saitoh M, Osanai T, Kamada T, Matsunaga T, Ishikaza H, Hanada H, Okumura K. High Plasma Level of asymmetric dimethylarginine in patients with acutely exacerbated congestive heart failure: role in reduction of plasma nitric oxide level. *Heart Vessels* 2003;18:177-182.

## 9. ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Konya'da doğdu. İlk, orta ve lise tahsilini Ankara'da tamamladı. Tıp Eğitimini 1993–1999 yılları arasında Konya Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde tamamladı. Konya Derebucak Merkez Sağlık Ocağında pratisyen hekim olarak çalıştı. Daha sonra Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Biyokimya ABD'de Tıpta Uzmanlık Eğitimi Programına başladı. Yabancı dili İngilizcedir.

## 10. TEŞEKKÜR

Tezin hazırlanması esnasındaki yardım ve desteklerinden dolayı baŐta Anabilim Dalı BaŐkanımız Prof. Dr. İdris MEHMETOĞLU'na, tez danıŐmanım Doç. Dr. Ali Ünlü'ye, Anabilim Dalımızda görevli tüm hocalarım ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma, Göğüs Hastalıkları ve Tüberküloz Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Fikret Kanat'a ve tüm Biyokimya Anabilim Dalı ve Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Biyokimya Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.