T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GEBELİK DÖNEMİNDE SERUM METİLARJİNİN SEVİYELERİNİN SIVI KROMATOGRAFİ-TANDEM KÜTLE SPEKTROMETRE(LC-MS/MS) METODU İLE BELİRLENMESİ

Hatice Banu KESKİNKAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Sedat ABUŞOĞLU

KONYA-2018

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GEBELİK DÖNEMİNDE SERUM METİLARJİNİN SEVİYELERİNİN SIVI KROMATOGRAFİ-TANDEM KÜTLE SPEKTROMETRE(LC-MS/MS) METODU İLE BELİRLENMESİ

Hatice Banu KESKİNKAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman

Doç. Dr. Sedat ABUŞOĞLU

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 16202040 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2018

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Bölümü Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Sedat ABUŞOĞLU yönetiminde hazırlanarak, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsüne Yüksek lisans tezi olarak sunulmuştur.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana olan desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ali Ünlü'ye teşekkürlerimi sunarım.

Bilimsel hayata esas anlamda adım atmamı sağlayan ve bilgisini, tecrübelerini, yardımlarını asla benden esirgemeyen, deneyimlerini, fikirlerini benimle paylaşmasının yanı sıra her aşamada bana en büyük destek olan, bilimsel çalışmanın zevkli yanlarını da keşfetmeme yardımcı olan ve bundan sonra da fikirlerine yaşantımın her anında ihtiyaç duyacağım danışman hocam Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Sedat ABUŞOĞLU' na gönülden teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, insani, manevi ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, tecrübeleri, yol göstericiliği ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı bölümümüz hocalarından Doç. Dr. Hüsamettin VATANSEV'e eğitim sürecimdeki tüm katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Bölümümüz hocalarından Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK ve Doç. Dr. Esma MENEVŞE'ye, her zaman sağladığı motivasyon ve hoşgörüden dolayı sayın Doç. Dr. Abdullah SİVRİKAYA'ya teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım sırasında beni maddi açıdan destekleyen S.Ü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü yöneticilerine teşekkürü bir borç bilirim.

Araştırmalarım sırasında çalışma ortamını paylaşmaktan keyif aldığım değerli çalışma arkadaşlarım Mehmet YILDIRIMEL ve Oğuzhan TOK'a ayrıca yardımları ve desteklerinden dolayı tüm Biyokimya laboratuvarı çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

En önemlisi sonsuz ve koşulsuz sevgilerini, emeklerini, sabırlarını, desteklerini ve ellerinden gelen tüm imkanları benden esirgemeyen ve yaşantımdaki her aşamada payları yadsınamayacak kadar büyük olan değerli aileme sonsuz bir teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR ..... **iv**

İÇİNDEKİLER ..... **v**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **viii**

ÖZET ..... **xii**

SUMMARY ..... **xiii**

ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **xv**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xvii**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Arjinin 3

1.1.1. Arjinin Metabolizması 5

1.1.1.1.L- Arginin Paradoksu 6

1.1.2. Arjinin ve Nitrik Oksit 7

1.1.2.1 Nitrik Oksit Görevleri 8

1.1.2.2. Nitrik Oksit Etki Mekanizması 9

1.1.2.3. Nitrik Oksit İle İlişkili Hastalıklar 11

1.1.2.4. Nitrik Oksit Sentaz (NOS) Görevleri 11

1.2. Metilarjininler 12

1.2.1. Genel Bilgi 13

1.2.1.1. Metilarjinin Oluşumu ve Çeşitleri 13

1.2.2. Asimetrik Dimetil Arjinin (ADMA) 16

1.2.2.1. Tanım ve Tarihçe 16

1.2.2.2. ADMA ve Yapısal Özellikleri 16

1.2.2.3. ADMA Sentezi 17

1.2.2.4. ADMA Yıkımı 19

1.2.2.5. Endotel Disfonksiyonu ve ADMA 20

1.2.2.6. ADMA ve Nitrik Oksit İlişkisi 21

1.2.3. L-Homoarjinin 22

1.2.3.1. Tanım ve Tarihçe 24

1.2.3.2. Homoarjinin Yapısal Özellikleri 24

1.2.3.3. Homoarjinin Yıkım ve Sentezi....26
1.3. Gebelik Dönemi Hakkında Genel Bilgi....27
1.3.1. Riskli Gebelikler....29
1.3.2. Gebelik Döneminde İkili Tarama Testi....31
1.3.2.1. Serbest Beta hCG (f β-hCG)....32
1.3.2.2. Pregnancy Associated Plasma Protein-A (PAPP-A)....32
1.3.3. Gebelik Döneminde Dörtlü Tarama Testi....33
1.3.3.1. İnhibin A....34
1.3.3.3. Beta hCG....35
1.3.3.4. Unkonjuge Estriol (uE3)....36
1.3.4. ADMA ve Gebelik İlişkisi....36

2. GEREÇ VE YÖNTEM....38

2.1. Gereç....38
2.1.1. Çalışma Şekli ve Olgu Seçimi....38
2.1.2. Örneklerin Toplanması ve Saklanması....39
2.1.3. Kullanılan Reaktif ve Çözeltiler....39
2.1.4. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler....40

2.2. Yöntem....41
2.2.1. LC-MS/MS Metoduyla ADMA, Homoarjinin ve Arjinin Analizi....41
2.2.1.1. Mobil Faz A' nın Hazırlanması....42
2.2.1.2. Mobil Faz B'nin Hazırlanması....42
2.2.1.3. Mobil .Fazların .Filtrasyonu .ve .Degaze .Edilmesi....42
2.2.1.4. ADMA Standart Hazırlanması....42
2.2.1.5. Arjinin Standart Hazırlanması....43
2.2.1.6. Homoarjinin Standart Hazırlanması....43
2.2.1.7.Türevleştirici Reaktif Hazırlanması....43
2.2.1.8. Çözdürücü Reaktif Hazırlanması....43
2.2.1.9. Numune Hazırlanması ve Ölçümü....44
2.2.1.10. ADMA Ölçümü İçin LC-MS/MS Değerleri....46
2.2.1.11. Homoarjinin Ölçümü İçin LC-MS/MS Değerleri....46
2.2.2. İstatistiksel Analiz....47

3. BULGULAR……...48

3.1. ADMA'nın Analiz Sonuçları.....48
3.2. Homoarjinin'in Analiz Sonuçları.....53
3.3. İstatiksel Analiz Sonuçları.....55
3.3.1. Demografik Verilerin ve Biyokimyasal Ölçümlerin Karşılaştırılması.....56
3.3.1.1.Gruplara Ait Serum İnhibin A, HCG, PAPP-A, f β-Hcg, AFP ve uE_3 Düzeyleri…….....58
3.3.1.2.Gruplara Ait Serum Homoarjinin Düzeyleri 59
3.3.1.3.Gruplara Ait Serum ADMA Düzeyleri 60
3.3.1.4. Gruplara Ait Serum SDMA, LNMMA, Arjinin, Sitrülin, Arg/ADMA, SDMA/ADMA, HArg/ADMA ve Total Metilarjinin Düzeyleri…. 61

4. TARTIŞMA.....78

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....86

5.1. Sonuçlar.....86
5.2. Öneriler.....86

KAYNAKLAR.....88

EKLER.....95

EK-A: Etik Kurul Kararı……..95
EK-B: Laboratuvarımızda bulunan LC-MS/MS cihazından metillarjininlere ait örnek bir kromatogram……..96
EK-C: LC-MS/MS cihazıyla analiz edilen Homoarjinin pikine ait örnek bir kromatogram (Homoarjinin 5µmol/L lik standartı)……97
EK-D : Tezden üretilmiş yayınlar.....98

ÖZGEÇMİŞ.....99

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	Santigrat derece
Ca^{+2}	Kalsiyum
HCl	Hidroklorik asit
IU/ml	International unıt per mililitre
mIu/ml	Miliinternational unıt per mililitre
Na^{+2}	Sodyum
ng/ml	Nanogram per mililitre
NO_3	Nitrat
O^2	Oksijen
pg/ml	Pikogram per mililitre
rpm	Revolution per minute
mm	Milimetre
ml	Mililitre
ml/dk	Mlililitre per dakika
µM	Mikromolar
µmol/L	Mikromol per litre

Kısaltmalar

ADMA	Asimetrik dimetil arjinin
AFP	Alfafetoprotein
AGAT	Arjinin glisin amidinotransferaz
AGXT2	Alanin glioksilat aminotransferaz
CAD	Collision Gas
CATs	Katyonik aminoasit taşıyıcı
CAAs	Katyonik aminoasitler
cGMP	Siklik guanidin monofosfat
CE	Collision energy
CXP	Collision Cell Exit Potential
DAG	1,2 – diaçil gliserol
DDAH	Dimetilarjinin dimetilaminohidrolaz
DMGV	Dimetil guanido valerik asit
DP	Declustering potential
DS	Down sendromu
EDRF	Endothelium derived relaxing factor
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentaz
EP	Entrance potential
ER	Endoplazmik retikulum
ESI	Elektrosprey Ionisation
Free β-HCG	Serbest beta human chorionic hormone
FSH	Folikül stimüle edici hormon
GS1	Ion source gas 1
GS2	Ion source gas 2
HArg	Homoarjinin
HPLC	High performance liquid chromatography
IGF	Insülin-like growth factor
IGFBF	Insülin-like growth factor binding protein-4
IP3	Fosfatidil inositol 1,4,5 trifosfat

IS	Ionspray Voltage
iNOS	İndüklenebilir Nitrik oksit sentaz
Km	Michaelis-Menten constant
LC-MS/MS	Sıvı Kromatografi-TandemKütleSpektrometre
LDL	Low-dansity lipoprotein
LH	Lüteinleştirici hormon
L-NMMA	N-monometil-L-arjinin
MI	Miyokardial İnfarktüs
MMA	Monometilarjinin
MoM	Multiples of Median
MW	Molekül ağırlığı
NG	Normal gebelik
nNOS	Nöronal Nitrik oksit sentaz
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
NTD	Nöral tüp defekti
PAPP-A	Pregnancy- associated plasma protein A
PRMT	Protein arjinin metil transferaz
PIP2	Fosfatidil inositol bifosfat
RAR	Retinoid a reseptör
SAH	S-adenozil homosistein
SAM	S-adenozil metionin
SDMA	Simetrik dimetil arjinin
T_2DM	Tip 2 Diabetes mellitus
TSH	Tiroid stimüle edici hormon
TEM	Temperature
UE3	Unkonjuge estradiol

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GEBELİK DÖNEMİNDE SERUM METİLARJİNİN SEVİYELERİNİN SIVI KROMATOGRAFİ-TANDEM KÜTLE SPEKTROMETRE (LC-MS/MS) METODU İLE BELİRLENMESİ

Hatice Banu KESKİNKAYA

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ/KONYA-2018

Asimetrik dimetil arjinin (ADMA) klinik tanıda değerlendirilmek maksadıyla üzerinde araştırmaların devam ettiği, metillenmiş bir arjinin türevidir. ADMA, Nitrik Oksit (NO) sentezini bloke ederek vazospazma ve endotel disfonksiyonuna sebebiyet vermekte ve gebelik döneminde preeklampsi oluşumu ile ilgili risk faktörü olarak kabul edilmektedir Homoarjinin, arjininin homoloğudur ve arjininle yarışarak NOS'ın subsratı olarak görev yapar. Fakat NO üretiminde arjininden daha az etkilidir.

Gebelikte erken dönemde ADMA düzeyi yüksek olan kadınlarda ADMA seviyeleri ile endotelyal disfonksiyon arasında ilişki vardır. Gebelik döneminde ADMA seviyesinin ve diğer metilarjinin seviyelerinin nasıl değişkenlik gösterdiği, hastalıkların patogenezini anlamak ve bunları tedavi ile ilişkilendirmek, yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesi ve hatta hastalıklar oluşmadan sağlıklı kişilerin risk faktörlerinin elimine edilmesi açısından son derece önemlidir. Bu sebeple çalışmamızda ikili ve dörtlü test istemi yapılan gebe katılımcıların serumlarında metilarjinin seviyelerini belirleyebilmeyi amaçladık.

Çalışmaya, toplam 200 gebe kadın dahil edildi. Bu katılımcılar 4'lü test istemi yapılan kontrol grubu (n=50), 4'lü test istemi yapılan riskli grup (n=50), 2'li test istemi yapılan kontrol grubu(n=50) ve 2'li test istemi yapılan riskli grup(n=50) olacak şekilde dört gruba ayrıldı. Her gruba ait serum metilarjinin ve bazı biyokimya testlerinin seviyeleri ölçüldü.

Dörtlü ve ikili test istemi yapılan riskli gruplardaki bireylerde serum homoarjinin seviyeleri bu grupların kontrollerine göre anlamlı derecede düşüktü. (sırasıyla p=0.001, p= 0.001) ve en düşük homoarjinin seviyelerinin ikili test istemi yapılan riskli gruba [0.91(0.45- 2.71)] ait olduğu görüldü. Gruplarda HArg seviyeleri yaş parametresi ($r= -0.295^{**}$, p=0.000) ve serum İnhibin-A seviyeleri ile($r= -0.288^{**}$, p=0.005) güçlü negatif bir korelasyon gösterirken ,serum ADMA seviyeleri ($r= 0.309^{**}$,

p=0.000) ile güçlü pozitif bir korelasyon gösterdi. Ayrıca arjinin (r= 0.471**, p=0.000) ve total metilarjininler (r= 0.476**, p=0.000) ile de arasında güçlü pozitif bir korelasyon söz konusuydu.

Dörtlü test istemi yapılan kontrol grubunda serum ADMA seviyeleri [0.13(0.02- 0.44)], dörtlü test istemi yapılan riskli gruba [0.06(0.02- 0.17)] ve ikili test istemi yapılan riskli gruba [0.09(0.03-0.24)] göre sırasıyla anlamlı derecede yüksek bulundu (p= 0.000, p= 0.038). İkili test istemi yapılan kontrol grubunda riskli gruptan daha yüksek serum ADMA düzeyleri bulunmasına rağmen aradaki fark istatiksel olarak anlamlı değildi (p= 0.080). Tüm gruplar arasında en yüksek ADMA seviyelerinin dörtlü test istemi yapılan kontrol grubuna ait olduğu görüldü [0.13(0.02- 0.44)]. Serum ADMA seviyeleri serum İnhibin-A seviyeleri (r= -0.352**, p=0.001) ile güçlü negatif bir korelasyon gösterirken, serum HCG seviyeleri (r= -0.261**, p=0.012) zayıf negatif bir korelasyon gösterdi.

Normal gebelik sırasında düşük serum maternal ADMA ve L-arjinin konsantrasyonu gibi gebelikle ilgili metabolik değişikliklerin endotel fonksiyonu düzenleyemeyebileceği düşünmekteyiz. Preeklampsi dışında serum ADMA düzeyi iyi bir belirteç olarak kullanılamayabilir. Homoarjinin serum seviyelerinin gebe kadınlardaki düzeyleri açısından literatürde bir boşluk olduğu görülmektedir. Gebelikte yüksek risk altındaki kadınların erken dönemde belirlenmesinde homoarjinin yeni bir risk markırı olarak ortaya çıkabilir.

Anahtar Sözcükler: Asimetrik dimetilarjinin; gebelik; homoarjinin; metilarjinin; nitrik oksit.

SUMMARY

T.C
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

DETERMINATION OF LEVELS OF SERUM METHYLARGININE IN PREGNANCY WITH LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY (LC-MS / MS)

Hatice Banu KESKİNKAYA

Department Of Medical Biochemistry

MASTER THESIS/KONYA-2018

Asymmetric dimethyl arginine (ADMA) is a derivative of a methylated arginine that continues to be studied for use in clinical diagnosis. Nitric oxide synthase synthesizes NO from L-arginine. ADMA inhibits nitric oxide (NO) synthesis and causes vasospasm and endothelial dysfunction and it is considered as a risk factor for the occurrence of preeclampsia during pregnancy. Homo arginine is the homologous of arginine and serves as a subsrat of NOS, competing with arginine. But it is less effective than arginine in NO production.

There is a relationship between ADMA level and endothelial dysfunction in women with high ADMA levels in early stage in pregnancy. How the levels of ADMA and other methlyarginines vary during pregnancy and related diseases, to understand pathogenesis of diseases and to associate them with treatment are extremely important in terms of the development of new treatment protocols and even the elimination of risk factors for healthy persons and as a subject that needs to be investigated. Due to thıs reason we aimed to determine the levels of the methlyarginine levels in the serum of pregnant participants who were subjected to binary- quad test in our study

In this study, a total of 200 pregnancy woman were enrolled. These individuals were divided into four groups as the control group with quadruple test (n=50), high risk group with quadruple test (n=50), control group with binary test (n=50) and high risk group with binary test (n=50). In each group, serum methylarginine levels and some of biochemical tests were measured.

Serum homoarginine levels were significantly lower ($p = 0.001$, $p = 0.001$, respectively) in the subjects high risk groups with in the quadruple and binary test than in the controls of these groups and the lowest homoarginine levels were found to belong to the high risk group [0.91 (0.45-2.71)] with binary test. While serum homorgininne levels showed a strong negative relationship with parameter of age ($r= -0.295^{**}$, $p=0.000$) and serum inhibin A levels ($r= -0.288^{**}$, $p=0.005$) there was a strong positive correlation with serum ADMA levels ($r= 0.309^{**}$, $p=0.000$). There was also a strong

positive correlation between serum homoarginine and arginine levels (r= -0.352**, p=0.001) and total methylarginines levels (r= 0.476** , p= 0.000).

In the control group with quadruple test serum ADMA values [0.13(0.02- 0.44)], were significantly higher than (p= 0.000, p= 0.038, respectively) high risk group with quadruple test [0.06(0.02- 0.17)] and high risk group with binary test [0.09(0.03-0.24)]. Although there was a higher serum ADMA levels in the control group with binary test than high risk group the difference was not statistically significant (p = 0.080). The highest ADMA levels among all groups were found to belong to the control group with quadruple test [0.13 (0.02-0.44)]. While serum ADMA levels showed a strong negative correlation with serum inhibin A (r= -0.352**, p=0.001) there was weak negative correlation with serum HCG levels (r= -0.261**, p=0.012).

We think that pregnancy-related metabolic changes such as low serum maternal ADMA and L-arginine concentration during normal pregnancy may not regulate endothelial function. Serum ADMA levels other than preeclampsia may not be a good indicator. It seems that there is a gap in the literatüre regarding the serum levels of homoarginine in pregnant women. Homoarginine may emerge as a new risk marker when women at high risk are identified early stage in pregnancy.

Key Words: Asymmetric dimethylarginine; homoarginine; methylarginine; nitric oxide; pregnancy.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. ADMA düzeylerinde artış görülen patofizyolojik durumlar ve artış düzeyi……..21

Çizelge 1.2. Çeşitli klinik olgularda ADMA konsantrasyonlarının kontrol grubuna göre durumu……22

Çizelge 1.3. Down Sendromu (DS) tarama testleri ve yakalama oranları……..34

Çizelge 3.1. Non-parametrik ve parametrik dağılım gösteren parametrelerin gruplar arası karşılaştırılması……..……56

Çizelge 3.2. Yaş, AFP(IU/ml), İnh-A (pg/ml), HCG (mIU/ml), uE3 (ng/ml) parametrelerinin korelasyonu……..68

Çizelge 3.3. f β-hCG, HArg(µmol/L), ADMA(µmol/L), SDMA(µmol/L), L-NMMA (µmol/L) parametrelerinin korelasyonu……72

Çizelge 3.4. Arjinin (µmol/L), Arjinin/ADMA, SDMA/ADMA, HArg/ADMA, ve total metilarjininler (µmol/L), parametrelerinin korelasyonu……75

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Arjinin molekül yapısı……..4
Şekil 1.2. Arjininin katıldığı metabolik üre döngüsü yolağı……5
Şekil 1.3. Arjininin katıldığı metabolik yollar……..6
Şekil 1.4. L- arjinin ve metillenen arjininlerin kimyasal yapısı……...7
Şekil 1.5. L-Arjininden NOS enzimi aracılığıyla NO sentezi……..8
Şekil 1.6. Nitrik oksit işlevleri ve etki mekanizması……...9
Şekil 1.7. Nitrik oksid etki mekanizması……...10
Şekil 1.8. NO'in damarsal etkileri ……12
Şekil 1.9. Endojen metilarjininlerin yapısı…….14
Şekil 1.10. Arjininin metillenmiş formları ve sentezi……15
Şekil 1.11. ADMA Oluşumu ve Metabolizmasının Şeması……...18
Şekil 1.12. ADMA metabolizması……..19
Şekil 1.13. Homoarjinin ve Arjinin kimyasal yapıları, molekül formülleri ve moleküler ağırlıkları (MW)……23
Şekil 1.14. Üre döngüsünde L-homoarjinin(A) ve L-arjinin(B) 'nin paralel biyokimyasal reaksiyonlarının şeması……25
Şekil 1.15. Homoarjinin ve kreatin metabolizması şeması……27
Şekil 1.16. Normal gebelik ve preeklampsinin patogenezinde L-arjinin ve nitrik oksit arasındaki etkileşim……29
Şekil 2.1. Laboratuvarımızda kullandığımız API 3200 marka kütle spektrometre (LC-MS/MS) cihazı……41
Şekil 2.2. ADMA, SDMA, MMA, L-arginin ve L-homoargininin bütillenmiş formlarının yapıları ve fragmanları ve iç standartlar D_7-ADMA, $13C_6$-L-arjinin ve D_4-L-homoarjinin ……..45
Şekil 3.1. 1,5µM ADMA standart kromatogramı……...48
Şekil 3.2. 0,75µM ADMA standart kromatogramı……....48
Şekil 3.3. 0,375µM ADMA standart kromatogramı……..49
Şekil 3.4. 0,185µM ADMA standart kromatogramı……...49
Şekil 3.5. 0,0937µM ADMA standart kromatogramı…….50

Şekil 3.6. ADMA kalibrasyon grafiği……50
Şekil 3.7. L-NMMA kalibrasyon grafiği……51
Şekil 3.8. SDMA kalibrasyon grafiği……51
Şekil 3.9. Arjinin kalibrasyon grafiği……52
Şekil 3.10. Sitrülin kalibrasyon grafiği……..53
Şekil 3.11. 5µM, 2,5µM, 1,25µM, 0,625µM homoarjinin standart kromatogramı…54
Şekil 3.12. Homoarjinin kalibrasyon grafiği……55
Şekil 3.13. Gruplara ait serum homoarjinin düzeyleri……60
Şekil 3.14. Gruplara ait serum ADMA düzeyleri……...61
Şekil 3.15. Gruplara ait serum SDMA düzeyleri……....62
Şekil 3.16. Gruplara ait serum LNMMA düzeyleri……63
Şekil 3.17. Gruplara ait serum Arjinin düzeyleri……64
Şekil 3.18. Gruplara ait serum Sitrülin düzeyleri……...64
Şekil 3.19. Gruplara ait serum Arjinin/ADMA oranı düzeyleri……65
Şekil 3.20. Gruplara ait serum SDMA/ADMA oranı düzeyleri……....66
Şekil 3.21. Gruplara ait serum HArg/ADMA oranı düzeyleri……...67
Şekil 3.22. Gruplara ait serum Total metilarjinin düzeyleri……...70
Şekil 3.23. Yaş ve Homoarjinin arasındaki korelasyon grafiği……...71
Şekil 3.24. İnhibin-A ve Arjinin/ADMA oranı arasındaki korelasyon grafiği……..70
Şekil 3.25. İnhibin-A ve Homoarjinin arasındaki korelasyon grafiği……71
Şekil 3.26. İnhibin-A ve ADMA arasındaki korelasyon grafiği……71
Şekil 3.27. İnhibin-A ve Total metilarjininler arasındaki korelasyon grafiği……72
Şekil 3.28. Homoarjinin ve ADMA arasındaki korelasyon grafiği……74
Şekil 3.29. Homoarjinin/ADMA oranı ve Arjinin arasındaki korelasyon grafiği…..76
Şekil 3.30. Homoarjinin/ADMA oranı ve Arjinin/ADMA oranı arasındaki korelasyon grafiği……...…...77
Şekil 3.31. Homoarjinin/ADMA oranı ve SDMA/ADMA oranı arasındaki korelasyon grafiği……...…...77

1. GİRİŞ

Günümüzde birçok hastalıkta olduğu gibi gebelik döneminde görülen hastalıkların patogenezinde de henüz aydınlatılamamış bazı kısımlar bulunmaktadır. Baştan çok normal görünen bir gebelik döneminde bile sonradan ciddi sorunlar yaşanabileceği için, riskli gebelik olsun veya olmasın bütün gebeliklerin takip altında olması büyük önem taşımaktadır. Gebelik dönemi süresince oluşabilecek komplikasyonların patogenezinde ve meydana gelebilecek maternal sorunlar (kardiyovasküler hastalıklar, preeklampsi, eklampsi, servikal yetmezlik vs.) veya fetusa bağlı gebelik dönemi sorunlarında (kromozom anomalileri, IUGR (fetusta gelişme geriliği),oligohidramnios vs.) özellikle endotel disfonksiyonun bir göstergesi olan metillenmiş arjinin türevleri gibi bazı biyomarkırların önemi son derece büyüktür.

İlk olarak 1895'te araştırmacı Hedin tarafından bulunmuş olan arjinin pozitif yüklü (bazik) bir aminoasittir ve nötral pH' ta guanidinyum grubu ihtiva eden bir proton alıcısı olarak bilinir. Polar özellik göstermektedir ve proteinlerin yüzeyinde yerleşmiş bulunmaktadır. Molekül ağırlığı 174 daltondur. D ve L arjinin olarak var olan iki formundan, proteinlerde bulunanı L-arjinin'dir (Barbul 1986, Carcillo 2003).

Dokularda, idrarda ve plazmada mevcut olan, asimetrik dimetilarjinin (ADMA), ilk olarak 1970 yılında idrarla atılan metillenmiş arjininler olarak tanımlanmıştır. Arjininin anoloğu olarak bilinmektedir. ADMA hayvan immün sistem hücrelerinde ve nöronlarında, insan endotel hücrelerinde saptanmıştır ve ilk olarak 1987 yılında izole edilmiştir (Barbul 1986, Carcillo 2003). Nitrik oksit sentaz (NOS) enzimini inhibe etmesi ADMA'nın bilinen en önemli fonksiyonudur (Cooke ve Dzau 1997, Napoli ve Ignarro 2001).

Nitrik oksid (NO) ilk kez 1995 yılında keşfedilmiş antiaterojenik bir molekül olarak bilinmektedir. eNOS, nitrik oksitin keşfedilmesinden çok kısa süre sonra klonlanmış ve bu enzimin substratı olan L-arjinin tanımlanmıştır (Lüscher ve Noll, 1999; Furchgott ve Zawadzki, 1980; Palmer ve ark., 1987; Palmer ve ark.,1988). NO, önceleri endotelden üretilen, salgılanan ve damar düz kasında guanilat siklaz

uyarılması ile vazodilatasyon gerçekleştiren gevşetici faktör (EDRF) olarak bilinmekteydi (Lüscher ve Noll, 1999; Furchgott ve Zawadzki, 1980; Oemar ve ark., 1998; Wang ve ark., 1996). Sonraları damar endotelinden izole edilmiş ve baskın olan kısmının nitrik oksit olduğu tespit edilmiştir. Nitrik oksitin yarı ömrü oldukça kısadır (5-10 saniye) ve ekstraselüler alanda sadece lokal etkisi söz konusudur. Nitrik oksit bilinen bütün nitrovazodilatörlerin aktif bir komponenti olarak bilinir (Lüscher ve Noll, 1999).

Vallence ve arkadaşları 1992 yılında ilk olarak insan idrar ve plazmasında eNOS'ın endojen bir inhibitörü olan ADMA varlığını tespit etmişlerdir. Metilarjininler grubu, asimetrik dimetilarjinin (ADMA), simetrik dimetilarjinin (SDMA) ve monometilarjinin (L-NMMA) ile beraber toplam üç aminoasitten meydana gelmektedir. Yalnızca L-NMMA ve ADMA NOS'u inhibe etme özelliğine sahip iken, SDMA biyolojik olarak inaktiftir ve NOS inhibitörü olarak fonksiyonu yoktur. İnsanlarda plazma ADMA seviyeleri L-NMMA seviyelerinden 10 kat daha fazladır (Cooke, 2000).

ADMA, yaklaşık olarak 1970'li yıllardan beri varlığı tanınan bir metabolit olsa da NOS'u inhibe etme özelliğinin açığa çıkarılmasıyla beraber dikkatleri çekmiştir ve o günden itibaren bu molekülle ilgili pek çok sayıda araştırma ve klinik çalışmalar yapılmaktadır (Erbil ve ark., 2012). Son zamanlarda özellikle plazmada ADMA konsantrasyonlarındaki artış; hiperkolesteremi, preeklampsi, diabetes mellitus ve hipertansiyon gibi çeşitli koroner arter risk markırı olarak kabul edilmektedir (Buğdaycı ve Serin, 2005).

ADMA, nükleoproteinlerde bulunan arjinin rezidülerine, protein arjinin metil tranferaz (PRMT) enzimi tarafından metil gruplarının posttransyonel modifikasyonla eklenmesi ve bu proteinlerin yıkılması neticesinde meydana gelen ve önemi gittikçe artan metillenmiş bir arjinin türevidir. Vücutta daha farklı metillenmiş arjinin bileşikleri de mevcuttur. Bu bileşikler 1 ya da 2 metil grubunun arjininin en fonksiyonel kısmı olan guanido azotuna eklenmesi sonucu oluşurlar. ADMA ve simetrik dimetil arjinin (SDMA) iki metil grubu transferi ile, N-monometil- L-

arjinin (L-NMMA) ise tek metil grubunun eklenmesiyle oluşan metillenmiş arjinin türevleridir (Prefumo, Thilaganathan, & Whitley, 2008).

Endotel disfonksiyonu kronik bir proses sonucunda gelişmektedir, bu prosese katkısı olan biyokimyasal parametreler önemli bir risk belirteci olarak ele alınmalıdır.

Sağlıklı bireylerde plazma ADMA seviyeleri 0.2-1.2 mmol/L arasında değişmektedir. ADMA konsantrasyonları normal gebelik süresinde azalır ancak preeklampsi gelişen gebe kadınlarda seviyelerinde bir artış söz konusudur. Özellikle son yıllarda yürütülen araştırmalarda gebelerde preeklampsi görülmeden önce ADMA düzeylerinde artış olduğu bildirilmiştir. Gebelikte yüksek risk altındaki kadınların erken dönemde saptanmasında ADMA molekülü önemli bir biyobelirteç olarak bilinmektedir.

Son birkaç yıldır kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıkların klinik akıbetinde, umut vaad edici bir biyolojik belirteç olarak endojen ve nonproteinogenik aminoasit L-homoarjinin ortaya çıkmıştır (Atzler ve ark., 2015). Bu bağlamda, insanda ve farelerde L-homoarjininin sentezinden sorumlu bir enzim olan AGAT(Arjinin glisin amidinotransferaz) enzimi üzerine yeni bir ışık tutulmuştur (Choe ve ark.,2013).

Çalışmamızın amacı, özellikle gebelik döneminde metilarjinin yükünü saptamaktır. Bu amaçla ikili ve dörtlü test istemi olan hastaların artan serumlarından metabolizma ürünleri olan metilarjininler çalışılmıştır. Hastahanemizin kadın doğum polikliniğine başvuran gebe kadınlardan alınan kan örneklerinin serumlarında arjinin, sitrülin, homoarjinin, SDMA, L-NMMA ve ADMA düzeylerini belirleyebilmeyi ve böylelikle ileri dönem vasküler patolojiler ve preeklampsi için bir öngörü sağlayabilmeyi amaçladık.

1.1. Arjinin

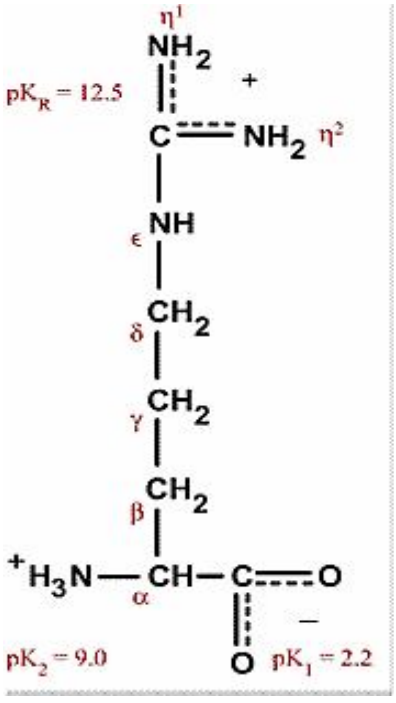
Arjinin (2-amino-5-guanidino pentanoik asit, C6H14N4O2), R), ilk olarak Hedin tarafından 1895'de bulunmuş pozitif yüklü (bazik) (R) amino asittir. L-arjinin formu proteinlerin yapısına katılan form olarak bilinmektedir. Vücutta L-arjinin'e

olan gereksinim bazı durumlarda artar, bu durumlar travma ya da enfeksiyon ve özellikle büyüme dönemidir. Bu bağlamda arjininin "yarı esansiyel bir amino asit" olarak ele alınması gerekmektedir (Barış ve ark.,2004).

Endojen arjinin kaynakları ;

- *Proteinlerin yıkımı yoluyla arjinin sentezi:* Plazmadaki arjinin konsantrasyonun büyük bir kısmı protein döngüsünden ve metabolizmasından gelmektedir. Net arjinin sentezinin başlıca organı böbreklerdir ve arjinin sentezinin yaklaşık olarak %60' ından sorumludurlar (Yavuz, 2006).

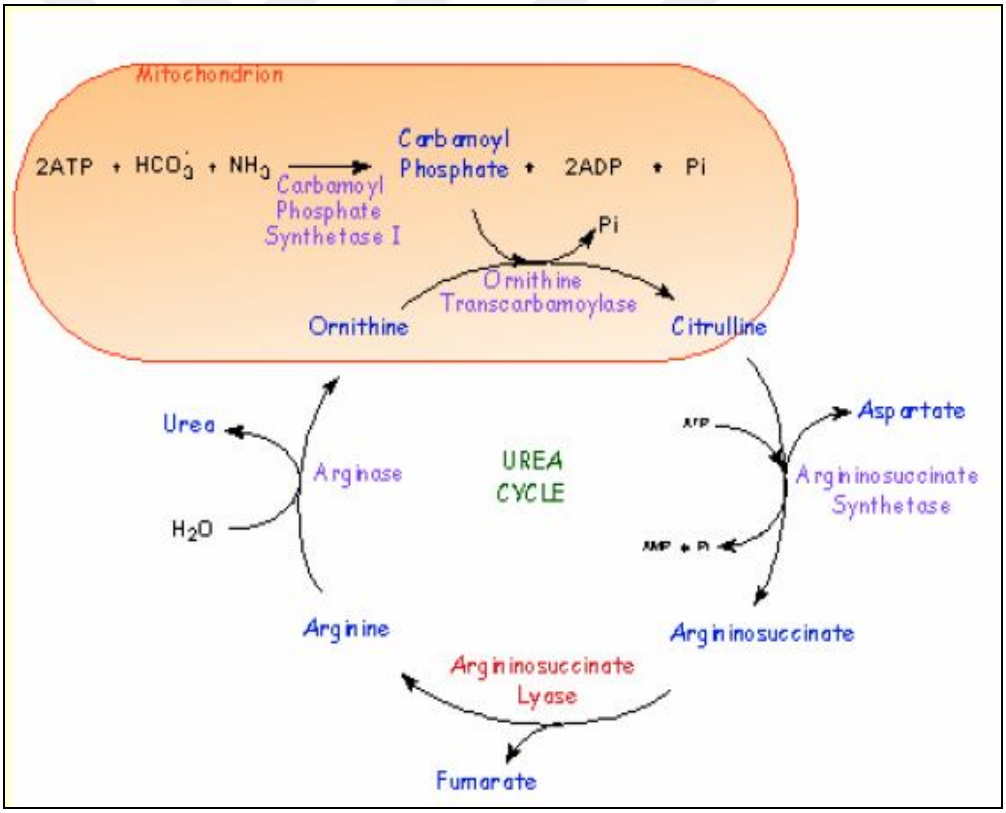
- *Sitrülin ve glutamatın metabolizasyonu ile arjinin sentezi:* (böbrek, ince barsak, ve karaciğerde). Vücuda diyetle alınan aminoasitlerin (glutamin,prolin ve glutamat vs.) metabolizasyonu neticesinde ince barsaklarda üretilen sitrülin, arjinin sentezinde birincil substrat rolü üstlenmektedir. Sitrülin sistemik dolaşıma geçtikten sonra böbrekler aracılığıyla alınarak proksimal tübüllerde arjinine dönüştürülür. Bu şekilde plazma arjinin düzeylerine yaklaşık %10 oranında katkısı olur. Normal plazma arjinin seviyesi 95-250 µmol/L'dir (Barış ve ark., 2004).



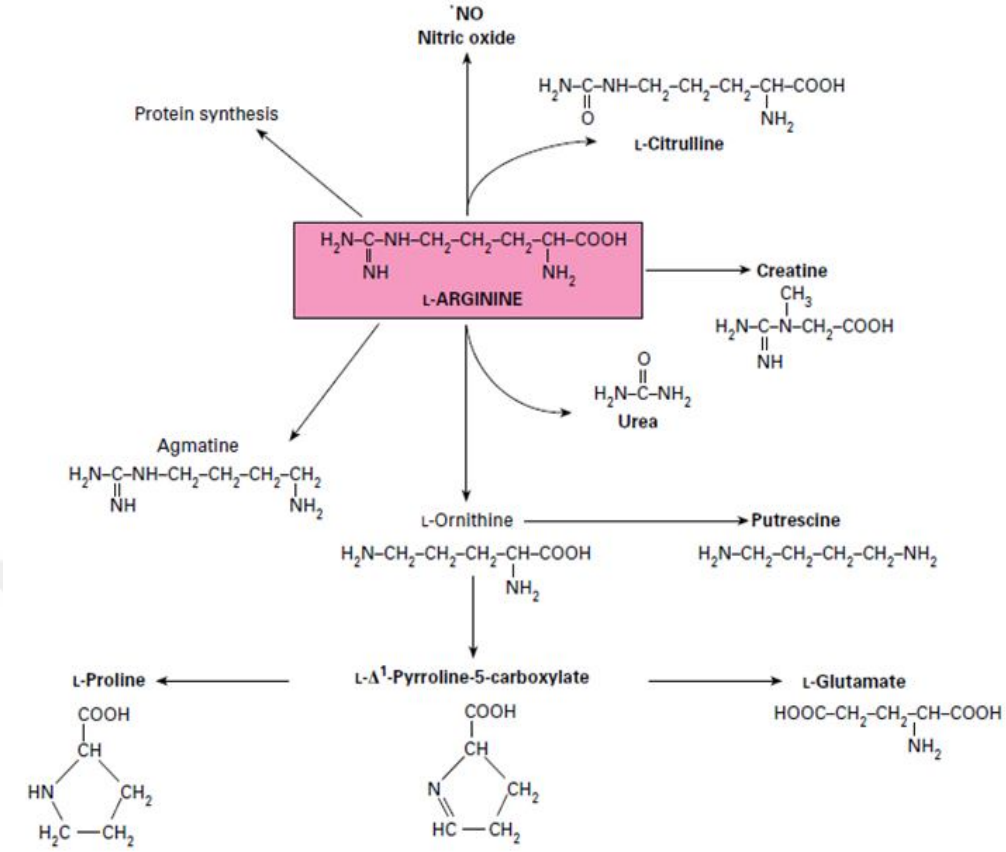
Şekil 1.1. Arjininin molekül yapısı (Barış ve ark., 2004)

1.1.1. Arjinin Metabolizması

Arjinin, şartlı esansiyel aminoasit olarak bilinir, protein sentezinde ve amonyak detoksifikasyonunda görev alır. Glikojenik bir aminoasit olması sebebiyle glukoza dönüştürülebilir ve enerji oluşturmak amacıyla katabolize edilebilir (Visek 1986). Arjinin ince bağırsak lümeninden enterositler vasıtasıyla alınır, aktif transportla emilir. Küçük bir kısmı enterositlerde metabolizasyona uğrar, burada protein sentezinde kullanılır. Metabolize olmayan kısmı da portal dolaşımla karaciğere ulaştırılarak biraz daha metabolize edilir. Metabolize olmayan arjinin sistemik dolaşıma geçerek farklı dokulara dağılır ve metabolik olaylarda rol alır. Glomerüler filtrasyona uğrayan arjininin neredeyse hepsi reabsorbe edilir (Onat ve ark 2002, Morris 2004).



Şekil 1.2. Arjininin katıldığı metabolik üre döngüsü yolağı (Tietz, 2005).



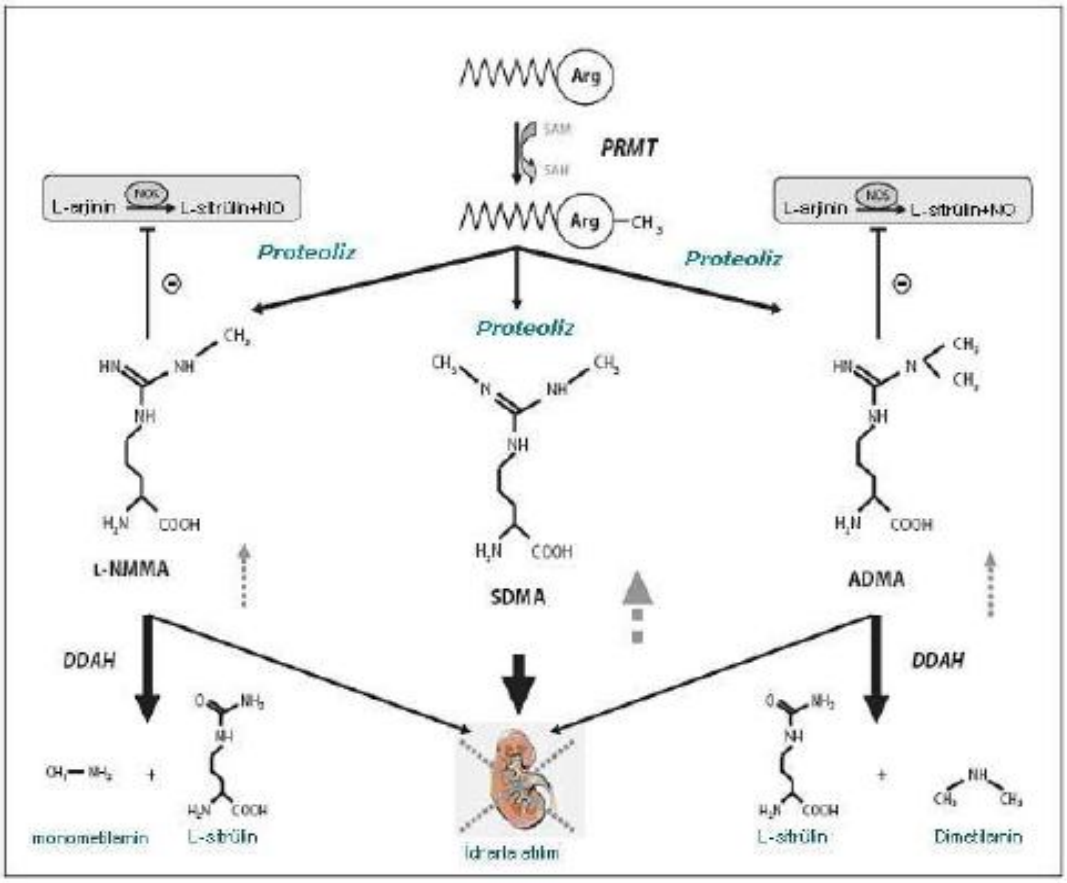
Şekil 1.3. Arjininin Katıldığı Metabolik Yollar (WU ve Morris,1998).

1.1.1.1. L- Arginin Paradoksu

ADMA; "arjinin paradoksu" olarak bilinen görüşten sorumlu olabilir fikrinden hareketle arjininin dokularda ve plazmadaki fizyolojik düzeyleri (mM düzeylere yakın), NOS'un Km değerinin (2,9 µmol/L) çok üstünde (~25 kat) olsa bile arjinin ekzojen olarak verildiğinde pek çok deneysel sistemde nitrik oksit üretiminde artış meydana getirmektedir. Hücre içerisinde eNOS'u maximum seviyede aktif halde tutacak L-arjinin miktarı mevcut olduğu halde bile ekzojen verilmiş olan L-arjininin nasıl bir şekilde eNOS aktivitesinde artışa sebep olduğu durumu "L-arjinin paradoksu" şeklinde tanımlanmıştır (Stefanie, 2007).

Yapılan çalışmalar neticesinde NOS' un enzimatik aktivitesinin ADMA'nın konsantrasyonu (endojen inhibitör) ve L-arjinin konsantrasyonu (doğal substrat)

arasındaki oran (L-Arjinin/ADMA) ile modüle edidiği düşünülmektedir. L- arjinin ve metillenen arjininlerin kimyasal yapısı aşağıdaki gibidir (Şekil 1.4.) (Yüksel, 2010).

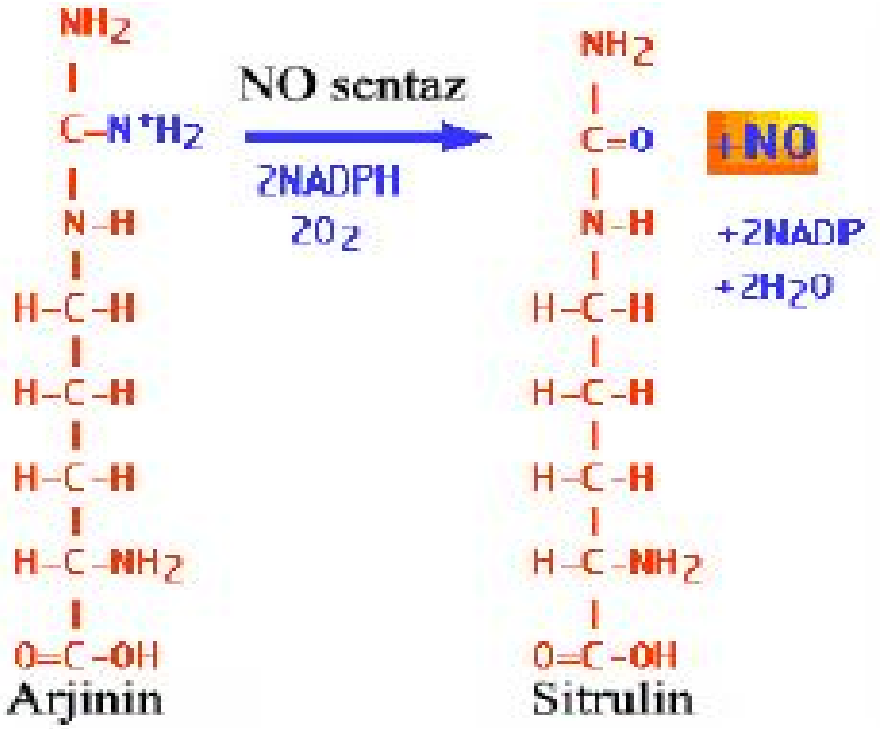


Şekil 1.4. L- arjinin ve metillenen arjininlerin kimyasal yapısı

Daha net şekilde söylemek gerekirse, normal L-arjinin düzeyleri varlığında ADMA düzeylerindeki herhangi bir artış, optimal NOS aktivitesi ile alakalı göreceli L-arjinin yetmezliğine yol açabilmektedir. ADMA, NOS'un yarışmalı inhibitörü olması sebebiyle inhibitör etkisi, L-arjinin düzeylerindeki yükselişten çok fazla etkilenebilmektedir (Böger, 2004).

1.1.2. Arjinin ve Nitrik Oksit

NO, bilinen bütün nitrovazodilatatörlerin aktif bir komponentidir (Şekil 1.5.). (Lüscher ve Noll, 1999).



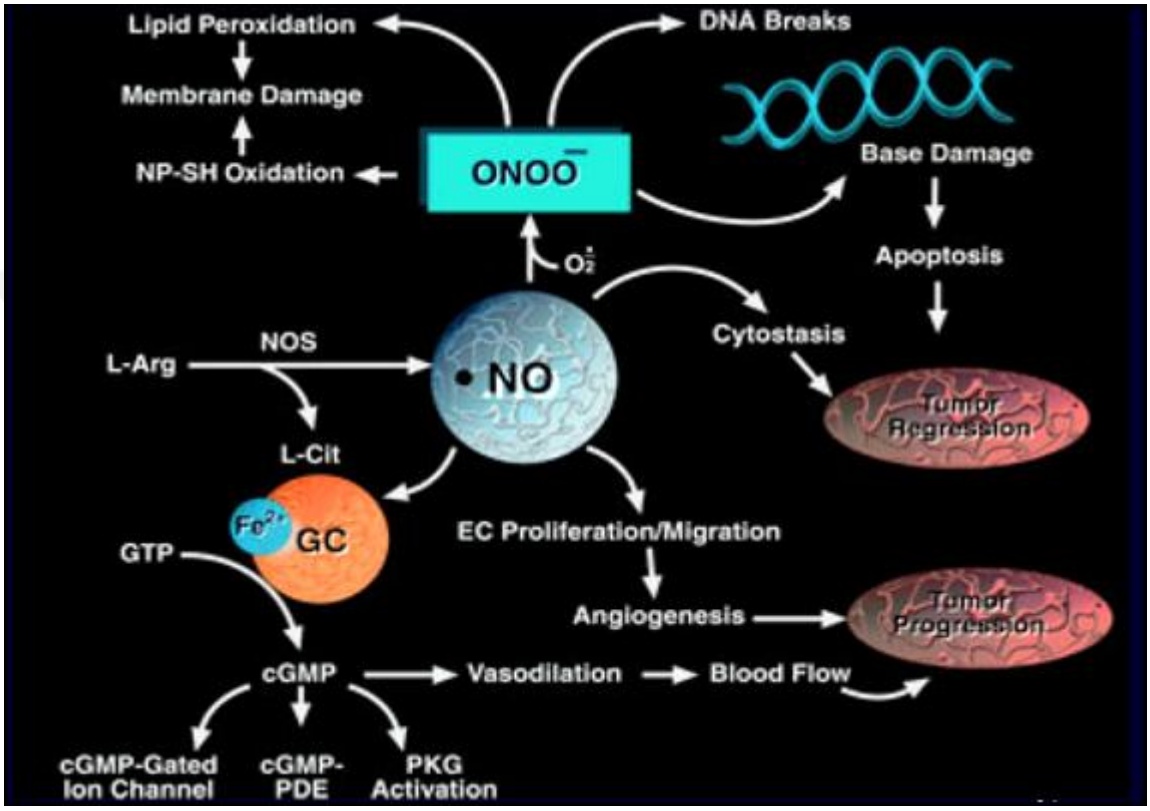
Şekil 1.5. L-Arjininden NOS enzimi aracılığıyla NO sentezi(Lüscher ve Noll, 1999).

Sitotoksik etkili ve bir nörotransmitter molekül olan NO , endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) olarak da isimlendirilir ve kan damarlarında vazodilatasyonu sağlar (Palmer ve ark 1987). Bu önemli etkisi nedeniyle, koroner arter hastalığı, konjestif kalp yetmezliği ve impotans gibi sınırlı kan akışı ve endotelyal disfonksiyon kaynaklı pek çok kardiyovasküler hastalığın tedavisinde kullanımı önerilmektedir (Cooke ve Tsao 1997).

1.1.2.1. Nitrik Oksit Görevleri

Nitrik oksit molekülünün başlıca fonksiyonları arasında damar düz kas hücrelerinin gevşemesini artırmak , bu hücrelerde büyümeyi ve göçü suprese etmek, damar duvarında sentez edilen endotelin düzenlenmesi ve trombosit aktivasyonunun inhibisyonu yer almaktadır (Cornwel ve ark., 1994) (Şekil 1.6). NO ayrıca, düz kas hücrelerinde proliferasyonu engeller, trombosit yapışkanlığını ve endotel tabakasının lökositler üstüne adhezyonunu inhibe eder. Nitrik oksitin

antioksidan, antienflamatuvar ve antifibrotik etkileri mevcuttur (Hayden ve Tyagi, 2003). Bu molekülün eksikliğinde vasküler endotelin artışı söz konusu hale gelir ve buna bağlı olarak periferik dirençte artış gözlenir. Hemoglobin, nitrik oksiti etkisizleştirmede önemlidir. (Ghilardi ve ark.,2002; Alvarez ve ark., 2001; Vidal ve ark., 1998).

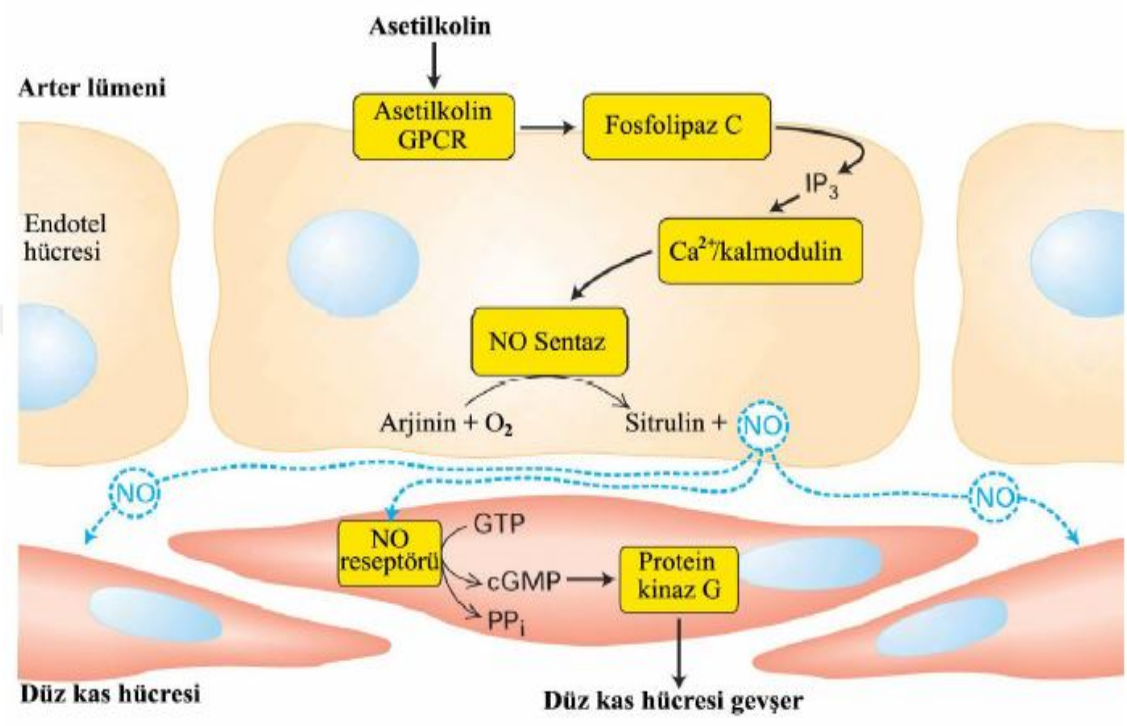


Şekil 1.6. Nitrik oksit işlevleri ve etki mekanizması (Alvarez ve ark., 2001).

1.1.2.2. Nitrik Oksit Etki Mekanizması

Toksik ve renksiz bir gaz olan nitrik oksit sentezi esnasında etkili olan ana uyarıcılar; kan akışının damarda meydana getirdiği basınç, bradikinin ve asetilkolin'dir (Alvarez ve ark., 2001). Asetilkolin hücre yüzeyindeki G proteine bağlı reseptöre bağlanarak G proteininde konformasyonel değişiklik meydana getirir ve böylelikle fosfolipaz-C aktive olmuş olur. Aktif hale gelen fosfolipaz-C, fosfatidil inositol bifosfat' ı (PIP2) 1,2-diaçil gliserol' ve fosfatidil inositol 1,4,5- trifosfat (IP3)'e (DAG) çevirir. Sitoplazmadaki IP3 düzeylerindeki artış endoplazmik retikulumda (ER) depolanmış olan Ca^{+2}' un sitoplazmaya geçmesini stimüle eder.

Ca^{+2}/ kalmodulin kompleksi ile NOS enzimini aktive hale getirilir ve böylece O_2 ve L-Arjinin'den, NO ve sitrülin sentez edilir (Şekil 1.7.) (Alvarez ve ark., 2001 ; Vidal ve ark., 1998).



Şekil 1.7. Nitrik oksid etki mekanizması (Alvarez ve ark., 2001)

NO endotel hücresinden salınır ve difüzyon ile düz kas hücrelerine ulaşır. Kas hücres içerisinde artmış olan NO seviyesi, döngüsel guanozin monofosfat (cGMP) miktarındaki artışı stimüle ederek protein kinaz G' yi aktifleştirir. Hücre içi Ca^{+2} düzeyleri azalış görülür, kas hücresi gevşeme gösterir (Güneş, 2003; Alvarez ve ark., 2001; Powell ve ark., 1994). NOS'u inhibe eden arjinin türevleri deney hayvanlarına verildiği zaman izlenen kan basıncında ani yükseliş nitrik oksitin fizyolojik rolünü destekler niteliktedir. Normal kan basıncının devamının sağlanabilmesi amacıyla nitrik oksitin tonik salınımına gereksinim vardır.

1.1.2.3. Nitrik Oksit İle İlişkili Hastalıklar

T2DM, ateroskleroz, koroner spazm , MI, kalp yetmezligi, hipertansiyon gibi kalp-damar sağlığını ilgilendiren pekçok hastalık endotelyal nitrik oksit sentaz genine ait Glu298Asp polimorfizmi ile ilişkili bulunmuştur. Kalp yetmezliğine karşı nitrik oksitin yeterli üretiminin koruyucu önemli bir etkisi söz konusudur. McNamara ve arkadaşları, eNOS aktivitesi olmayan Asp298 varyantının kalp yetmezliğinin oluşmasını arttırdığını rapor etmişlerdir (McNamara ve ark., 2003). Yapılan çeşitli çalışmalarda eNOS genine ait olan Glu298Asp polimorfizmini homozigot şekilde mutant taşıyan bireylerde koroner spazm, ateroskleroz, MI ve koroner arter hastalığı riskinin arttığı gösterilmiştir (Lembo ve ark., 2001; Hingorani ve ark., 1999).

1.1.2.4. Nitrik Oksit Sentaz (NOS) Görevleri

Nitrik oksit sentaz çok kısa yarı ömrü olan (5-10 sn) bir serbest radikal olan NO üretimi için L-arjinini substrat olarak kullanan enzimdir. NOS üç izoenzim ailesinden meydana gelir. Bunlar;

-iNOS: İndüklenebilir izoformdur. Miyositlerde ve aktif makrofajlarda mevcuttur.

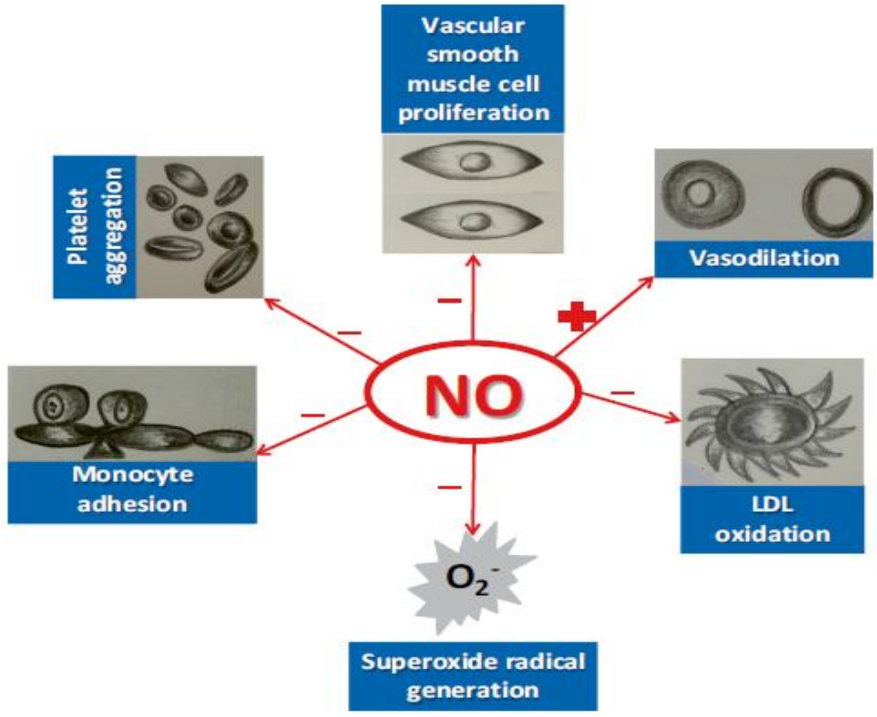
-eNOS: Konstitutif endotelyal izoformdur.

-nNOS: Konstitutif nöronal izoformdur. Sempatik sinirlerde, vasküler endotel, endokardiyum ve trombositlerde bulunur (McNamara ve ark., 2003 ; Khan ve ark; 1999).

NOS'un yapısal formları olan endotelyal ve nöronal izoformları özellikle damar endoteli, santral ve periferik sisnir sistemi gibi dokularda lokalizedir ve aktifleşebilmek için Ca^{+2}/kalmodulin kompkleksine bağımlıdır böylelikle bazal nitrik oksit konsantrasyonunu çok az miktarda artırırlar. iNOS ise doğru fizyolojik uyaran verildiği zaman $Ca^{+2'}$dan bağımsız olarak yüksek miktarlarda NO üretimi gerçekleştirir ve bakteri, tümör hücresi gibi yabancı hücrelerde sitotoksik veya sitostatik etki oluştururlar. NOS enziminin üç izoformu da kalpte bulunmaktadır. Vasküler endotel aracılığıyla in vivo ve in vitro olarak devamlı sentezlenen tek NOS izoformu eNOS'dur (Khan ve ark; 1999; Miyamoto ve ark; 1998 ; McNamara ve

ark., 2003). Nitrik oksitin potent vazodilatör etkisine ilave olarak pekçok başka etkisi bulunmaktadır (Şekil 1.8.).

Nitrik oksit trombosit agregasyonunu engeller ve lökosit ve monosit hücrelerinin sağlıklı vasküler endotele yapışmasını inhibe eder. Ayrıca, sitotoksik ve inflamatuar süreçlerde var olan süperoksit radikallerinin vasküler salınımını azaltır, böylece düşük dansiteli lipoprotein (LDL) oksidasyonunu inhibe etmiş olur. Vasküler sistem için faydalı olan böylesi etkilerinden ötürü nitrik oksit molekülü "endojen anti-aterojenik molekül" olarak adlandırılır. NO'nun bu anti-aterojenik fonksiyonlarının ADMA'nın varlığıyla ortadan kalktığını gösteren ve bu olayın patofizyoloik süreçlerini inceleyen birçok çalışma vardır (Blackwell, 2010). Crohn ve ülseratif kolon hastalığının patogenezinde nitrik oksit'in rol aldığına dair bulgular mevcuttur (Moore ve Rowland, 1993).



Şekil 1.8. NO'in damarsal etkileri (Khalil ve ark., 2015).

1.2. Metilarjininler

Başlıca metilarjinin türevleri N-monometil L-arjinin (L-NMMA), Asimetrik dimetilarjinin (ADMA) ve simetrik dimetilarjinin (SDMA) dir. Metilarjininler proteinlerde bulunan arjinin rezidülerinin posttranslasyonel modifikasyon ile

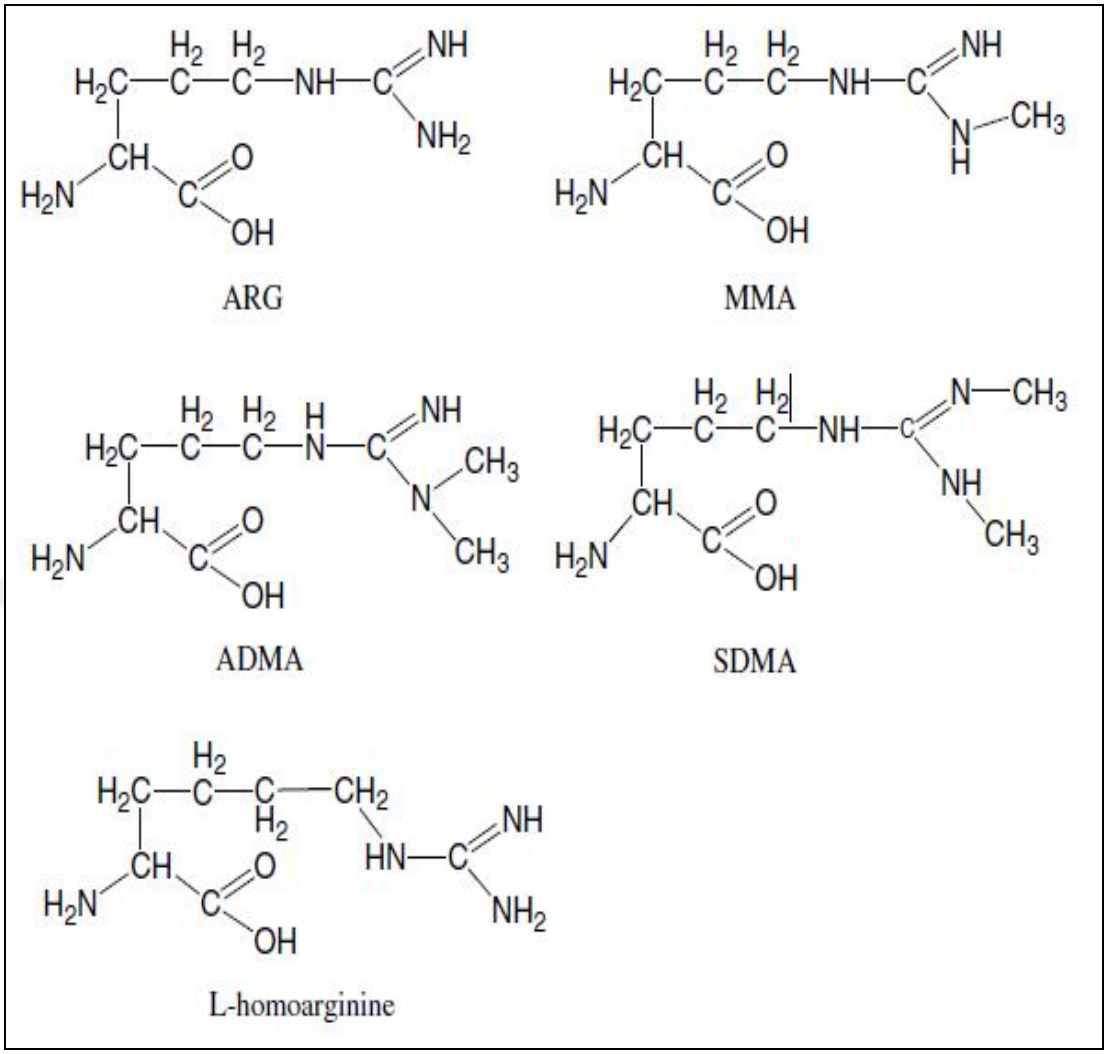
metilasyonu sonucu meydana gelen arjinin türevleridir. ADMA ve L-NMMA'nın sentez edilebilmesi için arjinin rezidülerine metil grupları transfer eden protein arjinin metiltransferaz tip I (PRMT-I) enzimine gereksinim vardır. Bu enzim proteinlerin içindeki arjininin en fonksiyonel kısmı olan guanido azotuna bir veya iki metil grubu transferi gerçekleştirir. Metil grubu vericisi olarak bu reaksiyonlar sırasında S-adenozil metiyonin (SAM) kullanılır (Clarke 1993, Mcbride ve Silver 2001).

1.2.1. Genel Bilgi

Metilasyon ya da metillenme spesifik bir şekilde bir hidrojen atomunun bir metil grubu ile yer değiştirmesi manasında kullanılan bir terimdir ve bu olay irreversibldır. Metillenmiş proteinler nukleusta bulunmaktadır. Arjinin guanido kısmından dolayı 1 ya da 2 defa metilasyona uğrayabilir. (Taner, 2010). Bu metilasyonu protein arjinin metil transferaz (PRMT) enzimi katalizler ve böylelikle proteinlerin içindeki L-arjinin rezidülerinin guanido azotuna 1 veya 2 metil grubu aktarımı gerçekleşir. Bu reaksiyonlar sırasında S-adenozil metiyonini (SAM), PRMT grubu enzimleri tarafından metil vericisi olarak kullanılır ve S-Adenozil homosisteine (SAH) dönüşür. SAH'de homosistein'e hidrolize olur (Mittermayer ve ark., 2005)(Clarke, 1993; McBride ve Silver, 2011).

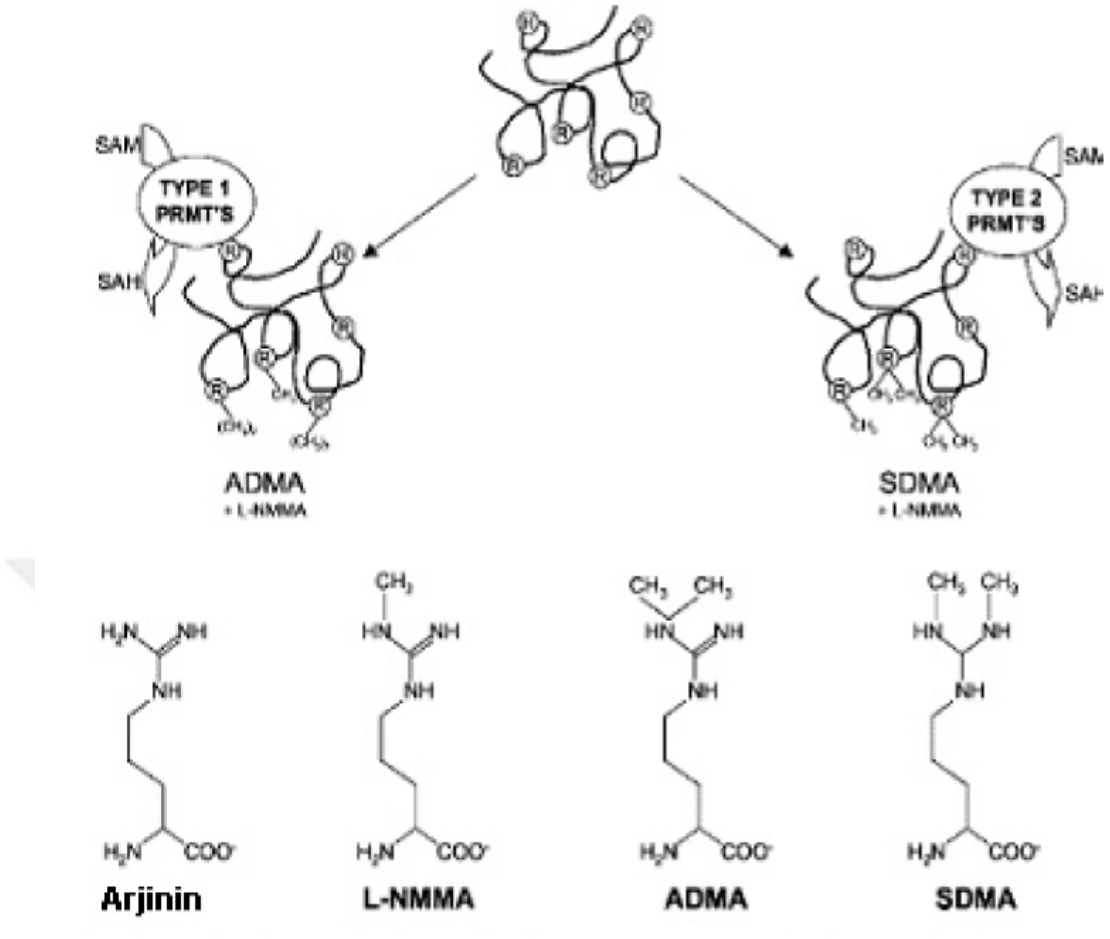
1.2.1.1. Metilarjinin Oluşumu ve Çeşitleri

ADMA ($C_8H_{18}N_4O_2$), protein arjinin metil tranferaz (PRMT) enzimi aracılığıyla metil gruplarının sentez sonrası düzenleme ile nükleoproteinlerdeki arjinin, rezidülerine transfer edilmesi ve bu proteinlerin katabolizması sonucu salınan serbest metilarjinin rezidülerinden sentezlenen klinik tanıda önemi giderek artan bir arjinin türevidir. ADMA ve SDMA arjinin'in guanido azotuna iki metil grubunun eklenmesiyle, N-monometil- L-arjinin (L-NMMA) ise tek bir metil grubunun eklenmesiyle oluşan metillenmiş arjinin türevleridir. (Alaçam, 2008). Endojen metilarjininler aşağıdaki şekilde görüldüğü gibidir (Şekil 1.9.)(Huang ve ark.,2004).



Şekil 1.9. Endojen metilarjininlerin kimyasal yapısı (Huang ve ark.,2004).

Arjininin metillenmiş formları ve sentezi aşağıda verildiği gibidir (Şekil 1.10.) (Vallance ve Leiper, 2004)



Şekil 1.10. Arjininin metillenmiş formları ve sentezi(Vallance ve Leiper, 2004)

Metilarjininlerin sentezinde rol alan PRMT enzimlerinin iki tipi mevcuttur; protein arjinin metiltransferaz tip 1 (PRMT-1) ve protein arjinin metiltransferaz tip 2 (PRMT2). PRMT-1 enzimi L-NMMA ve ADMA yı sentezleyen enzimdir. PRMT-2 enzimi ise SDMA'nın sentezinden sorumludur. Tip1 PRMT en sık rastlanılan tipidir ve, düz kas hücrelerinde, kardiyovasküler sistemde kalp ve endotelyal hücrelerde yerleşik olduğu bilinmektedir. Tip 1 PRMT aktivitesi neticesinde meydana gelen arjinin türevlerinin nitrik oksit sentaz enzimini inhibe etme yeteneği mevcuttur. SDMA, ADMA ile eşit konsantrasyonlarda üretilir fakat NOS aktivitesine etkisi söz konusu değildir (Bayraktutan, 2011).

Proteinler hidrolize uğradıkları zaman metillenmiş olan arjinin rezidüleri serbest kalır, ve daha sonra bunlar idrarla atılır. Renal yetmezliği olan hastalarda metillenmiş arjininler idrarla vücuttan uzaklaştırılamaz ve konsantrasyonlarında artış

meydana gelir. Metilarjininler böbrekte dimetilarjinin metil transferaz/hidrolaz (DDAH) enzimi ile, karaciğerde ise asetilasyon ile metabolizasyona uğrarlar.

1.2.2. Asimetrik Dimetil Arjinin (ADMA)

1.2.2.1. Tanım ve Tarihçe

Proteinlerdeki arjinin rezidülerinin, protein arjinin metiltransferaz (PRMT) tip 1 aracılığıyla metilasyonu ile sentez edilen; plazmada, idrarda ve dokularda bulunan asimetrik dimetilarjinin (ADMA) ilk olarak 1970 yılında idrarla atılan metillenmiş bir arjinin türevi olarak tanımlanmıştır. Hayvanların immün sistem hücre ve nöronlarında, insan endotel hücrelerinde saptanmış ve ilk defa 1987 yılında izole edilmiştir. Daha sonra Vallence ve ark. 1992 yılında insan plazma ve idrarında endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS)'ın endojen inhibitörü olarak ADMA'nın varlığını tanımlamışlardır. (Cooke, 2000).

1.2.2.2. ADMA ve Yapısal Özellikleri

ADMA son derece stabil bir moleküldür ve hücreler arasında rahatça dolaşabilir böylece etkisini serbest olarak gösterebilmektedir. Bir hücrede üretilip etkinliğini kolaylıkla başka bir hücrede gösterebilmektedir. Mesela damar düz kas hücresinde üretildikten sonra endotel hücresinde etkisini gösterebilir (Taner, 2010).

ADMA'nın intrasellüler miktarları protein metilasyonu, proteinlerin yıkım hızı ve ADMA'nın böbreklerde DDAH tarafından yıkım hızına bağlıdır. Protein katabolizmasının fazla olduğu iskemik kalp hastalığı, diyabet gibi bazı durumlarda hücre içerisinde fazla miktarda oluşan ADMA dolaşıma verilmekte ve dolaşımdaki konsantrasyonu artış göstermektedir. Salınan ADMA hem orijin yerinden dışarı çıkabilir hem de plazmadan uzak bölgelerden de alınabilmektedir. Bu olay da arjinin ve diğer katyonik aminoasitler (CAAs) için değiş-tokuşla katyonik aminoasit taşıyıcılar (CATs) tarafından gerçekleştirilir (Baylis, 2006; Welch ve Wilcox, 2007).

ADMA kan basıncını artırır, vazokonstrüksiyona sebep olur, endotelyal hücre adhezivitesini artırır ve endotel bağımlı relaksasyonu bozar, kardiak outputu azaltır. Uzayan NOS inhibisyonun neticesinde sol ventrikuler hipertrofi gelişebilir. Plazma ADMA seviyeleri ile endotel disfonksiyonu arasında doğrudan ilişki mevcuttur. Hemodiyaliz hastalarında oluşan endotel disfonksiyonu, kardiyovasküler olaylar ve özellikle mortalitede ADMA sorumlu faktörlerden birisidir (Vallance ve Leiper, 2004).

Endotel kaynaklı NO, endotelin normal fonksiyonlarının idamesinde oldukça önem arz eder. NO'nun antitrombotik işlev, vazodilatasyon, ve inflamasyonun kontrolünde kritik rolleri bulunmaktadır.

Y taşıyıcı aktivitesi metilarjininlerin lokal düzeylerinde önemlidir. CAT sistem metilarjininleri endotel hücreleri içinde konsantre eder. Bu sebeple intrasellüler konsantrasyonu sirkülasyondan daha fazladır. Y taşıyıcı sistemde herhangi bir defekt meydana gelmesi sirkülasyonda daha fazla ADMA konsantrasyonuna neden olur. Dolayısıyla azalmış NO biyosentezi ile neticelenir (Tarnow ve ark., 2004).

Nitrik oksit biyosentezinin bozulması ile endotel fonksiyon bozulur ve beraberinde çok sayıda vasküler hadiseyi getirir. ADMA, nitrik oksitin tübüler Na+ reabsorbsiyonu üzerndeki inhibitör etkisini sınırlandrarak anormal renal sodyum tutulumuna da katkı sağlayabilir. CAT ve NOS'un inhibe edilmesi ile vasküler ve organ hastalıklarının orijini olan mikrovasküler oksidatif stresin oluşumu ve endotelyal disfonksiyona iştirakçi olabilir (Palm ve ark., 2007).

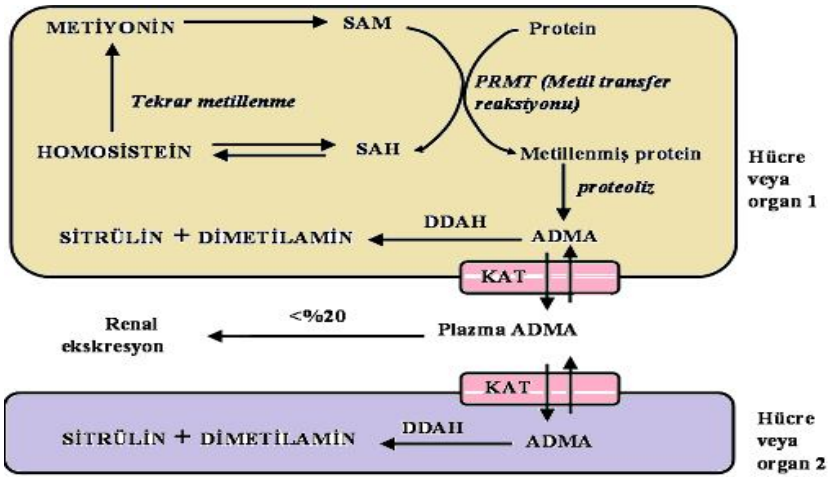
1.2.2.3. ADMA Sentezi

İki kompleks olayın gerçekleşmesi ile serbest ADMA oluşumu meydana gelir. Bunlardan ilki, proteinlerdeki arjinin rezidülerinin metilasyonu, ikincisi ise bu metilenmiş proteinlerin proteoliz ile serbest aminoasitlere kadar yıkılması durumudur (Erbil ve ark 2012). Proteinlerdeki arjinin kalıntılarına metil gruplarının eklenmesini, PRMT enzimleri gerçekleştirir (Clarke 1993). PRMT 1 izoformu kalpte, düz kas hücrelerinde ve endotel hücrelerde eksprese olmaktadır. Her ikiside arjiininin

monometillenmesini sağlayabilir. Ancak ikinci bir metil grubu transferiyle oluşacak ürün, PRMT enzimi çeşitine bağlıdır. Tip 1 PRMT enzimi, aynı guanidino azotunu dimetilleyerek ADMA oluşumunu katalizlerken, tip 2 PRMT her iki guanidino azotunu monometilleyerek SDMA oluşumunu gerçekleştirir (Vallance ve Leiper 2004, Tran ve ark 2003).

PRMT enzimleri tarafından metil vericisi olarak kullanılan SAM ATP ve metiyoninden sentez edilir. SAM, metil grubunu kaybederek S-adenozilhomosisteine dönüşür. Meydana gelen homosistein trans-sülfürasyon yolağı aracılığıyla metabolize edilir veya remetilasyona uğrayarak metiyonine dönüştürülür. (Şekil 1.11). Yeniden metilasyon reaksiyonu, metil vericisi olarak vitamin B ve 5-metil tetrahidrofolik asit'e bağımlıdır ADMA sentezi reaksiyonunda iki adet metil grubu gereklidir ve yan ürün olarak iki adet homosistein oluşur. Plazma homosistein ve ADMA düzeyleri arasında pozitif korelasyon olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Holden ve ark., 2003).

Proteine bağlı ADMA' nın NOS enzimi üzerinde inhibitör etkisi yoktur. İnhibisyon etkisinin söz konusu olabilmesi için metillenmiş proteinlerin proteolizi ile oluşan serbest ADMA şarttır. Bugüne kadar serbest arjininden ADMA sentezlendiğine dair literatürde herhangi bir bilgi mevcut değildir (Erbil ve ark 2012). Sağlıklı insanlarda ADMA' nın plazma seviyeleri literatür verilerine göre 0,35-0,70 μmol/L arasındadır (Baylis, 2006).

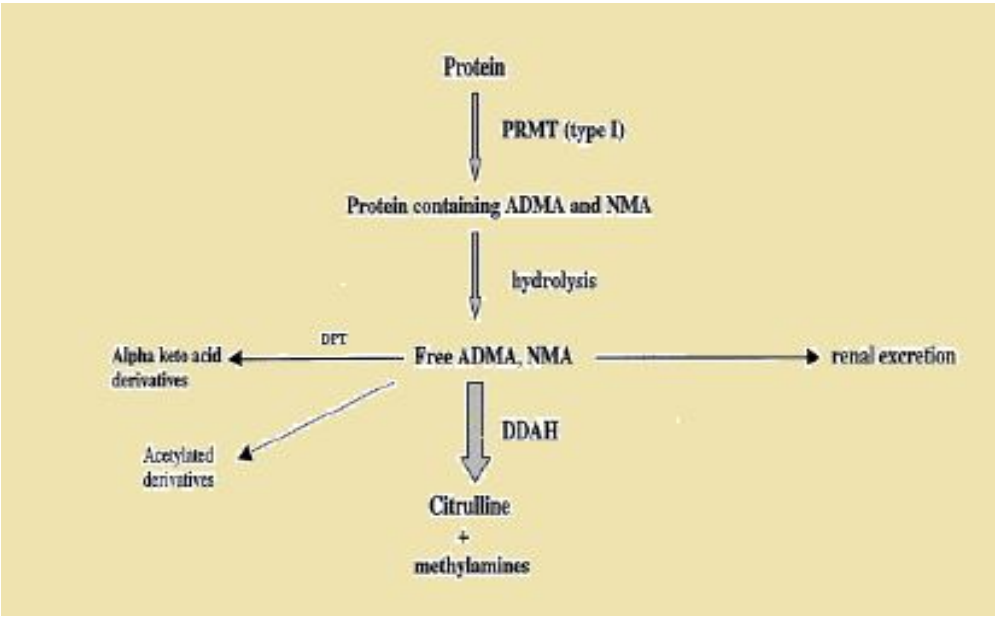


Şekil 1.11. ADMA Oluşumu ve Metabolizmasının Şeması (Erbil ve ark 2012).

1.2.2.4. ADMA Yıkımı

ADMA'nın katabolizmasında 3 kritik yolak vardır: Birinci yolak; ADMA'nın DDAH enzimi tarafından sitrülin ve dimetilaminlere yıkılmasıdır (>%90). İkinci yol ; ADMA'nın değişmeden böbreklerden atılmasıdır(~%5). Üçüncü yol ise; dimetilarjinin pürivat aminotransferaz enzimi aracılığıyla α-ketoasitlere dönüştürülmesidir (<% 5)(Ogawa ve ark 1989, Ogawa ve ark 1990).

ADMA yıkılımının düzenlenmesinde DDAH merkezi rol oynar. DDAH, karaciğer, böbrek, kan damarları ve pankreasta eksprese olur. Enzimin iki izoformundan DDAH-1 , karaciğer, beyin, testis, böbrek, adrenal bez gibi nNOS'un eksprese olduğu dokularda bulunmaktadır. DDAH-2 ise aorta, kalp ve plesanta gibi eNOS ve iNOS'u eksprese eden dokularda fazla bulunmaktadır. DDAH, ADMA için spesifiktir, SDMA'yı etkilemez. SDMA intravenöz olarak enjekte edildiğinde %60 oranında idrara çıkmaktadır ancak ADMA intravenöz enjekte edildikten sonra %5 oranında idrara çıkar. Bu nedenle renal yetmezliklerde SDMA, ADMA' ya kıyasla plazmada çok daha yüksek seviyelerde bulunur. Yapılan çeşitli çalışmalarda ADMA'nın DDAH enzimi için substrat olduğu SDMA' nın ise olmadığı rapor edilmiştir. ADMA'nın SDMA'ya göre daha yaygın bir metabolizmasının olduğu gösterilmiştir (Şekil 1.12)(Kimoto ve ark 1995).



Şekil 1.12. ADMA metabolizması

Pek çok hastalıkta azalan DDAH aktivitesi, dolaşımdaki ADMA seviyelerinin artmasına sebep olmaktadır. Hiperkolesterolemi ve hiperglisemi gibi durumlar doğrudan ADMA akümülasyonu ile sonuçlanan DDAH aktivitesinde azalmaya yol açar (Chan ve Chan 2002).

1.2.2.5. Endotel Disfonksiyonu ve ADMA

İnsanlarda hızlı değişen plazma ADMA seviyeleri endotelyal vazodilatör fonksiyonundaki değişiklikler ile alakalıdır. ADMA günümüzde endotel disfonksiyonu için önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (Cooke 2004).

NO, vasküler homeostazda çok önemli bir yere sahip olması ve vazodilatör aktivitesinin yanı sıra, vasküler hastalıklarda kilit rol üstlenen trombosit agregasyonu, lökosit adezyonu ve vasküler düz kas hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir. Hayvan modellerinde vasküler nitrik oksit sentezindeki değişikliklerin, restenoz ve ateroskleroz ilerleyişinde mühim bir etkisi olduğu gözlenmiştir. NOS yolağının bozulması, kardiyovasküler hastalıklar için bağımsız bir gösterge durumundadır (Işıklar ve Mutaf , 2010). Son dönem böbrek hastalığı olan bireylerde renal klirenste azalma sebebiyle artış gösteren plazma ADMA konsantrasyonları diyaliz yardımı ile düşürülmüş ve endotel fonksiyonunda düzelme sağlanmıştır. Daha sonra yapılan araştırmalarda, artmış ADMA düzeyleri ile endotelyal vazodilatör disfonksiyon arasında ilişki bir çok kez ortaya çıkarılmıştır.

Endotel tarafından salgılanan nitrik oksitin damar yapısını ve fonksiyonlarını koruyucu etkileri mevcuttur ve endotel tabakasında meydana gelen bir harabiyet NO düzeylerini azaltır ve bu da damar fonksiyonlarında bozulma meydana getirir. NO eksikliğinde damar düz kaslarında proliferasyon görülmekte, damar duvarının elastikiyeti azalmakta ve bunların sonucunda akışa bağımlı vazodilatasyon kaybı meydana gelmektedir (Cooke 2005).

ADMA'nın intra-arteriyel infüzyonu lokal vazokontsrüksiyona sebep olur iken, sistemik infüzyonu sistemik vasküler rezistansı arttırır ve renal fonksiyonu bozar. Yapılan deneysel ve klinik çalışmalarda ADMA düzeylerindeki ufak

değişikliklerin bile vasküler tonusta, vasküler NO üretiminde ve sistemik vasküler dirençte anlamlı değişikliklere sebep olduğu gösterilmiştir (Böger ve Ron 2005).

Çizelge 1.1. ADMA düzeylerinde artış görülen patofizyolojik durumlar ve artış düzeyi (Böger, 2006).

Hastalık	ADMA Düzeyi
Kronik Böbrek Hastalığı	2-7 kat
Çocukluk Çağı Hipertansiyonu	2,3 kat
Periferik Arter Hastalığı	2-3 kat
Hiperkolesterolemi	2 kat
Kronik Kalp Yetmezliği	2-3 kat
Preeklampsi	2 kat
Hipertansiyon	2 kat
Hiperhomosisteinemi	2 kat
Pulmoner Hipertansiyon	2-3 kat
Kararlı Koroner Arter Hastalığı	2 kat
İnme	2 kat
Tip II DM	2-3 kat
Hipertiroidizm	2 kat
İnsülin Direnci	2 kat
Karaciğer Yetmezliği	2 kat
Erektil Disfonksiyon	2 kat
Akut Koroner Sendrom	2-3 kat

1.2.2.6. ADMA ve Nitrik Oksit İlişkisi

ADMA, endojen olarak sentez edilir. ADMA ve L-NMMA, NOS'un endojen inhibitörleri olarak bilinmektedir. Vasküler tonus ve sağlıklı yapının korunması için endotel tabakasından salınan vazoaktif mediatörlerin fonksiyonları önemlidir, bu mediatörlerin en önemlilerinden biri nitrik oksit'tir. Nitrik oksit, NOS enziminin 3 izoformu (endotelyal, nöronal ve makrofajlardaki uyarılabilir formları) tarafından sentezlenir. ADMA ve arjininin, NO sentezinin idamesinde kritik rolleri vardır. NO trombosit adezyon ve agregasyonunda rol alır. ADMA, SDMA ve L-NMMA, endotelyal hücrelerin içerisine Y taşıyıcı protein vasıtasıyla girerler. Metilarjininler birbirleriyle ve arjinin ile hücreye giriş için yarışırlar. Yüksek konsantrasyonda bulunan ADMA, L- arjininin hücre içine transportunu engelleyerek de NO

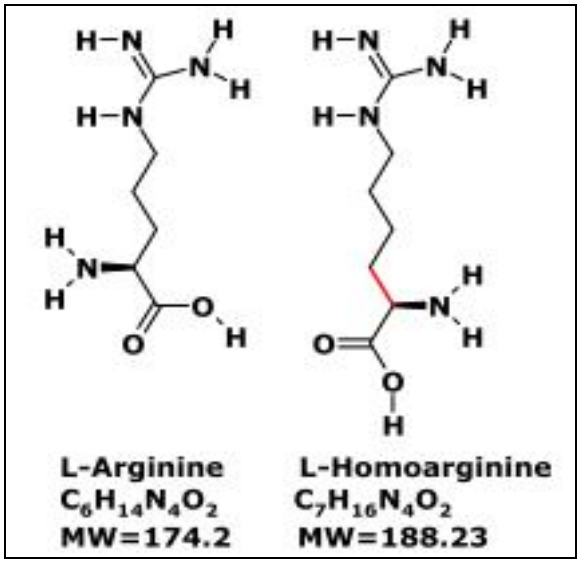
sentezini azaltır. Çeşitli klinik olgularda ADMA düzeyinin kontrol grubuna göre durumu aşağıdaki tabloda verildiği gibidir (Çizelge 1.2.)

Çizelge 1.2. Çeşitli klinik olgularda ADMA konsantrasyonlarının kontrol grubuna göre durumu (Erdem ve Ünlü, 2009)

Hastalık	Artış oranı
Hiperkolesterolemi	2-3 kat
Hipertrigliseridemi	2 kat
Hipertansiyon	2 kat
Preeklampsi	2 kat
Periferal Damar Hastalığı	2-4 kat
Kronik Böbrek Yetmezliği	2-12 kat
Kronik Kalp Yetmezliği	2-3 kat
Tip II Diabetes Mellitus	2 kat

1.2.3. L-Homoarjinin

L-Homoarjinin ($C_7H_{16}N_4O_2$), L-arjinin'den daha uzun bir karbon zinciri olan fazladan bir CH2 grubu içeren bazik, saf olmayan katyonik bir amino asittir, L-arjinin'in homoloğudur (Şekil 1.13). L-lizin 'den L-arjinin glisin-amidinotransferaz (AGAT, EC 2.1.4.1) enzimi tarafından transaminasyon yoluyla oluştuğu varsayılır (Ryan ve Wells,1964; Ryan ve ark., 1969). L-arjinin'e yapısal benzerliği göz önüne alındığı zaman, L-homoarjinin ve arjinin metabolizması ile etkileşebilir ve sinyalizasyonu kesintiye uğratabilir (Leiper ve Wallance, 1999; Moncoda ve ark.,2002). L-homoarjinin, L- arjinin'den NO üreten nitrik oksit sentaz (NOS) için bir substrattır ve NOS'un yarışmalı inhibitörü olarak görev yapar. Bu nedenle, L-homoarjininin NOS'un aktif alanına bağlanması için L-arjinin ile yarışması, endotel fonksiyonunu etkileyebilir.



Şekil 1.13. L-Homoarjinin ve L-arjinin kimyasal yapıları, molekül formülleri ve moleküler ağırlıkları (MW) (Kayaçelebi ve Beckmann, 2014).

Bununla birlikte, arjinin ile karşılaştırıldığında, homoarjininin Km değeri, homoarjinini substrat olarak kullanan NOS'un daha düşük bir katalitik verimliliğini yansıttığından daha yüksektir. Bu nedenle, NO üretimi, yüksek bir homoarjinin / arjinin oranında azalabilmektedir. Kardiyovasküler hastalıkla ilişkili olarak, yüksek veya düşük L-homoarjinin düzeylerinin faydalı olup olmadığı belirsizliğini korumaktadır. Son zamanlarda, plazmada düşük L-homoarjinin seviyeleri, büyük bir kohort çalışmada kardiyovasküler mortalite ve inme ile ilişkilendirilmiştir. Buna karşın, pekçok sayıda çalışma düşük seviyelerinden ziyade yüksek homoarjinin seviyelerinin, ADMA plazma konsantrasyonları ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Davids ve ark.,2012).

Hiperornitinemi, hipersitrülinemi ve hiperammoniemi gibi çeşitli metabolik hastalıkların varlığında L-homoarjinin ve L-homositrülin atılımı idrarda artmış bulunmuştur (Walser ve ark., 1983). Marz ve ark.,'nın (2010) yakın zamanda yapmış oldukları bir çalışmada, düşük homoarjinin plazma konsantrasyonlarının kardiyovasküler hastalıklarla ile ilişkili olduğu ve hepsinin koroner anjiyografi veya hemodiyaliz uygulanan hastalarda mortaliteye neden olduğu ileri sürülmüştür (Marz ve ark., 2010). Özellikle, NOS'un inhibisyonun yanısıra ADMA, SDMA ve MMA'nın oluşumu hücrelerde meydana gelir ve bu nedenle kardiyovasküler

hastalığın tahmini için ADMA, SDMA, MMA, L-arjinin ve L-homoarjininin hücre içi seviyeleri plazma düzeylerinden daha önemli olabilir (Teerlink,2005).

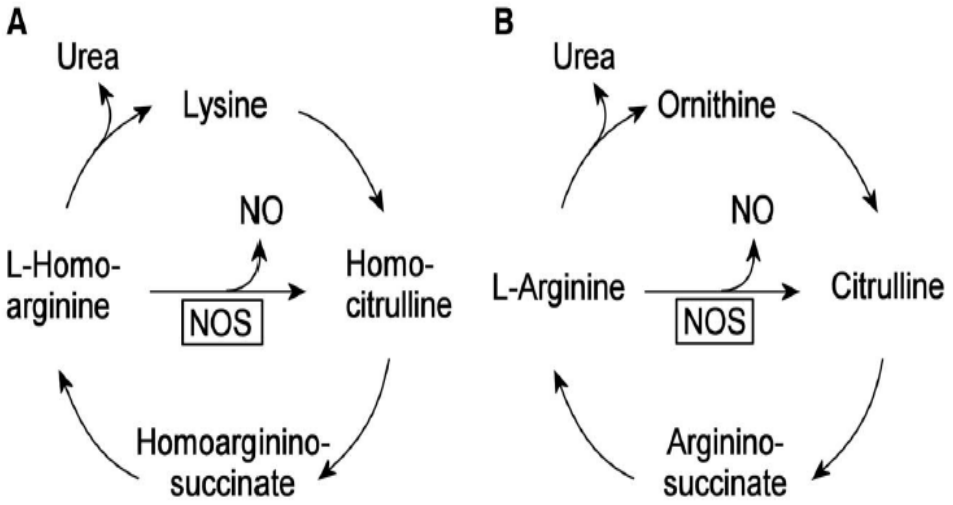
1.2.3.1. Tanım ve Tarihçe

L-homoarjinin yapısal olarak L-arjinin ile ilişkili, in vivo L-arjinin/NO metabolizmasına müdahale etme potansiyeli olan nonproteinogenik bir aminoasittir. Molekül ağırlığı 188.228 g.mol‘dür. L-homoarjinin, incelenen tüm vücut sıvıları ve organlarında (örneğin serum, idrar, beyin-omurilik sıvısı, karaciğer, böbrek ve beyin) az miktarda tespit edilmiştir, ancak işlevi henüz net olarak aydınlatılamamıştır (Valtonen ve ark., 2008). Dolaşımdaki konsantrasyonları çeşitli popülasyonlara dayalı çalışmalarda, tek-nükleotit polimorfizmleri (SNPs) ile ilişkilendirilmiştir. Gutenberg Sağlık Çalışması’nda genom düzeyinde ilk olarak L-homoarjinin plazma konsantrasyonları ve 15. kromozom üzerindeki AGAT geni ile ilişkili SNP ler arasında bir ilişki tespit edilmiştir. Bu çalışma, homoarjinin ile AGAT enzimi arasındaki fare ve insan verileriyle yapılan ilk çalışmadır (Choe ve ark., 2013).

LURIC (Ludwigshafen Risk ve Kardiyovasküler Sağlık)’in araştırması kapsamında hastalar ve Yang Fin’s çalışmasında katılımcıların genom birliği çalışması AGAT geni ile ilişkili dolaşımdaki L-homoarjinin ve SNP’ler arasında güçlü bir ilişki olduğunu doğrulamıştır (Kleber ve ark., 2013).

1.2.3.2. Homoarjinin Yapısal Özellikleri

ADMA ve H-Arg, NOS üzerindeki spesifik bağlanma bölgeleri için arjinin ile rekabet ederler (Moali ve ark., 1998). Yapılan birkaç çalışmada L-arjinine ek olarak L-homoarjinin’in NOS tarafından NO üretimi için bir substrat olarak hareket edebildiği gösterilmiştir (Şekil 1.14) (Valtonen ve ark., 2008).



Şekil 1.14. Üre döngüsünde L-homoarjinin (A) ve L-arjinin (B) 'nin paralel biyokimyasal reaksiyonlarının şeması (Valtonen ve ark., 2008).

Böylece, L-homoarjinin en az 3 nedenden dolayı ilginç bir bileşik olarak düşünülebilir. İlk olarak, L-homoarjinin, NO salınımının düzenlenmesinde bir rol oynayabilir ve L-arjinin gibi, bir vazodilatatör olduğu bilinmektedir. İkincisi, daha önceki araştırmalar, katyonik amino asitlerin, transport mekanizmaları yoluyla hücresel L-arjinin alımını değiştirerek endotelyal hücrelerde NO üretimini modüle edebildiğini göstermiştir. Üçüncüsü, L-homoarjininin seviyesinin bir dizi fizyolojik ve patolojik koşulda değişmediğine inanılmaktadır. Bu nedenle, ADMA'nın preeklampsi de dahil olmak üzere birçok patolojik durumda rolünü değerlendiren çalışmalarda bir iç standart olarak kullanılmıştır (Bhardwaj ve Moore, 1989 ; Khan ve ark.,1999).

HArg, NOS için alternatif ancak daha az etkili bir substratken, ADMA doğrudan nitrik oksit sentazlar için inhibitör görevi görür. ADMA, SDMA ve H-Arg, hücre içine transport için arjinin ile yarışırlar ve bu nedenle, NOS için mevcut olan arjinin miktarını da sınırlayabilirler (Closs ve ark.,1997). NO sentaz aracılığıyla L-arjininden endojen vazodilatatör nitrik oksit (NO) üretimi L-homoarjinin, L-monometil-arjinin (MMA), asimetrik dimetilarjinin (ADMA) ve simetrik dimetilarjinin (SDMA) ile modüle edilir (Davids ve ark., 2012).

Atzler ve arkadaşları tarafından 2014 yılında Almanya Pomerania'daki sağlıklı bireylerin katıldığı çalışmada serum L-Homoarjinin referans değerleri

Erkek = 1.41 - 5.00 mmol/L
Kadın = 1.20 – 5.53 mmol/L olarak bildirilmiştir (Atzler ve ark.,2014).

H-Arg ile ilgili olarak literatürde, nefronun renal tübüllerinde sistem y+ transport aracılığıyla makula densa hücrelerine alımı için homoarjinin'in arjinin, l-ornitin ve l-lizin ile rekabet ettiği "alternatif üre siklusu" maküla densa nitrik oksit sentazının ekspresyonunda ve düzenlenmesi çalışması dışında klinik olarak yararlı olduğuna dair kanıt bulunmamaktadır (Closs ve ark.,1997).

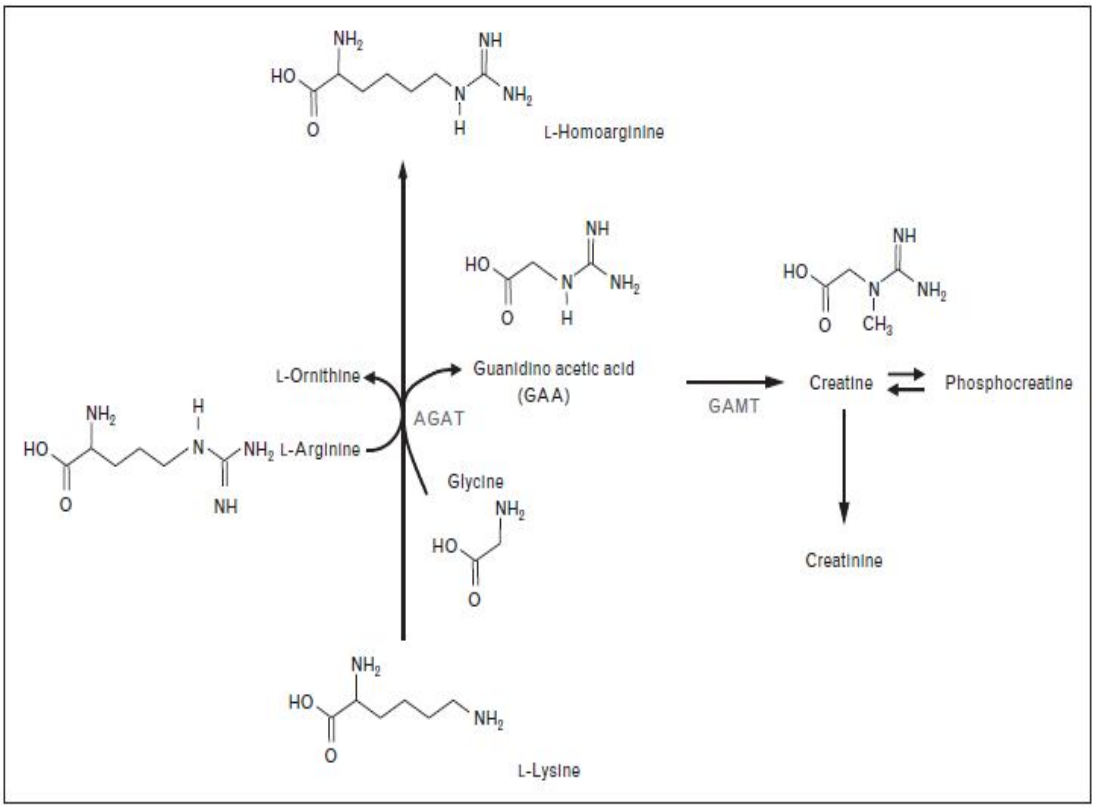
Bununla birlikte, kinetik analizler L-arjininin L-homoarjinine göre NOS enzimine 2 kat daha hızlı bir maksimum bağlanma oranı sergilediğini ve dolaşımda büyük bir L-arjinin fazlalığı olduğunu ortaya çıkarmıştır, bu nedenle L-homoarjininin fonksiyonel rolü NO bağımlı endotel vazodilatasyonunda sadece küçük bir önem taşımaktadır (Bird ve ark., 2003).

1.2.3.3. Homoarjinin Yıkım ve Sentezi

Son birkaç yıldır kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıkların klinik akıbetinde, umut vaad edici bir biyolojik belirteç olarak endojen ve nonproteinogenik aminoasit L-homoarjinin ortaya çıkmıştır (Atzler ve ark., 2015). Bu bağlamda, insanda ve farelerde L-homoarjinin'in sentezinden sorumlu bir enzim olan AGAT enzimi üzerine yeni bir ışık tutulmuştur (Choe ve ark.,2013).

Yakın zamana kadar, AGAT enziminin bilinen tek fonksiyonu glisin'den guanidoasetat ve ara ürün olarak kreatin sentezi idi. L-homoarjininin sentezindeki rolü fonksiyonu homoarjinin kaynakları fizyolojisi ve klinik etkisi ile ilgili mevcut bulgular hakkında tartışılmaya devam edilmektedir.

Böbrekte AGAT enzimi, L-arjinin'in guanido grubunu glisin'e transfer ederek gunidoasetat ve ornitin üretimini katalizler (Şekil 1.15)(Atzler ve ark., 2015).
Karaciğerde ise, guanidoasetatın metilasyonu guanidoasetat N-metil transferaz (GAMT, E.C 2.1.1.2) tarafından katalizlenir ve bu şekilde de kreatin oluşur (Brosnan ve ark., 2011).



Şekil 1.15. Homoarjinin ve kreatin metabolizması şeması (Atzler ve ark., 2015).

1.3. Gebelik Dönemi Hakkında Genel Bilgi

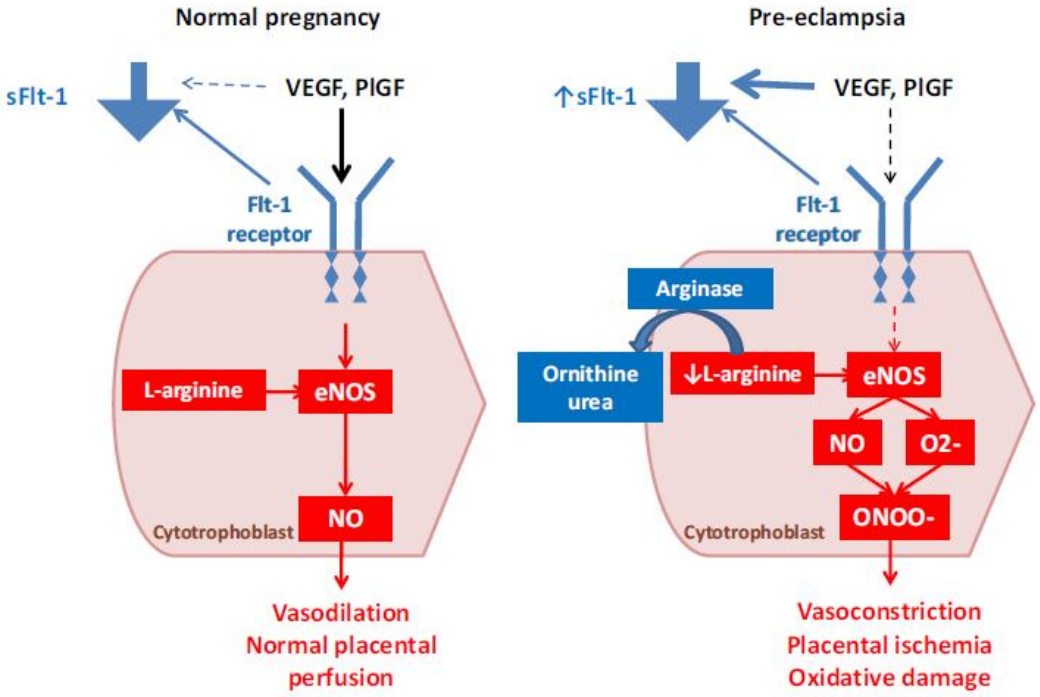
Gebelik süresi en son menstruasyonun ilk günü itibariyle dokuz ay 10 gün veya 40 hafta ya da 10 lunar aydır (Taşkın, 2010). Sağlıklı bir gebelik, tahmin edilebilir herhangi bir risk olmaksızın şu anda ya da geçmişinde herhangi bir gebelik komplikasyonunun bulunmayışı, ciddi maternal hastalığının bulunmaması, evvelinde maternal mortalite veya morbidite hikayesinin bulunmayışı ve yeterli fetal büyümenin olması olarak ifade edilir (Yates, 2011).

Gebelik, uterin kan akımı ve kardiyovasküler sistem anatomisinde ve fonksiyonunda meydana gelen bazı değişimlerle karakterizedir ve bu vasküler adaptasyon henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Vazokonstriktörler için azalmış vasküler cevap ve vazodilatörler için artmış cevap gebelik ilişkili artmış uterin kan akımının altında yatan sebep olarak ileri sürülmektedir.

Normal gebelik, gelişmiş vazodilatasyon içeren derin hemodinamik değişikliklerle ilişkilidir.

2005 yılı Ulusal Anne Ölümleri Araştırması'na göre anne ölümlerinin %21.2'si dolaylı, %78.8'i doğrudan sebeplerden meydana gelmiştir. Anne ölümlerinde doğrudan nedenlerden ilk üç sırayı kanamalar (%25.3), preeklampsi/eklampsi (%18.4) ve enfeksiyonlar (%4.6) almaktadır. Dolaylı anne ölüm sebepleri arasında ise kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklar en büyük paya sahiptir. Gelişmekte olan ülkelerde kanama ve hipertansif hastalıklar anne ölümlerinin en büyük kısmını oluşturmakta olup kanama Afrika'da anne ölümlerinin %4'ünü, Asya'da %31'ini oluşturarak birinci sırada yer almaktadır (Wenstrom, 2005).

Gebelikte plazma nitrat/nitrit seviyeleri artmaktadır. Normal gebelik (NG) boyunca plasental mitokondrinin metabolik aktivitesi artar. Böylece NG'likte plasenta ROS ve reaktif nitrojen türleri oluşturur. Riskli gebeliklere de aynı artmış seviyeler eşlik eder. Paralel olarak, riskli gebeliklerde plasentadaki amino asit taşıyıcılarının değişen ifadesi de bulunmuştur. Bu bakımdan, serbest radikallerden kaynaklanan NO ve süperoksit, plasental sinsityotrofoblast amino asit alımını ve in vitro sodyum (Na^+) geçirgenliğinin artışını bozar. Düşük arjinin seviyelerinin oksidatif strese katkıda bulunduğu ve preeklampsi oluşumunu tetiklediği bilinmektedir (Şekil 1.16). Plasentadaki bu fazlalık nedeniyle, NO ve süperoksit, potansiyel bir prooksidan olan peroksinitrit oluşumu için etkileşebilir. Peroksinitrit oluşumu fizyolojik fonksiyonları etkileyen plasental NO seviyelerini değiştirecektir. Nitratif stres varlığı fetal plasentanın azalmış vasküler reaktivitesi ile bağlantılıdır. Plasentada birçok NO_3 proteini bulunmuştur. Plasental proteinlerin nitrasyonu NG'likte vardır fakat patolojik gebeliklerde seviyeleri artmıştır (Huang ve ark., 2012).



Şekil 1.16. Normal gebelik ve preeklampsinin patogenezinde L-arjinin ve nitrik oksit arasındaki etkileşim (Noris ve ark.,2005).

1.3.1. Riskli Gebelikler

"Risk", bir ya da daha fazla faktörün varlığı ile istenmeyen durumların. oluşma olasılığı şeklinde ifade edilirken "gebelik açısından risk", normal koşullar altında gerçekleşmesi beklenmeyen fakat daha öncesinden mevcut bulunan veya gebelikte gelişebilecek bazı komplikasyonların oluşma olasılığı olarak tanımlanmaktadır (Kuru, 2007). Diğer bir deyişle bir gebeliğin anne ve bebek açısından kötü sonuçlarının olma sıklığı, normal popülasyondan daha fazla ise; o gebelik ''Riskli Gebelik'' olarak adlandırılır (Reddy ve Wapner, 2007).

Gebelik her ne kadar fizyolojik bir süreç olsa da, riskler bu süreç tamamlanıncaya dek devam etmektedir. Gebe kadınların yaklaşık olarak %19,8'i nin gebelikte sağlıkla alakalı sorun yaşadıkları bildirilmiştir. Risk maternal veya fetal olabilir. Annelerin gebelikte en sık yaşadıkları problemler; kardiyolojik problemler (%4,5) ,toksoplazma infeksiyonu (%4,5), gestasyonel diyabet (%9,1), bel ağrısı (%9,1), üriner sistem enfeksiyonu (%9,1), hipertansiyon (%13,7), bulantı ve kusma (%18,2), ve erken doğum riski (%22,7) olarak belirtilmiştir (Turan ve ark.,2008).

Başka literatürlere bakıldığı zaman gebelikte risk faktörleri açısından farklı detaylarda sınıflamalar karşımıza çıkmakla beraber,

Gebelikte risk faktörleri 3 ana başlık altında toplanabilir:

1. Sistemik durumlar ve genel sağlık durumlarını içeren hazırlayıcı risk faktörleri
2. Emosyonel ve psikolojik olguları içeren davranışsal ve sosyo-ekonomik faktörler
3. Obstetrik durumlar (Yates, 2010).

Gebelik aşağıdaki durumlarda riskli hale gelir:

1. Enfeksiyonlar (Hem anne, hem fetüsü etkileyebilir)

- Annede HIV, sitomegalovirüs, parvo virüs gibi çeşitli enfeksiyonlar olması

2. Annenin sistemik hastalıkları

- Annede yüksek tansiyonla giden hipertansif bozukluklar(preeklampsi/eklampsi)
- Diyabet
- Epilepsi
- Otoimmun hastalıklar
- Kanda pıhtılaşma bozukluğu

3.Erken doğum riski olan gebelikler

- Çoğuk gebelikler
- Rahim ağzı yetmezliği teşhisi alan gebelikler

4. Erken doğum eylemi başlamış olan gebelikler

5. Plasental patolojiler

6. Fetusla ilgili problemler

- Kromozomal bozukluklar(Down sendromu gibi trizomiler)
- Anatomik bozukluklar
- Kardiyak anormallikler
- Kan hastalıkları
- Anne karnında gelişim geriliği
- Genetik sendromlar
- Enfeksiyonlar (Burgin, 2008).

Normal başlamış olan gebeliklerin herhangi bir döneminde maternal ya da fetüs kaynaklı problemler meydana gelebilir.

%2-3 bebeklerde anomali,sakatlık,

%7-10 abortus-erken doğum olabilir.

%5-7 preeklampsi gelişebilir.

%1-6 kromozom anomalisi,

%5-6 IUGR (fetusta gelişme geriliği)meydana gelebilir (Burgin, 2008).

Tüm gebeliklerin yaklaşık %5' ini kapsayan ve yüksek derecede risk oluşturan preeklampsi klinik ve oldukça komplike bir hastalık olup, perinatal ve maternal morbidite ve mortaliteden sorumludur (Duley, 2009). Preeklampsinin patofizyolojisinde anormal plasentasyon, azalmış plasenta perfüzyonu, oksidatif stres, aşırı inflamatuvar yanıtlar ve tekrarlı endotelyal disfonksiyon gibi klinik belirtiler tespit edilmiştir fakat bunların nasıl bir rol oynadığı henüz tam olarak açıklanamamıştır. (Tamás ve ark.,2009).

1.3.2. Gebelik Döneminde İkili Tarama Testi

10. ve 14. gebelik haftasında 2 farklı biyokimyasal belirteç kullanılarak yapılan özellikle Down Sendromu gibi kromozom bozukluğu olan trizomilerin saptanmasını sağlayan ilk trimester tarama testidir. Erken prenatal tanı yönetimine imkan sağlayan ilk trimester tarama testleri 1995 yılından itibaren uygulanmaya başlanmış, günden güne yaygınlaşarak kullanımına devam edilmiştir.

Bu tarama testinde biyokimyasal ve sonografik belirteçler kombine kullanılır. Maternal serumda pregnancy associated plazma protein A (PAPP-A) ve serbest insan

koryonik gonadotropini (free βhCG) ölçülür. Bu ölçümler çoklu ortalama (MOM) ile ifade edilir. DS gebeliklerde maternal serumda PAPP-A seviyelerinde azalış söz konusudur. Gebelik haftası ilerledikçe ikili tarama duyarlılığını kaybeder en duyarlı hafta 10. haftadır. Kombine taramanın DS yakalama oranı yaklaşık % 85, yanlış pozitifliği ise % 5'tir (Wenstrom, 20015).

1.3.2.1. Serbest Beta hCG (f β-hCG)

Serbest Beta hCG, karbonhidrat yan zincirleri taşıyan glikoprotein yapılı bir hormondur. Plasenta tarafından glikozillenir ve böylece bu proteinin yarı ömrü uzatılır. Alfa ve beta subünitleri mevcuttur. Alfa subüniti LH, FSH, ve TSH'nın alfa subünitleriyle aynıdır (Stenman ve ark., 2006). β-hCG sitotrofoblastlardan salgılanır ve %1' den daha azı serbest formda bulunur. (Tanrıverdi ve Çınar, 2006). β- hCG'nin gebelik döneminde en önemli rolü luteo-plasental shift olana kadar korpus luteumun fonksiyonlarını sürdürebilmesi için gereksinimi olan hormonal uyarıyı sağlamasıdır (Stenman ve ark., 2006).

Gebelik varlığında beklenen regl tarihinde anne kanında β-hCG 100 IU/L düzeylerinde iken, 8 ila 10. gebelik haftaları arasında 100.000 IU/L maksimum konsantrasyondadır. 18 ila 20. gebelik haftalarında düzeyleri 10.000-20.000 IU/L'ye kadar düşüş gösterir. İkinci trimesterde seviyesinin neden düştüğü konusunda bilinmezlik söz konusudur. DS'li gebeliklerde, ilk ve ikinci trimesterde serbest β-hCG düzeyleri normal fetüs taşıyan gebeliklere oranla daha yüksektir (Stenman ve ark., 2006; Tanrıverdi ve Çınar, 2006). DS'li gebeliklerde bu belirtecin MoM düzeyleri gebelik haftasına göre değişkenlik gösterse de yapılan çalışmalarda elde edilen bulgulara göre β-hCG yaklaşık 2,0 MoM olarak bildirilmiştir (Malone ve ark., 2001; Zournatzi ve ark., 2008).

1.3.2.2. Pregnancy Associated Plasma Protein-A (PAPP-A)

PAPP-A ,1974'te gebe kadınların kanında yüksek seviyelerde bulunan ve plesanta kaynaklı olduğu tahmin edilen dört proteinden biri olarak izole edilmiştir (Lin ve ark., 1974). Biyolojik fonksiyonu 25 yıl bilinmemesine rağmen bu belirteç gebelerde Down sendromu taramasında kulanım alanı bulmuştur (Wald ve ark.,

1999). 1990'lı yıllarda birçok laboratuvar hücre kültürlerinde Insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4) karşı proteaz yeteneğine sahip bir proteindir (Conover ve ark., 1993; Parker ve ark., 1995).

Lawrence ve ark. 1999'da, IGF'ye bağımlı IGFBP-4 proteazının insan fibroblast kültür ortamından izole edildiğini ve PAPP-A olarak tanımlandığı rapor ettiler (Lawrence ve ark., 1999). Daha ileriki zamanlarda, PAPP-A'nın sadece gebelikle bağlantılı olmadığı ayrıca damar düz kasından, plesentada trofoblastlardan, yumurtalıkta granülosa hücrelerinden ve birçok hücre tarafından sentezlenebildiği gözlendi (Lawrence ve ark., 1999; Giudice ve ark., 2002). DS'li gebeliklerde MoM değerleri gebelik haftasına göre değişkenlik göstermesine rağmen yapılan araştırmalarda elde edilen bulgulara göre PAPP-A yaklaşık 0,45 MoM olarak rapor edilmiştir (Malone ve ark., 2001 ;Zournatzi ve ark., 2008).

1.3.3. Gebelik Döneminde Dörtlü Tarama Testi

15. ile 20. gebelik haftasında 4 farklı biyokimyasal belirteç kullanılarak yapılan bir ikinci trimester tarama testidir ve Down Sendromu (DS), Trizomi 13 (Patau Sendromu) ve Trizomi 18 (Edwards Sendromu) gibi kromozom anomalilerinin yanı sıra Nöral Tüp Defekti (NTD) açısından da risk saptanabilmektedir (Discroll ve Gross, 2009).

Trizomi 21'in saptanması maternal serum belirteçlerinin test edilmesi ile ilk defa 1984'de tanımlanmıştır (Cuckle ve ark., 1984; Merkatz ve ark, 1984). O dönemden itibaren trizomi 21 için maternal tarama testleri oldukça yaygın kullanılmaya başlanmıştır. Trizomi 18 tanılı gebeliklerde AFP, e3, HCG parametreleri düşük seviyededir. Üçlü test ile (AFP, e3, HCG) ile DS'li bebeklerin %40'ı taranamamaktadır. Bu nedenle dört test önerilmektedir (Marcus-Braun ve ark., 2009).

Tüm bu belirteçler, anne yaşına bağlı riskle kombine edildiği zaman, DS yakalama oranı yaklaşık % 65 ve yanlış pozitiflik oranının % 5 olduğu bildirilmiştir. Yine yakalama oranı yaklaşık %70'tir. Son yıllarda inhibin A'nın da eklenerek

oluşturulduğu dörtlü testle DS yakalama oranı % 80'e çıkmıştır. DS'li gebeliklerde inhibin A konsantrasyonlarının da yükseldiği bilinmektedir (Kuşkucu Çınar, 2010).

Çizelge 1.3. Down Sendromu (DS) tarama testleri ve yakalama oranları (Kuşkucu Çınar,2010)

Tarama testi	Yakalama oranı (%)	Yanlış pozitiflik (%)
İlk trimester		
• NT ölçümü	64-70	5
• NTölçümü + PAPP-A ve BhCG	82-87	5
İkinci Trimester		
• Üçlü Tarama (AFP, hCG, E3)	69	5
• Dörtlü Tarama (AFP, hCG, E3, InhA)	81	5
İlk ve İkinci Trimester		
• Entegre (NT, PAPP-A, dörtlü tarama)	94-96	5
• Ardışık		
1. Bağımsız	94-98	8
2. Aşamalı	95	3-5
3. Tesadüfi	90-95	3-5

1.3.3.1. İnhibin A

Dimerik inhibin A glikoprotein yapılı hormonun dolaşımdaki konsantrasyonu erken gebelikte artar, gebeliğin 12.haftasından sonra ise düşer ve 24.haftaya kadar düşük seviyelerdedir (Muttukrishna ve ark., 1995; Birdsall ve ark., 1997). Bundan sonra konsantrasyon yavaş yavaş artar ancak üçüncü trimesterde belirgin bir artış olur (Muttukrishna ve ark., 1995). Fetoplasental ünite gebelikte inhibin A'nın önemli bir kaynağıdır (Birdsall ve ark.,1997)

Yapılan çalışmalarda şiddetli preeklampsili kadınlarda maternal serum inhibin A konsantrasyonlarının anlamlı kontrollerine göre 10 kat yüksek bulunduğu gösterilmiştir (Muttukrishna ve ark., 1995).

DS taramasına yönelik yapılan retrospektif bir çalışmada, preeklampsi gelişen kadınlarda serum inhibin A konsantrasyonun 13-18 hafta arası yükseldiği tespit edilmiştir (Muttukrishna ve ark.,2000). DS'li gebeliklerde inhibin A'nın ortalama 1,77 MOM ve üzerinde olduğu bildirilmiştir (Malone ve ark., 2001).

1.3.3.2. Alfa Fetoprotein (AFP)

Merkatz ve ark., ilk kez 1984 yılında maternal serumda düşük alfa fetoprotein (AFP) düzeyleri ile Down Sendromu arasında ilişki olduğunu ve bu parametrenin 35 yaş altındaki gebe bireylerde DS tarama testinde kullanılabilecek biyokimyasal bir belirteç olduğunu rapor etmişlerdir. Serum AFP seviyeleri kromozom anomalilerinin pek çoğunda ve özellikle DS'li gebeliklerde eşik değerin altında bir düzeydedir. Bu düşük AFP seviyelerinin sebebi net olarak aydınlatılamamasına rağmen fetal hepatik gelişimin tamamlanamamış olmasının bir işareti olduğu fikri düşünülmektedir. Serum AFP ve anne yaşı parametresi kombine ele alındığında, 35 yaş altındaki gebelerde DS saptama oranı % 25-33 iken, yalancı pozitiflik oranı % 5 civarındadır (Marcus-Braun ve ark., 2009).

Biyokimyasal belirteçlerin değerleri, aynı gebelik haftasındaki maternal serumda ölçülen değerlerin ortalamasıyla hesaplanan çoklu ortalama ("Multiple of median", MoM) şeklinde ifade edilir. DS'li gebeliklerde maternal serumda AFP değeri, ortalama 0,74 MoM'a kadar iner (Malone ve ark., 2001).

1.3.3.3. Beta hCG

İlk olarak 1987'de Bogard ve ark. tarafından DS'li gebelerde insan koryonik gonadotropin (hCG) düzeylerinin normal gebelere kıyasla 2-2,5 kat arttığı bildirilmiştir. Bu artışın sebebi henüz net bir şekilde bilinmese de DS'li gebeliklerde plasental gelişim yetersizliği olarak düşünülmektedir. Aynı yıl içinde Wald ve ark., 77 DS'li fetus sahibi gebenin ikinci trimesterdaki hCG düzeylerini değerlendirmiş ve hCG ile anne yaşı değerlerinin kombine değerlendirmesinde DS'li bebeklerin yaklaşık olarak % 60'ının belirlenebileceğini ve yalancı pozitiflik oranının ise % 6.7 olduğunu bildirmişlerdir (Marcus-Braun ve ark., 2009; Önderoğlu ve ark., 1996). Bu gözleme dayalı olarak ve gebelik esnasında AFP düzeyleri artarken hCG düzeyleri

aynı anda azalmaktadır. DS'li gebeliklerde hCG'nin ortalama 2,06 MoM'un üzerine çıktığı bildirilmiştir (Malone ve ark., 2001).

1.3.3.4. Unkonjuge Estriol (uE3)

1988 yılında Canick ve ark., DS'li gebeliklerde maternal serumda unkonjuge estriol (E_3) seviyesinin de AFP gibi normal gebeliklere kıyasla düşük olduğunu bildirmiştir ve DS'li gebeliklerde E_3 ortalama 0,75 MoM veya altındadır (Önderoğlu ve ark., 1996).

1.3.4. ADMA ve Gebelik İlişkisi

Gebeliğin ilk trimesterında dolaşımda ADMA konsantrasyonları düşüş gösterir ve bu düşüş ilk trimesterda gözlenen kan basıncı azalışıyla korelesyon gösterir. Bu, aynı zamanda, feto-plasental birim içindeki ADMA konsantrasyonlarında bir düşüşü de yansıtıyorsa, NO üretimini artıracak ve trofoblast invazyonu ve sağkalım süresinin uzamasını teşvik edecektir (Prefumo ve ark., 2008). Normal bir gebelikte, gebe olmayan kadınlarda bulunan düzeylere kıyasla azalmış ADMA seviyeleri görülmektedir. Komplikasyonlu gebeliklerde örneğin preeklampside plazma ADMA konsantrasyonlarının yükselebileceği bildirilmiştir (Valtonen ve ark., 2008). ADMA' nın başlıca eliminasyon yolu DDAH enzimi tarafından karaciğerde parçalanmasıdır fakat renal hiperfiltrasyon gebelik esnasındaki düşük serum ADMA seviyelerinden sorumlu olabilir. DDAH enziminin böbrek glomerüllerinde ve tubuluslarında oldukça yüksek düzeylerde bulunmasından dolayı renal hiperfiltrasyonla böbreklere gelen ADMA düzeylerinde bir azalma gerçekleşiyor olabilir (Fliser, 2005).

ADMA konsantrasyonları normal gebelik süresinde azalmaktadır, fakat preeklampsili gebelerde yükselmektedir. Preeklampsi gelişiminden önce ADMA konsantrasyonlarının arttığı son zamanlarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Gebelik döneminde erken dönemde ADMA seviyeleri yüksek olan kadınlarda ADMA düzeyleri ile endotelyal disfonksiyon arasında ilişki mevcuttur fakat bu, kadınlarda yalnızca preeklampsi gelişimi olarak görülmektedir (Vallance, 2004).

1.3.5. Homoarjinin ve Gebelik İlişkisi

Bugüne kadar, sağlık ve hastalıkta L-homoarjinin plazma konsantrasyonlarının raporlanması ve bunun insan patofizyolojisi ile ilişkisine dair çalışmalar nadirdir (Valtonen ve ark.,2008). İlk olarak Valtonen ve arkadaşları (2008) tarafından gebelik döneminde ilk ve ikinci trimesterda artmış homoarjinin plazma konsantrasyonları rapor edilmiştir (Valtonen ve ark.,2008).

Gebelikteki yükselmiş L-homoarjinin için bir açıklama, L-arjinin'in: östrojen tarafından indüksiyonundan sonra glisin amidinotransferaz geninin artmış ekspresyonu olabilir. Normal olarak, maternal östrojen konsantrasyonu, hamilelik sırasında büyük ölçüde artar ve östrojen, L-arjinin glisin amidinotransferaz geninin ekspresyonunu modüle ettiği gösterilmiştir.

Ryan ve arkadaşları yaptıkları çalışmada bir hayvan modeli kullanılarak L-arjinin glisin amidinotransferaz enzimin, rat böbreğinde lizinin ornitinin yerini aldığı, üre döngüsüne benzer reaksiyonlarda lizini L-homoarjinine dönüştürebildiğini göstermiştir (Ryan ve ark., 1969). L-homoarjinin gibi guanidinli amino asitlerin, proteinlere dahil edildiğinde lizinden daha kararlı oldukları da bilinmektedir. Guanidinli proteinler ile ilgili bir olasılık, L-homoarjininin karaciğer ve böbreklerdeki arginaz tarafından lizine dönüşmesi ve böylece lizin eksikliğinin önlenmesidir (Valtonen ve ark., 2008).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Çalışma Şekli ve Olgu Seçimi

Bu tez çalışması için Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 17 Mayıs 2016 tarih ve 2016/161 sayılı kararı ile onay alındıktan sonra Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne yazılı başvuru ile bütçe desteği talebinde bulunulmuştur.

Çalışmamız için Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi hastahanesinin Kadın Doğum Polikliniği'ne 2016 Mayıs ve 2017 Eylül ayları arasında başvuran ve muayene sonrası kendisinden ikili (PAPP-A, serbest βHCG) ve dörtlü tarama test (AFP, inhibin A, HCG, $uE_{3)}$ istemi yapılan gebe kadınlardan alınan kanlar kullanılmıştır. Tüm bireyler çalışmaya gönüllü olarak katılmak isteyen kişilerden seçilmiştir. Bu hastalardan alınan kanlardan istenen testler çalışıldıktan sonra kalan atık serumlar çalışmamızda kullanılmıştır. İkili test istemi yapılan hastalardan 50 normal, 50 riskli gebe, dörtlü test istemi yapılanlardan 50 normal 50 riskli gebe toplam 200 hasta çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmamızda bilinen herhangi bir kronik rahatsızlığı (diabetes mellitus, hipertansiyon, karaciğer, böbrek, kalp hastalıkları vs.) olmayan bireylerin kan örnekleri kullanılmıştır. Bilinen herhangi bir akut veya kronik rahatsızlığı olanlar, sigara ve alkol kullananlar ile çalışmaya katılmayı kabul etmeyenler dışlama kriteri olarak belirlenmiştir.

I. Hastaların çalışmaya alınma kriterleri;

- İkili ve dörtlü tarama testleri neticesinde taramada pozitif olan (riskli gebelik tanısı almış)
- Araştırmaya katılmak için gönüllü olan sağlıklı gebeler

II. Kontrol grubunun çalışmaya alınma kriterleri;

- Araştırmaya katılmak için gönüllü olan bireyler

- İkili ve dörtlü tarama testleri neticesinde taramada negatif olan (normal gebeler)

III. Hastaların ve kontrol grubunun çalışmaya alınmama kriterleri;

- Akut ve kronik karaciğer hastalığı olan bireyler
- Kronik böbrek yetmezliği olan bireyler (Glomerüler Filtrasyon Hızı 60
- ml/dk)
- Kanser öyküsü olan bireyler
- Diyabet tiplerine sahip hastalar
- Sigara kullanan bireyler
- Çoğul gebeliği olanlar
- Düzenli alkol ve ilaç kullanan hastalar
- Antiagregan, antikoagulan, antihiperlipidemik ilaç kullanan bireyler
- Hemolizli, lipemik ve bilirübinemik örnek çalışmaya dahil edilmedi.

2.1.2. Örneklerin Toplanması ve Saklanması

Çalışmaya alınan bireylerden ilk olarak sabah venöz kan örnekleri alınmıştır. Bu alınan kanlar antikoagülan içermeyen tüplere alınmış ve santrifüj edilerek serumları ayrılmıştır. Bu bireylerin hekimleri tarafından istenen testler çalışıldıktan sonra bireylerin kalan atık serumları ayrılarak yapacağımız biyokimyasal analizler gerçekleştirilinceye kadar -80°C' de saklanmıştır. Çalışmamızda hastalardan, hekimlerinin istediği testler için alınan kan örneklerinden başka ekstra kan örneği alınmamıştır.

Çalışmaya kabul edilen bireylerin, poliklinik muayeneleri sırasında tespit edilen yaş gibi demografik bilgileri, laboratuvar ölçümlerinde tespit edilen inhibin A, alfafetoprotein, HCG, unkonjuge östriol, PAPP-A ve serbest β-hCG değerleri veri kayıt formuna kaydedildi.

2.1.3. Kullanılan Reaktif ve Çözeltiler

1) ADMA Standart (Calbiochem, Lot: 311204, US)

2) ADMA İnternal Standart (d7-ADMA)
3) Arjinin Standart (Merck, 519- K 538944,Darmstadt Germany)
4) Homoarjinin Standart [Sigma: 1483-01-8 (lot: 010M1218V)]
5) HCl (Merck, K 25039614-814, Darmstadt Germany)
6) Metanol Metanol [Sigma: 34885-2,5L-R (lot: S2BD126SV)]
7) Asetonitril (gas chromatography SupraSolv® Merck Katalog. No: 1000172500, Almanya)
8) [2H7]- ADMA (Medical Isotopes Katalog No: DLM-7476-5, A.B.D)
9) Formik Asit (98-100% Suprapur® Merck Katalog No: 1116701000, Almanya)
10) Bütanol (Sigma Katalog No: W217808-1KG-K)

2.1.4. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

1) Santrifüj (Beckman Coulter AllegraTM X-2212) (ABD)
2) PH Metre (Radiometer Copenhagen PHM 92 Lab Ph Meter)
3) Millipore Filtre
4) Magnetik Bar, Magnetik Karıştırıcı.
5) Nuçe Erleni
6) Vorteks (Heidolph, Almanya)
7) Phenomenex Luna C18 50 x 2.1 mm (5 µm) kolon (HPLC Brand Katalog No: 00A-4040-B0 A.B.D).
8) Shimadzu LC-20AD system
9) Tandem MS (ABSCIEX API 3200) (Singapur)
10) HPLC { (SHIMADZU UFLC; DGU-20 A3 (degasser), LC-20 AD (A pompası) LC20 AD (B pompası) ve SIL-20 AC HT (oto sampler) }(Kyoto,Japonya)
11) Hassas terazi: Sartorius BP 110 S
12) Otomatik pipetler : Eppendorf Resarch 100 – 1000 µL, 20-200 µL
13) Örnek saklama tüpleri: Ependorf marka, 1,5 mL
14) Vakumlu tüpler: 9 mL serum pıhtı aktivatörlü, Venosafe Marka
15) Derin dondurucu : Sanyo Ultra Low (-80 º C)
16) Karıştırıcı: Stuart Scientific Magnetic Stirrer Hotplate.



Şekil 2.1. Laboratuvarımızda kullandığımız API 3200 marka kütle spektrometre (LC-MS/MS) cihazı

2.2. Yöntem

2.2.1. LC-MS/MS Metoduyla ADMA, Homoarjinin ve Arjinin Analizi

ADMA (Asimetrik Dimetil Arjinin) molekül ağırlığı: 202.26 $g.mol^{-1}$.
Arjinin molekül ağırlığı : 174.204 $g.mol^{-1}$.
Homoarjinin molekül ağırlığı : 188.228 $g.mol^{-1}$.

ADMA, homoarjinin ve arjinin ölçümlerinde Di Gangi ve ark.'nın (2010) yaptıkları çalışmadaki metot referans alındı, yeni birtakım düzenlemelerle modifiye edilerek ölçüm zamanı da kısaltıldı.

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

2.2.1.1. Mobil Faz A' nın Hazırlanması

1 litre HPLC grade su içerisinden 1 ml çekilip atıldı, üzerine 1 ml formik asit ilave edilerek mobil faz A hazırlandı.

2.2.1.2. Mobil Faz B'nin Hazırlanması

1 litre metanol içerisinden 1 ml çekilip atıldı, üzerine 1 ml formik asit ilave edilerek mobil faz B hazırlandı.

2.2.1.3. Mobil Fazların Filtrasyonu ve Degaze Edilmesi

Hazırlanan mobil faz 0,45 µm filtreler kullanılarak filtre edildi. Degaze işlemi su trombu ile sağlandı. Musluğa bağlı olan su trombu bir hortum vasıtası ile nuçe erlenine bağlandı. Nuçe erleni magnetik karıştırıcının üzerine yerleştirildi, magnetik bar mobil fazın içine kondu ve nuçe erleninin ağzı tıpa ile kapatılarak etrafı parafilmle sıkıca sarıldı ve böylelikle hava girişi engellendi. Musluk hafifçe açılıp, magnetik bar düşük devirde çevrilirken, 1-2 dakika içinde kabarcıklar görülmeye başlandı. Kabarcıklar kaybolunca musluk daha fazla açıldı ve karıştırıcının devri artırıldı. Hiç kabarcık oluşumu gözlenmeyene kadar işleme devam edildi, daha sonra çıkarılarak çalkalamadan cihazda uygun pompalara hortumlar vasıtasıyla bağlandı.

2.2.1.4. ADMA Standart Hazırlanması

ADMA stok standart solüsyonu (0.5mM) 0.1 M HCl içinde hazırlanıp buzdolabında saklandı. Stok solüsyonunun 0.1 M HCl ile dilüsyonuyla standart solüsyonu (50 µM) hazırlandı. Hazırlanan 50 µM standart solüsyondan 0.1M HCl ile dilüsyonlarla sırasıyla 1,5 µM, 0,75 µM, 0,375 µM, 0,185 µM, 0,0937 µM, olmak üzere standart çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan standartlar derivatizasyon işleminden sonra otomatik örnekleme cihazına konularak 40 µl enjekte edildi. Alınan pik alanlarıyla ADMA standart grafiği oluşturuldu.

2.2.1.5. Arjinin Standart Hazırlanması

Arjinin stok standart solüsyonu (1 mM) 0.1 M HCl içinde hazırlandı ve buzdolabında muhafaza edildi. Stok solüsyonunun .0.1 M HCl ile dilüsyonu ile standart solüsyonu (500 µM) hazırlandı. Hazırlanan 500 µM standart solüsyondan 0.1 M HCl ile dilüsyonla sırasıyla 250 µM, 125µM, 62,5 µM, 31,25 µM, 15,56, 7,78 µM olmak üzere standart çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan standartlar derivatizasyon işleminden sonra otomatik örnekleme cihazına konularak 10µl enjekte edildi. Alınan pik alanlarıyla arjinin standart grafiği oluşturuldu.

2.2.1.6. Homoarjinin Standart Hazırlanması

Homoarjinin (hArg) stok standart solüsyonu (0.5mM) 0.1 M HCl içinde hazırlandı ve analizlere kadar buzdolabında saklandı. Stok solüsyonunun 0.1 M HCl ile dilüsyonu ile standart solüsyonu (50 µM) hazırlandı. Hazırlanan 50 µM standart solüsyondan 0.1M HCl ile dilüsyonlar ile sırasıyla 5 µM, 2,5 µM, 1,25 µM, 0.625 µM, 0.312 µM, 0.156 µM olmak üzere standart çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan standartlar derivatizasyon işleminden sonra otomatik örnekleme cihazına konuldu ve 10 µl enjekte edildi. Alınan pik alanlarıyla homoarjinin standart grafiği oluşturuldu.

2.2.1.7.Türevleştirici Reaktif Hazırlanması

Bir cam beher veya erlene 19 ml bütanol konuldu. Üzerine 1 ml asetilklorid eklenerek türevleştirici reaktif hazırlandı.

2.2.1.8. Çözdürücü Reaktif Hazırlanması

18 ml HPLC grade distile su alınarak bir cam beher veya erlene konuldu. Üzerine 2 ml metanol eklendi. Bu karışımdan 20 µl çekilip atıldı. Üzerine 20 µl formik asit eklenerek çözdürücü reaktif hazırlandı.

2.2.1.9. Numune Hazırlanması ve Ölçümü

Çalışma gününde -80 °C'de saklanan serumlar eş zamanlı olarak çözündükten sonra Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Metabolizma Laboratuvarında ADMA ve homoarjinin düzeyleri Shimadzu LC-20AD system MDS SCIEX(USA)
API 3200 kütle spektrometre cihazında analiz edildi.

a. -80 °C'de ependorf tüplerinde stoklanmış olan serumlar çözünmesi için oda sıcaklığında bekletildi. Çözünen serumların homojenliği sağlamak için 3-5 saniye vorteks edildi.

b. 200 µL serum örneğinin üzerine 100 µL metanol içerisinde çözülmüş iç standart (d7-ADMA) eklendikten sonra 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj ile çöken proteinler uzaklaştırıldı.

c. Süpernatant temiz bir tüpe alınıp 60 ^{0}C de azot gazı altında uçuruldu.

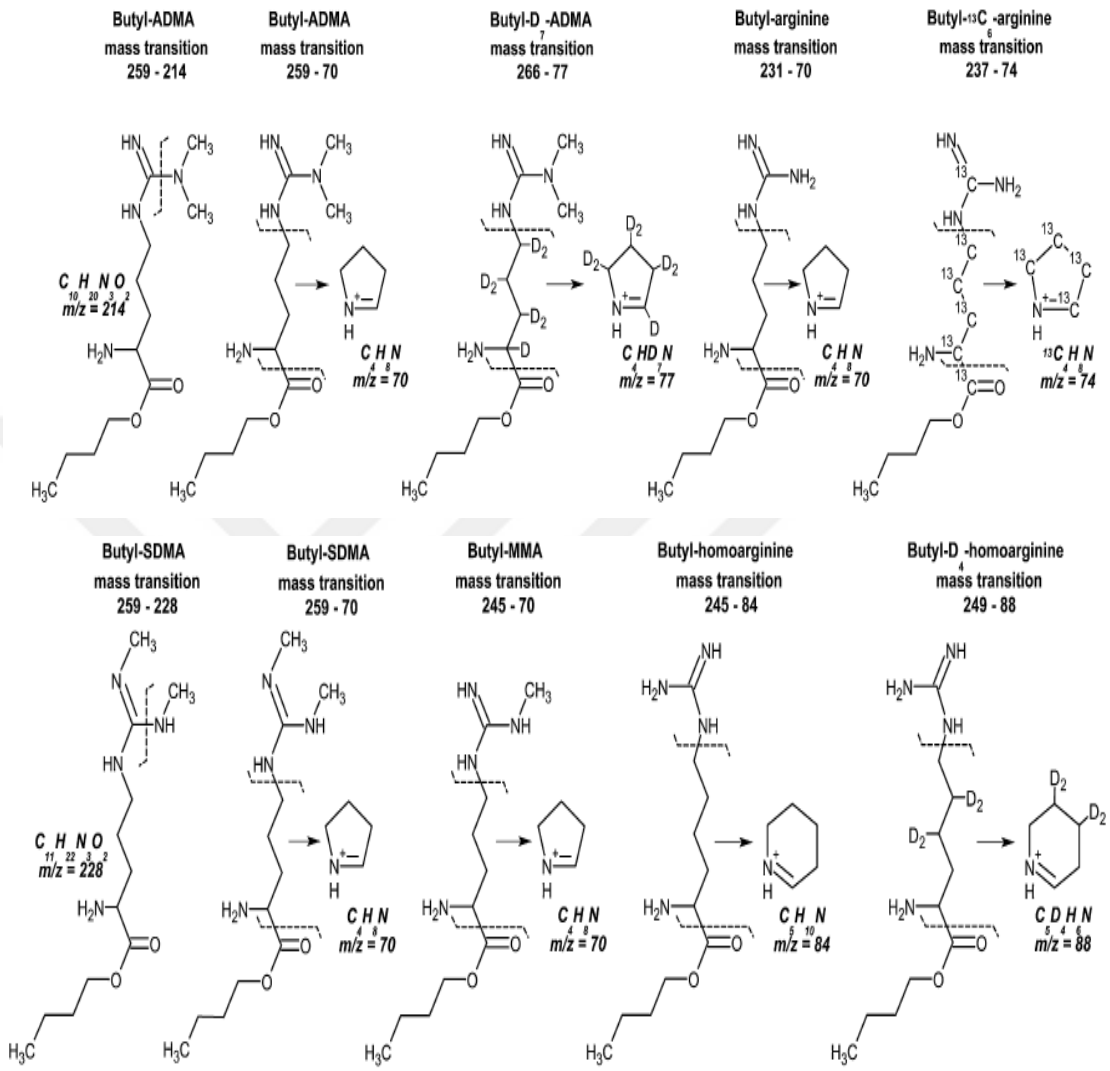
d. Türevleştirme işlemi için taze hazırlanmış 200 µL %5 (v v−1) lik bütanol/asetil klorid solüsyonu eklenip 60'^{0}C de 20 dakika sıcakta bekletildi. Tekrar 60 ^{0}C'de azot gazı altında solvent uçuruldu.

e. Çözdürme işlemi %0.1 (v v−1) formik asit içeren 100 µL su–metanol (90:10, v v−1) ile gerçekleştirildi.

f. Analitik kolona 40 µL enjeksiyon yapıldı. Bu metodun gün içi ve günler arası değişkenlik (CV) değerleri sırasıyla % 8.6 ve % 10.1 idi.

g. Serum ADMA, SDMA, L-NMMA, homoarjinin, arjinin ve sitrülin düzeyleri Shimadzu LC-20AD (Japonya) yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile eşlenmiş Applied Biosystems MDS SCIEX(USA) API 3200 marka kütle spektrometre (LC-MS/MS) cihazında elektrosprey iyonizasyon (ESI) tekniği kullanılarak pozitif mod ile ölçüldü. Kromatografik analiz Phenomenex Luna C18 marka kolon ile

modifiye edilmiş bir metot ile gerçekleştirildi (Di Gangi ve ark 2010) (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. ADMA, SDMA, MMA, L-arjinin ve L-homoarjininin bütillenmiş formlarının yapıları, fragmanları ve iç standartlar D_7-ADMA, $13C_6$-L-arjinin ve D_4-L-homoarjinin

(Kütlesel geçişler, analitlerin protonlanmış formlarına ve fragmanlarına dayanır. ADMA ve SDMA benzersiz bir parça üretir(ADMA için m / z = 214 ve SDMA için m/z = 228), ancak daha yüksek yoğunluklu bir sinyali olan ortak bir parçayı (m/z = 70) paylaşmaktadırlar. Ortak parçanın ölçümü için fragmanın kromatografik ayırımı şarttır).

2.2.1.10. ADMA Ölçümü İçin LC-MS/MS Değerleri

Çalışmada kullanılan LC-MS/MS cihazında ayarlanan ADMA metot özellikleri aşağıda verilmiştir.

Kromatografi için;
Pompa Modu Binary Flow
Total Akış 0.8000 mL/min
Enjeksiyon volume 40.00 uL
Analiz süresi 5 dk
Kolon Phenomenex Luna C18 colon
Mobil faz A Grade su+1 mL formik asit=1L
Mobil faz B Metanol ve 1 mL formik asit=1L
Kütle spektrometresi için;
Ion Source Gas1 (GS1) 40.00
Ion Source Gas2 (GS2) 60.00
Ionisation Mode Pozitif
Entrance Potential (EP) 7.5
Collision Cell Exit Potential (CXP) 4.00
Ionspray Voltage (IS) 5500.00
Declustering Potential (DP) 40.00
Collision Gas (CAD) 5.00
Collision Energy (CE) 24.00
Temperature (TEM) 550.00
Q1 Mass 259.300
Q3 Mass 214.000

2.2.1.11. Homoarjinin Ölçümü İçin LC-MS/MS Değerleri

Çalışmada kullanılan LC-MS/MS cihazında ayarlanan ADMA metot özellikleri aşağıda verilmiştir. Kromatografi için;

Pompa Modu Binary Flow
Total Flow 0.8000 mL/min
Enjeksiyon volume 40.00 uL

Analiz süresi 5 dk

Kolon Phenomenex Luna C18 colon

Mobil faz A Grade su+1 mL formik asit=1L

Mobil faz B Metanol ve 1 mL formik asit=1L

Kütle spektrometresi için;

Ion Source Gas1 (GS1) 40.00

Ion Source Gas2 (GS2) 60.00

Ionisation Mode Pozitif

Entrance Potential(EP) 7.5

Collision Cell Exit Potential (CXP) 4.00

Ionspray Voltage (IS) 5500.00

Declustering Potential (DP) 40.00

Collision Gas (CAD) 5.00

Collision Energy (CE) 24.00

Temperature (TEM) 550.00

Q1 Mass 245.200

Q3 Mass 84.200

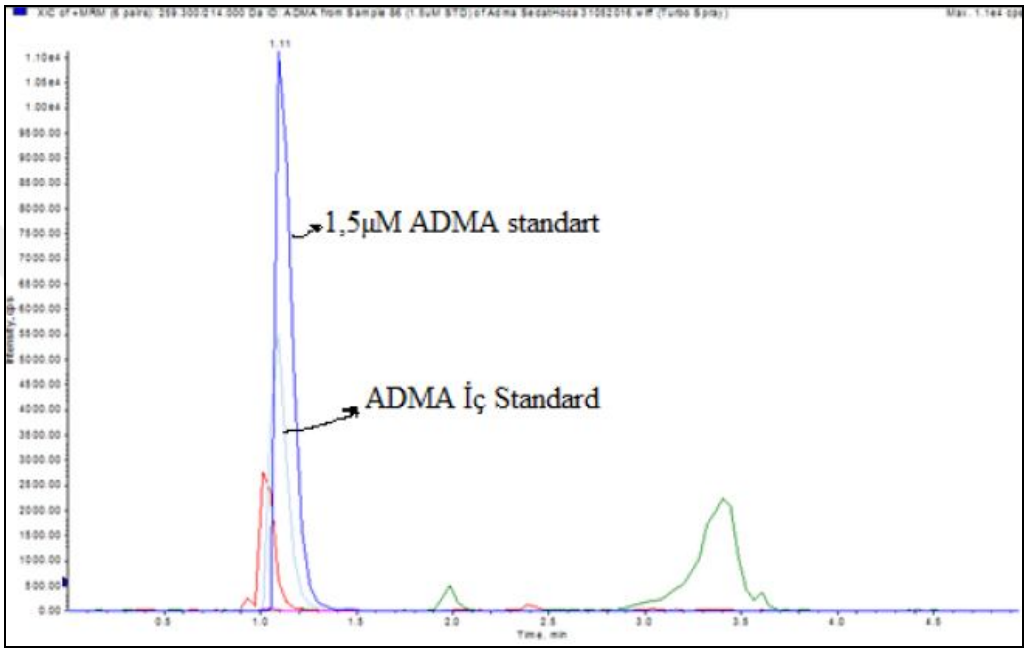
2.2.2. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızdaki tüm istatiksel analizler SPSS (Statistical Package For the Social Sciences) v21 programı kullanılarak gerçekleştirildi. Araştırmamızda istatistiksel olarak; sonuçların değerlendirilmesinde %95 güven aralığında % 5 hata payı dikkate alınarak $p<0.05$ değeri anlamlılık değeri olarak kabul edildi. Verilerin değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistikler (ortalama ± standart sapma) olarak sunuldu. Verilerin dağılımı One-Sample Kolmogrov Smirnov testi ile incelendi ve $p>0.05$ olması durumunda normal dağılım gösterdiği kabul edildi. Yaş, AFP ve uE3 parametrelerinin normallik testinde normal dağılım gösteren parametrelerdi Normal dağılım göstermeyen diğer veriler için iki grubun kıyaslanmasında non-parametrik Mann-Whitney U testi uygulandı. İkiden fazla grubun kıyaslamasında Kruskall-Wallis testi yapıldı ve parametreler arasındaki korelasyonlar Spearman korelasyon testi ile değerlendirildi.

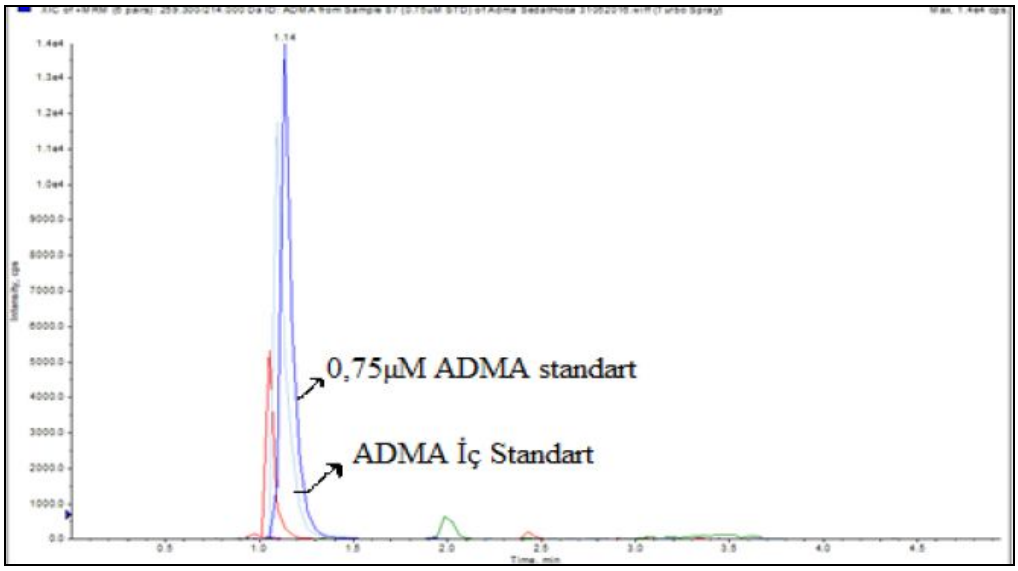
3. BULGULAR

3.1. ADMA'nın Analiz Sonuçları

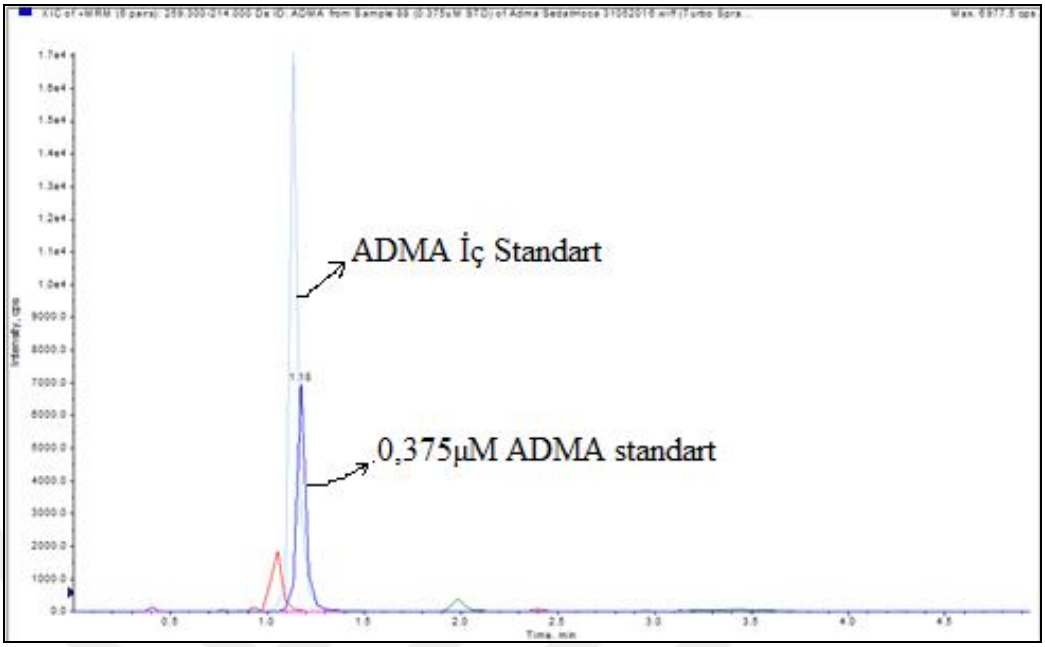
LC-MS/MS cihazıyla analiz edilen her bir ADMA standardının kromatogramı ve piklerin çıkma zamanı verilmiştir.



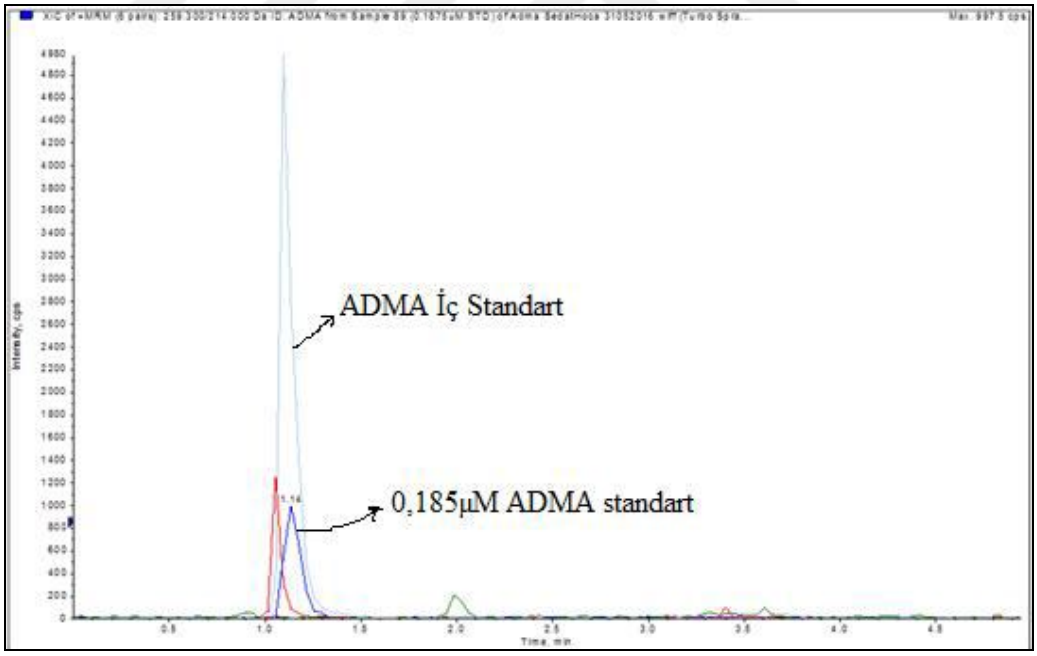
Şekil 3.1. 1,5µM ADMA standart kromatogramı



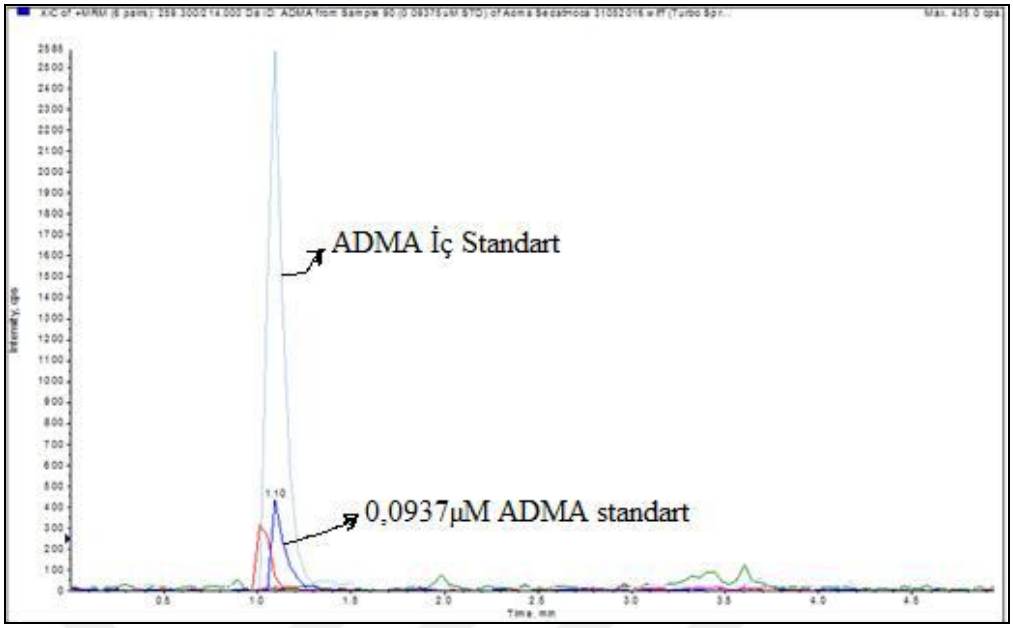
Şekil 3.2. 0,75µM ADMA standart kromatogramı



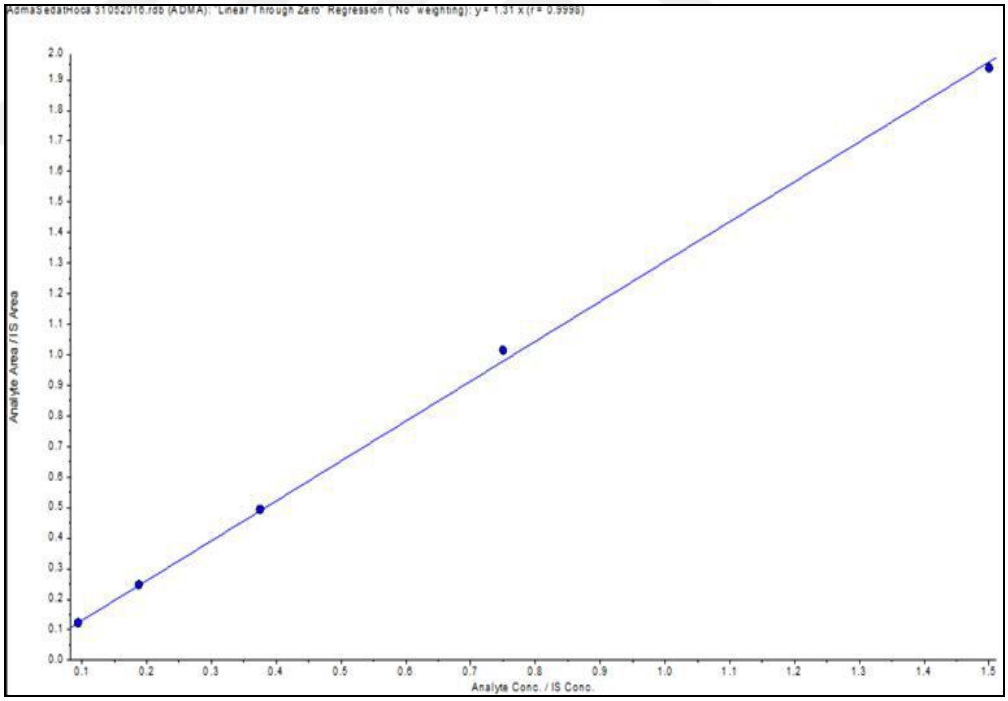
Şekil 3.3. 0,375µM ADMA standart kromatogramı



Şekil 3.4. 0,185µM ADMA standart kromatogramı

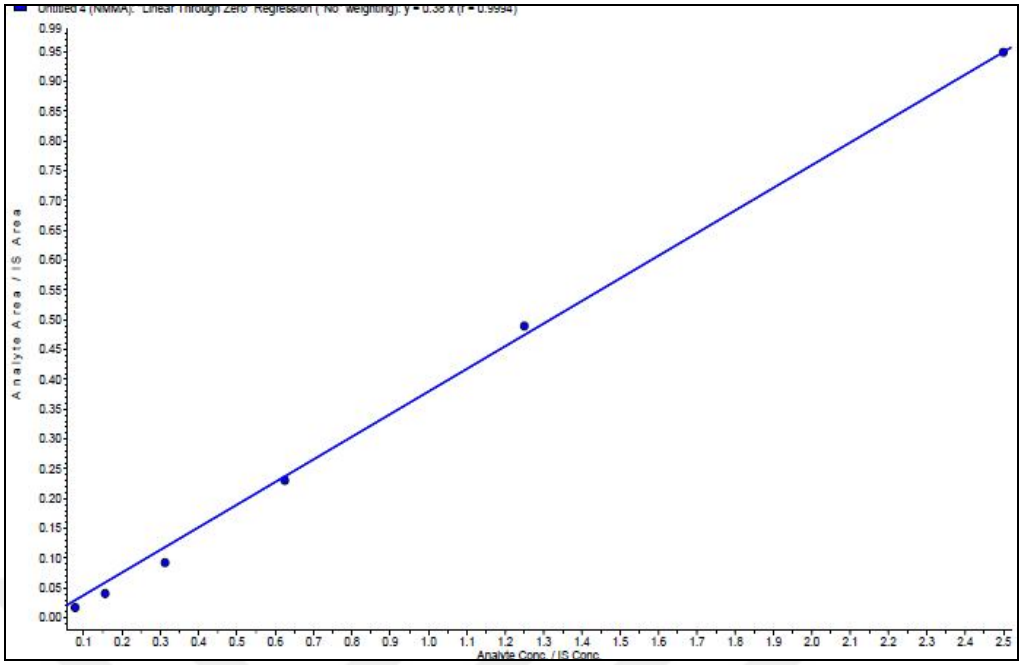


Şekil 3.5. 0,0937µM ADMA standart kromatogramı



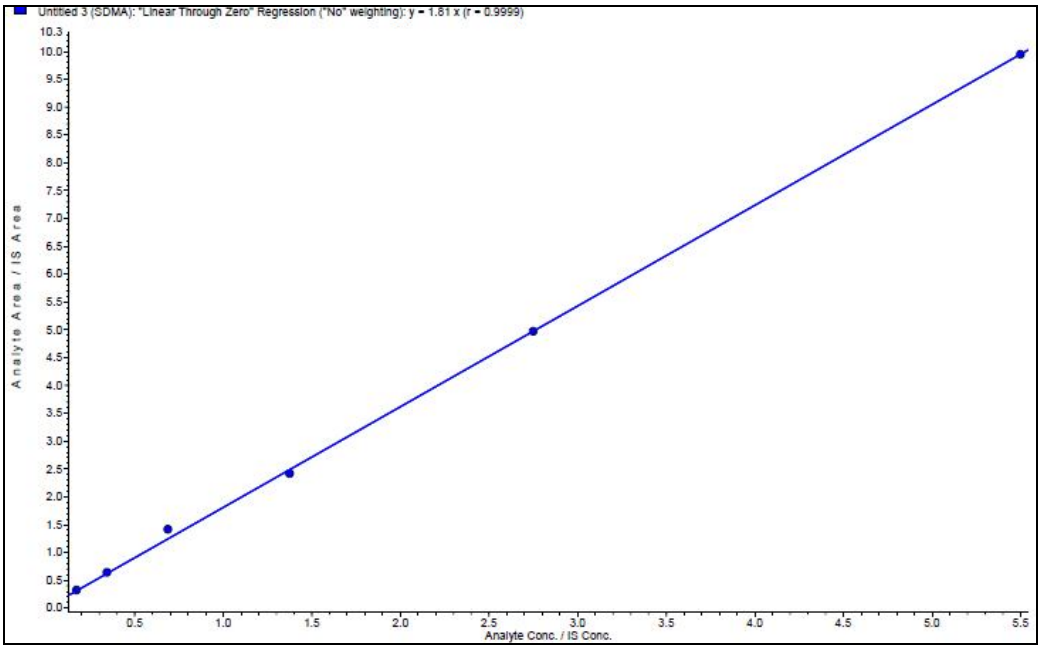
Şekil 3.6. ADMA kalibrasyon grafiği

1,5 µM, 0,75 µM, 0,375 µM, 0,185 µM ve 0,0937 µM'lik konsantrasyonlardaki ADMA standartları LC-MS/MS cihazında ölçüldü ve ADMA standartlarına ait kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Şekil 3.6).



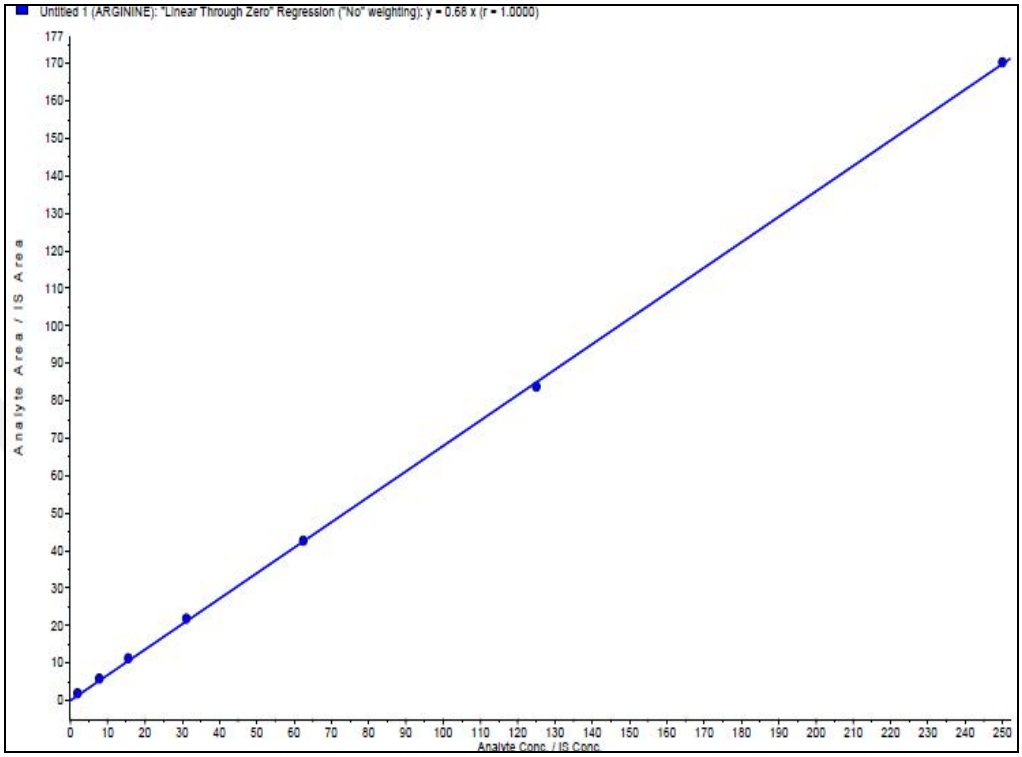
Şekil 3.7. L-NMMA kalibrasyon grafiği

5,5 µM, 2,75 µM, 1,375 µM, 0,6875 µM, 0,34375 µM ve 0,178 µM değerlerinde L-NMMA standartları hazırlandı ve LC-MS/MS cihazında ölçümleri yapıldı. Standartların konsantrasyon sonuçlarına göre LC-MS/MS cihazında kalibrasyon grafiği oluşturuldu (Şekil 3.7).



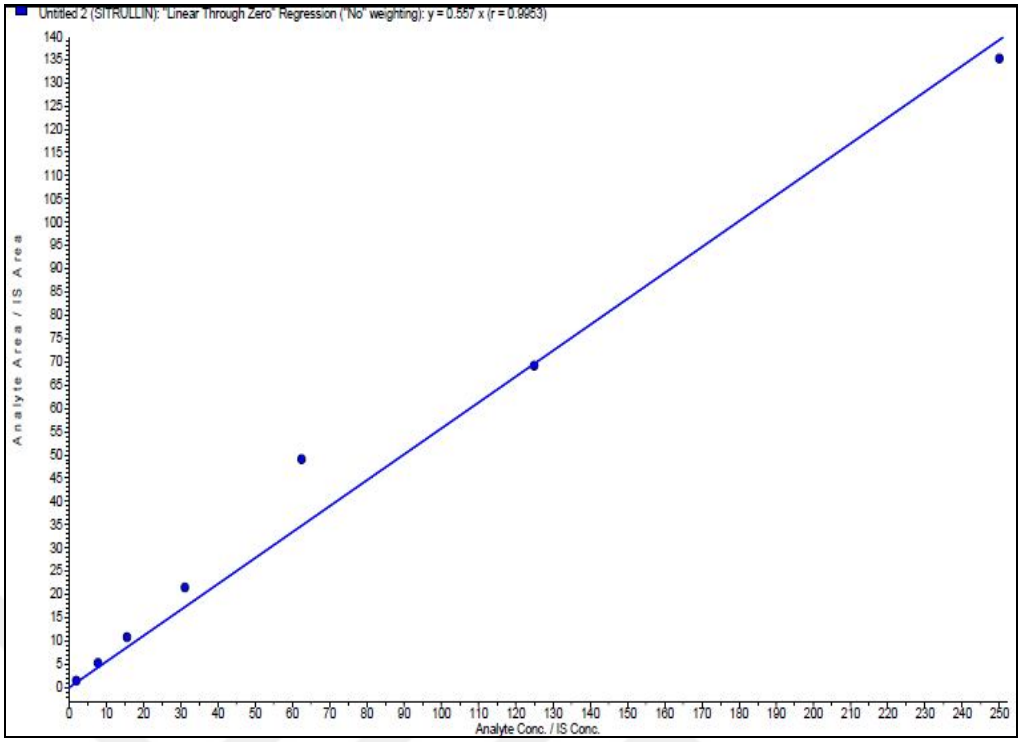
Şekil 3.8. SDMA kalibrasyon grafiği

5,5µM, 2,75µM, 1,375µM, 0,688µM, 0,344µM ve 0,172µM miktarlarda SDMA standartları hazırlandı ve ölçümleri yapıldı. Bu standartlara ait konsantrasyon sonuçlarına göre LC-MS/MS cihazında kalibrasyon grafiği oluşturuldu (Şekil 3.8).



Şekil 3.9. Arjinin kalibrasyon grafiği

250 µM, 125 µM, 62,5µM, 31,125 µM, 15,56µM ve 7,78 µM konsantrasyonlardaki arjinin standartları hazırlandı ve ölçümleri yapıldı. Standartların, konsantrasyon sonuçlarına göre LC-MS/MS cihazında kalibrasyon grafiği oluşturuldu (Şekil 3.9).

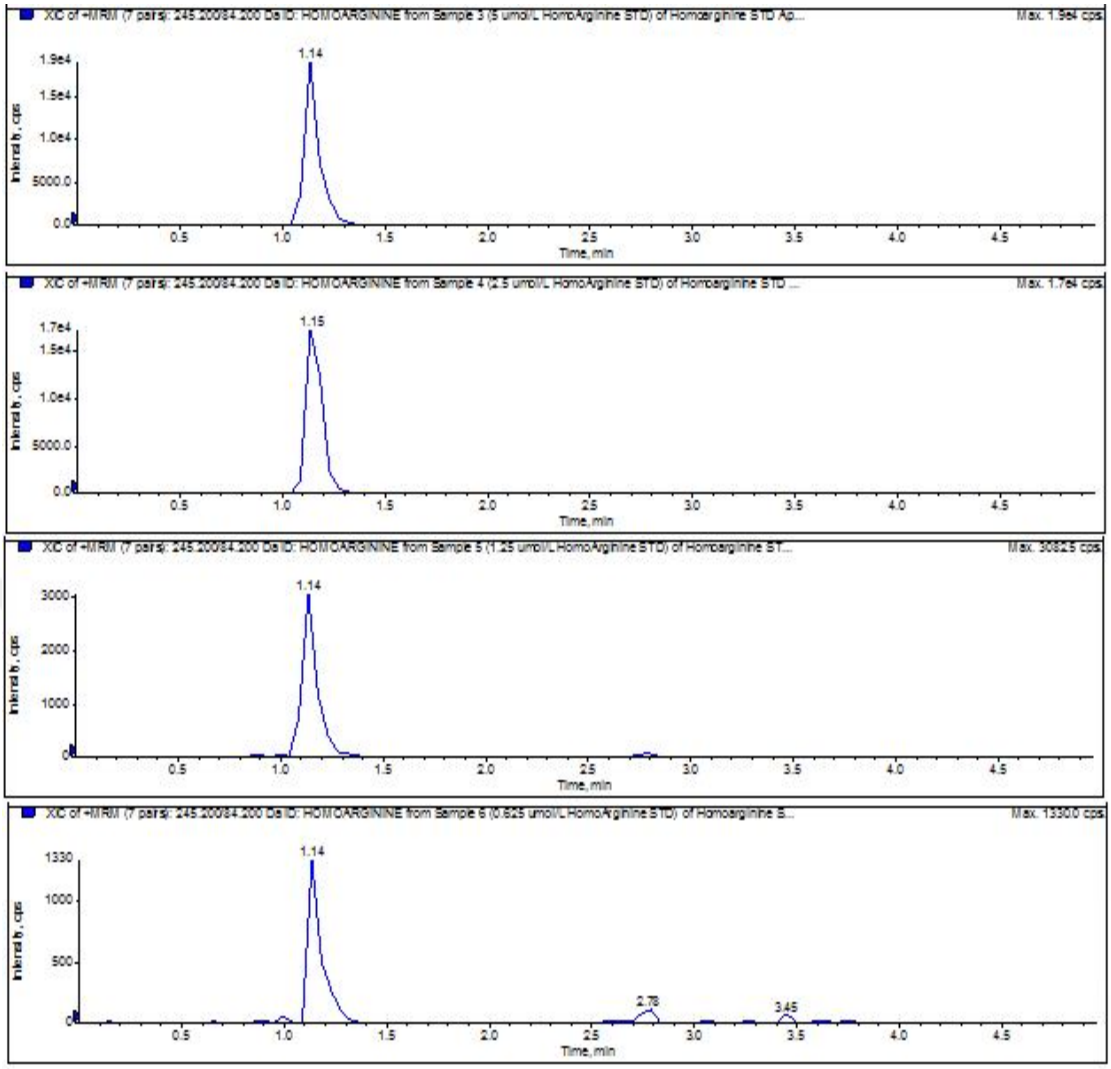


Şekil 3.10. Sitrülin kalibrasyon grafiği

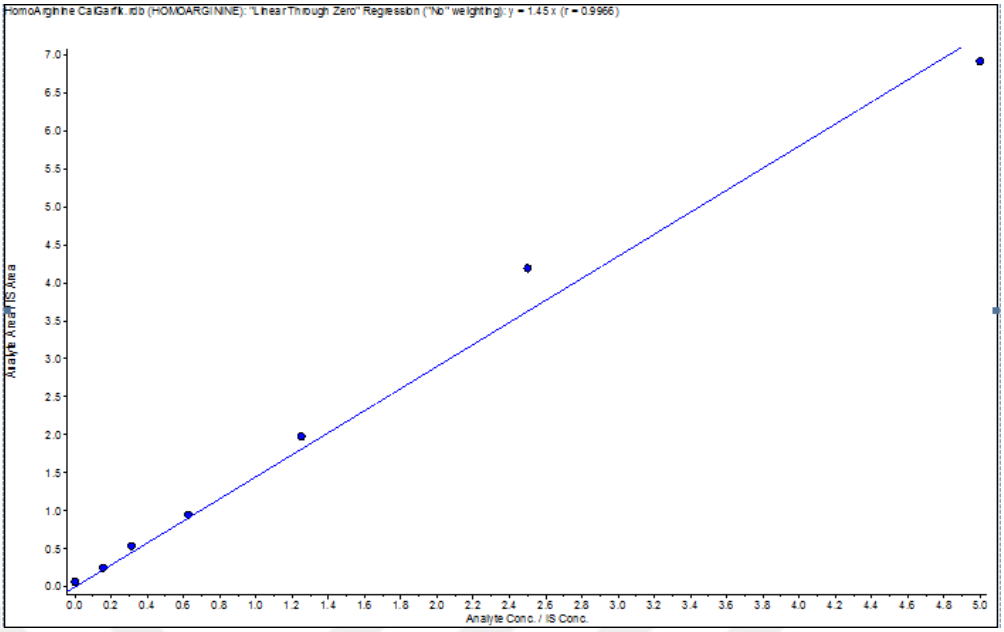
250 µM, 125 µM, 62,5 µM, 31,125 µM, 15,56 µM ve 7,78 µM konsantrasyonlarda sitrülin standartları hazırlandı ve ölçümleri yapıldı. Standartların, konsantrasyon sonuçlarına göre LC-MS/MS cihazında kalibrasyon grafiği oluşturuldu (Şekil 3.10).

3.2. Homoarjinin'in Analiz Sonuçları

LC-MS/MS cihazıyla analiz edilen HArg standart kromatogramları ve piklerin çıkma zamanı verilmiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. 5 µM, 2,5µM, 1,25µM, 0,625µM homoarjinin standart kromatogramı



Şekil 3.12. Homoarjinin kalibrasyon grafiği

5 µM, 2,5 µM, 1,25 µM, 0,625 µM, 0,3125 µM ve 0,156 µM konsantrasyonlardaki homoarjinin standartları hazırlandı ve ölçümleri yapıldı. Standartların, konsantrasyon sonuçlarına göre LC-MS/MS cihazında kalibrasyon grafiği oluşturuldu (Şekil 3.12).

3.3. İstatiksel Analiz Sonuçları

Çalışmamızda hastahanemizin Kadın Doğum Polikliniğine başvuran toplam 200 gebe kadın değerlendirmeye alındı. Bu katılımcılar, ikili test istemi yapılan kontrol grubu (n=50) ve taramada pozitif sonuç veren riskli grup (n=50), dörtlü test istemi yapılan kontrol grubu (n=50) ve taramada pozitif sonuç veren riskli grup (n=50) olmak üzere birbirinden bağımsız dört gruba ayrıldı.

Verilerin değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistikler ortalama±standart sapma şeklinde sunuldu. Verilerin dağılımın nasıl olduğuna karar vermek için One-Sample Kolmogrov Smirnov testi ile normalliğe bakıldı ve verilerin dağılımında $p > 0.05$ olması normal dağılım (homojen) olarak kabul edildi. Yaş, AFP ve uE_3 parametreleri normallik testinde normal dağılım gösteren parametrelerdi. ADMA, SDMA, LNMMA, homoarjinin, inhibin A, HCG, PAPP-A, serbest β-hCG, arjinin,

sitrülin, total metilarjinin, arjinin/ADMA oranı, SDMA/ADMA oranı normal dağılım göstermeyen (homojen olmayan) parametrelerdi. Bu parametrelere ait değerlendirmelerin istatistiği Çizelge 3.1'de verilmiştir. İki bağımsız grubun karşılaştırılmasında kullanılan non-parametrik Mann-Whitney U testi ile gruplar arasındaki parametrelerin ilişkilerine tek tek bakıldı. Non-parametrik olan değerler için [medyan (minimum-maksimum)] şeklinde verilmiştir. Sonuçların değerlendirilmesinde. %95 güven aralığında % 5 hata payı dikkate alınarak $p<0.05$ anlamlılık değeri olarak kabul edilmiştir.

3.3.1. Demografik Verilerin ve Biyokimyasal Ölçümlerin Karşılaştırılması

Çizelge 3.1. Non-parametrik ve parametrik dağılım gösteren parametrelerin gruplar arası karşılaştırılması

	4'lü Kontrol (n=50) Median (min-max)	4'lü Riskli (n=50) Median (min-max)	2'li Kontrol (n=50) Median (min-max)	2'li Riskli (n=50) Median (min-max)	p
İnhibin -A (pg/ml)	**190.6 (67.0 – 438.0)**	**297.0 (165.0- 758.0)**			a=0.000
HCG (mIU/ml)	**18478.5 (5929 – 52595)**	**30743.0 (11208- 144881)**			a=0.000
PAPP-A (mIU/ml)			**2.53 (0.8 – 9.7)**	**2.25 (0.6- 9.9)**	f=0.271
f β-Hcg (mIU/ml)			**26.0 (6.4 – 180.6)**	**34.9 (9.9 – 273.7)**	f=0.063
hArG (µmol/L)	**2.25 (0.47- 7.07)**	**1.47 (0.25- 4.22)**	**1.34 (0.44 – 4.76)**	**0.91 (0.45 – 2.71)**	a=0.001 b=0.000 c=0.000 d=0.598 e=0.001 f=0.001

ADMA (µmol/L)	**0.13 (0.02 – 0.44)**	**0.06 (0.02- 0.17)**	**0.11 (0.02 – 0.33)**	**0.09 (0.03 – 0.24)**	a=0.000 b=0.402 c=0.038 d=0.000 e=0.000 f=0.080
SDMA (µmol/L)	**0.14 (0.03 – 0.4)**	**0.09 (0.03 – 1.21)**	**0.11 (0.05 – 0.45)**	**0.11 (0.05 – 0.26)**	a=0.000 b=0.021 c=0.071 d=0.026 e=0.015 f=0.729
L-NMMA (µmol/L)	**0.25 (0.10 – 0.91)**	**0.22 (0.10 – 0.62)**	**0.15 (0.04 – 0.70)**	**0.15 (0.09 – 0.93)**	a=0.088 b=0.000 c=0.000 d=0.007 e=0.003 f=1.000
Arginine (µmol/L)	**134.5 (13 – 494)**	**118.0 (67 – 280)**	**78.0 (37- 177)**	**65.4 (30 – 153)**	a=0.082 b=0.000 c=0.000 d=0.000 e=0.000 f=0.012
Citrulline (µmol/L)	**40.00 (10- 88)**	**35.20 (10 – 94)**	**24.75 (11 – 179)**	**44.85 (13 – 122)**	a=0.726 b=0.013 c=0.084 d=0.018 e=0.029 f=0.000
Arginine/ ADMA	**1109.6 (51.6- 8316.5)**	**1721.2 (956.3 – 5387.2)**	**751.5 (130.2 – 4666.7)**	**714.9 (263.6 -2494.3)**	a=0.002 b=0.007 c=0.005 d=0.000 e=0.000 f=0.581
SDMA/ ADMA	**1.03 (0.06 – 7.58)**	**1.37 (0.52 – 20.0)**	**0.94 (0.38 – 5.49)**	**1.17 (0.40 – 7.21)**	a=0.111 b=0.268 c=0.433 d=0.002 e=0.189 f=0.045
HArg/ ADMA	**21.7 (2.80 – 75.6)**	**24.3 (7.0 – 65.8)**	**13.3 (1.5- 83.3)**	**10.6 (4.0 - 33.0)**	a= 0.134 b= 0.003 c= 0.000 d= 0.000 e= 0.000 f= 0.199

Total metilarjininler (µmol/L)	**0.55 (0.22 – 1.92)**	**0.37 (0.16 – 1.38)**	**0.40 (0.17 – 1.17)**	**0.38 (0.20 – 1.23)**	a=0.000 b=0.000 c=0.000 d=0.581 e=0.996 f=0.559
	Mean ±SD	**Mean ±SD**	**Mean ±SD**	**Mean ±SD**	
Yaş	**29.62±4.94**	**28.26±5.109**	**27.92 ±5.04**	**30.13 ±3.65**	a=0.062 b=0.166 c=0.452 d=0.056 e=0.061 f=0.057
AFP (IU/ml)	**28.04±11.84**	**22.90±9.64**			a=0.037
uE3 (ng/ml)	**0.73±0.30**	**0.79±0.44**			a=0.111

a= 4'lü kontrol-4'lü riskli, b=4'lü kontrol-2'li kontrol c=4'lü kontrol-2'li riskli, d=4'lü riskli-2'li kontrol, e=4'lü riskli-2'li riskli , f= 2'li kontrol- 2'li riskli.

Non-parametrik olan değerler için[medyan (minimum-maksimum)], parametrik olan değerler için ortalama±standart sapma (mean±**SD)** şeklinde verildi. Sonuçların değerlendirilmesinde %95 güven aralığında % 5 hata payı dikkate alınarak p< 0.05 değeri anlamlılık değeri olarak kabul edildi. ADMA(µmol/L): Asimetrik Dimetil Arjinin, SDMA(µmol/L): Simetrik Dimetil Arjinin, L-NMMA (µmol/L): NG Monometil L-arjinin , hArG : Homoarjinin, βHCG: Human Chorionic Gonadotropin, PAPP-A: Pregnancy Associated Plasma Protein-A, f β-hCG: Serbest Beta Human Chorionic Gonadotropin, AFP : alfa fetoprotein, uE3 : unkonjuge estradiol.

Çizelge 3.1.'de görüldüğü gibi biyokimya testlerinin ve metilarjininlerin gruplar arası medyan (min-max) ve [ortalama± standart sapma (X±SD)] ve değerleri verilmiştir.

3.3.1.1.Gruplara Ait Serum İnhibin A, HCG, PAPP-A, f β-Hcg, AFP ve uE_3 Düzeyleri

Dörtlü test istemi yapılan kontrol grubundaki inhibin A değerleri(196.9± 76.75) dörtlü test istemi yapılan riskli gruptaki inhibin A değerlerinden (351.8± 145.8) anlamlı olarak düşüktü (p= 0.000)(p<0.001).

HCG değerleri döstlü test istemi yapılan kontrol grubunda (20362.7±9186.8) riskli gruba (36218.8± 25457.7) göre daha düşük bulundu ve bu fark istatiksel olarak anlamlıydı (p=0.000)(p<0.001).

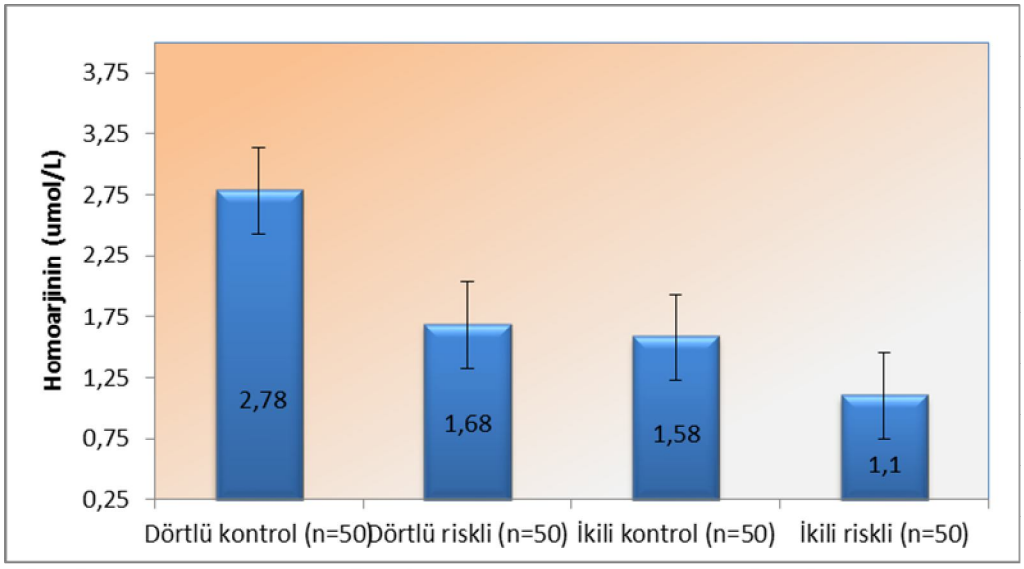
PAPP-A seviyeleri bakımından ikili test istemi yapılan kontrol grubu ve riskli grup arasında anlamlı herhangi bir farklılık gözlenmedi (p=0.271)(p>0.05).

f β-hCG seviyeleri de ikili test istemi yapılan riskli grupta (48.38±48.8) kontrol grubuna (36.38±32.35) kıyasla yüksekti fakat aradaki bu fark istatiksel olarak anlamlı değildi (p= 0.063) (p>0.05).

Dörtlü test istemi yapılan kontrol grubundaki bireylerde AFP seviyeleri (28.04 ± 11.84) riskli gruptaki bireylere (22.9±9.64) göre anlamlı olarak daha yüksek bulunurken (p= 0.037), uE_3 seviyeleri bakımından her iki grup arasında herhangi bir farklılık gözlenmedi (p= 0.111)(p>0.05).

3.3.1.2.Gruplara Ait Serum Homoarjinin Düzeyleri

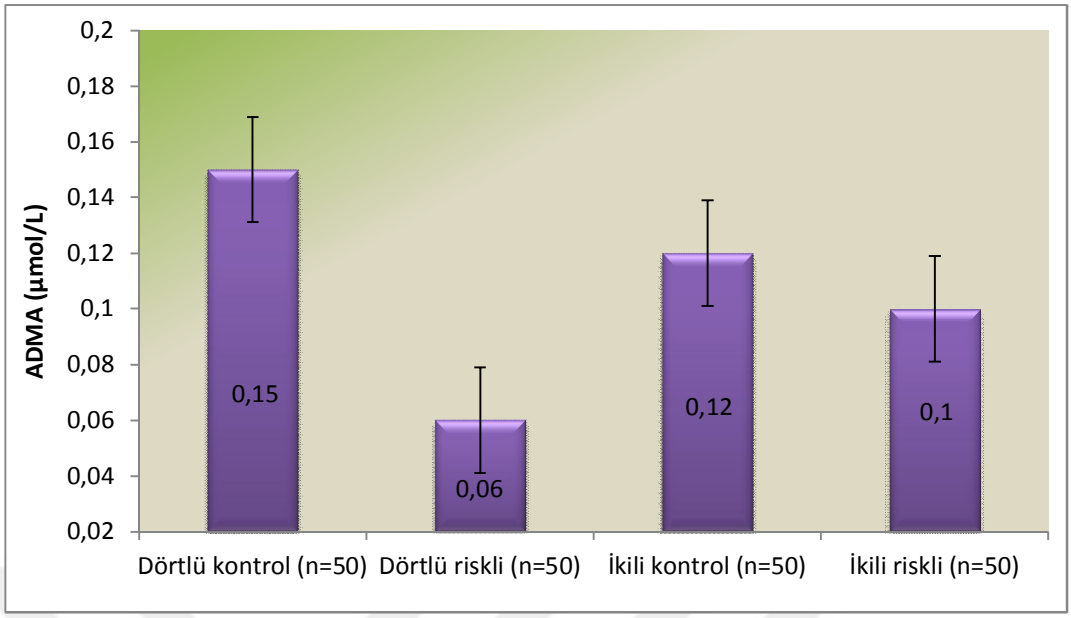
Dörtlü test istemi yapılan kontrol grubunda serum homoarjinin seviyeleri [2.25(0.47-7.07)] dörtlü test istemi yapılan riskli gruptan [1.47(0.25- 4.22], ikili test istemi yapılan kontrol grubundan [1.34(0.44- 4.76)] ve ikili test istemi yapılan riskli gruptan [0.91(0.45- 2.71)] anlamlı derecede yüksek bulundu (sırasıyla p= 0.001, p= 0.000, p= 0.000). Dörtlü ve ikili test istemi yapılan riskli gruplardaki bireylerde serum homoarjinin seviyeleri bu grupların kontrollerine göre anlamlı derecede düşüktü (sırasıyla p=0.001, p= 0.001). Tüm gruplar arasındaki serum homoarjinin seviyelerine bakıldığında dörtlü test istemi yapılan riskli grup ile ikili test istemi yapılan kontrol grubu arasında herhangi bir anlamlı fark gözlenmezken (p= 0.598) diğer tüm gruplar arasında anlamlı bir fark söz konusuydu ve en düşük homoarjinin seviyelerininin ikili test istemi yapılan riskli gruba [0.91(0.45- 2.71)] ait olduğu görüldü (Şekil 3.13.).



Şekil 3.13. Gruplara ait serum homoarjinin düzeyleri

3.3.1.3.Gruplara Ait Serum ADMA Düzeyleri

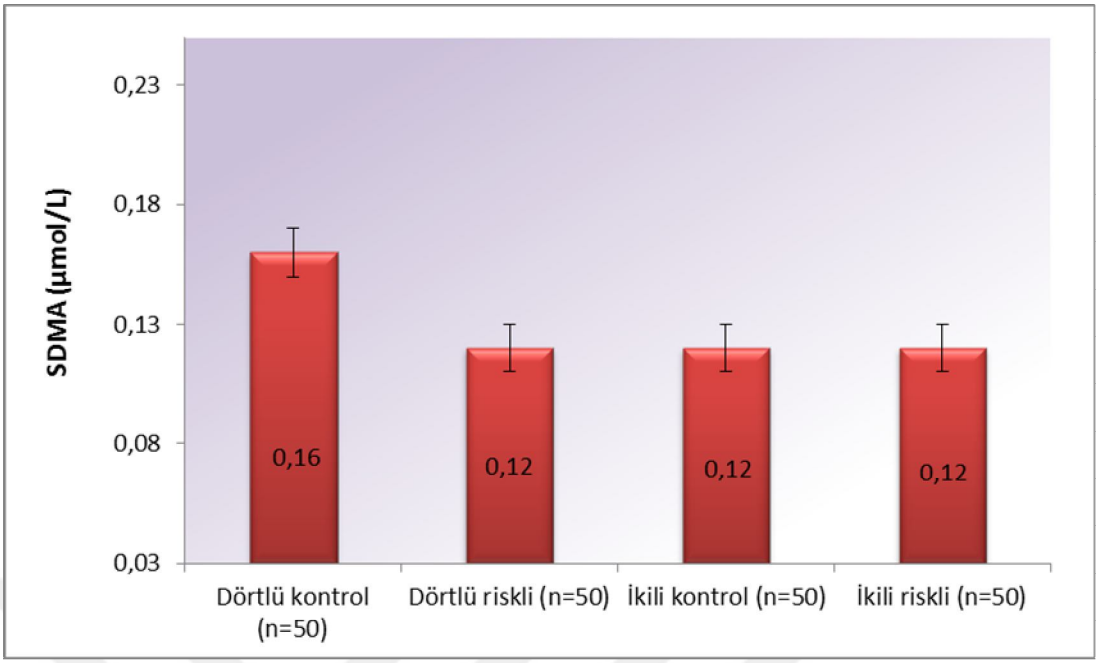
Dörtlü test istemi yapılan kontrol grubunda serum ADMA seviyeleri [0.13(0.02- 0.44)], dörtlü test istemi yapılan riskli gruba [0.06(0.02- 0.17)] ve ikili test istemi yapılan riskli gruba [0.09(0.03-0.24)] göre anlamlı derecede yüksek bulundu (sırasıyla p= 0.000, p= 0.038). Yine ikili test istemi yapılan kontrol grubuna [0.11(0.02- 0.33)] kıyasla yüksek serum ADMA seviyeleri söz konusuydu fakat aradaki fark istatiksel olarak anlamlı değildi (p= 0.402). İkili test istemi yapılan kontrol grubunda riskli gruptan daha yüksek serum ADMA düzeyleri bulunmasına rağmen aradaki fark istatiksel olarak anlamlı değildi (p= 0.080). Tüm gruplar arasında en yüksek ADMA seviyelerinin dörtlü test istemi yapılan kontrol grubuna ait olduğu görüldü [0.13(0.02- 0.44)] (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. Gruplara ait serum ADMA düzeyleri

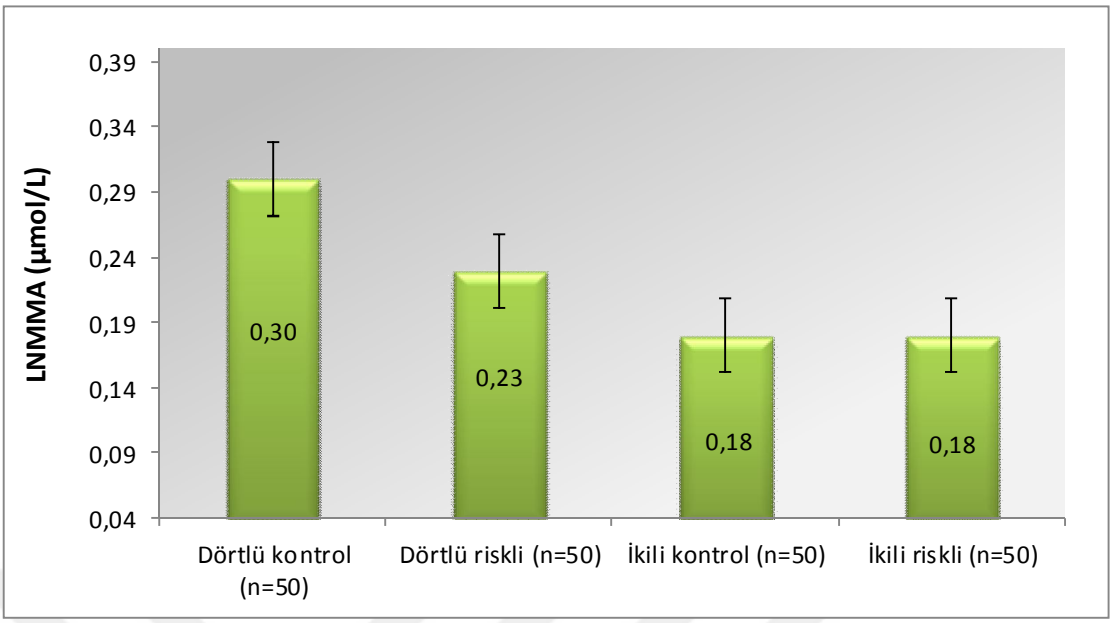
3.3.1.4. Gruplara Ait Serum SDMA, LNMMA, Arjinin, Sitrülin, Arg/ADMA, SDMA/ADMA, HArg/ADMA ve Total Metiarjinin Düzeyleri

İkili test istemi yapılan kontrol grubunda serum SDMA düzeyleri [0.11(0.05-0.45)] ile ikili test istemi yapılan riskli gruptaki düzeyleri [0.11(0.05-0.26)] arasında herhangi bir fark gözlenmezken (p= 0.729), dörtlü test istemi yapılan kontrol grubunda [0.14(0.03-0.4)] dörtlü test istemi yapılan riskli gruba [0.09(0.03- 1.21)] göre anlamlı derecede daha yüksek SDMA düzeyleri bulundu (p= 0.000). Dörtlü test istemi yapılan riskli grupta, ikili test istemi yapılan kontrol grubuna ve ikili test istemi yapılan riskli gruba göre anlamlı olarak daha düşük serum SDMA düzeyleri saptandı(sırasıyla p= 0.026, p= 0.015) (Şekil 3.15).



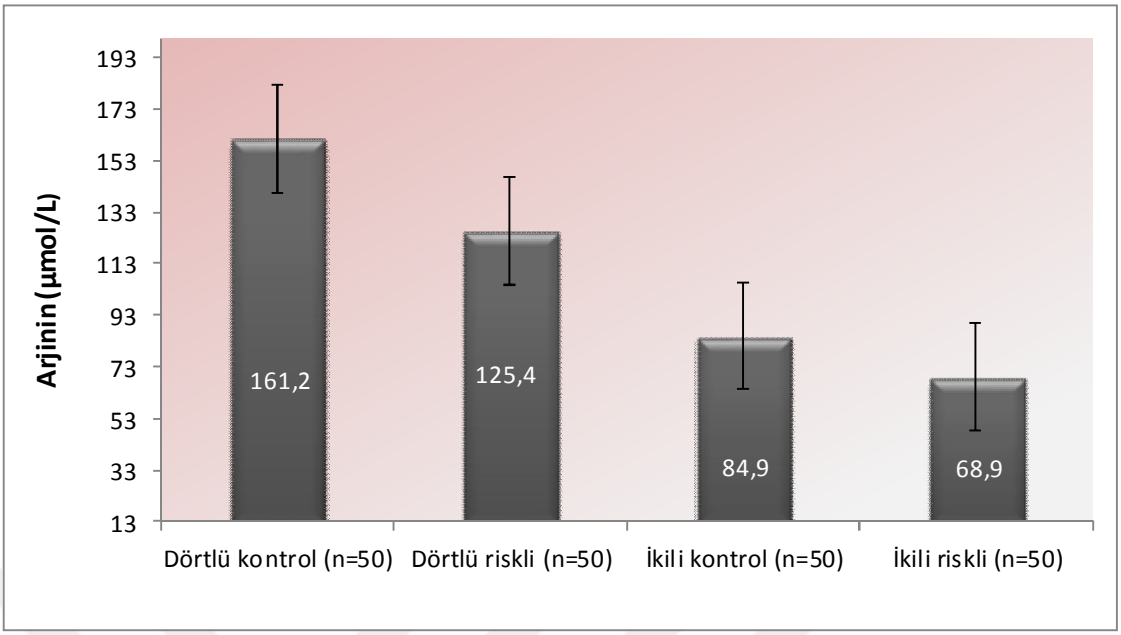
Şekil 3.15. Gruplara ait serum SDMA düzeyleri

İkili test istemi yapılan kontrol grubunda serum LNMMA düzeyleri [0.15(0.04-0.70)] ile ikili test istemi yapılan riskli gruptaki düzeyleri [0.15(0.09-0.93)] arasında istatiksel olarak herhangi bir fark gözlenmezken (p= 1.000), dörtlü .test istemi yapılan kontrol grubunda [0.25(0.10-0.91)] dörtlü test istemi yapılan riskli gruba [0.22(0.10- 0.62)] göre daha yüksek LNMMA düzeyleri bulundu fakat bu fark istatiksel olarak anlamlı değildi (p= 0.088). Dörtlü test istemi yapılan riskli grupta, ikili test istemi yapılan kontrol grubuna ve ikili test istemi yapılan riskli gruba göre anlamlı derecede yüksek serum LNMMA düzeyleri saptandı.(sırasıyla p= 0.007, p= 0.003) (Şekil 3.16).



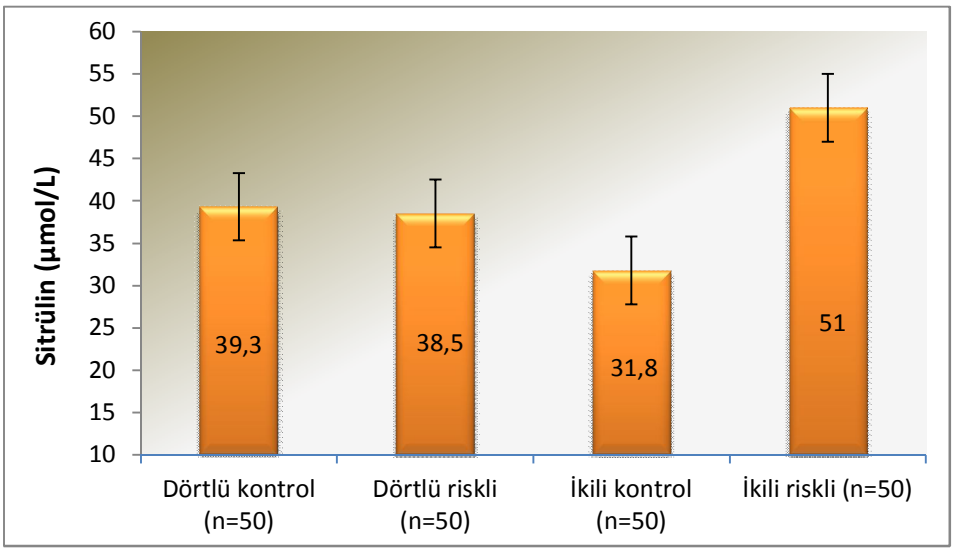
Şekil 3.16. Gruplara ait serum LNMMA düzeyleri

Dörtlü test istemi yapılan kontrol grubunda serum arjinin seviyeleri [134.5(13-494)] ile dörtlü test istemi yapılan riskli gruptaki seviyeleri [118(67- 280)] arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmezken (p= 0.082), ikili test istemi yapılan kontrol grubu [78(37- 177)] ve ikili test istemi yapılan riskli gruba [65.4(30-153)] göre anlamlı şekilde yüksekti (sırasıyla p= 0.000, p= 0.000). Dörtlü test istemi yapılan riskli grupta, ikili test istemi yapılan kontrol grubuna ve ikili test istemi yapılan riskli gruba göre anlamlı derecede yüksek serum arjinin düzeyleri bulundu (sırasıyla p= 0.000, p= 0.000) (Şekil 3.17).



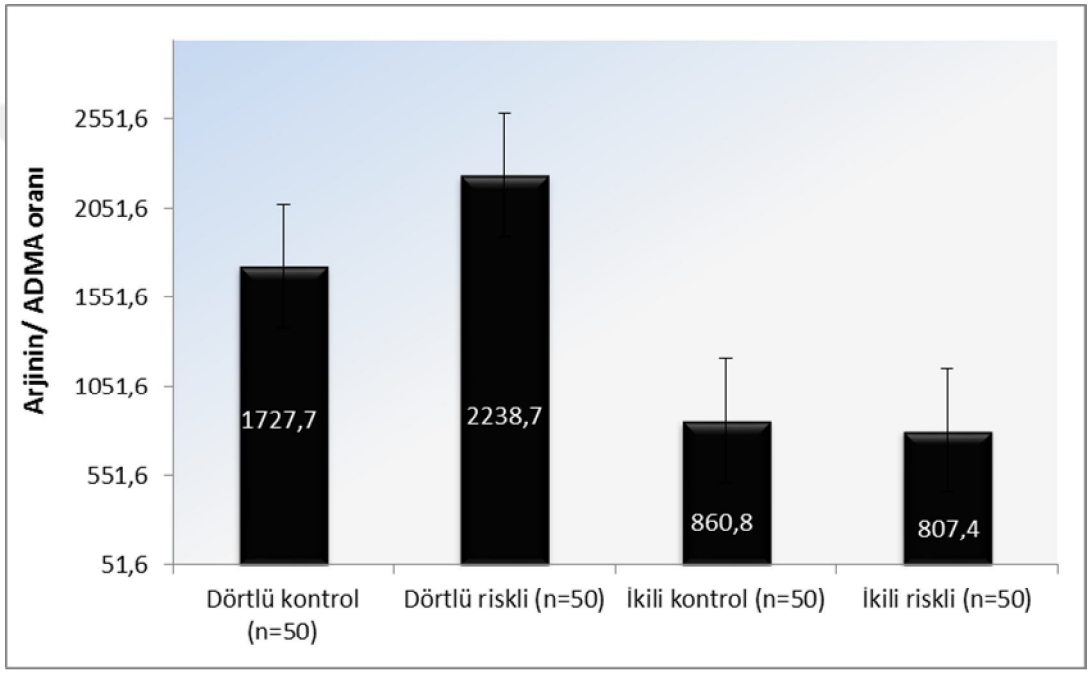
Şekil 3.17. Gruplara ait serum arjinin düzeyleri

Dörtlü test istemi yapılan kontrol grubunda serum sitrülin seviyeleri [40(10-88)], dörtlü test istemi yapılan riskli gruba [35.2(10- 94)] kıyasla yüksek bulundu fakat aradaki bu fark istatiksel olarak anlamlı değildi (p= 0.726) İkili test istemi yapılan kontrol grubunda ise sitrülin seviyeleri [24.7(11- 179)] ikili test istemi yapılan riskli gruba[44.8(13- 122)] göre anlamlı şekilde düşüktü (p= 0.000). Dörtlü test istemi yapılan riskli gruptaki sitrülin seviyelerinin ikili test istemi yapılan riskli gruptakinden anlamlı şekilde düşük olduğu gözlendi (p= 0.029)(Şekil 3.18).



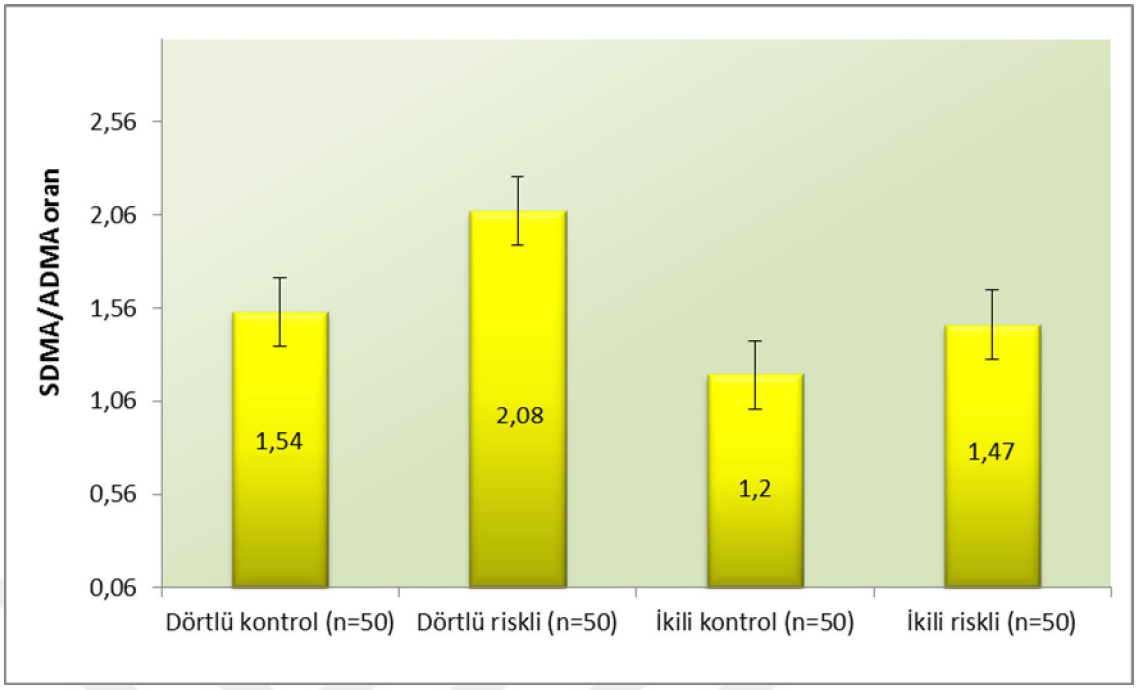
Şekil 3.18. Gruplara ait serum sitrülin düzeyleri

Dörtlü test istemi yapılan kontrol grubunda serum Arjinin/ADMA değerleri [1109.6 (51.6- 8316.5)] dörtlü test istemi yapılan riskli gruba[1721.2(956.3- 5387.2)] kıyasla anlamlı şekilde düşük bulundu (p=0.002). İkili test istemi yapılan kontrol grubu [751.5(130.2- 4666.7)] ve riskli gruba [714.9(263.6- 2494.3)] kıyasla ise daha yüksek serum Arjinin/ADMA değerleri söz konusuydu(sırasıyla p=0.007, p=0.005). İkili test istemi yapılan riskli gruptaki serum Arjinin/ADMA değerleri ikili test istemi yapılan kontrol grubu değerlerine göre daha düşük bulundu fakat bu fark istatiksel olarak anlamlı değildi (p=0.581) (Şekil 3.19).



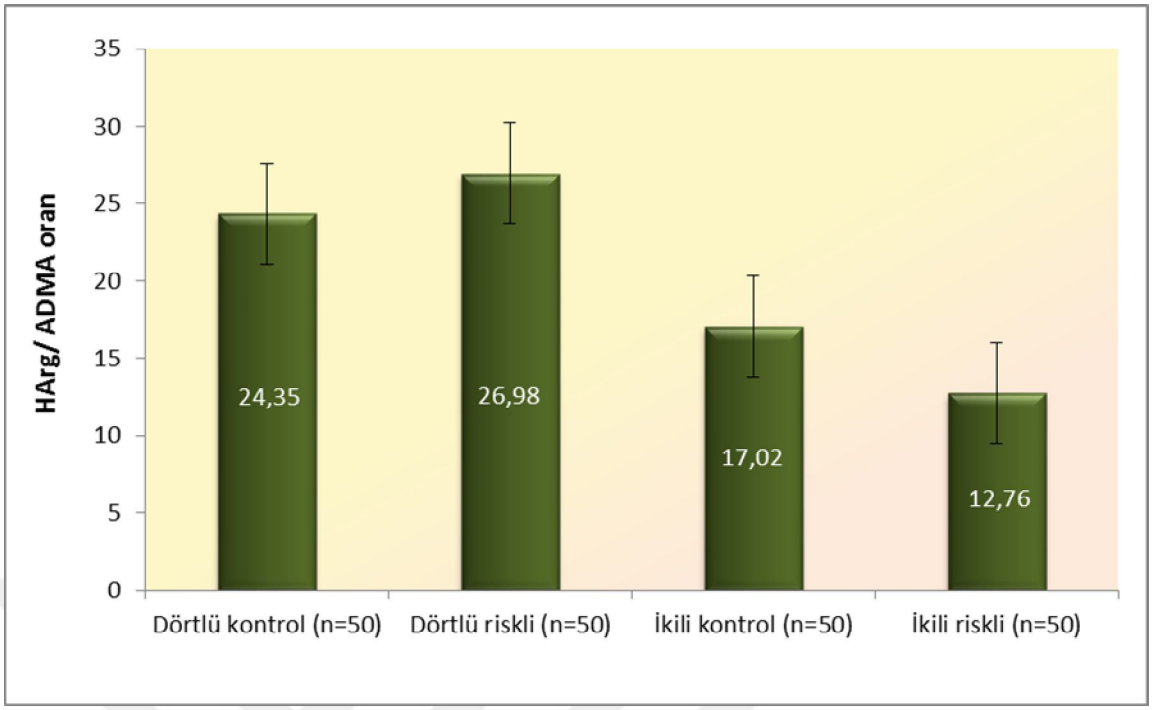
Şekil 3.19. Gruplara ait serum Arjinin/ADMA oranı düzeyleri

Dörtlü test istemi yapılan riskli gruptaki SDMA/ADMA oranı düzeyleri [1.37 (0.52- 20.0)], ikili test istemi yapılan kontrol grubuna kıyasla [0.94 (0.38- 5.49)], ikili test istemi yapılan kontrol grubunda ikili test istemi yapılan riskli gruba kıyasla anlamlı şekilde yüksek bulundu. (sırasıyla p= 0.002, p= 0.045). Dörtlü test istemi yapılan kontrol grubu ve ikili test istemi yapılan kontrol grubu arasında, dörtlü test istemi yapılan kontrol grubu ile ikili test istemi yapılan riskli grup arasında ve dörtlü test istemi yapılan riskli grup ile ikili test istemi yapılan riskli grup arasında SDMA düzeyleri bakımından anlamlı herhangi bir fark gözlenmedi (sırasıyla p=0.268, p=0.433, p= 0.189) (Şekil 3.20).



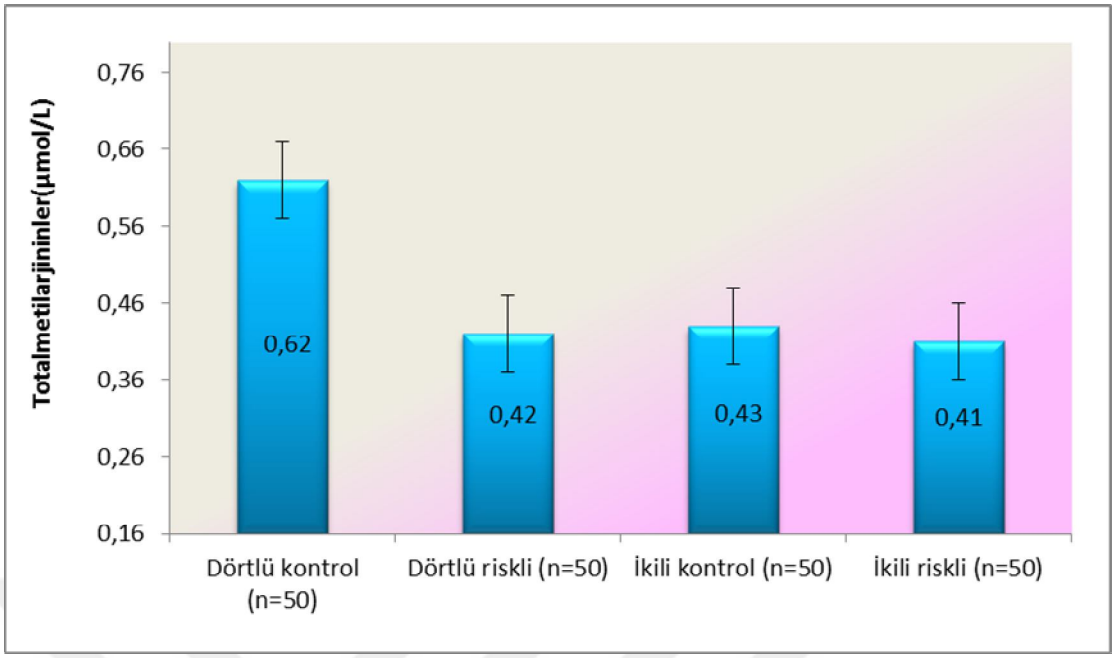
Şekil 3.20. Gruplara ait serum SDMA/ADMA oranı düzeyleri

Dörtlü test istemi yapılan kontrol grubunda HArg/ADMA değerleri [21.7 (2.80–75.6)] dörtlü test istemi yapılan riskli grup değerleri [24.3(7.0– 65.8)] arasında anlamlı bir fark gözlenmezken (p=0.134), ikili test istemi yapılan kontrol grubu değerleri [13.3(1.5–83.3)] ve ikili test istemi yapılan riskli grup değerlerine [10.6(4.0–33.0)] kıyasla anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla p=0.003, p=0.000) (p<0.001). Dörtlü test istemi yapılan riskli grupta, ikili test istemi yapılan kontrol ve riskli gruplara göre daha yüksek HArg/ADMA düzeyleri gözlendi (sırasıyla p=0.000, p=0.000). İkili test istemi yapılan kontrol ve ikili test istemi yapılan grup değerleri arasında ise anlamlı herhangi bir farklılık saptanmadı. (p= 0.199) (Şekil 3.21).



Şekil 3.21. Gruplara ait serum HArg/ADMA oranı düzeyleri

Dörtlü test istemi yapılan kontrol grubunda total metilarjinin değerleri [0.55(0.22 – 1.92)] dörtlü test istemi yapılan riskli grup değerlerinden [0.37(0.16-1.38)], ikili test istemi yapılan kontrol grubu değerleri [0.40(0.17 – 1.17)] ve ikili test istemi yapılan riskli grup değerlerinden [0.38(0.20 – 1.23)] anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla p= 0.000, p= 0.000, p=0.000) ($p<0.001$). Dörtlü test istemi yapılan riskli grup ile ikili test istemi yapılan kontrol grubu ve riskli grup arasında ve yine ikili test istemi yapılan kontrol grubu ve riskli grup arasında total metilarjinin düzeyleri açısından herhangi bir anlamlı farklılık gözlenmedi (sırasıyla, p= 0.581, p=0.996, p= 0.559) ($p>0.05$) (Şekil 3.22).



Şekil 3.22. Gruplara ait serum total metilarjinin düzeyleri

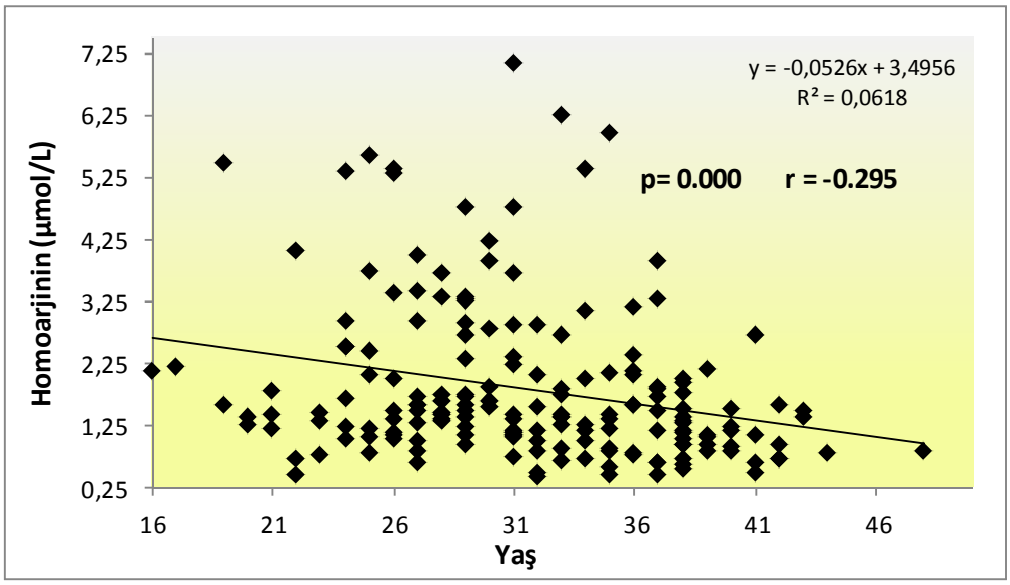
Çizelge 3.2. Yaş, AFP(IU/ml), İnh-A (pg/ml), HCG (mIU/ml), uE3 (ng/ml) parametrelerinin korelasyonu

	Yaş		AFP(IU/ml)		İnh-A(pg/ml)		HCG (mIU/ml)		uE3(ng/ml)	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
AFP (IU/ml)	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	**0.318****	**0.002**
İnhA (pg/ml)	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	**0.447****	**0.000**	*NS*	*NS*
HCG (mIU/ml	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	**0.447****	**0.000**	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*
uE3 (ng/ml)	*NS*	*NS*	**0.318****	**0.002**	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*
HArg (µmol/L)	**-0.295****	**0.000**	*NS*	*NS*	**-0.288****	**0.005**	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*
ADMA (µmol/L)	**-0.267****	**0.000**	*NS*	*NS*	**-0.352****	**0.001**	**-0.261***	**0.012**	*NS*	*NS*
SDMA (µmol/L)	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	**-0.246***	**0.018**	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*

L-NMMA (µmol/L)	**-0.158***	**0.033**	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*
Sitrülin (µmol/L)	**0.202****	**0.006**	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*
Arjinin/ ADMA	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	**0.228***	**0.028**	**0.213***	**0.041**	*NS*	*NS*
SDMA/ ADMA	**0.199****	**0.007**	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*
Total metilarjininler (µmol/L)	**-0.258****	**0.000**	*NS*	*NS*	**-0.250***	**0.016**	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*

NS: Önemli değil
Korelasyon değerlendirmesinde korelasyon katsayısı(r);
r: 0.00–0.24 arası zayıf,
r:0.25–0.49 arası orta,
r:0.50–0.74 arası güçlü,
r:0.75–1.00 arası çok güçlü ilişki olduğu görülmektedir (Sümbüloğlu 1978).
*p<0,05: Anlamlı **p<0,001: İleri derecede anlamlı.. ADMA(µmol/L): Asimetrik Dimetil Arjinin, SDMA(µmol/L): Simetrik Dimetil Arjinin, L-NMMA (µmol/L): NG Monometil L-arjinin , hArG : Homoarjinin, βHCG: Human Chorionic Gonadotropin, PAPP-A: Pregnancy Associated Plasma Protein-A,f β-hCG: serbest beta Human Chorionic Gonadotropin, AFP : alfa fetoprotein, uE3 : unkonjuge estradiol.

Çizelge 3.2' de görüldüğü gibi gruplarda yaş, sitrülin (r= 0.202**, p= 0.006) ve SDMA/ADMA oranı (r= 0.199**,p= 0.007) ile güçlü pozitif korelasyon, ADMA (r= -0.267**, p=0.000), HArg (r= -0.295**, p=0.000),ve totalmetilarjinler ile ise (r= -0.258**, p=0.000) güçlü negatif bir korelasyon gösterdi.

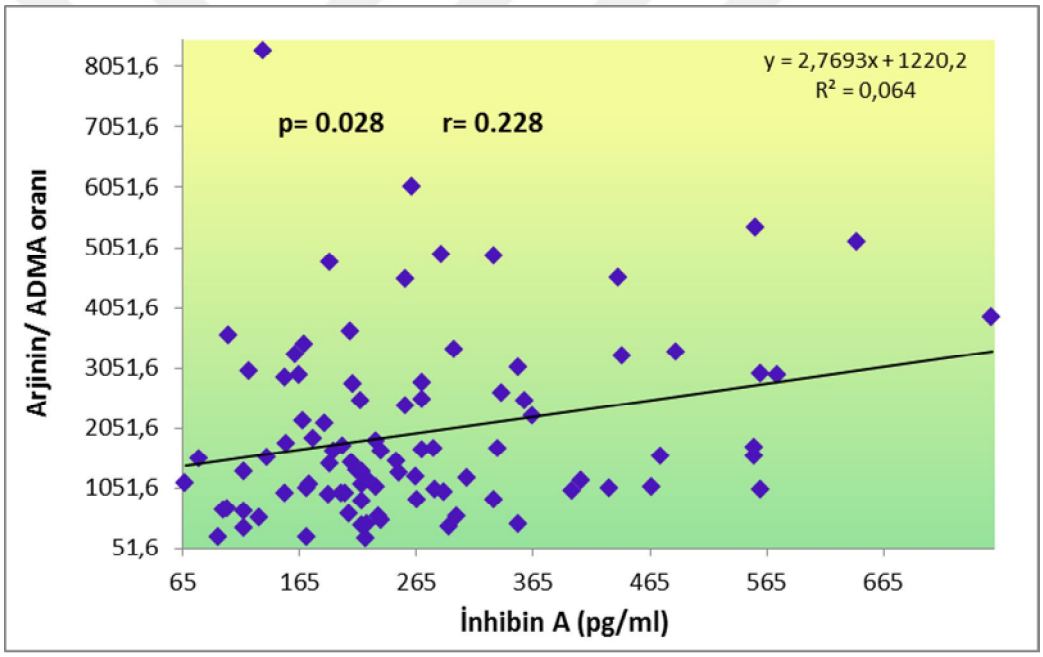


Şekil 3.23. Yaş ve Homoarjinin arasındaki korelasyon grafiği

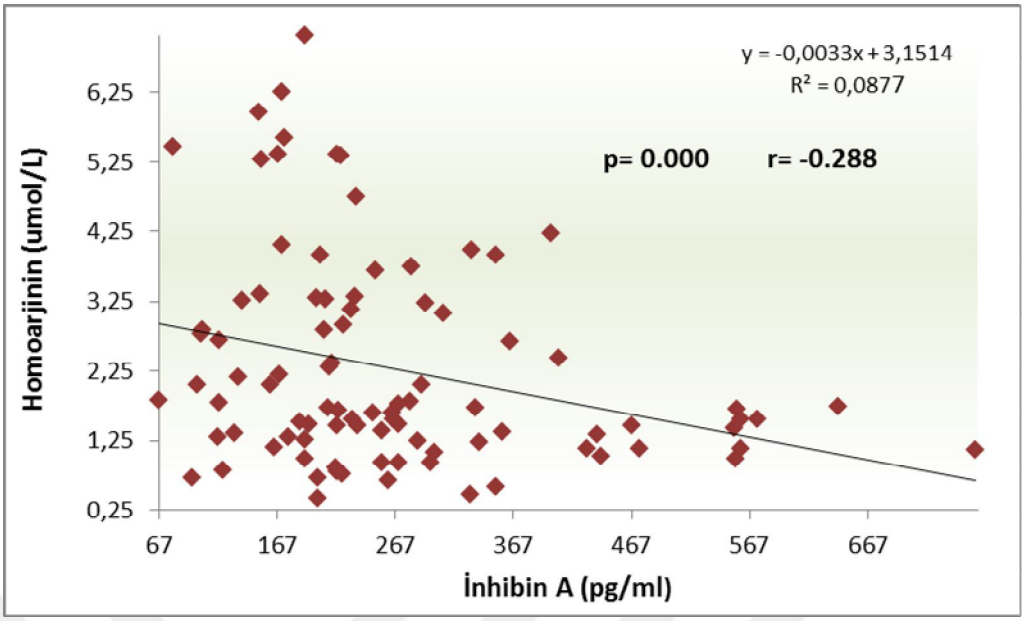
Yine diğer metilarjinin türevlerinden LNMMA (r= -0.158*, p= 0.033) ile de yaş arasında zayıf negatif bir ilişki saptandı.

Bulgularımıza göre, dörtlü test istemi yapılan gruplarda serum AFP seviyeleri, uE3 (r= 0.318**, p=0.002) ile güçlü pozitif bir korelasyon göstermekteydi.

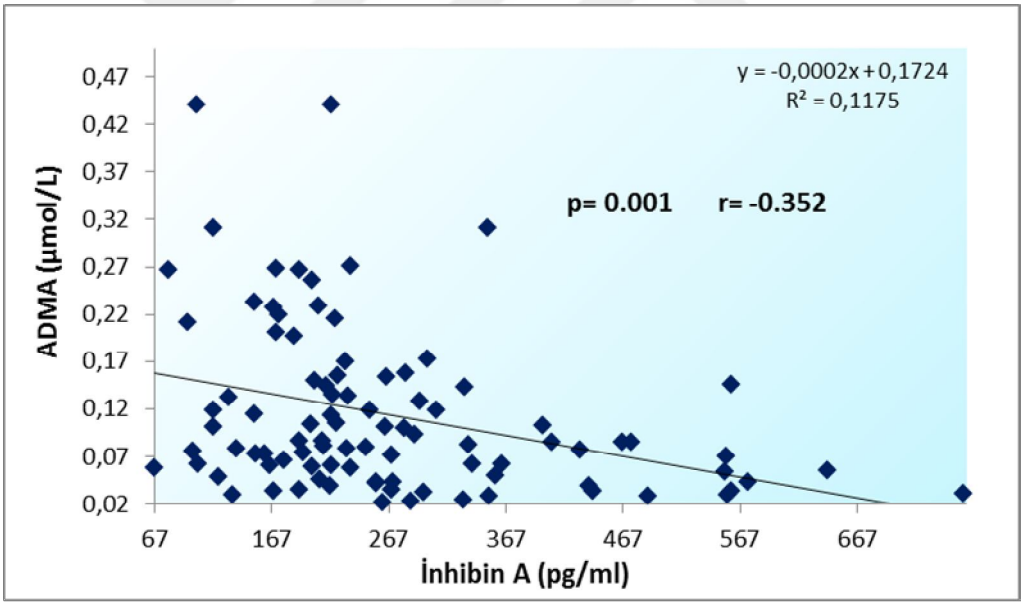
Dörtlü test istemi yapılan gruplarda serum İnhibin-A seviyeleri, HCG (r= 0.447**, p=0.000) ile güçlü pozitif bir korelasyon ve Arjinin/ADMA oranı (r= 0.228*, p=0.028) ile zayıf pozitif bir korelasyon gösterirken (Şekil 3.24), serum HArg (r= -0.288**, p=0.005) (Şekil 3.25) ve serum ADMA (r= -0.352**, p=0.001) ile güçlü negatif bir korelasyon gösterdi (Şekil 3.26).



Şekil 3.24. İnhibin-A ve Arjinin/ADMA oranı arasındaki korelasyon grafiği

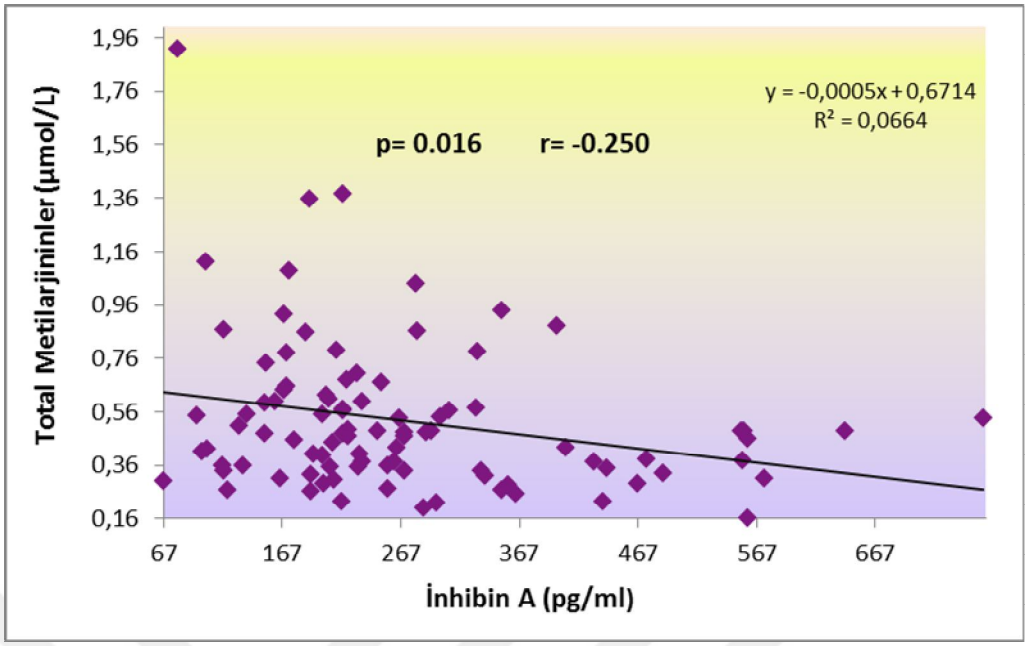


Şekil 3.25. İnhibin-A ve Homoarjinin arasındaki korelasyon grafiği



Şekil 3.26. İnhibin-A ve ADMA arasındaki korelasyon grafiği

Yine SDMA (r= -0.246*, p=0.018) ve Total metilarjininler (r= -0.250*, p=0.016) ile de İnhibin-A arasında zayıf negatif bir ilişki söz konsuydu (Şekil 3.27).



Şekil 3.27. İnhibin-A ve Total metilarjininler arasındaki korelasyon grafiği

Dörtlü test istemi yapılan gruplarda serum HCG ile serum ADMA (r= -0.261**, p=0.012) seviyeleri arasında zayıf negatif bir korelasyon gözlenirken, Arjinin/ADMA oranı (r= 0.213*, p= 0.041) ile zayıf pozitif bir korelasyon bulundu.

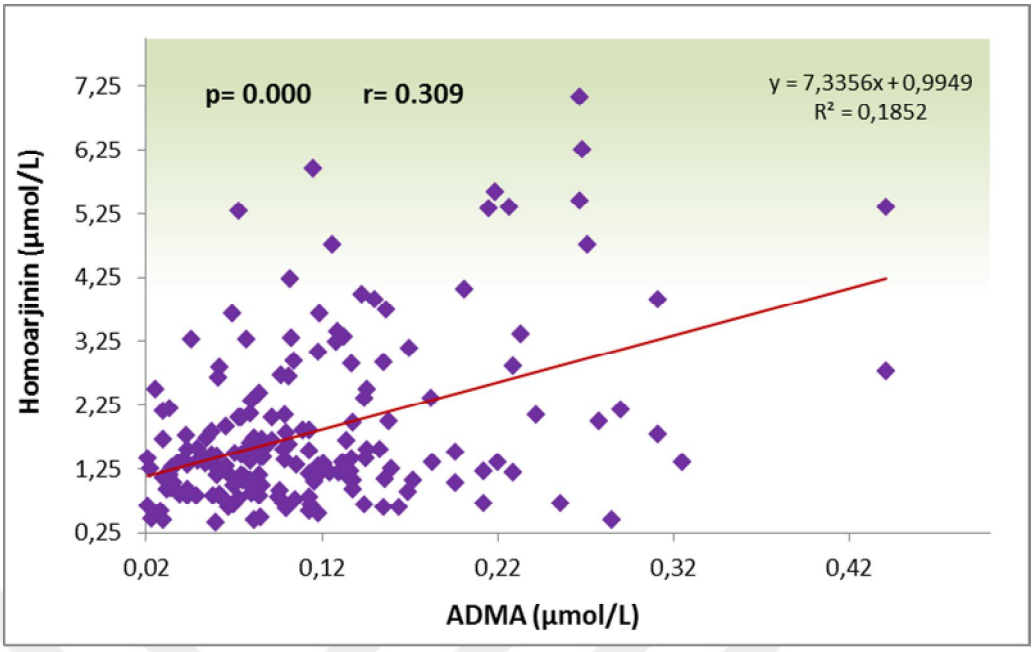
Çizelge 3.3. f β-hCG, HArg(µmol/L), ADMA(µmol/L), SDMA(µmol/L), L-NMMA (µmol/L) parametrelerinin korelasyonu

	f β-hCG (mIU/ml)		HArg(µmol/L)		ADMA (µmol/L)		SDMA (µmol/L)		L-NMMA (µmol/L)	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Yaş	*NS*	*NS*	**-0.295****	**0.000**	**-0.267****	**0.000**	*NS*	*NS*	**-0.158***	**0.033**
İnh-A (pg/ml)	-	-	**-0.288****	**0.005**	**-0.352****	**0.001**	**-0.246***	**0.018**	*NS*	*NS*
HCG (mIU/ml)	-	-	*NS*	*NS*	**-0.261***	**0.012**	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*

hArG (µmol/L)	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	**0.309****	**0.000**	**0.360****	**0.000**	**0.332****	**0.000**
ADMA (µmol/L)	*NS*	*NS*	**0.309****	**0.000**	*NS*	*NS*	**0.449****	**0.000**	**0.164***	**0.026**
SDMA (µmol/L)	*NS*	*NS*	**0.360****	**0.000**	**0.449****	**0.000**	*NS*	*NS*	**0.194****	**0.009**
L-NMMA (µmol/L)	**0.214***	**0.042**	**0.332****	**0.000**	**0.164***	**0.026**	**0.194****	**0.009**	*NS*	*NS*
HArg/ ADMA	*NS*	*NS*	**0.539****	**0.000**	**-0.572****	**0.000**	*NS*	*NS*	**0.168***	**0.023**
Arjinin (µmol/L)	*NS*	*NS*	**0.471****	**0.000**	*NS*	*NS*	**0.147***	**0.047**	**0.377****	**0.000**
Arjinin/ ADMA	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	**-0.720****	**0.000**	**-0.218****	**0.003**	*NS*	*NS*
SDMA/ ADMA	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	**-0.624****	**0.000**	**0.313****	**0.000**	*NS*	*NS*
Total metilarjininler (µmol/L)	*NS*	*NS*	**0.476****	**0.000**	**0.610****	**0.000**	**0.648****	**0.000**	**0.721****	**0.000**

İkili test istemi yapılan gruplarda serum f β-hCG'nin metilarjinin türevlerinden sadece LNMMA (r= 0.214*, p=0.042) ile zayıf pozitif korelasyon gösterdiği gözlendi.

Serum HArg seviyelerinin, ADMA (r= 0.309**, p=0.000)(Şekil 3.28) , SDMA (r= 0.360**, p=0.000), LNMMA (r= 0.332**, p=0.000), HArg/ADMA oranı (r= 0.539**, p=0.000), Arjinin (r= 0.471**, p=0.000) ve total metilarjininler (r= 0.476**, p=0.000)) ile arasında güçlü pozitif bir korelasyon bulundu.



Şekil 3.28. Homoarjinin ve ADMA arasındaki korelasyon grafiği

Korelasyon grafiğinde gösterildiği gibi HArg ve ADMA(r= 0.309**, p=0.000) arasında artan bir korelasyon bulundu. HArg tüm metilarjinin türevleriyle pozitif güçlü bir ilişki gösterdi.

ADMA değerleri ise, SDMA (r=0.449**, p=0.000), ve total metilarjininler ile (r=0.610**, p=0.000) ile güçlü pozitif ilişki gösterirken, LNMMA (r= 0.164*, p= 0.026) ile zayıf pozitif korelasyon, HArg/ADMA oranı (r= -0.572**, p=0.000), arjinin/ADMA oranı (r= -0.720**, p=0.000) ve SDMA/ADMA oranı (r= -0.624**, p=0.000) ile güçlü negatif korelasyon gösterdi.

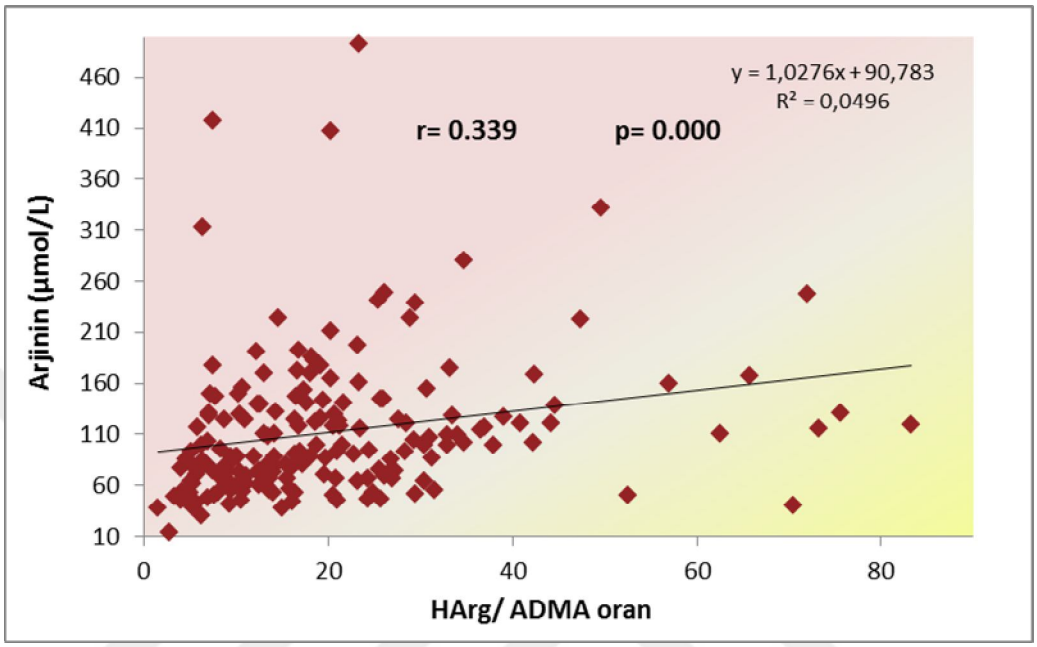
SDMA değerleri, LNMMA (r=0.194**, p=0.009), SDMA/ADMA oranı (0.313** , p=0.000) ve total metilarjininler (r=0.648**, p=0.000) ile güçlü pozitif korelasyon gösterirken, arjinin (r=0.147, p=0.047) ile arasında zayıf pozitif bir korelasyon, arjinin/ADMA oranı (r= - 0.218**, p=0.003) ile de güçlü negatif bir korelasyon bulundu.

LNMMA değerleri ise, HArg/ADMA oranı (r= 0.168*, p=0.023) ile zayıf pozitif korelasyon, arjinin (r=0.377**, p=0.000) ve total metilarjinin (r=0.721**, p=0.000) değerleri ile de güçlü pozitif korelasyon gösterdi.

Çizelge 3.4. Arjinin (µmol/L), Arjinin/ADMA, SDMA/ADMA, HArg/ADMA, ve total metilarjininler (µmol/L), parametrelerinin korelasyonu

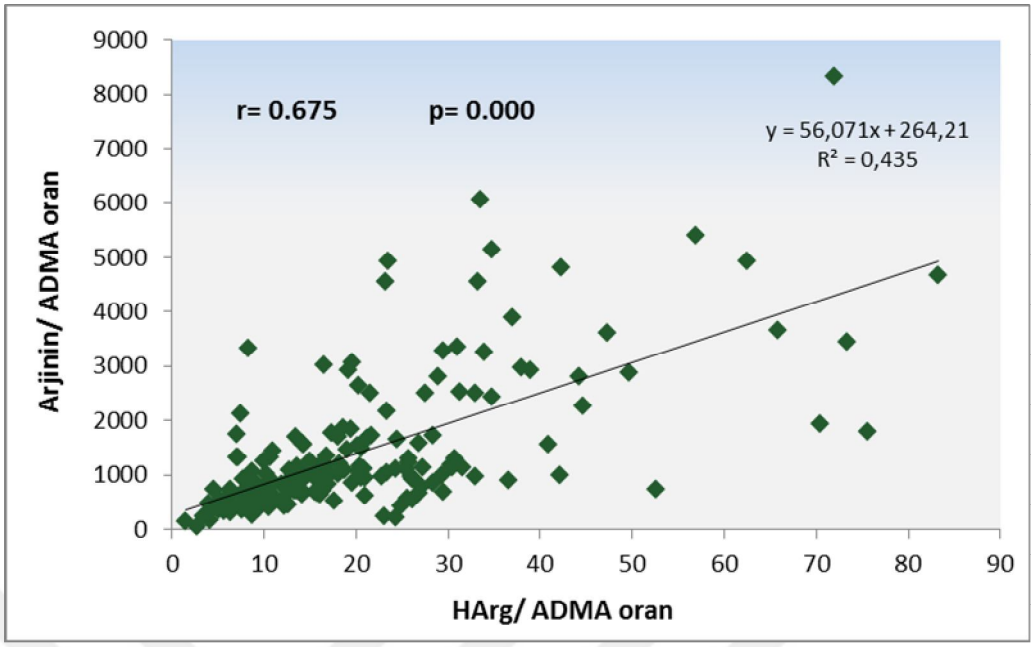
	Arjinin (µmol/L)		Arjinin/ADMA		SDMA/ADMA		HArg/ADMA		Total metilarjininler (µmol/L)	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Yaş	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	**0.199****	**0.007**	*NS*	*NS*	**-0.258****	**0.000**
İnh-A (pg/ml)	*NS*	*NS*	**0.228***	**0.028**	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	**-0.250****	**0.016**
HCG (mIU/ml)	*NS*	*NS*	**0.213***	**0.041**	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*
hArG (µmol/L)	**0.471****	**0.000**	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	**0.539****	**0.000**	**0.476****	**0.000**
ADMA (µmol/L)	*NS*	*NS*	**-0.720****	**0.000**	**-0.624****	**0.000**	**-0.572****	**0.000**	**0.610****	**0.000**
SDMA (µmol/L)	**0.147***	**0.047**	**-0.218****	**0.003**	**0.313****	**0.000**	*NS*	*NS*	**0.648****	**0.000**
L-NMMA (µmol/L)	**0.377****	**0.000**	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	**0.168***	**0.023**	**0.721****	**0.000**
HArg/ ADMA	**0.339****	**0.000**	**0.675****	**0.000**	**0.552****	**0.000**	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*
Arjinin (µmol/L)	*NS*	*NS*	**0.605****	**0.000**	*NS*	*NS*	**0.339****	**0.000**	**0.294****	**0.000**
Arjinin/ ADMA	**0.605****	**0.000**	*NS*	*NS*	**0.561****	**0.000**	**0.675****	**0.000**	**-0.254****	**0.001**
SDMA/ ADMA	*NS*	*NS*	**0.561****	**0.000**	*NS*	*NS*	**0.552****	**0.000**	*NS*	*NS*
Total metilarjininler (µmol/L)	**0.294****	**0.000**	**-0.254****	**0.001**	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*

Çizelge 3.4'de görüldüğü gibi Arjinin değerleri ile HArg/ADMA oranı (r=0.339**,p= 0.000)(Şekil 3.29), Arjinin/ADMA oranı (r=0.605**, p=0.000) ve total metilarjininler (r=0.294**, p= 0.000) arasında güçlü pozitif korelasyon bulundu.



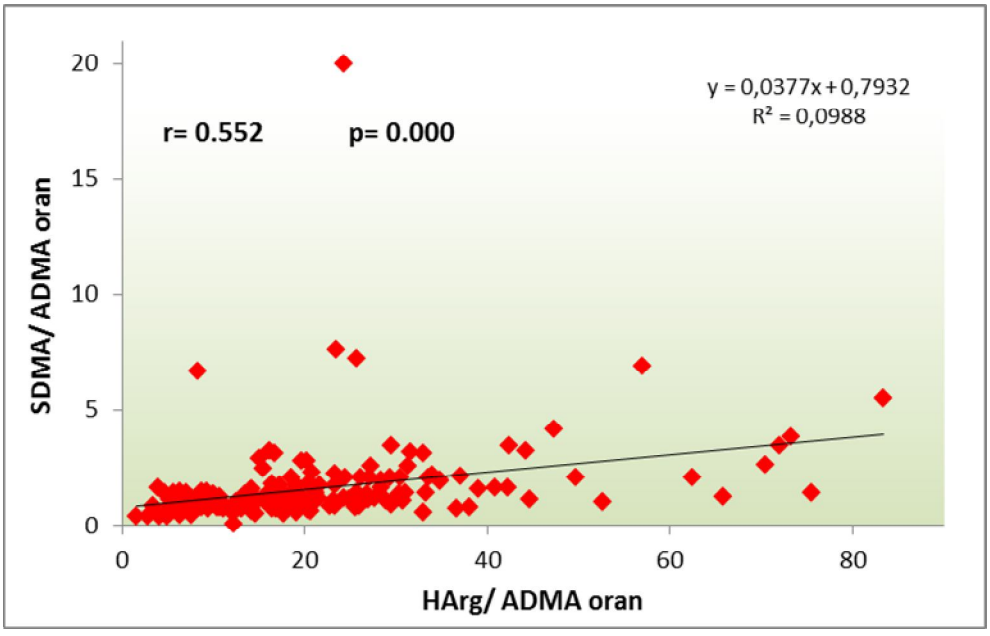
Şekil 3.29. Homoarjinin/ADMA oranı ve arjinin arasındaki korelasyon grafiği

Arjinin/ADMA oranı ise, SDMA/ADMA oranı (r=0.561**, p= 0.000) ve HArg/ADMA oranı (r=0.675**, p=0.000)(Şekil 3.30) ile güçlü pozitif korelasyon gösterirken, total metilarjininler (r= - 0.254**, p= 0.001) ile güçlü negatif korelasyon gösterdi.



Şekil 3.30. Homoarjinin/ADMA oranı ve Arjinin/ADMA oranı arasındaki korelasyon grafiği

HArg/ADMA oranı ile SDMA/ADMA oranı (r=0.552**, p= 0.000) arasında güçlü pozitif korelasyon gözlendi (Şekil 3.31).



Şekil 3.31. Homoarjinin/ADMA oranı ve SDMA/ADMA oranı arasındaki korelasyon grafiği

4. TARTIŞMA

Bu çalışma, gebeliğin ikinci trimesterinde (dörtlü tarama testi yapılan gruplar) maternal L-homoarjinin ve L-arjinin konsantrasyonlarının arttığını göstermiştir. Ayrıca, L-homoarjinin konsantrasyonu, endotelyal disfonksiyon göstergesi olan İnhibin-A ile ilişkiliydi. Yani gebelik komplikasyonları açısından risk arttıkça L-homoarjinin düzeyleri azalmaktaydı.

Bu bulgular, L-homoarjininin normal gebelikte, endotele bağlı vazodilatasyon ile ilişkili olabilecek biyolojik bir işlevi olduğunu düşündürmektedir. Maternal L-homoarjinin konsantrasyonu ile ADMA konsantrasyonu arasında bulmuş olduğumuz ilişki de L-homoarjininin fizyolojik konsantrasyonunda ADMA'nın kilit bir düzenleyicisi olması olasılığını düşündürmektedir.

Vasküler tonus ve sağlıklı yapının sürdürülmesinde çok önemli bir rolü olan endotel hücrelerde fonksiyon bozukluğunun aterosklerotik sürecin başlangıcını oluşturduğu fikri benimsenmiştir. Endotel disfonksiyonunun major nedeni, L-argininden NOS aracılığıyla sentezlenen nitrik oksitin üretimindeki azalmadır. eNOS inhibitörü olan ADMA'nın endotel disfonksiyon ve koroner kalp hastalığında oldukça yeni bağımsız bir risk faktörü olduğu fikri ileri sürülmüştür (Tuncer, 2008).

Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarda preeklampsi gelişiminden evvel ADMA seviyelerinde bir artış gözlendiği rapor edilmiştir. Gebelik süresinde erken dönemde ADMA düzeyi yüksek olan kadınlarda endotelyal disfonksiyon ile ADMA seviyesi arasında ilişki vardır ve bu, kadınlarda preeklampsi gelişiminde öngörü sağlayabilir. (Vallance ve Leiper, 2004).

ADMA seviyeleri normal gebelik esnasında azalır ve ilk trimestrin sonunda minimuma ulaşır, daha sonra gebelik yaşının artışıyla birlikte düzeyleri artar. Fakat gebelik döenminde ADMA konsantrasyonlarının düşük olduğu ve gebelik haftaları arasında herhangi bir fark olmadığı yönünde çalışmalar da mevcuttur (Alaçam,2008).

Gebelik boyunca maternal sistemik vasküler fonksiyon değişiklik gösterir. Uterin kan akışında ve kardiak outputta artış görülür iken kan basıncı ve periferal direnç azalır. Deneysel ve klinik çalışmalarla elde edilen kanıtlar artan NO sentezinin gebelikte maternal vasküler adaptasyonun önemli bir kısmından sorumlu olduğunu göstermiştir (Sladek ve ark., 1997 ;Williams ve ark.,1997).

Preeklampsi ve ADMA ilişkisi ilk olarak 1993 yılında Fickling ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Preeklampsili hastalardaki ADMA düzeylerinin, sağlıklı gebe kadınlara göre anlamlı şekilde daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (Fickling ve ark., 1993).

Savvidou ve arkadaşları ADMA'nın yüksek plazma konsantrasyonlarının preeklampsi görülmeden önce oluştuğu ve preeklampsi gelişimine sebep olduğu hipotezini test etmişlerdir. Sonuçta preeklampsi gelişen kadınlarda maternal endotel fonksiyonlarının bozulduğunu ve bu düşüşün klinik belirtilerin gelişmesinden önce olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada, daha sonra preeklampsi gelişen kadınlarda ilk trimesterde ADMA düzeyleri yükselmiştir; bu faktörün gebeliğin erken döneminde yararlı bir prediktif belirteç sağlayabileceğini göstermektedir. Preeklampsinin geliştiği kadınlarda maternal endotelyal fonksiyonun bozulduğunu gözlemlemişlerdir. Birçok çalışma, preeklampsi gelişen kadınların hayatın ilerleyen döneminde artmış kardiyovasküler komplikasyonlar oluşturma riski taşıdıklarını ileri sürmüştür. Maternal endotel disfonksiyonu, yerleşmiş preeklampsinin bir özelliğidir, ancak bunun, bozukluğun bir nedeni veya sonucu olup olmadığı belli değildir (Savvidou ve ark., 2003).

Kim ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmada L-arjinin ADMA ve SDMA plazma konsantrasyonlarını HPLC ile ölçmüş ve preeklamptik gebelerde normal gebe kadınlara göre L-arjinin seviyelerini önemli ölçüde düşük bulmuşlardır. Fakat ADMA ve SDMA seviyeleri arasında, normal ve preeklamptik gebeler arasında anlamlı herhangi bir değişiklik saptamamışlardır. Preeklampsinin gelişiminde azalmış L-arjinin düzeylerinin, artmış ADMA düzeylerinden çok daha etkili olduğunu iddia etmişlerdir (Kim ve ark.,2006).

Tamas ve arkadaşları 2013 yılında yaptıkları çalışmada; hastaları klinik semptomların görüldüğü (hipertansiyon + proteinüri) gebelik yaşına göre(<34 vs. ≥ 34) kategorize etmişler ve L-arjinin, ADMA, SDMA, MMA seviyelerini LC-MS/MS ile ölçmüşlerdir. Sağlıklı gebelere göre preeklamptik gebelerde plazma ADMA ve MMA seviyelerini önemli ölçüde yüksek bulmuşlardır ($p<0.002$). Erken. -başlangıç ve geç –başlangıç preeklampsili hastalar arasında ADMA ve SDMA parametreleri açısından anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Tamas ve ark., 2013).

Prefumo ve arkadaşları 2008 yılında yaptıkları çalışmada gebe kadınlarda ilk trimesterda uterin arter direnci ile maternal serum ADMA düzeyleri arasında ilişkiyi

araştırmışlardır. 21'i yüksek arter direnci ve 19'u kontrol grubu olan 40 gebelik incelemişlerdir. Preeklampsi oluşan 3 vaka da yüksek arter dirençli grupta yer almaktaydı. Ortalama maternal serum ADMA seviyelerini kontrol grubunda 0.93(%56) µmol/L, yüksek arter dirençli grupta 0.78(%44) µmol/L olarak bulmuşlardır (p=0.17). Maternal serum ADMA ile uterin arter direnci arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (r=-0.15, p=0.36)(Prefumo ve ark., 2008).

Kardiyovasküler sistem üzerine pek çok düzenleyici fonksiyonu olan molekülü (NO) inhibe etmesi sebebiyle ADMA, özellikle son yıllarda üzerinde sık araştırma yapılan moleküllerden biri haline gelmiştir. Literatüre bakıldığında ADMA sentezinde ve yıkımında rol oynayan enzimlerin çeşitli hastalıklarda aktivitelerinin değiştiği görülmektedir. Bir kısım hastalıkların ADMA düzeylerinde artışa PRMT1 aktivitesini artırıp sentezini artırarak; bir kısmının da ADMA yıkımını azaltarak sebep olduğu dikkat çekmektedir. Özellikle kardiyovasküler hastalıklar olmak üzere birçok hastalıkta "bir belirteç olabilir mi" sorusuna cevaplar aranmaya devam edilmektedir. Buna ilaveten endotel disfonksiyonuna sebebiyet vermesi ve pek çok hastalığın patogenezinde endotel disfonksiyonun son derece önemli olması, yakın gelecekte de ADMA ve diğer metillenmiş arjinin türevleri hatta homoarjinin üzerine çalışmaların devam edeceğine işaret etmektedir (Alaçam, 2008).

Yapılan birçok çalışmada, gebeliğin özellikle 3.trimesterda preeklampsili gebelerde maternal serum ADMA konsantrasyonları anlamlı olarak daha yüksekti (Fickling ve ark., 1993; Holden ve ark., 1998; Petterson ve ark.,1998; Ellis ve ark.,2001). Bununla birlikte, Kolombiya, Kore ve Hollanda'nın yakın tarihli raporlarında bu bulgular doğrulanmadı. Bu farklılıkların açıklaması bilinmemekle birlikte, bazı durumlarda etnik köken, coğrafi konum ve beslenme durumu arasındaki farklılıklar, hastalık şiddeti ve maternal böbrek / karaciğer tutulumunun kapsamı gibi faktörlerle birlikte önemli rol oynadığı düşünülmektedir.

Valtonen ve arkadaşları 2009 yılında yapmış oldukları çalışmalarında gebe olmayan kadınlara kıyasla (0.57±0.07) gebeliğin erken dönemlerdeki bireylerde (0.53 ± 0.06) azalmış ADMA konsantrasyonları rapor etmişler ve buna bağlı olarak NO'in artışının plasental perfüzyonun bozulmamasının ve fetusun normal büyüme ve gelişmesinin altında yatan mekanizmalardan biri olduğu fikrini benimsemişlerdir. Bizim de çalışmamızda bulduğumuz gebe gruplarındaki tüm ADMA

konsantrasyonları refere edilen çalışmalardaki gebe olmayan bireylerdeki konsantrasyonlardan [(0.93 μmol/L(Prefumo ve ark.,2008), düşük bulunmuş ve bu araştırmacıların elde ettiği serum ADMA düzeyleri ile kesin olmamakla beraber benzerlik gösterdiği düşünülmektedir. Aynı araştırmacı grubu tarafından 2008 yılında yapılan çalışmada, L-arjinin, L-homoarjinin ve ADMA seviyeleri HPLC ile ölçülmüş ve gebe olmayan kontrol grubunda (n=61) serum L-homoarjinin konsantrasyonları 1.trimester (n=13) (3.1±1.4)μmol/L 2.trimester(n=22)(4.8±1.7) μmol/L ve 3.trimesterdaki(n=23) (5.3±1.5) μmol/L gebe gruplarına kıyasla anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. L-homoarjinin konsantrasyonu gebelik yaşı ile anlamlı bir korelasyon göstermiştir.($r = 0.426$, $p = 0.001$)

Bu araştırma grubunun gözlemlerine göre, gebelik sırasında L-homoarjinin konsantrasyonunun ardındaki mekanizma henüz belirsizdir ancak mevcut sonuçlar, gebe olmayan bir kadında 6μmol / L'yi aşan bir L-homoarjinin konsantrasyonunun yüksek olabileceğini, buna karşılık gebe bir kadında böyle bir konsantrasyonun yaygın olduğunu göstermektedir. L-arjinin düzeyleri de, gebe olmayan grupta (100.6±17.1) 1.2. ve 3.trimesterdaki düzeylerinden daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla 87.1±11.5 , 97.2±17.2, 94.7±16.1). ADMA seviyeleri ise kontrol grubunda 0.57±0.07 μmol/L olarak ölçülmüş ve gebelikte 1.,2. ve 3. trimesterdaki düzeylerine göre daha yüksek konantrasyonlarda olduğu rapor edilmiştir. Gebelik trimesterları arasında(1.2.ve 3.trim.) ise ADMA seviyeleri benzer düzeylerde bulunmuş ve herhangi bir farklılık saptanmamıştır (sırasıyla 0.51±0.08, 0.51±0.07, 0.51±0.06 μmol/L). NOS'un NO üretiminin bir göstergesi olan L-arjinin / ADMA oranı, tüm trimesterlerde değişmeden kalmıştır. ADMA'nın indirgeyici enzimi DDAH'ın bir indeksi olan SDMA/ADMA oranı, , birinci ve üçüncü trimesterdeki oranla kıyaslandığında ikinci trimesterde istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0.05$) (Valtonen ve ark.,2008).

Çalışmamızda ise L-arjinin/ADMA oranı ikili tarama testi yapılan gruplarda (1.Trimester), dörtlü tarama testi yapılan (2.Trimester) gruplara göre anlamlı derecede düşük seviyedeydi. SDMA/ ADMA oranı ise bu araştırma grubunun çalışmalarında olduğu gibi ikinci trimesterda dörtlü tarama testi yapılan gruplarda , birinci trimesterda ikili tarama testi yapılan gruplara göre anlamlı derecede artış göstermiştir.

Holden ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları çalışmada menopoz öncesi 15 kadında (yaş ortalamaları 55 olan 46 dan 63' e kadar değişen yaşlarda) 2 haftada bir subkutan 100 mg etinilestradiol vermişler ve bu işlem yapılmadan önce ortalama östrojen konsantrasyonu seviyesini 188.4±20.4 ng/Lolarak bulmuşlardır. Etinilestradiol implantı sonrası ise anlamlı bir atış olmuş östrojen konsantrasyonu 220.3±23.6 ng/L ($p<0.05$) bulunmuştur. Ortalama plazma ADMA konsantrasyonu ise 0.722 ±0.04 μmol/L den 0.588 ±0.03 μmol/L' e anlamlı olarak düşüş göstermiştir ($p<0.05$). 17-β estradiol tedavisi sonrası her ne kadar ortalama plazma SDMA konsantrasyonu 0.395± 0.14 μmol/L olarak bulunmuştur (estradiol implantı öncesi (0.486± 0.07 μmol/L ($p= 0.54$)) fakat bu düşüş istatiksel olarak anlamlı değildir. Normal şartlarda erken gebelikte maternal östrojen konsantrasyonu belirgin şekilde artmaktadır ve bunun da DDAH enzim aktivitesini ve ADMA 'nın metabolize olmasını stimüle ettiğini göstermişlerdir (Holden ve ark.,2003).

Bizim de çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulardan yola çıktığımızda dörtlü test istemi yapılan kontrol grubumuzda ve riskli grubumuzda saptanmış olan Ue_3 düzeylerimiz (sırasıyla 0.73±0.30, 0.79±0.44) tam mekanizması kesin olarak bilinmese de ,yine dörtlü test istemi yapılan riskli grupta kontrol grubuna kıyasla daha düşük ADMA düzeyleri bulunmasının arkasında yatan faktörlerden biri olabileceğini fikrini bize düşündürmektedir. Dolayısıyla, maternal dolaşımda ADMA konsantrasyonunda azalma, artmış DDAH aktivitesi, artan böbrek klirensi veya hemodilüsyona bağlı olabilir diye düşünmekteyiz. Ancak, aynı hasta grupları için, dimetilarjinin dimetil amino hidrolaz (DDAH) enzimini de değerlendirmeye alsaydık bu konu biraz daha netleşebilirdi. Çünkü, ADMA düzeylerinin artmasının bilinen en yaygın nedenlerinden biri de bozulan DDAH aktivitesidir. Bu enzim aktif bölgesinde bir reaktif sülfidril grubu ihtiva etmesi sebebiyle oksidatif strese karşı duyarlıdır. Alternatif olarak uE_3 bir antioksidan gibi davranabilir çünkü oksidatif stres DDAH ekspresyonunu etkilemeksizin DDAH enzimini inhibe edebilir.

Rizos ve arkadaşları 2012 yılında ADMA'nın gebelik döneminde 3 trimesterda düzeylerini araştırdıkları çalışmalarında, normal gebeliklerde (n=41) ADMA konsantrasyonlarını 3 trimesterda (sırasıyla 0.51 ±0.14; 0.52 ±0.13; 0.58 ±0.16) olarak rapor etmişlerdir. Erken gebelik haftasında doğum yapan gebelerde (Small gestational age baby) (n=14) ise ADMA konsantrasyonları (0.40 ±0.10 1.trim

p=0.005; 0.42 ±0.10 2.trim p=0.007; 0.45 ±0.10 3.trim p=0.007) normal gebeliklere kıyasla anlamlı derecede düşük bulmuşlardır.

Table III. Mean (±SD, range) ADMA concentration (μmol/L) of the three studied groups in the three trimesters of pregnancy.

	Uncomplicated pregnancies	Pregnancies complicated with preeclampsia	Pregnancies with SGA infants
N	41	10	14
1st trimester 1			
GA at sampling (weeks)	12.6±0.5 (11.7–13.9)	12.4±0.3 (12.0–13.0)	2.7±0.5 (12.0–13.7)
ADMA	0.51±0.14 (0.23–0.84)	0.58±0.10 (0.42–0.78)	0.40±0.10 (0.25–0.57)[a]
2nd trimester			
GA at sampling (weeks)	21.8±1.6 (19.7–25.9)	21.6±1.1 (20.3–23.4)	22.0±1.4 (21.0–25.9)
ADMA	0.52±0.13 (0.32–0.74)	0.63±0.14 (0.51–0.99)[b]	0.42±0.10 (0.32–0.65)[c]
3rd trimester			
GA at sampling (weeks)	31.8±1.4 (28.1–36.1)	31.8±2.1 (31.6–34.0)	31.7±1.0 (30.3–33.0)
ADMA	0.58±0.16 (0.27–0.86)[d]	0.68±0.11 (0.53–0.84)	0.45±0.10 (0.33–0.62)[c]

[a] $p < 0.005$ compared to uncomplicated pregnancies.
[b] $p < 0.02$ compared to uncomplicated pregnancies.
[c] $p < 0.007$ compared to uncomplicated pregnancies.
[d] $p < 0.04$ compared to 1st trimester.
GA, gestational age.

Preeklampsi gelişen gebeliklerin (n=10)(0.58 ± 0.10 1.trim; 0.63 ± 0.14 2.trim, 0.68 ± 0.11) ADMA düzeyleri komplikasyonsuz gebelere göre tüm trimesterlarda yüksek olmasına rağmen fark sadece 2.trimesterda istatiksel olarak anlamlı idi (p=0.02).

Leiper ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları çalışmada knockout farelerinde homozigot DDAH-1 geninin delesyona uğraması ölümcül olduğu için, DDAH aktivitesinin fetal gelişim için de önemli olduğu yapılan çalışmalarda sunulmuştur (Leiper ve ark., 2007).

Noris ve arkadaşları 2005, preeklamptik trofoblastik hücrelerde normal plasentaya kıyasla L-arjinin-hidrolize edici enzim arginaz II' nin önemli ölçüde yükselmiş seviyelerine işaret etmişlerdir. Sıçanlarda ve farelerde görüldüğü gibi enzimin testosteron tarafından potansiyel olarak upregülasyonu söz konusudur. Kan ve doku belirteçlerinde oksidatif stresin yüksek düzeyleri görülmüştür ve L-arjininin düşük miktarlarının oksidatif strese katkıda bulunarak preeklampsiyi indüklediği bilinmektedir (Noris ve ark., 2005).

Normal gebelikte endotel hücrelerinde nitrik oksit sentezi artmakta ve böylece fizyolojik vazodilatasyona katkıda bulunmaktadır. Dolayısıyla, ilk üç aylık dönemde L-arjinin konsantrasyonunun önemli ölçüde düşmesi, L-arginin'in NO

sentezi için artmış tüketiminin bir yansıması olabilir ve çalışmamızda elde ettiğimiz ilk trimesterda ikili tarama testi yapılan kontrol ve riskli gruplarda diğer gruplara kıyasla (dörtlü tarama testi yapılan kontrol ve riskli grup) daha düşük arjinin seviyeleri, gebelik sırasında gözlemlenen ADMA baskılanmasına yani azalmış ADMA düzeyleri ile paralellik göstermektedir.

Çok düşük ADMA seviyelerinin, L-arjinin konsantrasyonu ADMA konsantrasyonundan 100 kat daha yüksek olduğunda L-arjinin substratı ile rekabet ederek NOS aktivitesini inhibe ettiğine inanılmaktadır. Ayrıca, daha önce yapılan incelemeler, katyonik amino asitlerin, taşıma mekanizmaları yoluyla hücresel L-arjinin taşınmasını değiştirerek endotelyal hücrelerde NO üretimini modüle edebildiğini göstermiştir (Bhardwaj ve Moore, 1989)

Atzler ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları çalışmalarında HPLC yöntemi ile ölçülen homoarjinin plazma konsantrasyonu, sağlıklı gönüllülerde ortalama 2.15 ± 0.75 ± µmol / L (ortalama ± SD, n = 30) olarak bulunurken (Atzler ve ark., 2015). Valtonen ve ark. da L-homoarjinin sağlıklı bireylerde plazma konsantrasyonunu 5.07 ± 0.07 µmol / L (ortalama ± SD, n =3) olarak bulmuşlardır. (Valtonen ve ark.,2008).

Marz ve arkadaşları Ludwigshafen Risk ve Kardiyovasküler Sağlık (LURIC) çalışmasında, koroner anjiyografi yapılan hastalarda ortalama serum L-homoarjinin konsantrasyonlarını 2.6 ± 1.1 / µ mol/L olarak rapor etmişlerdir (HPLC metodu ile) (Marz ve ark., 2010).

Bu farklı yöntemlerle saptanan ortalama L-homoarjinin plazma konsantrasyonları arasındaki farklar, farklı iç standartlara veya araştırılan farklı popülasyonlara bağlı olabilir.

L-homoarjininin, NOS tarafından NO üretimi için bir substrat olarak hareket edebildiğini ve gebeliğin NO' nun artan tüketimine yanıt olarak hücre sinyallemesinin yeniden programlanmasıyla ilişkili olduğunu gösteren çeşitli fonksiyonel çalışmalar mevcuttur (Yi FX ve ark., 2005; Hecker ve ark., 1991; Hrabak ve ark., 1994).

Gerritsen ve arkadaşları, erişkenlerde değil fakat yenidoğanların idrarında L-homositrülin gözlemlemişlerdir, ve NOS enziminin L-homoarjinin'i L-homositrüline dönüştürdüğü bilinmektedir (Gerritsen ve ark., 1961).

Bu çalışma, gebeliğin ikinci trimesterinde (dörtlü tarama testi yapılan gruplar) maternal L-homoarjinin konsantrasyonlarının arttığını göstermiştir. Ayrıca, L-homoarjinin konsantrasyonu, invazif olmayan endotelyal disfonksiyon göstergesi olan İnhibin-A ile ilişkiliydi. Yani gebelik komplikasyonları açısından risk arttıkça L-homoarjinin düzeyleri azalmaktaydı. Bu bulgular, L-homoarjininin normal gebelikte, endotele bağlı vazodilatasyon ile ilişkili olabilecek biyolojik bir işlevi olduğunu düşündürmektedir. Maternal L-homoarjinin konsantrasyonu ile ADMA konsantrasyonu arasında bulmuş olduğumuz ilişki de L-homoarjininin fizyolojik konsantrasyonunda ADMA'nın kilit bir düzenleyicisi olması olasılığını düşündürmektedir.

Son olarak, normal gebelik sırasında anne vücudunda birbiriyle etkileşime giren çeşitli fizyolojik, metabolik ve immünolojik değişiklikler olduğu göz önünde bulundurulmalıdır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

ADMA konsantrasyonları gebelikte genellikle ilk trimesterın sonunda minumuma ulaşır ve ikili test istemi yapılan riskli ve kontrol grubundaki bireylerde birbirine benzer ADMA düzeyleri bulunması ve yine çalışmamızda riskli gruplarda kontrol gruplarına göre daha düşük konsantrasyonlarda ADMA düzeyleri varlığı, gebeliğin ilk trimesterında serum ADMA konsantrasyonlarının riskli grupları belirlemede kesin bir belirteç olamayabileceğini düşündürmektedir ve preeklampsi dışında serum ADMA düzeyi iyi bir belirteç olarak kullanılamayabilir. Yine gebelik haftaları arasında da ADMA konsantrasyonlarının değişkenliği daha kapsamlı çalışmalarla aydınlatılması gereken bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır.

ADMA'nın major eliminasyon yolu karaciğerde DDAH enzimi tarafından yıkılmasıdır fakat gebelik döneminde renal hiperfiltrasyon düşük ADMA düzeylerinden sorumlu olabilir, Çünkü DDAH enzmi böbrek glomerüllerinde ve tubuluslarında oldukça yüksek seviyelerde bulunmaktadır ve bu da enal hiperfltrasyon ile böbreklere ulaşan ADMA seviyelerinde azalışa sebep olabilmektedir diye düşünmekteyiz.

Homoarjinin serum seviyelerinin gebe kadınlardaki düzeyleri açısından ve tarama testlerinde bakılan inhibin A düzeyleri ile HArg düzeyleri arasındaki ilişki bakmından literatürde bir boşluk olduğu görülmektedir ve bu bağlamda yapılan ilk çalışma olması sebebiyle, HArg- İnhibin A mekanizmasının tam olarak aydınlatılabilmesi için yapılacak ek çalışmalara ihtiyaç vardır. Yüksek risk altındaki kadınların erken dönemde belirlenmesinde homoarjinin yeni bir risk markırı olarak ortaya çıkabilir.

5.2. Öneriler

Baştan çok normal görünen bir hamilelik döneminde bile sonradan ciddi sorunlar yaşanabileceği için, riskli gebelik olsun veya olmasın bütün gebeliklerin takip altında olması büyük önem taşımaktadır. Gebelik dönemi süresince oluşabilecek komplikasyonların patogenezinde ve meydana gelebilecek maternal

sorunlar (kardiyovasküler hastalıklar, preeklampsi, eklampsi, servikal yetmezlik vs.) veya fetusa bağlı gebelik dönemi sorunlarında (kromozom anomalileri, IUGR (fetusta gelişme geriliği),oligohidramnios vs.) özellikle endotel disfonksiyonun bir göstergesi olan metillenmiş arjinin türevleri gibi bazı biyomarkırların önemi son derece büyüktür.

ADMA'nın maternal ve fetoplasental ünitedeki etkilerinin daha iyi anlaşılması gerekmektedir. Fonksiyonel olarak plasentada 2.trimesterda ADMA konsantrasyonundaki bir artış, trofoblast motilitesi, invazyon ve sağkalım gibi bir takım durumları etkiliyor olabilir. Bununla birlikte, ilk trimesterde fetusun ürettiği ADMA'nın, ikinci trimesterde artmış maternal ADMA konsantrasyonuna yol açıp açmadığı henüz araştırılmamıştır ve bu konunun da aydınlatılması gerekmektedir.

Hastalıkların patogenezini anlayabilmek ve bunları tedavi ile ilişkilendirmek, yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesi ve hatta hastalıklar oluşmadan sağlıklı kişilerin risk faktörlerinin elimine edilmesi açısından bu biyomarkırların biyokimyasal fonksiyonlarının ve önemlerinin anlaşılabilmesi son derece mühim ve araştırılması gereken bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır.

Homoarjinin ve diğer metillenmiş arjinin türevlerinin tanısal performansını belirlemek için farklı hasta popülasyonlarında ve geniş çalışma gruplarında yapılacak daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Çünkü, bu belirteçlerin vücut sıvı düzeylerindeki herhangi bir artış gebeliğin erken safhasında saptanabilirse, gebelikte oluşabilecek hastalıkların erken teşhis ve tedavilerini sağlamak ve bu suretle hem tedavi maliyetlerinin düşürülmesi hem de riskli gebeliklerin komplikasyonlardan erken prognozu sağlanabilecektir.

ADMA , homoarjinin ve inhibin A düzeylerinin, gebelik döneminde değişkenliği ve nasıl bir rol izlediği yapılacak ilave çalışmalarla daha da netleşecek, hastalıklar için spesifik belirteç olarak laboratuvarlarda kullanılabilir olacaktır. Ayrıca sadece serumda değil doku düzeyinde de araştırmalara ihtiyaç vardır. HArg takviyesi de dahil olmak üzere, HArg'nin insanlarda klinik olarak bazı etkilere sahip olup olmadığı ya da AGAT aktivitesi gibi bazı patofizyolojik süreçlerde yeni bir belirteç olarak kullanılıp kullanılamayacağı konusunu açıklayabilmek için yapılacak ek çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu gruplara ait hasta sayıları arttırılarak daha fazla sayıda katılımcı ile yapılacak çalışmaların da yine gebelik döneminde bu ilişkileri daha net olarak saptayacağını söyleyebiliriz.

KAYNAKLAR

Alaçam, H., Dikmen, Z. G., Doğan, P., 2010, Asimetrik dimetil arjinin (ADMA) metabolizması ve ADMA'n›n oksidatif hasar, endotel hasarı ve çeşitli hastalıklarla ilişkisi, 41:75-81.

Alaçam, H., 2008, Preeklampside Asimetrik Dimetil Arjinin (Adma) Ve Oksidan/Antioksidan Sistemin Rolü, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 67s.

Alvarez R, Gonzalez P, Batalla A, Reguero JA, Cubero G, Hevia S, Cortina A, Merino E, Gonzalez I, Alvarez V, Coto E. Association between the NOS3 (2786 T/C) and the ACE (I/D) DNA Genotypes and Early Coronary Artery Disease. *J Biol Chem.* 2001; 5: 343-348.

Atzler D, Schwedhelm E, Nauck M, et al. Serum reference intervals of homoarginine, ADMA, and SDMA in the Study of Health in Pomerania. Clin Chem Lab Med 2014; doi: 10.1515/cclm 2014-0314 [Epub ahead of print].

Atzler, D., Edzard, S., Choe CU.,2015. L-Homoarginine and cardiovascular disease, Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2015, 18:83–88.

Baylis, C., Arginine, arginine analogs and nitric oxide production in chronic kidney disease. Nat Clin Pract Nephrol. 2006; 2(4): 209-220.

Bayraktutan, Z., 2011. Akciğer Kanserli Hastalarda Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz (Enos) Gen Polimorfizmi Ve Plazma Asimetrik Dimetil Arjinin (Adma) Konsantrasyonunun Belirlenmesi, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı , Uzmanlık Tezi , Erzurum, 93 s.

Bird IM, Zhang L, Magness RR. Possible mechanisms underlying pregnancy-induced changes in uterine artery endothelial function. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284: R245– R258.

Birdsall M, Ledger W, Groome N, Abdalla H, Muttukrishna S.(1997) Inhibin A and activin A in the first trimester of human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* ,82(5):1557-60.

Bhardwaj R, Moore PK. The effect of arginine and nitric oxide on resistance blood vessels of the perfused rat kidney. *Br J Pharmacol* 1989; 97: 739–744.

Blackwell S. The biochemistry, measurement and current clinical significance of asymmetric dimethylarginine. Ann Clin Biochem 2010, 47: 17-28.

Böger, R., H. 2006. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): A novel risk marker in cardiovascular medicine and beyond. Annals of Medicine, 38: 126-136,.

Böger, R., H. 2004. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous ınhibitor of nitric oxide synthase, explains the "l-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor. J. Nutr; 134: 2842–2847.

Böger, R., H. 2004. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous ınhibitor of nitric oxide synthase, explains the "l-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor. J. Nutr; 134: 2842–2847.

Brosnan JT, da Silva RP, Brosnan ME. The metabolic burden of creatine synthesis. Amino Acids 2011; 40:1325–1331.

Buğdaycı, G., Serin, E., 2005, Asimetrik dimetilarginin (ADMA). Düzce Tıp Fakültesi Dergisi; 2: 36-41.

Burgin KB. Prenatal genetic screening. J Midwifery Womens Health 2008; 53(4):391-2.

Cardounel, A., J., Cui, H., Samouilov, A., Johnson, W., Kearns, P., Tsai, A., L., Berka, V. And Zweier, J., L. Evidence for the pathophysiological role of endogenous methylarginines in regulation of endothelial no production and vascular function. The Journal Of Bıologıcal Chemıstry 2007; 282 (2): 879–887.

Chan, N. N., Chan, J. C. N. Asymmetric dimethylarginine (adma): a potential link between endothelial dysfunction and cardiovascular diseases in insulin resistance syndrome?. Diabetologia 2002; 45: 1609–1616.

Choe CU, Atzler D, Wild PS, et al. Homoarginine levels are regulated by L-arginine:glycine amidinotransferase and affect stroke outcome: results from human and murine studies. Circulation 2013; 128:1451–1461.

Clarke S. Protein methylation. Curr Opin Cell Biol 1993;5:977–983.

Closs E.I., Basha F.Z , Habermeier A., Förstermann U., Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y+ carrier hCAT-2B.Nitric Oxide 1 (1997) 75.

Cornwell TL, Arnold E, Boerth NJ, Lincoln TM. Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by Cgmp. *Am J Physiol.*1994; 267: 1405-1413.

Cooke JP, Tsao PS. Arginine: a new therapy for atherosclerosis? Circulation, 1997; 95: 311-312.

Cooke, J., Does adma cause endothelial dysfunction. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000; 20: 2032-2037.

Cooke JP., 2004, Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker Circulation 109:1813-1818.

Conover CA, Kiefer MC, Zapf J, Posttranslational regulation of insulin-like growth factor binding protein-4 in normal and transformed human fibroblasts: insulin-like growth factor dependence and biological studies, J. Clin. Invest. 91 (1993) 1129– 1137.

Cuckle HS, Wald NJ, Lindenbaum RH. 1984. Maternal serum alphafetoprotein measurement: a screening test for Down syndrome. Lancet 28: 926–929.

Davids, M., Swieringa E., Palm, F., Smith,D., Smulders, Y.MScheffer. P.G, Blom, H.J., Teerlink, T. Simultaneous determination of asymmetric and symmetric dimethylarginine, l-monomethylarginine, l-arginine, and l-homoarginine in biological samples using stable isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography* B, 900 (2012) 38– 47.

Di Gangi IM, Chiandetti L, Gucciardi A, et al. Simultaneous quantitative determination of N(G),N(G)-dimethyl-L-arginine or asymmetric dimethylarginine and related pathway's metabolites in biological fluids by ultrahigh-performance liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry. Anal Chim Acta, 2010; 677(2):140-8.

Discroll DA, Gross SJ. Screening for fetal aneuploidy and neural tube defects. Genet Med 2009; 11:818-21.

Duley L . T he global impact of pre-eclampsia and eclampsia. Semin Perinatol 2009 ; 3 : 130 – 7 .

Ellis J, Wennerholm UB, Bengtsson A, Lilja H, Pettersson A, Sultan B, Wennergren M, Hagberg H. Levels of dimethylarginines and cytokines in mild and severe preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001;80:602–608.

Erbil, M., Kurt, G., Yaman, H., Çakır, E., Akgül, Ö., Çaycı, T., 2012, Asimetrik dimetilarjininin metabolizması ve klinik önemi. Türk Biyokimya Dergisi; 37 (1): 99–105.

Erdem, S., Ünlü, A. Asimetrik dimetilarjinin ve klinik önemi. Selçuk Tıp Derg 2009; 25 (2): 107-115.

Fickling SA, Williams D, Vallance P, Nussey SS, Whitley GS. Plasmaconcentrations of endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Lancet* 1993;342:242–243.

Fliser, D. Asymmetric dimethylarginine (adma): the silent transition from an „uraemic toxin" to a global cardiovascular risk molecule. European Journal of Clinical Investigation 2005; 35: 71–79.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; 299: 373-376.

Gerritsen T, Lipton SH, Strong FM, Waisman HA. On the isolation and identification of homocitrulline from urine. *Biochem Biophys Res Commun* 1961; **4:** 379 – 383.

Ghilardi G, Biondi ML, DeMonti M, Bernini M, Turri O, Marroso F, Guagnellini E, Scorza R. Independent Risk Factor for Moderate to Severe Internal Carotid Artery Stenosis: T786C Mutation of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene. *Clin Chem.* 2002; 48: 989-993.

Giudice LC, Conover CA, Bale L ve ark, Identification and regulation of the IGFBP-4 protease and its physiological inhibitor in human trophoblasts and endometrial stroma: evidence for paracrine regulation of IGF II bioavailability in the placental bed during human implantation, J. Clin. Endocrinol. Metab. 87 (2002) 2359–2366.

Hayden MR, Tyagi SC. Is type 2 diabetes mellitus a vascular disease (atheroscleropathy) with hyperglycemia a late manifestation? The role of NOS, NO, and redox stres. *Cardiovascular Diabetology.* 2003, 2: 2.

Hecker M, Walsh DT, Vane JR. On the substrate specificity of nitric oxide synthase. *FEBS Lett* 1991; 294**:** 221 – 224.

Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, Haydock S, Hopper RV, Stephens NG, O'Shaughnessy KM, Brown MJ. A common variant of endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation.* 1999, 100: 1515-1520.

Hrabak A, Bajor T, Temesi A. Comparison of substrate and inhibitör specificity of arginase and nitric oxide (NO) synthase for arginine analogues and related compounds in murine and rat macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 198: 206– 212.

Holden DP, Fickling SA, Whitley GS, Nussey SS. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine, a natural inhibitor of nitric oxide synthase, in normal pregnancy and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:551–556.

Holden DP, Cartwright JE, Nussey SS, Whitley GS. Estrogen stimulates dimethylarginin dimethylaminohydrolase activity and the metabolism of asymmetric dimethylarginine. Circulation 2003;108:1575–1580.

Huang, L. T., Hsieh, C. S., Chang, K. A., and Tain, Y. L..(2012). Roles of nitric oxide and asymmetric dimethylarginine in pregnancy and fetal programming. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), 14606-14622.

Huang, LF., Guo, FQ., Yi-Zeng Liang , YZ., Li, YB., Cheng, BM.,Simultaneous determination of L-arginine and its mono- and dimethylated metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* (2004) 380: 643–649.

Kakoki M, Kim HS, Edgell CJ, Maeda N, Smithies O, Mattson DL. Amino acids as modulators of endothelium-derived nitric oxide. *AmJ Physiol Renal Physiol* 2006; **291:** F297– F304

Khalil, A., Hardman, L., and O Brien, P. (2015, June). (In pres). The role of arginine, homoarginine and nitric oxide in pregnancy. *Amino Acids*.

.

Khan SD, Khan T, Zeballos GA, Mathew L, Potharlanka P, Knect M, Whelan J.Decreased activity of the L-arginine nitric oxide metabolic pathway in patients with congestive heart failure. *Circulation.* 1999; 99: 2113-2117.

Kim YJ, Park HS, Lee HY. Reduced L-arginine level and decreased placental eNOS activity in preeclampsia. Placenta 2006; 27(4-5): 438-44.

Kleber ME, Seppala I, Pilz S, et al. Genome-wide association study identifies 3 genomic loci significantly associated with serum levels of homoarginine: the AtheroRemo Consortium. Circ Cardiovasc Genet 2013; 6:505–513.

Kuru A. Yüksek Lisans Tezi; "Gebelerin Risk Durumunun Belirlenmesinde Kullanılan "Knox Skorlama Sisteminin Geçerliliğinin Değerlendirilmesi" Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ebelik Anabilim Dalı, Tez Yöneticisi; Yrd. Doç. Dr. Neriman Soğukpınar. İzmir - 2007.

Kuşkucu Çınar, A. Fetal Kromozom Anomalisi Tarama Testleri, JOPP Derg 2(2):55-60, 2010.

Lawrence JB, Oxvig C, Overgaard MT ve ark, The insulin-like growth factor (IGF)- dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy associated plasma protein-A, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999) 3149–3153.

Leiper J, Nandi M, Torondel B, Murray-Rust J, Malaki M, O'Hara B, et al. Disruption of methylarginine metabolism impairs vascular homeostasis. Nat Med 2007;13:198–203.

Leiper,J., Vallance , P., Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases *Cardiovascular Research* .43. 1999. 542 –548.

Lembo G, De Luca N, Battagli C, Iovino G, Aretini A, Musicco M, Frati G, Pompeo F, Vecchione C, Trimarco B. A common variant of endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is an independent risk factor for carotid atherosclerosis. *Stroke.* 2001, 32: 735-740.

Lin TM, Halbert SP, Kiefer D, Spellacy WN, Gall S, Characterization of four human pregnancy-associated plasma proteins, Am. J. Obstet. Gynecol. 118 (1974) 223–236.

Lüscher T, Noll G. Is it all in genes…? Nitric oxide synthase and coronary vasospasm.*Circulation.* 1999, 99:2855-2857.

Malone FD, Canick JA, Ball RH, Nyberg DA, Comstock CH, Bukowski R, Berkowitz RL, Gross SJ, Dugoff L, Craigo SD, Timor-Tritsch IE, Carr SR, Wolfe HM, Dukes K, Bianchi DW, Rudnicka AR, Hackshaw AK, LambertMesserlian G, Wald NJ, D'Alton ME. First- and SecondTrimester Evaluation of Risk (FASTER) Research Consortium. First-Trimester or Second-Trimester Screening or Both, for Down Syndrome. N Engl J Med 2005; 353(19):2001-11.

Marcus-Braun N, Brick O, Manor E, Segal D, Harari G, Toma I, ShalevS, Borochowitz Z.U, Yaron Y, Sharony R, Itzhaky D, Shtoyerman R, Appelman Z, Braun G. Dependence of maternal serum AFP / hCG median ratios on age of gestation: comparsion of trisomy 21 to euploid pregnancies. Prenat Diagn 2009.

März, W. Meinitzer, A. Drechsler, C. Pilz, S. Krane, V. Kleber, M.E. Fischer, J. Winkelmann, B.R. Bohm, B.O. Ritz, E. Wanner, C. Circulation 122 (2010) 967.

McBride AE, Silver PA. State of the Arg: Protein methylation at arginine comes of age.Cell 2001;106:5–8.

McNamara DM, Holubkov R, Postava L, Ramani R, Janosko K, Mathier M, MacGowan GA, Murali S, Feldman AM, London B. Effect of the Asp298 variant of endothelial nitric oxide synthase on survival for patients with congestive heart failure. *Circulation.* 2003, 107: 1598-602.

Merkatz IR, Nitowsky HM, Macri JN, Johnson WE. 1984. An association between low maternal serum alpha-fetoprotein and fetal chromosomal abnormalities. Am J Obstet Gynecol 148: 886–894.

Mittermayer F, Pleiner J, Krzyzanowska K, et al. Regular physical exercise normalizes elevated ADMA concentrations in patients with Type 1 Diabetes mellitus. Wien Klin Wochenschr. 2005;117(23-24):816- 20.

Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K, Ogawa E, Hamanaka I, Takahashi N, Kaneshige T, Teraoka H, Akamizu T, Azuma N, Yoshimasa Y, Yoshimasa T, Itoh H, Mashuda I, Yasue H, Nakao K. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension.* 1998; 32: 3-8.

Moali, C. , Boucher J.L., Sari M.A ,. Stuehr D.J., Mansuy D., Biochemistry 37 (29) (1998) 10453–10460.

Moncada,S., Higgs, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. Engl. N. J. Med. 329 (1993) 2002.

Muttukrishna S, North RA, Morris J, Schellenberg JC, Taylor RS, Asselin J, Ledger W, Groome N, Redman CW. Serum inhibin A and activin A are elevated prior to the onset of pre-eclampsia. *Hum Reprod.* 2000;15(7):1640-5.

Muttukrishna S, George L, Fowler PA, Groome NP, Knight PG. Measurement of serum concentrations of inhibin-A (alpha-beta A dimer) during human pregnancy. *Clin Endocrinol* (Oxf). 1995;42(4):391-7.

Noris M, Perico N, Remuzzi G (2005) Mechanisms of disease: preeclampsia. Nat Clin Prac Nephrol 1:98–114.

Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, Lüscher TF. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis.*Circulation.* 1998; 30: 2494-2498.

Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K, 1989. Purification and properties of a new enzyme: NG, NGdimethylarginine dimethylaminohydrolase from rat kidney. J Biol Chem, 264, 10205–10209.

Önderoğlu L, Kabukçu A, Aktaş D, Kaşifoğlu MA, Balcı S, Gökşin E. İkinci tirmester anne serumunda Alfa-fetoproetin, koryonik gonadotropin ve ankonjuge östriol düzeylerinin Down Sendromu taramasında etkinliği perinatoloji dergisi 1996; 4:117-120.

Palm, F., Onozato, M., L., Luo, Z. And Wilcox, C., S. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (ddah): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007; 293: 3227-3245.

Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988; 333: 664-666.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987; 327: 524-526.

Parker A, Gockerman A, Busby WH, Clemmons DR, Properties of an insulin-like growth factor-binding protein-4 protease that is secreted by smooth muscle cells, Endocrinology 136 (1995) 2470–2476.

Pettersson A, Hedner T, Milsom I. Increased circulating concentrations of asymmetric dimethyl arginine (ADMA), an endogenous inhibitör of nitric oxide synthesis, in preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998;77:808–813.

Powell JT, Higman DJ. Smoking, nitric oxide and the endothelium. *Br J Surg.* 1994; 81:785-787.

Prefumo, F., Thilaganathan, B., & Whitley, G. S. 2008. First-trimester uterine artery resistance and maternal serum concentration of asymmetric dimethylarginine. *Ultrasound Obstet Gynecol,* 31(2): 153-157.

Reddy UM, Wapner RJ. Comparison of first and second trimester aneuploidy risk assessment. Clin Obstet Gyn 2007; 50:442-53.

Ryan, W.L.,Wells, I.C. Science 144 (1964) 1122.

Ryan WL, Johnson RJ, Dimari S. Homoarginine synthesis by rat kidney. *Arch Biochem Biophys* 1969; 131**:** 521 – 526.

Savvidou MD, Hingorani AD, Tsikas D, Frolich JC, Vallance P, Nicolaides KH. Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia. Lancet. 2003; 361: 1511–1517. PMID: 12737861.

Sladek SM, Magness RR, Conrad KP. Nitric oxide and pregnancy. Am J Physiol 1997;272:R441–463.

Slaghekke F, Dekker G, Jeffries B. Endogenous inhibitors of nitric oxide and preeclampsia: A review. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2006;19:447–452.

Stefanie M., Bode-Böger A.,Fortunato Scalera A., Louis J., Ignarro B. The L-arginine paradox: ımportance of the l-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. Pharmacology & Therapeutics 2007 ;114 : 295–306.

Stenman U.H, Tiitinen A, Alfthan H ve ark. The classification, functions and clinical use of different isoforms of HCG Human Reproduction Update, 2006:12,769–784

Tamás, P., Bódis, j., Sulyok, E., Kovács, GL., Hantosi,E., Molnár, G., Martens-Lobenhoffer, J., Stefanie M. Bode-Böger , L-arginine metabolism in early-onset and late-onset preeclampticpregnancies, *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation,* 2013; 73:5 436–443.

Taner, A., 2010. Diyabetik Hastalarda Maskeli Hipertansiyonun Gelişiminde Asimetrik Dimetil Argininin Rolü, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı , Uzmanlık Tezi , Konya, 69 s.

Tanrıverdi HA, Çınar E. Brinci Trimester Tarama Testleri. Ed: Çiçek MN, Akyürek C, Çelik Ç, Haberal A. Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi. Ankara: Güneş Kitabevi. 2004: 247-264.

Tarnow L, Hovind P, Teerlink T, et al. Elevated plasma ADMA as a marker of cardiovascular morbidity in early diabetic nephropathy in Type 1 diabetes. Diabetes Care 2004;27(3):765-9.

Taşkın L. Doğum ve Kadın Sağlığı Hemşireliği.10. Baskı. ISBN: 975-94661-0-4 Ankara- 2011. ss: 227-273.

Teerlink,T. ADMA metabolism and clearance.Vasc. Med. 10 (Suppl. 1) (2005) S73.

Turan T, Ceylan SS, Teyikçi S. Annelerin düzenli prenatal bakım alma durumları ve etkileyen faktörler. Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi 2008; 3(9): 157-172.

Vallance, P., Leiper, J., Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine: dimethylarginine dimethylaminhydrolase pathway. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004; 24:1023-1030.

Valtonen,P., T. Laitinen, T. Lyyra-Laitinen, O.T. Raitakari, M. Juonala, J.S. Viikari, N. Heiskanen, E. Vanninen, K. Punnonen, S. Heinonen, Circ. J. 72 (2008) 1879.

Valtonen P, Punnonen K, Saarelainen H, Heiskanen N, Raitakari OT, Viikari JS, Lyyra-Laitinen T, et al. Maternal serum ADMA is not associated with proinflammatory cytokines or C-reactive protein during normal pregnancy. *Cytokine* 2009;46:216–221.

Vidal MJ, Romero JC, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing factor inhibits rennin release. *Eur J Pharmacol.* 1998; 14: 401-402.

Wald NJ, Watt HC, Hackshaw AK, Integrated screening for Down's syndrome based on tests performed during the first and second trimesters, N. Engl. J. Med. 341 (1999) 461– 467.

Walser, M.,in: Strangburg, J.B., Wyngaaoden, J.B., Fredrisckson, D.S. (Eds.), The Metabolic Basis of Inherited Disease, 4th edn., Mc Graw Hill, New York, 1983,p. 402.

Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, McCredie RM, Wilcken DE. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat Med.* 1996; 2:41-45.

Wenstrom K. First-trimester Down Syndrome screening: Component analytes and timing for optimal performance. Semin Perinatol 2005; 29:195-202.

Welch, J. W., Wilcox, S. C., Macula densa arginine delivery and uptake in the rat regulates glomerular capillary pressure. The American Society for Clinical Investigation 2007 ; 9: 2235–2242.

Yates S. Pregnancy and Childbirth.1. Edition ISBN 978-0-7020-3055-0 China - 2010. ss: 367-392.

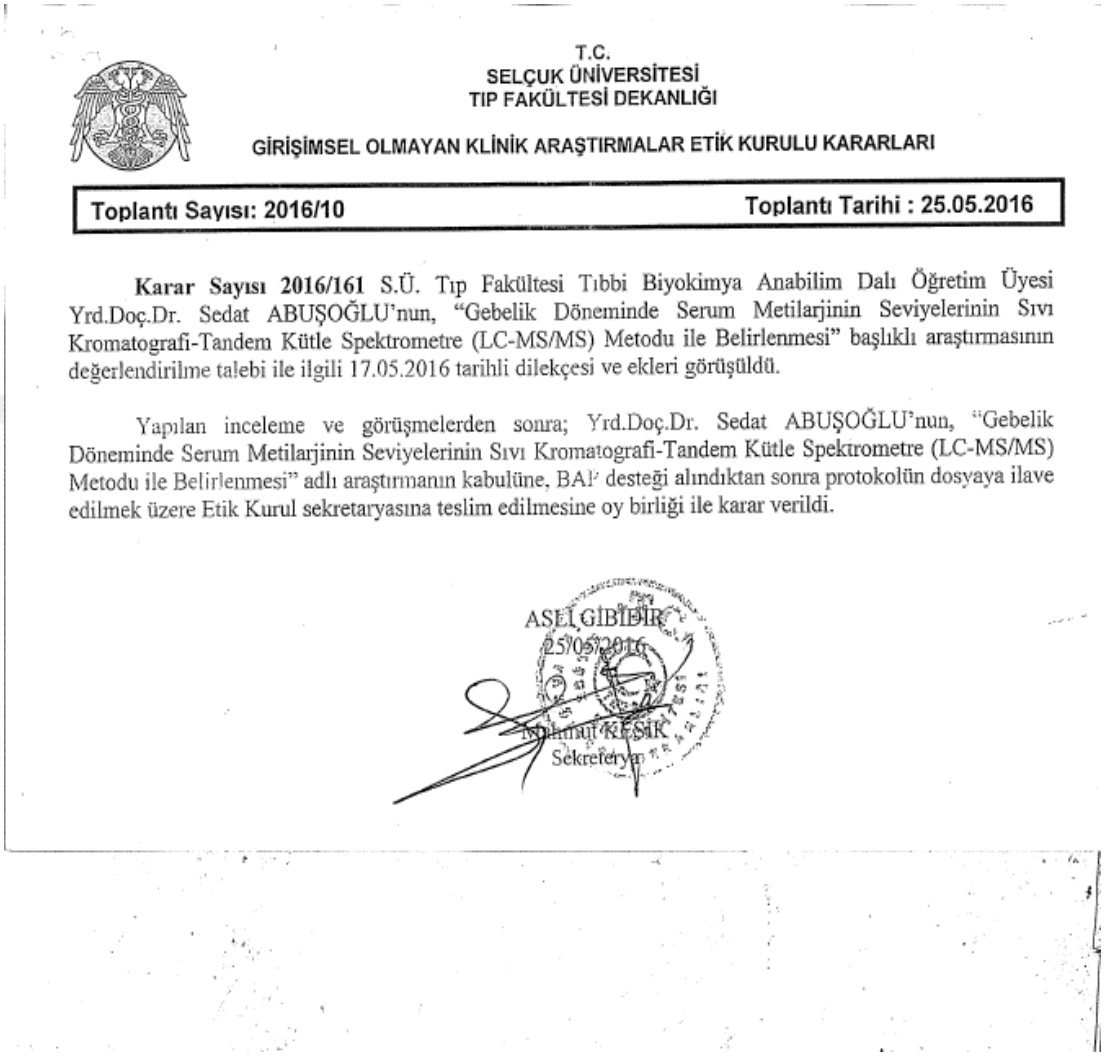
Yi FX, Magness RR, Bird IM. Simultaneous imaging of [Ca2+]i and intracellular NO production in freshly isolated uterine artery endothelial cells: Effects of ovarian cycle and pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288**:** R140– R148.

Yüksel, E., 2010, Ağır Sepsis Ve Septik Şoklu Hastalarda Asimetrik Dimetilarjinin (Adma) Ve Nitrik Oksit (No) Düzeylerinin Araştırılması, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 82 s.

Zournatzi V, Dandiilidis A, Karidas C, Tantanasis T, Loufopoulos A, Tzafettas J. Aprospective two years study of first trimester screening for Down Syndrome Hippokratia 2008; 12(1):28-32.

EKLER

EK-A: Etik Kurul Kararı



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARARLARI

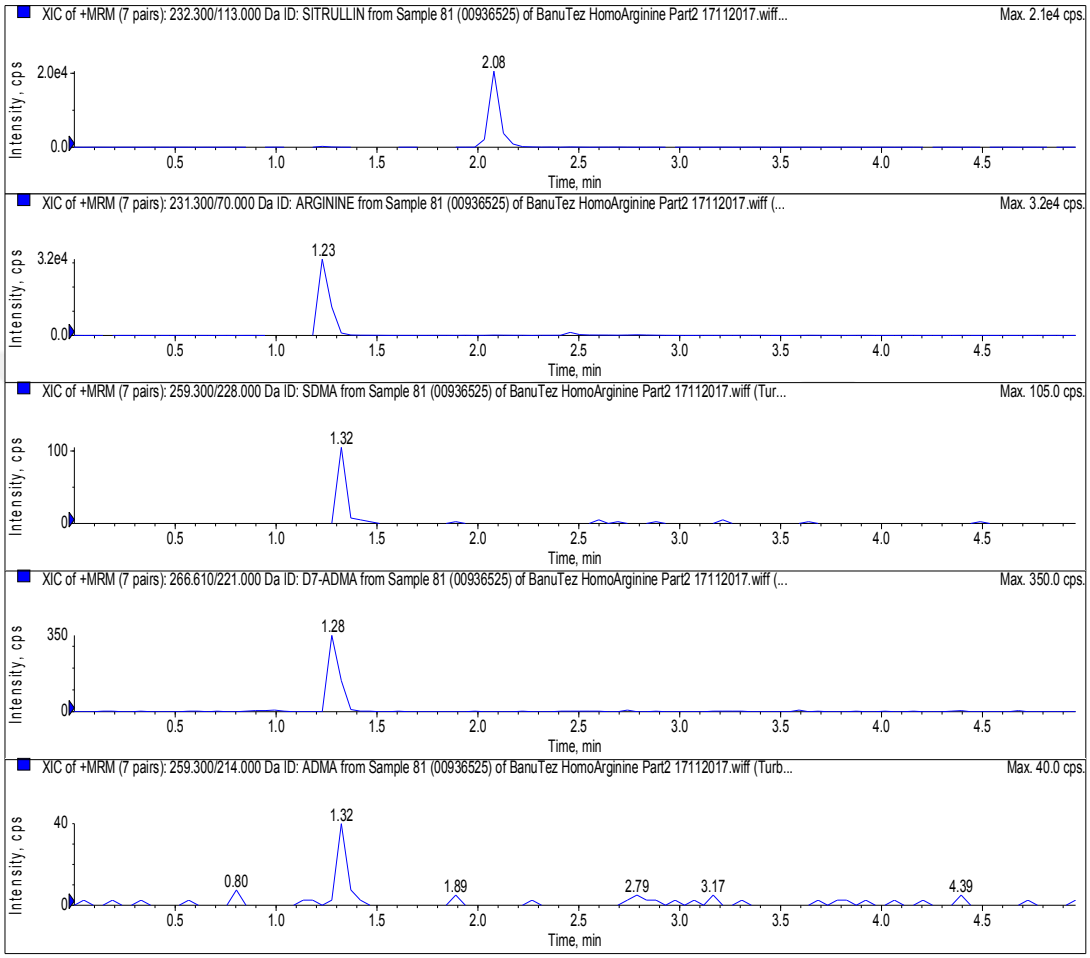
Toplantı Sayısı: 2016/10 **Toplantı Tarihi : 25.05.2016**

Karar Sayısı 2016/161 S.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr. Sedat ABUŞOĞLU'nun, "Gebelik Döneminde Serum Metilarjinin Seviyelerinin Sıvı Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometre (LC-MS/MS) Metodu ile Belirlenmesi" başlıklı araştırmasının değerlendirilme talebi ile ilgili 17.05.2016 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü.

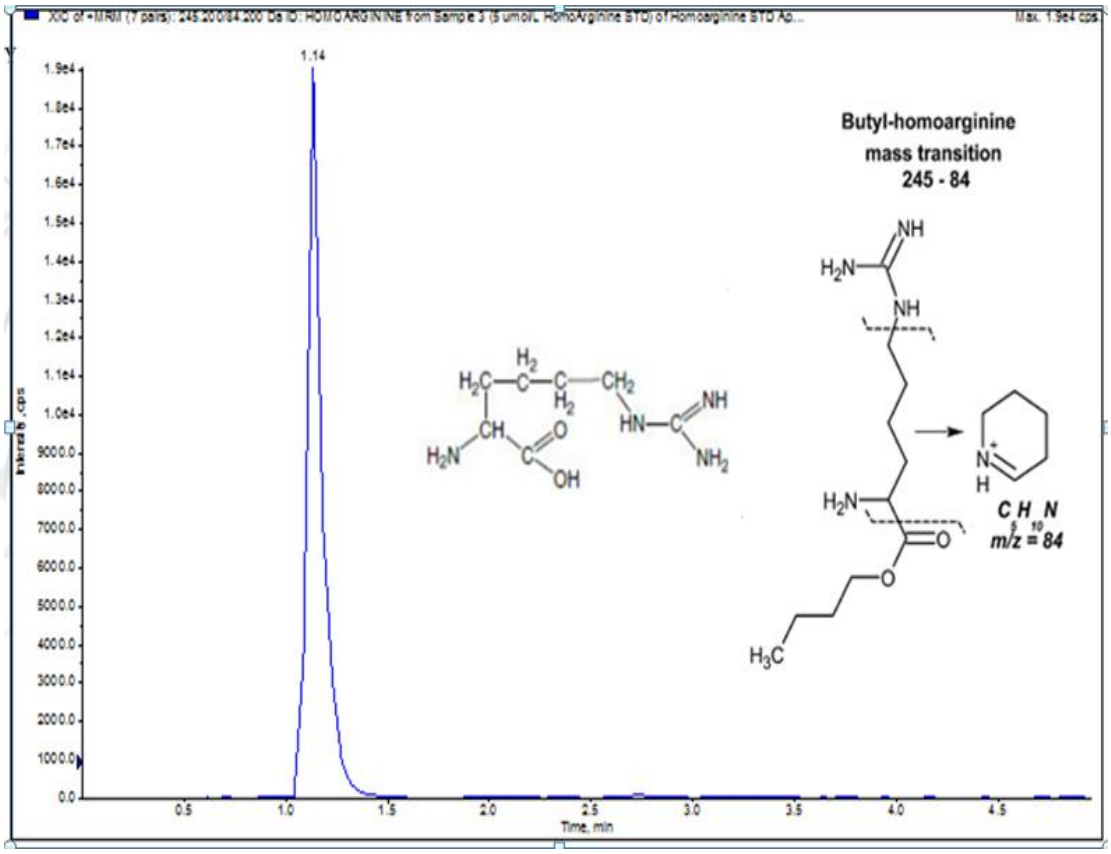
Yapılan inceleme ve görüşmelerden sonra; Yrd.Doç.Dr. Sedat ABUŞOĞLU'nun, "Gebelik Döneminde Serum Metilarjinin Seviyelerinin Sıvı Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometre (LC-MS/MS) Metodu ile Belirlenmesi" adlı araştırmanın kabulüne, BAP desteği alındıktan sonra protokolün dosyaya ilave edilmek üzere Etik Kurul sekretaryasına teslim edilmesine oy birliği ile karar verildi.

ASEL GİBİDİR
25/05/2016
Mahmut KEŞİK
Sekreterya

EK-B: Laboratuvarımızda bulunan LC-MS/MS cihazından Metillarjininlere ait kromatogram



EK-C: LC-MS/MS cihazıyla analiz edilen Homoarjinin pikine ait kromatogram (Homoarjinin 5µmol/L lik standardı)



EK- D : Tezden üretilmiş yayınlar

1. H.Banu KESKİNKAYA, Sedat ABUŞOĞLU, Abdullah SİVRİKAYA Setenay Arzu YILMAZ, , Ali ÜNLÜ. Gebelik Döneminde Serum Asimetrik Dimetilarjinin Düzeyleri, 3.In *vitro* Diagnostik Sempozyumu, **Poster Bildiri**, 28.02-02.03.2018 İzmir.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Hatice Banu KESKİNKAYA
Uyruğu : T.C
Doğum Yeri ve Tarihi : ANKARA / 23.05.1990
Telefon : 0507.711.88.90
e-mail : banu_biondo01@hotmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Yahya Kemal Beyatlı Anadolu Lisesi ANKARA	2008
Üniversite	: Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2012

UZMANLIK ALANI

Biyokimya

YABANCI DİLLER

İngilizce

KATILDIĞI KURSLAR VE EĞİTİMLER

Kursun Konusu

1.LC-MS/MS (Sıvı Kromotografisi Kütle Spektrometresi) Sistemleri Yazılım, Donanım Ve Temel Kullanım Sertifikası

2.HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromotografisi) Sistemleri Yazılım, Donanım Ve Temel Kullanım Sertifikası

3.ICP-MS (İndüktif Eşleşmiş Plazma (ICP) Kütle (Mass Spektrometresi) Sistemleri Yazılım, Donanım Ve Temel Kullanım Sertifikası

4. Westrern Blot Kursu Genom ve Kök Hücre Merkezi, Erciyes Üniversitesi, 25-26 Mayıs 2016.

5. Pedagojik Formasyon Eğitimi Sertifikası – Necmettin Erbakan Üniversitesi

6. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası –Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Deney Hayvanları Etik Kurulu

7.ISO9001 :2008 Kalite Yönetim Sistemi Sertifikası - TSC Yönetim Sistemleri Eğitim Akademisi

8. ISO 14001 : 2004 Çevre Yönetim Sistemi - TSC Yönetim Sistemleri Eğitim Akademisi

9.OHSAS 18001 : 2007 İş Sağlığı ve Güvenliği Yönetim Sistemi - TSC Yöneti Sistemleri Eğitim Akademisi

10.ISO 10002 : 2004 Müşteri Memnuniyeti Yönetim Sistemi - TSC Yönetim Sistemleri Eğitim Akademisi

11. Motivasyon ve Stres Yönetimi Eğitim Sertifikası-A.K..E.D(Anadolu Kariy Egitim Danışnmanlık Hizmetleri)

12.İleri Satış, Pazarlama Ve İkna Teknikleri Eğitim Sertifikası- A.K.E.D

13. Etkili İletişim Ve Beden Dili Eğitim Sertifikası- A.K.E.D

14. Etkili Konuşma Ve Diksiyon Eğitim Sertifikası- A.K.E.D

15. Etkin Yönetim Ve Liderlik Eğitim Sertifikası - A.K.E.D

16. İnsan Kaynakları Yönetimi Eğitim Sertifikası - A.K.E.D

17. Takım Çalışması Ve Performans Yönetimi Eğitim Sertifikası - A.K.E.D

18.Zaman Yönetimi Eğitim Sertifikası - A.K.E.D

19.TUBİTAK 2229- Tıbbi Bilimlerde Lisansüstü Öğrencilere Yönelik Bilimsel Araştırma ve Proje Hazırlama Eğitimi

ÜYELİKLER

Üyelik Dönemi	Üyelik Türü	Kuruluş
2015 - 2018	TAM	TÜRK BİYOKİMYA DERNEĞİ
2017- 2018	FAHRİ	KLİNİK BİYOKİMYA UZMANLARI DERNEĞİ

2017- 2018	FAHRİ	TÜRK KLİNİK BİYOKİMYA DERNEĞİ

YAYINLAR, POSTERLER VE BİLİMSEL ÇALIŞMALAR

1. H.Banu KESKİNKAYA, Cengiz AKKÖZ, Numan Emre GÜMÜŞ, Serdar KARAKURT, Beyşehir ve Çavuşçu Göllerindeki Toksik ve Karsinojenik Organik Kirliliğin Bu Göllerde Yaşayan Sazan Balığı(*Cyprinus Carpio L.,1758)* Üzerine Etkilerinin Biyokimyasal Olarak İncelenmesi, II.Balıklandırma ve Rezervuar Sempozyumu, **Poster Bildiri,** 20.05-22.05.2015, Isparta.(Yüksek lisans tezinden yapılmıştır.)

2. H.Banu KESKİNKAYA, Hatice Müge SAMANCI DURSUN, Sibel ERDOĞAN, Sedat ABUŞOĞLU, Ali ÜNLÜ, Konya Bölgesindeki B–Talasemi Taşıyıcılığı Ve Hemoglobin Varyantları Prevalansı, 27.Ulusal Biyokimya Kongresi, **Poster Bildiri**, 03.11-06.11.2015, Antalya.

3. Mehmet Nuri ATALAR, H.Banu KEKİNKAYA, Sedat ABUŞOĞLU, Süleyman BALDANE, Suleyman Hilmi İPEKÇİ, Ali ÜNLÜ, Levent KEBAPÇILAR, Diyabetik Hastalarda Serum Galektin-3 Seviyeleri İle İnsülin Direnci Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi, İnsülin Direnci Sempozyumu, **Poster Bildiri**, 22.03.2017, İzmir.

4. H.Banu KESKİNKAYA, Mehmet Nuri ATALAR, Sedat ABUŞOĞLU, Süleyman BALDANE, Suleyman Hilmi İPEKÇİ, Ali ÜNLÜ, Levent KEBAPÇILAR, Diyabetik Hastalarda Artmış Serum ADMA Düzeyleri İle İnsülin Direnci Arasında İlişki, İnsülin Direnci Sempozyumu, **Sözlü Bildiri**, 22.03.2017, İzmir.

5. H.Banu KESKİNKAYA, Fatih KARA, Hüsamettin VATANSEV, Üniversite Öğrencilerinin Depresyon Düzeyleri, Beslenme Alışkanlıkları-Bilgisi Ve Beden Kitle İndeksi Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesİ, 4. Uluslararası Helal ve Sağlıklı Gıda Kongresi, **Sözlü Bildiri,** 03.11-05.11.2017, Ankara.

6. H.Banu KESKİNKAYA, Büşra KAMA, Fatih KARA, Hüsamettin VATANSEV, Üniversite Öğrencilerinin Depresif Belirtileri ve Beslenme Davranışları Arasındaki İlişki, 4. Uluslarası Helal ve Sağlıklı Gıda Kongresi, **Sözlü Bildiri,** 03.11-05.11.2017, Ankara

7. Hüsamettin VATANSEV, Nurcan EVLİYAOĞLU, E.Nedime BİLİR, H.Banu KESKİNKAYA, Ender ERDOĞAN, Protectıve Effects Of Nigella Satıva On Carbon Tetrachlorıde-Induced Nephrotoxıcıty Model In Rats, Food and Chemical Toxicology,?? (hakem sürecinde)

8. H.Banu KESKİNKAYA, Hakan VATANSEV, Meryem AYRANCI, Morbid Obez Hastalara Uygulanan Sleeve Gastrektomi Cerrahi Yönteminin B12

Vitamini Ve Folik Asit Düzeylerine Etkisi, 3.In *vitro* Diagnostik Sempozyumu, **Poster Bildiri,** 28.02-02.03.2018, İzmir.

9. H.Banu KESKİNKAYA, Sedat ABUŞOĞLU, Abdullah SİVRİKAYA, Setenay Arzu YILMAZ, , Ali ÜNLÜ. Gebelik Döneminde Serum Asimetrik Dimetilarjinin Düzeyleri 3.In *vitro* Diagnostik Sempozyumu, **Poster Bildiri**, 28.02-02.03.2018 İzmir(Yüksek lisans tezinden yapılmıştır.

10. Hakan VATANSEV, Muammer ÖZDEMİR, H.Banu KESKİNKAYA, Asbest Maruziyeti İle Oluşan Akciğer Hastalıkları. 2.Uluslararası Mesleksel ve Çevresel Hastalıklar Kongresi, **Poster Bildiri,** 04.03-08.03.2018, Antalya .

11. Hakan VATANSEV, H.Banu KESKİNKAYA, Muammer ÖZDEMİR, Öznur EYMİR, Pestisitlerin İnsan Sağlığı Ve Çevreye Olan Olumsuz Etkileri. 2.Uluslararası Mesleksel ve Çevresel Hastalıklar Kongresi, **Poster Bildiri,** 04.03-08.03.2018, Antalya .