

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

**AĞIR SEPSİS VE SEPTİK ŞOKLU HASTALARDA ASİMETRİK
DİMETİLARJİNİN (ADMA) VE NİTRİK OKSİT (NO) DÜZEYLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ELİF YÜKSEL

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Aysel ARICIOĞLU

ANKARA
MAYIS 2010

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

**AĞIR SEPSİS VE SEPTİK ŞOKLU HASTALARDA ASİMETRİK
DİMETİLARJİNİN (ADMA) VE NİTRİK OKSİT (NO) DÜZEYLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ELİF YÜKSEL

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Aysel ARICIOĞLU

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01-2009/38 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
MAYIS 2010

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ	v
TABLolar LİSTESİ.....	vii
KISALTMALAR.....	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Sepsis	4
2.2. Nitrik Oksit (NO).....	7
2.2.1. Nitrik oksitin biyokimyası.....	8
2.2.2 Nitrik oksitin biyosentezi	9
2.2.3. Nitrik oksit sentaz izozimleri.....	10
2.3. İNFLAMASYON VE SEPSİSTE NİTRİK OKSİT	12
2.4. ADMA.....	17
2.4.1. Genel yapısı	17
2.4.2. ADMA'nın NO ve endotel hasarı ile ilişkisi.....	19
2.4.2.1 ADMA'nın NO ile ilişkisi.....	19
2.4.2.2 ADMA'nın endotel hasarı ile ilişkisi	21
2.5. HOMOSİSTEİN	23
2.5.1. Homosistein metabolizması.....	23
2.5.2. Homosistein, endotel disfonksiyonu ve ADMA	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1. Çalışmaya Katılacak Grupların Belirlenmesi	28
3.1.1. Hastaların çalışmaya alınma kriterleri.....	29
3.1.2 Hastaların çalışmamaya alınmama kriterleri.....	29
3.1.3 Kan alma ve serum hazırlama	30
3.2 Deneyler.....	30
3.2.1. Kullanılan reaktifler ve aletler.....	30
3.3 Yöntem.....	31

3.3.1. ADMA'nın HPLC yöntemiyle ölçümü	31
3.3.1.1 Analitik prosedür	32
3.3.2. Homosisteinin HPLC yöntemiyle ölçümü	34
3.3.2.1. Numune hazırlama:	34
3.3.3. Nitrit-Nitrat düzeylerinin kolorimetrik deney kiti kullanılarak ölçümü	36
3.4. Sonuçların Analizi	38
4. BULGULAR	39
4.1 Kontrol, Ağır Sepsis ve Septik Şoklu Hastalarda ADMA Seviyeleri	39
4.2 Kontrol, Ağır Sepsis ve Septik Şoklu Hastalarda SDMA Seviyeleri	43
4.3 Kontrol, Ağır Sepsis ve Septik Şoklu Hastalarda Homosistein Seviyeleri	45
4.3 Kontrol, Ağır Sepsis ve Septik Şoklu Hastalarda Nitrit-Nitrat Seviyeleri	49
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	51
6. ÖZET	57
7. SUMMARY	59
8. KAYNAKLAR	61
9. EKLER	78
10. ÖZGEÇMİŞ	82

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Nitrik oksitin sentezi	10
Şekil 2: Nitrik oksitin oluşumu ve etki mekanizması	10
Şekil 3: Endotel disfonksiyonu	15
Şekil 4: Vücutta başlıca metillenmiş metilarjininler	17
Şekil 5: L- arjinin ve metillenen arjininlerin kimyasal yapısı	18
Şekil 6: ADMA sentezi ve NOS üzerine inhibitör etkisi	20
Şekil 7: Homosistein metabolizması	23
Şekil 8: Homosistein, ADMA ve NO'nun endotel fonksiyon bozukluğundaki rolleri	26
Şekil 9: Nitrit-nitrat için standart grafiği.....	37
Şekil 10: Ağır sepsisli hastaya ait ADMA-SDMA kromotogramı	39
Şekil 11: Septik şoklu hastaya ait ADMA-SDMA kromotogramı	40
Şekil 12: Kontrole ait ADMA-SDMA kromotogramı	41
Şekil 13: Kontrol ve hasta grupları arasında ADMA ölçümünün istatistiksel sütun grafiği.....	42
Şekil 14: Kontrol ve hasta grupları arasında SDMA ölçümünün istatistiksel sütun grafiği.....	44
Şekil 15: Ağır sepsisli hastaya ait homosistein sonuç kromotogramı.....	45
Şekil 16: Septik şoklu hastaya ait homosistein sonuç kromotogramı.....	46
Şekil 17: Kontrole ait homosistein sonuç kromotogramı.....	47
Şekil 18: Kontrol ve hasta grupları arasında HOMOSİSTEİN ölçümünün istatistiksel sütun grafiği	48
Şekil 19: Kontrol ve hasta grupları arasında NO ölçümünün istatistiksel sütun grafiği.....	50

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: Nitrik oksit sentaz izozimleri	11
Tablo 2: NOS izozimlerinin özellikleri	11
Tablo 3: Kullanılan reaktifler ve aletlerin gösterimi.....	30
Tablo 4: ADMA kitinin bileşenleri	31
Tablo 5: ADMA için HPLC sistemi parametreleri.....	32
Tablo 6: ADMA çalışma prosedürü.....	32
Tablo 7: Homosistein çalışma prosedürü.....	34
Tablo 8: Homosistein için HPLC sistemi parametreleri.....	35
Tablo 9: Nitrit-nitrat deney düzeneği.....	36
Tablo 10: Nitrit–nitrat için standart değerleri	37
Tablo 11: ADMA sonuçları için p değerleri.....	42
Tablo 12: ADMA sonuçları için kontrol ve hasta grupları arasındaki ortalama±standart sapma değerleri	42
Tablo 13: SDMA sonuçları için p değerleri.....	43
Tablo 14: SDMA için kontrol ve hasta grupları arasındaki ortalama±standart sapma değerleri	44
Tablo 15: Homosistein sonuçları için p değerleri.....	48
Tablo 16: Kontrol ve hasta grupları arasındaki ortalama±standart sapma değerleri.....	48
Tablo 17: Nitrit-nitrat sonuçları için p değerleri	49
Tablo 18: Kontrol ve hasta grupları arasındaki ortalama±standart sapma değerleri.....	49
Tablo 19: Tüm çalışılan parametrelerin ve grupların sonuçlarının karşılaştırılması ile ortalama±standart hata ve p değerleri.....	50

KISALTMALAR

ADMA	Asimetrik dimetilarjinin
SDMA	Simetrik dimetilarjinin
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentaz
cNOS	Yapısal nitrik oksit sentaz
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentaz
MODS	Multiple organ disfonksiyonu sendromu
cGMP	Siklik guanozin 3',5'-monofosfat
PRMT	Protein arjinin metil transferaz
SIRS	Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu
EDRF	Endotel kökenli gevşetici faktör
L-NMMA	Monometil-L-arginin
L-NNA	Nitro-L-arginin
L-NAME	Nitro-L-arginin metil ester
DDAH	Dimetilarjinin dimetilaminohidrolaz
SOD	Süperoksit dismutaz
SAM	S-adenozil metyonin
SAH	S-adenozil homosistein
tHcy	Total homosistein
TNF- α	Tümör nekroz faktörü
IL-1	İnterlökin 1
PAF	Platelet (trombosit) aktive edici faktör
MCP-1	Monosit kemoatraktan protein-1
NADPH	Nikotinamidadenindinükleotid fosfat

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnflamasyon, inflamatuvar bir stimulusa cevap olarak elde edilen dinamik olaylar zinciridir. İnflamasyon alanında vazodilatasyonu takiben kan akımı değişiklikleri, damar permeabilite artışı, ödem sıvısı oluşumu, lokal lökosit birikimi gözlenir. Bu birbirini takip eden olayların gelişiminden çeşitli mediatörler sorumludur.¹

Sepsis, birçok sistemi tutan, özellikle hemodinamik değişikliklere yol açan, şok, organ fonksiyon bozukluğu ve organ yetmezliğine kadar giden öldürücü bir enfeksiyon hastalığıdır.^{1,120} Sepsise, hipotansiyon, laktat yüksekliği veya organ yetmezliği eşlik ederse klinik tablonun adı ağır sepsistir. Ağır sepsis, hipotansiyon sıvı tedavisi ile düzeltilemiyorsa klinik tablo septik şok olarak adlandırılır.^{5,6,7}

Sepsis epidemiyolojisi ile ilgili son yıllarda oldukça geniş kapsamlı ve önemli çalışmalar yapılmıştır. Ağır sepsis, tüm dünyada yüksek mortalite ve morbitideye sahiptir.² Hastaneye yatırılan her 1000 olgunun 10'unda sepsisin görülmesi ve bu olguların %30'unda MODS (multiple organ disfonksiyonu sendromu) gelişmesi; sepsisli olguların %20'si, septik şoklu olguların ise %60-80'inde mortalite gözlenmesi nedeniyle oldukça önemlidir.^{102,108}

Sepsiste hedef organ damar endotelidir ve hemen hemen bütün mediyatörler damarlar üzerine etkilidir. Endotoksin, TNF- α (tümör nekroz faktörü), IL-1 (interlökin-1), PAF (Platelet [trombosit] aktive edici

faktör), lökotrienler, tromboksan A2 ve nitrik oksit (NO) endotel permeabilitesini artırır.⁴

Endotel fonksiyonlarının düzenlenmesinde en önemli aracı moleküllerden biri NO'tir. NO, vasküler endotelde endotelial nitrik oksit sentetaz (eNOS) enzimi tarafından L-argininden sentezlenen vazoaktif bir maddedir ve vasküler düz kas gevşetici etkisi ile endotel bağımlı vazodilatasyonun ana mediyatörüdür.⁴ eNOS'un farmakolojik inhibisyonu veya genetik eksikliğinde endotele bağımlı vazodilatasyon bozulur ve vasküler rezistans artar.^{13,14} NO difüzyonla vasküler düz kas hücrelerine geçer, guanil siklazı stimüle ederek cGMP (siklik guanozin 3',5'-monofosfat) sentezini artırır. Artan cGMP vasküler düz kas relaksasyonu ve vazodilatasyonuna neden olur.⁴ NO'in akut ve kronik enflamasyon, sistemik inflamatuvar yanıt ve sepsiste rol oynadığını gösteren çok sayıda çalışma vardır.¹⁰

NO sentezi enzimin aktif bölgesi için yarışmalı inhibitör olarak davranan L-arjininin guanidino-ilaveli analogları tarafından selektif olarak inhibe edilebilir. İnsan plazmasında varlığı uzun süredir bilinen ADMA (asimetrik dimetilarjinin) 'nın NOS için bir inhibitör olduğunu ilk bildiren Vallance ve arkadaşlarıdır.¹¹⁹ ADMA'nın, NO sentezin substrat bağlanma bölgesinde L-arjinin ile yer değiştirdiğinde NO'ı ortamdan uzaklaştırdığı bildirilmektedir.¹² Ayrıca endotelial fonksiyon bozukluğunda ve koroner kalp hastalığında yeni bağımsız bir risk faktörü olduğu öne sürülmüştür.⁸³

ADMA, L-Arjinin guanidino analogu olan, endojen olarak sentezlenen, proteinlerdeki arjinin rezidülerinin protein arjinin metil transferazlarıyla (PRMT I) metillenmesiyle meydana gelen bir türev aminoasittir. PRMT II ise SDMA (simetrik dimetilarjinin) oluşumunda rol oynar. ⁽¹⁰⁹⁾ ADMA ve SDMA iki metil grubunun eklenmesiyle oluşan türevlerdir. SDMA'nın ADMA'nın aksine NOS üzerinde inhibitör etkisinin olmadığını fakat arjinin ve ADMA ile hücre giriş yolunu etkileyerek NO üretim hızında dolaylı yoldan etki ettiği bildirilmiştir. ¹⁰⁹

Homosistein protein yapısında olmayan ve metiyonin metaboliti olarak bulunan, sülfür taşıyan bir amino asittir. Homosisteineminin endotel disfonksiyondaki rolünü açıklayan en geçerli mekanizma, NO'nun oksidatif parçalanmasının artışı, süperoksit anyon, hidrojen peroksit ve disüflitlerin birikimi yolu ile olanıdır. Homosisteineminin diğer bir potansiyel etkisi de, NO sentezinin azalması olabilir. ⁶⁹ Homosistein akut ve kronik endotel fonksiyon bozukluğuna yol açar.

Çalışmamızı inflamasyon sonucu gelişen ağır sepsis ve septik şok hastalarında serum NO, homosistein, ADMA ve SDMA düzeylerindeki değişimi incelemek amacıyla planladık. Ağır sepsis ve septik şoklu hastalarda bu konuda çok fazla çalışmanın olmayışı ve ileri dönemde ciddi komplikasyonlara neden olabilen bir bozukluk olması nedeniyle üzerine durulması gerektiğinden bu tez çalışmasının sonraki çalışmalarda tanıyı destekleme ve prognozu belirlemede yararlı olabileceği düşünülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Sepsis

Sepsis ve septik şok, cerrahi ve dahiliye yoğun bakım ünitelerinde en sık görülen ölüm nedenidir.^{15,16} Tedavi yöntemlerinin hemen tümü başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Başarısızlığın önemli nedenlerinden biri sepsise olan konakçı yanıtının fizyopatolojik ve genetik temellerinin tam olarak bilinmemesidir. Tıbbi teknolojiye gelişmeler, invaziv girişimlerin artması, alt hastalığı olan hastaların yaşam süresinin uzaması enfeksiyon riskini, özellikle de öldürücü bir enfeksiyon olan sepsis görülme sıklığını artırmıştır.¹⁵

Klinik bulguların ortaya çıkışı genellikle sinsidir. Ateş, bilinç bulanıklığı, geçici hipotansiyon, idrar miktarında azalma veya nedeni açıklanamayan trombositopeni şeklinde ortaya çıkabilir. Eğer gerekli önlemler alınmaz veya tedavi edilmezse solunum ve böbrek yetmezliği, koagülasyon bozuklukları ve tedaviye yanıtızsız hipotansiyon gelişebilir. Sepsise neden olan enfeksiyonlar genellikle pnömoni, intraabdominal nedenler, üriner sistem enfeksiyonu ve bakteremidir.

Sepsis etiyolojisinden birçok bakteriyel etken sorumludur. Streptokoklar ve stafilokoklar en sık sepsis nedeni olan bakterilerdir.¹⁷ Değişik çalışmalarda, sepsislerin % 20-64'ünde gram negatif bakterilerin etken olduğu, % 27-74'ünde gram pozitif bakterilerin etken olduğu, % 15 ve daha az oranda ise polimikrobiyal etken izole edildiği görülmektedir.

18,19

Vücut ısısı, kalp hızı, solunum sayısı ve beyaz küre sayısına dayalı sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) kriterlerinin özgüllüğünün düşük olması nedeniyle 2001 yılında Uluslararası Sepsis Tanısı Konferansı'nda sepsise işaret edebilecek bulgu ve semptomların listesi genişletilmiştir.³ Ancak yeterince kanıt olmaması nedeniyle 1991 yılında Amerikan Göğüs Hastalıkları (American College of Chest Physicians-ACCP) ve Yoğun Bakım Dernekleri (Society of Critical Care Medicine-SCCM) sepsis ile ilgili tanımları yeniden gözden geçirilmiş ve sepsis spektrumu içerisinde yer alan tanımlar aşağıdaki gibi belirlenmiştir.¹⁶

İnfeksiyon: Mikroorganizmaların, normalde steril konak dokularında bulunması veya invazyonu sonucu gelişen bir inflamatuvar cevaptır.

Bakteriyemi: Canlı bakterinin dolaşımda bulunmasıdır. Bakteriyemi tanısı kan kültür pozitifliği ile konur.

SIRS: Değişik ağır klinik durumlara inflamatuvar cevap olarak tanımlanmıştır. İnfeksiyon ve infeksiyon dışı (pankreatit, yanık, multiple travma gibi) nedenlere bağlı gelişebilir. İnfamatuvar cevap, klinik olarak aşağıdaki durumlardan iki veya daha fazlasının bulunması ile tanınır;¹¹²

1. Vücut ısısının $>38^{\circ}\text{C}$ veya $<36^{\circ}\text{C}$ olması,
2. Kalp atım hızının $>90/\text{dk}$ olması,
3. Solunum hızının $>20/\text{dk}$ veya arteriyel karbondioksit basıncının <33 mmHg olması,
4. Lökosit sayısının $>12000/\text{mm}^3$ veya $<4000/\text{mm}^3$ olması, periferik yaymada >10 'un üzerinde band formunun bulunması.¹¹²

Sepsis: Birçok sistemi tutan, özellikle hemodinamik değişikliklere yol açan, şok, organ fonksiyon bozukluğu ve organ yetmezliğine kadar giden öldürücü bir infeksiyon hastalığıdır ve var olan infeksiyona karşı konakçının aşırı ve düzensiz yanıtı olarak tanımlanabilir. İnfeksiyon sonucu SIRS bulgularının iki veya daha fazlasının bulunması ile tanısı konabilir.

Ağır sepsis: Sepsis ile birlikte en az 1 organ fonksiyon bozukluğu, hipoperfüzyon veya hipotansiyonun bulunması durumudur.

Septik şok: Sepsiste, yeterli sıvı tedavisine rağmen, direnen, hipotansiyon ile birlikte perfüzyon bozukluğu belirtilerinin (laktik asidoz, oligüri, akut mental değisiklik) devam etmesi durumudur. Sepsiste gelişen en önemli fizyopatolojik olaylardan biri de septik şoktur. Septik şok en fazla gram negatif bakteriyel sepsislerde görülür. ¹⁵

Sepsise bağlı hipotansiyon: Sistolik kan basıncının 90 mmHg'nin altına düşmesi veya diğer nedenler olmaksızın, bilinen sistolik kan basıncının 40 mmHg' den daha fazla aşağı düşmesidir.

MODS: Akut hastalık tablosu içinde olan bir hastada organ fonksiyon değişikliklerinin bulunmasıdır. Bu klinik tabloda tedavisiz homeostaz sağlanamaz. İnfeksiyon odağının etkin bir şekilde ortadan kaldırılamadığı veya uygun tedavi edilmediği durumlarda sepsis, septik şok ve çoklu organ yetmezliği gelişimi söz konusu olabilir. ^{15,16}

2.2. Nitrik Oksit (NO)

Bu molekülün rolü ilk olarak vasküler tonusun düzenlenmesinden sorumlu ajanların tanımlanması çalışmaları sırasında keşfedilmiştir. Bu ajan başlangıçta endotel kökenli gevşetici faktör (EDRF) olarak isimlendirilmiş ve EDRF'nin diğer birçok sinyalizasyon molekülü gibi protein benzeri bir yapıya sahip olabileceği düşünülmüştür. Uzun süren çalışmalar sonucu EDRF'nin aslında bir protein değil, oldukça reaktif bir gaz olan NO olduğu gerçeğinin keşfi, Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro ve Ferid Murad'a 1998 Nobel Tıp Ödülü'nü kazandırmıştır.^{93,94}

NO, ortamda oksijen varlığında dahi stabilitesini koruyabilen, lipofilik, kimyasal olarak stabil olmayan, suda çözünebilen bilinen en düşük moleküler ağırlıklı memeli hücresinin biyoaktif sekresyon ürünüdür.^{36,88} NO, insan fizyolojisi ve fizyopatolojisinde önemli bir yere sahiptir ve rol oynadığı olaylardan bazıları aşağıda özetlenmiştir;

- Düz kas proliferasyonunu engeller (antimitojenik etki),
- Endotel katmanın geçirgenliğini azaltarak damar duvarından lipoproteinlerin geçmesini engeller,
- Trombositlerin yapışkanlığını azaltır ve agregasyonunu baskılar,
- Endotel hücrelere monositlerin yapışmasını azaltır,
- Lökosit aktivasyonunu engeller,
- Anjiyogenik etkileri olduğu bilinmektedir.⁴⁰
- Kardiyovasküler hastalıklar için risk faktörü olarak sayılan hipertansiyonun, hiperkolesteroleminin, diyabetin, yaşlanmanın, postmenapozal durumun, sigaranın ve enfeksiyonların ateroskleroz patogeneğinde NO eksikliğinin etkili olduğu gösterilmiştir.^{29,30}

2.2.1. Nitrik oksitin biyokimyası

Atmosferdeki bakteriler, asit yağmurları, jetler, baca gazları, egzoz gazları ile tüten sigaralar NO• ve diğer reaktif oksijen türlerini üreterek hava kirliliğine neden olabilirler. NO•'in açık formülünde görülen çiftlenmemiş elektronu, azot ve oksijen atomları üzerinde yer değiştirerek 'rezonans stabilitesi' sağlar, reseptörden bağımsız olarak membranlardan kolayca diffüze olabilir.^{37,38} Tüm bu özellikleri NO•'e ideal bir haberci molekül özelliği kazandırmaktadır.³⁷

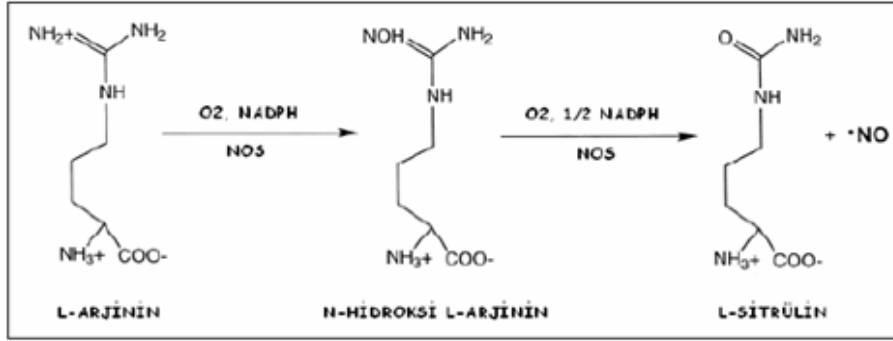
Renksiz ve son derece toksik bir gaz olan NO• serbest radikal yapısından dolayı yarı ömrü çok kısadır, dokuda, 1060 saniyelik kısa bir yarı ömrü vardır. Daha sonra hızla metabolitleri olan nitrit (NO₂) ile nitrata (NO₃) dönüşür.^{37,92,95,130} Bu nedenle NO üretiminin araştırıldığı çalışmaların büyük kısmında onun metabolitleri olan nitrit ve nitratın konsantrasyonları farklı örneklerde ölçülmüştür.¹³⁰ Bu değişkenlik, dokuların taşıdığı oksijenli bileşiklerin oranındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. NO'nun bu özellikleri, onu ideal bir molekül haline getirir ve bu sayede NO, oksijen, süperoksit radikalleri ve geçiş metalleriyle (demir, bakır, kobalt, manganez gibi) reaksiyona girer.^{37,95} NO• düşük konsantrasyonlarda iken toksik değildir.^{34,35,88}

NO• üretildiği hücreden dışarı çıkarak direkt hedef hücrelerine yönelir. Sonuçta hedef molekülüne bağlanarak direkt olarak veya enzim aktivitesini değiştirerek amaçlanan etkiyi oluşturur. Buna eNOS'ın vazodilatasyon, nNOS'un sinaptik transmisyon ve makrofaj iNOS'unun savunmayla ilgili etkileri örnek olarak verilebilir.

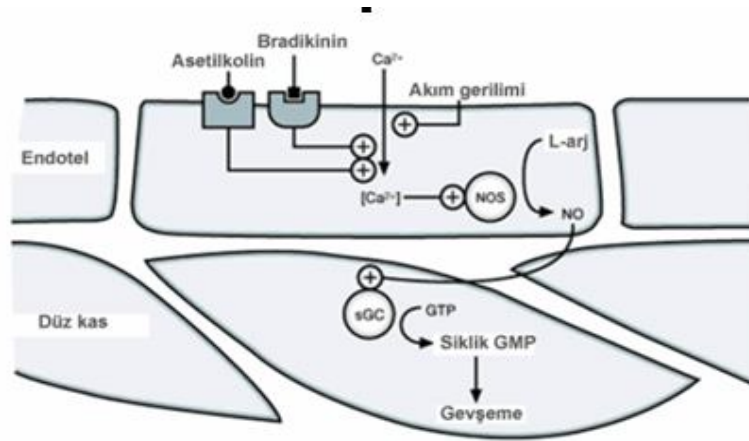
NO•'in önemli bir hedefi de bir oksijen radikali olan süperoksit (O₂•-) molekülüdür.⁵⁰ Bu ikisinin (NO• ve O₂•-) tepkimesiyle oluşan peroksinitrit (ONOO-)'-den, nitrojen dioksit (NO₂-) ile hidroksil (OH•) radikali oluşabilir. Yine NO•'in lipidler üzerine olan etkisiyle lipid peroksidasyonu başlatılır ve çeşitli peroksitler üretilir.^{38,39}

2.2.2 Nitrik oksitin biyosentezi

L-arjininin guanido grubundaki nitrojenin hidroksilasyonu ile sentez başlatılır⁹⁰ (Şekil 1). Sağlam damar endoteli, bazal bir hız ile sürekli NO oluşturur. Bu arada fizyolojik bir stimulus agonist olarak yanıtı artırabilir. Agonist etkisi ile intrasellüler Ca⁺² artışı NOS'u aktive eder ve L-Arjinin aminoasidinden sitrüllin ile birlikte sentezlenen NO, endotel hücrelerinden düz kas hücrelerine difüze olur. Düz kaslarda NO çözünür guanilat siklazı aktive ederek cGMP'yi artırır. Oluşan cGMP Ca⁺² düzeylerini azaltarak düz kaslarda relaksasyon ile vazodilatasyona neden olur¹⁰¹ (Şekil 2). NO sentezi mekanik güçler ve endotel reseptörlerine etkili çeşitli ajanlarla oluşmaktadır. Sentezden sorumlu endotel reseptörlerine etkili ajanlar asetilkolin, P maddesi, bradikinin, trombin, ATP, ADP, tromboksan A₂, peptidolökotrienler, histamin, endotelin, ve agregre trombositlerdir.⁸¹ Tetrahidrobiopterin ve nikotinamidadenin-dinükleotid fosfat (NADPH) kofaktör olarak rol oynamaktadır.^{81,82}



Şekil 1: Nitrik oksitin sentezi (90)

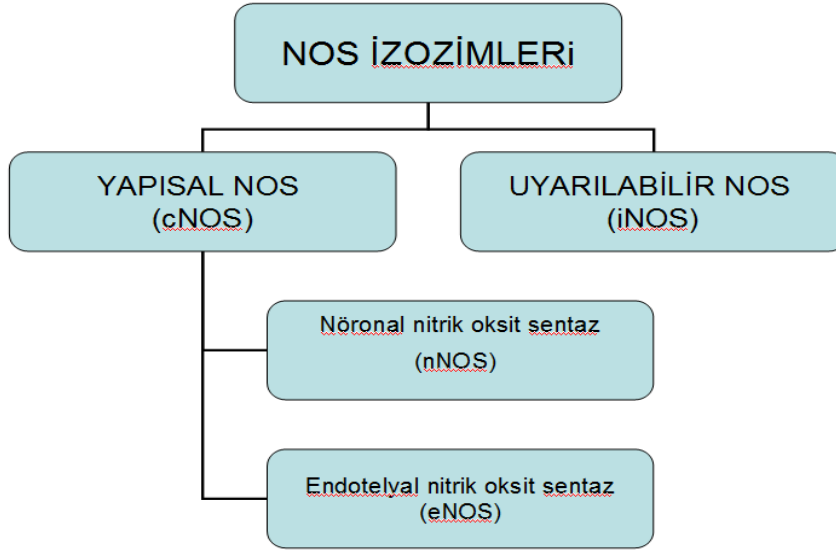


Şekil 2: Nitrik oksitin oluşumu ve etki mekanizması (151)

2.2.3. Nitrik oksit sentaz izozimleri

L-arjininden NO oluşturan enzimler NOS izoenzimleri olarak bilinmektedir 41,42,43,44,74,76 (Tablo 1).

Tablo 1: Nitrik oksit sentaz izozimleri (41,42,43,44,74,76)



NOS izozimlerinin özellikleri ise tablo 2’de belirtilmiştir.

Tablo 2: NOS izozimlerinin özellikleri (41,42,43,44,74,76)

<u>cNOS’un özellikleri</u>	<u>iNOS’un özellikleri</u>
Hücre içi iyonize kalsiyumu (Ca^{++}) artıran her türlü etkileşimde, kalsiyumun kalmodüline bağlanmasıyla oluşan kompleks ya Ca^{++} ya da kalmodülin cNOS’un aktifleşmesini sağlar ve NO sentezlenir.	Aktivite için Ca^{++} bağımlı değildir. Bunun nedeni enzimin kalmodülinle çok sıkı bağlanmış olması olabilir.
Ca^{++} ’u arttıran uyarı kesilince, hücre içi Ca^{++} ’da azalmaya başlar ve enzim aktivitesi ortadan kalkarak $NO\bullet$ sentezi durur	Enzim indüklendiği zaman $NO\bullet$ üretimi, yapısal formdaki gibi kısa sürmez, saatlerce hatta günlerce devam edebilir. Özellikle non spesifik immünitede önemli rol oynar.
Bu yüzden bu izoform, normal biyolojik sistemlerde düşük miktardaki $NO\bullet$ sentezinden sorumludur.	Daha fazla NO üretir ve sepsis sırasındaki periferik vasküler tonus değişikliklerinden sorumludur
nNOS ve eNOS adlı iki izoformu da Ca^{++} bağımlıdır.	

2.3. İNFLAMASYON VE SEPSİSTE NİTRİK OKSİT

İnflamasyon, inflamatuvar bir stimulusa cevap olarak elde edilen dinamik, olaylar zinciridir. İnflamasyon alanında vazodilatasyonu takiben kan akımı değişiklikleri, damar permeabilite artışı, ödem sıvısı oluşumu, lokal lokosit birikimi gözlenir.¹ Bu birbirini takip eden olayların gelişiminden çeşitli mediatörler sorumludur. İnflamasyonda mediatör çağı 1927 yılında Thomas Lewis'in, histaminin klasik olarak "üçlü cevap" olarak bilinen etkisini tanımlamasıyla başlamıştır. Lewis, dokunun künt travmaya maruz kalmasıyla açığa çıkan histaminin, doğrudan doğruya lokal kan damarlarına etki ederek travma bölgesinde:

- 1- Saniyeler içerisinde kızarıklık,
- 2- 15-30 saniye içinde, travmanın birkaç santimetre çevresine yayılan kırmızılık,
- 3- 2-3 dakika içinde vasküler permeabilite artışına bağlı olarak oluşan lokal ödem geliştiğini tanımlamıştır.²⁷

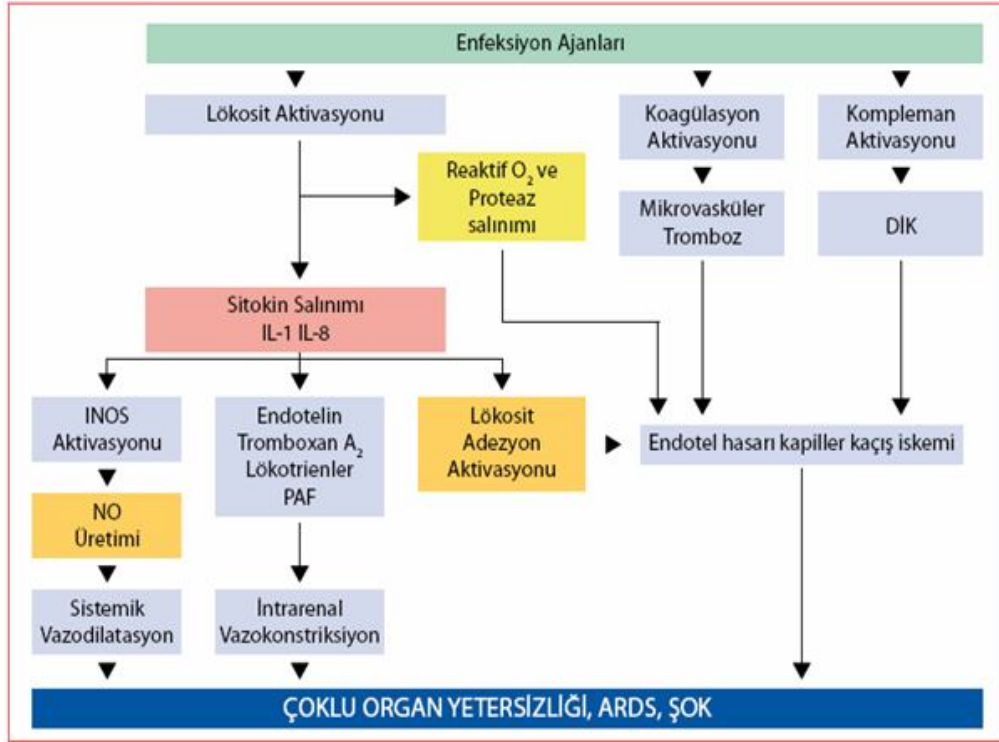
NO'nin akut ve kronik inflamasyon, sistemik inflamatuvar yanıt ve sepsiste rol oynadığını gösteren çok sayıda çalışma vardır.¹⁰⁶ Bakteriyel endotoksinler iNOS'u uyarır ve kardiyomiyositlerde, endokardiyumda ve düz kas hücrelerinde NO sentezini artırarak venlerde kan birikmesine ve kardiyak fonksiyonlarının bozulmasına (sepsise bağlı dilate kardiyomyopati) yol açar ve artan NO vazodilatasyonu artırır, ödem oluşturur ve hassas sinir uçlarını etkiler. Tüm bu etkiler inflamatuvar yanıtın önemli göstergelerindendir.

NO sentezi bazı yarışmalı inhibitorler tarafından inhibe edilmektedir. Bunlar: Monometil-LArginin (L-NMMA), ADMA, Nitro-L-Aginin (L-NNA), Nitro-Larginin metil ester (L-NAME). L-NAME daha çok cNOS için, L-NMMA ise her iki NOS için inhibitördür. eNOS, L-arginin analogları L- NMMA, L-NAME ve ADMA tarafından yarışmalı (kompetitif) olarak inhibe edilmektedir.¹²⁶ Dolaşan konsantrasyonu L-NMMA'dan 10 kat fazla olan ADMA, insanda NO biyosentezinin majör inhibitörüdür.¹²⁵ Ortamda yüksek konsantrasyonda L-argininin bulunmasıyla da bu moleküllerin inhibitör etkisi ortadan kalkmaktadır.¹²⁷ Septik şokun tedavisinde NO'nin aşırı üretiminin antagoneze edilmesi mantığını gündeme getirmiştir ve yapılan ilk yaklaşım iNOS'un kompetitif inhibitörleri olarak L-NNMA, L-NAME, L-NNA gibi L-arginin analoglarının kullanılmasıdır. Glikokortikoid ve NOS inhibitörleri ile yapılan tedaviler inflamasyonun şiddetinin azaltılmasında etkili olmaktadır. Başlangıçta bu maddelerle yapılan hayvan çalışmaları umut vaatetmiştir, sonraki çalışmalar değerlendirildiğinde elde edilen veriler çok değişkendir, bu değişkenliğin nedeni hayvan modellerinin farklılığı veya uygulanan dozların çeşitliliğinden ve NO'nin hem dokuda lokal hem de sistemik olarak bazı etkiler gösterdiğinden bağlanmaktadır.¹⁰³ Bu nedenle çalışmalarda selektif NO inhibitörlerinin kullanılması ve hatta bunların da sistemik değil lokal olarak ilgili yere uygulanması önerilmiştir. Nitekim, bir çalışmada endotoksemi sırasında non-selektif iNOS inhibisyonunun karaciğere toksik olduğu; selektif iNOS inhibisyonunun ise karaciğerde bir etki oluşturmadığı gösterilmiştir.¹⁰⁷

iNOS inhibitörlerinin arteriyel kan basıncını ve sistemik damar direncini arttırdığı ve kardiyak output'u düşürdüğü gözlenmiştir.¹¹¹ Hatta bir hayvan sepsis modelinde L-NNMA'in yüksek dozlarda mortalitede artışa neden olduğu bildirilmiş ve bu ilaçların terapötik pencerelerinin darlığı vurgulanmıştır. Septik şokta NO'nin ve NOS inhibitörlerinin etkisinin daha iyi

anlaşılabilmesi için toksik olmayan, kısa etkili, dozu titre edilebilir nitelikte ve daha selektif iNOS inhibitörlerinin geliştirilmesi ve denenmesi gerekmektedir.⁹⁶

Sepsiste hedef organ damar endotelidir ve hemen hemen bütün mediyatörler damarlar üzerine etkilidir. Bu mediyatörlerin bir çoğu vazoregulatördür. Bunlar; PGI₂, tromboksan A₂, histamin, serotonin ve NO'dur. Endotoksin, TNF- α , IL-1, PAF, lökotrienler, tromboksan A₂ ve NO endotel permeabilitesini artırır. Vazoaktif mediyatörlerin etkisi ile sistemik damar direnci azalır. Bu da dokulara giden kan akımının azalmasına neden olur.^{15,20,21} Kompleman sisteminin aktivasyonu da endotel hasarı yapar ve damar permeabilitesini direkt veya nötrofilleri aktive ederek indirekt yolla bozar. Ayrıca degranülasyon esnasında nötrofillerden açığa çıkan toksik oksijen radikalleri ve lizozomal enzimler de endotel permeabilitesini artırır. Damar permeabilitesinin artması ve endotel hasarı, ekstrasvazasyon ve mikrotrombüslerin oluşumunu kolaylaştırır. Bir anatomik yerde yeterli endotel hasarı oluşunca, orada organ perfüzyonu bozulur ve organ yetersizliği gelişir^{3, 31} (Şekil 3).



Şekil 3: Endotel disfonksiyonu (31)

Gram (-) bakteri enfeksiyonlarında bakteri hücre duvarı komponentlerinden olan lipopolisakkarid veya başka bir deyişle endotoksinin dolaşıma salınması proinflatuar sitokinlerin üretimini uyarır. Endotoksinin kendisi ve sitokinler makrofajlarda ve vasküler düz kasta indüklenebilir NO üretiminden sorumlu iNOS enzimini direkt gen transkripsiyonu basamağında uyarır ve in vitro NO üretimini artırır.¹⁰⁴

Endotoksinle karşılaşmadan sonra iNOS'un indüksiyonu saatler almaktadır, ancak iNOS bir kez indüklendiğinde aşırı miktarlarda NO sentezlenmesini sağlar ve sonuçta septik vazodilatasyon ve hipotansiyon ortaya çıkar. Septik şokun karakteristik bir özelliği de sempatik sinir uyarısına verilen vasküler yanıtın bozulmasıdır, ve bunda da NO aracılığı söz konusudur.¹⁰⁰

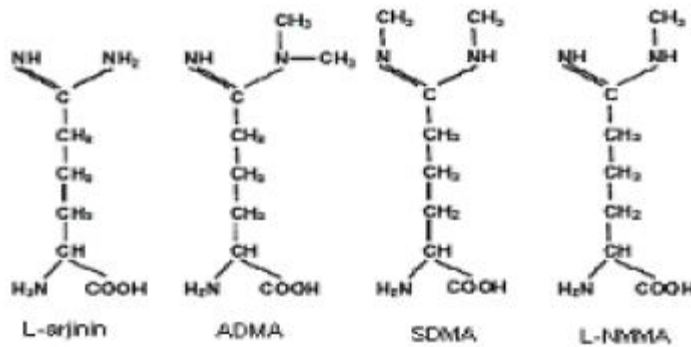
Sepsiste aşırı NO üretimini bloke etmek için diğer bir yaklaşım proinflatuar ve antiinflatuar sitokinler arasındaki dengeyi düzenlemektir.⁹¹ Bu amaçla TNF- α , IL-1 veya IF- γ gibi sitokinlere karşı monoklonal antikor kullanımı denenmiştir. NOS'ı inhibe etmek için enzimatik kofaktörlerinin (örneğin tetrahidrobiopterin) üretiminin inhibisyonu bir diğer yaklaşımdır, ancak deneysel sepsis modellerinde bu konu çalışılmamıştır.

Endotelin antitrombojenik özelliklerine temel katkısı sağlayan molekül NO'dur. Aterosklerotik lezyonların gelişiminde kilit mekanizmalardan biri olan endotelyal fonksiyonunun bozulmasında, bu fonksiyonların devamını sağlayan NO'nun miktarında veya biyoyararlanımında bir azalma olacağı aşıkardır. eNOS'u inhibe etmek yoluyla NO miktarını azaltan ve böylece endotelin koruyucu etkisini ortadan kaldırarak ateroskleroza yol açan temel madde ADMA'dır.^{97,98,99}

2.4. ADMA

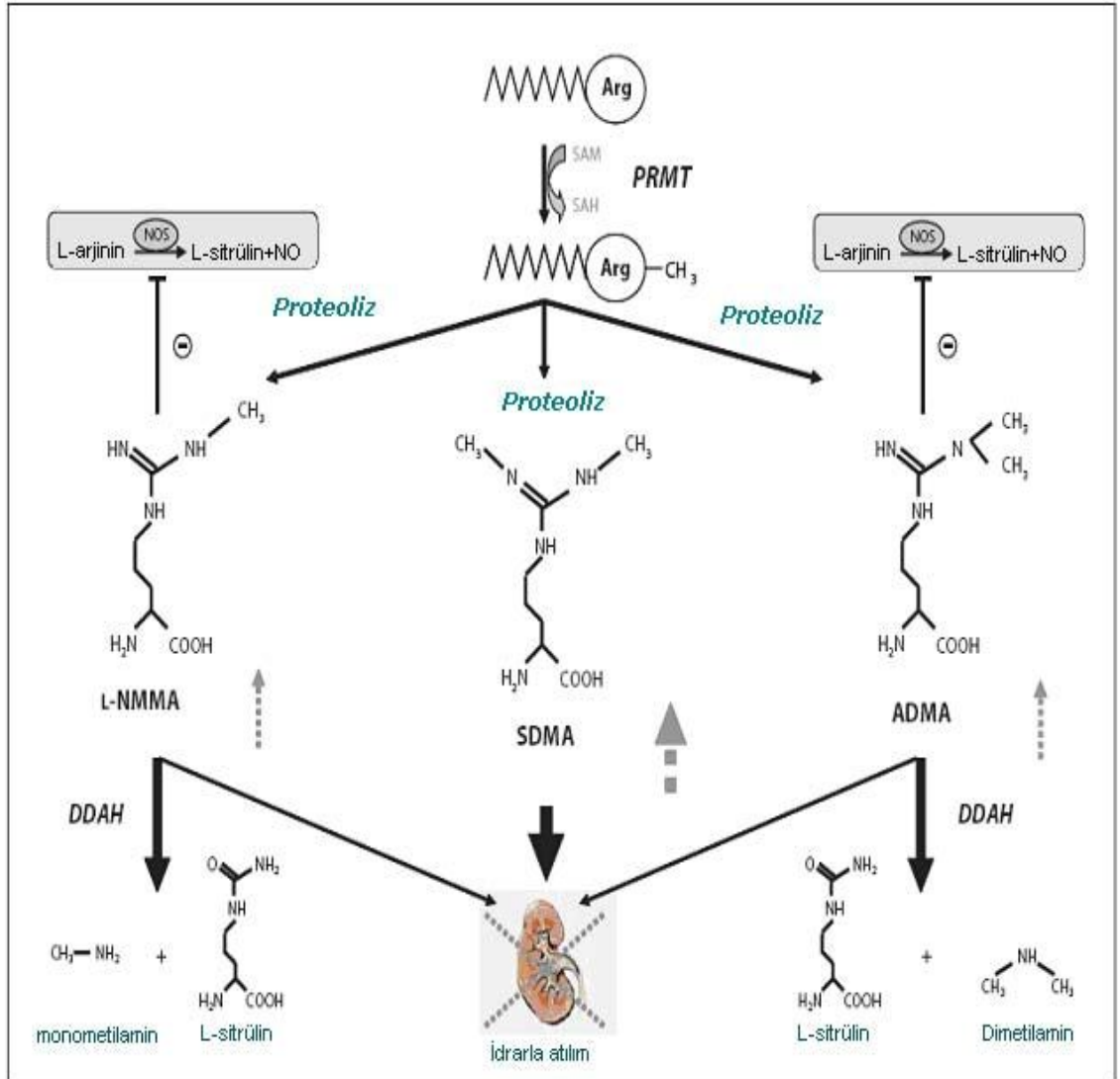
2.4.1. Genel yapısı

ADMA, nükleoproteinlerde bulunan arjinin rezidülerine, protein arjinin metil transferaz (PRMT) enzimi tarafından metil gruplarının sentez sonrası düzenleme ile eklenmesi ve bu proteinlerin yıkılması sonucunda meydana gelen ve önemi giderek artan bir metillenmiş arjinin türevidir. Vücutta daha farklı metillenmiş arjinin bileşikleri de bulunmaktadır. Bu bileşikler bir ya da iki metil grubunun arjinine eklenmesi sonucunda meydana gelmektedirler. ADMA ve SDMA iki metil grubunun eklenmesiyle, L-NMMA ise bir metil grubunun eklenmesiyle oluşan türevlerdir.¹²¹ ADMA, L-Arjininin guanidino analogu; endojen olarak sentezlenen, proteinlerdeki arjinin rezidülerinin PRMT I metillenmesiyle meydana gelen bir türev aminoasittir. PRMT II ise SDMA oluşumunda rol oynar.¹⁰⁹ PRMT'ler yoluyla proteinlerin metilasyonu ve oluşan metil arjinin türevleri gösterilmektedir (Şekil 4).



Şekil 4: Vücutta başlıca metillenmiş metilarjininler (133)

Hem ADMA hem de onun regioisomeri SDMA, renal ekskresyon ile vücuttan atılır.^{13,110} Ancak ADMA, dimetilarginin dimetilaminohidrolaz (DDAH) enziminin etkisi ile sitrulin ve dimetilamine hidrolitik yıkılma yoluyla metabolize olur. L-sitrülin DDAH'nın aktivitesini inhibe edebilir.^{72,73} İşte bu yüzden DDAH aktivitesi çeşitli hastalıklarda endotel fonksiyon bozukluğunun patogenezeine katkıda bulunur.¹³ DDAH, SDMA'ya etki etmemektedir^{7,72} (Şekil 5).



Şekil 5: L- arjinin ve metillenen arjininlerin kimyasal yapısı (121)

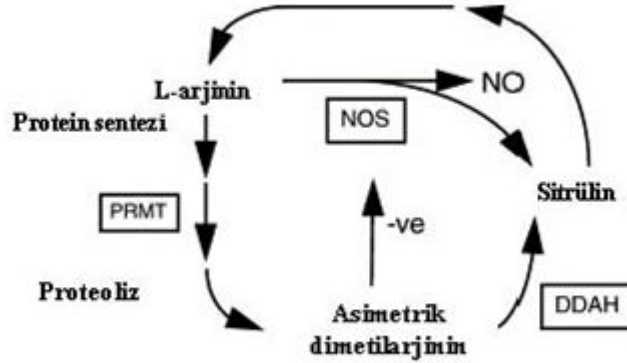
ADMA özellikle endotel hücreleri tarafından sentezlenmektedir.⁶¹ Böger ve ark. yaptıkları çalışma sonucunda insan endotel hücre kültürlerinde de ADMA ve SDMA sentezinin gerçekleştiği saptanmıştır.⁸⁶ Dolaşımda serbest halde veya proteinlere bağlı olarak bulunmaktadır ve normal protein döngüsünün içerisinde sürekli olarak üretilmektedir.¹¹⁵ İnsan, hayvan plazma ve idrarında bulunur. Sağlıklı kişilerde plazma ADMA düzeyi $1.15 \pm 0.19 \mu\text{M}$ 'dır.¹²² Hücre içi ADMA miktarı plazmada bulunana düzeyden yaklaşık olarak 10 kat fazladır.⁷⁹

Bugüne kadar serbest metil arjininden ADMA sentezinin direkt yolu tanımlanmamıştır.¹²¹ Böylece hücre içindeki toplam ADMA miktarı, protein turnover hızına ve proteinlerdeki arjinin metilasyonunun miktarına bağlıdır.^{121,125}

2.4.2. ADMA'nın NO ve endotel hasarı ile ilişkisi

2.4.2.1 ADMA'nın NO ile ilişkisi

3 adet metilarjinin (ADMA, SDMA ve L-NMMA) Y taşıyıcı protein adı verilen katyonik aminoasit taşıyıcıları aracılığıyla endotel hücrelerin içine girerler. Metil arjininler birbirleriyle ve arjinin aminoasidi ile hücre içine giriş için yarışır. Yüksek konsantrasyondaki (3-10 μM) ADMA, izole edilmiş kan damarlarında, kültür edilmiş makrofajlarda ve endotel hücrelerinde, L- arjininin hücre içine transportunu engeller. Sonuç olarak NO sentezini NOS aracılı olarak inhibe eder ve endotel fonksiyon bozuklukları gelişmektedir^{77,87,109,114, 119} (Şekil 6).



Şekil 6: ADMA sentezi ve NOS üzerine inhibitör etkisi (77)

DDAH aktivitesinin, metilargininlerin hücre içi konsantrasyonunu belirleyebileceği gibi NOS enziminin kontrolüne de katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.⁷⁸

Bugün, pek çok hastalık durumunda ADMA düzeyi yüksekliği bilinmektedir. NO üretimindeki anormallikler, septik şok, hipertansiyon, multiple skleroz, hiperkolesterolemi ve renal yetmezlik gibi birçok hastalıkta görülmektedir.¹¹⁷ İleri yaş, yüksek plazma ADMA konsantrasyonu ile ilişkilidir.¹²³

Plazma ADMA seviyeleri ile endotel disfonksiyonu arasında ilişki vardır. Hemodiyaliz hastalarında gelişen endotel disfonksiyon, kardiyovasküler olaylar ve mortalitede ADMA sorumlu faktörlerden birisidir.¹⁰⁹

iNOS aktivitesi inflamasyonda çok artıp ve NO'nun çok fazla miktarda üretilmesiyle, üretilen NO süperoksit radikalleriyle birleşip peroksinitrite dönüşür ve NO'nun yarılanma ömrünü azaltır.¹¹³ Peroksinitrit oluşumu süperoksit dismutaz'ın (SOD) süperoksit radikallerini yakalamasından daha hızlı gelişmektedir. Peroksinitritte DDAH'ın aktif bölgesine bağlanarak aktivitesini azaltır, böylece ADMA miktarında artışa ve NO düzeylerinde azalmaya yol açar. Oksidatif stres ADMA yapımında rol alan enzimlerin aktivitelerini değiştirerek ADMA miktarlarında değişime yol açmaktadır.¹²⁴ PRMT aktivitesi reaktif oksijen türleriyle artırılır ve ADMA düzeyleri artar.⁶⁶ ADMA yükselmesine sebep olan bir diğer muhtemel mekanizma da ADMA'nın böbrekten azalmış atılımıdır.^{53,98}

DDAH ve NOS' ın endotelde birlikte lokalize oluşları hücre içi ADMA konsantrasyonunun NO oluşturan hücrelerde aktif ve hücreye spesifik şekilde düzenlendiği hipotezini desteklemektedir.⁸⁹

2.4.2.2 ADMA'nın endotel hasarı ile ilişkisi

Damar düz kasları tarafından salgılanan faktörler daha çok vazokonstrüksiyona sebep olurken, endotel tabakasının salgıladığı faktörler ise daha çok vazodilatasyonda rol alırlar. Endotelde meydana gelen bir harabiyet NO düzeylerinde azalma meydana getirmekte, bu da damar fonksiyonlarının bozulmasına, damar düz kaslarında proliferasyon izlenmesine, damar duvarının esnekliğinin azalmasına ve bunların sonucu olarak akışa-bağımlı vazodilatasyon kaybı ortaya çıkmaktadır.⁶⁵ Endotel bağlı vazodilatasyon bozulmasıyla anlaşıldığı gibi, artan ADMA düzeyleri indirgenmiş NO sentaz ile ilişkilidir.¹³

Klinik ve deneysel çalışmalar endotel disfonksiyonunu, artmış oksijen kökenli serbest radikal üretimiyle ilişkilendirmiştir.⁶⁶ NO'ın yarılanma ömrü oksidatif stres altında azalmaktadır. NO süperoksit anyonlarıyla birleşmekte, peroksinitrit meydana gelmekte ve meydana gelen bu ürün lipit peroksidasyonuna yol açmaktadır. ADMA, NOS aktivitesini inhibe ettiğinden dolayı NO düzeylerinde bir azalmaya yol açmakta, bunun sonucu olarak endotel fonksiyon bozuklukları gelişmektedir.^{67,68} ADMA düzeyi endotelyal disfonksiyon ve ateroskleroz ile bağlantılı olarak yükselmektedir.^{81,82}

O'Dwyer ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada septik şokta NO retiminde NOS inhibitörlerinden ADMA'nın potansiyel regülatör olduğu belirlenmiştir.⁴⁶ Böger ve ark. tarafından yapılan çalışma sonucunda ADMA'nın endoteldeki oksidatif stresi arttırdığı ve endotele monositlerin yapışmasını güçlendirdiği bildirilmiştir. Bu etkilerin ise dışarıdan L-arginin verilmesiyle tersine döndüğü gözlenmiştir.⁷⁹

Yu ve ark. tarafından yapılan çalışmada metilenmiş proteinlerin hidrolizinin artması sonucunda ADMA düzeyinin yükseldiği saptanmıştır.⁶³ Kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde rol oynayan risk faktörleri bulunan kişilerde ADMA düzeyleri yüksek bulunmuştur. Hiperkolesterolemide ³¹, hiperhomosisteinemide ¹⁰, hipertansiyonda ³², hipertrigliseridemide ³³ ADMA düzeyleri yüksektir.

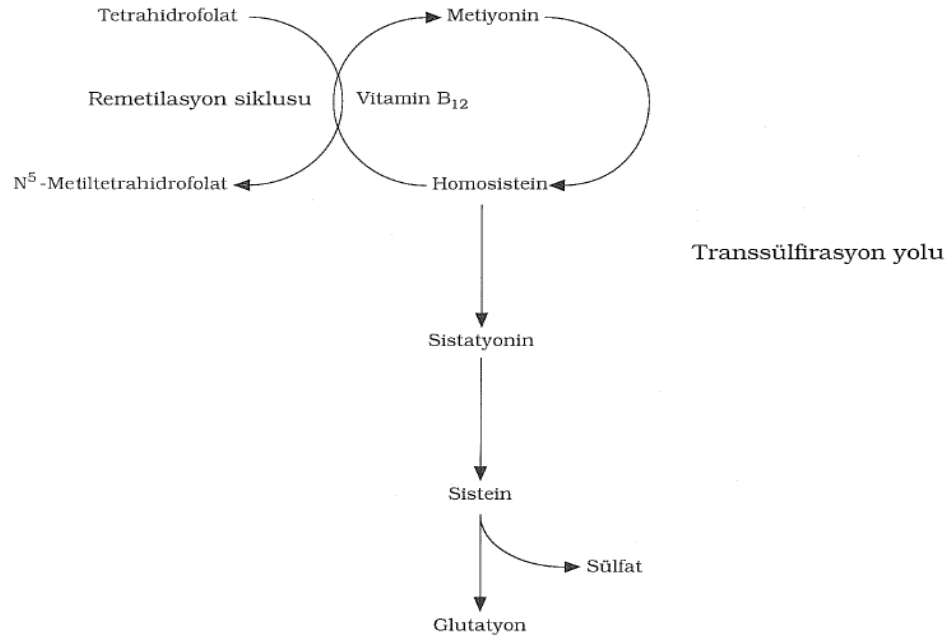
ADMA aynı zamanda damar içine verildiğinde lokal vazokonstriksiyona neden olur. Artık, ADMA ile ilgili biyokimyasal ve fizyolojik yollar daha iyi anlaşılmaktadır.

2.5. HOMOSİSTEİN

2.5.1. Homosistein metabolizması

Protein yapısında bulunmayan, sülfür taşıyan bir amino asittir. Remetilasyon ve transsülfirasyon süklusu olmak üzere iki ana metabolik yolla metabolize edilir.²⁶

Homosistein, S-adenozil metiyonin (SAM) ve S-adenozil homosistein (SAH) aracılığı ile metiyoninden oluşur. Homosisteininin metillenmesi folat ve kobalamin bağımlı bir enzim olan metiyonin sentaz tarafından yapılır²⁶ (Şekil 7). Kofaktör vitamin B12 ve 5-metiltetrahidrofolat ile metiyonin sentaz enzim aracılığı ile tekrar metiyonine metillenebilir.^{13,60}



Şekil 7: Homosistein metabolizması (26)

Homosistein plazmada birçok formda bulunur: 70-80% proteine bağlı, 20-30% disülfid ve çok az bir miktarda serbest ve indirgenmiş halde bulunur. Artmış plazma homosistein seviyeleri, miyokard enfarktüsü, felç ve periferik vasküler hastalıklarda bağımsız bir risk faktörü olarak belirtilmiştir. Folik asit, vitamin B6 ve vitamin B12 eksikliği, sistatiniyon β - sentaz ve 5,10- metilentetrahidrofolat redüktaz gibi metabolizmasında yer alan değişik enzimlerin eksiklikleri, plazma homosistein düzeyinin artmasına yol açmaktadır. Homosistein vasküler fonksiyonu bozarak aterosklerozda komplikasyon riskini artırır.²⁶

2.5.2. Homosistein, endotel disfonksiyonu ve ADMA

Homosistein akut ve kronik endotel fonksiyon bozukluğuna yol açar. Endotel fonksiyon bozukluğu hipertansiyon, hiperlipidemi, diyabet ve hiperhomosisteinemi gibi durumlarda bozulmuş endotel bağımlı gevşemeyi ifade etmek için kullanılır.⁹⁷ Bu duruma hidrojen peroksit sentezi, süperoksit anyon radikallerinin oluşumu, NO sentezinin azalması, hücre adezyon moleküllerinin upregülasyonu, stres cevabı olarak hücre içindeki redoks durumundaki değişiklikler ile sebep olur. Homosisteine maruz kalan endotel hücrelerinde gen ekspresyonunda değişiklikler de tanımlanmıştır.^{51,}

Homosistein, sağlıklı orta yaşlı bireylerde yaş, cinsiyet, vücut kitle indeksi, kan basıncı, vitamin B12 ve kolesterol seviyesinden bağımsız olarak endotel fonksiyon bozukluğunun en kuvvetli habercisidir.⁵⁵ Ancak hiperrhomosisteinemideki endotelial disfonksiyon tartışmalıdır.⁷⁰ Homosisteineminin endotel disfonksiyondaki rolünü açıklayan en geçerli mekanizma, NO'nun oksidatif parçalanmasının artışı, süperoksit anyon, hidrojen peroksit ve disülfidlerin birikimi yolu ile olanıdır. Bir potansiyel

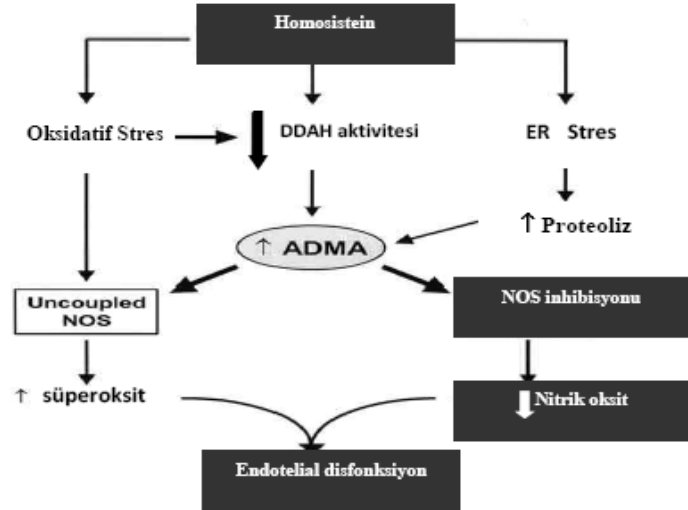
etkisi de, NO sentezinin azalması olabilir.⁶⁹ Antioksidan vitamin verilmesiyle, deneysel hiperhomosisteinemideki endotel vazodilatatör fonksiyon bozukluğu önlenabilir.^{13,70} Bu bulgularla, homosisteinin etkisinin oksidatif stres ile olduğu ileri sürülmüştür.⁷⁰

ADMA ve homosistein arasındaki ilişki aralarında çok etkileşim olduğundan dolayı ilginçtir. L-arjininden dimetilarjininlerin sentezi sırasında kullanılan metil grupları homosistein döngüsünden gelmektedir; dolayısıyla homosistein, ADMA sentezinde dolaylı da olsa rol oynayan bir moleküldür. Homosistein, DDAH enzim aktivitesinin post-translasyonel inhibitörüdür, ADMA birikimi ve NOS inhibisyonuna yol açar.^{13,55,69,70} Bu, enzimin aktif bölgesindeki sistein rezidüsüyle etkileşimi yoluyla olabilir. Homosistein metilasyonda anahtar rolü oynar. SAM arjinin metilasyonunda metil vericisidir, ürünü SAH'dir, bu da homosisteine çevrilir. Metiyonin döngüsünün yüksek olması homosistein seviyelerini artırır bu da endotel disfonksiyonla beraber seyreder. Sistein gibi sülfhidril bloke edici ajanlar DDAH enzimini inhibe ederler. Dithiothreitol gibi dithiol redüktanları bu inhibisyonu engelleyebilir veya tersine çevirebilir.⁵⁵ Sonuç olarak homosistein endotel aracılı-NO-bağımlı vazodilatasyonu bozarak etki gösterir.^{13,69} ADMA, DDAH ile enzimatik olarak parçalanır. Böylece; homosistein ve potansiyel SAH ile DDAH'ın inhibisyonu, ADMA birikiminde artış ve endotel fonksiyonunun inhibisyonu ile sonuçlanır^{13,60} (Şekil 8).

Homosisteinin endotel hücreleri üzerine direkt bir toksik etkisi ve homosistenin tarafından NO'nin oksidatif bir inaktivasyonu söz konusu olabilir.^{54,55,56} Her ne kadar hiperhomosisteinemi MCP-1 (Monosit kemoatraktan protein-1) ekspresyonunu artırarak monositlerin intimaya girişini hızlandırırsa da eNOS ekspresyonuna önemli bir etkisi gösterilememiştir. Bu bulgular normal miktarda NO sentezi olduğunu

ancak NO miktarlarının bir başka mekanizma ile azaltıldığını ve/veya eNOS'un inhibe edildiğini göstermektedir.¹¹

Son 15 yılda, insanlarda ve hayvanlarda yapılan birçok çalışma hiperhomosisteineminin endotel fonksiyon bozukluğuna ADMA seviyesini arttırarak ve NO biyoyararlanımını azaltarak yol açtığını göstermiştir.^{13,57,58,97} ADMA hiperhomosisteinemde vasküler fonksiyon bozukluğuna yol açan ana mediyatördür hipotezi; homosistein ve ADMA arasındaki yakın metabolik bağla ve de birçok hayvan ve klinik çalışma da gözlemlenen plazma tHcy (total homosistein), plazma ADMA ve endotel fonksiyon bozukluğu arasındaki ilişkiyle desteklenmektedir.^{22,52,71,75,97,98} Yoo ve ark.'nın çalışmasında, ADMA konsantrasyonu plazma tHcy seviyeleriyle pozitif olarak ilişkili bulunmuştur. Hiperhomosisteinematik bireylerde hem ADMA, hem de arjinin seviyesini azalttığı gösterilmiştir.⁵⁴



Şekil 8: Homosistein, ADMA ve NO'nun endotel fonksiyon bozukluğundaki rolleri

(13)

Yapılan bazı çalışmalarda da homosisteinin endotel fonksiyon bozukluğuna ADMA seviyesini arttırarak NO biyoyararlanımını azalttığını göstermektedir. Homosistein, NO biyoaktivitesini birçok mekanizma ile azaltabilir.²² Upchurch ve ark. 1997'de yaptıkları bir çalışmaya göre, homosistein doza bağımlı olarak, glutatyon peroksidaz mekanizması ile, NO'nun biyoyararlanımını azaltmaktadır.²³ Homosisteinin NO üretimini etkilediğı bilinen bir konu olmasına rağmen mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır.²⁴

ADMA insanlardaki deneysel hiperhomosisteinemideki zayıflamış akıma-bağımlı dilatasyonun potansiyel bir mediatörüdür.⁵⁵ Böger ve ark. tarafından yapılan çalışmalar sonucunda hiperhomosisteinemide ADMA düzeylerinin artmış olarak bulunmuştur. Yüksek metiyonin ve artmış homosisteinin varlığında endotel hücreleri tarafından ADMA üretimi artmaktadır.^{62,75} Bunun yanı sıra hiperhomosisteinemi tedavisi için verilen folik asidin ADMA'nın da plazma düzeylerinin azalmasını sağladığı rapor edilmiştir.²⁴

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları-Dahiliye Yoğun Bakım bölümündeki hastalar ve kontrol grubundan alınan kanlar Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı Araştırma Laboratuvarında çalışıldı. Çalışma için Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulundan bilimsel araştırma izin alındı. Bu çalışma Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi (01/2009-38 No'lu proje) tarafından desteklenmiştir.

3.1. Çalışmaya Katılacak Grupların Belirlenmesi

Çalışma süresi boyunca yoğun bakıma ağır sepsis veya septik şok tanısı ile yatırılan hastalar veya yoğun bakımda yatışı sırasında ağır sepsis geliştiren hastalar çalışmaya alınacaktır. Sepsis tanısı, sepsis tanı ve tedavisini yönlendiren uluslararası bir kuruluş olan “*Surviving Sepsis Campaign*”nin 2008 kılavuzuna⁴⁵ dayalı olarak konulacaktır. Buna göre şüpheli veya tanı konulmuş herhangi bir infeksiyon odağı ile birlikte SIRS kriterleri olan şu kriterlerden iki veya daha fazlası mevcutsa hasta sepsis olarak kabul edilmiştir.

1. Vücut ısısının $>38^{\circ}\text{C}$ veya $<36^{\circ}\text{C}$ olması,
2. Kalp atım hızının $>90/\text{dk}$ olması,
3. Solunum hızının $>20/\text{dk}$ veya arteriyel karbondioksit basıncının <33 mmHg olması,
4. Lökosit sayısının $>12000/\text{mm}^3$ veya $<4000/\text{mm}^3$ olması, periferik yaymada $>\%10$ 'un üzerinde band formunun bulunması

Sepsise eşlik eden organ yetmezliği (hepatik, renal, kardiyovasküler, nörolojik, solunumsal, hematolojik) veya doku perfüzyon bozukluğu [hipotansiyon (sistolik kan basıncının <90 mmHg olması veya ortalama arter basıncının <70 mmHg olması veya sistolik kan basıncının >40 mmHg veya yaşına göre normal tansiyon değerinden <2SD olacak şekilde düşmesi) veya laktat artışı (4 mmol/L) veya oligüri olması] mevcutsa ağır sepsis, yeterli sıvı tedavisine rağmen düzelmeyen ve vazopressör gerektiren hipotansiyon mevcutsa septik şok kabul edilmiştir.

3.1.1. Hastaların çalışmaya alınma kriterleri

- 1-Ağır sepsis veya septik şok tanısı ile yoğun bakıma yatan hastalar
- 2-Yoğun bakımda ağır sepsis tanısı alan hastalar

3.1.2 Hastaların çalışmamaya alınmama kriterleri

- 1-Gebelik
- 2-Akut miyokard infarktüs varlığı
- 3-Pulmoner emboli varlığı
- 4-İleri dönem kanser hastaları (kemoterapi alan) veya AIDS varlığı

Çalışmamızda Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları-Dahiliye Yoğun Bakım Bölümünde yatan 8 ağır sepsis, 16 septik şoklu hastayı içeren grup ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları-Dahiliye Yoğun Bakım Bölümünde çalışan sağlıklı personelden oluşan, sigara ve alkol kullanmayan, herhangi bir hastalığı bulunmayan, ilaç kullanmayan, rutin biyokimyasal testler normal değerlerde olan 15 sağlıklı gönüllüden oluşan kontrol grubu yer aldı.

3.1.3 Kan alma ve serum hazırlama

Çalışmamızda ağır sepsisli hastalardan alınan kanlar 1.grup, septik şoklu hastalardan alınan kanlar 2.grup ve kontrolden alınan kanlar 3. grup olarak planlanmıştır. 1. ve 2. grubumuzda kanlar hastalık tanısı konduğu anlarda, 3.grubumuz kontrol grubundan da 10 cc biyokimya tüpüne alındı. Tüpler 4000 rpm'de 10 dk santrüj edilip serumları ayrılarak ependorflara konup etiketlendi. Daha sonra tüm ölçümler için serum örnekleri -80°C'de analiz zamanına kadar muhafaza edildi.

3.2 Deneyler

3.2.1. Kullanılan reaktifler ve aletler

Tablo 3: Kullanılan reaktifler ve aletlerin gösterimi

Santrifüj (Sigma 2-5 Sartorius)	İzokratik sisteme sahip floresan detektörlü yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC-Shimadzu)
Hassas terazi (Shimadzu)	Araştırma laboratuvarında mevcut bulunan ve biyokimyasal tetkikler için gerekli olan diğer malzemeler (joje, pipet, tüp...)
Vorteks (Heidolph Reax 2000)	Micro plak okuyucu (Bio-tek ELX800)
Derin Dondurucu (Arçelik 2020D)	HPLC cihazı için faz kolonu (C18)
pH metre (Jenway)	

3.3 Yöntem

3.3.1. ADMA'nın HPLC yöntemiyle ölçümü

ADMA ve SDMA'nın analizi HPLC yöntemiyle floresans dedektörle ölçüldü. Eureka ADMA kiti (100 testlik) kullanıldı.

Tablo 4: ADMA kitinin bileşenleri

Reaktif A : conditioning (koşullanma) solüsyonu N° 1, 1X100 ml
Reaktif B : koşullanma solüsyonu N° 2, 1X100 ml
Reaktif C : koşullanma solüsyonu N° 3, 1X100 ml
Reaktif D : dilüsyon solüsyonu, 1x100 ml
Reaktif E : yıkama solüsyonu N° 1, 1X100 ml
Reaktif F : yıkama solüsyonu N° 2, 1X100 ml
Reaktif I : ayrıştırma solüsyonu 1X 100 ml
Reaktif J : başlama solüsyonu 1X 5 ml
Reaktif L :derivatization (türevlendirme) solüsyonu, 1 X 4,6 mg
Reaktif N : tampon solüsyonu N° 1, 1X 20 ml
Reaktif O : tampon solüsyonu N° 2, 1X 15 ml
Reaktif M : mobil faz,8 X 500 ml
Reaktif P : ADMA için kimyasal standart kalibratör , 1 X 5 ml
Reaktif Q : SDMA için kimyasal standart kalibratör , 1 X 5 ml
Reaktif R : Arjinin için kimyasal standart kalibratör , 1 X 5 ml

Tablo 5: ADMA için HPLC sistemi parametreleri

Kolon	C18 10 µm
Kolon dimensiyonu	125 mm x 4 mm
Akış hızı	0,8 ml/dk
UV dedektörü	Eksitasyon 420 nm- Emisyon 483 nm
Voltaj	Orta
İnjesiyon	5 saniye
İnjesiyon hacmi	100 µl
Basınç	Yaklaşık 120 bar

3.3.1.1 Analitik prosedür

Tablo 6: ADMA çalışma prosedürü

BASAMAK 1	Standart	Numuneler
Reaktif D-solüsyonu seyreltildi	1000 µl	1000 µl
Reaktif P- kimyasal standart solüsyonu seyreltildi.	400 µl	/
Örnekler	/	400 µl
10 ml'lik plastik tüplere kimyasal standart kalibratör ve numuneler konur		
BASAMAK 2	Kimyasal standart kalibratör ve örneklerden 1,4 ml önceden hazırlanmış temizleme kolonuna konur.	
BASAMAK 3	Temizleme kolonlarına 1,0 ml reaktif E – yıkama solüsyonu N° 1 konur, sıvı süzülerek boşalır. 1,0 ml reaktif F - yıkama solüsyonu N° 2 konur, sıvı süzülerek boşalır ve kurulanır.	

BASAMAK 4	Temizleme kolonlarına 1,0 ml Reaktif I-derişimi azaltma solüsyonu eklenir.
BASAMAK 5 (Türevlendirme prosedürü)	200 µl eluate (purifikasyon basamağından) 200 µl reaktif N –tampon solüsyonu 150 µl reaktif O- tampon solüsyonu 30 µl reaktif J –başlama solüsyonu 30 µl reaktif L – türevlendirme solüsyonu (rekonstitüsyondan sonra) 1,5 ml'lik tüplere pipetlenir ve vortekslenir.
BASAMAK 6	30 dakika 20 °C de inkübasyon
BASAMAK 7	150 µl HPLC grade dH ₂ O eklenir ve 5 saniye vortekslenir. Basamak 5'te hazırlanan solüsyondan 100 µl sisteme enjekte edilir. Bu basamaktan sonra örnekler 2-8°C'de 24 saat bekleyebilir.

Bu işlemlerden sonra HPLC sistemindeki pompa, otosampler, fırın ve bunlardan sonra da sistem kontrolör (SCL) power düğmeleri açılır. Bilgisayarla bağlantı kurulur, ADMA metodu seçilerek program çalıştırılır. Numune çalışmaya başlamadan önce sistemden metanollü su geçirilerek 15-20 dakika yıkama yapılır. Daha sonra pompa durdurularak ADMA mobil fazı takılır, sistem mobil fazla dolunca ADMA kolonu takılır, 0,8 ml/dk'lık akış hızında 15-20 dakikada mobil faz atığa atılır. İnjektasyon hacmi 100 µl olarak kalibratör, normal ve anormal kontrol okutularak cihaz ayarlanır. Numuneler okutulur. Çalışma bittikten sonra pompa durdurulur, kolon çıkartılır ve daha sonra mobil faz yerine metanollü su takılarak sistem yıkanarak temiz olarak kapatılır.

ADMA kolonu takılı iken çalışma esnasında çıkan ADMA pikinin ardından hazırlanan yönteme uygun olarak SDMA piki de gözlenir. Referans aralıkları ADMA için 0.369 $\mu\text{mol/l}$ -SDMA için 0.29-0,63 $\mu\text{mol/l}$ 'dir.

3.3.2. Homosisteinin HPLC yöntemiyle ölçümü

Serum homosisteinini ölçerken sülfidril (tiol) gruplarına spesifik ajanlarla kolon öncesi işaretleme (derivatizasyon) yapılarak floresans dedektörlü sahip ölçüm yöntemini kullanıldı. Immunochrom HPLC Homosistein kiti (100 testlik) ile çalışıldı.

3.3.2.1.Numune hazırlama:

Tablo 7: Homosistein çalışma prosedürü

Numune, kalibratör veya kontrol	50 μl
İnternal standart	50 μl
Ayırma reaktifi	20 μl
Türevlendirme	100 μl Konularak 5-6 sn vortekslenir
10 dakika 60°C'de İnkübasyon için bekletilir. Sonra hemen buzdolabında soğutulur.	
Çökelme	100 μl eklenerek 5-6 sn vortekslenir
2-8°C'de 5 dakika inkübasyon için beklenir. 5 dakika 10000g'de santrifüj yapılır	

Tablo 8: Homosistein için HPLC sistemi parametreleri

Kolon	C18 10 µm
Kolon boyutu	125 mm x 4 mm
Akış hızı	1,0 ml/dk
UV dedektörü	Eksitasyon 385 nm- Emisyon 515 nm
Voltaj	Orta
İnjesiyon	5 dakika
İnjesiyon hacmi	20 µl
Basınç	Yaklaşık 100 bar

HPLC sistemindeki pompanın, otosamplerın, fırının ve bunlardan sonra da SCL power düğmelerinden açılır. Bilgisayarla bağlantı kurulur, metodun altından homosistein programı seçilerek program çalıştırılır. Numune çalışmaya başlamadan önce sistemden metanollü su geçirilerek 15-20 dakika yıkama yapılır. Daha sonra pompa durdurularak homosistein mobil fazı takılır, sistem mobil fazla dolunca homosistein kolonu takılır, 1.0'lik akış hızında 15-20 dakikada mobil faz atığa atılır. İnjesiyon volumü 20 µl olarak kalibratör, normal ve anormal kontrol okutularak cihaz ayarlanır. Bu işlemden sonra numuneler okutulur. Çalışma bittikten sonra pompa durdurulur, kolon çıkartılır ve daha sonra mobil faz yerine metanollü su takılarak sistem yıkanarak temiz olarak kapatılır.

Referans aralıklar: 6-15 µmol/l olarak bildirilmektedir.

3.3.3. Nitrit-Nitrat düzeylerinin kolorimetrik deney kiti kullanılarak ölçümü

Kontrol grubu ve hasta grubundan elde edilen serum örneklerinde nitrit-nitrat düzeyleri colorimetrik deney kiti (Cayman chemical Co.) kullanılarak ölçülmüştür. Fizyolojik koşullarda NO hızla nitrit ve nitrate okside olur. Deney prensibinde nitratın nitrite redüksiyonu şarttır ve enzimatik reaksiyonla (Nitrat redüktaz) gerçekleşir. Ortamdaki total nitrit ise Griess 1 ve Griess 2 ile reaksiyon sonucu oluşan mor renkli azo bileşiğinin 540 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri ile belirlenir.¹³²

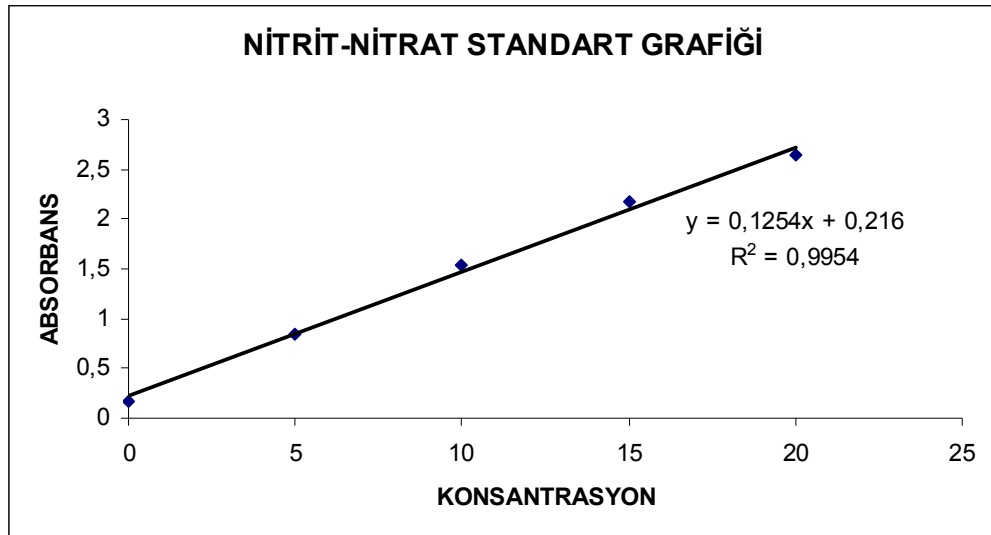
Tablo 9: Nitrit-nitrat deney düzeneği

	Kör	Numune
Serum	-	80 µl
Ultra saf su	80 µl	-
Kofaktör	10 µl	10 µl
Enzim (Nitrat redüktaz)	10 µl	10 µl
1 saat inkübasyon		
Gres 1 solüsyonu	50 µl	50 µl
Gress 2 Solüsyonu	50 µl	50 µl
10 dakika inkübasyonu takiben 540 nm okut.		

Deneyde standart olarak sodyum nitrat (0-35 µM) kullanılmıştır. Grafikten elde edilen $y=ax+b$ denklemine göre serum örneklerinde nitrit-nitrat düzeyleri hesaplanmıştır.

Tablo 10: Nitrit–nitrat için standart değerleri

STANDART	ORTALAMA DEĞER
0	0,17
5	0,84
10	1,53
15	2,17
20	2,64



Şekil 9: Nitrit-nitrat için standart grafiği

3.4. Sonuçların Analizi

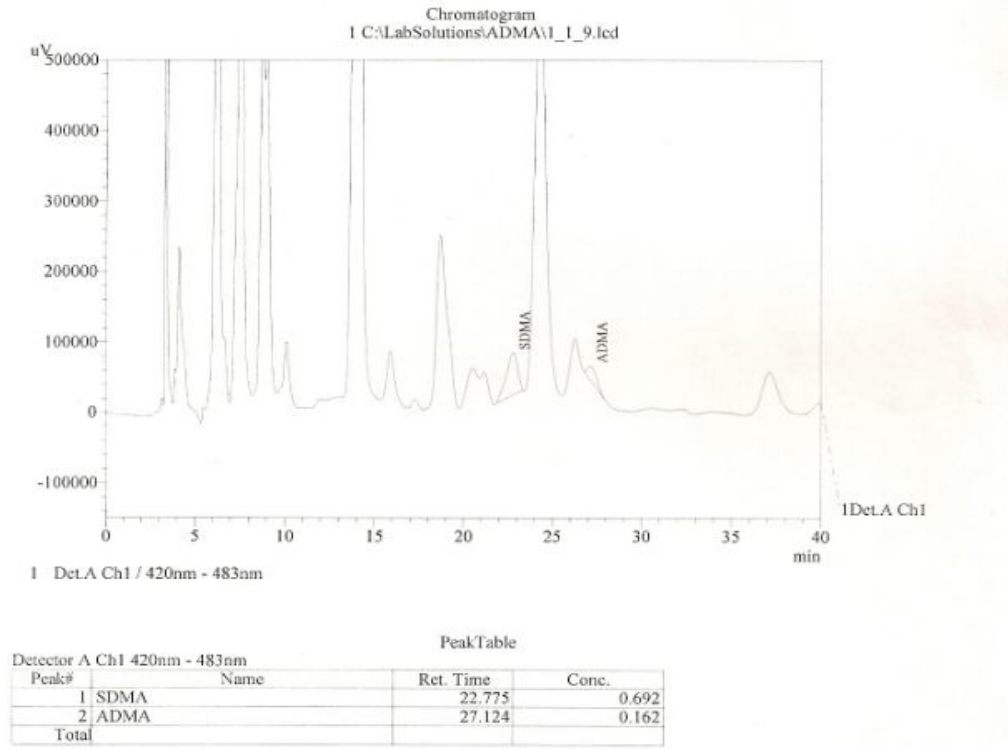
Verilerin analizi SPSS (Statistical Package for Social Science) 11.5 paket programında yapıldı. Hasta ve kontrol grubunda karşılaşma yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler ortalama $\pm$ standart sapma biçiminde ifade edildi. Gruplar arasında laboratuvar ölçümleri yönünden farkın önemliliği Mann Whitney U testi ve Wilcoxon İşaret testi kullanılarak araştırıldı. Sonuçlar istatistiksel olarak $p<0.05$ değeriinde anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

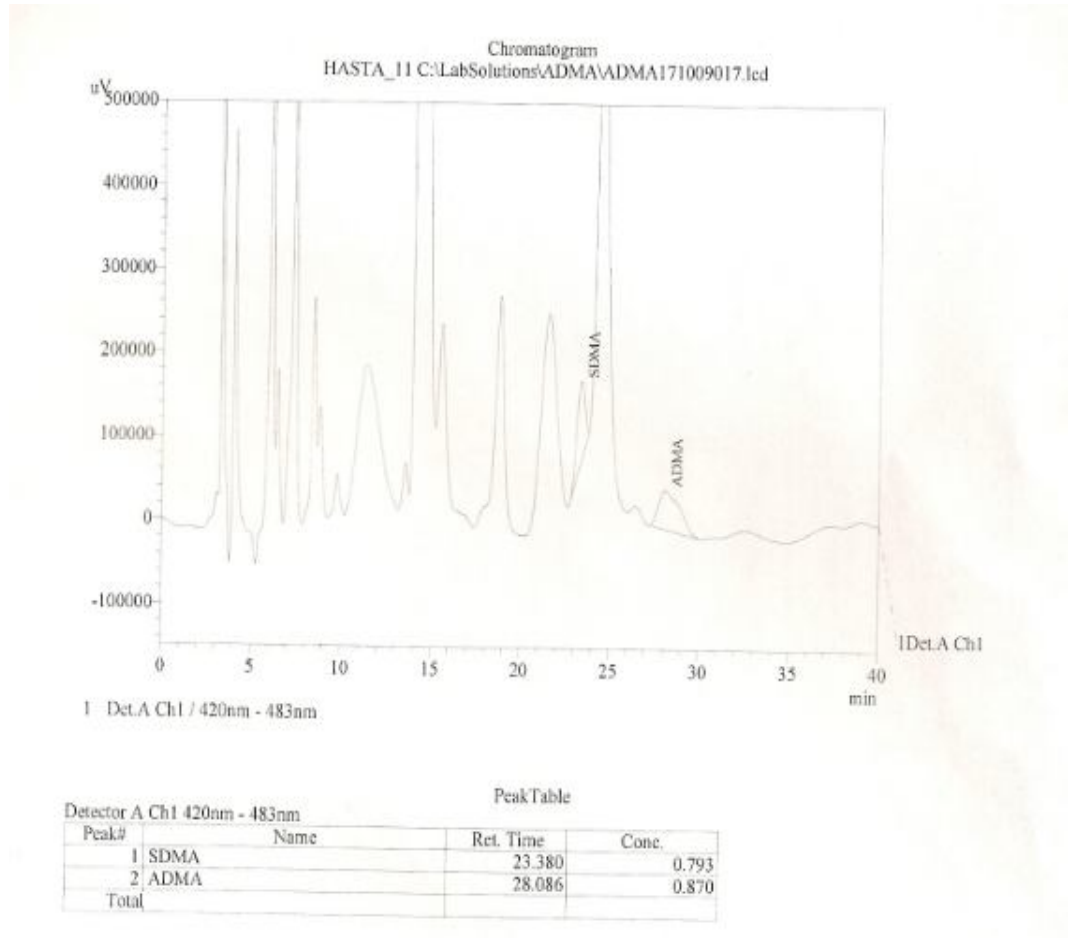
Bu çalışmada, ağır sepsis ve septik şok tanısı almış hasta gruplarında ADMA, SDMA, homosistein ve NO düzeylerine bakılarak aralarındaki ilişki kontrol grubu ile karşılaştırılarak incelenmiştir.

4.1 Kontrol, Ağır Sepsis ve Septik Şoklu Hastalarda ADMA Seviyeleri

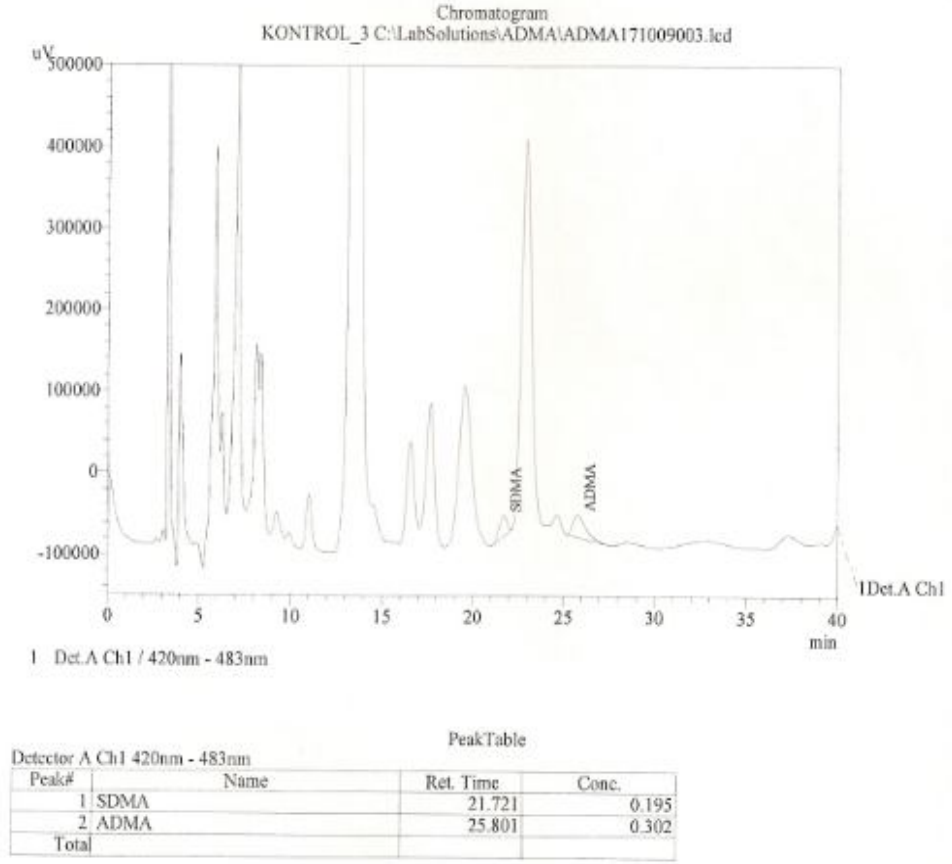
Şekil 10'da ağır sepsisli hasta grubuna ait ADMA ve SDMA sonuç kromotogramı gösterilmektedir. Şekil 11'da septik şoklu hastaya ait ADMA ve SDMA sonuç kromotogram gösterilmektedir. Şekil 12'de kontrole ait ADMA ve SDMA sonuç kromotogram gösterilmektedir.



Şekil 10: Ağır sepsisli hastaya ait ADMA-SDMA kromotogramı



Şekil 11: Septik şoklu hastaya ait ADMA-SDMA kromotogramı



Şekil 12: Kontrole ait ADMA-SDMA kromotogramı

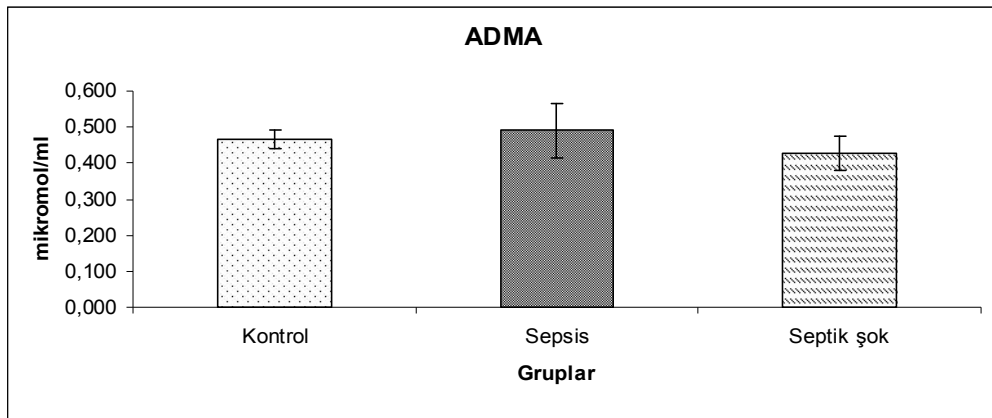
Gruplara ait (kontrol-ağır sepsis, kontrol-septik şok ve ağır sepsis-septik şok) ADMA p değerleri tablo 11’de verilmiştir. Gruplara ait ADMA ortalama±standart sapma değerleri tablo 12’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre kontrol ve ağır sepsisli hasta grubu, kontrol grubu septik şok hasta grubu ve ağır sepsis-septik şok hasta grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). ADMA seviyelerinde anlamlı bir artış gözlenmemiştir (Şekil 13).

Tablo 11: ADMA sonuçları için p değerleri

GRUPLAR	p DEĞERLERİ
KONTROL GRUBU-AĞIR SEPSİSLİ HASTA GRUBU	0,843
KONTROL GRUBU-SEPTİK ŞOKLU HASTA GRUBU	0,446
AĞIR SEPSİSLİ HASTA GRUBU-SEPTİK ŞOKLU HASTA GRUBU	0,583

Tablo 12: ADMA sonuçları için kontrol ve hasta grupları arasındaki ortalama±standart sapma değerleri

GRUPLAR	ORTALAMA± STANDART SAPMA
KONTROL GRUBU	0,468±0,026
AĞIR SEPSİSLİ HASTA GRUBU	0,490±0,074
SEPTİK ŞOKLU HASTA GRUBU	0,428±0,047



Şekil 13: Kontrol ve hasta grupları arasında ADMA ölçümünün istatistiksel sütun grafiği

4.2 Kontrol, Ağır Sepsis ve Septik Şoklu Hastalarda SDMA Seviyeleri

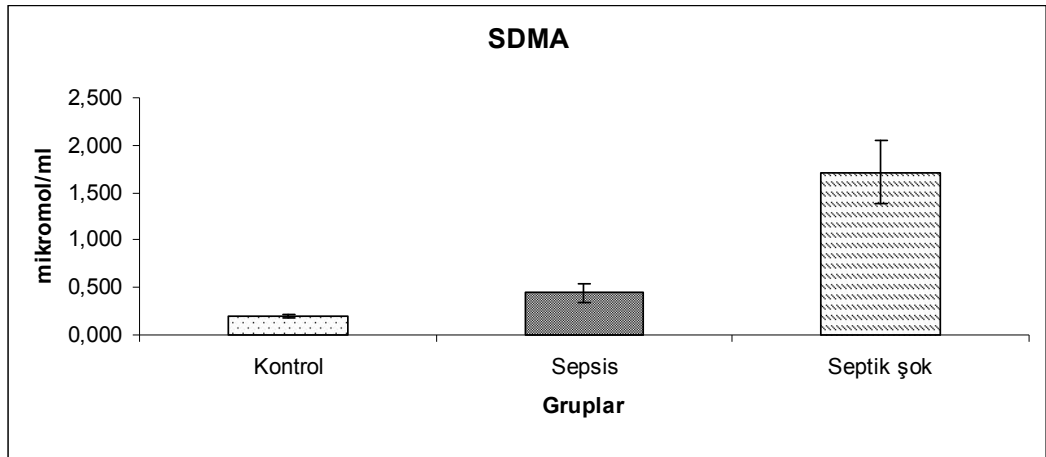
Şekil 10'da ağır sepsisli hastaya ait SDMA'nın sonuç kromotogramı gösterilmektedir. Şekil 11'da septik şoklu hastaya ait SDMA'nın sonuç kromotogramı gösterilmektedir. Şekil 12'de kontrol grubuna ait SDMA'nın sonuç kromotogram gösterilmektedir. Gruplara ait (kontrol-ağır sepsis, kontrol-septik şok ve ağır sepsis-septik şok) SDMA sonuçları için tablo 13'de p değerleri verilmiştir. Gruplara ait SDMA ortalama±standart sapma tablo 14'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre kontrol-ağır sepsisli hasta grubu, kontrol-septik şoklu hasta grubu ve ağır sepsis-septik şoklu hasta grup arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,05$) (şekil 14).

Tablo 13: SDMA sonuçları için p değerleri

GRUPLAR	p DEĞERLERİ
KONTROL GRUBU-AĞIR SEPSİSLİ HASTA GRUBU	0,017
KONTROL GRUBU-SEPTİK ŞOKLU HASTA GRUBU	0
AĞIR SEPSİSLİ HASTA GRUBU-SEPTİK ŞOKLU HASTA GRUBU	0,017

Tablo 14: SDMA için kontrol ve hasta grupları arasındaki ortalama±standart sapma değerleri

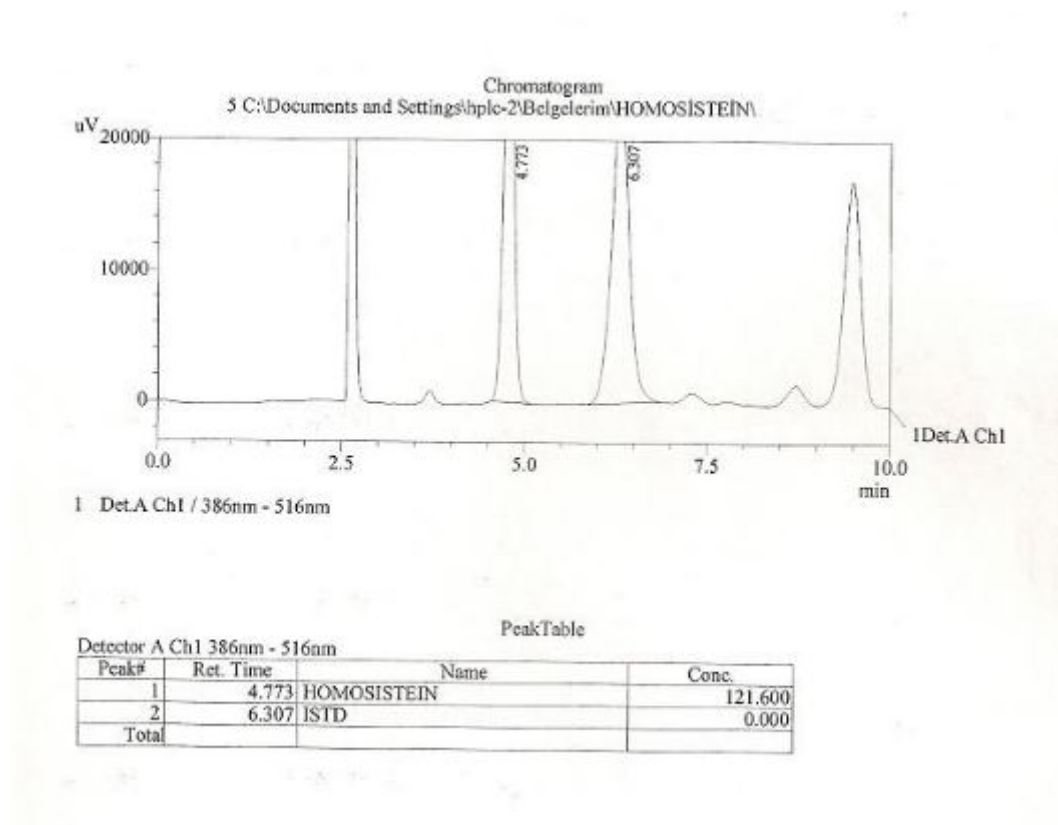
GRUPLAR	ORTALAMA± STANDART SAPMA
KONTROL GRUBU	0,191±0,018
AĞIR SEPSİSLİ HASTA GRUBU	0,443±0,095
SEPTİK ŞOKLU HASTA GRUBU	1,713±0,335



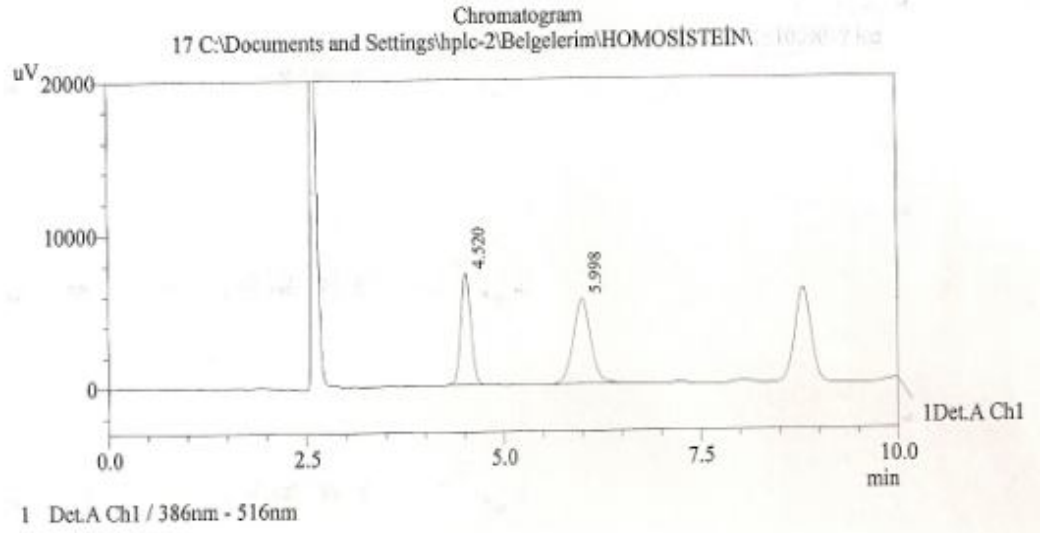
Şekil 14: Kontrol ve hasta grupları arasında SDMA ölçümünün istatistiksel sütun grafiği

4.3 Kontrol, Ağır Sepsis ve Septik Şoklu Hastalarda Homosistein Seviyeleri

Şekil 15'te ağır sepsisli hastaya ait homosistein sonuç kromotogramı gösterilmektedir. Şekil 16'da septik şoklu hastaya ait homosistein sonuç kromotogramı gösterilmektedir. Şekil 17'de kontrol grubuna ait homosistein sonuç kromotogram gösterilmektedir.



Şekil 15: Ağır sepsisli hastaya ait homosistein sonuç kromotogramı

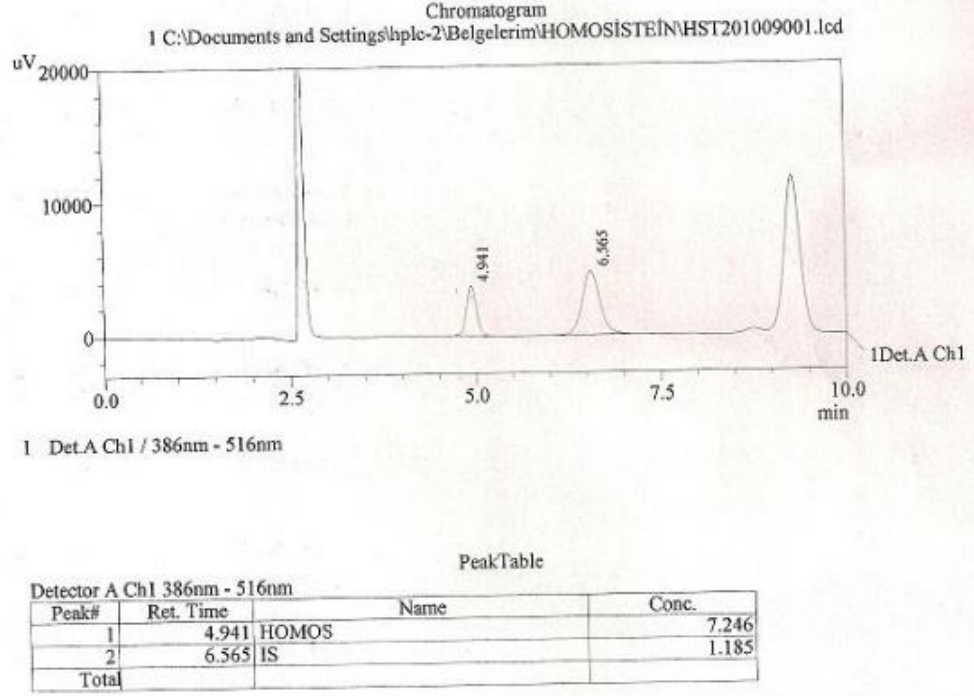


PeakTable

Detector A Ch1 386nm - 516nm

Peak#	Ret. Time	Name	Conc.
1	4.520	HOMOSISTEIN	106.513
2	5.998	ISTD	0.000
Total			

Şekil 16: Septik şoklu hastaya ait homosistein sonuç kromotogramı



Şekil 17: Kontrole ait homosistein sonuç kromotogramı

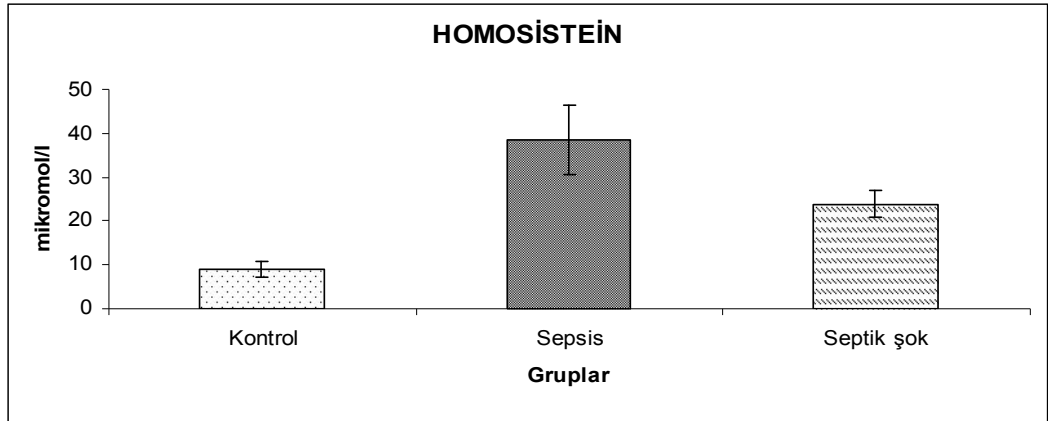
Gruplara ait (kontrol-ağır sepsis, kontrol-septik şok ve ağır sepsis-septik şok) homosistein p değerleri tablo 15'te verilmiştir. Gruplara ait Grplara ait homosistein ortalama±standart sapma değerleri tablo 16'da verilmiştir. Bu sonuçlara göre kontrol-ağır sepsisli hasta grubunda ve kontrol-septik şoklu hasta grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,05$). Ağır sepsisli ve septik şok grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (Şekil 18).

Tablo 15: Homosistein sonuçları için p değerleri

GRUPLAR	p DEĞERLERİ
KONTROL GRUBU-AĞIR SEPSİSLİ HASTA GRUBU	0,001
KONTROL GRUBU-SEPTİK ŞOKLU HASTA GRUBU	0
AĞIR SEPSİSLİ HASTA GRUBU-SEPTİK ŞOKLU HASTA GRUBU	0,065

Tablo 16: Kontrol ve hasta grupları arasındaki ortalama±standart sapma değerleri

GRUPLAR	ORTALAMA± STANDART SAPMA
KONTROL GRUBU	9,00±1,92
AĞIR SEPSİSLİ HASTA GRUBU	38,46±7,83
SEPTİK ŞOKLU HASTA GRUBU	23,90±3,15



Şekil 18: Kontrol ve hasta grupları arasında HOMOSİSTEİN ölçümünün istatistiksel sütun grafiği

4.3 Kontrol, Ağır Sepsis ve Septik Şoklu Hastalarda Nitrit-Nitrat Seviyeleri

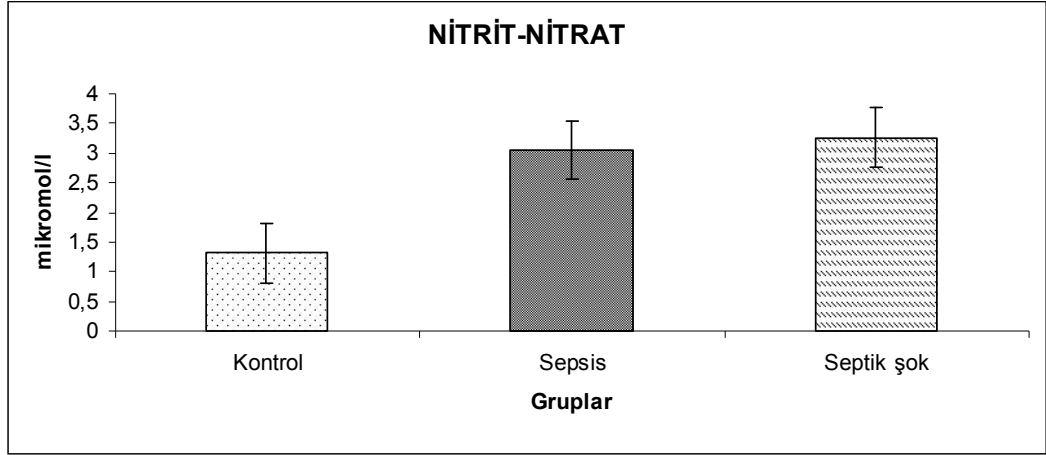
Gruplara ait (kontrol-ağır sepsis, kontrol-septik şok ve ağır sepsis-septik şok) nitrit-nitrat p değerleri tablo 17’de verilmiştir. Gruplara ait nitrit-nitrat ortalama±standart sapma değerleri tablo 18’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre kontrol grubu ile septik şoklu hasta grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,05$). Kontrol grubu-ağır sepsisli hasta grubu ile ağır sepsisli hasta grubu-septik şok grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (Şekil 19).

Tablo 17: Nitrit-nitrat sonuçları için p değerleri

GRUPLAR	p DEĞERLERİ
KONTROL GRUBU-AĞIR SEPSİSLİ HASTA GRUBU	0,082
KONTROL GRUBU-SEPTİK ŞOKLU HASTA GRUBU	0
AĞIR SEPSİSLİ HASTA GRUBU-SEPTİK ŞOKLU HASTA GRUBU	0,453

Tablo 18: Kontrol ve hasta grupları arasındaki ortalama±standart sapma değerleri

GRUPLAR	ORTALAMA± STANDART SAPMA
KONTROL GRUBU	1,32±0,16
AĞIR SEPSİSLİ HASTA GRUBU	3,05±0,77
SEPTİK ŞOKLU HASTA GRUBU	3,26±0,35



Şekil 19: Kontrol ve hasta grupları arasında NO ölçümünün istatistiksel sütun grafiği

Tablo 19: Tüm çalışılan parametrelerin ve grupların sonuçlarının karşılaştırılması ile ortalama±standart hata ve p değerleri

Parametreler	Kontrol Grubu	Ağır Sepsisli Hasta Grubu	Septik Şoklu Hasta Grubu
ADMA	0,468±0,026	0,490±0,074	0,428±0,047
p değeri	0,843	0,583	0,446
SDMA	0,191±0,018	0,443±0,095	1,713±0,335
p değeri	0,017	0,017	0
Homosistein	9,00±1,92	38,46±7,83	23,90±3,15
p değeri	0,001	0,065	0
Nitrit-nitrat	1,32±0,16	3,05±0,77	3,26±0,35
p değeri	0,082	0	0,453

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İnflamasyon, inflamatuvar bir stimulusa cevap olarak elde edilen dinamik olaylar zinciridir. İnflamasyon alanında vazodilatasyonu takiben kan akımı değişiklikleri, damar permeabilite artışı, ödem sıvısı oluşumu, lokal lökosit birikimi gözlenir. Vazodilatasyon, vasküler permeabilitedeki değişim ve ekstrasvazasyon, lökosit migrasyonu gibi inflamasyonla beraber giden olaylarda NO önemli rol oynar.¹

Sepsis, birçok sistemi tutan, özellikle hemodinamik değişikliklere yol açan, şok, organ fonksiyon bozukluğu ve organ yetmezliğine kadar giden öldürücü bir enfeksiyon hastalığıdır. Sepsiste hedef organ damar endotelidir ve hemen hemen bütün mediyatörler damarlar üzerine etkilidir.

Endotel disfonksiyonunun başlıca sebebi azalan NO'nun biyovarlığıdır. NO, L-argininden NOS yoluyla vasküler endotelden üretilen potent biyolojik bir vazodilatatördür. Vasküler hastalıklarda, NO'nun biyovarlığı eNOS'un NO üretmesi ve/veya artan oksidatif stres nedeni ile NO parçalanması gibi birçok mekanizma tarafından bozulabilir. eNOS'un inaktivatörü NO'in endojen inhibitörü olan ADMA'nın yüksek plazma değerleri ile ilişkilidir.³ ADMA'nın endotelial fonksiyon bozukluğunda ve koroner kalp hastalığında yeni bağımsız bir risk faktörü olduğu öne sürülmüştür.⁴

ADMA'nın, hücrel stres (örneğin hipoksi) gibi durumlarda arttığı gösterilmiştir. Hipoksi de hemorajik şokun en karakteristik özelliğidir. ADMA düzeylerinin hemorajik şokta yükseldiği görülmüştür. Şiddetli hemoraji durumunda oluşan oligüriden dolayı azalmış üriner atılım nedeniyle ADMA seviyeleri artar. Bu şok tablosu içerisinde ADMA birikimi nedeniyle Arjinin-NO yolağının bozulmasından dolayı bir fizyolojik mekanizma olarak akut hipovolemide sistemik kan basıncını düzenleyebileceği Aneman ve ark. tarafından yapılan çalışmalar sonucunda önerilmiştir.^{105,118} Son yıllarda ADMA'nın NO sentezinin regülasyonunda önemli rol oynayabileceğini göstermiştir.

Valance ve arkadaşları tarafından 1992'de ADMA'nın bulunmasından sonra yapılan araştırmalar, ADMA düzeylerindeki artışın endotel disfonksiyonu ile ilişkili olduğunu ve ADMA'nın bir kardiyovasküler risk faktörü olarak nitelendirilebileceğini bildirmişlerdir.⁶⁴ ADMA plazma düzeyi 10 µM miktarlarında olduğunda endotel bağımlı vazodilatasyonu ve vasküler dokuda bulunan NOS'u inhibe eder.^{77,87} Bizim çalışmamızda bu çalışmadan farklı olarak septik şoklu hastalarla çalışılmış ve bu grubumuzda ADMA seviyelerinde anlamlı bir artış gözlenmemiştir. ($p>0,05$) ADMA artışını bu hastalık grubunda etkileyen başka faktörler olabilir. Septik şoklu hastalarda artan NO seviyelerine karşı inhibitör etkisiyle ADMA seviyelerinde de bir artış beklenmektedir. Ancak ADMA endotel hücrelerinde NO sentezini etkileyebilecek kadar üretilmektedir ancak hangi faktörlerin hangi mekanizma ile ADMA düzeylerini etkilediği henüz bilinmemektedir.⁶⁴

Nijveldt ve çalışma arkadaşları yoğun bakım hastalarının üzerinde yaptıkları çalışmada ADMA'nın çok güçlü bir prediktör olduğunu belirlemişler. Yoğun bakım ünitelerindeki ciddi organ disfonksiyonu

yüzünden yatan hastalarda hastaların plazma ADMA düzeyleri belirlenmiş ve ADMA seviyesi en yüksek çeyrekteki hastaların mortalite oranı en düşük çeyrekteki hastaların mortalite oranından 17 kat fazla olduğunu göstermişlerdir. ADMA düzeyleri mortalite açısından bağımsız olarak artan bir belirleyici olarak belirtilmiştir.^{84,116}

SDMA, ADMA'nın inaktif yapısal bir izomeridir ve ADMA'nın aksine NOS inhibisyonu yapmaz.^{25,28} Aslında L-arjinin, ADMA ve SDMA hücre içine giriş için ortak yolları kullanırlar. Böylece, yüksek plazma SDMA konsantrasyonu hücre içine alımda, L-arjininin ile yarışarak dolaylı olarak NO üretimini azaltabilir.¹²² Ueda ve ark.'nın 2007'de yaptıkları çalışmada da, SDMA' nın NOS üzerinde inhibitör etkisinin olmadığını belirtmişlerdir fakat arjinin ve ADMA ile hücre giriş yolunu etkileyerek NO üretim hızında dolaylı yoldan etkisi olduğunu belirtmişlerdir.^{12,109,121,123,124} Bizim çalışmamızda da hasta grubunda kontrol grubuna oranla anlamlı derecede yükselme gözlenmiştir. ($p<0,05$) Bu durum SDMA'nın dolaylı da olsa artan NO'nun üretim hızını etkileyebileceğini gösterilmiştir.

iNOS ile NO aşırı üretiminin sepsisteki sistemik vazodilatasyondan sorumlu major mekanizma olduğu düşünülmektedir.³³ Smith ve ark.'nın 20 sepsis 3 travma yoğun bakım hastası, 29 kontrol grubu ile yaptıkları çalışmada idrar nitrat-nitrit konsantrasyonları travma ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yüksektir.⁴⁸ Septik şokta gözlenen kontraktıl ajanlara vasküler yanıt azlığı, hipotansiyon ve miyokard depresyonu tablosundan aşırı NO üretimi sorumlu tutulmaktadır.¹⁰³ Sepsisin klinik en önemli bulgusu periferik vasküler tonusun belirgin olarak azalmasıdır. Sepsis ve inflamasyonda iNOS enziminin tetiklenmesi sonucunda NO üretimi artar ve sepsis sırasındaki periferik vasküler tonus

değişikliklerinden sorumludur. Travma durumunda ise ekstrahepatik arginaz I ekspresyonu ve aktivasyonu artarken NO sentezi azalır.⁴⁷

Preiser ve ark. 16 yanık ve 6 kontrol ile yaptıkları çalışmada yanık sonrası sepsis gelişen hastalarda plazma nitrit-nitrat konsantrasyonları sepsis görülmeyen hastalardan daha yüksektir.¹³¹

Hanan ve ark.'nın ratlarda endotoksinle oluşturdukları septik şokta beyin dokusunda yaptıkları incelemede nitrit-nitrat miktarının anlamlı derecede arttığını bildirmektedirler.¹²⁸

Evans ve ark. yaptıkları değişik çalışmalarda septik şoklu plazmalarında nitrat konsantrasyonlarının arttığını gözlemlemişlerdir. Bu araştırmacılar sepsisemi sonucu iNOS aktivitesinin artmasıyla NO'nin fazla üretildiğini ve bu artan NO'nin vazodilatasyona, miyokardiyal fonksiyon bozukluklarına neden olduğunu ve bunun yanında plazma nitrat miktarının artışına neden olduğunu göstermişlerdir.¹²⁹

Sepsisli hastalarda, damar gerginliğinde bir azalma ile birlikte, idrarda NO'nin parçalanma ürünleri olan nitrit ve nitrat miktarındaki artış, septik şokta kalp-damar sisteminde meydana gelen değişimlerin NO kaynaklı olduğunu düşündürmüştür. Yapılan çalışmalar sonucunda, endotoksinlerin başlangıçta endotelial cNOS kaynaklı NO ve ardından da fazla miktarda iNOS kaynaklı NO salınımına neden olarak hipotansiyon meydana getirdiği belirlenmiştir.⁸⁰ Gram (-) bakteriyel infeksiyonlarda, bakteri hücre duvarının polisakkarit komponentleri iNOS'u uyarak aşırı NO yapımına bağlı şiddetli hipotansiyon, şok ve ölüme neden olabilir, NOS

inhibitörleri hipotansiyonu geri döndürebilir. NOS inhibitörleri doza bağlı olarak inflamasyondaki ödem ve vasküler permeabilite artışını önler. Halen kesin bulgu ve korelasyon bulunamamıştır.⁹ Bizim çalışmamızda da septik şoklu hasta grubunda nitrit-nitrat seviyelerinde anlamlı bir artış gözlenmiştir. ($p<0,05$) Bunun aksine ağır sepsisli hasta grubunda nitrit-nitrat seviyelerinde anlamlı bir artış gözlenmemiştir. Kesin bir bulgu olmaması ve mekanizmanın tam anlaşılamaması yorum yapmamızı kısıtlamaktadır.

Homosisteinin NO üretimini etkilediği bilinen bir konu olmasına rağmen mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır ve araştırma grupları birbiri ile çelişen sonuçlar elde etmişlerdir. Homosisteinin NO sentezini arttırdığını gösteren çalışmaların yanı sıra homosisteinin NO sentaz aktivitesine etki etmeden, NO düzeyini azalttığı bulguları da mevcuttur.⁵⁹ Hiperhomosisteineminin endotel bozukluğunu hangi mekanizma ile gerçekleştirdiği açıklığa kavuşmamıştır.²⁴ Yüksek homosistein düzeyi, endotel disfonksiyonuna ve ateroskleroz gelişimine yol açması nedeniyle koroner hastalıklarda bağımsız bir risk faktörü olduğu belirtilmiştir.⁸ Homosistein, deneysel hayvan modellerinde ve in vitro olarak endotel fonksiyonunu bozmaktadır.⁵⁵ Bizim çalışmamızda hasta grupları arasında anlamlı bir fark bulunmazken, ($p>0,05$) ağır sepsisli ve septik şoklu hastalarda kontrol grubuna oranla homosistein düzeyleri anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. ($p<0,05$) Bu yükselme sepsisli hastalarda endotel disfonksiyona bağlı olabilir. Kesin bir bulgu olmaması homosistein seviyelerindeki artışın başka nedenlere de bağlı olabilir mi sorusunu akla getirmektedir.

İnflamasyon sonucu gelişen ağır sepsis ve septik şok hastalarında serum NO, homosistein, ADMA ve SDMA düzeylerindeki değişim incelendiğinde, bulgularımız diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında yukarı belirtildiği gibi benzer ve farklı sonuçlar gözlemlendi. Daha fazla sayıda hasta grubu içeren araştırmaların yapılması ile daha güvenilir bilgilere ulaşılabilecektir.

6. ÖZET

Sepsis ve septik şok, cerrahi ve dahiliye yoğun bakım ünitelerinde en sık görülen ölüm nedenidir. Sepsiste inflamatuvar yanıtta rol oynayan mediyatörler çeşitli yollarla birbirleriyle etkileşirler ve vazoaaktif NO'nun artışına neden olurlar. ADMA, insanda NO biyosentezinin majör inhibitörüdür. SDMA, ADMA'nın inaktif yapısal bir izomeridir ve NOS inhibisyonu yapmaz. Yüksek plazma SDMA konsantrasyonu hücre içine alımda, L-arjininin ile yarışarak dolaylı olarak NO üretimini azaltabilir. Homosistein artışının ise NO sentezinin azalmasına, akut ve kronik endotel fonksiyon bozukluğuna, aynı zamanda ADMA birikimi ve NOS inhibisyonuna yol açtığı bildirilmektedir.

Çalışmamızda inflamasyon sonucu gelişen ağır sepsis ve septik şoklu hastalarda serum ADMA, SDMA ve homosistein düzeylerindeki değişim HPLC yöntemi (Eureka kit) ile nitrit-nitrat düzeylerindeki değişim Griess yöntemi ile kolorimetrik olarak ölçüldü.

Sonuçlarımıza göre ağır sepsisli ve septik şoklu hasta grubunda SDMA, nitrit-nitrat ve homosistein değerleri kontrol grubuna oranla yüksek gözlemlendi. Bu artış SDMA ve homosisteinde her iki hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı iken ($p<0,05$) nitrit-nitrat değerlerinde sadece septik şoklu hasta grubunda anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Ağır sepsisli hasta grubu ile septik şoklu hasta grubu karşılaştırıldığında sadece SDMA değerleri arasında istatistiksel olarak anlam bulunmuştur ($p<0,05$). ADMA değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında kontrol ve gruplar arasında anlamlı fark gözlenememiştir ($p>0,05$).

Bu parametrelerin ağır sepsis ve septik şoklu hastalarda tanıyı destekleme ve prognozu belirlemede yararlı olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: ağır sepsis, septik şok, asimetric dimetilarjinin, simetric dimetilarjinin, homosistein, nitrik oksit

7. SUMMARY

Sepsis and septic shock, surgery and medical intensive care unit shock and the most common causes of death. The role inflammatory mediators in response to variety of ways they interact with each other. NO causes an increase in vasuactive ADMA, NO biosynthesis is the major inhibitor in human. SDMA, ADMA is a structural isomer inactive and NOS inhibition does not. In take into the cell a high concentration of plasma SDMA, L-arginine with the race to reduce NO production indirectly. If the increase in homosistein decreased NO synthesis in acute and chronic dysfunction endotelium, ADMA and NOS inhibition also caused the accumulation has been reported.

In our study, as a result of heavy inflammation in patients with severe sepsis and changes in homocysteine, ADMA and SDMA levels by HPLC (Eureka kit) together with changes in nitrite-nitrate levels were measured by Griess method and as colorimetric.

According to our results in patients with severe sepsis and septic shock SDMA, nitrite-nitrate and homocysteine higher than control group. In increase, in patients with severe sepsis and septic shock SDMA and homocysteine as in both patient groups was statistically significant ($p < 0,05$) nitrite-nitrate levels were significant only in patients with septic shock ($p < 0,05$). Septic shock patients with severe sepsis compared with patients only SDMA was found between the values of means is statistically ($p < 0,05$). ADMA levels compared to controls and statistically significant difference between groups was observed ($p > 0,05$).

We are suggesting that these parameters should help in diagnosis and prognosis of the patients having severe sepsis and septic shock.

Key words: Severe sepsis, septic shock, asymmetric dymethlyarginine, symmetric dymethlyarginine, homocysteine, nitric oxide

8. KAYNAKLAR

1. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357, 593-615, 2001.
2. Murphy SL. Deaths: final data for 1998. *National Vital Statistics Report.* 2000 24;48:1-105.
3. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* 2003 17; 348:1546-54.
- 4-Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;329:2002-12.
5. Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest.* 1992 : 101 (6): 1481-3
6. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.* 2003; 31 (4): 1250-6
7. Anane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet.* 2005; 365 (9453)
8. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995; 274: 1049-57.

9.Nitrik oksit donörleri ve inhibitörleri(internet); www.ctf.edu.tr/farma/no.pdf

10. Tsiotou AG, Sakorafas GH, Anagnostopoulos G, Bramis J. Septic shock;current pathogenetic concepts from a clinical perspective. Med Sci Monit 2005;11(3):RA76-85.

11. Wang G, O K. Homocysteine stimulates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 receptor (CCR2) in human monocytes: possible involvement of oxygen free radicals. Biochem J. 2001; 357: 233-240.

12. Cooke JP: Does ADMA cause endothelial dysfunction? Arterioscler Thromb Vasc Biol 20:2032.-2037, 2000.

13. Böger RH: The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. Cardiovascular Research 59: 824 – 833, 2003.

14. Chan NN, Chan JCN: Asymmetric dimethylarginine (ADMA) : a potential link between endothelial dysfunction and cardiovascular diseases in insulin resistance syndrome? Diabetologia 45: 1609 – 1616, 2002.

15. Bone RC. The patogenesis of sepsis. Ann Intern Med 1999;115:457.

16. American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care Medicine Concensus Conference Committee. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Chest 1992; 101: 1644.

17. Bone RC. Gram-positive organisms and sepsis. Arch Intern Med 1994;154:26.24

18. Weinstein MP, Towns ML, Quartery SM et al. The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s; A prospective comprehensive evaluation of microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. Clin Infect Dis 1997; 24:584.
19. Uzun Ö, Akalin HE, Hayran M, Ünal S. Factors influencing prognosis in bacteremia due to gram-negative organism: evaluation fo 448 episods in a Turkish University Hospital. Clin Infect Dis 1992; 15:866.
20. Fourrier F, Chopin C. Goudemand J, et al. Septic shock, multiple organ failure, and disseminated intravascular coagulation. Chest 1992; 101: 816-822.
21. Wenzel RP, Pinsky MR, Ulevitc RJ, Young L. Current understanding of sepsis. Clin Infect Dis 1996; 22: 407.
22. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. J Biol Chem 1991; 266: 4244-4250.
23. Upchurch GR Jr, Welch GN, Fabian AJ, Pigazzi A, Keaney JF Jr, Loscalzo J. Stimulation of endothelial nitric oxide production by homocyst(e)ine. Atherosclerosis 1997; 132: 177-185.
24. Zhang XH. Effects of homocysteine on endothelial NO production. Am. J. Physiol.-Renal Physiol 2000; 279: F671-F678.
25. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. Nature 2002;420:885-91. Hotchkiss RS, Karl IE. The Pathophysiology and treatment of sepsis.N Engl J Med 2003;348/2:138-150.

26. Hofmann MA, Lalla E, Lu Y, Gleason MR, Wolf BM, Tanji N, Ferran LJ Jr, Kohl B, Rao V, Kiesel W, Stern DM, Schmidt AM. Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. *J Clin Invest*. 2001; 107: 675-683.
27. Coleman, J.W., 2001. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int. Immunopharmacol*. 1(8), 1397-1406
28. Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Fitting C, Adrie C, Payen D. Cytokine cascade in sepsis. *Scand J Infect Dis* 2003;35(9):535-44.
29. Cooke J.P., Dzau V.J., Derangements of the nitric oxide synthase pathway, L-Arginine, and cardiovascular diseases. *Circulation*., 1997; 96: 379-382.
30. Gensini G.F., Comeglio M., Colella A., Classical risk factors and emerging elements in the risk profile for coronary artery disease. *Eur. Heart J*., 1998; 19 {Suppl A): A53-A61
31. Yorgancı K. Sepsis patofizyolojisi *Yoğun Bakım Dergisi* 2005;5(2):80-84.
32. Klahr S: Role of Arachidonic acid metabolites in acute renal failure and sepsis. *Nephrol and Dialysis Trans* 1999; 8:64-68.
33. Day NP, Phu NH, Mai N et al. Effects of dopamine and epinephrine infusions on renal hemodynamics in severe sepsis. *Crit Care Med* 2000; 28: 1353-1362.

34. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginin: A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem pharmacol* 1989; 38:1709-15.
35. Palmer RMJ, Moncada S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989; 158: 348-52.
36. Grisham MB. Reactive metabolites of oxygen and nitrogen in biology and medicine. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1997; 169: 70-5.
37. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: A physiologic messenger. *Ann. Intern. Med* 1994; 120: 227-37.
38. Yallampalli DVM, Smith MB, Sharon MS. Steroid hormones modulate the production of NO and cGMP in the rat uterus. *Endocrinology* 1994; 134(4):1971-4.
39. Marletta MA. Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide and N-Nitrosatingagents. *Chem Res Toxicol* 1987;249-57.
40. Toutouzas P.C.: Nitric oxide synthesis in atherosclerosis. *Eur. Heart J.*, 1998;19: 1504-1511.
41. Richard K. Nitric oxide synthases. *The Biochemist*. Nov. 1994;16(5):3-6.
42. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *The J. Biol. Chem.* 1993; 268 (17): 12231-4.

43. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 1994; 298: 249-58.
44. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharm Rev* 1991; 43: 109-41.
45. R. Phillip Dellinger, Mitchell M. Levy, Jean M. Carlet, Julian Bion, Margaret M. Parker, Roman Jaeschke, Konrad Reinhart, Derek C. Angus, Christian Brun-Buisson, Richard Beale, Thierry Calandra, Jean-Francois Dhainaut, Herwig Gerlach, Maurene Harvey, John J. Marini, John Marshall, Marco Ranieri, Graham Ramsay, Jonathan Sevransky, B. Taylor Thompson, Sean Townsend, Jeffrey S. Vender, Janice L. Zimmerman, Jean-Louis Vincent, PhD; for the International Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee, Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008
46. O'Dwyer MJ, Dempsey F, Crowley V, Kelleher D, McManus R, Ryan T: Septic shock is correlated with asymmetrical dimethyl arginine levels, which may be influenced by a polymorphism in the dimethylarginine dimethylaminohydrolase II gene: a prospective observational study. *Crit Care* 2006, 10:R139.
47. Snygg J, Fandriks L, Bengtsson J, Holm M, Pettersson A, Aneman A. Jejunal luminal nitric oxide during severe hypovolemia and sepsis in anesthetized pigs. *Intensive Care Med* 2001;27:1807-13
48. Smith LM, Cuthbertson B, Harvie J, Webster N, Robins S, Ralston SH. Increased bone resorption in the critically ill: association with sepsis and increased nitric oxide production. *Crit Care Med* 2002;30:837-40.

49. Upchurch GR Jr, Welch GN, Fabian AJ, Pigazzi A, Keaney JF Jr, Loscalzo J. Stimulation of endothelial nitric oxide production by homocyst(e)ine. *Atherosclerosis* 1997; 132: 177-185.
50. Synder SH. Nitric oxide and neurons. *Curr. Opin. Neurobiol* 1992; 2: 323-38.
51. Starkebaum G, Harlan JM. Endothelial cell injury due to copper catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest* 1986;77:1370–1376.
52. Boger RH. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk marker in cardiovascular medicine and beyond. *Ann Med* 2006;38(2):126-36.
53. Lang D, Kredan MB, Moat SJ et al. Homocysteine-induced inhibition of endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta: role for superoxide anions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:422–427.
54. Lentz SR, Rodionov RN, Dayal S. Hyperhomocysteinemia, endothelial dysfunction and cardiovascular risk: the potential role of ADMA. *Atherosclerosis Supplements* 2003; 4: 61–65.
55. Mark F. McCarty. *Medical Hypotheses* 2004;63: 699–708.
56. De Groot PG, Willems C, Boers GHJ, Gonsalves MD, van Aken WG, van Mourik JA. Endothelial cell dysfunction in homocystinuria. *Eur J Clin Invest* 13: 405- 410, 1983
57. Nijveldt RJ, Teerlink T, van Leeuwen PA: The asymmetrical dimethylarginine (ADMA)-multiple organ failure hypothesis. *Clin Nutr* 2003, 22:99-104.

58. Lopez A, Lorente JA, Steingrub J, Bakker J, McLuckie J, Willatts S, Brockway M, Anzueto A, Holzapfel L, Breen D, *et al.*: Multiplecenter, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. *Crit Care Med* 2004, 32:21-30.
59. Chow K, Cheung F, Lao TT, O K. Effect of homocysteine on the production of nitric oxide in endothelial cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; 26: 817-818.
60. Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, *et al.* Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 1991;324:1149-55.
61. Burnett AL, Lowenstien CJ, Bredt DS. Nitric oxide a physiologic mediator of penile erection. *Science* 1992; 257: 401-3.
62. Stuhlinger M.C., Tsao P.S., Her J.H., Kimoto M.: Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: Role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation.*, 2001; 104:2569-2575
63. Yu X.J., Li Y.J., Deng H.W, Increase of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in serum of high cholesterol fed rabbits. *Life Sci* 1994-54:753-758
64. Vallance P., Leone A., Calver A., Collier J., Moneada S.: Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet*, 1992;339:572-575

65. Cooke JP. ADMA: its role in vascular disease. *Vasc Med.* 2005;10:S11-17.
66. Sydow K, Münzel T. ADMA and oxidative stress. *Atheroscler Suppl.* 2003;4:41-51.
67. Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol.* 1986;250:H822-827.
68. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly. *Am J Physiol.* 1996;271:1424-1437.
69. Stühlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, Cooke JP. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2001;104(21):2569-75.
70. Stühlinger MC, Oka RK, Graf EE, Schmölder I, Upson BM, Kapoor O, et al. Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2003;108(8):933-8.
71. Dayal S, Devlin AM, McCaw RB, Liu ML, Arning E, Bottiglieri T, et al. Cerebral vascular dysfunction in methionine synthase-deficient mice. *Circulation* 2005;112(5):737-44.
72. Kwon NS, Stuehr DS, Nathan CF. Inhibition of tumor cells ribonucleotide reductase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 179: 442-8.

73. Liew FY, Li Y, Millott S. TNF- α induced macrophage leishmanicidal activity is, mediated by nitric oxide from Larginine. Immunology 1990; 71: 556-9.

74. Francis MC, Allen N, Mizel JB, Albina DE. Suppression of arthritis by an inhibitor of NOS. J Exp Med 1993; 178:749-54.

75. Böger R.H., Bode-Böger SM., Sydow K., Heistad D.D., Lentz S.R.: Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia. Arterioscler. Thromb.Vase. Biol., 2000; 20:1557-1564.

76. Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Barnes P. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. Lancet 1994; 343: 133-5.

77. Faraci FM., Brian J.E.J., Heistad D.D.: Response of cerebral blood vessels to an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase. Am. J. Physiol., 1995; 269:H1522-H1527

78. Stuehr DJ and Nathan CF. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. J Exp Med 1989; 169: 1543-55

79. Böger R.H., Bode-Böger S.M., Tsao P.S., Lin P.S., Chan J.R., Cooke J.P.: An endogenous inhibitor of NO synthase regulates endothelial adhesiveness for monocytes. J. Am. Coll. Cardiol., 2000; 36:2287-2295

80. Vincent JL, Zhang H, Szabo C, Preiser JC (2000): Effects of nitric oxide in septic shock. *Am. J. Resir.Crit. Care Med.*, 161, 1781-1785. Geliş Tarihi: 01.02.2005/ Kabul Tarihi: 14.03.2005
81. Gültekin N, Ersanlı M, Küçükateş E: Güncel ve etkin bir transmitter: Nitrik Oksit. *Türk Kardiyol Dern Arş* 1996; 24: 311-320.
82. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004; 109: III-29-32.
83. Veli-Pekka Valkonen, Hannu Paiva, Jukka T Salonen. Risk of coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* 2001; 358:2127-28.
84. Nijveldt RJ, Teerlink T, Van der Hoven B et al. Asymmetrical dimethylarginine factor of ICU mortality. *Clin Nutr* 2003; 22: 23-30.
85. Fickling S.A., Leone A.M., Nussey S.S., Vallance P., Whitley G.St.J.:Synthesis of NG-NG dimethylarginine by endothelial cells.*Endothelium*, 1993; 1:137-140.
86. Böger R.H., Bode-Böger S.M., Tsao P.S.: The endogenous NO synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine (ADMA) exerts pro-atherosclerotic effects in cultured human endothelial cells. *Circulation*, 1997; 96:1-588
87. Kurose I., Wolf R., Grisham M.B., Granger D.N.: Effects of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis on postcapillary venules. *Am. J. Physiol.Heart Circ. Physiol.* 1995;268:H2224-H2231.

88. Kanno K, Hirata Y, Emori T, et. al. L-arginine infusion induces hypotension and diuresis/natriuresis with concomittant increased urinary excretion of nitrite/nitrate and cyclic GMP in humans. Clin Exp Pharmacol Physiol 1992; 19: 619-25.
89. Tojo A, Welch WJ, Bremer V et al: Colocalization of demethylating enzymes and NOS and functional effects of methylarginines in rat kidney. Kidney Int 52: 1593–1601, 1997.
90. Baudouin SV, Bath P, Martin JF, Du Bois R, Evans TW. L-arginine infusion has no effect on systemic haemodynamics in normal volunteers, or sytemic and pulmonar haemodynamics in patients with elevated pulmonary vascular resistance.Br J Clin Pharmacol 1993; 36: 45-9.
91. Aji W, Ravalli S, Szabolcs M ve ark. L-arginine prevents xantoma development and inhibits atherosclerosis in LDL receptor knockout mice. Circulation. 1997;95:430-7.
92. Dmaizumi T, Hirooka Y, Masaki H, et. al. Effects of L-arginine on forearm vessels and responses to acetylcholine. Hypertension 1992; 20:511-7.
93. Marsh N, Marsh A. A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. Clin Exp Pharmacol Physiol 2000;27(4):313-9.
94. Bian K, Murad F. Nitric oxide (NO)--biogenesis, regulation, and relevance to human diseases. Front Biosci 2003;8:264-78.
95. Hakim TS, Sugimori K, Camporesi EM, Anderson G. Half-life of nitric oxide in aqueous solutions with and without haemoglobin. Physiol Meas 1996;17(4):267-77.

96. Nava E, Palmer RMJ, Moncada S. The role of nitric oxide in endotoxic shock: Effects of N^G-monomethyl-L-arginine. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1992;20:5132-4.
97. Dayal S, Lentz SR. ADMA and hyperhomocysteinemia. *Vasc Med* 2005;10(1):27-33.
98. Siekmeier R, Grammer T, Marz W. Role of Oxidants, Nitric Oxide and Asymmetric Dimethylarginine in Endothelial Function. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2008;13(4):279-97.
99. Chatterjee A, Catravas JD. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascul Pharmacol* 2008;49(4-6):134-40.
100. Gonzales C, Fernandez A, Mortin C, *et al*. Nitric oxide from endothelium and smooth muscle modulates responses to sympathetic nerve stimulation: implications for endotoxin shock. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;186:150-6.
101. Lahera V, Salom MG, Miranda Guardiola F, Moncada S, Romero JC. Effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester on renal function and blood pressure. *Am J Physiol* 1991; 261: 1033-7.
102. Luce JM. Pathogenesis and Management of Septic Shock. *Chest* 1987; 91(6):883-88.
103. Kirkebøen KA, Strand ØA. The role of nitric oxide in sepsis-an overview. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1999;43:275-88.
104. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, controls. *Cell*. 1994;78:915-8.

105. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988;333: 664-6.
106. Davies MG, Fulton GJ, Hagen PO. Clinical biology of nitric oxide. *Br J Surg* 1995;82:1598-610.
107. Vos TA, Gouw AS, Klok PA, Havinga R, van Goor H, Huitema S, et al. Differential effects of nitric oxide synthase inhibitors on endotoxin-induced liver damage in rats. *Gastroenterology* 1997;113:1323-33.
108. Bone CR, Crodin CJ, Balk AR. Sepsis: A New Hypothesis for Pathogenesis of the Disease Process. *Chest* 1997; 112: 235-43.
109. Cashin-Hemphill L, Dinsmore R E, Chan R C et. Al. For the QUIET Investigators. LDL cholesterol and angiographic progression in the QUIET trial. (Abstr) *J Am Coll Cardiol* 1997; 29 (Suppl A): 85A.
110. Fliser, D., Kielstein, J.T., Haller, H., Böger, S.M.B., "Asymmetric dimethylarginine: A cardiovascular risk factor in renal disease?", *Kidney Inter.*, 63: 84, 37-40 (2003).
111. Petros A, Bennett D, Vallance P. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet*. 1991; 338: (8782-8783): 1557-1558.
112. Member of the ACCP/SCCM Consensus Conference Committee: ACCP/SCCM consensus conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992;20:864-74.

113. Noris M, Perico N, Remuzzi G. Mechanisms of disease: Pre-eclampsia. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2005;1:98-114.
114. Böger RH, Bode-Böger SM, Thiele W, Creutzig A, Alexander K, Frölich JC. Restoring vascular nitric oxide formation by L-arginine improves the symptoms of intermittent claudication in patients with peripheral arterial occlusive disease. *J Am Coll Cardiol* 1998;32(5):1336-44
115. MacAllister R.J., Parry H., Kimoto M., Ogawa T., Russell R.J., Hodson., Whitley G.S., Vallance P.: Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Br.J.Pharmacol.*, 1996;119: 1533-1540
116. Maeso R, Navarro-Cid J, Munoz-Garcia R, Rodrigo E, Ruilope LM, Lahera V, Cachafeiro V. Losartan reduces phenylephrine constrictor response in aortic rings from spontaneously hypertensive rats. Role of nitric oxide and angiotensin II type 2 receptors. *Hypertension* 1996;28(6):967-72.
117. Wahbi, N., Dalton, R. N., Turner, C., Denton, M., Abbs, I., Swaminathan, R., "Dimethylarginines in chronic renal failure", *J. Clin. Pathol.*, 54: 470-473 (2001).
118. Anemon A, Backman V, Snygg J, Von Bothmer C, Fandriks L, Petterson A. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase during graded hemorrhagic shock. *Circ Shock* 1994;44(3):111-4.
119. Tran CT, Leiper JM, Vallance P. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler Suppl* 2003;4(4):33-40.

120. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RMH, Sibbald WJ.. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 1992; 101: 1644–1655.
121. Vallance P, Leiper J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine: dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(6):1023-30.
122. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992 ;339(8793):572-5.
123. Yoo JH, Lee SC. Elevated levels of plasma homocysteine and asymmetric dimethylarginine in elderly patients with stroke. *Atherosclerosis* 2001;158(2):425-30.)
124. Valkonen VP, Laaksonen R. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and acute vascular events. *Clin Chim Acta* 2004;348(1-2):9-17.
125. Chan NN, Chan JC. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a potential link between endothelial dysfunction and cardiovascular diseases in insulin resistance syndrome? *Diabetologia* 2002;45(12):1609-16.
126. Tsikas D., Böger R.H., Sandmann J., Bode-Böger S.M, Frölich J.C.: Endogenous nitric oxide synthase inhibitors are responsible for the L- Arginine paradox *FEBS Letters*,2000; 478:1-3.
127. Goligorsky M.S.: Endothelial celi dysfunction and nitric oxide synthase. *Kidney Int*2000; 58:1360-1376.

128. El-Gawad H. And Khalifa A.E:Quercetin, Coenzyme Q10, and L-Canavanine as protective agents against lipid peroxidation and nitric oxide generation in endotoxin-induced shock in rat brain. *Pharmalogical Research*. Vol.43 No:3 (2001)
129. Evans T, Carpenter A, Kinderman H. et al. Evidence of increased nitric oxide production in patients with the sepsis syndrome. *Circ. Shock* 41,77-78 (1993)
130. Buhimschi IA, Saade GR, Chwalisz K, Garfield RE. The nitric oxide pathway in pre-eclampsia: pathophysiological implications. *Hum Reprod Update* 1998; 4(1): 25-42.
131. Presier J.C., Reper P.,Vlasselaer D., Vray B., Zhang H., Metz G. Et al.: Nitric oxide production is increased in patients after burn injury. *J. Trauma* 1996; 40:368-71.
132. Tunçtan, B., Nitrik oksit miktarlarının Griess yöntemi ile ölçülmesi. Türk Farmakoloji derneği Farmakoloji Eğitim Sempozyumları Programı Nitrik oksidin Farmakolojisi, 27 Mayıs, Mersin,61-68, (2005).
- 133- Beltowski J, Kedra A. *Pharmacological Reports* 2006;58:159-178.

9. EKLER

ETİK KURUL ONAYI



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

Sayı : B.30.Z.GÖN.0.01.00

Konu :

ANKARA

Tarih : ... / ... / 200...

Sayın *Prof.Dr. Aysel Arıoğlu*

Proje Yürütücüsü

Fakültemiz Yerel Etik Kurulu'nun 22 Aralık 2008 tarihinde yapılan toplantısında alınan kararlar ekte sunulmuştur.

Bölgelerinizi rica ederim.



Prof.Dr.E.Turgut TALİ
Dekan Yardımcısı



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ YEREL ETİK KURULU
RESEARCH ETHICS COMMITTEE OF MEDICAL FACULTY, GAZİ UNIVERSTY
ANKARA-TÜRKİYE
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI
İLAÇ DIŞI KLİNİK ÇALIŞMALAR

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL ADI	"Ağır sepsis ve sepsis çok tanısı konan hastalarda asimetrik dimetilarginin (ADMA) ve nitrik oksit (NO) düzeylerinin araştırılması"	
	SORUMLU ARAŞTIRICI UNVANI, / ADI	Prof.Dr.Aysel Arıcıoğlu	
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı	Tarih / değişiklik No.su	Dili Türkçe
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 406	Tarih : 22 Aralık 2008	
	Üniversitemiz Tıp Fakültesinde yapılması tasarlanan ve yukarıdaki konyede kayıtlı araştırma projesine ait dosya; araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım, yöntemler ve aydınlatılmış onayın yeterliliği yönünden incelenmiş, bütçe dışında uygun olduğuna karar verilmiştir. Etik Kurul kararı; projenin bütçesi BAP tarafından kabul edildiği takdirde yürürlüğe girecek olup, BAP kararının Etik Kurula bildirilmesi gerekmektedir.		

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI: KLİNİK UYGULAMALAR KILAVUZU, HELSINKİ BELGESİ, BİYOEĞİTİCİ SÖZLEŞMESİ

ÜYELER

Unvan / Adı / Soyadı / Üyelik	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlgili (*)	Kabul (**)	İmza
Prof.Dr.Necati BAYAN BAŞKAN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları - Nefroloji	G.Ü.T.F. Çocuk Sağ. ve Hast. A.D.	K	☒ E ☒ H	☒ E ☒ H	
Prof. Dr. Fatma Arslan ÜYE	Enfeksiyon	G.Ü.T.F. Enfeksiyon Hast. A.D.	K	☒ E ☒ H	☒ E ☒ H	
Prof. Dr. Aysel ARICIOĞLU ÜYE	Tıbbi Biyokimya	G.Ü.T.F. Tıbbi Biyokimya A.D.	-K	☒ E ☒ H	☒ E ☒ H	Oylamaya Katılmadı
Prof. Dr. Fatma ATALAY ÜYE	Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon	G.Ü.T.F. Fiziksel Tıp ve Rehab. A.D.	K	☒ E ☒ H	☒ E ☒ H	
Prof. Dr. Çağrı ÇİFTÇİ ÜYE	Genel Cerrahi	G.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	☒ E ☒ H	☒ E ☒ H	
Prof. Dr. Seyhan ERSAN ÜYE	Farmasötik Kimya Ecz. Fak.	G.Ü.E.P. (Ecz.Fak.) Farmasötik Kimya	K	☒ E ☒ H	☒ E ☒ H	
Prof. Dr. Rahat KURUOĞLU ÜYE	Nöroloji	G.Ü.T.F. Nöroloji A.D.	E	☒ E ☒ H	☒ E ☒ H	
Doç. Dr. Nezir ÇOBANOĞLU ÜYE	Tıp Eğitimi ve Tıp Tarihi	G.Ü.T.F. Tıp Eğitimi ve Tıp Tarihi A.D.	K	☒ E ☒ H	☒ E ☒ H	Katılmadı
Doç. Dr. Mehmet Ali Ergün ÜYE	Tıbbi Genetik	G.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	☒ E ☒ H	☒ E ☒ H	
Doç. Dr. Ayhan POYRAZ ÜYE	Tıbbi Fizyoloji	G.Ü.T.F. Tıbbi Fizyoloji A.D.	K	☒ E ☒ H	☒ E ☒ H	
Doç. Dr. Cengiz ULUOĞLU ÜYE	Tıbbi Farmakoloji	G.Ü.T.F. Tıbbi Farmakoloji A.D.	K	☒ E ☒ H	☒ E ☒ H	Raporlu
Doç. Dr. Merve YAGCI ÜYE	İç Hastalıkları - Hematoloji	G.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	☒ E ☒ H	☒ E ☒ H	
Doç. Dr. Bülent DEMİREL ÜYE	Adli Tıp	G.Ü.T.F. Adli Tıp A.D.	E	☒ E ☒ H	☒ E ☒ H	Katılmadı
Ünvanlı Öğretim Görevlisi ÜYE	Hukuk Müfettişliği	Rakıtsal Hukuk Müfettişliği	E	☒ E ☒ H	☒ E ☒ H	Katılmadı

Sonuçlar: 10/10
Tayinler: 10/10

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince her konuda desteğini gördüğüm, benden ilgisini, özellikle sabır ve anlayışını esirgemeyen çok değerli hocam, danışmanım Prof. Dr. Aysel ARICIOĞLU'na,

Yüksek lisans öğrenimim boyunca her konuda yol gösteren çok değerli hocam Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hatice PAŞAOĞLU'na,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve birikimlerini bizimle paylaşan, her konuda destek olan diğer bölüm hocalarıma,

Tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen Gazi Üniversitesi İç Hastalıkları Yoğun Bakım Ünitesindeki hocalarım Doç. Dr. Ş. Gülbin AYGENCEL BIKMAZ, Yrd. Doç. Dr. Melda AYBAR TÜRKOĞLU ve Araş. Gör.Dr. Hülya YORULMAZ'a

Tez çalışmalarım sırasında gerek deneysel gerek tez yazım kısmında ve 3 yıldır her sıkıştığımda aradığım ve yardımını aldığım çok değerli dostum Uzm. Biyolog Ahmet CÜMAOĞLU'na,

Yüksek lisans derslerini beraber aldığım, dostluğunu paylaştığım, her konuda desteğini ve ilgisini gördüğüm çok değerli dostum Kimyager Durmuş AYAN'a,

Yüksek lisans öğrenimime başladığımda tanıdığım ve iyi ki de tanıdığım, her derdimi paylaştığım, beraber üzülp, beraber güldüğüm, canım kardeşim Uzm. Biyolog Seçil Şengören ve çok kıymetli ailesine,

Diğer bütün yüksek lisans, doktora bölümündeki arkadaşlarım ve Biyokimya araştırma görevlilerine,

Canım aileme,

En içten teşekkürlerimi sunarım...

10. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı-Soyadı : Elif YÜKSEL
Doğum Yeri : ANKARA
Doğum Tarihi : 04/11/1984

EĞİTİM DURUMU

2007- :Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya
Yüksek Lisans
2002-2006 : Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü (3. derece ile mezuniyet)
1998-2002 : Çankaya Lisesi (YDA)
1990-1998 : Kavaklıdere İlköğretim Okulu

YABANCI DİL : İngilizce