

163172

T.C
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı

**TİP 1 DİYABETİKLERDE
ACE İNHİBİSYONUNUN ENDOTEL FONKSİYONU VE
PLAZMA ASİMETRİK DİMETİLGİNİN DÜZEYLERİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

(İç Hastalıkları Uzmanlık Tezi)

Dr Dilek Yazıcı

Tez Danışmanları:

Prof Dr Sema Akalın,
Yrd Doç Dr Dilek Yavuz

İstanbul, 2004

Tez çalışmamın planlanması ve gerçekleşmesinde değerli katkıları nedeniyle tez danışmanlarım Prof Dr Sema Akalın ve Yard Doç Dr Dilek Yavuz'a, çalışmamın laboratuvar bölümünde büyük emekleri olan Yard Doç Dr. Seda Ünsalan, Doç.Dr Ahmet Toprak ve Öğr.Grv. Meral Yüksel ve Hem. Aynur Altun'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca asistanlık eğitimim boyunca bana desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocalarıma ve tüm paylaşımlarından dolayı sevgili çalışma arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

Dr Dilek Yazıcı

Aralık 2004.

İÇİNDEKİLER

1. Giriş ve Amaç.....	1
2. Genel Bilgiler.....	3-44
3. Araç ve Yöntem.....	45-49
4. Bulgular.....	50-57
5. Tartışma.....	58-64
6. Özet (Türkçe).....	65-66
7. Özet (İngilizce).....	67-68
8. Referanslar.....	69-85

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes mellitusun mortalite ve morbiditesi mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlarının varlığı ile ilişkilidir (1,2). Makrovasküler komplikasyonlar koroner ve serebral arterler ile alt ekstremitenin büyük arterlerinde ilerlemiş ateroskleroz sonucunda ortaya çıkarken, mikrovasküler komplikasyonlar ise retinopati, nefropati ve nöropati şeklinde görülmektedir (3).

Vasküler komplikasyonların genel olarak hiperglisemiye bağlı gelişen metabolik bozukluklar sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir (4). Patogenezdeki ortak mekanizmaların endotel disfonksiyonu ile ilişkili olduğu yönünde veriler artmaktadır (5). Endotel disfonksiyonu terimi genel olarak endotelin vazoregülatuar fonksiyonundaki bozulmayı tanımlamak için kullanılmaktadır (6).

Aterosklerozun en erken belirteci olarak kabul edilen (5,7) endotel disfonksiyonu endotelden kaynaklanan ana vazodilatör madde olan NO'nun metabolizmasında ve işlevindeki bozukluklar nedeniyle oluşmaktadır (8). Güçlü bir vazodilatör madde olan NO vasküler direnç ve akımın regülasyonunda önemli bir rol oynamaktadır (9). NO L-argininden nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla sentezlenmektedir (10). NOS enziminin endojen bir inhibitörü olan asimetrik dimetilarginin (ADMA) düzeylerindeki artış endotel disfonksiyonunun öne sürülen nedenlerinden birisidir (11,12). Plazma ADMA düzeyleri endotel disfonksiyonu olduğu bilinen hiperkolesterolemi (12), hipertrigliseridemi (13), hipertansiyon (14) ve hiperhomosisteinemi (15) yüksek bulunmuştur. Tip 2 diyabetik hastalarda yüksek plazma ADMA düzeylerinin endotel disfonksiyonuyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (16). Tip 1 diyabetik hastalarda ise yeterli veri bulunmamaktadır.

Diyabetiklerde mikrovasküler komplikasyonların önlenmesinde kullanılan (17) anjiyotensin-dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörlerinin tip 1 ve tip 2 diyabetik hastalarda endotel fonksiyonu üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir. Tip 2 (18) ve tip 1 diyabetik hastalarda (19) dörder haftalık enalapril tedavisi NO'ya bağımlı vazodilatasyonda düzelmeye neden olmuştur. Ayrıca 1 haftalık kaptopril ve enalapril tedavisinin de endotel disfonksiyonu üzerinde olumlu etkisi gösterilmiştir (20).

ACE inhibitörleri endotel fonksiyonu üzerindeki olumlu etkilerini NO ve bradikinin konsantrasyonlarında artış ve anjiotensin II konsantrasyonlarında azalma aracılığıyla yapmaktadır (21). ACE inhibitörlerinin NO düzeylerinde artış yapma mekanizmalarından biri plazma ADMA düzeylerinin azaltılmasıdır (22). ACE inhibitörleri anjiotensin II düzeylerini düşürerek oksidatif stresi azaltmaktadır (21,23). Oksidatif stresin ADMA'nın metabolizmasından sorumlu olan dimetilarginin dimetilminohidrolaz (DDAH) enzimi düzeylerini azalttığı bilinmektedir (24). Buna göre ACE inhibitörleri oksidatif streste azalma sonucunda ADMA'nın hidrolizinde artışa neden olmaktadır. Ancak tip 1 diyabetik hastalarda ACE inhibisyonu, ADMA ve oksidatif stres arasındaki ilişki açık değildir.

Bu çalışmanın amacı hipertansif olmayan Tip 1 diyabetik hastalarda a) endotel fonksiyonunun belirleyicileri olarak akıma bağlı dilatasyon ve ADMA düzeylerinin ölçümünü yapmak, b) bunların lipid peroksidasyonu ile ilişkisini incelemek, ve c) ACE inhibisyonun sözü edilen parametreler üzerindeki etkisini değerlendirmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TİP 1 DİABETES MELLİTUS:

Diabetes mellitus insülin sekresyonunun azalması ya da hiç olmaması veya insülinin periferik etkisinde azalma sonucunda gelişen kronik hiperglisemi ve beraberinde karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklar ile seyreden bir sendromdur. Diabetes mellitus toplumda sık görülen bir hastalık olup prevalansı dünyada ortalama % 6.6 civarındadır (25). Tip 1 diabetes mellitus, insülin tedavisine kesin ihtiyaç duyulan, genel olarak 30 yaşından önce başlayan ve otoimmün beta hücre yıkımıyla giden diyabet tipidir. Tip 1 diabetik hastalar diyabetlilerin % 5-10'unu oluşturmaktadır (26).

Hastalık kısa dönemde ketoasidoz, nonketotik koma gibi akut metabolik komplikasyonlar, geç dönemde ise çeşitli vasküler komplikasyonlarla seyreder. Mikrovasküler komplikasyonları görme kaybına yol açabilen retinopati, böbrek yetmezliği ile sonlanabilen nefropati, ayak ülserlerine ve amputasyonlara neden olabilen periferik nöropati ile gastrointestinal, genitoüriner ve kardiyovasküler bozukluklarla gidebilen otonomik nöropati şeklinde ortaya çıkar. Makrovasküler komplikasyonlar ise klinikte aterosklerotik koroner arter hastalığı, periferik arter hastalığı ve serebrovasküler hastalık olarak görülür (3). Bu komplikasyonlara bağlı morbidite ve erken mortalite riski yüksektir (1). Tip 1 diabetiklerde mikrovasküler komplikasyonların gelişimi diyabet süresi ve kan şekeri kontrolü ile yakından ilişkilidir (4).

2.2. DİYABETİN MİKROVASKÜLER KOMPLİKASYONLARI:

Diyabetiklerde uzun dönemde vücuttaki tüm mikrovasküler yapının etkilenmesine rağmen, özellikle retina, böbrek glomerülü ve sinirlerde önemli patoloji görülmektedir.

2.2.1. Retinopati:

Diyabetiklerde retinopatinin prevalansı hastalık süresi ile ilişkili olarak artmaktadır. Genç yaşta başlayan diyabette genelde 5 yıldan önce retinopati gelişmezken, 15 yıldan sonra % 25 ve 20 yıldan sonra % 50 oranında görülmektedir. İleri yaşta başlayan diabetes mellitusta retinopati hastalığının ilk birkaç yılında ortaya çıkabilir, ancak bu popülasyonda 15 yıl veya daha sonrasında retinopati geliştirme prevalansı genç yaştaakilere göre daha az olarak % 15-20 arasındadır (27). Retinopatinin patogenezi retinada kapillerlerin hasarı sonucunda ödem, eksüda, yeni damar oluşumu ve kanamalar olmasıyla ilişkilidir. Bunun yanında diyabetiklerde katarakt oluşumunda da hızlanma meydana gelmektedir. Tüm bunların sonucunda diyabetiklerde ciddi görme bozukluğu gelişmektedir (27).

2.2.2. Nefropati:

Tip 1 diyabetik hastalarda % 30-50 oranında (28), tip II diyabetik hastalarda % 25 oranında (29) nefropati gelişebilmektedir. Diyabetik nefropatinin klinikteki erken belirtisi mikroalbuminüridir. Mikroalbuminüriyi overt proteinüri ve son dönem böbrek yetersizliği takip eder. Diyabetik nefropati sürecinde kalıcı proteinüri, son dönem böbrek yetmezliğine gidişin önemli bir göstergesidir. Kalıcı proteinürisi olan tip 1 diabetes mellituslu hastaların % 25 'inde 6 yıl, % 75 'inde 15 yıl içinde son dönem böbrek yetmezliği gelişir (28). Kalıcı proteinürisi olan hastalarda beklenen ortalama yaşam süresi 7-10 yıldır (28). Böbreklerde mikroalbuminüri evresinde glomerüllerde patoloji görülmezken, daha ileri evrelerde glomerüler kapiller damar hasarına bağlı bazal membranda ve mesanjiyumda değişiklikler olması sonucunda kronik böbrek yetmezliği gelişmektedir (29).

2.2.3. Nöropati:

Diyabet süresi 15-20 yıl olan hastaların %50'sinde klinik nöropati belirtilerinin bulunduğu gösterilmiştir (30) Diyabetik nöropati nontravmatik amputasyonların ve otonomik disfonksiyonun en sık sebebidir (25). Nöropati hem tip I, hem de tip II diyabette kendini birçok farklı klinik formda gösterebilir. Diyabetik nöropatinin en sık karşılaşılan formu distal simetrik sensorimotor polinöropatidir (31). Otonomik nöropati, gastrik ve intestinal motiliteyi, mesane fonksiyonunu, erektil fonksiyonları, kardiyak fonksiyonları ve vasküler tonüsü etkileyebilir. Nöropatinin patogenezinde sinirlerde vasa nervorumdaki değişikliklere bağlı olarak sinir dokusunda fonksiyonel ve yapısal bozukluklar meydana gelmesi vardır (31).

Üç patolojik durumda değişiklikler kapiller ve arteriollerini kaplayan vasküler hücrelerde ve onların bazal membranlarında meydana gelmektedir. Burada ortak olarak görülen patofizyolojik özellik damar duvarında meydana gelen hasar sonrasında kapillerde daralma ve tıkanma ile bunun sonucunda gelişen iskemi ve organ perfüzyonunda bozulmadır (32). Bu değişikliklerin ilk basamağı olarak endotel disfonksiyonu gözlenmektedir (5).

2.2.4. Mikrovasküler Komplikasyonların Patogenezi:

Mikrovasküler komplikasyonların temelinde uzun süreli hiperglisemi sonrasında meydana gelen metabolik değişikliklerin yattığı düşünülmektedir (4,32). Tip 1 diabetes mellitusu olan hastalarda yapılmış çok merkezli bir çalışma olan DCCT'de (Diabetes Control and Complications Trial) kronik hiperglisemi ve diyabetik mikrovasküler hastalık arasında ilişki gösterilmiştir (4). Ancak komplikasyonlara duyarlılık her hastada değiştiği için yaş, cinsiyet, ırk, genetik faktörler, sosyoekonomik durum, sigara içiciliği ve hipertansiyon, hiperlipidemi gibi eşlik eden faktörlerin komplikasyonların gelişmesinde etkili olabileceği düşünülmektedir (33).

Hiperglisemi hücre metabolizmasında akut dönemde geri-dönüşümlü değişiklikler; uzun dönemde ise ekstrasellüler alan elemanları gibi

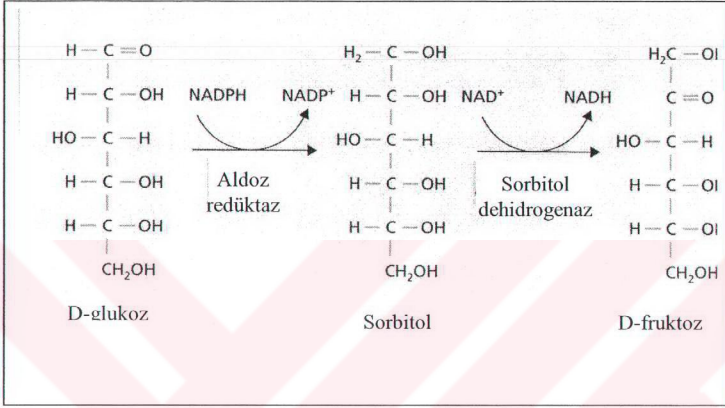
makromoleküllerde geri-dönüşümsüz değişiklikler yaparak hücrelere zarar vermektedir (32). Bu değişiklikler Tablo 1’de görülebilir.

Tablo 1. Hipergliseminin neden olduğu akut ve kronik biyokimyasal değişiklikler (32)

Akut Geri-Dönüşümlü Değişiklikler	Kronik Geri-Dönüşümsüz Değişiklikler
<ul style="list-style-type: none">• Polioli yolu aktivitesinde artış• NADH/NAD⁺ oranında artış• İntrasellüler miyoinositol düzeylerinde azalma• <i>De novo</i> diaçilgliserol sentezinde artış• Protein kinaz C aktivitesinde artış• Erken glikozilasyon ürünlerinde artış• Erken glikozilasyon ürünleri nedeniyle serbest radikal oluşumunda artış	<ul style="list-style-type: none">• Ekstrasellüler alanda ilerlemiş glikozilasyon ürünleri (AGE) oluşumunda artış• Anormal matriks bağlayıcı proteinlerin oluşması• Bazal membran yapısında bozulma• Bazal membran geçirgenliğinde artış• Nükleik asit ve nükleoproteinlerde AGE üretiminde artış

2.2.4.1. Polioli oluşumu ve redox potansiyelinde değişiklikler:

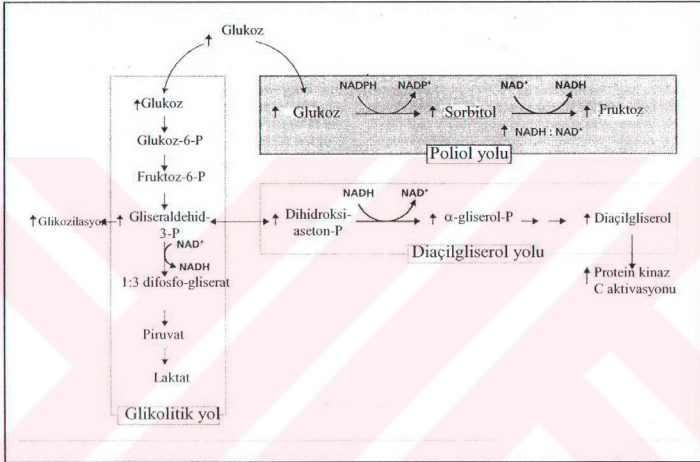
Aldoz redüktaz polioli yolunda ilk ve hız kısıtlayıcı enzim olup, glukozu sorbitole indirgemektedir (32) (Şekil 1). Aldoz redüktaz enzimi, hücre içine glukoz alınımının insülin gerektirmediği dokular olan sinir, retina, lens, glomerüller ve damar duvarı gibi dokularda bulunup, kandaki glukoz düzeyleri normal olduğu sürece inaktif olan bir enzimdir. Hiperglisemide bu enzimin aktif hale gelmesiyle sorbitol birikir. Buna bağlı olarak doku içinde ozmotik basınç artar ve doku hasarı meydana gelir. Örneğin diyabetiklerde gözde katarakt oluşumunda lenste sorbitol birikmesinin rol aldığı düşünülmektedir (32).



Şekil 1. Poliil (sorbitol) yolu (Ref 32'den alınarak modifiye edilmiştir)

Aldoz redüktaz enziminin glukozu sorbitole dönüştürmesi sırasında NADPH kullanıldığı için ortamda NADPH azalır ve hücre içi redox dengesi bozulur. NADPH, NO sentaz ve sitokrom P450 gibi birçok enzimin işlevi için ve ayrıca glutasyon redüktazın antioksidan aktivitesi için gereklidir ve harcanması sonucunda NO yapımının ve antioksidan aktivitenin azalması gibi durumlar ortaya çıkar (8, 34). Sorbitol daha sonra kofaktör olarak NAD'yi kullanan bir enzim olan sorbitol dehidrogenaz aracılığıyla fruktoza dönüştürülmektedir. Sorbitolün fruktoza okside olması sırasında ortamda NADH'nin artmasına bağlı olarak metabolik dengesizlik meydana gelir (35). NADH/NAD⁺ oranının artmasıyla doku hipoksisini hatırlatan bir durum oluşur ve glikoliz artar. Bu duruma *hiperglisemik pseudohipoksi* denmektedir (35). Bu oranının artması sonucunda gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz inhibe olur ve hücre içinde yüksek derecede reaktif glukozile şekerlerin konsantrasyonları artar. Gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz enziminin

inhibe olmasıyla dihidroksiaseton fosfatın alfa-gliserol-3-fosfata dolayısıyla diaçilgliserol ve protein kinaz C'ye dönüşümü artar (Şekil 2) (32). Reaktif şekerlerin ve protein kinaz C yolunun aşağıda belirtilen etkilerine bağlı olarak hücrelerde hasar meydana gelir. NADH/NAD⁺ oranının artmasının başka bir sonucu da ksantin oksidaz enziminin aktive olup, intra ve ekstrasellüler süperoksit dismütazın inaktive olması ve buna bağlı olarak serbest oksijen radikallerinin ortaya çıkmasıdır (34).

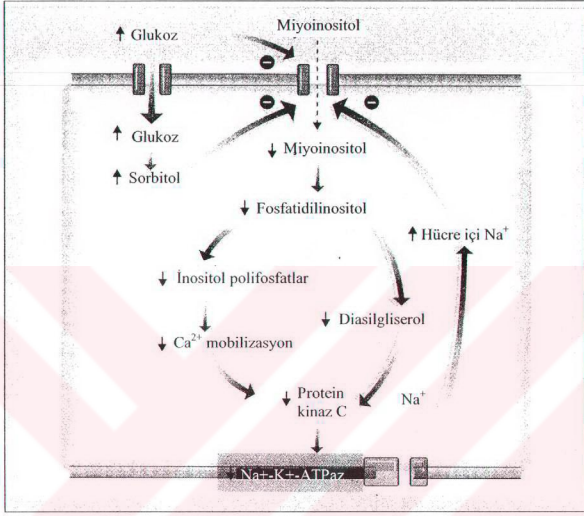


Şekil 2. Poliöl ve diaçilgliserol yolları arasındaki ilişki (Ref 32'den alınarak modifiye edilmiştir)

2.2.4.2. Poliöl yolu, miyoinositol ve Na⁺/K⁺ ATPaz:

Miyoinositol fosfatidilinositol gibi fosfoinositidlerin öncül molekülüdür. Fosfoinositidler, direkt olarak veya inozitol fosfat ve diaçilgliserol gibi maddeler aracılığıyla nöron zarında Na⁺/K⁺ ATPaz'ı aktive etmektedir. Diyabetiklerde glukozun miyoinositol ile yarışmaya girmesi gibi olası mekanizmalar sonucunda miyoinositol konsantrasyonları azalır. Miyoinositol konsantrasyonlarının azalması sonucunda inozitol polifosfat ve diaçilgliserol gibi moleküllerin yapımında da azalma görülür. İnositol polifosfatlar kalsiyum mobilizasyonunu önleyerek, diasilgliserolun azalması da direkt olarak, protein kinaz C'nin aktivitesini engeller. Buna bağlı olarak Na⁺/K⁺ ATPaz aktivitesinde de azalma meydana gelir ve hücre içinde Na⁺ düzeyleri artar. Miyoinositolun azalmasına bağlı meydana gelen

değişiklikler Şekil 3'te gösterilmiştir. Artmış hücre içi Na düzeylerinin nodal depolarizasyonu ve yavaş sinir-ileti hızını azalttığı düşünülmektedir (32).



Şekil 3. Hiperglisemide intrasellüler miyoinositol harcanması (Ref 32'den alınarak modifiye edilmiştir)

2.2.4.3. Diaçilgliserol sentezi ve protein kinaz C aktivasyonu:

Protein kinaz C (PKC) enzimleri, çoğu fosfatidilserin varlığında 1,2-diaçilgliserol (DAG) tarafından aktive olan izoenzimler ailesidir. DAG glikolitik yolun ara ürünleri olan gliseraldehit-3-fosfat ve dihidroksiaseton fosfattan sentezlenmektedir (32). DAG retina, aorta, kalp ve glomerüllerde artmış olarak bulunmaktadır. DAG artışına sekonder PKC aktivitesi de artmaktadır (32). PKC izoformları hücre içinde hücre yüzey reseptörleri, enzimler, kontraktıl proteinler, transkripsiyon faktörleri, diğer kinazlar gibi çeşitli hedef proteinleri fosforile ederek hücre regülasyonuna etki etmektedir. Buna bağlı olarak vasküler geçirgenlik ve kan akımının regülasyonu gibi diyabetik komplikasyonlar için önemli mekanizmalarda rol oynamaktadır (36).

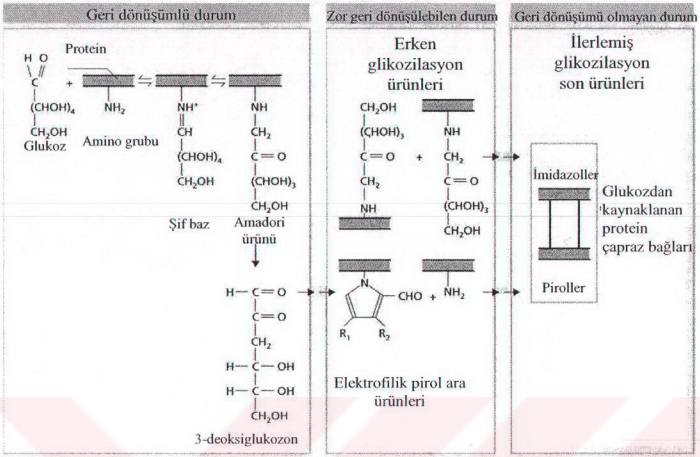
2.2.4.4. Proteinlerin Glikozilasyonu:

Erken Glikozilasyon Ürünleri:

Bu maddeler glukoz ve proteinlerin amino grupları arasında nonenzimatik glikozilasyon reaksiyonunun ürünüdür. Glukozun proteinlerin amino gruplarına bağlanıp, non-enzimatik bağlanma reaksiyonu sonrasında Schiff bazlarını oluşturmasının ardından bu ürünler haftalar içinde Amadori düzenlemesiyle daha stabil olan erken glikozilasyon ürünlerine dönüşmektedir. Bu şekilde oluşmuş en bilinen ürün hemogloblin A1c'dir. Erken glikozilasyon ürünlerinin *in vivo* olarak oluşumunu sağlayan iki ana faktör glukoz konsantrasyonu ve glukozu maruz kalma süresidir (32). Erken glikozilasyon ürünlerinin fazlaca oluşumu birçok yoldan diyabetik komplikasyonların gelişmesinde etkindir. Bu mekanizmalardan biri serbest radikallere bağlı oluşan hasarın artmasıdır (37).

Stabil makromoleküllerde kronik geri-dönüşümsüz değişiklikler:

Erken glikozilasyon ürünleri belirli oksidatif ve nonoksidatif reaksiyonlardan geçtikten sonra geri-dönüşümsüz olarak ilerlemiş glikozilasyon ürünlerini (AGE) oluşturmaktadır. AGE normalde düşük bir hızda oluşsa da hiperglisemi oluşum hızlarını artırır. Çapraz bağlar oluşturarak dokularda biriken ve serbest oksijen radikallerini oluşturan AGE'ler patogeneizde önemlidir. (32). Erken ve geç glikozilasyon ürünlerinin oluşumu Şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 4. Geri-dönüşümlü erken ve geri dönüşsüz ilerlemiş noz-enzimatik glikozilasyon ürünlerinin oluşumu (Ref 32'den alınarak modifiye edilmiştir)

AGE'lerin diyabetik dokularda yaptıkları zarar ekstrasellüler alan proteinleri, spesifik AGE reseptörleri ve intrasellüler makromoleküller ile etkileşimleri sonucunda ortaya çıkmaktadır (32).

a)Ekstrasellüler alan proteinleriyle çapraz bağ oluşumu:

Diyabetiklerde kollajenin glikozilasyonu artmaktadır ve insan LDL'si *in vitro* olarak glukozile edilmiş kollajene bağlanmaktadır (38). AGE'ler retinal, glomerüler ve endonöronal arteriyollerin bazal membranlarında IgG, IgM ve albumin gibi plazma proteinleriyle depolanmaktadır (39). Glukozla çapraz bağlar oluşturan matriks molekülleri damar duvarlarında birikmekte ve normal enzimatik bölünmeye daha az maruz kalmaktadır. Sonuç olarak matriks elemanlarının artışı damarların daralmasına neden olmaktadır (32).

b) AGE'lerin hücresele reseptörleri:

İnsan endotel ve glomerüler mesanjijyel hücrelerinde AGE reseptörleri (RAGE) tanımlanmıştır. Mesanjijyel ve endotel hücrelerinde AGE-RAGE ilişkisi serbest oksijen radikallerinin yapımını artırmakta ve buna bağılı olarak tümör nekroz faktörü (TNF- α), insülin-benzeri büyüme faktörü (IGF-1), trombositten-kaynaklanan büyüme faktörü (PDGF) ve adhezyon moleküllerinin salgılanmasıyla mesanjijyel hücre ve arter düz kası proliferasyonu meydana gelmektedir (40).

c) İntrasellüler AGE oluşumu:

Ekstrasellüler AGE oluşumu genel olarak glukozdan olmakla birlikte intrasellüler AGE oluşumu glukozdan çok daha hızlı bir şekilde reaksiyona giren birtakım glukozile edici şekerlerden olmaktadır. Bunlar arasında fruktoz ve gliseraldehit-3-fosfat (GAP) gibi glikolitik ara ürünler vardır. Bu maddeler DNA nükleotidlerinin amino gruplarıyla reaksiyona girerek bu molekülde değişikliklere neden olmaktadır (41).

2.2.4.5. Oksidatif stres:

Oksidatif stres reaktif oksijen türevlerinin düzeylerinde artış olarak tanımlanıp, artmış serbest radikal üretimi ve/veya azalmış antioksidan savunma mekanizmaları sonucunda ortaya çıkmaktadır (42). Oksidan maddeler eşleşmemiş elektronlar içerdikleri için kimyasal reaktiviteleri fazladır. Bilinen serbest radikaller arasında süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali ($\cdot OH$), nitrik oksit (NO) ve peroksinitrit ($ONOO^-$) vardır (43). O_2^- anyonu, aerobik solunum sırasında moleküler oksijenin indirgenmesi, aktive fagositlerden üretilme, katekolaminlerin oksitlenmesi ve araşidonik asit kaskadının aktifleşmesiyle ortaya çıkan elektronun moleküler oksijeni indirgemesi sonucunda ortaya çıkabilir. $\cdot OH$ radikali aerobik solunum sırasında moleküler oksijenin indirgenmesi sonucunda oluşur. NO vasküler endotelde salgılanırken, $ONOO^-$ de NO ile O_2^- 'nin reaksiyona girmesi sonucunda oluşur (43).

Denek hayvanlarında, $\cdot O_2^-$ 'nin hücrel kaynakları arasında endotel (44) ve vasküler düz kas hücreleri (VSMC) (45) vardır. Damar duvarında $\cdot O_2^-$ üretiminin ana kaynakları NAD(P)H oksidaz (46), ksantin oksidaz (47) ve endotelial NOS enzimidir (43). $\cdot O_2^-$ NO ile ONOO $^-$ oluşturarak veya süperoksit dismütaz ile reaksiyona girip H_2O_2 'ye dönüşerek metabolize edilir (43).

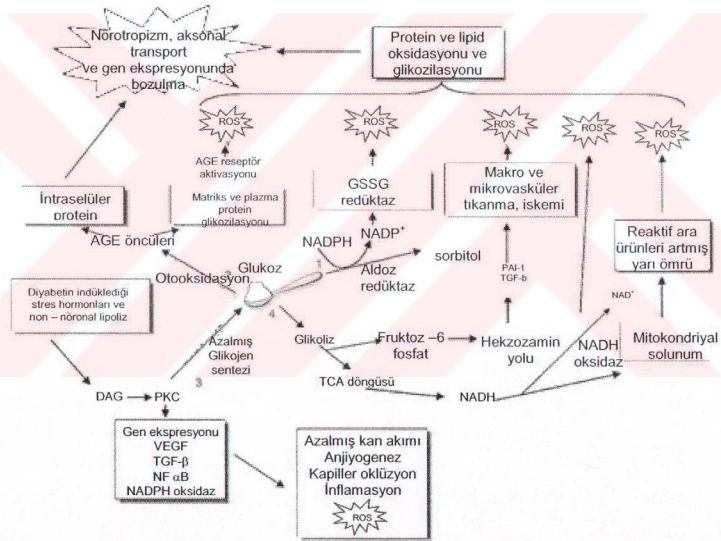
Serbest oksijen radikalleri eşleşmemiş elektronlar içermelerinden dolayı stabil olmayan moleküllerdir ve bu nedenle yağ, protein, nükleik asit ve karbonhidratlar gibi yapılarla reaksiyona girerler. Lipid peroksidasyonunun hücre hasarının çok iyi bir göstergesi olduğu düşünülmektedir (48). Lipid peroksidasyonunda ilk aşamada oksijen radikalleri yağ asitlerinin metilen grubundan hidrojen atomunu koparır. Geri kalan kısım oksijen ile birleşerek peroksi radikalini oluşturur. Ardından bir hidrojen atomunun daha kopmasıyla zincir şeklinde reaksiyon başlar. Sonuçta oluşan lipid peroksitler genel olarak stabil maddelerdir. Ancak demir ve bakır gibi metaller veya metal kompleksleriyle katalizasyon sonucunda alkoksil veya peroksil radikalleri meydana gelir. Bu maddeler de daha ileri lipid peroksidasyonuna neden olur. Lipid peroksidasyonu hücre membranının akışkanlığında değişikliklere, geçirgenliğinde artışa, membran potansiyelinde azalmaya ve sonuçta membranın rüptürüne neden olur. Hasar görmüş hücre lipid peroksidasyonuna daha duyarlıdır (43).

Reaktif oksijen radikallerinin direkt olarak ölçülmesi mümkün değildir. Bu nedenle lipid peroksidasyonu, DNA oksidasyonu ve protein oksidasyonu gibi oksidatif hasar ürünlerinin ölçümü oksidatif stresin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Başka bir yöntem de α -tokoferol, C vitamini ve tiol grupları gibi antioksidanların düzeylerindeki azalmanın ölçülmesidir (43). Lipid peroksidasyon ürünleri en fazla çalışılan oksidasyon ürünleridir (43,48). Lipid peroksidasyonunu değerlendirmek için tiobarbitürik asit-reaktif madde, konjüge dienler, hidroperoksitler, F_2 isoprostanlar ve nitroksit ölçümleri yapılır (48). Bunlar arasında en sık kullanılan yöntem olan TBARS yönteminde malondialdehidin tiyobarbitürik asit ile birleşmesinden oluşan ürün fluometri veya spektrofotometri ile ölçülür (49).

Oksidatif stres diyabetik vaskülopatinin patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır. Klinik ve deneysel diabetes mellitusta serbest oksijen radikallerinin arttığı ve antioksidan olan süperoksit dismütaz, katalaz, glutatyon ve askorbik asidin doku ve plazma konsantrasyonlarının azaldığı gösterilmiştir (50).

Diyabetiklerde, poliol yolundan substrat geçişinin artması, hiperglisemik psödohipoksi ve AGE oluşumunun, artmış oksidatif stresin önemli belirleyicileri olduğu düşünülmektedir (51). Reaktif oksijen radikalleri diyabetiklerde çeşitli mekanizmalarla etkilerini gösterir. Bunlar arasında membran lipidlerinin peroksidasyonu, NO'yla etkileşim gibi direkt etkilerin yanında, LDL oksidasyonunun artması, AGE'lerin oluşması ve trombosit ve monositlerin aktivasyonu gibi indirekt etkiler de vardır (50,51).

Hipergliseminin metabolik etkilerinin özeti Şekil 6'da verilmiştir.



Şekil 6. Hipergliseminin metabolik etkilerinin özeti (Endocrine Reviews 2004;25(4):s.614'ten alınarak modifiye edilmiştir. 1)Poliol yolu aktivasyonu; 2) glukoz otooksidasyonu ve AGE'lerin oluşumu; 3)PKC aktivasyonu; 4) elektron transport zincirinin yavaşlaması ve NADH oksidaz aktivasyonu

2.3. DİYABETİN MAKROVASKÜLER KOMPLİKASYONLARI:

Diabetes mellitus major bir kardiyovasküler risk faktörüdür ve diyabetik hastalarda prematür kardiyovasküler morbidite ve mortalite artmıştır (52). Tip 1 diabetes mellitus hastalarında 55 yaşına gelindiğinde koroner arter hastalığına bağlı mortalite % 30'lara kadar çıkmaktadır (53).

2.3.1. Diyabette ateroskleroz için risk faktörleri:

Genel popülasyon için gösterilmiş risk faktörleri diyabetikler için de geçerli olup, bunlardan en önemlileri arasında dislipidemi, hipertansiyon ve hiperinsülinemi vardır.

2.3.1.1. Dislipidemi:

Diyabetiklerde görülen dislipidemi hipertrigliseridemi, HDL düzeylerinde azalma, LDL içeriğinde değişme (trigliseritten zengin küçük, yoğun LDL parçalarında artış) ve apo E ile B gibi apolipoproteinlerde artış şeklindedir (54). Diyabet hastalarında ayrıca lipoproteinlerin glikozilasyon ve oksidasyon eğilimleri artmaktadır (55). Bu değişiklikler kötü metabolik kontrol ile artmakta ve sadece parsiyel olarak geri döndürülebilmektedir (54).

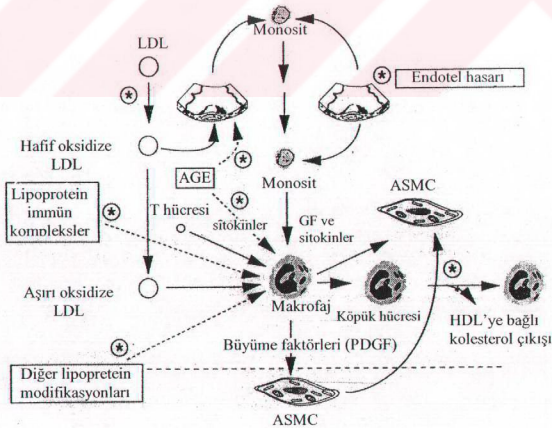
Hipertrigliseridemi Tip 1 ve Tip 2 diabetes mellitusu olanlar için önemli bir risk faktörüdür (56). Diyabetiklerde LDL yüksek olmamasına rağmen daha küçük, yoğun parçalar halinde bulunduğu görülmektedir. Genel popülasyonda küçük yoğun LDL'nin koroner arter hastalığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (57). Lipoproteinlerle ilişkili diğer risk faktörleri arasında lipoprotein a [Lp (a)] ve apolipoprotein B (apo B) vardır. Lp(a)'nın plazminojen ile homolojisi olmasından dolayı plazminojen reseptörüne bağlanmak için plasminojen ile yarışa girer. Buna bağlı olarak da plazminojenin trombolitik etkisini engeller (58). Apolipoprotein B, VLDL ve LDL'nin ana yapısal lipoproteini olup, bu lipoproteinlerin düzeyleri yükseldiği zaman plazmada artmış olarak bulunabilir (54).

2.3.1.2. **Hipertansiyon:**

Hipertansiyon genel popülasyonla karşılaştırıldığında Tip 1 diabetes mellitus hastalarında daha sık görülmektedir (54). Hipertansiyon diyabetik nefropatinin sonucunda gelişebildiği gibi nefropatisi olmayan diyabetiklerde normal popülasyona göre daha fazla karşılaşılmaktadır (59).

2.3.1.3. **Hiperinsülinemi:**

Artmış insülin konsantrasyonları ve insülin direncinin kardiyovasküler hastalık için bağımsız risk faktörleri olduğu bilinmektedir (60), ancak insülinin makrovasküler hastalık etyolojisindeki rolü bilinmemektedir (61). İnsülin direnci Tip 2 diabetes mellitusa özgü bir mekanizmadır. Tip 1 diyabetiklerde ise egzojen insülin alımına bağlı hiperinsülinemik durum gelişebilir (54). İnsülin, çeşitli sinyal mekanizmalarıyla vasküler hücrelerdeki gen ekspresyonu, protein sentezi ve NO üretimi gibi işlevleri gerçekleştirmektedir (54). Artmış insülin konsantrasyonu düz kas hipertrofisi ve hiperplazisi ile ekstraselüler matris proteinlerinin artması aracılığıyla aterogeneze katkıda bulunmaktadır (61). Bununla birlikte insülinin vazodilatör etkileri gösterilmiştir ve bu etkilerin kısmen NO tarafından gerçekleştirildiği düşünülmektedir (62).



Şekil 7. Aterosklerotik süreçte diyabetin etki bölgeleri (Ref 27'den alınarak modifiye edilmiştir) (HDL= yüksek dansiteli lipoprotein; LDL= düşük dansiteli lipoprotein; GF= büyüme faktörü; ASMC= arteryel düz kas hücresi; PDGF=trombositten kaynaklanan büyüme faktörü)

2.3.2. Makrovasküler komplikasyonların patogenezi:

Diyabetin makrovasküler komplikasyonlarının temelinde yatan aterosklerotik sürecin gelişiminde çeşitli basamaklar etkili olmaktadır. Bunlar Şekil 7’de gösterilmiştir.

2.3.2.1. Uzamış hiperglisemi ve protein glikozilasyonu:

Diyabetiklerde dolaşımdaki lipoproteinlerin glikozilasyonunda artış meydana gelmektedir (55). Bazı çalışmalarda makrofajlar tarafından glukozile LDL alımında artış olduğu gösterilmiştir (38).

2.3.2.2. Lipoproteinlerin oksidatif olarak modifikasyonu:

Diyabetiklerde lipoprotein parçalarının oksidatif modifikasyonu artmaktadır (55,63,64). Okside LDL’nin ateroskerozda önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (65). Okside LDL monositlerin bağlanması, kemoatraksiyonu, ve makrofajlara dönüşümüne neden olmaktadır (65). Diyabetiklerde daha çok görülen küçük yoğun lipoprotein parçaları büyük parçalara göre oksidatif modifikasyona daha fazla eğilim gösterir (66).

2.3.2.3. Lipoprotein immün komplekslerin oluşumu:

Dolaşımda bulunan lipoprotein immün komplekslerin, makrofaj köpük hücre oluşumunu indükleyerek veya arter duvar hücrelerinde aterojenik mekanizmaların uyarılması yoluyla, akselere ateroskleroza ilişkili olduğu gösterilmiştir (67).

2.3.2.4. Lipoprotein agregasyonu:

LDL reseptörleri aracılığıyla lipoprotein agregatların fagosite edilmesi lipidlerin birikimine ve köpük hücrelerinin oluşumuna neden olmaktadır (68).

2.3.2.5. Lipoprotein yüzey kompozisyonunda değişiklikler:

Tip 1 diyabetiklerde plazmadaki kolesterol/lesitin oranında artış görülmektedir. Bu oran kardiyovasküler hastalık riskinin bir indeksi olarak düşünülmektedir (69).

2.3.2.6. Tromboza eğilim:

Diyabetiklerde trombosit tutunması ve agregasyonunda anormallikler yanında çeşitli koagülasyon faktörlerinin ve doku plazminojen aktivatörü (tPA) düzeylerinin de arttığı gösterilmiştir (70).

2.3.2.7. Endotel disfonksiyonu:

Anormal endotel fizyolojisi aterogenezin hem erken hem de ilerleyen dönemlerinde rol oynamaktadır (5,7). Koroner endotel vazodilatatör disfonksiyonu, aterosklerotik hastalık progresyonunun ve kardiyovasküler olay oranının bağımsız bir prediktörü olarak bulunmuştur (71). Endotel disfonksiyonunun anlaşılabilmesi için önce endotel fonksiyonuna yakından bir göz atmanın yararı olacaktır.

2.4. ENDOTEL FONKSİYONU:

Endotel, yıllar boyunca sadece kan ve intertisyum arasında su ve küçük moleküllerin geçmesini sağlayan semipermeabl bir bariyer olarak görülmüştür. Endotel hücrelerinin varlığı ilk defa 1800'lü yıllarda von Recklinghausen tarafından damarların sadece tünellerden oluşmadığı, ancak hücrelerle kaplı olduğunun gösterilmesiyle anlaşılmıştır (72). Yıllar sonra damar duvarıyla ilişkili elektron mikroskopisi ve fizyolojik çalışmaların artmasıyla endoteli önemli sekretuar, sentez yapan, metabolik ve immunolojik işlevleri olan bir organ olarak tanımlayan bugünkü görüşe ulaşılmıştır (5).

Endotelin fonksiyonları arasında tromboz ve trombolizin kontrolü, koagülasyonun kontrolü, damar duvarı ile trombosit ve lökositlerin etkileşiminin sağlanması, düz kas hücre proliferasyonu ve vasküler tonüsün sağlanması vardır (5). Vasküler tonüs üzerindeki etkileriyle kan akımının regülasyonunda çok önemli bir rol oynamaktadır. Endotel hücreleri hemodinamik durumdaki değişiklikleri ve kanda bulunan çeşitli fiziksel ve kimyasal uyarıları, reseptörleri aracılığıyla algılayıp, bunlara vazoaktif, tromboregülatuar moleküller ve büyüme faktörleri salgılayarak cevap vermektedir. Endotelden salgılanan bu maddeler parakrin yolla damar yataklarının daralmasına ve genişlemesine neden olarak kan akımını düzenler (72).

Endotelden salgılanan maddeler arasında endotel-kaynaklı gevşeme faktörü (EDRF), prostasiklin, endotel-kaynaklı hiperpolarizan faktör (EDHF), endotelin, interlökinler, trombosit aktive edici faktör (PAF), doku tipi plazminojen aktivatörü (t-PA), plazminojen inhibitörleri ve von Willebrand faktör vardır (5). Bunlardan bazıları detaylı olarak Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2: Endotelden salgılanan ana regülatuar maddeler, etkileri, salınım yolları, kimyasal bileşikleri ve öncül bileşikleri (72)

Madde	Ana etki	Diğer etkiler	Salınım	Bileşik	Öncül bileşik
NO (nitrik oksit)	Vazodilatasyon	Damarların bazal tonusunu sağlar; lökosit adhezyonunu inhibe eder; trombosit adhezyon, aktivasyon, sekresyon ve agregasyonunu inhibe eder; düz kas migrasyonu ve proliferasyonunu inhibe eder	Parakrin/konstitütif ve trombin; ADP, bradikinin, Substans P, muskarinik agonistler, yıkıcı stres ve sitokinler tarafından indüklenir	Heterodiatomik serbest radikal	L-arginin
PGI ₂ (prostasiklin)	Vazodilatasyon	Trombosit agregasyonu ve depozisyonunu geciktirir	Parakrin/vasküler düzensizlik bölgelerinde indüklenir	eicozonoid	Araşidonik asit
PAF (trombosit aktive edici faktör)	Vazokonstriksiyon	Hücre yüzeyinde lökosit adhezyonunu uyarır	indüklenir	fosfolipid	Araşidonik asit
ET-1 (endotelin-1)	Vazokonstriksiyon	Düz kas hücreleri için mitojen;çeşitli maddelerin etkilerini ayarlar	Parakrin/hüpoaksi, yıkıcı stres ve iskemi ile indüklenir	21 aminoasitlik peptid	Prepro-endotelin-1 (203 amino asit)

2.4.1. Endotelten salgılanan vazodilatasyon özelliği olan medyatörler:

Endotel hücrelerinden salgılanıp damar düz kasında gevşemeye neden olan üç önemli madde vardır (5). Bunlar EDHF, prostasiklin ve EDRF'dir.

2.4.1.1. Endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör (EDHF):

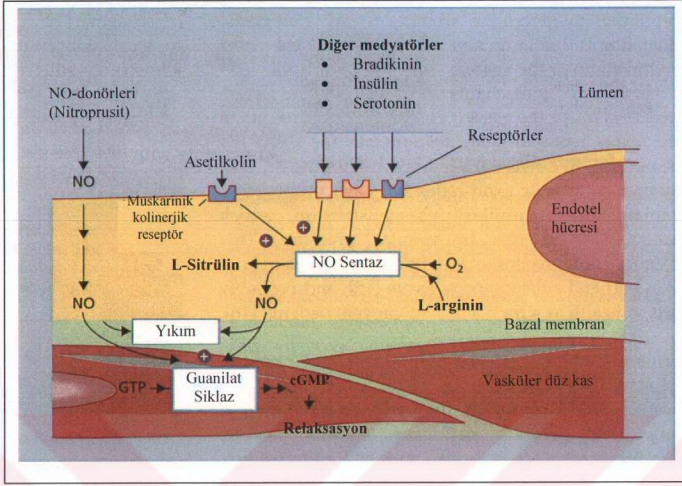
Endotel bu madde aracılığı ile alttaki düz kasın hiperpolarizasyonuna ve dolayısıyla gevşemesine neden olmaktadır (5). Büyük arterlerde endotele bağımlı vazodilatasyonda NO daha önemli rol oynasa da NO eksikliği durumlarında EDHF de normale yakın vazodilatasyon sağlayabilir (5).

2.4.1.2. Prostrasiklin:

Siklooksijenaz enzimi ile arasıdonik asitten oluşturulan bu madde adenilat siklazı aktive edip, siklik 3', 5'-adenozin monofosfat (siklik AMP) üretimini artırarak vasküler düz kasın gevşemesini sağlamaktadır. Bu maddenin ayrıca antitrombotik etkisi vardır (5).

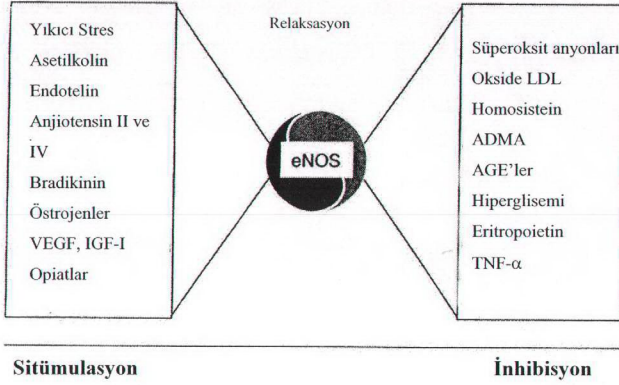
2.4.1.3. Endotel- kaynaklı gevşeme faktörü (EDRF):

EDRF'nin içeriği hakkında çelişkili veriler vardır. Genel olarak EDRF NO ile aynı madde olarak kabul edilse de EDRF'nin NO, EDHF ve prostasiklin ile birlikte birden fazla maddeden oluştuğu da düşünülmektedir (73). Bu madde ilk kez Furchgott ve Zawadzki tarafından intakt endotel varlığında asetilkolin verilmesi sonucunda tavşan aortik halkalarında gevşeme görülmesi üzerine gösterilmiştir (74). Daha sonra gevşemeye neden olan bu madde Palmer ve arkadaşları tarafından NO olarak tanımlanmıştır (10). NO, heterodiatomik bir serbest radikal olup, L-argininin NOS (nitrik oksid sentaz) enzimi ile L-sitruiline oksidasyonu sırasında ortaya çıkan üründür (10). NOS enzimi aktivitesi için ortamda NADPH, flavin adenin mono ve dinükleotidler ve tetrahidriyopterin bulunması gerekmektedir (10,75). NO üretimi Şekil 8'de gösterilmiştir.



Şekil 8. Damar duvarında NO üretimi ve yıkımı (Textbook of Diabetes 1997, 2. basım, s. 43.3'ten alınarak modifiye edilmiştir)

NOS enziminin izoformlarında biri olan eNOS, endotel hücrelerinin membranında kaveoline bağlı olarak inaktif formda bulunur. Çeşitli uyarılar yoluyla hücre içinde kalsiyum oluşumu kalmodulin oluşumunu artırır ve kalmodülin de kaveolini yerinden ayırarak NOS enzimini aktive eder (10). Kalsiyum aracılığıyla etki eden uyarılar dışında, yıkıcı stres de enzimin fosforilasyonu aracılığıyla NO üretimini uyarır (7). Endotelial NOS enzimini aktive ve inhibe eden maddeler Şekil 9'da gösterilmiştir.



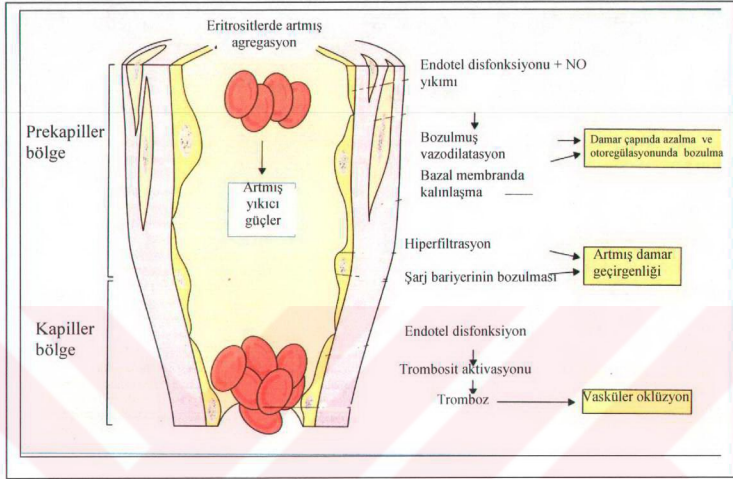
Şekil 9. eNOS stimülasyon ve inhibisyonu (Ref 112'den alınarak modifiye edilmiştir) (VEGF=vasküler endotelial büyüme faktörü; IGF-1=insülin-benzeri büyüme faktörü; TNF- α =tümör nekrozis faktör- α)

EDRF (NO) salınımı:

a)Yıkıcı stres (*shear stress*):

NO salınımını etkileyen ana faktörlerden biridir. Damardaki laminar akım endoteli yıkıcı strese maruz bırakmaktadır. Fizyolojik sınırlarda olduğu müddetçe yıkıcı stres NO, prostasiklin gibi vazoaktif maddelerin salınımına neden olmaktadır. Yıkıcı stres NO salınımını sağlamanın yanında NOS'un ve NO'nun oksidatif olarak yıkılmasını engelleyen süperoksit dismütazın da ekspresyonunu artırmaktadır (76). Patolojik sınırlara ulaştığında endotel hücrelerinin alttaki tabakayla fokal kontakt bölgelerinde teması sonucunda hücre morfolojisinde değişme meydana gelmektedir.

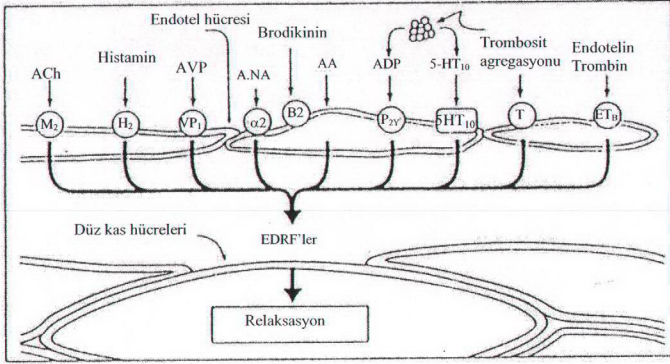
Ayrıca endotel gen ekspresyonunun da etkilenmesi yoluyla hücre yapısında değişikliğe neden olmaktadır (77). Aterosklerozun en fazla koroner arterlerin dallanma noktalarında gözlenmesi yıkıcı stresin bu bölgelerde çok yoğun olmasına bağlanabilir (78). Yıkıcı stresin damar duvarındaki etkileri Şekil 10'da görülebilir.



Şekil 10. Yıkıcı stresin damar duvarında etkileri (Textbook of Diabetes1997, 2. basım, s.43.9'dan alınarak modifiye edilmiştir)

b) Endotel reseptörlerinin uyarılması:

Uyarı yapan maddeler arasında asetilkolin, hormonlar (vazopresin, katekolaminler), otokoidler (histamin, bradikinin, Substans P), trombositler tarafından salgılanan maddeler (serotonin, adenozin difosfat) ve koagülasyon sırasında oluşan maddeler (trombin) vardır (Şekil 11). Çoğunlukla, bu uyarılarla sadece NO değil, beraberinde EDHF ve/veya prostasiklin de salgılanmaktadır (7).



Şekil 11. Endoteli uyaran maddeler. (Ref 7'den alınarak modifiye edilmiştir).

A=adrenalin; AA=araşidonik asit; Ach=asetilkolin; ADP=adenozin difosfat; α_2 =alfa adrenerjik reseptör; AVP=arginin vazopressin; B=kinin reseptörü; ET=endotelin reseptörü; H=histaminergik reseptör; 5-HT₁₀:serotonin, serotinerjik reseptör; M=muskarinik reseptör; NA=noradrenalin; P=pürinerjik reseptör; T=trombin reseptörü; VP=vazopresinerjik reseptör.

NO etki mekanizması:

NO vasküler düz kas hücrelerini gevşeterek damarın bazal tönüsünü sağlamaktadır (7). NO subendotelial boşluğa ve düz kas hücrelerine geçer. Guanilat siklazın hem grubuna bağlanması sonucunda 3'-5' guanozin monofosfat (cGMP) meydana gelir (79). Bunun sonucunda cGMP'ye bağımlı protein kinaz aktive olur, kalsiyum iyonları hiperpolarize olur ve düz kas hücrelerinde gevşeme meydana gelir (7). Molekül, yine siklik GMP'ye bağlı bir mekanizma ile trombosit adhezyonu, aktivasyonu ve agregasyonunu engellemektedir (80). NO ayrıca endotele lökosit adhezyonunu (81) ve düz kas proliferasyonunu (82) inhibe etmektedir.

2.4.2. Endotel fonksiyonunun ölçümü:

Endotel fonksiyonunun ölçülmesi için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Dolaşımda endotel kaynaklı regülatuar proteinlerin ölçülmesi endotel fonksiyonu hakkında bilgi verebilirken, endotele-bağımlı vazodilatasyonun ölçümü de kullanılan başka bir yöntemdir (83).

2.4.2.1. Endotele-bağımlı vazodilatasyonun ölçülmesi:

Endotel vazoreaktivitesi endotele-bağımlı vazodilatasyonu sağlayacak çeşitli uyarılarla değerlendirilmektedir. Klasik uyarıcı olan asetilkolin, muskarinik reseptörler üzerinden etki ederek vasokonstriksiyona neden olur. Aynı zamanda G proteinleri aracılığıyla NO salınımını uyarır ve sonuçta endotel üzerinde bu iki mekanizmanın dengesi önemli olur. (84).

Endotel vazoreaktivitesinin ölçülmesi için çeşitli invazif ve non-invazif yöntemler kullanılmaktadır.

Anjiografi:

Bu yöntemle koroner dolaşıma asetilkolin infüzyonu sonrasında koroner çap ölçümleri yapılabilmektedir (85). Bu yöntemin invazif olması bir dezavantaj olup, ateroskleroza bağlı herhangi bir belirti veya bulgu vermeyen hastalarda kullanılması uygun olmayabilir (5).

Venöz oklüzyon pletismografi:

Bu yöntemde ön koldan intra-arteryel kateterizasyon yoluyla basınç ölçümleri yapılır. Uyarı için intraarteryel olarak vazodilatör maddeler verilir veya ön koldan manşonla basınç yapılarak iskemi meydana getirilir ve vazodilatasyon cevabı ölçülür. (86). Bu yöntemin de invazif olma dezavantajı vardır.

PET:

Bu yöntem non-invazif bir yöntem olup, miyokard kan akımını değerlendirmek için kullanılmaktadır. Bazal kan akımı ölçüldükten sonra dipiridamol ve adenosin verilmesiyle kan akımında meydana gelen değişiklik hesaplanmakta ve bu da koroner akım rezervi olarak değerlendirilmektedir (6).

Doppler ultrasonografi:

Bu yöntemle reaktif hiperemi oluşturarak endotele-bağımlı vazodilatasyon ve sublingual nitrogliserin verilerek endotelden bağımsız vazodilatasyon ölçülebilmektedir. Brakiyal arterden yapılan ölçümlerde yüksek çözünürlü ultrasonografi cihazı kullanılır. Ölçümler antekübital fossanın 5-10 cm üzerinden yapılır ve brakiyal arter uzunlamasına görüntülenir. Bazal brakiyel arter çapı ölçüldükten sonra manşon şişirilerek 5 dakika beklenip indirilir. Kan akımında geçici olarak 5-10 kat artış meydana gelir; bir başka deyişle reaktif hiperemi oluşturulur. Ölçüm manşonun indirilmesinden bir dakika sonra diyastolün sonunda yapılır (87). Akıma bağılı dilatasyon arter çap değişikliğinin bazal arter çapına bölünmesiyle hesaplanır ve % fark olarak ifade edilir ($\% \text{FMD} = \frac{\text{arter çap değişikliği}}{\text{bazal arter çapı}} \%$). Arter çapı yakından uzağa kan-duvar kalınlığı veya en yoğun eko ile ölçülür. Sağlıklı genç bireylerde olması gereken vazodilatasyon miktarı üst koldan ölçümlerde %10-20 civarında tespit edilmiştir (83,88). Endotelden bağımsız vazodilatasyonu, yani arteryel düz kas etkisini değerlendirmek amacıyla nitrogliserin verilmeden önce ve verildikten 5 dakika sonra ölçümler tekrarlanır (83). Normal olarak nitrogliserin brakiyal arteri yaklaşık olarak % 20 kadar genişletir (89). Bu yöntemin tekrarlanabilir olduğu (90) ve sonuçlarının koroner endotel fonksiyonu ölçümleriyle iyi korele olduğu gösterilmiştir (91).

2.4.2.2. Endotel fonksiyon belirteçlerinin ölçülmesi:

Endotel hasarı sonucu salınan bu maddeler dolaşımında tespit edilebilir ve endotel disfonksiyonunun göstergesi olarak kullanılabilirler. Bu belirteçler Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3. Endotel fonksiyonun dolaşımdaki belirteçleri.

- Asimetrik dimetilarginin (ADMA)
- Von Willebrand faktör (vWF)
- Plazminojen aktivatör inhibitörü
- Endotelin-1
- İntersellüler adhezyon molekülü (ICAM-1)
- Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VCAM)
- Trombomodulin

2.5. ENDOTEL DİSFONKSİYONU:

Endotel disfonksiyonu endotelin çeşitli fonksiyonlarında bozulma ile kendisini göstermektedir. Bunlardan bazıları azalmış bariyer fonksiyonu, bozulmuş antitrombojenik özellikler, azalmış anjiyogenik kapasite, vasküler düz kas tonisitesinin, proliferasyon kapasitesinin ve migratuvar özelliklerinin uygunsuz regülasyonu, bozulmuş sentez işlevleri, nötrofil ve monositlerin diapedezinin engellenememesidir (8). Ancak endotel disfonksiyonu endotelin daha çok vazoregülasyon işlevinin bozulması için kullanılmaktadır (6). İnsan çalışmalarından elde edilen sonuçlar, endotele-bağımlı vazodilatasyonda bozulmanın aterosklerozun erken evrelerindeki önemini vurgulamaktadır (7).

Belirgin bir darlık olmaksızın vazodilatasyonda bozulma hiperkolesterolemi (92), insülin rezistansı ve obezite (93), tip 1 (94,95,96,97,98,99,100) ve tip 2 (101,102) diabetes mellitus ve hipertansiyonda (103) gözlenmekle birlikte ilerlemiş yaş (104) ile aktif sigara kullanımı (105) gibi durumlarda da görülmektedir.

2.5.1. Endotel disfonksiyon patogenezi:

Endotel fonksiyonunda bozulma çeşitli mekanizmalar sonucunda meydana gelebilir (8). Bu mekanizmalar Tablo 4'te gösterilmiştir.

Tablo 4. Endotel disfonksiyon patogenezindeki mekanizmalar

2.5.1.1. NO sinyal mekanizmasında değişiklik:

Kalsiyum ionoforları reseptör aktivasyonundan bağımsız olarak endotel hücrenin içine kalsiyum girişini sağlayıp NO salınımına neden olmaktadır (106). Endotel disfonksiyonunda kalsiyum ionofor uyarısıyla meydana gelen endotele bağımlı vazodilatasyonun, genel olarak reseptör aracılığıyla meydana gelen cevap kadar etkilendiği görülmüştür (107). Bu da endotel disfonksiyonunda problemin daha çok membran reseptörlerinde veya bu reseptörler tarafından aktive edilen sinyal mekanizmalarında olduğunu düşündürmektedir (106).

2.5.1.2. NO yıkımının artması:

Köpeklerde süperoksit dismutaz verilmesinin NO düzeylerini iki kat artırması serbest oksijen radikallerinin NO'nun yıkımını artırdığını düşündürmüştür (108).

2.5.1.3. Düz kasın NO'ya cevabının azalması:

NO'nun egzojen kaynağı olan nitrogliserine azalmış cevap olması düz kasın NO'ya karşı duyarlılığında bir azalma olduğunu göstermektedir. Endotele-bağımlı vazodilatasyon bozukluğunda genel olarak endotelden-bağımsız olan vazodilatörlere cevap azalmamıştır, çünkü düz kasta herhangi bir patolojik durum yoktur (8). Ancak bazı durumlarda endotelden-bağımsız dilatasyonunun da

bozulduğu saptanmıştır. Diyabette endotelden bağımsız vasodilatör olan sodyum nitropruside ile kan akım cevabının (% GTN) normal (101,109) veya bozulmuş olduğunu gösteren çalışmalar vardır (95,96,97). Diyabetiklerde % GTN normalken % FMD'nin bozulmuş olması endotel disfonksiyonunun düz kasın azalmış NO duyarlılığından daha önce ortaya çıktığını düşündürmektedir (102).

2.5.1.4. Endotele-bağlı konstriktör maddelerin artması :

Bunların NO'yla birlikte salgılanan prostanoidler olduğu bilinmektedir (8). Bu maddelerin izole edilmiş diyabetik aortada gözlenen endotel disfonksiyonunda rol oynadıklarını düşünülmektedir (110).

2.5.1.5. NO üretiminin azalması:

NOS ekspresyonu ve aktivitesindeki değişiklikler:

NO'daki azalma kısmen aterosklerotik damarlarda eNOS aktivitesinin azalmasına bağlanmıştır (111). Çeşitli patofizyolojik faktörlerin eNOS ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir. Tümör-nekrozis faktör- α (TNF- α), hipoksi, yüksek konsantrasyonda okside LDL (oxLDL), O_2^- , homosistein, ADMA, AGE'ler, hiperlipisemi ve eritropoietin maruziyeti eNOS düzeylerini azaltmaktadır (97,112).

NOS enzimi substratında azalma:

NOS'un substratı L-arginin aminoasitidir (10). Endotel hücresi içindeki arginin konsantrasyonunun milimolar düzeydeyken hücre dışındakinin mikromolar düzeyde olmasından dolayı argininin NOS enzimi için hız kısıtlayıcı özellik taşımadığı düşünülmektedir. L-argininin hücre içindeki düzeylerinin NOS enziminin işlevi için gereken düzeylerden oldukça fazla olması, L-argininin dışardan verilmesinin NO üretimi üzerinde etkisi olmayacağını düşündürmektedir (22). Buna karşın bazı durumlarda dışardan L-arginin verilmesiyle endotelde NO üretiminin arttığı görülmüştür (12,113,114).

Tetrahydrobiopterinde azalma:

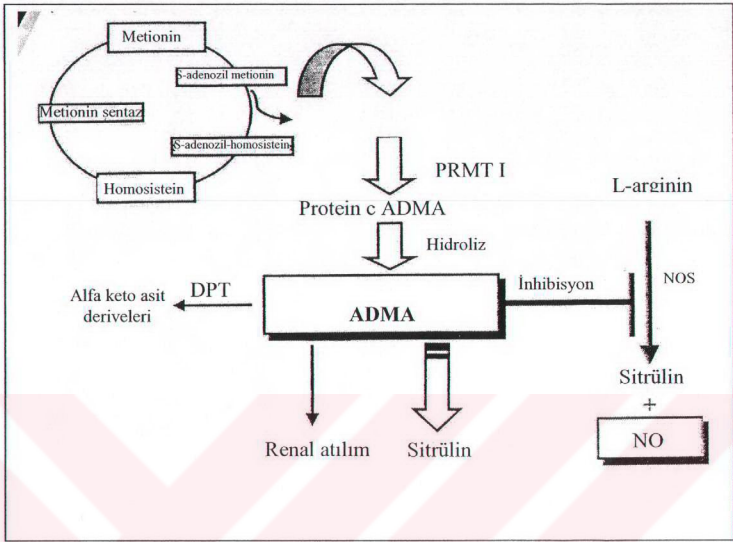
Tetrahydrobiopterin NOS enzimi için kritik bir kofakör olup, enzimin L-arginini bağlama yeteneğine katkıda bulunmaktadır. Tetrahydrobiopterin eksikliği durumunda enzim elektronları moleküler oksijene transfer edip O_2^- anyonunun oluşumuna neden olmaktadır (115).

NOS inhibitörleri:

Asimetrik dimetilarginin (ADMA) ve N-monometil-L-arginin (L-NMMA) NOS enziminin kompetitif inhibitörleridir (116). ADMA proteinlerin posttranslasyonel olarak metile edilmesi ve daha sonra hidrolize olmasından oluşan modifiye bir amino asittir (117). Arginin rezidülerini metile eden iki tip enzim bulunmaktadır. Protein arginin metiltransferaz tip I (PRMT I) ADMA'yı oluştururken, protein arginin metiltransferaz tip II (PRMT II) ADMA'nın bir stereoizomeri olan simetrik dimetilarginini (SDMA) oluşturmaktadır (118). ADMA'nın kandaki konsantrasyonu SDMA'nın yaklaşık 10 katı kadardır (119). SDMA'nın NOS enzimi üzerinde direkt inhibe edici etkisi yoktur (118).

Her üç metilarginin (ADMA, SDMA ve L-NMMA) endotel hücrelerinin içine, toplu olarak y^+ taşıyıcısı olarak bilinen katyonik amino asit bir taşıyıcı yoluyla girer ve bunun için birbirleriyle ve arginin ile yarış halindedir (118,120). Endotel hücreleri içindeki ADMA miktarının plazmaya göre daha fazla olduğu düşünülmektedir (12). İzole edilmiş damarlar ve endotel hücre kültürlerinde egzogen ADMA'nın 1 ve 10 $\mu\text{mol/L}$ arasındaki düzeylerinin vasküler NO sentaz aktivitesini ve dolayısıyla endotele-bağımlı vazodilatasyonu etkilediği gösterilmiştir (121).

ADMA kısmen renal yolla vücuttan atılsa da, metabolizmasının çoğundan dimetilarginin dimetil-aminohidrolaz (DDAH) enzimi sorumludur. ADMA DDAH enzimi ile L-sitrülin ve dimetilamine hidrolize olur. SDMA aynı enzim ile metabolize olmaz. (122). ADMA'nın metabolizmasının küçük bir kısmı da dimetilarginin piruvat transferaz (DPT) aracılığıyla böbrekte veya asetilasyon yoluyla karaciğerde gerçekleşmektedir (22). Parenteral olarak verilen ADMA'nın sadece % 5'i idrarda atılmaktadır (15). ADMA'nın yapımı ve metabolizması Şekil 12'de görülmektedir.



Şekil 12. ADMA molekülünün yapımı ve metabolizması (Nephrol Dial Trasplant 2001;16'dan alınarak modifiye edilmiştir) (PRMT-1=protein arginin metiltransferaz tip I;DPT= dimetilarginin piruvat transferaz)

ADMA molekülü ilk kez 1992'de Vallance ve arkadaşları (116) tarafından tanımlanmış ve plazma ADMA konsantrasyonlarının böbrek yetmezliği olan hastalarda arttığı ve endojen ADMA'nın endotele bağımlı vazodilatasyon üzerinde antagonizm yaptığı gösterilmiştir (123). Sağlıklı kişilerde $1.0 \pm 0.1 \mu\text{mol/L}$ olan (24) plazma ADMA düzeyleri hiperkolesterolemik kişilerde 2 kat (12), periferik arter hastalığı ve yaygın ateroskleroza olanlarda da yaklaşık 3 kat artmıştır (124). Plazma ADMA düzeyleri ayrıca hipertrigliseridemi (13), postprandiyal dislipidemi (125), hipertansiyon (14,126), hiperhomosisteinemi (15), konjestif kalp yetmezliği (127), inme (128), akut koroner sendrom (129) durumlarında ve yaşlılarda (130) artmış olarak bulunmuştur. Sağlıklılarda bakılan ADMA konsantrasyonları yaş, ortalama kan basıncı ve ortalama glukoz değerleriyle anlamlı ilişkili olarak artmış bulunmuştur (11). Tip 2 diyabetik hastalarda ADMA elevasyonları bildirilmiştir (16,22,131). Tip 1 diyabetiklerde ADMA düzeyleri ile ilişkili olarak literatürde herhangi bir veri bulunmamaktadır.

ADMA'nın, aterosklerozun non-invazif bir ölçümü olan (132) karotis arter intima media kalınlığı ile pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur (11). Son dönem böbrek yetmezliği ve hiperkolesterolemi durumlarında ADMA'nın kardiyovasküler olayların ve total mortalitenin bağımsız bir prediktörü olduğu öne sürülmüştür. Buna bağlı olarak ADMA'nın ateroskleroz için erken bir gösterge olabileceği düşünülmektedir (11,12,133). Ayrıca ADMA düzeylerinin aterosklerotik hastalığın ciddiyetiyle paralel olduğu gösterilmiştir (10,11,124).

Plazma ADMA düzeylerinde artış görülmesi için 3 ana sebep vardır. Bunlar enzimatik hidrolizinde azalma, renal filtrasyonunda azalma ve sentezinde artıştır (11). Tip 2 diyabetik yapılmış sıçanlarda DDAH aktivitesindeki azalmanın ADMA düzeylerindeki artış ile güçlü bir ilişkide bulunması, bununla birlikte SDMA düzeylerinde değişiklik olmaması, hipergliseminin ADMA'daki artışı DDAH tarafından hidrolizini azaltarak yaptığını düşündürmektedir (34,113,133). Son dönem böbrek yetmezliğinde ADMA düzeylerinde artış olduğu bilinmektedir ve buradaki mekanizmanın ADMA'nın klirensindeki azalma olabileceği öne sürülmektedir (133). Bununla birlikte plazma ADMA düzeyleri ile kreatinin klirensi arasında korelasyon bulunmamıştır; bu da ADMA düzeylerindeki artışın ADMA'nın renal klirensindeki azalmaya bağlı olmadığını düşündürmektedir (11). Okside LDL varlığında protein-arginin N-metiltransferaz enziminin ekspresyonunun ve dolayısıyla ADMA yapımının arttığı gösterilmiştir (134).

2.6. TİP 1 DİYABETİKLERDE ENDOTEL DİSFONKSİYONU:

Tip 1 diabetes mellitusta endotel disfonksiyonu varlığına dair çelişkili sonuçlar vardır. Asemptomatik Tip 1 diabetes mellitus hastalarında, klinik olarak gösterilmiş ateroskleroz olmaksızın büyük arterlerde endotel fonksiyonun bozuk olduğu gösterilmiştir (95). Rezistans damarlarında yapılan çalışmalarda asetilkolin'in indüklediği endotele-bağımlı vazodilatasyonun normal (109,135) ve bozulmuş olduğunu gösteren çalışmalar vardır (94,96,97,98,99,100). Çelişkili sonuçlar olmasının sebebi bilinmemekle birlikte, mikro veya makrovasküler komplikasyonların varlığı, cinsiyet, endotel fonksiyon testleri sırasında değişken

glukoz düzeyleri, insülin düzeyleri ve glisemik kontroldeki farklılıkların sonuçları etkileyebileceği düşünülmektedir (98). Buna karşın endotel disfonksiyonu ile açlık kan şekeri veya insülin düzeyleri arasında ilişki bulunmayıp, hastalık süresiyle önemli korelasyon bulunmuştur. Bu da hiperglisemini yoğunluğundan çok süresinin endotel disfonksiyonu gelişiminde önemli olduğunu düşündürmektedir (95). Bu sonuçlar diyabet süresinin küçük ve büyük damar komplikasyonu gelişmesiyle güçlü korelasyon göstermesiyle uyumludur (136). İnsanlarda yapılan çalışmalarda A1c değerleri ile endotel disfonksiyonu arasında korelasyon olduğunu gösteren (99) ve göstermeyen (94,95,100) çalışmalar vardır. Tip 1 diabetes mellitus hastalarında endotel disfonksiyonunun genel olarak mikroalbuminüriden önce meydana geldiği bildirilmiştir (94,96,105,135).

2.6.1. Diyabetiklerde endotel disfonksiyon mekanizmaları:

Hipergliseminin diyabetin mikro ve makrovasküler komplikasyonlarının meydana gelmesindeki temel etki mekanizmalarına daha önceki bölümlerde değinilmiştir. Burada bu temel mekanizmaların özellikle NO[•]yla ilişkileri üzerinde durulacaktır.

2.6.1.1. Aldoaz redüktaz yolundaki ve redox potansiyelinde değışiklikler:

Hiperglisemiye bağlı olarak aldoaz redüktaz yolunun aktivitesinin artması sonucunda hücredeki NADPH tüketilir. NADPH L-argininden NO üretimi için gerekli olduğu için NADPH'nin azalmasına bağlı olarak NO oluşumunda da azalma meydana gelir (51). Aynı zamanda NAD⁺'nin NADH'ye indirgenmesi sonucunda NADH/NAD⁺ oranı artar ve buna bağlı olarak serbest radikal oluşumunda artış olur (34).

2.6.1.2. Protein kinaz C'nin aktivasyonu:

Endotel fonksiyonunun kısmen PKC enzimi sinyal mekanizmaları tarafından regüle edildiği düşünülmektedir (36,137). PKC enziminin aktive olmasıyla vazodilatasyonun engellendiği gösterilmiştir (137).

Direkt etki:

PKC'nin retinal mikrovasküler endotel hücrelerinde eNOS'u inhibe ettiği düşünülmektedir (138).

Oksidasyonla ilişkili etki:

PKC inhibitörlerinin damarlarda O_2^- artışı engellediği (139) ve endotele-bağımlı vazodilatasyonda düzleme yaptığı gözlenmiştir (140). PKC'nin, fosfolipaz A2 aktivasyonu sonucunda potent oksidize edici etkileri olan araşidonik asit metabolit üretiminde artış yaparak vazodilatasyon oluşturduğu düşünülmektedir (8). E vitamini verilmesinin diyabette PKC'ye bağlı vasküler disfonksiyonu engellediğinin gösterilmesi oksidatif stres ve PKC yolu arasındaki ilişkiyi göstermektedir (141). Diyabetiklerde okside-LDL'nin PKC aktivitesini uyarıp endotel hücrelerinden NO salınımını azalttığı düşünülmektedir (142).

Vazokonstriktör prostanoidler aracılığıyla etki:

Tavşan aortalarıyla yapılan bir çalışmada PKC inhibitörlerinin vazokonstriktör prostanoidlerini azaltarak endotele-bağımlı relaksasyonu sağladığı gösterilmiştir (137).

2.6.1.3. AGE:

Endotel hücrelerini mediadaki düz kas hücrelerinden ayıran subendotelial bir kollajen tabakası bulunmaktadır. Kollajen dönüşümünün çok yavaş olmasından dolayı AGE'ler kan şekerinin yüksek olduğu dönemlerde bu tabakada birikmektedir. Bu tabakanın kalınlaşmasından dolayı NO'nun düz kasa geçmesi engellenmektedir (51). Aynı zamanda oksidatif stres kollajenin çapraz bağ oluşturmasını artırmaktadır (143). Bu şekilde oluşan kollajen daha az çözünebilir ve daha az miktarda proteolitik yıkıma maruz kalır. Buna bağlı olarak NO'nun kollajen tabakadan geçişi zorlaşır (8).

Deneysel olarak diabetes mellitus oluşturulmuş sıçanlarda AGE'lerin NO'yla reaksiyona girdiği ve aktivitesini baskıladığı gösterilmiştir (144). AGE'lerin NO inaktivasyonu üzerindeki etkisi glikozilasyon inhibitörü olan aminoguanidinin diyabetik hayvanlara verilmesi sonucunda vazodilatör bozuklukta düzleme

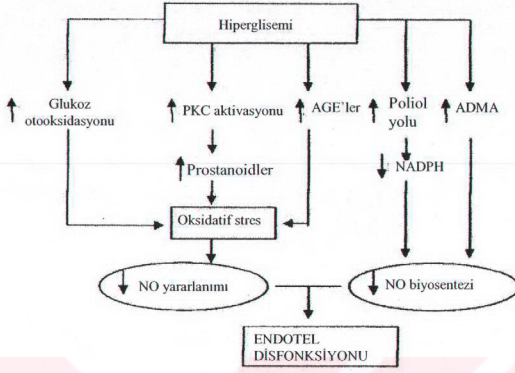
görülmesiyle anlaşılmaktadır (144). Aynı zamanda AGE'lerin NO'nun antiproliferatif etkilerini inhibe ettiği gösterilmiştir (145).

2.6.1.4. Oksidatif stres:

$\cdot O_2^-$ anyonunu ortadan kaldıran süperoksit dismütaz ve katalaz gibi enzimlerin çeşitli diyabet modellerine verilmesi sonucunda endotele-bağımlı cevapta düzelme görülmüştür (146,147). Tip 2 diyabetiklerde antioksidan olan askorbik asit infüzyonu ateroskleroz vasküler cevabı artırmaktadır (148). İnsan aortik endotel hücrelerinde uzun süreli yüksek glukoz maruziyetininin NOS gen ekspresyonunu, protein ekspresyonunu ve dolayısıyla NO üretimini artırdığı (%40 gibi bir oranla), ancak aynı zamanda O_2^- oluşumunu da % 300'lük bir oranda artırdığı gösterilmiştir. Bu şekilde $\cdot O_2^-$ ile reaksiyona giren NO'nun inaktivasyonu sonucunda vazorelaksasyonun bozulduğu gösterilmiştir (149). Okside LDL L-arginin yoluyla etkileşmekte ve L-arginin sağlanmasını ve sonunda NO üretimini etkilemektedir (150). NO ile O_2^{\cdot} 'nin reaksiyona girmesiyle oluşan peroksinitrit sınırlı bir şekilde NO gibi biyoaktiviteye sahip olup, NO'nun vazodilatasyon gibi işlevlerini yapmasını engellemektedir (151).

$\cdot O_2^-$ anyonunun insan damar duvarındaki ana kaynağının NADPH oksidazlar olmasına karşın, hiperglisemi durumunda eNOS enziminin O_2^- üretebildiği gösterilmiştir. Bu duruma 'NOS uncoupling' denmektedir (149,152). Endotelden $\cdot O_2^-$ oluşumun eNOS inhibitörü L-NAME tarafından engellenmesi eNOS'un O_2^- oluşturduğunu göstermektedir (152). Bu olayın kofaktör tetrahidrobiopterine bağlı olduğu ve PKC sinyal mekanizmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir (139).

ADMA'nın metabolizmasından sorumlu olan DDAH enzimi, oksidanduyarlı bir enzimdir (8,24,34). Tip 2 diyabet geliştirilmiş sıçan endotelinde okside LDL ve TNF- α 'nın DDAH enzimi aktivitesini azalttığı gösterilmiştir. Eş zamanlı olarak DDAH düzeylerinde değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Bu modelde ayrıca ADMA konsantrasyonlarındaki artışın intrasellüler antioksidan olan polietilen-glikol-konjüge süperoksit dismütaz (PEG-SOD) tarafından geri döndürüldüğü gösterilmiştir (34). Bunun yanı sıra ADMA'nın kendisinin de oksidatif stresi artırdığı düşünülmektedir (153). Diyabetiklerde endotel disfonksiyonuyla ilişkili mekanizmalar Şekil 13'te özetlenmiştir.



Şekil 13. Diyabetiklerde endotel disfonksiyon mekanizmaları. (118)

Diyabetiklerde endotel disfonksiyonunun patogenezinde hipergliseminin çeşitli mekanizmalarla NO düzeylerini azaltması rol oynamaktadır. Glukoz ootoksidasyonu, protein kinaz C aktivasyonu ve AGE oluşumu sonucu meydana gelen oksidatif stres NO biyoyararlanımını azaltarak, poliol yolunun aktivasyonu ve ADMA düzeylerinde artış da NO biyosentezinin azaltarak endotel disfonksiyonunda rol oynamaktadır.

2.7. ACE İNHİBİTÖRLERİNİN ENDOTEL DİSFONKSİYONUNDAKİ YERİ:

ACE inhibitörleri kardiyovasküler hastalık tedavisinde sıklıkla kullanılan ilaçlardır. Antihipertansif olarak etkin olan ajanlar ciddi konjestif kalp yetmezliğinde semptomlarda ve mortalitede azalma sağlamaktadır (154). ACE inhibitörlerinin ayrıca ejeksiyon fraksiyonu düşük olan hastalarda miyokard infarktüsü, anstabil angina gibi majör iskemik olaylarda ve koroner revaskülarizasyon işlemlerinde azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (21). Diyabetiklerde ise nefropatinin önlenmesi amacıyla kullanılmaktadır (17).

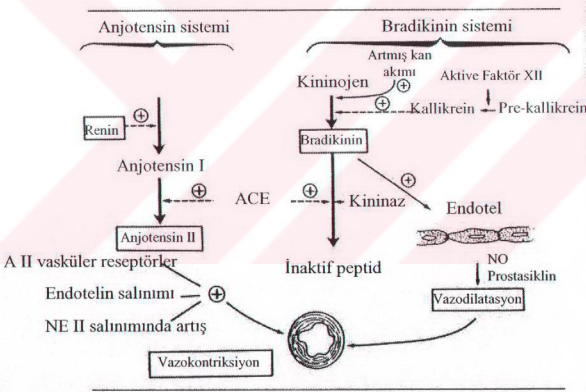
ACE inhibitörlerinin çeşitli hastalıklarda görülen endotel disfonksiyonu üzerinde de etkili oldukları gösterilmiştir. TREND çalışmasında koroner arter hastalığı olan ve sol ventrikül fonksiyonu korunmuş hastalarda 6 aylık kinapril tedavisinin bozulmuş endotel fonksiyonunu düzelttiği gösterilmiştir. Burada, asetilkoline bağlı vazokonstriksiyonun azalmasına rağmen nitroglicerine karşı vasküler duyarlılığın ne plasebo ne de kinapril grubunda değişmemiş olması ACE inhibisyonunun endotele bağımlı değişiklik yaparak etki ettiğini göstermektedir (155). Hipertansiyon hastalarında 4 haftalık perindopril (156) tedavisinin endotel disfonksiyonu üzerinde olumlu etkileri gösterilmiştir.

Mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonları olmayan Tip II diyabetik hastalarda yapılan bir çalışmada 4 haftalık enalapril tedavisi ile endotel disfonksiyonunda düzelmeye tespit edilmiştir (18). Buna karşın yine Tip II diyabetiklerde 6 aylık perindopril tedavisiyle endotel disfonksiyonun düzelmediği gösterilmiştir.(157). Burada hastaların çoğunun yaşlı, obez, hipertansif ve hiperkolesterolemik olmaları gibi ek faktörler nedeniyle cevabın engellenmiş olabileceği düşüncesi öne sürülmüştür (157).

Tip I diyabetik hastalarda 4 haftalık enalapril tedavisinin NO'ya bağlı vasküler relaksasyonu artırdığı gösterilmiştir (19). Başka bir Tip I diyabetik grubunda da 1 haftalık enalapril ve kaptopril tedavisinin endotele bağlı vazodilatasyonu artırdığı gösterilmiştir (20). Bunun yanında ACE inhibitörlerinin Tip I diyabetiklerde etkili olmadığını gösteren çalışmalar da vardır. Tip I diyabetik 91 hastada 6 aylık enalapril tedavisinin (100) ve 24 Tip I diyabet hastasında 5 haftalık kinapril tedavisinin (158) endotel disfonksiyonu üzerinde etkisi olmadığı görülmüştür. ACE inhibitörlerine karşı çelişkili cevap alınmasında çalışmalara katılan popülasyonların glisemik kontrollerinde, diyabet süresinde ve vasküler komplikasyonlarının varlığında farklılıklar rol alabilir (20). Burada etkin olabilecek bir başka mekanizma olarak da aterosklerotik plak olmayan durumlarda ACE ekspresyonunun az olmasıdır. Buna bağlı olarak ACE-inhibisyonunun daha ilerlemiş aterosklerotik hastalıkta etkili olabileceği öne sürülmektedir (159).

ACE, anjotensin I'in II'ye dönüştürülmesinden ve bradikininin yıkımından sorumlu enzim olup, renin-anjiotensin-aldosteron sisteminin önemli bir elemanıdır (160) (Şekil 14). ACE esas olarak endotel hücrelerinde ektoenzim olarak bulunmakta ve plazmaya bu hücrelerden salgılanmaktadır (161). ACE aktivitesi hem

dolaşımında ve hem de dokuda gösterilmiştir (21,162). Aterosklerotik lezyonlarda ACE aktivesi monositler ve köpük hücreleriyle aynı bölgelerde bulunmaktadır (163). ACE inhibitörleri farmakokinetiklerinde ve terapötik dozlarda erişilen doku düzeylerinde farklılıklar göstermektedir. Her bir ACE-inhibitörünün etkinliği lipid çözünürlüğü, vasküler dokuda ACE afinitesi ve klirensi gibi farmakolojik özelliklerinden etkilenebilir (164) Kalp yetmezliği hastalarında doku ACE'si için yüksek afiniteye sahip olan kinapril ve rölatif olarak kötü doku penetransı olan enalaprilin endotel fonksiyonu üzerindeki etkileri karşılaştırıldığında sadece kinaprilin bazal ve reaktif hiperemi sonrasındaki radyal arter kan akımını artırdığı gösterilmiştir (165). Benzer şekilde kinapril, enalapril, losartan ve amlodipin karşılaştırıldığında, sadece kinaprilin endotele-bağımlı kan akımını artırdığı gösterilmiştir (166)



Şekil 14. ACE inhibitörlerinin etki mekanizmaları.(Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors, İkinci basım, s.2'den alınarak modifiye edilmiştir)

2.7.1. ACE inhibitörlerinin aterosklerotik kardiyovasküler hastalıkta etki mekanizmaları:

ACE inhibitörleri kardiyovasküler riski çeşitli mekanizmalarla azaltmaktadır (163).

Tablo 5. ACE inhibitörlerinin kardiyovasküler etkileri (21)

Kardiyoprotektif etkiler:

- miyokarda oksijen ihtiyacı ve temini arasındaki dengeyi sağlama
- sol ventrikül ön ve ard yükü azaltma
- sol ventrikül kitlesini azaltma
- sempatik uyarıyı azaltma
- reperfüzyon hasarında olası olumlu etkiler

Vasküloprotektif etkiler:

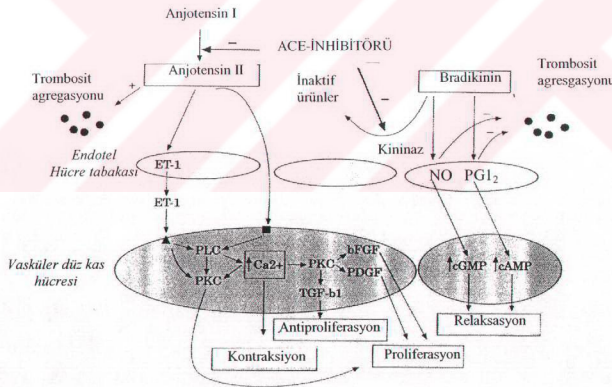
- antienflamatuvar etkiler
- düz kas hücreleri, nötrofiller ve mononükleer hücreler üzerinde antiproliferatif ve antimigratuvar etkiler
- endotel fonksiyonunu düzeltme
- plak rüptürünü engelleme;
- antirombosit etkiler
- antihipertansif etkiler
- fibrinolizi arttırıcı etkiler
- arter komplians ve tonüsünü düzeltme

ACE inhibitörleri antiproliferatif, antienflamatuvar ve vazodilatatör etkinlikleri nedeniyle, ateroskleroza en erken olarak endotel disfonksiyonundan başlayıp, primer aterosklerotik lezyonların engellenmesinden, PTCA sonrasında miyointimal proliferasyonu önlemeye kadar giden bir spektrumda etkilemektedir (162).

ACE inhibitörlerinin vasküloprotektif etkilerini, kardiyak ve vasküler miyositler ile diğer dokularda lokal renin-anjiyotensin sistemi aracılığıyla yaptığı düşünülmektedir (167). Çalışmalarda ACE-inhibisyonun endotel fonksiyonu üzerindeki olumlu etkilerini kan basıncında belirgin bir düşmeye neden olmaksızın yapması olumlu etkilerinin antihipertansif etkilerinden bağımsız olduğunu düşündürmektedir (19,155).

2.7.2. ACE inhibitörlerinin endotel disfonksiyonu üzerindeki etki mekanizmaları:

ACE inhibitörlerinin endotel fonksiyonu üzerindeki olumlu etkileri: anjiyotensin II oluşumunu engellemek, bradikinin, prostasiklin ve NO'nun konsantrasyonlarını artırmak ve antioksidan savunma mekanizmalarına yardımcı olmaktır (21) (Şekil 15). Renin/anjiyotensin sistemi ve damar duvarındaki NO/L-arginin yolu arasında direkt ilişkiler olduğuna dair kanıtlar artmaktadır (168).



Şekil 15. ACE inhibitörlerinin vasküler etkileri (Ref 163'ten alınarak modifiye edilmiştir. ET-1=endotelin-1; PGI₂=prostasiklin; PLC=fosfolipaz C; PKC=protein kinaz C, bFGF:temel fibroblast büyüme faktörü; PDGF=trombositten-kaynaklanan büyüme faktörü; TGFβ1=transforme edici büyüme faktörü)

2.7.2.1. Bradikinin üzerinden etkileri:

NO salınımının düzenlenmesindeki önemli mekanizmalardan biri ACE'nin kininaz etkisiyle bradikinin yıkımından sorumlu olmasıdır. Bradikinin de NO ve prostasiklin sekresyonunun etkin uyarılarından biri olduğu için ACE inhibitörleri bradikininin salınımını artırarak bu vazodilatatör maddenin artmasına neden olmaktadır (168). Hayvanlarda yapılan çeşitli çalışmalarda bradikininin endotele bağımlı vazodilatasyonu artırdığı gösterilmiştir (169). İnsanlarda bradikinin reseptör inhibitörü ACE inhibitörleriyle görülen endotele bağımlı vazodilatasyonu azaltmaktadır (170). Bilinen koroner arter hastalığı olmayan insanlarda koroner damarlara verilen bradikinin sistemik arter basıncında ve koroner kan akımında değişiklik yapmaksızın büyük epikardiyal ve rezistans koroner arterlerde dilatasyon yapmıştır. Burada bradikinin tarafından meydana getirilen dilatasyon enalapril verilmesi sonrasında artmaktadır (171).

Bradikininin NO üzerindeki etkilerini çeşitli mekanizmalarla yaptığı düşünülmektedir. Bunlardan en önemlisi NO salınımının uyarılmasıdır (168). Bunun yanı sıra NOS enzimini stimüle etmektedir. Köpek koroner arterlerine ramiprilat öncesi bradikinin antagonisti verilmesi ACE-inhibitörüne bağlı vazodilatasyonu azaltmaktadır (172). Düşük bradikinin konsantrasyonlarında lisinopril verilmesinin etkisi *in vitro* olarak NO sentaz inhibitörü, nitro-L-arginin ile ortadan kalkmaktadır (173). Ayrıca insanlarda da L-NNMA'nın önceden verilmesinin arter çapında ve kan akımında bradikininine bağlı meydana gelen artışı azalttığı gösterilmiştir (171). Bradikininin NO yıkımını engellediğine dair de birçok kanıt vardır (161,170). Bradikininin ayrıca eikozanoid metabolizmasıyla etkileşerek ve vazodilatatör prostanoidin üretimini artırarak vazodilatasyon yaptığı düşünülmektedir(168).

2.7.2.2. Anjiyotensin II üzerinden etkileri:

ACE inhibitörlerinin vazodilatatör etkisi ile ilişkili bir başka mekanizma da anjiyotensin II oluşumunu engellemeleridir. Anjiyotensin II *in vivo* bulunan en etkin vazokonstriktörlerden biridir (168). Hüresel proliferasyonu, enflamasyonu ve endotel fonksiyonunu düzenlemektedir (160).

Anjiotensin II'nin vasküler tonüs üzerindeki etkileri:

Anjiotensin II'nin vasküler tonüs üzerinde çeşitli etkileri vardır.

- damar düz kasındaki AT-1 reseptörü aracılığıyla gerçekleşen ve hücre içinde kalsiyum artışına bağlı vazokonstriksiyon oluşturulması (174).
- endotel hücrelerini anjiotensin II reseptörleri aracılığıyla uyararak NO (175), vazokonstriktör prostanoidler (176) ve endotelin salgılanması
- düz kas hücresi mitogenezi ve profilerasyonuna neden olan fibroblast-büyüme faktörü (FGF), trombositen-kaynaklanan büyüme faktörü (PDGF) ve antiproliferatif olan dönüştürücü büyüme faktörü (TGF- β) salınımının sağlanması (162)

Anjiotensin II'nin NO üzerindeki etkileri:

NO ve anjiotensin II hem doğrudan hem de birbirlerinin etkisini engelleyerek endotel fonksiyonu üzerinde ters etkiler yapmaktadır (160).

a) PKC üzerinden NOS ekspresyonunun regülasyonu:

NOS enzimi daha önceden de belirtildiği gibi konstitütif olarak bulunan bir enzim olmasına karşın yıkıcı stres, okside LDL, hipoksi ve PKC aktivitesindeki değişiklikler ile regüle edilmektedir (168). Anjiotensin II vasküler düz kas üzerindeki reseptörlere bağlanarak PKC oluşumuna neden olur (168).

b) Oksidatif stres sonucunda NO aktivitesinin önlenmesi:

Anjiotensin II'nin insan arterlerinde $\cdot O_2^-$ üretimini artırdığı gösterilmiştir (25). Anjiotensin II uyarısı, diaçilgliserol lipaz yolu üzerinden araşidonik asidin oluşmasına ve araşidonik asit de hem nötrofillerde hem de damar düz kasında NADH/NADPH oksidazların ve $\cdot O_2^-$ 'nin meydana gelmesine neden olur. Bunun sonucunda da NO'nun dokudaki aktivitesi engellenir (168,177,178). Oluşturulmuş ateroskleroz modellerinde lokal renin-anjiotensin sistemiyle birlikte NADH/NADPH oksidaz sisteminin de aktive olduğu gösterilmiştir (179). ACE inhibitörleri anjiotensin II tarafından meydana getirilen tüm bu etkileri antagonize etmektedir.

c) Plazma ADMA düzeyleri üzerindeki etkileri:

Hipertansif hastalarda renin-anjiotensinojen sisteminin ADMA elevasyonu ve endotel hasarı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (156). Esansiyel hipertansiyonu olan hastalara verilen 4 haftalık perindopril, losartan ve bisoprolol tedavisi sonucunda ADMA düzeylerinin perindopril ve losartan ile düşerken, bisoprolol ile değişmediği gösterilmiştir (156). Sendrom X'i olan hastalarda 8 haftalık enalapril tedavisi plazma ADMA düzeylerini azaltmaktadır (180). Dört haftalık perindopril tedavisi komplikasyonsuz ve iyi kontrollü Tip 2 diabetes mellitus hastalarında ADMA düzeylerini düşürmüştür (22).

Daha önceden de değinildiği gibi oksidatif stresin ADMA'yı metabolize eden enzim olan DDAH'ın düzeyini azalttığı bilinmektedir (24). Bununla bağlantılı olarak ACE inhibitörlerinin anjiotensin II'yi azaltarak oksidatif stresi ve dolayısıyla ADMA'yı azalttığı düşünülebilir (180). NO'nun kendisinin de vasküler NADH oksidazlar üzerinde inhibitör etkisi olduğu için (181) ACE inhibitörleri NO'yu bradikinin aracılığıyla artırarak da oksidatif stresi azaltmaktadır (182). Oksidatif stresin ADMA yapımını da artırdığı gösterilmiştir (134). Bu durumda ACE-inhibisyonunun antioksidan etkinliğiyle ADMA yapımını da azaltacağı düşünülebilir.

ACE inhibitörlerinin *in vitro* antioksidan etkinlikleri olduğu gösterilmiştir (183). Enalaprilin streptozosin ile diyabet meydana getirilmiş sıçanların kalp ve böbreklerinde TBARS ve floresan kromolipidlerin düzeyinde düşme meydana getirerek lipid peroksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca tedaviyle glutatyon oksidasyonu azalmıştır (182). Streptozosin ile diyabet meydana getirilmiş sıçanlarda kanda olası antioksidan etkileri gösterilmiştir (184). Hemodiyaliz hastalarında ACE inhibitörlerinin endojen antioksidan savunma mekanizmalarını artırdığı gösterilmiştir (185). İnsan endotel hücreleriyle *in vivo* yapılan bir çalışmada kaptopril ve enalaprilin glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismütazı azalttığı ve lipid peroksidasyon ürünlerini düşürmediği gösterilmiştir (186). ACE inhibitörü tedavisi verilen Tip 2 diabetes mellitus hastalarında bakılan lipoperoksit (22) ve malindialdehit-modifiye LDL (156) düzeylerinin ACE inhibisyonu ile değişmediği görülmüştür. Buna göre ADMA'nın artışında oksidasyonun rolü tam olarak bilinmemektedir.

Sonuç olarak bu çalışmanın amacı Tip I diyabetiklerde ACE inhibisyonunun endotel disfonksiyonu göstergeleri olan akıma bağlı vazodilatasyon ve ADMA üzerindeki etkisini belirlemek ve burada oksidatif mekanizmaların yerini değerlendirmektir.

3. ARAÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Endokrinoloji Polikliniğinde takip edilen aşağıdaki kriterlere uygun 30 tip 1 diyabetik hasta (Diyabet grubu) ve benzer yaş ve cinsiyette 29 sağlıklı kişi (Kontrol grubu) olarak yazılı onayları alındıktan sonra dahil edildi. Çalışma Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı.

3.1 Çalışmaya dahil edilme ölçütleri:

En az 6 aydır Tip 1 diabetes mellitus tanısı olanlar

İnsulin tedavisini düzenli kullananlar

3.2 Çalışma dışı bırakılma ölçütleri:

Endotel fonksiyonunu etkileyecek hastalığı (akut veya kronik enfeksiyonu, kronik karaciğer ve böbrek hastalığı, kalp yetmezliği, hipertansiyon, sistemik enflamatuvar hastalığı, hipoksik akciğer hastalığı vb) olanlar

Endotel fonksiyonunu etkileyebilecek ilaç (aspirin, antihiperlipidemikler, ACE inhibitörü, antioksidan) kullananlar

Sigara içenler

Gebe ve emzirmekte olanlar

Çalışmaya katılmak istemeyenler

Diabetes mellitus tanısında Amerikan Diyabet Cemiyeti (ADA 2004) tanı kriterleri kullanıldı (26). Hipertansiyon tanımında Hipertansiyon Birleşik Ulusal Kongresi Yedinci Raporu (JNC-VII) (187), hiperlipidemi tanısında ise Amerikan Ulusal Kolesterol Eğitim Programı, erişkin tedavi paneli III (NCEP-ATP III) kriterleri esas alındı (188).

3.3. Uygulanan işlemler:

Hasta ve kontrol grubunun ilk olarak anamnezi alındı ve fizik muayeneleri yapıldı. JNC-VII'de belirtilen kan basıncı ölçümleri göz önünde bulundurularak aynı civalı manometre ile kan basıncı ölçümleri yapıldı. Ayrıca katılanların ağırlık, boy, bel ve kalça çevreleri ölçüldü. Vücut kitle indeksleri (VKI) kilogram türünden alınan ağırlık biriminin metre türünden alınan boy biriminin karesine bölünmesiyle

hesaplanarak kaydedildi. Bu kişilerden alınan serum örneklerinde açlık kan şekeri, total kolesterol, yüksek dansiteli lipoprotein (HDL), düşük dansiteli lipoprotein (LDL), trigliserit, A1c değerleri çalışıldı. Ayrıca her bir bireyden plazma L-arginin, ADMA ve SDMA düzeylerinin belirlenmesi amacıyla 4 cc venöz kan örneği EDTA'lı tüplere; NO ve TBARS düzeyleri çalışılması amacıyla 10 cc venöz kan örneği kuru tüpe alındı. Tüm örnekler ön kol brakial veninden vakumlu tüplere bir seferde alındı. Alınan kan örnekleri 10 dakika süreyle 5000 devir/dakikada santrifüje edilerek plazma ve serumların ayrışması sağlandı. Ayrılan plazma ve serum örnekleri -20°C'de saklandı.

Bu işlemlerin tamamlanmasının ardından Doppler ultrasonografi yöntemiyle akıma bağlı vazodilatasyon ve karotis intima medya kalınlığı (IMT) ölçümü yapıldı.

Sözü edilen işlemler tip 1 diyabetik hastalarda 0.5 mg trandolapril başlanmasının 15. ve 90. günlerinde tekrarlandı. Benzer işlemler sağlıklı gönüllülere de 15. ve 90. günlerde tekrar edildi. IMT ölçümleri sadece bazal olarak yapıldı.

Tip 1 diyabetik hastaların klinik takipleri 15 günlük dönemlerde yapıldı. Bu takiplerde fizik muayene ve kan basıncı ölçümleri gerçekleştirildi. İlaç uyumları tablet sayımı ile denetlendi.

3.3.1. Doppler Ultrasonografi (USG):

Akıma bağlı dilatasyon ölçümleri gruplardaki bireylerin hangi gruptan oldukları maskelenerek Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi A.B.D'da görevli, daha önceden bu konuda deneyimi olan uzman hekim tarafından yapıldı. Ölçümler için GE Vingmed System 5 cihazı ve 10Mhz'lik Broadband probu kullanılarak, Celermajer ve arkadaşlarının (83) tarif ettikleri yöntem uygulandı. Ölçümler hastalar yatar pozisyondayken yapıldı. İlk olarak Doppler USG ile dirsek ön yüzünün 2-15 cm yukarısında bulunan brakial arter tespit edildi. On dakikalık dinlenme bölümünden sonra brakial arterin çapı ve brakial kan akım hızı tespit edildi. Sonrasında tansiyon aletinin manşonu brakial arterin tespit edildiği ön kola sarılıp 300 mmHg'ye kadar şişirilerek 5 dakika bekletildikten sonra aniden indirilerek 45-60. saniye arasında ikinci kez arter çapı ve akım hızı ölçüldü. Tansiyon aletinin manşonunu indirildikten sonra ölçülen arter çapı ile bazal arter çapı arasındaki fark bazal çapa bölünerek yüzde olarak elde edildi ve bu da akıma bağlı vazodilatasyon (% FMD) olarak kaydedildi. Onbeş dakika dinlenmeden sonra arterin çapı tekrar

ölçülerek 400 µg sublingual gliseril trinitrat (GTN) sprey uygulandı. İlaç uygulandıktan 3-4 dakika sonra arterin çapı tekrar ölçüldü. Ölçülen bu çap ile bazal çap arasındaki fark bazal çapa bölünüp yüzde olarak hesaplanarak GTN'ye bağlı vazodilatasyon (% GTN) olarak kaydedildi.

Aynı ultrasonografi uzmanı tarafından daha sonra IMT ölçümü yapıldı. Bu ölçüm Barth ve arkadaşlarının tarif ettikleri yöntemle yapıldı (193). IMT ölçümleri aynı cihazla fakat 10Mhz'lik prob kullanılarak yapıldı. Ölçümler hasta yatar pozisyondayken, başı yaklaşık 45° ultrasonografistin ters tarafına dönük şekilde yapıldı. Sağ ana karotis arterin (CCA) uzak duvarında mümkün olan en uzun bölüm belirlendikten sonra görülen paralel çizgi ayrı ayrı lumen-intima, medya-adventisya birleşme bölgeleri olarak belirlendi. Bu iki birleşme bölgesi arasındaki mesafe IMT olarak kaydedildi. Diastol sonunda üç noktadan ölçüm yapılarak ortalaması alındı. IMT ölçümleri sadece bazal olarak yapıldı, 15. ve 90. günlerde tekrarlanmadı.

3.3.2. ADMA, SDMA ve L-arginin ölçümü:

İnternal standart olarak kullanılan MMA (metilarginin) 200 µL plazma örneğine eklendikten sonra fosfatlı salin ile 1 mL'ye tamamlandı. Plazmadan ekstraksiyon için Oasis® 1cc/30 mg SPE (solid phase extraction; katı faz ekstraksiyon) kolonları kullanıldı. Kolonlara örnek uygulanmasının ardından 1 mL 100 mM hidroklorik asit ve 1 mL metanol ile yıkama yapıldı ve maddeler kolondan amonyak : su : metanol (10:40:50) karışımı ile geri kazanıldı. Ardından 60°C de azot gazı altında kuruluğa kadar uçuruldu (189). Örnekler 120µL'ye su ile tamamlandı ve 40µL'lik kısmı 40µL OPA (o-ftaldialdehid) ile türevlendirilip ADMA ve SDMA, diğer kısmı 20 kat seyreltilip L-Arginin olarak yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde (HPLC) gözlemlendi.

3.3.3. Lipid peroksidasyon ölçümü (TBARS yöntemi):

Serum örnekleri tiyobarbitürik asit ile birlikte kaynatıldı. Ardından butanol ile ekstraksiyon işlemi uygulanarak sıvının üst fazında oluşan pembe rengin abzorbanası 532 nm dalga boyunda ölçüldü. Sonuçlar 1,1,3,3-tetraetoksipropan standardı kullanılarak tespit edilerek nmol MDA/mL serum olarak ifade edildi (190,191).

3.3.4. Nitrit ölçümü:

Nitrit ölçümünde serum örneği sulfasalilik asit içeren tamponla muamele edilerek proteinlerin çöktürülmesi sağlandı. Santrifügasyon sonrası elde edilen süpernatant amonyum klorür ve sodyum bromat içeren tamponla karşılaştırıldı. Ardından sulfanilik asit ve HCl eklendi. İnkübasyon süresinin ardından üzerine *N*-1 naftilendiamin dihidroklorür eklenerek abzorbans değerleri 548 nm dalga boyunda ölçüldü. Sonuçlar sodyum nitrit grafiğine göre düzenlendi ve µmol olarak ifade edildi (192,193).

3.3.5. AKŞ ölçümü:

Roche 917R cihazında enzimatik (glukoz oksidaz) kalorimetrik yöntem kullanılarak çalışıldı. Kitin test içi (intra-assay) varyasyon katsayısı % 0.9 ve test arası (inter-assay) varyasyon katsayısı % 1.8'di.

3.3.6. A1c ölçümü:

Hemolizlenmiş tam kan için turbidimetrik inhibisyon immünoassay yöntemi ile Roche 917R cihazı kullanılarak ölçüldü. Kullanılan kit için test içi % 2.3 ve test arası varyasyon katsayısı % 3.2 idi.

3.3.7. Total kolesterol, LDL, HDL ve trigliserit ölçümleri:

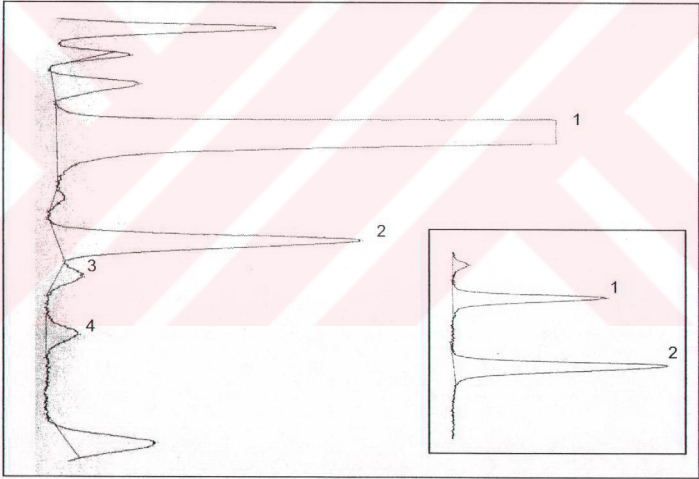
Roche 917R cihazı kullanılarak enzimatik kalorimetrik yöntemle çalışıldı. Total kolesterol kiti için test içi varyasyon katsayısı % 0.8, test arası varyasyon katsayısı % 1.7 idi. Trigliserit kiti için test içi varyasyon katsayısı % 1.5, test arası varyasyon katsayısı % 1.8'di. HDL kiti için test içi varyasyon katsayısı % 0.9, test arası varyasyon katsayısı % 1.85'ti. LDL değerleri [Total kolesterol-(Trigliserit/5+HDL)] formülüyle hesaplandı.

3.3.8. Kreatinin ölçümleri:

Enzimatik kalorimetrik yöntemle Roche 917R cihazı kullanılarak çalışıldı. Kullanılan kit için test içi varyasyon katsayısı % 0.9, test arası varyasyon katsayısı % 2.1'di.

3.4. İstatistiksel İncelemeler:

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 11.0 programı kullanıldı. Ölçüm grupları karşılaştırması için ANOVA, korelasyon değerlendirmeleri için ise Pearson testleri kullanıldı. Yüzde FMD ve ADMA'yı etkileyen bağımsız faktörlerin belirlenmesi için logistic stepwise regresyon analizi kullanıldı. Yüzde FMD ve ADMA için ayrı ayrı korelasyon gösteren ve göstermeyen klinik ve laboratuvar parametreler (yaş, diyabet süresi, açlık kan şekeri, A1c, total kolesterol, trigliserit, LDL, HDL, TBARS) değerlendirmeye alındı. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SD) olarak gösterilerek % 95'lik güven aralığında, anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi (194).



Şekil 15. Diyabetik bir hastanın HPLC grafiği. Bu grafikte hastanın L-arginin, ADMA ve SDMA pikleri görülmektedir. Normal ölçümlerde L-arginin pikinin sınırı ayırd edilemediği için, L-arginin ölçümleri örneklerin 20 kat seyreltilmesi sonrasında yapılmıştır. Küçük grafik seyreltilmiş örnekteki L-arginin pikini göstermektedir. 1=L-arginin, 2=MMA (internal standart), 3=ADMA, 4=SDMA

4. BULGULAR

Çalışmaya 30 Tip 1 diyabetik hasta (Diyabet grubu) ve yaş, cinsiyet uyumlu 29 sağlıklı gönüllü denek (Kontrol grubu) olmak üzere 59 olgu dahil edilmiştir. Çalışma Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Komitesi tarafından onaylanmış olup, çalışmaya katılan her bireyden yazılı onay alınmıştır. Çalışma gruplarının demografik özellikleri Tablo 6'da belirtilmiştir.

Tablo 6:Çalışma gruplarının demografik verileri

		DİYABET GRUBU			KONTROL GRUBU		
		Bazal	Ted 15. gün	Ted 90. gün	Bazal	15. gün	90. gün
Denek sayısı		30			29		
Cinsiyet (K/E)		18/12			16/13		
Yaş (yıl)		29,73 ± 6,1			30,45 ± 6,46		
Diyabet süresi (ay)		93.52 ± 69.58			-		
Mikrovasküler komplikasyonlar	Retinopati	5/30			-		
	Nefropati	4/30			-		
	Nöropati	2/30			-		
Makrovasküler komplikasyonlar	KAH	0/30			-		
	SVO	0/30			-		
	PAH	0/30			-		
VKİ (kg/m ²)		22.17± 2.75	22.21± 2.72	22.45± 2.80	23.58± 2.13	23.58± 2.14	23.72± 2.16
Bel/kalça oranı		0.76±0. 06	0.76±0. 06	0.77±0. 06	0.77±0. 07	0.77±0. 07	0.77±0. 06
TA sistolik (mmHg)		114.67 ±12.24	113.83 ±11.84	113.33 ±11.07	116.14 ±8.68	115.86 ±10.3	115.36 ±9.87
TA diastolik (mmHg)		75.60± 9.90	74.27± 6.60	74.33± 4.81	72.52± 4.96	72.32± 6.46	72.76± 7.48

KAH=koroner arter hastalığı, SVO=serebrovasküler olay, PAH=periferik arter hastalığı, VKİ=vücut kitle indeksi, TA=tansiyon arteryel

Tablo 7. Çalışma grubunun biyokimyasal parametreleri

	DİYABET GRUBU				KONTROL GRUBU		
	Bazal	Tedavi 15. gün	Tedavi 90. gün	Bazal	15. gün	90. gün	
Açlık kan şekeri (mg/dL)	220.89 ± 89.92 *	210.27 ± 97.40 †	221.90 ± 76.66 ‡	78.47 ± 8.76 *†‡	75.77 ± 11.19 *†‡	74.40 ± 10.11 *†‡	
Hemogloblin A1c (%)	7.697 ± 1.31 #	-	7.70 ± 1.47 #	4.5 ± 1.2 #	-	-	
Total kolesterol (mg/dL)	174.77 ± 34.44	171.50 ± 27.25	176.60 ± 31.57	165.97 ± 23.17	166.14 ± 25.86	158.03 ± 30.29	
LDL Kolesterol (mg/dL)	96.53 ± 30.82	90.33 ± 24.84	101.50 ± 24.75	93.24 ± 16.60	95.21 ± 18.41	90.52 ± 19.07	
HDL Kolesterol (mg/dL)	61.27 ± 13.65	61.60 ± 12.98	60.97 ± 13.22	57.20 ± 8.57	57.10 ± 8.80	56.83 ± 9.63	
Trigliserit (mg/dL)	86.57 ± 53.90	77.47 ± 31.29	75.07 ± 34.40	79.55 ± 26.36	76.59 ± 26.52	77.00 ± 24.99	
Kreatinin (mg/dL)	0.68 ± 0.14	0.66 ± 0.13	0.68 ± 0.12	0.57 ± 0.19	0.54 ± 0.17	0.58 ± 0.14	

* diyabetik vs kontrol p<0.001

† diyabetik tedavi 15. gün vs. kontrol p<0.001

‡ diyabetik tedavi 90. gün vs. kontrol p<0.001

diyabetik vs kontrol p<0.0001

Tablo 8. Çalışma gruplarının ADMA, SDMA, L-arginin, NO, % FMD, TBARS ve IMT değerleri

	DIYABET GRUBU				KONTROL GRUBU			
	Bazal	Tedavi 15. gün	Tedavi 90. gün	Bazal	15. gün	90. gün		
ADMA (nmol/L)	271.1 ± 48.06 *#	252.17 ± 39.54	229.63 ± 42.91 *	237.52 ± 25.17 #	236.29 ± 33.63 #	235.04 ± 31.46 #		
SDMA (nmol/L)	313.80 ± 86.60	289.57 ± 58.88	268.47 ± 52.05	280.62 ± 63.55	280.41 ± 52.65	257.79 ± 43.97		
L-arginin (mmol)	18.95 ± 6.31	17.91 ± 5.72	18.30 ± 5.64	20.40 ± 7.22	18.82 ± 6.19	17.7 ± 6.90		
NO (µM)	1.24 ± 0.36 ©\$	1.31 ± 0.50 Ω	1.73 ± 0.37 ©Ω	1.81 ± 0.39 \$	1.72 ± 0.34	1.71 ± 0.26		
% FMD	4.67 ± 1.96 ¥†	6.38 ± 3.44 \$	8.62 ± 4.13 ¥	11.17 ± 3.88 ¶§	10.80 ± 2.95 ¶§	11.89 ± 2.86 ¶§		
TBARS (nmol/MDA)	4517.10 ± 2366.90 &‡†	2362.83 ± 1150.60 &‡	1531.77 ± 1036.0 ‡†	1775.90 ± 598.72 †	1819.43 ± 718.27 †	1654.20 ± 772.90 †		
IMT (mm)	0.84 ± 0.21	-	-	0.85 ± 0.09	-	-		

* diyabetik bazal vs tedavi 90. gün p<0.001

diyabetik bazal vs. kontrol p<0.05

© diyabetik bazal vs tedavi 90. gün p<0.001

\$ diyabetik bazal vs kontrol bazal p<0.001

Ω diyabetik tedavi 15. gün vs 90. gün p<0.01

¥ diyabetik bazal vs tedavi 90. gün p<0.01

¶ diyabetik bazal vs kontrol p<0.001

§ diyabetik tedavi 15. gün vs kontrol p<0.001

& diyabetik bazal vs. tedavi 15. gün p<0.05

‡ diyabetik bazal vs tedavi 90. gün p<0.001

† diyabetik bazal vs kontrol p<0.001

‡ diyabetik tedavi 15. gün vs. tedavi 90. gün p<0.05

Diyabetik grup ve kontrol grubunun demografik özellikleri benzer bulunmuştur. Diyabet grubunun VKİ ve bel/kalça oranları kontrollerden farksız bulunmuştur. Tedavi sonrası değerlerde değişiklik olmamıştır.

Diyabet grubunun sistolik ve diastolik kan basıncı değerleri kontrollerden farksız bulunmuştur. Tedavi ile diyabetiklerin kan basıncı değerlerinde anlamlı bir farklılık meydana gelmemiştir.

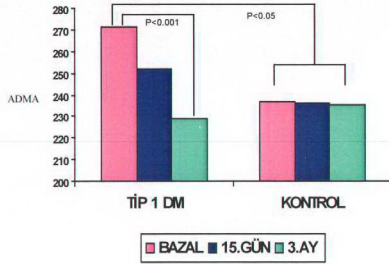
Diyabetik hastaların bazal, 15. gün ve 90. günlerdeki açlık kan şekeri (AKŞ) ($p<0.001$) ve A1c ($p<0.0001$) değerleri kontrollerle karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksektir. Diyabetiklerin total kolesterol, trigliserit, düşük molekül ağırlıklı lipoprotein (LDL), yüksek molekül ağırlıklı lipoprotein (HDL) ve kreatinin düzeyleri kontrollerden farksızdır. AKŞ, A1c, total kolesterol, trigliserit, LDL, HDL ve kreatinin düzeylerinde tedavi sonucunda anlamlı bir fark görülmemiştir. Çalışma gruplarının biyokimyasal parametreleri Tablo 7’de gösterilmiştir.

Diyabetiklerde bazal ADMA düzeyleri (271.1 ± 48.06) kontrollere (237.52 ± 25.17) göre anlamlı olarak daha fazladır ($p<0.05$). Tedaviyle ADMA düzeylerinde tedavinin 15. gününde (252.17 ± 39.34) bazale göre değişiklik görülmezken, 90. günde (229.63 ± 42.91) bazale göre anlamlı olarak düştüğü görülmüştür ($p<0.001$) (Şekil 16) SDMA ve L-arginin düzeyleri kontrollerle benzer bulunmuştur. Bazal NO değerleri (1.24 ± 0.36) kontrol grubundan (1.81 ± 0.39) anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0.001$). Tedaviyle 15. gün değerleri (1.31 ± 0.50) bazal diyabetik değerlerden farksız bulunurken, 90. gün değerleri (1.73 ± 0.37) bazale ($p<0.001$) ve 15. güne göre ($p<0.001$) anlamlı bir yükselme göstermektedir (Tablo 8).

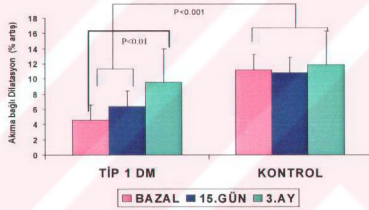
Diyabetiklerde % FMD’nin bazal (4.67 ± 1.96) ve tedavinin 15. günündeki değerleri (6.38 ± 3.44) kontrollere göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0.001$). Tedavinin 15. gününde (6.38 ± 3.44) bazalle karşılaştırıldığında fark yoktur. Tedavinin 90. günde (8.62 ± 4.13) bazale göre anlamlı bir artış meydana gelmiştir ($p<0.01$) (Şekil 17).

Diyabetiklerdeki bazal TBARS değerleri (4517.10 ± 2366.90) kontrollerle karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). TBARS değerleri tedavinin 15. (2362.83 ± 1150.60) ($p<0.05$) ve 90. günlerinde (1531.77 ± 1036.0) ($p<0.001$) anlamlı olarak azalmıştır (Şekil 18).

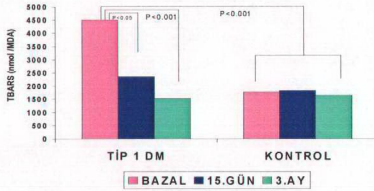
Karotis intima medya kalınlığı (IMT) diyabetiklerde kontrollerden farksız bulunmuştur ve tedaviyle değişiklik göstermemektedir. Çalışma gruplarının ADMA, SDMA, L-arginin, NO, % FMD, IMT ve TBARS değerleri Tablo 8'de gösterilmiştir.



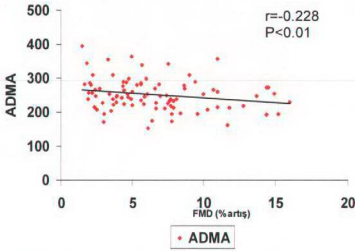
Şekil 16. Çalışma gruplarının ADMA değerleri. Diyabetiklerin bazal ADMA değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). Diyabetiklerdeki bazal ADMA değerleri 90. günde anlamlı olarak düşmüştür ($p < 0.001$)



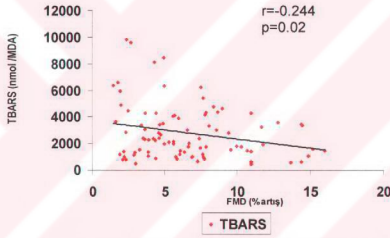
Şekil 17. Çalışma gruplarının % FMD değerleri Diyabetiklerin bazal ve tedavinin 15. günündeki % FMD değerleri sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. ($p < 0.001$). Tedavinin 90. gününde bazale göre anlamlı bir artış meydana gelmiştir ($p < 0.01$).



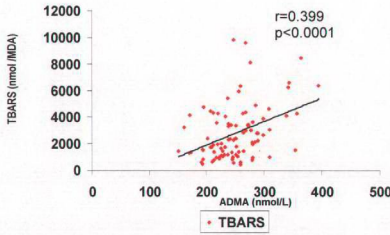
Şekil 18. Çalışma gruplarının TBARS değerleri Diyabetiklerde bazal TBARS değerleri kontrollere göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. ($p < 0.001$). Diyabetiklerin TBARS değerleri tedavinin 15. gününde ve ($p < 0.005$) 90. gününde ($p < 0.001$) anlamlı olarak düşmüştür.



Şekil 19. Diyabetiklerde ADMA ve % FMD arasındaki korrelasyon eğrisi. Diyabetiklerin % FMD değerleriyle ADMA değerleri arasında negatif korrelasyon vardır.



Şekil 20. Diyabetiklerde % FMD ve TBARS arasındaki korrelasyon eğrisi. Diyabetiklerin % FMD değerleriyle TBARS değerleri arasında negatif korrelasyon vardır.



Şekil 21. Diyabetiklerde ADMA ve TBARS arasındaki korrelasyon eğrisi. Diyabetiklerin ADMA değerleriyle TBARS değerleri arasında pozitif korrelasyon vardır.

Yapılan korelasyon analizlerinde ADMA ve % FMD'nin negatif korelasyon gösterdiği ($r=-0.228$, $p<0.01$) saptanmıştır (Şekil 19). Ayrıca % FMD ve TBARS ($r=-0.244$, $p=0.02$) arasında negatif (Şekil 20), ADMA ve TBARS ($r=0.399$, $p<0.0001$) arasında ise pozitif korelasyon bulunmuştur (Şekil 21).

Lojistik stepwise regresyon analizinde % FMD'yi bağımsız olarak etkileyen parametreler açlık kan şekeri ($r=0.359$), TBARS ($r=0.447$) ve HDL ($r=0.480$) olarak bulunmuştur. ADMA'yi bağımsız olarak etkileyen tek parametre ise TBARS ($r=0.343$) olarak saptanmıştır.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada birkaç önemli sonuç elde edilmiştir:

a) Klinik olarak saptanmış ateroskerozu olmayan Tip 1 diabetes mellitus hastalarında iskemi sonrasında akıma bağlı vazodilatasyonda (%FMD) bozulma vardır;

b) Plazma ADMA düzeylerinde artış vardır;

c) Trandolapril tedavisi sonrasında 15. günde % FMD ve ADMA değerlerinde anlamlı bir değişiklik görülmezken, 90. günde % FMD değerlerinde artış ve ADMA düzeylerinde de azalma meydana gelmiştir;

d) Lipid peroksidasyon göstergesi olan TBARS düzeyleri sağlıklılara göre yüksektir ve tedaviyle 15. ve 90. günlerde TBARS düzeylerinde azalma olmuştur.

Aterosklerozun en erken göstergelerinden biri (5,7) olan endotel disfonksiyonun diyabetin mikro ve makrovasküler komplikasyonlarının patogeneğinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (7). Endotel fonksiyonunu değerlendirmek için akıma bağlı dilatasyon ölçümü ve dolaşım birtakım belirteçlerin düzeylerinin ölçülmesi gibi yöntemler kullanılmaktadır (2,83). Akıma bağlı vazodilatasyon sağlıklı endotelin iskemi veya asetilkolin gibi uyarılara karşı NO salgılamaya cevabını göstermektedir. Bu parametreyi değerlendirmek amacıyla Doppler ultrasonografi gibi noninvazif ve venöz pletismografi gibi invazif yöntemler kullanılmaktadır. Doppler ultrasonografi yönteminin basit, tekrarlanabilen ve güvenilir bir yöntem olduğu bilinmektedir (90,91).

Çalışmamızda tip 1 diyabetik hastalarda Doppler ultrasonografi yöntemiyle yapılan ölçümlerde brakiyal arterde iskemi sonrası % FMD değerleri diyabetik olmayan sağlıklı bireylere göre düşük izlenmiştir. Bu veri literatürdeki birçok veri ile uyumludur.

Clarkson ve arkadaşları (95), klinik olarak gösterilmiş ateroskerozu olmayan asemptomatik 80 Tip 1 diyabetik hastada brakiyal arterlerde Doppler ultrasonografi yöntemiyle yapılan ölçümlerde % FMD'yi sağlıklılara göre düşük bulmuşlardır. Johnstone ve arkadaşlarının (94) 1993 yılında yaptıkları bir çalışmada, 15 Tip 1 diyabetikte venöz pletismografi yöntemiyle metakoline bağlı oluşan

vazodilatör cevap kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmış bulunmuştur. Dogra ve arkadaşları (96) ise 17 Tip 1 diyabetik hastada ön koldan brakial arter çap ölçümlerinde post-iskemik akıma bağlı dilatasyonu bozulmuş olarak bulmuşlardır. Calver ve arkadaşları (97), 10 Tip 1 diabetes mellitus hastasında venöz pletismografi yöntemiyle ön kola NO sentaz antagonisti NMMA infüzyonuyla vazokonstriktör cevabın azaldığını görmüşlerdir. Bu da bazal NO salınımının azaldığını göstermektedir.

Yukarıdaki çalışmaların aksine literatürde tip 1 diyabetiklerde endotel fonksiyonunda değişiklik olmadığını ileri süren çalışmalar da mevcuttur. Smits ve arkadaşları (109) 11 Tip 1 diyabetik hastada iskemi ve metakolin infüzyonu sonrası pletismografi yöntemiyle değerlendirdikleri akıma bağlı vazodilatasyonu kontrol grubuyla benzer bulmuşlardır. Enderle ve arkadaşları (102) uzun diyabet süresine rağmen iyi metabolik kontrol sağlanmış Tip 1 diyabetiklerde, Tip 2 diabetes mellitus hastalarının aksine ön koldan akıma bağlı vazodilatasyonun Doppler ultrasonografi yöntemiyle sağlıklı kontrollerden farksız olduğunu göstermişlerdir. Lambert ve arkadaşları (135) 52 kişilik Tip 1 diabetes mellitus serisinde Doppler ultrasonografi yöntemiyle endotele bağımlı olan vazodilatasyonu normal bulmuşlardır. Çelişkili sonuçlar diyabet süresi, kontrolü, mikro veya makrovasküler komplikasyonların varlığı, endotel fonksiyon testleri sırasındaki glukoz düzeyleri veya ölçüm yöntemlerinin uygulanması ve duyarlılığındaki farklılıklara bağlı olabilir (98).

Çalışmamıza dahil edilen hastaların ortalama A1c düzeyleri yaklaşık % 7.69 olup, bazal ve 3. ay değerleri arasında belirgin bir farklılık yoktur. Her üç ölçüm sırasında bakılan kan şekeri değerleri benzer olup, ortalama 220 civarında olmasına karşın, standart deviasyonlarının 97'lere varması kan şekeri değerlerinin değişken olduğunu göstermektedir. Ölçüm anındaki kan glukoz değerlerinin yüksek olması endotel fonksiyonunu olumsuz yönde etkilemiş olabilir. Ancak kan şekeri değerleri her üç ölçümde, yani tedavi sonrası ölçümlerde de yüksek olduğu için tedavinin etkisini değerlendirmede kan şekeri yüksekliğinin problem oluşturmayacağı düşünülmektedir. Korelasyon analizlerinde % FMD ile açlık kan şekeri veya A1c değerleri arasında korelasyon görülmezken, multipl regresyon analizinde % FMD'nin açlık kan şekeri ile ilişkili olduğu, buna karşın A1c düzeyleriyle korelasyon göstermediği gözlemlenmiştir. Literatürde A1c değerleriyle korelasyon gösterilen (99) ve gösterilmeyen (94,95,100) yayınlar vardır.

Çalışmadaki diyabetik grupta sağlıklılarla karşılaştırıldığında lipid profilleri açısından anlamlı fark yoktur. Lipid parametrelerinden sadece HDL değeri % FMD ile multipl regresyon analizinde pozitif korelasyon gösterirken, lipid parametreleriyle ADMA arasında herhangi bir ilişki görülmemiştir. Bu veri literatürle uyumlu olmasına karşın (19,96), Tip 1 diyabetiklerde % FMD'nin total kolesterol (100) ve LDL değerleriyle (95) negatif korelasyon gösterdiği yayımlar da vardır. Çelişkili sonuçlar çalışmalara katılan hastaların diyabet süresi, kontrolü ve vasküler komplikasyonlarının farklılıklarından kaynaklanabilir.

Hastaların % GTN değerleri kontrollerle benzer çıkmıştır. Bu veriyi literatürde destekleyen (19,100,102,135) ve desteklemeyen (95,96,97) bulgular vardır. Bu parametrede farklılık olmaması diyabetiklerde damar düz kasının endotelden sonra etkilendiğini düşündürmektedir (102).

Hastalarımızın çoğunda ateroskleroz için bir risk faktörü olduğu bilinen mikroalbuminüri yoktur. Bu da % FMD'de azalmanın mikroalbuminden önce meydana geldiğine dair literatürdeki veriyi desteklemektedir (94,96,105,135).

ACE inhibitörlerinin diyabetik hastalarda endotel disfonksiyonuna olumlu etkileri bilinmektedir. Çalışmamızda hipertansif olmayan tip 1 diyabetiklerde 0.5 mg trandolapril tedavisinin kan basıncında anlamlı bir düşme yapmadan % FMD düzeylerinde artışa neden olduğu izlenmiştir. Bu veri literatürde tip 1 diyabetiklerde elde edilen veriler ile uyumludur. Arcaro ve arkadaşları (20) 9 normotansif Tip 1 diyabetik hastada 1 haftalık plasebo, kaptopril ve enalapril uygulaması sonrasında yapılan endotel fonksiyon değerlendirilmesinde kaptopril ve enalaprilin endotele-bağımlı vazodilatasyonda düzelmeye yaptığını göstermişlerdir. Driscoll ve arkadaşları (19), 9 Tip 1 diyabet hastasının intrabakiyal enalapril sonrası ve 4 haftalık oral enalapril tedavisi sonrası venöz pletismografi yöntemiyle brakiyal arterden asetilkolin cevabını değerlendirmişlerdir. İntrabakiyal enalapril verilmesiyle asetilkolin cevabında anlamlı bir değişiklik olmamış, ancak bir aylık oral enalapril tedavisi sonrasında asetilkolin cevabında düzelmeye olmuştur.

Buna karşın ACE-inhibisyonun endotel disfonksiyonu üzerinde etkisi olmadığını gösteren çalışmalar da vardır. Mullen ve arkadaşları (100), 91 hastalık Tip 1 diabetes mellitus serisinde 6 aylık enalapril tedavisinin, Schalkwijk ve arkadaşları (158) da 24 Tip 1 diyabetik hastada 5 haftalık kinapril tedavisinin endotel disfonksiyonu üzerinde etkisi olmadığını göstermişlerdir. Burada ACE

inhibitörlerine cevaptaki farklılıkların sebebi olarak daha önceden belirtildiği gibi yaş, diyabet süresi, kontrolü, plazma glukoz değerleri, endotel fonksiyonu ölçüm metodlarındaki değişiklikler, ilaçların terapötik dozlara ulaşip ulaşmaması düşünülebilir. Bunun yanında kullanılan ACE-inhibitör tiplerinin farklı farmakokinetik özelliklere sahip olması değişken yanıtları açıklayabilir (165). ACE-inhibitörlerinin damar koruyucu etkileri dolaşımdaki ACE yerine doku ACE'sini inhibe etme özelliklerine dayanabilir (195). Doku ACE'sini inhibe etmelerindeki farklılıklar endotel fonksiyonu üzerindeki etkinliklerini değiştirebilir. Bu bağlamda, ACE'nin aterosklerotik plak olmayan damarlarda ekspresyonunun az olması ilerlemiş aterosklerotik hastalıkta daha etkin olabileceğini düşündürmektedir (159). Tüm bunlardan ayrı olarak ACE genotipindeki varyasyonlar da etkinlikteki değişiklikleri açıklayabilir (196).

Çalışmamızda trandolapril tedavisiyle hastaların kan basıncı değerlerinin değişmediği görülmüştür. Aynı şekilde Tip 1 diyabetiklerde enalapril (19) ile kan basıncında değişiklik görülmezken, hipertansif hastalarda (156) da benzer hipotansif etkiye rağmen perindopril ile endotel fonksiyonunun düzeldiği, bisoprolol ile düzelmediği görülmüştür. Bu bulgular ACE-inhibitörlerinin endotel fonksiyonu üzerindeki olumlu etkilerinin kan basıncını düşürme özelliklerinden bağımsız olduğunu düşündürmektedir.

Tip 1 diabetes mellitus hastalarında endotel disfonksiyonun patogenezinde NO'nun azalmış üretimi önemli bir yer tutmaktadır. NO yapımının azalması kısmen NOS enzim inhibitörü ADMA'nın varlığına bağlıdır (8). Kardiyovasküler mortalitenin bir göstergesi (12,133) olarak kabul edilen ADMA endotel disfonksiyonunun dolaşımdaki belirteçlerinden biridir. Plazma ADMA düzeyi endotel disfonksiyonuyla ilişkili birçok durumda yüksek bulunmuştur. Endotel disfonksiyonuyla birlikte giden durumlardan Tip 1 diabetes mellitus hastalarında plazma ADMA düzeylerine dair şimdiye kadar literatürde yayınlanmış herhangi bir çalışma yoktur. Bizim çalışmamız bu açıdan bir ilki oluşturmaktadır.

Çalışmamızda plazma ADMA değerleri diyabetik hastalarda sağlıklılarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Eş zamanlı bakılan SDMA düzeyleri kontrollerden farksız çıkmıştır. SDMA DDAH enzimi tarafından metabolize olmadığından dolayı SDMA'da yükseklik olmadan sadece ADMA düzeylerinde artış olması ADMA'daki yüksekliğin metabolizmasındaki sorundan

kaynaklandığını düşündürmektedir. Bunun yanında yapımındaki artışın da ADMA düzeyindeki artışa neden olabileceği düşünülmelidir. Böger ve arkadaşları okside LDL varlığında protein-arginin N-metiltransferaz enziminin ekspresyonunun arttığını ve bunun da hiperlipidemide ADMA elevasyonlarını açıklayabilecek bir mekanizma olduğunu öne sürmüşlerdir (134). Tüm bunlardan bağımsız olarak ADMA'nın yapım veya yıkım enzimlerinde meydana gelebilecek mutasyonların ADMA yüksekliğinde etkisi olabilir, ancak ACE inhibitörleri ile mutasyonlara bağlı ADMA yüksekliklerini azaltması beklenemez.

Çalışmada 0.5mg trandolapril tedavisi altında diyabetiklerdeki plazma ADMA düzeylerinin 15. günde aynı düzeylerde kalıp 90. günde istatistiksel anlamlı olarak düştüğü görülmüştür. Beraberinde bakılan SDMA düzeylerinde fark yoktur.

ACE inhibitörlerinin endotel fonksiyonu ile giden çeşitli durumlarda plazma ADMA düzeylerini azalttıkları bilinmektedir. Ito ve arkadaşları (156), 4 haftalık perindopril, losartan ve bisoprolol tedavisi verdikleri hipertansif grupta perindopril ve losartan ile plazma ADMA düzeylerini anlamlı olarak düşürürken bisoprololün etkilemediğini göstermişlerdir. Aynı çalışma grubu 11 Tip 2 diyabetik hastada başlangıçta yüksek olan ADMA düzeylerinde 4 haftalık perindopril tedavisiyle anlamlı düşme olduğunu göstermişlerdir (22). Benzer şekilde Chen ve arkadaşları, (180) sendrom X tanımlanmış 20 hastada 8 haftalık enalapril tedavisiyle plazma ADMA düzeylerinde azalma saptamışlardır.

Çalışmamızda SDMA düzeylerinde de tedaviyle herhangi bir değişiklik görülmemektedir. SDMA düzeylerinde fark olmaması ADMA düzeylerinde meydana gelen düşmenin üretiminin azalması yerine metabolizmasının artmasından dolayı olduğunu düşündürmektedir.

ACE inhibitörlerinin endotel fonksiyonu üzerindeki olumlu etkilerini NO üzerinden yaptıkları düşünülmektedir. ACE inhibitörleri bradikininini artırarak NO salınımını uyarmak ve oksidatif stresi azaltarak ADMA düzeylerini düşürmek yoluyla etki etmektedir. ADMA'nın yıkımından sorumlu enzim olan DDAH enzimi aktivitesinin oksidatif stres durumlarında engellendiği bilinmektedir (8,24,34). ACE inhibitörleri intrasellüler oksidatif stresi arttıran (25,177) anjiotensin II'yi azaltmak yoluyla veya direkt antioksidan etkileriyle (182) oksidatif stresi engeller. Oksidatif streste azalma sonucunda DDAH enziminin normal çalışması sağlanır; dolayısıyla ADMA daha çok metabolize olur ve düzeyleri azalır.

ADMA düzeylerindeki azalmanın patofizyolojisinde etkin olabilecek diğer bir mekanizma da renal klirensinde artış olmasıdır. Ancak 90 günlük zaman zarfında hastaların böbrek fonksiyonlarında bir değişiklik olmaması nedeniyle ADMA düzeylerindeki azalma bu şekilde açıklanamaz.. Bu açıdan olası bir diğer mekanizma ACE inhibisyonunun ADMA'nın renal klirensinde artışa neden olmasıdır ki böyle bir bağlantı da literatürde henüz bildirilmemiştir. Literatürde çok fazla üzerinde durulmasa da endotel disfonksiyonunun patofizyolojisinde ADMA yapımında artışın yer alabileceği de gösterilmiştir. Okside LDL varlığında ADMA yapımının arttığı bilindiğine göre (134), ACE'nin antioksidan etkinliğinin ADMA yapımını azaltıcı etkisi olabileceği de düşünülmelidir. ACE inhibisyonunun ADMA azalmasındaki hangi mekanizma üzerinde etkin olduğunu açıklayabilmek için daha ileri *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızdaki önemli bir bulgu da trandolapril tedavisiyle lipid peroksidasyon göstergelerinden TBARS aktivitesinde anlamlı düşme görülmesi ve bu düşmenin endotel fonksiyon belirteçlerinin ikisiyle de korelasyon göstermesidir. Diğer bir deyişle hastalarda tedaviyle % FMD'de artış ve ADMA düzeylerindeki azalma TBARS aktivitesindeki azalmayla birlikte gitmektedir. Bu veri de çalışmamızda görülen endotel fonksiyon parametrelerinde düzelmede oksidatif strese azalmanın katkısı olduğunu düşündürmektedir.

Literatüre bakıldığında da ACE inhibitörünün antioksidan etkinlikleriyle ilişkili çelişkili sonuçlar bulunmuştur. De Cavanagh ve arkadaşları (185) hemodiyaliz hastalarında ACE-inhibitör tedavisiyle eritrosit glutatyon, selenyuma bağlı glutatyon peroksidaz aktivitesi ve plazma beta-karoten düzeylerinin arttığını saptamışlardır. Buna karşın Ito ve arkadaşları (22) Tip 2 diyabetiklere perindopril verdikleri çalışmada lipoperoksit düzeylerinde herhangi bir farklılık tespit etmemişlerdir. Aynı çalışma grubu hipertansif hastalarda malindialdehit-modifiye LDL (156) düzeylerinin perindopril tedavisi ile değişmediğini göstermişlerdir. Bu sonuçlara göre ACE inhibitörlerinin oksidasyon parametreleri üzerindeki etkilerinin daha ileri çalışmalarla belirlenmesi gerektiği düşünülmektedir.

Çalışmamızda trandolaprilin % FMD ve ADMA üzerindeki etkisi 15. günde görülmeyip, 90. günde gözlenmiştir. Tip 1 diyabetiklerde ACE inhibisyonunun endotel disfonksiyonundaki etkisiyle ilişkili literatürde en kısa zaman olarak intraarteryel enlaprilatin % FMD üzerindeki akut etkisine bakılmış ve etkisiz

görülmüş (19), ancak aynı çalışmada 1 aylık tedaviyle olumlu etki gösterilmiştir. Bunun yanında 1 haftalık uygulamanın % FMD'yi artırmada etkin olduğunu gösteren bir yayın vardır (20). ADMA düzeylerinin ise hipertansif hastalarda (156) ve tip 2 diyabetik hastalarda (22) 4 haftalık, sendom X'i olan hastalarda (180) 8 haftalık ACE inhibitör tedavisiyle azaldığı görülmüştür. Buradan yola çıkılarak ACE-inhibitörlerinin olası etkilerinin yaklaşık 1 haftadan itibaren görüldüğü söylenebilir.

Çalışmamızda diyabetiklerdeki karotis arter intima medya kalınlığı sağlıklılardan farksız bulunmuştur. IMT değerleri ile % FMD veya ADMA arasında korelasyon görülmemiştir. Literatürde IMT değerlerinin Tip 1 diyabetiklerde arttığı gösterilmiştir. Yamasaki ve arkadaşları (197) 105 Tip 1 diyabetik hastada baktıkları IMT değerlerini sağlıklı kontrolere göre artmış bulurken, 17 kişilik hasta grubunda Enderle ve arkadaşları (102) da bizim bulgularımızla benzer sonuçlar almışlardır. Literatürde ADMA değerleri ile IMT arasında da sağlıklılarda (11) ve son dönem böbrek yetmezliği olan hastalarda korelasyon görülürken (198), hipertrigliseridemi (13) olanlarda görülmemiştir. IMT ve % FMD'nin aterosklerozun değişik evrelerini göstermeleri ve farklı arterlerde ölçüm yapılmasının sonuçları etkileyebileceği düşünülmektedir (102).

Sonuç olarak ACE inhibitörü tedavisi Tip 1 diyabetiklerde plazma ADMA düzeylerini azaltarak endotel disfonksiyonu üzerinde olumlu etki yapmaktadır. ACE inhibisyonunun bu etkiyi olası antioksidan etkinliğinden dolayı ADMA metabolizmasında artış yoluyla yaptığı düşünülmektedir. Buna karşın ACE inhibisyonunun ADMA yapım ve yıkımı üzerinde etkin olabilecek başka etkileri açısından daha ileri araştırmalar yapılması gerekmektedir. Bu aşamada özellikle ADMA'nın yapım ve hidrolizinde yer alan enzimlerin genetik varyantlarının tanımlanması yararlı olabilir. Daha da önemlisi, ACE inhibisyonuna bağlı endotel disfonksiyonunda meydana gelen düzelmenin makrovasküler komplikasyonlar üzerindeki etkilerinin anlaşılabilmesi amacıyla uzun dönemli prospektif çalışmalar gerekmektedir.

6. ÖZET (TÜRKÇE)

Endotel disfonksiyonunun patogeneğinde plazma ADMA düzeylerindeki yüksekliğin önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Endotel disfonksiyonuyla birlikte giden birçok durumda ADMA elevasyonları bildirilse de Tip 1 diyabetiklerde ADMA düzeyleriyle ilişkili olarak literatürde herhangi bir veri bulunmamaktadır. ACE inhibitörlerinin çeşitli hastalıklarda endotel disfonksiyonu üzerinde olumlu etkileri gösterilmiştir. Bu etkide antioksidan etkinliklerinin rol oynadığı düşünülmektedir. Bu bilgilerin ışığında, bu çalışmada Tip 1 diyabetiklerde endotel fonksiyonun akıma bağlı dilatasyon ve ADMA ölçümleriyle değerlendirilmesi, ACE inhibisyonunun endotel disfonksiyonu üzerindeki etkisinin ve bu etkinin oksidasyonla ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmaya 30 Tip 1 diyabet hastası (yaş: $29,73 \pm 6,1$; K/E:18/12) ile yaş ve cinsiyet uyumlu 29 sağlıklı kontrol (yaş: $30,45 \pm 6,46$;K/E:16/13) dahil edilmiştir. Başlangıçta her iki grupta Doppler ultrasonografi yöntemiyle akıma bağlı dilatasyon ve HPLC yöntemiyle ADMA ölçümleri yapıldıktan sonra, diyabet grubunda 0.5mg trandolapril tedavisinin 15. ve 90. günlerinde, kontrol grubunda da benzer aralıklarda bu ölçümler tekrar edilmiştir. Diyabetiklerde % FMD'nin bazal (4.67 ± 1.96) ve tedavinin 15. günündeki değerleri (6.38 ± 3.44) kontrollere (11.17 ± 3.88) göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0.001$). Tedavinin 90. gününde (8.62 ± 4.13) bazale göre anlamlı bir artış meydana gelmiştir ($p<0.01$). Diyabet grubunun bazal ADMA düzeyleri (271.1 ± 48.06) kontrollere (237.52 ± 25.17) göre anlamlı olarak daha fazladır ($p<0.05$). Tedaviyle ADMA düzeylerinin 90. günde (229.63 ± 42.91) bazale göre anlamlı olarak düştüğü görülmüştür ($p<0.001$). Diyabetiklerdeki bazal TBARS değerleri (4517.10 ± 2366.90) kontrollere karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). TBARS değerleri tedavinin 15. (2362.83 ± 1150.60) ($p<0.05$) ve 90. günlerinde (1531.77 ± 1036.0) ($p<0.001$) anlamlı olarak azalmıştır. ADMA ve % FMD ($r=-0.228$) ile % FMD ve TBARS ($r=-0.244$) arasında negatif korelasyon görülürken, ADMA ve TBARS ($r=0.399$) arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. Lojistik stepwise regresyon analizinde % FMD'yi bağımsız olarak etkileyen parametreler açlık kan şekeri ($r=0.359$), TBARS ($r=0.447$)

ve HDL ($r=0.480$) olarak bulunmuştur. ADMA'yı bağımsız olarak etkileyen tek parametre ise TBARS ($r=0.343$) olarak saptanmıştır.

Bu bulgular Tip 1 diyabetiklerde endotel disfonksiyonun ADMA düzeylerinde artışla birlikte gittiğini ve ACE inhibitörlerinin antioksidan etkinlikleri aracılığıyla ADMA düzeylerinde düşmeye yol açarak endotel fonksiyonunu düzelttiğini göstermektedir.

7. ÖZET (İNGİLİZCE)

Increased ADMA levels are known to play an important role in the pathogenesis of endothelial dysfunction. Although this association has been shown in many disease states related to endothelial dysfunction, no data exists about the levels of ADMA in Type 1 diabetics. ACE inhibitors have been shown to reverse endothelial dysfunction in some conditions. It is believed that their antioxidant properties play a role in this regard. The aim of this study is to assess endothelial dysfunction by measuring flow-mediated vasodilation and ADMA levels, to determine the effect of ACE inhibition on endothelial dysfunction and to investigate the association of this effect with oxidation.

30 Type 1 diabetic patients (age: $29,73 \pm 6,1$; F/M:18/12) and 29 age and sex matched controls (age: $30,45 \pm 6,46$; F/M:16/13) were included in the study. Baseline flow-mediated dilation was determined by Doppler ultrasonography and ADMA measurements were made by HPLC in both groups. These measurements were repeated on the fifteenth and nintieth day after the initiation of 0.5mgtrandolapril therapy in diabetics and at similar intervals for the control group. FMD % values at the baseline (4.67 ± 1.96) and on day 15 of therapy (6.38 ± 3.44) were significantly lower than the controls ($p < 0.001$). A significant elevation in the FMD % level was seen on day 90 (8.62 ± 4.13) ($p < 0.01$). Baseline ADMA levels (271.1 ± 48.06) of the diabetics were significantly greater than the values of the control group (237.52 ± 25.17) ($p < 0.05$). ADMA levels on day 90 seemed to decrease significantly compared with baseline (229.63 ± 42.91) ($p < 0.001$). Baseline TBARS levels of the diabetics (4517.10 ± 2366.90) were significantly greater than the control group ($p < 0.001$). TBARS levels on day 15 (2362.83 ± 1150.60) ($p < 0.05$) and day 90 (1531.77 ± 1036.0) ($p < 0.001$) of therapy were significantly lower than the baseline levels. There was a negative correlation between ADMA and FMD % ($r = -0.228$, $p < 0.01$), FMD % and TBARS ($r = -0.244$, $p = 0.02$) and a positive correlation between ADMA and TBARS ($r = 0.399$, $p < 0.0001$) levels. Logistic stepwise regression analysis showed the independent variables affecting FMD % as fasting plasma glucose ($r = 0.359$), TBARS ($r = 0.447$) and HDL ($r = 0.480$). The only independent variable affecting ADMA was TBARS ($r = 0.343$).

These findings indicate that endothelial dysfunction in Type 1 diabetics go along with elevations of plasma ADMA levels and that ACE inhibition improves endothelial dysfunction by decreasing ADMA levels through an antioxidant process.



8. KAYNAKLAR

1. Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414:813-20.
2. Swerdlow AJ, Jones ME. Mortality during 25 years of follow-up of a cohort with diabetes. *Int J Epidemiol* 1996;25:1250-61.
3. Nathan DM. Long term complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993;328:1676-85.
4. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993;329:977-86.
5. Celermajer DS. Endothelial dysfunction: Does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol* 1997;30:325-33.
6. Anderson TJ. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:631-8.
7. Vanhoutte PM, Boulanger CM, Mombouli JV. Endothelium-derived relaxing factors and converting enzyme inhibition. *Am J Cardiol* 1995;76:3E-12E.
8. De Vriese AS, Verbeuren TJ, Voorde JV, et al. Endothelial dysfunction in diabetes. *British Journal of Pharmacology* 2000;130:963-74.
9. Moncada S, Higgs A. The arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;329:2002-12.
10. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988;333:664-6.
11. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, et al. Endogenous nitric oxide inhibitor. A novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 1999;99:1141-6.
12. Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): A novel risk factor for endothelial dysfunction: Its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998;98:1842-7.
13. Lundman P, Eriksson MJ, Stühlinger M, et al. Mild-to-moderate hypertriglyceridemia in young men is associated with endothelial dysfunction and increased plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:111-6.

14. Fujiwara N, Osanai T, Kamada T, et al. Study on the relationship between plasma nitrite and nitrate level and salt sensitivity in human hypertension. Modulation of nitric oxide synthesis by salt intake. *Circulation* 2000;101:856-61.
15. Stühlinger MC, Tsao PS, Her JH, et al. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway. Role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2001;104:2569-75.
16. Avogaro A, Piarulli F, Valerio A, et al. Forearm nitric oxide balance, vascular relaxation and glucose metabolism in NIDDM patients. *Diabetes* 1997;46:1040-6.
17. Adler SA, Nast C, Artishevsky A. Diabetic nephropathy: pathogenesis and treatment. *Ann Rev Med* 1993;44:303-15.
18. O'Driscoll G, Green D, Maiorana A, et al. Improvement in endothelial function by angiotensin-converting enzyme inhibition in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 1999;33:1506-11.
19. O'Driscoll G, Green D, Rankin J, et al. Improvement in endothelial function by angiotensin converting enzyme inhibition in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1997;100:678-84.
20. Arcaro G, Zencr BM, Saggiani F et al. ACE Inhibitors improve endothelial function in type 1 diabetic patients with normal arterial pressure and microalbuminuria. *Diabetes Care* 1999;22:1536-1542.
21. Lonn EM, Yusuf S, Jha P, et al. Emerging role of angiotensin-converting enzyme inhibitors in cardiac and vascular protection. *Circulation* 1994;90:2056-69.
22. Ito A, Egashira K, Narishige T, et al. Angiotensin-converting enzyme activity is involved in the mechanism of increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circ J* 2002;66:811-815.
23. Berry C, Hamilton CA, Brosnan MJ, et al. Investigation into the sources of superoxide in human blood vessels. Angiotensin II increases superoxide production in human internal mammary arteries. *Circulation* 2000;101:2206-12.
24. Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, et al. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 1999;99:3092-5.
25. Foster DW: Diabetes mellitus. In 14 th edition: Harrison's Principles of Internal Medicine, editors: Fauci A, Braunwald E, Isselbacher K, Wilson J, Martin J, Kasper D, Hauser S, Longo D. New York, Mc Graw Hill;1998 .pp2060-2080.

26. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. American Diabetes Association: Clinical Practice Recommendations 2004:Position Statement. *Diabetes Care* 2004;27:S5-10.
27. Klein R. The epidemiology of diabetic eye disease. In second edition: *Textbook of Diabetes*, editors: Pickup J, Williams G. London, Blackwell Science;1997, pp44.1-44.9
28. Krolewski AS, Warram JH: Natural history of diabetic nephropathy. *Diabet. Rev.* 1995;3:446-459.
29. Ritz E, Stefanski A. Diabetic nephropathy in Type II diabetes. *Am J Kidney Dis.* 1996;27:167-194.
30. Vinik AI, Holland MT, Le Beau JM, et al: Diabetic neuropathies. *Diabetes Care.* 1992;15:1926-75.
31. Watkins PJ, Edmonds ME: Clinical features of diabetic neuropathy. In second edition: *Textbook of Diabetes*, editors: Pickup J, Williams G. London, Blackwell Science ;1997, pp50.1-50.20.
32. Giardino I, Brownlee M. The biochemical basis of microvascular disease. In second edition: *Textbook of Diabetes*, editors: Pickup J, Williams G. London, Blackwell Science; 1997, pp42.1-42.16.
33. Herman WH, Crofford OB. The relationship between diabetic control and complications. In second edition: *Textbook of Diabetes*, editors: Pickup J, Williams G. London, Blackwell Science, 1997, pp41.1-41.11.
34. Lin KY, Asagami T, Tsao PS, et al. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus. Role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 2002;106:987-92.
35. Williamson JR, Chang K, Frangos M, et al. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes* 1993;42:801-13.
36. Xia P, Inoguchi T, Kern TS, et al. Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes* 1994;43:1122-9
37. Gillery P, Monboisse JC, Maquart FX, et al. Glycation of proteins as a source of superoxide. *Diab Metab* 1988;14:25-30.

38. Brownlee M, Vlassara H, Cerami A, et al. Non-enzymatic glycosylation products on collagen covalently trap low-density lipoprotein. *Diabetes* 1985;34:938-41.
39. Michael AF, Brown DM. Increased concentrations of albumin in kidney basement membranes in diabetes mellitus. *Diabetes* 1981;30:843-6.
40. Heidland A, Sebekova K, Schinzel R et al. Advanced glycation end products and the progressive course of renal disease. *Am J Kidney Dis.* 2001 Oct;38(4 Suppl 1):S100-6.
41. Bucala R, Model P, Cerami A. Modification of DNA by reducing sugars: a possible mechanism for nucleic-acid aging and age-related dysfunction in gene expression. *Proc Natl Acad Sci* 1984;81:105-9.
42. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause and consequence. *Lancet* 1994;344:721-4.
43. Betteridge. What is oxidative stress? *Metabolism* 2000;49[Supplement 1]:3-8.
44. Kerr SM, Brosnan MJ, McIntyre M, et al. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: the role of the endothelium. *Hypertension* 1999;33:1353-8.
45. Miller FJ, Gutterman DD, Rios CD, et al. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res* 1998;82:1298-1305.
46. Mohazzab-HK, Kaminski PM, Wolin MS. NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol* 1994;266:H2568-72.
47. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 1993;91:2546-51.
48. Gutteridge MCJ. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995;41:1819-28.
49. Lapenna D, Ciofani G, Pierdomenico SD, et al. Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid peroxides in human plasma. *Free Rad Biol Med* 2001;31:331-5.
50. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996;19:257-67.

51. Stehouwer CDA, Lambert J, Donker AJM, et al. Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy. *Cardiovascular Research* 1997;34:55-68.
52. Garcia MJ, McNamara PM, Gordon T, et al. Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population: sixteen year follow-up study. *Diabetes* 1974;23:105-11.
53. Krolewski AS, Kosinski EJ, Warram JH. Magnitude and determinants of coronary artery disease in juvenile-onset, insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 1987;59:750-5.
54. Chait A, Bierman EL. Pathogenesis of macrovascular disease in diabetes. In thirteenth international edition: *Joslin's Diabetes Mellitus*, editors Kahn CG, Weir GC. Pennsylvania, Lea&Febiger,1994,pp648-664
55. Curtiss LK, Witztum JL. Plasma apolipoproteins AI, AII, B, CI and E are glycosylated in hyperglycemic diabetic subjects. *Diabetes* 1985;34:452-61.
56. West KM, Ahuja MMS, Bennett PH. The role of circulating glucose and triglyceride concentrations and their interactions with other 'risk factors' as determinants of arterial disease in nine diabetic population samples from the WHO multinational study. *Diabetes Care* 1983;6:361-9.
57. Austin MA, Breslow JA, Hennekens CH. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA* 1988;260:1917-21.
58. Mc Lean JW, Tomlinson JE, Kuang WJ, et al. cDNA sequence of lipoprotein (a) is homologous to plasminogen. *Nature* 1987;330:132-7.
59. Wingard DL, Barrett-Connor E, Criqui MH, et al. Clustering of heart disease risk factors in diabetic compared to non-diabetic adults. *Am J Epidemiology* 1983;117:19-26.
60. Després J-P, Lamarche B, Mauriège P, et al. Hyperinsulinemia as an independent risk factor for ischemic heart disease. *N Eng J Med* 1996;334:952-7.
61. Feener EP, King GL. Vascular dysfunction in diabetes mellitus. *Lancet* 1997;350 (suppl 1):9-13.
62. Scherrer U, Randin D, Vollenweider P, et al. Nitric oxide release accounts for insulin's vascular effects in humans. *J Clin Invest* 1994;94:2511-15.
63. Kawamura M, Heinecke JW, Chait A. Pathophysiological concentrations of glucose promote oxidative modification of low density lipoprotein by a superoxide-dependent pathway. *J Clin Invest* 1994;94:771-8.

64. Heinecke JW, Baker L, Rosen H, et al. Superoxide-mediated modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1986;77:757-61.
65. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis-an update. *N Eng J Med* 1986;131:443-53.
66. Chait A, Brazg RL, Tribble DL, et al. Susceptibility of small dense low-density lipoproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype, pattern B. *Am J Med* 1993;94:350-6.
67. Wissler RW. Update on pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Med* 1991;91:35-95.
68. Lopes-Virella MF, Griffith RL, et al. Enhanced uptake and impaired intracellular metabolism of low-density lipoproteins complexed with anti-low density lipoprotein antibodies. *Arter Thromb* 1991;11:1356-67.
69. Bagdade JD, Subbaiah PV. Whole-plasma and high-density lipoprotein subfraction surface lipid composition in IDDM men. *Diabetes* 1989;38:1226-30.
70. Banga JD, Sixma JJ: Diabetes mellitus, vascular disease and thrombosis. *Clin Haematol* 1986;15:465-92.
71. Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000;101:1899-1906.
72. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998;91:3527-61.
73. Steinberg HO, Brechtel G, Johnson A, et al. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J Clin Invest* 1994;94:1172-79.
74. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-6.
75. Busse R, Mulsch A, Fleming I. Mechanisms of nitric oxide release from the vascular endothelium. *Circulation* 1993;87:V18-V25.
76. Cooke JP. Flow, NO and atherogenesis. *PNAS* 2003;100:768-70.

77. Khachigian LM, Resnick N, Gimbrone MA, Nuclear factor- κ B interacts functionally with the platelete-derived growth factor b-chain shear-stress response element in vascular endothelial cells exposed to fluid shear stress. *J Clin Invest* 1995;96:1169-75.
78. McLenachan JM, Vita J, Fish RD, et al. Early evidence of endothelial vasodilator dysfunction at coronary branch points. *Circulation* 1990;82:1169-73.
79. Ignarro LJ. Heme-dependent activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide:regulation of enzyme activity by porphins and metalloporphins. *Semin Hematol* 1989;26:63-76.
80. Mendelsohn ME, O'Neill S, George D, et al. Inhibition of fibrinogen binding to human platelets by S-nitroso-N-acetylcysteine. *J Biol Chem* 1990;265:19028-33.
81. Caterina RD, Libby P, Peng HB, et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995;96:60-68.
82. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide (NO) and 8-bromo-cyclic GMP inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989;83:1974-80.
83. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992;340:1111-15.
84. Hodgson JMcB, Marshall JJ. Direct vasoconstriction and endothelium dependent vasodilatation:mechanisms of acetylcholine effects on coronary flow and arterial diameter in patients with nonstenotic coronary arteries. *Circulation* 1989;79:1043-51.
85. Ludmer PL, Selywn AP, Shook TL, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1986;315:1046-51.
86. Creager MA, Cooke JP, Mendelsohn ME, et al. Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 1990;86:228-34.
87. Coretti MC, Plotnick GD, Vogel RA. Technical aspects of evaluating brachial artery endothelium-dependent vasodilation using high-frequency ultrasound. *Am J Physiol* 1995;268:H-1397-H1404.

88. Vogel RA, Coretti MC, Plotnick GD. A comparison of brachial artery flow-mediated vasodilation using upper and lower arm arterial occlusion in subjects with or without coronary risk factors. *Clin Cardiol* 2000;23:571-5.
89. Vogel RA. Measurement of endothelial function by brachial artery flow-mediated vasodilation. *Am J Cardiol* 2001;88(suppl):31E-34E.
90. Sorensen KE, Celermajer DS, Spiegelhalter DJ, et al. Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *Br Heart J* 1995;74:247-53.
91. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* 1995;26:1235-41.
92. Sorensen KE, Celermajer DS, Georgakopoulos D, et al. Impairment of endothelium-dependent dilation is an early event in children with familial hypercholesterolemia and is related to lipoprotein (a) level. *J Clin Invest* 1994;93:50-55.
93. Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, et al. Obesity/Insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest* 1996;97:2601-10.
94. Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM, et al. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 1993;88:2510-16.
95. Clarkson P, Celermajer DS, Donald AE, et al. Impaired vascular reactivity in insulin-dependent diabetes mellitus is related to disease duration and low-density lipoprotein cholesterol levels. *J Am Coll Cardiol* 1996;28:573-9.
96. Dogra G, Rich L, Watts GF. Endothelium-dependent and independent vasodilation studied at normoglycemia in type I diabetes mellitus with and without microalbuminuria. *Diabetologia* 2001;44:593-601.
97. Calver A, Collier J, Vallance P. Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 1992;90:2548-54.
98. Elliott TG, Cockcroft JR, Groop PH et al. Inhibition of nitric oxide synthesis in forearm vasculature of insulin-dependent diabetic patients. Blunted vasoconstriction in patients with microalbuminuria. *Clin Sci.* 1993;85:687-93:

99. Jorgensen RG, Russo L, Mattioli L, et al. Early detection of vascular dysfunction in type I diabetes. *Diabetes*. 1988;37:292-6.
100. Mullen MJ, Clarkson P, Donald AE, et al. Effect of enalapril on endothelial function in young insulin-dependent diabetic patients: a randomized, double-blind study. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:1330-5.
101. Williams SB, Cusco JA, Roddy MA, et al. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 567-74.
102. Enderle M, Benda N, Schmuelling, et al. Preserved endothelial function in IDDM patients, but not in NIDDM patients, compared with healthy subjects. *Diabetes Care* 1998;21:271-77.
103. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, et al. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990;323:22-7.
104. Egashira K, Inou T, Hirooka Y, et al. Effects of age on endothelium-dependent vasodilation of resistance coronary artery by acetylcholine in humans. *Circulation* 1993;88:77-81.
105. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, et al. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation* 1993;88[part 1]:2149-55.
106. Harrison DG. Perspective series: Nitric oxide and nitric oxide synthases: cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest*. 1997;100:2153-57.
107. Bossaller C, Habib H, Yamamoto C et al. Impaired muscarinic endothelium dependent relaxation and cyclic guanosine 5' monophosphate formation in atherosclerotic human coronary artery and rabbit aorta. *J Clin Invest* 1987;79:170-4.
108. Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hypoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986;250:H822-H827.
109. Smits P, Kapma JA, Jacobs MC, et al. Endothelium-dependent vascular relaxation in patients with type I diabetes. *Diabetes* 1993;42:148-53.
110. Shimizu K, Muramatsu M, Kalebawa Y et al. Role of prostaglandin H₂ as an endothelial-derived contracting factor in diabetic state. *Diabetes* 1993;42:1246-52.

111. Batty LD, Chester AH, Springall DR et al. Atherogenic levels of low-density lipoprotein increase hydrogen peroxide generation in cultured human endothelial cells: Possible mechanisms of heightened endocytosis. *J Pathol* 1996;179:197.
112. Goligorsky MS. Endothelial cell dysfunction and nitric oxide synthase. *Kidney International* 2000;58:1360-76.
113. Mac Allister RJ, Parry H, Kimoto M, et al. Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *British Journal of Pharmacology* 1996;119:1533-40.
114. Cooke JP, Dzau VJ. Derangements of the nitric oxide synthase pathway, L-arginine, and cardiovascular diseases. *Circulation* 1997;96:379-82.
115. Pieper GM. Acute amelioration of diabetic endothelial dysfunction with a derivative of nitric oxide synthase cofactor, tetrahydrobiopterin. *J Cardiovascular Pharmacology* 1997;29:8-15.
116. Vallance P, Leone A, Calver A, et al. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339: 572-5.
117. Kakimoto Y, Akazawa S. Isolation and identification of N-G,N-G- and N-G,N'-G-dimethyl-arginine, N-epsilon-mono-, di-, and trimethyllysine, and glucosylgalactosyl- and galactosyl-delta-hydroxylysine from human urine. *J Biol Chem* 1970;245:5751-8.
118. Chan NN, Chan JCN. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a potential link between endothelial dysfunction and cardiovascular diseases in insulin resistance syndrome? *Diabetologia* 2002;45:1609-16.
119. Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2032-7.
120. Leiper J, Vallance P. Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res* 1999;43:542-548.
121. Kurose I, Wolf R, Grisham MB, et al. Effects of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis on postcapillary venules. *Am J Physiol* 1995;268:H2224-H2231.
122. Mac Allister RJ, Fickling SA, Whitley GSJ, Vallance P. Metabolism of methylarginines by human vasculature: implications for the regulation of nitric oxide synthesis. *Br J Pharmacol* 1994;112:43-8.

123. Vallance P, Leone A, Calver A et al. Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992;20(suppl 12):S60-S62.
124. Böger RH, Bode-Böger SM, Thiele W, et al. Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 1997;95:1068-74.
125. Fard A, Tuck CH, Donis JA et al. Acute elevation of plasma asymmetric dimethylarginine and impaired endothelial function in response to a high-fat meal in patients with type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:39-44.
126. Surdacki A, Norwicki M, Sandmann J, et al. Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethyl arginine in men with essential hypertension. *J Cardiovas Pharmacol* 1999;33:652-8.
127. Usui M, Matsuoka H, Miyazaki H, et al. Increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with congestive heart failure. *Life Sci.* 1998;62:2425-30.
128. Yoo JH, Lee SC. Elevated levels of plasma homocysteine and asymmetrical dimethylarginine in elderly patients with stroke. *Atherosclerosis* 2001;158:425-30.
129. Valkonen VP, Palva H, Salonen JT, et al. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* 2001;2127-8.
130. Chauhan A, More RS, Mullins PA, et al. Aging-associated endothelial dysfunction in humans is reversed by L-arginine. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28: 1796-804.
131. Fard A, Tuck CH, Donis JA, et al. Acute elevations of plasma asymmetric dimethylarginine and impaired endothelial function in response to a high-fat meal in patients with type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2039-44
132. Craven TE, Ryu JE, Espeland MA, Kahl FR et al. Evaluation of associations between carotid artery atherosclerosis and coronary artery stenosis: a case control study. *Circulation* 1990;82:1230-42.
133. Zoccali C, Bode-Böger SM, Mallamaci F, et al. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet* 2001;358:2113-7.

134. Böger RH, Sydow K, Borlak J, et al. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res*. 2000;87:99-105.
135. Lambert J, Aarsen M, Donker AJM, et al. Endothelium-dependent and -independent vasodilation of large arteries in normoalbuminuric insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996 May;16(5):705-11
136. Orchard TJ, Dorman JS, Maser R, et al. Prevalence of complications in IDDM by sex and duration: Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study II. *Diabetes* 1990;39:1116-24.
137. Tesfamariam B, Brown ML, Cohen RA. Elevated glucose impairs endothelium-dependent relaxation by activating protein kinase C. *J Clin Invest* 1991;87: 1643-8.
138. Chakravarthy U, Hayes RG, Stitt AW et al. Constitutive nitric oxide synthase expression in retinal vascular endothelial cells is suppressed by high glucose and advanced glycation end products. *Diabetes* 1998;47:945-52.
139. Hink U, Li H, Mollnau H et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res* 2001;88:c14-e22.
140. Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB et al. Inhibition of protein kinase C β prevents impaired endothelium-dependent vasodilation caused by hyperglycemia in humans. *Circ Res* 2002;90:107-111.
141. Kunisaki M, Bursell SE, Clermont AC et al. Vitamin E prevents diabetes-induced abnormal retinal blood flow via the diacylglycerol-protein kinase C pathway. *Am J Physiol*. 1995;269:E239-46.
142. Booth G, Stalker TJ, Lefer AM, et al. Mechanisms of amelioration of glucose-induced endothelial dysfunction following inhibition of protein kinase C in vivo. *Diabetes* 2002;51:1556-64.
143. Monnier VM, Glomb M, Elgawish A, et al. The mechanism of collagen cross-linking in diabetes: a puzzle nearing resolution. *Diabetes*. 1996;45 (Suppl 3):S67-72.
144. Bucala R, Tracey KJ, Cerami A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest* 1991; 87: 432-8.

145. Hogan M, Cerami A, Bucala R. Advanced glycosylation end products block the antiproliferative effect of nitric oxide. Role in the vascular and renal complications of diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1992 Sep;90(3):1110-5.
146. Tesfamariam B, Cohen RA. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am J Physiol*. 1992;263:H321-6.
147. Katusic ZS, Vanhoutte PM. Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor. *Am J Physiol*. 1989 Jul;257:H33-7.
148. Ting HH, Timimi FK, Boles KS, et al. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1996;97:22-8.
149. Cosentino F, Hishikawa K, Katusic ZS. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation* 1997;96:25-8.
150. Tanner FC, Noll G, Boulanger CM, et al. Oxidized low density lipoproteins inhibit relaxation of porcine coronary arteries. Role of scavenger receptor and endothelium-derived nitric oxide. *Circulation*. 1991;83:2012-20.
151. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:1620-1624.
152. Channon KM, Guzik TJ. Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2002;53:515-24.
153. Suda O, Tsutsui M, Morishita T, et al. Asymmetric dimethylarginine produces vascular lesions in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice: involvement of renin-angiotensin system and oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1682-8
154. The CONSENSUS Trial Study Group. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N Eng J Med* 1987; 316: 1429-35.
155. Mancini GBJ, Henry GC, Macaya C, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease: THE TREND (Trial on Reversing Endothelial Dysfunction) Study. *Circulation* 1996;94:258-65.

156. Ito A, Egashira K, Narishige T et al. Renin angiotensin system is involved in the mechanism of increased serum asymmetric dimethylarginine in essential hypertension. *Jpn Circ J* 2001;65:775-778.
157. Bijlstra PJ, Smits P, Lutterman JA, et al. Effect of long-term angiotensin-converting enzyme inhibition on endothelial function in patients with the insulin-resistance syndrome. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995 Apr;25(4):658-64.
158. Schalkwijk CG, Smulders RA, Lambert J et al. ACE-inhibition modulates some endothelial functions in healthy subjects and in normotensive type I diabetic patients. *Eur J Clin Invest* 2000 Oct;30:853-60
159. Diet F, Pratt RE, Berry GJ, et al. Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease. *Circulation* 1996; 94: 2756-67.
160. Halkin A, Keren G. Potential indications for angiotensin-converting enzyme inhibitors in atherosclerotic vascular disease. *Am J Med* 2002;112:126-34.
161. Auch-Schwelk W, Duske E, Claus M, Graf K, Fleck E. Endothelium-mediated vasodilation during ACE-inhibition. *European Heart Journal* 1995;16[Supplement C]:59-65.
162. Curzen NP, Fox KM. Do ACE inhibitors modulate atherosclerosis? *European Heart Journal* 1997;18:1530-35.
163. Mancini GBJ. Role of angiotensin-converting enzyme inhibition in reversal of endothelial dysfunction in coronary artery disease. *Am J Med* 1998;105[1A]:40S-47S.
164. Johnston CI, Fabris B, Yamada H et al. Comparative studies of tissue inhibition by angiotensin converting enzyme inhibitors. *J Hypertens Suppl.* 1989;7:S11-6.
165. Hornig B, Arakawa N, Haussmann D, et al. Differential effects of quinaprilat and enalaprilat on endothelial function of conduit arteries in patients with chronic heart failure. *Circulation* 1998;98:2842-8.
166. Anderson TJ, Elstein E, Haber H, Charbonneau F. Comparative study of ACE-inhibition, Angiotensin II Antagonism and Calcium Channel Blockade on flow-mediated vasodilation in patients with coronary disease (BANFF Study). *J Am Coll Cardiol* 2000;35:60-6.
167. 343. Dzau VJ, Re R. Tissue angiotensin system in cardiovascular medicine. A paradigm shift? *Circulation* 1994;89:493-8.

168. Rajagopalan S, Harrison DG. Reversing endothelial dysfunction with ACE inhibitors. A new TREND? *Circulation* 1996;94:240-3.
169. Pelc LR, Gross GJ, Warltier DC. Mechanism of coronary vasodilation produced by bradykinin. *Circulation* 1991;83:2048-56.
170. Hornig B, Kohler C, Drexler H. Role of bradykinin in mediating vascular effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors in humans. *Circulation*. 1997;95:1115-8.
171. Kuga T, Mohri M, Egashira K, et al. Bradykinin-induced vasodilation of human coronary arteries in vivo: Role of nitric oxide and angiotensin-converting enzyme. *J Am Coll Cardiol* 1997;30:108-12.
172. Sudhir K, Chou TM, Hutchison SJ, et al. Coronary vasodilation induced by angiotensin-converting enzyme inhibition in vivo. Differential contribution of nitric oxide and bradykinin in conductance and resistance arteries. *Circulation* 1996;93:1734-39.
173. Moore PK, al-Swayeh OA, Chong NW et al. L-NG-nitro arginine (L-NOARG), a novel, L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation in vitro. *Br J Pharmacol*. 1990;99:408-12.
174. Lee MA, Bohm M, Paul M, et al. Tissue renin-angiotensin systems. Their role in cardiovascular disease. *Circulation*. 1993;87(5 Suppl):IV7-13.
175. Seyedi N, Xu X, Nasjletti A, et al. Coronary kinin generation mediates nitric oxide release after angiotensin receptor stimulation. *Hypertension*. 1995;26:164-70.
176. Lin L, Mistry M, Stier CT Jr, et al. Role of prostanoids in renin-dependent and renin-independent hypertension. *Hypertension*. 1991;17:517-25.
177. Griendling K, Ollerenshaw JD, Minieri CA, et al. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994;74:1141-1148.
178. Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 1996;97:1916-23.
179. Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, et al. Increased NADH oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation*. 1999;99:2027-2033.

180. Chen JW, Hsu NW, Wu TC, et al. Long term angiotensin-converting enzyme inhibition reduces plasma asymmetric dimethylarginine and improves endothelial nitric oxide bioavailability and coronary microvascular function in patients with syndrome X. *Am J Cardiol* 2002;90:974-82
181. Kuo PC, Abe KY, Schroeder RA. Interleukin-1-induced nitric oxide production modulates glutathione synthesis in cultured rat hepatocytes. *Am J Physiol*. 1996;271:C851-C862.
182. de Cavanagh EMV, Insera F, Toblli J et al. Enalapril attenuates oxidative stress in diabetic rats. *Hypertension*. 2001;38:1130-1136.
183. Bartosz M, Kedziora J, Bartosz G. Antioxidant and prooxidant properties of captopril and enalapril. *Free Radic Biol Med*. 1997;223:729-735.
184. Kedziora-Kornatowska K, Luciak M. Effect of angiotensin convertase inhibitors on lipid peroxidation and peroxy radical-trapping capacity in rats with experimental diabetes. *Biochem Mol Biol Int*. 1998;45:905-910.
185. de Cavanagh EMV, Ferder L, Carrasquedo F et al. Higher levels of antioxidant defenses in enalapril treated vs. enalapril-untreated hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*.1999;34:445-455.
186. Mailloux A, Deslandes B, Vaubourdoille M et al. Captopril and enalaprilat decrease antioxidant defences in human endothelial cells and are unable to protect against apoptosis. *Cell Biol Int*. 2003;27:825-30.
187. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA*. 2003;289:2560-72.
188. Executive summary of the third report of the NCEP adult treatment panel III: *JAMA* 2001;285:2486-97.
189. Barth J. Which tools are in your cardiac workshop? Carotid ultrasound, endothelial function and magnetic resonance imaging. *Am J Cardiol* 2001;87(suppl):8A-14A.
190. Teerlink T, Nijveldt RJ, Jong S, et al. Determination of arginine, asymmetric dimethylarginine and symmetric dimethylarginine in human plasma and other biological samples by high performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* 2002;303:131-137.

191. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 1979;95:351-8.
192. Haklar G, Erşahin C, Moini H, et al. Involvement of free radicals in the cardioprotective effect of defibrotide. *Arsneimittelforschung* 1996;46:381-4.
193. Wishnok JS, Glogowski JA, Tannenbaum SR. Quantitation of nitrate, nitrite and nitrosating agents. *Methods Enzymol* 1996;268:13-41.
194. Drawing inferences from data. In third edition: *Basic and Clinical Biostatistics*, editors: Dawson-Saunders B, Trapp RG. Connecticut, Appleton & Lange;1994,pp82-98.
195. Lees KR, MacFayden RJ, Reid JL. Tissue angiotensin converting enzyme inhibition: relevant to clinical practice? *Am J Hypertension* 1990;3:266S-72S.
196. Deedwania PC. Endothelium: a new target for cardiovascular therapeutics. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:67-70.
197. Yamasaki Y, Kawamori R, Matsushima H et al. Atherosclerosis in carotid artery of young IDDM patients monitored by ultrasound high-resolution B-mode imaging. *Diabetes*. 1994;43:634-9.
198. Zoccali C, Benedetto FA, Maas R, et al. Asymmetric dimethylarginine, C-reactive protein, and carotid intima-media thickness in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:490-6.