

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**İNSAN UMBİLİKAL VEN ENDOTEL HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE
ENDOTOKSİN ARACILI ENDOTEL DİSFONKSİYONDA
NO-ADMA-HOMOSİSTEİN ARASINDAKİ İLİŞKİ,
ARGİNİN VE TAURİNİN ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZGE TUĞÇE PAŞAOĞLU

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nurten TÜRKÖZKAN

ANKARA

Ocak 2010

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**İNSAN UMBİLİKAL VEN ENDOTEL HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE
ENDOTOKSİN ARACILI ENDOTEL DİSFONKSİYONDA
NO-ADMA-HOMOSİSTEİN ARASINDAKİ İLİŞKİ,
ARGİNİN VE TAURİNİN ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZGE TUĞÇE PAŞAOĞLU

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nurten TÜRKÖZKAN

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2009-06 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

Ocak 2010

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya (Tıp) Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 18/ 01 / 2010

Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Nurten TÜRKÖZKAN
Gazi Üniversitesi

Yrd.Doç.Dr.Barbaros BALABANLI
Gazi Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Şekiller	iii
Tablolar	iv
Kısaltmalar	v
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. İnflamasyon.....	4
2.1.1. İnflamasyonun kardiyovasküler hastalıklardaki önemi.....	6
2.1.2. Endotoksemi aracılı inflamasyon.....	8
2.2. Endotel.....	9
2.2.1. Endotelin yapı ve fonksiyonları.....	9
2.2.2 Endotel kaynaklı mediatörler.....	10
2.3. Nitrik oksit.....	11
2.3.1. NO'nun sentezi.....	12
2.3.1.a. NOS izoformları.....	13
2.3.1.b. NOS'un mekanizması.....	16
2.3.1.c. NOS inhibitörleri.....	17
2.3.2. NO'nun yıkımı ve eliminasyonu.....	19
2.3.3. NO'nun biyolojik etki mekanizması ve önemi.....	20
2.4. Asimetrik Dimetilarginin (ADMA).....	23
2.4.1. ADMA'nın yapımı.....	23
2.4.2. ADMA'nın yıkımı.....	23
2.4.3. ADMA'nın taşınması.....	25
2.4.4. ADMA'nın patofizyolojisi.....	26
2.4.5. L-arginin paradoksu.....	28
2.5. Homosistein (Hcy).....	29
2.5.1. Homosistein'in oluşumu.....	29
2.5.2. Homosistein'in metabolizması.....	30
(a) Remetilasyon yolu.....	31
(b) Transsülfürasyon yolu.....	32

2.5.3. Homosistein'in patofizyolojisi.....	32
2.6.Taurin.....	35
2.6.1. Taurin'in sentezi.....	36
2.6.2. Taurin'in önemi.....	37
3. GEREÇ VE YÖNTEM	42
3.1. Gereçler.....	42
3.1.1. Umblikal kordlar.....	42
3.1.2. Cihaz ve Malzemeler.....	42
3.2. Yöntemler.....	43
3.2.1. Hücre Kültürü.....	43
(a) Umblikal kordların alınması ve saklanması.....	43
(b) Hücre kültürü için solüsyon hazırlanması.....	44
(c) Hücre Kültürünün yapılması.....	44
(d) Deney grupları ve madde uygulamaları.....	45
3.2.2. Nitrat/Nitrit Tayini.....	46
3.2.3. Homosistein Tayini.....	49
3.2.4. ADMA Tayini.....	51
3.2.5. İstatistiksel Analiz.....	53
4. BULGULAR	54
4.1. HUVEC kültürü bulguları.....	54
4.2. Parametrelere ilişkin bulgular.....	55
4.2.1. Nitrat/Nitrit düzeyleri bulguları.....	55
4.2.2 Homosistein düzeyleri bulguları.....	57
4.2.3. ADMA düzeyleri bulguları.....	60
5. TARTIŞMA	63
6. SONUÇ	70
7. ÖZET	71
8. SUMMARY	73
9. KAYNAKLAR	75
10. ÖZGEÇMİŞ	90
TEŞEKKÜR	91

Şekiller

Şekil 1: NOS tarafından katalizlenen NO oluşumu

Şekil 2: NOS katalizörlüğünde NO oluşumu

Şekil 3: NOS'un şematik görünümü

Şekil 4: Arginin, SDMA,ADMA ve L-NMMA'nın yapısı

Şekil 5: In vivo NO metabolizması

Şekil 6: NO'nun KVS üzerindeki biyolojik etkileri

Şekil 7: ADMA'nın yapımı ve yıkımı

Şekil 8: Homosisteinin oluşumu

Şekil 9: Homosisteinin oluşumu ve metabolizması

Şekil 10: Remetilasyon yolu

Şekil 11: Transsülfürasyon yolu

Şekil 12: Homosistein ve ADMA'nın muhtemel ilişkisi

Şekil 13: Taurinin yapısı

Şekil 14: Taurinin sentezi

Şekil 15: Taurinin bazı yararlı etkileri

Şekil 16: Nitrat/nitrit tayininin prensibi

Şekil 17: Homosistein tayini prosedürü

Şekil 18: HUVEC kültürü inverted mikroskop görüntüleri

Şekil 19: Nitrat/nitrit ölçümüne ait standart grafiği

Şekil 20: Nitrat/nitrit düzeyleri grafiği

Şekil 21: Hcy ölçümüne ait standart grafiği

Şekil 22: Bir numuneye ait Hcy piki

Şekil 23: Hcy düzeyleri grafiği

Şekil 24: ADMA ölçümüne ait standart grafiği

Şekil 25: Bir numune ile aynı numunenin ADMA standardı eklenmiş pikleri

Şekil 26: ADMA düzeyleri grafiği

Tablolar

Tablo 1: Nitrat standartları

Tablo 2: OPA-ADMA türevlerinin ayrıştırılması için gradient programı

Tablo 3: Tüm grupların nitrat/nitrit düzeyleri

Tablo 4: Tüm grupların Hcy düzeyleri

Tablo 5: Tüm grupların ADMA düzeyleri

KISALTMALAR

NO: Nitrik oksit

NOS: Nitrik oksit sentaz

ADMA: Asimetrik dimetilarginin

SDMA: Simetrik dimetilarginin

Hcy: Homosistein

tHcy: Total Homosistein

KVH: Kardiyovasküler hastalıklar

KVS: Kardiyovasküler sistem

LDL: Düşük dansiteli lipoprotein

LPS: Lipopolisakkarit

NO_2^- : Nitrit

NO_3^- : Nitrat

ONOO⁻: Peroksinitrit

O_2^- : Süperoksit

SAM: S-adenozil metiyonin

SAH: S-adenozil homosistein

PRMT: Protein arginin metiltransferaz

DDAH: Dimetilarginin dimetilaminohidrolaz

CAA: Katyonik amino asit

CAT: Katyonik amino asit taşıyıcısı

ESRD: End-stage renal hastalıklar

MI: Miyokard infarktüsü

ROS: Reaktif oksijen türleri

HUVEC: İnsan Umblikal ven endotel hücresi

HPLC: Yüksek Basıncılı/Performanslı Sıvı Kromatografisi

RT: Alınkonma süresi (retention time)

1. GİRİŞ

İnflamasyon, organizmanın hasara karşı verdiği non-spesifik bir cevaptır. ¹⁻³ Endotel hücreleri inflamasyona spesifik adaptif yanıtla aktif olarak katılırlar. Bu hücrel adaptif yanıt, serbest oksijen radikali oluşumu ve endotel hücreleri tarafından üretilen nitrik oksit (NO)in miktarının artmasıyla karakterizedir.⁴ Çeşitli çalışmalar, endotoksin aracılı inflamasyon modellerinde endotel disfonksiyonunun varlığını göstermiştir. Endotel disfonksiyonu, aterosklerotik hastalıkların her aşamasında önemli rol oynamaktadır. ¹⁻³

L-Argininden nitrik oksit sentaz (NOS) aracılığıyla sentez edilen nitrik oksit (NO) vasküler yapı ve fonksiyonlarının korunmasında önemli bir yer tutmaktadır. ⁵⁻⁸ Endotel hücrelerinde eNOS'un enzimatik etkisiyle oluşan az miktardaki NO'nun vazodilatasyon, platelet agregasyonunun inhibisyonu gibi çok önemli fizyolojik fonksiyonları vardır. Ancak eNOS aracılığıyla oluşan NO az miktarda sentezlenir ve uzun süre gözlenemez. Bir inflamasyon durumunda proinflamatuvar sitokinler ve endotoksinle gerçekleşen iNOS aktivasyonu sonrasında yüksek miktarda NO oluşarak endotel hücre bileşenlerini ve fonksiyonlarını negatif etkilemektedir. ^{4,9}

İntraselüler arginin konsantrasyonu NOS'un maksimum aktiviteyi gösterebileceği seviyelerde bulunmaktadır ve bu durumda substrat verilmesinin NO seviyelerinde değişime neden olmaması beklenirken, arginin takviyesi endotele bağlı vazodilatasyonu uyarmaktadır. Bu durum arginin paradoksu olarak adlandırılmıştır. ¹⁰ Bir çok araştırmacı L-arginin paradoksuna getirilebilecek açıklamanın, L-argininin asimetrik dimetilarginin (ADMA) yoluna da girmesi olduğunu söylerken ^{10,11}, bir kısım ise bu durumun ADMA'yla ilgisi olmadığını iddia etmektedir. ¹²

Bir arginin analogu olan asimetrik dimetilarginin (ADMA), proteinlerin içindeki arginin amino asitinin guanido nitrojen atomlarının metilasyonu ile sentezlenir.¹³ Tüm NOS izoformlarını inhibe ederek NO miktarını azalttığı bildirilmektedir.^{14,15} ADMA, insan vasküler hastalıklarının patofizyolojisinde önemli rol oynamaktadır ve kardiyovasküler hastalıklar için yeni bir risk faktörü olarak görülmektedir.¹³

Endotel disfonksiyonuna neden olması dolayısıyla kardiyovasküler hastalıklar (KVH) için önemli ve büyük bir risk faktörü olan homosistein, metiyonin amino asitinden sentezlenen ve sülfür içeren bir moleküldür. Artmış plazma homosistein düzeyleri klinikte KVH markeri olarak kullanılmaktadır.^{16,17} Bazı araştırmacılar, metiyoninin homosisteine demetilasyonu sırasında açığa çıkan metil gruplarının arginine taşındığını ve bu şekilde ADMA oluştuğunu ortaya atmışlardır.¹⁸ Buna karşın bazı araştırmacılar ise ADMA ve homosistein arasında bir ilişki olmadığını, ancak homosistein artışının NO üretimini direkt olarak azalttığını iddia etmektedir.¹⁹

Diğer yandan taurin, sülfür içeren, protein yapısına girmeyen bir amino asittir. Önemli antioksidan özelliğe sahip olduğu söylenmektedir. Antioksidan ve antiinflamatuvar etkili taurinin endotel fonksiyonlarını LDL'yi azaltarak koruduğu bildirilmiştir. Taurin, ADMA miktarını azaltarak ve bu şekilde NO miktarını fizyolojik düzeylere çekerek endotel fonksiyonlarını restore ettiği ortaya atılmıştır.¹⁴ Bazı araştırmacılar ise taurinin homosistein tarafından oluşturulan oksidatif stresi antagonize ettiğini söylemektedir.²⁰ Bunun yanında, yapılan bazı in vivo inflamasyon modellerinde taurinin değişik dokularda farklı etki gösterdiği, bazı dokularda prooksidan bazı dokularda ise antioksidan etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.²¹

Görüldüğü gibi NO, ADMA, Homosistein seviyeleri arasındaki ilişki konusunda çelişkili bilgiler mevcuttur Çalışmamızın birincil amacı endotel hücre kültürlerinde bu ilişkiyi aydınlatmaktır. İkincil amacımız ise hem NO hem de ADMA'nın prekürsörü olan arginin amino asitinin ilavesinin ve taurin ilavesinin söz konusu parametreler üzerine olan etkilerini saptamaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnflamasyon

Organizmada bulunan hücre veya dokuların hasar görmesi ya da ölmesi sonucu, yakın dokular tarafından verilen lokal cevap inflamasyon olarak adlandırılır. Daha spesifik olarak inflamasyon, sıvı, çözünmüş madde ve hücrelerin, dolaşımdaki kandan hasar veya nekroz olan interstisyel dokulara sevk edildiği vasküler reaksiyondur.²² İnflamasyonun amacı hasar verici ajanı ve hasarlı dokuyu yok etmek, etkisini azaltmak veya sağlam dokudan tecrit etmektir. Klasik bulgularının yanı sıra mikroskobik olarak kompleks bir olaylar serisini içerir. Bu olaylar, arteriol, kapiller ve venüllerin genişlemesi, vasküler permeabilite artışı, sıvıların, plazma proteinlerinin ve lökositlerin damar dışına çıkarak inflamasyon odağına yönelmesini içerir.²²

İnflamasyonla karakterize hastalıklar, insanlarda morbilite ve mortalitenin önemli nedenlerinden biridir. Ayrıca, gereksiz bir durumda harekete geçen veya kendisini yabancı kabul ederek inflamatuvar cevap oluşturan immün sistem otoimmün hastalıkların temelinde yatmaktadır.²³ İnflamasyon, yarattığı rahatsızlıktan dolayı her ne kadar istenmeyen bir durum gibi görünse de homeostazı devam ettirmek için yararlı ve gerekli bir mekanizmadır. Gerekli zamanda oluşturulamayan bir inflamatuvar cevap konağı riske atar.²² Bu ikili özelliğinden dolayı, bir çok araştırmacı inflamasyonu “iki tarafı keskin bir kılıç” olarak görmektedir.^{24,25}

İnflamasyonun özellikleri yaklaşık 2000 yıl önce Cornelius Celsus tarafından “sıcaklık ve ağrıyla seyreden kızarıklık ve şişkinlik” – “*rubor et tumor cum calore et dolor*” şeklinde tanımlanmıştır; ve halen inflamasyonun kardinal bulguları olarak bilinmektedir. İnflamasyonun dört kardinal bulgusu: rubor (kızarıklık), Calor (sıcaklık), Dolor (ağrı) ve Tumor

(şişkinlik)'dur. Son yüzyılda ise Galen tarafından beşinci bir bulgu, Functio laesa (fonksiyonun bozulması) eklenmiştir. ²⁶

Rubor, inflamasyonun olduğu alanda genellikle ilk fark edilen bulgudur. İnflamatuar reaksiyonların başlamasıyla inflamasyonun olduğu alanı besleyen arterioller genişleyerek lokal mikrosirkülasyona daha fazla kan akımına izin verir. Kapillerler ise hızla kanla dolu bir hal alır. Bu durum hiperemi ve konjesyon olarak bilinir. ²²

Calor, lokal mikrosirkülasyonda artan kan akımının bir sonucu olarak kızarıklığa eşlik eder. Aslında sıcaklık artışı, normal merkez sıcaklıktan (37°C) düşük olan vücudun dış yüzeyindeki bir inflamatuvar reaksiyonun karakteristiğidir. Merkez sıcaklığın 37°C olduğu vücudun derinlerinde bu durum gözlenmez. ²²

Dolorun oluşması çeşitli nedenlerden kaynaklanabilir. Lokal pH'nın değişmesi veya belirli iyonların konsantrasyonlarının artması sinir sonlanmalarını stimule edebilir. Benzer şekilde, belirli biyoaktif kimyasalların salınması da impuls yaratabilir. Ek olarak inflamasyonun olduğu bölgenin şişmesi ve dolayısıyla basıncın lokal olarak atması da ağrı oluşturur. ²²

Tumor, dolaşımdaki kanda bulunan sıvının ve hücrelerin interstisyel dokulara geçmesi sonucu oluşur. Alanda biriken bu sıvı eksudadır. İnflamatuar reaksiyonun erken evrelerinde eksudanın çoğu sıvı iken daha sonra lökositler bu sıvıya katılır. ²²

Functio laesa, sonradan tanımlanan beşinci kardinal bulgudur. İnflamasyonun dört kardinal bulgusunu taşıyan ve dolayısıyla normal olmayan dokuda fonksiyon bozulması görülür.²²

2.1.1. İnflamasyonun kardiyovasküler hastalıklardaki önemi

İnflamasyon, etiyolojisine bakılmaksızın, immün sistemin dahil olduğu vasküler bir reaksiyondur.^{22,23} Ateroskleroz ve diğer kardiyovasküler hastalıkların (KVH) başlangıcı, ilerlemesi ve klinik komplikasyonlara neden olması dahil tüm basamaklarında inflamasyonun rolü vardır.²⁷⁻³² Bu sebepten dolayı “The Center for Disease Control” ve “American Heart Association” 2003 yılında yayınladığı raporda kardiyovasküler hastalıklar için inflamatuvar markerların da kullanılması gerektiğini belirtmektedir.³⁰

İnflamatuvar markerların risk markerı mı yoksa aynı zamanda risk faktörü mü olduğuna ilişkin çeşitli modeller vardır. Marker olan molekülün aynı zamanda KVH’ın oluşmasına bir şekilde katkısı olabileceği söylenmektedir.^{29,30,33} Buna karşılık, araştırmacıların bir kısmı bazı inflamatuvar markerların yalnızca risk markerı olduğunu, risk faktörü olmadığını söylemektedir.³⁴

İnflamatuvar markerlar arasında şu markerlar saymak mümkündür.³⁰

- 1- Adezyon molekülleri
- 2- Sitokinler
- 3- Okside düşük dansiteli lipoprotein (LDL)
- 4- Akut faz reaktanları
 - a. C reaktif proteini (CRP)
 - b. Serum amiloid A (SAA)
 - c. Fibrinojen

5- Lökosit sayımı

6- Diğer markerlar (örneğin sedimantasyon hızı)

Dolaşımdaki bir çok inflamatuvar mediatörden akut faz reaktanlarından biri olan C reaktif proteini (CRP) araştırmacılar tarafından oldukça fazla ilgi görmektedir. Bunun en büyük nedeni CRP ölçümünün kolay ²⁹ ve analitin 19 saat kadar ³⁰ stabil oluşudur. CRP'in başlıca kaynağı hepatositlerdir. Interlökin-6 (IL-6)'ya cevap olarak, interlökin-1 (IL-1) ve Tumor necrosis faktör (TNF)'ün sinerjistik artırıcı etkisiyle üretilir. ²⁹

İnflamatuvar bir marker olmasının yanı sıra, CRP bazı araştırmacılar tarafından KVH için bir mediatör olarak görülmektedir. CRP'nin kompleman sistemini aktive edip inflamatuvar aktiviteyi artırabileceği, aynı zamanda, NOS'un aktivitesini bozarak NO üretimini azaltabileceği ve bu yolla endotelial hücre apoptozisini kolaylaştıracağı söylenmektedir. ²⁹ Son çalışmalar, CRP'nin monositleri potasyel olarak çektiğini ve makrofajların LDL alımını kolaylaştırdığını göstermektedir. ³³ Buna karşılık, bazı çalışmalar CRP'nin yalnızca bir marker olduğunu, KVH için risk faktörü olmadığını iddia etmektedir. ³⁴

Patolojik olarak bakıldığında, aterosklerotik plak gelişiminin bütün aşamaları organizmanın hasara verdiği yanıttır. ³⁰⁻³² Ateroskleroz, en erken olayı endotelial hücre disfonksiyonu olan, lipid birikimi, inflamasyon, hücre ölümü ve fibrozisle karakterize progresif bir hastalıktır. ^{29,32,35} Dislipidemi, arteriyel hipertansiyon, diabetes mellitus (DM) ve sigara kullanımı gibi bir çok toksik uyarı endotelial disfonksiyonla sonuçlanabilir. ²⁹ İnflamasyon ile kardiyovasküler hastalıkları birbirine bağlayan hücresel mekanizmanın bilinmesi tedavilerde yeni hedefler ortaya çıkaracaktır. ²

2.1.2. Endotoksemi aracılı inflamasyon

Endotoksinler, gram negatif bakterilerin hücre duvarı yapısında bulunan lipopolisakkarit (LPS)lerdir. Bakterinin hücre dışına saldığı maddeler olmayıp, bakteri, lizise uğradığında açığa çıkar. LPS, toksik bir yağ asidi çekirdeği (Lipit A) ve her biri bakteri türüne özğü, O antijenlerini de içeren kompleks bir polisakkarit kılıfından oluşur. Gram negatif bir bakteri kaynaklı enfeksiyonda konakda görülen patolojik olaylardan sorumludur.³⁶

İnfeksiyon ve inflamasyon arasında bir bağ olduğu bilinmektedir. (örneğin sitokin cevabı)³⁷ Endotoksemi ise inflamasyon cevabı oluşturan en önemli mekanizmalardan biridir. Kardiyovasküler hastalıkların inflamasyonla olan sıkı bağlantısı göz önüne alındıđında²⁷⁻³², *in vivo* veya *in vitro* koşullarda inflamatuvar ajanlar uygulamak suretiyle deneysel bir endotelial disfonksiyon tablosu oluşturmamak mümkündür. Bhagat ve arkadaşları² insanlarda yaptıkları bir çalışmada bakteriyel endotoksin tarafından indüklenmiş inflamatuvar reaksiyonun endotelial disfonksiyona neden olduğunu kanıtlamışlardır. Çeşitli çalışmalar sağlıklı bireylere düşük doz endotoksin verilmesinin vazodilatasyon ve endotelial disfonksiyonla sonuçlandığını göstermiştir.³ Bu deneysel model yaygın inflamasyonun hemodinamik deđişiklikler³ gibi bir çok patolojik durumunu oluşturmaktadır.²

In vivo ve *in vitro* koşullarda yaratılan inflamasyon modellerinde sıklıkla *Escherichia coli* endotoksini kullanılmaktadır.^{1-3,38}

E. coli, 2-6 µm boyunda, 1-1,5 µm eninde, düz, uçları yuvarlak çomak şeklinde gram (-) bir bakteridir. 60°C'de 30 dakika, oda sıcaklığında uzun süre canlı kalabilen dirençli bir türdür. Normalde

bağırsak florasında bulunur ve putrefikasyon-fermantasyon dengesinin düzenlenmesinde önemlidir. Ancak, belirli koşullarda patojen olup diyareyle karakterize bağırsak hastalıklarına sebep olurlar. Ayrıca, bağırsak kanalı dışına çıkıp diğer dokulara yerleşerek çeşitli klinik tablolar oluşturmaları sık görülür.³⁹

2.2. Endotel

2.2.1. Endotelin yapı ve fonksiyonları

Endotel, morfolojik olarak bir doku olarak sınıflandırılır.⁴⁰ Endotelyal hücrelerin yan yana dizilmeleriyle bütün kardiyovasküler sistemi (KVS) içten astarlayan, anatomik olarak vasküler düz kas tabakası ile dolaşım halindeki kan arasında tek hücre katmanından oluşmuş bir yapıdır. Endoteli oluşturan hücreler histolojik olarak tek katlı yassı epitel hücreleridir.^{41,42} Ortalama boyutlarda bir insanda 1800 g ağırlığına ve 4000-7000m² yüzey alanına sahiptir. Endotel tabakası taşıdığı özelliklerden dolayı son yıllarda artık endokrin bir organ olarak görülmektedir.^{40,41}

Endotel, inert bir hücre katmanından ibaret değildir.^{2,40,42} Vazomotor tonusun kontrolü, permeabilitenin kontrolü gibi bir çok fizyolojik olayda oldukça önemlidir.⁴⁰ Endotelyal hücreler, mekanik veya hüümorale sinyallere cevap olarak çeşitli mediatörler üretirler. Bu mediatörler vasküler düz kas hücrelerinin kontraksiyon, dilatasyon ve proliferasyonunu, platelet adhezyonu ve agregasyonunu, koagülasyonu ve lökosit adhezyonunu düzenler. Bu nedenle vasküler homeostazın sağlanmasında oldukça önemlidir.⁴¹⁻⁴³

2.2.2 Endotel kaynaklı mediatörler

Vasküler endotel, damarların fonksiyonunu yerine getirmesinin yanı sıra sağlamlığının ve açıklığının sağlanmasından da sorumludur. Endotelin bu fonksiyonlarını salgıladığı mediatörler sayesinde gerçekleştirdiği bilinmektedir.⁴⁴

Endotelin(ET)ler , endotelde yapılan parakrin ve otokrin etki gösteren, 21 aminoasitten oluşan, bilinen en potent vasokonstriktör polipeptiddir. Ayrıca büyüme promotörüdür. ET-1, ET-2 ve ET-3 olmak üzere 3 tiptir.^{44,45}

Angiotensin dönüştürücü enzim (ACE), angiotensin I'in angiotensin II'ye dönüşmesini sağlar. Angiotensin II ise güçlü vazokonstriktör aktiviteye sahiptir. ACE ayrıca bradikininleri ve diğer vazodilatör peptitleri yıkar.⁴⁶

Prostasiklin, araşidonik asitten köken alarak sentezlenen bir eikazanoiddir. Vasküler tonusun kontrolünde vazodilatör özelliktedir. Platelet agregasyonunu inhibe eder ve sitoprotektif özelliği vardır. Büyüme inhibitörüdür.⁴⁷

Nitrik oksit (NO), son yıllarda oldukça dikkat çeken vazodilatör, antiplatelet ve büyüme inhibitörü özelliğinde bir gazdır.⁴⁸

Endotel kökenli hiperpolarize edici faktör (EDHF) de endotel tarafından salınan, vazodilatör özellikte bir mediatördür.⁴⁶

Trombomodulin ve heparin benzeri moleküller, antikoagülan özelliği olan mediatörlerdir. ⁴⁴

Doku plazminojen aktivatörü (tPA) profibrinolitik, plazminojen aktivatör inhibitörü tip 1 (PAI-1) ise antifibrinolitik. ⁴⁴

Bütün bunların yanına endotel bazı inflamatuvar mediatörler de üretir. Bunların içinde endotelyal lökosit adezyon molekülü (ELAM), intraselüler adezyon molekülü (ICAM) ve vasküler hücre adezyon molekülleri (VCAM) yer alır. ⁴⁴

2.3. Nitrik oksit

Bilinen mediatörlerden en önemlilerinden ve son yıllarda en çok dikkat çekenlerden biri de oksidasyon basamağı +2 olan azot monoksit (nitrik oksit)tir. ^{6,43,49} Tek bir oksijen atomunun tek bir azot atomuyla enzimatik birleşmesi memeli hücrelerinin en küçük sentetik ürününü oluşturur. ⁵⁰ NO, ilk olarak endotel-kaynaklı gevşetici faktör (endothelium-dependent relaxing factor, EDRF) adıyla endotel hücrelerinde Furchgott ve Zawadzki tarafından 1980 yılında bulunmuştur. ⁵¹ EDRF'nin esasen NO olduğunun 1987 yılında Ignarro ve arkadaşları ⁴⁹ ve Palmer ve arkadaşları ⁶ tarafından ortaya konması biyolojik araştırmalarda yeni bir alanın açılmasını sağlamıştır. ⁴⁴ 1992 yılında ise NO, *Science* dergisi tarafından “yılın molekülü” olarak tanımlanmıştır. ⁵²

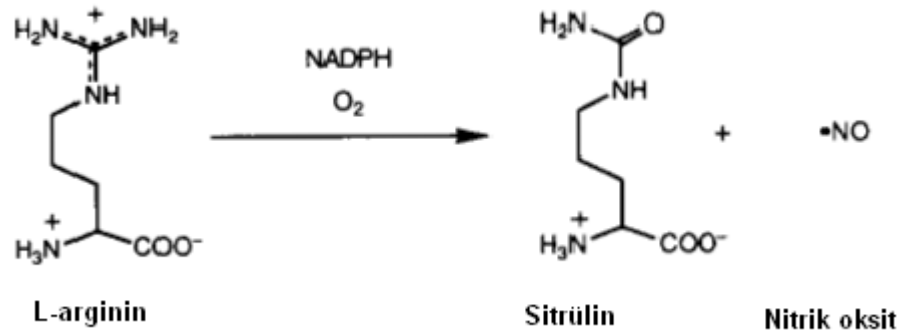
NO, renksiz, oksijen yokluğunda suda çözünebilen inorganik bir gazdır. Son orbitalinde bulunan eşleşmemiş elektronu nedeniyle radikal özellik gösterir. Sıvı ortamlarda serbestçe diffüze olur ve hücre membranından kolaylıkla geçer. ^{48,53} Hücreden hücreye yakın menzilde ve

kısa süreli etkide hızlıca hareket eden, buna karşılık yüksek biyolojik aktivite gösteren lokal etkili bir habercidir.⁵⁰

Günümüze kadar yapılan çalışmalar, NO'nun düz kas gevşemesinde, platelet inhibisyonunda, nörotransmisyonunda, bakteriyal öldürmede, tümör hücresi lizisinde, hormonal salınımında ve immün fonksiyonun düzenlenmesinde önemli fonksiyonları olduğunu göstermiştir.⁴⁸

2.3.1. NO'nun sentezi

NO'nun sentezi, monooksijenaz aktivitesi gösteren nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından katalizlenen, L-arginin'in L-sitrülin'e oksidasyonu sırasında gerçekleşen bir reaksiyondur. L-argininin terminal guanido azot grubu ile moleküler oksijenin nikotinamid adenin dinükleotid fosfatın redükte formunun varlığında (NADPH) etkileşmesi sonucu NO oluşumu sağlanır.^{5,48} (Şekil 1) Sentezde ara ürün olan N-hidroksi-L-arginin hızla L-sitrülin ve NO'ya dönüşür.⁵⁰



Şekil 1. Nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından katalizlenen NO oluşum reaksiyonu.⁵⁴

NO sentezi ilk olarak endotel hücrelerinde tespit edilmiş, daha sonra ise daha bir çok hücrede bu sentezin olduğu bulunmuştur.⁵¹ Başlıca, beyin, serebellum, endotel hücreleri, nötrofiller ve makrofajlarda tespit etmek mümkündür.⁴⁸

2.3.1.a. NOS izoformları

NO'nun regülasyonu ve dolayısıyla fonksiyonunun anlaşılması bilinen üç NOS izoformunun keşfedilmesiyle mümkün olmuştur. Her izoform kendine özgü ekspresyon modeli ve kendine özgü regülasyon mekanizmaları göstermektedir.⁵⁰

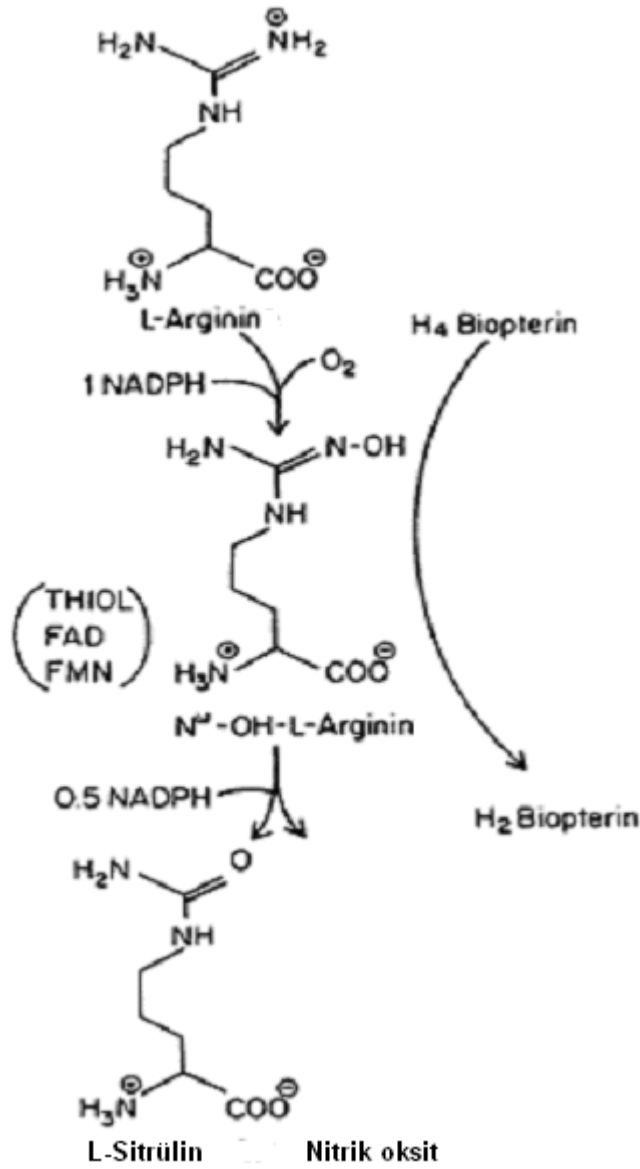
NOS, başlıca 2 katagoriye ayrılabilir : konstitütif NOS (cNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS). cNOS ise kendi içerisinde nöronal NOS (nNOS) ve endotelyal NOS (eNOS) olarak ayrılabilir.^{6,50} cNOS ve iNOS'un bazı ortak noktaları vardır:^{48,50,54}

1. İkisi de L-arginin'i substrat olarak kullanır.
2. Reaksiyonlarını moleküler oksijen ve NADPH varlığında gerçekleştirirler.
3. Reaksiyonun amino asit ürünü 'sitrülin'dir.
4. Reaksiyonda her zaman kalmodulin kofaktörlüğüne ihtiyaç duyulur.
5. Enzim yapısı homodimer şeklindedir.
6. Prostetik grup olarak Hem-Protoporfirin IX içerir.

Üç NOS izoformunun benzerliklerinden daha önemli olarak bazı farkları vardır:

1. Her üç enzim de kendine özgü bir genin ürünüdür, ancak aralarında yaklaşık %50 amino asit homolojisi vardır. ^{55,56}
2. cNOS posttranskripsiyonel modifikasyona uğrarken, iNOS'un regülasyonu için bilinen bir posttranskripsiyonel modifikasyon yoktur. ⁴⁸
3. eNOS ve nNOS konstitütif NOS (cNOS) olarak adlandırılırlar. cNOS tarafından NO üretimi aralıklı ve az miktardadır. Her zaman belli bir seviyede mevcut olmaları fizyolojiktir. iNOS ise sitokin, mikroorganizma veya mikrobiyal ürün tarafından stimülasyon sonucu oluşur. Böyle bir durumda iNOS tarafından NO oluşturulması sürekli ve oluşum miktarı oldukça fazladır. ^{48,50,54}
4. cNOS izoformları yalnızca hücre içine bırakılan kalsiyumun kalmodulinle oluşturduğu kompleksin enzime bağlandığı durumda aktiftir. Bu nedenle cNOS aktivitesi intraselüler kalsiyum seviyesine bağımlıdır. Buna karşın iNOS kendisine her zaman sıkıca bağlı bir kalmodulin içerir. Dolayısıyla da bu izoformun aktivitesi kalsiyum seviyesinden bağımsızdır ve enzim her zaman aktif olabilecek durumdadır. ^{48,50,54}
5. cNOS ve iNOS izoformlarının kendilerine özgü özelliklerini belirleyen bir başka kıstas da kofaktör gereksinimleridir. Kofaktörler flavoproteinler (flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN)), tetrahidrobiopterin (BH₄) ve tiyoldür. (Şekil 2) Bazı sitokiyometri çalışmaları, farklı yerlerden kaynaklanan

izoenzimlerin, söz konusu kofaktörlerden birine veya birkaçına gereksinim gösterebildiği gibi hiçbirine gereksinim göstermeyebileceğini söylese de bu bulguların saflaştırma hatasından kaynaklandığını iddia edenler de vardır.^{48,50,54}

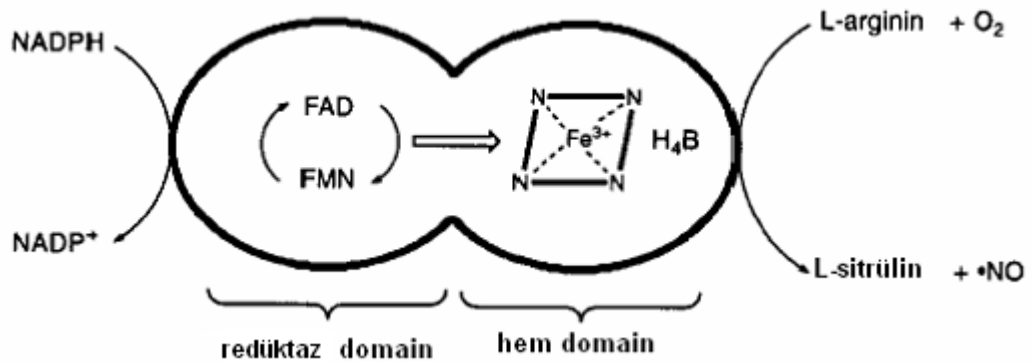


Şekil 2. NOS katalizörlüğünde NO oluşumu.⁴⁸

2.3.1.b. NOS'un mekanizması

NOS izoformlarının kofaktör gereksinimlerine göre farklı olduklarına dair görüşlere karşılık, çoğu araştırmacıya göre tüm NOS'ların işlevini yerine getirmesi için FAD ve FMN domainleri bulunmalıdır. Sitokiyometri çalışmalarında bazı yerlerde (örneğin makrofajlarda) bulunan NOS'ların FAD ve FMN domainini içermediğinin saptanmasının sebebinin saflaştırma sırasında flavinin kaybedilmesi olabileceği söylenmektedir.⁵⁴

NOS'un yapısının sitokrom P-450 redüktaz sistemine olan homolojisi, FAD ve FMN varlığı ve NADPH gereksinimi göz önüne alınarak bir mekanizma ortaya atılmıştır. Özetle, FAD ve FMN ikisi birlikte redüktaz domaini oluştururken, BH₄ hem domaini teşkil etmektedir. Elektron akışının, NADPH'nin FAD'ı indirgemesi, FAD'ın da FMN'yi indirgemesi şeklinde olduğu düşünülmektedir.⁵⁴ (Şekil 3)



Şekil 3. NOS'un şematik görünümü⁵⁴

2.3.1.c. NOS inhibitörleri

Günümüze kadar bir çok NOS inhibitörü geliştirilmiştir. Bir kısmı *in vitro* deneyler için sıklıkla kullanılsa da klinik olarak hala deney aşamasındadırlar.^{48,54} İleride tedavi amacıyla kullanımlarının mümkün olması endotoksik şok gibi bazı klinik durumlarda yararlı olacaktır.⁵⁴

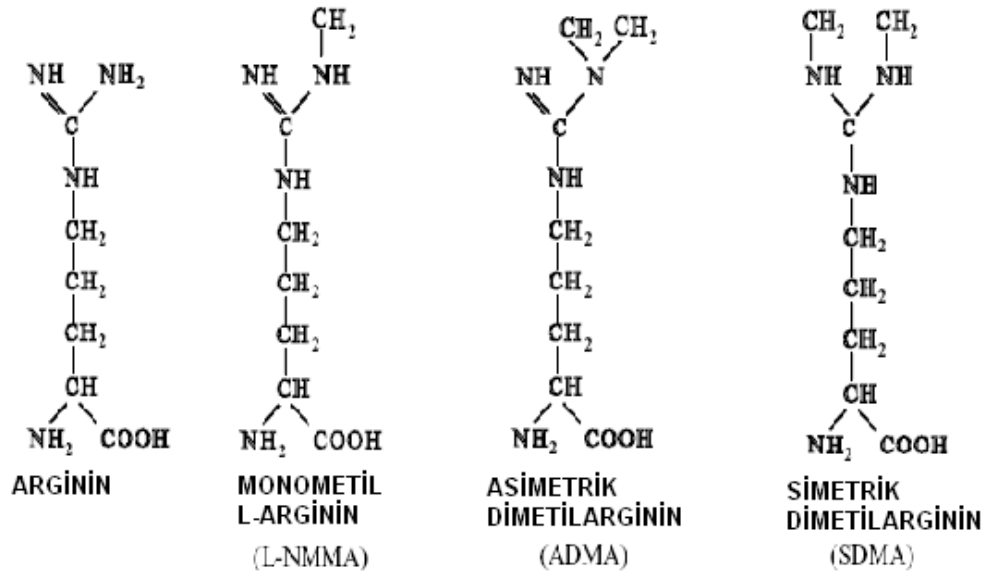
N^G-monometil-L-arginin (L-NMMA veya L-NMA) ve N^G-nitro-L-argininmetilester (L-NAME) arginin amino asitinin benzeri olan sık kullanılan molekülüdür (Şekil 4) ve dolayısıyla L-arginin – NO yolunu inhibe ederler. N^G-nitro-L-arginin (L-NNA veya L-NA) ve N^G-amino-L-arginin (L-NAA) de NOS inhibitörleri olarak kullanılmaktadır.⁴⁸ L-NMMA'nın endojen olarak da üretildiği bilinmektedir.⁵⁷

Bu moleküller, NOS aktivitesini yarışmalı olarak inhibe etmektedir. Bu nedenle inhibisyon L-arginin verilmesiyle geri döndürülebilir. Ancak son veriler gösteriyor ki, NOS'un L-NMMA'ya uzun süreli olarak maruz kalması enzimin geri dönüşümsüz inaktivasyonu ile sonuçlanmaktadır.⁴⁸

NOS inhibitörlerinin göreceli olarak selektifleri farklılık gösterebilir. L-NAME cNOS'u inhibe etmede göreceli olarak daha potentken , L-NMMA hem cNOS hem de iNOS'a yaklaşık olarak benzer derecede etki etmektedir.⁵⁸ L-NNA, beyin ve endotel kaynaklı NOS'a, makrofaj kaynaklı NOS'a kıyasla dikkat çekici derecede selektifken, L-NMMA ve L-NAA her üç hücre tipinden kaynaklı NOS üzerinde benzer inhibitörük etki göstermektedir.⁵⁹

Sık kullanılan NOS inhibitörlerine ek olarak, nNOS inhibitörleri olan 7-nitroindazol (7-NI)⁶⁰ ve S-metil-L-tiositrülin (L-SMTC)⁶¹, iNOS'u selektif olarak inhibe eden agmatin⁶², L-kanavanin⁶³ de NOS inhibitörleri arasında sayılabilir.

Son yıllarda oldukça dikkat çeken ve hakkında bir çok araştırma yapılan asimetrik dimetilarginin (ADMA), bir arginin analogu olup (Şekil 4) endojen üretilen bir NOS inhibitörüdür. Proteinlerde bulunan metillenmiş arginin rezidülerinin katabolizmasından üretilir. Üretimi ve yıkımı bazı enzimlerin katalizörlüğünde gerçekleştirilir. Artmış ADMA seviyeleri kardiyovasküler bir risk faktörü ve markeri olarak görülmektedir.⁶⁴

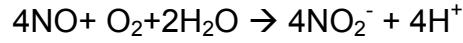


Şekil 4. Arginin, SDMA, ADMA ve L-NMMA' nın yapısı. ADMA ve L-NMMA, endojen NOS inhibitörleridir.

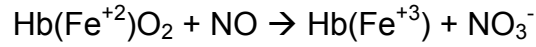
2.3.2. NO'nun yıkımı ve eliminasyonu

NO'nun ortadan kaldırılması özel bir enzim sistemine gerek duymaz. Fizyolojik sistemlerde yarı ömrü 0,1-5 saniye kadardır. ^{6,48} Bu nedenle NO varlığını ve miktarını göstermek amacıyla yıkım ürünleri olan nitrit ve nitrattan yararlanır. ^{50,53}

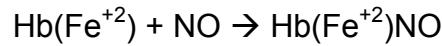
NO, moleküler oksijen ile reaksiyona girerek nitrit oluşturur. ^{48,53}



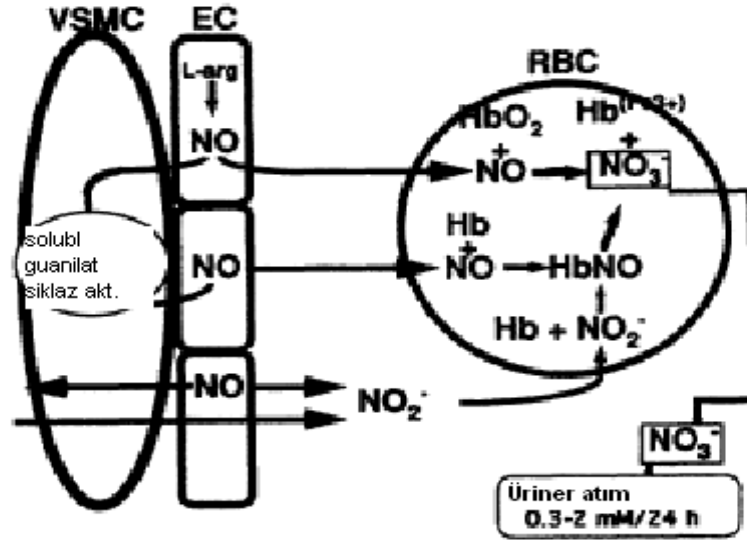
Oksijene hemoglobin (Hb)'le olan reaksiyonuyla ferrik methemoglobin (metHb) ve nitrat oluşturur. ^{48,53}



Bunun dışında NO, deoksijene ferröz hem grubuna yüksek afiniteyle bağlanarak nitrozilhemoglobin (HbNO) oluşturur. ^{48,53}



Endojen olarak oluşan NO'nun bir kısmının ekspirasyon sırasında akciğerlerden dışarı verildiği düşünülmektedir. NO'nun bir kısmı ise moleküler oksijen varlığında nitrite çevrililmektedir. Eritrositler tarafından alınan NO, oksihemoglobinle (HbO₂) reaksiyona girerek MetHb ve NO₃⁻ veya deoksijene hemoglobinle beraber HbNO oluşturur. HbNO daha sonra MetHb ve NO₃⁻'ye dönüşebilir. Eritrositler tarafından alınmadan önce NO₂'e çevrildiği durumda da Hb ile reaksiyonu sonucu aynı son ürünleri oluşturur. NO₃⁻ ise böbrekler tarafından elimine edilmek üzere plazmaya diffüze olur. ⁶⁵ (Şekil 5)



Şekil 5. In vivo NO metabolizması. (L-arg: L-arginin, EC: endotel hücresi, VSMC: vasküler düz kas hücresi, RBC: eritrosit.)⁶⁵

2.3.3. NO'nun biyolojik etki mekanizması ve önemi

NO'nun bir çok dokudaki biyolojik etkisi solubl guanilat siklaz/ siklik guanozin monofosfat (cGMP) sistemiyle kontrol edilmektedir.^{48,66} Hücrede oluşan veya yan hücreden difüze olan NO, hücre membranından kolaylıkla geçer ve solubl guanilat siklazı aktive eder. Bu şekilde intraselüler veya interselüler bir haberci gibi davranarak cGMP artışına yol açar. Hücre içi cGMP düzeyinde artış, intraselüler kalsiyum konsantrasyonunda azalmaya yol açar. Bu şekilde, NO'nun cGMP bağımlı etkileri ortaya çıkar:^{48,67,68}

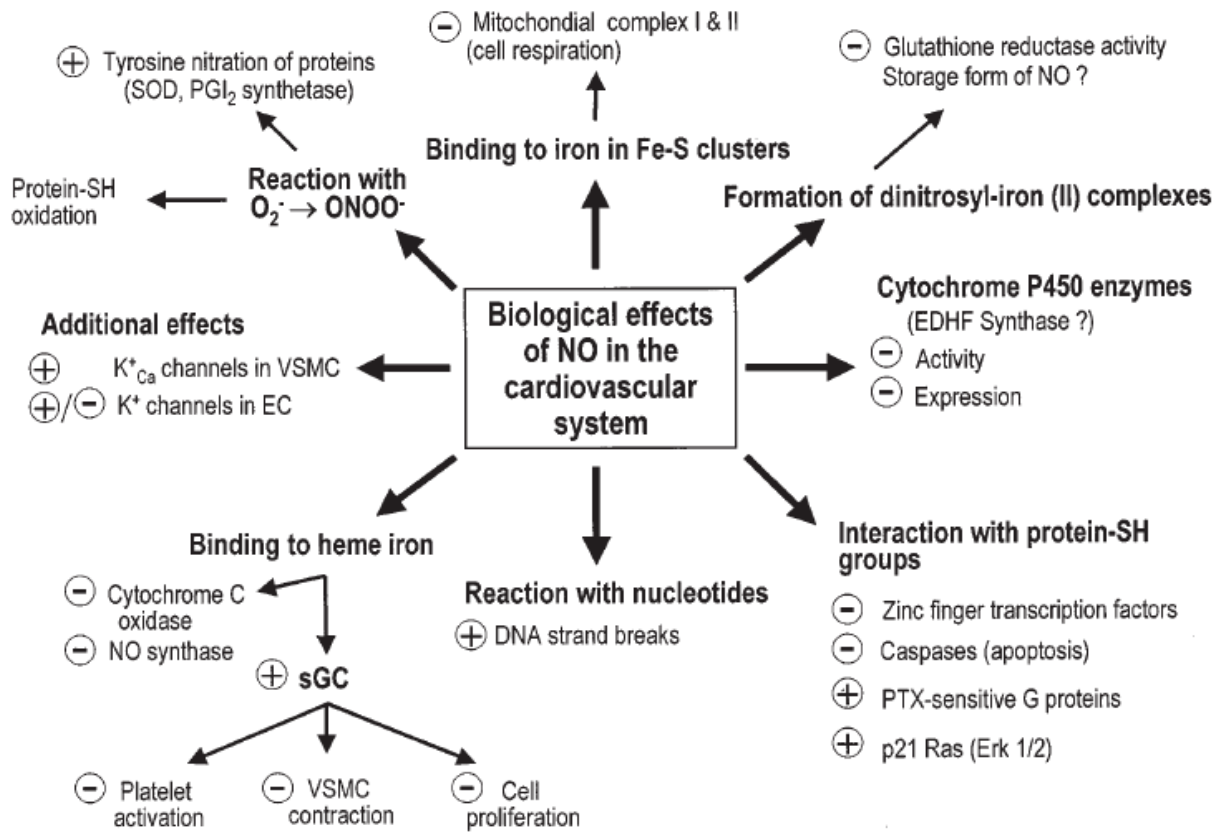
- 1- Vasküler ve nonvasküler dokularda düz kas gevşemesi
- 2- Platelet adezyon ve agregasyonunun inhibisyonu
- 3- Polimorfonükleer lökositlerin kemotaksisinin inhibisyonu
- 4- Santral ve periferel sinir sisteminde sinyal iletimi

NO'nun cGMP bağımlı etkilerinin yanı sıra, cGMP'den bağımsız bazı etkilerinin olduğu bilinmektedir: ^{48,68}

- 1- Makrofajlarda siklooksijenaz aktivasyonu
- 2- Mitokondriyal Fe-S enzimlerinin inhibisyonu
- 3- Sitokrom P-450 sisteminin inhibisyonu
- 4- Gen transkripsiyonu ve translasyonu üzerinde etkili
- 5- Na-K-ATPaz ve kalsiyuma bağımlı potasyum kanallarının aktivasyonu
- 6- Yüksek konsantrasyonlarda bazı mikroorganizmalar ve tümör hücre için sitostatik ve sitotoksik, dolayısıyla antiinflamatuvar etkiye sahip
- 7- p53 aracılığıyla apoptotik hücre ölümü
- 8- Bazı radikallerle reaksiyona girmek suretiyle onları etkisiz hale getirerek antioksidan özellik.

Görüldüğü üzere, NO'nun kardiyovasküler sistem üzerinde oldukça önemli etkileri vardır. Özellikle eNOS tarafından üretilen NO, vasküler homeostazda oldukça önemlidir. ⁴⁴ Öyle ki, bozulmuş vasküler homeostazın düzenlenmesi için NO donör ilaçların (nitrovazodilatörlerin) kullanımı söz konusudur. ⁶⁶ Şekil 6'da NO'nun kardiyovasküler sistem (KVS) üzerindeki etkileri özetlenmiştir.

Yukarıda bahsedildiği gibi NO önemli bir antioksidan ajandır.⁶⁹ Ancak, bir çok yararlı etkisinin yanı sıra, aşırı üretiminin, aşırı vazodilatasyona bağlı olarak septik şok ve benzeri tablolardan birincil sorumlu olduğu bilinmektedir. NO'nun aşırı üretimi, dolaşımın bozulmasına, miyokardiyal disfonksiyona, organ hasarlarına ve sonunda multiple organ yetmezlik sendromuna (MODS) katkı sağlayabilir.⁷⁰



Şekil 6. NO'nun KVS üzerindeki biyolojik etkileri

Fazla miktarda NO'nun neden olduğu aşırı vazodilatasyon tablolarının dışında bilinen bir başka etkisi de süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) ile birleşerek peroksinitrit ($ONOO^-$) anyonunu oluşturabilmesidir. $ONOO^-$, lipid peroksidasyonuna neden olan bir bileşiktir. Bu özelliğinden dolayı NO,

hem antioksidan hem de prooksidan olarak davranabilir. Antioksidan veya prooksidan davranışının NO ve O₂·'nin üretimi ve lokal konsantrasyonuna bağlı olduğu söylenmektedir.⁶⁹

2.4. Asimetrik Dimetilarginin (ADMA)

2.4.1. ADMA'nın yapımı

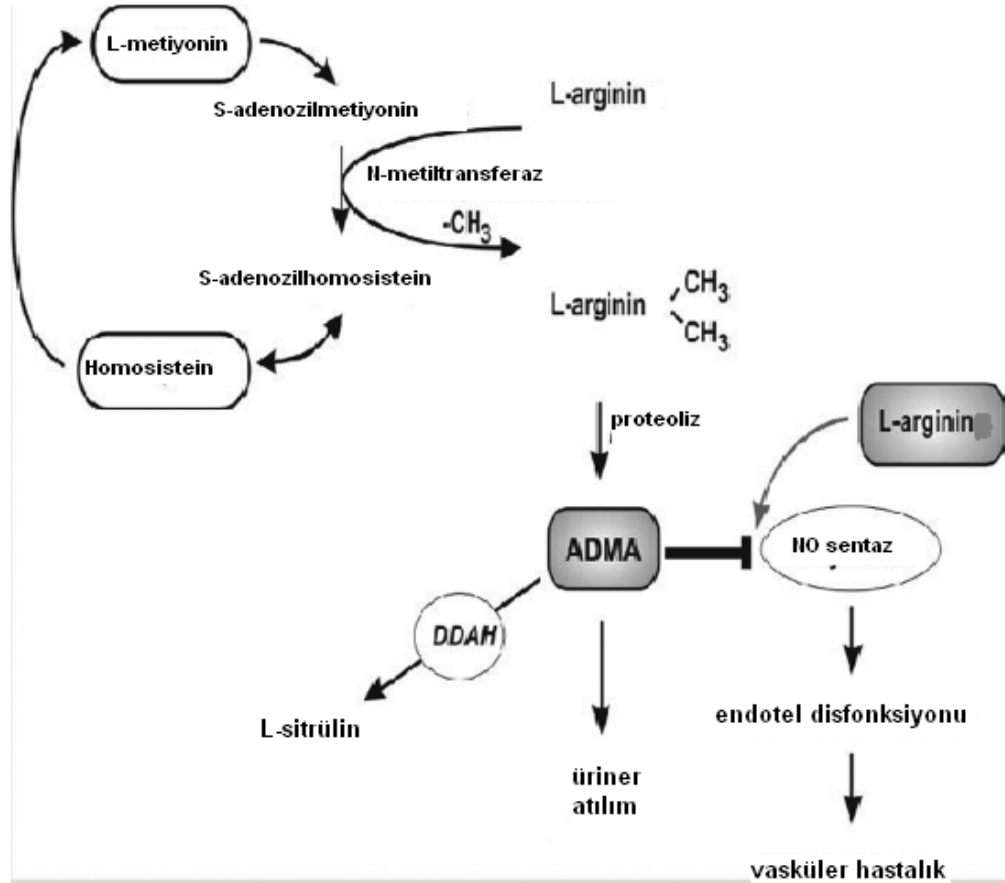
Metilargininler, spesifik proteinlerdeki arginin rezidülerinin metilasyonu sonucu oluşur. Bu metilasyonu katalizleyen enzim ailesi protein arginin metiltransferaz(PRMT)lardır.^{57,71-74} ADMA, asimetrik metillenmiş proteinlerin hidrolitik yıkılmasıyla ortaya çıkmaktadır.^{71,72} (Şekil 7)

PRMT'ler tip I ve tip II olmak üzere 2 çeşittir. Her iki tip PRMT de önce L-arginin'den monometilarginin (MMA) oluşumunu sağlar. İkinci bir basamak olarak ise asimetrik ya da simetrik ikinci bir metilasyon gerçekleştirir. PRMT-I izoformu, asimetrik metilasyonu sağlayarak ADMA'yı oluştururken, PRMT-II izoformu simetrik metilasyonu katalizleyerek simetrik dimetilarginin (SDMA) oluşturur.⁷² PRMT'ler, metil donörü olarak S-adenozilmetiyonin (SAM) kullanır.⁵⁷ Bazı proteinlerin bu şekilde metilasyonu önemli bir posttranslasyonel modifikasyondur.^{71,72}

2.4.2. ADMA'nın yıkımı

Organizmadaki metilargininlerden ADMA'nın az bir kısmı, SDMA'nın ise çoğu idrarla dışarı atılır ve SDMA'nın yıkımı için bilinen bir enzim sistemi yoktur.^{72,75} Asimetrik olarak metillenmiş proteinlerin hidrolizinden açığa çıkan serbest ADMA'nın çoğu dimetilarginin dimetilaminohidrolaz (DDAH) enzimi aktivitesiyle L-sitrülin ve dimetilamine çevrilir.^{71,75,76} (Şekil 7) Achan ve arkadaşları⁷⁷ tarafından yapılan

çalışmada ADMA'nın eliminasyonunun başlıca DDAH yoluyla olduğu gösterilmiştir.



Şekil 7. ADMA'nın yapımı ve yıkımı ⁷⁸

DDAH'nin bilinen iki izoformu vardır. DDAH-1 ve DDAH-2 farklı regülasyon ve farklı doku özgüllüğü göstermektedirler. ^{71,72,79} DDAH-1, plazmadan ADMA'yı ekstrakte eden organlar olan böbrek ve karaciğerde bulunan baskın izoformken, DDAH-2 vasküler dokunun baskın izoformudur. Bazı DDAH-1'ler endotel hücre lizatlarının membran fraksiyonlarında bulunsa da, DDAH-1 ve -2 predominant olarak sitoplazmik enzimlerdir. ⁷⁹ Ancak, hangi DDAH izoformunun esas

metilarginin metabolize edici enzim olduğu net değildir. Endotelin, hem DDAH-1 hem de DDAH-2 için mRNA ve protein içerdiği bilinmektedir. Enzim kinetiği çalışmalarına göre DDAH-2 için ADMA metabolizması hızı, DDAH-1'e göre yaklaşık 70 kat daha düşüktür. Bu durum göz önüne alındığında, endotelde DDAH-1'in ADMA'yı metabolize eden ana yol olduğu düşünülebilir. ⁷²

DDAH'ın, ADMA'yı metabolize ettiği ve ADMA'nın plazma değerlerini düzenlediği düşünüldüğünde, NO'nun varlığıyla ilgili bilgi vereceği anlaşılabilir. ^{72,79} DDAH'ın azalmış ekspresyonu veya inhibisyonu intraselüler ve ekstraselüler ADMA konsantrasyonlarında artmaya yok açar. ⁷³

Ogawa ve arkadařları⁸⁰ 1989 yılında argininin DDAH'ın kompetatif inhibitörü olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca başka çalışmalar da oksidatif stresin (rneğin TNF gibi kemokinlerden ve okside LDL kolesterolden kaynaklı) DDAH-2 inaktivasyonuna neden olabileceğine dair bulgular içermektedir. ⁷¹

2.4.3. ADMA'nın taşınması

Sitozoldeki ve ekstraselüler sıvıdaki ADMA miktarlarını belirleyen kritik adım taşıyıcı görevi gören transmembran proteinlerdir. ⁷³ Amino asit taşıyıcıları hücre membranına stratejik bir şekilde konumlanmıştır. ⁸¹ ADMA'nın kaynaklandığı yerden dışarıya verilmesi ve plazmadan hücre içine alınması katyonik amino asit taşıyıcıları (CATlar) sayesinde gerçekleşir. ⁷³

Katyonik amino asit (CAA) taşıma sisteminden, sistem y+ bu amino asitler için selektiftir. ⁸² Sistem y+'den sorumlu olan CAT molekülleri,

memelilerdeki amino asit taşıma sistemlerinden ilk keşfedilenlerden biridir. Solute carrier 7 (SCL7) adı verilen bir alt aile oluştururlar. Bu alt aile bir çok üye içerir. Bunlardan CAT-1, CAT-2A ve CAT-2B, CAT-3 memelilerde arginin ve ADMA taşınmasıyla ilgili olanlardır.⁸³

CAT-1, yüksek afiniteli ve düşük kapasiteli, CAT-2 ise düşük afiniteli ve yüksek kapasitelidir.⁷³ CAT-1, genel olarak karaciğer dışında tüm doku ve organlarda eksprese olur. CAT-2'lerin ise daha kısıtlı bir ekspresyonu vardır. CAT-2A güçlü olarak karaciğerde, zayıf olarak iskelet kasında ve pankreasta eksprese olur. CAT-2B ise bir çok dokuda pro-inflamatuar sitokinlerce, sıklıkla NOS ve arginaz enzimlerinin indüklenabilir formlarıyla uyarılır. Yetişkin hayvanlarda CAT-3'ün ekspresyonu beyinle sınırlıdır; ancak timus ve meme bezlerinde de tespit edilmiştir.⁸³

Azalmış CAT ekspresyonu veya aktivitesi, ADMA'nun hücreden dışarı çıkmasını yavaşlatacağı için intraselüler ADMA seviyelerinde artışa, ekstraselüler ADMA seviyelerinde ise azalmaya yol açacaktır.⁷³

CAT sistemi ADMA ile inhibe edilebilmektedir. Bu şekilde argininin hücre içine alınıp NO oluşum reaksiyonuna girmesi de engellenmektedir.⁷³

2.4.4. ADMA'nın patofizyolojisi

Asimetrik dimetilarginin (ADMA) 1987 yılında izole edilmiştir.⁷⁶ Vallance ve arkadaşları⁸⁴ tarafından 1992 yılında ADMA ve L-NMMA gibi endojen oluşumlu L-arginin analoglarının NOS'u kompetatif olarak inhibe ettiğinin keşfiyle ADMA hakkında araştırmalar oldukça artmıştır. ADMA, hem cNOS'u hem de iNOS'u doz-bağımlı bir şekilde⁸⁵ inhibe etmektedir.⁷³

Günümüze kadar, ADMA hakkında bir çok önemli epidemiyolojik çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların sonucu olarak ADMA'nın kardiyovasküler hastalıklar (KVH) ve kronik böbrek hastalıkları için bir risk faktörü olduğu anlaşılmıştır.⁷³ Bunlara ek olarak, ADMA'nın plazma konsantrasyonlarının son safha renal hastalıklarda (ESRD) mortaliteyi⁸⁶, yüksek, orta derece veya düşük vasküler riski bulunan popülasyonlarda kardiyovasküler olayları ve mortalitelerini öngörebildiği bulunmuştur.⁷¹

Vallance ve arkadaşları⁸⁴ tarafından yapılan çalışmada diyaliz tedavisi alan kronik böbrek hastalarında ADMA'nın plazmada biriktiği gösterilmiştir. Ancak aynı araştırmacılar, söz konusu ekstrem durumda bile ölçülen plazma ADMA seviyelerinin, izole edilmiş aortik stripte zorlukla kontraksiyona neden olduğunu rapor etmişlerdir. Bu bulgu, ADMA'nın renal hastalıklar için çok iyi bir marker olduğunun ancak patofizyolojik bir mediatör olmadığının düşünülmesine yol açmıştır.⁸⁷ Ancak, hücre içi ADMA seviyelerinin plazmaya göre 10-20 kat fazla olmasının da bir katkısı olabilir.⁷³

ADMA konsantrasyonların etkisinin araştırıldığı koroner arter risk determinasyonu çalışmasının sonucu olarak (Coronary Artery Risk Determination, the Influence of ADMA Concentration (CARDIAC)) ADMA'nın koroner arter hastalığı için bağımsız bir risk faktörü olduğu rapor edilmiştir.⁸⁸

Bunlara karşılık olarak, Walker ve arkadaşları⁸⁹ yaptıkları bir çalışmada ADMA konsantrasyonları ile endotel fonksiyonu arasında bir korelasyon bulamamıştır.

ADMA, sadece NOS'u inhibe etmekle kalmayıp membranda bulunan taşıma sistemi olan CAT'ları da inhibe etmektedir. Bu sayede argininin hücreye alınmasını da bozarak oksidatif strese ve NO biyosentezinin daha ileri derecede engellenmesine yol açmaktadır.⁷³

İntra ve ekstraselüler ADMA konsantrasyonlarında PRMT-DDAH- CAT arasındaki ilişkinin oldukça önemli olduğu açıktır.⁷³

Son yıllara kadar ADMA'nın KVH ve böbrek hastalıkları için bir risk faktörü olduğu ancak SDMA'nın böyle bir etkisinin olmadığı söylenmekteydi. Ancak yakın zamanda yapılan çeşitli çalışmalar SDMA'nın renal fonksiyon için çok iyi bir marker olduğunu rapor etmektedir. NOS inhibisyonunda bir rolü olmadığı düşünülmese de KVHda önemli olabileceğine dair araştırmalar vardır.⁹⁰⁻⁹²

2.4.5. L-arginin paradoksu

Bir çok durum, amino asitlerin plazma konsantrasyonlarını değiştiriyor olsa da plazma havuzunun intraselüler havuza göre oldukça küçük olduğu bilinmektedir.⁹³ Normalde intraselüler arginin konsantrasyonu NOS'un maksimum aktiviteyi gösterebileceği seviyelerde bulunmaktadır. Ancak, şaşırtıcı bir şekilde arginin takviyesi endotele bağlı vazodilatasyonu uyarmaktadır. Bu durum arginin paradoksu olarak adlandırılmıştır.¹⁰

Bir çok araştırmacı, L-arginin paradoksuna açıklamanın ADMA olduğunu söylemiştir.^{10,11} Ancak araştırmacıların bazıları da bu durumun ADMA'yla ilgisinin olmadığını iddia etmektedir.¹²

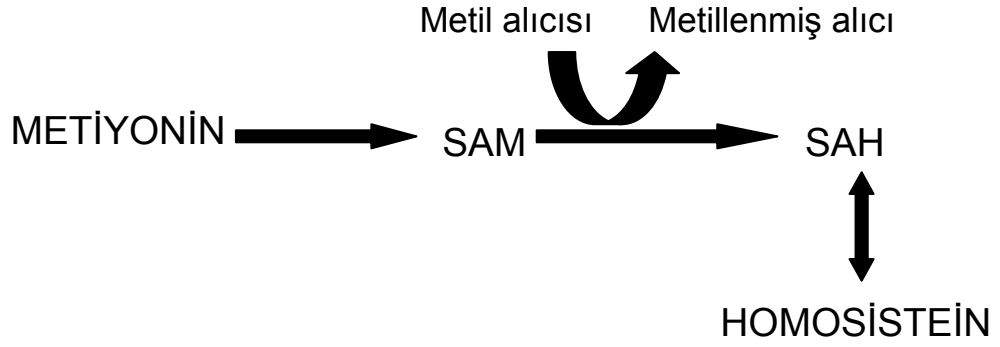
2.5. Homosistein (Hcy)

Homosistein (Hcy), sülfür içeren bir amino asittir.⁹⁴ Diyet proteinleriyle alınmaz ve protein sentezine katılmaz.⁹⁵ Esansiyel bir amino asit olan metiyonin (Met) amino asitinin metabolizmasında anahtar bir ara üründür. Metil transfer reaksiyonları sırasında ortaya çıkan bir yan üründür.⁹⁴

Plazma total homosisteini (tHcy) homosistein ve onun disülfid derivelerini kapsar. Bu disülfid deriveleri homosistein-sistein disülfidi veya proteine bağlı disülfirler olabilir.⁹⁶ Total Hcy'in alt sınırı 5 µmol/L kabul edilir. Üst değeri ise klinik laboratuvarlar arasında değişiklik gösterebilir. Buna ek olarak, yaşa (yaşla beraber artar), cinsiyete (erkeklerde kadınlara göre daha yüksek), etnik kökene ve diyetle folat alımına bağlı olarak popülasyonlar arasında 10-20 µmol/L arasında değişmekle birlikte, 12µmol/L'den az olması tercih edilir.⁹⁷

2.5.1. Homosistein'in oluşumu

Homosistein, esansiyel bir amino asit olan metiyonin(Met)in metabolizmasının kritik bir dalında bulunmaktadır. Metiyonin döngüsünde, metiyonin S-adenozilmetiyonin(SAM)e çevrilir. SAM, metil transferazlar için metil donörüdür.⁹⁴ SAM'a bağlı metil transfer reaksiyonlarının başlıca ürünü S-adenozilhomosistein(SAH)'dir. SAH ise geri dönüşümlü olarak homosisteine hidroliz olur.⁹⁶ (Şekil 8)



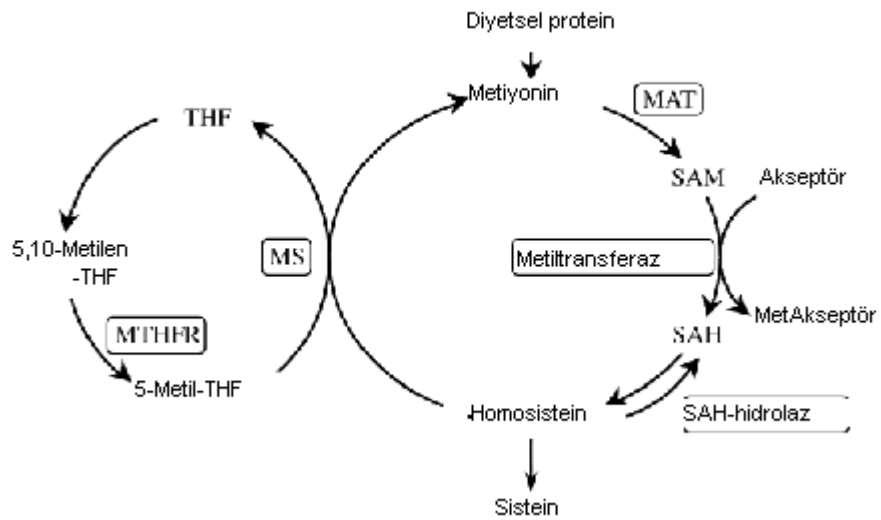
Şekil 8. Homosisteinin oluşumu.

(SAM: S-adenozilmetiyonin; SAH: S-adenozilhomosistein)

2.5.2. Homosistein'in metabolizması

Homosistein, iki yol ile metabolize olabilir. Birincisi, remetilasyon yoluyla yeniden metiyonine dönüşmesi, ikincisi ise transsülfürasyon yoluyla sistationine (oradan da sisteine) dönüşmesidir. ⁹⁴

(Şekil 9)



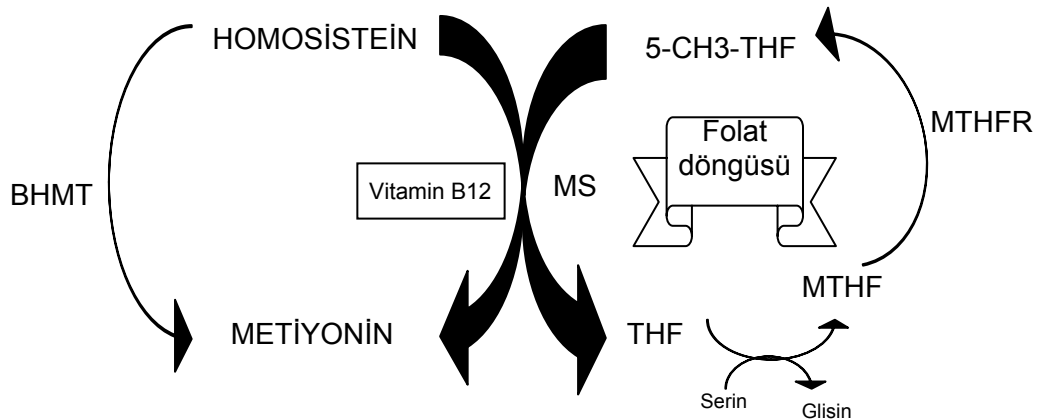
Şekil 9. Homosisteinin oluşumu ve metabolizması ¹⁹

Homosistein, bu iki yol dışında, ekstraselüler sıvıya ve kana verilip plazma proteinleriyle disülfid değişim reaksiyonlarına veya oksidasyon reaksiyonlarına da girebilir. ⁹⁶

(a) Remetilasyon yolu:

Homosisteinin metiyonine dönüştüğü yoldur. Bu reaksiyon, Metiyonin Sentaz (MS), Vitamin B12, Folat ve 5,10-metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) varlığında gerçekleşir. Homosistein, vitamin B12 bağımlı bir enzim olan MS varlığında metiyonine dönüşür. Bu dönüşüm sırasında folat siklusunda yer alan 5-metil-tetrahidrofolat (5-CH₃-THF) da 5,10-metilentetrahidrofolat(MTHF)a dönüşür. MTHFnin, yeniden 5-metil-tetrahidrofolat'a dönüşmesi için, MTHFR enzimine ihtiyaç vardır. ^{94,97} (Şekil 10)

Karaciğer ve böbrekte homosisteinin bir kısmı betain homosistein metiltransferaz (BHMT) enziminin katalizinde metiyonine remetile olur. ^{94,97} (şekil 10)



Şekil 10. Remetilasyon yolu. (MS: Metiyonin Sentaz; 5-CH₃-THF: 5-metil-tetrahidrofolat; THF: 5,10-metilentetrahidrofolat ; MTHFR: 5,10-metilen tetrahidrofolat redüktaz; BHMT: Betain homosistein metiltransferaz)

(b) Transsülfürasyon yolu:

Homosisteinin sisteine dönüştürüldüğü yoldur. Hcy önce sistationin β -sentaz (CBS) enzimi katalizörlüğünde sistationine daha sonra ise sisteine dönüştürülür. Sisteinin de sülfata dönüşmesiyle idrarla atılmaya hazır hale getirilmiş olur. CBS enzimi vitamin B6'ya gereksinim duyar^{94,97} (Şekil 11)



Şekil 11. Transsülfürasyon yolu. (CBS: Sistationin β -sentaz)

2.5.3. Homosistein'in patofizyolojisi

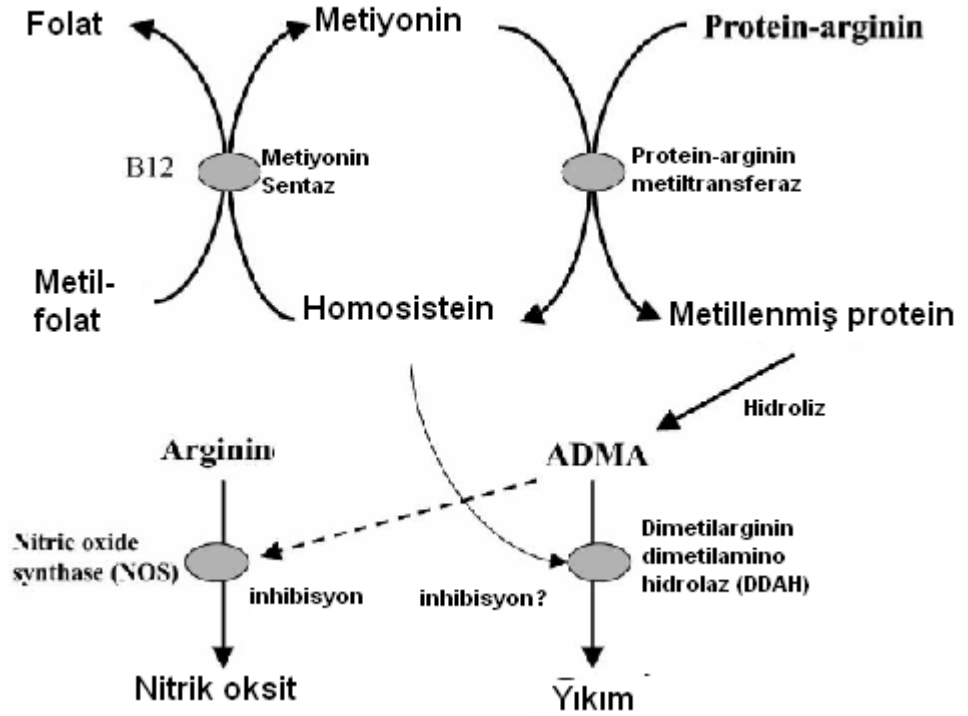
Uzun süredir yüksek plazma homosistein düzeylerinin (homosisteinemi) artmış kardiyovasküler riskle ilişkili olduğu bilinmektedir.⁹⁷ Yapılan bir meta analiz çalışmasının sonucu olarak plazma total homosisteininin her 2,5 $\mu\text{mol/L}$ artışında, miyokard infarktüsü (MI) riskinin %10, felç riskinin ise %20 oranında arttığı rapor edilmiştir.⁹⁸ Ancak, artmış homosisteinin kardiyovasküler hastalıkların bir nedeni mi, sonucu mu yoksa markerı mı olduğu tartışmalıdır.⁹⁷

Artmış homosistein seviyelerinin KVD'nin bir sonucu olduğunu savunanlar, homosisteinin vasküler bir olay olduktan sonra (retrospektif çalışma) artma eğiliminin, vasküler bir olay olmadan önce (prospektif çalışma) artma eğiliminden daha yüksek olduğunu söylemektedir.⁹⁸

Homosisteinin KVHın oluşumunda rolü olduğunu söyleyenler ise, analizin prospektif veriyle kısıtlı olduğu durumlarda homosisteineminin KVH için tutarlı ve önemli bir risk faktörü olduğunu saptamışlardır.⁹⁸

Artmış tHcy seviyelerinin dana önceden kardiyovasküler hastalığı veya diğer risk faktörleri var olan hastalarda mortalitenin güçlü bir prediktörü olduğu bilinmektedir. Bu şekliyle de iyi bir marker olduğu düşünülebilir.⁹⁷

ADMA ve homosisteinin oluşum mekanizmaları düşünülünce aralarında metabolik bir ilişki olduğu ortaya atılmaktadır. Bu iki molekül birbirleriyle metil transferaz reaksiyonları sırasında karşılaşmaktadır.⁹⁶ ADMA oluşumu, PRMT enzimleri tarafından metillenmiş proteinlerin proteolizinden oluşmaktadır. PRMTler ise bu metilasyon işlemlerini SAMın metil donörlüğünde yapmakta ve SAMın metil grubu vermesiyle SAH (ve sonuçta Hcy) oluşmaktadır.^{71,72,93} Ayrıca homosisteinin DDAH inhibisyonuna da neden olabileceği söylenmektedir.⁹⁹ (Şekil 12)



Şekil 12. Homosistein ve ADMA'nın muhtemel ilişkisi ¹⁰⁰

Böger ve arkadaşları ¹⁰¹ SAMa bağlı protein metilasyonunun ADMA ve homosistein seviyeleri üzerinde artırıcı etkisi olacağı hipotezini test etmek amacıyla yaptıkları deneyde, metiyonince zengin, folat yönünden fakir hiperhomosisteinamik diyetle beslenen maymunlarda plazma ADMA ve tHcy seviyelerinde yaklaşık üç kat artış rapor etmişlerdir.

Koroner arter hastalığı, periferel arterel hastalık, felç ve Alzheimer hastalığıyla ilgili vaka-kontrol çalışmaları, homosisteinemi ve plazma ADMA seviyelerinde artış arasında bir ilişki bulmuştur.⁹⁶ Buna karşılık söz konusu ilişkiye dair bulgular elde etmeyen araştırmacılar da mevcuttur.¹⁰⁰ Hiperhomosisteinemi durumunda ADMA seviyelerinin artması bazı araştırmacılar tarafından azalmış renal atılıma bağlanmıştır.¹⁹

Homosistein ve ADMA arasındaki metabolik bağlantıya *in vitro* koşullarda da kanıtlar elde edilmiştir. İnsan endotel hücrelerinin L-metiyonin veya L-homosistein ile inkübasyonu, ADMA'nın kültür ortamında doz bağımlı bir artış göstermesiyle sonuçlanmıştır.^{102,103}

İnsanda oral metiyonin yüklemesiyle deneysel olarak indüklenen akut homosisteinemi endotel disfonksiyona yol açmaktadır.^{99,104} Böger ve arkadaşları¹⁰⁴, yaptıkları çalışmada endotel disfonksiyonun oluşum nedeninin, homosisteineminin ADMA oluşumunu artırarak NO oluşumunu kısıtlaması olabileceğini rapor etmişlerdir. Başka araştırmacılar tarafından da, insanda akut metiyonin yüklemesinden sonra plazma ADMA seviyelerinin hızla arttığı bulunmuştur.¹⁸ Doshi ve arkadaşları⁹⁹ ise yaptıkları benzer bir çalışmada, oral metiyonin ve homosistein yüklemesinin yol açtığı endotel disfonksiyonun ADMA seviyeleriyle bir ilişkisinin olmadığını söylemektedir.

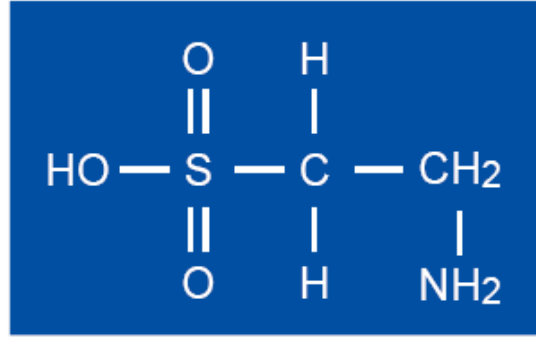
ADMA'nın oksijen radikali oluşumunu artırma yoluyla¹⁰⁵, homosisteinin ise yine redox bağlantılı bir yolla senesensi hızlandığı bulunmuştur.¹⁰⁶ L-arginin ise NO oluşumunu artırarak endotel hücre yaşlanmasını geciktirmektedir.¹⁰⁷

2.6.Taurin

Taurin ilk olarak 1827 yılında safranin bir komponenti olarak keşfedilmiş, ancak insan beslenmesindeki önemi 1975 yılına kadar tanımlanmamıştır.¹⁰⁸

Taurin (2-aminoetan sülfonik asit), sülfür içeren yarı esansiyel bir amino asittir.^{14,109,110} Amino asit olarak tarif edilmesine

rağmen, klasik olarak her amino asitte bulunan karboksilik asit grubu bulunmaz. Bunun yerini bir sülfonik asit grubu almıştır. ²⁰ (Şekil 13)



Şekil 13. Taurin'in yapısı ¹⁰⁸

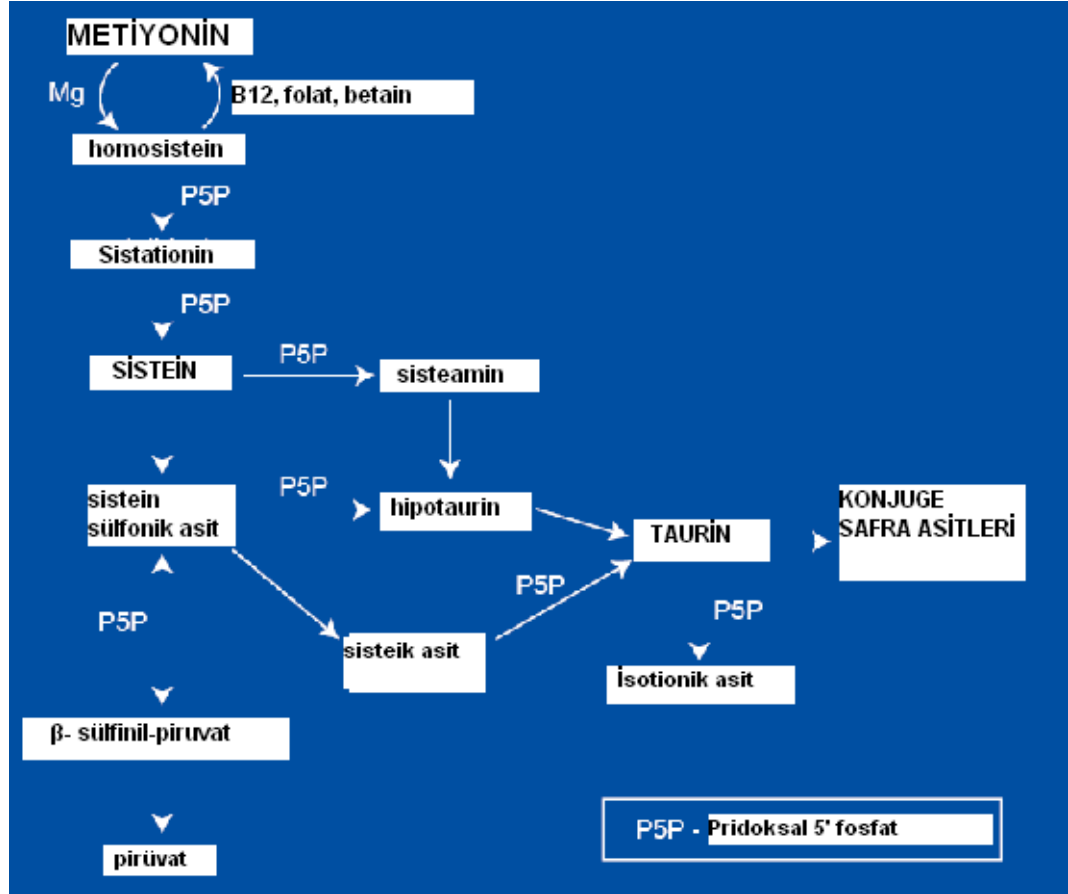
Taurin protein sentezine katılmaz. İnsanda endojen olarak bir miktar sentezlenebilir ancak majör kaynağı diyetir. ^{14,110}

Memelilerde bir çok dokuda bulunmakla beraber, özellikle beyin, retina, kalp ve iskelet kası gibi elektriksel olarak uyarılabilir dokularda boldur. ^{108,109}

2.6.1. Taurin'in sentezi

Taurin endojen olarak, esasiyel bir amino asit olan metiyoninden ve onunla ilişkili non-esansiyel bir amino asit olan sisteinden sentezlenir. Sisteinden taurin sentezi için bilinen üç yol vardır. Her üçü de vitamin B6'nın aktif koenzim formu olan pridoksal-5-fosfat (P5P)a ihtiyaç duyar. Vitamin B6 eksikliğinin taurin sentezini bozduğu bilinmektedir. ¹⁰⁸

Taurin'in sentez yolları şekil 14'de gösterilmiştir.

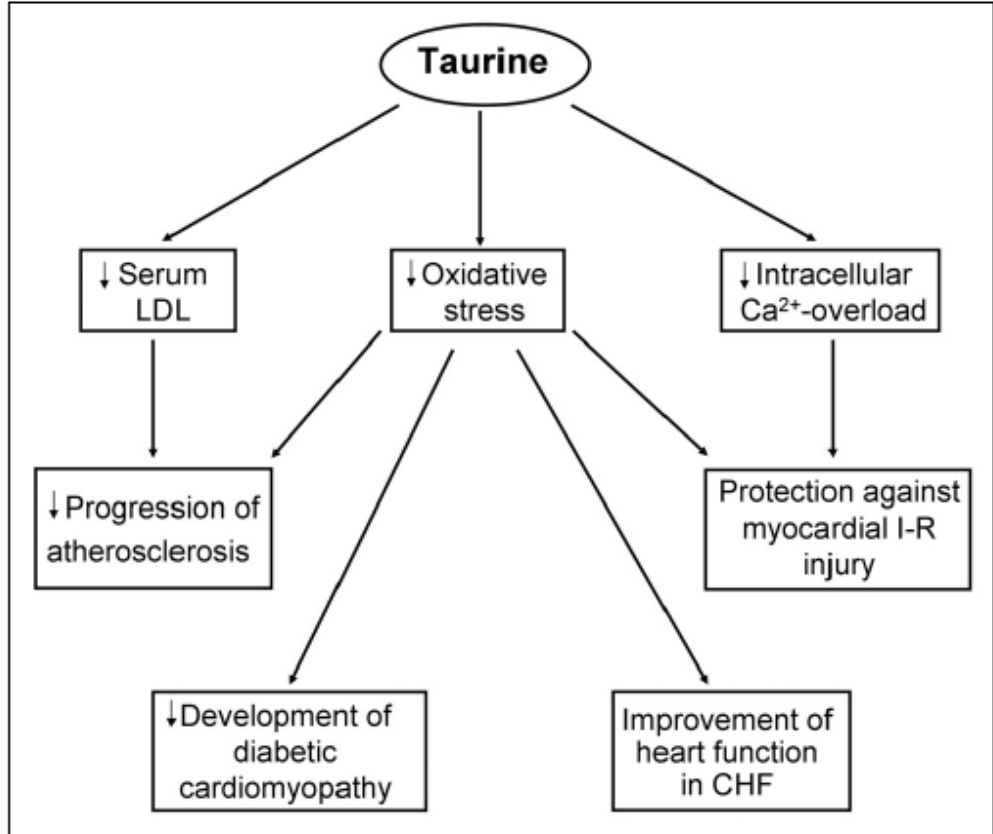


Şekil 14. Taurin'in sentezi ¹⁰⁸

2.6.2. Taurin'in önemi

Merkezi sinir sisteminde taurinin 2 ana fonksiyonu vardır: Hücre volümü regülasyonu ve inhibitör nöromodülasyon veya nörotransmisyon. Nörotransmitter fonksiyonunu spesifik taurin reseptörleri sayesinde gerçekleştirirken, nöromodülatör fonksiyonunu diğer transmitter sistemlerle olan interferansı ile gerçekleştirmektedir. Diğer dokularda ise taurinin hücre korunmasında bir antioksidan olarak hareket ettiği ve kardiyovasküler fonksiyonlar üzerinde yararlı etkilere sahip olduğu düşünülmektedir.¹⁰⁹ Taurinin gelişmekte olan memelilerin dokularında

yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu tespit edilmiştir. Araştırma sonuçları, taurinin sinir sisteminin gelişmesinde oldukça önemli olduğunu göstermiştir.¹¹¹



Şekil 15. Taurinin bazı yararlı etkileri¹¹⁰

Taurin ve derivelerinin çoğu, bir çok patolojik durumda potansiyel farmasötik ajanlar olarak test edilmiştir.¹⁰⁹ Wu ve arkadaşları¹¹² farmakolojik dozda (0,5 mg/mL) taurin uygulamasının yüksek glukozla indüklenmiş endotelial hücre apoptozunu kısa ve uzun dönem inkübasyonda engellediğini göstermiştir.

Klinikte taurin, KVH, epilepsi ve diğer nöbet bozuklukları, makular dejenerasyon, Alzheimer hastalığı, hepatik bozukluklar ve kistik

fibrosis gibi çok çeşitli durumların tedavisinde kullanılmıştır. Bir taurin analogu olan acamprosate, alkolizm tedavisinde kullanılmıştır. ¹⁰⁸

Taurin, antioksidan, ozmoregülatör ve intraselüler Ca^{+2} akış regülatörü olması yoluyla bir çok sitoprotektif özellik göstermektedir. ¹¹² Taurinin oksidatif stres kaynaklı toksisiteyi bloke ettiğine dair bir çok kanıt vardır. Ancak bunun altında yatan mekanizma kesinleşmiş değildir. Tahmin edilen mekanizmalardan biri, taurinin antioksidan aktivitesini hipohalöz asiti detoksifiye ederek göstermesidir. Taurinin antioksidan aktivitesi yalnızca hipohalöz asitle sınırlı değildir ve süperoksit anyonu, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit gibi klasik reaktif oksijen türleri(ROS)ni direkt olarak yakalama yeteneğinde olmasa da ROS oluşumunun efektif bir inhibitörüdür. ¹¹³

Taurinin aynı zamanda iskemi-reperfüzyona bağlı hücre hasarını azalttığı ¹¹⁴, çeşitli toksinlerin sebep olduğu bir çok akciğer hasarı tablosuna karşı koruma sağladığı ¹¹⁵, insan nötrofil ve monositlerinin antimikrobiyal fonksiyonunu artırdığı ¹¹⁶ gösterilmiştir. Buna ek olarak, endotel hücre apoptozisini azalttığı ve endotel disfonksiyonu engellediği tespit edilmiştir. ¹¹⁷

Kalbin total serbest amino asit havuzunun yaklaşık %50'si taurinden oluşmaktadır. ^{108,118} Kardiyak doku üzerinde pozitif iyonotropik etkisi vardır. Bazı çalışmalarda kan basıncını düşürdüğüne dair bulgular elde edilmiştir. Taurinin bu etkisinin mekanizmasının, kalbi, fazla bulunan Ca^{+2} iyonu düzeyleri üzerinden işlediği düşünülmektedir. ¹⁰⁸

Takatani ve arkadaşları ¹¹⁹, kardiyomiyosit kültürlerinde yaptıkları bir çalışmada iskemi tarafından indüklenmiş apoptozisin taurin tarafından bastırıldığını, taurinin bu antiapoptotik etkisini ise Apaf-

1/kaspaz-9 apoptozomunun oluşmasını engellemek yoluyla gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Parıldar ve arkadaşları¹²⁰ tarafından yaşlı ratlar üzerinde yapılan çalışmada ise kalp taurin seviyelerinin kalp dokusunun lipid peroksidasyonuna direncini belirlediği ve taurin desteği verilmesinin kalp dokusunda yaşa bağlı oksidatif stres üzerinde koruyucu etkiye sahip olduğu bulunmuştur.

Taurinin antiaterosklerotik etkileri de bulunmuştur. Bazı araştırmacılar, bu etkiyi taurinin serum lipid profilini düzeltmesine, bazıları taurinin safra asitlerinin bir komponenti olması sayesinde kolesterolün vücuttan atımını kolaylaştırmasına, bir kısmı ise taurinin antioksidan özellik göstermesine bağlamaktadır. Ayrıca taurin uygulamasının, önceden var olan aterosklerotik lezyonların gerilemesini hızlandığı görülmüştür.¹²¹ Başka araştırmacılar tarafından da taurinin endotel fonksiyonunu iyileştirdiği, endotel hücrelerinin apoptozunu inhibe ettiği ve plazma LDL seviyelerini düşürerek aterosklerozun başlamasını ve ilerlemesini engellediği gösterilmiştir.^{121,122}

Taurin, kardiyovasküler koruyucu özelliklerini bir antioksidan, anti-inflamatuar, ozmoregülatör ve intraselüler Ca^{+2} akış regülatörü olmasıyla göstermektedir. Ancak tam mekanizma bilinmemektedir.¹⁴ Tan ve arkadaşları¹⁴, yaptıkları bir çalışmanın sonucu olarak, *in vitro* LDL uygulanmasıyla sağlanmış endotel bağımlı vazodilatasyonun bozulmasının taurin tarafından azaltıldığını, bu durumda ise NO'da artış, DDAH aktivitesinde artış ve ADMA'da ise azalma olduğunu tespit etmişlerdir.

Rat vasküler düz kas hücrelerinde in vitro ortamda yapılan bir deneyde ise homosisteinin ROS oluşumu ve antioksidan enzim aktiviteleri üzerindeki etkisinin taurin tarafından antagonize edildiği tespit edilmiştir. Taurin, homosisteinin biyolojik antagonisti gibi görünmektedir. Bu ve benzeri çalışmalar, KVD'nin önlenmesi ve tedavisinde yeni bir strateji olarak taurini öne çıkarmaktadır.²⁰

Taurince zenginleştirilmiş gıdaların veya multivitamin ve mineral formülasyonlarının ciddi bir yan etkisi bildirilmemiştir. Ancak ratlar üzerinde yapılan bazı araştırmalarda gebelikte yapılan maternal taurin takviyesinin yavrularda insülin rezistansı ve obeziteyle sonuçlandığı saptanmıştır. Bu tespit, taurince zenginleştirilmiş besin desteklerinin tüketilmesinde özellikle gebelikte dikkatli olunması gerektiğini işaret etmektedir.¹²³

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Primerden hücre izolasyonu için umblikal kordlar Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden temin edilmiştir.

İzolasyon ve inkübasyon işlemleri Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

Nitrat/nitrit, homosistein ve ADMA parametrelerinin ölçümü, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda ve Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA) Biyokimya Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

3.1. Gereçler

3.1.1. Umblikal kordlar

Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden, sağlıklı gebelik geçirmiş ve sezaryen doğum yapmış kadınlardan alınmıştır. Dokular izolasyona kadar fizyolojik solüsyon içinde muhafaza edilmiş ve aynı gün izolasyonları gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. Cihaz ve Malzemeler

Steril Kabin (Clean Air EN 12469)

6-kuyulu plateler (Orange Scientific)

0,2µm'lik şırınga filtresi (Orange Scientific)

0,2µm'lik membran filtre (Orange Scientific)

Otomatik pipetler (Eppendorf)

Santrifüj (Nüve NF 800R)

Inverted mikroskop ve kamera (Leica DMIL ve Leica DFC 420C)
Distile su cihazı (Milli-Q)
Etüv (Sanyo CO2 incubator)
Derin dondurucu (Sanyo)
Nitrat/Nitrit kolorometrik çalışma kiti (Cayman Chemical)
HPLC cihazları (Agilent Technologies, SHIMADZU)
Elisa plate reader (Tecan)
Klemp, pens
Cam malzemeler
Plastik malzemeler (15 ve 50 mL 'lik kapaklı Santrifüj tüpleri, Eppendorf tüpleri, steril idrar kablari, pipetler, pipet uçları, besleme sondası vb...)

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücre Kültürü

Hücre kültürü steril kabin içerisinde yapılmıştır.

(a) Umblikal kordların alınması ve saklanması

Umblikal kordlar, kontaminasyon riskini en aza indirmek için sezaryen doğumlardan alınmıştır. İzolasyona kadar Krebs Henseleit solüsyonu içinde muhafaza edilmiştir. Solüsyonun 1L'si, 119mM NaCl, 25mM NaHCO₃, 4,6mM KCl, 1,2mM KH₂PO₄, 11mM Monohidrat glukoz, 1,2mM MgCl₂, 2,5mM CaCl₂ içermektedir. İzolasyon aynı gün içinde gerçekleştirilmiştir.

(b) Hücre kültürü için solüsyon hazırlanması

Solüsyonlar için gerekli olan maddeler:

1. PBS (Phosphat Buffered Saline), 10X (*Gibco*)
2. FBS (Fetal Bovine Serum) Gold (*PAA*)
3. Kollajenaz Type II (*Gibco*)
4. Jelatin, %2 (*Sigma*)
5. Medium199 Earles, 10X (*Gibco*)
6. HEPES 1M (*Gibco*)
7. NaHCO₃ (%7.5 w/v) (*Merck*)
8. Penicilline-Streptomycine (*Gibco*)
9. L-Glutamin 200mM (*Sigma*)
10. 1 N NaOH

Hücre kültür ortamı, Medium 199 kullanarak hazırlanmıştır. Tamamlanmış mediumda (100mL için): 10mL FBS (%10), 1mL Penisilin-Streptomisin, 1.8mL NaHCO₃, 1.5mL Hepes bulunmaktadır. Steril distile suyla dilüe edilen M199 (1X) ile 100mL'ye tamamlanır.

Kollagenaz, 100mL PBS (1X)'e 200 mg kollagenaz tip II eklenerek hazırlandı. pH 7,4'e ayarlandı ve sterilizasyon için 0,2µm'lik şırınga filtresiyle süzüldü.

(c) Hücre Kültürünün yapılması

Tüm solüsyonlar sıcak su banyosuna konarak 37°C'ye gelmeleri sağlandıktan sonra işlemler gerçekleştirildi.

Umbilikal kordların venleri, kısaltılmış feeding sonda yardımıyla önce PBS ile yıkandı. Daha sonra kollagenaz ile doldurularak

şışırıldı ve her iki tarafı kleplendi. 14 dk kadar 37°C'lik etüvde bekletildi. Etüvden çıkarılan kordların bir uçları kesilerek hücreler toplandı ve kalan hücreleri almak için venin içi M199(tamamlanmış):PBS (1:1, v/v) ile yıkandı.

Hücreler 1500 x g'de 10 dakika sentrifüj edildi. Supernatant atılarak pellet taze mediumla resuspend edildi ve hepsi bir tüpte toplanarak havuz yapıldı. Daha sonra 6-kuyulu plate için her kuyuya 1mL olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirilerek 37°C'lik, %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı.

Ertesi gün mediumlar aspire edilerek PBS'le yıkandı ve ardından PBS alınarak yeni medium kondu. Medium gün aşırı yenisiyle değiştirildi.

Hücreler inverted mikroskopla kontrol edilerek konfluense ulaşmaları beklendi ve deneye tabi tutuldu.

(d) Deney grupları ve madde uygulamaları

Deney grupları ve dozlar şu şekilde uygulanmıştır:

- 1- Kontrol: Hiçbir madde uygulaması yapılmamış HUVEC kültürü
- 2- LPS (Sigma): 10µg/mL E.coli 0111:B4 suşu ¹²⁴
- 3- Arginin (MERCK) : 10⁻⁴ mol/L ¹²⁵
- 4- Taurin (Sigma):5 µg /mL ¹⁴
- 5- LPS + Arginin uygulaması: Her iki madde de yukarıda verilenlerle aynı dozlarda ve aynı anda uygulandı.
- 6- LPS+ Taurin uygulaması: Her iki madde de yukarıda verilenlerle aynı dozlarda ve aynı anda uygulandı.

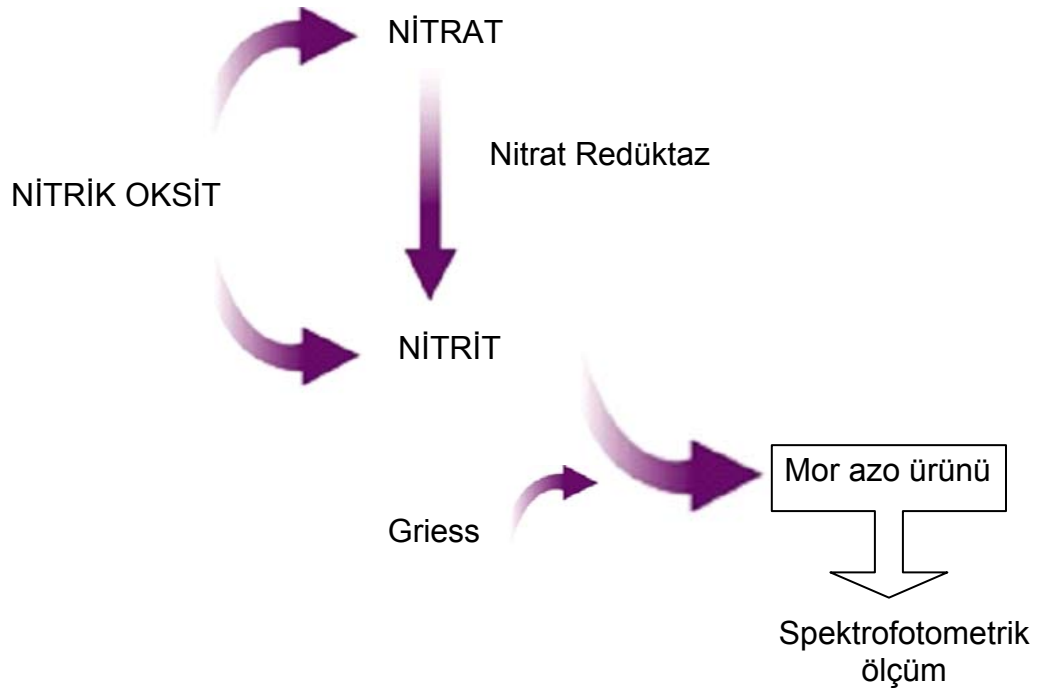
Madde uygulamaları yapıldıktan sonra 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında mediumlar eppendorf tüplerine alınarak -20°C’de saklanmıştır.

3.2.2. Nitrat/nitrit Tayini

Nitrat/Nitrit Colorometric Assay Kit (Cayman Chemical) kullanılarak yapılmıştır.

Prensip:

Yarı ömrü saniyeler olan NO’nun ölçümü için son ürünlerinin ölçümü yolundan yararlanılır. NO’nun in vivo son ürünleri nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-)’tır. NO_2^- ve NO_3^- oranları değişkendir ve tam olarak bilinemez. Bu nedenle total NO, NO_2^- ve NO_3^- ’ın toplamı olarak hesaplanır. İşlemi iki aşamada gerçekleştirmek mümkündür. Birinci basamak, nitratın nitrite çevrilmesidir. Bu işlem, nitrat redüktaz enzimi katalizörlüğünde gerçekleştirilmiştir. Nitrat redüktaz NADPH bağımlıdır. Bu nedenle de nitrat redüktaz enzim kofaktör preperatı kullanılarak NADP^{+} ’nin NADPH’a dönüşümü sağlanır. İkinci basamak ise Griess reaktifinin nitriti mor renkli azo ürününe çevirmesidir. Oluşan renk spektrofotometrik olarak okunur.^{126,127} (Şekil 16)



Şekil 16. Nitrat/nitrit tayininin prensibi

Reaktifler:

Kit içeriğinde bulunan reaktifler hazırlanarak kullanılmıştır. Kitle beraber gelen kimyasallar şu şekildedir:

- Nitrat/nitrit Assay Buffer
- Nitrat Redüktaz Enzim Preperatı
- Nitrat Redüktaz Kofaktör Preperatı
- Nitrat Standardı
- Griess Reaktifi R1
- Griess Reaktifi R2

Reaktiflerin Hazırlanması:

Reaktiflerin hazırlanması işlemi kit kitapçığında anlatıldığı şekilde aşağıdaki gibi gerçekleştirildi:

- 1- Assay Buffer: Assay Buffer şişesinin içeriği 100mL ultra saf suyla dilüe edildi.
- 2- Nitrat Redüktaz Enzim preperasyonu: Şişenin içeriği üzerine 1,2mL Assay buffer eklendi. Çalışma süresince buz üzerinde tutuldu.
- 3- Nitrat Redüktaz Kofaktör preperasyonu: Şişenin içeriği üzerine 1,2mL Assay buffer eklendi. Çalışma süresince buz üzerinde tutuldu.
- 4- Nitrat Standardı: Şişe içeriğinin üzerine 1,0mL Assay Buffer eklendi. Vortekslenerek homojen bir çözünme sağlandı.
- 5- Griess Reaktifleri R1 ve R2: Kullanıma hazırlar.

Nitrat Standartlarının Hazırlanması:

Nitrat Standardı stok solüsyonu, 0,9mL Assay Buffer üzerine 0,1mL nitrat standardı (sulandırılmış) konarak hazırlandı. Bu stok 200µM'dır. Daha sonra aşağıdaki tablodaki konsantrasyonlara ulaşılması için kuyucukların içinde dilüe edildi.

Tablo 1. Nitrat standartları

Final Nitrat konsantrasyonu (µM)*	Assay Buffer (µL)	Nitrat Standardı (µL)
0	80	0
5	75	5
10	70	10
15	65	15
20	60	20
25	55	25
30	50	30
35	45	35

*: Konsantrasyonlar total 200µL'lik final hacme göre hesaplanmıştır.

Prosedür:

1. Standartlar tabloda verildiği şekilde kuyucuklara pipetlendi.
2. Kör olacak olan kuyucuklara 200 µL Assay Buffer pipetlendi ve başka herhangi bir şey konmadı.
3. Diğer kuyucuklara 40µL numune, 40µL Assay Buffer olacak şekilde dilüe edilerek numuneler pipetlendi.
4. Standart ve numunelere 10µL Enzyme Cofactor Mixture ve ardından 10 µL nitrat redüktaz pipetlendi.
5. Kültür mediumu çalışıldığı için, kit kitapçığında belirtildiği gibi 2 saat, platein üstü örtülerek inkübasyona bırakıldı.
6. Inkübasyon süresi sonunda standart ve numune kuyucuklarına önce 50µL Griess Reaktifi R1, daha sonra ise 50µL Griess Reaktifi R2 pipetlendi.
7. Griess reaktiflerinin mor renk oluşumunu sağlamaları için 10 dakika inkübasyona bırakıldı.

Ölçüm:

Spektrofotometrik ölçüm 540 nm dalga boyunda, ELISA plate readerda gerçekleştirildi.

3.2.3. Homosistein Tayini

Immuchrom homosistein kitiyle çalışıldı.

Prensip:

Homosistein tayini için numune, tek basamakta redükte ve derivatize edilmektedir. Albumine bağlı ve okside Hcy indirgenmekte ve floresan bir proba çevrilmektedir. Presipitasyon sırasında yüksek molekül ağırlıklı maddeler uzaklaştırılmaktadır.^{129,130} Konsantrasyonlar cihaz tarafından “internal standart” metoduna göre hesaplanmaktadır.¹²⁹

Reaktifler ve Mobil Faz:

Reaktifler kit ile beraber sağlanmaktadır. Plazma kalibratör, Internal Standart, Reduction Solution, Derivat ve PREC reaktifi, kitin çalışma yönergesine göre Recon solüsyonu içinde çözülerek hazırlandı. Hcy tayini için kullanılan tek Mobil Faz da kitin beraberinde bulunmaktadır.

HPLC Sistem Parametreleri:

HPLC cihazı, ekipmanları ve çalışma parametreleri şu şekildedir:

HPLC cihazı ve ekipmanları: SHIMADZU

Kolon: Partikül çapı 2,5µm olan 125 x 4 mm MZ Inertsil ODS kolonu

Kolon sıcaklığı: 30°C

Akış hızı: 1,0mL/dk

Dalga boyu: Ex=385nm ; Em=515nm

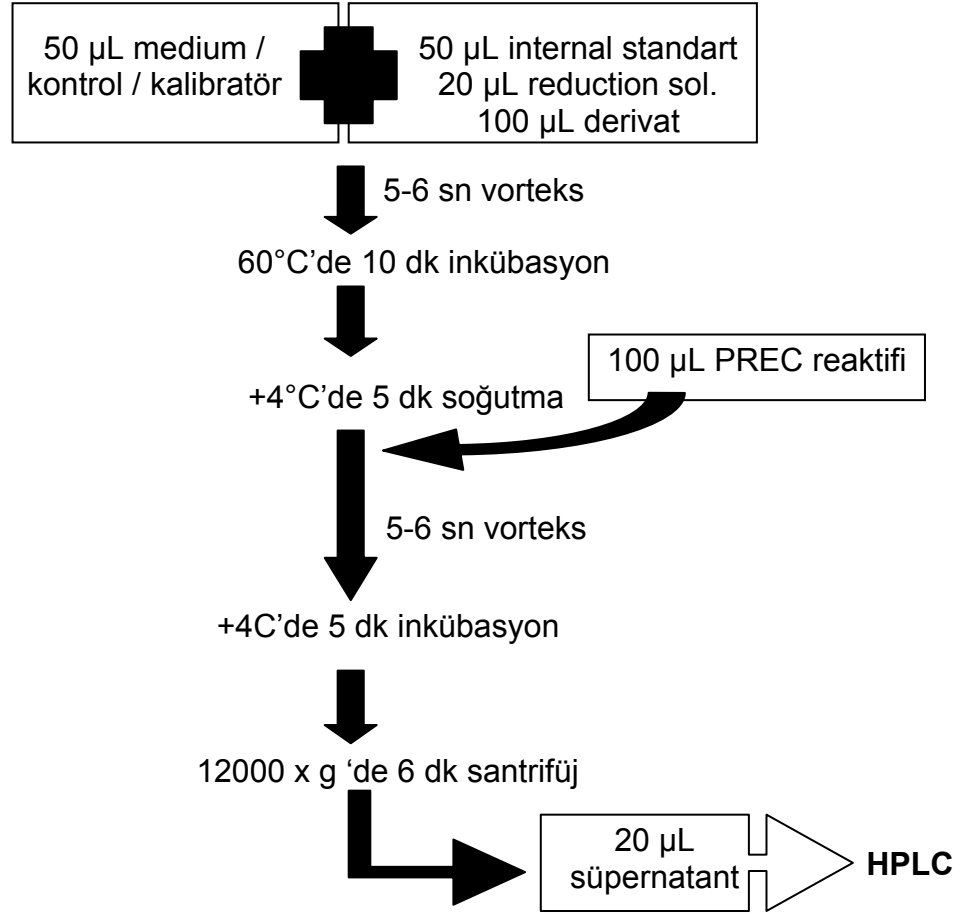
Çalışma süresi: 5 dk

Prosedür:

Standart eğri çıkarılması için 50 µL kontrol veya kalibratör üzerine, çalışma için ise 50 µL numune üzerine 50 µL internal standart, 20µL reduction solution, 100 µL derivat eklendi. 5-6 sn vortekslendi. Derivatizasyon için 10 dk 60°C'lik su banyosunda inkübe edildi ve inkübasyon sonunda hemen buzdolabına (+4°C) konarak 5 dk soğutuldu. 100 µL PREC reaktifi eklendi ve 5-6 sn vortekslendi. 4°C'de 5 dk daha inkübe edildikten sonra 12000 x g'de 6 dk santrifüjlendi. Oluşan supernatanttan cihaza 20 µL enjeksiyon yapıldı. (Şekil 17)

Hcy'nın ayrımı:

Hcy piki internal standart pikinden önce çıkmaktadır.



Şekil 17. Homosistein tayini prosedürü

3.2.4. ADMA Tayini

ADMA tayini Chen ve arkadaşları¹²⁸ tarafından tarif edilen şekilde yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile yapılmıştır.

Prensip:

Numunenin 5-sülfosalisilik asit (5-SSA) ile deproteinize edilmesi, o-fitaldialdehit (OPA) ile derivatizasyonu ve sonrasında HPLC'de floresan dedektörle analizi esasına dayanır.

Reaktifler ve Mobil Faz:

- 1- ADMA standardı: Çalışma için ADMA standartları 0,1 M HCl içinde hazırlandı. 500µM ADMA (MA: 202,3 g/mol) stok standardından seri dilüsyonlar yapıldı.
- 2- 5-SSA: Katı madde olan 5-SSA'dan 1mL mediuma 25 mg olacak şekilde kondu ve deproteinizasyon sağlandı.
- 3- OPA reaktifi: 10mg OPA'nın 0,5mL metanol, 2mL Borat tamponu (0,4M ; pH=10 (KOH pellet ile pH ayarı)) ve 30 µL 2-mercaptoetanol içinde çözülmesiyle hazırlandı.
- 4- Mobil faz: 50mM sodyum asetat (pH=6,8), HPLC-grade metanol ve tetrahidrofuran (THF) ile hazırlandı. Oranlar sırayla (v:v:v) mobil faz A için 82:17:1 ve mobil faz B için 22:77:1 şeklindedir. Hazırlanırken milli-Q kalite su kullanıldı. Cihaza verilmeden önce 0,2µm por çapına sahip membran filtreden geçirildi.

HPLC Sistem Parametreleri:

HPLC cihazı, ekipmanları ve çalışma parametreleri şu şekildedir:

HPLC cihazı ve ekipmanları: Agilent Technologies

Kolon: Partikül çapı 5µm olan 150 x 4 mm I.D. Nova-Pak C18 kolonu

Gradient Programı: OPA-ADMA derivatlarının ayrıştırılması için gradient programı Tablo 2 'de verilmiştir.

Kolon sıcaklığı: 37°C

Akış hızı: 1,0mL/dk

Dalga boyu: Ex=338nm ; Em=425nm

Çalışma süresi: 35 dk

Tablo 2. OPA-ADMA türevlerinin ayrıştırılması için gradient programı

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

Numunelerin hazırlanması:

Numunelerin hazırlanması için 1mL medium, 25 mg 5-SSA ile deproteinize edildi. 5000 x g'de 6 dk santrifüj edilerek presipite olmuş proteinler ayrıldı. 0,2µm'lik filtreden geçirilen 10µl'lik süpernatantın üzerine 100 µl OPA reaktifi eklenerek derivatizasyon sağlandı. OPA eklenmesinden 3 dk sonra 10 µl karışım okumaya alındı.

ADMA'nın ayrımı:

ADMA piki arginin ve γ-aminobütirik asit (GABA) pikinin arasında çıkar. Arginin ve sitrülün, ADMA'yla interferans verme olasılığı en yüksek olan amino asitlerdir.

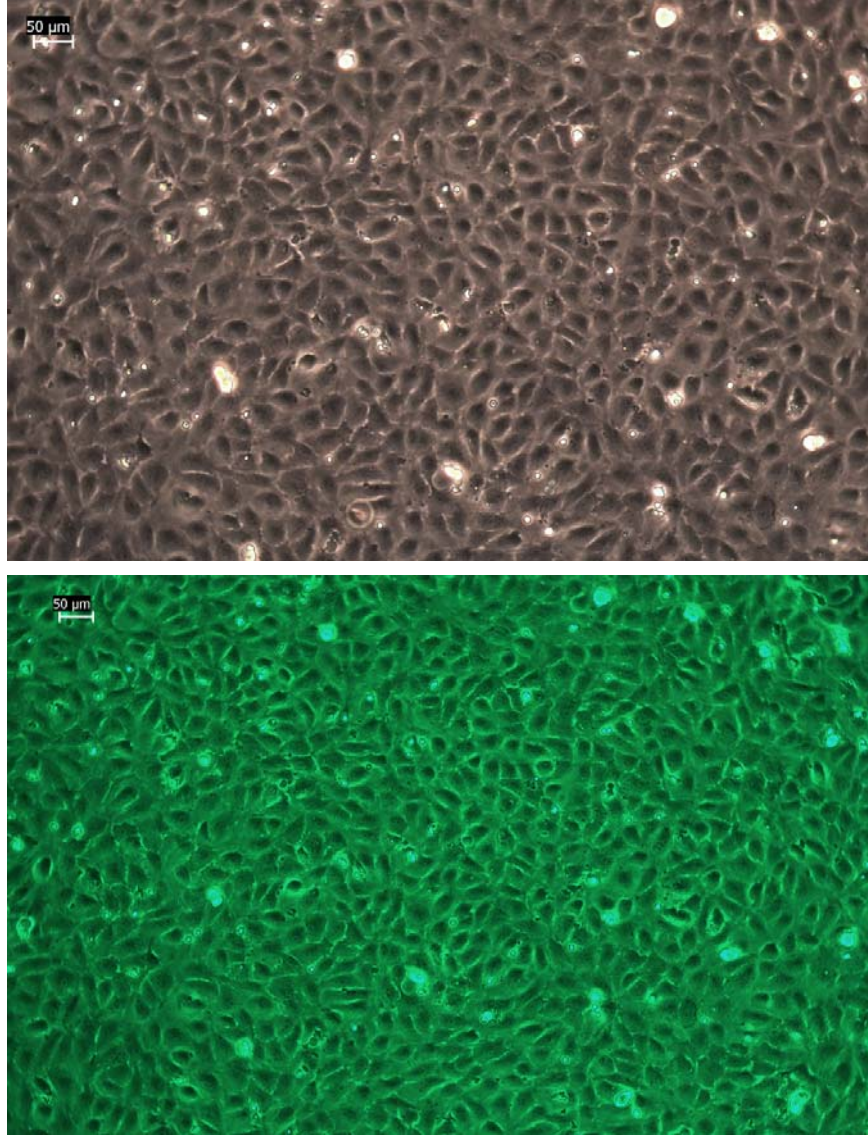
3.2.5. İstatistiksel Analiz

Tüm veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel hesaplamaların yapılmasında SPSS 16.0 (Statistical Package for the Social Sciences) programı ve grafik çizimlerinde Microsoft Excel programı kullanıldı. Grupların istatistiksel karşılaştırması için Kruskal-Wallis varyans analizi ve Mann-Whitney U testi uygulandı. p<0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. HUVEC kültürü bulguları

Tüm hücreler konfluense ulaşana kadar düzenli olarak inverted mikroskopla kontrol edildi. Hücrelerin canlılıklarından, kontamine olmadıklarından ve konfluense ulaştıklarından emin olunduktan sonra deneye alındılar. şekil 18 de konfluent olmuş hücrelerin inverted mikroskop ve kamerayla çekilen görüntü örnekleri görülmektedir.



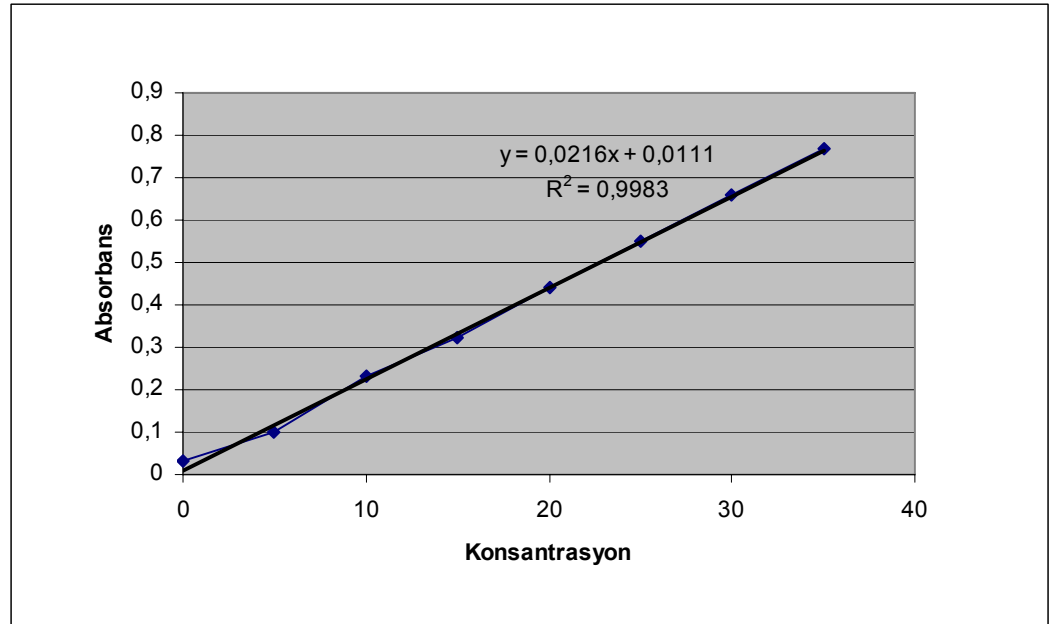
şekil 18: HUVEC kültürü inverted mikroskop görüntüleri

4.2. Parametrelere ilişkin bulgular

Yapılan Kruskal-Wallis analizine göre her üç parametre açısından da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır.

4.2.1. Nitrit/Nitat düzeyleri bulguları

Nitrat/nitrit seviyelerinin tayini için kullanılan Nitrat/Nitrit kolorimetrik ölçümüne ait standart grafiği Şekil 19’da verilmiştir.



Şekil 19: Nitrat/nitrit ölçümüne ait standart grafiği

Tüm grupların nitrat/nitrit düzeyleri ortalama $\pm$ standart sapma olarak Tablo 3’de verilmiştir. Tüm grupların nitrat/nitrit düzeyleri Şekil 20’deki grafikte gösterilmiştir.

Tablo 3: Tüm grupların nitrat/nitrit düzeyleri

Grup	Nitrat/nitrit ($\mu\text{mol/L}$)
Kontrol n=5	3,99 $\pm$ 0,84
LPS n=5	11,98 $\pm$ 0,66 ^{a,c,e}
Arginin n=5	13,42 $\pm$ 1,99 ^{a,b}
Taurin n=5	9,88 $\pm$ 0,42 ^{a,d}
LPS+Arginin n=5	8,77 $\pm$ 1,47 ^{a,b,c}
LPS+Taurin n=5	9,86 $\pm$ 0,78 ^{a,d,e}

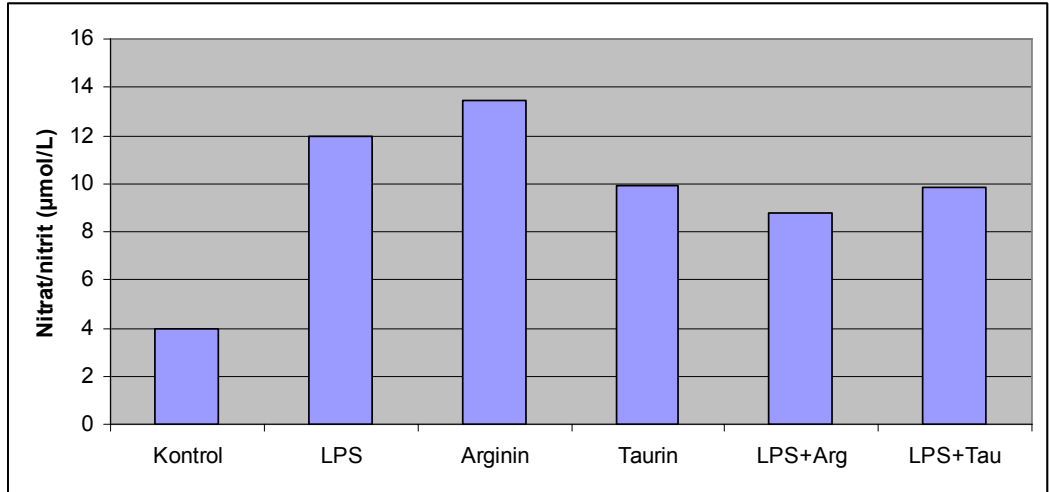
a: Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0,01$

b: Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında $p < 0,01$

c: Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında $p < 0,05$

d: Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında $p > 0,05$

e: Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında $p < 0,05$



Şekil 20: Nitrat/nitrit düzeyleri grafiği

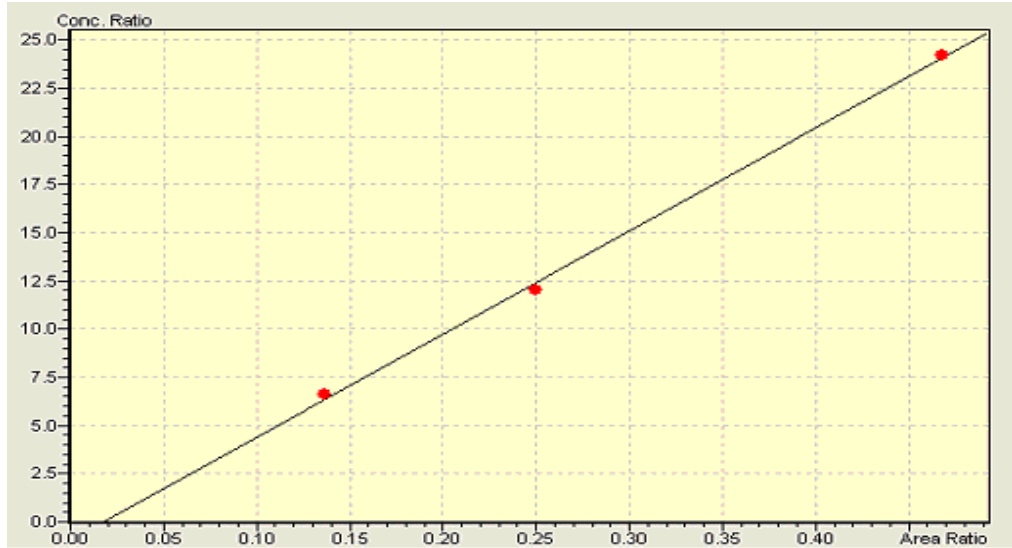
Nitrat/nitrit düzeyleri, kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda anlamlı artış göstermiştir. ($p<0,01$)

Arginin verildiğindeki nitrat/nitrit artışı LPS+Arginin verilmesine göre anlamlı derecede fazladır. ($p<0,01$) LPS grubunun nitrat/nitrit değerleri, LPS+Arginin grubuna göre anlamlı derecede yüksektir. ($p<0,05$)

Taurin+LPS grubunun nitrat/nitrit düzeyleri Taurin grubuyla aynıken, LPS grubuna göre anlamlı azalma göstermiştir. ($p<0,05$)

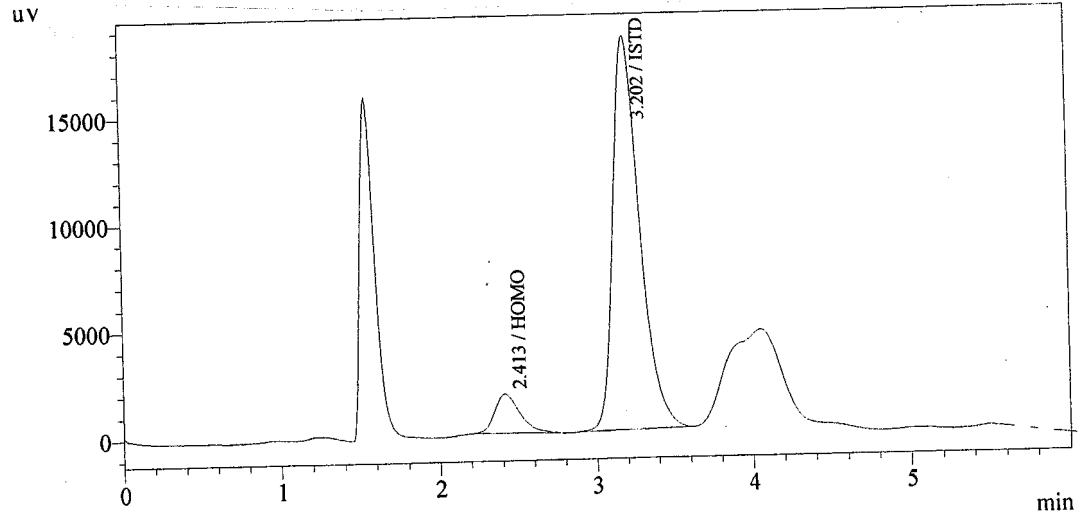
4.2.2 Homosistein düzeyleri bulguları

Immuchrom homosistein ölçüm kitine ait standart grafik Şekil 21'de verilmiştir.



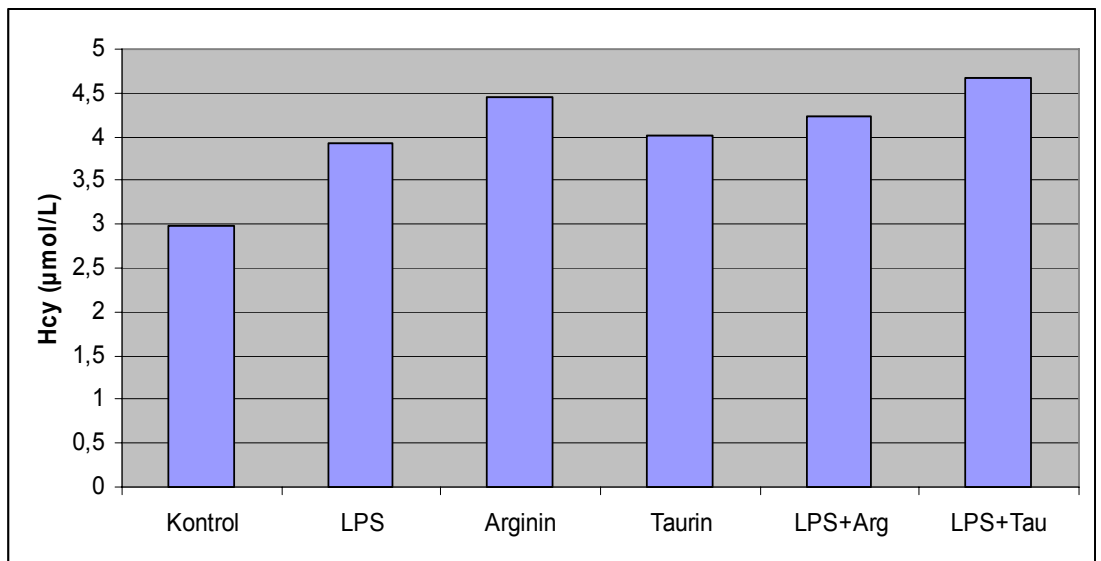
Şekil 21: Hcy ölçümüne ait standart grafiği

Hcy için alıkonma zamanı (retention time, RT) 2-3 dakikaları arasındır.(Şekil 22)



Şekil 22: Bir numuneye ait Hcy Piki

Tüm grupların Hcy düzeyleri ortalama $\pm$ standart sapma olarak Tablo 4’de verilmiştir. Tüm grupların Hcy düzeyleri Şekil 23’deki grafikte gösterilmiştir.



Şekil 23: Hcy düzeyleri grafiği

Tablo 4: Tüm grupların Hcy düzeyleri

Grup	Hcy ($\mu\text{mol/L}$)
Kontrol n=5	2,98 $\pm$ 0,19
LPS n=5	3,92 $\pm$ 0,67 ^{a,c,d}
Arginin n=5	4,46 $\pm$ 0,31 ^{a, b}
Taurin n=5	4,02 $\pm$ 0,30 ^{a,e}
LPS+Arginin n=5	4,24 $\pm$ 0,56 ^{a, b,c}
LPS+Taurin n=5	4,68 $\pm$ 0,33 ^{a,d,e}

a: Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0,05$

b: Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında $p > 0,05$

c: Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında $p > 0,05$

d: Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında $p > 0,05$

e: Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında $p < 0,05$

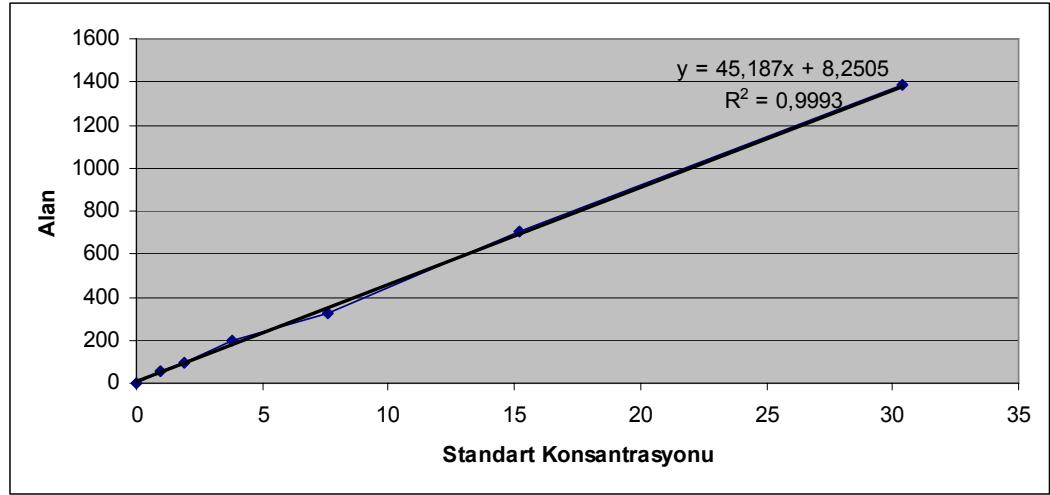
Hcy düzeyleri, kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda anlamlı artış göstermiştir. ($p < 0,05$)

Arginin+LPS grubunun Hcy değerleri Arginin ve LPS gruplarıyla istatistiksel olarak aynıdır.

Taurin+LPS grubunun Hcy düzeyi Taurin uygulanmış gruba göre anlamlı derecede artış gösterirken ($p < 0,01$), LPS grubuyla arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır.

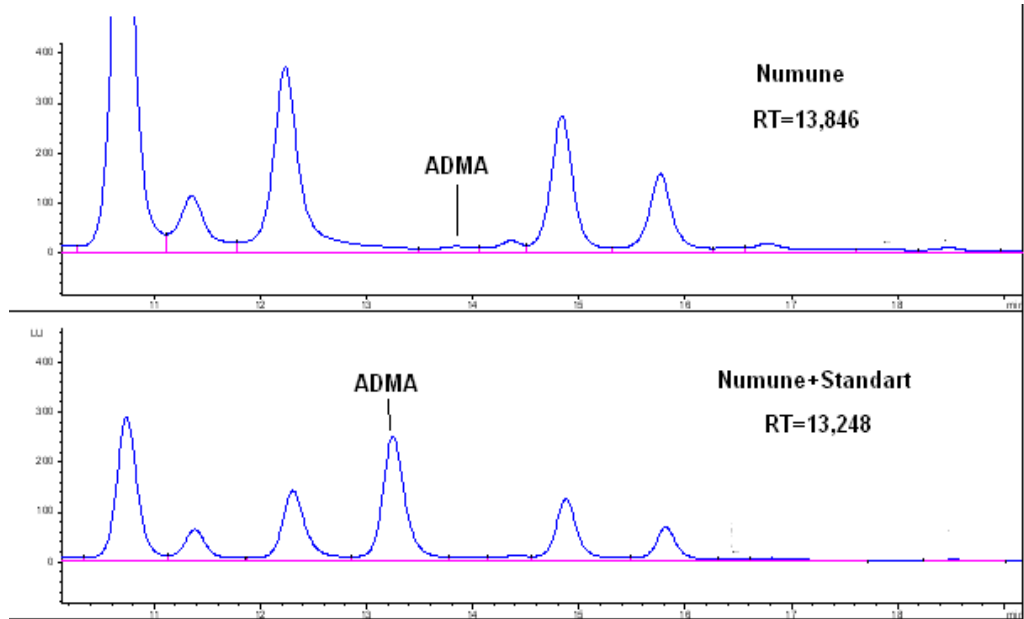
4.2.3. ADMA düzeyleri bulguları

ADMA düzeylerinin tayini için kullanılan HPLC ölçümüne ait standart grafiği Şekil 24'de verilmiştir.



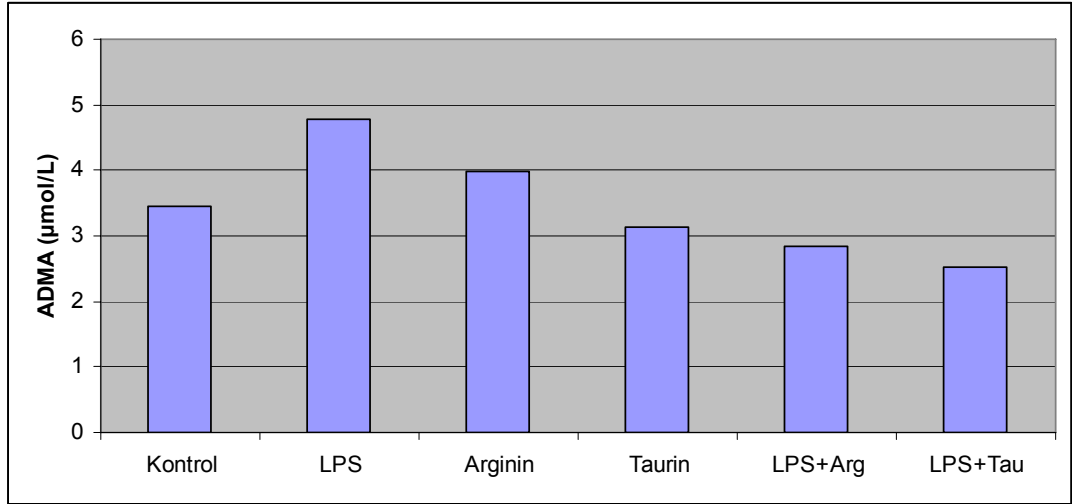
Şekil 24: ADMA ölçümüne ait standart grafiği

ADMA için alıkonma zamanı (retention time, RT) 13-14. dakikalar arası olarak bulunmuştur. (Şekil 25)



Şekil 25: Bir numune ile aynı numunenin ADMA standardı eklenmiş pikleri

Tüm grupların ADMA düzeyleri ortalama $\pm$ standart sapma olarak Tablo 5’de verilmiştir. Tüm grupların ADMA düzeyleri Şekil 26’daki grafikte gösterilmiştir.



Şekil 26: ADMA düzeyleri grafiği

Tablo 5: Tüm grupların ADMA düzeyleri

Grup	ADMA (µmol/L)
Kontrol n=5	3,46 ± 0,48
LPS n=5	4,77 ± 0,42 ^{a,d,f}
Arginin n=5	3,98 ± 0,59 ^{b,c}
Taurin n=5	3,14 ± 0,69 ^{b,e}
LPS+Arginin n=5	2,83 ± 0,72 ^{b,c,d}
LPS+Taurin n=5	2,52 ± 0,57 ^{a,e,f}

- a: Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p<0,05$
- b: Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p>0,05$
- c : Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında $p<0,05$
- d: Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında $p<0,01$
- e: Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında $p>0,05$
- f: Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında $p<0,01$

ADMA düzeyleri, kontrol grubuna kıyasla LPS grubunda anlamlı artış ($p<0,05$), LPS+Taurin grubunda anlamlı azalma ($p<0,05$) gösterirken diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermemiştir.

Arginin verildiğindeki ADMA düzeyi LPS+Arginin verilmesine göre anlamlı derecede yüksektir. ($p<0,05$) LPS grubunun ADMA değerleri, LPS+Arginin grubuna göre anlamlı derecede fazladır. ($p<0,01$)

Taurin+LPS grubunun ADMA düzeyleriyle Taurin grubunun ADMA düzeyleri arasında istatistiksel olarak fark yoktur. LPS grubunun ADMA değerleri LPS+Taurin grubuna göre anlamlı derecede fazla bulunmuştur. ($p<0,01$)

5. TARTIŞMA

Kültür ortamındaki endotel hücreleri, dışarıdan verilen uyarılarla hızlı bir şekilde biyokimyasal ve fenotipik değişikliklere uğrarlar. In vitro şartlardaki bu değişimler, in vivo şartlarda bir uyarıma cevap olarak meydana gelen, inflamasyona ve homeostasise aktif olarak katılım sağlayan değişimlere eşdeğerdir. Endotel hücreleri tarafından strese karşı verilen bu adaptif cevaplar, bu hücrelerce gerçekleştirilen NO üretiminin artmasıyla ve serbest radikal oluşumuyla karakterizedir. ^{4,8}

Bilindiği gibi endotel hücrelerinde bulunan eNOS izoformu aracılığıyla az miktarda ve fizyolojik olaylardan sorumlu olan NO oluşmaktadır. Ancak endotel hücrelerinin sitokinler ve lipopolisakkaritler (LPS) aracılığıyla aktivasyonu sonucu iNOS izoformu kataliziyle çok miktarda NO oluşmakta ve vasküler sistemde patolojik olaylara neden olmaktadır. ⁴

Yapılan çalışmalar, stresin, LPS ve sitokin uyarısının ve deneysel sepsisin NO miktarlarında artışa neden olduğunu bildirmektedir. ^{4,9,131} Biz de çalışmamızda insan umbilikal ven endotel hücre (HUVEC) kültürlerinde endotoksin (LPS) uyarısından sonra nitrat/nitrit seviyelerini ölçtük. LPS uyarımı sonucunda nitrat/nitrit düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı artış tespit ettik.

Düzeylerini incelediğimiz NO ile bağlantılı olduğu bilinen bir diğer parametre de endojen bir NOS inhibitörü olan ADMA'dır. Balabanlı ve arkadaşları¹³² tarafından kobaylar üzerinde yapılan deneysel endotoksemi çalışmasında LPS verilmesinin Arginin-ADMA yolunu aktive ederek ADMA seviyelerinde yükselmeye neden olduğu bildirilmiştir. Ancak Mittermayer ve arkadaşlarının¹ insanlar üzerinde yaptıkları endotoksemi

çalışmasında L-arginin/ADMA oranının düştüğü ancak ADMA'nın kontrol grubuna göre değişmediği tespit edilmiştir. Bizim ADMA hakkında elde ettiğimiz veriler ise LPS verilmesiyle beraber ADMA'da önemli bir artış olduğuna işaret etmektedir.

Çalışmamızın ADMA ve nitrat/nitrit değerleri beraber göz önüne alınınca LPS uyarısına bağlı olarak hem Arginin-ADMA hem de Arginin-NO yolunun aktive olduğu tespit edilmiştir. Deneysel çalışmaların bir çoğunda ADMA'nın NOS'un tüm izoformlarını inhibe ettiği bilgisi ⁷³ göz önüne alındığında bizim bulgumuz ters bir bulgu olarak görünmektedir. Ancak, uyguladığımız LPS dozu ve inkübasyon süresinin sonunda artış gösteren ADMA'nın iNOS'u inhibe edecek düzeyde olmadığını ve/veya ancak iNOS'a göre oldukça az miktarlarda üretilen eNOS'u inhibe etmiş olabileceği görüşündeyiz.

HUVEC kültürlerinde incelediğimiz bir diğer parametre ise kardiyovasküler hastalıklar için risk faktörü olarak kabul edilen homosisteindir.⁹⁷ Çalışmamızda, LPS uyarısı sonucu homosistein düzeyleri kontrole göre anlamlı artış göstermiştir.

Nitrat/nitrit ve homosistein parametreleri arasında çelişkili bilgiler mevcuttur. Upchurch ve arkadaşlarına¹³³ göre homosistein eNOS'u stimule etmektedir. Zhang ve arkadaşlarına¹³⁴ göre ise Hcy eNOS'u inhibe etmektedir. Bir başka çalışma ise Tyagi ve arkadaşları ⁹⁵ tarafından gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar, homosisteinin iNOS'u indükleyerek oksidatif stres oluşturduğunu ve eNOS'u azalttığını söylemektedir. Bizim elde ettiğimiz verilere göre kontrol grubuna kıyasla LPS uyarısı verilmiş grupta hem Hcy hem de NO artmıştır.

Bir çok çalışma ADMA ve Hcy'in metabolik yolunun metil transferazlar aracılığıyla bağlantılı olduğunu ortaya atmıştır.^{71,72,80} Her iki parametrenin de KVH için risk faktörü olduğu önerilmektedir.⁹² İnsanlar üzerinde yapılan deneysel hiperhomosisteinemi çalışmalarında, oral metiyonin yüklemesinden sonra hem ADMA, hem de Hcy'in anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.^{99,104}

Stühlinger ve arkadaşları¹⁰³ tarafından endotel hüce kültürlerinde yapılan çalışmada homosistein ilavesinin ADMA seviyelerini anlamlı derecede artırdığı bulunmuştur. Ayrıca aynı araştırmacılar, kültür ortamına eklenen Hcy'in ADMA'yı yıkan enzim olan DDAH'ın aktivitesini azalttığını ve buna bağlı olarak da ADMA'nın akümülyasyonuna neden olduğunu söylemektedir. Bu araştırmacılara göre bu şekilde oluşan ADMA da eNOS'u inhibe etmekte ve eNOS kataliziyle oluşturulan NO miktarı azalmaktadır. Heydrick ve arkadaşlarının¹³⁵ yaptığı çalışmaya göre, homosistein ilavesiyle ortaya çıkan endotel disfonksiyonu, bazı şartlarda NO'dan ziyade süperoksit oluşturan eNOS üzerinden olmaktadır ve bu şekilde eNOS kaynaklı NO oluşumu engellenmektedir. iNOS'un etkisinden söz edilmemiştir. Tyagi ve arkadaşlarının⁹⁵ önerdiği mekanizmaya göre ortamda bulunan fazla miktarda Hcy, NADPH oksidaz sistemini aktive ederek ROS üretimine neden olmaktadır. Bu şekilde artan oksidatif stres iNOS ekspresyonunu artırmakta ve indirekt olarak DDAH ekspresyonunu azaltmaktadır. Bu sebeple akümüle olan ADMA ise spesifik olarak eNOS'u inhibe etmekte ve bu şekilde eNOS kataliziyle oluşan NO'nun miktarı azalmaktadır. Bu bulgular bir çok yönden bizim çalışmamızı en iyi şekilde desteklemektedir. Ancak, çalışmamızda deneysel bir endotoksemi durumu oluşturulduğu için fazla miktarda NO oluşumunu katalizleyen enzimin iNOS olduğu düşünülmektedir. Bu sebeple, LPS uyarısı sonucu oluşan homosistein, direkt veya ADMA yoluyla indirekt olarak eNOS'u inhibe etmiş olsa bile veya LPS uyarısı sonucu oluşan ADMA eNOS'u inhibe etmiş olsa bile total nitrat/nitrit seviyesinde artış saptanacaktır. Bütün

veriler bir arada değerlendirildiğinde çalışmamızda hücre kültürlerinin LPS ile uyarılması sonucu NO, ADMA ve Hcy parametrelerinin her üçünde de artışın mekanizmasının bu şekilde olduğunu düşünüyoruz.

Arginin bir taraftan guanido grubuna ait bir azot atomunun oksidasyonu ile NO ve sitriline dönüşerek Arginin-NO yolunu oluştururken, diğer taraftan guanido grubunun metilasyonu ile ADMA'yı meydana getirmektedir. Görülmektedir ki arginin, hem NO hem de ADMA'nın sentezinde ortak bir substrattır.¹³⁶ Çeşitli araştırmacılar, ekstraselüler argininin spesifik transporterlarla hücre içine alındığını ve bu transporterların ekspresyonunun oksidan stresle, inflamatuvar sitokinlerle, iNOS artışıyla ve endotoksemiyle indüklendiğini bildirmektedir.¹³⁷⁻¹⁴⁰

Argininin bu önemli yerini göz önüne alarak biz de HUVEC kültürlerine tek başına (arginin grubu) ve LPS ile beraber (LPS+arginin grubu) ayrı ayrı uyguladık. Arginin grubunda NO miktarlarının kontrole göre anlamlı artış gösterdiğini gözledik. Bu artış, hem LPS grubundan hem de LPS+arginin grubundan anlamlı derecede fazlaydı. ADMA düzeyleri ise arginin uygulamasıyla kontrole göre değişiklik göstermedi. Bu durumda, ilave edilen argininin ADMA sentezinde kullanılmadığı, NOS enzimleri tarafından NO oluşturmak için kullanıldığı açıktır. Ancak, arginin grubunda iNOS'u stimule edebilecek bir etken yoktur; çünkü bakteriyel kontaminasyona dair herhangi bir mikroskobik bulguya rastlanmamıştır. Bu durumda yalnızca eNOS'un aktif olduğu düşünülürse, fizyolojik koşullarda az miktarda NO üreten eNOS'un nasıl bu kadar fazla miktarda NO üretebildiği açıklanamamıştır. Bu numunelerde eNOS ve iNOS aktivasyonlarının ölçümleri yapılsaydı konuya açıklık getirilmesi mümkün olabilirdi.

LPS'nin endotel hücrelerinde oluşturduğu NO ve ADMA değişimleri üzerine argininin etkisini incelemek amacıyla LPS ile beraber arginin (LPS+arginin grubu) uygulaması yaptık. Bu grupta NO ve ADMA'nın LPS grubuna göre anlamlı derecede azaldığını saptadık.

Bu güne kadar yapılan çeşitli çalışmalar argininin eNOS'u regüle ederek NO'yu düzenlediğini ve bu şekilde endotel fonksiyonunu restore ettiğini vurgulamıştır.^{125,141,142} Ancak argininin iNOS üzerindeki etkisine dair açıklayıcı bir çalışmaya rastlamadık. Bulgularımızın argininin iNOS üzerinde de regüle edici bir etkisinin bulunduğunu ve bu şekilde endotoksemi durumunda da endotel fonksiyonunu restore edici bir etki gösterdiğini düşünüyoruz.

LPS+arginin grubunda Hcy seviyeleri arginin grubuna göre anlamlı değişim göstermedi. ADMA miktarı aynı gruplarda azaldığına göre metiyonin kaynaklı metil grupları argininden başka bir metil akseptörü tarafından kullanılmış olabilir. Endotoksemi durumunda arginin ilavesinin Hcy açısından iyileştirici bir yönü bulunmamaktadır.

Çalışmamızda antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri kanıtlanmış olan taurinin NO, ADMA ve Hcy parametreleri üzerine etkisini araştırmak amacıyla HUVEC kültürlerine tek başına taurin (taurin grubu) ve LPS ile beraber taurin (LPS + Taurin grubu) uygulaması yaptık.

Taurin grubunun NO miktarları kontrol grubuna göre artış göstermekle beraber ADMA miktarı değişikliğe uğramadı. LPS+taurin grubunun NO miktarları LPS grubuna göre anlamlı derecede azalma gösterdi.

Fennessy ve arkadaşları¹⁴³ yaptıkları çalışmada taurinin cNOS sentezini upregüle iNOS sentezini ise downregüle ederek endotelde koruyucu etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Çalışmamızda endotoksemi durumu söz konusu olduğundan LPS uygulamasıyla iNOS aktivitesi artmış durumdadır. Bu iNOS artışı LPS+taurin gruplarında tespit edildiği üzere taurin sayesinde düşürülmüştür.

NO sonuçları göz önüne alındığında, intakt endotele taurin uygulandığında prooksidan bir molekül olarak davrandığı tespit edilmiştir. Ekremoğlu ve arkadaşları¹⁴⁴ ve Erdamar ve arkadaşları²¹ taurinin normal durumdaki hücre ile endotoksinle uyarılmış hücrelerde farklı etkiler gösterdiğine dair tespitlerde bulunmuşlardır. Bizim çalışmamız da bu sonuçlarla paralellik göstermektedir. Bulgularımıza göre taurin tek başına verilmesi hasar yaratıcı bir etkiye neden olurken LPS ile beraber taurin verilmesi LPS'nin zararlı etkilerini azaltmaktadır.

Tan ve arkadaşları¹⁴ bizim kullandığımız dozda taurini, oksideLDL (oxLDL) ile uyarılmış HUVEC kültürlerine verdiklerinde, oxLDL tarafından artırılan ADMA miktarının azaldığını bulmuşlardır. Araştırmacılara göre taurin, öncelikle ADMA'nın yıkımını DDAH enzimini aktive ederek hızlandırmakta ve bu sayede ADMA miktarları düşmektedir. Ayrıca inflamasyonda artan sitokinler tarafından DDAH enziminin inhibe olduğu bilinmektedir. Araştırmacıların bulguları, taurinin sitokin sentezini inhibe ederek de ADMA miktarını azaltmış olduğuna işaret etmektedir. Bizim çalışmamızdaki ADMA düzeylerinin düşüşünün de bu yolla olabileceğini düşünüyoruz.

Taurinin Hcy üzerindeki etkisini incelediğimizde çelişkili sonuçlarla karşılaşmaktadır. Taurin, tek başına verildiğinde ADMA'yı değiştirmezken Hcy'i artırdı. LPS ile beraber taurin verildiğinde ise taurin

grubuna kıyasla Hcy daha da fazla artış gösterdi. Bu noktada taurinin metiyoninden homosistein oluşumunu sağlayan demetilasyon reaksiyonlarını hızlandırıcı bir etkisi olmuş olabilir. Çalışmamızda taurinin Hcy üzerindeki etkisine dair bulguların bu konuda çalışan araştırmacılarla benzerlik göstermemektedir. Chang ve arkadaşları²⁰ tarafından rat vasküler düz kas hücreleri üzerinde yapılan çalışmada deneysel hiperhomosisteinemi oluşturduktan sonra ortama taurin eklemişler ve taurinin homosistein aracılı serbest radikal oluşum reaksiyonlarını inhibe ettiğini saptamışlardır. Bizim çalışmamızda dışarıdan herhangi bir homosistein ilavesi söz konusu değildir ve endotel hücresinin doğal Hcy miktarı ölçülmüştür. Sonuçlar arasındaki farklılık bu durumdan ileri geliyor olabilir. Bu noktanın daha ileri çalışmalarla aydınlatılması gerekmektedir.

6. SONUÇ

Sonuç olarak, HUVEC kültürlerinde LPS eklenmesiyle oluşturulan deneysel endotoksemi NO, ADMA, Hcy parametreleri arasında yakın ilişkinin varlığı saptandı. Bu ilişki her üçünün de artışı şeklindeydi.

HUVEC kültürlerine eklenen argininin endotoksemi durumunda NO ve ADMA parametrelerini düşürücü bir etkisi tespit edilirken, Hcy üzerinde, tahminen farklı metabolik yolların olaya karışmasıyla, çelişkili etkileri olduğu saptanmıştır.

Taurin ilavesinin ise intakt endotel ve LPS ile uyarılmış endotel üzerinde farklı sonuçlar verdiğini . NO ve ADMA bulgularımıza göre taurin, intakt endotel söz konusu olunca prooksidan gibi davranırken, LPS ile uyarılmış endotelde LPS'nin zararlı etkilerini azaltıcı şekilde davranmaktadır. Taurin, ADMA ve NO konusunda antioksidan etkiye sahip olarak görünürken Hcy üzerinde bu şekilde bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Bu konuda daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. ÖZET

Çalışmamızın amacı endotoksinle uyarılmış insan umbilikal ven endotel hücre (HUVEC) kültürlerinde NO-ADMA-Homosistein arasındaki ilişkiyi ve bu ilişkiye arginin ve taurinin etkisini araştırmaktır.

Bu amaçla altı grup oluşturuldu. Kontrol grubuna hiçbir madde uygulaması yapılmazken, LPS grubuna 10µg/mL endotoksin (E.coli 0111:B4 suşu), Arginin grubuna 10⁻⁴ mol/L arginin, Taurin grubuna 5 µg /mL taurin, LPS+Arginin grubuna aynı dozlarda endotoksin ile beraber arginin ve LPS+Taurin grubuna aynı dozlarda endotoksin ile beraber taurin uygulaması yapıldı.

NO parametresi ölçümü için son ürünler olan nitrit ve nitratın Griess yöntemiyle spektrofotometrik ölçümünden yararlanıldı. ADMA ve Homosistein parametreleri HPLC cihazında floresan dedektörle ölçüldü.

Çalışmamızın sonucunda endotokseminde NO, ADMA ve Homosistein parametreleri arasında her üçünün de artışı şeklinde bir ilişki saptandı. (p<0,05) LPS ile beraber arginin uygulamasının NO ve ADMA'yı düşürücü (p<0,05); ancak Homosistein açısından çelişkili etkileri olduğu bulundu. Taurinin intakt endotelde NO'nun anlamlı artışını (p<0,01), LPS ile uyarılmış endotelde ise NO ve ADMA'nın LPS grubuna göre anlamlı düşüşünü (p<0,05) sağladığı bulundu. LPS ile beraber taurin verilmesi Taurin grubuna göre anlamlı homosistein artışına neden olurken (p<0,05) LPS grubuna göre homosisteinde anlamlı bir değişime neden olmamıştır.

Çalışmamızda, LPS uyarısıyla hem Arginin-ADMA hem de Arginin-NO yolunun aktive olduğu bulunmuştur. LPS uyarısı nedeniyle inkübasyon sonunda artış gösteren ADMA'nın iNOS'u inhibe edecek

düzeyde olmadığını düşünüyoruz. Sonuçlarımızdan yola çıkarak, argininin endotoksemi durumunda NO ve ADMA parametreleri üzerinde düşürücü bir etkisi olduğu söylenebilir. Verilerimiz, taurinin intakt endotelde prooksidan, LPS ile uyarılmış endotelde antioksidan olarak davrandığını göstermektedir. Sonuçlarımıza göre taurinin Homosisteini düşürücü bir etkisinin saptanmaması nedeniyle fazla alımı konusunda şüpheyi yaklaşılması gerektiğini düşünüyoruz.

8. SUMMARY

The aim of our study was to investigate the relationship between NO, ADMA, Homocysteine and the influence of arginine and taurine on this relationship in endotoxin-induced human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) cultures.

For this reason six groups are formed. Control group consists of HUVEC cultures without any treatment. LPS, Arginine, Taurine, LPS+Arginine and LPS+Taurine groups are treated with 10 µg/mL endotoxin (*E.coli* 0111:B4), 10^{-4} mol/L arginine, 5 µg /mL taurine, endotoxin plus arginine (same doses) and endotoxin plus taurine (same doses) respectively.

The measurement of NO levels is implemented by the spectrophotometric measurement of nitrite and nitrate, which are end-products of NO, by Griess method. ADMA and Homocysteine levels are measured using HPLC with fluorescence detector.

The results of our study showed that there was a significant increase of NO, ADMA and Hcy in endotoxemia. ($p < 0,05$) LPS plus arginine treatment lowered NO and ADMA levels ($p < 0,05$) while this treatment showed conflicting results for Hcy. Taurine treatment elevated NO levels significantly ($p < 0,01$) while LPS+taurine treatment diminished NO and ADMA, compared to LPS group ($p < 0,05$). As a result of simultaneous treatment of LPS and taurine, Hcy levels increased significantly compared to Taurine group ($p < 0,05$) and did not change compared to LPS group.

In our study, LPS stimulation activated both Arginine-ADMA and Arginine-NO pathways. In our opinion, ADMA, which is formed after the incubation with LPS, was not elevated enough to inhibit iNOS. According to our results, arginine has a decreasing effect on NO and ADMA levels in endotoxemia. Our data showed that taurine acts as a prooxidant on intact endothelium and as an antioxidant on LPS-stimulated endothelium. Furthermore, as taurine did not show any diminishing effect on Hcy, we speculate that there should be a suspicious act towards excess intake.

9. KAYNAKLAR

1. Mitermayer F , Namiranian K, Pleiner J, Schaller G, Wolzt M. Acute Escherichia coli endotoxaemia decreases the plasma L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio in humans. *Clinical Science* 2004; 106 : 577–581
2. Bhagat K, Moss R, Collier J, Vallance P. Endothelial "stunning" following a brief exposure to endotoxin: a mechanism to link infection and infarction? *Cardiovasc Res.* 1996 ; 32(5):822-9.
3. Pleiner, J., Heere-Ress, E., Langenberger, H. et al. Adrenoceptor hyporeactivity is responsible for Escherichia coli endotoxin- induced acute vascular dysfunction in humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002; 22 :95–100
4. Cristina de Assis M, Cristina Plotkowski M, Fierro IM, Barja-Fidalgo C, de Freitas MS. Expression of inducible nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells during primary culture. *Nitric Oxide.* 2002 ; 7(4):254-61.
5. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993; 329(27):2002-12.
6. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987; 327(6122):524-6.
7. Davignon J, Ganz P Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 2004;109:III27–III32.
8. Laurindo FR, Pedro Mde A, Barbeiro HV, Pileggi F, Carvalho MH, Augusto O, da Luz PL. Vascular free radical release. Ex vivo and in vivo evidence for a flow-dependent endothelial mechanism. *Circ Res.* 1994; 74(4):700-9
9. Jia YX, Pan CS, Yang JH, Liu XH, Yuan WJ, Zhao J, Tang CS, Qi YF. Altered L-arginine/nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in the

vascular adventitia of rats with sepsis. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2006 ; 33(12):1202-8.

10. Bode-Böger SM, Scalera F, Ignarro LJ. The L-arginine paradox: Importance of the L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. Pharmacol Ther. 2007;114(3):295-306.
11. Cooke JP. Does ADMA Cause Endothelial Dysfunction? Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20:2032-2037
12. Pope AJ, Karupiah K, Kearns PN, Xia Y, Cardounel AJ. Role of dimethylarginine dimethylaminohydrolases in the regulation of endothelial nitric oxide production. J Biol Chem. 2009;284(51):35338-47.
13. Wells SM, Holian A. Asymmetric dimethylarginine induces oxidative and nitrosative stress in murine lung epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol. 2007;36(5):520-8.
14. Tan B, Jiang DJ, Huang H, Jia SJ, Jiang JL, Hu CP, Li YJ. Taurine protects against low-density lipoprotein-induced endothelial dysfunction by the DDAH/ADMA pathway. Vascul Pharmacol. 2007; 46(5):338-45.
15. MacAllister RJ, Fickling SA, Whitley GS, Vallance P. Metabolism of methylarginines by human vasculature; implications for the regulation of nitric oxide synthesis. Br J Pharmacol. 1994; 112(1):43-8.
16. Vasan RS, Beiser A, D'Agostino RB, Levy D, Selhub J, Jacques PF, et al. Plasma homocysteine and risk for congestive heart failure in adults without prior myocardial infarction. JAMA. 2003; 289:1251–7
17. Herrmann M, Kindermann I, Muller S, Thomas G, Kindermann M, Böhm M, et al. Relationship of plasma homocysteine with the severity of chronic heart failure. Clin Chem 2005;51:1512–5.
18. Böger RH, Lentz SR, Bode-Böger SM, Knapp HR, Haynes WG. Elevation of asymmetric dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inemia in humans. Clin Sci 2001; 100: 161-67.

19. Jonasson TF, Hedner T, Hultberg B, Ohlin H. Hyperhomocysteinaemia is not associated with increased levels of asymmetric dimethylarginine in patients with ischaemic heart disease. *Eur J Clin Invest.* 2003;33(7):543-9
20. Chang L, Xu JX, Zhao J, Pang YZ, Tang CS, Qi YF. Taurine antagonized oxidative stress injury induced by homocysteine in rat vascular smooth muscle cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2004 ;25(3):341-6.
21. Erdamar H, Türközkan N, Ekremoğlu M, Kurt Y, Yaman H. The effect of taurine on polymorphonuclear leukocyte functions in endotoxemia. *Amino Acids.* 2007;33(4):581-5.
22. Prince SA, Wilson LM. Editors. *Pathophysiology Clinical Concepts of Disease Processes.* 6th ed. Missouri: Mosby; 2003.
23. Galin JI, Goldstein IM, Synderman R. Editors. *Inflammation Basic Principles and Clinical Correlates.* 2nd ed. New York: Raven Press; 1992
24. Ren JL, Pan JS, Lu YP, Sun P, Han J. Inflammatory signaling and cellular senescence. *Cell Signal.* 2009;21(3):378-83.
25. Ribatti D, Levi-Schaffer F, Kovanen PT. Inflammatory angiogenesis in atherogenesis--a double-edged sword. *Ann Med.* 2008;40(8):606-21.
26. Rather LJ. Disturbance of function (functio laesa): the legendary fifth cardinal sign of inflammation, added by Galen to the four cardinal signs of Celsus. *Bull N Y Acad Med.* 1971; 47(3): 303–322.
27. Frostegard J, Haegerstrand A, Gidlund M and Nilsson J. Biologically modified LDL increases the adhesive properties of endothelial cells. *Atherosclerosis* 1991; 90: 119-126.
28. Khawaja FJ, Iftikhar JK. Novel markers of peripheral arterial disease. *Vasc Med* 2009; 14 (4):381-92.
29. Athyros VG, Kakafika AI, Karagiannis A, Mikhailidis DP. Do we need to consider inflammatory markers when we treat atherosclerotic disease? *Atherosclerosis.* 2008 ;200(1):1-12.
30. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease application to clinical and

- public health practice. A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 2003;107:499–511.
31. Plutzky J. Inflammatory pathways in atherosclerosis and acute coronary syndromes. *Am J Cardiol.* 2001; 88(8A):10K-15K.
 32. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J.* 1999;138(5 Pt 2):419-20.
 33. Zwaka TP, Hombach V, Torzewski J. C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation* 2001;103:1194–7.
 34. Nordestgaard BG, Zacho J. Lipids, atherosclerosis and CVD risk: Is CRP an innocent bystander? *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 2009; 19: 521-524
 35. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000 407: 233-241.
 36. Zhang C, Walker LM, Mayeux PR. Role of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced oxidant stress in the rat kidney. *Biochem Pharmacol.* 2000;59(2):203-9.
 37. Nieminen MS, Mattila K, Valtonen V. Infection and inflammation as risk factors for myocardial infarction. *Eur Heart J* 1993;14:7-12.
 38. Hagiwara S, Iwasaka H, Matumoto S, Hidaka S, Noguchi T. Effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor on the inflammatory response in in vivo and in vitro models. *Crit Care Med.* 2009;37(2):626-33.
 39. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(1):142-201.
 40. Warren BJ. Editor. *The endothelium.* 1st ed. New York: Wiley-Liss; 1990.
 41. Torun E, Bayram F. Endokrin Bir Organ Olarak Endotel Ve Endotelinin Hipertansiyondaki Rolü. *Erciyes Tıp Dergisi (Erciyes Medical Journal)* 2004; 26 (3): 126-131

42. Lüscher TF, Noll G. The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator. *Atherosclerosis*. 1995;118:81-90.
43. Gryglewski RJ, Botting RM, Vane JR. Mediators produced by the endothelial cell. *Hypertension*. 1988;12(6):530-48.
44. Fleming I, Buse R. NO: the Primary EDRF. *Mol Cell Cardiol*. 1999;31: 5–14
45. Abraham D, Dashwood M. Endothelin--role in vascular disease. *Rheumatology (Oxford)*. 2008 ;47(5):23-4.
46. Imig JD. ACE Inhibition and Bradykinin-Mediated Renal Vascular Responses: EDHF involvement. *Hypertension* 2004;43:533-535
47. Gryglewski RJ. Prostacyclin among prostanoids. *Pharmacol Rep*. 2008;60(1):3-11.
48. Mizutani T, Layon AJ. Clinical applications of nitric oxide. *Chest*. 1996;110(2):506-24.
49. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(24):9265-9.
50. Biliar TR. Nitric oxide. Novel biology with clinical relevance. *Ann Surg*. 1995;221(4):339-49.
51. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288:273-276.
52. Koshland DE Jr. The molecule of the year. *Science* 1992; 258(5090):1861.
53. Jensen FB. The role of nitrite in nitric oxide homeostasis: A comparative perspective. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009; 1787: 841–848
54. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem*. 1993;268(17):12231-4.

55. Janssens SP, Shimouchi A, Quertermous T, et al. Cloning and expression of cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1992; 267:14519-14522.
56. Geller DA, Lowenstein CJ, Shapiro RA, et al. Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:3491-3495.
57. Tran CTL, Leiper JM, Vallance P. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atherosclerosis Supplements* 2003; 4: 33–40
58. Lambert LE, French JF, Whitten JP, et al. Characterization of cell selectivity of two novel inhibitors of nitric oxide synthesis. *Eur J Pharmacol* 1992; 216:131-34
59. Lambert LE, Whitten JP, Baron BM, et al. Nitric oxide synthesis in the CNS, endothelium and macrophages differs in its sensitivity to inhibition by arginine analogues. *Life Sci.* 1990; 48:69-75
60. Carlström M, Brown RD, Edlund J, Sällström J, Larsson E, Teerlink T, Palm F, Wåhlin N, Persson AE. Role of nitric oxide deficiency in the development of hypertension in hydronephrotic animals. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008 ;294(2):362-70
61. Cervenka L, Kramer HJ, Malý J, Heller J. Hypertension. Role of nNOS in regulation of renal function in angiotensin II-induced hypertension. 2001;38(2):280-5.
62. Abe K, Abe Y, Saito H. Agmatine suppresses nitric oxide production in microglia. *Brain Res.* 2000;872(1-2):141-8.
63. Furuichi M, Yokozuka M, Takemori K, Yamanashi Y, Sakamoto A. The reciprocal relationship between heme oxygenase and nitric oxide synthase in the organs of lipopolysaccharide-treated rodents. *Biomed Res.* 2009;30(4):235-43.
64. Ozkan Y, Firat H, Simşek B, Torun M, Yardim-Akaydin S. Circulating nitric oxide (NO), asymmetric dimethylarginine (ADMA), homocysteine, and oxidative status in obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome (OSAHS). *Sleep Breath.* 2008;12(2):149-54.

65. Wennmalm A, Benthin G, Edlund A, Jungersten L, Kieler-Jensen N, Lundin S, Westfelt UN, Petersson AS, Waagstein F. Metabolism and excretion of nitric oxide in humans. An experimental and clinical study. *Circ Res.* 1993;73(6):1121-7.
66. Ignarro LJ. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol.* 2002;53(4 Pt 1):503-14.
67. Schmidt HH, Lohmann SM, Walter U. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta.* 1993;1178(2):153-75.
68. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev.* 2001;53(1):135-59.
69. Violi F, Marino R, Milite MT, Loffredo L. Nitric Oxide and its Role in Lipid Peroxidation. *Diabetes Metab Res Rev.* 1999;15(4):283-8.
70. Thiernemann C. Nitric Oxide and Septic Shock. *Gen. Pharmac.* 1997; 9(2):159-166
71. Böger RH, Maas R, Schulze F, Schwedhelm E. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a prospective marker of cardiovascular disease and mortality—An update on patient populations with a wide range of cardiovascular risk. *Pharmacol Res.* 2009;60(6):481-7.
72. Pope AJ, Karupiah K, Cardounel AJ. Role of the PRMT-DDAH-ADMA axis in the regulation of endothelial nitric oxide production. *Pharmacol Res.* 2009;60(6):461-5.
73. Teerlink T, Luo Z, Palm F, Wilcox CS. Cellular ADMA: Regulation and action. *Pharmacol Res.* 2009;60(6):448-60
74. Vallance P, Leiper J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine: dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(6):1023–30.

75. Khan U, Hassan A, Vallance P, Markus HS. Asymmetric dimethylarginine in cerebral small vessel disease. *Stroke*. 2007;38(2):411-3.
76. Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Occurrence of a new enzyme catalyzing the direct conversion of NG,NG-dimethyl-L-arginine to L-citrulline in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987;148(2):671-7.
77. Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, MacAllister R, Vallance P. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(8):1455-9.
78. Landim MB, Casella Filho A, Chagas AC. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and endothelial dysfunction: implications for atherogenesis. *Clinics (Sao Paulo)*. 2009;64(5):471-8.
79. Palm F, Onozato ML, Luo Z, Wilcox CS. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 293:3227-3245
80. Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Purification and properties of a new enzyme, NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. *J Biol Chem* 1989;264:10205–9.
81. Hundal HS, Taylor PM. Amino acid transceptors: gate keepers of nutrient exchange and regulators of nutrient signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296(4):E603-13
82. Devés R, Boyd CA. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiol Rev*. 1998;78(2):487-545.
83. Closs EI, Boissel JP, Habermeier A, Rotmann A. Structure and function of cationic amino acid transporters (CATs). *J Membr Biol* 2006;213:67–77

84. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992;339:572–5.
85. Wang J, Sim AS, Wang XL, Salonikas C, Naidoo D, Wilcken DE. Relations between plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) and risk factors for coronary disease. *Atherosclerosis*. 2006;184(2):383-8.
86. Zoccali C, Bode-Boger SM, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino LS, et al. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet* 2001;358:2113–7.
87. Vallance P, Leiper J. Asymmetric dimethylarginine and kidney disease—marker or mediator? *J Am Soc Nephrol* 2005;16:2254–6.
88. Schulze F, Lenzen H, Hanefeld C, Bartling A, Osterziel KJ, Goudeva L, Schmidt-Lucke C, Kusus M, Maas R, Schwedhelm E, Strödtter D, Simon BC, Mügge A, Daniel WG, Tillmanns H, Maisch B, Streichert T, Böger RH. Asymmetric dimethylarginine is an independent risk factor for coronary heart disease: results from the multicenter Coronary Artery Risk Determination investigating the Influence of ADMA Concentration (CARDIAC) study. *Am Heart J*. 2006;152(3):493.e1-8.
89. Walker HA, McGing E, Fisher I, Böger RH, Bode-Böger SM, Jackson G et al. Endothelium-dependent vasodilation is independent of the plasma L-arginine/ADMA ratio in men with stable angina: lack of effect of oral L-arginine on endothelial function, oxidative stress and exercise performance. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38:499–505.
90. Kielstein JT, Fliser D, Veldink H. Asymmetric dimethylarginine and symmetric dimethylarginine: axis of evil or useful alliance? *Semin Dial*. 2009;22(4):346-50.
91. Schepers E, Glorieux G, Dhondt A, Leybaert L, Vanholder R. Role of symmetric dimethylarginine in vascular damage by increasing ROS via store-operated calcium influx in monocytes. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24: 1429–1435

92. Korandji C, Zeller M, Guillard JC, Vergely C, Sicard P, Duvillard L, Gambert P, Moreau D, Cottin Y, Rochette L. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and hyperhomocysteinemia in patients with acute myocardial infarction. *Clin Biochem*. 2007;40(1-2):66-72.
93. Cynober LA. Plasma amino acid levels with a note on membrane transport: characteristics, regulation, and metabolic significance. *Nutrition*. 2002;18(9):761-6.
94. Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr*. 1999;19:217-46.
95. Tyagi N, Sedoris KC, Steed M, Ovechkin AV, Moshal KS, Tyagi SC. Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(6):H2649-56.
96. Dayal S, Lentz SR. ADMA and hyperhomocysteinemia. *Vasc Med*. 2005;10(1):S27-33.
97. Lentz SR, Haynes WG. Homocysteine: is it a clinically important cardiovascular risk factor? *Cleve Clin J Med* 2004; 71(9):729-34.
98. Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA* 2002; 288:2015–2022.
99. Doshi S, McDowell I, Goodfellow J, Stabler S, Boger R, Allen R, Newcombe R, Lewis M, Moat S. Relationship between S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, asymmetric dimethylarginine, and endothelial function in healthy human subjects during experimental hyper- and hypohomocysteinemia. *Metabolism*. 2005;54(3):351-60.
100. Wanby P, Brattström L, Brudin L, Hultberg B, Teerlink T. Asymmetric dimethylarginine and total homocysteine in plasma after oral methionine loading. *Scand J Clin Lab Invest*. 2003;63(5):347-53.
101. Böger RH, Bode-Böger SM, Sydow K, Heistad DD, Lentz SR. Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with

- hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 1557-64.
- 102.Böger RH, Sydow K, Borlak J et al. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res* 2000; 87: 99-105.
 - 103.Stühlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, Cooke JP. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2001;104:2569-75
 - 104.Böger RH, Lentz SR, Bode-Böger SM, Knapp HR, Haynes WG. Elevation of asymmetrical dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inaemia in humans. *Clin Sci (Lond).* 2001;100(2):161-7.
 - 105.Bode-Böger SM, Scalera F, Martens-Lobenhoffer J. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) accelerates cell senescence. *Vasc Med.* 2005;10(1):65-71
 - 106.Xu D, Neville R, Finkel T. Homocysteine accelerates endothelial cell senescence. *FEBS Lett.* 2000;470(1):20-4.
 - 107.Scalera F, Martens-Lobenhoffer J, Träger M, Bukowska A, Lendeckel U, Bode-Böger SM. Effect of L-arginine on asymmetric dimethylarginine (ADMA) or homocysteine-accelerated endothelial cell aging. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;345(3):1075-82.
 - 108.Timothy C, Birdsall ND. Therapeutic Applications of Taurine *Alt Med Rev* 1998;3(2):128-136
 - 109.Oja SS, Saransaari P. Pharmacology of taurine. *Proc West Pharmacol Soc.* 2007;50:8-15
 - 110.Xu YJ, Arneja AS, Tappia PS, Dhalla NS. The potential health benefits of taurine in cardiovascular disease. *Exp Clin Cardiol.* 2008;13(2):57-65.
 - 111.Sturman JA. Taurine in development. *Physiol Rev.*1993;73(1):119-47.

112. Wu QD, Wang JH, Fennessy F, Redmond HP, Bouchier-Hayes D. Taurine prevents high-glucose-induced human vascular endothelial cell apoptosis. *Am J Physiol.* 1999;277(6 Pt 1):C1229-38.
113. Schaffer SW, Azuma J, Mozaffari M. Role of antioxidant activity of taurine in diabetes. *Can J Physiol Pharmacol.* 2009;87(2):91-9.
114. Chen, Y. X. Protective action of taurine on ischemia-reperfusion liver injury in rats and its mechanism. *Chin. Med. J. (Engl.)* 1993 ; 73:276–279.
115. Cantin AM Taurine modulation of hypochlorous acid-induced lung epithelial cell injury in vitro: role of anion transport. *J. Clin. Invest.* 1994; 93: 606–614.
116. Watson, RWG, Redmond HP, Bouchier-Hayes D. Taurine up-regulates anti-microbial function of human inflammatory cells through a calcium-dependent mechanism. *Surg. Forum* 1994; 80: 679–681.
117. Wang, J. H., H. P. Redmond, R. W. G. Watson, C. Condrón, and D. Bouchier-Hayes. The beneficial effect of taurine on the prevention of human endothelial cell death. *Shock* 1996; 6: 331–338.
118. Allo SN, Bagby L, Schaffer SW. Taurine depletion, a novel mechanism for cardioprotection from regional ischemia. *Am J Physiol.* 1997;273(4 Pt 2):H1956-61.
119. Takatani T, Takahashi K, Uozumi Y, Shikata E, Yamamoto Y, Ito T, Matsuda T, Schaffer SW, Fujio Y, Azuma J. Taurine inhibits apoptosis by preventing formation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287(4):C949-53.
120. Parildar H, Dogru-Abbasoglu S, Mehmetcik G, Ozdemirler G, Koçak-Toker N, Uysal M. Lipid peroxidation potential and antioxidants in the heart tissue of beta-alanine- or taurine-treated old rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2008;54(1):61-5.
121. Balkan J, Oztezcan S, Hatipoglu A, Cevikbas U, Aykac-Toker G, Uysal M. Effect of a taurine treatment on the regression of existing

- atherosclerotic lesions in rabbits fed on a high-cholesterol diet. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2004 May;68(5):1035-9.
- 122.Fennessy, F.M., Mo neley, D.S., Wang, J.H., Kelly, C.J., Bouchier-Hayes, D.J.Taurine and vitamin C modify monocyte and endothelial dysfunction in young smoker. *Circulation* 2003; 107:410–415.
 - 123.Hultman K, Alexanderson C, Manneras L, Sandberg M, Holmäng A, Jansson T. Maternal taurine supplementation in the late pregnant rat stimulates postnatal growth and induces obesity and insulin resistance in adult offspring. *J Physiol* 2007;579:823-33.
 - 124.Bachetti T, Comini L, Francolini G, Bastianon D, Valetti B, Cadei M, Grigolato P, Suzuki H, Finazzi D, Albertini A, Curello S, Ferrari R. Arginase pathway in human endothelial cells in pathophysiological conditions. *J Mol Cell Cardiol.* 2004;37(2):515-23.
 125. Ji Y, Han Y, Diao J, Huang Y, Chen Q, Ferro A. Inhibition of endothelial nitric oxide generation by low-density lipoprotein is partially prevented by L-arginine and L-ascorbate. *Atherosclerosis.* 2004;176(2):345-53.
 - 126.Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982;126(1):131-8.
 - 127.Bories PN, Bories C. Nitrate determination in biological fluids by an enzymatic one-step assay with nitrate reductase. *Clin Chem.* 1995;41(6 Pt 1):904-7
 - 128.Chen BM, Xia LW, Zhao RQ. Determination of N(G),N(G)-dimethylarginine in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1997 ;692(2): 467-71.
 - 129.Principle of the method. [online]. 2009 [cited 2009 Dec 03]. Available from: URL: <http://www.immuchrom.de/>

130. Araki A, Sako Y. Determination of free and total homocysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr* 1987;422:43-52.
131. Kirkebøen KA, Strand OA. The role of nitric oxide in sepsis--an overview. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1999;43(3):275-88.
132. Balabanli B, Erdamar H, Türközkan N, Yaman H, Kurt Y. Effect of taurine on endotoxin-induced alterations in plasma asymmetric dimethylarginine, L-arginine and nitric oxide in guinea pigs. *J Thromb Thrombolysis*. 2007;24(1):53-7.
133. Upchurch GR Jr, Welch GN, Fabian AJ, Pigazzi A, Keaney JF Jr, and Loscalzo J. Stimulation of endothelial nitric oxide production by homocyst(e)ine. *Atherosclerosis* 1997; 132: 177–185.
134. Zhang X, Li H, Jin H, Ebin Z, Brodsky S, and Goligorsky MS. Effects of homocysteine on endothelial nitric oxide production. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279: F671–F678.
135. Heydrick SJ, Weiss N, Thomas SR, Cap AP, Pimentel DR, Loscalzo J, Keaney JF Jr. L-Homocysteine and L-homocystine stereospecifically induce endothelial nitric oxide synthase-dependent lipid peroxidation in endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2004;36(5):632-40.
136. Tsikas D. Analysis of the L-arginine/Nitric Oxide Pathway: The Unique role of Mass Spectrometry. *Current Pharmaceutical Analysis* 2005;1(1): 15-30
137. Bruins MJ, Soeters PB, Lamers WH, Meijer AJ, Deutz NE. L-arginine supplementation in hyperdynamic endotoxemic pigs: effect on nitric oxide synthesis by the different organs. *Crit Care Med*. 2002; 30(3):508-17.
138. Luiking YC, Hallemesch MM, Vissers YL, Lamers WH, Deutz NE. In vivo whole body and organ arginine metabolism during endotoxemia (sepsis) is dependent on mouse strain and gender. *J Nutr*. 2004;134(10):2768S-2774S

- 139.Venardos K, Zhang WZ, Lang C, Kaye DM. Effect of peroxynitrite on endothelial L-arginine transport and metabolism. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(12):2522-7.
- 140.Wu G, Morris SM Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J.* 1998;336(1):1-17.
- 141.Scalera F, Closs EI, Flick E, Martens-Lobenhoffer J, Boissel JP, Lendeckel U, Heimburg A, Bode-Böger SM. Paradoxical effect of L-arginine: acceleration of endothelial cell senescence. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;386(4):650-5.
- 142.Böger RH. The pharmacodynamics of L-arginine. *J Nutr.* 2007;137(6 Suppl 2):1650S-1655S.
- 143.Fennessy F, Smith G, Kelly C, Bouchier-Hayes DJ: Taurine restores endothelial-dependent but not independent dysfunction in young smokers. *Br J Surg* 1998;85:1582
- 144.Ekremoğlu M, Türközkan N, Erdamar H, Kurt Y, Yaman H. Protective effect of taurine on respiratory burst activity of polymorphonuclear leukocytes in endotoxemia. *Amino Acids.* 2007;32(3):413-7.

10. ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Kayseri’de doğdum. İlk ve Orta öğrenimimi TED Ankara Koleji Vakfı Özel İlköğretim Okulu ve Lisesi’nde 2004 yılında bitirdim. Aynı yıl Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’ne girdim. 2008 yılında mezun oldum. 2008 yılı Güz döneminde Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Tıp) yüksek lisans programına başladım. 2009’da Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’ne Araştırma Görevlisi olarak atandım. Aynı yerde görevimi sürdürmekteyim. Yabancı dilim İngilizce’dir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım süresince bilgi ve deneyimiyle her zaman yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Prof.Dr.Nurten Türközkan'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Eğitimim boyunca bilgi ve yardımlarından faydalandığım Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki bütün hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim. Tez çalışmalarım sırasında değerli katkı ve yardımlarından dolayı Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr.Mustafa Ark'a, Arş.Gör.Aysun Özdemir'e, GATA Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Doç.Dr.Halil Yaman'a, Yrd.Doç.Dr.Yasemin Kurt'a ve Arş.Gör.Dr.Mehmet Ağıllı'ya teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemi sağlayan, koşulsuz destek ve sevgileriyle her konuda yanımda olan annem Prof.Dr.Hatice Paşaoğlu ve babam Prof.Dr.Aydın Paşaoğlu'na sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Arş.Gör.Özge Tuğçe PAŞAOĞLU
ANKARA 2010