

**T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**İNSÜLİNE BAĞIMLI OLMAYAN DİABETES MELLİTUS'LU
HASTALARDA ENDOTELYAL NİTRİK OKSİD SENTAZ
(eNOS) GLU298ASP POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI**

Biyolog Burcu Bayođlu

YÜKSEK LİSANS TEZİ



İSTANBUL, 2007

**T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**İNSÜLİNE BAĞIMLI OLMAYAN DİABETES MELLİTUS'LU
HASTALARDA ENDOTELYAL NİTRİK OKSİD SENTAZ
(eNOS) GLU298ASP POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI**

Biyolog Burcu Bayođlu

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Belgin Súsleyici Duman

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL, 2007

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. KARBOHİDRAT METABOLİZMASI.....	5
4.1.1. İnsülin	6
4.1.2. İnsülin Reseptörü ve İnsülin Sekresyonu	6
4.1.3. Kan Glikoz Düzeyinin Hormonal Kontrolü	7
4.2. DİABETES MELLİTUS	8
4.2.1. Diabetes Mellitus Tanı Kriterleri.....	8
4.2.2. Diyabetin Etiyolojik Sınıflandırması.....	9
4.2.3. Tip 2 Diabetes Mellitus Risk Faktörleri	10
4.3. TİP 2 DİYABETİN GENETİĞİ.....	11
4.4. NİTRİK OKSİD	12
4.4.1. Nitrik Oksidin Görevleri.....	13
4.4.2. Nitrik Oksid Etki Mekanizması.....	13
4.4.3. Nitrik Oksid Sentaz (NOS) ve Görevleri.....	14
4.4.4. Endotelyal Nitrik Oksid Sentaz Geni	15
4.4.5. Endotelyal Nitrik Oksid Sentaz Geni Glu298Asp Polimorfizmi.....	17
4.4.6. Nitrik Oksid ile İlişkili Hastalıklar	17
4.4.7. Endotelyal Nitrik Oksid Sentaz Fonksiyon Bozukluğu ve Endotelyal Nitrik Oksid.....	18
4.4.8. Endotelyal Nitrik Oksid Sentaz ve Tip 2 Diyabet	19
4.5. POLİMORFİZM.....	22
5. MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
5.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE ÇÖZELTİLER	23

5.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	23
5.1.2. Kullanılan Çözeltiler	24
5.2. ÇALIŞMA GRUBU	25
5.2.1. Tip 2 Diyabet ve Sağlıklı Kontrol Grubuna Ait Klinik Veriler.....	25
5.3. KULLANILAN İNCELEME YÖNTEMLERİ.....	26
5.3.1. Kan Örneklerinin Alınması ve Saklanma Koşulları.....	26
5.3.2. Uygulanan Biyokimyasal Laboratuvar Analizleri.....	26
5.4. ENDOTELYAL NİTRİK OKSİD SENTAZ GEN ÇOĞALTILMASI VE GLU298ASP POLİMORFİZMİNİN TESPİTİ İLE İLGİLİ YÖNTEMLER	27
5.4.1. Kandan Genomik DNA İzolasyonu.....	27
5.4.2. DNA Miktarının Ölçülmesi	28
5.4.3. Primerlerin Hazırlanması.....	28
5.4.4. PZR Ürünlerinin Yatay Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi.....	29
5.4.5. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Analizi	30
5.5. İSTATİSTİKSEL DEĞERLEDİRME	31
6. BULGULAR	32
7. TARTIŞMA.....	44
8. SONUÇ.....	50
9. TEŞEKKÜR	51
10. KAYNAKLAR.....	52

SİMGE VE KISALTMALAR

A	: Adenin
Ach	: Asetilkolin
ADMA	: Asimetrik dimetil arjinin
Apo A1	: Apolipoprotein A1
Apo B	: Apolipoprotein B
Apo E	: Apolipoprotein E
Arg	: Arginin
Asp	: Aspartik asit
bç	: Baz çifti
BKI	: Beden-kitle indeksi
C	: Sitozin
Ca²⁺	: Kalsiyum
cAMP	: Döngüsel adenzin monofosfat
cGMP	: Döngüsel guanozin monofosfat
Cav-1	: Kaveolin-1
DAG	: 1, 2-diaçil gliserol
Dk	: Dakika
DM	: Diabetes mellitus
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleozid trifosfat
EDRF	: Endotelden türevlenen gevşetici faktör
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EC	: Endotelyal hücre
eNO	: Endotelyal nitrik oksid
eNOS	: Endotelyal nitrik oksid sentaz
ER	: Endoplazmik retikulum
Et	: Endotelin
G	: Guanin
Glu	: Glutamik asit
HDL	: Yüksek dansiteli lipoprotein
HIS	: Hepatik insulin hassasiyeti
HOMA	: β-hücre indeksi
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksid sentaz
IP₃	: İnositol 1, 4, 5 trifosfat
KVH	: Kardiyovasküler hastalık
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
Mİ	: Miyokard infarktüsü
mRNA	: Haberci ribonükleik asit
NO	: Nitrik oksid
NOS	: Nitrik oksid sentaz
Nt	: Nükleotid

nNOS	: Nöronal nitrik oksid sentaz
OD	: Optik dansite
PIP₂	: Fosfatidil inositol 4, 5-bifosfat
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RFLP	: Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
sn	: Saniye
T	: Timin
T2DM	: Tip 2 Diabetes Mellitus
TG	: Trigliserid
T-kol	: Total kolesterol

T.C. Kadir Has Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu tarafından alınan
01.02.2006 tarih ve 2006/001 nolu karar ile onaylanmıştır.

Araştırma Projesi Numarası: TBG/0202005

1. ÖZET

Çalışmamızın amacı, Tip 2 diyabet (T2DM) gözlenmiş hastalarda eNOS Glu298Asp polimorfizminin sıklığını belirlemek, eNOS Glu298Asp genotiplerinin (Glu/Glu, Glu/Asp/Asp) insülin ile ilişkili fenotipler ve serum lipidleri üzerindeki etkilerini saptamaktır.

Çalışma, T2DM tanısı konmuş 115 hasta (67 Erkek, 48 Kadın) ve klinik tanı yöntemleri ile T2DM olmadığı belirlenen 68 sağlıklı kontrol (47 Erkek, 21 Kadın) üzerinde yapıldı. eNOS genotipleri, polimeraz zincir reaksiyonu ve restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi yöntemlerinin uygulanması ile saptandı. eNOS geni Glu298Asp genotipleri, insülin ile ilişkili fenotipler ve serum lipid parametreleri açısından karşılaştırıldı.

Endotelial nitrik oksid sentaz Glu298Asp genotip frekansları Glu/Glu, Asp/Asp ve Glu/Asp için T2DM grubunda sırasıyla % 13.0, % 49.6 ve % 37.4; kontrol grubunda ise % 16.2, % 41.2 ve % 42.6 olarak saptandı. T2DM ve kontrol grupları arasında eNOS Glu298Asp genotip sıklıkları açısından istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadı. Açlık kan şekeri, insülin, HbA1c, insülin direnci, hepatik insülin hassasiyeti (HIS) ve β hücre indeksi (HOMA) düzeyleri T2DM ve kontrol grupları karşılaştırıldığında anlamlı bulundu ($p \leq 0.001$). T2DM grubunda Asp/Asp genotipine sahip kişilere ait HIS düzeyleri Glu/Glu genotipine sahip hastalara oranla daha düşük bulundu. İnsülin ve HOMA düzeyleri ise Asp/Asp genotipine sahip sağlıklı kontrollerde Glu/Glu genotipine kıyasla daha düşük bulundu. Ayrıca, Asp/Asp genotipine sahip tip 2 diyabetli kişilerde visceral obezite Glu/Glu genotipine sahip hastalara kıyasla daha yüksek bulundu. T2DM grubunda eNOS Glu298Asp polimorfizminin lipid düzeyleri üzerine bir etkisi saptanmazken, sağlıklı kontrol grubunda Asp/Asp genotipine sahip kişilerde Glu/Glu genotipine kıyasla daha düşük oranda serum apoB düzeyleri tespit edildi ($p \leq 0.05$).

Anahtar Kelimeler: eNOS, Glu298Asp, Tip 2 diyabet, hepatik insülin hassasiyeti, HOMA

2. SUMMARY

The aim of our study is to determine the frequency of eNOS gene Glu298Asp polymorphism in patients with Type 2 diabetes (T2DM) and to determine the effects of Glu298Asp genotypes (Glu/Glu, Glu/Asp, Asp/Asp) on insulin related phenotypes and serum lipids.

The study has been performed on 115 patients (67 Men, 48 Women) with T2DM and 68 healthy individuals (47 Men, 21 Women) proven not to have T2DM with clinical diagnosis methods. eNOS gene Glu298Asp genotypes were determined with polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism methods. The eNOS gene Glu298Asp genotypes have been compared with respect to insulin related phenotypes and serum lipid parameters.

The frequencies of eNOS gene Glu298Asp genotypes were found to be % 13.0 for Glu/Glu, % 49.6 for Asp/Asp and %37.4 for Glu/Asp in the T2DM group and % 16.2 for Glu/Glu, % 41.2 for Asp/Asp, %42.6 for Glu/Asp in the control group. No significant difference was observed for eNOS Glu298Asp genotype frequencies when T2DM and control groups were compared. A significant difference ($p \leq 0.001$) was observed for fasting glucose, insulin, HbA1c, insulin resistance, hepatic insulin sensitivity (HIS) and β -cell index (HOMA) levels when T2DM and control groups were compared. In T2DM group patients with Asp/Asp genotype were found to have lower HIS levels in comparison to Glu/Glu. In healthy controls, the insulin and HOMA levels were found to be lower in Asp/Asp genotype with respect to Glu/Glu genotype carriers. Also, in type 2 diabetic patients with Asp/Asp genotype, visceral obesity was found to be higher in comparison to Glu/Glu genotype. eNOS Glu298Asp polymorphism was not found to affect serum lipid levels in T2DM group. However in the healthy control group, lower serum apoB levels have been observed in Asp/Asp genotype when compared to Glu/Glu genotype carriers ($p \leq 0.05$).

Key Words: eNOS, Glu298Asp, Type 2 diabetes, hepatic insulin sensitivity, HOMA

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Tip 2 diabetes mellitus (T2DM), hiperglisemi, hiperlipidemi ve hiperaminozidemi ile karakterize sistemik bir hastalıktır (1). Genetik ve çevresel faktörler T2DM oluşumunda büyük rol oynar (2). T2DM gelişimini etkileyen risk faktörleri arasında; genetik yatkınlık, yaş, şişmanlık, düşük fiziksel aktivite, yüksek kan basıncı, HDL-kolesterol, trigliserid, metabolik sendrom, etnik köken, doğum ağırlığının düşük veya yüksek olması, prediyabet ve bazı endokrin hastalıklar sayılabilir. T2DM' un patogenezinde birçok faktörün insülin direnci ve β -hücre fonksiyon bozukluğu ile bağlantılı olduğu ileri sürülmüştür. T2DM' lu kişilerin büyük çoğunluğu şişman olduğundan yağ doku T2DM patogenezinde çok önemli bir rol oynamaktadır (2). T2DM' lu hastalardaki temel fizyopatolojik bozukluklar anormal insülin salınımı ve hedef dokularda insülin etkisine karşı dirençtir.

Endotelden salınan gevşetici faktör (EDRF) olup yarı ömrü çok kısa olan nitrik oksid (NO), tüm vasodilatörlerin aktif komponenti olması nedeni ile kalp-damar fizyolojisinin düzenlenmesinde önemli rol oynar. NO, L-Arjininden nitrik oksid sentaz (NOS) enzimi tarafından sentezlenir. NOS enziminin nöronal nitrik oksid sentaz (nNOS) (3,4), indüklenbilir nitrik oksid sentaz (iNOS) (5-7), endotelial nitrik oksid sentaz (eNOS) (8-12) olmak üzere üç izoformu vardır. eNOS hem in vivo hem de in vitro şartlarda sürekli sentez edilen tek NOS izoformudur (13).

Yirmi altı ekson içeren eNOS geni, 21 kilobazlık genomik DNA' dan oluşur. eNOS genine ait Glu298Asp polimorfizmi eNOS geninin 7. eksonunun 894. pozisyonundaki G-T nükleotid değişimi sonucunda oluşur. Bu değişim sonucunda eNOS proteininin 298. amino asiti olarak Glutamik asit yerine Aspartik asit kodlanır (14). eNOS geninde Glu298Asp polimorfizminin etkisi T2DM (15), kalp yetmezliği (16), koroner spazm (17), ateroskleroz (18), miyokard infarktüsü (Mİ) (19) ve hipertansiyon (19) gibi bir çok kalp-damar hastalığı ile ilişkilendirilmiştir. eNOS geni Glu298Asp polimorfizminin hipertansiyon ve spastik angina sıklığında artışa sebep olduğu bulunmuştur (20). Diğer bir çalışmada ise anormal koroner angiografik bulguların arttığı ve ateroskleroza yatkınlığın mevcudiyeti saptanmıştır (21, 22, 23). eNOS Glu298Asp polimorfizminin, sigara kullanımı, metabolik toksinler gibi çevresel

şartlardan etkilendiği ve sağlıklı kişilerde bazal NO üretiminde düşüş meydana getirdiği belirlenmiştir (21, 23, 24).

Bu çalışmanın amacı, T2DM tanısı konmuş hastalarda ve sağlıklı kontrollerde etiyolojik risk faktörlerinden biri olan eNOS geni Glu298Asp genotip sıklıklarının belirlenmesinin yanında insulin ile ilişkili fenotipler ve serum lipid parametreleri ile Glu298Asp genotiplerinin etkilerini araştırmaktır.

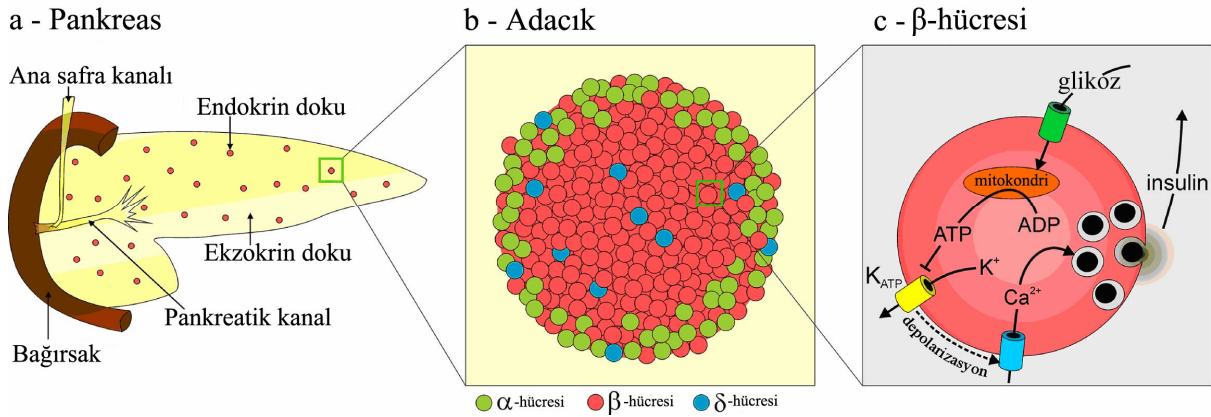
4. GENEL BİLGİLER

4.1. KARBOHİDRAT METABOLİZMASI

Kan glikoz seviyeleri enerji metabolizmasında temel rol oynar. Kan glikoz düzeyi glikozun alım ve sentezi yolu ile belirlenir. Glikoz dengesi; karaciğer ve böbrekler tarafından glikoz üretimi ile beyin, böbrekler, kas ve yağ doku tarafından kullanılan glikoza bağlıdır.

Pankreasta Langerhans adacıklarında hormon üreten hücreler karbohidrat metabolizmasında önemli rol oynar. Adacıklardaki α , β ve δ hücreleri sinsisyum oluştururlar. Pankreas adacıklarındaki α , β ve δ hücreleri sırasıyla glukagon, insülin ve somatostatin üretiminden sorumludurlar (Şekil 1).

Pankreas hormonlarının ana fonksiyonları besin maddelerini glikojen ve trigliserid şeklinde depolamak, glikoz oksidasyonu, açlıkta veya streste enerji depolarını mobilize etmek, kan şeker düzeyini sabit tutmak ve büyümeyi hızlandırmaktır (1, 25).



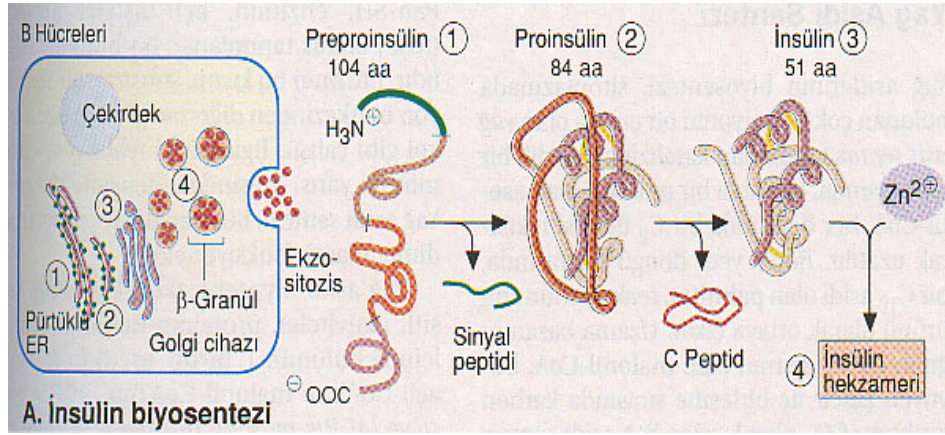
Şekil 1. a- Pankreas yapısı;

b- Pankreas adacığındaki α , β ve δ hücreleri;

c- Pankreas β -hücre; (26).

4.1.1. İnsülin

Panreatik β hücrelerinden salgılanan peptid yapıda bir hormon olan insülin, karbohidrat, lipid ve protein metabolizmalarını düzenler. İnsülin, 51 amino asitten oluşan bir peptiddir ve proinsülinin C zincirinin uzaklaşması ile (84 a.a) oluşur. Proinsülin preproinsülinin parçalanması sonucu ortaya çıkar. İnsülin A ve B zincirleri olmak üzere iki peptid zincirden oluşmaktadır. Bu zincirler iki disülfid bağı (S-S bağları) ile birbirlerine bağlıdır. Daha sonra proinsülin ve insülin içeren granüller oluşur. Pankreasın insülin içeriği kabaca 6-10 mg olup bunun 2 mg' ı günlük salgılanan miktardır. İnsülinin yarı ömrü yaklaşık 10-30 dakikadır ve çoğunlukla karaciğer ve böbreklerde parçalanır (Şekil 2) (25, 27).



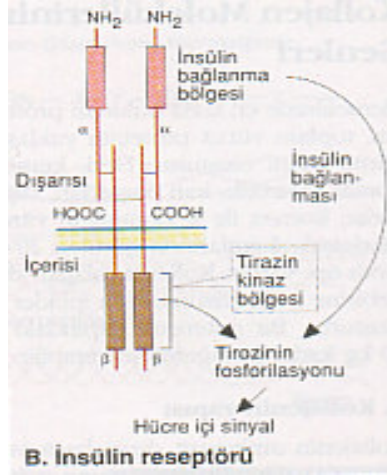
Şekil 2. İnsülin biyosentezi (27)

4.1.2. İnsülin Reseptörü ve İnsülin Sekresyonu

İnsülin reseptörü tüm vücutta bulunmasına rağmen kas, karaciğer ve yağ doku olmak üzere 3 ana hedef dokuda metabolik faaliyetini sürdürür.

İnsülin reseptörü 2 α altbirim ve 2 β altbirimden oluşmuş tetramerik bir komplekstir. Alfa altbirimler birbirleriyle ve beta altbirimlerle disülfid köprüleri ile kovalent olarak bağlanmışlardır. Ekstraselüler bölgede bulunan α altbirimler insülin bağlanma bölgelerine sahiptirler. Beta altbirimler transmembran bölgede bulunur ve tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. İnsülin molekülü ekstraselüler bölgeden dimer halindeki α altbirimlere bağlanır ve

onları aktive eder. İnsülin molekülünün bağlanmasıyla reseptörün katalitik bölgesi fosforile olarak aktifleşir. Otofosforilasyona uğrayan tirozin rezüdüler hücre içindeki hedef proteinler için yüksek ilgili bağlanma bölgeleri olarak görev yapar (28) (Şekil 3).



Şekil 3. İnsülin reseptörünün yapısı (29)

İnsülin, karaciğer başta olmak üzere glikoz depolanmasını artırarak hücre içi glikoliz düzeyinde ve glikogeneze artışa sebep olur. Böylece besin alınımını takiben glikozun plazma düzeyi düşürülür. İnce barsaktan absorbe olan glikozun yaklaşık üçte ikisi geçici olarak depolanır ve sindirim arası dönemde yeniden kullanılır. Bu sayede, glikoza ileri derecede bağımlı olan merkezi sinir sistemine besin alımından bağımsız şekilde glikoz sağlanmış olur. İnsülin ayrıca amino asitlerin proteinler şeklinde depolanmasını sağlar, büyümeyi hızlandırır ve vücutta K⁺ un dağılımını etkiler.

İnsülin fazlalığı hipoglisemiye yol açar. Aşırı miktarda karbohidrat alımı ile glikojen depo kapasitesi aşıldığında karaciğer glikozu yağ asitlerine dönüştürülür. Yağ asitleri yağ dokusuna taşınarak trigliserid şeklinde depo edilirler (25).

4.1.3. Kan Glikoz Düzeyinin Hormonal Kontrolü

İnsülin, glikozun kas ve yağ hücrelerine girişini kolaylaştırır. Karaciğer hücrelerinde ise glikozun, glikojen şeklinde depolanmasını uyarır. Glukagon ise karaciğer hücrelerinde, hücre

içi ikincil haberci molekül olan döngüsel adenozin monofosfat (cAMP) aracılığı ile glikojen kullanımını uyarır. İnsülin ve glukagon kan glikoz düzeyini sabit tutmak için birlikte çalışır (30). Plazma glikoz düzeyindeki artış insülin salınımını uyararak insülinin karaciğer hücre membranındaki reseptörlere bağlanmasına neden olur. Glikojen sentaz aktivitesinde artış meydana gelerek plazma glikoz düzeyi azalır ve glikoz glikojen şeklinde depolanır. Eğer plazma glikoz düzeyindeki artış sonucu insülin yağ ve kas hücre membranlarındaki reseptörlere bağlanırsa glikoz taşıyıcılarının aktivasyonu gözlenir ve glikoz alımındaki artış plazma glikoz düzeyinin azalmasını ve glikozun glikojen şeklinde depolanmasını sağlar. Plazma glikoz düzeyinde azalma ise glukagon salınımını uyararak glukagonun membran reseptörlerine bağlanması sağlar. Adenil siklazın aktivasyonu cAMP düzeyinde artış meydana getirir ve cAMP bağımlı kinazı aktive eder. Glikojen fosforilazın aktivasyonu ve glikojen sentazın inhibisyonu, glikojenin glikoza indirgenmesine ve glikozun kana karışmasına neden olur.

Yemek sonrası, plazma glikozundaki küçük bir artış pankreatik β hücrelerinden insülin salınımını artırır. Karaciğer tarafından glikoz üretimi azaltılarak, kas ve yağ dokunun glikoz kullanımını artırır. Tüm bu olaylar, gen transkripsiyonundaki değişimleri, glikojen sentezinde kullanılan enzimlerin sentez hızını, glikolitik yolu ve lipid metabolizmasını etkiler (2).

4.2. DİABETES MELLİTUS

4.2.1. Diabetes Mellitus Tanı Kriterleri

Dünya Sağlık Teşkilatı' nın 1997 ve Amerikan Diyabet Birliği' nin 2006 tanı kriterlerine göre; rastgele bir plazma örneğinde glikoz düzeyinin 200 mg/dl' den fazla olması veya 10-12 saatlik bir açlıktan sonra açlık plazma glikoz düzeyinin 126 mg/dl' den fazla olması Diabetes Mellitus olarak tanımlanır (31, 32).

Açlık kan glikozu 126 mg/dl' nin altında fakat 100 mg/dl' nin üzerinde olan hastalarda insülin salınımının ilk fazının bozulmuş olabileceği düşünülür ve bozulmuş açlık glikozu olarak isimlendirilir. 75 g glikozun oral yolla verilmesi ile 2. saat plazma glikoz değerinin ölçülmesi oral glikoz tolerans testi (OGTT) olarak adlandırılır. OGTT ile açlık kan glikozu

126 mg/dl' nin altında bulunan hastalarda OGTT 2. saat değerinin 140 mg/dl' den yüksek 200 mg/dl' den düşük olması bozulmuş açlık glikozu olarak isimlendirilir ve diabetes mellitus tanı kriterlerinden bir diğeridir (Tablo 1).

Tablo 1. Diabetes Mellitus tanı kriterleri

	Plazma Glikoz Seviyesi (mg/dl)	
	Açlık Plazma Glikozu	Oral Glikoz Tolerans Testi ile Ölçülen Plazma Glikozu
Diyabet	≥126	veya ≥200
Bozulmuş Açlık Glikozu	≥100<126	
Bozulmuş Glikoz Toleransı		≥140<200

4.2.2. Diyabetin Etiyolojik Sınıflandırması

Diabetes Mellitus;

- Tip 1 Diyabet
- Tip 2 Diyabet
- Gestasyonel Diyabet
- Diğer Spesifik Diyabet Tipleri olarak sınıflandırılır.

Tip 1 diyabet, insüline bağımlı diabetes mellitus veya juvenil başlangıçlı diabetes mellitus olarak da isimlendirilir. T hücreleri aracılığıyla pankreatik β hücrelerinin otoimmün harabiyeti söz konusudur. İnsülin yetersizliği görülür (32).

Gestasyonel diyabet, gebelik esnasında ortaya çıkar. Çoğunlukla üçüncü trimesterde gelişir. Kesin tanısı için doğumdan 6 hafta sonra açlık plazma glikoz düzeyleri tayin edilmelidir. Bu hastaların tip 2 diyabet geliştirme riski oldukça yüksektir.

Diğer spesifik diabetes mellitus tipleri içerisinde tip 1 ve tip 2 diyabet ile ilişkisi olmayıp etiyojileri bilinen diyabet tipleri bulunur. Pankreas hastalıkları (kronik pankreatit, hemakromatoz), hormon bozuklukları (feokromositoma, akromegali), ilaçlar ve kimyasal maddeler (kortikosteroid, tiazid), insülin reseptör anomalileri (Kahn A, B, C tipi), genetik sendromlar (Wermer sendromu, Alström sendromu).

Tip 2 diabetes mellitus (T2DM), hiperglisemi, hiperlipidemi ve hiperaminozidemi ile karakterize sistemik bir hastalık olup tüm diabetes mellitus vakalarının % 90' ını oluşturur. T2DM insülin direnci ve/veya insülin salgılanma kusuru sonucu ortaya çıkar. T2DM aynı zamanda insüline bağımlı olmayan diabetes mellitus veya 40 yaşından sonra ortaya çıktığı için erişkin başlangıçlı diabetes mellitus olarak isimlendirilir. Heterojen ve çok genli bir hastalıktır. Beyaz ırkın %5-10' unu etkiler. Yaşla beraber sıklığı artar (32).

4.2.3. Tip 2 Diabetes Mellitus Risk Faktörleri

Tip 2 diabetes mellitus, genler ve çevresel faktörler tarafından ortaya çıkan çok genli bir hastalıktır. T2DM' un görülme sıklığındaki bu hızlı artışın sebebi ikincil faktörler olan obezite, hipertansiyon ve fiziksel aktivite eksikliğidir. T2DM' un tanımlanmış risk faktörleri aşağıda sıralanmıştır (2).

- 1. Genetik Yatkınlık :** T2DM aile hikayesi olan kişilerin hastalığı geliştirme riskleri yüksektir.
- 2. Yaş :** Genellikle 40-45 yaş üzeri T2DM gelişimi için bir risk faktörüdür.
- 3. Obezite :** T2DM hastalarının çoğu şişmandır. Şişmanlık, karaciğerde ve periferde azalmış insülin faaliyeti ile bağlantılıdır. Şişmanlık ile T2DM arasındaki bağlantı birçok mekanizmanın sonucu ortaya çıkar. Plazma serbest yağ asitlerinin (FFA) artışı, adipositlerden tümör nekroz faktörü α' nın salınımı bunlardan birkaçıdır (2).
- 4. Fiziksel Aktivite :** Fiziksel aktivite yoksunluğu T2DM ile bağlantılıdır. Çalışmalar; egzersizin, insülin etkisini artırdığını ve kas hücrelerindeki glikoz taşıyıcılarının da düzenlenmesini artırdığını göstermektedir (2).
- 5. Hipertansiyon :** Kan basıncının >140/90 mmHg olması T2DM gelişiminde ve T2DM' a bağlı makrovasküler komplikasyonların oluşumunda etkili bir risk faktörüdür.
- 6. HDL-Kolesterol :** Çalışmalar yüksek HDL-kolesterolün T2DM için potansiyel bir koruyucu faktör olduğunu göstermektedir (33). HDL-kolesterolün 35 mg/dl' den düşük olması T2DM için bir risk faktörüdür.
- 7. Trigliserid :** Trigliserid düzeyinin 250 mg/dl' den yüksek olması T2DM için bir risk faktörüdür.

8. Metabolik Sendrom : İnsülin direnci sendromu olarak da bilinen metabolik sendrom, T2DM için bağımsız bir risk faktörüdür (34).

9. Doğum Ağırlığı : Düşük veya yüksek doğum ağırlığı T2DM için bağımsız birer risk faktörüdür. Doğum ağırlığının çok yüksek olduğu durumlarda annede gestasyonel diyabet görülmesi söz konusu olup ileride T2DM gelişmesi için bir risk faktörüdür. Yüksek doğum ağırlıklı bebekte de T2DM için genetik yatkınlık bulunmaktadır (35).

10. Etnik Köken : Çalışmalar ve yapılan demografik gözlemler sonucu T2DM prevalansı çeşitli toplumlarda incelenmiştir. Çin toplumunda ve Papua Yeni Gine’de prevalans %1 gibi oldukça düşük bir değere sahipken, Kuzey Amerika’da bulunan Pima Hintlilerinde %50 gibi oldukça yüksek bir değere sahiptir (2).

11. Prediyabet : Oral glikoz tolerans testi ile belirlenen glikoz değerinin 140’ tan yüksek 200’den az olduğu durum bozulmuş glikoz toleransı olarak bilinir. Bu tip hastaların yaklaşık %30’ unda 10 yıl içinde DM gelişme riski bulunmaktadır (36).

12. Bazı Hastalıklar : Polikistik over sendromu ve bazı endokrin hastalıklar (hipertiroidi, akromegali...) T2DM gelişimi için birer risk faktörüdür.

4.3. TİP 2 DİYABETİN GENETİĞİ

Tip 2 diabetes mellitus’ ta hastalığın ortaya çıkışı birçok gen lokusuna bağlıdır ve hepsinin küçük de olsa etkileri vardır. Multifaktöriyel bir hastalık olan T2DM’ ta genler sadece kendi aralarında etkileşmez. Aynı zamanda çevresel faktörlerle de etkileşir. İnsülin aktivitesi ve salınımı bir çok lokusta genetik varyansa sahiptir. Bu multifaktöriyel modele göre; hastalığa yatkınlık, değişik genetik varyantların (genotiplerin) ve çevresel faktörlerin birleşmesiyle kendini gösterir (2). Obezite ve tip 2 diyabetin genetiği çoğunlukla çakışır.

Tip 2 diyabet aday genleri üç ana gruba ayrılır (37);

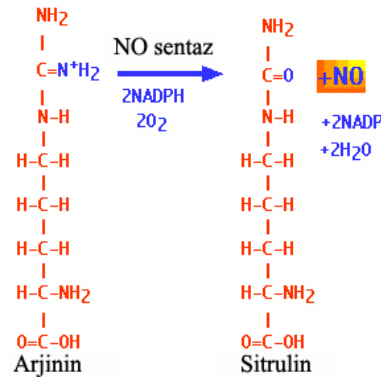
1. Pankreatik β -hücre fonksiyonu ile ilgili olan genler (CDX2, NEUROD1, PAX4, PAX6, HNF4A, TCF1, TCF2, ABCC8, ADCYAP1R1, CPE, GCK, GLP1R, INS, KCNJ11, SLC2A2).

2. Ana hedef dokular olan kas, karaciğer ve yağ dokularında insülin faaliyeti ve glikoz metabolizmasını etkileyen genler (*INSR Sinyal Yolu Aracılığı ile Etki Edenler*; AKT1, AKT2, CAV3, FOXO3A, FYN, GRB10, GRB14, GRB2, GRB7, INSR, IRS1, PDE3B, PIK3CA, PIK3R1, RPS6KA2, SLC2A4, SOS1, SOS2. *İnsülin Faaliyetinin Negatif Regülatörü Aracılığı ile Etki Edenler*; AHSB, ENPP1, GH1, INPPL1. *Karbohidrat Metabolizması Aracılığı ile Etki Edenler*; FBP1, GPD1, HK1, HK2, PFKM, SLC2A5, G6PT1, GYS1, GYS2, PPP1CC, PPP1R3A, PPP2R1A, PCK1).

3. Enerji girişi ve kullanımı, yağ metabolizması gibi diyabet ile ilgili süreçleri etkileyen genler (*Lipid Metabolizması Aracılığı ile Etki Edenler*; CETP, FABP2, FABP4, LIPC, LIPE, PLCG1, PPARG. *Beslenme Davranışı/Enerji Homeostazı Aracılığı ile Etki Edenler*; GAL, PPARGC1, ADRB3, PYY. *Diğerleri*; USF1, KCNJ6, STXBP3, SGNE1, NCOA1, RXRG, ABCC9, ENPP2, GC, **NOS3 (eNOS)**).

4.4. NİTRİK OKSİD

Nitrik oksid (NO) 1995 yılında keşfedilmiştir. NO' in bulunmasından kısa bir süre sonra endotelial nitrik oksid sentaz geni (eNOS) klonlanarak bu enzimin substratı olan L-Arginin tanımlanmıştır (17, 38, 39, 40). NO, endotelden üretilip salgılanan ve damar düz kasının gevşemesini sağlayan gevşetici faktördür (EDRF) (17, 38, 41, 42). NO, lokal vasküler denge için esansiyel olup, kimyasal olarak stabil olmayan bir serbest radikaldir. 5-10 saniye arasında değişen yarı ömrü nedeniyle hücre dışı alanda sadece lokal bir etkiye sahiptir. NO, tüm nitrovazodilatörlerin aktif komponentidir (13, 16, 17, 39) (Şekil 4).



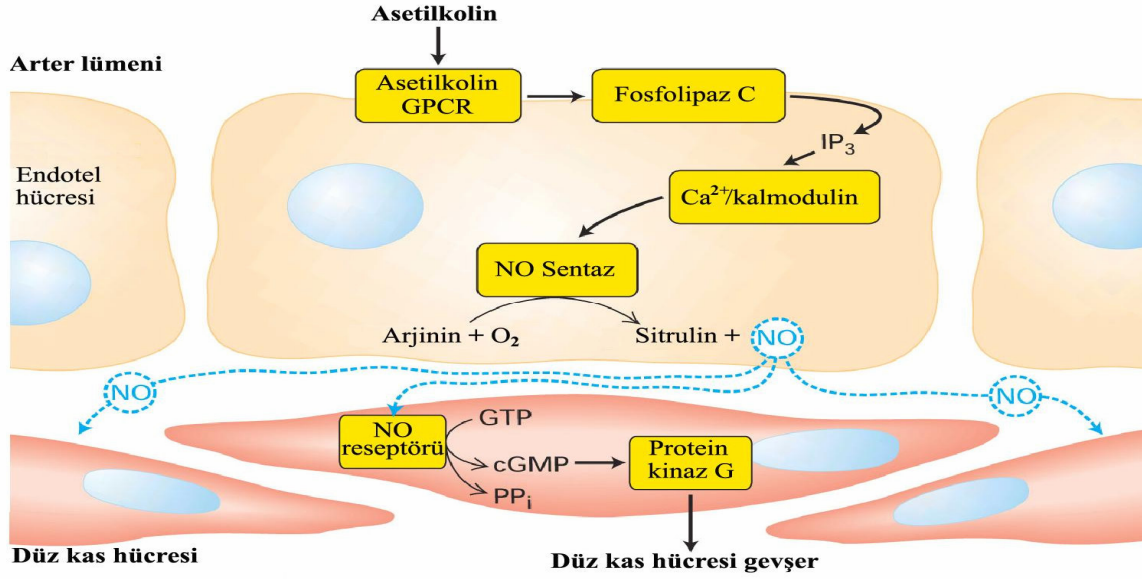
Şekil 4. L-Arjininden NOS enzimi aracılığıyla NO sentezi

4.4.1. Nitrik Oksidin Görevleri

Nitrik oksidin başlıca görevleri arasında damar düz kas hücrelerinin gevşemesini artırmak, trombosit aktivasyonunun inhibisyonu, damar düz kas hücrelerinde büyüme ve göçün baskılanması ve damar duvarında sentezlenen endotelin' in düzenlenmesi yer alır (43, 44). NO aynı zamanda, düz kas hücre proliferasyonunu önler, platelet yapışkanlığını ve endotel tabakasının lökositlerin üzerine yapışmasını azaltır. NO' in antiinflamatuvar, antioksidan ve antifibrotik etkileri vardır (45). NO eksikliğinde vasküler endotelin artışına bağlı olarak periferik dirençte artış meydana gelir (46, 47, 48). NO, hemoglobin tarafından etkisizleştirilir.

4.4.2. Nitrik Oksid Etki Mekanizması

Nitrik oksid sentezinde etkili olan başlıca uyaranlar; kan akımının damar üzerinde oluşturduğu basınç, asetilkolin ve bradikinindir (47, 49, 50). Asetilkolin, endotel hücre yüzeyinde bulunan G proteine bağlı reseptöre bağlanır. G proteininde oluşan konformasyonel değişiklikle fosfolipaz-C aktive olur. Aktifleşen fosfolipaz-C, fosfatidil inositol bifosfat' ı (PIP₂) fosfatidil inositol 1,4,5- trifosfat (IP₃) ve 1,2-diaçil gliserol' e (DAG) dönüştürür. Sitoplazmada IP₃ seviyesinin artışı endoplazmik retikulumda (ER) depolanan Ca⁺², un sitoplazmaya geçişini tetikler. Sitozolda oluşan Ca⁺²/ kalmodulin kompleksinin NOS enzimini aktive etmesi sonucu L-Arginin ve O₂' den, sitrulin ve NO sentezlenir (Şekil 5) (47, 51, 52).



Şekil 5. Nitrik oksid etki mekanizması

Endotel hücrelerinden salınan NO, düz kas hücrelerine difüzyon ile geçer. Kas hücresi içerisinde artan NO konsantrasyonu, döngüsel Guanozin monofosfat (cGMP) artışını tetikleyerek protein kinaz G'yi aktive eder. Hücre içi Ca²⁺ seviyesi azalır ve kas hücresi gevşer (28, 47, 52).

Nitrik oksid sentazı inhibe eden çeşitli arginin türevlerinin deney hayvanlarına verildiğinde gözlenen kan basıncındaki ani yükselme, NO'nun fizyolojik rolünü desteklemektedir. Normal kan basıncının korunması için NO'nun tonik salınımı gerekmektedir.

4.4.3. Nitrik Oksid Sentaz (NOS) ve Görevleri

Nitrik oksid sentaz, L-Argininden NO sentezler. NOS üç izoenzim ailesinden oluşur. Bunlar;

-nNOS: Nöronal izoformdur. Sempatik sinir sonlarında bulunur.

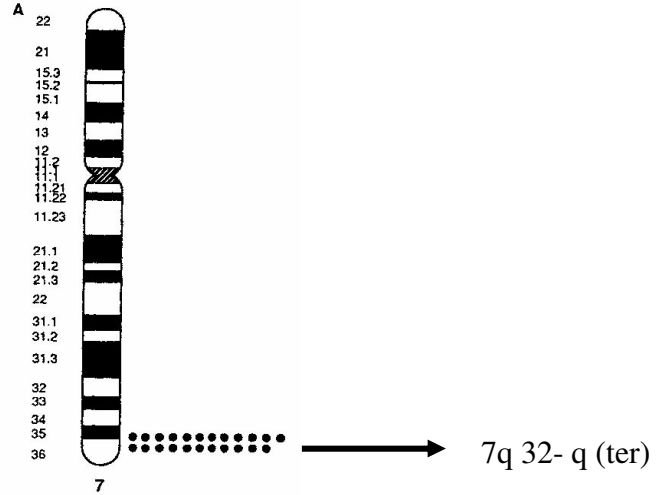
-iNOS: Uyarılabilir izoformdur. Aktif makrofajlar ve miyositlerde bulunur.

-eNOS: Endotelial izoformdur. Vasküler endotel, trombositler ve endokardiyumda bulunur (16, 53).

Nitrik oksid sentazın endotelyal ve nöronal izoformları Ca^{+2} /kalmodulin mekanizmasına bağımlı bir şekilde bazal NO seviyesini az miktarda yükseltir. Buna karşılık iNOS doğru fizyolojik uyarın verildiğinde yüksek seviyelerde NO üretir. Bu üretim Ca^{+2} dan bağımsızdır. NOS enziminin her üç izoformu kalpte mevcuttur. eNOS vasküler endotel tarafından hem in vivo hem de in vitro şartlarda sürekli sentez edilen tek NOS izoformudur (16, 20, 53).

4.4.4. Endotelyal Nitrik Oksid Sentaz Geni

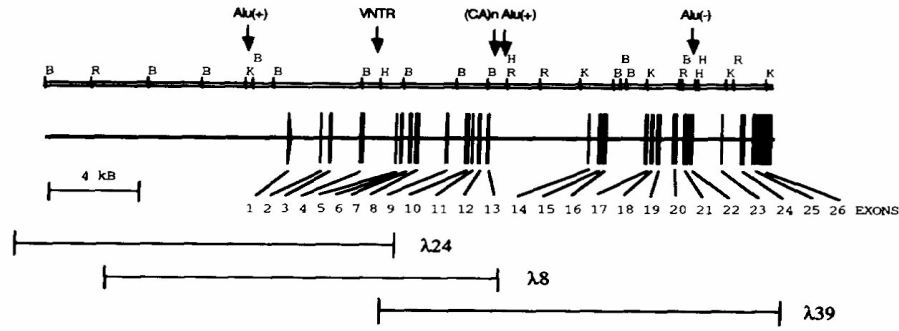
Endotelyal nitrik oksid sentaz geni 7q 32-q terminal (ter) bölgesinde yer alır (Şekil 6). eNOS geni 1203 amino asitten oluşan eNOS enziminin transkripsiyonundan ve sentezinden sorumludur.



Şekil 6. eNOS geninin yerleşimi

İnsan eNOS genine ait genomik klonlar kodlanmış ve genin yapısal organizasyonu belirlenmiştir. eNOS genine ait ayrıntılı bilgiler Şekil 7, Tablo 2 ve Tablo 3' te görülmektedir. Yirmi altı ekson içeren eNOS geni 21 kilobazlık genomik DNA' dan oluşur. Kodladığı haberci RNA (mRNA) 4052 nükleotid içerir ve haploid genomda tek kopya olarak bulunur. eNOS geninin 5' flanking bölgesi TATA kutusu içermez. TATA kutusunun görevi proksimal promotör elementler tarafından üstlenilmiştir. Bu elementler endotel hücresinin yapısal genlerinde bulunan promotör elementler ile uygunluk göstermektedir. Sterol düzenleyici cis elementleri, SP1, CRE, GATA, NF-1, AP-1, AP-2 ve p53 eNOS geninin proksimal promotör elementleridir (13).

Endotelial nitrik oksid sentaz



Şekil 7. eNOS geninin yapısal organizasyonu

Endotelial nitrik oksid sentaz geninde intron-ekson sınırlarında donör-akseptör kuralına uygun olarak intronların 5' ucunda GT, 3' ucunda ise AG baz çiftleri bulunmaktadır. Eksonlar, 5' ve 3' uçlarında aynı tip yapışkan uçlar taşımaları şartı ile intronik rekombinasyon yolu ile yerleştirilebilir, çıkarılabilir ve duplike olabilirler. Eksonların uzunluğu 67 ile 579 bp arasında değişiklik gösterir. 5, 15, 21 ve 25. intronlar yaklaşık 80 bp.' lik en kısa uzunluğa sahiptir (Tablo 2, 3).

Tablo 2. İnsan eNOS geni ekson özellikleri ve intron-ekson bağlantıları

İntron	ekson	5' Donör	3' Kabul eden	Ekson
1	ACAG	GTAAGG	CCTGGCTCCCAACAG	CCCC
2	GCAG	GTAAGG	ACTCCCTCGACCCAG	GATG
3	AGAG	GTGACA	CCCTCTCTCCCCAG	GAGC
4	GCAG	GTGCGG	CCTCGGCTGGCTCAG	GTGT
5	TTCG	GTGAGT	CCCATGCGTGCCAG	CTCG
6	CGAG	GTGGGC	GCCCACTCCCAACAG	CTCT
7	CCAC	GTGAGC	CCCAACACCCCCAG	GCTG
8	GGAG	GTGAGG	ACCCTTCTGCCCCAG	GATG
9	CCAG	GTGCAG	CTCTCTCCCTTCCAG	CTAG
10	CCAG	GTGCC	TCATCTCTTGCAAG	CCAG
11	CCAA	GTGGGT	CTTCTCTCCCGCAG	CGCC
12	CCGG	GTAGGG	TCTTCCACCCACAG	GTCC
13	AGAG	GTGAGA	CACTCCCTCGCCAG	AGCT
14	ACAA	GTGAGT	GTCTCTCTTGCCAG	GAGT
15	TCAG	GTCAGG	ACCCCTGCACCCAG	GTC
16	CCAG	GTGAGC	CCGCTGTCCCGCAG	GCCG
17	CCAG	GTGGGC	CCTCCCGCCCCAG	GTCT
18	CCAC	GTGAGG	TCTCCCAACCCCCAG	GAGG
19	CCTG	GTGAGG	GTGCACTATCCCCAG	GTGG
20	CCAG	GTGGG	ATCCTGCCCGCCAG	GATC
21	CAGG	GTGAGG	CCTTCCCAACCCCCAG	ATGG
22	GGGG	GTAAGT	TGTCTCTCTGCCAG	GGCT
23	AAAG	GTGAGG	CGGGGTGCTTGCAG	GGCT
24	CAAG	GTGTGA	CCGCGCCCGCCAG	ACCT
25	GCGG	GTGCGG	GCTCTTTCCGACAG	GATC

eNOS genine ait, intron-ekson bağlantılarında, intronların 5' ucunda GT, 3' ucunda ise AG baz çiftleri (bp) bulunmaktadır.

Tablo 3. Endotelyal nitrik oksid sentaz geninde intron/ekson yerleşimleri ve uzunlukları

Ekson	boyut	amino asit	özellik	intron	bç	tip	
1	180	53	5'-UTR, asetilasyon	1	1235	II	
2	112	37		2	≈300 ^a	0	
3	149	50		3	≈1200 ^a	II	
4	163	54		4	≈1400 ^a	0	
5	92	31		5	90	II	
6	142	47		6	265	0	
7	140	47		7	104	II	
8	175	58		8	≈500 ^a	0	
9	102	34		9	≈700 ^a	0	
10	195	65		10	115	0	
11	74	26	{Ca ²⁺ Kalmodulin	11	203	II	
12	145	48		12	234	0	
13	105	35	FMN bağlanma	13	≈4300 ^a	0	
14	68	23		14	391	II	
15	117	39		15	96	II	
16	175	58		16	≈1700 ^a	0	
17	133	44		17	125	I	
18	79	27		18	130	II	
19	188	62		19	530	I	
20	173	58		{FAD bağlanma	20	309	0
21	211	70			21	91	I
22	88	30		22	≈1200 ^a	II	
23	122	40	{NADPH bağlanma	23	758	I	
24	149	50		24	337	0	
25	195	65		25	89	0	
26	580	53	3'-UTR bölgesi				

eNOS geninde tip I, II ve III intronların görülme sıklığı sırası ile % 48, % 16 ve % 36' dır. eNOS geninin 26. eksonunun 3' ucunda poliadenilasyon sinyali (AATAAA) bulunmamaktadır (16).

4.4.5. Endotelyal Nitrik Oksid Sentaz Geni Glu298Asp Polimorfizmi

Endotelyal nitrik oksid sentaz genine ait Glu298Asp polimorfizmi 7. eksonun 894. pozisyonundaki G-T nükleotid değişimi sonucu eNOS proteininin 298. amino asidi olarak "Glutamik Asit" yerine "Aspartik Asit" kodlanır (14).

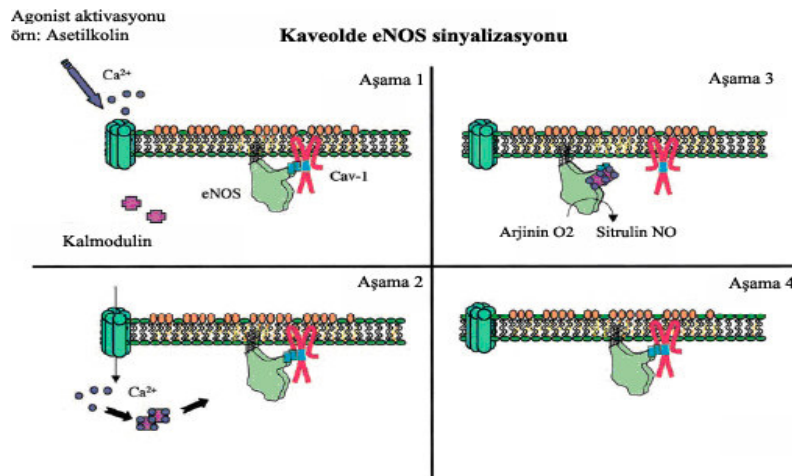
4.4.6. Nitrik Oksid İle İlişkili Hastalıklar

Endotelyal nitrik oksid sentaz genine ait Glu298Asp polimorfizmi ile T2DM (15), kalp yetmezliği (16), koroner spazm (17), ateroskleroz (18), Mİ (19), hipertansiyon (19) gibi bir çok kalp-damar hastalığı ilişkilendirilmiştir. Nitrik oksid üretimi kalp yetmezliğine karşı koruyucu bir etkiye sahiptir. McNamara ve arkadaşları, eNOS aktivitesi bulunmayan Asp298 varyantının kalp yetmezliğinin oluşumunu artırdığını göstermişlerdir (16). eNOS genine ait

Glu298Asp polimorfizmini homozigot mutant olarak taşıyan kişilerde ateroskleroz, koroner spazm, koroner arter hastalığı ve Mİ riskinin arttığı çeşitli çalışmalarla bildirilmiştir (54-56).

4.4.7. Endotelial Nitrik Oksid Sentaz Fonksiyon Bozukluğu ve Endotelial Nitrik Oksid

Endotelial nitrik oksid sentaz fonksiyon bozukluğu ve NO seviyesinin azalması ile ilişkili faktörler arasında lipidler, reaktif oksijen türleri (ROS), glikozillenmiş eNOS ve eNOS Glu298Asp polimorfizmi yer almaktadır (45). eNOS plazma membranının kaveolünde lokalize olmuştur (30). Kaveolde, sinyal molekülleri arasında en iyi çalışılmış olan eNOS' dur. Kaveolin-1 (Cav-1) ile etkileşmeyen, kaveollere lokalize olmuş eNOS optimal enzimatik fonksiyona sahiptir. Ancak, Cav-1 ile interaksiyona girmek eNOS fonksiyonunu inhibe eder. Kaveoller çoğu sinyal proteininin bazal aktivitesini inhibe eden, genel negatif regülatörler olarak fonksiyonlarını sürdürürler. Kaveoldeki eNOS lokalizasyonu maksimum eNOS aktivitesi için gerekli olduğu halde; Cav-1, bu aktiviteyi eNOS ile etkileşime girerek inhibe edebilir. Şekil 8' de kaveolde eNOS aktivasyon ve inhibisyon döngüsü anlatılmıştır. Cav-1 eNOS aktivitesini kuvvetli bir şekilde inhibe eder (Şekil 8, Aşama 1). Asetilkolinin agonist aktivasyonu ile Ca^{2+} sitozole geçer ve kalmoduline bağlanır (Şekil 8, Aşama 2). Ca^{2+} ile aktive olmuş kalmodulin eNOS' a bağlanır. Böylece Cav-1' in kuvvetli inhibisyonu hafifletilerek NO üretilir (Şekil 8, Aşama 3). Cav-1 eNOS' a tekrar bağlanarak döngü tamamlanır (Şekil 8, Aşama 4) (57).



Şekil 8. eNOS sinyal mekanizmasının hücre membranının kaveolünde gösterilmesi (57)

Endotelyal nitrik oksid sentazın görevi endotelyal nitrik oksid (eNO) üretimini dengelemektir. eNO endotel hücresi tarafından sentezlenen, doğal yollarla meydana gelen endojen, zincir kıran bir antioksidandır. eNO sağlıklı endotel ile, superoksit [O₂⁻] ise fonksiyonel olmayan endotelle ilişkilidir (45).

4.4.8. Endotelyal Nitrik Oksid Sentaz ve Tip 2 Diyabet

Endotelyal nitrik oksid sentaz reaksiyonu 3 koldan gerçekleştirilen bir reaksiyon olup eNO üretiminden sorumludur.

eNO üretiminde L-arginin Kolu

L-arginin substratı esansiyel bir amino asit olup ateroskleroz ve tip 2 diyabet ile ilişkili olan ateroskleropate mevcut olan fonksiyonel olmayan endotel hücrelerinin yüksek oranda ihtiyaç duydukları bir amino asittir. Endojen olarak üretilen asimetrik dimetil arginin (ADMA) endotel hücre fonksiyon bozukluğunun en önemli sebeplerinden biridir. Nadir olarak görülen arginin eksikliği ADMA ve Nitroarginin ile kompetitif inhibisyonu sonucunda oluşabilir. ADMA L-argininin endojen olarak üretilen kompetitif inhibitörü olup, eNOS enziminin eNO üretmek için kullandığı doğal substratı olan L-arginin düzeylerinde azalmaya yol açabilir. ADMA düzeylerinin yükselmesi arginin N-metil transferaz (PRMTs) proteinin artmış sentezi veya dimetil arginin dimetil amino hidrolaz (DDAH) enzimi tarafından azalmış eliminasyonu ile gerçekleşir (58-61). DDAH selektif olarak ADMA' yı L-sitrulin ve dimetil amine hidroliz eder. Bu sebeple DDAH aktivitesi artınca ADMA düzeyleri azalır. DDAH aktivitesinin inhibisyonu ise ADMA düzeylerini artırır. Normal ve okside LDL-kolesterolün PRMT sentezini uyarırken DDAH aktivitesini düşürdüğü bildirilmiştir (62). Bu ise ADMA düzeylerini yükselterek endotel hücre fonksiyon bozukluğuna ve artmış oksidatif strese yol açarak ateroskleroz ve tip 2 diyabetle ilişkili ateroskleropatiye yol açar. Tip 2 diyabetli ve normal kişilere L-arginin infüzyonu yapıldığında Homosistein düzeylerinin düştüğü, NO düzeylerinin yükseldiği ve oksidatif stresin ortadan kalktığı görülmüştür (63). Bu sebeple artmış ADMA düzeyleri sonucunda ortaya çıkan L-arginin eksikliği oksidatif strese yol açarak insülin direnci, metabolik sendrom ve tip 2 diyabete sebep olabilir.

eNOS Kolu

Endotelial nitrik oksid sentaz enziminin aktivasyonu için gerekli önemli agonistler NO üretiminde önemli bir rol oynarlar. eNOS geni çıkartılmış fare modelinde eNOS enzimi hiç bulunmadığından bu farelerde insülin direnci, hipertansiyon, hiperlipidemi geliştiği görülmüştür (64). Duplain ve arkadaşları eNOS' un insülin sensitivitesinin düzenlenmesinde çok önemli bir rolü olduğunu kanıtlamışlardır (64). eNOS enziminin 1203 amino asitlik proteininde yapılacak olan bir veya birkaç değişiklik tip 2 diyabetik fenotiplerin ortaya çıkması için yeterli olmaktadır. Poligenik bir hastalık olan T2DM ve ateroskleropatide önemli rolü bulunan eNOS genine ait polimorfizm Glu298Asp' tır. Gen polimorfizmlerinde eNOS aktivitesi bozulmuştur ve anormal yapı meydana gelmektedir. Glu298Asp polimorfizmi hipertansiyon ve spastik angina (20), ateroskleroz (21, 22, 23) ortaya çıkma sıklığını artırır (20). Glu298Asp polimorfizminin sağlıklı kişilerde bazal NO düzeyini azalttığı Veltman ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (24). Glu298Asp polimorfizmi diğer gen polimorfizmleriyle etkileştiği gibi aynı zamanda sigara, obezite, insülin direncinden sorumlu toksisiteler (ROS, O₂, H₂O₂), metabolik sendrom ve T2DM ile de etkileşebilir. Japon (21), İngiliz (23) ve İtalyan (24) toplumlarında Glu298Asp polimorfizmi ateroskleroz ve koroner arter olaylarıyla ilişkili bulunmuştur. Veltman ve arkadaşları (24) bu gen polimorfizminin farklı hasta popülasyonlarında geniş bir dağılım gösterdiğini ve hasta popülasyonlarının yaklaşık %10' unda mevcut olduğunu göstermişlerdir. Noili ve arkadaşları renal hastalığı bulunan T2DM' lu kişilerde, Glu298Asp polimorfizmi ile hastalık arasında bir ilişki bulmuşlardır (65). Bu çalışma endotel hücresi ve eNOS reaksiyonunun önemini göstermektedir.

BH₄ Kolu

Tetrahidrobiopterin (BH₄), L-arginini NAD(P)H oksidaz enzimine bağlayan ve L-arginini okside edip NO ve L-sitruiline çeviren önemli bir kofaktördür. Bu kofaktörün ve mekanizmasının önemi yeni anlaşılmaya başlanmıştır. Eğer bu kofaktör doğru olarak işlev görmezse, tüm eNOS reaksiyonu bozulur ve endotel bozulan NAD(P)H oksidaz reaksiyonu içinde superoksit [O₂'] üreticisi olur. BH₄ önemli bir kofaktör olmasına ek olarak; [O₂'] ve

peroksinitrit [ONOO'] gibi reaktif oksijen türlerini (ROS) temizleyen doğal bir antioksidandır. Eğer BH₄ miktar ve işlev olarak yetersiz ise eNOS reaksiyonu sadece sonradan oluşan fazla [O₂]' i ve [ONOO']' i ayırmaz; aynı zamanda yüksek miktardaki lokal ROS' u temizleyecek daha az BH₄ oluşturma dezavantajı oluşur (66). Bu önemli kofaktörün eNOS reaksiyonunu yürütmeyi sürdürebilmesi için direkt folik asit etkisi gereklidir. ADMA üretimindeki azalma folik asitin yardımıyla indirekt olarak sağlanır. T2DM' lu hastalara folik asit vermek, endotelial gevşeme için bir gelişmedir. Bu olay homosisteinin düşürülmesinden çok daha hızlı gerçekleştirilir (67, 68). eNOS reaksiyonunun 3 kolunun önemine bakıldığında; ateroskleroz, insülin direnci, metabolik sendrom, prediyabet ve T2DM ile ilişkili endotelial fonksiyon bozukluğu görülen bu hastaların tedavi örneğinde 2 olası değişiklik vardır. Birinci olarak, hastalığın ilerlemesini azaltmak için global risk azalması yaklaşımına ihtiyaç vardır. İkinci olarak, tedavi örneğine folik asit ve arginin eklemek gereklidir. T2DM günümüzde koroner risk ile eşdeğerdir. Bu yüzden tüm T2DM' lu ve diyabetik olmayan aterosklerotik hastalara folat takviyesi yapılmalıdır.

Folik asit (5-MTHF)

B vitamini son zamanlarda, kardiyovasküler hastalıklar (KVH), nörodejeneratif hastalık, nöral tüp defektleri ve kansere karşı pozitif etkisiyle ilgi kazanmıştır. Folik asit, homosisteinin remetilasyonunda önemli bir rol oynar, böylece yükselen homosistein seviyelerini düşürür (69). Folat metabolizmasının yetersizliği veya bozulması hiperhomosisteinemi (hHcy), hipometilasyon, DNA hasarı ve bozulan hücre proliferasyonu, malinansi ve bozulmuş eNO üretimi ile ilişkilidir (70-74). 5-MTHF bir elektron donörü, hidrojen donörü ve bir metil donörüdür. Tüm bu özellikler, folik asitin fonksiyonu ile ilgili tek bir rolü gösterir. eNOS reaksiyonu için önemli bir kofaktör olan BH₄' i oluşturmak üzere BH₂ ve BH₃' e hem hidrojen hem de elektron sağlar. Bu özellik eNOS reaksiyonunun tekrar oluşabilmesine olanak sağlar. Böylece eNO tekrar üretilir ve T2DM ve hiperlipidemideki endotelial vazodilatasyon yenilenir (75). Son yıllarda İsviçre halkında yapılan kalple ilgili çalışmalarda, folik asit, B12 ve B6 vitamin kombinasyonunun stent restenozu ve 1 yıllık takipte rastlanan hastalık tekrarlarında azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir (76-78).

Nitrik oksid sentaz, NO ve redoks stresi T2DM oluşumunda rol alır. L-arjinin eksikliği ve eNOS' un inhibitörü olan ADMA seviyelerindeki artış; oksidatif strese ve insülin direnci, metabolik sendrom, prediyabet, T2DM nedeniyle oluşan ateroskleropatiye sebep olur (45). T2DM' un vasküler bir hastalık olup olmadığı halen tartışma konusudur. Azalmış nitrik oksid üretimi ve endotel hücre fonksiyon bozukluğu ile disfonksiyonel eNOS enzimi reaksiyonu oluşur ve bunun sonucu da T2DM ortaya çıkar.

Tip 2 diabetes mellitus KVH için artan morbidite ve mortalite gelişimi ile karakterize olması nedeniyle kardiyovasküler bir hastalık olarak düşünülebileceği ileri sürülmüştür. T2DM ve KVH' lar ortak genetik ve çevresel etmenler tarafından geliştirilir. İnsülin direnci patogenezinde kas ve yağ dokusu önemli rol oynar. Kalori alımının fazla olması sonucunda sitrik asit döngüsündeki substrat fazlalığına bağlı uyarılı artış, mitokondrial NADH (mNADH) ve ROS' un miktarını yükseltir. İn vitro çalışmalar ve hayvan modelleri anti oksidanların, insülin hassasiyetini düzelttiğini göstermektedir (79).

Fazla kalori alımı ve düşük fiziksel aktivite hücrelerde glikoz ve serbest yağ asiti miktarlarını artırır. Glikoz ve yağ asitlerinin enerjiye dönüşümüne, oksidatif stres eşlik eder. Oksidatif stres, kas hücreleri ve adipositlerde insülin direnci oluşumuna yol açarken, pankreatik β -hücrelerinde ve endotel hücrelerinde fonksiyon kaybına neden olur. Oluşan post-prandiyal hiperglisemi ile oksidatif stres uyarılır. Hem bozulmuş glikoz toleransı hem de diyabet esnasında oluşan oksidatif stres KVH gelişimine zemin hazırlar (79).

4.5. POLİMORFİZM

Aynı tür organizmalar genellikle birbirinden farklı fenotip gösterirler. Bu farklılıklar genetik olarak belirlenmiştir ve polimorfizm olarak isimlendirilir. Bir çok gen lokusunda iki allel yer alır. Mutasyonların fenotipe farklı yansımalarının nedeni çoklu allellerin varlığındandır. Genetik polimorfizm, bir popülasyonda, farklı allelere bağlı, genetik olarak belirlenmiş iki veya daha çok alternatif fenotipin görülmesidir. Çoklu allel içeren bir bölge polimorfiktir (80, 81).

5. MATERYAL VE YÖNTEM

5.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE ÇÖZELTİLER

5.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- 1) Gene Ruler™ 100 bp DNA moleküler ağırlık merdiveni (Fermentas, # SM0241)
- 2) Ban II restriksiyon enzimi, 1500 U (Fermentas, # ER0281)
- 3) Nükleotidler dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Fermentas, #R0141, #R0151, #R0161, #R0171)
- 4) Taq DNA polimeraz (Fermentas, # K0163)
- 5) 10 X PZR Tamponu (Fermentas, # B15)
- 6) Agaroz, (Sigma A # 5093)
- 7) Tris baz, (Sigma T 8524)
- 8) Sukroz, (Sigma S 2395)
- 9) Magnezyum klorür (MgCl₂), (Sigma M 0250)
- 10) Potasyum klorür (KCl), (Sigma P 4504)
- 11) Borik asid, (Merck K21183760)
- 12) Primerler (IDT, #14846500, #14846498)
- 13) Proteinaz K, (Sigma P 4914)
- 14) Bromfenol mavisi, (Merck 8122)
- 15) Etidyum bromid (EtBr), (Applichem 1239-45-8)
- 16) Polaroid film, (Sigma 3000/36°C (677), F 4638)
- 17) Sodyum klorür (NaCl), (BDH GPR™ 301237S)
- 18) Sodyum hidroksit (NaOH), (Merck UN 1823)
- 19) Sodyum dodesil sülfat (SDS), (Sigma, L4390)

5.1.2. Kullanılan Çözeltiler

1. Jele Yükleme Tamponu
% 0.25 Bromfenol mavisi
2. EtBr: 10 mg/dl
EtBr 0.2 g
H₂O 20 ml
3. % 1.5' lik Agaroz (mini jel)
Agaroz 0.6 g
10 X TBE 40 ml
EtBr 5 µl
4. % 2' lik Agaroz (midi jel)
Agaroz 2 g
10 X TBE 100 ml
EtBr 15 µl
5. Proteinaz K: çift distile suda 20 mg/ml
6. PZR primerleri: 0.5 pmol/ µl
7. dNTP' ler: 10 mM
8. 1 X TBE
Tris baz 10.8 g
Borik asit 5.5 g
0.5 M EDTA 4 ml, pH 8.0
H₂O 1 lt
9. TE: Tris 1M, EDTA 0.5 M
10. 10 X PZR Tamponu
11. Nükleaz Tamponu
Tris baz 10 mM
NaCl 400 mM
EDTA 2 mM

12. Lizis Tamponu
NH₄Cl 155 mM
KHCO₃ 10 mM
EDTA 0.1 mM
13. % 10 SDS
Tris baz 15.1 g
Glisin 72 g
SDS 5 g
H₂O 1 lt
14. 1 M EDTA (pH 8.0)
Na₂EDTA X 2H₂O 37.2 g
NaOH 10 M
H₂O 0.1 lt
15. 1 M KCl
KCl 74.6 g
H₂O 1 lt

5.2. ÇALIŞMA GRUBU

5.2.1. Tip 2 Diyabet ve Sağlıklı Kontrol Grubuna Ait Klinik Veriler

Toplam 115 tip 2 diyabetik hasta (67 Erkek, 48 Kadın) ve 68 sağlıklı kontrol (47 Erkek, 21 Kadın) ile çalışıldı. Tip 2 diyabetik hastalar, Ocak 2005-Ekim 2005 tarihleri arasında Çağlayan Florence Nightingale Hastanesi' ne her 1-2 ayda bir rutin tetkiklerini yaptırmaya gelenler arasından seçildi. Diabetes mellitus, açlık plazma glikozu ≥ 140 mg/dl ve/veya 75 g oral glikoz yüklemesinden 2 saat sonra plazma glikozu ≥ 200 mg/dl olarak teşhis edildi. Kontrol grubu Ocak 2005-Ekim 2005 Çağlayan Florence Nightingale Hastanesi merkez laboratuvarına rutin sağlık kontrolleri için müracaat edip diyabeti, kalp hastalığı ve hipertansiyonu olmadığı tespit edilen kişilerden oluşturuldu.

Tip 2 diyabetik hasta ve kontrol gruplarında bulunan kişiler Türkiye' nin değişik bölgelerinden gelmekte ve çalışma grubundaki hiçbir kimse arasında akrabalık ilişkisi bulunmamaktadır. Tüm tip 2 diyabetik hastaların hepatik ve endokrin fonksiyonları normal olup, HbA1c düzeyleri %8' in altında idi. Hasta ve kontroller yaş, cinsiyet ve beden-kütle indeksi (BKİ) açısından eşleştirilerek seçildi. Hasta ve kontrol gruplarındaki kişilere çalışmanın amacı açıklanarak izinleri alındı.

Hastaların yaş, boy, kilo, sigara, içki kullanıp kullanmadıkları, beslenme alışkanlıkları, egzersiz, kendilerinde veya ailelerinde diyabet, kalp hastalığı, anne ve baba arasında akrabalık olup olmadığı sorularak saptandı. Hastaların tamamı oral antidiyabetik ilaç kullanmakta olup, kontrollerin hiçbiri ilaç kullanmamakta idi.

5.3. KULLANILAN İNCELEME YÖNTEMLERİ

5.3.1. Kan Örneklerinin Alınması ve Saklanma Koşulları

Hasta ve kontrol grupların açlık periferik kan örnekleri 5 ml' lik vakumlu steril K₃-EDTA' lı ve antikoagülan içermeyen steril tüplere alındı. K₃- EDTA' lı kanlar alındıkları andan itibaren ilk 3-5 gün içerisinde genomik DNA' ları izole edilene kadar +4°C' de saklandı. Antikoagülan içermeyen tüplere alınan kandan, serum hemen ayrılarak lipid ölçümleri yapıldı.

5.3.2. Uygulanan Biyokimyasal Laboratuvar Analizleri

Hasta ve kontrol örneklerinin biyokimyasal analizlerinden total-kolesterol, trigliserid, apolipoprotein E (Apo E), apolipoprotein A1 (Apo A1), apolipoprotein B (Apo B), açlık kan şekeri, insülin ve HbA1c değerlerinin ölçümü yapıldı. Total- kolesterol, trigliserid, Apo E, açlık kan şekeri otoanalizörde ve serumla çalışıldı. Serum Apo A1, Apo B değerleri nefelometrede ölçüldü. Serumlar ön işleme tabi tutulmadan analiz edildi. Lipid ya da apolipoprotein düzeyleri referans değerlerinin üzerinde olan örnekler ise çift distile su ile sulandırılarak ölçüldü. Şişmanlığı değerlendirmede, beden kütle indeksi (BKİ) *Quatelet's*

(ağırlık (kg) / uzunluk² (m²)) formülüne göre hesaplandı (82). BKİ 25 ve üzerinde olan kişiler şişman olarak değerlendirildi.

5.4. ENDOTELYAL NİTRİK OKSİD SENTAZ GEN ÇOĞALTILMASI VE GLU298ASP POLİMORFİZMİNİN TESPİTİ İLE İLGİLİ YÖNTEMLER

Hasta ve kontrol grubuna ait kişilerden alınan venöz kan örneklerinden, genomik DNA' ların izolasyonunu takiben 517 bç uzunluğundaki eNOS gen ürününü çoğaltmak amacıyla polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) uygulandı. Çoğaltılan ürünler, eNOS Glu298Asp genotiplerinin belirlenmesi amacıyla restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) yöntemine tabi tutuldu.

5.4.1. Kandan Genomik DNA İzolasyonu

Yüksek tuz konsantrasyonu kullanılarak genomik DNA aşağıda belirtilen yöntemle göre izole edildi (83).

1. 0.5 ml EDTA' lı periferik kan üzerine 1.5 ml lizis tamponu eklendi. (Lizis tamponu: 155 mM NH₄Cl; 10 mM KHCO₃; 0.1 mM EDTA)
2. +4°C' de 15 dakika (dk) inkübe edildi.
3. 5000 rpm' de 10 dk. santrifüj edildi.
4. Süpernatant atıldı ve pellet üzerine lizis tamponu eklendi.
5. 5000 rpm' de 10 dk. santrifüj edildi.
6. 4. ve 5. basamaklar 2-3 kez tekrar edildi.
7. Nükleus pelleti üzerine, 150 µl nükleaz tamponu (Nükleaz tamponu: 10 mM Tris-base; 400 mM NaCl; 2 mM EDTA) , 20 µl çift distile su, 1.5 µl proteinaz K ve 2.5 µl % 10 SDS eklendi.
8. Karışım 37 °C' de bir gece inkübasyona bırakıldı.
9. İnkübasyon sonrası 1:1 oranında çift distile su ve 5 M NaCl karışıma ilave edildi.
10. 10000 rpm' de 20 dk. santrifüj edildi.

11. Süpernatant başka bir tüpe aktarılarak üzerine saf etanol eklendi ve tüp birkaç kez altüst edilerek karıştırıldı.
12. 10000 rpm' de 5 dk. santrifüj edildi.
13. Pellet üzerine %70 izopropanol eklendi ve DNA çöktürüldü.
14. Süpernatant atıldı ve pellet 200 µl 1X TE içerisine çözdürüldü.

5.4.2. DNA Miktarının Ölçülmesi

İzole edilen DNA' nın konsantrasyonu 260 nm' deki optik dansitesinden (OD), saflığı da 260 nm/280 nm' deki OD oranından tespit edildi (84).

5.4.3. Primerlerin Hazırlanması

Endotelyal nitrik oksit sentaz geni Glu298Asp genotiplerinin belirlenmesi için ileri (298F) ve geri (298R) primerler (HPLC yöntemi ile saflaştırılmış) kullanıldı. Liyofilize formdaki primerler DNaz, RNaz içermeyen çift distile saf su ile çözdürüldü (100 pmol/ µl). Sulandırılmış primer stokları (10 pmol/ µl) -20°C' de kullanılıncaya dek muhafaza edildi.

Oligonükleotid Primerlerin Dizisi

Endotelyal nitrik oksid sentaz Glu298Asp genotiplerini belirlemek amacıyla PZR reaksiyonunda kullanılan ileri (298F) ve geri (298R) primerlerin dizileri aşağıdaki gibidir.

298F : 5'- GACCCTGGAGATGAAGGCAGGAGA -3'

298R : 5'- ACCACCAGGATGTTGTAGCGGTGA -3'

Standart 25 µl' lik PZR reaksiyon karışımı 0.2 ml' lik ince duvarlı PZR tüplerinde Tablo 4' te belirtildiği gibi hazırlandı.

Tablo 4. eNOS Glu298Asp PZR reaksiyon karışımı içeriği

Kullanılan temel komponentler	Final Konsantrasyon
10 X PZR tamponu	2.5 µl
MgCl ₂	2.0 mM
İleri primer (10 pmol/µl)	0.4 µM
Geri primer (10 pmol/µl)	0.4 µM
dNTP'ler (2 mM)	200 µM
Taq DNA polimeraz (5 U/ µl)	0.5 U
Kalıp DNA	100 ng
Çift distile su	Total hacim 25 µl' ye tamamlanır

Total hacimleri 25 µl olan PZR karışımları termal döngü cihazında çoğaltılan ürünler restriksiyon yapılarına dek - 20°C' lik derin dondurucuda saklandı.

PZR Programı

1. 95 °C' de 5 dk. denatürasyon
2. 30 kez tekrarlanacak şekilde;
 - 94 °C' de 1 dk.
 - 58 °C' de 1 dk.
 - 72 °C' de 1 dk. sentez ve uzama
3. 72 °C' de 5 dakika

5.4.4. PZR Ürünlerinin Yatay Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi

PZR ürünlerinin jel elektroforezinde kullanılacak agaroz jelin konsantrasyonu ayrıştırılmak istenen parçanın büyüklüğüne göre değişmektedir. Bu çalışmada çoğaltılan eNOS geninin PZR ürünleri (517 bç) % 1.5' lik agaroz jelde yürütüldü. Agaroz jeller ultraviyole (UV) ışık altında incelendi.

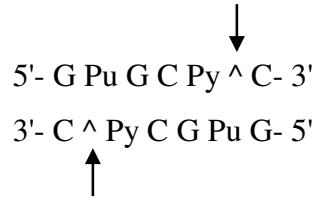
Mini jel kasetinin büyüklüğüne göre tartılan 0.6 g agaroz, 10 X ana stoktan sulandırılmış 40 ml 1 X TBE tamponu içerisinde kaynatıldı. Elle tutulabilecek sıcaklığa (55-50°C) düştüğünde 5 µl etidyum bromid eklendi. İyi karıştırılıp kaset üzerine döküldü. Cepleri oluşturacak tarak yerleştirilip donması bekledi. Tarak dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra jel elektroforez tankına geçirildi.

5 µl PZR ürünleri 2 µl yükleme tamponu ile karıştırılıp ceplere yüklendi. Jeldeki DNA, Consort E861 elektroforez sistemi ile 90 V gerilimde ve 1X TBE tamponu içerisinde 30 dakika yürütüldü. PZR ürünlerinin büyüklükleri Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder moleküler ağırlık standardı ile karşılaştırılarak belirlendi.

5.4.5. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Analizi

Prokaryotlardan izole edilen, çift iplikli DNA' da özel dizileri tanıyan ve DNA' yı belli noktalardan kesen enzimlere restriksiyon enzimleri adı verilir (85). Bakteriler, sahip oldukları restriksiyon endonükleazları ile virus DNA' sını bozarak bakteri hücrelerini virus saldırısına karşı korumaktadır. Bu enzimler, DNA' da 4-8 nükleotidlik spesifik dizileri tanırlar. Bazı restriksiyon endonükleazları, kesilen parçaların her iki ucunda kısa, tek zincirli DNA kuyrukları oluşturur. Bu tip uçlar yapışkan uçlar olarak tanımlanır. Yapışkan uçlar aynı enzim ile kesim sonucu oluşan diğer uçlarla komplementer baz çiftleri oluşturabilir. Bu şekilde herhangi iki DNA fragmanı yapışkan uçları sayesinde kolayca birbirine bağlanabilir. Bazı enzimler ise DNA' daki tanıma noktalarında aynı noktadan karşılıklı kesim yaparlar ve küt uçlu olarak adlandırılırlar. EcoRI, HindIII, Pst I enzimleri yapışkan uçlar, HpaI gibi enzimler ise küt uçlar oluştururlar.

eNOS Glu298Asp genotiplerinin belirlenmesi amacıyla amplifiye edilen PZR ürünleri Ban II (Eco241) enzimi ile kesildi. Ban II restriksiyon endonükleazı DNA parçalarında yapışkan uç oluşturan bir enzimdir. Ban II enziminin tanıdığı nükleotid sırası aşağıdaki gibidir.



Şekil 9 . Ban II (Eco241) enziminin kesim bölgesi

Restriksiyon enzimlerinin optimal aktivite gösterdikleri iyon konsantrasyonu ve ısıları farklıdır. 20 µl PZR ürünü için 3 U (0.3 ml) Ban II enzim eklendi ve 37°C' lik etüvde 1 gece inkübe edildi.

5.5. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

İstatistiksel analiz Unistat 5.1 software programı kullanılarak yapıldı. Değerler ortalama \pm standart hata (SE) olarak ifade edildi. Genotipler ile tip 2 diyabet ve diğer risk faktörleri arasındaki ilişki iki yönlü varyans analizi ile tespit edildi. $p \leq 0.05$ değerleri istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi. Hasta ve kontrol grubundaki parametreleri karşılaştırmak için Student- t testi kullanıldı. Hasta ve kontrol grubundaki genotip frekansları χ^2 testi ile karşılaştırıldı. Bonferroni testi ile her bir parametre için genotipler birebir karşılaştırıldı. Çalışılan hasta grubunda eNOS Glu298Asp polimorfizmi T2DM için bağımsız bir risk faktörü oluşturmadığından Lojistik Regresyon analizi yapılmasına gerek duyulmadı.

6. BULGULAR

Bu çalışmada 115 tip 2 diyabetli hasta ve 68 sağlıklı kontrol ile çalışıldı. Tip 2 diyabet grubu, yaş ortalamaları 58.23 ± 0.93 olan 67 erkek ve 48 kadından, kontrol grubu ise yaş ortalamaları 55.30 ± 1.46 olan 47 erkek ve 21 kadından oluşturuldu.

Çalışma grubunu oluşturan tip 2 diyabet ve kontrol gruplarına ait demografik özellikler Tablo 5' te verilmiştir. Gruplar ağırlık, boy, BKİ, bel, kalça ve bel/kalça değerleri açısından karşılaştırıldıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi (Tablo 5).

Tablo 5. Hasta ve kontrol gruplarının demografik özellikleri açısından karşılaştırılması

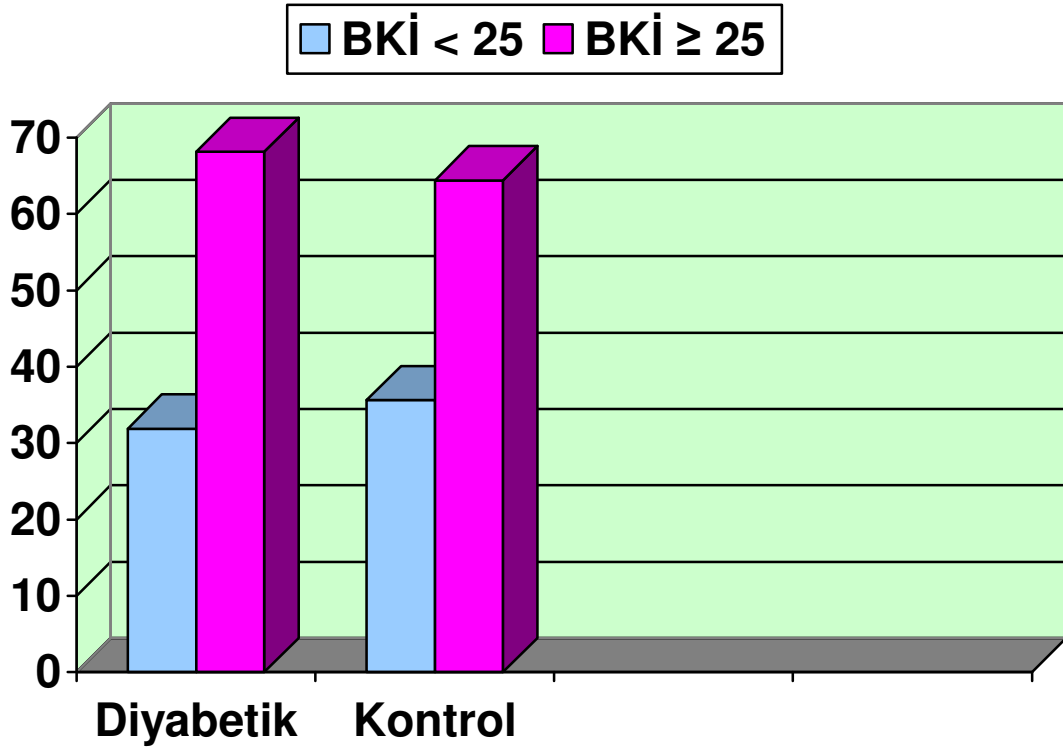
Parametre	Hasta (n=115)	Kontrol (n=68)	p
Ağırlık (kg)	73.63 ± 1.17	72.50 ± 1.53	AD
Boy (m)	1.64 ± 0.00	1.63 ± 0.01	AD
BKİ (kg/m^2)	27.39 ± 0.41	27.19 ± 0.50	AD
Bel (cm)	96.83 ± 1.80	95.88 ± 2.61	AD
Kalça (cm)	103.69 ± 0.82	103.88 ± 0.97	AD
Bel/Kalça	0.92 ± 0.01	0.91 ± 0.02	AD

Değerler ortalama \pm Standart hata olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı olmayan sonuçlar AD olarak belirtilmiştir.

Çalışma grubunu oluşturan hasta ve kontrol gruplarının BKİ açısından değerlendirilmesi Tablo 6 ve Şekil 10' da gösterilmiştir.

Tablo 6. Hasta ve kontrol gruplarının BKİ değerleri

	BKİ < 25 (%)	BKİ ≥ 25 (%)
Diyabet	31.9	68.1
Kontrol	35.6	64.4



Şekil 10. Hasta ve kontrol gruplarının BKİ değerlerinin grafik ile gösterilmesi

Tablo 7’ de hasta ve kontrol gruplarının biyokimyasal özellikleri karşılaştırılmıştır. Hasta ve kontrol gruplarının, insülin, HbA1c, açlık kan şekeri, hepatik insülin sensitivitesi (HİS), β -hücre indeksi (HOMA), total-kolesterol, trigliserid, apolipoprotein E (apo E), apolipoprotein A1 (apo A1), apolipoprotein B (Apo B) düzeyleri belirlenmiştir. Hasta grubunda insülin ($p \leq 0.001$), HbA1c ($p \leq 0.001$), açlık kan şekeri ($p \leq 0.001$) ve HOMA ($p \leq 0.001$) düzeyleri kontrol grubuna kıyasla oldukça yüksek bulunmuş ve ileri derecede anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubunda HİS ($p \leq 0.001$) düzeyleri hasta grubuna kıyasla daha yüksek bulunmuş ve ileri derecede anlamlı olduğu görülmüştür. Hasta ve kontrol grupları, total-kolesterol, trigliserid, apo E, apo A1 ve apo B düzeyleri açısından karşılaştırıldığında p değeri 0.05’ in üzerinde bulunarak anlamlı bir farklılık göstermediği saptanmıştır.

Tablo 7. Hasta ve kontrol gruplarının klinik ve biyokimyasal veriler açısından karşılaştırılması

Parametre	Hasta (n=115)	Kontrol (n=68)	p
İnsülin ($\mu\text{U/ml}$)	14.19 \pm 0.57	3.85 \pm 0.20	≤ 0.001
HbA1c	7.69 \pm 0.21	4.58 \pm 0.06	≤ 0.001
Açlık kan şekeri (mmol/L)	9.60 \pm 0.36	3.62 \pm 0.09	≤ 0.001
Hepatik İnsülin Sensitivitesi (HİS)	0.26 \pm 0.02	1.96 \pm 0.12	≤ 0.001
β - hücre indeksi (HOMA)	1.82 \pm 0.07	1.29 \pm 0.07	≤ 0.001
Total-kolesterol (mmol/L)	5.41 \pm 0.11	5.63 \pm 0.16	AD
Trigliserid (mg/dl)	2.00 \pm 0.20	1.83 \pm 0.12	AD
Apolipoprotein E (mg/L)	45.40 \pm 2.51	52.44 \pm 4.40	AD
Apolipoprotein A1 (g/L)	1.42 \pm 0.02	1.40 \pm 0.03	AD
Apolipoprotein B (g/L)	1.15 \pm 0.03	1.15 \pm 0.03	AD

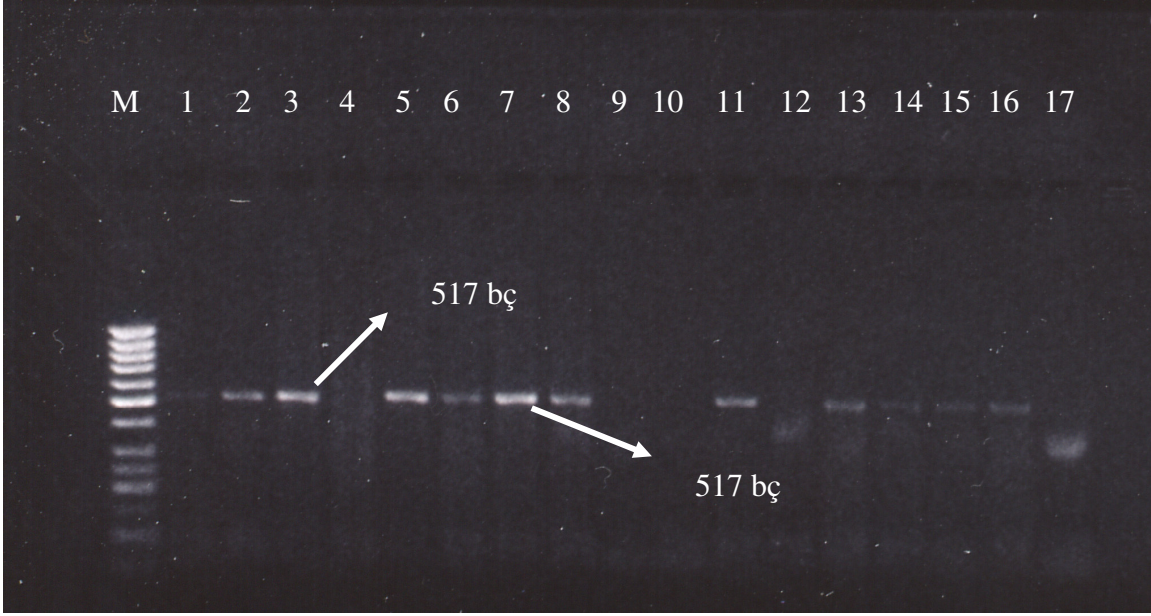
Değerler ortalama \pm Standart hata olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı olmayan sonuçlar AD olarak belirtilmiştir.

Endotelyal nitrik oksid sentaz geni Glu298Asp genotiplerinin saptanması amacıyla 517 bç uzunluğundaki PZR ürünlerinin (Şekil 11) Ban II enzimi ile kesimi sonucunda oluşan DNA parçalarının uzunlukları Tablo 8’ de verilmiştir. Ban II enzimi kesim bölgesinin bulunması 346 bç ve 171 bç’ lik iki DNA parçasının oluşmasına neden olurken, kesim bölgesinin bulunmaması 517 bç’ lik tek parçanın gözlenmesiyle sonuçlanır. Kesim ürünleri %2’ lik agaroz jelde yürütülüp UV ışık altında polaroid film ile fotoğrafları çekildi.

Her örnek için kesim olup olmadığı, Gene Ruler™ 100 bç DNA ladder moleküler ağırlık merdiveni standartına göre değerlendirildi. eNOS Glu298Asp genotipleri, restriksiyon bölgesinin her iki allelde de bulunmaması normal (Glu/Glu), restriksiyon bölgesinin her iki allelde de bulunması mutant (Asp/Asp), restriksiyon bölgesinin sadece bir allelde bulunması heterozigot (Glu/Asp) şeklinde açıklanır (Şekil 12, 13).

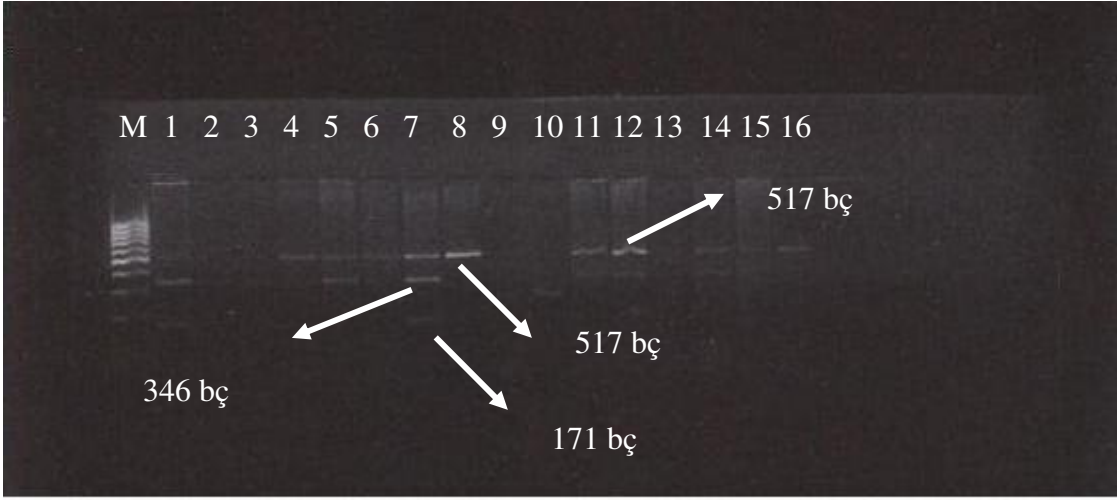
Tablo 8. eNOS Glu298Asp PZR ürünlerinin Ban II enzimi ile kesiminden sonra ortaya çıkan DNA parçalarının uzunlukları

	Homozigot Normal (Glu/Glu)	Heterozigot (Glu/Asp)	Homozigot Mutant (Asp/Asp)
517 bç	—	—	
346 bç		—	—
171 bç		—	—



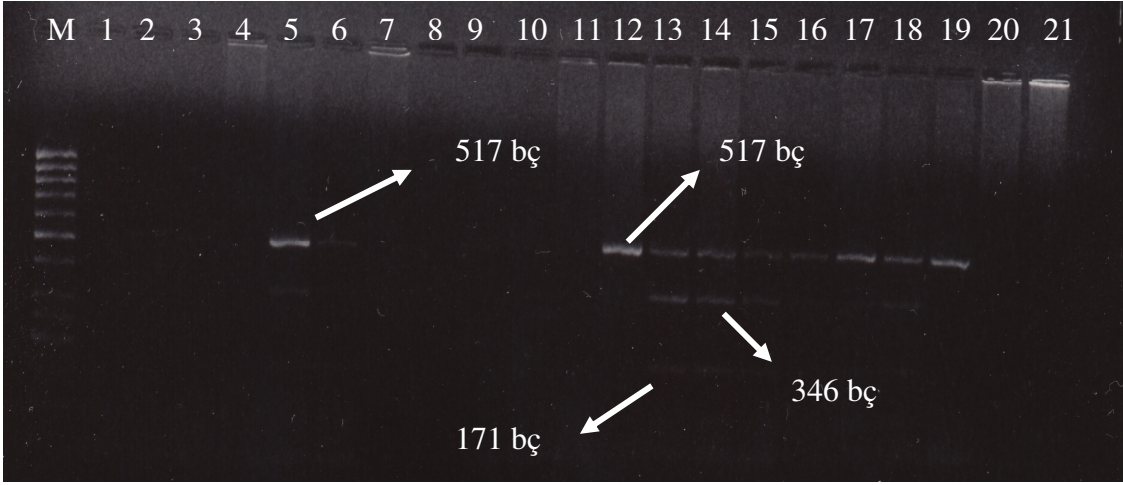
Şekil 11. eNOS geni Glu298Asp polimorfik bölgesini taşıyan PZR ürünleri

M: 100 bç DNA moleküler ağırlık merdiveni; 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 11, 13, 14, 15, 16. kuyular:
517 bç' lik PZR ürünleri



Şekil 12. PZR ürünlerinin kesimi ile elde edilen Glu298Asp genotipleri

M: 100 bç DNA moleküler ağırlık merdiveni; 1, 2, 3, 4, 5, 7, 11, 12, 14, 15, 16. kuyular Glu/Asp genotipi; 6, 8. kuyular Glu/Glu genotipi; 9, 10. kuyular Asp/Asp genotipi.



Şekil 13. PZR ürünlerinin kesimi ile elde edilen Glu298Asp genotipleri

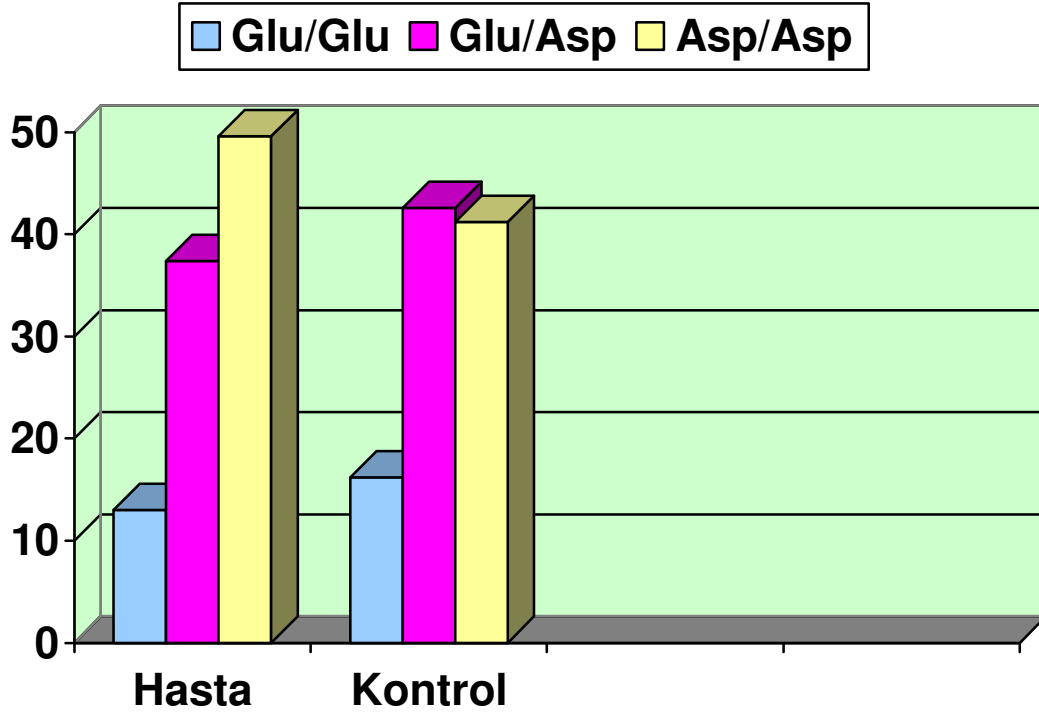
M: 100 bç DNA moleküler ağırlık merdiveni; 12, 19. kuyular: Glu/Glu genotipi; 5, 13, 14, 15, 16, 17, 18. kuyular: Glu/Asp genotipi

Hasta ve kontrol gruplarına ait Glu298Asp genotip dağılımı Tablo 9 ve Şekil 14' te verilmiştir. Tip 2 diyabetli grupta 57 kişi mutant, 43 kişi heterozigot ve 15 kişi normal bulunurken, kontrol grupta 28 kişi mutant, 29 kişi heterozigot ve 11 kişi normal genotiptedir. eNOS geni Glu298Asp allel frekans dağılımları; hasta grubunda % 49.6 Asp/Asp, % 37.4 Glu/Asp, % 13.0 Glu/Glu ve kontrol grubunda % 41.2 Asp/Asp, % 42.6 Glu/Asp, % 16.2 Glu/Glu olarak bulundu. Hasta ve kontrol grupları eNOS gen sıklıkları açısından karşılaştırıldığında genotip dağılımlarının istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği saptandı ($\chi^2= 1.243$, $p= 0.537$).

Tablo 9. Hasta ve kontrol gruplarında eNOS geni Glu298Asp genotip dağılımları

	eNOS Glu298Asp Genotip Sıklıkları		
	Glu/Glu; n (%)	Glu/Asp; n (%)	Asp/Asp; n (%)
Hasta	15 (13.0)	43 (37.4)	57 (49.6)
Kontrol	11 (16.2)	29 (42.6)	28 (41.2)

Glu/Glu, homozigot normal ; Glu/Asp heterozigot ; Asp/Asp homozigot mutant. Değerler sayı ve yüzde olarak verilmiştir. Kontrol ve diyabetik gruplarda eNOS genotip frekansları χ^2 testi ile karşılaştırılmıştır ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($\chi^2 = 1.243$, $p= 0.537$).



Şekil 14. Hasta ve kontrol gruplarında eNOS Glu298Asp genotip dağılımlarının grafik ile gösterilmesi

Tablo 10 ve 11’ de sırasıyla hasta ve kontrol gruplarının eNOS Glu298Asp genotipleri demografik ve biyokimyasal parametreler açısından Bonferroni testi ile birebir karşılaştırıldı. Tip 2 diyabetli grupta eNOS geni Glu298Asp genotipleri birbirleriyle ikili gruplar halinde karşılaştırıldığında genotipler arasında incelenen klinik özelliklerin hiçbiri için istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p \geq 0.05$) (Tablo 10).

Tablo 10. Tip 2 diyabetli grupta eNOS geni Glu298Asp genotiplerinin klinik karakteristik özellikler açısından birbirleriyle karşılaştırılması

Parametre	eNOS geni Glu298Asp Genotipi		
	Glu/Glu (n=15)	Glu/Asp (n=43)	Asp/Asp (n=57)
Ağırlık (kg)	69.00 ± 2.38	76.90 ± 2.12	72.35 ± 1.57
Boy (m)	1.61 ± 0.02	1.65 ± 0.01	1.64 ± 0.01
BKİ (kg/m ²)	26.48 ± 1.02	28.22 ± 0.71	26.99 ± 0.56
Bel (cm)	88.13 ± 5.94	98.62 ± 2.80	97.78 ± 2.47
Kalça (cm)	101.20 ± 2.53	104.97 ± 1.32	103.37 ± 1.14
Bel/Kalça (cm)	0.86 ± 0.04	0.93 ± 0.02	0.94 ± 0.02
Açlık kan şekeri (mmol/L)	9.43 ± 1.36	9.66 ± 0.56	9.61 ± 0.50
HbA1c	7.43 ± 0.65	7.63 ± 0.35	7.83 ± 0.30
İnsülin (µU/ml)	11.64 ± 1.62	15.43 ± 0.94	13.88 ± 0.79
Hepatik insülin sensitivitesi (HİS)	0.37 ± 0.07	0.22 ± 0.03	0.27 ± 0.03
β- hücre indeksi (HOMA)	1.54 ± 0.24	1.95 ± 0.13	1.78 ± 0.10
Total-kolesterol (mmol/L)	5.64 ± 0.41	5.37 ± 0.16	5.39 ± 0.16
Trigliserid (mg/dl)	1.40 ± 0.17	2.17 ± 0.27	2.03 ± 0.35
Apolipoprotein E (mg/L)	41.29 ± 3.31	47.28 ± 3.65	45.01 ± 4.19
Apolipoprotein A1 (g/L)	1.45 ± 0.09	1.39 ± 0.03	1.43 ± 0.03
Apolipoprotein B (g/L)	1.14 ± 0.09	1.11 ± 0.03	1.19 ± 0.06

Değerler ortalama ± Standart hata olarak ifade edilmiştir.

Kontrol grupta eNOS geni Glu298Asp genotipleri birbirleriyle ikili gruplar halinde karşılaştırıldığında Apo B değerlerinin Glu/Glu genotipine sahip kişilerde Asp/Asp genotipine sahip kişilere kıyasla daha yüksek olduğu bulundu ($p \leq 0.05$). Kontrol grubunda incelenmiş olan diğer klinik parametreler açısından Glu298Asp genotipleri arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p \geq 0.05$) (Tablo 11).

Tablo 11. Kontrol grupta eNOS geni Glu298Asp genotiplerinin klinik karakteristik özellikler açısından birbirleriyle karşılaştırılması

Parametre	eNOS geni Glu298Asp Genotipi		
	Glu/Glu (n=11)	Glu/Asp (n=29)	Asp/Asp (n=28)
Ağırlık (kg)	72.72 ± 4.82	71.78 ± 2.08	73.14 ± 2.47
Boy (m)	1.63 ± 0.03	1.63 ± 0.01	1.63 ± 0.01
BKİ (kg/m ²)	26.94 ± 1.21	27.01 ± 0.75	27.47 ± 0.84
Bel (cm)	90.81 ± 7.78	96.82 ± 3.89	96.92 ± 3.93
Kalça (cm)	100.45 ± 2.95	104.39 ± 1.43	104.71 ± 1.40
Bel/Kalça	0.90 ± 0.06	0.92 ± 0.03	0.92 ± 0.03
Açlık kan şekeri (mmol/L)	3.52 ± 0.17	3.74 ± 0.16	3.51 ± 0.13
HbA1c	4.46 ± 0.14	4.66 ± 0.09	4.54 ± 0.08
İnsülin (µU/ml)	4.00 ± 0.61	3.78 ± 0.27	3.87 ± 0.33
Hepatik insülin sensitivitesi (HIS)	1.98 ± 0.29	1.93 ± 0.19	2.00 ± 0.19
β- hücre indeksi (HOMA)	1.36 ± 0.22	1.22 ± 0.09	1.34 ± 0.13
Total-kolesterol (mmol/L)	6.33 ± 0.37	5.65 ± 0.24	5.30 ± 0.27
Trigliserid (mg/dl)	1.69 ± 0.16	2.02 ± 0.19	1.67 ± 0.20
Apolipoprotein E (mg/L)	43.44 ± 4.29	58.04 ± 8.61	49.56 ± 4.87
Apolipoprotein A1 (g/L)	1.41 ± 0.07	1.37 ± 0.04	1.43 ± 0.05
Apolipoprotein B (g/L)	1.33 ± 0.08 ^a	1.16 ± 0.06	1.08 ± 0.04

Değerler ortalama ± Standart hata olarak ifade edilmiştir. ^a $p \leq 0.05$ Asp/Asp genotipine kıyasla.

Çalışılan hasta ve kontrol gruplarında eNOS Glu298Asp polimorfizmi ile araştırılmış olan tip 2 diyabetle ilişkili fenotipler arasında anlamlı bir ilişkiye rastlanmadığı için Logistik Regresyon analizi yapılmasına gerek duyulmadı.

7. TARTIŞMA

Tip 2 diyabet çok faktörlü bir genetik sendrom olup bir çok gen ve çevresel faktör tarafından belirlenir. Dünya çapında 150 milyon kişiyi etkileyen tip 2 diyabet insidansı şişmanlık, hipertansiyon ve fiziksel aktivite gibi sekonder faktörler sebebiyle hızla artmaktadır. Tip 2 diyabetin prevalans ve insidansını etkileyen en önemli faktörler diabetes mellitus için pozitif aile öyküsü, yaş, fazla kilo, artmış abdominal yağ, hipertansiyon, fiziksel aktivite azlığı ve etnik kökendir. Bazı biyokimyasal belirteçler de risk faktörü olarak bulunmuş olup bunlar; açlık hiperinsülinemisi, açlık proinsülindeki artış ve azalmış HDL-kolesteroldür (86).

İnsan genomunda yaklaşık 34.000 gen olduğu (87, 88) ve bu genlerin farklı formlarının bulunduğu ve genlerin birbirleriyle ve çevresel faktörlerle etkileştiği düşünülürse tip 2 diyabetin aday genlerinin belirlenmesinin ne kadar karmaşık bir problem olduğu ortaya çıkar. Diyabetin moleküler temelinde glikoz ve enerji metabolizmalarının moleküler genetik ve patofizyolojisinde rol oynayan genler yer alır. Tip 2 diyabette rol alan pek çok gen lokusunun hastalık üzerinde küçük veya orta derecede etkileri bulunur. Tip 2 diyabette rol alan genlere ait tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) tespiti tip 2 diyabetin patogenezinin aydınlatılmasına yol açacağı gibi aynı zamanda hastalığın teşhis, tedavi ve önlenmesinde yardımcı olacaktır. Tip 2 diyabetin ailesel yatkınlık göstermesi, kişinin hastalığa olan yatkınlığında genlerin rolünün fazla olduğunu göstermektedir. Tip 2 diyabet oluşumunu etkilediği bilinen yaş, cinsiyet, etnik köken, diyet, sigara içimi (89, 90), obezite ve vücudun yağ dağılımı (89, 91) gibi faktörlerin de genetik kontrol altında olduğu gösterilmiştir (89, 92).

Çoğunlukla obezite sebebiyle ortaya çıkan insülin direnciyle karakterize tip 2 diyabet, β -hücresinin artan insülin direncini dengelemek için β -hücresinin yeterince insülin salgılayamamasındaki yetersizlik sebebiyle meydana gelir (93, 94). Tip 2 diyabet hastalarının çoğu obezdir. Genetik kontrol altında olan abdominal obezitenin (89, 95-98) insülin direncine yol açtığı bilinmektedir. İnsülin direnci her ne kadar tip 2 diyabetin önemli bir göstergesiye de tek başına diyabet sebebi değildir. Tip 2 diyabetli hastaların çoğunda orta derecede insülin direnci bulunur (99, 100). Tip 2 diyabetin primer genetik belirleyicilerinin insülin direnci ya da bozulmuş insülin sekresyonu ile ilişkili anormal genler ya da polimorfizmler mi olduğu

yoksa hastalığın patogeneğinde sadece insülin direnci ve bozulmuş insülin sekresyonunun belirleyici olduğu halen araştırma konusudur. Bu konuda yapılmış olan çalışmalar hastalığın oluşmasındaki genetik tablonun insülin direnci ve sekresyonundaki bozuklukların önemini azaltmadığını göstermektedir. Bu nedenle insülin direnci ve sekresyonunu etkileyen genler tip 2 diyabet oluşumunda önem kazanmaktadır. Uzun zincirli yağ asitlerinin gen transkripsiyonunu etkilediği ya da direkt olarak glikojen sentaz aktivitesini etkilediği bilinmektedir (99, 101). Ayrıca adipoz dokusu proinflatuar bir sitokin olan tümör nekroz faktör α' yı üretir ki bu da insülin reseptörü ve IRS1' in fosforilasyonu inhibe ederek insülin sinyalleşmesini önler (99, 102). İnterlökin gibi diğer sitokinler aynı zamanda endotel fonksiyon bozukluğuna yol açarak metabolik sendrom risk faktörlerinin biraraya gelmesine neden olabilir (99, 103). Çoğu insülin direnci olan obez kişiler diyabet geliştirmez (89, 104). Çoğu obez kişi diyabet geliştirmezken, zayıf kişilerin tip 2 diyabeti olduğu görülür. Bu bulgular tip 2 diyabetin çok genli olma özelliğinden kaynaklanıp bozuk olan birkaç genin tek başına diyabete yol açmadığının göstergesi olabilir. Buna ek olarak obez ve diyabetik olmayan kişiler orta derecede insülin direncine sahip olup her zaman glikoz intoleransı göstermezler. Bu da insülin eksikliğinin hiperglisemi gelişimindeki esansiyel rolünü kanıtlamaktadır. Hiperglisemi geliştikten sonra glikoz toksisitesi insülin direncini indükleyerek pankreatik β - hücre fonksiyonunu azaltabilir.

Endotelial nitrik oksid, eNOS enzimi tarafından L-argininden sentezlenen bir endotelial vazodilatördür. eNOS bağımlı NO salgılanması; kofaktör etkileşimi, fosforilasyon, protein-protein etkileşimleri ve substrat varlığı gibi pek çok olay tarafından düzenlenir. Sağlıklı bir endotel eNO salgılamak, fonksiyonu bozulmuş olan endotel süperoksid üretir (105). Hem tip 2 diyabet hem de ateroskleropate fonksiyonel olmayan endotel tarafından üretilen süperoksid radikali rol alır. eNOS molekülünün endotel hücresindeki fonksiyon bozukluğuna yol açması intimada ateroskleropatiye, pankreasın β adacıklarında ise redoks stresi ile β - hücre fonksiyonunda azalmaya yol açar. Araştırmacılar tip 2 diyabetin vasküler bir hastalık olup olmadığı sorusuna cevap ararken NOS, NO ve redoks stresinin rollerini de araştırmaktadırlar. Popülasyon veya doku çalışmaları, eNOS genindeki bazı DNA varyantlarının düşük eNOS ekspresyonuna sahip olup, taşıyıcı endotel hücrelerini çevresel risklere karşı daha hassaslaştırdığını göstermiştir. eNOS geninin 7. eksonunda, 298. pozisyonundaki Glutamik asitin

Aspartik asite dönüşümüne yol açan Glu298Asp polimorfizminin bazal NO üretiminde azalmaya sebep olduğu bilinmektedir (24, 106).

Endotelial nitrik oksid sentaz geni Glu298Asp polimorfizminin koroner arter hastalığı (107), koroner arter spazmı (55), miyokard infarktüsü (22, 108), koroner ateroskleroz yaygınlığı (14, 23) ve hipertansiyon gibi hastalıklar ile olan ilişkileri çeşitli çalışmalar ile bildirilmiştir. Senthil ve arkadaşları insan umbilikal ven endotel hücrelerinde (HUVEC) yaptıkları çalışmalarında Glu298Asp polimorfizmine ait nadir rastlanan Asp/Asp genotipinde düşük düzeyde eNOS proteini saptarken, kontrol ve sigara içenlerin ekstraktları ile muamele edilmiş endotel hücrelerinde yüksek düzeyde eNOS mRNA düzeyleri saptamışlardır. Düşük düzeydeki eNOS protein düzeyleri ve enzim aktiviteleri artmış vasküler risk ile ilişkili olan nadir allelin (Asp/Asp) sıklığı ile uyumludur. Aynı hücrelerdeki yüksek düzeydeki eNOS mRNA' ları transkripsiyondaki dengeleyici düzenleme olabilir. Çünkü ekson 7' deki Glu298Asp polimorfizmi hızlandırılmış protein yıkımı ile sonuçlanabilir (106, 108). Glu298Asp mutasyonu protein stabilitesini düşürerek biyolojik olarak aktif eNOS miktarını etkileyebilir. Ancak bu polimorfizm farklı toplumlarda yapılan diğer bazı çalışmalarda vasküler hastalıkla ilişkili bulunmamıştır. Endotelial nitrik oksid sentaz genine ait Glu298Asp varyantlarının oluşturduğu protein ürünler farklı bölgelerden kesime uğrayabilir. Şöyle ki; 35 kDa' luk amino terminal ve 100 kDa' luk karboksi terminal fragmanları oluşturabilir (108) bu da, bu polimorfizmin eNOS proteini üzerinde fonksiyonel bir etkisi olduğunu düşündürür. Glu298Asp polimorfizminin ayrıca eNOS enziminin hücreler arası trafiğini kontrol eden şaperon proteinlerle, protein-protein etkileşimleri yaptığı gösterilmiştir (108). Aynı protein-protein etkileşimleri enzimin aktive edilmesindeki süreçte işlev gören proteinlerle de gerçekleştirdiği bilinmektedir. Fonksiyonel olmayan eNOS' un vasküler hastalıkların patogenezinde yer alıp almadığı kesin olarak bilinmemektedir.

Endotelial nitrik oksid sentaz gen varyantlarından Glu298Asp polimorfizminin insülin direnci veya tip 2 diyabetle ilişkili olup olmadığını araştıran sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Monti ve ark. (15) makrovasküler komplikasyonu bulunmayan 159 adet tip 2 diyabetik hasta ve 207 adet sağlıklı kişide yaptıkları çalışmalarında tip 2 diyabetik kişilerde Glu/Glu, Glu/Asp ve Asp/Asp genotiplerinin sıklıklarını sırasıyla %32.7, %39.6 ve %27.7 olarak; kontrol kişilerde ise %46.4, %39.6 ve %14 olarak bildirmişler ve gen sıklıklarını

gruplar arasında istatistiksel anlamlı olarak farklı bulmuşlardır ($\chi^2=1$, $p=0.0005$). Monti ve ark.'nın (15) sonuçlarına göre Asp/Asp genotipinin sıklığı tip 2 diyabetik hastalarda kontrol kişilere kıyasla istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek sıklıkta tespit edilmiştir. Srivastava ve ark. ise (109) 139 adet sağlıklı Hintlide yaptıkları çalışmalarında Glu298Asp genine ait Glu/Glu genotip sıklığını %71.22, Glu/Asp genotip sıklığını %28.06 ve Asp/Asp genotip sıklığını %0.72 olarak bildirmiş ve genotip sıklıklarının arasında anlamlı bir fark tespit etmemişlerdir. Çalışmamızda tip 2 diyabetik kişilerde Glu/Glu, Glu/Asp ve Asp/Asp genotiplerinin sıklıkları sırasıyla % 13.0, % 37.4 ve % 49.6 olarak; sağlıklı kontrol kişilerde ise % 16.2, % 42.6 ve % 41.2 olarak bulunmuş olup hasta ve kontrol grupları arasında genotip sıklıkları açısından istatistiksel anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($\chi^2= 1.243$, $p=0.537$).

Monti ve ark. (15) tip 2 diyabetik hastalarda Glu298Asp genotiplerinin arasında visceral obezite (bel/kalça oranı) haricinde metabolik parametreler (plazma glikoz, BKİ, trigliserid, sistolik ve diastolik kan basıncı) açısından anlamlı bir fark bulmamışlardır. Asp/Asp genotipine sahip tip 2 diyabetik kişilerde visceral obezitenin diğer genotiplere kıyasla anlamlı olarak daha fazla olduğunu bildirmişlerdir (15). Bu çalışmada da Monti ve ark.'nın (15) sonuçlarına uyumlu olarak istatistiksel anlamlı olmamakla birlikte Asp/Asp genotipine sahip tip 2 diyabetiklerde Bel/Kalça oranının (viseral obezite) Glu/Glu genotipindeki hastalara kıyasla daha yüksek olduğu bulundu. Monti ve ark. (15) sağlıklı kişilerde Asp/Asp genotipine sahip kişilerin insülin, C-peptid, NO ve HOMA düzeylerinin Glu/Glu genotipine kıyasla daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda da insülin ve HOMA (β -hücre indeksi) düzeylerinin Asp/Asp genotipine sahip sağlıklı kontrollerde Glu/Glu genotipine sahip kişilere kıyasla daha düşük olduğu görüldü ($p \geq 0.05$). Duplain ve ark. (64) ise eNOS geni bulunmayan farelerde hipertansiyon, hiperinsülinemi, hiperlipidemi olduğu ve insülinle uyarılmış olan glikoz geri alımında %40 oranında azalma olduğunu göstermişlerdir. Son yıllarda NO' in insülin salgılanması ve insülin direncindeki rolü araştırılmaktadır. Spinass ve ark. (110) NO' in fizyolojik insülin sekresyonunun düzenleyicisi olduğunu göstermişlerdir. Özellikle iskelet kasının mitokondrilerinde lokalize olan eNOS aktivasyonunun (111, 112) artmış glikozun kas hücresine taşınmasıyla kas-kan akımını artırdığı bir çok çalışma ile tespit edilmiştir (113). İnsülinin glikozun geri alımındaki etkisinin %30' unun artmış kan perfüzyonu sebebiyle

olduğu bilinmektedir (113). Bu bilgiler eNOS genindeki polimorfizmlerin hiperinsülinemi ve insülin direncine yol açabileceğini düşündürmektedir.

Monti ve ark. eNOS Glu298Asp polimorfizmi ile tip 2 diyabet arasında anlamlı bir ilişkinin varlığını gösteren ilk çalışma grubu olup, bu gen varyasyonunun hiperinsülinemi, insülin direnci ve tip 2 diyabet için yeni genetik risk faktörlerinden biri olabileceğini ortaya koymuşlardır. Aynı araştırmacılar (15) bir kişinin öncelikle diyabet mi yoksa kardiyovasküler hastalığı mı geliştirme olasılığının eNOS varyantlarının muhtemel doku spesifiklerine bağlı olabileceğini de öne sürmüşlerdir. Bu hipotezlerini ise farklı eNOS varyantlarının vasküler hasarın olduğu bölgelerde lokalize olmalarına dayandırmaktadırlar (45). Barroso ve ark., 2134 Kafkasyalı kişide 71 adet tip 2 diyabet aday genine ait 152 adet tek nükleotid polimorfizminin tip 2 diyabetle ilişkilerini araştırdıkları çalışmalarında eNOS geni Glu298Asp polimorfizminin hastalıkla ilişkisini tespit etmemişlerdir (37). Mevcut çalışmamızda Barroso ve ark. (37) sonuçlarına benzer şekilde eNOS Glu298Asp polimorfizmi ile tip 2 diyabet arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı. Monti ve ark.'nın Glu298Asp polimorfizmiyle tip 2 diyabet arasında tespit ettikleri ilişkiyi Hibbie ve ark. (108) Mİ'nde, Myamoto ve ark. ise (20) hipertansiyonda tespit etmişlerdir. Tipik insülin direnci sendromu oluşturan Mİ ve hipertansiyon gibi hastalıklardaki eNOS polimorfizm ilişkisinin ortak bir genetik kaynağa dayanıyor olma ihtimali hayatın farklı evrelerinde farklı klinik sonuçlar ortaya çıkarabilir. Lembo ve ark. (54) Asp/Asp genotipinin hipertansif kişilerde karotid aterosklerozu için bağımsız bir risk faktörü olduğunu bildirmiştir. Monti ve ark. da tip 2 diyabetik hastalardaki Glu298Asp polimorfizmine ait allel sıklıklarını kardiyovasküler hastalığı (Hibbie ve ark 102) olan kişilerin allel sıklıklarına benzer bulmuşlardır. Ukkola ve ark (114), yüksek oranda makroanjyopatisi olan tip 2 diyabetik kişilerde Glu298Asp polimorfizmini araştırmış ancak tip 2 diyabetik ve kontrol kişiler arasında allel sıklığı açısından anlamlı bir fark bulmamıştır. Ukkola ve arkadaşlarının çalışmalarının bizim çalışmamızdan farkı hastalığın fenotipik konumudur. Şöyle ki; Ukkola ve arkadaşlarının çalıştığı tip 2 diyabetik kişilerde ciddi makroanjyopati mevcut olup Asp/Asp polimorfizmine sahip diyabetik grupta daha yüksek bir mortalite oranına yol açması muhtemeldir. Endotelial nitrik oksid, iskelet kasının glikozu almasını kolaylaştırır. Enerji harcanması ise eNOS geninin indüklenmesine sebep olarak insüline bağımlı glikoz salınımına yol açar. Franks ve ark. (115), 461 adet tip 2 diyabetik ve 474 adet

kontrol kişilerde eNOS genine ait tek nükleotid polimorfizmlerinin diyabetle ilişkisini; 1444 kişide ise gen ve glikoz intoleransı ilişkisini araştırmışlar ve eNOS gen varyasyonlarının, diyabet riskini ve glikoz intoleransını etkileyebileceğini ileri sürmüşlerdir (115). Bu hipotezlerini destekleyici hipotez fikir olarak harcanan total enerjinin eNOS genindeki varyasyonlar ile etkileşime girerek diyabet riski ve glikoz intoleransı düzeyleri gibi fenotipleri değiştirdiğini ileri sürmüşlerdir (115). Yoshimura ve ark. (19), 45 adet koroner arter hastasında Glu298Asp polimorfizmine ait Asp/Asp genotipinin insülin sensitivitesini düşürdüğünü ($p>0.05$) bulmuşlardır. Çalışmamızda da tip 2 diyabetli hasta grubunda, Yoshimura ve ark.'nın sonuçlarına benzer şekilde Asp/Asp genotipindeki kişilerin hepatik insülin sensitivitesinin Glu/Glu genotipine kıyasla daha düşük olduğu bulunmuştur.

Bilgimiz dahilinde literatürde tip 2 diyabetli hastalarda eNOS geni Glu298Asp polimorfizminin lipid parametrelerine olan etkilerini araştıran bir çalışmaya rastlamadık. Sadece 118 sağlıklı kişi ile yapılan bir çalışmada (18) Glu298Asp polimorfizminin lipid parametreleri üzerine etkili olmadığı bildirilmiştir. Bu çalışmada da tip 2 diyabetli grupta eNOS geni Glu298Asp genotipleri lipid düzeyleri üzerine etkili bulunmazken, sağlıklı kontrol grubunda Asp/Asp genotipinde Glu/Glu genotipine kıyasla daha düşük apo B düzeyleri gözlemlendi.

8. SONUÇ

Tip 2 diyabet ve kontrol grupları arasında eNOS Glu298Asp genotip sıklıkları açısından istatistiksel anlamlı bir fark olmayışı ve sağlıklı kontrollerde mutant (Asp/Asp) genotip sıklığının (%41.2) tip 2 diyabetli gruba (%49.6) benzer şekilde yüksek sıklıkta görülmesi, Glu298Asp polimorfizminin tip 2 diyabet ile ilişkili olmadığını düşündürmektedir. Bu çalışmada polimorfizm-fenotip ilişkileri de incelenmiştir. Buna göre, tip 2 diyabetli hasta grubunda Asp/Asp genotipine sahip kişilere ait hepatik insülin sensitivitesinin Glu/Glu genotipine sahip hastalara oranla daha düşük olduğu bulunmuştur. Ayrıca istatistiksel anlamlı olmamakla birlikte visceral obezitenin, Asp/Asp genotipine sahip tip 2 diyabetli kişilerde Glu/Glu genotipine sahip hastalara kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Mevcut çalışma lipid parametreleri açısından incelendiğinde, hasta grubunda eNOS Glu298Asp polimorfizminin lipid düzeyleri üzerine bir etkisi saptanmazken, sağlıklı kontrol grubunda Asp/Asp genotipine sahip kişilerde Glu/Glu genotipine sahip kişilere kıyasla daha düşük oranda serum apoB düzeyleri tespit edilmiştir. Son olarak çalışma grubumuzda insülin ve HOMA düzeyleri Asp/Asp genotipine sahip sağlıklı kontrollerde daha düşük oranda bulunmuştur. Çalışma tip 2 diyabetli hastalarda eNOS Glu298Asp gen polimorfizminin sıklığı ve klinik önemi hakkında bilgi veren Türk toplumunda yapılmış olan ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır. Çalışmaya hasta ve kontrol grubundaki sayılar artırılarak devam edilecektir.

9. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bana her türlü bilimsel desteği sağlayan, yakın ilgi, güler yüz ve anlayışını hiç eksik etmeyen danışmanım Sn. Doç. Dr. Belgin Süssleyici Duman' a çok teşekkür ederim.

Hasta ve kontrol örneklerinin toplanması ve hasta verilerinin oluşturulması sırasında bilimsel desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Çavlan Çiftçi' ye, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü Doç. Dr. Nedret Altıok' a saygılarımla teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarımda bilimsel yardımları, emeği ve yakın dostluğu için Melike Ersöz' e, istatistiksel analizleri yapan Uzm. Dr. Penbe Çağatay' a ve her fırsatta yardımına koşan, güler yüzünü hiç eksik etmeyen Enstitü Sekreterimiz İlknur Karaosmanoğlu' na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim sürem boyunca beni destekleyen ve her zor durumumda yanımda olan aileme çok teşekkür ederim.

10. KAYNAKLAR

1. Yenigün M. Her Yönü ile Diabetes Mellitus. İstanbul, Haseki Hastanesi Vakfı Yayını, 1995.
2. Tilburg J, Haeften TW, Pearson P, Wijmenga C. Defining the genetic contribution of type 2 diabetes mellitus. *J Med Genet.* 2001, 38: 569-578.
3. Brecht DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P- 450 reductase. *Nature.* 1991, 351: 714-718.
4. Nakane M, Schmidt HHW, Pollock JS, Forsterman U, Murad F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett.* 1993, 316: 175-180.
5. Lyons CR, Orloff GJ, Cunningham JM. Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J Biol Chem.* 1992, 267: 6370-6374.
6. Xie Q, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD. et al. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science.* 1992, 256: 225-228.
7. Lowenstein CJ, Glatt CS, Brecht DS, Snyder SH. Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992, 89: 6711-6715.
8. Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992, 89: 6348-6352.
9. Sessa WC, Harrison JK, Barber CM, Zeng D. et al. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1992, 267: 15274-15276.
10. Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA. et al. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest.* 1992, 90: 2092-2096.

11. Janssens SP, Shimouchi A, Quertermous T, Bloch DB, Bloch KD. Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/ nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1992, 267: 14519-14522.
12. Marsden PA, Schappert KT, Che HS, Flowers M. et al. Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett.* 1992, 307: 287-293.
13. Marsden P, Heng H, Scherer S, Stewart R, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem.* 1993, 268: 17478-17488.
14. Colombo MG, Paradossi U, Andreassi MG, Botto N, Manfredi S, Masetti S, Biagini A, Clerico A. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of coronary artery disease. *Clinical Chemistry.* 2003, 49: 389-395.
15. Monti LD, Barlassina C, Citterio L, Galluccio E, Berzuini C, Setola E, Valsecchi G, Lucotti P, Pozza G, Bernardinelli L, Casari G, Piatti P. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms are associated with type 2 diabetes and the insulin resistance syndrome. *Diabetes.* 2003, 52: 1270-1275.
16. McNamara DM, Holubkov R, Postava L, Ramani R, Janosko K, Mathier M, MacGowan GA, Murali S, Feldman AM, London B. Effect of the Asp298 variant of endothelial nitric oxide synthase on survival for patients with congestive heart failure. *Circulation.* 2003, 107: 1598-602.
17. Lüscher T, Noll G. Is it all in genes...? Nitric oxide synthase and coronary vasospasm. *Circulation.* 1999, 99:2855-2857.
18. Paradossi U, Ciofini E, Clerico A, Botto N, Biagini A, Colombo MG. Endothelial function and carotid intima-media thickness in young healthy subjects among endothelial nitric oxide synthase Glu²⁹⁸ → Asp and T⁻⁷⁸⁶ → C polymorphisms. *Stroke.* 2004, 35: 1305-1309.
19. Yoshimura T, Hisatomi A, Kajihara S, Yasutake T, Ogawa Y, Mizuta T, Ozaki I, Utsunomiya T, Yamamoto K. The relationship between insulin resistance and polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene in patients with coronary artery disease. *J Atheroscler Thromb.* 2003, 10: 43-47.

20. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K, Ogawa E, Hamanaka I, Takahashi N, Kaneshige T, Teraoka H, Akamizu T, Azuma N, Yoshimasa Y, Yoshimasa T, Itoh H, Mashuda I, Yasue H, Nakao K. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension*. 1998; 32: 3-8.
21. Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, Haydock S, Hopper RV, Stephens NG, O' Shaughnessy KM, Brown MJ. A common variant of endothelial nitric oxide synthase (Glu298→Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation*. 1999, 100: 1515-1520.
22. Shimasaki Y, Vasue H, Yoshimura M, Nakayama M, Kaugiyama K, Ogawa H, Harada E, Masuda T, Koyama W, Saito Y, Miyamoto Y, Ogawa Y, Nakao K. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 1998, 31: 1506-1510.
23. Colombo MG, Andreassi MG, Paradossi U, Botto N, Manfredi S, Masetti S, Rossi G, Clerico A, Biagini A. Evidence for association of a common variant of the endothelial nitric oxide synthase gene (Glu298→Asp polymorphism) to the presence, extent, and severity of coronary artery disease. *Heart*. 2002, 87: 525-528.
24. Veldman BA, Spiering W, Doevendans PA, Ver-Voort G, Kroon AA, de Leeuw PW, Smits P. The Glu298Asp polymorphism of the NOS 3 gene as a determinant of the baseline production of nitric oxide. *J Hypertens*. 2002, 20: 2023-2027.
25. Despopoulos A, Silbernagl S. Renkli Fizyoloji Atlası. Ed: H. Çavuşoğlu, B. Yeğen, Z. Aydın, İ. Alican. İstanbul, Nobel Tıp & Yüce Yayınları, 1997.
26. MacDonald PE, Rorsman P. Oscillations, intercellular coupling, and insulin secretion in pancreatic β cells. *Journal pbio*. 2006, 4: 167-171.
27. Koolman J, Röhm KH. Renkli Biyokimya Atlası Ed: A. Yeşilkaya, A. Baykal, Ö. Alper. İstanbul, Nobel Tıp & Yüce Yayınları, 2002.
28. Güneş HV. Moleküler Hücre Biyolojisi. Eskişehir, Kaan Kitabevi, 2003.
29. Passarge E, Renkli Genetik Atlası Ed: G. Lüleci, M. Sakızlı, Ö. Alper. İstanbul, Nobel Tıp & Yüce Yayınları, 2000.
30. Berk L, Matsudaira Z. Molecular Cell Biology. Baltimore, Darnell, 1999.

31. American Diabetes Association. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 1997, 20: 1183-1197.
32. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2006, 29: S43-S48.
33. Campagna AF, Knowler WC, Narayan KMV, Hanson RL, Saaddine J, Howard BV. HDL cholesterol subfractions and risk of developing type 2 diabetes among Pima Indians. *Diabetes Care*. 1999, 22: 271-274.
34. Lorenzo C, Okoloise M, Williams K, Stern MP, Haffner SM. The metabolic syndrome as predictor of type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2003, 26: 3153-3159.
35. Edwards JWR, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Gillman MW, Hennekens CH, Speizer FE, Manson JE. Birthweight and the risk for type 2 diabetes mellitus in adult women. *Ann Intern Med*. 1999, 130: 278-284.
36. Bozboru A. Obezite ve tedavisi. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2002.
37. Barroso I, Luan J, Middelberg RPS, Harding AH, Franks PW, Jakes RW, Clayton D, Schafer AJ, O'Rahilly S, Wareham NJ. Candidate gene association study in type 2 diabetes indicates a role for genes involved in β -cell function as well as insulin action. *Journal pbio*. 2003, 1: 41-55.
38. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 299: 373-376.
39. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987; 327: 524-526.
40. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988; 333: 664-666.
41. Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, Lüscher TF. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation*. 1998; 30: 2494-2498.
42. Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, McCredie RM, Wilcken DE. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat Med*. 1996; 2:41-45.

43. Cornwell TL, Arnold E, Boerth NJ, Lincoln TM. Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by Cgmp. *Am J Physiol.* 1994; 267: 1405-1413.
44. Graaf JC, Banga JD, Moncada S, Palmer RM, Groot PG, Sixma JJ. Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation.* 1992; 85: 2284-2290.
45. Hayden MR, Tyagi SC. Is type 2 diabetes mellitus a vascular disease (atheroscleropathy) with hyperglycemia a late manifestation? The role of NOS, NO, and redox stres. *Cardiovascular Diabetology.* 2003, 2: 2.
46. Ghilardi G, Biondi ML, DeMonti M, Bernini M, Turri O, Marroso F, Guagnellini E, Scorza R. Independent Risk Factor for Moderate to Severe Internal Carotid Artery Stenosis: T786C Mutation of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene. *Clin Chem.* 2002; 48: 989-993.
47. Alvarez R, Gonzalez P, Batalla A, Reguero JA, Cubero G, Hevia S, Cortina A, Merino E, Gonzalez I, Alvarez V, Coto E. Association between the NOS3 (2786 T/C) and the ACE (I/D) DNA Genotypes and Early Coronary Artery Disease. *J Biol Chem.* 2001; 5: 343-348.
48. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991; 43: 109-42.
49. Vidal MJ, Romero JC, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing factor inhibits rennin release. *Eur J Pharmacol.* 1998; 14: 401-402.
50. Nadaud S, Bonnardeaux A, Lathrop GM, Soubrier F. Gene structure, polymorphism and mapping of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 198: 1027-1033.
51. Uwabo J, Soma M, Nakayama T, Kanmatsuse K. Association of a variable number of tandem repeats in the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with essential hypertension in Japanese. *AJH.* 1998; 11: 125-128.
52. Powell JT, Higman DJ. Smoking, nitric oxide and the endothelium. *Br J Surg.* 1994; 81: 785-787.
53. Khan SD, Khan T, Zeballos GA, Mathew L, Potharlanka P, Knect M, Whelan J. Decreased activity of the L-arginine nitric oxide metabolic pathway in patients with congestive heart failure. *Circulation.* 1999; 99: 2113-2117.

54. Lembo G, De Luca N, Battagli C, Iovino G, Aretini A, Musicco M, Frati G, Pompeo F, Vecchione C, Trimarco B. A common variant of endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is an independent risk factor for carotid atherosclerosis. *Stroke*. 2001, 32: 735-740.
55. Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Sumida H, Sugiyama S, Kugiyama K, Ogawa H, Ogawa Y, Saito Y, Miyamoto Y, Nakao K. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum Genet*. 1998, 103: 65-69.
56. Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, Haydock S, Hopper RV, Stephens NG, O'Shaughnessy KM, Brown MJ. A common variant of endothelial nitric oxide synthase (Glu298→Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation*. 1999, 100: 1515-1520.
57. Razani B, Woodman SE, Lisanti MP. Caveolae: From cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rew*. 2002, 54: 431-467.
58. Stuhlinger MC, Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin TL, Cooke JP, Reaven GM, Tsao PS. Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *JAMA*. 2002, 287: 1420-1426.
59. Cooke JP, Oka RK. Atherogenesis and the arginine hypothesis. *Curr Atheroscler Rep*. 2001, 3: 252-259.
60. Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Tsuji H, Reaven GM, Cooke JP. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus : role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation*. 2002, 106: 987-992.
61. Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000, 20: 2032-2037.
62. Nash DT. Insulin resistance, ADMA levels, and cardiovascular disease. *JAMA*. 2002, 287: 1451-1452.
63. Faldetta CM, Laurenti O, Desideri G, Bravi MC, DeLuca O, Marinucci MC, De Mattia G, Ferri C. L-arginine infusion decreases plasma total homocysteine concentrations through

increased nitric oxide production and decreased oxidative status in type II diabetic patients. *Diabetologia*. 2002, 45: 1120-1127.

64. Duplain H, Burcelin R, Sartori C, Cook S, Egli M, Lepori M, Vollenweider P, Pedrazzini T, Nicod P, Thorens B, Scherrer U. Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2001, 104: 342-345.

65. Noiri E, Satoh H, Taguchi J, Brodsky SV, Nakao A, Ogawa Y, Nishijima S, Yokomizo T, Tokunaga K, Fujita T. Association of eNOS Glu298Asp polymorphism with end-stage renal disease. *Hypertension*. 2002, 40: 535-540.

66. Werner-Felmayer G, Golderer G, Werner ER. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, utilization and pharmacological effects. *Current Drug Metabolism*. 2002, 3: 159-173.

67. Doshi SN, McDowell IF, Moat SJ, Payne N, Durrant HJ, Lewis MJ, Goodfellow J. Folic acid improves endothelial function in coronary artery disease via mechanisms largely independent of homocysteine lowering. *Circulation*. 2002, 105: 22-26.

68. Van Etten RW, De Koning EJ, Verhaar MC, Gaillard CA, Rabelink TJ. Impaired NO-dependent vasodilation in patients with Type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus is restored by acute administration of folate. *Diabetologia*. 2002, 45: 1004-1010.

69. Tyagi SC. Homocyst(e)ine and heart disease: Pathophysiology of extracellular matrix. *Clin Exper Hypertens*. 1999, 21: 181-198.

70. Miller A, Mujumdar V, Palmer L, Bower JD, Tyagi SC. Reversal of endocardial endothelial dysfunction by folic acid in homocysteinemic hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 2002, 15: 157-163.

71. Mujumdar VS, Tummalapalli CM, Aru GM, Tyagi SC. Mechanism of constrictive vascular remodeling by homocysteine: role of PPAR. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002, 282: C1009-1015.

72. Mujumdar VS, Aru GM, Tyagi SC. Induction of oxidative stress by homocyst(e)ine impairs endothelial function. *J Cell Biochem*. 2001, 82: 491-500.

73. Mujumdar VS, Hayden MR, Tyagi SC. Homocyst(e)ine induces calcium second messenger in vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol*. 2000, 183: 28-36.

74. Miller A, Mujumdar V, Shek E, Guillot J, Angelo M, Palmer L, Tyagi SC. Hyperhomocyst(e)inemia induces multi organ damage. *Heart Vessels*. 2000, 15: 135-143.

75. Stanger O. Physiology of folic acid in health and disease. *Current Drug Metabolism*. 2002, 3: 211-223.
76. Schnyder G, Roffi M, Flammer Y, Pin R, Hess OM. Effect of homocysteine-lowering therapy with folic acid, vitamin B12, and vitamin B6 on clinical outcome after percutaneous coronary intervention: the swiss heart study: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2002, 288: 973-979.
77. Schnyder G, Roffi M, Flammer Y, Pin R, Hess OM. Association of plasma homocysteine with restenosis after percutaneous coronary angioplasty. *Eur Heart J*. 2002, 23: 726-33.
78. Schnyder G, Roffi M, Pin R, Flammer Y, Lange H, Eberli FR, Meier B, Turi ZG, Hess OM. Decreased rate of coronary restenosis after lowering of plasma homocysteine levels. *N Engl J Med*. 2001, 345: 1593-600.
79. Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004, 24: 816-823.
80. Albertz B, Bray D, Lewis J. *Molecular biology of the cell*. 3. Ed, 1994.
81. Lewin B. *Genes VII*. Oxford University Press, 2000.
82. James WP. Treatment of obesity: the constraints on success. *Clin Endocrinol Metab*. 1984, 13: 635-659.
83. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from nucleated cells. *Nucl Acids Res*. 1988, 16: 1215.
84. Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour, New York. 1982.
85. Strobel SA, Dervan PB. Site-specific cleavage of a yeast chromosome by oligonucleotide-directed-triple helix formation. *Science*. 1990, 249: 73-75.
86. DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*. 1991, 14: 173-94.
87. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J,

Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florae L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Francesco VD, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X. The sequence of the human genome. *Science*. 2001, 291: 1304-51.

88. McPherson JD, Marra M, Hillier L, Waterston RH, Chinwalla A, Wallis J, Sekhon M, Wylie K, Mardis ER, Wilson RK, Fulton R, Kucaba TA, Wagner-McPherson C, Barbazuk WB, Gregory SG, Humphray SJ, French L, Evans RS, Bethel G, Whittaker A, Holden JL, McCann OT, Dunham A, Soderlund C, Scott CE, Bentley DR, Schuler G, Chen HC, Jang W, Green ED, Idol JR, Maduro VV, Montgomery KT, Lee E, Miller A, Emerling S, Kucherlapati, Gibbs R, Scherer S, Gorrell JH, Sodergren E, Clerc-Blankenburg K, Tabor P, Naylor S, Garcia D, de Jong PJ, Catanese JJ, Nowak N, Osoegawa K, Qin S, Rowen L, Madan A, Dors M, Hood L, Trask B, Friedman C, Massa H, Cheung VG, Kirsch IR, Reid T, Yonescu R, Weissenbach J, Bruls T, Heilig R, Branscomb E, Olsen A, Doggett N, Cheng JF, Hawkins T, Myers RM, Shang J, Ramirez L, Schmutz J, Velasquez O, Dixon K, Stone NE, Cox DR, Haussler D, Kent WJ, Furey T, Rogic S, Kennedy S, Jones S, Rosenthal A, Wen G, Schilhabel M, Gloeckner G, Nyakatura G, Siebert R, Schlegelberger B, Korenberg J, Chen XN, Fujiyama A, Hattori M, Toyoda A, Yada T, Park HS, Sakaki Y, Shimizu N, Asakawa S, Kawasaki K, Sasaki T, Shintani A, Shimizu A, Shibuya K, Kudoh J, Minoshima S, Ramser J, Seranski P, Hoff C, Poustka A, Reinhardt R, Lehrach H. A physical map of the human genome. The International Human Genome Mapping Consortium. *Nature*. 2001, 409: 934-41.
89. Gerich JE. The Genetic Basis of Type 2 Diabetes Mellitus: Impaired Insulin Secretion versus Impaired Insulin sensitivity. *Endocrine Reviews*. 1998, 19: 491-503.
90. Targher G, Alberiche M, Zenere M, Bonadonna R, Muggeo M, Bonora E. Cigarette smoking and insulin resistance in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997, 82: 3619-3624.
91. Yki-Järvinen H. Role of insulin resistance in the pathogenesis of NIDDM. *Diabetologia*. 1995, 38: 1378-1388.
92. Bouchard C. Genetics and the metabolic syndrome. *Int J Obesity*. 1995, 19: S52-S59.
93. Shuldiner AR, McLenithan JC. Genes and pathophysiology of type 2 diabetes: more than just the Randle cycle all over again. *J Clin Invest*. 2004, 114: 1414-1417.
94. Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1999, 104: 787-794.

95. Bjorntorp P. Abdominal obesity and the development of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Rev.* 1988, 4: 615-622.
96. Kissebah A, Freedman D, Peiris A. Health risk of obesity. *Med Clin North Am.* 1989, 73: 111-138.
97. Carey D, Jenkins A, Campbell L, Freund J, Chisholm D. Abdominal fat and insulin resistance in normal and overweight women: direct measurements reveal a strong relationship in subjects at both low and high risk of NIDDM. *Diabetes.* 1996, 45: 633-638.
98. Banerji M, Chaiken R, Gordon D, Kral J, Lebovitz H. Does intra-abdominal adipose tissue in black men determine whether NIDDM is insulin-resistant or insulin-sensitive? *Diabetes.* 1995, 44: 141-146.
99. So WY, Ng MCY, Lee SC, Sanke T, Lee HK, Chan JCN. Genetics of type 2 diabetes mellitus. *HKMJ.* 2000, 6: 69-76.
100. De Fronzo RA. The triumvirate: β -cell, muscle, liver: a collusion responsible for NIDDM. *Diabetes.* 1998, 37: 667-87.
101. Hertz R, Magenhelm J, Berman I, Bar-Tana J. Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4 α . *Nature.* 1998, 392: 512-6.
102. Kroder G, Bossenmaier B, Kellerer M, Capp E, Stoyanov B, Mühlhöfer A, Berti L, Horikoshi H, Ullrich A, Häring H. Tumor necrosis factor- α and hyperglycemia-induced insulin resistance: evidence for different mechanisms and different effects on insulin signaling. *J Clin Invest.* 1997, 97: 1471-7.
103. Wilson SH, Celermajer DS. Nitric oxide, cytokines and free radicals in diabetic vascular disease. In: Diabetes in the new millennium. Ed: Turtle JR, Kaneko T, Osato S. Sydney, *Pot Still Press.* 1999, 423-32.
104. Warram J, Martin B, Krolewski A, Soeldner S, Kahn C. Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents. *Ann Intern Med.* 1990, 113: 909-915.
105. Hayden MR, Tyagi SC. Intimal Redox Stress: Accelerated atherosclerosis in metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. Atheroscleropathy. *Cardiovascular Diabetology.* 2002: 1-3 [<http://www.cardiab.com>].

106. Senthil D, Raveendran M, Shen YH, Utama B, Dudley D, Wang J, Wang XL. Genotype-Dependent Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) and Its Regulatory Proteins in Cultured Endothelial Cells. *DNA Cell Biol.* 2005, 24: 218-224.
107. Tesauro M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaud-Hary PP, Moss J. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: Cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000, 97: 2832-2835.
108. Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujita T, Ochiai H, Kosuge M, Watanabe Y, Yoshii Y, Kihara M, Ishii M, Umemura S. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension.* 1998, 32: 521-526.
109. Srivastava K, Biswas UK, Narang R, Varghese JJ, Das N. Prevalence of eNOS Glu298Asp Polymorphism in Healthy Volunteers from a Region of Northern India. *Community Genet.* 2005, 8: 180-183.
110. Spinass GA. The dual role of nitric oxide in islet β -cells. *N Physiol Sci.* 1999, 14: 49-54.
111. Bates TE, Loesch A, Burnstock G, Clark JB. Mitochondrial nitric oxide synthase: a ubiquitous regulator of oxidative phosphorylation? *Biochem Biophys Res Commun.* 1996, 218: 40-44.
112. Kobzik L, Stringer B, Balligand JL, Reid MB, Stamler JS. Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995, 211: 375-381.
113. Baron AD, Zhu JS, Irsula O, Brechtel G, Keech C. Insulin resistance after hypertension induced by the nitric oxide synthesis inhibitor L-NMMA in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1995, 269: E709-E715.
114. Ukkola O, Erkkila PH, Savolainen MJ, Kesaniemi YA. Lack of association between polymorphism of catalase, copper-zinc superoxide dismutase (SOD), extracellular SOD and endothelial nitric oxide synthase genes and macroangiopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Int Med.* 2001, 249: 451-459.
115. Franks PW, Luan J, Barroso I, Brage S, Sanchez JLG, Ekelund U, Rios MS, Schafer AJ, O'Rahilly S, Wareham NJ. Variation in the eNOS Gene Modifies the Association Between Total Energy Expenditure and Glucose Intolerance. *Diabetes.* 2005, 54: 2795-2801.