T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İDRAR METİL ARJİNİN TÜREVLERİNİN REFERANS ARALIKLARININ SAPTANMASI

Nazik YAPRAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ LABORATUVAR ANABİLİM DALI

Danışman
Doktor Öğretim Üyesi Gülsüm ABUŞOĞLU

KONYA-2023

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İDRAR METİL ARJİNİN TÜREVLERİNİN REFERANS ARALIKLARININ SAPTANMASI

Nazik YAPRAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ LABORATUVAR ANABİLİM DALI

Danışman
Doktor Öğretim Üyesi Gülsüm ABUŞOĞLU

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 21202138 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2023

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmza

Öğrencinin Adı SOYADI

Tarih:

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, değerli bilgi ve katkıları ile yöneten, tezimin her aşamasında her türlü yardımlarını esirgemeyen danışman Hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Gülsüm ABUŞOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca bana olan desteğini esirgemeyen Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Sedat ABUŞOĞLU' na çok teşekkür ederim.

Tezime ait biyokimyasal parametrelerin analizlerinin yapılmasında önemli katkıları bulunan laboratuvarda çalışan tüm personel ve lisansüstü öğrencilerine bu çalışmayı BAP proje kapsamında destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne, teşekkür ederim.

Tezimin tamamlanmasında fedekarlığını esirgemeyen Selçuk Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu İlk ve Acil yardım Programı Öğretim Görevlisi Fatma HAKYEMEZ'e çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında manevi desteklerini her an yanımda hissettiğim; anneme, babama ve ailemin diğer fertlerine, yoğun eğitim dönemim boyunca sabırla beni destekleyen, varlığıyla huzur veren kızım Ayşe ve eşim Ahmet YAPRAK'a sonsuz saygı, sevgilerimi sunar, çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **vi**
ÖZET ..... **x**
SUMMARY ..... **xi**
1.GİRİŞ **1**
1.1.Böbreğin Yapısı ve Görevleri 2
1.1.1.Kronik Böbrek Hastalığı 6
1.2.Arjinin 7
1.2.1.Vücutta Eksojen olarak alınan arjinin dağılımı 9
1.2.2.Endojen arjinin sentezi 9
1.2.3.Arjinin metabolizması 10
1.2.4.Arjinin Eksikliği 15
1.2.5.Arjinin fazlalığı 16
1.2.6.Arjinin klinik kullanımda önemi 16
1.2.7.L-Arginin Paradoksu 18
1.3.Metil Arjininler 18
1.3.1.Metil Arjinin Oluşumu ve Türleri 19
1.3.2.Asimetrik Dimetilarjinin (ADMA) 20
1.4.ADMA'nın Analizi 31
1.4.1.ADMA analizi için analitik yöntemler ve Kromatografi 31
1.4.2.Sıvı Kromatografisi Ardışık Kütle Spektrometresi (LC- MS/MS) 32
2.GEREÇ VE YÖNTEMLER **34**
2.1.Kullanılan Reaktif ve Çözeltiler 34
2.3.Kullanılan Cihaz ve Malzemeler 34
2.4.Numune Toplama ve Saklama 35
2.5.Numunelerin analize hazırlanması 36
2.6.LC-MS/MS Metoduyla ADMA, Homoarjinin ve Arjinin Analizi 36
2.7.ADMA Ölçümü İçin LC-MS/MS Değerleri 37
2.8.Homoarjinin Ölçümü İçin LC-MS/MS Değerleri 38
2.9.İstatistiksel Analiz 39
3.BULGULAR **41**
3.1.Araştırma Grubunda Tanımlayıcı Özelliklerine İlişkin Bulgular 41
3.2.ADMA'nın Kalibrasyon Grafikleri ve Analiz Sonuçları 41
3.3.L-NMMA Kalibrasyon Grafikleri ve Analiz Sonuçları 42
3.4.SDMA Kalibrasyon Grafikleri ve Analiz Sonuçları 43

3.5.Arjinin Kalibrasyon Grafikleri ve Analiz Sonuçları 44
3.6.Sitrülin Kalibrasyon Grafikleri ve Analiz Sonuçları 45
3.7.Homoarjinin Kalibrasyon Grafikleri ve Analiz Sonuçları..... 46
3.8.Ornitin'in Kalibrasyon Grafikleri ve Analiz Sonuçları 47
4.TARTIŞMA 50
5.SONUÇ VE ÖNERİLER..... 57
6.KAYNAKLAR 58
7.EKLER..... 71
EK- A Etik Kurul Kararı 71
EK- B Turnitin Raporu..... 73
8.ÖZGEÇMİŞ..... 74

SİMGELER VE KISALTMALAR

umol/g	Mikromol per gram
CA+2	Kalcium
HCl	Hidroklorik asit
IU	International unıt per mililitre
ml	Mililitre
ml/dk	Mililitre per dakika
mm	Milimetre
Na+2	Sodyum
ng/m	Nanogram per mililitre
nM	Nanopolar
nmol/l	Nanomol per litre
NO3	Nitrat
O 2	Oksijen
OC	Santigrat derece
µM	Mikromolar
µmol/L	Mikromol per litre
ABY	Akut böbrek yetmezliği
Ac-ADMA	Asimetrik N α-asetildimetilarginin
Ac-SDMA	Simetrik N α-asetildimetilarginin
AD	Alzheimer hastalığı
ADC	Arjinin dekarboksilaz
ADH	Antidiüretik hormon
ADMA	Asimetrik dimetil arjinin
AGAT	Arjinin glisin amidinotransferaz
AGAT2	Alanin glioksilat aminotransferaz
ARG	Arjinin
Ark.	Arkadaşları
ASL	Arjininosüksinat liyaz
ASS	Arjininosüksinat sentaz
ATS	Arjinil-tRNA sentetaz
BMI	Vücut kitle indeksi

BOS	Beyin omurilik sıvısı
Bp	Tansiyon
C8H18N4O2	Asimetrik NG, NG dimetilarjinin
CAAs	Katyonik aminoasitler
CAD	Collision Gas
CAT	Katyonik aminoasit taşıyıcı
CATs	Katyonik aminoasit taşıyıcılar
CE	Collision Energy
KBY	Kronik böbrek yetmezliği
CRP	C-reaktif protein
CXP	Collision Cell Exit Potential
DDAH	Dimetilarjinin dimetilaminohidrolaz
DM	Diabetes mellitus
DMA	Dimetilarginin
DP	Declustering Potential
eGFR	Glomerüler filtrasyon hızı GFR
ELISA	Enzime bağlı immünosorbent testi
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentaz
EP	Entrance Potential
ESRD	Son dönem böbrek yetmezliği
FAD	Flavin adenin dinükleotit
FMN	Flavin mononükleotit
GAA	Asid alfa glikosidaz
GABA	γ-aminobütirik asit
GC	Gaz kromatografi
GC-MS	Gaz kromatografik-kütle spektrometrik analizi
GFR	Glomerüler filtrasyon hızı
GS1	Ion Source Gas1
GS2	Ion Source Gas2
H2O2	Hidrojen peroksid
HArg	Homoarjinin
Hiperarjininemi	Arjinin fazlalığı

HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IS	Ionspray Voltage
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
KBH	Kronik böbrek hastalığı
KDIGO	Küresel Sonuçların İyileştirilmesi
KoA	Koenzim A
LC-MS/MS	Sıvı Kromotografi-Tandem Kütle Spektrometresi
LDH	Laktat dehidrogenaz
LN	Lupus nefriti
L-NMMA	N-monometil-L-arjinin
LV	Sol ventrikül
MMA	Monometilarjinin
MS	Kütle spektrometrisi
MSNA	Kas sempatik sinir aktivitesi
MTHFR	Metilenetetrahidrofolat redüktazı
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NKF-KDOQI Quality Initiative	National Kidney Foundation-Kidney Disease Outcomes
NMM	N-monometil-arjinin
NMMA	NG-monometil-L-arginin
nNOS	Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
OAT	Ornitin aminotransferaz
ODC	Ornitin dekarboksilaz
PKG	Perkütan koroner girişim
PRMT	Protein Arjinin Metil Tranferaz
PRMT1	Protein Arjinin Metil Tranferaz Tip 1
PRMT2	Protein Arjinin Metil Tranferaz Tip 2
RTR	Böbrek nakli alıcıları
SAH	S-Adenosilhomosistein
SAM	S-Adenozil Metiyonin

SDMA	Simetrik Dimetilarjinin
SLE	Sistemik lupus eritematozusun (
Tc,CD8	Periferal kanda sitotoksik T hücrelerini
TEM	Temperature
Th, CD4	Yardımcı T hücreleri

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İdrar Metil Arjinin Türevlerinin Referans Aralıklarının Saptanması

Nazik YAPRAK

Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Laboratuvar Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ/ KONYA-2023

Endojen arginin bazı fizyolojik ihtiyaçları karşılamak için yetersiz kaldığından metabolik veya travmatik streste zorunlu bir amino asit haline gelebilmektedir. Hastalık anında argininin tükenmesi, yara iyileşmesinde uzama ya da bozulma, kan akışındaki bozukluklar ve T-hücre disfonksiyonu ile ilgilidir. Asimetrik dimetilarjin (ADMA), N-monometil L-arjin (L-NMMA) ve simetrik dimetilarjinin (SDMA) başlıca metil arjin türevleridir. Böbrek yetmezliği ya da böbrek hasarı olan hastaların idrarlarında, ADMA ve diğer metilarjinin düzeylerindeki değişikliklerin incelenmesi, hem hastalıkların patogenezinin farkına varmak hem de elde edilen veriler doğrultusunda tedavi protokollerinde yenilikler geliştirerek sağlıkli kişilerde hastalık meydana gelmeden önce risk faktörlerini belirlemek açısından önemlidir. Dolayısıyla çalışmamızda idrar metil arjinin türevlerinin sağlıklı bir şekilde saptanabilmesi için referans aralığı geliştirme amaçlanmştır.

Referans aralığını belirleme çalışması için, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Polikliniklerine başvuran hastalardan idrar istemi yapılan ve tam otomatik idrar analizi yapıldıktan sonra kullanılmayacak artık numuneler içerisinden herhangi bir patoloji saptanmamış rasgele idrar numuneleri (n=132) seçilmiştir. Toplanan idrarlardan metilarjinin ve ADMA seviyelerinin analizi, sıvı kromotografi - tandem kütle spektrometre (LC-MS/MS) cihazında yapılmıştır. Aynı zamanda idrar kreatin düzeyleri de rutin biyokimya cihazında analiz edilmiştir. İstatistiksel analiz olarak Kolmogorov-Smirnov testi yapılmıştır.

Metil arjinin ve türevlerininin analiz sonuçları, kreatin sonuçlarına oranlanmıştır. Sonuç olarak referans aralıkları; ADMA için 0,662-9,944 umol/g kreatinin, SDMA için 1,334-11,638 umol/g kreatinin, LNMMA için 0,000-0,786 umol/g kreatinin, Homoarginin için 10,005-27,532 umol/g kreatinin, Arginin için 0,468-9,502 umol/g kreatinin, Sitrülin için 0,462-5,397 umol/g kreatinin ve Ornitin için 62,347-98,645 umol/g kreatinin olarak bulunmuştur.

Birçok yayın, metil arjinin ve türevlerinin yalnızca hastalığı tahmin etmek için mükemmel bir araç değil, aynı zamanda potansiyel yeni bir terapötik hedef olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak çalışmamız, idrarda Metil arjinin ve türevlerinin referans aralığını belirlemede geniş kapsamlı ilk çalışma olma niteliğindedir. Bu bağlamda amacımız literatüre yeni bilgiler kazandırmaktır. Konuyla ilgili örneklerin artırılmasının yeni çalışmalarla daha anlamlı ve değerli sonuçlara ulaşılabileceği düşünülmektedir. Araştırmamızın yeni araştırmaları teşvik edeceğine inanmaktayız.

Anahtar Sözcükler: Arjinin; ADMA; LC-MS/MS; referans aralığı

SUMMARY

T.R.
SELCUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Determination of Reference Ranges for Urine Methyl Arginine Derivatives

Nazik YAPRAK

Selcuk University Institute of Health Sciences

Department of Medical Laboratory

MASTER'S THESIS/ KONYA-2023

Since endogenous arginine is insufficient to meet some physiological needs, it can become an essential amino acid in metabolic or traumatic stress. It is related to the depletion of arginine at the time of illness, prolongation or deterioration in wound healing, disorders in blood flow and T-cell dysfunction. They are the main methyl arjine derivatives of asymmetric dimethylarginine (ADMA), N-monomethyl L-arginine (L-NMMA) and symmetric dimethylarginine (SDMA). Examining the changes in the urine of patients with renal failure or kidney damage, ADMA and other methylarginine levels are important both to recognize the pathogenesis of diseases and to determine risk factors before the disease occurs in healthy people by developing innovations in treatment protocols via obtained data. Therefore, in our study, it was aimed to develop a reference range in order to detect urinary methyl arginine derivatives in a healthfully.

In order to determine the reference range, random urine samples (n=132) without any pathology were selected from the residual samples, which were not used after fully automatic urine analysis and for which urine was requested from the patients who applied to the Policlinic of Selcuk University Medical Faculty Hospital. The analysis of methylarginine and ADMA levels from the collected urines was performed in a liquid chromatography - tandem mass spectrometer (LC-MS/MS) device. Urine creatinine levels were also analyzed in a routine biochemistry device. Kolmogorov-Smirnov test was performed as statistical analysis.

The results of the analysis of methyl arginine and its derivatives were proportional to the results of creatine. As a result, reference ranges were found to be 0.662-9.944 umol/g creatinine for ADMA, 1.334-11.638 umol/g creatinine for SDMA, 0.000-0.786 umol/g creatinine for LNMMA, 10.005 - 27.532 umol/g creatinine for homoarginine, 0.468-9.502 umol/g creatinine for Arginine, 0.462-5,397 umol/g creatinine for citrulline and and 62.347 -98.645 umol/g creatinine for ornithine.

Many publications show that methyl arginine and its derivatives are not only an excellent tool for predicting disease, but also a potential new therapeutic target. As a result, our study is the first comprehensive study to determine the reference range of methyl arginine and its derivatives in urine. In this context, our aim is to provide new information to the literature. It is thought that increasing the examples on the subject can reach more meaningful and valuable results with new studies. We believe that our research will encourage new research.

Key Words: Arginine; ADMA; LC-MS/MS; reference range

1. GİRİŞ

Kronik böbrek hastalığı (KBH), dünya çapında artan insidansı ile yaygın bir sağlık sorunu olup, önemli iş gücü kaybına ve bir dizi komplikasyona neden olan, hemen hemen tüm yaş gruplarını etkileyen ve yaşamı tehdit eden bir hastalıktır. Bu nedenle tıp tarihinde önemli bir yer tutan kaynakların kapsamlı bir şekilde incelenmesi, tıbbi gelişimin seyri hakkında değerli bilgiler sağlar. Bugün bilim dünyasının ulaştığı seviye, insanlık tarihi boyunca biriken bilgilerin toplamıdır. Günümüz tıp literatürünün çok detaylı bir makroskopik anatomi bilgisini içermesi, asırlık bir bilginin ürünüdür. Bilgi birikimi ve bilimsel bakış açısıyla çağının ilerisinde olan bilim insanları da tıbbi gelişim sürecine çok önemli katkılarda bulunmuşlardır.

KBH olan hastalarda böbrek fonksiyonlarının ilerleyici kaybının, anemi, kardiyovasküler hastalıklar, hiperparatiroidi, inflamasyon, metabolik asidoz, yetersiz beslenme ve protein-enerji israfı gibi komplikasyonlarla da ilişkisi vardır (Garibotto ve ark 2010).

Böbrek yetmezliği ya da böbrek hasarı olan hastalarda idrarda ADMA ve diğer metilarjinin seviyelerindeki değişimleri ve hastalığın patogenezini anlamak, aynı zamanda bunları tedavi ile ilişkilendirmek; sağlıklı bireylerde hastalık ortaya çıkmadan önce risk faktörlerini ortadan kaldırmak ve yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesi için önemlidir.

Protein arginin metilasyonundaki patolojik ve gelişimsel süreçler hızla büyüyen biyomedikal araştırma alanından biridir ve bu alandaki gelişmeler anlayışımızı artırmak için umut vaat etmektedir. On yıldan kısa bir süre önce, iki düzineden az proteinin metilarjinin içerdiği doğrulanmış, bununla birlikte şimdi yüzlerce metilarjinin proteini tespit edilmiş ve birçoğu kütle spektrometresi ve diğer proteomik ve moleküler tekniklerle onaylanmıştır (Aletta ve Hu 2008).

Metilproteinlerin standart immünohistokimya ile tespit edilmesi, metilarjinin proteinlerinin karsinojenezi de içeren biyolojik süreçlerdeki rolünü araştırmak için yeni bir araç sağlayabilir. Metilarjinine spesifik antikorlar, parafin gömülü dokularda metillerjinin proteinlerini bilebilir. Metillarjinin proteinleri çeşitli organlarda ve neoplastik koşullarda hücre altı lokalizasyonunda farklılıklar göstermektedir (Vezzalini ve ark 2010).

İdrarda, dokularda ve plazmada bulunan, ilk 1970 yılında idrar yoluyla atılan metilenmiş arjinin türevi olarak karşımıza çıkan Asimetrik dimetilarjinin (ADMA), aynı zamanda izole edilen insan endotel hücrelerinde, hayvan immün sistem hücre ve noronlarında da bulunmuştur (Kimato ve ark 1993).

ADMA, ateroskleroz ve endotel disfonksiyonu ile bağlantılı nitrik oksit (NO) sentazının endojen inhibitörüdür. ADMA ayrıca kronik böbrek yetmezliği (KBY) ve son evre böbrek hastalığında da artmış kardiyovasküler riskle ilişkilidir (Zoccali ve ark 2002).

Endotelyal disfonksiyona neden olan artmış ADMA konsantrasyonu ve artmış oksidatif stresin önemini anlamak için ADMA'nın *in vivo* verilmesi ile ilgili deneyler çalışmaların yapılması, ADMA konsantrasyonlarını azaltmak ve muhtemel tedavi seçeneklerini değerlendirmek için etkili olabilir (Sydow ve Münzel 2003).

Arjinin ve türevleri hayati önem taşıyan ve çalışmalarda güncelliğini koruyan mucizevi moleküllerdir. Günümüzde birçok hastalığın patogenezinde açıklanamayan kısımlar vardır. Hastalıkların patogenezi, tedavisi, yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesi ve sağlıklı kişilerin hastalık oluşmadan önce risklerinin analiz edilmesi önem arz etmektedir. Birçok sistem üzerinde düzenleyici etkisi bulunan bu moleküldeki değişiklikler özelikle kardiyovasküler ve renal sistem üzerinde etkili olarak bu sistemlerde hastalık riskini analizinde kullanılabilir.

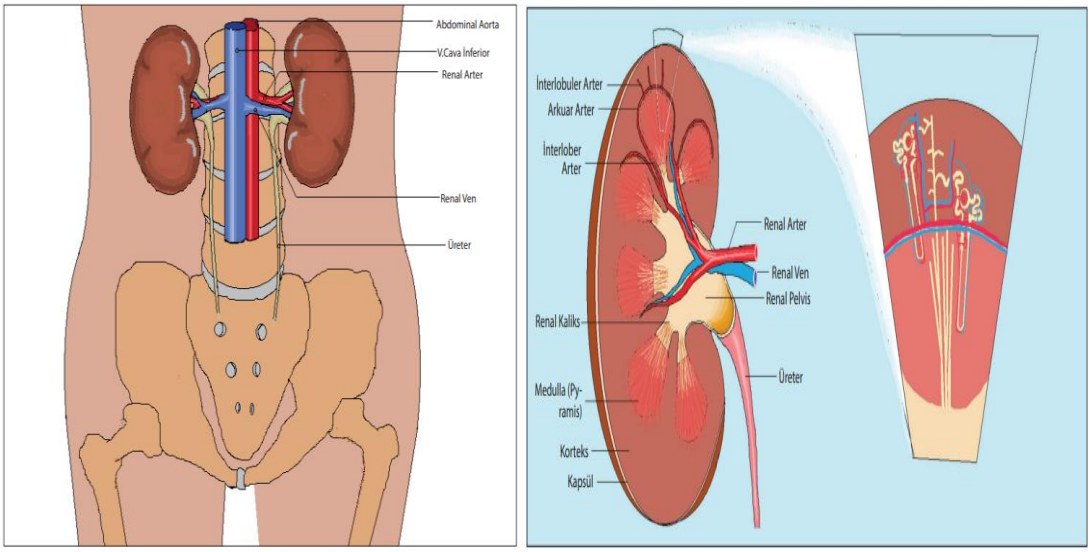
Çalışmamızda, selçuk üniversitesi tıp fakültesi hastanesi polikliniklerine başvuran ve rutin idrar istemi yapılan hastaların idrar metilarjinin seviyelerininin belirlenmesi amaçlandı. İdrar metilarjinin ve ADMA seviyelerinin analizi, rutin biyokimya laboratuvarında bulunan kütle spektrometre sıvı kromotografi-tandem kütle spektrometre (LC-MS/MS) cihazı ile yapılmıştır (Şekil 2.1).

1.1. Böbreğin Yapısı ve Görevleri

İnsan vücudunda karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal alanda yerleşen, logitudinal uzunluğu yaklaşık 3 vertebra boyutunda olan iki adet böbrek, çoğunlukla on ikinci torakal vertabra ile üçüncü lomber vertebra aralığındadır.

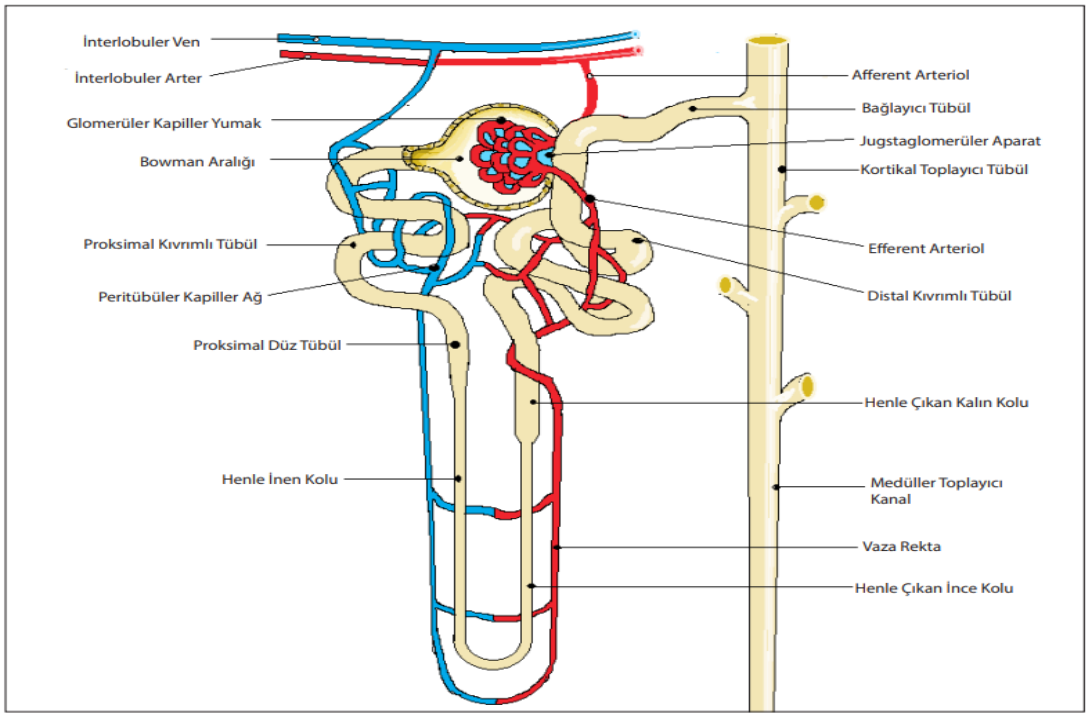
Her bir böbrek yaklaşık 125-175 gram ağırlığındadır. Sağ böbrek, üstünde bulunan karaciğer nedeni ile biraz daha aşağı yerleşimlidir. Kesit düzeyinde dışta

korteks, içte medulla ve üçgen şeklinde piramidler ve piramidlerin kalikslere açılan tepe kısımlarında papillalar vardır. Küçük kaliksler birleşerek büyük kaliksleri oluşturur ve renal pelvise açılır. İdrar pelvisten üreterlere oradan da idrar kesesine boşalarak vücuttan atılır (Şekil 1.1.) (Gür ve Keçecioğlu 1976).



Şekil 1.1. Börek anatomisi(Altunören ve ark 2017)

Her bir böbrek birbirinden bağımsız çalışan yaklaşık iki milyon nefron ünitesinden oluşmuştur. Nefronların her biri glomerülerdeki damarların oluştuğu kapiller yumak ve yumağı çevreleyen Bowman kapsülü, kapsül boşluğunun açıldığı proksimal tübülüs, Henle kulpu, distal tübülüs ve toplayıcı kanallardan meydana gelmektedir. Toplayıcı kanallar birleşmekte ve papiller kanallara açılmaktadır (Şekil.1.2.). Böbreklerin kanlanması kalpten atılan kanın 1/5 ile olmakta ve böbreğe gelen kanın glomerül kapillerleri boyunca ultrafiltrasyon ile idrar oluşmaya başlamaktadır (Gür ve Keçecioğlu 1976).



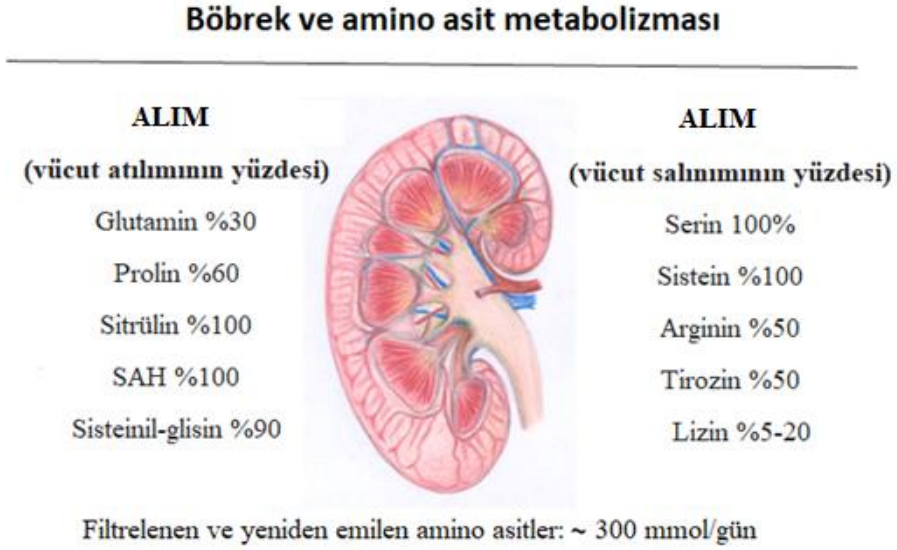
Şekil 1.2. Böbreğin yapısı (Altunören ve ark 2017)

Nefron ünitesinin çalışması sonucu organizma için önemli üç fonksiyon yerine getirilmektedir. Bunlar:

1. Organizmanın metabolik artıkları olan kreatinin, üre, ürik asit, zehirler, bazı ilaçlar ve bunların parçalanma ürünlerinin temizlenmesi,
2. Bir endokrin organ olan böbrekte D vitamininin aktif hale getirilmesi, eritropoetin, renin ve natriüretik hormon gibi hormonların üretilmesi,
3. Homeostazis: hücre içi, hücreler arası ve damar içi vücut sıvılarının konsantrasyon, volüm ve bileşimlerinin dengede tutulmasıdır (Gür ve Keçecioğlu 1976, YAVUZ ve ANKARALI 2021).

Böbrekler, protein metabolizmasında peptidlerin ve aminoasitlerin sentezi, parçalanması, filtrasyonu, yeniden emilmesi ve idrar yoluyla atılması gibi önemli role sahip olan organlardır (Hilal ve Feray 2019). Normal koşullarda büyük miktarlarda amino asitler (yaklaşık 50-70 g/gün) böbrekte süzülür ve neredeyse süzülen aminoasitlerin %97-98'i proksimal tübüllerde emilir (Garibotto ve ark 2004). Dolaşımdaki ve doku havuzlarındaki amino asitlerin ince ayarını yapabilen böbrekler, arter kanından glutamin ve prolinin atılması ve böbrekte yeni üretilen serin, tirozin ve arginin gibi bazı amino asitlerin diğer dokulara taşınmak üzere net salınımı için birincil

organdır (Garibotto ve ark 2004, Kopple 2007). Şekil 1.3. Vücudun amino asit havuzunun homeostazında insan böbreğinin rolünü göstermektedir.



Şekil 1.3. Vücudun amino asit havuzunun homeostazında insan böbreğinin rolü (Garibotto ve ark 2010).

Böbrek düşük molekül ağırlıklı plazma peptidleri ve proteinlerin katabolizmasında da önemli görevi bulunmaktadır. Ayrıca arjinin metabolizması ve transmetilasyonu, fenilalanin-tirozin dönüşümü gibi birçok işlevi bulunan, aminoasit metabolizmasına katkısı bulunmaktadır. Metabolik asidoz, enflamatuar süreçler, hastalığın tıbbi beslenme tedavisinde protein kısıtlaması, diyaliz tedavisi vb. birçok faktör böbrek fonksiyon bozukluğu ve/veya böbrek hastalığının kaybı nedeniyle ortaya çıkmakta ve protein metabolizmasında değişikliklere neden olmaktadır (Yıldıran ve Gençer 2018).

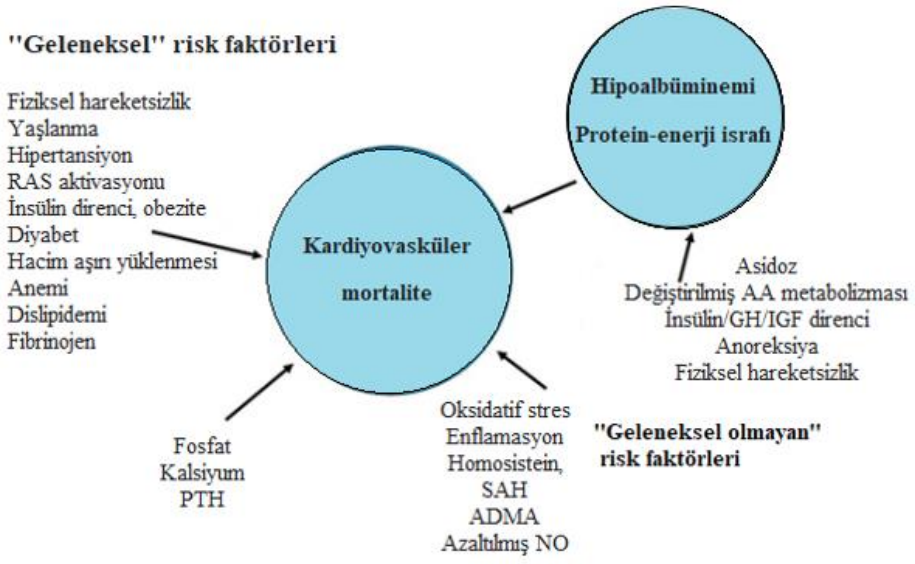
Arjinin metabolizmasında böbreklerin kreatin sentezi, arjinin sentezi ve arjinin yeniden emilmesi olarak 3 önemli rolü bulunmaktadır. Bağırsaklar tarafından üretilen sitrulinden böbreklerde önemli miktarda arjinin sentezlenmektedir. L-arginin: glisin amidinotransferaz Kreatin biyosentezinin ilk enzimidir. Böbrekte oluşur ve böbrek damarına salınan guanidinoasetat üretilmektedir. Ayrıca, guanidinoasetatın renal yoldan çıkması oldukça az ve kreatin sentezinin tüm yolun karaciğerde de meydana gelebileceği düşünülmektedir. Arginin sentezinde yer alan renal enzimler, argininosüksinat sentetaz ve argininosüksinat liyaz proksimal tübüler hücrelerde

gerçekleşmektedir. Arginin sentez hızı sitrülinin dağılımına bağlıdır. Arginin, lizin, ornitin ve sistin Proksimal tübüler hücrelerin apikal membranında bir taşıyıcıyı paylaşmakta olup, heteromerik taşıyıcıdaki kusurlar sonucu idrarda arginin, lizin ve ornitin'in taşıma bozukluğu ile karakterize sistinüri oluşmaktadır. Arjinin, lizin ve ornitini taşıyan bazolateral membrandaki proksimal tübüler hücrelerde başka bir heteromerik taşıyıcı tarafından taşınmakta olup taşıyıcıdaki kusurlar lizinürik protein intoleransına neden olmaktadır (Brosnan ve Brosnan 2004).

1.1.1. Kronik Böbrek Hastalığı

KBH, çeşitli nedenlerden kaynaklı böbreğin işlevinde ve yapısında aylar veya yıllar içerisinde geri dönüşümsüz hasarlarla karakterize bir durumdur (Webster ve ark 2017).

KBH olan hastalarda ilerleyici böbrek fonksiyon kaybı, anemi, hiperparatiroidizm, metabolik asidoz, artmış kardiyovasküler mortalite, inflamatuar değişiklikler, kaşeksi ve kas güçsüzlüğü gibi komplikasyonlar sıklıkla görülmektedir. Hem geleneksel hem de geleneksel olmayan risk faktörleri aşırı kardiyovasküler mortaliteye katkıda bulunur (Kovesdy ve Kalantar-Zadeh 2009). Geleneksel ve geleneksel olmayan risk faktörleri şekil.1.4. gösterilmektedir.



Şekil 1.4. KBH'lı hastalarda, kardiyovasküler mortaliteye katkısı olan geleneksel ve geleneksel olmayan risk faktörleri (Garibotto ve ark 2010).

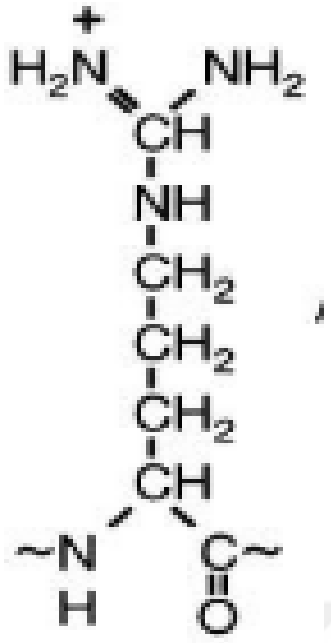
Zaman içerisinde KBH'nin sınıflandırılmasında gelişmeler yaşanmış, 2002 yılında KBY'nin tanımlanması, sınıflandırılması ve değerlendirilmesi adına Amerika Ulusal Böbrek Derneği Böbrek Hastalığı Sonuçları Kalite Girişimi (NKF-KDOQI) tarafından bir rehber yayınlamıştır. 2012 yılında yayımlanan geliştirilmiş rehberde ise KBY, daha önce böbreğe ait klinik tanı almamış, 3 ay/3 aydan daha uzun süre Glomerüler filtrasyon hızı < 60 ml/dakika/1,73m2 (azalmış böbrek fonksiyonu) ya da albuminüri olarak tanımlanmıştır (Stevens ve ark 2013).

Türkiye' de ise 2004 yılında Sağlık Bakanlığı'nın böbrek hizmetleri için Ulusal hizmet çerçevesi, 2002 yılında Amerika Ulusal Böbrek Derneği Böbrek Hastalığı Sonuçları Kalite Girişimi (NKF-KDOQI) tarfından yayımlanan sınıflandırma kabul edilmiştir (Centre for Clinical Practice at 2013, 2015). Bu sınıflandırmada KBH 5 aşamaya ayrılmış ve evrelerin tanımlanması için böbrek fonksiyon indeksi, böbrek hasarı belirteçlerinin kombinasyonu ve glomerüler filtrasyon hızı (GFR) kullanılmıştır (Bonner ve ark 2013, Centre for Clinical Practice at 2013).

1.2. Arjinin

Proteinlerin yapısına da katılan L-Arjinin (2-amino-5-guanidino pentanoik asit) (Gambardella ve ark 2020) ilk 1895 yılında Hedin'in araştırmalarında saptanmış olup, pozitif yüklü (bazik R) bir amino asittir (Beaumier ve ark 1996).

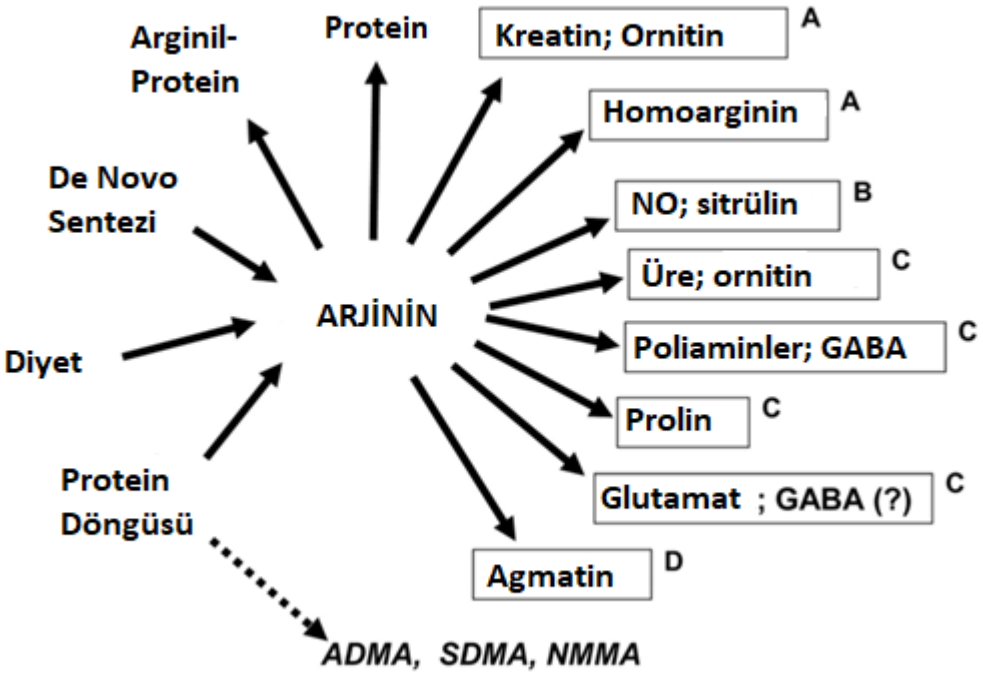
Molekül ağırlığı 174 dalton olan ve iki formda olan D ve L arjininin, proteinde olan formu L arjinindir ve $C_6 H_{12} N_4 O_2$ molekül formülüne sahip (Şekil 1.5) nötral pH guanidinyum grubu bir proton alıcısı olan polar özellikte olup proteinlerin yüzeyindedir (Barbul 1986, Carcillo 2003).



Şekil 1.5. Arjinin kimyasal Yapısı (McBride ve Silver 2001).

Nitrik oksit sentezi için spesifik bir substrat olan L-argininin (Cherla ve Jaimes 2004) mevcudiyeti renal iskemi/reperfüzyon hasarında önemli bir rol oynar. Endojen L-arginin türevleri, simetrik dimetilarginin (SDMA) (Martens-Lobenhoffer ve Bode-Boger 2015) ve ADMA hücresel L-arginin alımını rekabetçi bir şekilde bloke ederek Nitrik Oksit (NO) üretimini inhibe eder (Betz ve ark 2013). Arginin metaboliti olan asimetrik dimetilarginin (ADMA) ve arginin analogu homoarginin risk sınıflandırması, yeni terapötik hedeflerin tanımlanmasındaki potansiyel rolleri nedeniyle giderek daha fazla araştırılmaktadır (Mangoni ve ark 2019).

Travmada, büyümede ve enfeksiyonda bağışıklık sisteminin güçlendirilmesinde Arjininin vücuttaki gereksinimi artmaktadır (Popovic ve ark 2007). Arjinin bebeklik ve çocukluk döneminde esansiyel amino asit (Coşkun 2011), yetişkinlerde amonyak detoksifikasyonuna ve protein sentezine katılan yarı esansiyel bir amino asitir (Barış ve ark 2004). Arjininin protein sentezindeki rolüne ek olarak; NO, agmatin, kreatin ve diğer poliaminlerin öncüsü olma ve ayrıca üre döngüsünde ara madde olarak görev alma gibi rolleri bulunmaktadır (Grillo ve Colombatto 2004, Morris 2006, Garibotto ve ark 2010). Arginin kaynakları ve yolağı şekil 1.6. ana hatları ile gösterilmektedir.



Şekil 1.6. Arginin kaynakları ve yolağı ana hatları: harflendirilmiş metin kutuları, substrat olarak arginin kullanan aşağıdaki enzimlerin etkisinin bir sonucu olarak hemen veya nihai olarak üretilen arginin metabolitlerini gösterir: A, arginin: glisin amidinotransferaz; B, sentez YOK; C, arginazlar; D, arginin dekarboksilaz. Puturesin, spermin ve spermidin burada belirtilen poliaminlerdir. ADMA; γ-aminobütirik asit (GABA); NG-monometil-L-arginin (NMMA); SDMA (Morris 2016).

1.2.1. Vücutta Eksojen olarak alınan arjinin dağılımı

İnce bağırsak lümeninden enterositler aracılığıyla alınan L-arjinin, aktif transport aracılığıyla absorblanır. Ufak bir bölümü de enterositlerde metabolizasyona uğradıktan sonra protein sentezinde kullanılabilen L-arjininin Metabolize olmayan bölümü ise portal dolaşım ile karaciğere gelerek biraz daha metabolize olmaktadır. Geri kalan metabolize olmayan arjinin ise sistem dolaşımına katılarak farklı dokulara gelir ve metabolik bazı işlevselliği üstlenir. Glomerüler filtrasyona uğrayan arjininin ise tamamına yakın kısmı geri emilime uğrar (Morris 2004).

1.2.2. Endojen arjinin sentezi

Arjinin üç şekilde sentezlenir:

Glutamat metabolizmasından, sitrülin metabolizmasından ve protein yıkımından arjinin sentezi yapılmaktadır (Soeters ve ark 2002).

Glutamattan arjinin biyosentezi

Üre döngüsünde 3 basamakta Ornitine, karbamoilfosfatın karbamoil grubunun ornitin transkarbamilaz tarafından aktarılması ile sitrülin; sitrülinden arginosüksinat, arginosüksinattan arginin ve fumarat meydana gelir (Barış ve ark 2004).

Sitrülin metabolizmasından arjinin sentezi

Sitrülin böbrek (Marini ve ark 2014), ince bağırsak ve üre döngüsü yolu ile de karaciğerde arjinin sentezlenir. Glutaminden oluşan sitrülin ince bağırsakta meydane gelmekte ve sistemik dolaşıma geçmektedir. Sistemik dolaşımdan böbrekler vasıtasıyla alınır proksimal tübüllerde arjinine çevrilir ve sentezlenen arjinin plazma düzeyine % 10 katkı sağlar (Barbul 1986)

Proteinlerin metabolizmasından arjinin sentezi

Plazmadaki arjininin büyük bir bölümü protein metabolizması ve döngüsü yolu ile gerçekleşmektedir. Bununla birlikte böbrekler arjinin sentezinden sorumlu birinci organ olup, arjinin sentezine % 60 katkı sağlamaktadır (Yavuz 2006).

1.2.3. Arjinin metabolizması

Arjinin tüm vücutta gerçekleşen protein döngüsü, bağırsak sentezi veya De nova sentezi yolu ile endojen kaynaklı sağlanabildiği gibi besinlerle dışarıdan da alınabilmektedir (Yavuz 2006). Arjinin alımında günlük belirlenen bir yönerge yoktur. Arjinin özellikle et, balık, deniz ürünleri ve kahvaltılık tahıllarda yüksek oranda bulunur (Visek 1986).

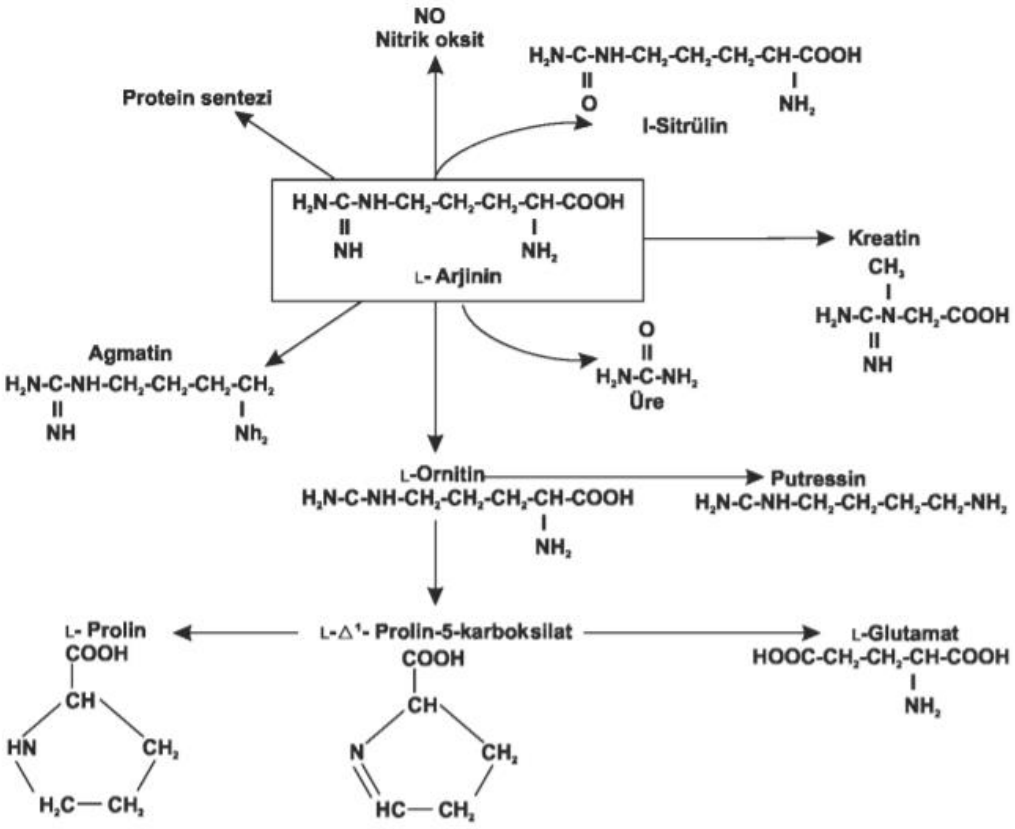
Şartlı esansiyel bir amino asit olan, amonyak detoksifikasyonu ve protein sentezine de katılan Arjinin, ayrıca bir glikojenik amino asit olması nedeniyle glikoza çevrilerek enerji üretimi için de katabolize edilir (Visek 1986).

Arjinin çok çeşitli metabolik işlemlerde kullanılması dolayısıyla farklı fizyolojik etkilerin çıkmasına neden olmaktadır. Arjinin alveolde makrofajda fagositik aktivite (Tachibana ve ark 1985), katil T hücreleri (Green ve ark 1990) nötrofil

sayısında artış, lokasit hücre aktivasyonunda artış gibi etkilerinin yanında, immün cevabı artırıcı etkileri de gözlemlenmiştir (Mühling ve ark 2002).

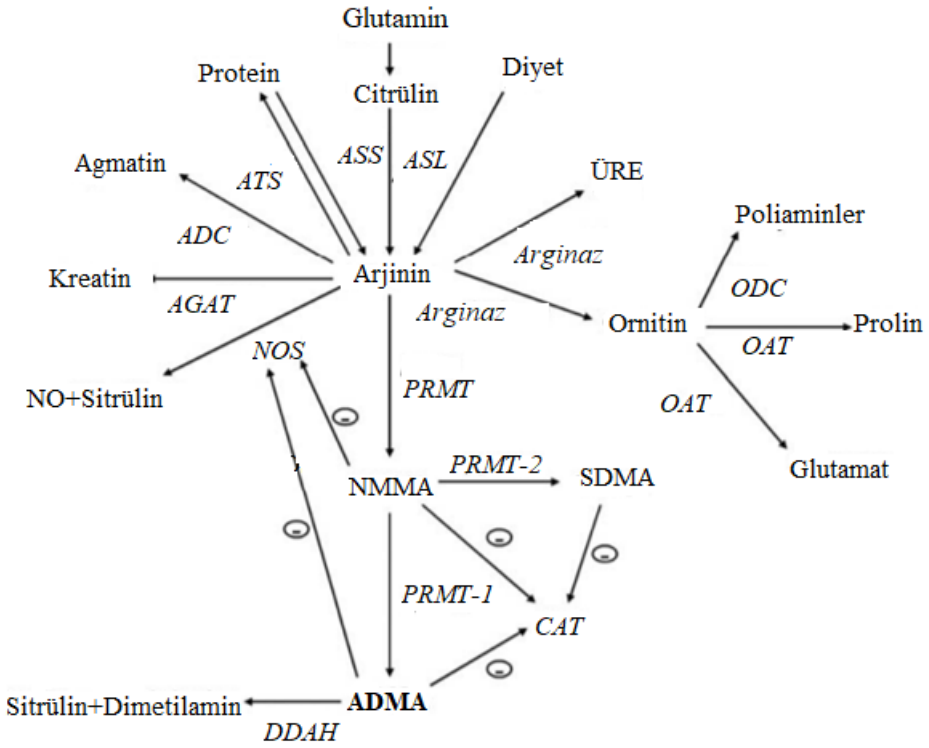
Literatürde birçok çalışmada, yara iyileşmesi (Stechmiller ve ark 2005), kemik kırıkları, gastrik ülser, ikinci derece yanık, diyabetik ayak ülserleri, radyasyon enteritleri ve ince barsağın ülseratif lezyonlarında Arjininin olumlu yönde etkisinin olduğunu gösteren bulgular bildirilmiştir (Kirk ve ark 1993).

Arjinin önemli bileşik yapılarında yer almak için çeşitli dokularda farklı metabolik olaylara katılmaktadır (Şekil 1.7.). Bunlar: glikojen ve glukoz oluşumu, protein, üre, ornitin, NO, agmatin, kreatin, glutamat ve prolin sentezi, poliamin biyosentezi ve antidiüretik hormon (ADH) yapısında yer almaktadır (Foye 1995, Soeters ve ark 2002).



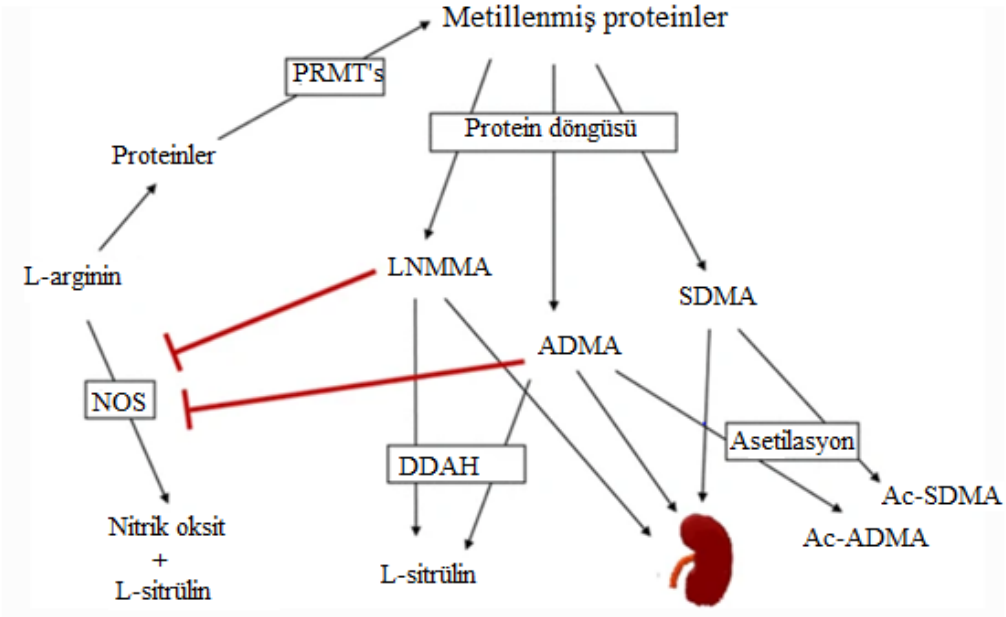
Şekil 1.7. Arjinin metabolik yolağı (Wu ve Morris 1998).

Arginin kaynağı nitrik oksit sentaz (NOS) ve arginaz (üre döngüsünün bir parçası) olmak üzere iki enzim sistemi tarafından düzenlenmektedir. Arjinin arjinaz enzimi sayesinde üre, ornitin, prolin, poliamin, glutamat ve glutamin dönüşmüne yardım ederek arjinin yıkımında önemli rolü vardır (Şekil 1.8). Arjinin üre döngüsü yolu ile amonyak detoksifikasyonunu için nitrojenin taşınması, depolanması ve atılması için önemli amino asitten biridir (Tong ve Barbul 2004).



Şekil 1.8. Arjinin sentezi metabolizması; arjinin dekarboksilaz (ADC); arjinin glisin amidinotransferaz (AGAT); arjininosüksinat liyaz (ASL); arjininosüksinat sentaz (ASS); arjinil-tRNA sentetaz (ATS); katyonik amino asit taşıyıcısı (CAT); dimetilarjinin dimetilaminohidrolaz (DDAH); N-monometi L-arjinin (NMM); ornitin aminotransferaz (OAT); ornitin dekarboksilaz (ODC); protein arjinin metiltransferaz (PRMT) (Visser ve ark 2010).

L-arjinin (Arg) bir ADMA metaboliti olup, tüm omurgalıların hücrelerinde ve kan plazmasında bulunmaktadır (Şekil 1.9.). Proteinlerdeki Arg kalıntılarının protein-arginin metiltransferaz tip 1 (PRMT1; EC 2.1.1.125) enzimi ailesi ve protein döngüsü ile ADMA, SDMA ve LNMMA serbest kalmaktadır (Martens-Lobenhoffer ve ark 2014).



Şekil 1.9. Arjinin metabolizması (Emrich ve ark 2018).

Glukoz ve glikojen oluşumu

Arjinin glukojenik bir amino asit olup, üre ve ornitine arjinaz enzimi sağlamaktadır. Gerçekleşen reaksiyon, üre döngüsünün bir parçası olarak karaciğerde oluşmaktadır. Transaminasyon ile ornitin glutamat gama-semialdehit üzerinden siklus asit siklusunun bir mataboli ve glukoneogenez substratı α-ketoglutarata dönüşmektedir (Onat ve ark 2002).

Nitrik Oksit (NO) oluşumu

L-arjininden, nitrik oksit sentezinin (NOS) etkisi ile NO sentezlenmektedir. L-arjininin elektronoksidasyonunun arjinini NO ve sitrülline dönüştürmesi için oksijen, NADPH, FMN, FAD, tetrahidrobiopterin, Ca+2, hem kompleksi (Fe+2) ve tiyol ve benzer kofaktörlere ihtiyaç duyulmaktadır. NOS'ın üç izoformu vardır. Bunlar;

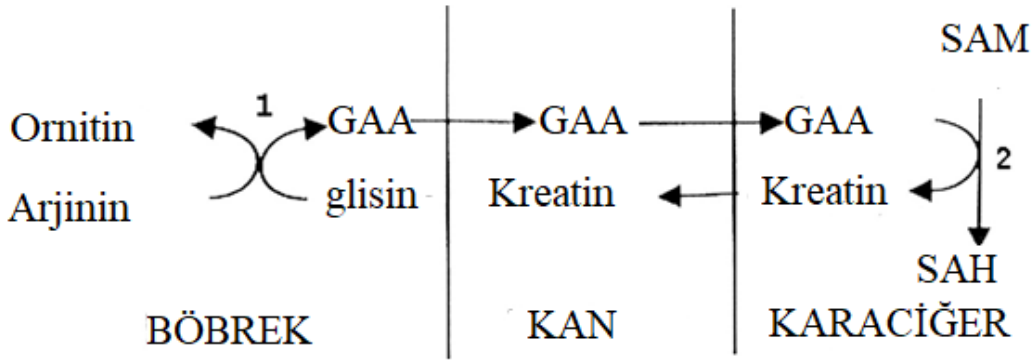
Tip 1 nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) periferik ve santral sinir sistemi hücrelerinde ilk olarak keşfedilmiştir. Ca+2 tabi olup NO devamlı olarak az miktarda sentezler.

Tip 2 indüklenebilir NOS (iNOS) Ca+2 tabi olmayan; NO üretimini, belirli sitokinlerin ve lipoolisakkarit muhteva eden mikrobiyal ürünlerin uyarısı ile miyosit, düz kas hücreleri, makrofaj ve hepatositlerde katalizler.

Tip 3 endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) endotelin spesifik bir hücresidir. Ca+2 tabi olup NO devamlı olarak az miktarda sentezler (Tapiero ve ark 2002).

Kreatinin sentezi

Kreatin sentezi iki reaksiyonla gerçeklemekte olup birincisi, L-arjinin tarafından yürütülen tepkime: glisin amidinotransferaz, guanidoasetat, arjininin ve ornitin oluşturabilmek için glisine bir amidino grubu verir. İkincisi kreatin, guanidinoasetat S-adenosilhomosistein ve guanidinoasetat N-metiltransferaz oluşturabilmek için S-adenozilmetiyonin tarafından melillenmesi ile gerçekleşir. Enerji metabolizmasında rol alan kreatin ise, SAM' dan sağlanan metil grubu ile metilasyonu sonucu oluşmaktadır (Şekil 1.10.) (Brosnan ve Brosnan 2004).



Şekil 1.10. Kreatin sentezi için önerilen interorgan yolu guanidoasetat (GAA) (Brosnan ve Brosnan 2004).

Glutamat Sentezi

Arjinin yıkımı sonucu elde edilen ornitinin ornitin aminotransferaz tarafından transaminasyonu ile glutamat semialdehit, ortaya çıkan glutamat semialdehit oksidasyonu ile de glutamat açığa çıkmaktadır. En son tepkimeyi katalizleyen enzim ise glutamat semialdehit dehidrogenazı yapmaktadır (Barış ve ark 2004).

Prolin Sentezi

Glutamat semialdehit, arjininden ortaya çıkan ornitinden sentezlenmekte ve kendiliğinden prolin 5-karboksilata dönüşmektedir. Prolin 5-karboksilat da redüktaz tarafından **proline** dönüştürülmektedir (Barış ve ark 2004).

Poliamin Sentezi

Poliamin, çok sayıda amino grup muhteva eden spermidin, spemin ve putresinden oluşan katyonik bileşiklerdir (Onat ve ark 2002).

Poliaminler, RNA ve DNA sentezinin uyarılması, DNA'nın stabilizasyonu, protein kinaz inhibisyonu, hücre bütünlüğünün stabilizasyonu ve hücre döngüsünün düzenlenmesi gibi önemli etkilerden sorumludur (Barış ve ark 2004).

ADH yapısındaki yeri

Hipotalamusun supraoptik çekirdeğinden sentezlenen ADH, arka hipofize nörofizin adlı proteinlerle taşınan bir nonopeptidtir. Aminoasidin ilk 6 sının bir disülfid köprüsü aracılığı ile halka yaptığı ADH'ın 8. Konumunda pozitif yüklü arjinin yer almaktadır. Reseptörler tarafında hormonun tanınması arjinine bağlıdır (Foye 1995).

1.2.4. Arjinin Eksikliği

Esansiyel olmadığı için yetişkinlerde arjinin eksikliği sık görülmemekle birlikte, vücutta aşırı negatif azot dengesine bağlı eksiklik oluşabilir. Bununla birlikte kanda aşırı amonyak, çok hızlı büyüme, gebelik, travma, sepsis, arjinin antagonisti olan lizizin varlığı veya malnütrisyon arjinin eksikliğine neden olabilmektedir (Milner 1985).

Arjinin eksikliğinde ise, kötü yara iyileşmesi, saçların dökülmesi veya kırılması, fasiyel raş, konstipasyon ve musküler distrofiye benzeyen kas zayıflığı görülebilmektedir. Karaciğer lipid ve glukoz metabolizması anomallikleri varlığında, karaciğer yağlanmasına ve bu durumun ilerlemesine bağlı hepatik koma ve siroz gelişebilir. Böyle bir durumda arjinin dışardan takviye olarak verilmesi gerekmedir (Milner 1985).

1.2.5. Arjinin fazlalığı

Arjinin fazlalığı (hiperarjininemi), otozomal çekinik kalıtılan arginaz eksikliğine bağlıdır ve kısmi veya tam arginaz enzimi defekt vardır. Arjinin fazlalığı doğumdan sonra ilk yıllarda asemptomatiktir ve 27 hastada rapor edilmiş çok nadir görülen bir hastalıktır. Genellikle diyette protein miktarının artmasına bağlı bulgular ortaya çıkmaktadır ve epileptik nöbetler, mental gerilik, spastik diplejının yanı sıra, hiperammonemik komaya neden olabilmektedir. İdrar, kan ve serabrospinal sıvıda amonyak ve arjinin artışı karakterizedir. Eritrositte düşük arginaz aktivitesi saptanmaktadır. Bu durumda protein ve arjininden kısıtlı diyet ve semptomatik tedavi uygulanmalıdır (Hewson ve ark 2003).

1.2.6. Arjinin klinik kullanımda önemi

L-arjinin suplemantasyonunun özellikle kardiyovasküler sistem olmak üzere birçok sistem üzerinde olumlu etkisinin olduğu belirtilmektedir. Literatürde L-arjinin suplemantasyonunun koroner arter hastalığı olan hastalarda kalp krizini önlediği, normal veya yetersiz renal işlevi olan temel hipertansiyonu olan hastalarda renal vasküler direnci ve kan basıncını azalttığı belirtilmiştir. Arjininin bu etkisi, NO sentezinde öncül olmasından kaynaklanmaktadır. L-arjininden sentezlenen NO, endotel hücrelerinde trombotik aktiviteyi, vazokonstriksiyonu, damar düz kas hücre çoğalmasını, intimal lezyon oluşumu ve enflamasyonunu inhibe eder (Maxwell ve ark 1998, Tapiero ve ark 2002). Bununla birlikte hiperkolesterolemi tedavisinde LDL-kolesterolü ve total kolesterol düşürücü etkiye sahip olması nedeni ile yarar sağlayabilmektedir. Arjininin oral ve intravenöz takviyesi ile hiperkolesterolemik hastalarda ve sigara alışkanlığı olan kişilerde endotelyal disfonksiyonu geriye döndürdüğü ileri sürülmüştür (Bassenge 1992, Blum ve Cannon 2001).

Antioksidan aktivitesi olan L-arjinin, süperoksit anyonlarını (O_2) ve hidrojen peroksid (H_2O_2) temizlemektedir (Nagase ve ark 1997). Aynı zamanda okside-LDL oluşumunu inhibe ettiği için antiaterojenik etkileride vardır (Vergnani ve ark 2000).

L-arjinin *in vivo* ve *in vitro* immunomodülatör aktiviteye sahip olması, immun sistem üzerinde birçok olumlu etkiye neden olmakta ve metabolizması T lenfositler ve makrofajlar için önem arz etmektedir. L-arjinin periferal kanda sitotoksik T hücrelerini (Tc,CD8) azaltmakta, lenfosit mitogenezini arttırmaktadır. Bu kapsamda yardımcı T

hücreleri (Th, CD4)/sitotoksik T hücreleri oranı artar. Tümör hücrelerine ve mikroorganizmalara karşı makrofaj afinitesini arttırmaktadır (Tapiero ve ark 2002, Carcillo 2003). L-arjinin, immunomodülatör etkiye sahip tuftsinin yapısında da bulunmaktadır (Cillari ve ark 1994).

Kanser tedavisinde özellikle meme kanserinde prognozal olumlu etkilerinden bahsedilmiştir. Enfeksiyon riskinin artığı travma, yanık, cerrahi girişim ve HIV gibi durumlarda arjinin suplementasyonunun yarar sağlayabileceği belirtilmiştir. Arjinin takviyesi sepsis durumunda çok büyük yarar sağlayabilir. Klinik araştırmalar, arjinin ya da arjininle farmakolojik glutamininin dozlarının, ameliyat ve ciddi fiziksel yaralanma geçirmiş hastalarda bağışıklık fonksiyonlarini iyileştirdiğini ve hastanede kalış sürelerinin azalttığını göstermiştir (Field ve ark 2000).

Arjininin ürogenital sistem üzerinde birçok etkisi vardır. Hem erkek hem de kadınlarda seksüel fonksiyon üzerinde etkileri vardır. Erkeklerde genital bölgede kanlanmayı arttırarak ereksiyon ve libido artışına neden olan arjinin, kadınlarda ise NO üzerinden klitoral ve vaginal kanlanmayı arttırarak orgazmı kolaylaştırmaktadır (Chen ve ark 1999). L-arjinin sperm motilitesini ve sperm oluşumunu arttırmakta, seminal sıvı arjininden zengindir. L-arjinin erkek infertilitesinde, oligospermi ve erektil disfonksiyonun tedavisinde umut verici olduğu belirtilmektedir (Schachter ve ark 1973, Chen ve ark 1999).

Literatür incelendiğinde son zamanlarda akut böbrek yetmezliği (ABY) tedavisinde arjinin kullanımına yönelik çalışmaların olduğu gözlenmektedir. Özellikle İskemi reperfüzyon hasarına bağlı ABY renal hücre apopitozunu önleyen, renal vasküler dilatasyon sağlayan ve oksidatif strese karşı koruna sağlayan endotelyal NOS aktivitesinin azaldığı belirtilmektedir. Ekzojen L-arjinin uygulanan rat modellerinde doku arjinin seviyelerini arttırdığı ve korele olarak iskemik akut böbrek yetmezliğinde artan süperoksit radikali üretimi baskılanmıştır (Chan 2004).

İnterstisyel sistit vajinal huzursuzluk, suprapupik üretra, perine bölgesinde ağrı, noktüri gibi belirti ve bulguları olan idrarda NO sentazının azaldığı işaret edilmiştir. L-arjinin NO sentazın substratı olup, uygulanması durumunda interstisyel sistit bulgularında hafifleme olduğu ve enzimin idrarda aktivitesini artırdığı gözlenmiştir (Korting ve ark 1999).

Hormonal sistem üzerinde olumlu etkisi olan arjinin büyüme hormonunun salınımı artırarak immun işlevlerde etkisi olmaktadır (Cynober 2003). Pankreası uyararak insülin üretimini sağlamaktadır (Robinson ve ark 2003, Liu ve ark 2016).

1.2.7. L-Arginin Paradoksu

"Arjinin paradoksu" adı ile bilinen görüşten ADMA sorumlu olabilir savından hareketle doku ve plazmadaki fizyolojik düzeyleri (milimolar düzeylerine yakın) (Gold ve ark 1989), NOS'un Km değerinin (2,9 μmol/L) (Bode-Böger ve ark 2007) çok üstünde (yaklaşık 25 kat) olsa bile, birçok deneysel sistemde arjinin eksojen olarak verildiğinde NO üretimini artış meydana getirmiştir (Böger 2004, Dioguardi 2011). Bu bağlamda hücre içerisinde eNOS'u maksimum seviyelerde aktif tutularak L-arjinin miktarı var olmasına rağmen eksojen verilen L-arjininin nasıl eNOS aktivitesinde artışa neden olmasının karmaşık olması durumuna "L-arjinin paradoksu" denir (Tentolouris ve ark 2004, Khalaf ve ark 2019).

Mevcut çalışmalarda NOS'un enzimatik aktivitesinin, ADMA (endojen inhibitör) konsantrasyonu ve L-arjinin (fizyolojik substrat) konsantrasyonu arasındaki oran (L-arjinin/ADMA) ile modüle edildiği kanaatindedir (Tsikas ve ark 2000).

Bu bağlamda L-arjininin normal düzeyde olması durumunda ADMA'ın seviyelerindeki herhangi bir artış, optimum NOS aktivitesi ile ilişkili göreceli L-arjinin eksikliği ile sonuçlanabilir. ADMA, NOS'in yarışmacı inhibitorü olması nedeni ile inhibitör etkisinde, L-arjinin düzeyindeki yükseklikten etkilenmektedir (Böger 2004).

1.3. Metil Arjininler

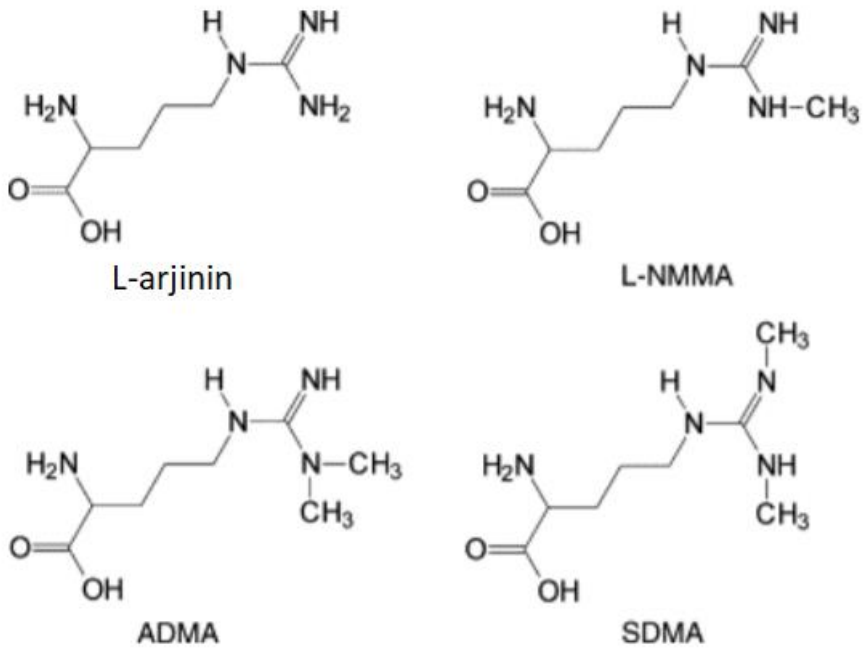
Proteinlerdeki arjinin rezidülerinin posttranslasyonel modifikasyon ile metilasyonu sonucunda meydana gelen arjinin türevleridir. ADMA, N-monometil L-arjin (L-NMMA) ve SDMA başlıca metil arjin türevleridir (McBride ve Silver 2001, Tsikas ve ark 2018). Ayrıca ADMA ve SDMA birçok hastalıkta çok işlevli bir rol oynayan üremik toksinlerdir (Tain ve Hsu 2017).

L-NMMA ve ADMA'nın sentezlenebilmesi için metil gruplarını arjinin rezidülerine aktaran protein arjinin metiltransferaz tip I (PRMT-I) enzimi gereklidir. PRMT-I enzimi, bir veya iki metil grubunu, proteindeki arjinin'in en işlevli kısmı olan

guanido azotuna aktarır ve metil grubu vericisi bu reaksiyonda SAM tüketilir (Clarke 1993, McBride ve Silver 2001).

1.3.1. Metil Arjinin Oluşumu ve Türleri

Bir arjinin türevi olan Asimetrik dimetilarjin (C8H18N4O), klinik tanıda önemli bir role sahiptir. Asimetrik dimetilarjin (C8H18N4O), protein arjininindeki metil tranferaz (PRMT) enzimi aracılığıyla metil gruplarının üretilmesi, sonrasında ayarlama ile nükleoproteinlerdeki arjinin rezidülerine transfer edilmesi ve bu proteinlerin katabolizması neticesiyle salınan serbest metilarjinin rezidülerinden üretilmektedir. L-NMMA, guanido azotuna tek bir metil grubunun eklenmesiyle; SDMA ve ADMA ise iki metil grubunun eklenmesiyle meydana gelen metillenmiş arjinin türevleridir (Gayatri ve Bedford 2014) (Şekil 1.11.).



Şekil 1.11. L-arjinin ve metil arjininlerin kimyasal yapıları (Martens-Lobenhoffer ve Bode-Böger 2007).

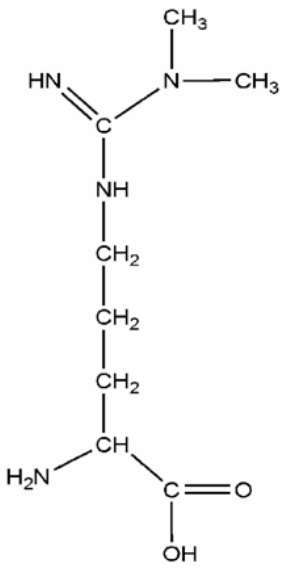
1.3.2. Asimetrik Dimetilarjinin (ADMA)

Tanımı ve Tarihçesi

ADMA arjinin rezidülerinin, PRMT1 enzimiyle metilasyonu sayesinde üretilmektedir (Cooke 2000, Bulau ve ark 2007). İlk 1970 yılında idrar yoluyla atılan metilenmiş arjinin türevi olarak karşımıza çıkmaktadır (Kakimoto ve Akazawa 1970, Aydın ve ark 2013). ADMA, idrarda, dokularda ve plazmada bulunmaktadır. İzole edilen insan endotel hücrelerinde ayrıca hayvan immün sistem hücre ve noronlarında bulunmuştur (Kimato ve ark 1993) 1992 yılında Vallence ve ark. insan idrarında ve plazmada eNOS'ın endojen inhibitörü olarak ADMA' nın var olduğunu açıklamışlardır (Vallance ve ark 1992).

Yapısal Özellikleri

Asimetrik N_G, N_G dimetilarjinin ($C_8H_{18}N_4O_2$) L arjinin guanidino anaoğudur. Proteinlerdeki arjinin rezidülerinin PRMT1 metillenmesiyle meydana gelen ve endojen olarak sentezlenen bir aminoasit çeşididir. ADMA oldukça stabil bir molekül ve hücreler arasında kolayca dolaşabilir ve bu sayede etkisini serbest olarak gösterebilmektedir. Bir hücrede üretilen ADMA, etkisini diğer bir hücrede rahatça gösterebilir. Örneğin düz kas hücresinde üretilen ADMA, endotel hücresi üzerinde etkisini rahatça gösterebilir (Fickling ve ark 1999). Şekil 1.12. ADMA' nın kimyasal yapısını göstermektedir.



Şekil 1. 12. ADMA'nın Yapısı (Ueda ve ark 2007).

ADMA'nın hücre içindeki miktarı dimetilarjinin dimetil aminohidrolaz (DDAH) tarafından yıkılma hızı, protein metilasyonu ve protein yıkım hızına bağlı olarak değişmektedir. ADMA, hücre içerisinde oluşmakta ve sonradan dolaşıma katılmaktadır. ADMA protein hidrolizi sonrası hücrelerin ve yapısal potent inhibitör (Vallance ve ark 1992) ve içerisine indüklenebilir NOS inhibitörü olarak salınmaktadır (Ueda ve ark 2003, Busch ve ark 2006). Diabet ve iskemik kalp hastalığı gibi durumlarda protein yıkımı artışından kaynaklı hücre içerisinde artan ADMA'nın dolaşıma karışması, dolaşımdaki ADMA seviyesinde artışa neden olacaktır (Goldberg ve St John 1976, Leiper ve ark 1999).

Arjinin ve diğer katyonik aminoasitler (CAAs) takasla katyonik aminoasit taşıyıcılar (CATs) aracılığı ile salınan ADMA hem başlangıç yerinden dışarı çıkabilir hem de plazmadan uzak bölgelerden de alınabilir (Welch ve Wilcox 1997, Baylis 2006).

Sitozol ve ekstrasellüler sıvı arasında ADMA'nın ayırımını belirlemede kritik adım CATs'lar aracılığı ile transmembran taşınmasıdır. CATs lar yüksek çekim hücre membranı üzerinde geniş şekilde dağılır. ADMA'nın hücresel dağılımı CAT-1 ve CAT-2 yoluyla gerçekleşmektedir (Baylis 2006). y^+, $y^+L,b^{0,+}$ ve B^{0+} katyonik aminoasit taşıyıcı sistemleri arasında y^+ sistemi arjinin ve ADMA transmembran taşınması için çok önem arz eder (Devés ve Boyd 1998).

Lireratüre göre sağlıklı bireylerde plazma ADMA seviyesinin 0,35-0,70 μmol/L arasında olması gerektiği bildirilmiştir (Teerlink 2007).

Metilarjininler hücre içerisine girmek için birbirleri ile ve arjinin aminoasidi ile yarış içerisindedir ve ADMA'nın yüksek konsantrasyonu, L-arjininin hücre içerisine transportunu engellediği için NO sentezini azaltmaktadır (Vallance ve Leiper 2004).

Uzayan NOS inhibisyonu sonucunda sol ventrikül hipertrofisi oluşabilir. Ayrıca kardiyak outputu azaltır, vazokonstrüksiyona neden olur, kan basıncını yükseltir, endotel bağımlı relaksasyonu bozmakta ve endotelyal hücre adhezivitesini artırmaktadır. ADMA, hemodiyaliz hastalarında oluşan kardiyovasküler olaylar, endotel disfonksiyonu ve özellikle mortaliteden sorumludur (Vallance ve Leiper 2004). Bununla birlikte endotelin normal fonksiyonlarının yerine getirilmesinde

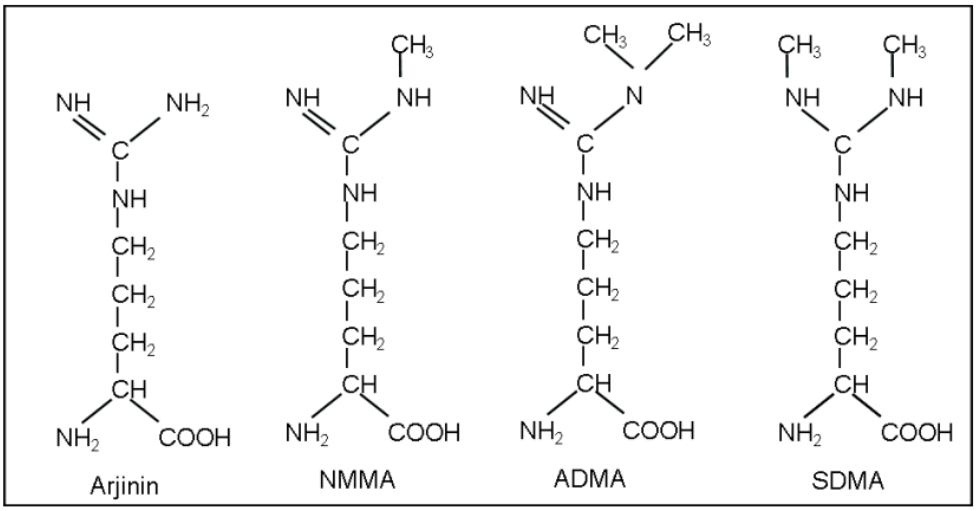
önemli olan NO nun inflamasyonun kontrolünde önemli olan ADMA'nın, antitrombotik işlev ve vazodilatasyonda kritik görevleri bulunmaktadır (Cooke 2000). NO biosentezinin bozulması ve endotel fonksiyonunun bozulması vasküler bir takım problemleri de beraberinde getirecektir. ADMA, arjininden NO sentezini kompetitif olarak engellemektedir. Ayrıca ADMA, NO'nun tübüler Na+ reabsorbsiyonu üzerindeki inhibitör etkisini sınırlı hale getirerek anormal renal sodyum tutulumuma da neden olabilir (Kielstein ve ark 2004).

CAT, NOS'nin inhibe edilmesi ile organ ve vasküler hastalıklarının başlangıcı olan endotelyal disfonksiyonu ayrıca mikrovasküler oksidatif stres olmasında yer alabilir (Wilcox 2005, Palm ve ark 2007).

ADMA Sentezi

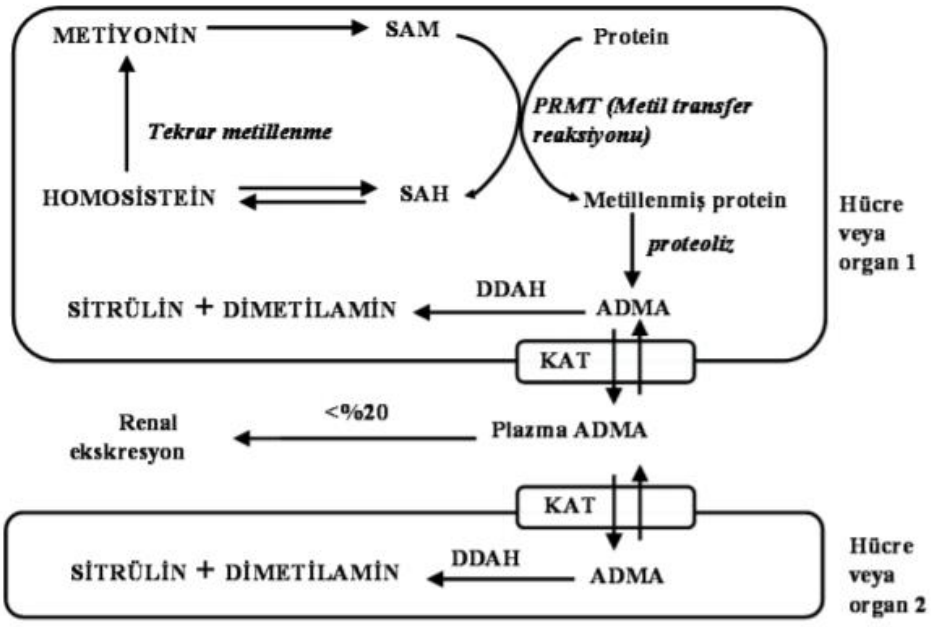
Proteinlerdeki arjinin yıkıntılarının metilasyonu ve bu metilenmiş proteinlerin proteoliz ile serbest aminoasitlere kadar yıkılması sonucu ADMA ortaya çıkmaktadır (Akyol ve ark 2015, Fulton ve ark 2019).

PRMT enzimleri, proteinlerdeki arjinin kalıntılarına metil gruplarının eklenmesini sağlar (Clarke 1993). PRMT enziminin iki ana varyasyonu vardır. İkisi de arjininin monometillenmesini sağlayabilir ve bunun sonucunda N^G-monometil-L-arjinin (NMMA) oluşmaktadır. Ancak ikinci bir metil grubu eklendiği durumda oluşacak ürün, PRMT enziminin tipine bağımlıdır. Tip 1 PRMT enzimi, aynı guanidino azotunu dimetilleyerek N^G, N^Gdimetil-L-arjinin, ADMA oluşumunu katalizlemektedir. Tip 2, her iki guanidino azotunu monometilleyerek N^G, N'^G-dimetil-L-arjinin ve SDMA oluşturmaktadır (Tran ve ark 2003, Vallance ve Leiper 2004) (Şekil 1.13.).



Şekil 1.13. L-Arjinin, NMMA (NG-monometil-L-arjinin), ADMA ve SDMA'nın moleküler formülleri (Erbil ve ark 2012).

SAM, ATP ve metiyoninden sentez edilir. SAM, metil grubuna transfer edildikten sonra S-adenozilhomosistein'e (SAH) dönüşür. SAH, enzimatik olarak homosisteine dönüşür. Çevrilen homosistein ise trans-sülfürasyon yolu ile metabolize edilir veya tekrar metillenerek metiyonine dönüştürülür (Şekil 1.14.). Metilasyon reaksiyonun tekrarı, metil vericisi olarak vitamin B12 ve 5-metil tetrahidrofolik aside bağımlıdır. ADMA, sentezlenmesi için iki adet metil grubu transferine ihtiyaç duyar. Bu reaksiyon sonrası yan ürün olan iki homosistein oluşur (Holven ve ark 2003).



Şekil 1.14. ADMA oluşması ve metabolizma şekli (Erbil ve ark 2012).

ADMA’nın NOS enzimi üzerinde inhibitör etkisi bulunmamaktadır(Tsikas ve ark 2003). Ancak, inhibisyon için metillenmiş proteinlerin yıkımı ile oluşan serbest ADMA gerekmektedir (Erbil ve ark 2012).

ADMAYıkılması

ADMA yadımlanması 3 şekildedir;

ADMA’nın DDAH enzimi tarafından sitrülin ve dimetilaminlere yıkılması (Ogawa ve ark 1989, Rodionov ve ark 2010, Emrich ve ark 2018)

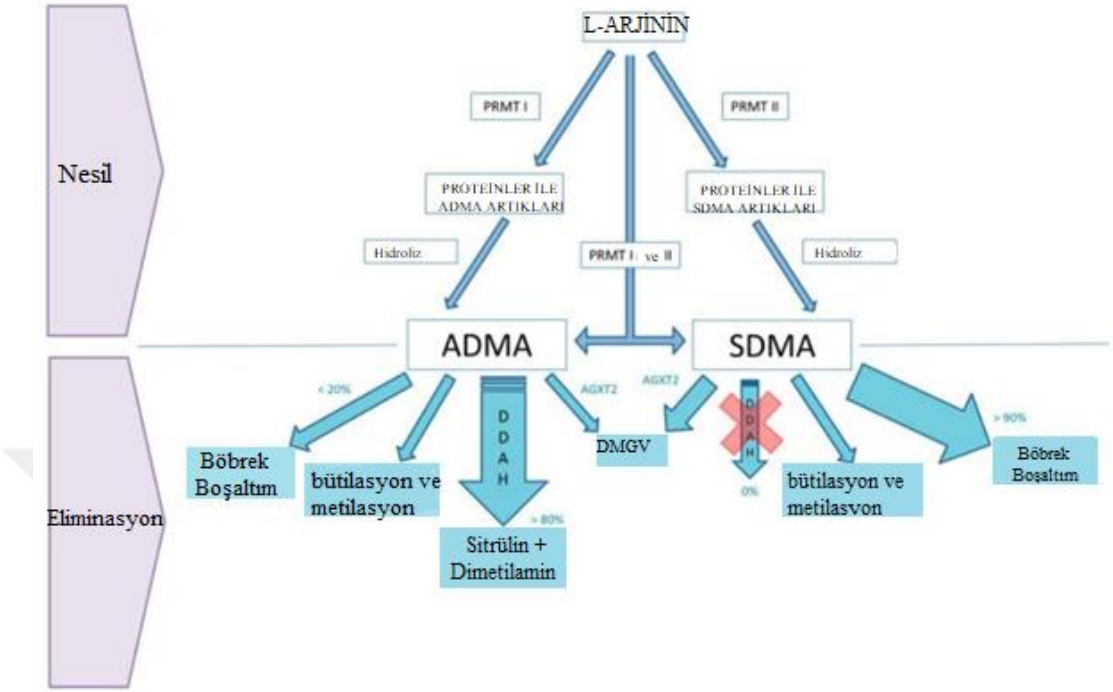
Dimetilarjinin pürivat aminotransferaz enzimiyle α-ketoasitlere dönüştürülmesi (Teerlink 2005)

iADMA’nın değişikliğe uğramadan böbreklerden atılması (Ronden ve ark 2012) şeklindedir.

Dokularda ve hücre içinde ADMA seviyelerininin düzenlenmesinde DDAH anahtar enzimdir. DDAH enzimi varlığı ve aktivitesi kalp, akciğer, beyin dokularında, karaciğer, böbrek, pankreas, plasenta, iskelet kası, monosit, eritrosit ve polimorfonükleer lökositlerde gözlemlenmiştir (Kang ve ark 2001, Leiper 2005). Yüksek organizmalarda DDAH enzimi, kromozom 1 (DDAH–1) ve 6’da (DDAH–2) lokalize genlerce kodlanan iki elzem izoformdur (Teerlink 2005). Birincisi DDAH-1, beyin, karaciğer, böbrek, testis ve böbrek üstü bez gibi nNOS’un eksprese olduğu dokularda bulunmaktadır. İkincisi ise DDAH-2 plesanta, kalp ve aort gibi eNOS ve iNOS’u üreten dokularda fazla bulunmaktadır (Leiper ve ark 1999). Ancak iki izoformun dokulardaki dağılımı farklı olmasına rağmen aktiviteleri benzerdir (Knipp ve ark 2001). DDAH enzimi sitozolik enzimlerden biridir. Açık bir kofaktör gereksinimi tespit edilmemiş fakat aktivitesi bakır ve kadmiyum gibi iki değerli katyon tarafından inhibe edilir (Ogawa ve ark 1989).

ADMA’nın dolaşıma geçmesi ve dolaşımda bulunan ADMA’nın büyük bir bölümünün hücre içerisinde yıkılması DDAH tarafından sağlanmaktadır. Yıkıma uğramayan eser seviyedeki ADMA, KAT tarafından hücreden plazmaya taşınmaktadır. KAT ADMA’nın hem hücre içerisine alınmasında, hemde hücre dışına salınmasında görevlidir. Yapılan çalışmalarda ABY, konjestif kalp yetmezliği ve septik şok gibi bazı klinik durumlarda KAT ekspresyonunda değişme olduğu

bildirilmiştir (Kaye ve ark 2000, Reade ve ark 2002). Şekil 1.15 ADMA'in Metabolizmasını göstermektedir.



Şekil 1.15. ADMA'nın Metabolizması(Oliva-Damaso ve ark 2019).

Bazı hastalıklarda (hiperglisemi ve hiperkolesterolemi) dolaşımdaki ADMA seviyesindeki artışın sebebi azalan DDAH aktivitesidir (Chan ve Chan 2002).

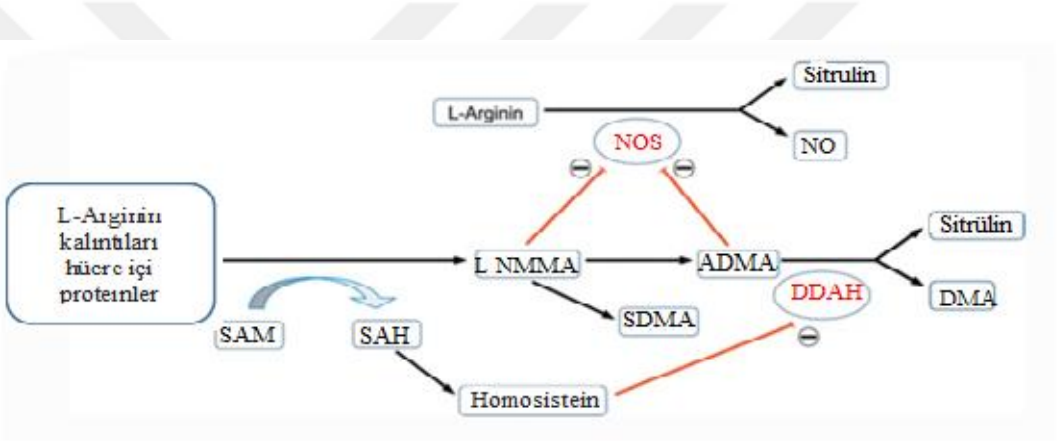
DDAH Enzimi Aracılığıyla Organlarda ADMA Metabolizması

Dolaşım da bulunan ADMA'nın bir kısmı idrar ile atılmakta, bununla birlikte atılan miktar kadar bir kısmı da karaciğer ve böbrek gibi bazı organlar tarafından hücreye geri alınmakta ve DDAH enzimi aracılığı ile yıkılmaktadır. ADMA böbrek yetmezliği durumunda biriktiği ayrıca seviyesindeki artışın son dönem böbrek hastalığındaki kardiyovasküler mortalite ile ilişkisi gözlemlenmiştir (Vallance ve ark 1992, Zoccali ve ark 2001). Literatürde karaciğer nakli yapılan hastalar ile gerçekleştirilen bir çalışmada, ADMA seviyelerinde operasyon öncesi konsantrasyon düzeyinin yüksek, nakil sonrası ADMA konsantrasyon düzeyininin hızla düştüğü bildirilmiştir (Siroen ve ark 2004). Plazma ADMA konsantrasyonu bu hastalarda mortalite için güçlü ve bağımsız bir risk faktörü olarak öne çıkmaktadır. Bu kapsamda bulgulara dayanarak ADMA'nın birikmesi, fizyolojik görevleri çok önemli olan NO

üretimini azaltarak, çoklu organ yetmezliği gelişimine neden olan bir etken olabileceği bildirilmektedir (Nijveldt ve ark 2003).

ADMA'nın Hücresel Seviyesinin Düzenlenmesi

Hücrede oluşan ve salınan net ADMA miktarı, arjinin metilasyonu, metillenmiş arjinin içeren proteinlerin yıkımı, ADMA'nın DDAH enzimleri ile metabolizasyonu ve hücreden atılımının oranları arasındaki denge sonucudur (Şekil 1.16.). ADMA proteinlerin yıkımı ile NO yolağı arasında önemli biyolojik bağlantıların kilit nokrasıdır. ADMA hücre içinde göreceli olarak stabildir. ADMA bir hücrede yapıldığında başka bir hücredeki NOS enzimini inhibe etme yeteneği vardır (Fickling ve ark 1999).



Şekil 1.16. ADMA ve diğer L-arginin metabolitlerinin önerilen biyokimyasal yollar (Bilgiç ve ark 2015).

Böbrek Patogenezinde Asimetrik Dimetilarginin

Kısmen substrat Arg'nin sınırlı sentezine ve aynı zamanda rekabetçi bir NOS inhibitörü olan ADMA'nın yüksek konsantrasyonlarına bağlı olarak böbrek yetmezliği olan hastalarda endotelyal NO üretiminde azalma gözlenmiştir (Loscalzo 2004).

KBY olan hastalarda ADMA birikmektedir (Kielstein ve ark 1999, Caglar ve ark 2006, Tripepi ve ark 2011). Bunun sonucunda NOS aktivitesini inhibe olmakta bir dereceye kadar olan KBY olan hastalarda endotel disfonksiyonunu ve yüksek tansiyonun oluşmasını açıklığa kavuşturabilir (Dobrian 2012, Kajimoto ve ark 2012).

Kronik böbrek hastalığında ADMA birikiminin nedenleri dört ana başlıkta açıklanabilir. Bunlar;

- Bozulmuş böbrek atılımı,
- ADMA'yı bozan DDAH'ın bozulmuş aktivitesi,
- Protein devir hızının artması,
- Daha yüksek protein metilasyon seviyeleridir (Aldámiz-Echevarría ve Andrade 2012).

Erken dönem böbrek hastalığı olan hastalarda glomerüler filtrasyon önemli ölçüde azalmadan önce bile ADMA seviyesi yüksek seyretmektedir (Kielstein ve ark 2002). Dolaşımdaki ADMA nın küçük bir bölümü idrar ile atılmakta (Bilgiç ve ark 2015) olup GRF ile negatif ilişki göstermektedir (Wilcken ve ark 2007).

Yüksek ADMA düzeyleriyle ilgili hastalıklar

Bilinen kardiyovasküler hastalığı olanlarda ve kardiyovasküler riskin arttığı birçok durumda Plazma ADMA konsantrasyonunun arttığını gösteren klinik çalışmalar mevcuttur. Akut koroner sendromu olan vaka çalışmalarında plazma ADMA seviyeleri yüksek olarak gözlemlenmiş ve medikal tedavi bu hastalarda plazma ADMA seviyesinin düştüğü gözlemlenmiştir (Bae ve ark 2005, Krempl ve ark 2005).

Stabil koroner hastalığı olan hastalarda yapılan çalışmada ADMA'nın yüksek plazma konsantrasyonunun Perkütan koroner girişim (PKG) sonrası daha kötü kardiyovasküler sonucun bağımsız bir belirleyicisi olduğu bildirilmiştir (Lu ve ark 2003). Aterosklerozu olanlarda olmayanlara göre plazma ADMA seviyesinin yüksek düzeyde seyrettiği gözlemlenmiştir (Kielstein ve ark 1999, Böger 2006).

Ventrikül kontraksiyonu ve kalp hızını azaltmada ADMA’nın etkisi bulunmaktadır. Kalp yetmezliği var olan hasta ise ADMA seviyeleri artmaktadır (Vallance ve Leiper 2004).

Pulmoner hipertansiyon ve konjenital kalp hastalığı olan hastalarda ADMA yükselmektedir (Gorenflo ve ark 2001). Ayrıca kronik hipoksiye bağlı pulmoner hipertansiyonda DDAH’nin, azalmış pulmoner aktivite göstererek genişletilmiş

(Millatt ve ark 2003). İdiyopatik pulmoner hipertansiyonu olan hastalarda yüksek ADMA plazma hemodinamik ve daha kötü sonuçlanabilir (Kielstein ve ark 2005).

ADMA seviyesinin yüksek olması kardiyovasküler risklerin artması yanı sıra karotid arter intima media kalınlığının artması, konsantrik sol ventriküler hipertrofi gösteren çalışmalar belirtilmiştir (Zoccali ve ark 2004). Karotis arteriyel intima-media kalınlığının kardiyovasküler olayları öngörüp görmediğini belirlemek için kullanılır (Hodis ve ark 1998).

Plazma ADMA düzeyi son dönem böbrek hastalarında diğer hastalarla kıyaslandığında daha yüksek seyretmektedir. ADMA renal yetmezliği olan hastalarda üremik toksin olarak karşımız çıkar (Kielstein ve Zoccali 2005).

PRMT1 aktivitesini arttırarak ADMA üretiminde artışa neden olan Anti-dsDNA ve Sistemik Lupus Eritematozus (SLE) da artmış olan otoantikorlardır (Teerlink 2005).

Son dönem karaciğer hastalarında ve multiple organ yetmezliği olan hastalarda plazmada ADMA yükselmesi bozulmuş karaciğer fonksiyonları olabilir. DDAH'lar karaciğer ve birçok organda bulunmaktadır. dekompanse sirozlu hastalarda ADMA yüksek çıkarken, SDMA gruplar arasında farklı sonuç bulunmuştur. Yüksek oranlı SDMA/ADMA, DDAH azalmış bir aktiviteyi işaretlemektedir (Lluch ve ark 2004).

Diyabeti olmayan ve normotansif vakalarda plazma ADMA konsantrasyonları insülin ile glukoz etkisiz hale gelmesinde bozulması ile pozitif korelasyon göstermiş. Plazma ADMA konsantrasyonları insülin dirençli vakalarda artmış. Bu bağlamda ADMA ve insilin direnci arasında yakın bir ilişki vardır (Stühlinger ve ark 2002).

Tip 1 ve 2 diyabetbulunan hayvan üzerinde yapılan çalışmalarda gözlemlenen, Tip 2 diabeteli vakalarda ADMA yüksek olduğu söylenmiştir (Xiong ve ark 2003). Serum ADMA düzeyi makroanjiyopatisi olan hastalarda olmayan hastaralar kıyasla daha yüksek çıkmıştır (Xiong ve ark 2005).

Tiroid disfonksiyonunda ADMA için bazı çalışmalar yapılmış olup, hem hipertiroidili hem de hipotiroidili hastalarında plazma, ADMA hasta olmayan gruplarda göre yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Altınova ve Arslan 2009).

Esansiyel hipertansiyonda (EH) ADMA yüksek düzeyde seyretmekte olduğu söylenmiştir (Surdacki ve ark 1999).

Bilinen vasküler hastalığı ve hipertansiyonu olamayan hastalarda yapılmış çalışma plazma ADMA ve arteriyal basınç arasında bir ilişki olduğunu bulmuşlardır (Wang ve ark 2009).

Alzheimer hastalığı (AD) hastalarında plazmada ADMA konsantrasyonlarında artış izlenirken, BOS ADMA konsantrasyonlarında azalma izlenmiştir. Plazmadaki ADMA yükselmesi NO metabolizmasındaki değişiklikler örneğin azalmış serebral mikroperfüzyon yoluyla AD katkı sağlayan bir neden olurken, BOS ADMA azalma peroksinitrit, NO üretimi ve oksidatif protein hasarının serabral artışına sebebiyet verebilir (Arlt ve ark 2008).

ADMA artması endotel oksidatif stresin bir belirtisi olduğu düşünülmektedir(McCarty 2004). Oligüri ve doku hipoksisi şiddetli hemorojik şoka özgü görülen bulgular arasındadır. Plazma ADMA konsantrasyonlarının hemorajik şok sırasında gözle görülür ölçüde artmaktadır (Aneman ve ark 1994).

Normal gebelik, erken dönemde kan basıncı gebe olamayanlara göre daha düşük olması bağlamında ADMA azalma eşlik ettiği fark edilmiştir. İlerleyen dönemlerde dolaşımdaki konsantrasyonu artmaktadır. Gebelikte preeklampsi durumunda ADMA daha da yükselmektedir (Holden ve ark 1998).

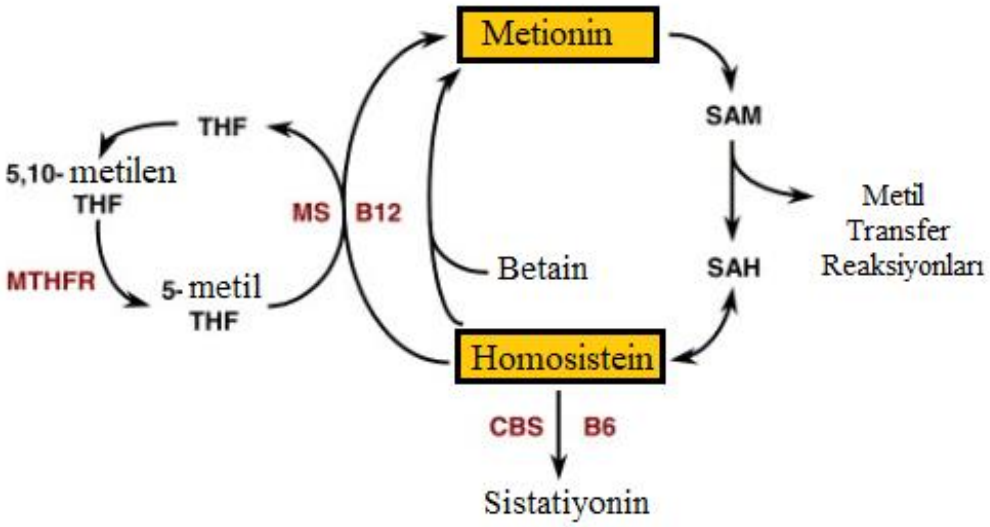
ADMA seviyeleri obezitede yapılan çalışmalarda artış göstermiştir (Alcelik ve ark 2012). Aşırı kilolu kişilerde endotel disfonksiyonuna bağlı ADMA'nın plazma düzeyi ve L-arjinin/ADMA oranı arasında güçlü ilişki olduğu gözlemlenmiştir (Eid ve ark 2004). Morbid obez hastalarında kilo vermesi sonucu ADMA düzeyinde anlamlı azalma gözlemlenmiştir (Konukoglu ve ark 2007).

Homosistein ve ADMA aralarında çok etkileşim olduğundan olayı ilginç bir ilişkiye sahiplerdir. DDAH aktivitesini homosistein sayesinde inhibe edebilir (Erdem ve Ünlü 2009).

PRMT enzimleri tarafından S-adenozilmetiononin (SAM) metil vericisi olarak kullanılan SAM, ATP ve metiyoninden sentez edilir. SAM metil grubunu transfer edilmesi sonrası S-adenozilhomosisteine (SAH) dönüşür. SAH, enzimatik olarak

homosisteine dönüşür. Çevrilen homosistein ise trans-sülfürasyon yolu ile metabolize edilir veya tekrar metillenerek metiyonine dönüştürülür. Metilasyon reaksiyonun tekrarı için, metil vericisi olarak vitamin B12 ve 5-metil tetrahidrofolik aside bağımlıdır. ADMA sentezlenmesi için iki adet metil grubu transferine ihtiyaç duyar. Bu reaksiyon sonrası yan ürün olarak homosistein oluşmaktadır (Jakubowski 1997, Dayal ve ark 2008). Metiltransferaz reaksiyonlarından homosistein birikmesi inme ve kardiyovasküler hastalık için neden olabilecek hiperhomosisteinemiye gibi risk faktörü oluşturabilir (2002).

Homosistein DDAH enzim aktivitesini inhibe ederek endotelyal ve doku hücre kültürlerinde ADMA düzeylerinde yükselme gözlemlenmiştir. Ayrıca Homosistein posttranslasyonel DDAH enzim aktivitesini inhibe eder sonuç olarak nitrik oksit sentezini inhibe etmesine ve ADMA'nın birikmesine sebebiyet verir (Stühlinger ve ark 2001).



Şekil 1.17. Homosistein metabolizması (Lentz ve ark 2003).

Tablo 1.1. ADMA düzeylerinde yükselme gösteren patofizyolojik durumlar ve artış düzeyi (Böger 2006).

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

1.4. ADMA'nın Analizi

HPLC teknolojisine dayalı farklı analitik yöntemlerle üretilen değerlerin karşılaştırmada yetersiz kalması nedeni ile literatürde ADMA ile ilgili idrarda referans aralığı belirlemek için geniş kapsamlı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışma yapılmamasının ana nedeni protein çökertme adımlarının çoğunun laboratuvarda gerçekleştirilememesi ve muhtemelen dolaşımdaki ADMA'nın sadece proteine bağlı olmayan kısmının değerlendirilmesidir. ADMA, plazma proteinlerine fark edilir ölçüde bağlı bulunmaktadır. Uluslararası bir araştırma girişimi 2002 yılında farklı laboratuvarlarda ölçülen verilerin karşılaştırılmasına yönelik bir görevi üslenmiştir (Böger 2006). Günümüzde ADMA ölçülmesinde daha doğru ve hassas ölçüm yapılabilmesi için sıvı kromatografisi (LC)-MS, LC-MS/MS, gaz kromatografisi (GC)-MS ve gaz kromatografi-kütle spektrometresi (GC-MS/MS) gibi çeşitli MS tabanında çalışan cihazlar üretilmiştir (Schwedhelm 2005).

1.4.1. ADMA analizi için analitik yöntemler ve Kromatografi

Birçok hastalığın risk göstergesi olduğu düşünülen arjinin, metil arjinin türevlerinin ve metabolitlerinin idrar, plazma, serum ve doku örneklerde ölçülebilmesi için yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar kılcal elektroforez, yüksek performanslı sıvı

kromatografi (HPLC), LC-MS, LC-MS/MS ve GC-MS yöntemleridir (Eryavuz Onmaz ve ark 2021).

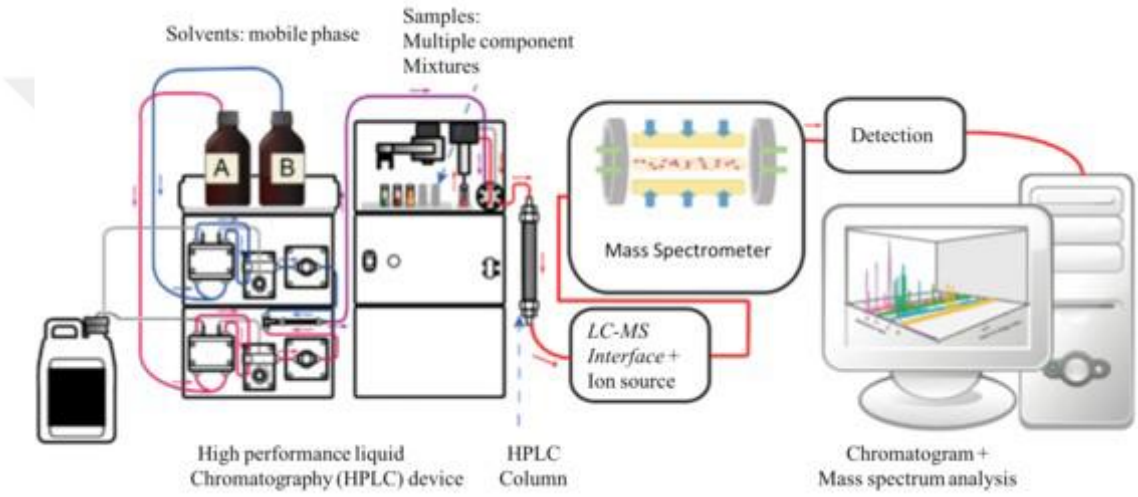
Kılcal elektroforez, HPLC ve kütle spektrometrisi (MS) (Huang ve ark 2004) ve Enzime bağlı immünosorbent testi (ELISA) ADMA'nın ölçülmesi için kullanılan analitik yöntemlerdir. ADMA'nın oftaldialdehit türevlerini floresan tespiti ile yaygın olarak kullanılan HPLC yöntemleri ile ölçülür. Ayrıca bu türevler kararlı olmadığından çevrim içi olarak analizi yapılmalıdır. ADMA, biyolojik olarak inaktif izomeri olan simetrik dimetilaminden kromatografik yol ile ayrılmalıdır. ADMA ve SDMA, farklı parçalanma modellerini gösteren GC-MS ile analizinde kullanılabilir. Bu yöntemler, çoklu ekstraksiyon ve türevlendirme adımlarını içerir ve önemli analiz süresi gerekmektedir (Schwedhelm ve ark 2005). Kirchherr ve Kühn-Velten 2005 yılında yaptıkları çalışmada türevlendirme prosedürlerini atlayan bir kütle spektrometrik yöntemi geliştirdiler (Kirchherr ve Kühn-Velten 2005). Ancak bu yöntem için ADMA'nın SDMA'dan kromatografik olarak ayrılması hala gereklidir (Schwedhelm ve ark 2005).

Karışım şeklinde olan bir örnek bileşenin ayrıştırılması, tanımlanması ve belirlenmesi için kullanılabilen yöntemlere verilen isimdir. Başka ayrıştırma yöntemleri kromatografi kadar etkili olmadığı için yaygın özelliklere sahip değildir. Bunu nedenlerden dolayı araştırma için kromatografi yöntemleri kullanılması tercih edilmektedir. 20. yüzyılın başlarında Michail Tswett bulmuştur. Yeşil yapraklardan elde ettiği çözeltiyi toz şekline getirmiş bulunan ksantofil ve klorofili renki maddesini, kolonda renkli bant şeklinde ayırmıştır. Bu renkli banlardan ilham alarak bu işleme kromotograf diyerek adlandırmıştır. Kelime manası renkli yazılımdır. Karışım içinde bulunan bileşenlerin iki faz ortasında dağılmasını sağlayacak şekilde ayırmaya dayanan bir teknik olup, bir tanesi geniş yüzeye sahip diğeri ise sabit faz süresince eylemde bulunan sıvı ya da gaz mobil fazdır (Bakanlığı 2013).

1.4.2. Sıvı Kromatografisi Ardışık Kütle Spektrometresi (LC- MS/MS)

Son on yılda, rutin toksikoloji laboratuvarlarında LC-MS/MS (Şekil 1.18), muazzam bir büyüme yaşamıştır. LC-MS/MS, immünoanalizler ve GC-MS gibi diğer geleneksel tahlillere göre önemli avantajları vardır (Zhang ve ark 2016). ADMA, SDMA, MMA ve ARG'nin insan plazmasından ekstraksiyonu ve miktar tayini için

basit, hassas ve hızlı bir LC-MS-MS yöntemdir (Vishwanathan ve ark 2000). Kompleks matrikslerde örnekleme hazırlama işlemlerde kullanılmış sistemlerin gelişmişlik ihtiyacının asgari seviyede olması, hassasiyet ve seçiciliğin gün geçtikçe çoğalması, kantitatif ve kalitatif yorumlamasını kolay yapılabilmesi sebebiyle, LC-MS/MS'ler seçilmiştir. LC-MS/MS sisteminde metodun geliştirilmesindeki en ehemmiyetli basamaklar; incelemeyi yapılacak maddenin özelliklerinin belirlenmesi, maddelerin aygıttaki optimizasyonu, maddeye özgü parçaların tanımlanması, maddenin yapısına uygun analitik sütunun tanımlanması, sütun üzerindeki akış ve sıcaklık parametrelerin tanımlanmasından oluşmaktadır (Bakanlığı 2013).



Şekil 1.18. LC-MS/MS(Sandıkçıoğlu 2017)

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1. Kullanılan Reaktif ve Çözeltiler

ADMA Standart (Calbiochem, Lot: 311204, US)

ADMA İnternal Standart (d7-ADMA)

Arjinin Standart (Merck, 519- K 538944,Darmstadt Germany)

Homoarjinin Standart [Sigma: 1483-01-8 (lot: 010M1218V)]

HCl (Merck, K 25039614-814, Darmstadt Germany)

Metanol Metanol [Sigma: 34885-2,5L-R (lot: S2BD126SV)]

Asetonitril (gas chromatography SupraSolv® Merck Katalog. No:1000172500, Almanya)

[2H7]- ADMA (Medical Isotopes Katalog No: DLM-7476-5, A.B.D)

Formik Asit (98-100% Suprapur® Merck Katalog No: 1116701000,Almanya)

Bütanol (Sigma Katalog No: W217808-1KG-K)

Türevleştirici Reaktif (%5 asetilklorid içeren bütonol): Bir cam veya behere 19 m

2.3. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Santrifüj (Beckman Coulter Allegra X-22R Centrifuge, ABD)

Vorteks (Beckman Coulter Microfuge X-22R Centrifuge, Almanya)

Phenomenex Luna C18 50 x2.1 mm (5 μm) kolon (HPLC Brand Katalog No:00A-4040-B0, ABD)

Shimadzu LC 20AD system

Tandem MS(ABSCIEX API 3200, Singapur) (Şekil 2.1)

HPLC ((SHIMADZU UFLC; DGU-20 A3 (degaste), LC 20 AD (Apompası) LC20 AD (B pompası) ve SIL-20 AC HT(oto sampler), Kyoto, Japonya) (Şekil 2.1)

Hassas terazi: Sartorius BP 110 S

Otomatik pipetler: Eppendorf Resarch 100 – 1000 µL, 20-200 Ml

Örnek saklama tüpleri: Ependorf marka, 1,5 ml

Derin dondurucu: New Brunswick Ultra-Low Temperature Freezer U570 Premium (-80 °C)



Şekil 2.1. Laboratuvarda kullanılan LC-MS/MS cihazı.

2.4. Numune Toplama ve Saklama

Tez çalışması Selçuk Üniversitesi Rektörlüğü Yerel Etik Kurulundan 28 Eylül 2021 tarih ve 2021/17 saylı karar ile onay alındıktan sonra Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne yazılı başvuru ile bütçe desteği talebinde bulunulmuştur.

Çalışmanın gerçekleştirilebilmesi için Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi biyokimya laboratuvarında Polikliniğinden idrar istemi yapılmış ve idrar tetkikleri sonuçlandırılmıştır. Bu çalışma kapsamında %53 ü erkek, %47 si kadın olan 18-80 yaş aralığında 132 adet rastgele idrar örneğinde tam idrar analizi yapılmış ve

herhangi bir patoloji saptanmamış idrar numunesi alınmıştır. Bu 132 adet örnek rutin tam idrar tetkiki yapılmış, sonucu çıkmış ve artık biyolojik atığa gönderilmiş idrar örneklerinden seçilerek yapılmıştır. Dolayısıyla çöpe atılacak numuneler çalışma amacıyla kullanılmıştır. Hastadan fazladan ekstra bir idrar numunesi alınmamıştır. Rutin tetkikler esnasında alınan idrar numunelerinden artık kalan 132 adet idrar örneği kullanılmış olup hastalara yönelik ek bir girişimde bulunulmamıştır. Numuneler toplanıp çalışma gününe kadar -80 °C'de saklanmış. Hastaya yönelik girişim olmadığından hastaya özel bir güvenlik önlemi alınmamıştır (data güvenliği hariç). Laboratuvar güvenlik kurallarına uyulmuş. Bu araştırma için 18 yaş altı bireyler ve özel popülasyonlar (gebe, çocuk, karaciğer yetmezliği) dahil edilmedi.

2.5. Numunelerin analize hazırlanması

-80 °C'de ependorf tüplerinde stoklanmış olan idrarlar, erimesi için oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Eriyen idrarda homojenliği sağlamak için 3-5 saniye vorteks edildi.

200 µL idrar örneğinin üzerine 100 µL metanol içerisinde çözülmüş iç standart (d7-ADMA) eklendikten sonra çöktürme işlemi için 1000 µL metanol eklendi vorteks yapıldı.

13000 rpm'de 10 dakika santrifüj ile çöken proteinler uzaklaştırıldı.

Süpernatant temiz bir tüpe alınıp 65'0 C de azot gazı altında uçurtuldu.

Türevleştirme işlemi için taze hazırlanmış 200 µL %5 (v v−1) lik bütanol/asetil klorid solüsyonu eklenip 65'^{0}C de 20 dakika bekletildi.

Tekrar 65' 0 C'de azot gazı altında solvent uçurtuldu. Çözdürme işlemi %0.1 (v /v) formik asit içeren 200 µL su–metanol (90:10, v v−1) ile gerçekleştirildi.

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

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

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

Hazırlanan mobil faz 0,45 µm filtreler kullanılarak filtre edildi. Degaze işlemi su trombu ile sağlandı. 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. Arjinin stok standart solüsyonu (1 mM) 0.1 M HCl içinde hazırlanacak 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. 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 konulacak ve 10 µl enjekte edildi. Alınan pik alanlarıyla homoarjinin standart grafiği oluşturuldu.

2.7. ADMA Ölçümü İçin LC-MS/MS Değerleri

Çalışmada kullanılan LC-MS/MS cihazında ayarlanan ADMA metot özellikleri aşağıda verilmiştir (Şekil 2.3).

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) 20.00

Temperature (TEM) 600.00

Q1 Mass 259.300

Q3 Mass 214.000

	Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Time (msec)	ID	DP (volts)	EP (volts)	CE (volts)
1	231.300	70.000	400.0	ARGININE	40.000	7.500	24.000
2	259.300	228.000	400.0	SDMA	40.000	7.500	24.000
3	259.300	214.000	400.0	ADMA	40.000	7.500	24.000
4	232.300	113.000	400.0	SITRULLIN	40.000	7.500	24.000
5	266.610	221.000	400.0	D7-ADMA	40.000	7.500	24.000
6	245.300	70.200	400.0	LNMMA	40.000	7.500	24.000
7	245.200	84.200	400.0	HOMOARJININ	40.000	7.500	24.000
8	189.000	70.000	600.0	ORNITIN	55.000	10.000	20.000
9							

Şekil 2.2. LC-MS/MS cihazında ayarlanan ADMA metot özellikleri.

2.8. Homoarjinin Ölçümü İçin LC-MS/MS Değerleri

Çalışmada kullanılan LC-MS/MS cihazında ayarlanan ADMA metot özellikleri aşağıda verilmiştir (Şekil 2.3).

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) 600.00

Q1 Mass 245.200

Q3 Mass 84.200

2.9. İstatistiksel Analiz

Verileri analiz etmek için değerlerin normal dağılıma uygunluğu ve varyans eşitliğine bakılarak parametrik veya parametrik olmayan testlerin uygulanabilirliğine karar verilmiştir. Verilerin normal dağılıma uygunluk testi, Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak kullanılarak test edilmiştir.

Çalışmanın istatistiki testlerinde SPSS 22 paket programları kullanılmıştır. Referans aralığı için parametrik Referans aralığı kullanılmıştır. İlgili değişkenin alt limiti için

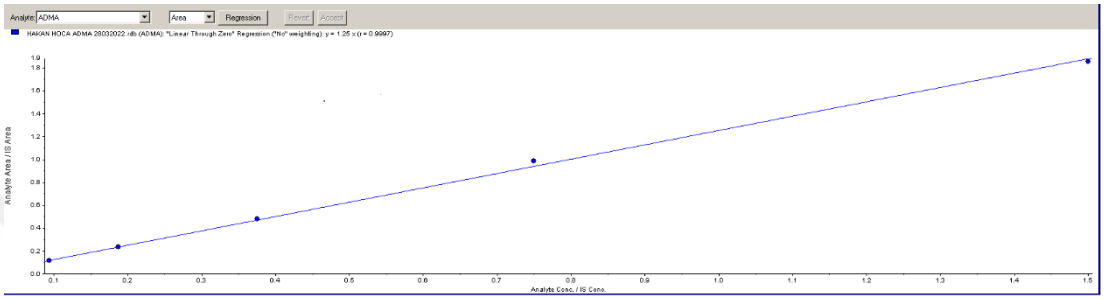
$\bar{X} - z_{\frac{\propto}{2}}\sqrt{\frac{\sigma^2}{n}}$, üst limit için $\bar{X} + z_{\frac{\propto}{2}}\sqrt{\frac{\sigma^2}{n}}$ formülünden hesaplanmıştır. %95 güven aralığında anlam seviyesi 0,05 alınmış ve bu sebeple $z_{\frac{\propto}{2}}$ değeri 1,96 olarak alınmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Araştırma Grubunda Tanımlayıcı Özelliklerine İlişkin Bulgular

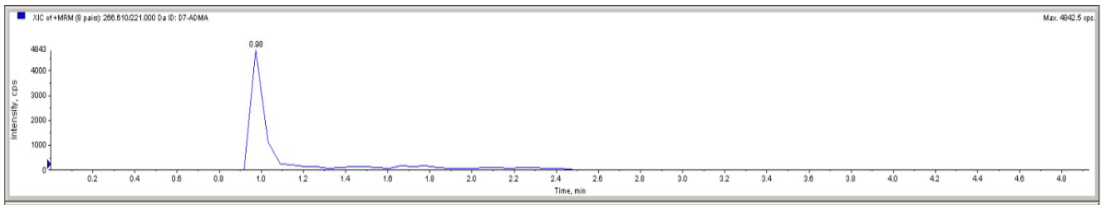
Araştırmaya %53 ü erkek, %47 si kadın olan 18-80 yaş aralığında 132 katılımcı dahil edilmiştir.

3.2. ADMA'nın Kalibrasyon Grafikleri ve Analiz Sonuçları



Grafik 3.1. ADMA'nın kalibrasyon grafiği.

ADMA'nın 50 µM standart solüsyondan 0.1 M HCl ile dilüsyonlarla sırasıyla 1,5 µM, 0,75 µM, 0,375 µM, 0,185 µM, 0,0937 µM'lik standart çözeltileri LC-MS/MS cihazında çalışma öncesi verildi ve kalibrasyon grafiği çizildi (Grafik 3.1). Bundan sonra çalıştığımız her numunedeki ADMA düzeyleri bu kalibrasyon grafiğine göre hesaplandı.



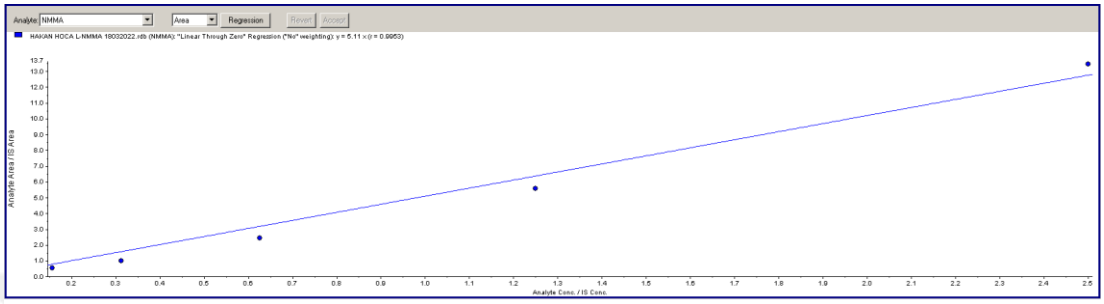
Grafik 3.2. ADMA'nın pik grafiği.

Grafik 3.2. çalıştığımız numunelerdeki ADMA'nın cihazda ilk çıkmış olduğu piki göstermektedir.

Sağlıklı gönüllülerden alınan numunelerin kreatin ve ADMA değerleri oranlanmıştır. Sonuç olarak ADMA umol/g Kreatinin değerinin alt limiti 0,662 iken,

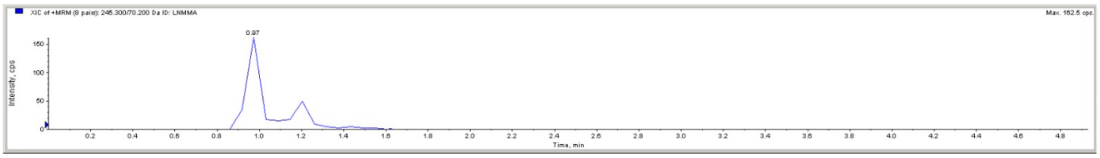
üst limiti 9,994 olarak bulunmuştur (Tablo 3.1.). Yani %95 ile referans aralığı (0,662-9,944) şeklindedir.

3.3. L-NMMA Kalibrasyon Grafikleri ve Analiz Sonuçları



Grafik 3.3. L-NMMA kalibrasyon grafiği.

L-NMMA'nın 50 µM standart solüsyondan 0.1 M HCl ile dilüsyonlarla sırasıyla 1,5 µM, 0,75 µM, 0,375 µM, 0,185 µM, 0,0937 µM'lik standart çözeltileri LC-MS/MS cihazında çalışma öncesi verildi ve kalibrasyon grafiği çizildi (Grafik 3.3). Bundan sonra çalıştığımız her numunedeki L-NMMA düzeyleri bu kalibrasyon grafiğine göre hesaplandı.

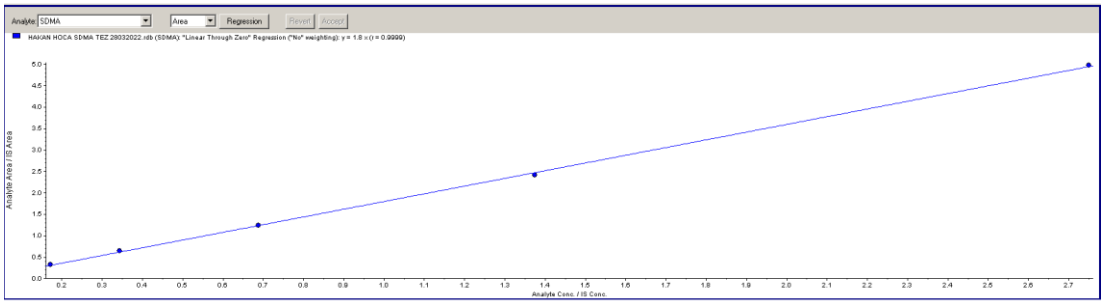


Grafik 3.4. L-NMMA pik grafiği.

Grafik 3.4. çalıştığımız numunelerdeki L-NMMA'nın cihazda ilk çıkmış olduğu piki göstermektedir.

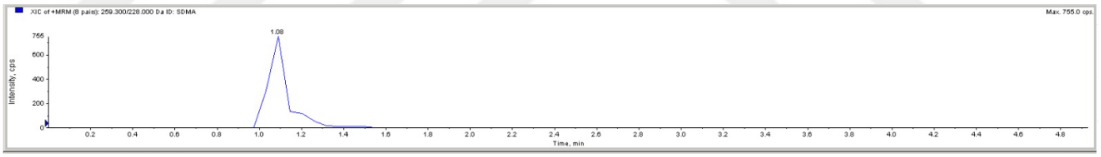
Sağlıklı gönüllülerden alınan numunelerin kreatin ve LNMMA değerleri oranlanmıştır. Sonuç olarak LNMMA umol/g Kreatinin değerinin alt limiti 0,000 iken, üst limiti 0,786 olarak bulunmuştur (Tablo 3.1.). Yani %95 ile referans aralığı (0,000-0,786) şeklindedir.

3.4. SDMA Kalibrasyon Grafikleri ve Analiz Sonuçları



Grafik 3.5. SDMA kalibrasyon grafiği.

SDMA'nın 50 µM standart solüsyondan 0.1 M HCl ile dilüsyonlarla sırasıyla 1,5 µM, 0,75 µM, 0,375 µM, 0,185 µM, 0,0937 µM'lik standart çözeltileri LC-MS/MS cihazında çalışma öncesi verildi ve kalibrasyon grafiği çizildi (Grafik 3.5). Bundan sonra çalıştığımız her numunedeki SDMA düzeyleri bu kalibrasyon grafiğine göre hesaplandı.

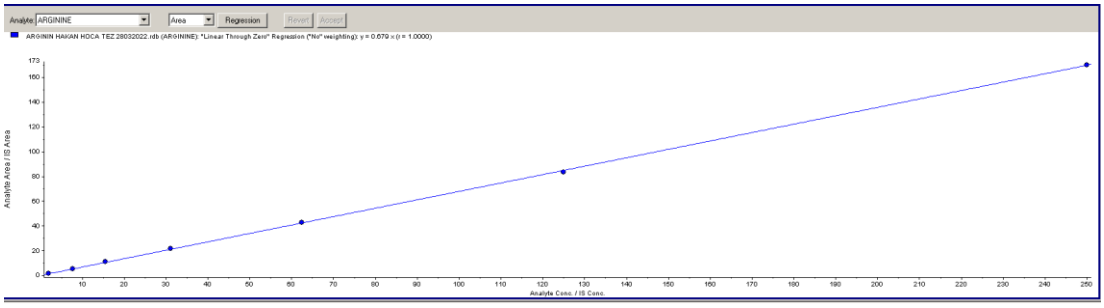


Grafik 3.6. SDMA pik grafiği.

Grafik 3.6. çalıştığımız numunelerdeki SDMA'nın cihazda ilk çıkmış olduğu piki göstermektedir.

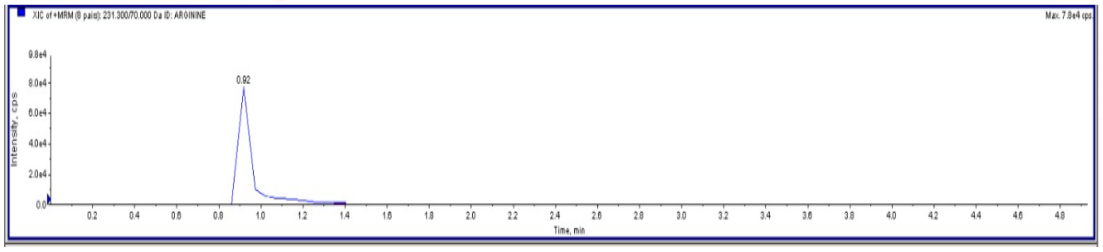
Sağlıklı gönüllülerden alınan numunelerin kreatin ve SDMA değerleri oranlanmıştır. Sonuç olarak SDMA umol/g Kreatinin değerinin alt limiti 1,334 iken, üst limiti 11,638 olarak bulunmuştur (Tablo 3.1.). Yani %95 ile referans aralığı (1,334-11,638) şeklindedir.

3.5. Arjinin Kalibrasyon Grafikleri ve Analiz Sonuçları



Grafik 3.7. Arjinin kalibrasyon grafiği.

Arjinin 50 µM standart solüsyondan 0.1 M HCl ile dilüsyonlarla sırasıyla 1,5 µM, 0,75 µM, 0,375 µM, 0,185 µM, 0,0937 µM'lik standart çözeltileri LC-MS/MS cihazında çalışma öncesi verildi ve kalibrasyon grafiği çizildi (Grafik 3.7). Bundan sonra çalıştığımız her numunedeki Arjinin düzeyleri bu kalibrasyon grafiğine göre hesaplandı.

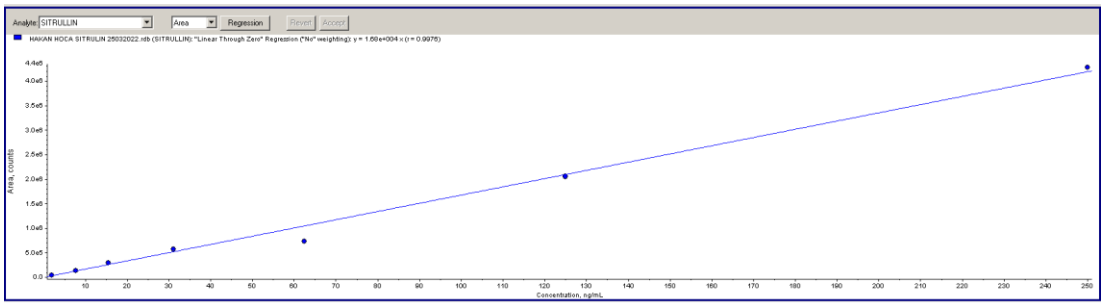


Grafik 3.8. Arjinin pik grafiği.

Grafik 3.8. çalıştığımız numunelerdeki arjininin cihazda ilk çıkmış olduğu piki göstermektedir.

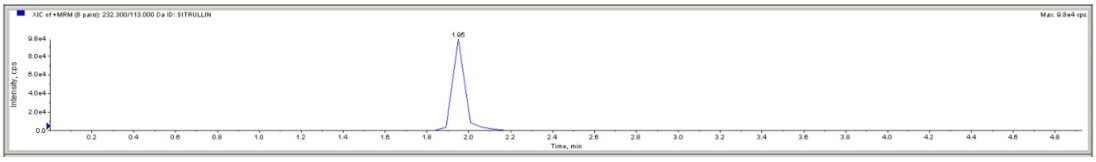
Sağlıklı gönüllülerden alınan numunelerin kreatin ve arjinin değerleri oranlanmıştır. Sonuç olarak Arginin umol/g Kreatinin değerinin alt limiti 0,468 iken, üst limiti 9,502 olarak bulunmuştur (Tablo 3.1.). Yani %95 ile referans aralığı (0,468-9,502) şeklindedir.

3.6. Sitrülin Kalibrasyon Grafikleri ve Analiz Sonuçları



Grafik 3.9. Sitrülin kalibrasyon grafiği.

Sitrülin'in 50 µM standart solüsyondan 0.1 M HCl ile dilüsyonlarla sırasıyla 1,5 µM, 0,75 µM, 0,375 µM, 0,185 µM, 0,0937 µM'lik standart çözeltileri LC-MS/MS cihazında çalışma öncesi verildi ve kalibrasyon grafiği çizildi (Grafik 3.9). Bundan sonra çalıştığımız her numunedeki Sitrülin düzeyleri bu kalibrasyon grafiğine göre hesaplandı.

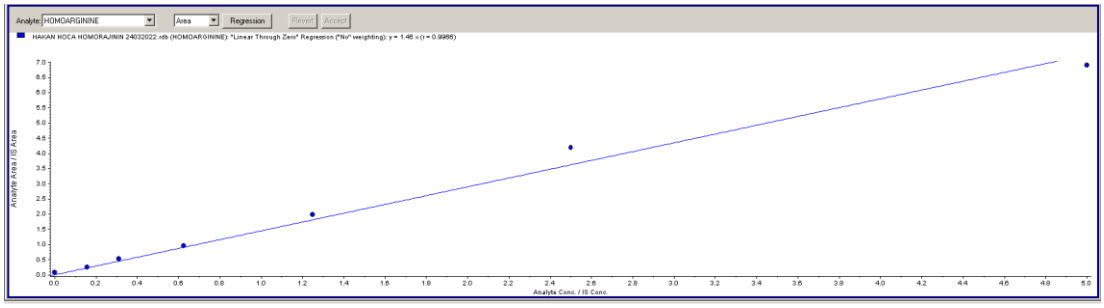


Grafik 3.10. Sitrülin pik grafiği.

Grafik 3.10. çalıştığımız numunelerdeki Sitrülin'in cihazda ilk çıkmış olduğu piki göstermektedir.

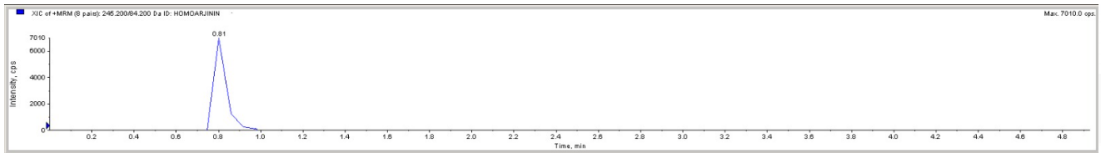
Sağlıklı gönüllülerden alınan numunelerin kreatin ve Sitrülin değerleri oranlanmıştır. Sonuç olarak Sitrülin umol/g Kreatinin değerinin alt limiti 0,462 iken, üst limiti 5,397 olarak bulunmuştur (Tablo 3.1.). Yani %95 ile referans aralığı (0,462-5,397) şeklindedir.

3.7. Homoarjinin Kalibrasyon Grafikleri ve Analiz Sonuçları



Grafik 3.11. Homoarjinin kalibrasyon grafiği.

Homoarjinin 50 µM standart solüsyondan 0.1 M HCl ile dilüsyonlarla sırasıyla 1,5 µM, 0,75 µM, 0,375 µM, 0,185 µM, 0,0937 µM'lik standart çözeltileri LC-MS/MS cihazında çalışma öncesi verildi ve kalibrasyon grafiği çizildi (Grafik 3.11). Bundan sonra çalıştığımız her numunedeki Homoarjinin düzeyleri bu kalibrasyon grafiğine göre hesaplandı.

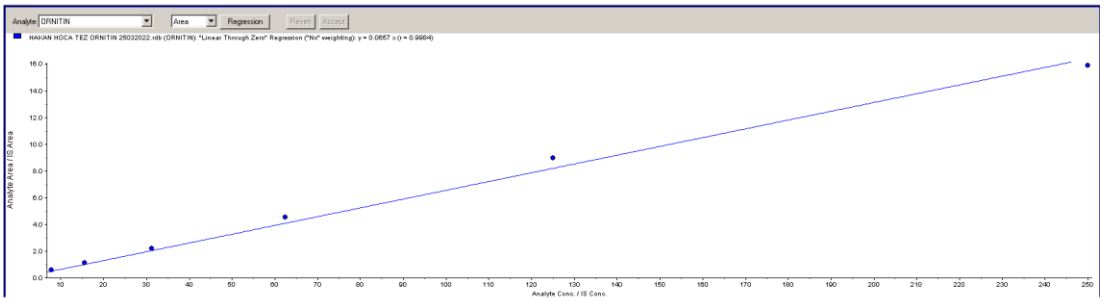


Grafik 3.12. Homoarjinin pik grafiği.

Grafik 3.12. çalıştığımız numunelerdeki Homoarjinin cihazda ilk çıkmış olduğu piki göstermektedir.

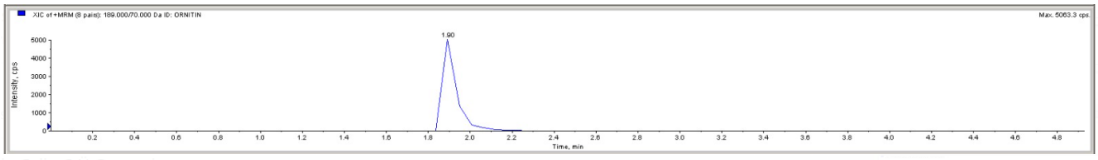
Sağlıklı gönüllülerden alınan numunelerin kreatin ve Homoarginin değerleri oranlanmıştır. Sonuç olarak Homoarginin umol/g Kreatinin değerinin alt limiti 10,005 iken, üst limiti 27,532 olarak bulunmuştur (Tablo 3.1.). Yani %95 ile referans aralığı (10,005-27,532) şeklindedir.

3.8. Ornitin'in Kalibrasyon Grafikleri ve Analiz Sonuçları



Grafik 3.13. Ornitin'in kalibrasyon grafiği.

Ornitin'in 50 µM standart solüsyondan 0.1 M HCl ile dilüsyonlarla sırasıyla 1,5 µM, 0,75 µM, 0,375 µM, 0,185 µM, 0,0937 µM'lik standart çözeltileri LC-MS/MS cihazında çalışma öncesi verildi ve kalibrasyon grafiği çizildi (Grafik 3.13). Bundan sonra çalıştığımız her numunedeki Ornitin düzeyleri bu kalibrasyon grafiğine göre hesaplandı.



Grafik 3.14. Ornitin'in pik grafiği.

Grafik 3.14. çalıştığımız numunelerdeki Ornitin'in cihazda ilk çıkmış olduğu piki göstermektedir.

Sağlıklı gönüllülerden alınan numunelerin kreatin ve Ornitin değerleri oranlanmıştır. Sonuç olarak Ornitin umol/g Kreatinin değerinin alt limiti 62,347 iken, üst limiti 98,645 olarak bulunmuştur (Tablo 3.1.). Yani %95 ile referans aralığı (62,347-98,645) şeklindedir.

Sağlıklı gönüllü grubunda %95 güven ile alt ve üst limitler aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 3.1. Metil arjinin ve türevlerinin referans aralığı.

	Alt Sınır	Üst Sınır
ADMA umol/g Kreatinin	0,662	9,944
SDMA umol/g Kreatinin	1,334	11,638
LNMMA umol/g Kreatinin	0,000	0,786
Homoarginin umol/g Kreatinin	10,005	27,532
Arginin umol/g Kreatinin	0,468	9,502
Sitrülin umol/g Kreatinin	0,462	5,397
Ornitin umol/g Kreatinin	62,347	98,645

Sağlıklı gönüllülerden alınan numunelerin kreatin seviyeleri her bir parametre ile oranlanmış olup çıkan değerlerin alt - üst sınırları Tablo 3.1.'de, ortalama ve standart hata değerleri Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Metilarjinin ve türevlerinin ortalama değer tablosu.

	N	Ortalama	Std Hata
ADMA_umol_g_Kreatinin	132	5,303	4,947
SDMA_umol_g_Kreatinin	132	6,486	4,798
LNMMA_umol_g_Kreatinin	132	0,111	0,386
Homoarginin _umol_g_Kreatinin	132	18,768	17,916
Arginin _umol_g_Kreatinin	132	4,985	6,060
Sitrülin _umol_g_Kreatinin	132	1,476	2,263
Ornitin _umol_g_Kreatinin	132	80,496	60,445

Araştırmaya %53 ü erkek, %47 si kadın olan 18-80 yaş aralığında 132 katılımcı dahil edilmiştir. Ayrıca araştırma kapsamında Sağlıklı gönüllülerden alınan numunelerin metilarjinin ve türevlerinin kreatin ile oranlanması sonucu çıkan değerler incelenmiş olup, kadın ve erkeklerde çıkan sonuçların ortalamaları alınmış Tablo 3.3.'de verilmiştir. Tabloda verilen bilgiler doğrultusunda kadın ve erkeklerde ortalamalarının birbirine yakın olduğu görülmektedir.

Tablo 3.3. Metilarjinin ve türevlerinin kadın ve erkeklerde ortalama değer tablosu.

	n=62 Kadın	n=70 Erkek
ADMA umol/g Kreatinin	5,261	5,341
SDMA umol/g Kreatinin	6,536	6,444
LNMMA umol/g Kreatinin	0,132	0,093
Homoarginin umol/g Kreatinin	17,062	20,281
Arginin umol/g Kreatinin	4,255	5,633
Sitrülin umol/g Kreatinin	1,459	1,493
Ornitin umol/g Kreatinin	81,005	80,046

4.TARTIŞMA

Protein arginin metilasyonu, patolojik ve gelişimsel süreçler anlayışımızı artırmak için umut vaat etmektedir. Hızla büyüyen bir biyomedikal araştırma alanından biridir. On yıldan kısa bir süre önce, iki düzineden az proteinin metilarjinin içerdiği doğrulanmış, bununla birlikte, şimdi yüzlerce metilarjinin proteini tespit edilmiş ve birçoğu kütle spektrometresi ve diğer proteomik ve moleküler tekniklerle onaylanmıştır (Aletta ve Hu 2008).

Metilproteinlerin standart immünohistokimya ile tespit edilmesi, metilarjinin proteinlerinin karsinojenezi de içeren biyolojik süreçlerdeki rolünü araştırmak için yeni bir araç sağlayabilir. Metilarjinine spesifik antikorlar, parafin gömülü dokularda metilarjinin proteinlerini bilebilir. Metilarjinin proteinleri çeşitli organlarda ve neoplastik koşullarda hücre altı lokalizasyonunda farklılıklar göstermektedir (Vezzalini ve ark 2010).

ADMA ilk olarak 1970 yılında idrar yoluyla atılan metilenmiş bir arjinin türevi olarak karşımıza çıkmaktadır (Kakimoto ve Akazawa 1970, Aydın ve ark 2013). ADMA, idrarda, dokularda ve plazmada bulunmaktadır. İzole edilen insan endotel hücrelerinde ayrıca hayvan immün sistem hücre ve noronlarında bulunmuştur (Kimato ve ark 1993).

Günümüzde laboratuvar testleri, hastalığın tanı ve takibinde, prognozun belirlenmesinde ve uygulanacak tedavi yöntemlerinin seçiminde çok önemli bir rol oynamaktadır. Referans aralığı laboratuvar testlerini değerlendirmede klinisyenlere tıbbi olarak yardımcı olan en önemli karar verme aracıdır. Referans aralığı, test ölçümlerinin normal kabul edilebileceği, çeşitli istatistiksel yöntemler kullanılarak referans bireylerden oluşan bir popülasyondan elde edilen sayı aralığını ifade eder. Referans aralıklarını belirlemeye yönelik çalışmalar, önce bir referans popülasyonu (yani, sağlıklı kabul edilen bir popülasyon) belirlemelidir. Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Polikliniğine başvuran hastalardan idrar istemi yapılan ve biyokimya laboratuvarında tam idrar analizi yapılmış çöpe atılacak numuneler içerisinden rasgele herhangi bir patoloji saptanmamış 132 idrar numunesi çalışma amacıyla kullanılmıştır. Dolayısı ile hastalardan fazladan ekstra bir idrar numunesi alınmamıştır. İdrarda metilarjinin ve ADMA seviyeleri, rutin biyokimya

laboratuvarında bulunan LC-MS/MS cihazında idrar metilarjinin düzeylerinin analizi yapıldı (Şekil 2.1.).

Literatürde benzer birçok çalışma bulunmasına rağmen geniş hasta kitlesi ile yapılan ilk çalışmadır. Aşağıdaki tabloda daha önce yapılan çalışmalar karşılaştırmalı olarak özetlenmiştir.

Tablo 3.3. Metilarjinin ve türevlerine ait literatür taraması.

YAZAR	CİHAZ	DOĞRULANMIŞ MATRİS	Arg	l-NMMA	ADMA	SDMA	REFERANS
Vishwanathan ve arkadaşları	LC-MS/MS	Plazma	62.6 ± 24.0	0.104 ± 0.020	0.124 ± 0.046	0.164 ± 0.065	(Vishwanathan ve ark 2000)
Tsikas ve arkadaşları	GC-MS	Plazma			0.390 ± 0.062 µM		(Tsikas ve ark 2003)
		İdrar			3.4±1.1 µmol/mmol kreatinin		
Huang ve arkadaşları	LC-MS/MS	İdrar 24 Saat	113,62 ± 29,96 µmol		56,28 ± 18,31 µmol	37,25 ± 12,92 µmol	(Huang ve ark 2003)
Martens-Lobenhoffer ve Bode-Böger	LC-MS/MS	Plazma	119.5 ± 21.6 µM		0.453 ± 0.128 µM	0.602 ± 0.168 µM	(Martens-Lobenhoffer ve Bode-Böger 2003)
		İdrar	11.9±2.4 µM		51.7±16.6 µM	50.4±13.0 µM	
Martens-Lobenhoffer ve arkadaşları	LC-MS/MS	Plazma	63,9 ± 23,9 µM		0.355 ± 0.066 µM	0.460 ± 0.092 µM	(Martens-Lobenhoffer ve ark 2004)
Albsmeier ve arkadaşları	**GC-MS)**	Plazma			0.600 ± 0.076 µM		(Albsmeier ve ark 2004)
Huang ve arkadaşları	LC-MS/MS	Plazma	72,64 ± 17,31 µmol L−1	0.35 ± 0.14 µmol L−1	0.48 ± 0.07 µmol L−1	0.41 ± 0.05 µmol L−1	(Huang ve ark 2004)
Kirchherr ve Kühn-Velten	**HPLC-tandem kütle spektrometrik yöntemi**	Plazma			0.455 µmol / L	0.678 µmol / L	(Kirchherr ve Kühn-Velten 2005)
Schwedhelm ve arkadaşları	LC-MS/MS	Plazma	65,6 ± 23,4 µmol		0.55 ± 0.14 µmol	0.69 ± 0.23 µmol	(Schwedhelm ve ark 2005)
Martens-Lobenhoffer ve Bode-Böger	**Sıvı Kromatografisi-Elektrosprey Tandem Kütle Spektrometrisi**	Plazma	60,6 ± 18,3 µmol / L		0.370 ± 0.061 µmol / L	0.449 ± 0.055 µmol / L	(Martens-Lobenhoffer ve Bode-Böger 2006)
		İdrar	1.67 ± 0.62 µmol / mmol kreatinin		2.92 ± 0.42 µmol / mmol kreatinin	3.72 ± 0.35 µmol / mmol kreatinin	
Martens-Lobenhoffer ve arkadaşları	LC-MS / MS	Plazma			0.446±0.067 µmol/L		(Martens-Lobenhoffer ve ark 2014)
		İdrar			3.50 ± 0.67 µmol / mmol kreatinin		
Martens-Lobenhoffer ve Bode-Boger	LC-MS / MS	Plazma				0.444 µM	(Martens-Lobenhoffer ve Bode-Boger 2015)
		İdrar				43.4 µM	

Martens-Lobenhoffer ve Bode-Böger (2006)' in sağlıklı gönüllülerden alınan plazma, idrar örneklerinde yaptıkları çalışmada; grup 1 alınan örneklerde plazmada

SD Arg için ortalama (SD) 60.6 (18.3) µmol / L, ADMA için 0.370 (0.061) µmol / L ve SDMA için 0.449 (0.055) µmol / L olduğunu söylemişlerdir. Grup 2 den alınan idrar örneklerinde konsantrasyon Arg için 1.67 (0.62) µmol / mmol kreatinin, ADMA için 2.92 (0.42) µmol / mmol kreatinin ve SDMA için 3.72 (0.35) µmol / mmol kreatinin söylemişlerdir. (Martens-Lobenhoffer ve Bode-Böger 2006). Tsikas ve arkadaşları (2003)' nın yaptıkları çalışmada; Sağlıklı gönüllülerden plazma ve idrarında ADMA sırasıyla 0.39±0.06 µM ve 3.4±1.1 µmol/mmol kreatinin konsantrasyonlarında olduğunu bulmuşlardır (Tsikas ve ark 2003). Çalışmamızdaki farklılıklar, Martens-Lobenhoffer, Bode-Böger, Tsikas ve arkadaşlarının mevcut çalışmalarında kullanılan cihaz markaları, modelleri ve metodolojilerindeki farklılıklarla ilgili olduğu düşünülmektedir.

Schwedhelm ve arkadaşları (2005)' nın yaptıkları çalışmada; sağlıklı gönüllülerden alınan plazma örneklerinde ADMA'yı L-arjinin, ADMA ve SDMA'nın ortalama (SD) konsantrasyonları sırasıyla 65.6 (23.4), 0.55 (0.14) ve 0.69 (0.23) µmol / L bulmuşlardır(Schwedhelm ve ark 2005). Kirchherr ve Kühn-Velten (2005)' in HPLC-Tandem Kütle Spektrometrik yöntem ile sağlıklı gönüllülerde yapmış olduğu çalışmada; plazma konsantrasyonlarının ADMA 327-606 nmol/L SDMA 424-946 nmol/L aralığında olduğunu ve (%95 güven aralığı) ortalama ADMA 455 (437–463) nmol/L SDMA 678 (641–715) nmol/L söylemişlerdir (Kirchherr ve Kühn-Velten 2005). Martens-Lobenhoffer ve arkadaşları (2004)' nın yaptıkları çalışmada; plazma konsantrasyon değerleri sağlıklı kontrollerde ARG, ADMA ve SDMA için Tablo 3.3 değerler verilmiş olup, ADMA için normal aralık 0.225 ila 0.485 µM arasında olduğunu söylemişler ayrıca Son dönem KBY hastalarında ise değerler ARG 48.1 ± 18.5 µM, ADMA 0.673 ± 0.134 µM ve SDMA 3.160 ± 0.911 µM olduğunu söylemişlerdir. Kontrol grubundan sırasıyla yaklaşık 1.9 ve 6.9 kat daha yüksek konsantrasyonlar sahip olduğunu söylemişlerdir ($p< 0.001$) (Martens-Lobenhoffer ve ark 2004). Albsmeier ve arkadaşları (2004)2 nın yaptıkları çalışmada; Plazma örneklerinde ADMA ölçümü, 0.48 ila 0.69 µM (n = 10) arasında değişen ortalama 0.600 ± 0.076 konsantrasyonunu bulmuşlardır (Albsmeier ve ark 2004). Huang ve arkadaşları (2004)' nın yaptıkları çalışmada; Sağlıklı gönüllülerin plazmasındaki ortalama±SD konsantrasyonları ARG için 72.64±17.31 µmol L^{-1}, MMA için 0,35±0,14 µmol L^{-1}, ADMA için 0,48±0,07 µmol L^{-1} ve SDMA için 0.41±0.05 µmol L^{-1} olarak bulmuşlardır (Huang ve ark 2004). Eryavuz Onmaz ve arkadaşları (2021)'

nın yaptıkları çalışmada; KBY olan hastalarda plazma konsantrasyonları ADMA için 1.06(0.43–3.36) µM, SDMA için 2.51(0.25–9.37) µM, L-NMMA için 0.12(0.02–0.78) µM, Arjinin için 94.95(39.50–326.02) µM, Ornitin için 43.21 (7.45–220.09) µM, Homoarginin için 3.03(0.63–18.94) µM ve Sitrülin için 94.85 (39.50–326.03) µM bulmuşlardır (Eryavuz Onmaz ve ark 2021). Vishwanathan ve arkadaşları (2000)' nın yaptıkları çalışmada; Plazmadaki ARG, ADMA, SDMA ve MMA konsantrasyonları kalibrasyon eğrileri kullanılarak hesaplamışlar ve Tablo 3.3 de bu değerler gösterilmektedir (Vishwanathan ve ark 2000). Referans aralığı tablosu incelendiğinde çalışmamızda elde edilen veriler sağlıklı gruplardan alınan idrar örneklerinden yapılmış olduğu plazmada yapılan çalışmada değerlerini etkileyen farklı faktörler olduğu için çıkan sonuçlarda farklı olmakla birlikte sonuçlarımız örtüşmemektedir.

Emrich ve arkadaşları (2018)' nın KBH (KDIGO) evresi G2-G4 kategorilerisinde olan hastalarda yaptıkları çalışmada temel plazma seviyelerini sıvı kromatografisi - tandem kütle spektrometrisi ölçmüşlerdir. Sonuç olarak ortalama plazma ADMA için 0.49 (0.44; 0.55) µmol/l, ortalama plazma SDMA için 0.72 (0.59; 0.98) µmol/l, ortalama plazma asimetrik Nα-asetildimetilarginin (AcADMA) için 1.24 (0.74; 2.16) nmol/l, ortalama plazma simetrik Nα-asetildimetilarginin (AcSDMA) için 8.42 (3.60; 19.12) nmol/l ve ortalama LNMMA için 52.29 (46.84; 58.74) nmol/l olduğunu söylemişlerdir. Kielstein ve arkadaşları (2002)' nın yaptıkları çalışmada plazma ADMA düzeyleri normal böbrek fonksiyonu olan hastalarda (n = 16; ADMA 4.0 ± 0.7 µmol/L), orta derecede böbrek yetmezliği olan hastalarda (n = 15; 3.8 ± 0.6 µmol/L) ve özellikle ileri böbrek yetmezliği olan hastalarda (n = 13; 4,7 ± 1,2 µmol/L) anlamlı seviyede yüksek ayrıca yeni başlayan primer böbrek hastalığı olanlarda da belirgin şekilde artığını gözlemlemişlerdir. Çalışmamız patolojik düzeylerinin belirlenmesi, uygulama kılavuzlar için bir zemin ve bu hastaların klinik yönetimini etkileyebileceğini ayrıca gereksiz tedavilerin önüne geçebileceğini düşünmekteyiz. Bu bağlamda hastalar için riski hem de sağlık harcamalarını azaltacağını düşünmekteyiz. Ayrıca, referans aralığı çalışmamız tedaviye yanıtı izlemek ve özellikle böbrek ve koroner hastalarında teşhis koymada yardımcı olmak için yeni araştırmaları teşvik edeceğini düşünmekteyiz.

Martens-Lobenhoffer ve Bode-Böger (2003)' in yaptıkları çalışmada; Sağlıklı gönüllülerden idrar konsantrasyonları ARG, ADMA, SDMA (Tablo 3.3) ve CIT için

3.99±4.3 μM bulmuşlar. Ayrıca sağlıklı deneklerde (n = 15), serumda ARG, ADMA, SDMA (Tablo 3.3.) ve CIT için 36.3±10.2 μM konsantrasyon değerleri ve Şiddetli böbrek yetmezliği olan (*n* = 10) olgularda, serum konsantrasyonları ARG için 123±78 μM, ADMA için 1.10±0.57 μM, SDMA için 1.53±0.75 μM ve CIT için 38.2±29.7 μM bulmuşlardır (Martens-Lobenhoffer ve Bode-Böger 2003). Huang ve arkadaşları (2003)' nın yaptıkları çalışmada; Sağlıklı gönüllüler de 24 saat başına idrarda konsantrasyonları (ortalama ± S.D.) ARG için 113,62 ± 29,96 μmol, ADMA için 56,28 ± 18,31 μmol, SDMA için 37,25 ± 12,92 μmol olduğunu söylemişlerdir (Huang ve ark 2003). Martens-Lobenhoffer ve arkadaşları (2014)' nın sağlıklı gönüllerde (7 kişi) idrar ve plazmada LC-MS / MS yöntemi ile yapmış oldukları çalışmada idrarda ADMA konsantrasyonu için 45.8 ± 14.9 μmol / L veya 3.50 ± 0.67 μmol / mmol kreatinin, Ac-ADMA konsantrasyonu için 152.7 ± 76.7 nmol / L, plazmada ise ADMA konsantrasyonu için 0.446±0.067 μmol/L, Ac-ADMA konsantrasyonu için 0.643±0.454 nmol/L olduğunu söylemişlerdir (Martens-Lobenhoffer ve ark 2014). Literatürde bulunan metilarjinin ve türevlerinin analizi için yapılan çalışmalara bakıldığında karşılaştırılabilir sonuçlar görülmekle birlikte alt ve üst sınırdaki değişiklikler, mevcut çalışmaların kontrol grup sayısının az, büyük fark yüzünden çıktığı düşünülmektedir.

Akyol ve arkadaşları (2015)' nın yaptıkları çalışmada; ADMA'nın böbreklerde doku üzerine etkilerini araştırtmak için Sprague Dawley cinsi rat kullanmışlar. Sonuç olarak kanda ADMA seviyesinin yüksek olması renal hasar için bir sebep olduğunu göstermişlerdir. Tripepi ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmada; uzun takip süreci (13 yıl) 225 hemodiyaliz hastasından oluşan bir kohortta ADMA ile inflamatuvar biyobelirteçler (C-reaktif protein ve IL-6) arasında etkileşimi, ölüm ve CV olaylarının belirleyicileri olarak araştırmışlardır. Sonuç olarak inflamasyonun SDBY'de artmış ADMA seviyeleri ile bağlantılı olarak mortalite ve CV olay riskini arttırdığını söylemişlerdir. Busch ve arkadaşları (2006)2 nın yaptıkları çalışmada SDMA'nın ortalama serum düzeyleri tüm gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak artığını, ADMA sadece HD ve RTR'de artığını gözlemlemişlerdir. Betz ve arkadaşları (2013)' nın ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada Şiddetli iskemik akut böbrek hasarından 24 saat sonra serum L-arjinin düzeylerinin ve NOS, SDMA ve ADMA'nın inhibitör türevlerinin artığını, böbrek dokusundaki L-arjinin azaldığını ilk kez söylemişlerdir. Eiselt ve arkadaşları (2014)' nın yaptıkları çalışmada bir yıl

içerisinde nefroloji polikliniğine başvuran 181 hastada ADMA'in ve KBH'nın ilerlemesi araştırmışlardır. Sonuç olarak kontrollerle karşılaştırıldığında, hastalar ADMA, oksidatif stres belirteçleri ve homosistein düzeylerinde anlamlı derecede yüksek (Eiselt ve ark 2014) olduğunu söylemişlerdir. Tomlinson ve arkadaşları (2015)' nın yapmış oldukları çalışmada azaltılmış renal metilarginin metabolizması ilerleyen böbrek hasarına karşı korur konusunda inceleme yapmışlar. Bu çalışma, yeni bir transgenik fare suşunu iki farklı böbrek hasarı formuna maruz kalarak ve iki insan kohortunun böbrek biyopsisini ve sonuç verilerini inceleyerek böbrek dokusuyla sınır yapılmış. Sonuç olarak, tübüler ADMA metabolizmasının ilerleyici böbrek fonksiyon düşüşüne karşı koruduğunu söylemişlerdir (Tomlinson ve ark 2015). Zhang ve arkadaşları (2020)' nın yapmış oldukları çalışmada serum ADMA lupus nefriti (LN) olan hastalarda 46.87 ng/mL, primer glomerüler hastalık için 63.33 ng/mL ve sağlıklı kontrol grubu için 19.28 ng/mL bulmuşlar. Sonuç olarak sağlıklı deneklere göre LN ve primer glomerüler hastalık olan hastalarda önemli ölçüde daha yüksek plazma ADMA seviyeleri bildirmişlerdir (Zhang ve ark 2020). Literatürde metil arjinin ve türevlerinin değerlerinin bazı hastalıklarla ilişkisinin araştırıldığı pek çok çalışma bulunmaktadır. Referans aralık çalışmamız klinisyenlere ışık tutabileceği, ek olarak Tablo 3.1. ve 3.2 deki verilen değerler daha sonraki çalışmalara kaynak olabileceğini düşünüyoruz.

MacAllister ve arkadaşları (1996)2 nın yapmış oldukları çalışmada Kontrollere kıyasla üremik hastalarda plazma ADMA konsantrasyonlarında (3 kat) belirgin bir artış gözlemlemişlerdir (MacAllister ve ark 1996). Fleck ve arkadaşları (2003)' nın yaptıkları çalışmada ADMA konsantrasyonları hasta grubunda sadece %40 civarında arttığını, SDMA'daki artış %250 olarak gerçekleştiğini bu bağlamda SDMA'nın azalmış böbrek fonksiyonunun hassas bir belirteci olduğunu (Fleck ve ark 2003) söylemişlerdir. Çağlar ve ark. (2006)' nın yapmış oldukları çalışmada, normal glomerüler filtrasyon hızına sahip proteinürisi olan ve sağlıklı gönüllüler arasında yapılmış olup, ADMA için kontrollerde 1.08±0.13 μmol/l, hastalarda 1.92±0.65 μmol/l ve SDMA için kontrollerde 0.90±0.23 μmol/l, hastalarda 1.81±0.69 μmol/l bulmuşlar. Sonuç olarak serum ADMA, SDMA, indeksleri hastalarda sağlıklı kontrol deneklerine göre anlamlı olarak daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir (Caglar ve ark 2006). Lu ve arkadaşları (2011)' nın yapmış oldukları çalışmada Proteinürisi olan hastalarda plazma ADMA düzeylerinin, olmayanlara göre anlamlı derecede daha

yüksek olduğunu ve plazma ADMA düzeylerinin eGFR ile anlamlı bir ilişkisi olduğunu bulmuşlardır(Lu ve ark 2011). Martens-Lobenhoffer ve Bode-Boger (2015)' in sağlıklı gönüllerde (10 kişi) idrar ve plazmada LC-MS / MS yöntemi ile yapmış oldukları çalışmada idrarda SDMA için 43.4 μM, AcSDMA için 558 nM, plazmada ise SDMA için 0.444 μM, AcSDMA için 3.51 nM olduğunu söylemişlerdir. Ac-SDMA'nın tek başına böbrek fonksiyonunun umut verici bir belirteci olabileceğini söylemişlerdir (Martens-Lobenhoffer ve Bode-Boger 2015). Referans aralığı çalışmalarının amacı yeni belirlenen değerleri güncel tanı ve tedavi protokollerine bilgi vermek için kullanılmasıdır. Bu kapsamda çalışmamız için iyi bir örnek olabileceğini düşünüyoruz.

5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Polikliniklerine başvuran hastalardan idrar istemi yapılan ve biyokimya laboratuvarında tam idrar analizi yapılmış çöpe atılacak numuneler içerisinden rasgele herhangi bir patoloji saptanmamış 132 idrar numunesi çalışma amacıyla kullanılmıştır. Dolayısı ile hastalardan fazladan ekstra bir idrar numunesi alınmamıştır.

- Birçok yayın, metil arjinin türevlerinden biri olan ADMA'nın yalnızca hastalığı tahmin etmek için mükemmel bir araç değil, aynı zamanda potansiyel yeni bir terapötik hedef olduğunu göstermektedir. Araştırmamızın yeni araştırmaları teşvik edeceğine inanmaktayız.
- Sonuç olarak litaratürde yaptığımız çalışmaya benzer birçok çalışma bulunmasına rağmen (Tablo 3.3.), Metil arjinin ve türevlerinin idrarda referans aralığı belirlemede geniş kapsamlı ilk çalışmadır. Bu bağlamda amacımız literatüre yeni bir bilgiler kazandırmaktır. Konuyla ilgili örneklerin artırılmasının yeni ve daha detaylı çalışmalarla daha anlamlı ve değerli sonuçlara ulaşabileceğini düşünülmektedir.
- Çalışmamız patolojik düzeylerinin belirlenmesi, uygulama kılavuzlar için bir zemin ve bu hastaların klinik yönetimini etkileyebileceğini ayrıca gereksiz tedavilerin önüne geçebileceğini düşünmekteyiz. Bu bağlamda hastalar için riski hem de sağlık harcamalarını azaltacağını düşünmekteyiz. Ayrıca, referans aralığı çalışmamız tedaviye yanıtı izlemek ve özellikle böbrek ve koroner hastalarında teşhis koymada yardımcı olmak için yeni araştırmaları teşvik edeceğini düşünmekteyiz.

6.KAYNAKLAR

Akyol S, Alıcı Ö, Altuntaş A, Pehlivan S, Kurşunlu SF, Alaçam H, 2015. Asimetrik Dimetil Arjinin (ADMA) Ratlarda Akut Tübüler Nekroza Neden Olur.

Albsmeier J, Schwedhelm E, Schulze F, Kastner M, Böger RH, 2004. Determination of NG,NG-dimethyl-l-arginine, an endogenous NO synthase inhibitor, by gas chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography B, 809, 1, 59-65.

Alcelik A, Karacay S, Alcelik A, 2012. Effects of Cardiometabolic Risk Parameters on Asymmetric Dimethylarginine. The Medical Journal of Okmeydani Training and Research Hospital, 28, 2, 59-64.

Aldámiz-Echevarría L, Andrade F, 2012. Asymmetric dimethylarginine, endothelial dysfunction and renal disease. Int J Mol Sci, 13, 9, 11288-311.

Aletta JM, Hu JC, 2008. Protein arginine methylation in health and disease. Biotechnology annual review, 14, 203-24.

ALTINOVA AE, Arslan MJMMJ, 2009. ENDOKRİN HASTALIKLARDA ASİMETRİK DİMETİLARJİNİN (ADMA). 22, 1, 80-4.

Altunören O, AYDIN G, Güngör ÖJBF, (2017). Böbrek anatomisi, sy**:** 1-3.

Aneman A, Backman V, Snygg J, von Bothmer C, Fändriks L, Pettersson A, 1994. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase during graded hemorrhagic shock. Circulatory shock, 44, 3, 111-4.

Arlt S, Schulze F, Eichenlaub M, Maas R, Lehmbeck JT, Schwedhelm E, Jahn H, Böger RH, 2008. Asymmetrical dimethylarginine is increased in plasma and decreased in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. Dementia and geriatric cognitive disorders, 26, 1, 58-64.

Aydın M, Armutçu F, YİĞİTOĞLU M, 2013. Asimetrik Dimetil Arjinin (ADMA) Metabolizması. International Journal of Basic and Clinical Medicine, 1, 1, 61-6.

Bae SW, Stühlinger MC, Yoo HS, Yu KH, Park HK, Choi BY, Lee YS, Pachinger O, Choi YH, Lee SH, Park JE, 2005. Plasma asymmetric dimethylarginine concentrations in newly diagnosed patients with acute myocardial infarction or unstable angina pectoris during two weeks of medical treatment. The American journal of cardiology, 95, 6, 729-33.

Bakanlığı TCME, (2013). Kimya Teknolojisi Kromatografik Analizler. Ankara, T.C. Milli Eğitim Bakanlığı. 06 Ağustos 2022.

Barbul AJJJPEN, 1986. Arginine: biochemistry, physiology, and therapeutic implications. 10, 2, 227-38.

Barış N, Turgan N, Ersöz BJTKBD, 2004. Argininin tıpsal biyokimyadaki önemi. 2, 2, 83-90.

Bassenge E, 1992. Clinical relevance of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). British journal of clinical pharmacology, 34 Suppl 1, Suppl 1, 37s-42s.

Baylis C, 2006. Arginine, arginine analogs and nitric oxide production in chronic kidney disease. Nature clinical practice. Nephrology, 2, 4, 209-20.

Beaumier L, Castillo L, Yu YM, Ajami AM, Young VR, 1996. Arginine: new and exciting developments for an "old" amino acid. Biomedical and environmental sciences : BES, 9, 2-3, 296-315.

Betz B, Möller-Ehrlich K, Kress T, Kniepert J, Schwedhelm E, Böger RH, Wanner C, Sauvant C, Schneider R, 2013. Increased symmetrical dimethylarginine in ischemic acute kidney injury as a causative factor of renal L-arginine deficiency. Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine, 162, 2, 67-76.

Bilgiç Ö, Altınyazar HC, Baran H, Ünlü A, 2015. Serum homocysteine, asymmetric dimethyl arginine (ADMA) and other arginine-NO pathway metabolite levels in patients with psoriasis. Archives of dermatological research, 307, 5, 439-44.

Blum A, Cannon RO, 3rd, 2001. l-Arginine for the prevention and treatment of coronary artery disease. Coronary artery disease, 12, 7, 535-9.

Bode-Böger SM, Scalera F, Ignarro LJ, 2007. The L-arginine paradox: Importance of the L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. Pharmacology & therapeutics, 114, 3, 295-306.

Bonner A, Caltabiano M, Berlund LJN, sciences h, 2013. Quality of life, fatigue, and activity in Australians with chronic kidney disease: a longitudinal study. 15, 3, 360-7.

Böger RH, 2004. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor. J Nutr, 134, 10 Suppl, 2842S-7S; discussion 53S.

Böger RH, 2006. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk marker in cardiovascular medicine and beyond. Annals of medicine, 38, 2, 126-36.

Brosnan ME, Brosnan JT, 2004. Renal arginine metabolism. J Nutr, 134, 10 Suppl, 2791S-5S; discussion 6S-7S.

Bulau P, Zakrzewicz D, Kitowska K, Leiper J, Gunther A, Grimminger F, Eickelberg O, 2007. Analysis of methylarginine metabolism in the cardiovascular system identifies the lung as a major source of ADMA. American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology, 292, 1, L18-24.

Busch M, Fleck C, Wolf G, Stein G, 2006. Asymmetrical (ADMA) and symmetrical dimethylarginine (SDMA) as potential risk factors for cardiovascular and renal outcome in chronic kidney disease - possible candidates for paradoxical epidemiology? Amino acids, 30, 3, 225-32.

Caglar K, Yilmaz MI, Sonmez A, Cakir E, Kaya A, Acikel C, Eyileten T, Yenicesu M, Oguz Y, Bilgi C, Oktenli C, Vural A, Zoccali C, 2006. ADMA, proteinuria, and insulin resistance in non-diabetic stage I chronic kidney disease. Kidney international, 70, 4, 781-7.

Carcillo JA, 2003. Does arginine become a "near" essential amino acid during sepsis? Critical care medicine, 31, 2, 657-9.

Centre for Clinical Practice at N, 2013. National Institute for Health and Clinical Excellence: Guidance. In: Hyperphosphataemia in Chronic Kidney Disease: Management of Hyperphosphataemia in Patients with Stage 4 or 5 Chronic Kidney Disease. Eds. Manchester: National Institute for Health and Clinical Excellence (UK)

Copyright © National Institute for Health and Clinical Excellence, 2013., p.

Chan LN, 2004. Nutritional support in acute renal failure. Current opinion in clinical nutrition and metabolic care, 7, 2, 207-12.

Chan NN, Chan JC, 2002. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a potential link between endothelial dysfunction and cardiovascular diseases in insulin resistance syndrome? Diabetologia, 45, 12, 1609-16.

Chen J, Wollman Y, Chernichovsky T, Iaina A, Sofer M, Matzkin H, 1999. Effect of oral administration of high-dose nitric oxide donor L-arginine in men with organic erectile dysfunction: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled study. BJU international, 83, 3, 269-73.

Cherla G, Jaimes EA, 2004. Role of L-arginine in the pathogenesis and treatment of renal disease. J Nutr, 134, 10 Suppl, 2801S-6S; discussion 18S-19S.

Cillari E, Arcoleo F, Dieli M, D'Agostino R, Gromo G, Leoni F, Milano S, 1994. The macrophage-activating tetrapeptide tuftsin induces nitric oxide synthesis and stimulates murine macrophages to kill Leishmania parasites in vitro. Infection and immunity, 62, 6, 2649-52.

Clarke S, 1993. Protein methylation. Current opinion in cell biology, 5, 6, 977-83.

Cooke JP, 2000. Does ADMA cause endothelial dysfunction? Arterioscler Thromb Vasc Biol, 20, 9, 2032-7.

Coşkun T, 2011. İmmünonütrisyondan farmakonütrisyona. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi, 54, 164-81.

Cynober L, 2003. Immune-enhancing diets for stressed patients with a special emphasis on arginine content: analysis of the analysis. Current opinion in clinical nutrition and metabolic care, 6, 2, 189-93.

Dayal S, Rodionov RN, Arning E, Bottiglieri T, Kimoto M, Murry DJ, Cooke JP, Faraci FM, Lentz SR, 2008. Tissue-specific downregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase in hyperhomocysteinemia. American journal of physiology. Heart and circulatory physiology, 295, 2, H816-25.

Devés R, Boyd CA, 1998. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. Physiological reviews, 78, 2, 487-545.

Dioguardi FS, 2011. To give or not to give? Lessons from the arginine paradox. Journal of nutrigenetics and nutrigenomics, 4, 2, 90-8.

Dobrian ADJKi, 2012. ADMA and NOS regulation in chronic renal disease: beyond the old rivalry for l-arginine. 81, 8, 722-4.

Eid HM, Arnesen H, Hjerkinn EM, Lyberg T, Seljeflot I, 2004. Relationship between obesity, smoking, and the endogenous nitric oxide synthase inhibitor, asymmetric dimethylarginine. Metabolism: clinical and experimental, 53, 12, 1574-9.

Eiselt J, Rajdl D, Racek J, Vostrý M, Rulcová K, Wirth J, 2014. Asymmetric dimethylarginine and progression of chronic kidney disease: a one-year follow-up study. Kidney & blood pressure research, 39, 1, 50-7.

Emrich IE, Zawada AM, Martens-Lobenhoffer J, Fliser D, Wagenpfeil S, Heine GH, Bode-Böger SM, 2018. Symmetric dimethylarginine (SDMA) outperforms asymmetric dimethylarginine (ADMA) and other methylarginines as predictor of renal and cardiovascular outcome in non-dialysis chronic kidney disease. Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society, 107, 3, 201-13.

Erbil MK, Kurt YG, Yaman H, Çakır E, Akgül EÖ, Çaycı T, 2012. Asimetrik dimetilarjininin metabolizması ve klinik önemi. Turkish Journal of Biochemistry/Turk Biyokimya Dergisi, 37, 1.

Erdem S, Ünlü A, 2009. Asimetrik dimetilarjinin ve klinik önemi. Selçuk Tıp Dergisi, 25, 2, 107-15.

Eryavuz Onmaz D, Abusoglu S, Yaglioglu H, Abusoglu G, Unlu A, 2021. Developing a robust, fast and reliable measurement method for the analysis of methylarginine derivatives and related metabolites. Journal of mass spectrometry and advances in the clinical lab, 19, 34-45.

Fickling SA, Holden DP, Cartwright JE, Nussey SS, Vallance P, Whitley GS, 1999. Regulation of macrophage nitric oxide synthesis by endothelial cells: a role for NG,NG-dimethylarginine. Acta physiologica Scandinavica, 167, 2, 145-50.

Field CJ, Johnson I, Pratt VC, 2000. Glutamine and arginine: immunonutrients for improved health. Medicine and science in sports and exercise, 32, 7 Suppl, S377-88.

Fleck C, Schweitzer F, Karge E, Busch M, Stein G, 2003. Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in patients with chronic kidney diseases. Clin Chim Acta, 336, 1-2, 1-12.

Foye W, (1995). Lemke TL and Williams DA: Principles of Medicinal Chemistry, Williams & Wilkins, Baltimore.

Fulton MD, Brown T, Zheng YG, 2019. The Biological Axis of Protein Arginine Methylation and Asymmetric Dimethylarginine. Int J Mol Sci, 20, 13.

Gambardella J, Khondkar W, Morelli MB, Wang X, Santulli G, Trimarco V, 2020. Arginine and Endothelial Function. Biomedicines, 8, 8.

Garibotto G, Pastorino L, Dertenois LJK, Massry's Nutritional Management of Renal Disease ebKJ, Massry SG. Philadelphia, PA: Lipincott, Williams, Wilkens, 2004. Protein and amino acid metabolism in renal disease and renal failure. 1-23.

Garibotto G, Sofia A, Saffioti S, Bonanni A, Mannucci I, Verzola D, 2010. Amino acid and protein metabolism in the human kidney and in patients with chronic kidney disease. Clinical Nutrition, 29, 4, 424-33.

Gayatri S, Bedford MT, 2014. Readers of histone methylarginine marks. Biochimica et biophysica acta, 1839, 8, 702-10.

Gold ME, Bush PA, Ignarro LJ, 1989. Depletion of arterial L-arginine causes reversible tolerance to endothelium-dependent relaxation. Biochemical and biophysical research communications, 164, 2, 714-21.

Goldberg AL, St John AC, 1976. Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells: Part 2. Annual review of biochemistry, 45, 747-803.

Gorenflo M, Zheng C, Werle E, Fiehn W, Ulmer HEJJocp, 2001. Plasma levels of asymmetrical dimethyl-L-arginine in patients with congenital heart disease and pulmonary hypertension. 37, 4, 489-92.

Green SJ, Mellouk S, Hoffman SL, Meltzer MS, Nacy CA, 1990. Cellular mechanisms of nonspecific immunity to intracellular infection: cytokine-induced synthesis of toxic nitrogen oxides from L-arginine by macrophages and hepatocytes. Immunology letters, 25, 1-3, 15-9.

Grillo MA, Colombatto S, 2004. Arginine revisited: minireview article. Amino Acids, 26, 4, 345-51.

Gür A, Keçecioğlu SJBvDD, 1976. Klinikte Sık Görülen Böbrek Hastalıkları Diyet Tedavileri I. Akut Glomerulonefrit. 5, 1, 12-22.

Hewson S, Clarke JT, Cederbaum S, 2003. Prenatal diagnosis for arginase deficiency: a case study. Journal of inherited metabolic disease, 26, 6, 607-10.

Hilal Y, Feray G, 2019. Böbrek Hastalıkları ve Protein Metabolizması. Beslenme ve Diyet Dergisi, 46, 0.

Hodis HN, Mack WJ, LaBree L, Selzer RH, Liu CR, Liu CH, Azen SP, 1998. The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events. Annals of internal medicine, 128, 4, 262-9.

Holden DP, Fickling SA, Whitley GSJ, Nussey SS, 1998. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine, a natural inhibitor of nitric oxide synthase, in normal pregnancy and preeclampsia. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 178, 3, 551-6.

Holven KB, Haugstad TS, Holm T, Aukrust P, Ose L, Nenseter MS, 2003. Folic acid treatment reduces elevated plasma levels of asymmetric dimethylarginine in hyperhomocysteinaemic subjects. The British journal of nutrition, 89, 3, 359-63.

Huang L-F, Guo F-Q, Liang Y-Z, Hu Q-N, Cheng B-M, 2003. Rapid simultaneous determination of arginine and methylated arginines in human urine by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. Analytica Chimica Acta, 487, 2, 145-53.

Huang L-F, Guo F-Q, Liang Y-Z, Li B-Y, Cheng B-M, 2004. Simultaneous determination of L-arginine and its mono-and dimethylated metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. Analytical and bioanalytical chemistry, 380, 4, 643-9.

Jakubowski HJJoBC, 1997. Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures: possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels. 272, 3, 1935-42.

Kajimoto H, Kai H, Aoki H, Yasuoka S, Anegawa T, Aoki Y, Ueda S, Okuda S, Imaizumi TJKi, 2012. Inhibition of eNOS phosphorylation mediates endothelial dysfunction in renal failure: new effect of asymmetric dimethylarginine. 81, 8, 762-8.

Kakimoto Y, Akazawa S, 1970. Isolation and identification of NG, NG-and NG, N'G-dimethylarginine, Nε-mono-, di-, and trimethyllysine, and glucosylgalactosyl-and galactosyl-δ-hydroxylysine from human urine. Journal of Biological Chemistry, 245, 21, 5751-8.

Kang ES, Cates TB, Harper DN, Chiang TM, Myers LK, Acchiardo SR, Kimoto M, 2001. An enzyme hydrolyzing methylated inhibitors of nitric oxide synthase is present in circulating human red blood cells. Free radical research, 35, 6, 693-707.

Kaye DM, Ahlers BA, Autelitano DJ, Chin-Dusting JP, 2000. In vivo and in vitro evidence for impaired arginine transport in human heart failure. Circulation, 102, 22, 2707-12.

Khalaf D, Krüger M, Wehland M, Infanger M, Grimm D, 2019. The Effects of Oral l-Arginine and l-Citrulline Supplementation on Blood Pressure. Nutrients, 11, 7.

Kielstein JT, Bode-Böger SM, Hesse G, Martens-Lobenhoffer J, Takacs A, Fliser D, Hoeper MM, 2005. Asymmetrical dimethylarginine in idiopathic pulmonary arterial hypertension. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 25, 7, 1414-8.

Kielstein JT, Böger RH, Bode-Böger SM, Frölich JC, Haller H, Ritz E, Fliser D, 2002. Marked increase of asymmetric dimethylarginine in patients with incipient primary chronic renal disease. J Am Soc Nephrol, 13, 1, 170-6.

Kielstein JT, Böger RH, Bode-Böger SM, Schäffer J, Barbey M, Koch KM, Frölich JC, 1999. Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: relationship to treatment method and atherosclerotic disease. J Am Soc Nephrol, 10, 3, 594-600.

Kielstein JT, Simmel S, Bode-Böger SM, Roth HJ, Schmidt-Gayk H, Haller H, Fliser D, 2004. Subpressor dose asymmetric dimethylarginine modulates renal function in humans through nitric oxide synthase inhibition. Kidney & blood pressure research, 27, 3, 143-7.

Kielstein JT, Zoccali C, 2005. Asymmetric dimethylarginine: a cardiovascular risk factor and a uremic toxin coming of age? American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation, 46, 2, 186-202.

Kimato M, Tsuji H, Ogawa T, Sasaoka K, 1993. Detection of NG, NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase in the nitric oxide-generating systems of rats using monoclonal antibody. Archives of Biochemistry and Biophysics, 300, 2, 657-62.

Kirchherr H, Kühn-Velten WN, 2005. HPLC–Tandem Mass Spectrometric Method for Rapid Quantification of Dimethylarginines in Human Plasma. Clinical chemistry, 51, 1, 249-52.

Kirk SJ, Hurson M, Regan MC, Holt DR, Wasserkrug HL, Barbul A, 1993. Arginine stimulates wound healing and immune function in elderly human beings. Surgery, 114, 2, 155-9; discussion 60.

Knipp M, Charnock JM, Garner CD, Vasák M, 2001. Structural and functional characterization of the Zn(II) site in dimethylargininase-1 (DDAH-1) from bovine brain. Zn(II) release activates DDAH-1. The Journal of biological chemistry, 276, 44, 40449-56.

Konukoglu D, Uzun H, Firtina S, Cigdem Arica P, Kocael A, Taskin M, 2007. Plasma adhesion and inflammation markers: asymmetrical dimethyl-L-arginine and secretory phospholipase A2 concentrations before and after laparoscopic gastric banding in morbidly obese patients. Obesity surgery, 17, 5, 672-8.

Kopple JDJTJon, 2007. Phenylalanine and tyrosine metabolism in chronic kidney failure. 137, 6, 1586S-90S.

Korting GE, Smith SD, Wheeler MA, Weiss RM, Foster HE, Jr., 1999. A randomized double-blind trial of oral L-arginine for treatment of interstitial cystitis. The Journal of urology, 161, 2, 558-65.

Kovesdy CP, Kalantar-Zadeh KJN, 2009. Biomarkers of clinical outcomes in advanced chronic kidney disease. 14, 4, 408-15.

Krempl TK, Maas R, Sydow K, Meinertz T, Böger RH, Kähler JJEhj, 2005. Elevation of asymmetric dimethylarginine in patients with unstable angina and recurrent cardiovascular events. 26, 18, 1846-51.

Leiper JM, 2005. The DDAH-ADMA-NOS pathway. Therapeutic drug monitoring, 27, 6, 744-6.

Leiper JM, Santa Maria J, Chubb A, MacAllister RJ, Charles IG, Whitley GS, Vallance P, 1999. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue

distributions and homology with microbial arginine deiminases. The Biochemical journal, 343 Pt 1, Pt 1, 209-14.

Lentz SR, Rodionov RN, Dayal SJAs, 2003. Hyperhomocysteinemia, endothelial dysfunction, and cardiovascular risk: the potential role of ADMA. 4, 4, 61-5.

Liu G, Wu X, Jia G, Chen X, Zhao H, Wang J, Wu C, Cai J, 2016. Arginine: New Insights into Growth Performance and Urinary Metabolomic Profiles of Rats. Molecules, 21, 9.

Lluch P, Torondel B, Medina P, Segarra G, Del Olmo JA, Serra MA, Rodrigo JM, 2004. Plasma concentrations of nitric oxide and asymmetric dimethylarginine in human alcoholic cirrhosis. Journal of hepatology, 41, 1, 55-9.

Loscalzo J, 2004. L-Arginine and Atherothrombosis. The Journal of Nutrition, 134, 10, 2798S-800S.

Lu TM, Chung MY, Lin CC, Hsu CP, Lin SJ, 2011. Asymmetric dimethylarginine and clinical outcomes in chronic kidney disease. Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN, 6, 7, 1566-72.

Lu TM, Ding YA, Lin SJ, Lee WS, Tai HC, 2003. Plasma levels of asymmetrical dimethylarginine and adverse cardiovascular events after percutaneous coronary intervention. European heart journal, 24, 21, 1912-9.

MacAllister RJ, Rambausek MH, Vallance P, Williams D, Hoffmann KH, Ritz E, 1996. Concentration of dimethyl-L-arginine in the plasma of patients with end-stage renal failure. Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association, 11, 12, 2449-52.

Mangoni AA, Rodionov RN, McEvoy M, Zinellu A, Carru C, Sotgia S, 2019. New horizons in arginine metabolism, ageing and chronic disease states. Age Ageing, 48, 6, 776-82.

Marini JC, Didelija IC, Fiorotto ML, 2014. Extrarenal citrulline disposal in mice with impaired renal function. American journal of physiology. Renal physiology, 307, 6, F660-5.

Martens-Lobenhoffer J, Bode-Boger SM, 2015. Amino acid N-acetylation: metabolic elimination of symmetric dimethylarginine as symmetric N(alpha)-acetyldimethylarginine, determined in human plasma and urine by LC-MS/MS. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 975, 59-64.

Martens-Lobenhoffer J, Bode-Böger SM, 2003. Simultaneous detection of arginine, asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine and citrulline in human plasma and urine applying liquid chromatography–mass spectrometry with very straightforward sample preparation. Journal of Chromatography B, 798, 2, 231-9.

Martens-Lobenhoffer J, Bode-Böger SM, 2007. Chromatographic-mass spectrometric methods for the quantification of L-arginine and its methylated metabolites in biological fluids. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 851, 1-2, 30-41.

Martens-Lobenhoffer J, Bode-Böger SM, 2006. Fast and Efficient Determination of Arginine, Symmetric Dimethylarginine, and Asymmetric Dimethylarginine in Biological Fluids by Hydrophilic-Interaction Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometry. Clinical chemistry, 52, 3, 488-93.

Martens-Lobenhoffer J, Krug O, Bode-Böger SM, 2004. Determination of arginine and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in human plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with the isotope dilution technique. Journal of Mass Spectrometry, 39, 11, 1287-94.

Martens-Lobenhoffer J, Rodionov RN, Bode-Böger SM, 2014. Determination of asymmetric Nα-acetyldimethylarginine in humans: a phase II metabolite of asymmetric dimethylarginine. Analytical biochemistry, 452, 25-30.

Maxwell AJ, Cooke JPJCoin, hypertension, 1998. Cardiovascular effects of L-arginine. 7, 1, 63-70.

McBride AE, Silver PA, 2001. State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. Cell, 106, 1, 5-8.

McCarty MF, 2004. Vascular endothelium is the organ chiefly responsible for the catabolism of plasma asymmetric dimethylarginine--an explanation for the elevation of plasma ADMA in disorders characterized by endothelial dysfunction. Medical hypotheses, 63, 4, 699-708.

Millatt LJ, Whitley GS, Li D, Leiper JM, Siragy HM, Carey RM, Johns RAJC, 2003. Evidence for dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase I in chronic hypoxia–induced pulmonary hypertension. 108, 12, 1493-8.

Milner JA, 1985. Metabolic aberrations associated with arginine deficiency. J Nutr, 115, 4, 516-23.

Morris SM, Jr, 2006. Arginine: beyond protein. The American journal of clinical nutrition, 83, 2, 508S-12S.

Morris SM, Jr., 2004. Recent advances in arginine metabolism. Current opinion in clinical nutrition and metabolic care, 7, 1, 45-51.

Morris SM, Jr., 2016. Arginine Metabolism Revisited. J Nutr, 146, 12, 2579S-86S.

Mühling J, Fuchs M, Fleck C, Sablotzki A, Krüll M, Dehne MG, Gonter J, Weiss S, Engel J, Hempelmann G, 2002. Effects of arginine, L-alanyl-L-glutamine or taurine on neutrophil (PMN) free amino acid profiles and immune functions in vitro. Amino Acids, 22, 1, 39-53.

Nagase S, Takemura K, Ueda A, Hirayama A, Aoyagi K, Kondoh M, Koyama A, 1997. A novel nonenzymatic pathway for the generation of nitric oxide by the reaction of hydrogen peroxide and D- or L-arginine. Biochemical and biophysical research communications, 233, 1, 150-3.

Nijveldt RJ, Teerlink T, Van Der Hoven B, Siroen MP, Kuik DJ, Rauwerda JA, van Leeuwen PA, 2003. Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) in critically ill patients: high plasma ADMA concentration is an independent risk factor of ICU mortality. Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland), 22, 1, 23-30.

Nijveldt RJ, Teerlink T, van Leeuwen PA, 2003. The asymmetrical dimethylarginine (ADMA)-multiple organ failure hypothesis. Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland), 22, 1, 99-104.

Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K, 1989. Purification and properties of a new enzyme, NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. The Journal of biological chemistry, 264, 17, 10205-9.

Oliva-Damaso E, Oliva-Damaso N, Rodriguez-Esparragon F, Payan J, Baamonde-Laborda E, Gonzalez-Cabrera F, Santana-Estupiñan R, Rodriguez-Perez JC, 2019. Asymmetric (ADMA) and Symmetric (SDMA) Dimethylarginines in Chronic Kidney Disease: A Clinical Approach. Int J Mol Sci, 20, 15.

Onat T, Emerk K, Sözmen EYJPY, 2002. İnsan biyokimyası. 110-117.

Palm F, Onozato ML, Luo Z, Wilcox CS, 2007. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. American journal of physiology. Heart and circulatory physiology, 293, 6, H3227-45.

Popovic PJ, Zeh HJ, III, Ochoa JB, 2007. Arginine and Immunity. The Journal of Nutrition, 137, 6, 1681S-6S.

Reade MC, Clark MF, Young JD, Boyd CA, 2002. Increased cationic amino acid flux through a newly expressed transporter in cells overproducing nitric oxide from patients with septic shock. Clinical science (London, England : 1979), 102, 6, 645-50.

Robinson TM, Sewell D, Greenhaff PL, 2003. L-arginine ingestion after rest and exercise: effects on glucose disposal. Medicine and science in sports and exercise, 35, 8, 1309-15.

Rodionov RN, Murry DJ, Vaulman SF, Stevens JW, Lentz SR, 2010. Human alanine-glyoxylate aminotransferase 2 lowers asymmetric dimethylarginine and protects from inhibition of nitric oxide production. The Journal of biological chemistry, 285, 8, 5385-91.

Ronden RA, Houben AJ, Teerlink T, Bakker JA, Bierau J, Stehouwer CD, De Leeuw PW, Kroon AA, 2012. Reduced renal plasma clearance does not explain increased plasma asymmetric dimethylarginine in hypertensive subjects with mild to moderate renal insufficiency. American journal of physiology. Renal physiology, 303, 1, F149-56.

Sandıkçıoğlu S, 2017. Kromatografik Teknikler.

Schachter A, Goldman JA, Zukerman Z, 1973. Treatment of oligospermia with the amino acid arginine. The Journal of urology, 110, 3, 311-3.

Schwedhelm E, 2005. Quantification of ADMA: analytical approaches. Vascular medicine (London, England), 10 Suppl 1, S89-95.

Schwedhelm E, Tan-Andresen J, Maas R, Riederer U, Schulze F, Böger RH, 2005. Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Method for the Analysis of Asymmetric Dimethylarginine in Human Plasma. Clinical chemistry, 51, 7, 1268-71.

Siroen MP, Warlé MC, Teerlink T, Nijveldt RJ, Kuipers EJ, Metselaar HJ, Tilanus HW, Kuik DJ, van der Sijp JR, Meijer S, van der Hoven B, van Leeuwen PA, 2004. The transplanted liver graft is capable of clearing asymmetric dimethylarginine. Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society, 10, 12, 1524-30.

Soeters PB, Hallemeesch MM, Bruins MJ, van Eijk HM, Deutz NE, 2002. Quantitative in vivo assessment of arginine utilization and nitric oxide production in endotoxemia. American journal of surgery, 183, 4, 480-8.

Soeters PB, Hallemeesch MM, Bruins MJ, van Eijk HM, Deutz NEJTAjos, 2002. Quantitative in vivo assessment of arginine utilization and nitric oxide production in endotoxemia. 183, 4, 480-8.

Stechmiller JK, Childress B, Cowan L, 2005. Arginine supplementation and wound healing. Nutr Clin Pract, 20, 1, 52-61.

Stevens PE, Levin A, medicine KDIGOCKDGDWGMJAoi, 2013. Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. 158, 11, 825-30.

Stühlinger MC, Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin TL, Cooke JP, Reaven GM, Tsao PS, 2002. Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. Jama, 287, 11, 1420-6.

Stühlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, Cooke JP, 2001. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. Circulation, 104, 21, 2569-75.

Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J, Tsikas D, Boeger RH, Bode-Boeger SM, Kruszelnicka-Kwiatkowska O, Kokot F, Dubiel JS, Froelich JCJJocp, 1999. Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. 33, 4, 652-8.

Sydow K, Münzel T, 2003. ADMA and oxidative stress. Atherosclerosis. Supplements, 4, 4, 41-51.

Tachibana K, Mukai K, Hiraoka I, Moriguchi S, Takama S, Kishino Y, 1985. Evaluation of the effect of arginine-enriched amino acid solution on tumor growth. JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition, 9, 4, 428-34.

Tain YL, Hsu CN, 2017. Toxic Dimethylarginines:Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) and Symmetric Dimethylarginine (SDMA). Toxins, 9, 3.

Tapiero H, Mathé G, Couvreur P, Tew KD, 2002. I. Arginine. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie, 56, 9, 439-45.

Teerlink T, 2005. ADMA metabolism and clearance. Vascular medicine (London, England), 10 Suppl 1, S73-81.

Teerlink T, 2007. HPLC analysis of ADMA and other methylated L-arginine analogs in biological fluids. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 851, 1-2, 21-9.

Tentolouris C, Tousoulis D, Stefanadis C, 2004. L-arginine "paradox" in coronary atherosclerosis. Circulation, 110, 7, e71.

Tomlinson JA, Caplin B, Boruc O, Bruce-Cobbold C, Cutillas P, Dormann D, Faull P, Grossman RC, Khadayate S, Mas VR, Nitsch DD, Wang Z, Norman JT, Wilcox CS, Wheeler DC, Leiper J, 2015. Reduced Renal Methylarginine Metabolism Protects against Progressive Kidney Damage. J Am Soc Nephrol, 26, 12, 3045-59.

Tong BC, Barbul A, 2004. Cellular and physiological effects of arginine. Mini reviews in medicinal chemistry, 4, 8, 823-32.

Tran CT, Leiper JM, Vallance P, 2003. The DDAH/ADMA/NOS pathway. Atherosclerosis. Supplements, 4, 4, 33-40.

Tripepi G, Raso FM, Sijbrands E, Seck MS, Maas R, Boger R, Witteman J, Rapisarda F, Malatino L, Mallamaci FJCJotASoN, 2011. Inflammation and asymmetric dimethylarginine for predicting death and cardiovascular events in ESRD patients. 6, 7, 1714-21.

Tsikas D, Bollenbach A, Hanff E, Kayacelebi AA, 2018. Asymmetric dimethylarginine (ADMA), symmetric dimethylarginine (SDMA) and homoarginine (hArg): the ADMA, SDMA and hArg paradoxes. Cardiovascular diabetology, 17, 1, 1.

Tsikas D, Böger RH, Sandmann J, Bode-Böger SM, Frölich JC, 2000. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors are responsible for the L-arginine paradox. FEBS letters, 478, 1-2, 1-3.

Tsikas D, Schubert B, Gutzki F-M, Sandmann J, Frölich JC, 2003. Quantitative determination of circulating and urinary asymmetric dimethylarginine (ADMA) in humans by gas chromatography–tandem mass spectrometry as methyl ester tri(N-pentafluoropropionyl) derivative. Journal of Chromatography B, 798, 1, 87-99.

Ueda S, Kato S, Matsuoka H, Kimoto M, Okuda S, Morimatsu M, Imaizumi T, 2003. Regulation of cytokine-induced nitric oxide synthesis by asymmetric dimethylarginine: role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. Circulation research, 92, 2, 226-33.

Ueda S, Yamagishi S, Kaida Y, Okuda S, 2007. Asymmetric dimethylarginine may be a missing link between cardiovascular disease and chronic kidney disease. Nephrology (Carlton, Vic.), 12, 6, 582-90.

Vallance P, Leiper J, 2004. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine: dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 24, 6, 1023-30.

Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S, 1992. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. Lancet (London, England), 339, 8793, 572-5.

Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S, 1992. Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. Journal of cardiovascular pharmacology, 20 Suppl 12, S60-2.

Vergnani L, Hatrik S, Ricci F, Passaro A, Manzoli N, Zuliani G, Brovkovych V, Fellin R, Malinski T, 2000. Effect of native and oxidized low-density lipoprotein on endothelial nitric oxide and superoxide production : key role of L-arginine availability. Circulation, 101, 11, 1261-6.

Vezzalini M, Aletta JM, Beghelli S, Moratti E, Della Peruta M, Mafficini A, Mojica WD, Mombello A, Scarpa A, Sorio C, 2010. Immunohistochemical detection of arginine methylated proteins (MeRP) in archival tissues. Histopathology, 57, 5, 725-33.

Visek WJ, 1986. Arginine needs, physiological state and usual diets. A reevaluation. J Nutr, 116, 1, 36-46.

Vishwanathan K, Tackett RL, Stewart JT, Bartlett MG, 2000. Determination of arginine and methylated arginines in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 748, 1, 157-66.

Visser M, Paulus WJ, Vermeulen MA, Richir MC, Davids M, Wisselink W, de Mol BA, van Leeuwen PA, 2010. The role of asymmetric dimethylarginine and arginine in the failing heart and its vasculature. European journal of heart failure, 12, 12, 1274-81.

Wang D, Strandgaard S, Iversen J, Wilcox CS, 2009. Asymmetric dimethylarginine, oxidative stress, and vascular nitric oxide synthase in essential hypertension. American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology, 296, 2, R195-200.

Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P, 2017. Chronic Kidney Disease. The Lancet, 389, 10075, 1238-52.

Welch WJ, Wilcox CS, 1997. Macula densa arginine delivery and uptake in the rat regulates glomerular capillary pressure. Effects of salt intake. The Journal of clinical investigation, 100, 9, 2235-42.

Wilcken DE, Sim AS, Wang J, Wang XL, 2007. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) in vascular, renal and hepatic disease and the regulatory role of L-arginine on its metabolism. Molecular genetics and metabolism, 91, 4, 309-17; discussion 8.

Wilcox CS, 2005. Oxidative stress and nitric oxide deficiency in the kidney: a critical link to hypertension? American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology, 289, 4, R913-35.

Wu G, Morris SM, Jr., 1998. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. The Biochemical journal, 336 (Pt 1), Pt 1, 1-17.

Xiong Y, Fu Y-f, Fu S-h, Zhou H-h, 2003. Elevated Levels of the Serum Endogenous Inhibitor of Nitric Oxide Synthase and Metabolic Control in Rats With Streptozotocin-Induced Diabetes. 42, 2, 191-6.

Xiong Y, Lei M, Fu S, Fu Y, 2005. Effect of diabetic duration on serum concentrations of endogenous inhibitor of nitric oxide synthase in patients and rats with diabetes. Life sciences, 77, 2, 149-59.

Yavuz H, Ankarali Sjdüsbed, 2021. Böbreklerin Endokrin Fonksiyonları. 11, 2, 265-72.

Yavuz Hu, 2006. Arjinin Ve Egzersiz. Spor Bilimleri Dergisi, 17, 3, 143-57.

Yıldıran H, Gençer FJBvDD, 2018. Böbrek Hastalıkları ve Protein Metabolizması. 46, 7-12.

Zhang L, Zhang K, Dong W, Li R, Huang R, Zhang H, Shi W, Liu S, Li Z, Chen Y, Ye Z, Liang X, Yu X, 2020. Raised Plasma Levels of Asymmetric Dimethylarginine Are Associated with Pathological Type and Predict the Therapeutic Effect in Lupus Nephritis Patients Treated with Cyclophosphamide. Kidney diseases (Basel, Switzerland), 6, 5, 355-63.

Zhang YV, Wei B, Zhu Y, Zhang Y, Bluth MH, 2016. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: An Emerging Technology in the Toxicology Laboratory. Clin Lab Med, 36, 4, 635-61.

Zoccali C, Benedetto FA, Maas R, Mallamaci F, Tripepi G, Salvatore Malatino L, Böger R, 2002. Asymmetric dimethylarginine, C-reactive protein, and carotid intima-media thickness in end-stage renal disease. J Am Soc Nephrol, 13, 2, 490-6.

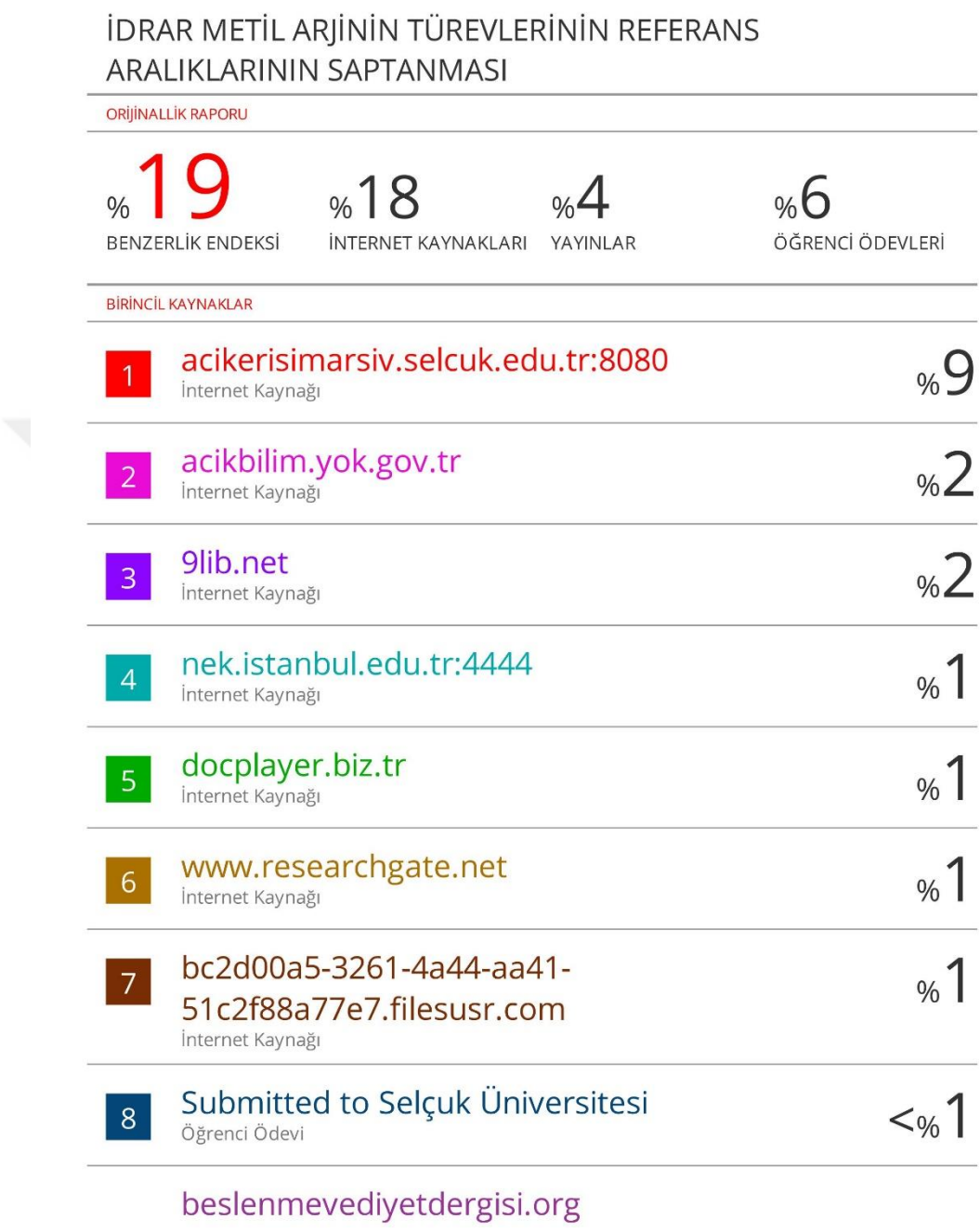
Zoccali C, Bode-Böger SM, Mallamaci F, Benedetto FA, Tripepi G, Malatino LS, Cataliotti A, Bellanuova I, Fermo I, Frölich JC, Böger RH, 2001. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. The Lancet, 358, 9299, 2113-7.

Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G, 2004. Novel cardiovascular risk factors in end-stage renal disease. J Am Soc Nephrol, 15 Suppl 1, S77-80.

2002. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. Jama, 288, 16, 2015-22.

2015. National Institute for Health and Care Excellence: Guidelines. In: Chronic kidney disease in adults: assessment and management. Eds. London: National Institute for Health and Care Excellence (NICE)Copyright © NICE 2020., p.

EK- B Turnitin Raporu



İDRAR METİL ARJİNİN TÜREVLERİNİN REFERANS ARALIKLARININ SAPTANMASI

ORİJİNALLİK RAPORU

%19	%18	%4	%6
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%9
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%2
3	9lib.net İnternet Kaynağı	%2
4	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	%1
5	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	%1
6	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	%1
7	bc2d00a5-3261-4a44-aa41-51c2f88a77e7.filesusr.com İnternet Kaynağı	%1
8	Submitted to Selçuk Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
	beslenmevediyetdergisi.org	