

T.C.  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

TIP II DİABETES MELLİTUSTA SERUM NİTRİK OKSİT  
DÜZEYLERİ VE LİPİD PARAMETRELERİYLE İLİŞKİSİ

Prof. Dr. ~~Meltem TELATAR~~

Prof. Dr. Ekin ZNOEK

Prof. Dr. Dahan DEĞER

Doç. Dr. İftihar KÖKSAL

Doç. Dr. Arın ÖREN

UZMANLIK TEZİ  
Dr. Emine KIRAN

TRABZON - 1998

T.C.  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

TİP II DİABETES MELLİTUSTA SERUM NİTRİK OKSİT  
DÜZEYLERİ VE LİPİD PARAMETRELERİYLE İLİŞKİSİ

UZMANLIK TEZİ  
Dr.Emine KIRAN

Tez Danışmanı : Doç.Dr.Asım ÖREM

TRABZON - 1998

## İÇİNDEKİLER

### KISALTMALAR

1.GİRİŞ .....	1
2.GENEL BİLGİLER .....	3
2.1.Diabet Mellitus .....	3
2.1.1.Diabet Mellitus ve Lipoproteinler .....	4
2.1.2.Diabet Mellitus ve Oksidan Stres .....	8
2.1.3.Diabet Mellitus ve Nitrik Oksit .....	11
2.1.4.Diabet Mellitus ve Ateroskleroz .....	17
3.MATERYAL VE METOD .....	23
3.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler, Cihazlar, Aletler ve Malzemeler .....	23
3.1.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	23
3.1.2.Kullanılan Cihazlar, Aletler ve Kimyasal Malzemeler .....	23
3.2.Numunelerin Toplanması .....	24
3.3.Kullanılan Metodlar .....	25
3.3.1.Hb Alc Tayini .....	25
3.3.2.Otoanalizörde tayin edilen parametreler ...	26
3.3.3.Nefelometrede tayin edilen parametreler ...	26
3.3.4.Lökosit Tayini .....	26
3.3.5. Eritrositlerde Malondialdehit (MDA) Tayini .....	26
3.3.6.Nitrit ve Nitrat Düzeylerinin Ölçülmesi .....	28
3.3.6.1.Nitrit Tayininin Prensibi .....	28
3.3.6.2.Nitrat Tayininin Prensibi .....	28
4.BULGULAR .....	37
5.TARTIŞMA .....	46
6.SONUÇ VE ÖNERİLER .....	52
7.ÖZET .....	54
8.İNGİLİZCE ÖZET (SUMMARY) .....	56
9.KAYNAKLAR .....	58

## KISALTMALAR

apo AI	: apoprotein AI
apo B	: apoprotein B
BMI	: Vücut kitle oranı (Body Mass Index)
BH <sub>4</sub>	: Tetrahidrobiopterin
DM	: Diabet Mellitus
FAD	: Flavın Adenin Dinükleotid
FMN	: Flavın Mononükleotid
HbA1c	: HemoglobınA1c
HDL	: Yüksek dansiteli lipoprotein
HDL-K	: HDL-kolesterol
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
LDL-K	: LDL-kolesterol
Lp(a)	: Lipoprotein (a)
MDA	: Malondialdehit
NADP <sup>+</sup>	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (okside şekli)
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (redükte şekli)
NOS	: Nitrik oksit sentetaz
NO	: Nitrik oksit
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	: Nitrit
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	: Nitrat
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	: Süperoksit radikali
·OH	: Hidroksil radikali
ox-LDL	: Okside LDL
·OONO <sup>-</sup>	: Peroksinitrit radikali
Tip I DM	: İnsüline bağımlı olan diabet mellitus
Tip II DM	: İnsüline bağımlı olmayan diabet mellitus
VLDL	: Çok düşük dansiteli lipoprotein

## 1-GİRİŞ

Diabet mellitus (DM), insülin eksikliğine, yokluğuna veya etkisizliğine bağlı, hiperglisemi ile karakterize oldukça sık görülen bir hastalıktır. DM'nin başlıca iki tipi vardır. DM'nin yaklaşık % 85-90'ı insüline bağımlı olmayan (tip II DM) ve % 5-10'u insüline bağımlı (tip I DM) olmaktadır (1). Hiçbiri DM için spesifik olmamakla beraber, hiperglisemi ile birlikte makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonlarla seyredebilir (2). Hiperlipoproteinemi veya dislipoproteinemi DM'de gözlenen önemli biyokimyasal değişikliklerden biridir.

Tip I ve tip II DM'de, kan şekeri kontrolü iyi olduğu zaman, plazma kolesterol ve trigliserid düzeyleri genellikle normal sınırlar içinde seyrederken, kan şekeri kontrolünün bozulmasıyla hipertrigliseridemi belirgin olmak üzere lipoprotein metabolizmasında anormallikler görülür. Hiperlipidemi, ateroskleroz gelişmesinde önemli bir risk faktörü olup, DM'de görülen metabolik değişikliklerin bir sonucudur (3).

Son yıllarda yapılan çalışmalar hiperlipidemiye, artan oksidan stresin etkisiyle, aşırı serbest radikal oluşumunun eşlik ettiğini göstermektedir. Bu olayların sonucunda oluşan lipid peroksidasyonu ve bu peroksidasyon sonucu oluşan toksik bileşikler (malondialdehit, 4-hidroksinonenal gibi) aterosklerotik plakların gelişiminde önemli rol oynar (4). Kontrolsüz DM'de gözlenen proteinlerin artan glikozilasyonu ve oksidasyonu, artmış ateroskleroz gelişim riskinde,

özellikle apoproteinler üzerinden çok daha belirgin rol oynar (5).

Hiperlipideminin, endotelial hücrelerde nitrik oksit (NO) oluşumunu bozarak aterosklerotik olayların gelişiminde etkili olabileceği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (6,7).

Bu çalışmamızda, kontrolsüz kan şekerli tip II DM'li hastalarda, serum nitrik oksit (NO) son ürünlerinden nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) ve nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ), lipid ve lipoprotein düzeyleri ile bir lipid peroksidasyon ürünü olan eritrosit malondialdehit (MDA) seviyelerini tespit ederek, bu parametreler arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlandı.

## 2-GENEL BİLGİLER

### 2.1.Diabet Mellitus

Diabet mellitus (DM) pankreasın insülin salgısının tamamen veya kısmi yetersizliği veya insüline karşı hücre direncinin olduğu klinik bir tablodur. Primer olarak hiperglisemi ile seyrederek. Karbonhidrat metabolizmasında gözlenen bu değişikliğe yağ ve protein metabolizmasındaki bozukluklar da eşlik eder (8, 9).

İnsülin bağımlı diabet mellitus (tip I DM) ve insülin bağımlı olmayan diabet mellitus (tip II DM) olmak üzere iki ana gruba ayrılır. DM'lilerin % 85-90'ı tip II'den oluşmaktadır. Tip I DM genellikle çocukluk döneminde gözlenirken, tip II DM erişkin yaş döneminde şişman bireylerde daha bariz gözlenir. Tip II DM'de genetik yatkınlık çok önemli bir faktördür. Tip I DM'nin gelişiminde genetik yatkınlığın önemli rolü olmakla birlikte, özellikle bazı viral hastalık salgınlarından sonra DM insidansında görülen artma otoimmün  $\beta$  hücre harabiyetinin başlamasında çevresel bazı etkenlerin varlığını düşündürmektedir (10,11).

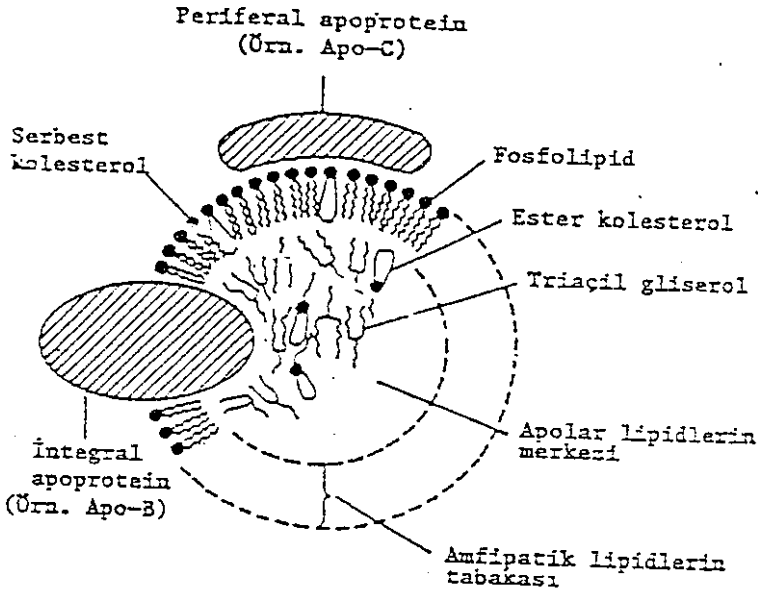
DM'de başlıca mikrovasküler (retinopati ,nöropati, nefropati) ve makrovasküler (aterosklerotik lezyonlar) komplikasyonlar hastaların klinik bulgularını ve ölüm nedenlerini oluşturur.

### 2.1.1.Diabet mellitus ve lipoproteinler

Hiperlipidemi, plazmada kolesterol ve trigliserid seviyelerinin normalin üzerinde seyrettiği durumdur. Plazmadaki kolesterol ve trigliseridler lipoproteinler tarafından taşınırlar. Lipoproteinlerin çekirdek kısmı hidrofobik tabiatlı kolesterol esterleri ve trigliseridlerce zenginken, dışlarındaki monoleyer tabaka fosfolipidler ve serbest kolesterolden oluşur. Apoproteinler ise lipoproteinlerin yapısında integral veya periferal proteinler şeklinde yer alırlar, bu dış tabakaya ya zayıf bağlarla tutulurlar ya da bir kısımlarıyla bu tabakaya gömülü halde bulunurlar (Şekil 1). Plazma lipoproteinleri şilomikronlar, çok düşük dansiteli lipoproteinler (VLDL), düşük dansiteli lipoprotein (LDL) ve yüksek dansiteli lipoproteinler (HDL) olmak üzere dört temel sınıfa ayrılır. Son yıllarda kimyasal ve fiziksel özellikleri ortaya konulan lipoprotein (a) [ Lp (a) ] bu sınıflamaya ilave edilmiştir. Plazmada başlıca trigliserid taşıyıcıları şilomikron ve VLDL iken kolesterol taşınımı LDL ve HDL vasıtasıyla gerçekleşir.

Lipoproteinlerin yapısında yer alan apoproteinler, fiziksel, kimyasal ve immünolojik özellikleri açısından birbirinden farklıdır. Lipidlerin taşınım ve metabolizmasında önemli rolleri vardır. Apolipoprotein AI (Apo AI), başlıca HDL'nin yapısında, apolipoprotein B<sub>100</sub> (apo B) ise LDL ve Lp (a)'nın yapısında yer alır ve laboratuvar analizleri hiperlipideminin değerlendirilmesinde önemli bilgi sağlar.





Şekil 1: Plazma lipoproteinlerinin genel yapısı

Tablo 1: Plazma lipoproteinlerinin özellikleri

Lipoprotein	Dansite aralığı (g/mL)	Flotasyon birimi (Sf)	Başlıca lipidleri	Elektroforetik özellikleri	Başlıca apoproteinleri
ŞM	< 0,94	>400	TG	Orjinde	B-48, A-I, A-IV
VLDL	0,94-1,006	60-400	TG	pre-β	B-100, E, CI, II, III
IDL	1,006-1,019	20-60	TG ve EK	geniş β	B-100-E
LDL	1,019-1,063	0-20	EK	β	B-100
HDL	1,063-1,21	-	FL ve K	α	A-I, A-II
Lp (a)	1,051-1,082	-	EK	pre-β1	(a), B-100

\* 1,063 dansiteli flotasyon

TG: Trigliserid

EK: Ester kolesterol

K: Kolesterol

FL: Fosfolipid

ŞM: Şilomikron

IDL: Orta dansiteli lipoproteinler

Lp (a): Lipoprotein (a)

DM'li hastalarda, yağ dokusunda insülin eksikliğine bağlı olarak trigliserid sentezi yerine yıkım yolu daha aktiftir. Böylece bol miktarda yağ asidi kana ve dolayısıyla karaciğere gelir. Karaciğerde trigliserid yapımı aktive olur ve bu da VLDL şeklinde sentezlenerek sekrete edilir. Sonuç olarak DM'li hastalarda hipertrigliseridemi bariz bir özellik olarak gözlenir. Hipertrigliserideminin şiddeti diabetin kontrolü ile yakın ilişkilidir.

Plazma total kolesterol ve LDL düzeyi kontrollü DM'de belirgin olarak artmamakla birlikte, kontrolsüz DM'de hafif veya orta derecede yükselmeler gösterir. Bu olayın temelinde LDL üzerindeki apo B proteinlerinin glikolizasyonu sonucu LDL'nin, LDL reseptörleri tarafından tanınmaması ve sonuçta LDL'nin plazmada yarılanma ömrünün uzaması vardır. Tip I DM'de LDL yapım hızında artma olduğu fakat insülin tedavisiyle bunun normale döndüğü yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (12). Bu, VLDL öncülerinin artmış sentezinden veya VLDL kalıntılarının bozulmuş temizlenmesinden kaynaklanabilir (13). Dolayısıyla total kolesterol ve apo B düzeyleri yüksek gözlenebilmektedir (14).

Diabetik hastalarda etkilenen lipid parametrelerinden biri de HDL düzeyidir. HDL düzeyinde azalma gözlenir. Bu tip I DM'de daha belirgindir ve insülin tedavisi ile normal düzeye ve hatta normalden biraz yükseğe ulaşabilir (15). Düşük HDL düzeylerinin şilomikron ve VLDL'nin lipolizisi sırasında apoproteinlerin ve fosfolipidlerin HDL'ye aktarılmasından sorumlu olan lipoprotein lipaz aktivitesindeki azalmaya bağlı olabileceği ileri sürülmektedir (16). HDL'nin ana proteini olan apo AI düzeyleri de DM'de düşük gözlenmektedir (16).

DM'li hastalarda, koroner arter hastalığı, periferik damar hastalığı ve serebrovasküler hastalık riskinde DM

olmayanlara göre diğer risk faktörleri de göz önüne alınarak bakıldığında iki ile üç kat artma gözlenir (17) (Tablo 2).

Tablo 2: Diabetik erkeklerde artmış risk\*

Risk durumu	Ölüm hızı diabet yok	Ölüm hızı diabet var	Fark
<b>düşük risk</b>	6	31	25
- kolesterol <200			
- sigara yok			
- KB < 120 sistolik			
<b>orta risk</b>	10	52	42
- kolesterol > 200			
- sigara yok			
- KB < 120 sistolik			
<b>yüksek risk</b>	47	125	78
- kolesterol > 200			
- sigara var			
- KB > 120 sistolik			

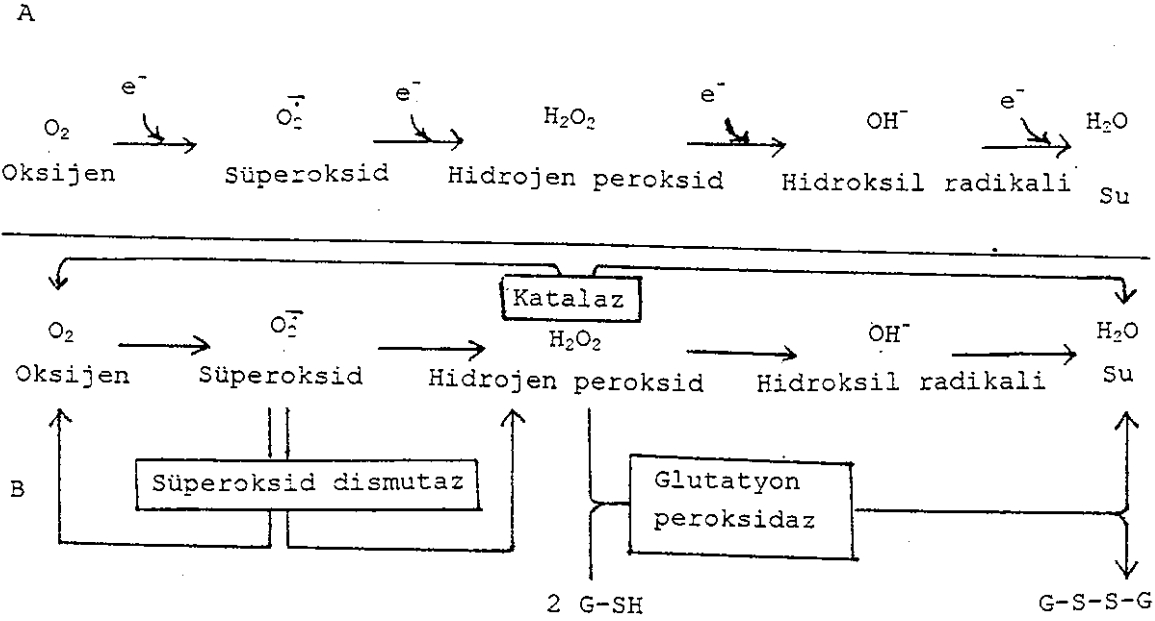
\* 10.000 kişi başına ölüm hızı

KB: Kan Basıncı

DM'de kardiyovasküler hastalığın artmış insidansı tam olarak açıklanamamaktadır. Fakat iyi tanımlanmış kardiyovasküler risk faktörleri ile bu artmaktadır. Amerikan Diyabet Birliği, DM'li hastalarda yüksek trigliserid ve LDL düzeylerinin tedavi edilmesini önermektedir (18). Trigliserid düzeyleri 200 mg/dL'nin altında tutulmalı, 200-400 mg/dL orta derecede yükseklik, 400 mg/dL üzeri ise aşırı yükseklik olarak alınmalıdır. LDL düzeyinin ise 130 mg/dL altında tutulması önerilmektedir.

### 2.1.2.Diabet mellitus ve oksidan stres

Serbest radikal, üzerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron bulunduran atom ya da molekül olarak tanımlanır. Nitrik oksit (NO), süperoksit ( $O_2^-$ ) ve hidroksil ( $\cdot OH$ ) radikalleri, vücutta üretilen radikallerin başında gelir (19). Üretimleri de çeşitli faktörlere bağlı olarak artar. Serbest oksijen radikalleri protein, karbonhidrat, ve lipidlerle etkileşmek suretiyle onların yapısında bozukluk ve yeni radikallerin oluşmasına yol açar. Lipidlerden, özellikle poliansatüre lipidler en fazla etkilenen bileşiklerdir (20). Serbest oksijen radikallerinin bu zararlı etkileri antioksidan mekanizmalarla ortadan kaldırılmaya çalışılır. Antioksidan savunma sistemi başlıca süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz gibi enzimler ve glutatyon, Vitamin E, Vitamin C gibi bileşiklerden oluşur (21). Normalde, vücuttaki oksidan-antioksidan sistem denge halindedir (Şekil 2). Antioksidan savunmanın yetersiz olduğu durumlarda serbest radikallerin zararlı etkileri görülür (22).



Şekil 2: A. Moleküler oksijenden reaktiflerin oluşumu  
 B. Antioksidan enzimlerin fonksiyonu

Oksidatif stres, DM seyri sırasında kan şekeri regülasyonuna bağlı olarak çeşitli değişiklikler göstermekle birlikte DM'nin seyri sırasında gözlenen komplikasyonlarının patogeneğinde önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir (4,23).

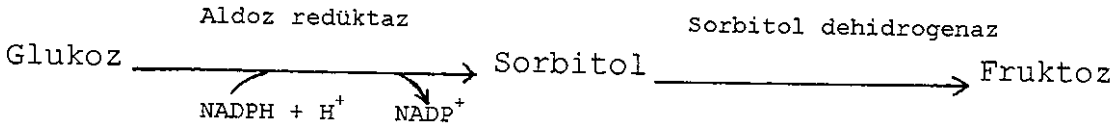
Oksidan - antioksidan sistemi bozan muhtemel mekanizmaları ikiye ayırabiliriz:

1. Antioksidan enzim aktivitelerinde azalma;

a. DM'li hastalarda genetik olarak antioksidan enzim aktiviteleri azalmış olabilir.

b. Protein yapısında olan antioksidan enzimlerin aktiviteleri, artmış protein glikolizasyonu ve radikal hasarı nedeniyle azalmış olabilir.

c. Polioll yolu vasıtasıyla aldoz redüktaz enziminin indüklenmesi, aşırı miktarda sorbitol oluşumuna yol açar. Artmış sorbitol sentezi ise NADPH'nın azalmasına sebep olur. Dolayısıyla, glutatyon redüktaz tarafından katalizlenen okside glutatyonun redükte glutatyonu indirgenmesi NADPH'ların azalmasıyla kısıtlanır ve antioksidan enzim aktivitesi substrat eksikliğine (NADPH + H<sup>+</sup>) bağlı olarak azalır (24).



Şekil 3: Polioll yolu

2. Serbest radikal üretiminde artma

Yapılan çalışmalarla DM'li hastalarda serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyon ürünlerinin arttığı gösterilmiştir (22,25,26). Hipoksi ve iskemik reperfüzyon hasarı sonucu oluşan lokalize doku hasarı, diabet mellitusta oksidatif stresi artıran mekanizmalardır (22).

### 2.1.3.Diabet mellitus ve nitrik oksit

Nitrik oksit (NO) bir çok farklı hücre türü tarafından sentezlenip farklı fizyolojik işlemleri kontrol etme ve etkileme gücüne sahiptir. NO, L-Arginin'den nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimi aracılığıyla sentezlenir (26).



Şekil 4: Nitrik oksit sentezi

NOS'nin muhtemel görevleri ve sentezlendiği hücre tipleri Tablo 3'te verilmiştir (24).

NO, bir oksijen ve bir azot atomunun oluşturduğu doğadaki en küçük 10 molekülden biridir. Ortaklanmamış bir elektron ihtiva ettiğinden dolayı radikal özelliği gösterir. Fakat bir çok serbest radikale göre daha az reaktiftir. Biyolojik sistemlerde yarılanma ömrü 30 saniyeden daha kısadır. Yüksüz olduğundan dolayı hücre içinde ve hücre membranları arasında hızlı, serbest olarak difüze olabilir. Bundan dolayı bir çok biyolojik sistemde haberci olarak etki gösterebilir. NO, aynı zamanda oldukça toksik olup, konakçı defansı sırasında sitotoksik bir mediatör olarak da etkisini gösterir. NO, gerek hücre ölümüne yol açan sitotoksik etkisi gerekse damar tonusunun kontrolü ve hücre içi haberleşme gibi fizyolojik işlemlerdeki görevi nedeniyle yoğun araştırmalara maruz kalmıştır.

Tablo 3: NOS'nin görevleri ve sentezlendiği hücre tipleri

özellikleri	Nitrik oksit sentaz izoformları		
	tip I NOS	tip II NOS	tip III NOS
Monomerin M.A.	160 kDa	130 kDa	133 kDa
Hücre içi lokalizasyon	Büyük miktarda sitozolik (iskelet kası hariç, iskelet kasında membrana bağlı)	sitozolik	membrana bağlı
Ekspresyonun düzenlenmesi	"constitutive" sinir harabiyeti sonrası ve seks hormonları aracılığıyla	Fizyolojik şartlarda bulunmaz. Sitokinler ve endotoksinlerle indüklenir	"constitutive" seks hormonları ve sürtünme kuvveti etkisi ile
Substratları	Arginin, O <sub>2</sub> , NADPH	Arginin, O <sub>2</sub> , NADPH	Arginin, O <sub>2</sub> , NADPH
Kofaktörleri	FAD, FMN, BH <sub>4</sub>	FAD, FMN, BH <sub>4</sub>	FAD, FMN, BH <sub>4</sub>
Prostetik grupları	Hem, kalmodulin	Hem, kalmodulin	Hem, kalmodulin
Ca <sup>2+</sup> bağımlılığı (kalmodulin bağımlı)	Var Ca <sup>2+</sup> ile aktive olur	Yok Ca <sup>2+</sup> 'den bağımsızdır	Var Ca <sup>2+</sup> ile aktive olur
Oluşan NO düzeyi	pikomol	nanomol	pikomol
Başlıca görevi	nöronal haberci	immünozitotoksik	vasküler düz kasın relaksasyonu

M.A. : Molekül ağırlığı

FAD : Flavin Adenin Dinükleotid

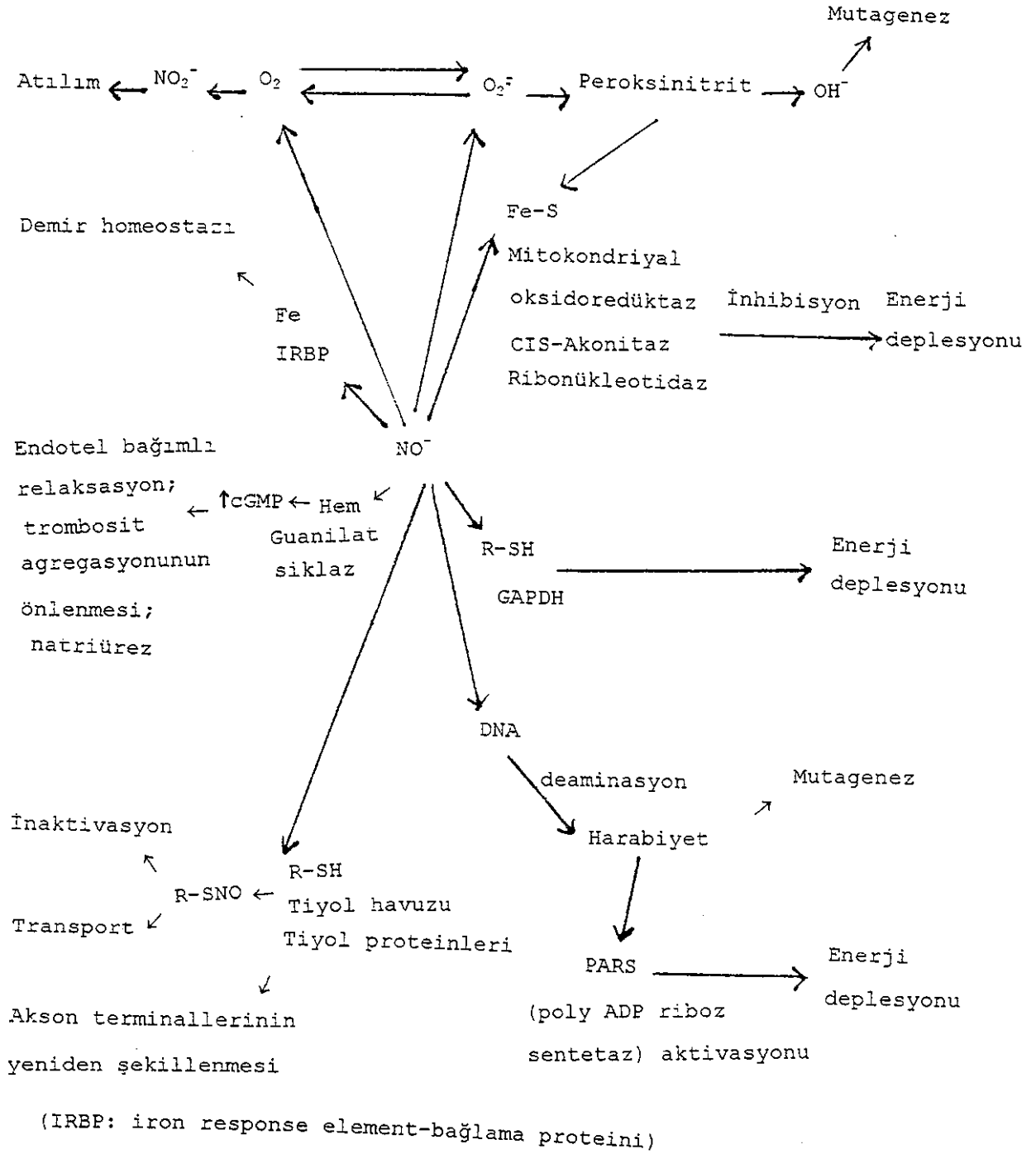
FMN : Flavin Mononükleotid

BH<sub>4</sub> : Tetrahydrobiopterin



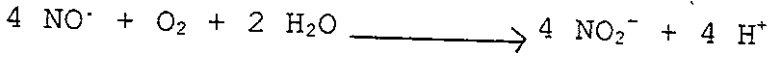
Fizyolojik haberci

Sitotoksik ajan

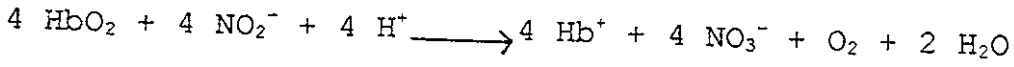
Düşük düzey NO ve  $O_2^-$ ↑ düzey NO ve  $O_2^-$ , tiyol havuzu ↓

Şekil 5: NO'nun fizyolojik haberci ve sitotoksik ajan olarak etkileri

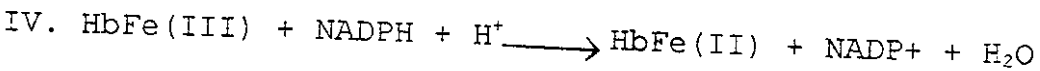
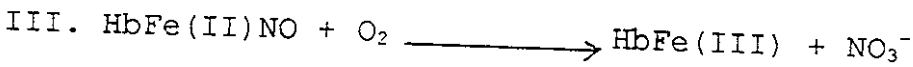
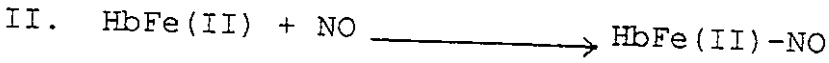
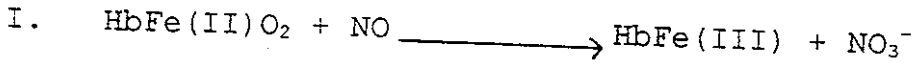
Oluşan NO, nitrit ve nitrata dönüşür veya reaktif oksijen radikalleriyle reaksiyona girerek reaktif nitrojen oksit türlerini meydana getirir. NO'nun yarı ömrü in-vivo olarak çok kısadır. NO, sulu çözeltilerde oksijen ile reaksiyona girerek hızla nitrit iyonuna dönüşür (27).



$\text{NO}_2^-$ 'nin hemen tamamı oksihemoglobinle reaksiyona girerek nitrata dönüşür.



Eritrositler yüksek kapasiteli bir NO toplayıcısıdır. NO hızla eritrosit içine diffüze olur. Oksihemoglobin hızla NO ile reaksiyona girerek methemoglobin oluşturur (reaksiyon I-III). Eritrosit, methemoglobini, methemoglobin redüktaz NADPH kullanarak methemoglobini oksihemoglobine indirger (reaksiyon IV) (28, 29). Bu kimyasal kademeler sonucu NO, nitrat olarak açığa çıkar.

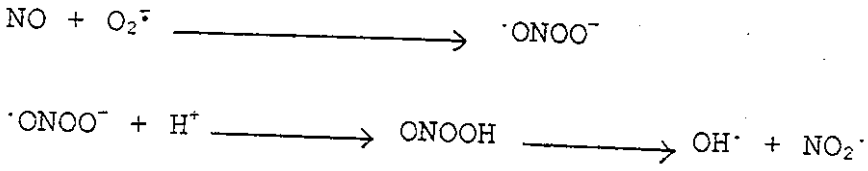


Nitrat plazmaya geçip böbrekten glomerüler filtrasyon yoluyla atılır. Nitratın plazma yarı ömrü yaklaşık 1,5 saattir.

NO ile radikaller arasında bir dengenin söz konusu olduğu söylenebilir. NO'yu,  $\text{O}_2^-$  toplayıcısı olarak düşünmek

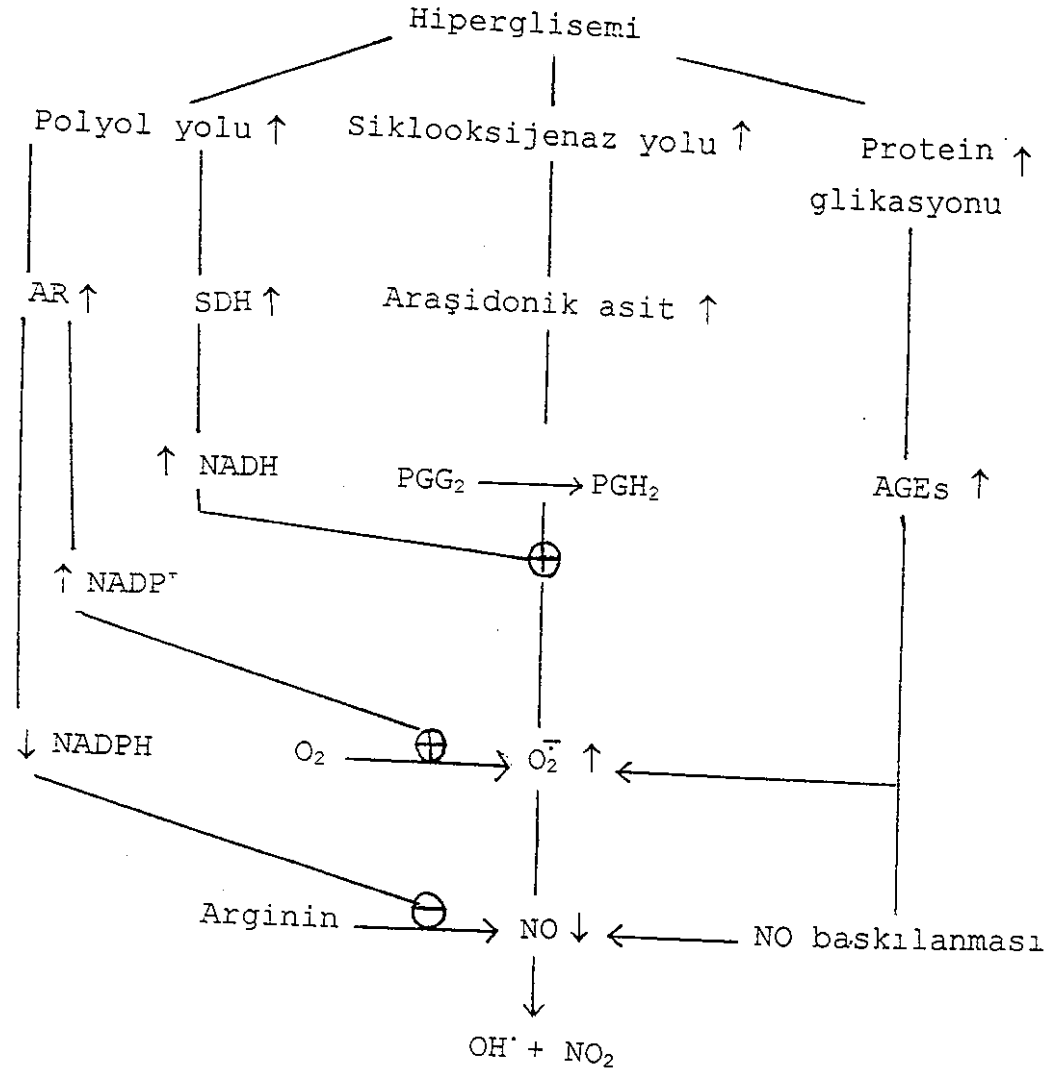
mümkündür. NO miktarı  $O_2^-$  miktarından çok fazla olduğu zaman NO'nun fizyolojik etkisi görülmektedir. NO,  $O_2^-$  toplamakta böylece  $O_2^-$  'nin sitotoksik etkisine bariyer oluşturmaktadır.

$O_2^-$  miktarı NO'ya göre çok fazla olduğu zaman ise NO'nun patolojik etkisi görülür. NO,  $O_2^-$  ile etkileştiğinde yüksek oranda peroksinitrit meydana gelir. Peroksinitritten de hidroksil radikali ( $OH^\cdot$ ) oluşur (26,30).



DM'nin en yaygın komplikasyonlarından biri vasküler hastalıklardır. NO tarafından endotel bağımlı cevaptaki azalma DM'li insan ve hayvan modellerinde gösterilmiştir (31-33). Aterosklerozda görüldüğü gibi, DM hastalığında da bozuk endotel bağımlı relaksasyonun, azalmış NO sentezinden ziyade süperoksit anyonları gibi reaktif oksijen bileşikleri tarafından NO'nun inaktivasyonu aracılığıyla oluştuğu ileri sürülmektedir (34).

Hiperglisemi ile yakın ilişkili bazı metabolik yolların aktivasyonu,  $O_2^-$  anyonları ile NO arasındaki dengenin bozulmasına yol açabilir.



AR: Aldoz redüktaz; SDH: Sorbitol dehidrogenaz;

PGH<sub>2</sub>: Prostaglandin H<sub>2</sub>; PGG<sub>2</sub>: Prostaglandin G<sub>2</sub>;

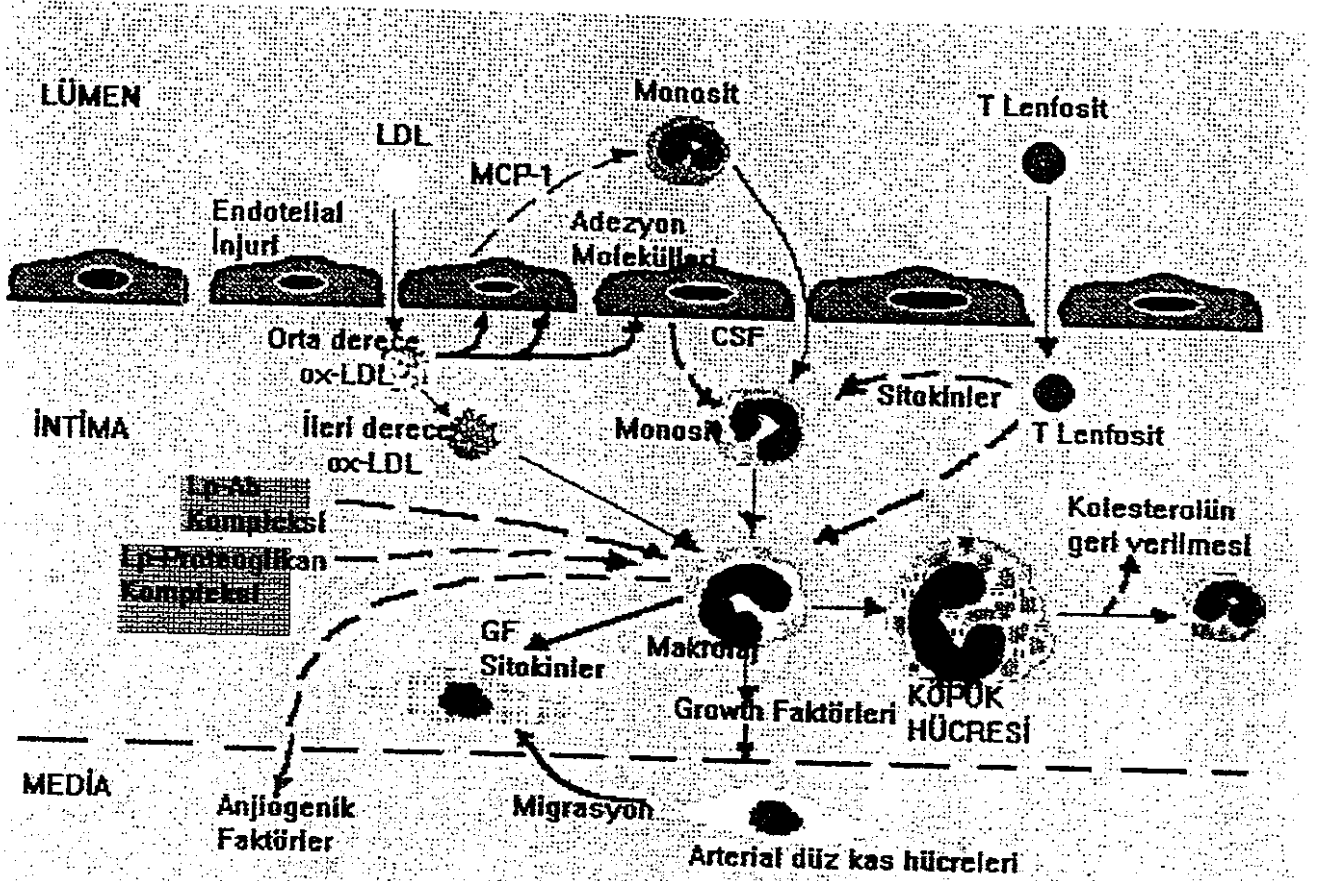
AGEs: Artmış glikozilasyon son ürünleri

Şekil 6: Hiperglisemi, O<sub>2</sub><sup>-</sup> ve NO arasındaki ilişki (24)

#### 2.1.4.Diabet mellitus ve ateroskleroz

Batı toplumunda ölüm nedenleri sıralamasında aterosklerotik kalp hastalığı birinci sırada yer almaktadır (ölemlerin % 50'si). Ateroskleroz gelişiminin primer ve sekonder lipid metabolizma bozukluklarıyla ilgili olduğu epidemiyolojik çalışmalarla ortaya konulmuştur (35). DM'de gözlenen sekonder hiperlipidemi ve endotelial disfonksiyon, aterosklerotik risk faktörlerinin en önemlilerini oluşturur (36,37).

Ateroskleroz, büyük damarların intimasında gözlenen dejeneratif karakterli patolojik bir süreçtir. Ateroskleroz gelişiminde başlıca makrofajlar, düz kas hücreleri, T lenfositler, fibroblastlar, endotel hücreleri, LDL başta olmak üzere lipidler ve özellikle kollajenler başta olmak üzere ekstraselüler matriks bileşenleri önemli rol oynar (38). Ateroskleroz gelişiminde etkili olan bu faktörler ve aralarındaki etkileşimler şekil 7'de basitçe özetlenmiştir (39).



Şekil 7: Ateroskleroz gelişiminde etkili faktörler ve aralarındaki etkileşimler

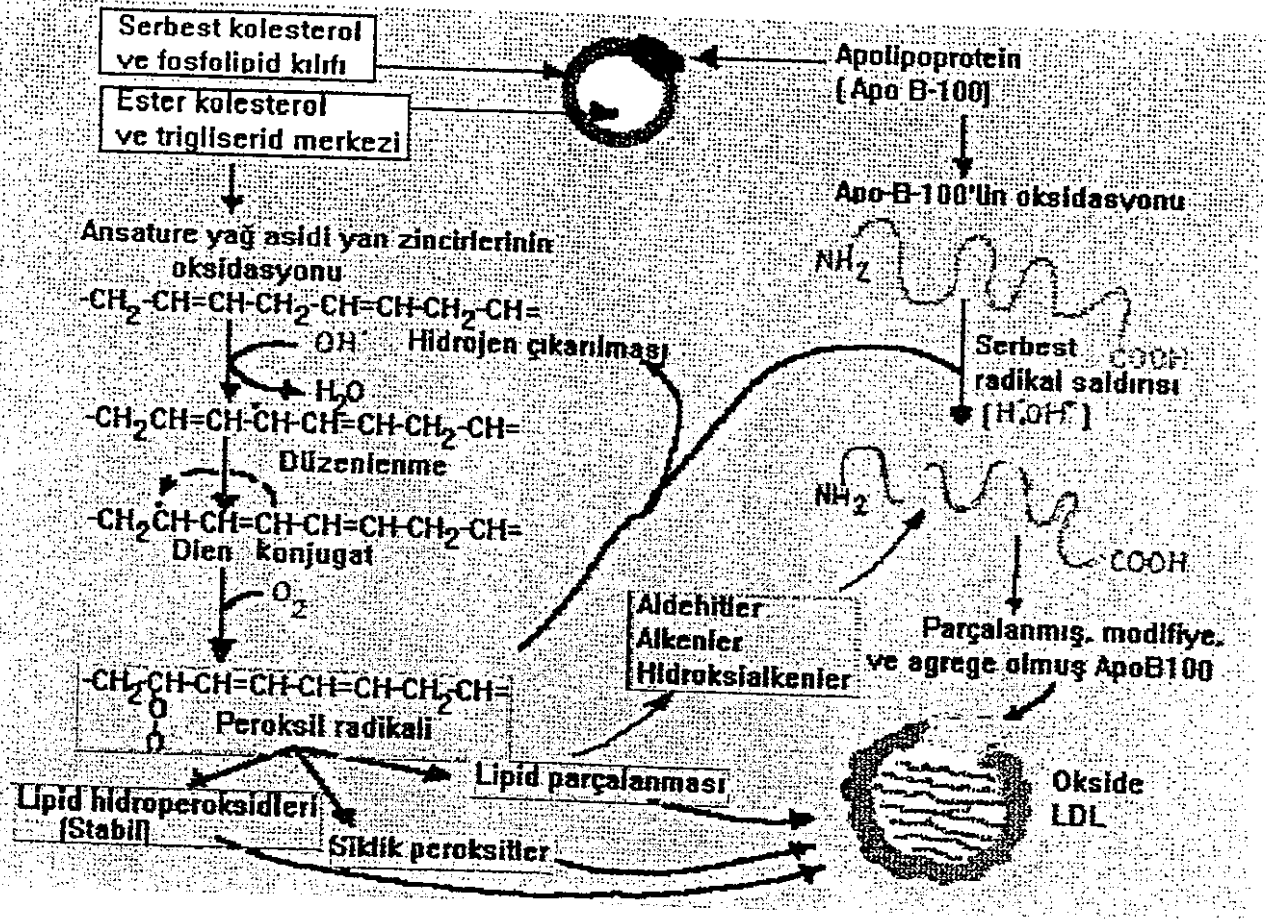
Dolaşımdaki lipoproteinlerin artması veya aralarındaki dengenin bozulması sonucunda endotelial harabiyet başlar ve damar intimasında lipoproteinler birikir. Subendotelial yüzeyde LDL'nin hafif derecede oksidasyona uğraması endotelial hücrelerden kemotaktik faktörlerin ekspresyonunu artırır. Monositler ve T lenfositler subendotelial yüzeye geçerler. Hafif derecede oksidasyona uğramış LDL'nin uyarımı ile endotelial hücrelerden salınan koloni stimüle edici faktörler (CSFs) monositlerin makrofajlara dönüşmesini

uyarırlar. T lenfositlerden salınan sitokinler, makrofajları aktive ederler. Salınan çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler intimada ve mediada bulunan arteriyel düz kas hücrelerini etkileyerek matriks proteinlerinin proliferasyon, migrasyon ve sentezini stimüle eder. Makrofajlar ve arteriyel damar düz kas hücrelerinden salınan anjiyojenik faktörler vasa vasorumların neovaskülarizasyonunu artırır. Oluşan neovaskülarizasyon lipoproteinlerin birikmesine ve mononükleer hücre infiltrasyonunu daha da artırır.

İleri derecede oksidasyona uğrayan LDL, lipoprotein-antikor kompleksi ve/veya lipoprotein-proteoglikan kompleksleri, makrofajların farklılaşması sonucu oluşan köpük hücrelerin çöpçü reseptörleri aracılığıyla fagosite edilir. Bu reseptörler, LDL reseptöründen farklı olarak "down-regulation"a uğramazlar. Sonuçta, yağların aşırı birikmesi ile köpük hücreleri ve bunların da aşırı birikmesi sonucu sırayla yağlı çizgilenme ve aterom plağı oluşur (40).

DM'li hastalarda, DM olmayanlara göre koroner arter hastalığı riskinin 2-3 kat daha fazla olduğu bilinmektedir (41,42). DM'li hastalar yüksek trigliserid ve orta dansiteli lipoproteinler ile düşük HDL düzeylerine sahiptir (37). DM'lilerdeki aterosklerotik plaklar diabetik olmayanlarınkine benzerdir. Fakat DM'de glukoz tarafından başta apoproteinler olmak üzere proteinlerin modifikasyonu aterosklerozun gelişmesinde önemli rol oynarlar.

Ateroskleroz gelişmesinde lipoproteinlerin oksidasyonu özellikle LDL'nin oksidasyonu önemli bir başlangıç oluşturur. Şekil 8'de lipoproteinlerin oksidasyon kademeleri görülmektedir (43).



Şekil 8: Lipoproteinlerin oksidasyon kademeleri

Oluşan okside LDL (ox-LDL) aterosklerotik etkisini aşağıdaki şekillerde gösterebilir (44):

- Çeşitli damar hücreleri için (endotelial hücreler, düz kas hücreleri ve fibroblastlar) sitotoksik olmasıyla
- Köpük hücre oluşumunda glikozillenmiş LDL'den daha etkili olmasıyla
- Prokoagulan etkisiyle,



d) İmmünolojik etkisi sonucu gelişen otoantikolarlar vasıtasıyla.

DM'de oksidatif reaksiyonlar glikozillenmiş ürünleri etkilediği zaman glikooksidasyon meydana gelmekte ve neticede proteinlerde dönüşümsüz yapısal değişiklikler oluşmaktadır. Glikooksidasyonun en büyük etkisi kollajen gibi uzun ömürlü proteinler üzerinde gözlenir (43).

Kollajendeki çapraz bağların artması vasküler rijiditeye ve tonusun değişmesine neden olur. Bu değişiklikler endotelial hasara yol açar. Kollajenin glikozillenmesi veya glikooksidasyona uğraması plazmadaki lipoproteinler, immün kompleksler ve diğer plazma proteinleri gibi maddelerin damar duvarından geçerek kollajene yapışmasına neden olur. Şayet plazmadaki bu maddeler glikozillenmişse bu etki daha da artmış gözlenir (45).

Ayrıca makrofajlarda glikooksidasyon ürünlerini bağlayan yüzey reseptörleri olduğu gösterilmiştir (46). Subendotelial glikooksidasyon ürünleri, monosit kemotaksisini sağlamakta ve monositlerin hem damar duvarı içine göç etmelerini hem de makrofajlara dönmelerini hızlandırmaktadır. Makrofajlar yalnız glikooksidate matriks proteinlerini değil aynı zamanda subendotelial lipoproteinleri de içine alarak köpük hücre oluşumunun artmasına, sitokin salınımına ve sonuçta damar duvarının oksidatif harabiyetine sebep olabilirler (47).

Glikozillenmiş kollajen matriks varlığında normal kollajen matrikse göre vasküler hücre cevabının yavaşladığı gösterilmiştir (48).

Sonuç olarak uzamış hiperglisemi proteinlerin nonenzimatik glikozilasyonu ve artmış glikozilasyon son ürünlerinin oluşumuna yol açar. Bu ürünler, NO aktivitesini

nötralize ederek endotel bağımlı vazodilatasyonu inhibe ederler (49). Yapılan çalışmalarla artmış glikozilasyon son ürünlerinin oluşumunu önleyen aminoguanidin kullanımının DM'de vasküler fonksiyon bozukluğunu engellediği gösterilmiştir (50).

Normal damarda endotelial hücrelerden salınan NO, Ox-LDL oluşumunu azaltır. Oluşan Ox-LDL ise NO'nun damar düz kas hücreleri üzerine olan etkilerini baskılar. Bu özelliğiyle antiaterojenik özelliğe sahiptir (25).

NO, endotelinin adeziv özelliklerini azaltarak monositlerin adezyonunu önler, endotelial bariyer fonksiyonunu devam ettirir ve vasküler düz kas hücre proliferasyonunu inhibe eder (51). NO bu özelliği ile antiaterojenik bir fonksiyon gösterir.

Ayrıca NO, trombositlerin adezyon ve agregasyonunu da önleyerek trombüs oluşumunu engeller. NO tarafından gerçekleştirilen endotel bağımlı relaksasyon aterosklerozda bozulmuştur ve bu bir çok hiperkolesterolemik hayvan ve insan modellerinde gösterilmiştir (52,53).

### 3-MATERYAL ve METOD

#### 3.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler, Cihazlar, Aletler, Malzemeler

##### 3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çinkosülfat heptahidrat (MERCK), o-fosforik asit (MERCK), flavin adenin dinükleotid disodyum (FAD) (MERCK), hidroklorik asit (MERCK), potasyum nitrat (MERCK) potasyum dihidrojen fosfat (MERCK), potasyum monohidrojen fosfat (MERCK), sodyum azid (MERCK), sodyum nitrit (MERCK), sodyum klorür (MERCK), trikloroasetik asit (MERCK), Tris (hidroksimetil)-aminometan (MERCK), nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) (SIGMA), laktat dehidrogenaz (LDH) (SIGMA), N-(1-Naftil)etilendiaminhidroklorür (SIGMA), sodyum m-arsenit (SIGMA), sodyum piruvat (SIGMA), sülfanilamid (p-aminobenzen sülfonamid) (SIGMA), 2-tiyobarbitürik asit (SIGMA), nitrat redüktaz (BOEHRINGER MANHEIM), HDL kolesterol çöktürme reaktifi (BIOTROL); kolesterol, trigliserid ve glukoz tayin reaktifleri (BOEHRINGER MANHEIM), HbA1c tayin kartuşu (BAYER), apo AI ve apo B tayin reaktifleri (BECKMAN).

##### 3.1.2.Kullanılan Cihazlar, Aletler, Malzemeler

Hassas terazi (Cyha MP-300)

Santrifüj (IEC Model Centra 4)

Soğutmali santrifüj (Herause Sepatech Suprafuge 22)

Spektrofotometre (LKB, Ultraspec K-4053)

Vorteks karıştırıcı (Autovortex mixer SA2)

Magnetik karıştırıcı (IKA-Labortechnik)

pH-metre (Hanna Instruments 8416)

Su banyosu (Elektromac)

Otoanalizör (Hitachi 747)

Otomatik kan sayım cihazı (Coulter, STKS)

Nefelometre (Beckman Protein Array 360)

Mikro kuyucuk okuyucusu (Microwell reader) (Diagnostics

Pasteur SR50)

Mikro kuyucuk yıkayıcısı (Microwell washer) (Diagnostics

Pasteur SR50)

ELISA mikro kuyucukları (96 kuyucuklu, 11 tabanlı)

(Organon)

DCA 2000 HbA1c analizörü (Ames, Bayer)

Çeşitli hacimlerde mikropipetler (Biohit Proline,

Socorex)

Kuartz mikroküvetler (SIGMA)

Derin dondurucu (-70°C) (Farma Scientific BioFreezer)

(-20°C) (Bosch)

### 3.2. Numunelerin Toplanması

Bu çalışma K.T.Ü.Tıp Fakültesi Farabi Hastanesine 1996-1997 döneminde başvuran, tip II DM tanısıyla takip edilen kişiler arasında HbA1c sonucuna göre seçilen, çeşitli yaş gruplarına ve cinslerine sahip 42 kişi üzerinde yapıldı. Aynı dönemde sağlık kontrolü için başvuran çeşitli yaş gruplarına ve değişik cinslere sahip 40 kişi sağlıklı kontrol grubu olarak alındı. Hastanede sağlık kontrolünden geçen kontrol grubunun anamnez, fizik muayene ve rutin klinik laboratuvar incelemeleri sonucu hiçbir patolojik bulgu tespit edilemedi.

Kan örnekleri bir gecelik (12 saat) açlık dönemini takiben brakial venden; HbA1c, malondialdehit (MDA) ve total

kan hücre sayı tayini için antikoagülanlı (1 mg/ml EDTA) vakumlu tüplere; kolesterol, trigliserid, HDL-K, LDL-K, apo AI, apo B, nitrit, nitrat tayini için ise antikoagülanlı vakumlu tüplere alındı. 20 dakikalık oda sıcaklığındaki inkübasyonu takiben 1500 x g'de 15 dakika santrifüjlenerek serumlar elde edildi. Nitrit ve nitrat tayini için serumlar derin dondurucuda (-70°C) en fazla 3 ay saklandı. MDA tayini için antikoagülanlı tüp 1800 x g'de 30 dakika santrifüjlenerek ve ardından çökelen kan hücreleri üç kez serum fizyolojikle yıkanarak eritrosit paketleri elde edildi ve MDA tayini için bekletilmeden hemen kullanıldı. HbA1c ve tam kan hücre sayımı için tam kan direkt olarak kullanıldı.

### 3.3.Kullanılan Metodlar

#### 3.3.1.HbA1c Tayini

Tayinin prensibi:

HbA1c tayini Latex İmmünoaglutinasyon inhibisyonmetodu ile yapıldı.

Hem HbA1c konsantrasyonu hem de total hemoglobin ölçüldü (ferrisiyanid metoduyla) ve oran % HbA1c olarak kaydedildi.

$$\% \text{HbA1c} = \left\{ \frac{[\text{HbA1c}]}{[\text{Total Hb}]} \right\} \times 100$$

Her iki reaksiyonun bütün reaktifleri DCA 2000 HbA1c reaktif kartuşu içindedir.

### 3.3.2.Otoanalizörde Tayin Edilen Parametreler

Glukoz, kolesterol, trigliserid, HDL-K tayinleri Hitachi 747 otoanalizöründe Boehringer Mannheim kitleri kullanılarak yapıldı. Glukoz, trigliserid ve kolesterol tayini için enzimatik yöntemler kullanıldı. HDL-K tayini için fosfotungustik asit-MgCl<sub>2</sub> çöktürme reaktifi ile presipitasyondan sonra enzimatik kolesterol tayin yöntemi kullanıldı. Tüm analizler günlük kalite kontrol çalışmalarını takiben yapıldı.

### 3.3.3.Nefelometrede Tayin Edilen Parametreler

"Array 360 System, Beckman" nefelometrede apo AI ve apo B tayinleri yapıldı. Testin prensibi monoklonal immünopresipitasyon metoduna dayanmaktadır ve orijinal kitler kullanılmıştır. Tüm analizler günlük kalite kontrol çalışmalarını takiben yapıldı.

### 3.3.4.Lökosit Tayini

Otomatik kan sayım cihazında değerlendirildi. STKS, Coulter orijinal reaktifleri kullanılarak bakıldı.

### 3.3.5.Eritrositlerde Malondialdehid (MDA) Tayini

Prensip: Lipid peroksidasyon ürünlerinden biri olan malondialdehit, tiyobarbitürik asitle asidik ortamda ısıtıldığında oluşturduğu pembe renkli kompleksin optik dansitesi ölçülür (54).

### Reaktiflerin Hazırlanışı

1. Tamponlu tuzlu su çözeltisi (PBS tampon): 1.76 ml 0.5 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ile 6.08 ml 0.5 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  karıştırıldı ve deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlandı. Bu çözelti 1 litre % 0.9 NaCl çözeltisine eklendi. pH 7.4'e ayarlandı.

2. Azid ( $\text{N}_3$ ) tamponu: 500 ml PBS tamponuna 5 ml 0.4 M  $\text{NaN}_3$  çözeltisi eklendi.

3. Triklorasetik asit-Arsenit (TCA-Arsenit) çözeltisi: 140 g TCA 250 ml deiyonize suda çözüldü, üzerine 13 g Na-arsenit eklendi ve deiyonize su ile hacim 500 ml'ye tamamlandı.

4. Tiyobarbitürik asit (TBA) çözeltisi: 5 g TBA tartıldı, 25 ml 1 N NaOH katılan 200 ml deiyonize suda ısıtılarak çözüldü. Soğuduktan sonra deiyonize su ile hacim 500 ml'ye tamamlandı.

### Deneyin Yapılışı

Paket eritrositler Hb konsantrasyonu 3 g/dl olacak şekilde azit tamponuyla ayarlandı. Bunun için 1 ml eritrosit paketi 9 ml  $\text{NaN}_3$  tamponuyla dilüe edildi. 37 °C'de hafifçe sallanarak 10 dk kadar tutuldu. Tüplerde Hb tayinleri cyanmethemoglobin metodu ile yapıldı (55). Sonra 5 ml fosfat tamponu eklendi ve 2 saat 37°C'de inkübe edildi.

MDA Tayini: 3 ml hücre süspansiyonu alınarak üzerine 2 ml TCA arsenit çözeltisi eklendi. 10 dk 3000 rpm'de santrifüje edildi. 3 ml süpernatant alındı başka bir deney tüpüne aktarıldı. Üzerine 1 ml TBA çözeltisi eklendi. Tam 15 dk kaynar su banyosunda tutuldu. Bekletilmeden 532 ve 600 nm'de absorbanlar okundu.

Hesaplama: 532 ve 600 nm dalga boylarında absorbanlar kaydedilerek aradaki fark aşağıdaki formüle göre nmol MDA/g Hb olarak hesaplandı.

$$[ \text{MDA} ] = ( A_{532} - A_{600} ) \times 900 = \text{nmol MDA/g Hb}$$

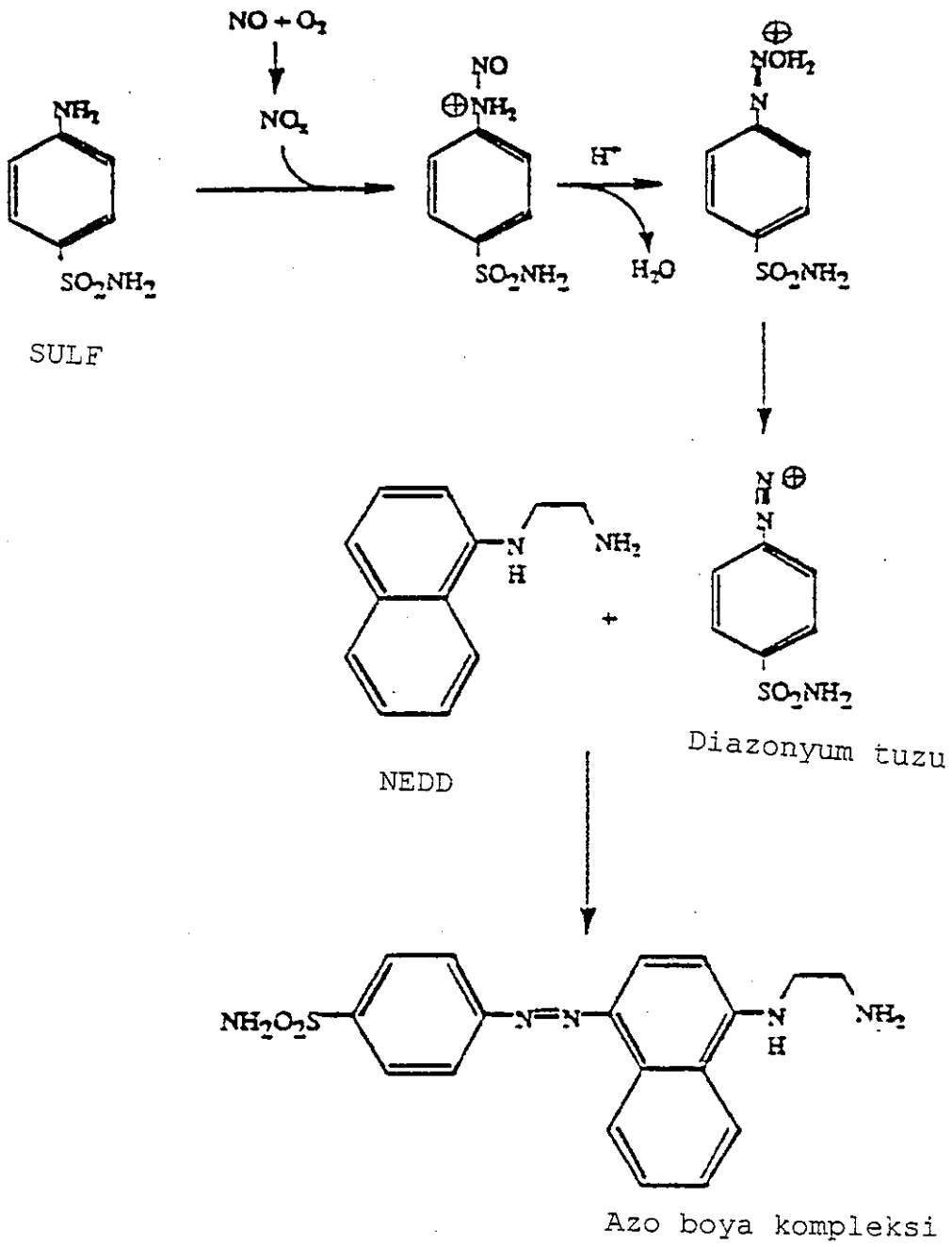
Seçilen bir örnek aynı anda yapılan bir çalışmada beş kez çalışılarak % CV değeri 6.6 olarak bulundu.

### 3.3.6.Nitrit ve Nitrat Tayin Yöntemi

3.3.6.1.Nitrit tayininin prensibi: Kandaki nitritin griess reaktifi ile oluşturduğu pembe renkli kompleksin optik dansitesi ölçülür (56). Deneyin prensibi aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (57).

3.3.6.2.Nitrat tayininin prensibi: Nitrat önce nitrat redüktaz (E.C.1.6.6.2.) enzimi aracılığıyla nitrite dönüştürülür (56) ve nitrit tayini basamakları aynen uygulanır. Böylece numunelerdeki toplam nitrit + nitrat miktarı bulunmuş olur. Toplam nitrit +nitrat değerinden nitrit konsantrasyonu çıkarılarak nitrat miktarı tespit edilir.





Şekil 9: Nitrit tayin prensibi

(NEDD: N-naftiletildiaminhidroklorür,  
SULF: Sülfanilamid)

### Kullanılan Çözeltiler:

#### 1. Griess Reaktifi

Sülfanil amid 200 mg (son konsantrasyonu % 0.01)

Fosforik asid 0.5 ml (son konsantrasyon % 2.5)

N-Naftil-Etilen-Diamin 20 mg (son konsantrasyon % 0.01)

Yukarıdaki miktarlarda alınan meddeler 20 ml deiyonize suda çözüldü. Griess reaktif kullanmadan hemen önce hazırlandı ve iyice karıştırıldı (ışıktan korunmalıdır).

#### 2. Deproteinizasyon çözeltisi (300 g/L ZnSO<sub>4</sub>): 2.67 g

ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 5 ml deiyonize suda çözüldü.

#### 3. Tris HCl çözeltisi (20 mM pH=7.4): 24.2 mg tris

tartıldı. Bir miktar deiyonize suda çözülerek pH 7.4 oluncaya kadar HCl ile titre edildi. Deiyonize su ile 10 ml'ye tamamlandı.

#### 4. FAD çözeltisi (1 mM): 4.15 mg FAD 5 ml çözelti (3)'de

çözüldü.

#### 5. NADPH çözeltisi (10 mM): 8.334 mg NADPH 1 ml çözelti

(3)'de çözüldü.

#### 6. Nitrat redüktaz çözeltisi (10 U/L): 20 U'lik nitrat

redüktaz 2 ml çözelti (3)'de çözüldü.

#### 7. Laktat dehidrogenaz çözeltisi = (10 mg/2 ml)

#### 8. Na pirüvat (0.5 M): 55 mg'ı 1 ml deiyonize suda

çözüldü.

#### 9. Fosforik asit çözeltisi (25 g/L) = 172 µL o-fosforik

asit (%85'lik) 10 ml deiyonize suda çözüldü.

#### 10. Standartlar:

100; 50; 25; 12.5; 6.25; 3.125; 0 µM'lik nitrit

standartları NaNO<sub>2</sub> kullanılarak hazırlandı.

50; 40; 30; 20; 10; 7.5; 5; 2.5; 0 µM'lik nitrat

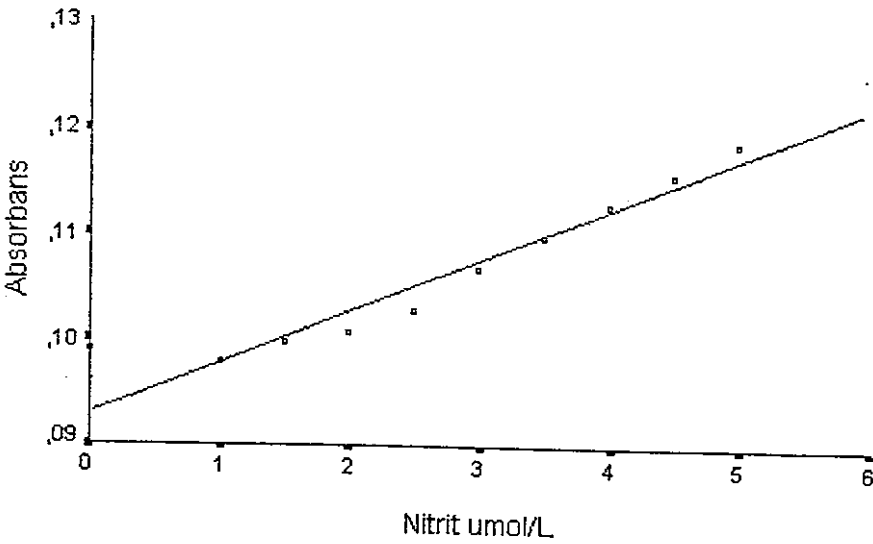
standartları KNO<sub>3</sub> kullanılarak hazırlandı.

## Nitrit Tayini:

- Numuneler 1 : 4 oranında deiyonize su ile dilüe edildi.
- 400 µL dilüe numuneye deproteinizasyon için % 30'luk  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 'dan 20 µL ilave edildi ve vortekslendi.
- 10 dakika 6000 rpm'de santrifüjleme yapıldı.
- Her kuyucuğa 100 µL süpernatant + 100 µL griess reaktifi koyuldu. Kör olarak 100 µL süpernatant + 100 µL fosforik asit kullanıldı.
- 10 dakika oda sıcaklığında enkübe edildi.
- 540 nm'de köre karşı mikrokuyucuk okuyucusunda okuma yapıldı.

Hasta numuneleri çift ve standartlar üç kez çalışıldı. Her kuyucuk için 100 µL standart kullanıldı.

Hesaplama: Mikrokuyucuk okuyucusunda 540 nm dalga boyunda numune ve standartların absorbansları okundu. Elde edilen sonuçlar grafiğe geçildi (Şekil 10). Bu grafikten yararlanılarak serum nitrit miktarı µmol/L olarak belirlendi.



Şekil 10: Nitrit standart çalışma grafiği

$$(r=0.98, y= -18.9 + 198 x)$$

Total Nitrit + Nitrat Tayini:

a. 100 µL serum alındı. 300 µL distile su ilave edilerek dört kat dilüe edildi.

b. NADPH son konsantrasyon 50 µmol/L olacak şekilde ilave edildi.

c. FAD son konsantrasyon 5 µmol/L olacak şekilde ilave edildi.

d. Nitrat redüktaz son konsantrasyon 200 U/L olacak şekilde ilave edildi.

e. Örnekler 20 dakika 37°C'de inkübe edildi.

f. Sodyum pirüvat son konsantrasyon 10 µmol/L olacak şekilde ilave edildi.

g. LDH son konsantrasyon 10 mg/L olacak şekilde ilave edildi.

h. 5 dakika 37°C'de inkübe edildi.

ı. 20 µL % 30'luk ZnSO<sub>4</sub> eklendi ve vortekslendi.

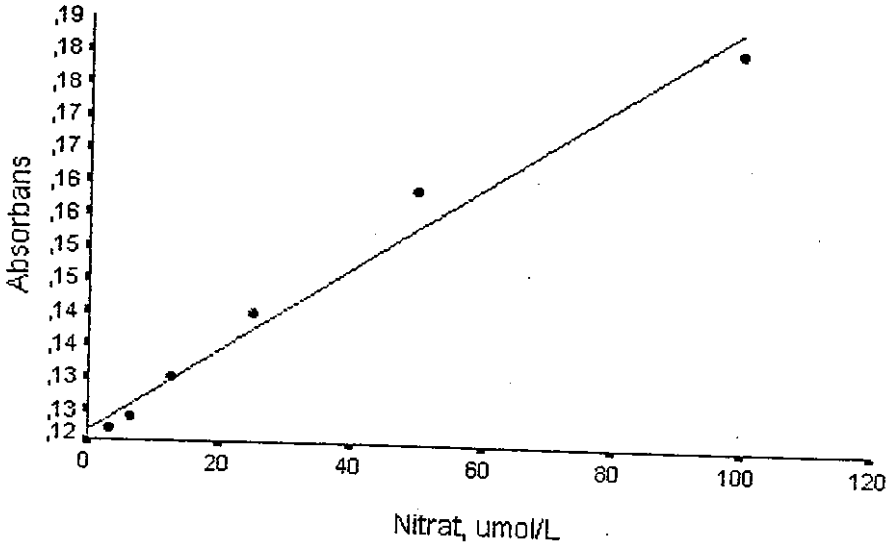
i. 6000 rpm'de 10 dakika santrifüje edildi.

j. Hazırlanan örneklerden her bir mikrokuyucuğa 100 µL süpernatant koyuldu. Üzerlerine 100 µL Griess reaktifi eklendi.

k. Renk meydana gelmesi için 10 dakika oda sıcaklığında beklendikten sonra O.D. 540 nm'de 100 µL fosforik asitle hazırlanan köre karşı okuma yapıldı.

Hasta numuneleri çift ve standartlar üç kere çalışıldı.

Hesaplama: 540 nm dalga boyunda numune ve standartların absorbanları kaydedildi. Elde edilen sonuçlardan standart grafiği çizildi (Şekil 11). Bu grafikten yararlanılarak nitrat miktarı µmol/L olarak belirlendi.



Şekil 11: Nitrat standart çalışma grafiği  
( $r=0.98$ ,  $y= -190 + 1564 x$ )

### Nitrik oksit metodunun değerlendirilmesi

"Recovery", metodun doğruluğunu tespit etmek için kullanılan bir analitik kriterdir. Tayin edilecek maddeyi, bazal değerde ihtiva eden serum üzerine, tayin edilecek maddenin belli konsantrasyonda eklenmesi ve sonra ilave edilen miktarların doğru değerlendirilmesidir.

Metodun "recovery"sini tespit etmek için yapılan çalışmanın sonuçları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 4: Nitrit "recovery"

Tip	Serum	Eklenen nitrit konsantrasyonu	Hesaplanan son konsantrasyon	Eklenen konsantrasyon	% R
A	2 ml	1000 $\mu\text{mol/L}$ 'den 100 $\mu\text{L}$	62.5	47.6	88
B	2 ml	500 $\mu\text{mol/L}$ 'den 50 $\mu\text{L}$	32.1	12.19	94.3
C	2 ml	-	20.6	-	-

% R : % "Recovery"

Tablo 5: Nitrat "recovery"

Tip	Serum	Eklenen nitrat konsantrasyonu	Hesaplanan son konsantrasyon	Eklenen konsantrasyon	% R
A	2 ml	1000 $\mu\text{mol/L}$ 'den 100 $\mu\text{L}$	65.0	47.6	90.39
B	2 ml	500 $\mu\text{mol/L}$ 'den 50 $\mu\text{L}$	33.76	12.19	96.7
C	2 ml	-	21.97	-	-

% R : % "Recovery"

Deney içi (within-run) hassasiyetinin değerlendirilmesi: Nitrit ve nitrat tayini için toplanan örnekler bir seferde çalışıldı. Elde edilen bulgular tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6: Nitrit ve nitrat için "within-run" % CV ve  $\bar{R}$  değerleri

	"Within-run"	$\bar{R}$
Nitrit	5.5 (n=10)	91.1
Nitrat	6.3 (n=10)	93.5

$\bar{R}$  : Ortalama "Recovery"

Kullandığımız bu metod basit olması, kısa zamanda fazla örnek çalışılabilmesi, serum ve doku gibi kolay elde edilebilir biyolojik materyallerin kullanılabilmesi ve çok pahalı ve ileri teknoloji gerektirmeyen cihazlar kullanılması nedeniyle tercih edilmektedir ve yaygın olarak kullanılmaktadır. Metodun sensitivite sınırı 0.1-1  $\mu\text{mol}'\text{dür}$ , lineerite sınırı 1-100  $\mu\text{mol}'\text{dür}$  (56,57).

#### İstatistiksel Analizler

Elde edilen değerlerin ortalamaları ( $\bar{X}$ ), standart sapmaları (SD), alt ve üst sınırları belirlendi. Elde edilen ortalama ve standart sapmalardan grupların normal dağılıma uygunlukları test edildi. Normal dağılıma uyan grupların ortalamaları arasındaki farkın önemliliğini belirlemek için

Student'in t testi, uymayanlar için ise Mann-Whitney U testi kullanıldı.

Parametreler arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için de Spearman korelasyon testi kullanıldı. Bu istatistiksel analizler IBM uyumlu bilgisayarda SPSS for Windows paket istatistik programında yapıldı.

$\% CV = \text{yüzde varyasyon katsayısı} = (SD / \bar{X}) \times 100$

$n = \text{vaka sayısı}$

$\bar{X} = \text{aritmetik ortalama}$

$SD = \text{standart sapma}$

$r = \text{korelasyon katsayısı}$



#### 4-BULGULAR

DM'li ve sağlıklı kişilerin demografik bulguları Tablo 7'de, kolesterol, trigliserid, LDL-K, HDL-K, apo AI, apo B, HbA1c, glukoz, lökosit, eritrosit MDA, Tablo 8'de ve Şekil 12 ve Şekil 13'te görölmektedir. Nitrit, nitrat, nitrit + nitrat ve nitrit / nitrat değerleri ve dağılımları Tablo 9'da ve Şekil 14'de verilmiştir. MDA, lipid parametreleri ve NO ürünlerinin box-plot grafiklerinde kutu ortasındaki çizgiler medyanı (ortancayı), kutuların alt çizgileri % 25, üst çizgileri % 75 persentili göstermektedir.

Tablo 7: Diabet mellituslu ve sağlıklı kişilerde demografik bulgular

	Diabet mellitus	Sağlıklı kişiler
n	42	40
yaş	49.3 $\pm$ 10.2	47.0 $\pm$ 8.4
E /K	18 / 24	19 / 21
BMI*	26.15 $\pm$ 3.63	22.42 $\pm$ 1.70

E : erkek

K : kadın

\* BMI : "Body mass index" (vücut kütle oranı) (kg/m<sup>2</sup>)

Gruplar demografik olarak yaş ve cins bakımından anlamlı değilken, BMI, DM'li grupta anlamlı yüksek tespit edildi.

Tablo 8: Diabet mellituslu ve sağlıklı kişileri biyokimyasal parametreleri (aritmetik ortalama  $\pm$  standart sapma)

	Diabet mellitus (n=42) $\bar{x} \pm SD$	Sağlıklı kişiler (n=40) $\bar{x} \pm SD$	P
Total kolesterol, (mg/dL)	228 $\pm$ 61	160 $\pm$ 29	# 0,001
Trigliserid (mg/dL )	190 $\pm$ 88	100 $\pm$ 52	# 0,001
HDL-K, (mg/dL)	36 $\pm$ 10	45 $\pm$ 9	# 0,001
LDL-C, (mg/dL)	147 $\pm$ 44	94 $\pm$ 28	# 0,001
Apo AI, (mg/dL)	118 $\pm$ 26	108 $\pm$ 27	# 0,137
Apo B, (mg/dL)	125 $\pm$ 38	81 $\pm$ 16	# 0,001
HbA1c, (%)	12.2 $\pm$ 1.57	4.4 $\pm$ 0.7	# 0,001
Glukoz, (mg/dL)	274 $\pm$ 104	88 $\pm$ 5.68	# 0,001
Lökosit, ( $10^3/\mu l$ )	5.19 $\pm$ 1.15	3.28 $\pm$ 0.5	# 0,001
Eritrosit MDA, (nmol/g Hb)	86.9 $\pm$ 22.46	58.5 $\pm$ 17.3	* 0,001

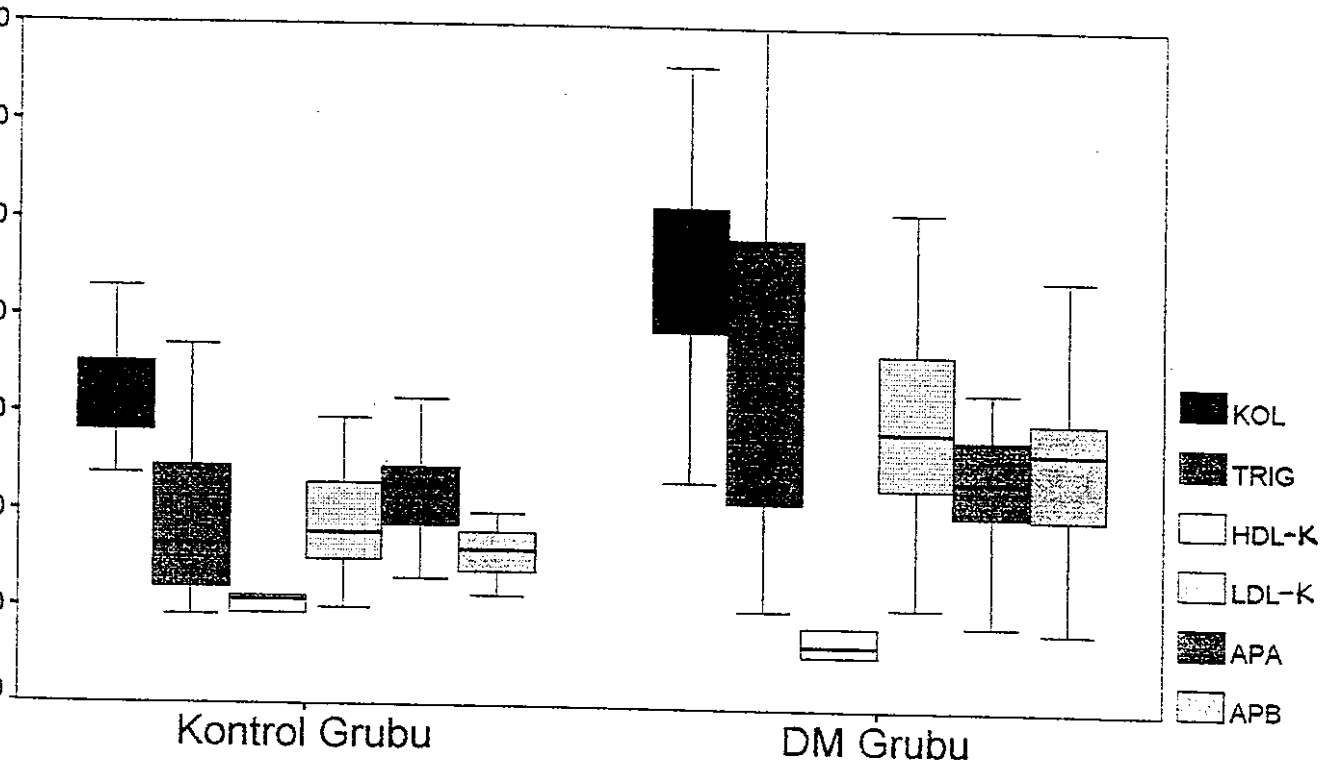
\* Mann Whitney U testine göre

# Student'in t testine göre

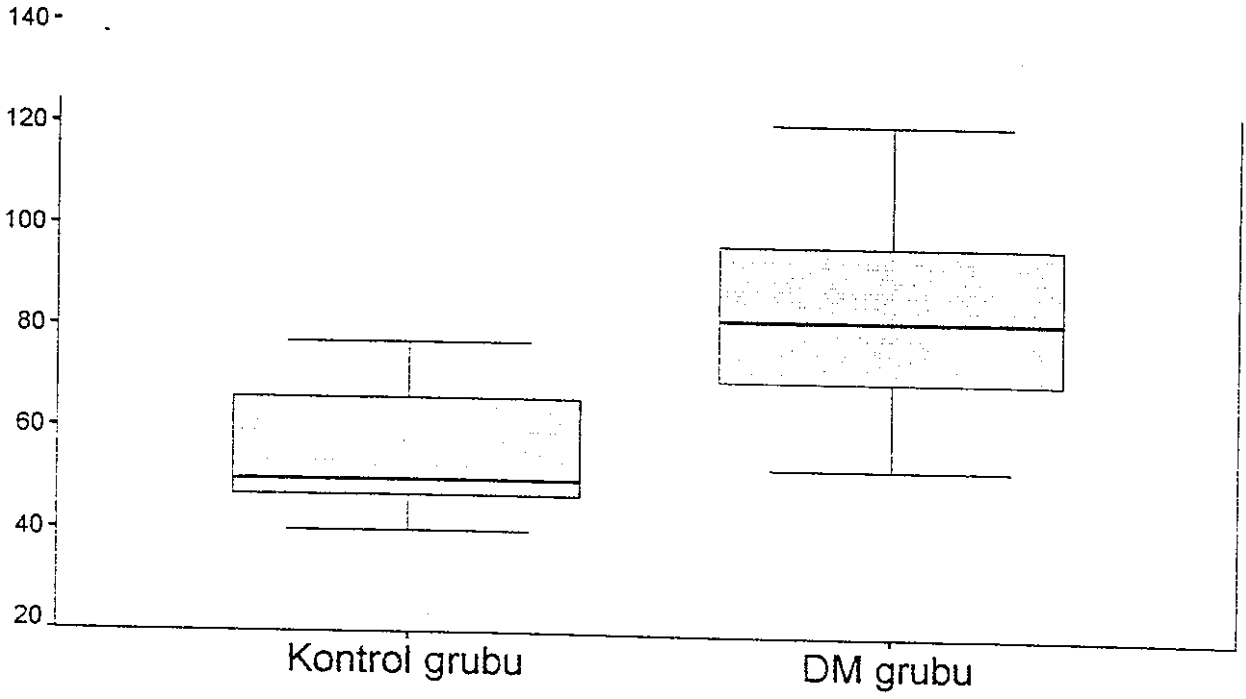
Tablo 9: Diabet mellituslu ve sağlıklı şahısların nitrik oksit parametreleri

	Diabet mellitus (n=42) $\bar{x} \pm SD$	Kontrol grubu (n=40) $\bar{x} \pm SD$	P
nitrit, ( $\mu mol/L$ )	4.96 $\pm$ 2.72	5.75 $\pm$ 3.26	* 0,383
nitrat, ( $\mu mol/L$ )	11.82 $\pm$ 8.55	22.83 $\pm$ 10.77	* 0,001
nitrit + nitrat, ( $\mu mol/L$ )	16.77 $\pm$ 11.01	28.79 $\pm$ 11.33	* 0,001
nitrit/nitrat	0.52 $\pm$ 0.29	0.41 $\pm$ 0.77	* 0,001

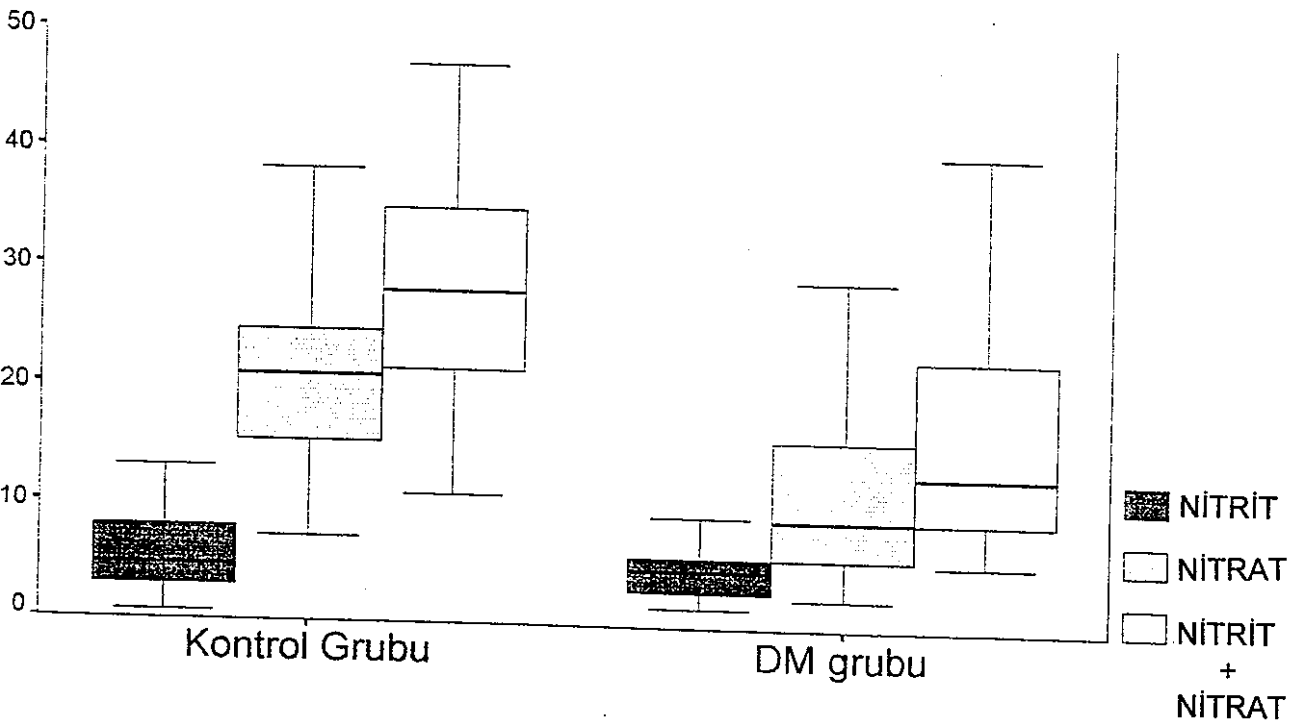
\* Mann Whitney U testine göre



Şekil 12: DM grubu ile kontrol grubu arasında lipid parametreleri (APA: apo AI, APB: apo B)



Şekil 13: DM grubu ile kontrol grubu arasında MDA düzeyleri



Şekil 14: DM grubu ile kontrol grubu arasında NO ürünleri

DM'li hastaların kolesterol, trigliserid, LDL-K, apo B, HbA1c, glukoz, lökosit, eritrosit MDA ve nitrit/nitrat değerleri sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. DM'li şahısların HDL-K, nitrat, nitrit + nitrat değerleri ise sağlıklı kontrol grubuna göre önemli ölçüde düşük bulunmuştur. Apo A değerleri DM grubunda yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak önemli fark göstermemiştir ( $p > 0,05$ ). Nitrit seviyesi hasta grubunda düşük olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0,05$ ).

Yapılan regresyon analizinde nitrat değerleri apo AI ve HDL-K ile anlamlı pozitif korelasyon ( $r = 0.41$  ,  $p < 0,05$ ;  $r = 0.51$  ,  $p < 0,05$ , sırasıyla), MDA ile ise anlamlı negatif korelasyon tespit edilmiştir ( $r = -0.37$  ,  $p < 0,05$ ). Nitrit ile apo A ve HDL-K arasında anlamlı pozitif korelasyon tespit edilmiştir ( $r = 0.38$  ,  $p < 0,05$ ;  $r = 0.44$  ,  $p < 0,05$ , sırasıyla). Nitrit + nitrat ile apo AI ve HDL-K arasında anlamlı pozitif korelasyon tespit edilmiştir ( $r = 0.39$  ,  $p < 0,05$ ;  $r = 0.53$ ,  $p < 0.05$  sırasıyla). Nitrit/nitrat ile LDL-K arasında anlamlı pozitif korelasyon tespit edilmiştir ( $r = 0.37$  ,  $p < 0,05$ ). Nitrit+nitrat ile MDA arasında anlamlı negatif korelasyon tespit edilmiştir. ( $r = -0.45$ ,  $p < 0,05$ )

Diabet Mellituslu ve sağlıklı şahıslardaki MDA, Nitrit, Nitrat, Nitrit + Nitratın daha önce elde edilen ilişkileri gösteren korelasyon grafikleri şekil 15'te görülmektedir.



Diabet mellitus grubundaki kolesterolü 200'ün üstünde ve altında olan şahısların MDA, nitrit, nitrat, nitrit + nitrat, nitrit / nitrat düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Tablo 10).

Tablo 10: Kolesterolü 200'ün üzerinde ve altında olan DM'li grubun MDA, nitrit, nitrat, nitrit+nitrat, nitrit/nitrat düzeylerinin karşılaştırılması

	Kolesterol, mg/dL		p*
	<200 (n=16)	>200 (n=26)	
MDA, nmol/L	82.9±21.9	88.9±22.0	>0.05
nitrit, µmol/L	5.79±3.34	4.55±2.34	>0.05
nitrat, µmol/L	15.2±10.6	10.6±6.9	>0.05
nitrit+nitrat, µmol/L	25.9±13.6	14.67±9.08	>0.05
nitrit/nitrat	0.44±0.23	0.57±0.57	>0.05

\* Mann Whitney U testine göre

Diabet mellitus grubundaki trigliseridi 200'ün üstünde ve altında olan şahısların MDA, nitrit, nitrat, nitrit+nitrat, nitrit / nitrat düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Tablo 11).

Tablo 11: Trigliseridi 200'ün üzerinde ve altında olan DM'li grubun MDA, nitrit, nitrat, nitrit+ nitrat, nitrit/nitrat düzeylerinin karşılaştırılması

	Trigliserid, mg/dL		p*
	<200 (n=24)	>200 (n=18)	
MDA, nmol/L	83.0±20.8	92.79±24.4	>0.05
nitrit, µmol/L	5.23±3.0	4.25±2.22	>0.05
nitrat, µmol/L	13.28±9.05	9.69±6.7	>0.05
nitrit+nitrat, µmol/L	18.4±12.2	14.2±8.7	>0.05
nitrit/nitrat	0.46±0.22	0.62±0.36	>0.05

\* Mann Whitney U testine göre

Hasta ve kontrol grubu olarak ayırmadan kolesterolü 200'ün üzerinde ve altında ve trigliseridi 200'ün üzerinde ve altında olanların hepsini değerlendirdiğimiz zaman nitrit değerleri hariç diğer parametreler anlamlı değişiklik göstermiştir (Tablo 12 ve 13).

Tablo 12: Kolesterolü 200'ün üzerinde ve altında olan DM'li + sağlıklı grubun MDA, nitrit, nitrat, nitrit+nitrat, nitrit/nitrat düzeylerinin karşılaştırılması

	Total kolesterol, mg/dL		p*
	<200 (n=38)	>200 (n=22)	
MDA, nmol/L	64.3±20.8	87.2±23.8	<0.05
nitrit, µmol/L	5.87±3.27	4.46±2.25	>0.05
nitrat, µmol/L	20.42±11.02	11.98±9.29	<0.05
nitrit+nitrat, µmol/L	26.44±12.36	16.45±10.61	<0.05
nitrit/nitrat	0.43±0.69	0.50±0.32	<0.05

\* Mann Whitney U testine göre



Tablo 13: Trigliseridi 200'ün üzerinde ve altında olan DM'li + sağlıklı grubun MDA, nitrit, nitrat, nitrit+nitrat, nitrit/nitrat düzeylerinin karşılaştırılması

	Total trigliserid, mg/dL		p*
	<200 (n=46)	>200 (n=14)	
MDA, nmol/L	68.12±22.3	87.3±26.4	<0.05
nitrit, µmol/L	5.43±3.14	5.12±2.62	>0.05
nitrat, µmol/L	19.1±11.4	11.4±7.7	<0.05
nitrit+nitrat, µmol/L	24.6±12.7	16.6±10.1	<0.05
nitrit/nitrat	0.43±0.63	0.57±0.37	<0.05

\* Mann Whitney U testine göre

## 5-TARTIŞMA

Çalışmada kolesterol, trigliserid, LDL-K, apo B düzeyleri DM'li hasta grubunda sağlıklı gruba göre anlamlı olarak yüksek bulundu. DM'de kan şekeri kontrolünün bozulmasıyla birlikte hipertrigliseridemi belirgin olmak üzere lipoprotein metabolizmasında anormallikler görülür (15,58). DM'de hipertrigliserideminin şiddeti kan şekerinin kontrolüyle yakın ilişkilidir. DM'li hastalarda gözlediğimiz yüksek trigliserid düzeylerinin sağlıklı kontrol grubunun iki katı olup oldukça farklı bir dağılım göstermektedir. DM'li hastaların kontrolsüz kan şekerlerinden dolayı bu beklenen bir bulgudur. Şilomikron ve VLDL remnantlarını klasik metodlarla belirlemek mümkün olmadığı için literatürle sadece trigliserid düzeylerini karşılaştırıp uyumlu olduğunu söyleyebilmekteyiz. Artmış trigliserid düzeylerine, artmış kolesterol düzeylerinin eşlik etmesi bize VLDL kalıntılarının yükselmiş olabileceğini literatürdeki bilgilerin ışığı altında düşündürmektedir (13).

DM'li hastalarda gözlediğimiz LDL-K ve apo B düzeyinde hafif veya orta derecede yükseklikler Rosenstock ve arkadaşlarının bulgularıyla uyumluluk göstermektedir (12). Plazma total kolesterol düzeyinin yaklaşık % 60-70'i plazmadaki LDL tarafından taşınır. Apo B ise LDL'nin tek ve ana proteindir. Çalışmamızda gözlediğimiz her üç parametredeki hafif ve orta dereceli yükselmeleri bu ilişkiyle açıklamak mümkündür.

DM'li şahıslarda sağlıklı gruba göre HDL-K seviyeleri anlamlı derecede düşük bulundu. Apo AI seviyesi ise DM'li grupla sağlıklı grup arasında istatistiksel olarak anlamlı değişiklik göstermedi ( $p > 0,05$ ), HDL-K düşüklüğünün sebebinin, hipertrigliserideminin hepatik lipaz aktivitesini indüklemesi sonucu HDL-K katabolizmasını artırması ve sonuçta serum HDL-K düzeyini düşürmesi olduğu ileri sürülmektedir (59). Apo AI, ŞM'lerin yapısında da olmasına rağmen başlıca HDL'nin yapısında bulunur. HDL'nin yaklaşık % 50'si proteindir. Bunun % 90'ı apo AI ve apo AII'dir (60). Bu nedenle apo AI ile HDL-K arasında pozitif korelasyon olması beklenmektedir. Buna rağmen çalışmamızda gözlediğimiz HDL-K düzeyinde düşüklük apo AI düzeyinde gözlenmemiştir.

Yapılan çalışmalarda, hiperlipideminin endotel hücresi, düz kas hücresi, nötrofiller ve trombositleri uyardığı ve bu hücrelerden üretilip salgılanan serbest oksijen radikal miktarının arttığı gösterilmiştir (61,62).

Hiperkolesteroleminin trombosit aktivasyonuna sebep olduğu ve kolesterolce zengin trombositlerin trombin, histamin ve ADP gibi maddeler saldıdığı bilinmektedir. Histamin ve ADP, fosfolipaz A<sub>2</sub>'yi aktive eder. Bu da membran yapısındaki fosfolipidleri hidrolizleyerek araşidonik asit salınımına yolaçar. Fosfolipaz A<sub>2</sub> aktivasyonundaki artış çeşitli hücrelerde prostaglandin sentezini artırır. Araşidonik asitlerden prostaglandinlerin sentezlendiği ara basamaklarda (PGG<sub>2</sub>'nin PGH<sub>2</sub>'ye dönüşümü) oksijen radikali üretilmektedir (24).

DM'de aktif olan hücre grubundan bir tanesi de PMN lökositlerdir. Bizim yaptığımız çalışmada da hasta grubu PMN değerleri sağlıklı grup PMN değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).

Hiperlipidemilerde gözlenen oksijen radikallerindeki artış, membran lipid peroksidasyonuna sebep olduğu gibi, plazma lipoproteinlerini de (özellikle LDL) oksidasyona uğratabilir. Sonuçta lipid peroksidasyon ürünleri meydana gelir. MDA, lipid peroksidasyonunun son metabolitlerinden biridir (40,63).

Eritrosit membran lipidleri, plazma lipid kompozisyonundan direkt etkilenmektedir. Ayrıca eritrositler, kılcal damarlar yoluyla dokulara kadar gittiğinden, dokudaki değişikliklerden etkilenmektedir. Bu iki faktör eritrosit membran lipidlerinin oksidasyonunu ve dolayısıyla eritrosit MDA düzeylerini etkilemektedir. Bu nedenle plazma MDA düzeyleri yerine çalışmamızda eritrosit MDA düzeylerine bakılması tercih edilmiştir. Çalışmamızda DM grubunun MDA değerleri sağlıklı gruba göre yüksek bulunmuştur. Fakat DM'li hastalarda total kolesterol ve trigliserid düzeylerinin 200'ün altında ve üstünde olması göz önüne alınarak yapılan sınıflamada, MDA düzeyleri anlamlı farklılık göstermemiştir. Buna ilaveten hasta ve kontrol grubunda total olarak bu sınıflamayı yaptığımızda MDA düzeyleri bu parametrelere bağlı olarak anlamlı farklılık göstermektedir. Vaka sayısının istatistiksel sonucu etkileyeceği gerçeği bu iki zıt sonucu açıklayabilir. Bu sonuçta literatür bilgisi ile uyumludur. DM ve hiperlipidemisi olan şahıslarda eritrosit MDA düzeylerinin yüksek olduğu bir çok çalışma ile gösterilmiştir (23,64).

MDA ölçümü, HPLC metoduyla daha hassas yapılabilmesine rağmen pratik olması ve ileri teknikli cihaza gereksinim duyulmaması nedeniyle çalışmamızda kolorimetrik yöntem seçilmiştir. MDA lipid peroksidasyonu hakkında genel bir bilgi vermektedir (64).

Gerek lipid metabolizmasında gözlediğimiz değişiklikler gerekse lipid peroksidasyon ürünlerindeki artış bize

kontROLSÜZ kan şekeri olan DM'li hastaların oldukça yüksek aterosklerotik riske sahip olduğunu düşündürmekte ve mevcut literatür bilgisini desteklemektedir (59,65).

Ateroskleroz gelişiminde son yıllarda en çok üzerinde durulan faktörlerden biri de endoteldir. Endotel dokusunun aterosklerotik olaylarda diğerlerine göre yapısal ve fonksiyonel değişiklik gösterdiği ve ateroskleroz gelişimi için bir bariyer oluşturduğu gözlenmiştir. Endotel sentezlediği ve salgıladığı biyolojik materyallerle bu dengenin oluşmasında önemli role sahiptir. Bu biyolojik markörlerden biri de endotelden salınan NO'dur. Endotel uyarı karşısında NO sentez ve salgısında belirgin değişiklik gösterdiği gibi, endotelden salgılanan NO'nun artmış  $O_2$  radikalleriyle etkileşerek inaktivasyonu ve daha toksik olan  $OH^-$  radikallerine dönüşerek de ateroskleroz gelişimine önemli katkı sağlar (66,67).

DM grubunda nitrit, nitrat, nitrit + nitrat seviyelerinde düşüklük, nitrit/nitrat oranında da artma tespit edilmiştir. Bu bulguyu muhtemel bir çok nedenle açıklamak mümkündür. Bunlardan biri NO sentezi için gerekli olan kofaktörlerden NADPH'nın DM'li hastalarda artmış poliol yolunda aldoz redüktaz enzimi için kofaktör olarak kullanılmasıdır. Ayrıca NADPH bazı antioksidan enzimlerin de kofaktörüdür. DM'lilerde artmış oksidan stresi dengelemek amacıyla mevcut antioksidan enzimler vasıtasıyla NADPH'nın tüketilmesi ortamdaki total NADPH'ların azalmasının muhtemel nedenidir (30). Çalışmamızda gözlediğimiz artmış eritrosit MDA düzeyleri, bize DM'li hastalarda lipid peroksidasyonunda artma olduğunu göstermektedir. Yani oksidan stres artmıştır veya antioksidan kapasite azalmıştır veya her ikisi birden söz konusu olabilir.

NADPH'nın azalmasına yol açabilecek faktörlerden biri de NO'nun hemoglobinle reaksiyonu sonucu oluşan methemoglobin tekrar hemoglobine indirgenmesi basamağında kullanılmasıdır. Sonuç olarak çeşitli doku ve hücrelerde NADPH tüketiminde artma gözlenmektedir. Bu da NO sentezini sınırlayan önemli faktörlerden biridir (28,29).

Ayrıca hiperlipidemi, NO sentezini azaltan önemli faktörlerden biridir. Son yıllarda yapılan çalışmalar hiperkolesterolemisi olan aterosklerotik kişilerin damarlarında endotelial NO sentezinin normal veya artmış olabileceğini, ancak bu hastalarda aşırı süperoksit üretiminin ve NO'nun bu radikallerle reaksiyona girmesinin sonucunda NO miktarının azaldığı gösterilmiştir (66).

Hiperlipidemide artmış ox-LDL düzeyleri hem NO topalayıcıların salınımını stimüle etmekte hem de kendisi direkt olarak çöpçü (scavenger) gibi davranmaktadır (68).

DM'li hastalarda lipid peroksidasyon ürünü olan MDA ile nitrit, nitrat ve nitrit+nitrat düzeyleri arasında şekillerde de (Şekil 15) görüldüğü gibi önemli negatif korelasyonlar elde edilmiştir. Okside LDL'nin direkt olarak endotelial NOS ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir (68). Artmış lipid peroksidasyon düzeyi ile ox-LDL arasındaki pozitif ilişki ve ox-LDL'nin NO'yu azaltıcı etkisi göz önüne alındığında, artmış eritrosit MDA düzeyleri ile azalmış NO üretimi arasındaki ilişki de anlamlı görülmektedir. ox-LDL ölçümü, teknik açıdan çok zor ve pahalı bir yöntem olduğu için çalışmamızda değerlendirilememiştir. Fakat bu bulguların ışığı altında, eritrosit MDA düzeylerinin de artmış lipid peroksidasyonu ve muhtemelen artmış ox-LDL düzeyini indirekt olarak göstereceği ve dolayısıyla literatür bilgilerinin ışığı altında endotelial NO sentezini azaltmış olabileceğini düşündürmektedir.

DM'li hasta grubunda ve sağlıklı kontrol grubunda, ayrı ayrı total kolesterolü 200 mg/dL'nin altında ve üstünde, trigliserid düzeyi 200 mg/dL'nin altında ve üstünde olan şahıslardaki nitrit, nitrat ve nitrit + nitrat düzeylerine baktığımızda anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, grupları ayırmadan tüm çalışmaya katılanlarla böyle bir sınıflandırma yaptığımızda NO üretiminin kolesterol ve trigliseridi 200 mg/dL'nin üzerinde olanlarda, altında olanlara göre azaldığını gözledik. Hasta grubunda ve sağlıklı grupta bu bulgunun anlamlı çıkmamasının muhtemel sebebinin istatistiksel analizlerde çok önemli olan vaka sayısından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

DM'de gözlenen artmış glikozilasyon son ürünlerinin NO ile reaksiyona girip NO'yu inaktive etmesi de çalışmamızda gözlediğimiz nitrit ve nitrat düzeylerindeki düşüklüğün muhtemel nedenleri arasında sayılabilir (29,49,69). Çalışma grubumuzda artmış glikozilasyon son ürünlerinden biri olan HbA1c düzeylerinin çok yüksek olması, bu yolun NO'nun azalmasında etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Yukarıda bahsettiğimiz nedenlerden dolayı gerek NO sentezi azalmakta gerekse NO reaksiyona girdiği bileşiklerle farklı forma dönüşmektedir. Bu farklı formları mevcut imkanlarımızla tespit etmemiz mümkün olmadığından sadece nitrit, nitrat düzeylerine bakarak DM'li hastalarda NO üretiminin azaldığını kesin olarak söylemek mümkün değildir. Bu amaçla NOS enziminin aktivitesi direkt belirlenmeli veya NO ile reaksiyon sonucu oluşan ürünlerin düzeyleri de belirlenmelidir. Bu dezavantajlara rağmen bir çok çalışmada serum nitrit, nitrat düzeylerinin NO sentez ve salınımı hakkında kabaca bilgi verdiği bildirilmektedir (56,57,69).

## 6-SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada 42 tip II diabet mellituslu hasta ile 40 sağlıklı kişide serum nitrit, nitrat, nitrit + nitrat, nitrit/nitrat, glukoz, kolesterol, trigliserid, LDL-K, HDL-K, apo AI, apo B, total kan HbA1c ve lökosit, eritrosit MDA düzeyleri değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda;

1. Diabet mellituslu hastaların kolesterol, trigliserid, LDL-K, apo B, HbA1c, glukoz, nitrit/nitrat, eritrosit MDA ve lökosit değerleri sağlıklı gruba göre yüksek bulunmuştur.
2. Diabet mellituslu hastaların nitrat, nitrit + nitrat ve HDL-K değerleri sağlıklı gruba göre düşük bulunmuştur.
3. Nitrit, nitrat, nitrit + nitrat düzeyleri ile apo AI ve HDL-K arasında pozitif korelasyon saptanmıştır.
4. Nitrit, nitrat ve nitrit + nitrat ile eritrosit MDA değeri arasında anlamlı negatif korelasyon tespit edilmiştir.

Bu bulguların ışığı altında:

Kontrolsüz DM'li hastalarda, artmış lipid ve lipoprotein düzeylerinin,  $\text{NO}_2^-$  ve  $\text{NO}_3^-$  düzeyleri ile dolayısıyla NO üretimiyle ters ilişkili olduğu, dolayısıyla ilave bir aterosklerotik risk oluşturduğu kanaatine varılmıştır.

Hastaların kan şekeri düzeylerinin uygun tedavi ile düzeltilmesi sırasında, gözlenen lipid ve lipoprotein bozukluklarının da mümkünse en kısa zamanda düzeltilmesi ve



tedaviye antioksidan ajanların eklenmesinin uygun olacağı kanaatindeyiz.

Hastaların kan şekerlerinin regüle ve unregüle dönemlerinde NO üretimi değerlendirilip bunun mevcut klinik bulgularla ilişkisini yorumlayan ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

İlaveten antioksidan sistemle ilgili çalışmalar da yapılabilir.

## ÖZET

Diabet mellitus, insülin eksikliğine veya dokularda etkisizliğine bağlı bir hastalıktır. DM'ye, hiperglisemi, hiperlipidemi, serbest radikal oluşumunun artması ve endotelyal hücrelerde nitrik oksit üretiminin azalması eşlik eder. Bu çalışmada, hasta grubunda serum nitrik oksit son ürünleri olan serum nitrit ve nitrat düzeyleri, serum lipid ve lipoprotein düzeyleri, lipid peroksidasyon markörü olan eritrosit malondialdehid (MDA) düzeyleri tespit edilerek, bu parametreler arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlandı.

Çalışma grubu olarak, HbA1c sonucuna göre seçilen 42 insülin bağımlı olmayan diabet mellituslu (NIDDM) hasta alındı. Ayrıca, cins ve yaşlarına göre çalışma grubuyla uyan 40 sağlıklı kişi kontrol grubu olarak alındı. Hasta ve kontrol gruplarında HbA1c, eritrosit MDA, serum glukoz, total kolestrol, trigliserid, LDL-kolesterol, HDL-kolesterol, apo AI, apo B, nitrit ve nitrat seviyeleri tespit edildi. Hastaların total kolestrol, trigliserid, LDL-kolesterol, apo B, HbA1c, glukoz, eritrosit MDA seviyeleri ve nitrit/nitrat oranı kontrol grubuna göre anlamlı seviyede yüksek bulundu. Bununla birlikte, HDL-kolesterol, nitrat, nitrit+nitrat düzeyleri ise kontrol grubuna göre önemli ölçüde düşük bulundu. Hasta grubunda yüksek apo AI ve düşük nitrit seviyesi gözlenmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Kan şekeri kontrolü iyi olmayan hastalara anormal lipid ve lipoprotein metabolizması, oksidan-antioksidan sistem dengesinde değişiklikler ve nitrik oksit sentezinin azalmasının eşlik ettiği ve bu değişikliklerin diabetik vasküler hastalıkların gelişiminde önemli rol oynadığı sonucuna varılmıştır.

## SUMMARY

### The Level of Serum Nitric Oxide and its Relationship with Lipid Parameters in Type II Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus is a disorder involving insulin deficiency or it does not act on tissues. It is also associated with hyperglycemia, hyperlipidemia, increased free radical generation and decreased nitric oxide production from endothelial cells. In the present study, it was aimed to determine serum lipid, lipoprotein, erythrocyte malondialdehyde (MDA) as a marker for lipid peroxidation levels, serum nitrite and nitrate levels as degradation products of nitric oxide, in the patients and also to investigate relationship among above mentioned parameters.

Study group was included 42 patients with noninsulin dependent diabetes mellitus (NIDD), who were chosen according to their respective HbA1c levels, and 40 sex and age matched healthy volunteers as a control group. HbA1c, erythrocyte MDA, serum glucose, total cholesterol, triglyceride, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, apo AI, apo B, nitrite and nitrate levels were determined in the patient and control groups. Total cholesterol, triglyceride, LDL-cholesterol, apo B, HbA1c, glucose, erythrocyte MDA levels and nitrite/nitrate ratio in the patients were found to be significantly higher than those of control group. However, HDL-cholesterol, nitrate, nitrite+nitrate levels in the patients were found to

be significantly decreased than those of control group. Increased apo AI and decreased nitrite levels were observed in the patients, but these were not found statistically significant.

It was concluded that the patient with unregulated blood glucose level is associated with abnormal lipid and lipoprotein metabolism, disturbance of balance for oxidant-antioxidant system and decreased synthesis of nitric oxide. It was suggested that these changes may play an important role for the development of diabetic vascular disorders.

## KAYNAKLAR

1. Davies MJ, Williams DRR, Metcalfe J: Community screening for non-insulin-dependent diabetes mellitus: Self-testing for post-prandial glycosuria. *Q J Med*, 86: 677-684, 1993.
2. Koloğlu S: Pankreas-Genel Bilgiler. *Endokrinoloji* (Koloğlu S, ed.). Network and Nobel, Ankara, 1996, s.359-386.
3. Brown WV: Lipoprotein disorders in diabetes mellitus. In *Lipid Disorders, The Medical Clinics of North America* (Hunninghake DB, ed.). WB Saunders Co., Philadelphia, 1994, pp 143-163.
4. Baynes JW: Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*, 40: 405-412, 1991.
5. Lyons TJ: Lipoprotein glycation and its metabolic consequences. *Diabetes*, 41: 67-73, 1992.
6. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID: Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*, 340: 1111-1115, 1992.
7. Minor RL, Myers PR, Guerra RJ, Bates JN, Harrison DG: Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen dioxides from rabbit aorta. *J Clin Invest*, 86: 2109-2116, 1990.
8. Roger H, Under WF, Daniel WF: Diabetes Mellitus. In *Williams Endocrinology Textbook*, Philadelphia, 1993, pp 1255-1333.

9. Bennet PH: Diabetes-definiton and pathogenesis. In Joslin's Diabetes Mellitus (Kahn CR, Weir GC, eds.), Lea&Febiger, 1994, pp 193-200.
10. Weir GC, Leahy JL: Pathogenesis of Non-insulin-dependent (type II) Diabetes Mellitus. In Joslin's Diabetes Mellitus (Kahn CR, Weir GC, eds.), Lea&Febiger, 1994, pp 240-265.
11. Muir A, Schatz DA, Maclaren NK: The Pathogenesis, Prediction, and Prevention of Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 21(2): 199-219, 1992.
12. Rosenstock JG, Vega GL, Raskin P: Improved diabetic control decreases LDLapoB synthesis in type I diabetes mellitus. *Arteriosclerosis*, 5: 513, 1985.
13. Gonnem B, White B, Schonfeld G: Plasma levels of apoprotein B in patients with diabetes mellitus: The effect of glycemc control. *Metabolism*, 34: 675-679, 1985.
14. Lopes-Virella M, Sherer G, Wohltmann D: Diabetic lipoprotein deficient serum: Its effect in low density lipoprotein uptake and degradation by fibroblasts. *Metabolism*, 34: 1079-1085, 1985.
15. Nikkila EA, Hormila P: Serum lipids and lipoproteins in insulin treated diabetics. Demonstration of increased high density lipoprotein concentrations. *Diabetes* 27: 1078- 1085, 1978.
16. Nikkila EA, Koosi T, Taskina MR: Role of lipoprotein lipase and hepatic endothelial lipase in the metabolism of high density lipoproteins: A novel concept on cholesterol transport in HDL cycle. In *Metabolic Risk Factors in Ischemic Cardiovascular Disease* (Carlson LA, Pernow B, eds.), New York, Raven Press, 1982, p 215.
17. Stamler J, Vaccara O, Neaton JD: Diabetes, other risk factors and 12-yr cardiovascular mortality for

- menscreened in the multiple risk factor intervention trial. *Diabetes Care*, 15: 434-444, 1993.
18. American Diabetes Association: Consensus Statement: Detection and Management of Lipid Disorders in Diabetes. *Diabetes Care*, 16: 106-112, 1993.
  19. Wink DA, Grisham MB: Direct and indirect effects of nitric oxide in chemical reactions relevant to biology. In *Methods in Enzymology* (Abenson JN, Simon IM, eds.), New York, Academic Press, 1996, pp 13-19.
  20. Yavuzer S: Serbest oksijen radikallerinde karşı savunma sistemleri, Hücre-II. Oksidan stres ve hücre hasarı. *TTB Tıpta Temel Bilimler Kolu, Sonbahar Okulu*, 1993, Kızılcahamam, 1993, s 6-9.
  21. Halliwell B: Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence? *The Lancet*, 344: 721-724, 1994.
  22. Akkuş İ: Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *Mimosa Yayınları*, Konya, 1995, s 1-128.
  23. Wolf SP: Diabetes mellitus and free radicals. *Br Med Bulletin*, 49: 642-652, 1993.
  24. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G: Diabetes mellitus, hypertension and cardiovascular disease: Which role for oxidative stress? *Metabolism*, 44: 363-368, 1995.
  25. Anggard E: Nitric oxide: Mediator, murderer, and medicine. *Lancet*, 343: 1199-1206, 1994.
  26. Yates MT, Lambert EL: A prospective role for nitric oxide in the oxydative modification of low density lipoproteins by mouse macrophages. *FEBS*, 309: 135-138, 1992.
  27. Steven AE, Madeleine FD, Gillian MT: Nitric oxide in biological fluids: Analysis of nitrite and nitrate by high-performance ion chromatography. *J Chromat A*, 706: 437-442, 1995.
  28. Young-Myeong K, Sun-Joo H: Counterprotective effect of erythrocytes in experimental bacterial peritonitis is



due to scavenging of nitric oxide and reactive oxygen intermediates. *Infect Immun*, Aug:3074-3080, 1996.

29. Wennmalm A: Endothelial nitric oxide and cardiovascular disease.  
*J Int Med*, 235: 317-327, 1994.
30. Belay T: Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction.  
*Free Rad Bio Med*, 16(3): 383-391, 1994.
31. 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*, 90: 2548-2554, 1992.
32. McVeigh GE, Brennan GM, Johnston GD, McDermott BJ: Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus.  
*Diabetologia*, 35: 771-776, 1992.
33. Cameron NE, Cotter MA: Impaired contraction and relaxation in aorta from streptozocin-diabetic rats: Role of polyol pathway.  
*Diabetologia*, 35: 1011-1019, 1994.
34. Langenstroer P, Pieper GM: Regulation of spontaneous EDRF release in diabetic rat aorta by oxygen free radicals.  
*Am J Physiol*, 263: H257-265, 1992.
35. Anderson KM, Castelli WP, Levy D: Cholesterol and mortality: 30 years of follow-up from the Framingham Study. *JAMA*, 257: 2176, 1987.
36. Efe H, Erem C, Değer O: Plasma malondialdehyde levels in NIDDM patients: Relationship with glycosylated hemoglobin and HDL-C.  
*Diabetes Research*, 31: 137-147, 1996.
37. Steiner G: The dyslipoproteinemias of diabetes.  
*Atherosclerosis*, 110: 27-33, 1994.

38. Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis- An update. *N Engl J Med*, 314: 488-500, 1986.
39. Austin MA, King MC, Vranizan KM: Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation*, 82: 495, 1990.
40. O'Brien KD, Chait A: The biology of the artery wall in atherogenesis. In *Lipid Disorders*, (Hanningshake DB, ed.), Philadelphia, WB Saunders Co., 1994, pp 47-67.
41. Kannel WB, McGee DL: Diabetes and cardiovascular disease: The Framingham Study. *JAMA*, 241: 2035-2038, 1979.
42. Krolewski AS, Kosinski EJ: Magnitude and detrminants of coronary artery disease in juvenile-onset insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Cardiol*, 14: 55-60, 1987.
43. Timothy JL: Glycation and oxidation: A role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Cardiol*, 71: 26B-31B, 1993.
44. Lyons TJ: Lipoprotein glycation and its metabolic consequences. *Diabetes*, 41(suppl.2): 67-73, 1992.
45. Fu MX, Knecht KJ, Thorpe SR: Role of oxygene in the cross-linking and chemical modification of collagen by glucose. *Proceedings of IDF Satellite Symposium. Diabetes*, 41: 42-48, 1992.
46. Vlassara H, Brownlee M, Cerami A: Novel macrophage receptor for glucose-modified proteins is distinct from previously described scavenger receptors. *J Exp Med*, 164: 1301-1309, 1986.
47. Wolff SP, Dean RT: Glucose autooxidation and protein modification: The potential role of "autooxidative glycosylation" in diabetes mellitus. *Biochem J*, 245: 243-250, 1987.
48. Tsilibary EC, Charonis AS, Gerritsen AG, Reger LA: Retinal mural cell response to non-enzymatically glucosylated basement membrane components. *Diabetes*, 40(2): 1206, 1991.

49. Bucala R, Tracey KJ, Cerami A: Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest*, 87: 432-438, 1991.
50. Tilton RG: Prevention of diabetic vascular dysfunction by guanidines. Inhibition of nitric oxide synthase versus advanced glycation end-product formation. *Diabetes*, 42: 221-232, 1993.
51. Lüscher TF, Noll G: Endothelium dysfunction in the coronary circulation. *J Cardiovas Pharma*, 24: 16-26, 1994.
52. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 43: 109-142, 1991.
53. Rubanyi GM: The role of the epithelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Car Pharma*, 22: 51-54, 1993.
54. Stocks J, Dormandy TL: The autooxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Br J Hematol*, 20: 95-111, 1971.
55. Fairbanks VF: Biochemical aspects of hematology. In *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, WB Saunders Co, Philadelphia, 1995, pp 1495-1588.
56. Moshage H, Kök B, Huizenka JR: Nitrit and nitrate determinations in plasma: A critical evaluation. *Clin Chem*, 41(6): 892-896, 1995.
57. Nims RW, Cook JC: Colorimetric assays for nitric oxide and nitrogen oxide species formed from nitric oxide stock solutions and donor compounds. In *Methods in Enzymology* (Abenson JN, Simon IM, eds.), Academic Press, New York, 1996, p 100.
58. Lopes-Virella MF, Wohltmann HJ, Loadholt JB: Plasma lipids and lipoproteins in young insulindependentdiabetic patients: Relationship with control. *Diabetologia*, 21: 216-223, 1981.

59. Bell SHD: Diabetes mellitus and coronary artery disease. *Coron Arter Dis*, 7: 715-722, 1996.
60. Thampson GR: Hiperlipidemi El Kitabı (Çev.E.Tamuğur) Uycan Yayınları, 1991, s 23-194.
61. Jialal I, Dabce F, Deveraj S: Antioxidans, LDL oxidation and atherosclerosis. *The Fats of Life*, 8: 3-15, 1995.
62. Hiramatsu K, Arimori S: Increased superoxide production by mononuclear cells of patients with hypertriglyceridemi and diabetes. *Diabetes*, 37: 832-837, 1988.
63. Haberland EM, Fong D, Cheng L: Malondialdehyde-altered protein occurs in atheroma of watanable heritable hyperlipidemic rabbits. *Science*, 241: 215-218, 1988.
64. Browne R, Armstrong D: The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compound related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. (Armstrong D, ed.), New York, Plenum Press, 1994, pp 43-58.
65. Assman G, Schule H: The prospective cardiovascular Munster (PROCAM) study: Prevalence of hyperlipidemia in persons with hypertension and/or diabetes and the relationship to coronary disease. *Am Heart J*, 116: 1713-1724, 1988.
66. Wendy J: Oxidized lipoproteins and nitric oxide. *Curr Opin Lipidol*, 7: 274-280, 1996.
67. Nova E, Noll G, Luscher TF: Nitric oxide in cardiovascular disease. *Ann Med*, 27: 343-351, 1995.
68. Liao JK, Shin WS: Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, 270(1): 319-324, 1995.
69. Hogan M, Cerami A, Bucala R: Advanced glycosylation end products block the antiproliferative effect of nitricoxide. *J Clin Invest*, 90: 1110-1115, 1992.