

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**DİYALİZ HASTALARINDA ATEROSKLEROZİS ve
eNOS GENİNİN Glu298Asp POLİMORFİZMİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Kadir ATEŞ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Nevin İLHAN

Elazığ

2009

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. İrfan ORHAN

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Necip İLHAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Nevin İLHAN _____ **Danışman**

Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Necip İLHAN _____

Prof. Dr. M. Ferit GÜRSU _____

Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ _____

Prof. Dr. İhsan HALİFEOĞLU _____

Doç. Dr. Nevin İLHAN _____

Çok Değerli Anneme, Babama

Sevgili Eşime...

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tez çalışmalarım sırasında gerekli her türlü desteği ve yardımı benden esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Nevin İLHAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında ve eğitimim süresince yardım ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocam Prof. Dr. Necip İLHAN'a ve değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. M. Ferit GÜRSU'ya, Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ'a, Prof. Dr. İhsan HALİFEOĞLU'na, Doç. Dr. Nermin Kılıç'a, Yrd. Doç. Dr. Süleyman AYDIN'a, Yrd. Doç. Dr. Dilara KAMAN'a teşekkür ederim. Çalışmalarım sırasında yardımını gördüğüm, değerli asistan arkadaşlarım Dr. Kerem METİN ve Dr. Enver SANCAKDAR'a ayrıca Biyokimya Anabilim Dalında görevli bütün personele teşekkür ederim.

Hastalarımızın intima medya kalınlıklarını yoğun iş yüküne rağmen bıkmadan görüntüleyen Radyoloji Anabilim Dalında görevli asistan arkadaşım Dr. Sonay COŞKUN'a ayrıca çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamda örnek toplama esnasında bana verdikleri destek için hastanemiz Nefroloji servisi ve hemodiyaliz ve periton diyalizi ünitelerinin tüm değerli öğretim üyeleri ve hemşirelerine ve Özel Çağrı Diyaliz Merkezi doktor ve çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Varlıklarıyla her zaman yanımda hissettiğim, bugüne kadar her konuda beni destekleyen başta annem, babam ve eşim olmak üzere tüm aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez çalışmasını 1484 no'lu proje ile destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projelendirme (FÜBAP) fonuna teşekkür ederim.

ÖZET

Dünyada her yıl 1 milyon kişiden 50-250'si son dönem böbrek yetmezliğine girmektedir. SDBY'nin tedavisi oldukça zor, masraflı ve hasta yakınları için de çok yıpratıcı olmaktadır. Bu hasta grubunda kardiyovasküler komplikasyonlar ölümün en önemli sebebidir. Kardiyovasküler olayların temelinde de ateroskleroz yatmaktadır.

SDBY'de aterosklerozun patogeneğinde NO sistemindeki değişikliklerin bilinmesinden dolayı biz bu çalışmada eNOS enzimindeki genetik polimorfizmin de bu koşullarda etkili olup olmadığını ve bu hipotezin ADMA birikimi ile ilişkili olup olmadığını araştırmayı hedefledik. Çalışmamızda Glu298Asp varyantını kodlayan G/T polimorfizmini araştırmayı planladık. Bu gendeki polimorfizm, protein diziliminde değişikliğe neden olan ve NO sentezi ile ilişkili olan bir polimorfizmdir. İntima medya kalınlığı, Glu298Asp varyantı, ADMA, arjinin ve NO düzeylerini SDBY'li bir grup hastada ve sağlıklı kontrol bireylerinde karşılaştırılıp değerlendirilmeyi amaçladık.

Çalışmamızda 200 SDBY (130 Hemodiyaliz ve 70 Periton diyalizi) hastası ve 100 sağlıklı kontrol incelendi. eNOS Glu298Asp genotip dağılımlarında ve allel sıklıklarında kontrol ile SDBY grubu arasında önemli bir farklılık görülmedi. ADMA, SDMA ve İMK değerleri SDBY grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek tespit edildi ($p<0.05$). Plazma NO düzeyleri; HD grubunda kontrol grubuna göre yüksek olmakla beraber bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. SDBY'li hastalarda aterosklerotik risk faktörleri karşılaştırıldığında, İMK ile yaş, total kolesterol, LDL kolesterol ve ADMA arasında pozitif korelasyon; HDL kolesterol ile negatif korelasyon saptadık. İMK ile sistolik ve diyastolik kan basınçları arasında ise anlamlı bir ilişki bulunamadı.

Sonuç olarak, eNOS Glu298Asp polimorfizminin SDBY gelişme riski ve SDBY'de görülen aterosklerotik değişiklikler üzerine doğrudan bir etkisi bulunmamıştır. SDBY'li hastalarda ADMA, SDMA ve İMK ölçümlerinin ateroskleroz gelişimini belirlemede faydalı olabileceği görülmektedir.

Anahtar kelimeler: SDBY, ADMA, eNOS polimorfizmi, İMK, NO

ABSTRACT

Atherosclerosis and the Glu298Asp Polymorphism of the eNOS Gene in patients under dialysis treatment

Every year in the world 50-250 person from 1 million goes to end stage renal disease. Treatment of ESRD is very difficult, expensive and very abrasive for the relatives of the patient. In this patient group cardiovascular complications are the major cause of death. Atherosclerosis lies in the basis of cardiovascular complications.

The changes in NO system is well known in the pathogenesis of atherosclerosis in patients with ESRD so in this study we wanted to explore if genetic polymorphism of eNOS enzyme is related to this situation and whether this hypothesis is related to the accumulation of ADMA or not. In this study we planned to focus on Glu298Asp variant which codes a G/T polymorphism. This polymorphism in this gene makes a change in the protein arrangement and is related to NO synthesis. We studied intima media thickness, eNOS Glu298Asp gene polymorphism, ADMA, Arginine and NO values in a group of patients with ESRD and healthy controls.

We included 200 ESRD (130 Hemodialysis and 70 Peritoneal Dialysis) patients and 100 healthy controls to our study. For eNOS Glu298Asp polymorphism genotype distributions and allele frequencies was not significantly different between controls and ESRD group. In patients with ESRD; ADMA, SDMA and IMT values were significantly higher than healthy controls ($p < 0.05$). Plasma NO values were higher in HD group than in controls but this was not statistically significant. When atherosclerotic risk factors were compared in patients with ESRD; we found a positive correlation between IMT, age, total cholesterol, LDL cholesterol and ADMA and negative correlation with HDL cholesterol. We did not establish a significant relationship between IMT and systolic and diastolic blood pressure.

In conclusion, data obtained from the present study indicates that; eNOS Glu298Asp gene polymorphism is neither associated with the development of ESRD nor has a direct effect on the atherosclerotic changes in patients with ESRD. Measurement of ADMA, SDMA and IMT can be useful to identify the development of atherosclerosis.

Key Words: ESRD, ADMA, eNOS polymorphism, IMT, NO

İÇİNDEKİLER

	Sa yfa No
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
TABLO LİSTESİ	IX
ŞEKİL LİSTESİ	X
KISALTMALAR LİSTESİ	XI
1. GİRİŞ	1
1.1. Kronik Böbrek Yetmezliği	1
1.1.1. İnsidans ve Epidemiyoloji	2
1.1.2. Kronik Böbrek Yetmezliğinde Klinik Bulgular	3
1.1.3. Tedavi Seçenekleri	4
1.1.3.1. Hemodiyaliz	4
1.1.3.2. Periton Diyalizi	5
1.1.4. Kronik Böbrek Yetmezliği ve Ateroskleroz	6
1.2. Asimetrik Dimetilarjinin	8
1.2.1. ADMA Sentezi	9
1.2.2. ADMA'nın Hedefleri	10
1.2.3. ADMA'nın İndirgenmesi: Dimetilarj inin Dimetil	
Aminohidrolazlar	11
1.2.4. Hücresel ADMA	12
1.2.5. Dolaşımdaki ADMA	12
1.2.6. KBY ve ADMA	13
1.2.6.1. Hemodiyaliz Sırasında ADMA Konsantrasyonundaki	
Geçici Değişiklikler	14
1.2.6.2. ADMA'nın Diyaliz ile Az Temizlenmesinin Sebebi Ne	
Olabilir?	15
1.2.6.3. KBY'de Kardiyovasküler Hastalıklar ve ADMA	16
1.2.6.4. KBY'de Hipertansiyon ve ADMA	16
1.2.7. Proteinüri ve ADMA	16
1.2.8. Diyabet ve ADMA	17
1.2.9. Periferel Arteriyel Hastalık ve ADMA	18

1.2.10. Obezite ve ADMA	18
1.2.11. Preeklampsi ve ADMA	19
1.2.12. Pulmoner Hipertansiyon ve ADMA	19
1.2.13. Tedavi İçin Hedefler	19
1.3. Nitrik Oksit	21
1.3.1. NO Nasıl ve Nereden Üretilmektedir?	22
1.3.2. Nitrik Oksit Sentaz Enzimleri	24
1.4. eNOS: Yapı, Fonksiyon ve Aktivasyonu	28
1.4.1. eNOS Gen Polimorfizmleri	30
1.4.2. eNOS Gen Polimorfizmleri ve Böbrek Hastalıkları	31
1.5. SDBY, İntima Medya Kalınlığı ve Ateroskleroz	32
1.5.1. Normal İMK Değeri Nedir?	32
2.GEREÇ VE YÖNTEMLER	34
3.BULGULAR	45
4.TARTIŞMA	59
5. KAYNAKLAR	68
6. ÖZGEÇMİŞ	85

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1. Kronik Böbrek Yetmezliğinin Uluslararası Tanımı	1
Tablo 2. Kronik Böbrek Yetmezliği Nedenleri	3
Tablo 3. Kronik Böbrek Yetmezliğinde Ateroskleroza Yol Açan Faktörler	7
Tablo 4. NO Üretimini DDAH/ADMA/NO Yolağının Modülasyonu Aracılığıyla Değiştirmek İçin Tedavi Stratejileri	20
Tablo 5. NOS İzoformlarını Kodlayan Genler ve Özellikleri	27
Tablo 6. eNOS Geninde İntron/Ekson Yerleşimleri ve Uzunlukları	29
Tablo 7. NO Sentazın Üç İzoformunun Özellikleri	30
Tablo 8. Nitrit Çalışması Şeması	38
Tablo 9. Nitrat Çalışması Şeması	40
Tablo 10. ADMA Kit Bileşenleri	41
Tablo 11. Kontrol ve SDBY (HD+PD) Hasta Gruplarının Klinik ve Biyokimyasal Değerleri	45
Tablo 12. Ban II Enzimi ile Kesimden Sonra Ortaya Çıkan DNA Parçalarının Uzunlukları	49
Tablo 13. Kontrol Grubu, HD ve PD Gruplarının Glu298Asp Genotip Dağılımı ile G ve A Alel Sıklığı	51
Tablo 14. Kontrol, HD ve PD Gruplarının NO, Arjinin, SDMA, ADMA ve İMK Düzeylerinin eNOS Glu298Asp Genotiplerine Göre Dağılımı	53
Tablo 15. SDBY(HD+PD)'li Hastalarda İMK ile Aterosklerotik Risk Faktörleri Arasındaki Korelasyon	57

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1. L-Arjinin ve Endojen Metilarjininlerin Y apısı	9
Şekil 2. ADMA'nın Sentez ve Metabolizması	10
Şekil 3. Metillenmiş Arjininlerin Metabolizması	10
Şekil 4. DDAH Disfonksiyonu ve Dolaşımdaki ADMA	12
Şekil 5. ADMA Metabolizmasına Toplu Bakış	21
Şekil 6. Arjininin NOS Aracılığıyla P arçalanması	22
Şekil 7. NO Sentezi ve Etki Mekanizması	23
Şekil 8. NOS'un Kofaktörleri ve Katalizlediği R eaksiyonlar	24
Şekil 9. eNOS Genine Ait Kromozomal Y erleşim	28
Şekil 10. Nitrit standart konsantrasyon grafiği	39
Şekil 11. Nitrat standart konsantrasyon grafiği	40
Şekil 12. ADMA, Arjinin ve SDMA kalibratörüne ait kromatogram	43
Şekil 13. Hasta numunesinde ADMA, Arjinin ve SDMA ölçümüne ait kromatogram	43
Şekil 14. Hasta ve Kontrol Gruplarında Arjinin ve NO Değerlerinin Grafik ile Gösterilmesi	46
Şekil 15. Hasta ve Kontrol Gruplarında ADMA, SDMA ve İMK Değerlerinin Grafik ile Gösterilmesi	47
Şekil 16. 248 bç'lik PZR Ürünlerinin Ultraviyole Transilluminatördeki Görüntüsü	48
Şekil 17. PZR Ürünlerinin Kesimi ile Elde Edilen Glu298Asp G enotipleri	49
Şekil 18. PZR Ürünlerinin Kesimi ile Elde Edilen Glu298Asp G enotipleri	50
Şekil 19. Grupların G/A 298 Genotiplerine Göre Serum Arjinin D üzeyleri	54
Şekil 20. Grupların G/A 298 Genotiplerine Göre NO Değerleri	54
Şekil 21. Grupların G/A 298 Genotiplerine Göre SDMA D üzeyleri	55
Şekil 22. Grupların G/A 298 Genotiplerine Göre ADMA D üzeyleri	55
Şekil 23. Grupların G/A 298 Genotiplerine G öre İMK Değerleri	56
Şekil 24. İMK ile Yaş Arasındaki Korelasyon	58
Şekil 25. İMK ile Total Kolesterol Arasındaki K orelasyon	58
Şekil 26. İMK ile LDL Kolesterol Arasındaki K orelasyon	58
Şekil 27. İMK ile ADMA Arasındaki Korelasyon	58

KISALTMALAR LİSTESİ

ACE	: Anjiyotensin Konverting Enzim
ADMA	: Asimetrik Dimetilarginin
APD	: Aletli Periton Diyalizi
Asp	: Aspartat
bç	: Baz çifti
BH4	: Tetrahidrobiyopterin
CAL	: Kalmodulin
cGMP	: Siklik Guanozin Monofosfat
CRP	: C Reaktif Protein
DDAH	: Dimetilarjinin Dimetilaminohidrolaz
DKB	: Diyastolik Kan Basıncı
DMA	: Dimetilamin
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
eNOS	: Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
FAD	: Flavın Adenin Dinükleotid
FMN	: Flavın Mononükleotid
GAPD	: Gece Aralıklı Periton Diyalizi
GFH	: Glomerül Filtrasyon Hızı
Glu	: Glutamat
HD	: Hemodiyaliz
HDL	: Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HSP	: Isı Şok Proteini
IP3	: İnositolt trifosfat
IL-6	: İnterlökin 6
İMK	: İntima Medya Kalınlığı
iNOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
KBY	: Kronik Böbrek Yetmezliği
LDL	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
L-NMMA	: NG-monometil-L-arjinin
MS	: Metiyonin Sentaz

NADP ⁺	: Nikotin Amid Adenin Dinükleotid Fosfat (Okside form)
NADPH	: Nikotin Amid Adenin Dinükleotid Fosfat (Redükte form)
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa B
NNDA	: N-naftiletilen Diamin
nNOS	: Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
PD	: Periton Diyalizi
PIP2	: Fosfatidilinozitolbifosfat
PRMT	: Protein Arjinin Metil Transferaz
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RRT	: Renal Replasman Tedavisi
SAH	: S-adenozil-L-homosistein
SAM	: S-adenozil Metiyonin
SAPD	: Sürekli Ayaktan Periton Diyaliz
SDMA	: Simetrik Dimetil Arjinin
SKB	: Sistolik Kan Basıncı
SNP	: Single Nucleotid Polimorphism (Tek Nükleotid Polimorfizm)
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TAT	: Trombin-antitrombin III Kompleksi
TNF-α	: Tümör Nekrozan Faktör Alfa
VLDL	: Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein
VNTR	: Variable Number Tandem Repeats (çeşitli sayıda tandem tekrarı)

1. GİRİŞ

1.1. Kronik Böbrek Yetmezliği

Kronik böbrek yetmezliği (KBY), çeşitli hastalıklara bağlı olarak nefronların ilerleyici ve düzelmesi mümkün olmayan kaybı ile karakterize olan bir sendromdur. Glomerüler filtrasyon hızı (GFH) genellikle aylar ve/veya yıllar içinde giderek azalır ve bu azalma temelde yatan nedene göre büyük değişkenlik gösterir. Böbrek yetmezliği olan bir olguda;

- Üç ay veya daha uzun süren azotemi
- Uzun süreli üremik belirti ve bulgular
- Renal osteodistrofi belirti ve bulguları
- Anemi
- Hiperfosfatemi
- Hipokalsemi
- İdrar sedimentinde geniş silendirler
- Radyolojik incelemelerde iki taraflı küçük böbrekler;

kronik hastalık göstergeleridir. Bu özellikler KBY'yi akut böbrek yetmezliğinden ayırır. Klinik açıdan KBY, asemptomatik böbrek fonksiyon azalmasından üremiye kadar değişen bir spektrum gösterir. Aslında böbrek yetmezliğinin evreleri birbiri içine girmiş olup kesin sınırlarla ayrılması mümkün değildir. Ancak, fonksiyonel değişikliklere göre evrelendirmek klinik açıdan yararlıdır (1).

Uluslararası çalışma grubunun tanımlamasında KBY beş evreye ayrılmıştır (K/DOQL; Kidney/Dialysis Outcome Quality Initiative) (Tablo 1) (2).

Tablo 1. Kronik Böbrek Yetmezliğinin Uluslararası Tanımı

Tanım	GFH (ml/dk/1.73m ²)	Planlama
Normal veya artmış GFH ile birlikte renal hasar	>90	Teşhis, beraberindeki hastalıkların tedavisi, ilerleyişin önlenmesi, kardiyovasküler risk azaltılması.
Hafif düzeyde azalmış GFH ile renal hasar	60-89	İlerlemeyi değerlendirme, önlem alma
Orta derecede azalmış GFH	30-59	Değerlendirme ve komplikasyon tedavisi
Ciddi derece azalmış GFH	15-29	Renal replasman tedavisi için hazırlık
Böbrek yetmezliği	<15	Renal replasman tedavisi

KBY'nin **erken evresinde** sadece böbreğin fonksiyonel rezervinde azalma vardır. Böbreğin atılım, biyolojik ve düzenleyici fonksiyonları genellikle iyi olduğu için klinik belirti veya bulgu yoktur.

Orta evrede; böbrek yetmezliğinde azotemi oluşur ve bazı klinik belirtiler ortaya çıkabilirse de (anemi gibi) çoğunlukla hastalar asemptomatiktir. Gerçi bu evrede bol su içme ve poliüri, noktüri başlamıştır ama genellikle hasta bu olay yavaş geliştiği takdirde durumun farkında değildir. Ancak infeksiyon, hipovolemi, üriner sistemde bir tıkanma ve nefrotoksik ilaç kullanımı gibi araya giren akut stresler hastayı hızla üremik tabloya sokar. Geri dönüşümü mümkün olan faktörlerin giderilmesi ile hasta sıklıkla tekrar eski durumuna döner.

İleri evreye ulaşmış böbrek yetmezliğinde GFH 25-30 ml/dk'nın altına düşmüştür. Böbreğin atılım, biyosentez ve düzenleyici fonksiyonlarının büyük ölçüde bozulması, klinik belirti ve bulguların (anemiye bağlı devamlı halsizlik, noktüri ve yaygın kemik ağrıları gibi) ortaya çıkmasına neden olur.

Son dönem böbrek yetmezliğinde (SDBY) ise böbrek fonksiyonlarının ileri derecede kaybı sonucunda giderek artan azotemi ve hemen hemen her organ sistemi ile ilgili belirti ve bulgular ortaya çıkar. Son dönemde ortaya çıkan bu klinik sendrom üremi olarak tanımlanır (1).

1.1.1. İnsidans ve Epidemiyoloji

KBY birçok nedene bağlı olarak gelişebilir ve bu nedenlerin sıklığı ülkelere göre değişmektedir. ABD'de son dönem böbrek yetmezliği sebeplerinin %39'unu diabetes mellitus, %26'sını hipertansiyon ve %11'ini glomerulonefrit oluşturmaktadır (3). Türkiye'de SDBY nedenleri ile ilgili en sağlıklı veriler Türk Nefroloji Derneği tarafından elde edilmiştir. Türk Nefroloji Derneği–2007 Registry raporuna göre 2007 yılı içinde KBY saptanan olguların etyolojik dağılımı Tablo 2'de belirtilmektedir. Ülkemizde KBY saptanan olgularda kronik böbrek yetmezliğine götüren ilk üç neden kronik glomerulonefrit, diyabet ve hipertansiyon olarak bulunmuştur (4).

Tablo 2. Kronik Böbrek Yetmezliği Nedenleri (4)

HASTALIK	TÜRKİYE (%)
Glomerülonefrit	9.4
Diabetes Mellitus (Tip 1 ve Tip 2 birlikte)	26.1
Hipertansiyon	24.4
Polikistik Böbrek Hastalığı	4.4
Piyelonefritler	4.1
Renal vasküler hastalık	1.0
Renal amiloidoz (primer veya sekonder)	2.4
Bilinen diğer nedenler	7.9
Nedeni bilinmeyen	18.4
Bilgi yok	1.8

1.1.2. Kronik Böbrek Yetmezliğinde Klinik Bulgular

Sıvı-Elektrolit Bozuklukları: Hipovolemi, hipervolemi, hipernatremi, hiponatremi, hipokalsemi, hiperpotasemi, hipopotasemi, hiperfosfatemi, metabolik asidoz, hipermağnezemi.

Sinir Sistemi: Stupor, koma, konuşma bozuklukları, uyku bozuklukları, demans, konvülsiyon, polinöropati, başa ağrısı, sersemlik, irritabilite, kramp, konsantrasyon bozuklukları, yorgunluk, huzursuz bacak (restless leg) sendromu, tik, tremor, myoklonus, terleme fonksiyonlarında bozulma, ruhsal bozukluklar.

Gastrointestinal Sistem: Hıçkırık, parotit, gastrit, iştahsızlık, stomatit, pankreatit, ülser, bulantı, kusma, gastrointestinal kanama, kronik hepatit, motilite bozuklukları, özafajit (kandida, herpes gibi fırsatçı etkenlere bağlı), intestinal obstrüksiyon, perforasyon, asit.

Hematoloji-İmmünoloji: Normokrom normositer anemi, eritrosit fragilitesinde artış, kanama, lenfopeni, infeksiyonlara yatkınlık, immün hastalıkların yatışması, kanser, mikrositik anemi (alüminyuma bağlı), aşıyla sağlanan immünitede azalma, tüberkülin gibi tanısal testlerde bozulma.

Kardiyovasküler Sistem: Perikardit, ödem, hipertansiyon, kardiyomiyopati, hızlanmış ateroskleroz, aritmi, kalp kapak hastalığı.

Pulmoner Sistem: Plevral sıvı birikimi, üremik akciğer, pulmoner ödem oluşumu.

Cilt: Kaşıntı, gecikmiş yara iyileşmesi, solukluk, tırnak atrofi, hiperpigmentasyon, üremik döküntü, ülserasyon, nekroz.

Endokrin Sistem: Glukoz intoleransı, hiperlipidemi, hiperparatiroidi, büyüme geriliği, hipogonadizm, impotans, libido azalması, hiperürisemi, malnütrisyon, hiperprolaktinemi.

Kemik: Üremik kemik hastalığı, hiperparatiroidi, amiloidoz (β_2 -mikroglobülin), D vitamini metabolizması bozuklukları, artrit.

Diğer: Susuzluk, kilo kaybı, hipotermi, üremik ağız kokusu, miyopati, yumuşak doku kalsifikasyonu, akkiz renal kistik hastalık, karpal tünel sendromu, noktüri sayılabilir (1).

1.1.3. Tedavi Seçenekleri

Son dönem böbrek yetmezliği, üç farklı tedavi seçeneğine sahip olmasıyla diğer son dönem organ yetersizliklerinden ayrılır. Bu tedavi seçenekleri sırasıyla hemodiyaliz (HD), periton diyalizi (PD) ve böbrek transplantasyonundan oluşmaktadır. Bu renal replasman tedavilerinin (RRT) her biri kendine özgü yararlar ve risklere sahiptir.

Replasman tedavilerinin seçimi, hastanın kliniğine ve tercihinine göre ayarlanmaktadır. Bu tedavilerin birbirinin alternatifi veya tamamlayıcısı olabileceği ve klinik duruma göre tedavi seçiminin ayarlanabileceği hekim ve hasta tarafından bilinmelidir. Burada kilit nokta, ilerleyici böbrek yetmezliği olan hastaların erken tespit edilmesi ve bu hastaların yaşam tarzlarına ve sosyo ekonomik düzeylerine uygun tedavinin seçilmesidir. Tedavi şeklinin erken belirlenmesi, acil servise başvuruları, gelişebilecek komplikasyonları ve maliyeti önemli ölçüde azaltmaktadır (1).

1.1.3.1. Hemodiyaliz

1946 yılında Willem Koff tarafından ilk hemodiyaliz uygulaması, başlangıçta akut böbrek yetmezliğinin tedavisinde, 1960'lardan itibaren de giderek KBY bulunan hastalarda uygulanmaya başlandı (5).

Böbrek yetmezliği nedeniyle uygulanan ekstrakorporal tedavilerde temel ilke, hastanın vücudunun dışında sıvı ve solütlerin kandan uzaklaştırılması ve/veya

eklenmesidir. Bu işlem sırasında hastanın kanı yapay bir yarı geçirgen membran içeren bir hemodiyalizör veya hemofiltreden sürekli olarak geçirilir.

Diyaliz yarı geçirgen bir membranın iki tarafında yer alan iki farklı solüsyon arasında sıvı ve elektrolit alışverişidir. Su ve küçük molekül ağırlıklı maddeler membranın deliklerinden kolayca geçerken, protein gibi büyük molekül ağırlıklı maddeler geçiş gösteremezler ve membranın iki yanındaki konsantrasyonları değişmez (1).

Diyalizin Klinik Endikasyonları

- Akut böbrek yetmezliği
- Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda kreatinin klirensi 10 ml/dk'nin altına inince RRT başlanır, ancak bazı hastalarda kreatinin klirensi bu değere düşmeden çeşitli nedenlerle hipervolemi, hiperpotasemi, asidoz ve üremik komplikasyonlar (perikardit, plörit, ensefalopati, üremik akciğer, bulantı, kusma, kontrol edilemeyen hipertansiyon, kaşıntı v.b) gelişebilir. Bu hastalar konservatif tedavi ile düzeltilemez ise diyaliz ihtiyacı duyarlar.
- Yüksek doz ilaç alımı ve zehirlenmelerde
- Aşırı ve tedaviye dirençli ödem
- İleri derecede sıvı - sodyum dengesizliği (hiponatremi, hipervolemi)
- Hiperpotasemi (serum potasyumunun 6.5 -7 mEq/L ve üzerinde olması)
- Metabolik asidoz (plazma bikarbonat 15 mEq/L ve kan pH'sı 7.15'den düşük olması)
- Kan üresinin 250-300 mg/dl'den fazla olması
- Kan üresinin günde 100 mg/dl veya kan potasyumunun günde 1 mEq/L'den fazla yükseldiği katabolik durumlar
- Hiperfosfatemi
- Hiperkalsemi
- Hiperürisemi
- Metabolik alkaloz (1)

1.1.3.2. Periton Diyalizi

Bir RRT şekli olan PD son 20 yılda basit, rahat ve nispeten ucuz olması nedeni ile tercih edilir olmuştur. Esas olarak sıvı içeren iki kompartmanı ayıran bir

membran aracılığıyla su ve solütlerin transportundan ibarettir. Burada diyalizer olarak iş gören periton zarıdır.

PD tekniğinde amaç vücuttan ozmotik yolla uzaklaşmasını istediğimiz maddeleri kapsamayan, uzaklaşmasını istemediğimiz maddeleri ise bileşiminde kanda bulunduğu oranda içeren steril bir diyaliz solüsyonunu periton boşluğu içine güvenli bir teknikle doldurmak, ozmotik eşitlemenin sağlanmasına kadar orada tutmak ve daha sonra bu sıvıyı vücuttan uzaklaştırarak bu işlemi gerektiği sürece tekrarlamaktır (6).

PD, Sürekli Ayaktan Periton Diyaliz (SAPD), Aletli Periton Diyalizi (APD) ve bunların karma tipleri olarak üç grupta incelenebilir.

1. SAPD: Karında sürekli olarak diyaliz solüsyonu bulunur ve günde 4 kez değiştirilir. İşlemler elle yapılır ve solüsyonun peritona verilmesi ve alınması yer çekimi etkisi ile gerçekleşir.

2. APD: Hızlı gelişen bir periton diyaliz modelidir. Peritonit sıklığının en az, sağlanan klirensin en fazla olduğu PD tipidir (1). Esas olarak iki temel gruba ayrılır.

a- Sürekli döngüsel periton diyalizi (SDPD)

b- Gece aralıklı periton diyalizi (GAPD)

3. Karma rejimler: Standart SAPD ve APD ile sağlanan klirensleri ve ultrafiltrasyonu hastanın yaşam tarzını bozmayacak şekilde ayarlamak için geliştirilen karma bir yöntemdir (7).

1.1.4. Kronik Böbrek Yetmezliği ve Ateroskleroz

Kalp hastalığı SDBY hastaları arasında ölümün en sık nedenidir. SDBY hastalarında kardiyovasküler nedenli ölümlerin %39'u kardiyak arrest ve %24'ü akut miyokard enfarktüsüne bağlıdır (8). Yaş, cinsiyet, ırk ve diyabet varlığı açısından düzeltme yapıldıktan sonra bile diyaliz hastaları arasında kardiyovasküler mortalite oranının sağlıklı popülasyondan 10-20 kat daha fazla olması böbrek yetmezliğinin kendisinin kardiyovasküler hastalık için önemli bir risk olduğunu göstermektedir (9). Hipertansiyon, dislipidemi, hiperhomosisteinemi, inflamasyon, oksidatif stres, endotel disfonksiyonu ve malnütrisyon SDBY hastalarında aterogenezin risk faktörleridir (10). SDBY hastalarında aterogeneze yol açan risk faktörleri Tablo 3'de toplu olarak görülmektedir.

Tablo 3. Kronik Böbrek Yetmezliğinde Ateroskleroza Yol Açan F aktörler (10)

Diabetes Mellitus
Hipertansiyon
Aşırı sıvı yüklenmesi
Dislipidemi
Lipoprotein artışı
Hipertrigliseridemi
HDL azalması
IDL artışı
VLDL artışı
Hiperhomosisteinemi
Oksidatif stres
Hiperparatiroidizm
Ca-P üretimi artışı
Hiperfibrinojenemi
İnflamasyon
Malnutrisyon

SDBY hastalarında total kolesterol ve LDL düzeyleri artmamış olmasına rağmen, azalmış HDL düzeyleri, artmış trigliserid, Lp(a), IDL ve VLDL düzeyleri nedeniyle bu hastaların lipid profili aterojenik potansiyel gösterir (11).

İnflamasyonun damar hastalığının gelişmesinde ve/veya ilerlemesindeki önemi artarak kabul görmektedir. İnflamasyon damar hastalığı gelişimine çeşitli mekanizmalarla katkıda bulunmaktadır. İnflamasyon; damar ve trombosit adezyon moleküllerinin ekspresyonu, lipoproteinlerin yapı ve konsantrasyonu, koagülasyon faktörlerinin düzeyleri ve oksidan ve antioksidanların aktivitesiyle ilişkilidir (12). Bugüne kadarki bulgular SDBY'nin kendisinin kronik ve ya tekrarlayan bir inflamasyon durumu olduğunu göstermektedir. SDBY hastalarında mortalite riskinin en güçlü göstergelerinden biri olan hipoalbuminemi, yalnızca malnutrisyon sonucunda değil aynı zamanda inflamasyona sekonder de görülür. Diyaliz hastalarında yapılan bir çok çalışmada TNF- α ve IL-6 gibi inflamasyon belirteçlerinde, CRP ve fibrinojen gibi akut faz reaktanlarının düzeylerinde artış

olduğu gösterilmiştir (13). Oksidatif stres SDBY hastalarında endotel disfonksiyonunu artırmaktadır. Okside LDL endotel hücreleri için sitotoksiktir ve bir damar düz kas hücresi mitojeni olan trombosit kaynaklı büyüme faktörünün sekresyonunu stimüle eder (14). SDBY hastalarında oksidatif stres artmıştır ve kardiyovasküler hastalığı olanlarda kardiyovasküler hastalığı olmayanlardan daha ciddi boyutlardadır. HD hastalarında oksidatif stres ve endotel disfonksiyon belirteçleri koroner arter ve karotis arter aterosklerozları ile ilişkilidir (15)

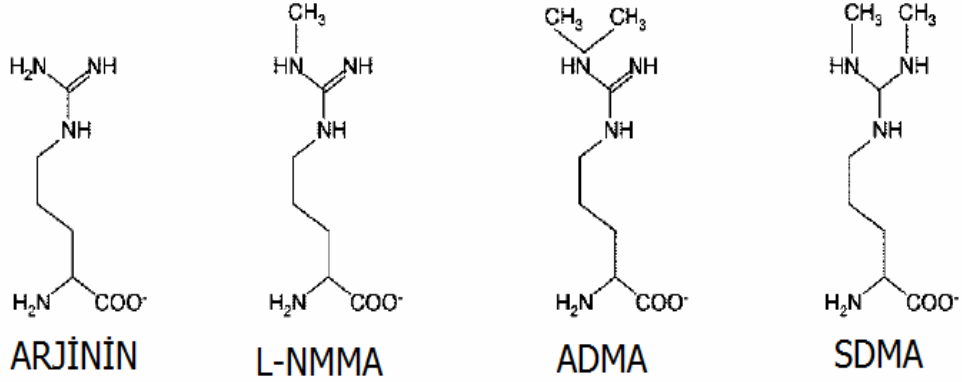
Bazı araştırmacılar kronik HD ve PD hastalarında prokoagülan faktörlerin (fibrinojen ve fibrinopeptid A) ve tromboz belirteçlerinin [trombin-antitrombin III kompleksi (TAT) ve D-dimer] düzeylerinde artış olduğunu saptamışlardır. Diyalize girmeyen üremik hastalarla diyalize giren hastalar karşılaştırıldığında, diyalize giren hastalarda TAT, D-dimer ve TNF- α 'nın artmış olması SDBY hastalarında diyalizin prokoagülan aktiviteye katkısı olduğunu göstermektedir (16).

Birçok araştırmacı genel popülasyonda aortik kalsifikasyon ve kardiyovasküler mortalite arasında ilişki olduğunu rapor etmişlerdir. Yaş, cinsiyet ve kan basıncı açısından eşleşmiş kontrol grubuyla SDBY'li hastalar kıyaslandığında; SDBY'li hastalarda kalsifiye lezyonların ve ateroskleroz plaklarının kontrol grubuna göre çok daha sık görüldüğü tespit edilmiştir. Arteriyel kalsifikasyonun derecesi yaş, diyaliz tedavisinin süresi, diyabet varlığı ve kalsiyum fosfat bağlayıcılarının kullanımıyla artmaktadır (17).

1.2. Asimetrik Dimetilarginin

Asimetrik Dimetilarginin (ADMA); plazmada dolaşan, idrarla atılan, hücre ve dokularda bulunan ve doğal olarak oluşan bir aminoasittir. ADMA, nitrik oksit sentazların (NOS) endojen bir inhibitörüdür ve bu yönüyle ilgiyi üzerine çekmiştir. Çünkü NOS'ları inhibe ederek özellikle kardiyovasküler sistemde dikkate alınması gereken biyolojik etkiler oluşturma potansiyeline sahiptir. Yapılan birçok çalışma ADMA'nın endotel disfonksiyonu, kardiyovasküler hastalıklar ve böbrek hastalıkları için risk belirteci olduğunu göstermiştir (18).

Üç tip metillenmiş arjinin bulunmaktadır (Şekil 1). Bunlar ADMA, N^G-monometil-L-arjinin (L-NMMA) ve simetrik dimetil arjinin (SDMA= ADMA'nın izomeri)'dir (19).



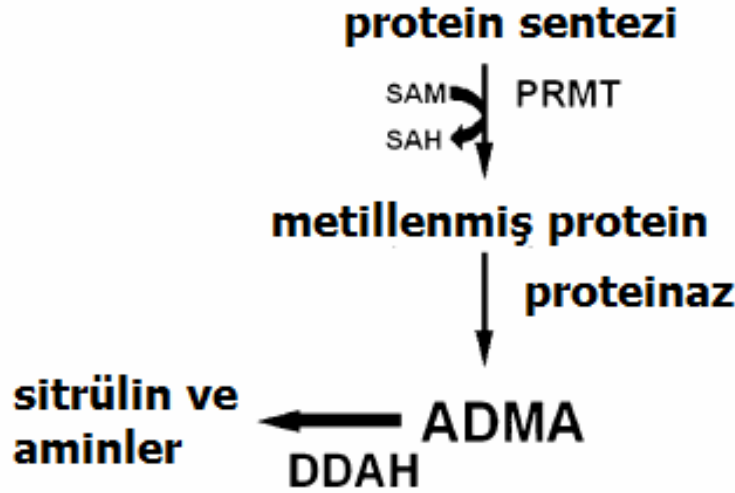
Şekil 1. L-Arjinin ve Endojen Metilarjininlerin Yapısı (19)

Metillenmiş arjininlerin biyolojik aktivitesi ilk olarak Hibbs ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Yapılan çalışmada L-NMMA'nın *in vitro* makrofaj aktivasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir (20). Daha sonra 1992 yılında Vallance ve arkadaşları ADMA ve L-NMMA'nın insan plazmasında ve idrarında bulunduğunu ve NOS'un endojen kompetitif inhibitörü olarak etki ettiklerini göstermişlerdir (21). SDMA'nın NOS aktivitesi üzerine hiçbir etkisi olmadığı için ve L-NMMA insan plazmasında çok az miktarda bulunduğundan dolayı, günümüzde ADMA'nın NOS aktivitesini inhibe eden endojen olarak oluşan metilarjininlerin majör tipi olduğu düşünülmektedir (19).

1.2.1. ADMA Sentezi

İnsan vücudunda günde yaklaşık olarak 300 mmol ADMA üretilmektedir (19). Proteinlerdeki arjinin kalıntılarının, Protein Arjinin Metiltransferaz (PRMT)'ların etkisi ile metillenmeleri sırasında ADMA sentez edilmektedir. Proteinlerdeki arjininlerin metilasyonu bir posttranslasyonel modifikasyon olup proteinlerin içinde yer alan arjinin aminoasitinin guanidin azotlarına 1 -2 metil grubu eklenmesi şeklindedir. PRMT'lerin genel olarak iki tipi vardır: Tip-1, ADMA oluşumunu katalizlerken, Tip-2 ise her iki guanidino nitrojenini de metilleyerek SDMA oluşumunu sağlar. Birçok izoformlarıyla birlikte her iki tip PRMT ayrıca tek (mono) metilasyon yapabilir ve böylece N^G-monometil-L-arjinin (L-NMMA) oluşmasına öncülük ederler. Proteinler indirgendikten sonra sitozolde serbest metilarjininler ortaya çıkar; bugüne kadar serbest arjininden ADMA'nın sentez edildiği direkt bir yol tanımlanamamıştır. Hücre içinde meydana gelen ADMA

miktarı, proteinlerdeki arjinin metilasyonunun ölçüsüne ve proteinlerin yıkım hızına bağlı kalmaktadır (Şekil 2) (18).

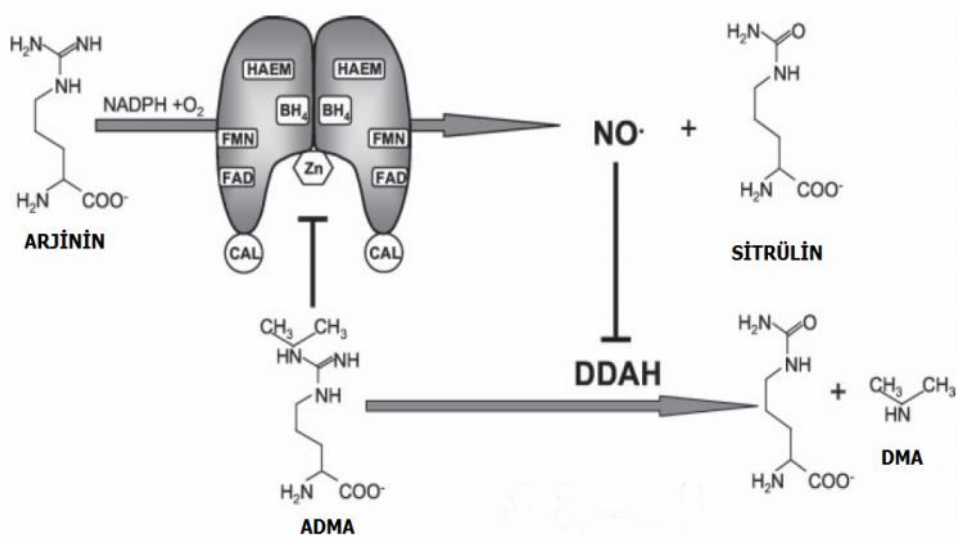


Şekil 2. ADMA'nın Sentez ve Metabolizması.

DDAH; dimetilarjinin dimetilaminohidrolaz, PRMT; protein arjinin metiltransferaz, SAM; S-adenozilmetiyonin, SAH; S-adenozilhomosistein.

1.2.2. ADMA'nın Hedefleri

ADMA, NOS'un her üç izoformunu da inhibe eder ve L -NMMA ile yaklaşık olarak aynı güçtedir. Metil arjinin metabolizması di rekt olarak NO tarafından düzenlenebilir (Şekil 3).



Şekil 3. Metillenmiş Arjininlerin Metabolizması

NOS; L-Arjinin ve moleküler oksijenin sitrülin ve NO dönüşümünü katalizler. NOS enzimleri katalitik olarak aktif homodimerlerdir ve optimal aktivite için kofaktörlerin [flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN), HAEM ve tetrahidrobiyopterin (BH4)] ve kalmodulinin (CAL) ba lanmasına gereksinim duyarlar. Her bir NOS dimeri bir  ink o atomuyla koordine olmaktadır. NO, sistein art  ının aktif bölgesinin S-Nitrozasyonu aracılığıyla direkt olarak DDAH'ı inhibe eder. DDAH'ın inhibisyonu sonucunda ADMA birikimi ve NOS inhibisyonu ortaya çıkar (18).

ADMA için bilinen en belirgin hedef, NOS olmasına rağmen bunun tek hedef olup olmadığı henüz kesin değildir. ADMA'nın potansiyel hedeflerinden biri de arjinin-glisin amidino transferazdır ki bu enzim ADMA'yı metabolize eden DDAH'a benzer yapıya sahiptir. ADMA bu enzimin zayıf bir inhibitörü d r (18).

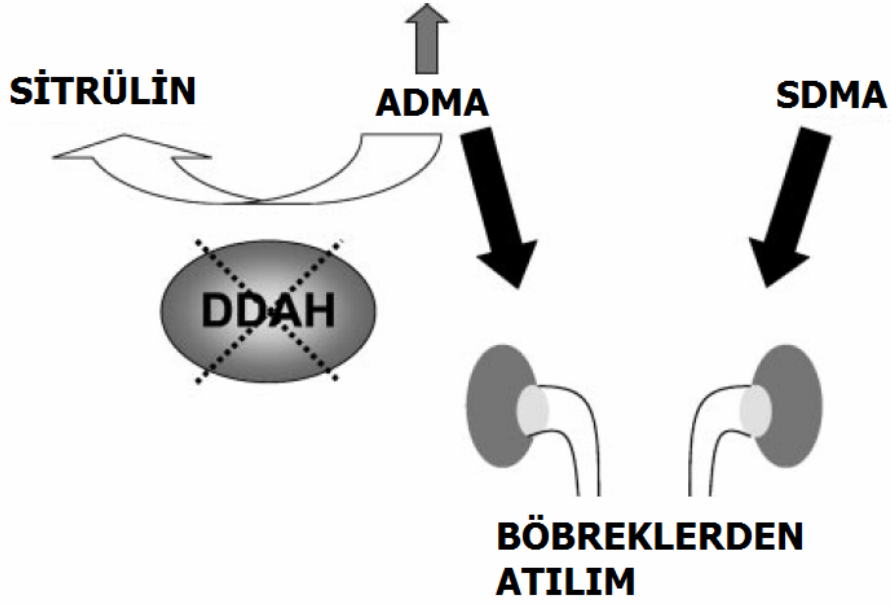
1.2.3. ADMA'nın İndirgenmesi: Dimetilarjinin Dimetil Aminohidrolazlar

Metilarjininler böbrekler aracılığıyla vücuttan atılmaktadır. SDMA'nın (NOS'u inhibe etmeyen metilarjini n) tamamına yakını de i meksizin böbreklerden idrarla atılmaktayken ADMA ve L -NMMA büyük oranda metabolize edilmektedir. Başlıca metabolik yol ise DDAH enzimlerinin katalizledi i bir reaksiyonla sitrülin ve dimetilamin oluşumu şeklindedir.

Hem ADMA hem de SDMA böbrekler tarafından temizlenir ve böbrek yetmezliğinde her ikisi de artar. ADMA a ynı zamanda DDAH tarafından metabolize olarak da uzaklaştırılmaktadır. DDAH aktivitesindeki bozukluk selektif olarak dolaşımdaki ADMA miktarının artmasına yol açarken, SDMA ise de i memi  olarak kalır ( ekil 4) (18).

Bu reaksiyon muhtemelen enzimin tersiyer yapısında aktive durumda bulunan sistein tarafından ADMA molekülünün guanidino parçasına yapılan nükleofilik bir atağı içermektedir. Bunun sistein olduğuna şüphe yoktur çünkü bunu bir serin rezid s yle değiştirmek enzimi inaktif hale çevirmektedir. Bu sistein NO tarafından düzenlenmeye ve oksidasyona duyarlıdır (18).

DDAH'lar açık bir subsellüler lokalizasyonu olmayan predominant sitozolik enzimlerdir. Aktiviteleri belirli divalent katyonlar tarafından inhibe edilmekle beraber bunlar için açık bir kofaktör ihtiya ı tanımlanmamıştır.



Şekil 4. DDAH Disfonksiyonu ve Dolaşımdaki ADMA

İnsanları da içeren yüksek organizmalarda DDAH'ın 2 izoformu tanımlanmıştır: DDAH-1 birinci kromozomda ve DDAH-2 altıncı kromozomda lokalize genler tarafından kodlanmaktadır. Bu iki izoform farklı dokularda gösterilmiş olmakla beraber benzer a ktivitelere sahiptir. DDAH-1 ile nöronal NOS ve DDAH-2 ile endotelial NOS ekspresyonları arasında bir örtüşme vardır (22).

1.2.4. Hücresel ADMA

ADMA hücrelerin içinde oluşur ve hücresel düzeylerinin patofizyolojik duruma göre değiştiğine dair kanıtlar mevcuttur. Endotelial hücreler PRMT'lerin ve DDAH'ların her ikisini de eksprese ederler ve DDAH'ın inhibisyonu önemli ölçüde ADMA birikimine yol açar (18).

1.2.5. Dolaşımdaki ADMA

Böbrekler metilarjininlerin temizlenmesinde bir yol oluşturdıkları için ADMA ve SDMA konsantrasyonlarının böbrek yetmezlikli hastalarda artması şaşırtıcı değildir. SDMA, kreatininle aynı oranda yükselir ve ADMA'dan daha yüksek değerlere ulaşır. Bu durum şaşırtıcı değildir çünkü ADMA; DDAH tarafından metabolize edilirken, SDMA metabolize edilmemektedir.

Böbreklerden atılım yoluyla ve DDAH aktivitesiyle elimine edilen dolaşımdaki ADMA oranı türler arasında farklılık göstermektedir. Ratlarda ADMA'nın büyük çoğunluğu (yaklaşık %90'ı) metabolize edilirken yalnızca çok

küçük bir miktarı idrarla değişmeden atılır (18). İnsanlarda ADMA infüzyonunun dimetilamin üretiminde artışa yol açması DDAH aktivitesinin bulunduğunu göstermektedir. Her gün 260 μmol ADMA'nın metabolize olduğu ve 60 μmol 'ün ekskrete olduğu hesaplanmıştır. ADMA eliminasyonunun tam yetmezliğinde plazma ADMA konsantrasyonlarında günde 5 $\mu\text{mol/L}$ artış olması beklenir (23). Bu bulgular ışığında ADMA değerlerinde kısa zaman periyodunda anlamlı bir değişme beklenmez. Ancak anlamlı miktardaki proteoliz veya dokudan plazmaya ani ADMA salınımı olması durumunda ADMA düzeylerinde kısa sürede değişim olabilir.

1.2.6. KBY ve ADMA

KBY'de ADMA'nın potansiyel rolü Zoccali C. ve arkadaşları tarafından detaylarıyla araştırılmıştır. Bu yazarların teorilerine göre; KBY'de ADMA'nın birikimini açıklayacak en azından dört muhtemel mekanizma mevcuttur. Bunlar: (i) proteinlerin artmış metilasyonu; (ii) artmış protein yıkımı; (iii) DDAH tarafından azalmış metabolizma (iv) böbreklerden azalmış atılım (24).

ADMA bir üremik toksin sayılması için birçok kritere sahiptir: böbrek yetmezliği geliştikçe vücutta biriken bir guanidino bileşiği olup aynı zamanda da , protein metabolizmasının bir ürünüdür. NOS'lar üzerinden etki gösterir, kronik böbrek yetmezlikli hastalarda bozulmuş olan birçok biyolojik fonksiyona etki etme potansiyeline sahiptir. Bu etkiler kardiyovasküler sistem, kemikler ve enfeksiyonlara karşı defans sistemi üzerinedir (21).

Böbrek yetmezlikli hastalarda ADMA plazmada birikir. Değişken DDAH aktivitesine, böbrek DDAH'ının kendisinin tüm ADMA eliminasyonuna katkısına ve çeşitli böbrek patolojilerinin böbrek DDAH ekspresyonu üzerine farklı etkiler yapmasına bağlı olarak ADMA'da değişken artışlar görülmektedir (21).

ADMA' nın plazma düzeyleriyle endotel disfonksiyonunun derecesi arasında ilişki mevcuttur (25). Hemodiyalize giren bir hasta grubunda yapılan çalışma sonucunda; ADMA düzeylerinin, bu hastalarda gelecekte oluşabilecek kardiyovasküler risklerin ve bu hastalardaki mortalite oranlarının tahmin edilmesinde faydalı olabileceği ileri sürülmüştür (26). L-arjinin ilavesinin ADMA' nın etkilerini tersine çevirmesi gerektiği düşünülmesine rağmen, böbrek hastalıklarında arjininin etkileriyle ilgili bilgiler tutarsızdır. Şöyle ki bazı çalışmalar renal yetmezlikli

hastalarda arjinin verilmesinin endotel fonksiyonunu geliştirdiğini gösterirken bazı çalışmalar bu bilgiye katılmaz (25,27).

Dimetilarjininler idrarla atıldığından dolayı, böbreklerden yetersiz atıl ım KBY’li hastalarda ADMA düzeylerinin artışına katkıda bulunabilir. Bununla beraber son zamanlarda bu görüşe karşı olan kanıtlar artmaktadır. Öncelikle, SDMA ve ADMA gibi dimetilarjininler ratlara intravenöz olarak enjekte edildiğinde; enjekte edilen SDMA’nın %66’sı idrarla atılırken ADMA’nın ise yalnızca %5’i idrarla atılmaktadır (28). İkinci olarak, plazma ADMA düzeyleri normal böbrek fonksiyonuna sahip olan yeni başlangıçlı böbrek hastalarında bile artmış olarak bulunmaktadır (29). Bu bulgular yalnızca çok az miktarlarda ADMA’nın idrarla atıldığını ve ADMA’nın böbrekler aracılığıyla temizlenmesinin dolaşımdaki düzeylerine çok az katkı sağladığını göstermektedir. Bunu destekleyecek şekilde, SDBY’li hastalarda ADMA’nın plazma düzeyleri SDMA’ninkinden belirgin olarak daha düşüktür (30).

Okubo ve arkadaşları böbrek yetmezlikli deneysel hayvan modelinde PRMT’nin inhibisyonunun plazma ADMA düzeylerini düşürdüğünü göstermişlerdir (31). KBY’de PRMT’nin upreglasyonunun ve/veya DDAH’ın downreglasyonunun moleküler mekanizmaları tam olarak açıklanamamış olmasına rağmen burada sıralanacak olan kanıtlar DDAH ve PRMT’nin bozulmuş düzenlenmesinde oksidatif stresin etkili olabileceğini göstermektedir: (i) endotel hücre kültüründe okside LDL tarafından tip I PRMT’nin gen ekspresyonu artırılmıştır (32); (ii) yüksek glukoz konsantrasyonları olan ortamda damar hücrelerinde DDAH aktivitesi azalmaktadır (33); ve (iii) KBY’li hastalarda oksidatif stres oluşumunun arttığı çok iyi bilinmektedir (34).

1.2.6.1. Hemodiyaliz Sırasında ADMA Konsantrasyonundaki Geçici Değişiklikler

ADMA’nın plazma konsantrasyonlarının hemodiyaliz ile kreatinin gibi efektif şekilde azalması beklenir. Bu beklenti SDBY’de ADMA’nın plazma konsantrasyonunun aşırı artış göstermesiyle desteklenmektedir. SDBY’de böbreklerin ADMA ve SDMA’yı temizleme yeteneği kaybolmuştur (35).

MacAllister ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, devam eden hemodiyaliz sırasında incelenen ADMA değerlerinde küçük bir azalma, diyalizin bitişinden sonra

ise küçük bir artış bulunmuştur. Hemodiyalizden 8 saat sonra ADMA düzeylerinde açık bir azalma tespit edilmemiştir. ADMA/kreatinin oranı hemodiyaliz sırasında belirgin bir artış göstermiş ve hemodiyalizin bitiminden 8 saat sonra diyaliz öncesi değerlerine yaklaşmış olarak bulunmuştur. Bu bulgular ADMA'nın hemodiyaliz sırasında kreatininden çok daha az efektif olarak temizlendiğini göstermektedir (35).

Kielstein ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada hemodiyaliz sırasında ADMA değerlerinde küçük bir artış olduğunu tespit etmişlerdir. Hemodiyalizden 6 saat sonra ise plazma ADMA değerlerinde küçük bir azalma tespit etmişlerdir. Bu durum plazma ve periferik doku kompartımanları arasında ADMA ve sıvı hacimlerinin 'redistribüsyon fenomeni' ile açıklanmıştır (36).

1.2.6.2. ADMA'nın Diyaliz ile Az Temizlenmesinin Sebebi Ne Olabilir?

Bir hipoteze göre ADMA'nın diyaliz ile az temizlenmesinin sebebi plazmada proteinlere bağlanması olabilir. Bu hipotezi araştırmak için aynı hastanın plazması önce proteinler çöktürülmeden çalışılmış ve daha sonra aynı plazma %5 trikloroasetik asitle muamele edilip proteinler çöktürülerek çalışılmıştır. Proteinler çöktürüldükten sonra ADMA değerlerinin 1.25 μmol 'den 0.67 μmol 'e ve SDMA'nın 0.71 μmol 'den 0.39 μmol 'e indiği tespit edilmiştir. Bu bulgular proteine bağlanmanın ADMA için %45 ve SDMA için %65 oranında olduğunu göstermektedir (37).

Genel popülasyonla kıyaslanınca diyaliz hastalarında kardiyovasküler mortalite oldukça yüksektir. Endotel disfonksiyonu diyaliz hastalarında kardiyovasküler hastalıkları açıklamada major patofizyolojik fenomenlerdendir. Bu durum NOS aktivitesinin azalmasına yol açan artmış ADMA plazma düzeyleriyle ilişkili olabilir. Bu nedenle ADMA; SDBY'li hastalarda artmış mortalite ve morbiditeyi açıklayabilir.

Kielstein ve arkadaşları (36) çalışmalarında kardiyovasküler hastalığı olan diyaliz hastalarında ADMA düzeylerinin kardiyovasküler hastalığı bulunmayan diyaliz hastalarından daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Uzun süreli yapılan çalışmalar plazma ADMA düzeyinde 2 $\mu\text{mol/L}$ 'lik bir artış fatal ve non-fatal kardiyovasküler olaylar için %37'lik bir risk artışına yol açtığını göstermiştir. Aynı çalışmada yüksek ADMA düzeylerine sahip hastaların daha düşük ADMA düzeyine sahip olan hastalara oranla yaşam beklentisinin daha

kısa olduğu gösterilmiştir (26). Bu bulgular diyaliz hastalarında ADMA'nın kardiyovasküler risk faktörü olduğunu açıkça göstermektedir.

1.2.6.3. KBY'de Kardiyovasküler Hastalıklar ve ADMA

Böbrek hastalıklarındaki durum ADMA'daki yükselişin kardiyovasküler risklere de eşlik etme ihtimali üzerine spekülasyonlar yapılmasına neden olmuştur. Çeşitli kardiyovasküler risk durumlarında ADMA düzeylerinde yükselme tespit edilmiştir (38). Bu durumlar hiperkolesterolemi (38), hipertansiyon (39), diyabet (40), hiperhomosisteinemi ve aterosklerotik hastalıklardır (41). Bu hastalıklardaki ADMA düzeyleri böbrek yetmezliğindeki ADMA düzeyleri kadar bulunmamıştır.

KBY'li hastalarda plazma ADMA düzeylerinin İMK (42), sol ventrikül hipertrofisi (42), kardiyovasküler komplikasyonlar ve mortalite (26) ile güçlü olarak ilişkili olduğu rapor edilmiştir.

Hemodiyaliz tarafından dolaşımdaki ADMA'nın kısa süreli azalmasının SDBY'li hastaların endotelial fonksiyonlarında gelişme sağladığı gösterilmiştir (43). Plazma ADMA düzeyleri ve dolaşımdaki endotelial progenitor hücreler arasında zıt korelasyon olduğu rapor edilmiştir (44). Bu bulgular SDBY'li hastalarda ADMA'nın aterosklerozun ilerlemesi ve gelişmesine aktif olarak katkı sağladığını göstermektedir.

1.2.6.4. KBY'de Hipertansiyon ve ADMA

Hipertansiyon KBY'li hastalardaki en sık komplikasyondur. Hipertansiyon yalnızca kardiyovasküler mortaliteye yol açmakla kalmaz aynı zamanda böbrek hastalığının ilerlemesinde bağımsız bir faktördür (45). KBY'de biriken ADMA hipertansiyon gelişimiyle ilişkili olarak görülmektedir. Subnefrektomili ratlarda plazma ADMA düzeylerinin kan basıncı düzeyleriyle güçlü olarak korele olduğu gösterilmiştir (46). Yine aynı modelde DDAH'ın aşırı ekspresyonunun plazma ADMA düzeylerini düşürdüğü ve böylece kan basıncı artışını önlediği gösterilmiştir (46). Bu bulgular KBY'li hastalarda artan plazma ADMA düzeylerinin hipertansiyon gelişimindeki patolojik önemini göstermektedir.

1.2.7. Proteinüri ve ADMA

Proteinüri ve mikroalbuminüri, diyabet veya hipertansiyonu olan veya olmayan kişiler arasında kardiyovasküler hastalıkların güçlü ve bağımsız bir belirtecidir (45,47). Proteinüri ile endotelial disfonksiyon arasında bağlantı

olduğuna dair birçok kanıt mevcuttur (48,49). Bozulmuş NO etimi endotelial disfonksiyonun karakteristik göstergesidir. KBY’li hastalar ve bir hayvan modelinde ADMA düzeyleri endotelial disfonksiyon ile ilişkili bulunmuştur (31,43). Bu nedenle KBY’de endojen biriken ADMA’nın proteinüri gelişiminde rol oynayabileceği mantıklı görülmektedir. Gerçekten KBY’li hastalarda proteinüri ve ADMA arasında pozitif bir korelasyon tespit edilmiştir (30,50). Bunlara ek olarak, subtotal nefrektomili ratlarda DDAH aşırı ekspresyonu sonucunda azalan ADMA düzeylerinin proteinüriyi anlamlı olarak azalttığı tespit edilmiştir (46). Proteinüri kendiliğinden ADMA düzeylerini etkileyebilir. Filtre olan proteinlerin büyük çoğunluğu proksimal tübüler hücreler tarafından reabsorbe edilmekte ve burada lizozomlar tarafından indirgenmektedir, bu da bize prot einrinin artmış protein yıkımının bir sonucu olduğunu göstermektedir. Serbest dimetil arjininlerin salınımının yüksek protein yıkımı durumlarında arttığı gösterilmiştir (51). Bu bulgular proteinürinin kendisinin ADMA üretimini artırabileceğini göstermektedir. Ek olarak DDAH tübüler hücrelerde bol miktarda eksprese edilmektedir (52). Bu nedenle, DDAH tübüler hücrelerde proteinüri kaynaklı ADMA’nın indirgenmesinde rol oynayabilir.

1.2.8. Diyabet ve ADMA

Tip 2 diyabetli hastalarda ya da insülin direnci olan kişilerde ve Tip1 ve Tip 2 diyabetli hayvan modellerinde yükselmiş ADMA değerleri ile (40,53) ADMA değerleri ve insülin direnci arasında güçlü bir korelasyon tespit edilmiştir (54).

Lin ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, Diabetes Mellitus (DM)’da bozulan nitrik oksit sentaz yolu incelenmiştir. Streptozotosinle indüklenen diyabetik ratlarda, plazma ADMA, diyabetik olmayan ratlardan daha yüksek bulunmuştur. Yüksek glukoza maruz bırakılmış hücre kültürlerinde diyabetik ratlardaki DDAH aktivitesinin normalden daha yüksek olduğu vasküler düz kas ve insan endotelial hücrelerinde; DDAH aktivitesinin bozulduğu ve ADMA birikimi olduğu gösterilmiştir. İnsan endotelial hücrelerinde polietilen glikol ile kombine süperoksid dismutaz (SOD) eklendiğinde DDAH aktivitesinin düzeldiği ve ADMA birikiminin azaldığı gösterilmiştir. Glukoz kendisi DDAH aktivitesini süprese edebilir ve ADMA düzeylerini artırabilir ancak diyabet veya insülin direnci nin hangi mekanizmayla ADMA düzeylerini artırdığı ise halen açıklık kazanmamıştır (33).

Tarnow ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada; Tip 1 DM' de erken diyabetik nefropatide kardiyovasküler morbiditen in belirteci olarak artmış ADMA değerlendirilmiş ve 1993 yılından bu yana takip edilen belirgin diyabetik nefropatisi olan 408 hasta ve 192 normoalbuminurik Tip 1 DM 'u olan kişiler kontrol grubu olarak çalışmaya alınmıştır. Takip edilen DM hastalarının ardışık olarak alınan 24 saatlik idrarlarında 300 mg/24 saatin üzerinde kalıcı makroalbuminüri si olanlar diyabetik nefropati olarak kabul edilmiştir. Sonuç olarak nefropatililerde plazma ADMA düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Diyabetik retinopatide ise anlamlı değişiklik saptanmamıştır. ACE inhibitörü alan ve almayanlarla, sigara içen ve içmeyenler arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Plazma arjinin ve SDMA konsantrasyonu ve L-Arjinin/ADMA oranı diyabetik nefropatililerde kontrollere göre değişmemiş olarak bulunmuştur . Miyokard enfarktüsü ve inme gelişen 44 hastada, kontrol grubuna göre plazma ADMA'nın arttığı gösterilmiştir ($p<0.005$). Bu çalışmada ayrıca, erken diyabetik nefropatide morbidite ve mortalitenin fazla olduğu gösterilmiştir (55).

1.2.9. Periferik Arteriyel Hastalık ve ADMA

Periferik arteriyel hastalığı bulunan kronik hiperhomosisteinemi hastalarda endotel disfonksiyonu gelişiminde ADMA'nın potansiyel rolünün araştırıldığı bir çalışmada; 76 hastanın plazma total homosistein, ADMA, total kolesterol, DM, sigara, sistolik kan basıncı arasında ilişki bulunmuştur. Bu çalışmada ayrıca ACE inhibitörleri ve AnjiyotensinI reseptör blokörlerinin ADMA ve Arjinin/ADMA oranını azalttığı gösterilmiştir (56).

1.2.10. Obezite ve ADMA

Krzyzanowska K. ve arkadaşları morbid obez kadınlarda yaptıkları bir çalışmada, gastroplastik cerrahi sonrası kilo kaybeden kadınlarda plazma ADMA düzeylerinde cerrahi öncesine göre anlamlı bir düşüş olduğunu göstermişlerdir. Bunun donucunda kilo kaybının dolaşımdaki ADMA düzeylerini azalttığını ileri sürmüşlerdir (57).

Eid ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada; obezite, sigara ve ADMA ilişkisi incelenmiştir. Yaş ortalaması 70 olan 563 yüksek riskli hastanın, ADMA düzeyi ve L-Arjinin/ADMA oranının ciddi metabolik risk faktörleriyle korelasyonunun anlamlı olduğu gösterilmiştir (58).

1.2.11. Preeklampsi ve ADMA

Normal hamilelikte ADMA düzeyleri düşme gösterirken (59) preeklampsili hamilelerde ise ADMA düzeylerinde artış gözlenir (60). ADMA düzeyleri preeklampsi gelişmeden önce yükselir. Bu bilgi ADMA'nın hamileliğinde preeklampsi gelişme ihtimali olan bayanları tespit etmekte yeni bir risk faktörü olabileceğini gösterir. ADMA fetüs tarafından üretilir ve fetal plazma ve idrarda yüksek miktarlarda mevcuttur (61). Ayrıca, plasentanın yüksek DDAH-2 düzeyleri eksprese ettiği gösterilmiştir (22). Tüm bu bilgiler ışığında artmış ADMA düzeylerinin tek başına yeterliliği olmadığı söylenebilir ancak bazı kişiler artmış ADMA düzeylerine daha duyarlıdır ve bu kişiler komplikasyon geliştirmekte daha büyük risk altındadırlar (18).

1.2.12. Pulmoner Hipertansiyon ve ADMA

Pulmoner hipertansiyonlu çocuklarda (62) ve deneysel pulmoner hipertansiyon modellerinde ADMA düzeyleri artmıştır ve DDAH ise defektiftir (63, 64). Domuzlarda yapılan hipoksi aracılıklı pulmoner hipertansiyonda DDAH ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (63). Pulmoner dolaşım NOS inhibitörlerine çok duyarlıdır ve L-NMMA pulmoner arter basıncında sürekli yükselme yapar (65). Deneysel pulmoner hipertansiyon modelinde görülen belirgin olarak azalmış DDAH ekspresyonu, NOS inhibisyonunun artışı için bir mekanizma oluşturmaktadır fakat hipoksinin direk olarak DDAH ekspresyonunu azaltıp azaltmadığı bilinmemektedir (18).

1.2.13. Tedavi İçin Hedefler

Kardiyovasküler patoloji için, en önemli tedavi hedefi artmış ADMA etkilerini tersine çevirmek ya da ADMA değerlerini düşürmek olmalıdır. Teorik olarak arjinin ADMA'nın yerine geçmeli ve NOS aktivitesini eski durumuna getirmelidir. Arjininin hiperkolesterolemili hastalarda endotel fonksiyonunu geliştirdiği ve periferik damar hastalığı olan hastalarda yürüme mesafesini artırdığı gösterilmiştir (66) bununla beraber günümüze kadar yapılmış olan çalışmalar göreceli olarak küçüktür ve arjininin potansiyel tedavi edici etkileri yeterince gösterilmemiştir.

Alternatif bir yaklaşım ise DDAH aktivitesini veya ekspresyonunu artırmak olabilir. Tiazolidindionlar ve metforminin ADMA düzeylerini düşürdüğünü gösteren

ilgi çekici bulgular daha ileri çalışmaları gerektirmektedir. Bu ilaçların DDAH üzerindeki etkilerinin mi ADMA düzeylerinin azalmasına katkıda bulunduğu yoksa ADMA düzeylerinin azalmasına farklı bir metabolik yolla mı katkı sağladıkları açığa çıkarılmalıdır.

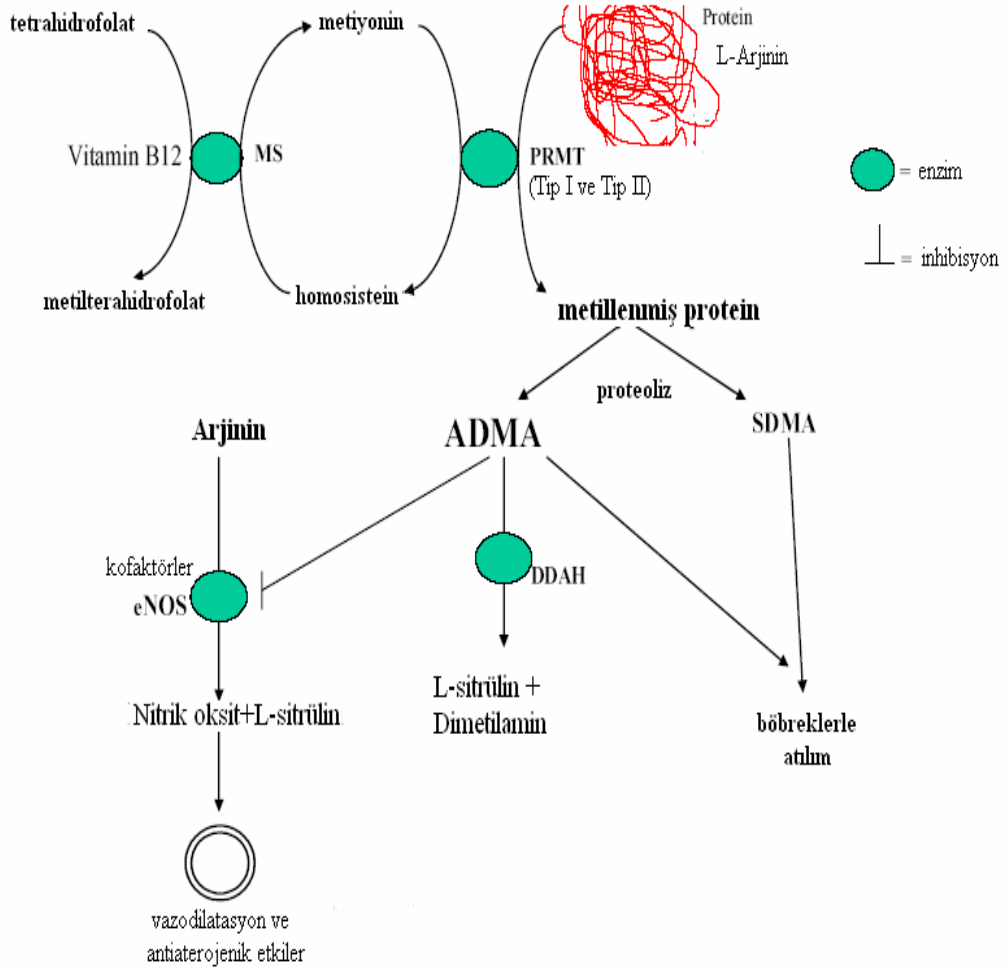
DDAH ekspresyonunun ayarlanması mevcut ilaçlarla mümkündür. Östrojenler ve retinoik asitin deneysel modellerde DDAH ekspresyonunu artırdığı ve ADMA düzeylerini azalttığı tespit edilmiştir (67,68). Bu aşamada ADMA ve DDAH'ın biyolojisini derinlemesine araştırmak için DDAH ekspresyonunu değiştiren ajanlar faydalı deneysel araçlar olacak gibi görülmekle beraber DDAH aktivitesini artırmanın potansiyel olarak faydalı tedavi hedefi olup olmadığını bilmek henüz zordur. Tümör anjiyogenezini inhibe etme veya akut inflamatuvar durumlarda artmış NO üretimini azaltmak gibi belirli durumlarda DDAH'ın kısa süreli inhibisyonunun faydalı olabileceği gösterilmiştir (69). Bununla beraber bu durumlarda artmış ADMA üretiminin protein yıkımının artmasına bağlı olarak ta oluşabileceği unutulmamalıdır.

ADMA düzeylerini azaltmak için tedavi stratejileri Tablo 4'de maddeler halinde sunulmuştur (18).

Tablo 4. NO Üretimini DDAH/ADMA/NO Y olağının Modülasyonu Aracılığıyla Değiştirmek İçin Tedavi Stratejileri

NO üretimini artırmak	NO üretimini sınırlamak
Arjinin/sitrülin verilmesi	DDAH'ın küçük molekül inhibitörleri
DDAH'ın transkripsiyonel upregülasyonu	
DDAH'ın küçük molekül aktivatörleri	
DDAH düzeylerini artırmak için gen tedavisi	
DDAH aktivitesini artırmak için antioksidan verilmesi	

ADMA proteinlerin arjinin rezidülerinin metilasyonu tarafından homosisteinle aynı metiyonin bağımlı (MS=Metiyonin sentaz) reaksiyon ile oluşur. Serbest ADMA proteinlerin yıkımı ile salınır ve eNOS'u yarışmalı inhibisyonla modüle eder. Homosisteinin ADMA düzeylerini artırmadaki muhtemel mekanizmaları; PRMT Tip 1'in artmış ekspresyonu veya aktivitesi, artmış proteoliz veya azalmış DDAH aktivitesi olabilir (Şekil 5) (70).



Şekil 5. ADMA Metabolizmasına Toplu Bakış (70).

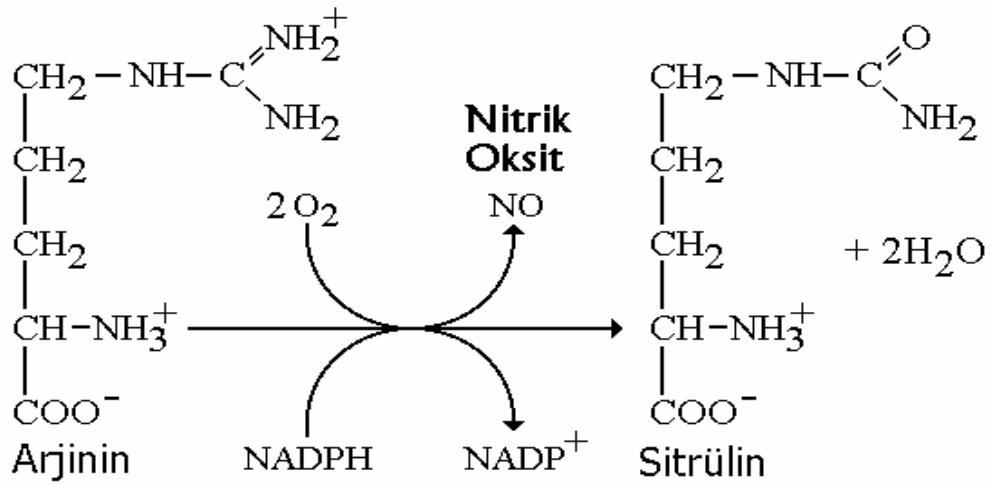
1.3. Nitrik Oksit

Nitrik oksit (NO), siklik guanozin monofosfat (cGMP) üzerinden etki gösteren potent bir periferik vasküler düz kas gevşetici olarak 1979'da tanımlanmıştır (71). NO, hem hücre içi hem de hücre dışında düzenleyici işlev gören küçük, reaktif bir serbest radikal moleküldür.

Molekül ağırlığı çok düşük olup gaz özelliğindedir. Yarı ömrü, 2-5 saniye olup parakrin ve otokoid olarak fonksiyon görmek üzere hücre zarından serbestçe geçen bir nörotransmitterdir. Birçok hücresel işlem; endotel, trombosit, vasküler düz kas hücreleri, nöronlar ve diğer NO üreten hücrelerden salınan NO tarafından düzenlenmektedir. Bağışıklık sisteminin düzenlenmesine katkı sağlar ve bu etki birçok önemli sistemik ve lokal olaydaki gibi patojen ve tümöral hücrelere karşı

sitotoksiste ile olur. NO'nun bu direkt etkilerinin yanında, düz kas hücrelerinin proliferasyonunu ve kollajen sentezini engellediği de gösterilmiştir (72,73). Özellikle dolaşım sistemi açısından NO'nun vazodilatör etki gösterdiği, bölgesel kan akımını ve sistemik kan basıncını düzenlediği, endotele yönelik olarak da ateroskleroza önleyici etki yaptığı bilinmektedir (74,75).

Vücutta birçok dokuda NO sentezlenmektedir. NO, endojen L -arjininden nitrik oksit sentaz (NOS) enzim sistemi tarafından sentezlenir. Arjininin NOS aracılığıyla parçalanması sonucunda NO ve sitrülün oluşumu Şekil 6'da gösterilmiştir.



Şekil 6. Arjininin NOS Aracılığıyla Parçalanması

İşlev sonrasında NO hızlı ve kararlı bir şekilde okside edilerek inaktif bileşikler olan nitrit ve nitrat gibi son ürünlere dönüşür.

1.3.1. NO Nasıl ve Nereden Üretilmektedir?

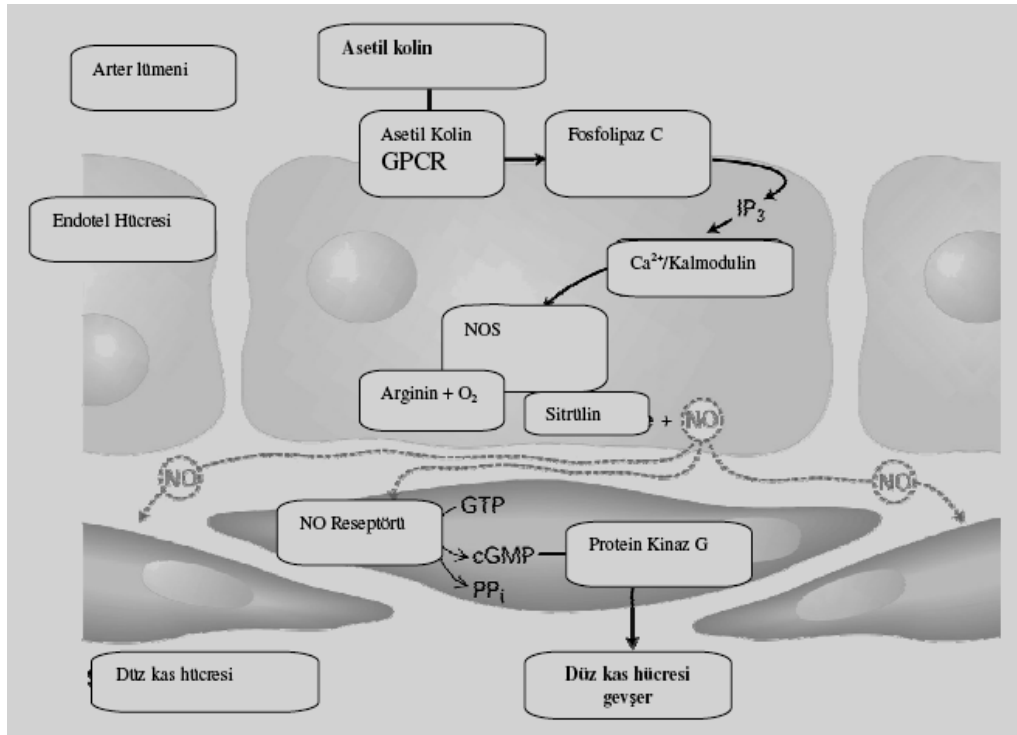
NO çeşitli mekanizmalarla üretilmektedir (76).

1. NO sentezi damarlarda başlıca “shear stres” ile tetiklenir. Bu fenomen, kalbin her sistolde kanı damarlara göndermesi sonucu damar endoteli yüzeyinde oluşturduğu mekanik etki (sürtünme) olarak ifade edilebilir. Endotel hücreleri bu mekanik etki ile şekil değişikliğine zorlanırken hücre iskeleti aracılığı ile hücre içine sinyaller gönderir. Bunun sonucunda Protein kinaz B aktive edilerek endotelial nitrik oksit sentazı (eNOS) fosforile eder. Fosforilasyon, bu enzimin aktivasyonuna neden olur. Sonuçta, endotel hücresinden mütemadiyen NO üretilip salıverilir. Damar endotelinden NO üretimine neden olan en önemli fizyolojik stimulus bu

fenomendir (“shear stres”). İlginç olarak bu şekilde NO üretimi için Ca^{+2} ’a gerek yoktur, eNOS’un fosforile edilerek aktive edilmesi yeterlidir.

2. Diğer taraftan hücre içi Ca^{+2} düzeylerini artıran bileşikler de (asetilkolin, histamin, bradikinin, trombin, glutamat, P maddesi, serotonin, noradrenalin, tromboksan A2, endotelin-1, ATP, anjiotensin-II, vb.) vasküler endotelyumda kalsiyuma bağımlı bir enzim olan eNOS enzimini aktive eder.

Asetilkolin, endotel hücre yüzeyinde bulunan G-reseptörüne bağlandığında G-reseptöründe yapısal değişiklik meydana gelir ve fosfolipaz C aktiflenir. Aktiflenen fosfolipaz-C, fosfatidilinozitolbifosfatı (PIP2) inozitoltrifosfatı (IP3) dönüştürür. Sitoplazmada IP3 seviyesinin artışı endoplazmik retikulumda depolanan Ca^{+2} ’un sitoplazmaya geçişini tetikler. Sitozolde oluşan Ca^{+2} /kalmodulin kompleksinin NOS’u aktiflemesi sonucu L-arjinin ve O_2 ’den, sitrülün ve NO sentezlenir (Şekil 7) (77-79).



Sekil 7. NO Sentezi ve Etki Mekanizması

Endotel hücresinden salınan NO, düz kas hücrelerine difüzyon ile geçer. Kas hücresi içerisinde artan NO konsantrasyonu, cGMP artışını tetikleyerek protein kinaz G’yi aktive eder, hücre içi Ca^{+2} seviyesi azalır ve kas hücresi gevşer (77,79).

3. NO, nitrejik nöronlarda, epitel hücrelerinde ve çizgili kaslarda kalsiyuma bağımlı bir şekilde nöronal NOS'tan üretilip salıverilir.

4. NO, ayrıca immünolojik olaylar sonucu Ca^{+2} 'dan bağımsız olarak immün sistem hücreleri tarafından da üretilir ve bu hücrelerin selektif olmayan sitotoksik etkilerine aracılık eder.

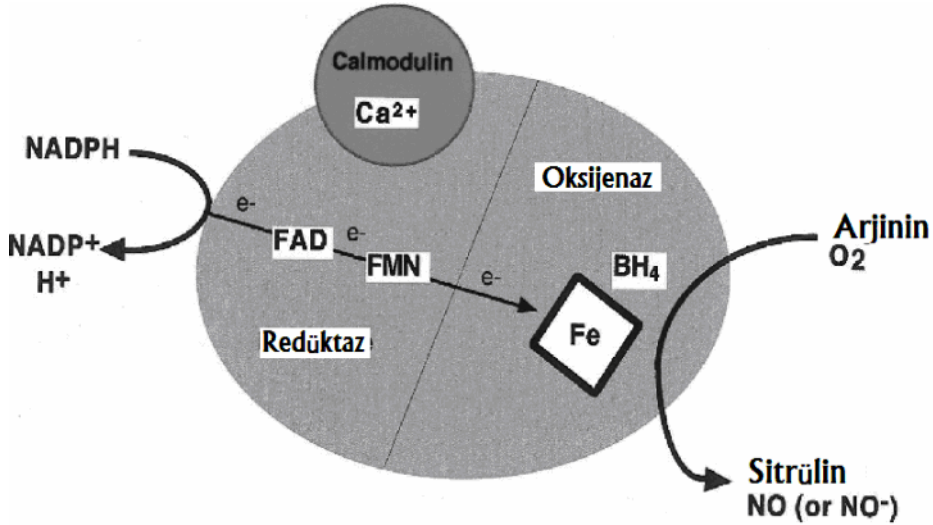
5. Ağızdaki bakteriyel flora tükürükte bulunan nitratı nitrite ve daha sonra nitrik okside dönüştürebilir. Diğer taraftan tükürükteki nitritin yutularak mideye geçmesi sonucu midenin asit ortamının etkisiyle NO açığa çıkar. Ayrıca iskemik ve hipoksik şartlarda hücre içi pH'nın aside doğru kayması yine nitriti NO'ya çevirebilir.

6. Nitrik oksit, non-enzimatik olarak ultraviyole ışığının etkisiyle hücre içi depolarından da salıverilebilir. Bunun fizyolojik önemi henüz bilinmemektedir.

1.3.2. Nitrik Oksit Sentaz Enzimleri

İlk olarak 1989 yılında tanımlanmalarını takiben, 1991-1994 yıllarında major izoformları ve 1998-1999 yıllarında ise NOS kristal yapıları belirlenmiştir.

NOS enzimi, L-arjinin amino asidinden guanido grubunun hidr oksilasyonu ile NO ve L- sitrülün sentezini katalizlemektedir. Reaksiyonda 5,6,7,8 -tetrahidro-biopterin (BH_4), FAD, FMN ve demir protoporfirin IX (hem) kofaktör olarak kullanılmakta ve sonuçta NO, L-sitrülün ve NADP oluşmaktadır (Şekil 8) (80).



Şekil 8. NOS'un Kofaktörleri ve Katalizlediği Reaksiyonlar.

NADPH tarafından ortama verilen elektronlar redoks taşıyıcıları FAD ve FMN tarafından oksijenaz bölgesine taşınmakta ve burada Fe ve BH_4 ile etkileşime

girerek L-arjinin ve oksijenden NO ve sitrülin oluşturan reaksiyonu katalizlemektedir (80).

NOS enzimleri aktif halde iken 134 kd'luk iki monomerden oluşan dimerik yapıdadır. N-terminal oksijenaz bölgesinde (oxygenase domain) hem, BH₄ ve L-arjinin bağlanma bölgeleri bulunmakta, C terminal redüktaz bölgesinde (reductase domain) ise FAD, FMN ve NADPH için bağlanma bölgeleri bulunmaktadır. Bu iki bölge Ca⁺²/kalmodulin tanınma sahası ile birbirine bağlanmışır (80).

Katalitik bölge içeren N-terminal oksijenaz bölgesi, L-arjinin, BH₄ ve 'hem' için bağlanma bölgeleri içerir. Redüktaz bölgesi, flavinlerden oksijenaz bölgesine bağlı 'hem' grubuna elektron transfer eder. Enzimin dimerik hale gelmesi hem molekülünün bağlanması ile başlar; 'hem'in yokluğunda enzim monomer halde kalır. Dimerik halde enzime BH₄ bağlanabilir ve dimeri kararlı hale getirir, kararlı hale geçiş aynı zamanda çinko iyonları ile de sağlanır. eNOS dimerinin fonksiyonel aktivitesi tetrahidrobiyopterin moleküllerinin bağlanma sayısına bağlıdır. Tetrahidrobiyopterin bağlanmamış bir eNOS dimeri O₂⁻ üretmeye eğilimlidir, tetrahidrobiyopterin (BH₄) molekülünün birinin bağlanması, eNOS dimerinin NO ve O₂⁻'nin her ikisini üretme eğilimi ile sonuçlanır. Yüksek seviyede BH₄ varlığı ise doymuş bir dimer oluşturarak yalnızca NO sentezleyen bir enzim oluşmasını sağlar (81).

Hücre içi artan Ca⁺² seviyeleri kalsiyum/kalmodulin kompleksinin oluşumuna yol açar ve bu kompleks kaveolinle yer değiştirerek, NOS enzimindeki kalmodulin bölgesine bağlanır ve enzimi aktifleştirir (81).

Vücutta yaygın olarak bulunan ve çeşitli fonksiyonlarda görev alan NOS enzimlerinin, üç farklı izoformu bulunmaktadır. Bu izoformlar farklı genler tarafından kodlanmakta ve her bir izoformun lokalizasyonları, düzenlenmeleri, katalitik özellikleri ve inhibitör duyarlılıkları farklıdır.  nsandaki NOS enzimleri arasında %51-57 oranında değişen bir homoloji vardır.

3 farklı NOS formu vardır;

a. Nöronal NOS (nNOS veya NOS-1):  lk bulunan formdur. 160 kDa 'lık bir polipeptiddir ve sitokrom P450 ile %36 benzerlik göstermektedir. NADPH, FAD, FMN ve kalmodulin için bağlanma bölgesi içermektedir (82,83).

Nöronal NOS başta beyin, spinal kord, sempatik gangliyon gibi sinir sisteminde bulunmakla beraber, adrenal bez, uterusun epitelyal hücreleri, akciğer ve mide gibi başka dokularda da tespit edilmiştir (84).

Merkezi sinir sisteminde nöromodülatör olarak görev alır, ayrıca koku alma, görme, ağrıyı algılama ve hafıza oluşması gibi işlevlerde de rolü vardır.

Periferik sinir sisteminde ise nonadrenerjik nonkolinerjik sistemde nörotransmitter olarak görev alır. Solunum fonksiyonlarında, gastrointestinal sistem motilitesinde, tüm dokuların kan basınçlarının ve akış hızının düzenlenmesinde rol oynar (85).

b. İndüklenebilir NOS (iNOS veya NOS-2): 130 kDa'luk sitozolik bir enzimdir (86). Makrofaj, endotel hücresi, nötrofil ve düz kas hücresi gibi pek çok hücre tipinde sitokinler, endotoksin ve lipopolisakkarit gibi bakteriyel ürünlere maruziyet sonrası indüklenir (87,88). eNOS ve nNOS gibi aktivasyon için eksojen kalsiyum ve kalmoduline bağımlı olmadığı için aktivitesi uzun sürer ve fazla miktarlarda NO üretimine yol açar (86,87). Enzim indüklendiğinde NO üretimi saatlerce hatta günlerce sürer (84). iNOS'un kalsiyumdan bağımsız olması kalmoduline sıkıca bağlanması sebebiyledir (87). iNOS aracılığıyla üretilen NO, bakteri, parazit ve tümör hücreleri üzerine sitotoksik etki yapar ve bazı DNA ve RNA virüslerinin yayılmasını önler. Bu etkilerini de, bazı enzimlerde bulunan demir gruplarını bağlayarak, çoğalmayı sağlayan ana metabolik yolları baskılayarak ve oksijenle birleşip hidrojen radikali ve antioksidanları ortaya çıkararak sağlar (85).

Makrofajlardan salınan NO, yabancı mikroorganizmalara karşı spesifik olmayan bir savunma yapar. Bunun yanı sıra artmış NO'nun doku tahribatı yaparak damar geçirgenliğini artırdığı ve septik şoktaki vazodilatasyona katkıda bulunduğu düşünülmektedir. NO sentezinin tamamen bozulması da inflamasyonu hızlandırmaktadır (83,89).

c. Endotelial NOS (eNOS veya NOS-3): İlk olarak vasküler endotelial hücrelerde tanımlanmıştır. eNOS kardiyovasküler sistemde vasküler düz kas gevşemesi, damar tonusu, trombosit agregasyonunun inhibe edilmesi gibi fizyolojik olaylarda görev almaktadır (80). NOS enzimlerini kodlayan genler ve özellikleri Tablo 5'de özetlenmiştir (90).

Tablo 5. NOS İzoformlarını Kodlayan Genler ve Özellikleri

NOS izoformları	Gen yapısı ve büyüklüğü	Kromozomal yerleşim	aminoasit sayısı protein büyüklüğü
nNOS	29 ekson	12q24.2	1434 aa
	28 intron	12q24.3	161 kDa
	>200 kb		
iNOS	26 ekson	17cen-q11.2	1153 aa
	25 intron		131 kDa
	37 kb		
eNOS	26 ekson	7q35-7q36	1203 aa
	25 intron		133 kDa
	21-22 kb		

eNOS ve nNOS; asetilkolin ve bradikinin gibi hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu artıran ajanlarca aktiflenir. Makrofajlar ve diğer bağışıklık hücrelerinde bulunan iNOS ise sitokinlerce uyarılır, kalsiyum ve kalmoduline bağımlı değildir ve yeni protein sentezine ihtiyaç duyar. NOS'un üzerinde NADPH, FAD, FMN ve tetrahidrobiopterin gibi kofaktörleri ve prostetik grupları bağlamak için birçok düzenleyici bölümü vardır. Hücrede eNOS esas olarak hücre membranına bağlı bulunurken nNOS sitozolde bulunur. NOS, N-metil-L-arjinin, N-nitro-L-arjinin ve N-amino-L-arjinin gibi L-arjinin analoglarınca inhibe edilebilir (91,92).

Vücutta NO konsantrasyonu düzenli olarak düşük seviyelerde dalgalanmalar gösterir ve eNOS ile nNOS tarafından kontrol edilir. Bu iki enzimin sentezi posttranskripsiyonel seviyede kontrol edilirken, iNOS uygun uyarı veya nükleer faktör Kappa B (NF- κ B) gibi transkripsiyonel faktörlere cevap olarak sentezlenir (93). Bu sentezi temelde tetikleyen, NF- κ B'ye cevap veren elemanların iNOS promotor gen bölgesini aktive etmesidir. iNOS, kalsiyum ve uyarıcı ajanlardan bağımsız çalıştığı için, aktivitesi daha uzundur. Bunlara bağlı olarak, iNOS'un ürettiği NO seviyesi, fizyolojik sınırların oldukça üstündedir. Bu durum, hücrel süperoksit anyon ($O_2^{\cdot-}$) varlığında ileri derecede toksik olan peroksinitrit molekülünün oluşmasına neden olur. Bunun sonucunda da lipit peroksidasyonu, DNA fragmentasyonu, plazma antioksidanlarının az alması, protein hasarı ve endotelial düz kas gevşemesinin engellenmesi gibi nedenlerle hücrel hasar oluşabilir. Peroksinitrit oluşumu; süperoksit ile süperoksit dismutaz (SOD) üretimi ve NO üretimi/harcanması arasındaki dengeye bağlıdır. Sonuç olarak, düşük konsantrasyondaki NO, hücrel fonksiyonları pozitif olarak düzenlerken, yüksek konsantrasyonlarda hücre üzerinde toksik etkiler yaratabilir (93). İnflamatuvar uyarı

Tablo 6. eNOS Geninde İntron/Ekson Yerleşimleri ve Uzunlukları (92)

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

Monomerlerin fonksiyonel olarak farklı olan iki kısmı vardır; katalitik bölümü ihtiva eden N-terminal oksijenaz (amino asit 1-491) ve NADPH, FAD ve FMN bağlanma bölümlerinin bulunduğu redüktazdır (amino asit 492-1205). Enzimin hücre içindeki yeri net olarak belirsizdir. Gol gi cisimciği, plazma membranı ve en çok da plazmalemmal kaveolada bulunduğu tespit edilmiştir. Kaveolada kaveolin adlı kaplayıcı proteinle sarılı olan eNOS inaktif haldedir. Hücre içi serbest kalsiyumun artması ile enzim bu proteinden sıyrılır ve aktif hale gelir ve serbest kalsiyum düzeyi düşene kadar aktif kalır. Aktive olmuş enzim ortadaki L-arjinin, oksijen ve NADPH'dan oldukça fazla NO üretimi yapar. Her ne kadar eNOS enzimi bazal bir düzeyde üretilse de hipoksi, östrojen gibi hormonlar, yükseltgenmiş düşük dansiteli lipoproteinler (LDL) ve mekanik güç gibi faktörler ekspresyonu artırabilir (81,94,95).

NO sentazların üç izoformunun özellikleri Tablo 7'de topluca verilmiştir.

Tablo 7. NO Sentazın Üç İzoforunun Özellikleri (96)

Özellik	Endotelial NOS (eNOS)	Nöronal NOS (nNOS)	İndüklenebilir NOS (iNOS)
Moleküler ağırlık (kDa)	135	155	130
NO'nun fonksiyonu	Anti-agregan, EDRF	Nörotransmitter, nöromodülatör	Non-spesifik, konakçı defansı
Kofaktör	bağımlı	bağımlı	bağımlı
Ca ⁺² /kalmodulin			
Diğer kofaktörler	bağımlı	bağımlı	bağımlı
NADPH, FAD, FMN, BH4			
Stimulanlar	Asetilkolin, bradikinin, serotonin, ATP	Nöro eksitatuvar aminoasitler	Proinflamatuvar sitokinler
Düzenleme mekanizması	(+)Ca ⁺² /kalmodulin protein etkileşimi, (+)HSP90, (+)dimerizasyon	(+)Ca ⁺² /kalmodulin protein etkileşimi, (+)dimerizasyon	(+)dimerizasyon
(+), aktivasyon; (-), inhibisyon	(-) fosforilasyon	(±) fosforilasyon	(+) fosforilasyon
Gen ekspresyonunun Düzenlenmesi	(+) shear stress	(+) östrojenler	(+) İL-1β, (+) İNFγ
(+), aktivasyon; (-), inhibisyon	(+) proliferasyon		(+) TNFα, (-) TGFβ
Düzenlenme mekanizması	(-) TNF α		(+) cAMP, (+) cGMP
Kromozom (insan)	(±) östrojenler		(+) NFκB, (-) NO
Subsellüler bölge	Transkripsiyonel, mRNA stabilitesi	transkripsiyonel	(-) glukokortikoidler
NO salınımı	Transkripsiyonel, mRNA stabilitesi	transkripsiyonel	Transkripsiyonel, mRNA stabilitesi
	7	12	17
	Membran>>sitozol	sitozol	Sitozol>>membran
	Düşük (pM)	Düşük (pM)	Yüksek (μM)

1.4.1. eNOS Gen Polimorfizmleri

Bir gen veya DNA dizisinin alternatif formlarından (allel) birinin toplumda %1'den fazla bulunduğu durumlar polimorfizm olarak adlandırılmaktadır. eNOS geninde bugüne kadar tanımlanmış olan yaklaşık 161 tek nükleotid polimorfizmi (SNP) bulunmasına rağmen fonksiyonel önemi olan polimorfizmler şunlardır (90):

- İntron 4, 27 bazçiftlik variable number tandem repeat (VNTR) (4b/4a)
- Ekson 7, missense Glu298Asp
- İntron 13, CA repeat
- İntron 18, Ala27Cys (A-C nükleotid değişimi, SNP)
- İntron 23, Gly10Thr (G-T nükleotid değişimi, SNP)

- Promotor bölgesinde üç tane SNP tanımlanmıştır. Thr786Cys, Ala922Gly, Thr1468Ala (90).

Bunların sonucunda normal fonksiyonel bir enzim oluşsa da polimorfizmler transkripsiyon işlev ve hızlarında değişime sebep olabilmektedir. Örneğin intron 13’de polimorfizmi olan bireylerde artmış koroner arter hastalığı riski olduğu, intron 4’de polimorfizmi olan bireylerde ise artmış diyabetik nefropati riski olduğu saptanmıştır (97,98).

Promotor bölgede 3 tek nükleotid değişimi saptanmıştır; Thr786Cys, Ala922Gly ve Thr1468Ala. Bu polimorfizmlerin, transkripsiyonu ve dolayısıyla enzim seviyelerini değiştirebildiği gösterilmiştir. Thr786Cys polimorfizmi miyokard enfarktüsü ve diyabet ile ilişkili bulunmuştur (98).

Bulunan son polimorfizm ise ekson 7’nin açık okuma bölümünde Glu298Asp değişimi olarak saptanmıştır. Bu polimorfizmin sonucunda proteinin primer yapısında ve fonksiyonunda değişim olur. Bazı çalışmalarda, bu polimorfizmin hipertansiyon, koroner arter hastalığı ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. Bu polimorfizm protein dizisinde değişiklik yapan tek polimorfizmdir. Proteinin primer yapısını bozarak, enzimde fonksiyonel değişiklikler oluşturmaktadır. eNOS geni 7. eksonunda Guanin (G) nükleotidinin Timin (T) ile yer değiştirmesi enzim yapısında 298 numaralı glutamat’ın (Glu) aspartat’a (Asp) dönüşmesine neden olmaktadır. Bu polimorfizm ile eNOS geninde 100 kDa ve 35 kDa ürünler ve sonuçta parçalanmaya eğilimli protein ürünleri oluşmaktadır. Yani bu polimorfizm eNOS proteininde fonksiyonel etkiler yapmaktadır (99).

1.4.2. eNOS Gen Polimorfizmleri ve Böbrek Hastalıkları

eNOS gen polimorfizmleri ile çeşitli hastalıklar arasında ilişki olup olmadığı farklı hasta gruplarında çalışılmıştır. Böbrek hastalıklarında ise özellikle Tip 1 veya Tip 2 diyabetik veya non diyabetik son dönem böbrek yetmezliği hastalarında (SDBY) eNOS geni intron 4a/b polimorfizmi ve Glu298Asp polimorfizmi çeşitli gruplar tarafından çalışılmıştır. Kronik glomerülonefrit (KGN), diyabet, hipertansiyon, polikistik böbrek hastalığı, lupus nefriti, vaskülit, reflü, obstrüktif nefropati, otozomal dominant polikistik böbrek hastalığı (ADPKD) ve interstisyel nefrit gibi böbrek hastalıkları sonucu SDBY gelişen ve hemodiyalize giren hastalarda Glu298Asp mutasyonu kontrollere göre belirgin olarak yüksek bulunmuştur. Bu

çalışmalarla diyabet ve nefropatisi olan hastalar için Glu298Asp polimorfizminin kötü prognoz ve SDBY'ye gidiş için bir risk oluşturduğu (100,101), benzer şekilde, eNOS intron 4 VNTR polimorfizmi a allelinin diyabetik ve non diyabetik hastalar, kronik glomerülonefrit, membranöz nefropati ve lupus nefriti gibi böbrek patolojilerinde hastalığın prognozu ve SDBY'ye gidiş için olası bir prognostik faktör olduğu gösterilmiştir (102-104).

1.5. SDBY, İntima Medya Kalınlığı ve Ateroskleroz

Arter duvarı üç tabakadan oluşmaktadır; bunlar intima, medya ve adventisya tabakalarıdır. Ateroskleroz çocukluk döneminde yağlı çizgilenmelerin gelişmesiyle başlamaktadır. Aterosklerozun histolojik olarak gösterilen ilk fazı düz kas hücreleri ve ekstrasellüler matriksteki artışla birlikte intimanın fokal olarak kalınlaşmasıdır. Hastalığın ilerlemesi sırasında, arteriyel damar duvarındaki değişiklikler intima ve medya tabakalarındaki kalınlaşmayla karakterizedir.

Karotis arter gibi yüzeysel bir arterin duvarının B-mod ultrasonografi ile direkt görüntülenmesi sayesinde arter duvarındaki kalınlaşma ölçülebilir. İntima medya kalınlığı (İMK); intimal lümen ve medya-adventisya arayüzü arasındaki kalınlık olarak tanımlanır. Aksiyal çözünürlüğün yetersizliğinden dolayı ultrasonografi görüntülemesiyle intima ve medya tabakaları birbirinden ayırt edilemez. Bununla beraber artmış İMK, ateroskleroz nedeniyle intima tabakasının artan kalınlaşmasını veya hipertansiyonda olduğu gibi vasküler hipertrofiye bağlı artmış medya tabakası kalınlığını göstermektedir. Bu nedenlerle bazı araştırmacılar plak olmayan bölgeden ölçüm yapıldığında İMK'nın aterosklerozdan ziyade erken arteriyel duvar değişikliklerinin bir belirteci olduğunu savunmakta dırlar (105).

1.5.1. Normal İMK Değeri Nedir?

İMK, damar duvarındaki erken aterosklerotik değişikliklerin sensitif bir göstergesi olduğundan asemptomatik hastaların tespit edilebilmesi için İMK'nın normal değerlerinin belirlenmesi önemlidir. Sağlıklı popülasyonda İMK'nın norm al değerleri yaş ve cinsiyet göz önüne alınarak tanımlanmıştır (106,107). İMK yaşla artmaktadır ve erkeklerdeki değeri kadınlardakinden daha yüksektir. İMK değerinin ırklara göre farklılık gösterdiği rapor edilmiştir. İMK değerleri siyah ırkta en yüksek, beyaz ırkta ortalama değerlerde ve esmerlerde en düşük tespit edilmiştir (108-110).

Epidemiyolojik alışmalar İMK değerinin 1 mm veya üzerinde olduğu durumların artmış kronik kalp hastalığı riskiyle ilişkili olduğunu göstermektedir (106).

Ateroskleroz klinik belirtileri ortaya çıkmasından çok daha önce başlayan difüz, sistemik bir hastalık durumudur. Birçok kardiyovasküler risk faktörünün birlikte etki etmesi ateroskleroz gelişimine katkıda bulunur. Yapısal arter duva r değişikliklerinin bir belirtec i olarak İMK bilinen kardiyovasküler risk faktörleriyle ilişkisinden dolayı aterosklerotik gelişimi yansıtmaktadır. Bu ilişki İMK'nın erken, preklinik aterosklerozun invazif olmayan bir belirtec i olarak kullanılmasını sağlamaktadır. (111).

Karotis arterdeki aterosklerotik değişikliklerin genel aterosklerozun aynası olduğu kabul edilmektedir. Genel popülasyonu ve SDBY'li has taları içeren çalışmalar karotis arterlerde plak oluşumu ve intima medya k alınlığının ölçülmesinin karotis aterosklerozun belirtec i olarak kullanılabileceğini göstermiştir (112,113).

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Hasta ve Kontrol Grupları İçin Birey Seçimi

Bu çalışmaya Eylül 2007 ve Eylül 2008 tarihleri arasında Fırat Üniversitesi Hastanesi Hemodiyaliz Ünitesinde ve özel bir hemodiyaliz merkezinde kronik hemodiyaliz programında olan 59 erkek, 71 kadın toplam 130 hasta ve ayrıca sürekli ayaktan periton diyalizi tedavisinde olan 37 erkek, 27 kadın toplam 64 hasta dahil edilmiştir. Kontrol grubu normal muayene için polikliniğe başvuran herhangi bir kronik hastalığı (hipertansiyon, diyabet vs.) bulunmayan 45 erkek, 47 kadın toplam 92 kişiden oluşmaktadır. Hemodiyaliz tedavisi gören hastaların yaş ortalaması 53.76 ± 17.04 , SAPD tedavisi alan hastaların yaş ortalaması 48.17 ± 14.93 ve sağlıklı kontrol grubunun yaş ortalaması 64.03 ± 10.06 şeklindeydi. Hemodiyaliz grubundaki hastalar haftada üç gün, dört saat hemodiyalize girmektedirler. SAPD tedavisi alan hastalar gün ve gece değişimlerinde glu koz içeren solüsyon kullanıyorlardı.

Tüm hastalar kan sayımı ve demir parametrelerine göre oral veya parenteral demir preparatları ile eritropoetin; kalsiyum ve fosfor dengelerine göre kalsiyum karbonat, kalsiyum asetat ve aktif D3 vitamini; lipid parametrelerine göre statin; tansiyon ve kilo takiplerine göre antihipertansif ve diüretik kullanıyorlardı. Hastalar antihipertansif olarak kalsiyum kanal blokeri, ACE inhibitörleri, ARB (Anjiyotensin reseptör blokeri) ve daha az olarak da intrinsik semp atomimetik aktivitesi olmayan β -blokerler kullanmaktaydılar.

Örneklerin Hazırlanması

Hasta ve kontrol gruplarından 12 saatlik açlıktan sonra sabah oturur halde venöz kan örnekleri alındı. Venöz kan örnekleri hemodiyaliz ve periton diyalizi hasta grubundan tedaviye girmeden önce alındı. DNA izolasyonu yapmak ve plazma elde etmek için ayrı ayrı olmak üzere K_3EDTA içeren tüplere 2'şer ml kan alındı. Elde edilen plazma NO ölçümünde kullanıldı. ADMA, glukoz, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, trigliserid, kolesterol ve serum elektrolitleri ölçümünde kullanılmak üzere jelli düz biyokimya tüpüne 5 ml kan alındı. Plazma ve serum elde etmek için tüpler 3500 rpm hızda 10 dakika santrifüj edildi (Heraeus Biofuge Stratos; Kendo Laboratory Products, Osterode-Germany). Elde edilen serumlar ve plazmalar küçük porsiyonlar halinde polipropilen tüplere konuldu ve bekletilmeden $-20^{\circ}C$ 'de donduruldu ve çalışma gününe kadar bu sıcaklıkta saklandı. DNA izolasyonu için

K₃EDTA'lı tüpe alınan kan da bekletilmeden -20°C'de donduruldu ve çalışma gününe kadar bu sıcaklıkta saklandı.

İMK Ölçümü

B Mod Renkli Dopler Ultrasonografi (Toshiba Applio, Japonya; SSA 770A/80)

B mod ultrasonografi kullanılarak hastalar ve kontrollerde karotis arterlerde İMK ölçümü yapıldı. Ancak bazı hasta ve kontrollerin İMK ölçümleri yapılamadı.

DNA İzolasyonu ve Genotiplendirme

DNA İzolasyonu

Lökosit örneklerinden ticari bir DNA izolasyon kiti (EZ -10 Spin Column Blood Genomic DNA Minipreps Kit, Bio Basic Inc., ürün -product code- kodu: BS484, Canada) kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen 200 µl DNA'nın 1 µl'si PCR karışımında kalıp DNA olarak kullanıldı.

eNOS geni Glu298Asp Polimorfizmi İçin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve PZR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesimi

Primerler: Integrated DNA Technologies,

TaqDNA Polimeraz, 10X PCR buffer, MgCl₂, Tris (Hydroxymethyl) Aminomethane (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, ABD)

dNTP'ler (Larova GmbH, Teltow, Almanya)

Thermocycler (Bio-Rad Laboratories, ABD; Model: PTC -200 rev:D:A)

Ultraviyole Transilluminatör (Bio-Rad Laboratories, ABD; Molecular Imager Gel Doc XR System)

Borik asit, EDTA.2H₂O (Merck, Darmstadt, Almanya)

Ethidium bromide (10mg/ml) (Dr.Zeydanlı Hayat Bilimleri, Ankara, Türkiye)

100 bp+1.5 kb DNA ladder, Agaroza (Bioron GmbH, Ludwigshafen, Almanya)

Ban II (New England Biolabs, Cambridge, İngiltere)

1 X TBE Tamponu: 21.8 gr Tris, 11.2 gr borik asit ve 1.66 gr EDTA.2H₂O 2 L distile suda çözülerek hazırlandı.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

eNOS geni Glu298Asp polimorfizmi ilgili bölgenin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması için kullanılan primer dizileri: F -5' AAGGCAGGAGACAGTGGATGGA 3' ve R-5' CCCAGTCAATCCCTTTGGTG CTCA 3'dir (114). PZR reaksiyon karışımı yaklaşık 100 ng kalıp DNA, her primerden 0.4 µM, 4 dNTP'den 200 µM, 1 U Taq DNA polimeraz, 2.0 mM MgCl₂, 2.5 µl 10X PZR tamponu içerecek şekilde 50 µl olarak hazırlandı ve thermocyclerda amplifikasyona bırakıldı. Amplifikasyonda 94°C'de 4 dakikalık ön denatürasyondan sonra denatürasyon için 94°C'de 30 s, bağlanma sıcaklığında 30 s, sentez için 72°C'de 30 s olacak şekilde 35 döngü gerçekleştirildi. Reaksiyon sonucu oluşan PZR ürünü 1X TBE tamponu içerisinde hazırlanmış % 3'lük agaroz jelde elektroforeze tabi tutulduktan sonra ethidium bromide (10 mg/ml) ile 30 dk süreyle boyandı ve Ultraviyole (UV) transilluminatörde incelenerek sonuçlar gözlemlendi. Oluşan bantların moleküler ağırlığını saptamak amacıyla 100 b ç'lik DNA ladder kullanıldı (114).

BanII Endonükleaz ile Kesim Reaksiyonu

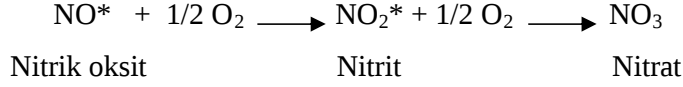
Glu298Asp polimorfizmi için 248 baz çiftlik PZR ürününün restriksiyon endonükleaz (RE) kesimini gerçekleştirmek amacıyla 25 µl PZR ürünü, 8 U Ban II enzimi, 5 µl 10X PZR tamponu, steril distile su ile 50 µl'ye tamamlanarak iyice karıştırılıp 3-5 sn santrifüjlenerek 37 °C'de 16 saatlik inkubasyona bırakıldı. BanII enzimi için kesim bölgesi içeren homo zigot bireylerde (Glu/Glu)163 ve 85 baz - çiftlik iki ayrı bant gözlemlendi. Heterozigot bireylerde ise (Glu/ASp) 248, 163 ve 85 baz çift uzunluğunda 3 bant gözlemlendi. BanII enzimi için kesim bölgesi içermeyen bireylerde (Asp/Asp) sadece 248 baz çift uzunluğunda bant gözlemlendi.

BanII endonükleaz ile kesim işlemine maruz bırakılan ürünler % 3'lük agaroz jelde yukarıda bahsedildiği şekilde elektroforeze tabi tutulduktan sonra boyanıp görüntülendi.

Serum Total Nitrik oksit (NO_x) Düzeylerinin Ölçülmesi

Nitrik oksit (NO), biyolojik sistemlerde üretildikten sonra, 2 -30 sn gibi çok kısa sürelerde nitrit (NO₂) ve ardından nitrat'a (NO₃) oksitlenir. Bu nedenle NO₂ ve NO₃ seviyeleri ölçülerek, nitrik oksit düzeyleri hakkında yaklaşımda bulunulmuştur.

Nitrit ve nitrat ölçümleri, Cortas ve arkadaşlarının (115) modifiye metoduna göre spektrofotometrik yöntemle ölçüldü.



Ayıraçlar

Glisin, Sülfanilamid, N-Naftiletilen diamin (NNDA), Sodyum hidroksit (NaOH), Bakır sülfat (CuSO₄), Çinko sülfat (ZnSO₄), sodyum nitrit (NaNO₂), potasyum nitrat (KNO₃): Merck, Darmstadt, Almanya

Çözeltilerin Hazırlanması

1) Glisin-NaOH Tamponu:

*---7.5 gr glisin 100 ml distile suda çözüldü. 3.2 gr NaOH ise 40 ml distile suda çözüldü. Hazırlanan bu NaOH solüsyonu ile glisin tamponunun pH'ı 9.7'ye ayarlandı. Daha sonra çözelti 500 ml'ye tamamlandı.

2) Sülfanilamid Çözeltisi:

*---66.2 ml 3M HCl alınıp bir mezür içerisinde hacmi 250 ml'ye tamamlandı. Bu çözelti içine 2.5 gr sülfanilamid eklendi. Sülfanilamid HCl içinde iyice çözüldü.

3) N-Naftiletilen diamin (NNDA) Çözeltisi:

*---50 mg NNDA tartıldı, 250 ml distile suda çözüldü.

4) Sodyum hidroksit (NaOH) Çözeltisi:

*---55 mmol/L'lik NaOH çözeltisi (1.1 gr NaOH 500 ml distile su)

5) Bakır sülfat (CuSO₄) Çözeltisi:

*---5 mmol/L'lik CuSO₄ çözeltisi (250 mg CuSO₄ 200 ml distile su)

6) Çinko sülfat (ZnSO₄) Çözeltisi:

*---75 mmol/L'lik ZnSO₄ çözeltisi (10.8 gr ZnSO₄ 500 ml distile su)

7) Standart Sodyum Nitrit (NaNO₂) Çözeltileri:

*--1 mM'luk stok NaNO₂ çözeltisinden 100, 50, 25, 10, 5 µmol konsantrasyonlarında nitrit standartları hazırlandı. Nitrit standartları hazırlanırken çözücü olarak konsantrasyonu 10 mmol/L olan Na₂B₄O₇ çözeltisi kullanıldı.

8) Standart Potasyum Nitrat (KNO₃) Çözeltileri:

*--1 mM'luk stok KNO₃ çözeltisi kullanılarak 100, 50, 25, 10, 5 µmol konsantrasyonlarında nitrat standartları hazırlandı. Nitrat standartları hazırlanırken çözücü olarak konsantrasyonu 10 mmol/L olan Na₂B₄O₇ çözeltisi kullanıldı.

9) Kadmiyum Granüllerinin Hazırlanması:

*-- 20-40 mg'lık kadmiyum granülleri, 810 µl H₂SO₄ alınıp 150 ml distile suya tamamlanarak hazırlanan 0.1 mol/L'lik H₂SO₄ çözeltisi içinde muhafaza edildi.

Nitrik Oksit Deneyinin Yapılışı

Numunelerin Deneye Hazırlanması: Derin dondurucudan çıkarılan numuneler oda sıcaklığında bekletilerek çözünmesi sağlandı.

Deproteinizasyon: Çözülen numuneler deproteinizasyon işlemine tabii tutuldu. Bu işlem için her bir numuneden 0.5 ml alınıp üzerine 2 ml ZnSO₄ çözeltisi ve 2.5 ml NaOH çözeltisi eklendi. Karışım vortekslenip iyice karışması sağlandı. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi, 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Proteinler çöktürülerek, süpernatant kısmı ayrıldı. Bu süpernatantlar deneyin bir sonraki aşamasında numune olarak kullanıldı.

Nitrit Deneyinin Yapılması ve Nitrit Standartları Ç alışması: Numuneler ve standart çözeltiler olarak hazırladığı mız 5 µmol, 10 µmol, 25 µmol, 50 µmol ve 100 µmol'lük nitrit çözeltileri (S1, S2, S3, S4, S5) Tablo 8'deki şekilde tüplere (ml hacimde) pipetlendi.

Tablo 8. Nitrit Çalışması Şeması

	Kör	Numune	S1	S2	S3	S4	S5
	tüpü	tüpü	5 µmol	10 µmol	25 µmol	50 µmol	100 µmol
Numune	-	2	-	-	-	-	-
NNDA	1	1	1	1	1	1	1
Sülfanilamid	1	1	1	1	1	1	1
Distile su	2.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Nitrit çözelt.	-	-	2	2	2	2	2

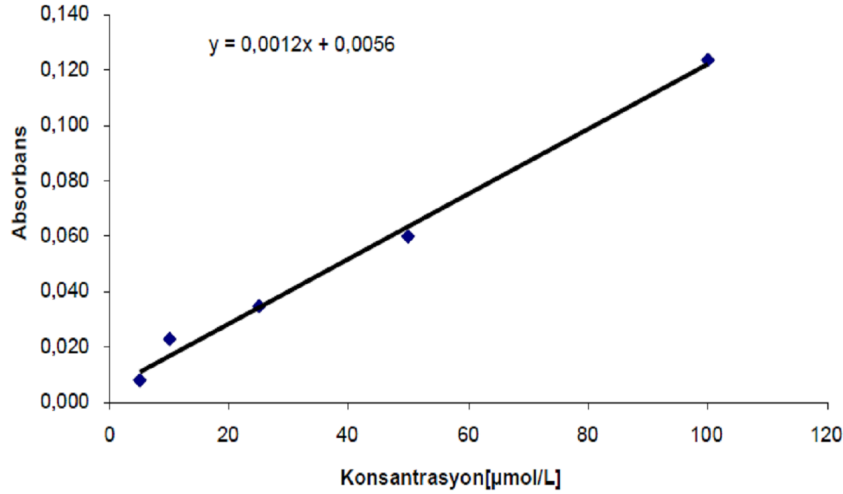
Pipetlemeden sonra tüpler vortekslenildi ve 45 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonda sülfanilamid, NNDA ve nitritle pembe renkli kompleks oluştu. Bu renkli kompleksin nitrit konsantrasyonunun artmasıyla koyuluğu fazlalaştı. Tüplerin optik dansiteleri spektrofotometrede 545 nm'de köre karşı okundu.

Hesaplama:

Standart konsantrasyonları, 545 nm deki absorbanlarına bölünerek faktör (F) hesaplanır. Numunenin absorbanı bu faktörle çarpılarak numunedeki mevcut nitrit miktarları hesaplanır veya nitrit standart konsantrasyon grafiği (Şekil 10) hazırlanarak, numunelerin konsantrasyonları bu grafikten hesaplanır.

$$\frac{\text{Numunenin Konsantrasyonu}}{\text{Numunenin absorbanı}} = \frac{\text{Standartın Konsantrasyon}}{\text{Standartın absorbanı}} = \text{Faktör (F)}$$

$$\text{Numunenin konsantrasyonu} = F \times \text{Numunenin absorbanı}$$



Şekil 10. Nitrit standart konsantrasyon grafiği

Kadmiyum Granüllerinin Deneye Hazırlanması: Kadmiyum granüllerinin aktivasyonu için 12 saat süreyle 0.1 mol/L'lik H₂SO₄ içinde muhafaza edilen kadmiyum granülleri rejenere edildi. Asitten çıkarıp deiyonize su ile 3 kere yıkanarak asidi uzaklaştırıldı. Üzerine 2 ml CuSO₄ çözeltisi konulup 2 dakika bekletildi. Glisin-NaOH tamponu ile 3 kere durulandı. Kurutma kağıdı kullanılarak kurutuldu. Nitrat deneyinde kullanmaya hazır duruma getirildi.

Nitrat Çalışması: Numuneler ve standart çözeltiler olarak hazırladığımız 5 μmol, 10 μmol, 25 μmol, 50 μmol ve 100 μmol'lük nitrat çözeltileri (S`1, S`2, S`3, S`4, S`5) Tablo 9'daki şekilde tüplere pipetlendi.

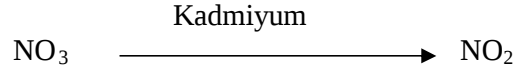
Tablo 9. Nitrat Çalışması Şeması

	Kör tüpü	Numune tüpü	S1 5 µmol	S2 10 µmol	S3 25 µmol	S4 50 µmol	S5 100µmol
Numune (ml)	-	1	-	-	-	-	-
Glisin-NaOH (ml)	1	1	1	1	1	1	1
H ₂ O (ml)	3	2	1	1	1	1	1
Nitrat çözelt.(ml)	-	-	2	2	2	2	2
Kadmiyum gr	2.5-3	2.5-3	2.5-3	2.5-3	2.5-3	2.5-3	2.5-3

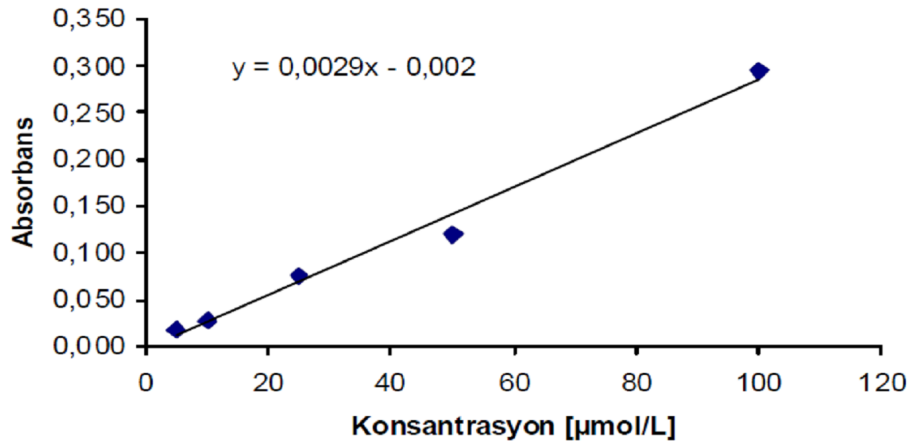
90 dakika oda sıcaklığında bekletildi, nitratlar nitrite dönüştü; de neye devam edildi.

H ₂ O (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Sülfanilamid (ml)	1	1	1	1	1	1	1
NNDA çözelt. (ml)	1	1	1	1	1	1	1

Bakır kaplı kadmiyum granülleri nitratları nitrite dönüştürdü:



Tüpler vortekslendi, 45 dakika oda sıcaklığında bekletildi, 545 nm’de kör tüpüne karşı optik dansiteleri okundu. Nitrit deneyinde olduğu gibi standartların konsantrasyonu bilindiğinden absorbens değerleri kullanılarak faktör hesaplandı, sonuçlar µmol/L cinsinden verildi.

**Şekil 11.** Nitrat standart konsantrasyon grafiği

NO₃ formu, NO türevlerinin en kararlı yapısıdır. Bu yüzden numunede bulunan NO₃’ı NO₂ formuna indirgenerek ortamda bulunan toplam NO₂ formu ölçülür. Toplam NO, ilk ölçülen NO₂ değeri ile NO₃ değerinin toplamıdır.

ADMA Ölçümü

L-Arjinin, SDMA VE ADMA ölçümleri HPLC (high performance liquid chromatography) cihazında EUREKA (Head Quarter: Via E. Fermi 25 60033 Chiaravalle (AN) ITALY) kiti kullanılarak floresans detektörüyle kromatogramlar analiz edilmiştir.

Tablo 10. ADMA Kit Bileşenleri

ADMA KİT BİLEŞENLERİ:	Tüm kit bileşenleri kullanıma hazır olup 2 – 8 °C de 3 yıl dayanıklıdır.
A Ayırıcı – Şartlandırma solüsyonu 1; 1x100 ml	
B Ayırıcı – Şartlandırma solüsyonu 2; 1 x 100 ml	
C Ayırıcı – Şartlandırma solüsyonu 3; 1 x 100 ml	
D Ayırıcı – Dilüsyon solüsyonu; 1 x 100 ml	
E Ayırıcı – Yıkama solüsyonu 1; 1 x 100 ml	
F Ayırıcı– Yıkama solüsyonu 2; 1 x 100 ml	
G Ayırıcı – Yıkama solüsyonu 3; 1 x 100 ml	
I Ayırıcı – Eluting solüsyonu; 1 x 100 ml	
H Ayırıcı – Test solüsyonu; 1 x 5 ml	
J Ayırıcı – Başlangıç Solüsyonu; 1 x 3 ml	
L Ayırıcı – Türevlendirme solüsyonu; 1 x 3 ml	
N Ayırıcı – Tampon solüsyonu 1; 1 x 20 ml	
O Ayırıcı – Tampon solüsyonu 2; 1 x 20 ml	
M Ayırıcı – Mobil faz; 8 x 500 ml	
P Ayırıcı – Kimyasal standart kalibratörü; 1 x 5 ml	
Q Ayırıcı – Stabilizasyon solüsyonu; 1 x 10 ml	
Temizleme kolonları – 100 pcs	

Basamak 1:Türevlendirme

1.5 ml'lik cam veya plastik bir tüpe

200 µl **H Ayırıcı** – Test Solüsyonu

200 µl **O Ayırıcı** – Tampon Solüsyonu 2

30 µl **J Ayırıcı** – Başlangıç Solüsyonu

30 µl **L Ayırıcı** – Türevlendirme solüsyonu konularak 5 s aniye karıştırılır.

Basamak 2: 20 °C' de (oda ısısında) 20 dk bekletilir.

Basamak 3: Q Ayırıcı – Stabilizasyon solüsyonundan 100µl eklenir ve bu solüsyondan standartların kromatogramdaki yerlerinin belirlenmesi için 100 µl alınarak HPLC cihazına enjekte ettirilir.

Standartların Hazırlanması: Standartların üçünü birlikte tek kromatogramda görmek için;

100 µl ADMA, 100 µl Arjinin, 100 µl SDMA standartlarından alınır ve 700 µl distile su eklenerek karıştırılır. Her bir standardın konsantrasyonu 5 µmol/l dir.

Örneklerin Hazırlanması:

1- Ön kolonların aktivasyonu

Kolonlardan sırasıyla 1 er ml A,B,C ayırıcı geçirilir.

A Ayırıcı – Şartlandırma Solüsyonu 1

B Ayırıcı – Şartlandırma Solüsyonu 2

C Ayırıcı – Şartlandırma Solüsyonu 3

Elüent’ler atılarak ön kolonlar aktive edilir.

Örneklerin Dilüsyonu: Örneklerden (numune veya standart) 400 µl alınır, dilüsyon solüsyonundan (D Ayırıcı) da 1000 µl alınarak karıştırılır.

Örneklerin Ön kolonlara Aplikasyonu: Dilüsyon yapılan örneklerden 1 ml alınarak ön kolondan geçirilir ve elüent atılır.

Ön kolonların Yıkama: Ön kolonlardan sırasıyla 1 er ml E,F,G solüsyonları geçirilir.

1.0 ml **E Ayırıcı** –Yıkama solüsyonu 1

1.0 ml **F Ayırıcı** – Yıkama solüsyonu 2

1.0 ml **G Ayırıcı** – Yıkama solüsyonu 3

Daha sonra ön kolonlar kurutulur. Toplanan ön kolonlar temiz tüplere yerleştirilir ve ön kolonlardan 1.0 ml **I Ayırıcı** geçirilir, elüent toplanır ve 5 sn karıştırılır.

Örneklerin Türevlendirilmesi:

1.5 ml’ lik cam veya plastik bir tüpe

200 µl **elüent**

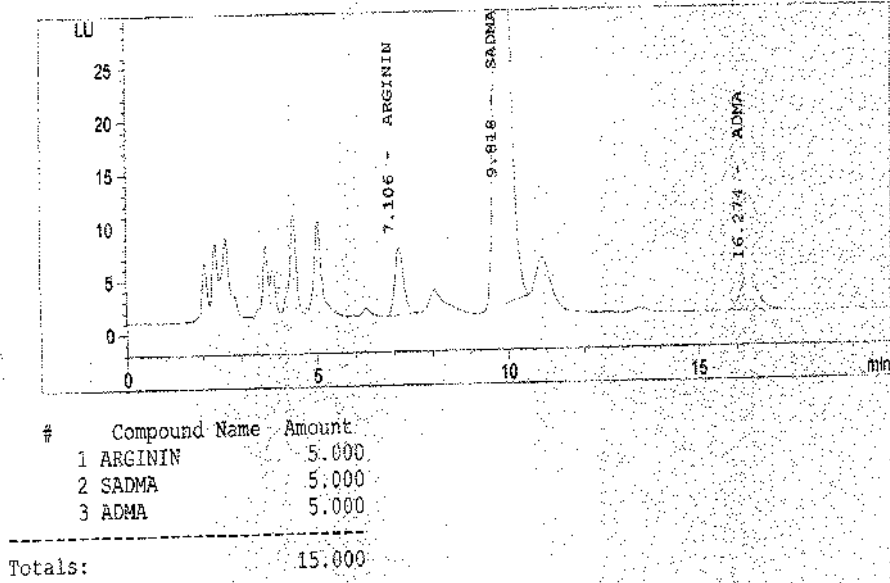
200 µl **N Ayırıcı** – Tampon solüsyonu 1

200 µl **O Ayırıcı** – Tampon solüsyonu 2

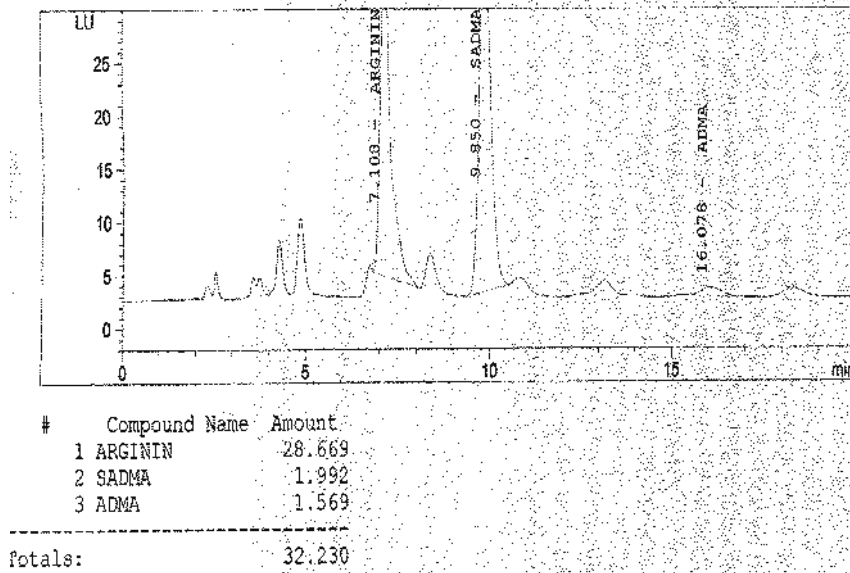
30 µl **J Ayırıcı** – Başlangıç solüsyonu

30 µl **L Ayırıcı** – Türevlendirme

Solüsyonlardan konularak 5 sn karıştırılır ve 20 °C' de (oda ısısında) 20 dk bekletilir. Daha sonara **Q Ayıracı**– Stabilizasyon solüsyonundan 100 µl eklenir ve 5 sn karıştırılarak HPLC cihazında 100 µl enjeksiyon yapılarak kromatogramlar değerlendirilir.



Şekil 12. ADMA, Arjinin ve SDMA kalibratörüne ait kromatogram



Şekil 13. Hasta numunesinde ADMA, Arjinin ve SDMA ölçümüne ait kromatogram

Biyokimyasal Ölçümler

Örnekler çözündürüldükten sonra serum glukoz, AST, ALT, ALP, GGT, total kolesterol, HDL, LDL ve trigliserid düzeyleri Olympus AU 600 (Olympus Optical Co. Ltd, Tokyo-Japan) otoanalizöründe Olympus marka ticari kitler kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü. VLDL-Kolesterol düzeyleri ise yine aynı otoanalizörde hesaplama ile elde edildi.

İstatistik

Çalışmadan elde edilen sonuçların biyoistatistiksel değerlendirmesi için SPSS 12.0 paket programı kullanıldı. Biyokimyasal parametrelerin kontrol ve hasta grupları arasında karşılaştırılmasında Student's t testi kullanılmıştır. Genotipler arasındaki değişkenlerin değerlendirilmesi ise tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılmıştır. eNOS genotipleri ile allellerinin görülme sıklığının ve gruplar arası farklılıklarının değerlendirilmesinde χ^2 testi kullanılmıştır. $p<0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

Bu çalışmaya 194 SDBY hastası ve 92 sağlıklı kontrol vakası alınmıştır. 194 SDBY hastasının; 130 tanesi HD, 64 tanesi ise PD tedavisi almaktaydı. HD hasta gurubu yaş ortalamaları 53.76 ± 17.04 olan 59 erkek ve 71 kadından, PD gurubu ise yaş ortalamaları 48.17 ± 14.93 olan 37 erkek ve 27 kadından oluşmaktaydı. Kontrol gurubu ise yaş ortalamaları 64.03 ± 10.06 olan 45 erkek ve 47 kadından oluşmaktaydı.

HD grubu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında; glukoz, trigliserid, albümin, üre, kreatinin, diyastolik kan basıncı (DKB) ($p < 0.0001$) ve sistolik kan basıncı (SKB) ($p < 0.01$) HD grubunda anlamlı olarak yüksek; HDL ($p < 0.0001$) ve kolesterol ($p < 0.01$) ise anlamlı olarak düşük bulundu (Tablo 11).

PD grubu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında; trigliserid, üre, kreatinin, SKB, DKB ($p < 0.0001$), LDL, glukoz ($p < 0.01$) ve albümin ($p < 0.05$) anlamlı olarak yüksek; HDL ($p < 0.0001$) ise anlamlı olarak düşük bulundu. (Tablo 11)

HD grubu PD grubuyla karşılaştırıldığında yalnızca üre ($p < 0.001$) anlamlı olarak yüksek; kolesterol, SKB ($p < 0.05$), kreatinin, DKB ($p < 0.0001$) ve LDL ($p < 0.005$) ise anlamlı olarak düşük bulundu (Tablo 11).

Tablo 11. Kontrol ve SDBY (HD+PD) Hasta Gruplarının Klinik ve Biyokimyasal Değerleri.

	HD (n=130)	PD (n=64)	Kontrol (n=92)
Yaş (yıl)	$53.76 \pm 17.04^{a,c}$	48.17 ± 14.93^a	64.03 ± 10.06
Glukoz (mg/dl)	134.71 ± 95.24^a	113.57 ± 58.93^b	82.37 ± 14.59
SKB (mmHg)	$130.0 \pm 25.0^{b,c}$	140.0 ± 30.0^a	120.0 ± 10.0
DKB (mmHg)	$80.0 \pm 15.0^{a,g}$	90.0 ± 20.0^a	70.0 ± 5.0
Kolesterol (mg/dl)	$184.62 \pm 62.42^{b,c}$	203.15 ± 47.57	203.78 ± 15.53
HDL (mg/dl)	40.49 ± 11.44^a	39.53 ± 6.71^a	60.43 ± 7.08
LDL (mg/dl)	117.70 ± 43.80^d	134.50 ± 37.10^b	118.72 ± 16.66
Trigliserid (mg/dl)	188.25 ± 125.87^a	190.50 ± 116.81^a	99.26 ± 43.92
T.protein (g/dl)	6.90 ± 0.86	7.02 ± 0.69	6.90 ± 0.44
Albumin (g/dl)	3.69 ± 0.65^a	3.69 ± 0.50^e	3.37 ± 0.64
Üre (mg/dl)	$155.94 \pm 61.15^{a,f}$	131.75 ± 41.26^a	36.13 ± 6.74
Kreatinin (mg/dl)	$7.98 \pm 2.54^{a,g}$	9.49 ± 2.88^a	1.13 ± 0.20
Ürikasit (mg/dl)	6.57 ± 1.95	6.05 ± 1.14	6.31 ± 1.59
NO ($\mu\text{mol/l}$)	656.38 ± 141.68^g	557.41 ± 141.68^h	635.06 ± 146.25
Arjinin ($\mu\text{mol/l}$)	24.25 ± 10.54^c	32.98 ± 12.10	30.62 ± 14.96
SDMA ($\mu\text{mol/l}$)	$3.77 \pm 0.71^{a,g}$	1.62 ± 0.15^i	1.43 ± 0.15
ADMA ($\mu\text{mol/l}$)	$2.97 \pm 1.03^{a,g}$	1.66 ± 0.48^i	1.31 ± 0.43
İMK (mm)	$1.19 \pm 0.17^{a,j}$	1.10 ± 0.15^a	0.94 ± 0.12

^ap<0.0001, kontrol ile karşılaştırıldığında

^bp<0.01, kontrol ile karşılaştırıldığında

^cp<0.05, PD ile karşılaştırıldığında

^dp<0.005, PD ile karşılaştırıldığında

^ep<0.005, kontrol ile karşılaştırıldığında

^fp<0.001, PD ile karşılaştırıldığında

^gp<0.0001, PD ile karşılaştırıldığında

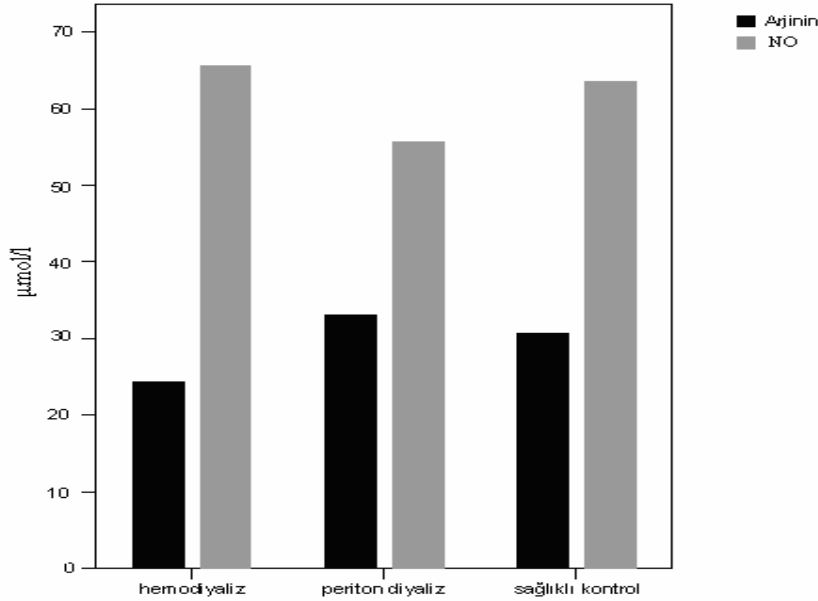
^hp<0.001, kontrol ile karşılaştırıldığında

ⁱp<0.05, kontrol ile karşılaştırıldığında

^jp<0.01, PD ile karşılaştırıldığında

NO düzeyleri HD hasta grubunda ortalama 656.38 ± 141.68 $\mu\text{mol/l}$; PD hasta grubunda ortalama 557.41 ± 141.68 $\mu\text{mol/l}$ ve sağlıklı kişilerde ortalama 635.06 ± 146.25 $\mu\text{mol/l}$ şeklindeydi. Bu değerler incelendiğinde HD hasta grubunda NO düzeyleri PD hasta grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti ($p<0.0001$). PD hasta grubunda NO düzeyleri sağlıklı grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü ($p<0.001$) (Tablo 11, Şekil 14).

Arjinin düzeyleri HD hasta grubunda ortalama 24.25 ± 10.54 $\mu\text{mol/l}$; PD hasta grubunda ortalama 32.98 ± 12.1 $\mu\text{mol/l}$ ve sağlıklı kişilerde ortalama 30.62 ± 14.96 $\mu\text{mol/l}$ şeklindeydi. Bu değerler incelendiğinde HD hasta grubunda arjinin düzeyleri PD hasta grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü ($p<0.05$). Bunun dışında hasta grupları ve sağlıklı kişiler arasında arjinin düzeyleri açısından anlamlı bir ilişki tespit edilemedi (Tablo 11, Şekil 14).



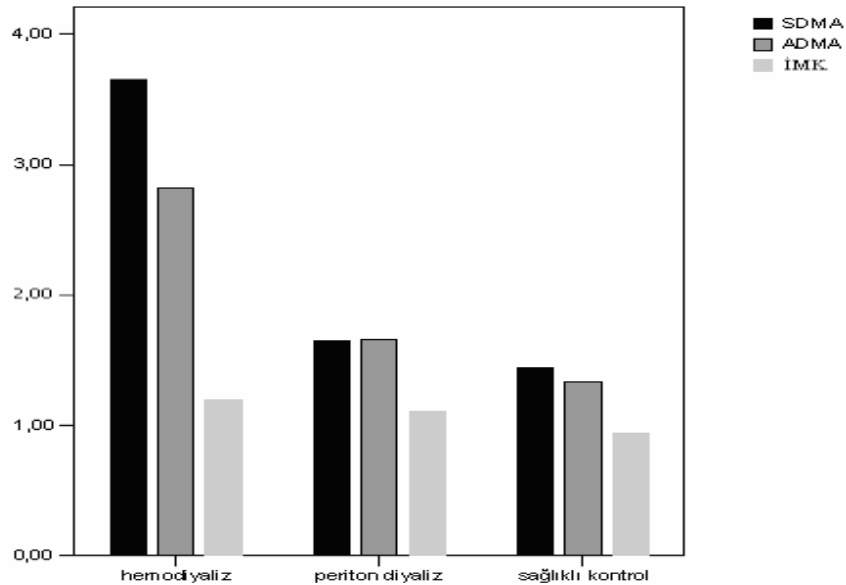
Şekil 14. Hasta ve Kontrol Gruplarında Arjinin ve NO Değerlerinin Grafik ile Gösterilmesi (NO değerleri 10'a bölünmüştür)

SDMA düzeyleri ise HD hasta grubunda ortalama 3.77 ± 0.71 $\mu\text{mol/l}$; PD hasta grubunda ortalama 1.62 ± 0.15 $\mu\text{mol/l}$ ve sağlıklı kişilerde ortalama 1.43 ± 0.15

$\mu\text{mol/l}$ şeklindeydi. Bu değerler incelendiğinde hem HD ($p<0.0001$) hem de PD ($P<0.05$) hasta grubu sağlıklı kişilerle karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha yüksek SDMA düzeylerine sahipti. Ayrıca HD ve PD hasta grupları kendi aralarında karşılaştırıldıklarında HD grubunda SDMA düzeyleri PD grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti ($p<0.0001$) (Tablo 11, Şekil 15).

ADMA düzeyleri HD hasta grubunda ortalama $2.97\pm1.03 \mu\text{mol/l}$; 70 PD hasta grubunda ortalama $1.66\pm0.48 \mu\text{mol/l}$ ve sağlıklı kişilerde ortalama $1.31\pm0.43 \mu\text{mol/l}$ şeklindeydi. Bu değerler incelendiğinde hem HD ($p<0.0001$) hem de PD ($P<0.05$) hasta grubu sağlıklı kişilerle karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha yüksek ADMA düzeylerine sahipti. Ayrıca HD ve PD hasta grupları kendi aralarında karşılaştırıldıklarında HD grubunda ADMA düzeyleri PD grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti ($p<0.0001$) (Tablo 11, Şekil 15).

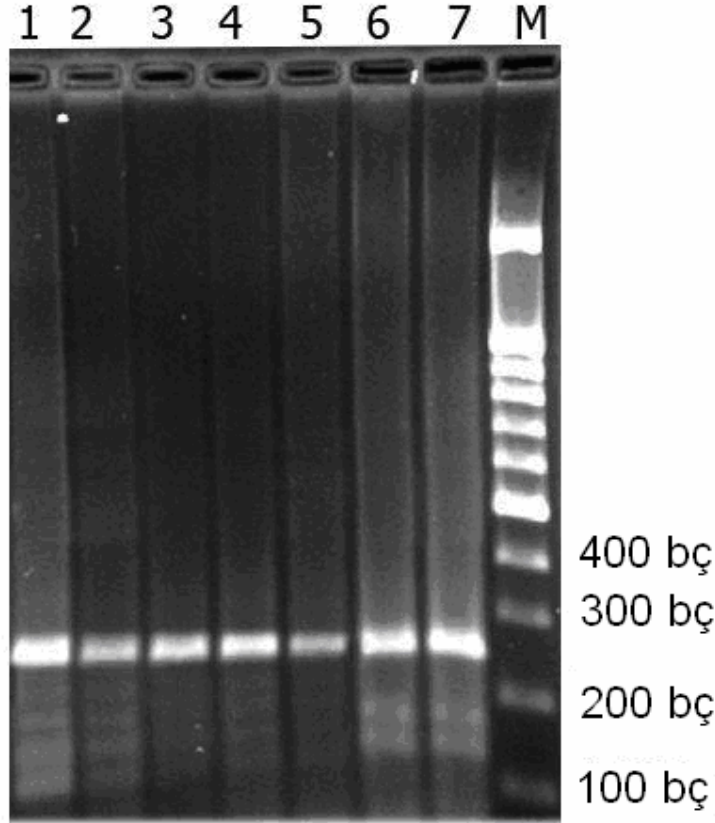
İMK değerleri HD hasta grubunda ortalama $1.19\pm0.17 \text{ mm}$; PD hasta grubunda ortalama $1.10\pm0.15 \text{ mm}$ ve sağlıklı kişilerde ortalama $0.94\pm0.12 \text{ mm}$ şeklindeydi. Bu değerler incelendiğinde hem HD hem de PD hasta grubu sağlıklı kişilerle karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha yüksek İMK değerlerine sahipti ($p<0.0001$). Bunun dışında hasta grupları ve sağlıklı kişiler arasında İMK değerleri açısından anlamlı bir ilişki tespit edilemedi (Tablo 11, Şekil 15).



Şekil 15. Hasta ve Kontrol Gruplarında ADMA, SDMA ve İMK Değerlerinin Grafik ile Gösterilmesi (ADMA ve SDMA'nın birimleri $\mu\text{mol/l}$, İMK'nın birimi ise mm cinsindendir)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve RFLP ile Genotiplendirme Bulguları

Endotelial nitrik oksit sentaz geni Glu298Asp genotiplerinin saptanması amacıyla 248 bp uzunluğundaki PZR ürünlerinin (Şekil 16) Ban II enzimi ile kesimi sonucunda oluşan DNA parçalarının uzunlukları Tablo 12’ de verilmiştir. Ban II enzimi kesim bölgesinin bulunması 163 bp ve 85 bp’ lik iki DNA parçasının oluşmasına neden olurken, kesim bölgesinin bulunmaması 248 bp’ lik tek parçanın gözlenmesiyle sonuçlanır. Kesim ürünleri %3’ lük agaroz jelde ethidium bromide ile boyanarak Bio-Rad Laboratories, ABD; Molecular Imager Gel Doc XR System ile görüntülendi (Şekil 16).

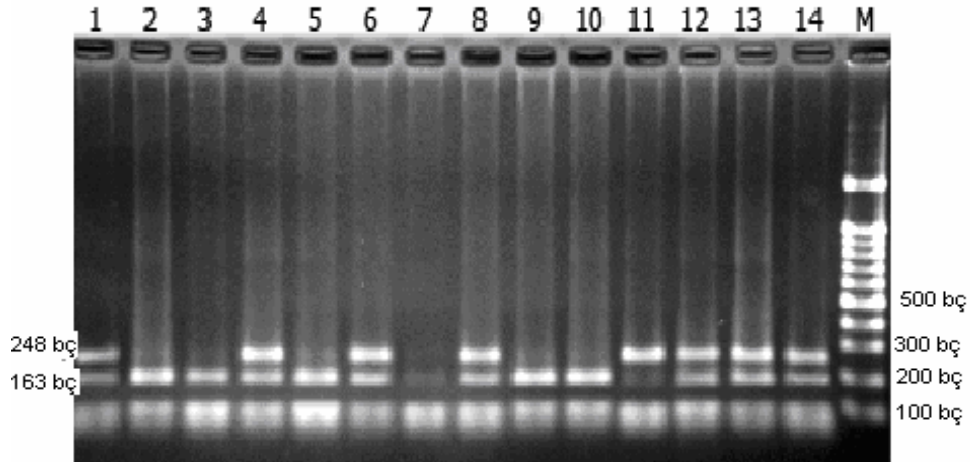


Şekil 16. 248 bp’lik PZR Ürünlerinin Ultraviyole Transilluminatördeki Görüntüsü
M: DNA ladder (100bp), 1-7. sıralar: 248 bp’lik PZR ürünleri.

Tablo 12. Ban II Enzimi ile Kesimden Sonra Ortaya Çıkan DNA Parçalarının Uzunlukları

	Homozigot Normal (Glu/Glu)	Heterozigot (Glu/Asp)	Homozigot Mutant (Asp/Asp)
248 bç		—	—
163 bç	—	—	
85 bç	—	—	

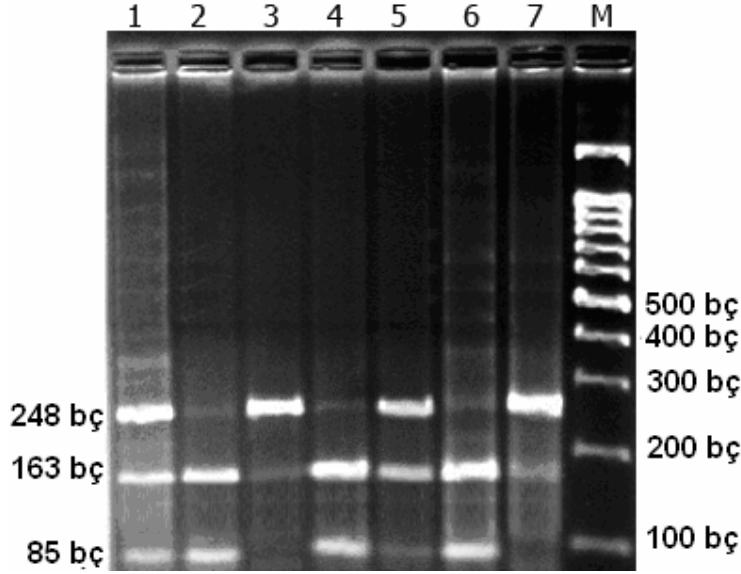
Her örnek için kesim olup olmadığı, 100 bç DNA ladder moleküler ağırlık merdiveni standardına göre değerlendirildi. eNOS Glu298Asp genotipleri, restriksiyon bölgesinin her iki allelde de bulunmaması mut ant (Asp/Asp), restriksiyon bölgesinin her iki allelde de bulunması normal (Glu/Glu), restriksiyon bölgesinin sadece bir allelde bulunması heterozigot (Glu/Asp) şeklinde açıklanır (Şekil 17, 18).



Şekil 17. PZR ürünlerinin kesimi ile elde edilen Glu298A sp genotipleri

M: 100 bç DNA moleküler ağırlık merdiveni; 1,4,6,8,12,13,14. kuyular

Glu/Asp genotipi; 11. kuyu Asp/Asp genotipi; 2,3,5,7,9,10. kuyular Glu/Glu genotipi.



Şekil 18. PZR ürünlerinin kesimi ile elde edilen Glu298Asp genotipleri
M: 100 bç DNA moleküler ağırlık merdiveni; 1. ve 5. kuyular Glu/Asp genotipi; 3 ve 7. kuyular Asp/Asp genotipi; kuyular 2. 4. ve 6. kuyular Glu/Glu genotipi.

Glu298Asp Genotip Dağılımı ile Glu298Asp Allel Sıklığının Kontrol ve PD, HD Gruplarındaki Dağılımları

Kontrol grubu, HD ve PD gruplarının Glu298Asp genotip dağılımı ile G ve A allel sıklığı tablo 13'te gösterilmiştir. Kontrol grubunda GG, GA ve AA genotip sıklığı sırası ile % 46.7, % 32.6 ve % 20.7; HD grubunda bu oranlar sırası ile % 39.2, % 40 ve % 20.8; PD grubunda ise sırası ile % 39.1, % 34.4 ve % 26.6 olarak bulundu. Hasta ve kontrol grupları eNOS gen sıklıkları açısından karşılaştırıldığında genotip dağılımlarının istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği saptandı ($\chi^2=2.52$, $p=0.64$).

Kontrol grubunda G alleli % 37.1, A alleli % 62.9 oranlarında bulunurken HD grubunda G alleli % 41.2, A alleli % 58.8 ve PD grubunda G alleli % 44.8, A alleli % 55.2 oranında bulundu. Üç grupta da en sık bulunan allel A alleli olup A ve G allel sıklığı bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($\chi^2=1.35$, $p=0.5$) (Tablo 13).

Tablo 13. Kontrol Grubu, HD ve PD Gruplarının Glu298Asp Genotip Dağılımı ile G ve A Allel Sıklığı

Genotip	Kontrol n (%)	PD n (%)	HD n (%)	
Glu/Glu	43 (46.7%)	25 (%39.1)	51 (%39.2)	$\chi^2 = 2.52$
Glu/Asp	30 (32.6%)	22 (34.4%)	52 (%40)	P değeri = 0.64
Asp/Asp	19 (20.7%)	17 (%26.6)	27 (%20.8)	
Allel	Kontrol (%)	PD (%)	HD (%)	
G	37.1	44.8	41.2	$\chi^2 = 1.35$
A	62.9	55.2	58.8	P değeri = 0.5

Glu/Glu, homozigot normal; Glu/Asp, heterozigot; Asp/Asp, homozigot mutant. Değerler sayı ve yüzde olarak verilmiştir. Kontrol ve hasta gruplarında eNOS Glu298Asp genotip frekansları χ^2 testi ile karşılaştırılmıştır ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($\chi^2= 2.52$, $p= 0.64$).

Arjinin Düzeyleri

Plazma arjinin düzeyleri; HD, PD ve kontrol grubunda, eNOS Glu298Asp genotiplerine göre incelendiğinde sırası ile GG genotipinde 23.2 ± 9.6 , 33.1 ± 12.8 ve 30.1 ± 16.4 $\mu\text{mol/l}$; GA genotipinde 26.7 ± 11.9 , 35.8 ± 10.7 ve 30.6 ± 9.3 $\mu\text{mol/l}$, AA genotipinde 21.2 ± 8.2 , 28.3 ± 12.2 ve 31.2 ± 13.2 $\mu\text{mol/l}$ olarak bulundu. Bu sonuçlar incelendiğinde HD grubunda GA genotipinde AA genotipine göre arjinin düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$) (Tablo 14).

HD, PD grubu ve Kontrol grubunun eNOS Glu298Asp genotiplerine göre plazma arjinin düzeyleri şekil 19'da verilmiştir.

NO Düzeyleri

NO düzeyleri; HD, PD ve kontrol grubunda, eNOS Glu298Asp genotiplerine göre incelendiğinde sırası ile GG genotipinde 624.1 ± 123.6 , 549.1 ± 94.5 ve 635.6 ± 130.2 $\mu\text{mol/l}$; GA genotipinde 664.2 ± 140.9 , 599.1 ± 206.1 ve 622.5 ± 175.0 $\mu\text{mol/l}$, AA genotipinde 702.1 ± 159.3 , 515.0 ± 72.8 ve 653.5 ± 147.9 $\mu\text{mol/l}$ olarak bulundu. Bu sonuçlar incelendiğinde HD grubunda GG genotipinde AA genotipine göre NO düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p < 0.05$) (Tablo 14).

HD, PD grubu ve Kontrol grubunun eNOS Glu298Asp genotiplerine göre NO düzeyleri şekil 20’de verilmiştir.

SDMA Düzeyleri

SDMA düzeyleri; HD, PD ve kontrol grubunda, eNOS Glu298Asp genotiplerine göre incelendiğinde sırası ile GG genotipinde 3.8 ± 0.7 , 1.62 ± 0.12 ve 1.45 ± 0.09 $\mu\text{mol/l}$; GA genotipinde 3.8 ± 0.8 , 1.58 ± 0.17 ve 1.40 ± 0.09 $\mu\text{mol/l}$; AA genotipinde 3.5 ± 0.4 , 1.68 ± 0.16 ve 1.43 ± 0.09 $\mu\text{mol/l}$ olarak bulundu. Bu sonuçlar incelendiğinde PD grubunda GA genotipinde AA genotipine göre SDMA düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p < 0.05$) (Tablo 14).

HD, PD grubu ve kontrol grubunun eNOS Glu298Asp genotiplerine göre SDMA düzeyleri şekil 21’de verilmiştir.

ADMA Düzeyleri

ADMA düzeyleri; HD, PD ve kontrol grubunda, eNOS Glu298Asp genotiplerine göre incelendiğinde sırası ile GG genotipinde 3.0 ± 1.13 , 1.57 ± 0.49 ve 1.40 ± 0.74 $\mu\text{mol/l}$; GA genotipinde 3.2 ± 1.0 , 1.67 ± 0.44 ve 1.23 ± 0.46 $\mu\text{mol/l}$; AA genotipinde 2.6 ± 0.7 , 1.78 ± 0.49 ve 1.23 ± 1.02 $\mu\text{mol/l}$ olarak bulundu. Bu sonuçlar incelendiğinde HD grubunda GA genotipinde AA genotipine göre ADMA düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$) (Tablo 14).

HD, PD grubu ve kontrol grubunun eNOS Glu298Asp genotiplerine göre ADMA düzeyleri şekil 22’de verilmiştir.

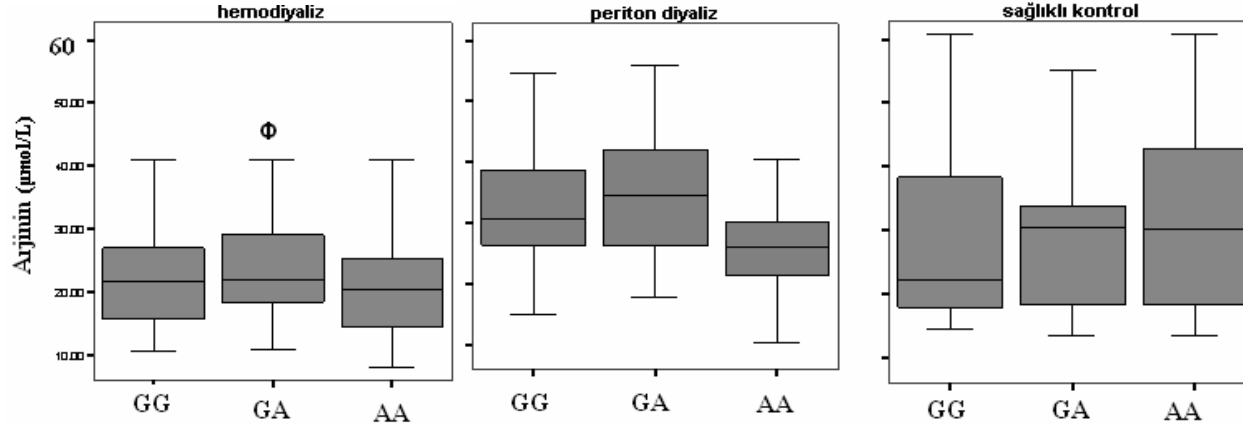
Tablo 14. Kontrol, HD ve PD Gruplarının NO, Arjinin, SDMA, ADMA ve İMK Düzeylerinin eNOS Glu298Asp Genotiplerine Göre Dağılımı

	HD			PD			Kontrol		
	GG	GA	AA	GG	GA	AA	GG	GA	AA
NO	624.1±123.6 ^b	664.2±140.9	702.1±159.3	549.1±94.5	599.1±206.1	515.0±72.8	635.6±130.2	622.5±175.0	653.5±147.9
Arjinin	23.2±9.6	26.7±11.9 ^b	21.2±8.2	33.1±12.8	35.8±10.7	28.3±12.2	30.1±16.4	30.6±9.3	31.2±13.2
SDMA	3.8±0.7	3.8±0.8	3.5±0.4	1.62±0.12	1.58±0.17 ^a	1.68±0.16	1.45±0.09	1.40±0.09	1.43±.09
ADMA	3.0±1.13	3.2±1.0 ^b	2.6±0.7	1.57±0.49	1.67±0.44	1.78±0.49	1.40±.74	1.23±.46	1.23±1.02
IMK	1.16±0.17	1.21±0.11	1.21±0.20	1.07±0.10	1.09±0.17	1.16±0.13	0.90±0.94 ^c	0.95±0.13	0.97±0.07

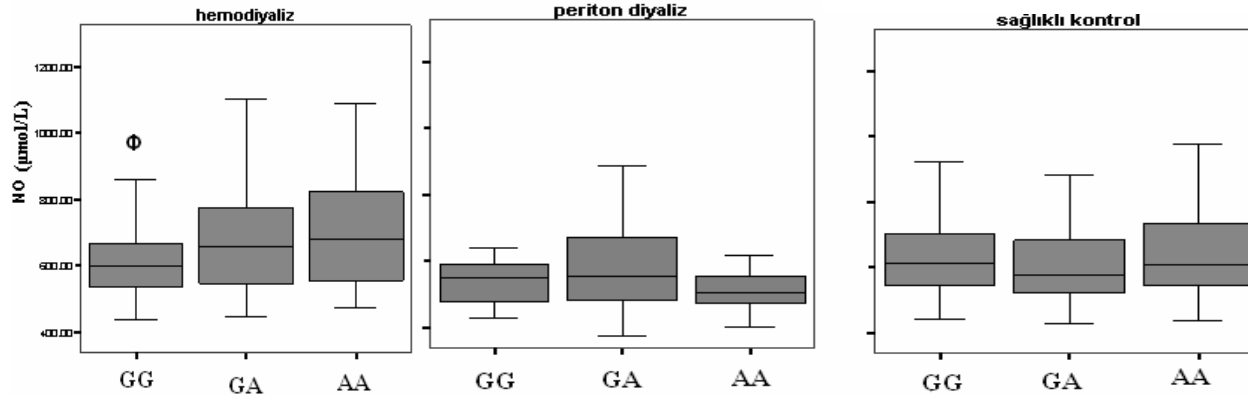
^aP<0.05, PD'de AA ile karşılaştırıldığında

^bP<0.05, HD'de AA ile karşılaştırıldığında

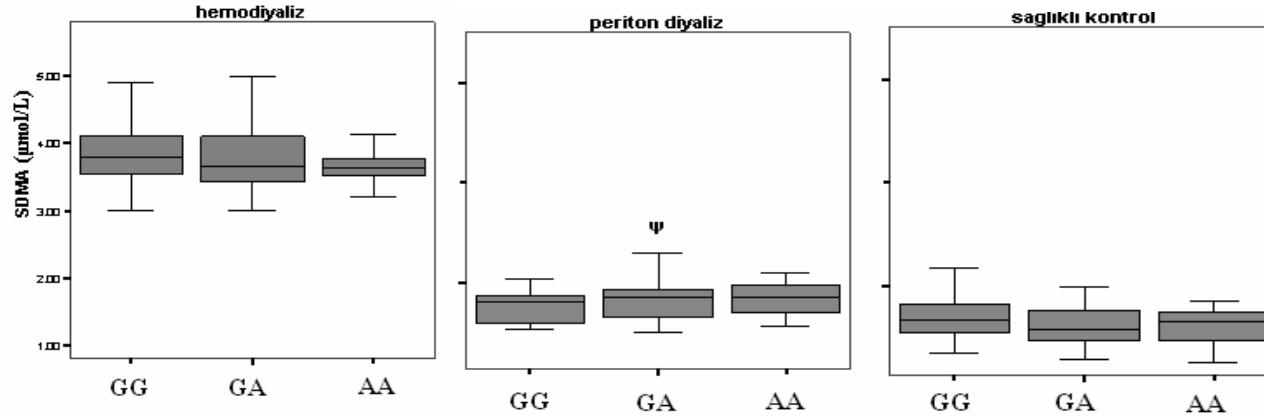
^cP<0.05, Kontrolde AA ile karşılaştırıldığında



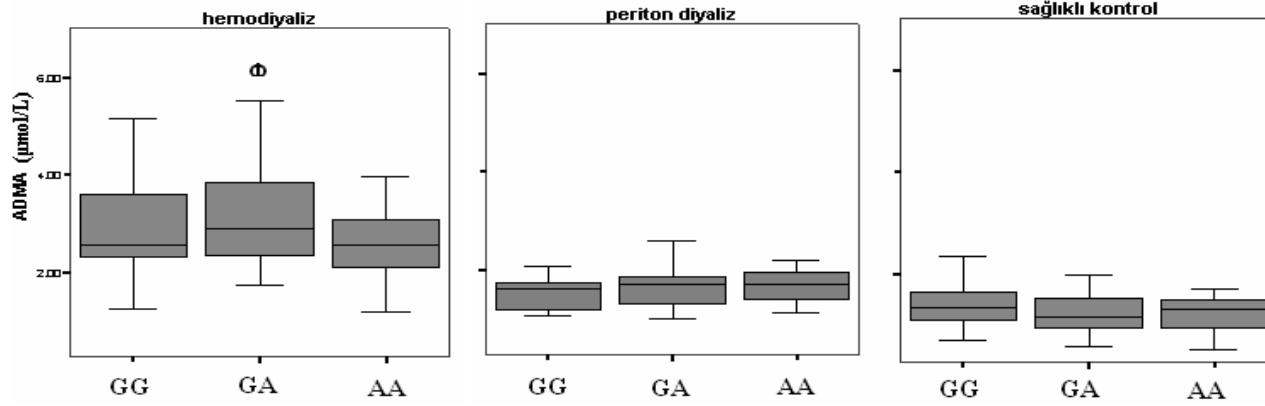
Şekil 19. Grupların G/A 298 Genotiplerine Göre Serum Arjinin Düzeyleri ^Φ P<0.05, AA ile karşılaştırıldığında



Şekil 20. Grupların G/A 298 Genotiplerine Göre NO Değerleri ^Φ P<0.05, AA ile karşılaştırıldığında



Şekil 21. Grupların G/A 298 Genotiplerine Göre SDMA Düzeyleri $\psi P < 0.05$, AA ile karşılaştırıldığında

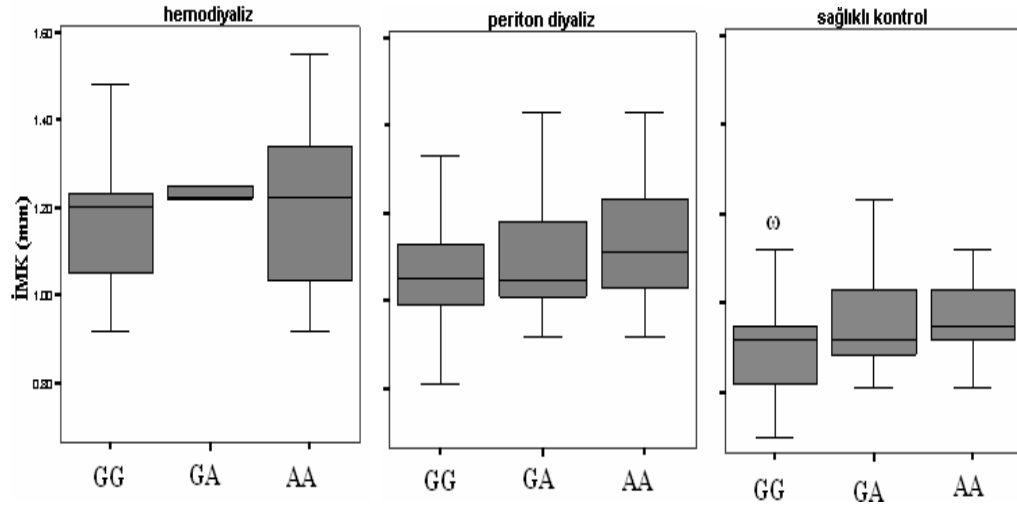


Şekil 22. Grupların G/A 298 Genotiplerine Göre ADMA Düzeyleri $\phi P < 0.05$, AA ile karşılaştırıldığında

İMK Değerleri

İMK değerleri; HD, PD ve kontrol grubunda, eNOS Glu298Asp genotiplerine göre incelendiğinde sırası ile GG genotipinde 1.16 ± 0.17 , 1.07 ± 0.10 ve 0.90 ± 0.94 mm; GA genotipinde 1.21 ± 0.11 , 1.09 ± 0.17 ve 0.95 ± 0.13 mm, AA genotipinde 1.21 ± 0.20 , 1.16 ± 0.13 ve 0.97 ± 0.07 mm olarak bulundu. Bu sonuçlar incelendiğinde sağlıklı kişilerde GG genotipinde AA genotipine göre İMK değerleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p < 0.05$) (Tablo 14).

HD, PD grubu ve Kontrol grubunun eNOS Glu298Asp genotiplerine göre İMK değerleri şekil 23’de verilmiştir.



Şekil 23. Grupların G/A 298 Genotiplerine Göre İMK Değerleri ^ω $P < 0.05$, sağlıklı kontrollerde AA ile karşılaştırıldığında

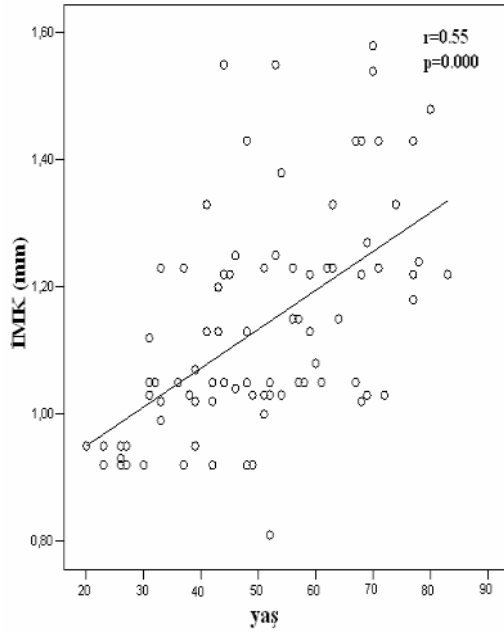
SDBY'DE (HD+PD) İMK İle Risk Faktörleri Arasındaki Korelasyon

Hasta grupları ve kontrol grubunda aterosklerotik risk faktörleri ile İMK arasındaki korelasyon Tablo 15'te verilmiştir.

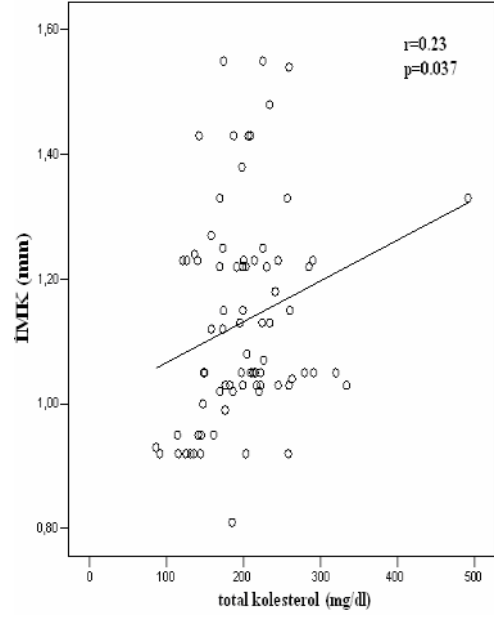
Tablo 15. SDBY(HD+PD)'li Hastalarda İMK ile Aterosklerotik Risk Faktörleri Arasındaki Korelasyon

	r	P
Yaş (yıl)	0.55	0.000
Glukoz (mg/dl)	0.23	0.035
Kolesterol (mg/dl)	0.23	0.037
LDL (mg/dl)	0.25	0.022
HDL (mg/dl)	-0.33	0.048
Kreatinin (mg/dl)	0.074	0.049
Ürik asit (mg/dl)	0.159	0.177
Kalsiyum (mg/dl)	0.124	0.260
iFosfor (mg/dl)	0.072	0.528
NO (μmol/l)	-0.048	0.661
Arjinin (μmol/l)	-0.147	0.173
SDMA (μmol/l)	0.171	0.116
ADMA (μmol/l)	0.213	0.047
SKB (mmHg)	0.142	0.199
DKB (mmHg)	0.140	0.140
eNOS gen polimorfizmi	0.136	0.21

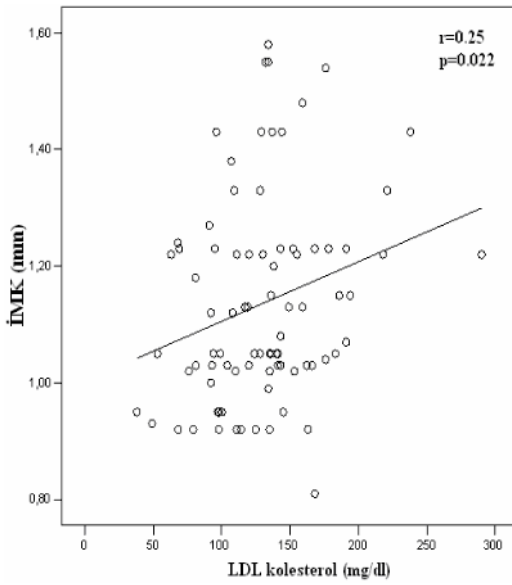
Bu inceleme sonucunda İMK ile yaş ($r=0.55$, $p=0.000$) (şekil 24), total kolesterol ($r=0.23$, $p=0.037$) (şekil 25), LDL kolesterol ($r=0.25$, $p=0.022$) (şekil 26) ve ADMA ($r=0.21$, $p=0.047$) (şekil 27) arasında pozitif korelasyon; HDL kolesterol ile ($r=-0.33$, $p=0.048$) negatif korelasyon saptandı. İMK ile sistolik ve diyastolik kan basınçları, NO, SDMA ve eNOS Glu298Asp gen polimorfizmi arasında ise anlamlı bir ilişki tespit edilemedi.



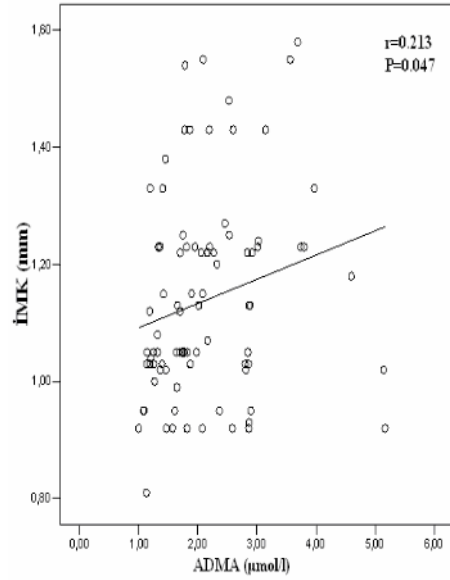
Şekil 24. İMK ile yaş arasındaki korelasyon



Şekil 25. İMK ile total kolesterol arasındaki korelasyon



Şekil 26. İMK ile LDL kolesterol arasındaki korelasyon



Şekil 27. İMK ile ADMA arasındaki korelasyon

4. TARTIŞMA

Dünyada her yıl 1 milyon kişiden 50-250'si son dönem böbrek yetmezliğine girmektedir. 2002 yılında ABD'de 406.000 kişinin böbrek replasman tedavisi (diyaliz veya transplantasyon) aldığı rapor edilmiştir Kronik böbrek yetmezliği (KBY), kronik seyirli böbrek hastalıklarında, ilerleyici nefron kaybı sonucunda böbrek fonksiyonlarının giderek bozulması ile ortaya çıkan, kalıcı glomerül filtrasyon hızının (GFH) azalması ile kendini gösteren bir tablodur. Böbrek fonksiyon kaybı kritik bir düzeyi aşınca altta yatan nedenin giderilmesi, çoğu kez hastalığın ilerlemesini durduramamaktadır (116).

Kardiyovasküler hastalıklar, kronik böbrek yetmezlikli hastalarda ölümün majör sebebidir (117). Bu hastalardaki artmış kardiyovasküler hastalık ve mortalite riski özellikle genç hastalarda rölatif olarak daha yüksektir ve bu durum böbrek hastalığının erken evrelerinde belirlenebilmektedir (9,118). Yaş, cinsiyet, ırk ve diyabet varlığı açısından düzeltme yapıldıktan sonra bile diyaliz hastaları arasında kardiyovasküler mortalite oranının sağlıklı popülasyondan 10-20 kat daha fazla olması böbrek yetmezliğinin kendisinin kardiyovasküler hastalık için önemli bir risk olduğunu göstermektedir (9). Diyabet, hipertansiyon, dislipidemi ve ilerlemiş yaş gibi geleneksel risk faktörleri KBY'li hastalar arasında sık görülmesine rağmen, bu faktörler bu hastalar arasında kardiyovasküler hastalıkların yüksek prevalansını açıklamada yeterli değildir (119,120). Bu nedenle üremik kardiyovaskül er hastalıkların patogenezi için geleneksel olmayan risk faktörlerini araştırmak oldukça önemli bir araştırma sahası haline gelmiştir.

Endotel disfonksiyonu; fibrinolizis, düz kas hücre proliferasyonu, damarlarda vazodilatasyonun kaybı, endotelin düzenli fonksiyonlarının bozulmasında ve kardiyovasküler hastalıkların patogeneziinde önemli bir role sahiptir (117,119). KBY'de damar hasarına; klasik risk faktörleri (hipertansiyon, sigara kullanımı, diyabet, dislipidemi) (121), hastalığa spesifik faktörler (anemi, hiperparatiroid izm) (9) ve hiperhomosisteinemi (26), artmış CRP (122) ve ADMA gibi eNOS'un endojen inhibitörünün birikimi katkıda bulunmaktadır (26).

Yakın geçmişe kadar aterosklerozun erken evreleri yalnızca post mortem çalışmalarda tespit edilebilmekteydi. 1982 yılında Zweibel büyük art er duvarlarındaki intima ve media kompleksinden oluşan çizgileri ultrasonografik

görüntü olarak tanımlayan ilk kişidir (123). Bu ultrasonografi tekniği, yüksek çözünürlüklü B mod ultrasonografinin kullanımı, arter duvarıyla ilgili bilgi sağlamada en önemli metotlardan birisidir. Bu metot la arterlerin subendotelyal bölgesindeki erken aterosklerotik değişikliklerin incelenmesi invazif olmayan , güvenli, tekrar edilebilen, rölatif olarak da ucuz bir metottur. Bu metotla elde edilen görüntüler “ultrasonik biyopsi” olarak da tanımlanabilir (124).

Karotis arterlerde ateroskleroz gelişimini belirlemek için İMK ölçümü genel popülasyonda ve SDBY’li hastalarda oldukça sık kullanılan bir metottur (125,126).

Bu çalışmada SDBY hastalarında ateroskleroz varlığını araştırmak amacıyla karotis arter İMK ölçümü yapıldı. İMK değerleri HD hastalarında ortalama 1.19 ± 0.17 mm; PD hastalarında ortalama 1.10 ± 0.15 mm ve sağlıklı kişilerde ortalama 0.94 ± 0.12 mm şeklindeydi. Bu değerler incelendiğinde hem HD hem de PD hasta grubu sağlıklı kişilerle karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha yüksek ($p < 0.0001$) İMK değerlerine sahipti. Daha sonra SDBY(HD+PD)’li hastalarda İMK yüksekliğinin dolayısıyla ateroskleroz sebeplerini araştırmak için İMK ile aterosklerotik risk faktörleri arasındaki korelasyonu incelendi. Bu inceleme sonucunda İMK ile yaş ($r=0.55$, $p=0.000$), total kolesterol ($r=0.23$, $p=0.037$), LDL kolesterol ($r=0.25$, $p=0.022$) ve ADMA ($r=0.21$, $p=0.047$) pozitif korelasyon; HDL kolesterol ile ($r=-0.33$, $p=0.048$) negatif korelasyon saptadık. İMK ile sistolik ve diyastolik kan basınçları arasında ise anlamlı bir ilişki tespit edilemedi.

Hojas ve ark. 28 (16 erkek, 12 kadın) hemodiyaliz hastası ve bunlarla yaş ve cinsiyet açısından eşleşmiş 28 sağlıklı kontrolde yaptıkları çalışmada; sağlıklı kontrollerle kıyaslandığında HD hastalarında karotis arter İMK değerlerini anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır (112).

Karotis arter İMK genel popülasyonda yaşla anlamlı olarak ilişkili olduğunu gösteren iki çalışma (127,128) ile tutarlı olarak bu çalışmada da SDBY hastalarında İMK ile yaş arasında anlamlı pozitif korelasyon tespit edildi. Çalışmamızın sonuçları, bu sonuçlarla ve ultrasonografi kullanarak HD hastalarında ateroskleroz varlığını araştıran Kawagishi T. ve ark. (129) ve London GM. ve ark. (126) Bevc S. ve ark. (130) çalışmalarının sonuçlarıyla uyumlu bulunmaktadır.

Bu çalışmalardan farklı olarak Burdick ve ark. (131) diyaliz hastalarında İMK ve yaş arasında ilişki bulamamışlardır. Ancak bu çalışmaya katılan hasta sayısının az olduğu gözden kaçmamalıdır.

Sağlıklı popülasyonda kanıtlanmış bir kardiyovasküler risk faktörü olan arteriyel hipertansiyon SDBY'li hastalar arasında da oldukça yaygındır. HD hastalarında yapılan çalışmalar (112,126,129,131) kan basıncı ve İMK arasında ilişki tespit edememiştir. Bu çalışmada da daha önceki çalışmalarda olduğu gibi arteriyel hipertansiyon ve İMK arasında ilişki bulunamadı. Bu durum hipertansif HD hastalarının çoğunun uzun süreli anti-hipertansif tedavi almalarına bağlı olabilir. HD hastalarında kan basıncı sıklıkla instabil olduğundan, bu durum arteriyel hipertansiyonun ateroskleroz açısından risk faktörü olmasını bu hasta grubunda engellemektedir (129).

Hiperkolesterolemi ve yüksek LDL düzeyleri ateroskleroz için bilinen risk faktörleridir (125,131). HD hastalarında yapılan çalışmalarda total ve LDL kolesterol ile İMK arasında pozitif korelasyon tespit edilmiştir (130-132). Çalışmamızda ise literatürdeki diğer çalışmalarla tutarlı olarak İMK, total ve LDL kolesterol arasında pozitif korelasyon tespit edildi.

Sonuç olarak ateroskleroza yol açan yaş, artmış total ve LDL kolesterol düzeyleri ile korelasyon gösteren artmış İMK düzeyleri aterosklerozun erken belirteci olarak kullanılabilir.

Endotel kaynaklı nitrik oksit trombosit agregasyonu ve kan basıncının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. NO; L-Arjinin aminoasidinin terminal guanidino nitrojeninin NOS enzimi sayesinde stereospesifik oksidasyonu ile sentezlenmektedir (91). NO'nin sentezi L-Arjinin aminoasidinin guanidino nitrojen atomunun metil-, nitro-, veya diğer kimyasal gruplarla yer değiştirmesiyle inhibe edilmektedir (21).

ADMA; NO sentazın endojen inhibitörü olarak bilinmektedir (21). Dimetilargininler simetrik ve asimetrik moleküller olarak ortaya çıkmaktadır. Bütün dimetilargininler böbrekler aracılığıyla elimine edilmektedir. ADMA %20 oranında böbrekler aracılığıyla elimine edilirken, %80 oranında DDAH enzimi ile sitrülün ve dimetilamine parçalanmaktadır (133,134). Kan damarları, pankreas ve böbrek dokusunda DDAH varlığı tespit edilmiştir (135).

cGMP; NO'nun kardiyovasküler sistemdeki etkilerine aracılık etmektedir (91). Plazmada NOS aktivitesi ADMA ve arjinin aminoasiti arasındaki ilişkiye bağlıdır. Böbrek yetmezlikli hastaların plazmasında dimetilarjininler birikmektedir ve arjinin/ADMA ve arjinin/SDMA oranları bu hasta grubunda azalmış olarak tespit edilmektedir (29,134). Arjinin ve ADMA hücrelerin içine insan katyonik aminoasit taşıyıcısı (hCAT-2B) aracılığıyla taşınmaktadır (136). Bu nedenle, dimetilarjininler ve arjinin arasında 'yarış fenomeni' olgusu tanımlanmıştır (137). ADMA'nın plazma düzeyleri ortalama arteriyel kan basıncıyla korelidir ve bu nedenle böbrek yetmezlikli hastalarda ADMA kan basıncını yükseltebilmektedir (41).

Malnütrisyon SDBY'li hastalar arasında oldukça sık görülen bir problemdir. Malnütrisyon ve düşük aminoasit konsantrasyonları SDBY'li hastaların sağ kalımında çok güçlü bir belirteç olarak görülmektedir. Malnütrisyon da özellikle hücre içi arjinin konsantrasyonları, arjinin ve ADMA arasındaki oran KBY'li hastalarda azalmıştır (138).

Çalışmamızda, SDBY hastalarında ve sağlıklı kişilerde ADMA, SDMA, arjinin, NO ölçümü yapıldı. ADMA değerleri HD hastalarında ortalama 2.97 ± 1.03 $\mu\text{mol/l}$; PD hastalarında ortalama 1.66 ± 0.48 $\mu\text{mol/l}$ ve sağlıklı kişilerde ortalama 1.31 ± 0.43 $\mu\text{mol/l}$ şeklindeydi. SDMA değerleri ise HD hasta grubunda ortalama 3.77 ± 0.71 $\mu\text{mol/l}$; PD hasta grubunda ortalama 1.62 ± 0.15 $\mu\text{mol/l}$ ve sağlıklı kişilerde ortalama 1.43 ± 0.15 $\mu\text{mol/l}$ şeklindeydi. Bu değerler incelendiğinde, hem HD ($p < 0.0001$) hem de PD ($p < 0.05$) hasta grubu sağlıklı kişilerle karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha yüksek ADMA ve SDMA değerlerine sahipti. Hasta grupları kendi aralarında karşılaştırıldıklarında HD grubunda hem ADMA hem de SDMA değerleri PD grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti ($p < 0.0001$).

Çalışmamızda arjinin değerleri ise HD hasta grubunda PD hasta grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü ($p < 0.05$). Hasta grupları ve sağlıklı kişiler arasında arjinin düzeyleri açısından anlamlı bir ilişki tespit edilemedi. Yine HD hasta grubunda NO düzeyleri PD hasta grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti ($p < 0.0001$). PD hasta grubunda NO düzeyleri sağlıklı grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşüktü ($p < 0.001$).

Ayrıca SDBY (HD+PD) grubunda ADMA ve İMK arasında pozitif korelasyon tespit edildi ($r=0.213$, $p=0.047$).

Kielstein ve ark. (36) SDBY hastalarında plazma ADMA, SDMA, arjinin düzeylerini ve bu parametrelerin NO oluşumuna etkilerini ayrıca hemodiyaliz ve periton diyalizi tedavilerinin bu parametreler üzerine etkilerini araştırmak için 43 HD, 37 PD ve böbrek fonksiyonları normal olan 37 sağlıklı kişide çalışma yapmışlardır. Çalışmalarının sonucunda plazma ADMA ve SDMA düzeylerinin sağlıklı gruba göre anlamlı olarak yüksek olduğunu bulmuşlardır. Bizim çalışmamızdaki sonuçlarda bu çalışmayla örtüşmektedir.

Arjinin konsantrasyonları açısından ise sağlıklılar ve HD grubu arasında anlamlı bir fark tespit etmemişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları da Kielstein ve ark. sonuçları ile örtüşmektedir. Aynı çalışmada HD ve PD grupları arasında arjinin konsantrasyonları açısından anlamlı bir fark bulunmazken, bu çalışmamızda HD grubunda arjinin konsantrasyonları PD grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Kielstein çalışmasında SDBY hastalarını ateroskleroza bulunan ve bulunmayan olarak iki gruba ayırıp arjinin düzeylerini incelemiştir. Bu inceleme sonucunda ateroskleroza bulunan SDBY hastalarında arjinin düzeylerinin ateroskleroza bulunmayan SDBY hastalarına göre daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Closs ve ark. hem ADMA hem de SDMA'nın hCAT-2B reseptörlerine yüksek affinite gösterdiklerini ve böylece arjinin uptakeini inhibe ederek hücrelerden arjinin atılımını artırdıklarını göstermişlerdir (136). Fleck ve ark. KBY'li hastalarda yaptıkları çalışmada arjininin plazma konsantrasyonu böbrek yetmezliğinin derecesiyle de değişebildiğini göstermişlerdir (137). Sonuç olarak arjinin düzeylerindeki bu farklılıklar hastaların kullandıkları periton diyaliz solüsyonlarına, hastalardaki mevcut ateroskleroz durumuna, hastalardaki böbrek yetmezliğinin derecesine ve hastaların diyetSEL farklılıklarına bağlı olabilir, çünkü insanlarda arjinin düzeyleri diyetle oldukça yakından ilişkilidir.

Kielstein ve ark. çalışmalarında (36) PD grubunda ADMA düzeyleri açısından sağlıklı gruba anlamlı bir fark olmamasına rağmen HD grubunda ADMA düzeyleri daha yüksek bulmuşlardır. Bu çalışmamızda ise PD grubunda ADMA düzeyleri sağlıklı gruba göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bu durumda ADMA'nın ancak %20'sinin böbreklerden elimine edildiği ve %80'inin DDAH

enzimi aracılığıyla metabolize edildiği ve bu enzimin etkisinin kişisel ve etnik farklılıklar gösterebileceği unutulmamalıdır. Kielstein ve ark. çalışması ile bu çalışmamızın ortak noktası PD grubunda SDMA düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmasıdır .

Kielstein ve ark. (36) çalışmalarında NO düzeylerini HD grubunda PD ve sağlıklı gruba göre anlamlı olarak düşük bulmuşlardır. Bu çalışmamızda ise Kielstein'ın çalışmasının tersine NO düzeyleri HD grubunda PD gruba göre anlamlı olarak yüksek; PD grubunda ise sağlıklı gruba göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Schmidt ve ark. (139) yaptıkları çalışmada KBY'de NO üretiminin azaldığını göstermişlerdir. Nakamura ve ark. yaptıkları çalışmada deneysel böbrek yetmezliğinde NO salınımının azaldığını göstermişlerdir (140). Vallance ve ark. KBY'de artmış dimetilarjininlerin NO sentezini inhibe ettiğini ve bunun sonucunda da hipertansiyon geliştiğini göstermişlerdir (21). Ayrıca SDBY hastalarında oksidatif stres artmıştır. Artmış oksidatif stres çeşitli mekanizmalarla NO düzeylerini düşürebilmektedir. Örneğin süperoksit hızla NO ile reaksiyona girerek peroksinitrit anyonunun oluşmasına ve bu durum NO'nun biyoaktivitesinin kaybına yol açabilmektedir (141). NO oldukça labil bir molekül olup gerçek düzeylerinin tespiti oldukça zor olmaktadır. Literatürlerdeki farklı NO düzeylerinin tespiti altında yatan en önemli nedenlerden birisi de metodolojik farklılıklardır. Aynı zamanda hem artan hem de azalan NO düzeylerinin her ikisinin de artmış hasara neden olabileceği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.

Literatüre daha geniş olarak baktığımızda birçok araştırmacı üremik hastalarda dimetilarjininlerin (ADMA, SDMA) konsantrasyonlarının arttığını göstermişlerdir (21,29,35,36,134,139,142,143). Çalışmamızdaki ADMA ve SDMA değerleri bu çalışmalardaki sonuçlarla uyumludur.

Bu çalışmada, kontrol grubunda GG, GA ve AA genotip sıklığı sırası ile %46.7, %32.6 ve %20.7; HD grubunda bu oranlar sırası ile %39.2, %40 ve %20.8; PD grubunda ise sırası ile %39.1, %34.4 ve %26.6 olarak bulundu. Hasta ve kontrol grupları eNOS gen sıklıkları açısından karşılaştırıldığında genotip dağılımlarının istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği saptandı ($\chi^2=2.52$, $p=0.64$).

Kontrol grubunda G alleli %37.1, A alleli %62.9 oranlarında bulunurken HD grubunda G alleli %41.2, A alleli %58.8 ve PD grubunda G alleli %44.8, A alleli

%55.2 oranında bulundu. Üç grupta da en sık bulunan allel A alleli olup A ve G allel sıklığı bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($\chi^2=1.35$, $p=0.5$).

Üremik çevre tarafından oluşturulan arteriyel hasarı a raştırmak için SDBY'li hastalarda ateroskleroz oluşumuna ve ilerlemesine yol açan sebeplerle genetik faktörler arasındaki ilişkiyi incelemek oldukça önemlidir. Bu amaçla bu çalışmada KBY (HD+PD)'li hastalarda ADMA, NO ve İMK'nın eNOS Glu298Asp gen polimorfizmiyle olan ilişkisi incelenerek bunlar sağlıklı kontrollerle kıyaslandı.

eNOS geni oldukça polimorfik bir gen olup bu gende çeşitli polimorfizmler tanımlanmıştır. eNOS geninin ekson 7 bölgesinde 894. pozisyondaki guanin bazının timin bazına dönüşmesi bu bölgede 298. kodonda glutamat aminoasiti yerine aspartat aminoasitinin üretilmesine neden olmaktadır (92).

Japon popülasyonunda eNOS Glu298Asp gen polimorfizminin esansiyel hipertansiyon, vazospastik angina, miyokard enfarktüsü ve nefropatili hastalarda kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiş (144-146) olmasına rağmen farklı popülasyonlarda yapılan bazı çalışmalar bu bulguları desteklememektedir (147-149). Karvonen ve ark. yaptıkları çalışmalarında genetik olarak homojen kabul edilebileceğini söyledikleri Fin popülasyonunda eNOS Glu298Asp gen polimorfizmiyle, kan basıncı, sol ventrikül hacmi ve karotis arter aterosklerozu arasında anlamlı bir ilişki olmadığını göstermişlerdir (150).

eNOS gen polimorfizmleriyle ilgili Türkiye'de yapılan çalışmaları incelediğimizde; Afrasyap ve ark. (114) anjiyografik olarak tanısı konmuş 250 koroner arter hastasında eNOS Glu298Asp gen polimorfizmi ve NO düzeylerini 150 sağlıklı kontrolle karşılaştırarak incelemişlerdir. Çalışmaları sonucunda eNOS Glu298Asp gen polimorfizminin genotip sıklığı, allel frekansları ve NO düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki bulamamışlardır. Güldiken ve ark. (151) 146 iskemik infarktüs hasta ve 133 sağlıklı kontrolle yaptıkları çalışmada eNOS Glu298Asp gen polimorfizminin genotip sıklığı ve allel frekansları açısından iskemik infarktüs hastalar ve sağlıklı kontroller arasında anlamlı bir fark bulamamışlardır. Berdeli ve ark. (152) 115 prematür koroner arter hastalığı olan kişi ve 83 sağlıklı kontrolle yaptıkları çalışmada eNOS Glu298Asp gen polimorfizminin Asp/Asp genotipinin prematür koroner arter hastalığı olan kişilerde sağlıklı kontrollerden anlamlı olarak sık

görüldüğünü tespit etmişlerdir. Yılmaz G. ve ark. 106 KAH ve 89 sağlıklı kontrolle yaptıkları çalışmalarında eNOS intron 4 VNTR gen polimorfizmi ve NO düzeyleri araştırılmış ve eNOS intron 4 VNTR gen polimorfizmi nin genotip ve allel sıklığı açısından KAH ile sağlıklı kontroller arasında anlamlı bir fark bulamamışlardır (153). Bayoğlu B. ve ark. çalışmalarında insüline bağımlı olmayan diabetes mellitusta eNOS Glu298Asp gen polimorfizmi sıklığını 115 tip 2 diyabet hastasını 68 sağlıklı kontrolle kıyaslayarak araştırmışlardır. Sonuç olarak tip 2 diyabet hasta grubu ve sağlıklı kontroller arasında eNOS Glu298Asp gen polimorfizminin genotip sıklıkları ve allel frekansları açısından anlamlı bir fark olmadığını tespit etmişlerdir (154).

Prado ve ark. 52 HD, 22 PD hastası ve 93 sağlıklı kontrol arasında yaptıkları çalışmada diyaliz hastaları ve sağlıklı kontroller arasında eNOS Glu298Asp gen polimorfizminin genotip sıklıkları açısından anlamlı bir fark bulamamışlardır (155). Bu çalışmamızda eNOS Glu298Asp gen polimorfizminin genotip sıklıkları ve allel frekansları açısından SDBY hastaları ve sağlıklı kontroller arasında anlamlı bir fark göstermediği tespit edilmiştir. Ayrıca Türk toplumunda eNOS Glu298Asp gen polimorfizminin değişik hasta gruplarında ve sağlıklı kişilerde çok sık görülmediği yukarıda özetlenen çalışmalardan da anlaşılmaktadır.

Testa ve ark. 261 SDBY hastasında kardiyovasküler mortaliteyi belirlemek için ADMA ile eNOS Glu298Asp gen polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Hastaları ortalama 42 ay boyunca mortalite açısından takip etmişler. Çalışmanın başlangıcında Glu/Glu, Glu/Asp ve Asp/Asp genotipleri arasında ADMA açısından anlamlı bir fark bulamamışlardır ($p>0.05$). 42 aylık takip sonrasında 81 tanesi kardiyovasküler sebeplerden olmak üzere toplam 138 hasta ölmüştür. Sonuç olarak yüksek ADMA düzeylerine sahip olan ve homozigot (Asp/Asp), heterozigot (Glu/Asp) risk alleli taşıyan kişilerde kardiyovasküler olaylar sebebiyle ölüm riskinin bu risk faktörlerinden yalnızca birini taşıyanlara göre daha fazla olduğunu göstermişlerdir (156).

Bilgimiz dahilinde literatürde eNOS Glu298Asp gen polimorfizminin ADMA ve İMK ile ilişkisini bir arada inceleyen araştırma oldukça azdır. Spoto ve ark. (157) 131 SDBY (86 HD ve 45 PD) hastasında eNOS Glu298Asp gen polimorfizmi, ADMA ve İMK düzeylerini incelemişlerdir. Glu/Glu, Glu/Asp ve Asp/Asp

genotipleri arasında ADMA açısından anlamlı bir fark bulmamışlardır ($p>0.05$). Multiple lineer regresyon analiz modelinde İMK'nın eNOS Glu298Asp genotipleri ($r=0.32$, $p<0.001$) ve ADMA ile ($r=0.19$, $p<0.03$) anlamlı olarak ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmamızda İMK ile eNOS Glu298Asp genotipleri arasında anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir ($r=0.14$, $p=0.21$); İMK ile ADMA arasında ise anlamlı bir korelasyon tespit edilmiştir ($r=0.22$, $p<0.05$).

Sonuç olarak gen polimorfizmi çalışmaları çalışmanın yapıldığı topluma özgü olup bu tip çalışmalarda incelenen parametreleri yalnızca araştırılan polimorfizmin tek başına etkilemediğine dikkat edilmelidir. Kişilerin içinde bulundukları çevresel faktörler, kullandıkları ilaçlar, sigara, alkol vb. maddeler araştırılan polimorfizmin etkilediği enzimin fonksiyonlarında değişiklikler yapabilmekte ve farklı sonuçların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir.

5. KAYNAKLAR

1. Akoğlu E, Süleymanlar G. Kronik Böbrek Yetmezliği -Son Dönem Böbrek Yetmezliğinin Tedavisi.Temel İç Hastalıkları. 2. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi 2003; 1298 -1334.
2. Winearls CG. Clinical Evaluation and Manifestations of Chronic Renal Failure. Johnson RJJ.(editor) Comprehensive Clinical Nephrology. 2nd edition. Spain, Mosby Elsevier Limited. 2003,857-871.
3. U.S. Renal Data System, USRDS 2005 Annual Data Report (<http://www.usrds.org/>); 2005.
4. Türk Nefroloji Derneği-2007 Registry Of The Nephrology, Dialysis And Transplantation in Turkey 2007.
5. Daugirdas JT. Second generation logarithmic estimates of single -pool variable volume Kt/V: an analysis of error. J Am Soc Nephrol 1993; 4 (5):1205-1213.
6. Daugirdas JT, Blake GP, Ing TS. Diyaliz El Kitabı. Bozfakıoğlu S (çev. ed.) s.281 -330, Ankara, Güneş Kitabevi, 2003.
7. Levy J, Morgan J, Brown E. Oxford Diyaliz El Kitabı. Uslan I (çev. ed.) s. 262-300, İstanbul, Nobel Kitabevi, 2002.
8. Bloembergen WE. Cardiac disease in chronic uremia: epidemiology. Adv Ren Replace Ther 1997; 4 (3):185-193.
9. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. Am J Kidney Dis 1998; 32:112 -119.
10. Casserly LF, Dember LM. Thrombosis in end-stage renal disease. Semin Dial 2003; 16 (3):245-256.
11. Shoji T, Kimoto E, Yamada A, Emoto M, Kawagishi T, Tabata T,et al. Elevated plasma free apo(a) levels in hemodialysis patients. Nephron 2000; 86 (3):389-390.

12. Kaysen GA. The microinflammatory state in uremia: causes and potential consequences. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12 (7):1549-1557.
13. Bologa RM, Levine DM, Parker TS, Cheigh JS, Serur D, Stenzel KH, et al. Interleukin -6 predicts hypoalbuminemia, hypocholesterolemia, and mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1998; 32 (1):107-114.
14. Thomas JP, Geiger PG, Girotti AW. Lethal damage to endothelial cells by oxidized low density lipoprotein: role of selenoperoxidases in cytoprotection against lipid hydroperoxide- and iron-mediated reactions. *J Lipid Res* 1993; 34 (3):479-490.
15. Boaz M, Matas Z, Biro A, Katzir Z, Green M, Fainaru M, et al. Comparison of hemostatic factors and serum malondialdehyde as predictive factors for cardiovascular disease in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1999; 34 (3):438-444.
16. Sagripanti A, Cupisti A, Baicchi U, Ferdeghini M, Morelli E, Barsotti G. Plasma parameters of the prothrombotic state in chronic uremia. *Nephron* 1993; 63 (3):273-278.
17. Guerin AP, London GM, Marchais SJ, Metivier F. Arterial stiffening and vascular calcifications in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15 (7):1014-1021.
18. Vallance P, Leiper J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine: dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(6):1023-1030.
19. Ueda S, Yamagishi S, Kaida Y, Okuda S. Asymmetric dimethylarginine may be a missing link between cardiovascular disease and chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton)* 2007; 12(6):582-590.
20. Hibbs JB, Vavrin Z, Taintor RR. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J Immunol* 1987; 138(2):550-565.
21. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339(8793):572 -575.

22. Tran CT, Fox MF, Vallance P, Leiper JM. Chromosomal localization, gene structure, and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins. *Genomics* 2000; 68(1):101-105.
23. Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, MacAllister R, et al. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(8):1455-1459.
24. Zoccali C, Kielstein JT. Asymmetric dimethylarginine: a new player in the pathogenesis of renal disease? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006; 15(3):314-320.
25. Cross JM, Donald AE, Kharbanda R, Deanfield JE, Woolfson RG, MacAllister RJ. Acute administration of L-arginine does not improve arterial endothelial function in chronic renal failure. *Kidney Int* 2001; 60(6):2318-2323.
26. Zoccali C, Bode-Boger S, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino L, et al. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet* 2001; 358(9299):2113-2117.
27. Hand MF, Haynes WG, Webb DJ. Hemodialysis and L-arginine, but not D-arginine, correct renal failure-associated endothelial dysfunction. *Kidney Int* 1998; 53(4):1068-1077.
28. McDermott JR. Studies on the catabolism of Ng-methylarginine, Ng, Ng-dimethylarginine and Ng, Ng-dimethylarginine in the rabbit. *Biochem J* 1976; 154(1):179-184.
29. Kielstein JT, Boger RH, Bode-Boger SM, Frolich JC, Haller H, Ritz E, et al. Marked increase of asymmetric dimethylarginine in patients with incipient primary chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(1):170-176.
30. Fliser D, Kielstein JT, Haller H, Bode-Boger SM. Asymmetric dimethylarginine: a cardiovascular risk factor in renal disease? *Kidney Int Suppl* 2003(84):S37-40.
31. Okubo K, Hayashi K, Wakino S, Matsuda H, Kubota E, Honda M, et al. Role of asymmetrical dimethylarginine in renal microvascular endothelial dysfunction in chronic renal failure with hypertension. *Hypertens Res* 2005; 28(2):181-189.

32. Boger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, et al. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res* 2000; 87(2):99-105
33. Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, et al. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 2002; 106(8):987 -992.
34. Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G. Novel cardiovascular risk factors in end -stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15 Suppl 1:S77 -80.
35. MacAllister RJ, Rambašek MH, Vallance P, Williams D, Hoffmann KH, Ritz E. Concentration of dimethyl-L-arginine in the plasma of patients with end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11(12):2449 -2452.
36. Kielstein JT, Boger RH, Bode-Boger SM, Schaffer J, Barbey M, Koch KM, et al. Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end -stage renal disease: relationship to treatment method and atherosclerotic disease. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10(3):594-600.
37. Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; 98(18):1842 -1847.
38. Boger RH, Bode-Boger SM, Sydow K, Heistad DD, Lentz SR. Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(6):1557-1564.
39. Goonasekera CD, Rees DD, Woolard P, Frend A, Shah V, Dillon MJ. Nitric oxide synthase inhibitors and hypertension in children and adolescents. *J Hypertens* 1997; 15(8):901 -909.
40. Xiong Y, Fu YF, Fu SH, Zhou HH. Elevated levels of the serum endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and metabolic control in rats with streptozotocin -induced diabetes. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003; 42(2):191-196.

41. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, et al. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 1999; 99(9):1141 - 1146.
42. Zoccali C, Benedetto FA, Maas R, Mallamaci F, Tripepi G, Malatino LS, et al. Asymmetric dimethylarginine, C-reactive protein, and carotid intima-media thickness in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(2):490 -496.
43. Cross JM, Donald A, Vallance PJ, Deanfield JE, Woolfson RG, MacAllister RJ. Dialysis improves endothelial function in humans. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16(9):1823 -1829.
44. Thum T, Tsikas D, Stein S, Schultheiss M, Eigenthaler M, Anker SD, et al. Suppression of endothelial progenitor cells in human coronary artery disease by the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46(9):1693 -1701.
45. Dinneen SF, Gerstein HC. The association of microalbuminuria and mortality in non-insulin-dependent diabetes mellitus. A systematic overview of the literature. *Arch Intern Med* 1997; 157(13):1413-1418.
46. Matsumoto Y, Ueda S, Yamagishi S, Matsuguma K, Shibata R, Fukami K, et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase prevents progression of renal dysfunction by inhibiting loss of peritubular capillaries and tubulointerstitial fibrosis in a rat model of chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18(5):1525 -1533.
47. Arnlov J, Evans JC, Meigs JB, Wang TJ, Fox CS, Levy D, et al. Low-grade albuminuria and incidence of cardiovascular disease events in nonhypertensive and nondiabetic individuals: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2005; 112(7):969 -975.
48. Stehouwer CD, Smulders YM. Microalbuminuria and risk for cardiovascular disease: Analysis of potential mechanisms. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(8):2106 -2111.
49. Sharma M, McCarthy ET, Savin VJ, Lianos EA. Nitric oxide preserves the glomerular protein permeability barrier by antagonizing superoxide. *Kidney Int* 2005; 68(6):2735-2744.

50. Caglar K, Yilmaz MI, Sonmez A, Cakir E, Kaya A, Acikel C, et al. ADMA, proteinuria, and insulin resistance in non-diabetic stage I chronic kidney disease. *Kidney Int* 2006; 70(4):781 - 787.
51. Marliiss EB, Chevalier S, Gougeon R, Morais JA, Lamarche M, Adegoke OA, et al. Elevations of plasma methylarginines in obesity and ageing are related to insulin sensitivity and rates of protein turnover. *Diabetologia* 2006; 49(2):351 -359.
52. Tojo A, Welch WJ, Bremer V, Kimoto M, Kimura K, Omata M, et al. Colocalization of demethylating enzymes and NOS and functional effects of methylarginines in rat kidney. *Kidney Int* 1997; 52(6):1593-1601.
53. Paiva H, Lehtimäki T, Laakso J, Ruukonen I, Rantalaiho V, Wirta O, et al. Plasma concentrations of asymmetric-dimethyl-arginine in type 2 diabetes associate with glycemic control and glomerular filtration rate but not with risk factors of vasculopathy. *Metabolism* 2003; 52(3):303-307.
54. Stuhlinger MC, Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin TL, Cooke JP, et al. Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *Jama* 2002; 287(11):1420-1426.
55. Tarnow L, Hovind P, Teerlink T, Stehouwer CD, Parving HH. Elevated plasma asymmetric dimethylarginine as a marker of cardiovascular morbidity in early diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27(3):765 -769.
56. Sydow K, Hornig B, Arakawa N, Bode-Boger SM, Tsikas D, Munzel T, et al. Endothelial dysfunction in patients with peripheral arterial disease and chronic hyperhomocysteinemia: potential role of ADMA. *Vasc Med* 2004; 9(2):93 -101.
57. Krzyzanowska K, Mittermayer F, Kopp HP, Wolzt M, Schernthaner G. Weight loss reduces circulating asymmetrical dimethylarginine concentrations in morbidly obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(12):6277 -6281.
58. Eid HM, Arnesen H, Hjerkin EM, Lyberg T, Seljeflot I. Relationship between obesity, smoking, and the endogenous nitric oxide synthase inhibitor, asymmetric dimethylarginine. *Metabolism* 2004; 53(12):1574-1579.

59. Saitoh M, Osanai T, Kamada T, Matsunaga T, Ishizaka H, Hanada H, et al. High plasma level of asymmetric dimethylarginine in patients with acutely exacerbated congestive heart failure: role in reduction of plasma nitric oxide level. *Heart Vessels* 2003; 18(4):177-182.
60. Holden DP, Fickling SA, Whitley GS, Nussey SS. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine, a natural inhibitor of nitric oxide synthase, in normal pregnancy and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178(3):551-556.
61. Savvidou MD, Hingorani AD, Tsikas D, Frolich JC, Vallance P, Nicolaides KH. Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia. *Lancet* 2003; 361(9368):1511-1517.
62. Gorenflo M, Zheng C, Werle E, Fiehn W, Ulmer HE. Plasma levels of asymmetrical dimethyl-L-arginine in patients with congenital heart disease and pulmonary hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 37(4):489-492.
63. Arrigoni FI, Vallance P, Haworth SG, Leiper JM. Metabolism of asymmetric dimethylarginines is regulated in the lung developmentally and with pulmonary hypertension induced by hypobaric hypoxia. *Circulation* 2003; 107(8):1195-1201.
64. Millatt LJ, Whitley GS, Li D, Leiper JM, Siragy HM, Carey RM, et al. Evidence for dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase I in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2003; 108(12):1493-1498.
65. Petros A, Lamb G, Leone A, Moncada S, Bennett D, Vallance P. Effects of a nitric oxide synthase inhibitor in humans with septic shock. *Cardiovasc Res* 1994; 28(1):34-39.
66. Boger RH, Bode-Boger SM, Thiele W, Creutzig A, Alexander K, Frolich JC. Restoring vascular nitric oxide formation by L-arginine improves the symptoms of intermittent claudication in patients with peripheral arterial occlusive disease. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32(5):1336-1344.
67. Holden DP, Cartwright JE, Nussey SS, Whitley GS. Estrogen stimulates dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity and the metabolism of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2003; 108(13):1575-1580.

68. Achan V, Tran CT, Arrigoni F, Whitley GS, Leiper JM, Vallance P. all -trans-Retinoic acid increases nitric oxide synthesis by endothelial cells: a role for the induction of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circ Res* 2002; 90(7):764 -769.
69. Vallance P, Leiper J. Blocking NO synthesis: how, where and why? *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1(12):939-950.
70. Par WW. On Certain Genetic and Metabolic Risk Factors For Carotid Stenosis and Stroke. Linköping: Linköping University Faculty of Health Sciences, Department of Medicine and Care, 2002
71. Gruetter CA, Barry BK, McNamara DB, Gruetter DY, Kadowitz PJ, Ignarro L. Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine. *J Cyclic Nucleotide Res* 1979; 5(3):211 -224.
72. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987; 2(8567):1057-1058.
73. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83(5):1774-1777.
74. Dusting GJ. Nitric oxide in cardiovascular disorders. *J Vasc Res* 1995; 32(3):143 -161.
75. Dusting GJ. Nitric oxide in coronary artery disease: roles in atherosclerosis, myocardial reperfusion and heart failure. *Exs* 1996; 76:33 -55.
76. Büyükaşar K. Nitrikoksitin fizyolojik ve fizyopatolojik olaylardaki rolü, *Türk Farmakoloji Derneği Mersin Seminer Özetleri*, 2005:2 -19.
77. Alvarez R, Gonzalez P, Batalla A, Reguero JR, Iglesias -Cubero G, et al. Association between the NOS3 (-786 T/C) and the ACE (I/D) DNA genotypes and early coronary artery disease. *Nitric Oxide* 2001; 5(4):343-348.

78. 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. *Am J Hypertens* 1998; 11:125-128.
79. Powell JT, Higman DJ. Smoking, nitric oxide and the endothelium. *Br J Surg* 1994; 81(6):785-787.
80. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357:593-615.
81. Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol* 2003; 199(1):8-17.
82. Stuehr DJ, Griffith OW. Mammalian nitric oxide synthases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1992; 65:287-346.
83. Bruhwylter J, Chleide E, Liegeois JF, Carreer F. Nitric oxide: a new messenger in the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 1993; 17(4):373-384.
84. Cekmen MB, Turkoz Y, Aygun AD, Gozukara EM. Nitric oxide (no[•]) , characteristics. *T Klin*, 2001;10:226-235.
85. Aladağ MA, Özerol İH. Nitrik oksit ve nörofizyopatolojik etkileri. *T Klin*, 2000;20:107 -111.
86. Cooke JP, Dzau VJ. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med* 1997; 48:489-509.
87. Sethi S, Dikshit M. Modulation of polymorphonuclear leukocytes function by nitric oxide. *Thromb Res* 2000; 100(3):223-247.
88. Blaise GA, Gauvin D, Gangal M, Authier S. Nitric oxide, cell signaling and cell death. *Toxicology* 2005; 208(2):177-192.
89. Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 1997; 100(10):2417-2423.

90. Alaşehirli B. Nitrik Oksit Sentaz Gen Polimorfizm leri ve Renal Hastalıklar. Türk Farmakoloji Derneği Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel Etkileşme Seminerleri Programı Kitabı, 2005:2-12.
91. Moncada S. The L-arginine: nitric oxide pathway, cellular transduction and immunological roles. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res 1993; 28:97 -99.
92. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. J Biol Chem 1993; 268(23):17478-17488.
93. Bivalacqua TJ, Champion HC, Hellstrom WJ. Implications of nitric oxide synthase isoforms in the pathophysiology of Peyronie's disease. Int J Impot Res 2002; 14(5):345 -352.
94. Hoffmann A, Gloe T, Pohl U. Hypoxia-induced upregulation of eNOS gene expression is redox-sensitive: a comparison between hypoxia and inhibitors of cell metabolism. J Cell Physiol 2001; 188(1):33-44.
95. Ruehlmann DO, Mann GE. Rapid non-genomic vasodilator actions of oestrogens and sex steroids. Curr Med Chem 2000; 7(5):533-541.
96. Hemmrich K. Antisense Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase Expression -Does it Make Sense? Düsseldorf: Heinrich-Heine University Medical Faculty, Department of Molecular Medicine, 2005.
97. Stangl K, Cascorbi I, Laule M, Klein T, Stangl V, Rost S, et al. High CA repeat numbers in intron 13 of the endothelial nitric oxide synthase gene and increased risk of coronary artery disease. Pharmacogenetics 2000; 10(2):133-140.
98. Zanchi A, Moczulski DK, Hanna LS, Wantman M, Warram JH, Krolewski AS. Risk of advanced diabetic nephropathy in type 1 diabetes is associated with endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. Kidney Int 2000; 57(2):405 -413.

99. Tesauro M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary 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 U S A* 2000; 97(6):2832-2835.
100. Suzuki H, Nagase S, Kikuchi S, Wang Y, Koyama A. Association of a missense Glu298Asp mutation of the endothelial nitric oxide synthase gene with end stage renal disease. *Clin Chem* 2000; 46(11):1858-1860.
101. Persu A, Stoenoiu MS, Messiaen T, Davila S, Robino C, El -Khattabi O, et al. Modifier effect of ENOS in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet* 2002; 11(3):229-241.
102. Nagase S, Suzuki H, Wang Y, Kikuchi S, Hirayama A, Ueda A, et al. Association of eNOS gene polymorphisms with end stage renal diseases. *Mol Cell Biochem* 2003; 244(1-2):113-118.
103. Buraczynska M, Ksiazek P, Zaluska W, Nowicka T, Ksiazek A. Endothelial nitric oxide synthase gene intron 4 polymorphism in patients with end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19(9):2302-2306.
104. Stratta P, Bermond F, Guarrera S, Canavese C, Carturan S, Dall'Omo A, et al. Interaction between gene polymorphisms of nitric oxide synthase and renin-angiotensin system in the progression of membranous glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19(3):587-595.
105. Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W, Jr., Richardson M, et al. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb* 1992; 12(1):120-134.
106. Chambless LE, Heiss G, Folsom AR, Rosamond W, Szklo M, Sharrett AR, et al. Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, 1987-1993. *Am J Epidemiol* 1997; 146(6):483-494.

107. O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson SK, Jr. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. N Engl J Med 1999; 340(1):14-22.
108. Howard G, Sharrett AR, Heiss G, Evans GW, Chambless LE, Riley WA, et al. Carotid artery intimal-medial thickness distribution in general populations as evaluated by B-mode ultrasound. ARIC Investigators. Stroke 1993; 24(9):1297-1304.
109. Urbina EM, Srinivasan SR, Tang R, Bond MG, Kie ltyka L, Berenson GS. Impact of multiple coronary risk factors on the intima-media thickness of different segments of carotid artery in healthy young adults (The Bogalusa Heart Study). Am J Cardiol 2002; 90(9):953-958.
110. D'Agostino RB, Jr., Burke G, O'Leary D, Rewers M, Selby J, Savage PJ, et al. Ethnic differences in carotid wall thickness. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study. Stroke 1996; 27(10):1744-1749.
111. Devine PJ, Carlson DW, Taylor AJ. Clinical value of carotid intima-media thickness testing. J Nucl Cardiol 2006; 13(5):710-718.
112. Hojs R. Carotid intima-media thickness and plaques in hemodialysis patients. Artif Organs 2000; 24(9):691-695.
113. Savage T, Clarke AL, Giles M, Tomson CR, Raine AE. Calcified plaque is common in the carotid and femoral arteries of dialysis patients without clinical vascular disease. Nephrol Dial Transplant 1998; 13(8):2004-2012.
114. Afrasyap L, Ozturk G. NO level and endothelial NO synthase gene polymorphism (Glu298Asp) in the patients with coronary artery disease from the Turkish population. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2004; 36(10):661-666.
115. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. Clin Chem 1990; 36(8 Pt 1):1440-1443.
116. Vural A. Kronik böbrek yetmezliği ve tedavisi. İçinde: Koçer İH ES, Baykal Y (eds) , İç Hastalıkları Günleri III. GATA Basımevi, Ankara 2002; 339-358.

117. Locatelli F, Marcelli D, Conte F, D'Amico M, Del Vecchio L, Limido A, et al. Cardiovascular disease in chronic renal failure: the challenge continues. Registro Lombardo Dialisi e Trapianto. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15 Suppl 5:69 -80.
118. Mitsnefes MM, Daniels SR, Schwartz SM, Meyer RA, Khoury P, Strife CF. Severe left ventricular hypertrophy in pediatric dialysis: prevalence and predictors. *Pediatr Nephrol* 2000; 14(10-11):898-902.
119. Ma KW, Greene EL, Raij L. Cardiovascular risk factors in chronic renal failure and hemodialysis populations. *Am J Kidney Dis* 1992; 19(6):505 -513.
120. Baigent C, Burbury K, Wheeler D. Premature cardiovascular disease in chronic renal failure. *Lancet* 2000; 356(9224):147-152.
121. Kronenberg F, Kuen E, Ritz E, Junker R, Konig P, Kraatz G, et al. Lipoprotein(a) serum concentrations and apolipoprotein(a) phenotypes in mild and moderate renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11(1):105-115.
122. Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int* 1999; 55(2):648 -658.
123. Zweibel WJ. High resolution B-mode and duplex carotid sonography. In: Zweibel WJ (ed.). *Introduction to vascular sonography*. New York, Grune and Stratton, 1982: 103 –109.
124. Belcaro G, Barsotti A, Nicolaidis AN. "Ultrasonic biopsy" --a non-invasive screening technique to evaluate the cardiovascular risk and to follow up the progression and the regression of arteriosclerosis. *Vasa* 1991; 20(1):40 -50.
125. Salonen R, Seppanen K, Rauramaa R, Salonen JT. Prevalence of carotid atherosclerosis and serum cholesterol levels in eastern Finland. *Arteriosclerosis* 1988; 8(6):788 -792.
126. London GM, Guerin AP, Marchais SJ, Pannier B, Safar ME, Day M, et al. Cardiac and arterial interactions in end-stage renal disease. *Kidney Int* 1996; 50(2):600 -608.

127. Craven TE, Ryu JE, Espeland MA, Kahl FR, McKinney WM, Toole JF, et al. Evaluation of the associations between carotid artery atherosclerosis and coronary artery stenosis. A case - control study. *Circulation* 1990; 82(4):1230 -1242.
128. Salonen R, Salonen JT. Determinants of carotid intima-media thickness: a population-based ultrasonography study in eastern Finnish men. *J Intern Med* 1991; 229(3):225 -231.
129. Kawagishi T, Nishizawa Y, Konishi T, Kawasaki K, Emoto M, Shoji T, et al. High - resolution B-mode ultrasonography in evaluation of atherosclerosis in uremia. *Kidney Int* 1995; 48(3):820-826.
130. Bevc S, Hojs R, Ekart R, Hojs-Fabjan T. Atherosclerosis in hemodialysis patients: traditional and nontraditional risk factors. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat* 2006; 15 (4):151-157.
131. Burdick L, Periti M, Salvaggio A, Bertoli S, Mangiarotti R, Castagnone D, et al. Relation between carotid artery atherosclerosis and time on dialysis. A non -invasive study in vivo. *Clin Nephrol* 1994; 42(2):121-126.
132. Wang PW, Liou CW, Wang ST, Eng HL, Liu RT, Tung SC, et al. Relative impact of low - density lipoprotein-cholesterol concentration and insulin resistance on carotid wall thickening in nondiabetic, normotensive volunteers. *Metabolism* 2002; 51(2):255 -259.
133. Boger RH, Bode-Boger SM. Asymmetric dimethylarginine, derangements of the endothelial nitric oxide synthase pathway, and cardiovascular diseases. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26(5):539-545.
134. Nijveldt RJ, Van Leeuwen PA, Van Guldener C, Stehouwer CD, Rauwerda JA, Teerlink T. Net renal extraction of asymmetrical (ADMA) and symmetrical (SDMA) dimethylarginine in fasting humans. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17(11):1999 -2002.
135. Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 1999; 99(24):3092 -3095.

136. Closs EI, Basha FZ, Habermeier A, Forstermann U. Interference of L -arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y+ carrier hCAT -2B. *Nitric Oxide* 1997; 1(1):65-73.
137. Fleck C, Schweitzer F, Karge E, Busch M, Stein G. Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in patients with chronic kidney diseases. *Clin Chim Acta* 2003; 336(1-2):1-12.
138. Ritz E, Vallance P, Nowicki M. The effect of malnutrition on cardiovascular mortality in dialysis patients: is L-arginine the answer? *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9(2):129 -130.
139. Schmidt RJ, Baylis C. Total nitric oxide production is low in patients with chronic renal disease. *Kidney Int* 2000; 58(3):1261 -1266.
140. Nakamura T, Prewitt RL. Effect of NG-monomethyl L-arginine on endothelium-dependent relaxation in arterioles of one-kidney, one clip hypertensive rats. *Hypertension* 1991; 17(6 Pt 2):875-880.
141. Sydow K, Munzel T. ADMA and oxidative stress. *Atheroscler Suppl* 2003; 4(4):41 -51.
142. Al Banchaabouchi M, Marescau B, Possemiers I, D'Hooge R, Levillain O, De Deyn PP. NG, NG-dimethylarginine and NG, NG-dimethylarginine in renal insufficiency. *Pflügers Arch* 2000; 439(5):524-531.
143. Wahbi N, Dalton RN, Turner C, Denton M, Abbs I, Swaminathan R. Dimethylarginines in chronic renal failure. *J Clin Pathol* 2001; 54(6):470 -473.
144. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 1998; 32(1):3-8.
145. Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Sumida H, Sugiyama S, et al. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum Genet* 1998; 103(1):65 -69.

146. Shimasaki Y, Yasue H, Yoshimura M, Nakayama M, Kugiyama K, Ogawa H, et al. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31(7):1506 -1510.
147. Poirier O, Mao C, Mallet C, Nicaud V, Herrmann SM, Evans A, et al. Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene - no consistent association with myocardial infarction in the ECTIM study. *Eur J Clin Invest* 1999; 29(4):284 -290.
148. Markus HS, Ruigrok Y, Ali N, Powell JF. Endothelial nitric oxide synthase exon 7 polymorphism, ischemic cerebrovascular disease, and carotid atheroma. *Stroke* 1998; 29(9):1908-1911.
149. Kato N, Sugiyama T, Morita H, Nabika T, Kurihara H, Yamori Y, et al. Lack of evidence for association between the endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension. *Hypertension* 1999; 33(4):933-936.
150. Karvonen J, Kauma H, Kervinen K, Rantala M, Ikaheimo M, Paivansalo M, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene Glu298Asp polymorphism and blood pressure, left ventricular mass and carotid artery atherosclerosis in a population -based cohort. *J Intern Med* 2002; 251(2):102-110.
151. Guldiken B, Sipahi T, Guldiken S, Ustundag S, Budak M, Turgut N, et al. Glu298Asp polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene in Turkish patients with ischemic stroke. *Mol Biol Rep* 2008.
152. Berdeli A, Sekuri C, Sirri Cam F, Ercan E, Sagcan A, Tengiz I, et al. Association between the eNOS (Glu298Asp) and the RAS genes polymorphisms and premature coronary artery disease in a Turkish population. *Clin Chim Acta* 2005; 351(1 -2):87-94.
153. Yılmaz G. Koroner Arter Hastalarında Ox -LDL, Total Antioksidan Aktivite, Nitrik Oksit ve eNOS Gen Polimorfizminin Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Konya: Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Biyokimya Bölümü, 2006.
154. Bayoğlu B. İnsüline Bağımlı Olmayan Diabetes Mellituslu Hastalarda Endotelial Nitrik Oksit Sentaz Glu298Asp Polimorfizminin Araştırılması. Yüksek lisans tezi, İstanbul: Bilim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Bölümü, 2007.

155. de Prado A, Donate T, Martinez E, Herreros A, Cabezas A, Andres E, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in dialysis patients. *Adv Perit Dial* 2002; 18:18 -20.
156. Testa A, Spoto B, Tripepi G, Mallamaci F, Malatino L, Fatuzz o P, et al. The GLU298ASP variant of nitric oxide synthase interacts with asymmetric dimethyl arginine in determining cardiovascular mortality in patients with end-stage renal disease. *J Hypertens* 2005; 23(10):1825-1830.
157. Spoto B, Benedetto FA, Testa A, Tripepi G, Mallamaci F, Maas R, et al. Atherosclerosis and the Glu298Asp polymorphism of the eNOS gene in white patients with end-stage renal disease. *Am J Hypertens* 2005; 18(12 Pt 1):1549 -1555.

6. ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Sivas'ta doğdum. 1994 yılında Balıkesir Sırrı Yırcalı Anadolu Lisesinden mezun oldum. 1995 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yüksek öğrenimime başladım ve 2001 yılında bu fakülteden mezun oldum. Daha sonra iki yıl Sakarya ili Karasu ve Söğütli ilçelerinde pratisyen hekimlik yaptım. Malatya 7. Ana Jet Üs komutanlığında Tabip Asteğmen olarak askerlik görevimi tamamladım. 2005 yılı Mart ayında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimime başladım. Halen aynı Anabilim Dalında araştırma görevlisi doktor olarak çalışmaktayım.