

1. GİRİŞ

Polikistik over sendromu (PKOS) üreme çağındaki kadınlarda en sık rastlanan endokrin bozukluktur. PKOS, kronik anovulasyon ve hiperandrojenizmle karakterizedir. Üreme çağındaki kadınların %4-8'i arasında bir sıklığa sahip olduğu çeşitli çalışmalarda belirtilmektedir.³⁵ Halen bir sendrom olarak kabul edilmekte ve tek bir tanı kriteri, klinik tanının kesin olarak konulabilmesi için yeterli olmamaktadır.

2003 Rotterdam Konsensus Çalıştayı'nda PKOS tanı kriterleri revize edilmiştir. Oligo-anovulasyon, hiperandrojenizmin klinik ve/veya biyokimyasal bulguları, ve polikistik overler ile diğer etiyolojilerin dışlanması kriterlerinden en az ikisi, PKOS tanısı koymak için gerekmektedir. PKOS, artmış insülin direnci, obezite, tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalık insidansı ile de ilişkilidir.¹⁰⁶

Asimetrik dimetil arginin (ADMA) bir arjinin analogu olup, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS)'ın yarışmalı inhibitörüdür.¹⁹ eNOS' u inhibe ederek nitrik oksit düzeylerini düşürme yanında, ADMA, süperoksit üreterek, nitrik oksiti (NO) ortamdan uzaklaştırabilir.⁴¹ NO bilinen en kuvvetli vazodilatatördür. eNOS'un farmakolojik inhibisyonu veya genetik eksikliğinde endotele bağımlı vazodilatasyon bozulur ve vasküler rezistans artar. ADMA' nın endotelial disfonksiyon ve endotelial disfonksiyon zemininde ortaya çıkan kardiyovasküler hastalıklar için risk faktörü olduğu düşünülmektedir.^{24,33} ADMA'nın vasküler endoteldeki etkilerinin azaltılması ile insülin direnci sendromu, diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar gibi hastalıkların tanı ve tedavisinde yol alınabileceği öne sürülmektedir.²⁴ PKOS ile birlikteliği olan insülin direnci, diyabet, obezite ve kardiyovasküler hastalıklar hemen daima endotel disfonksiyonu ile beraber bulunduğundan ADMA ile PKOS' un ilişkisi önem arz etmektedir. İlişkinin olası varlığı etiyopatolojik zeminde yeni bilgiler sağlayacaktır.

PKOS' lu hastalarda bu konuda çok fazla çalışmanın olmayışı ve PKOS' un genç bir hasta popülasyonunda ileri dönemde ciddi komplikasyonlara neden olabilen bir bozukluk olması nedeniyle bu tez çalışmasında PKOS' ta ADMA ve NO düzeylerinin çalışılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Polikistik Over Sendromu

2.1.1. Tanımı

İlk defa 1953 yılında İrving Stein-Leventhal tarafından tarif edilen polikistik over sendromu (PKOS), tipik olarak kronik anovulasyon ve hiperandrojenizm ile kendini belli eden, sık rastlanan endokrin hastalıklardan olup, heterojen prezentasyonlara sahip sendromdur.⁷² Yakın zamana kadar PKOS’u olan hastalarda asıl sorunun oligomenore, infertilite ve hirsutizm olduğu bilinirken; son zamanlarda, bu hastalarda bir metabolik bozukluk olan insülin direnci ve hiperinsülineminin de patogeneizde, hastaların uzun vadeli prognozu ve yaşam kalitesi üzerinde önemli etkilere sahip olduğu ortaya konmuştur. Bugün için geçerli olan PKOS tanımlaması Amerika Ulusal Sağlık Enstitüsünün 1990 yılındaki PKOS konferansında “modifiye PKOS tanımı” olarak yapılmış olup bu tanım Tablo 1’de sunulmuştur.⁷¹

Chereau, Stein-Leventhal’ den 90 yıl önce, 1844’te, insan overi üzerinde sklerokistik değişiklikler tanımlamıştır. 1958’de luteinizan hormon (LH) düzeyinde yükselme bildirilmiş ve tanı için bir kriter olarak kabul edilmiştir. 1971’de radioimmunoassayin (RIA) bulunması biyokimyasal tanının güvenilirliğini artırmıştır. 1976 yılında LH düzeyleri normal olan PKOS’ luların da olabileceği görülmüştür. 1976’da Kah ve arkadaşlarının ve 1980’de de Burghen ve arkadaşlarının PKOS ile insülin direnci arasındaki ilişkiyi göstermeleri dönüm noktası olarak değerlendirilebilecek bir gelişmedir. İlk olarak Swanson ve arkadaşları PKOS’ lu kadınlarda USG bulgularını tanımlamışlardır.

Tablo 1. Polikistik over sendromu tanı kriterleri⁷¹ (Ulusal Sağlık Enstitüsü, Nisan, 1990)

Majör Kriterler	Minör Kriterler
Menstrüel disfonksiyon	İnsülin direnci
Hiperandrojenizm	Perimenarş dönemde başlangıç
Hiperandrojenizmin klinik bulguları	Artmış LH / FSH oranı
Diğer etiyolojilerin yokluğu	PKOS' un ultrasonografik bulguları
	Hiperandrojenemi ile birlikte görülen menstrüel disfonksiyon

2.1.2. PKOS Görülme Sıklığı

PKOS, üreme çağındaki kadınlar arasında en sık görülen endokrin bozukluklardan biridir. Bu yaş grubundaki sıklığı %4 ile %8 arasında değişir.^{5,35,172} Bu hastaların %50-65'i obezdir, %35-45'inde insülin direnci ve %7-10'unda tip 2 Diabetes Mellitus (DM) mevcuttur. Sekonder amenoresi olan kadınlar arasındaki sıklığı %30, oligomenoresi olanlar arasındaki sıklığı %75 ve hirsutizmi olanlar arasındaki sıklığı %90'dır.⁴ Bu yüksek görülme sıklığı nedeniyle PKOS'un tanısı, etiyolojisi ve tedavisi önem arz etmektedir.

2.1.3. PKOS' un Fiziopatolojisi

Normal bir ovulasyonun oluşabilmesi için, menstrüel sistemlerin tüm katmanları arasında koordinasyon mevcut olması, yani hipotalamo-hipofizer aks, geri bildirim sinyalleri ve over içerisindeki lokal cevapların normal şekilde oluşması gerekmektedir. Ovulasyon kaybı, bu düzeylerin herhangi birindeki faktörlerde normalden sapma halinde gelişebilmektedir. Sonuçta disfonksiyonel bir durum oluşmakta, anovulasyon ve polikistik over tablosu ortaya çıkmaktadır.

PKOS etiyolojisi kesinlik kazanmamıştır. Birçok klinik, laboratuvar ve deneysel veri toplanmasına rağmen etiyoloji aydınlatılamamıştır. Çeşitli organ sistemlerini ilgilendiren birçok mekanizma ileri sürülmüştür; bunlar arasında overler, hipotalamo-pituiter ünite, tiroid, adrenal ve yağ dokusuna ilişkin anomaliler yer almaktadır. PKOS' ta referans laboratuvar bulgularıyla da ilişkili olarak üç majör hipotez ortaya konmuştur.¹⁸⁸

2.1.3.1. LH Hipotezi: LH aşırı salınımı PKOS' un karakteristik özelliklerinden biridir. Normalde LH salınımı pulsatil özellik gösterir. PKOS' lu kadınlarda LH pulslarının hem sıklığı hem de amplitüdü artmıştır. Bu nedenle 24 saatlik salınım da artar. LH sekresyonundaki bu artışın hipotalamik gonadotropin salgılayan hormon (GnRH) salınım sıklığının artmış olmasına bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir. Primer bir nöroendokrin defektle GnRH' ın pulsatil salınımındaki artış LH sekresyonunda artışa neden olur. Ovaryan hiperandrojenizm ve anovulasyon ile sonuçlanan LH salınım frekansının ve amplitütünün aşırı derecede artması sonucu artmış olan intraovaryan androjenler, folliküler olgunlaşmayı inhibe ederek foliküler atrezi ve over kapsülünün kalınlaşmasına neden olur. Artan androjenler periferik yağ dokusunda östrojenlere dönüşür. Progesteron ile karşılanmamış yüksek östrojen, GnRH salınımını artırmak

yoluyla LH' yı artırır. LH artarken FSH artmaz. Ayrıca overlerden sekrete edilen inhibin de FSH' yı baskılar.¹³³

2.1.3.2. Over Hipotezi: Seks steroidleri sentezindeki veya metabolizmasındaki primer bir defekt ovaryan androjenlerin aşırı sekresyonuna ve anovulasyonuna yol açmaktadır.¹⁸⁹ Androjen üstünlüğünü östrojen üstünlüğüne dönüştüremeyen PKOS' ta bazı foliküller atreziye giderken, başka folikül grubu ayrı gelişim sürecine girer. Granüloza hücreleri dejenere olurken, teka hücreleri hiperplaziye uğrar ve over stroması artar. Bu da overdeki androjen sentezini artırır. Yetersiz FSH salınımı nedeniyle yeterli foliküler gelişme olmaz, aromataz enzimi de aktif hale geçemediğinden, östradiol yapılamaz ve sonuçta ovulasyon oluşmaz.¹³³

2.1.3.3. İnsülin Hipotezi: İnsülinin yapım yeri olan pankreasın β - hücrelerinden salınmasından, hedef hücrelerde beklenen etkilerini oluşturuncaya kadar geçecek aşamalarda ortaya çıkabilecek herhangi bir etki azalması insülin direnci olarak değerlendirilebilir. Son yıllarda PKOS etiyopatogenezindeki en önemli aşama, insülin direnci sonucu geliştiği düşünülen, kompensatuvar hiperinsülinemi^{26,50,91,89} ile IGF-1'in bu hastalığın oluşumunda önemli rol oynadığının anlaşılmasıdır.¹²

Hiperinsülinemiden, insülin reseptörlerinin down-regülasyonunun sorumlu olduğu veya bu durumun katkısının olabileceği düşünülmektedir.⁹⁵ Overlerde hem insülin hem de IGF-1 reseptörleri mevcuttur.¹⁵⁵ Ayrıca overde insülin belki de IGF-1 reseptörlerine etki etmektedir. Overlerde insülin ve IGF-1'in hücresel düzeyde LH ve FSH reseptörlerini uyarabileceği ve granüloza hücrelerinde steroid biyosentezini ve desmolaz ile aromataz aktivitelerini artırabileceği gösterilmiştir.⁸⁵

Genel olarak insülin direncinin etiyolojik nedenleri 3 grupta toplanabilir:

1- Anormal hücre salgı ürünleri

- a) Anormal insülin molekülleri
- b) Proinsülin-insülin dönüşümünde patoloji

2- Dolaşımda insülin antagonistlerinin bulunması

- a) İnsüline karsıtı hormonlarda artış
- b) Antiinsülin antikorların pozitif olması
- c) Antiinsülin reseptör antikor pozitifliği

3- Hedef organ etki defekti

- a) İnsülin reseptör defekti
- b) Postreseptör defekti

Bugüne kadar PKOS' lu olgularda insülin reseptör gen mutasyonu¹⁹¹, insülin reseptörlerine karşı otoantikorlar¹⁹⁰ ve postreseptör defektler⁵¹ gösterilmiştir. PKOS'ta insülin aktivitesindeki değişikliklerden sorumlu mekanizmaların; insülin otofosforilasyonundaki anormallikler veya glukoz transportuyla reseptör fosforilasyonu yapan sinyal defektleri ile bunun yanı sıra GLUT4 seviyelerindeki düşüş olduğu gösterilmiştir.^{51,161}

Hiperinsülinemiye neden olan insülinin etkisindeki bozukluk, androjen salınmasında fazlalık ve anovulasyonla sonuçlanır. PKOS olgularının %40-50'si obezdir. Birçok çalışmada insülin direnci ile hiperandrojenizm arasında güçlü bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. Bu ilişki ilk olarak 1921'de Achard ve Thiers' in sakalları olan ve aynı zamanda diyabetik olan bir kadın olguyu yayınlamaları ile dikkat çekmiştir.⁷¹ Androjenlerin, hiperinsülinemiye uyardığı bildirilmektedir. Bununla birlikte GnRH agonisti ile over fonksiyonlarının durdurulduğu çalışmalar da, hiperinsülineminin primer faktör

olduğunu destekler niteliktedir.¹⁵⁶ Bu bulgu insülin etkinliğindeki değişikliğin androjenlerdeki artıştan önce olduğunu göstermektedir. İnsülin ve IGF-1, 17-alfa hidroksilaz ve 17-20 liyaz enzimlerini sürekli olarak pozitif yönde etkileyerek, androstenodion ve testosteron düzeyleri ile östradiol düzeyinin artmasına neden olur. Artmış östradiol ve inhibin, negatif geri bildirim yoluyla FSH'nın azalmasına yol açar. Androstenodion ve testosteron artışı androjen etkilerinin klinikte görülmesine zemin hazırlar. 17 alfa hidroksilaz ve C17-20 liyaz enzimlerinin hız kısıtlayıcı bir enzim olan, mikrozomal sitokrom P450C17 α tarafından katalizlendiği ve bu katalizör yardımıyla bu iki enzimin aktivitesinin arttığı gösterilmiştir.¹³² PKOS' lu hastalarda hiperinsülinemi varlığında P450C17 α aktivitesinin arttığı da gösterilmiştir.^{132,196,206}

PKOS' lu hastalarda deneysel olarak insülin düzeyleri azaltıldığında androjen düzeyleri de azalmaktadır. İnsülin invitro olarak teka hücrelerinin androjen üretimini artırır. PKOS' lu kadınlara insülin verilmesi dolaşımdaki androjenleri artırır⁵⁶, glikoz verilmesi ise hem insülin hem de androjen seviyelerini artırır.¹⁷³

İnsülinin, insan karaciğer hücrelerinden seks hormon bağlayıcı globülin (SHBG) salgılanmasını inhibe ettiği invitro çalışmalarda gösterilmiştir. SHBG düzeylerindeki azalma biyolojik olarak aktif olan androjenlerin serbest fraksiyonunda artışa neden olur.

İnsülinin etki ve sekresyonunda rol oynayan genlerdeki bir defekt, insülin direnci ve hiperinsülineminin ortaya çıkmasına sebep olabilmektedir.

PKOS' lu olgularda uygulanan tedavi protokolü kilo verme, klomifen sitrat veya gonadotropinler ile ovulasyon indüksiyonu, ovaryan operasyon ve invitro fertilizasyonu (İVF) içermektedir.

PKOS patofizyolojisinde hiperinsülineminin etkileri göz önüne alındığında; insülin direncine etkili tedavi alternatiflerinin PKOS olgularındaki endokrin dengesizliği

değiştirebileceği, ovulasyon indüksiyonunu sağlayabileceği, ovulatuar menstrüel siklusları ve gebeliği artırıcı alabileceği düşünülmektedir.

PKOS, fertilitiyi etkileme ve birçok bireyin sağlığını etkileme potansiyeli olan, kompleks bir metabolik sendrom olarak kabul edilebilir. Bu sendrom, kalıtsal genetik yatkınlık ve ek çevresel risk faktörlerinin ortak etkisi ile başlatılır ve sürdürülür.

2.1.4. PKOS' da Klinik Bulgular

PKOS' lu kadınlar geniş bir semptom spektrumu gösterirler. Bu spektrumun bir ucunda, tamamen normal olup hiçbir hiperandrojenizm bulgusu olmayan kadınlar ve amenoreik fakat USG' de polikistik overi olan kadınlar; diğer uçta ise Stein-Leventhal sendromunun tüm klinik bulgularını gösteren kadınlar vardır.

2.1.4.1. Aile Öyküsü ve Genetik Aktarım: Ailesel anovulasyon ve polikistik overlerin saptanması, hastalığa neden olabilen genetik bir yatkınlık olabileceğini düşündürmektedir.^{42,110} Bu hastaların bir bölümünde, hastalığın X kromozomuna bağlı dominant geçiş gösteren genetik özellik taşıdığı gösterilmiştir.³⁴ PKOS, otozomal dominant olarak tek genle taşınmaktadır ve probandların ailelerinde erkek fenotipleri serum androjenlerinin yükselmesiyle birlikte erken kelleşmeyle tanınırlar. PKOS'ta bir diğer genetik geçiş insülin direncine neden olan postreseptör defektidir.¹²¹ PKOS lu hastaların ailelerinde hipertansiyon, diyabet, insülin direnci ve obezite; erkek aile bireylerinde ise endokrin bozukluklar ve testis fonksiyon bozuklukları daha sık görülür.

2.1.4.2. Obezite: PKOS' lu kadınların %80'ninden fazlasının puberteden önceki dönemde obez oldukları kaydedilmiştir. Pek çok çalışma, obezitenin artmış androjen

üretimi ve amenore ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu gözlemler, obezitenin, PKOS' un patogeneğinde rol oynadığı tartışmasına yol açmıştır. Fakat PKOS' lu kadınların sadece %35-60'ı obezdir ve tüm obez kadınlarda hormonal bozukluk gözlenmemektedir. Obezitenin kronik hiperandrojenik anovulasyonda oynadığı rolü açıklayabilmek için çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür:

İlk olarak, androjenin östrojene artmış aromatzasyonundan ve azalmış SHBG' den dolayı, obezite, gonadal steroid geri bildirim değışikliklerine yol açabilir. Bu değışiklikler kronik olarak yanlış östrojen geri bildirimi yoluyla düzensiz gonadotropin salınımı ve anovulasyona yol açıp androjen üretimini artırarak PKOS gelişimine katkıda bulunabilir.

İkinci olarak, ventromedial hipotalamustaki beslenme merkezini ve burayla yakın anatomik ilişkisi olan GnRH salgılayan arkuat nükleusu kapsayan santral lezyonlar gibi nöroendokrin bozukluklar PKOS ve obezite ilişkisini açıklayabilir. PKOS' lu nonobez kadınlar obez olanlara göre daha az derecede hiperinsülinemiktir.

Üçüncü olarak, obezite, androjenlerle ilişkili kilo alımı veya enerji tüketiminde azalma gibi metabolik değışikliklere ikincil olabilir.

Sonuç olarak, obezite, kesin olarak bilinmeyen bir mekanizma ile PKOS' taki hormonal bozukluklara katkıda bulunmaktadır. Obez PKOS' lu hastalarda kilo vermek en başta düşünülmesi gereken basit tedavi yaklaşımlarından biridir. Ağırlığın %15 kaybı ile androjen düzeyi azalır, ovulasyon normale dönebilir. Obezite, normal ovulasyonu bozan üç değışiklik yapmakta olup, zayıflama ile bu değışiklikler düzelebilmektedir: 1) Periferde androjenlerin östrojenlere aromatzasyonunda artış. 2) Serbest östradiol ve testosteron düzeylerinin artmasına neden olan SHBG düzeylerinde azalma. 3) Overin stroma dokusunda androjen sentezini uyaran insülin düzeyinde artış.

2.1.4.3. Menstrüel Düzensizlikler: Hiperandrojenemik kadınlarda oligomenore ve amenore, kronik anovulasyonun klinik özellikleri olarak ortaya çıkmaktadır. PKOS' lu olguların %20'si düzenli adet görebilmektedir. Olguların %30'nda ciddi disfonksiyonel kanamalar meydana gelebilmektedir. Kronik anovulasyonun nedeni; progesteronla karşılanmamış asiklik östrojene bağlı endometriumun aşırı stimülasyonudur. Buna bağlı endometrial hiperplazi ve endometrial kanser riski mevcuttur.⁶⁴

2.1.4.4. Hirsutizm: Hirsutizm ve akne hiperandrojeneminin klinik bulgularıdır. Hirsutizm, Ferriman-Gallway' in kriterlerine göre değerlendirilebilir. Bu değerlendirme kriterleri Ferriman-Gallway'in hormonal kıl skorunun 12'den fazla olmasını hirsutizm göstergesi olarak kabul etmektedir. Fakat vücudun bazı bölgelerindeki kıllanma başlıca genetik faktörlere bağlıdır ve dolayısıyla ırksal farklılıklar bulunur.

2.1.4.5. Biyokimyasal Değerlendirme:

Periferik kandaki hormonlar;

- Yüksek androjen seviyeleri (testosteron, androstenodion)
- Artmış LH/FSH oranı (>2.5)
- Artmış serbest östradiol, östron
- Hiperprolaktinemi
- İnsülin direnci
- Azalmış SHBG

Foliküler sıvı hormon seviyeleri;

- Hücre veya ovaryan doku kültürüyle invitro granüloza hücre fonksiyonu

2.1.4.6. Hiperandrojenemi: Konjenital adrenal hiperplazi, androjen üreten tümörler, Cushing hastalığı, kadından erkeğe dönen transeksüellerde uzun dönem androjen tedavisi gibi çeşitli klinik durumlarda anovulasyon ve PKOS oluşumuna yol açabilir. Androjen taraması; testosteron ve diğer steroidlerden androstenodion, dihidroepiandrosteron, dihidrotestosteron veya 17 alfa-hidroksiprogesteron için yapılır. Adrenal androjen üretiminin göstergesi olan dihidroepiandrosteron-sülfat (DHEA-SO₄) ölçümü yararlıdır. Ovaryen-adrenal androjen üretiminin ayırt edilebilmesini sağlayarak önemli terapötik sonuçlar sağlar. Artmış LH/FSH oranlarının PKOS tanısı için anahtar biyokimyasal kriterlerden biri olduğu düşünülmektedir.

2.1.4.7. Galaktore: PKOS'ta %10 oranında görülebilmekte olup, hiperprolaktinemi ile beraber seyreder.⁶²

2.1.4.8. Akantozis Nigrikans: Gri, kahverengi bazen verriköz olabilen renk değişiklikleri olup, genellikle boyun, koltukaltı, meme altında görülür ve insülin direnci belirticidir. Hiperandrojenemik kadınlarda görülmesi, hiperinsülineminin varlığına ve ciddiyetine işaret eder. Akantozis nigrikansın gelişimi uzun bir süreç gerektirdiği için, görülmesi androjen salgılayan tümöre bağlı hirsutizm olmadığına dair delil olarak da değerlendirilebilir.¹⁷⁷

2.1.4.9. Ultrasonografi Bulguları

- Overlerin periferinde inci tanesi gibi 2-8 mm arasında 10 veya daha fazla follikül (Şekil 1)
- Hiperekojen santral stroma mevcuttur.

- Overler genellikle normalden büyük ve kronik anovulasyona bağlı olarak kalın bir sedef kapsül ile kaplıdır.⁸⁰ Büyümekte olan ve atreziye uğramış follikül sayısı normalin 2 katıdır. PKOS'lu olgularda stromal vaskülaritenin belirgin şekilde arttığı 'tipik vasküler patern' gözlenmiştir. Ovaryan arterde direnç endeksi ve pulsatilite endeksinde düşme olduğu belirlenmiştir.⁷



Şekil 1. PKOS' un ultrasonografik görünümü

2.2. Metabolik Sendrom

Kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde rol alan ve ortak etiyopatogenezi paylaştıkları düşünülen çeşitli risk faktörlerinin bir arada bulunması metabolik sendrom olarak adlandırılmaktadır. Sendrom X, İnsülin Direnci Sendromu olarak da bilinen metabolik sendrom, aterosklerotik hastalıklar ve tip 2 diyabetin en önemli ve en sık görülen nedenleri arasında yer alır.

İlk kez 1988’de Reaven, çeşitli risk faktörlerinin sıklıkla bir arada bulunduğu dikkat çekmiş ve sendrom X olarak adlandırdığı bu beraberliğin kardiyovasküler hastalıkların gelişme riskini arttırdığını belirtmiştir.¹⁶⁰

Metabolik sendrom sıklığı, ilerleyen yaş ve vücut ağırlığı artışıyla artar. Amerika Birleşik Devletleri’nde 20 yaş ve üzeri kişilerde metabolik sendrom sıklığı % 27 bulunmuş, metabolik sendrom sıklığının kadınlarda daha hızlı olmak üzere artmakta olduğu saptanmıştır.⁵⁴ Ülkemizde, 2004 yılında yapılan METSAR (Türkiye Metabolik Sendrom Araştırması) sonuçlarına göre 20 yaş ve üzerindeki erişkinlerde metabolik sendrom sıklığı % 35 olarak saptanmıştır. Bu araştırmada kadınlarımızda metabolik sendrom sıklığı, erkeklere göre daha yüksek bulunmuştur (kadınlarda % 41.1, erkeklerde % 28.8).¹²² Geniş kapsamlı diğer bir çalışma olan TEKHARF (Türkiye’de Erişkinlerde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri Sıklığı) çalışmasında ise metabolik sendrom sıklığı 30 yaş ve üstü erkeklerde %28, kadınlarda %45 olarak tespit edilmiştir.¹⁴¹

Metabolik sendromun etiyolojisi tam olarak bilinmemekle beraber, insülin direncinin etiyopatogeneizde anahtar rolü oynadığı düşünülmektedir. Metabolik sendromun tüm bileşenlerinin birbirleriyle ve insülin direnci ile olan ilişkilerini gösteren çeşitli bulgular mevcuttur.

İnsülin duyarlılığı, insülinin iskelet kası başta olmak üzere insüline bağımlı çeşitli dokulardaki glukoz alımına cevaplılığını, adipoz dokuda lipolizi ve karaciğerde glukoneogenezi baskılama yeterliliğini gösterir. Tip 2 diyabette sıklıkla görülen insülin direnci, normal glukoz toleransı olan ve diyabetik olmayan bireylerde de görülebilir. Tip 2 diyabetlilerin obez olmayan ve diyabeti bulunmayan yakınlarında da insülin direncinin saptanması genetik yatkınlığın rolünü desteklemektedir. Obezite, sedanter yaşam tarzı, sigara içimi, düşük doğum ağırlığı ve perinatal malnütrisyon da insülin direnci gelişimi ile ilişkili bulunmuştur.⁵³

Adipoz doku ve bu dokudan salgılanan hormonlar, hipotalamo-hipofiz-adrenal aks bozuklukları, ilerleyen yaş, genetik (CD36 da dahil olmak üzere) ve çevresel nedenler de rol alan diğer faktörler arasındadır.

2.3. Endotel Disfonksiyonu

Son yıllarda kardiyovasküler biyoloji ve patobiyolojide endotel fonksiyonlarının merkezi bir rol üstlendiği anlaşılmıştır. Endotel, endokrin, parakrin ve otokrin fonksiyonları ile vücudun en aktif ve en yaygın dokularından biridir. Endotelin başlıca fonksiyonları; damar tonusunun, geçirgenliğinin düzenlenmesi, lökositlerin ve trombositlerin damar duvarına adezyonu ve trombosit agregasyonunun ayarlanması ve damar duvarının biçimlenmesidir. Çeşitli vazodilatör ve vazokonstriktör ajanlar damar endoteli üzerine olan etkileri ile damar tonusunu düzenlerler. Nitrik oksit (NO), prostasiklin ve bradikinin damar duvarını dilate ederken, endotelin, superoksit anyonu, anjiyotensin II ve tromboksan ise konstriksiyona yol açarlar. Bu ajanlar sadece arter tonusunu düzenlemekle kalmayıp ateroskleroza yol açan diğer parametreleri de etkilemektedirler.

Endotelial disfonksiyon mekanizması birçok faktöre ve vasküler bozukluğun tipine bağlıdır. Endotel disfonksiyonu, artmış vazokonstriktör ve/veya azalmış vazodilatör etkiye bağlı olabilir. Azalmış vazodilatör etkinin nedenleri arasında NOS yolağının düzensizlikleri, üzerinde en çok çalışılmış olanıdır. Bu düzensizlikler;

- 1) NO yarı ömrü
- 2) NO sensitivitesi
- 3) NOS ekspresyonu
- 4) NOS aktivitesinde azalma, olarak kategorize edilebilir.

NO yarı ömrü oksidatif stres varlığında azalır. Tersine antioksidan stratejiler NO yarı ömrünü uzatır, NOS ekspresyonunu artırır ve endotelial disfonksiyonu tamir eder.^{67,127,158} Antioksidanlar NOS kofaktörü olan tetrahidrobiopterini koruyarak NOS aktivitesini artırır.⁷⁹ Aterosklerozun geç döneminde endojen ve eksojen NO sensitivitesinin azaldığı gözlenmektedir. Bu durum yüksek olasılıkla NO'nin ve/veya solubl guanilat siklazın oksidatif inaktivasyonuna bağlı olabilir. İlerlemiş aterosklerozda muhtemelen sitokin veya lipid kaynaklı instabiliteye ve/veya NOS mRNA transkripsiyonunun azalmasına bağlı olarak eNOS ekspresyonunun da azaldığı gözlenmektedir.^{107,136}

Son olarak, giderek artan sayıda veri, endojen NOS inhibitörlerinin endotelial disfonksiyondan sorumlu olabileceğini göstermektedir. Endojen inhibitörler, asimetric dimetilarjinin (ADMA) ve N-monometilarjinin (NMA) dir. ADMA, NMA'dan 10 kat fazla salınan predominant inhibitördür.

Dislipidemi, hipertansiyon, diyabet ve sigara içimi gibi risk faktörleri ile oluşan oksidatif stres, endotel disfonksiyonuna ve damarda inflamasyona yol açar, vazodilatör etkili nitrik oksit düzeyi düşer, oksidatif stres daha da artar, diğer biyolojik mediyatörler aktifleşir ve böylece vasküler komplikasyonlara yol açan çeşitli patobiyolojik olaylar

başlatılmış olur.¹⁴⁰ Bu inflamasyonu takiben damar düz kas hücreleri intima tabakasına göç ederler, çoğalırlar ve hücre dışı matriks proteinlerinin yapımını artırırlar. Tüm bu olaylar, aterosklerotik plakların oluşumu ile sonuçlanır.³⁰

İnsülin, bir yandan fizyolojik konsantrasyonlarında NO salınımını artırarak, vazodilatör ve antiinflamatuvar etki gösterirken, diğer yandan hiperinsülinemi, endotel ve damar düz kas hücrelerine direkt etki ile aterosklerozun ortaya çıkmasına katkıda bulunur. İnsülin direnci ve hiperinsülinemi endotel fonksiyonları bozarak vasküler hasar gelişmesine yol açar. İnsülin direnci, NO aracılı vazodilatasyonu bozar. Metabolik sendromda ve diyabette superoksit dismutaz gibi reaktif oksijen radikallerinin aşırı üretimine bağlı olarak NO miktarları azalır. İnsülin direnci aynı zamanda adipoz dokudan serbest yağ asitlerinin salınımını uyararak reaktif oksijen radikallerinin artışına yol açar. NO ve diğer vazodilatörlerin azalmasına, endotelin ve anjiyotensin II artışı eşlik eder. Oksidatif stres, NO azalması ve dislipidemi beraberliği transkripsiyon faktörlerinin regulasyonunu arttırarak, TNF- α ve IL-1 gibi inflamatuvar mediyatörlerin sentezini arttırır. Diyabet gelişimi için yüksek risk altında bulunan tip 2 diyabetli kişilerin birinci dereceden akrabalarında endotel fonksiyon bozukluğu olduğu gösterilmiştir.

2.4. Nitrik Oksit ve Nitrik Oksit Sentaz

2.4.1. Nitrik Oksit

Kimyasal özellikleri ilk olarak 1772’de Joseph Priestley tarafından tanımlanmış olmasına rağmen, nitrik oksitin (NO) biyolojik sistemlerdeki önemi 1980’lerin ortalarına kadar anlaşılamamıştır.^{21,70,115,144} NO, stabil olmayan bir radikal moleküldür. NO, O₂, O₂⁻ radikalleri veya H₂O₂ ile hızlıca reaksiyona girerek NO₂⁻, ONOO⁻ ve NO₃⁻ ürünlerine dönüşür.

NO, organizmada pek çok hücrede, P₄₅₀ sitokrom–oksidoredüktaz ailesine ait bir enzim grubu olan nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla L-arjinin terminal guanido nitrojeninden sentezlenir.^{6,22,149,170,178} Bu sentez iki basamaktan oluşmaktadır:

- L-arjininin N-oksidasyonu ile L-OHArjinin (L-OHArj) oluşumu.
- L-OHArj’in C=N bağının oksidatif olarak yıkılması ile sitrülün ve NO oluşumu.

İkinci basamakta kofaktör olarak tetrahidrobiopterin (BH₄), flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN) ve sitokrom P450 kullanılır. Her iki basamakta da nikotin adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ve oksijen tüketilmektedir.^{6,22,113,149,178} Ayrıca enzimin tamamen fonksiyonel olabilmesi için “hem” ve kalmoduline (CaM) de ihtiyaç vardır.

NO’in sentez ve salınımı Ca⁺⁺’a bağımlı olaylardır. Endotel hücresine Ca⁺⁺ girişinin reseptör-aracılı bir iyon kanalıyla ve daha az olarak da hücre içi depolardan Ca⁺⁺ salınımı şeklinde gerçekleştiği düşünülmektedir.¹¹³

2.4.2. NOS

P₄₅₀ sitokrom–oksidoredüktaz ailesine ait bir enzim grubudur. C-terminal redüktaz alanı, NADPH, FMN ve FAD için bağlanma bölgeleri içerip sitokrom P₄₅₀'e çok benzerken, N-terminal bölgesi, biopterin (BH₄), hem ve L-Arg için bağlanma bölgelerine sahiptir. NOS aynı anda 5 kofaktör/prostetik grup (FAD, FMN, Hem, BH₄ ve Ca⁺⁺ – CaM) bağı gerektiren, bilinen tek enzim grubudur.¹³¹

NOS enziminin üç temel izoformu vardır. Bunlardan ikisi yapısal olarak (cNOS), biri sitokinler ve bakteriyel lipopolisakkaritler gibi bileşiklerce indüklenebilir formdur (iNOS). cNOS'un iki subtipi mevcuttur. İlk olarak sıçan nöronlarında tespit edilmiş olup nöronal NOS (nNOS) veya tarihsel nedenlerden dolayı NOS-I olarak adlandırılmıştır. Diğeri ise sığır endotelial hücrelerinde tanımlanmış olup, endotelial NOS (eNOS) veya NOS-III olarak adlandırılmıştır.^{14,125,149,170,171,68} Bugün eNOS' un damar endoteline ek olarak trombositler, eritrositler ve beyindeki bazı nöron topluluklarını da içeren pek çok dokuda bulunduğu bilinmektedir.^{76,86,135} nNOS 'un ise beyinde, medulla spinaliste, sempatik ganglionlarda, adrenal bezlerde, uterus, bronşlar ve trakeanın epitelyum hücrelerinde, mide, trombositler ve pankreas adacık hücrelerinde eksprese olduğu gösterilmiştir.^{49,94,126,157,167,168} İlk olarak kemirgen makrofaj ve hepatositlerinde tespit edilmiş olan iNOS veya NOS-II, bu hücrelere ek olarak endotel hücreleri, nötrofiller, düz kas hücreleri ve eritrositleri de içeren pek çok hücrede mevcuttur.^{16,74,119,121} nNOS ve iNOS esas olarak eriyebilir enzimlerken, eNOS'un %90'dan fazlası tanecik şeklindedir.¹¹³ Bunların fonksiyonu, dağılımı ve regülasyonu farklıdır, ancak hepsi de aynı redoks reaksiyonlarını katalizlerler ve O₂⁻ üretebilirler. Bidomain yapıda olan NOS proteinleri aminoterminal yarısında oksijenaz aktivitesine, karboksil terminal yarısında ise redüktaz aktivitesine sahiptirler.^{6,22,76,178}

cNOS ve iNOS arasında pek çok önemli farklılıklar vardır^{123,131}:

cNOS yapısal olarak bazal düzeyde bulunurken, iNOS yapısal olarak bulunmaz. cNOS Ca^{++} /Kalmoduline bağımlıdır. iNOS Ca^{++} /Kalmodulinden bağımsızdır. Kalmodulin, flavinlerden NOS'un hem bölgesine elektron transferinde görevli olup, NO biyosentezinde önemli bir basamak olan flavin indirgenmesinin hızını belirler.^{14,76,135} cNOS'a kalmodulin bağlanması ve aktivasyon fizyolojik Ca^{++} konsantrasyon değişikliklerine cevaben meydana gelirken, kendisine sıkıca bağlı kalmoduline sahip olan iNOS düşük Ca^{++} konsantrasyonlarında bile (Ca^{++} konsantrasyonundan bağımsız olarak) maksimum flavin redüksiyonuna imkan sağlar.^{14,170} Bu nedenle iNOS bir kez eksprese olduğunda teorik olarak, substrat ve diğer kofaktörlerce sınırlanana kadar NO sentezlemeye devam eder.⁷⁶

Yapısal NOS enzimlerine sahip hücreler, damar endotelinde asetil kolin (Ach), beyinde glutamat veya trombositlerde kollajen gibi agonistlere yanıt olarak fizyolojik düzeylerde NO sentezlerler.^{70,76,170} Bu reseptör aracılı cevaplar cNOS'un aktivasyonu için kritik olan hücre içi Ca^{++} konsantrasyonunda artışa yol açarlar.^{76,113} cNOS tarafından üretilen NO damar tonüsü, trombosit agregasyonu, immün yanıt ve nörotransmisyon gibi fizyolojik fonksiyonları düzenler.^{14,70} İnterlökin-1 (IL-1), TNF- α , IFN- α ve bakteriyel endotoksinler gibi inflamatuvar sitokinlere cevap olarak eksprese olan iNOS tarafından oluşturulan NO üretimi birkaç saatlik bir gecikme ile başlasa da, bu enzim bir kez uyarıldığında, saatler ve günlerce aktif kalabilir ve yapısal NO formlarına göre 1000 kat fazla NO salınımına sebep olabilir.^{113,149,171} Aktive makrofajlarca fazla miktarlarda sentezlenen NO, bu hücrelere bakteri, virüs, protozoa ve tümör hücrelerini öldürme yeteneği kazandıran sitotoksik özelliklere sahiptir.^{14,70,76} cNOS fosforile olabilen bir enzimdir.^{113,170} cNOS'un cAMP bağımlı protein kinazlarca fosforilasyonu sonucu aktivitelerinde azalma oluşurken, iNOS'un böyle bir özelliği yoktur. Kısaca özetlemek gerekirse, cNOS sentezi çok kısa

sürede olur, az miktardadır (pmol) ve fizyolojik olayların devamında görevlidir. iNOS sentezi içinse saatler gerekir, çok miktardadır (nmol) ve fizyopatolojik değişikliklere sebep olur.

2.4.3. NO Biyokimyası

Suda çözünürlüğü düşük olan, nonpolar bir gazdır.^{113,115} Hem zayıf bir oksidan hem de bir indirgeyici molekül olarak etki edebilen, son yörüngesinde eşleşmemiş bir elektrona sahip olan biatomik bir moleküldür.^{113,115,144} Bu eşleşmemiş elektron sayesinde ortamda bulunan diğer serbest radikallerle çok kısa süre içinde reaksiyona girebilir.⁷⁶ Yarı ömrü birkaç saniye kadar olan NO, biyolojik membranlardan kolayca difüze olabilir.¹⁷⁰ Fizyolojik mediatör fonksiyonu gösterilmiş olan ilk endojen olarak sentezlenen gazdır.¹⁴ Serbest radikal, nitrozonyum (NO^+) ve nitroksil iyonu (NO^-) olmak üzere üç adet birbiri ile ilişkili NO şekli tanımlanmıştır.^{96,109} Bu formların üçü de NOS enzimi tarafından sentezlenir.¹⁶⁶ NO, organizmada hem grupları, metal içeren enzim bölgeleri, tiol grupları ile reaksiyona girebilir.^{14,84,114,128,135,170}

NO tam kanda hızlıca NO_2^- ve NO_3^- 'e metabolize olur, bir başka deyişle NO'nun son ürünleri NO_2^- ve NO_3^- 'tir. NO_2^- ve NO_3^- 'in invivo koşullardaki NO üretiminin önemli göstergeleridir. Diğer kararlı son ürün ise “sitrülin”dir. NO_3^- , NO'nun tam kanda stabil bioreaksiyon ürünüdür. Doku kültürü ortamında hemoglobin yokluğunda NO_2^- ara stabil üründür. Tam kanda NO_2^- hızla NO_3^- 'a dönüşür. Bu nedenle kanda bazal NO_2^- konsantrasyonları NO_3^- 'tan düşüktür. NO_2^- ve NO_3^- 'in biyolojik aktiviteleri çok azdır. Ancak NO yapımını yansıtan iyi birer göstergedirlere.

NO için bir diğer yıkım yolu kuvvetli bir oksidan olan ONOO^- 'i oluşturmak üzere O_2^- anyonlarıyla hızlı şekilde reaksiyona girmesidir. Fazla miktardaki ONOO^- , NO_3^-

ortaya çıkaracak şekilde parçalanabilir.^{84,149} Alternatif olarak, NO oksijen ile reaksiyona girerek reaktif ara ürünler oluşturabilir.

2.4.4. NO Etkileri

Sinyal iletimine yol açan, guanilat siklaz-cGMP (3',5' guanozin monofosfat) sistemiyle olan etkileşim, günümüzde NO'nun en iyi bilinen fizyolojik etkisidir. Sentezini takiben diffüze olduğu hücrelerde NO, sitozolik guanilat siklaz'ın aktif bölgesinde bulunan hem demirine (Fe^{++}) geri dönüşümsüz olarak bağlanır. Aktif guanilat siklaz tarafından intraselüler seviyesi yükselen cGMP, kinazlar aracılığıyla, Ca^{++} 'un, ya hücre dışına çıkarılmasını ya da hücre içinde depolanmasını uyarak, intraselüler Ca^{++} seviyelerini düşürür.

NO'nun, cGMP bağımlı etkileri^{31,131}:

- 1) Düz kasların gevşemesi.
- 2) Platelet adezyonu ve agregasyonunun inhibisyonu.
- 3) Santral ve periferel sinir sistemlerinde sinyal iletiminin sürdürülmesi.
- 4) Nötrofil kemotaksisinin önlenmesi.

Periferel kan mononükleer hücrelerinde ise NO, cGMP'den bağımsız bir yol ile G proteinlerini aktive ederek bir sinyal molekülü olarak görev yapar. NO'nun, hem hücrelerarası iletişimde rol alması hem de sitotoksik bir ajan olarak görev yapması, cNOS ve iNOS tarafından niceliksel olarak farklı yollarla salınması ile ilişkilidir.

NO'nun, cGMP'den bağımsız biyolojik etkileri¹⁸⁴:

1) Siklooksijenaz gibi bazı enzimlerin hem gruplarına bağlanarak, onların aktivitelerini inhibe eder.

2) NADH, süksinat oksidoredüktaz, akonitaz gibi bazı mitokondriyal demir-sülfür enzimlerini inhibe eder.

3) NOS ile yapısal benzerlik gösteren sitokrom p450 sistemini inhibe eder.

4) Na-K-ATPaz ve Ca^{++} a bağımlı K^+ kanallarını aktive eder.

5) Birçok inflamasyon durumunda yüksek düzeyde sentezlenen NO, mantar, bakteri, helmint, protozoa gibi mikroorganizmalar ve tümör hücreleri için sitostatik ve sitotoksik etkiye sahiptir.

6) p53 (tümör baskılayıcı gen) düzeylerini artırarak, apoptoz aracılı hücre ölümüne yol açar.

7) Lipit peroksi radikallerini yakalayarak, zincir yayılma reaksiyonlarını ve böylece lipit peroksidasyonunu önleyerek antioksidan özellik gösterir.

Bunlar dışında NO'nun biyolojik etkileri şu faktörlere de bağlıdır⁵⁵:

- 1) Üretilen NO miktarına,
- 2) Etki bölgesindeki NO konsantrasyonuna,
- 3) NO'nun üretildiği spesifik bölgeye,
- 4) O_2^- anyonları veya hem grupları gibi reaktif gruplara bağlanmaya paralel olarak meydana gelen NO inhibisyonunun oranına,
- 5) NO etkilerine aracılık eden guanilat siklaz gibi enzimlerin kullanılabilirliğine bağlıdır.

NO'nun tek başına mı yoksa O_2^- radikalleriyle etkileşimi sonucunda mı toksik olduğu henüz tartışmalıdır. Ancak iNOS aracılığı ile uzun süre salınan NO'nun toksik olduğu açıktır. NO'nun O_2 kaynaklı radikallerle girdiği reaksiyon sonucunda bazen kendisinden daha toksik bileşikler meydana gelebilir. NO, Cu^{++} içeren proteinleri de etkiler. Açığa çıkan Cu^{++} da hücre hasarını artırıcı etki yapmaktadır

2.4.4.1. NO'nun Kardiyovasküler Etkileri

NO miyokard kontraktilitesi, trombosit agregasyonu ve damar tonüsünün düzenlenmesinde önemli rollere sahiptir. Bu nedenle, onun oluşumu ya da hücre içi etkilerini göstermesi ile ilgili herhangi bir patoloji, esansiyel hipertansiyon, ateroskleroz, anjina ve vazospazm gibi bir grup kardiyovasküler hastalığa neden olur.^{14,109,135,171} Miyositler, ventrikül dokusu ve kan damarlarında iNOS ve cNOS' un varlığı gösterilmiştir. NO, miyositlerin mitokondriyel solunumunu inhibe ederek kalbin oksijen tüketimini azaltır. Damar düz kas tonüsünün ve periferik direncin düzenlenmesi de NO₂' in önemli görevleri arasındadır.^{82,109,170,171} NO'nun bir diğer önemli kardiyovasküler etkisi, damar düz kası proliferasyonunu inhibe etmesidir.^{109,115,199} NO üretiminde azalma veya yıkımındaki artışın, aterogenezisi uyardığı ve aterom plakları oluşumuna neden olabildiği, L-arjinin tedavisinin ise bu lezyonların oluşumunu engellediği gösterilmiştir.^{14,115,171,199} Aterom plaklarının oluşumu, NO'nun damar reaktivitesi ve trombosit fonksiyonları üzerindeki etkilerine bağlı olabileceği gibi, monosit infiltrasyonu ile de ilişkili olabilir. NO aterosklerotik lezyonların gelişiminde özellikle erken dönemde çok önemli olan LDL oksidasyonunu inhibe etmektedir.¹⁰⁹ Bununla birlikte ortamda NO ve O₂⁻ beraber bulunduklarında veya düşük pH'da oksijen mevcudiyetinde, hem NO hem de metaboliti olan ONOO⁻, LDL'yi oksitler. Böylece NO, ateroskleroz patogenezinde erken dönemde koruyucu etki göstermek ve geç dönemde lezyonun gelişimine katkıda bulunmak suretiyle iki taraflı rol oynamaktadır.¹⁹⁹

NO eksikliği, hipertansiyona neden olmaktadır.^{109,170,171,199} L-arjinin analogu olan L-NMMA ve NOS inhibitörü olan L-NAME, endotelial NO üretimini inhibe ederek hipertansiyona ve endotel bağımlı vazorelaksasyonda azalmaya neden olur.^{14,170,171,199} eNOS tarafından üretilen NO, sadece damar düz kasına etkiyerek vazodilatasyona neden

olmakla kalmaz, aynı zamanda lümene diffüze olarak trombositlerin aktivasyonunu, agregasyonunu ve damar duvarına adezyonunu da inhibe eder, agreg olmuş trombositlerin disagrege olmalarını indükler.^{82,84,109,157,170,199} NO üretiminin azalması trombositlerin normal damarlara adezyonunu etkilemezken, hasarlı damarlara adezyonunu artırır.¹⁴ NO aktive trombositlerden de salınmaktadır ve endotel ve trombosit kaynaklı NO birlikte intravasküler trombosit aktivasyonunu sınırlayıcı bir negatif geri bildirim mekanizması oluştururlar.^{14,157} Trombositler aktive olup trombin üretimi uyarıldığında, hem trombositler hem de endotel hücrelerinden NO salınımı artar ve trombus oluşumu sınırlandırılır. Salınan NO, trombosit ve lökositlerden, büyüme faktörleri ve proaterojenik faktörlerin salınımını da engelleyerek, trombus oluşumunun önlenmesine katkıda bulunur.¹⁰⁹ NO'nun antitrombosit etkileri, hücre adezyon molekülleri aracılığıyla düzenlenmektedir. NO, P-selektin ve/veya fibrinojen reseptörü (IIb/IIIa reseptörü) ekspresyonunu inhibe eder.^{14,84,199}

2.4.4.2. NO' nun Gastrointestinal Sistem Üzerine Etkileri

NO, gastrointestinal sistemde bir takım hücreler üzerine etki ederek, sekresyon, tonus ve motilite, kan akım, elektrolit ve su absorpsiyonu, mukozal koruma ve inflamasyon gibi olaylara karışır. Sayılan bu etkilere, genellikle guanilil siklaz aktivasyonu aracılık eder. NO, mide kan akımını artırır. NO donörleri, vagal uyarı veya histaminle indüklenen asit salgılanmasını azaltabilir. L-arginin: NO yolağı barsak elektrolit ve su absorpsiyon/sekresyon olaylarına karışır. NO'nun hem proabsorptif hem de sekretuar olduğu bildirilmiştir. NO, midenin besin alınımı sırasında minumum basınç ve maksimum gevşeme yanıtı olan “adaptif gevşeme” fenomeninde en önemli rolü oynayan nörotransmitterdir. NO, post-ganglioner parasempatik orijinli nöronların ucundan salıverilir ve gastrointestinal sistem boyunca (özofagus, alt özofageal sfinkter, mide, pilorik sfinkter,

duodenum safra kesesi, Oddi sfinkteri, ileum, kolon, rektum ve anal sfinkter) tonus ve motiliteyi düzenler.

iNOS karaciğerde önemli fonksiyonlara sahiptir. Hem parankimal hem de parankimal olmayan hücrelerden iNOS'ca sentezlenen NO immün cevapta rol oynar. NO, karaciğerde protein sentezi, mitokondrial elektron transportu ve sitrik asit siklusu komponentleri gibi önemli hücre içi fonksiyonları düzenler.¹⁴

2.4.4.3. NO'nun Solunum Sistemi Üzerine Etkileri

NO' nun, solunum fonksiyonunun düzenlenmesinde, solunum yollarının direncini ayarlanmasında ve inflamatuvar solunum sistemi hastalıklarının patofizyolojisinde önemli rolü bulunmaktadır. NO, solunum sisteminin düz kasını gevşetir, hava yollarında bronkodilatör sinirlerin transmitteri olup, kolinerjik nöral mekanizmalarca oluşturulan bronkokonstrüksiyona ters etki gösterir.^{14,113}

İnflamatuvar hava yolu hastalıklarında, ekspirasyon havasında NO konsantrasyonunun artmış bulunması, akciğerlerde artmış endojen NO üretimini düşündürmektedir. Havayollarında artmış NO üretimi, hiperemi, plazma eksüdayonu, mukus sekresyonunda artmaya neden olur.¹⁷⁰

2.4.4.4. NO' nun Santral Sinir Sistemi Üzerine Etkileri

Beyin çok fazla miktarda NO üretme kapasitesine sahiptir. NO' nun, nörotransmitter fonksiyonu ilk olarak beyinde gösterilmiştir. NO, santral sinir sisteminde, öğrenme, hafıza, ağrı, uyku, beslenme ve seksüel fonksiyonları da içeren pek çok önemli fizyolojik fonksiyona aracılık eder. Nöronlarda NO üretimi için, en iyi bilinen tetikleyici mekanizmalardan biri eksitatuvar bir nörotransmitter olan glutamattır.^{14,82} Beyindeki esas

NO sentaz izoformu nNOS'dur, ancak bazı nöron gruplarında eNOS' un varlığı da bildirilmiştir. Glial hücreler ve nöronların bakteriyel lipopolisakkarit ve/veya sitokinlere maruz kaldıklarında iNOS eksprese edebildikleri hücre kültürü deneylerinde gösterilmiştir.^{14,171} nNOS veya iNOS aracılığıyla fazla miktarda NO üretiminin nöronlarda hasara neden olduğu, iskemiden sonra gözlenen akut nöron kaybından sorumlu olduğu, ayrıca Parkinson, multipl skleroz ve bazı motor nöron hastalıklarının patofizyolojisinde rol oynadığı gösterilmiştir.^{14,113,171} Alzheimer hastalığının ve migrenin patogeneğinde de NO' nun rolü vardır.

2.4.4.5. NO' nun Üreme Sistemi Üzerine Etkileri

Korpus kavernozum ve penisi besleyen kan damarlarını innerve eden nöral liflerde NOS enzimi mevcuttur ve NO penis ereksiyonuna aracılık eder.¹⁷⁰ Penisteki sinir uçları ve/veya damar endotelinde NO₂'nin yetersiz üretiminin bozulmuş ereksiyon veya empotansa neden olduğu bilinmektedir. İnsan spermatozoa hücrelerinde de eNOS ve nNOS enzimleri mevcuttur.¹⁷¹

2.4.4.6. NO' nun İmmünite ve İnflamasyon Üzerine Etkileri

NO' nun immün sistem üzerine etkileri detaylı şekilde incelenmiştir. Aktive makrofajların fazla miktarda NOS eksprese ettikleri ve NO ürettikleri bilinmektedir. Makrofajlarda iNOS ekspresyonunu indükleyen sitokinlerin başında; IL-1, IFN- γ , TNF- α ve migrasyon inhibitör faktör gelmektedir.^{14,113,170} Üretilen NO, makrofajların hücre içi ve hücre dışı patojenleri öldürme fonksiyonuna katkıda bulunur. Ama sitotoksik etkili olan esas molekül NO değil, onun O₂⁻ le etkileşimi ile meydana gelen ONOO⁻'tir.

Organizmada iNOS ekspresyonu, çok dar sınırlar içinde sabit tutulmaktadır. IL-4, IL-10 ve TGF- β gibi bir grup sitokin makrofajlarda NOS'ın indüksiyonunu down-regüle edebilir.¹⁴ NO'nin kendisi de 'geri bildirim' inhibisyonla NOS aktivitesini azaltabilir. iNOS ekspresyonu makrofaj dışında bir grup hücrenin inflamasyon ve enfeksiyona verdiği cevapta da önemlidir. Ayrıca septik şokta, miyokard depresyonu, hipotansiyon, mikrovasküler kan akım bozuklukları ve sitotoksiteden iNOS aktivasyonu sonucu salınan NO'nun sorumlu olduğu bilinmektedir.^{109,113,171}

NO, hem invitro hem de invivo lökositlerin damar duvarına adezyonunu inhibe eder.^{84,99,109,171,199} NO, aynı zamanda hücre içi cGMP düzeylerini artırarak invitro monosit kemotaksisini inhibe eder.⁸¹ NO, P-selektin, fibrinojen reseptörü (IIb/IIIa reseptörü) ve CD11b/CD18'i de içeren bir grup adezyon molekülünün aktivasyon ve ekspresyonunu da inhibe ederek, lökositlerin damar duvarına adezyonunu düzenler.^{14,84,99,109,199}

2.4.5. Nitrit ve Nitrat

NO, serbest oksijen radikali olduğu için yüksek oranda reaktiftir ve pek çok maddeyle etkileşir. NO' nun yarılanma ömrü 6–30 saniye arasındadır. Tam kanda NO hızlıca nitrite (NO_2^-) ve nitrata (NO_3^-) metabolize olur, yani NO' nun son ürünleri NO_2^- ve NO_3^- 'tir. NO_2^- ve NO_3^- invivo koşullardaki NO üretiminin önemli göstergeleridir. Diğer kararlı son ürün ise "sitrülin" dir.

NO_3^- , NO' nun tam kanda stabil bioreaksiyon ürünüdür. Doku kültürü ortamında hemoglobin yokluğunda nitrit ara stabil üründür. Tam kanda NO_2^- hızla NO_3^- a dönüşür. Bu nedenle kanda bazal NO_2^- konsantrasyonları NO_3^- tan düşüktür. NO_2^- ve NO_3^- ın biyolojik aktiviteleri yoktur. Ancak NO yapımını yansıtan iyi birer göstergedirlere.

2.4.6. NOS Enziminin İnhibitörleri

NOS inhibitörlerinin keşfi NO ve NOS' la ilgili çalışmaların başarısını büyük oranda etkilemiştir. Prototip NOS inhibitörü olan N-monometil-L-arjinin (L-NMMA) tüm NOS izoformlarını etkin bir şekilde inhibe eder.^{14,135} L-NMMA gibi diğer L-arjinin analogları da her üç NOS tipinin yarışmalı inhibitörleridir; ayrıca NO' nun kendisi de NOS enziminin hem parçası ile reaksiyona girerek bu enzimin aktivitesini inhibe edebilir.^{22,68,170} NN-dimetil-L-arjinin (L-ADMA) endojen NOS inhibitörüdür, ancak normal plazma konsantrasyonu düşüktür.⁷⁶

Diğer bir L-arjinin analogu olan L-NAME de yarışmalı non-selektif bir NOS inhibitörüdür. cNOS' u, iNOS' a göre daha güçlü şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir.^{22,68,135,149} L-NAME, NO üretimini engelleyerek, Ach tarafından indüklenen vazodilatasyonu inhibe ederek, kan basıncında artışa, lökosit adezyonunda artışa ve damar geçirgenliğindeki artışa bağlı mikrovasküler sıvı ve protein kaybına neden olur.^{25,98,99,135}

L-Canavine, L-N-(G)-monometilarjinin (L-NMA), N-amino-L-arjinin, aminoguanidin ve N-iminoetil-I-ornitin (L-NIO) makrofaj iNOS' unu cNOS'a göre daha fazla inhibe ederler.^{22,76} Glukokortikoidler, BH₄ sentezi ve L-arjinin taşınmasını engelleyerek, iNOS' u inhibe ederler.¹⁷⁰ S-metil-izotioüre (SMT) de yaygın kullanılan, oldukça kuvvetli bir iNOS inhibitörüdür.⁶⁵

Bazı kofaktör antagonistleri de NOS inhibitörleri olarak kullanılmaktadır. Aromatik iodonium bileşikleri, nükleotide gereksinim gösteren flavoproteinleri inhibe ederek, iNOS ve eNOS aktivitesini geri dönüşümsüz inhibe ederler.⁷⁶ NOS' u inhibe etmenin bir diğer yolu, substrat veya kofaktörlerden birini sınırlandırmaktır.

2.4.7. L-Arjinin

Özellikle gelişme çağındaki çocuklar için esansiyel bir amino asit olan L-arjinin arjinaz, NOS, arjinin dekarboksilaz gibi önemli enzimler için de substrattır.¹¹³ Arjinaz, üre siklusunda arjinini katabolize eden klasik enzimdir. Arjinin dekarboksilaz ise L-arjininin, α_2 -adrenoreseptörler için endojen bir agonist olan agmatine dönüşümünü katalizler.

L-arjinin, klinik uygulamalarda NO eksikliği ile karakterize bir grup hastalığın tedavisinde kullanıldığı gibi, deneysel çalışmalarda, NO öncülü olarak da yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.5. Asimetrik Dimetilarjinin

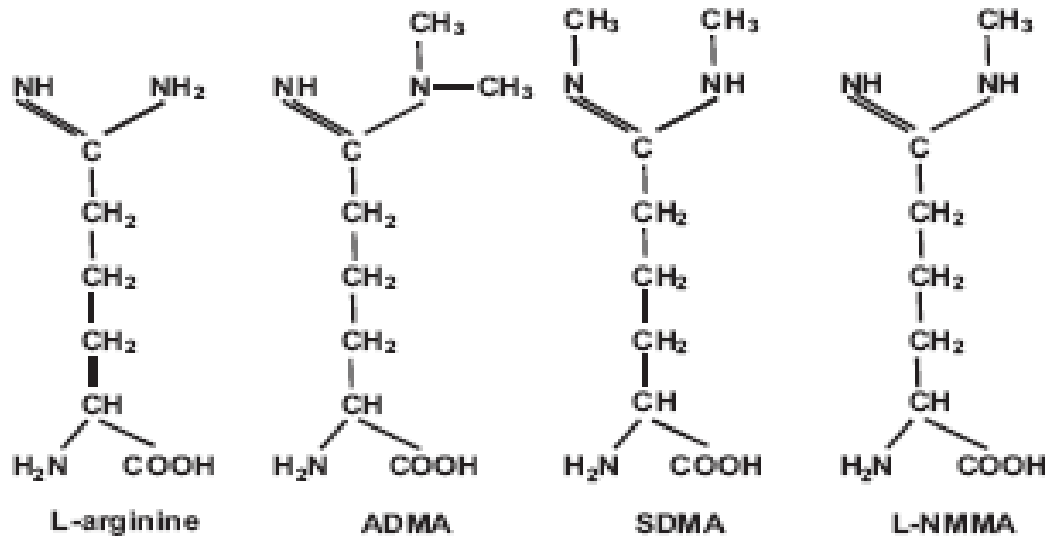
Arjinin analogu olup, nitrik oksit sentazın (eNOS) yarışmalı inhibitörüdür.¹⁹ eNOS'u inhibe ederek NO düzeylerini düşürme yanında asimetrik dimetilarjinin (ADMA) süperoksit üreterek NO'yu ortamdan uzaklaştırabilir.⁴¹

ADMA serbest arjininin metillenmesiyle değil, proteinlerdeki arjinin yan zincirlerinin, arjinin N-metiltransferaz tip 1 (PMRT) aracılığı ile metillenmesi sonucu oluşur. Bu proteinler çekirdekte bol miktarda bulunurlar ve RNA işlenmesi ve transkripsiyonel kontrolünde rol oynarlar.¹³⁰ Memeli dokularında iki farklı tip PMRT aktivitesi tarif edilmiştir. PMRT tip 1 arjinin artıklarını, hem monometiller hem de dimetiller. Dimetilasyon, asimetrik gerçekleşir. PMRT tip 2 ise, monometilasyon yanında, simetrik dimetilasyon yapar ve simetrik dimetil arjinin (SDMA) oluşur.^{66,159} ADMA' nın stereoizomeri olan SDMA'nın NOS üzerine bilinen bir etkisi yoktur. O halde ADMA' nın ana kaynağı PMRT tip 1 etkinliğidir.

PRMT, metil verici olarak S-adenozil metiyonini (SAM) kullanır ve yan ürün olarak homosistein verme potansiyeli olan S-adenozil homosistein (SAH) ortaya çıkar.

Tüm SAM bağımlı metiltransferazlar gibi PMRT etkinliği de hücre içi SAM ve SAH konsantrasyonları ile denetlenir. SAM artışı, PMRT’i aktive ederken SAH artışı ise bu etkinliği baskılar. ADMA, metilenmiş arjinin artıkları taşıyan proteinlerin proteolizi ile oluştuğundan, artmış SAM bağımlı metilenmiş proteinler, ADMA’nın artmasına neden olurlar.

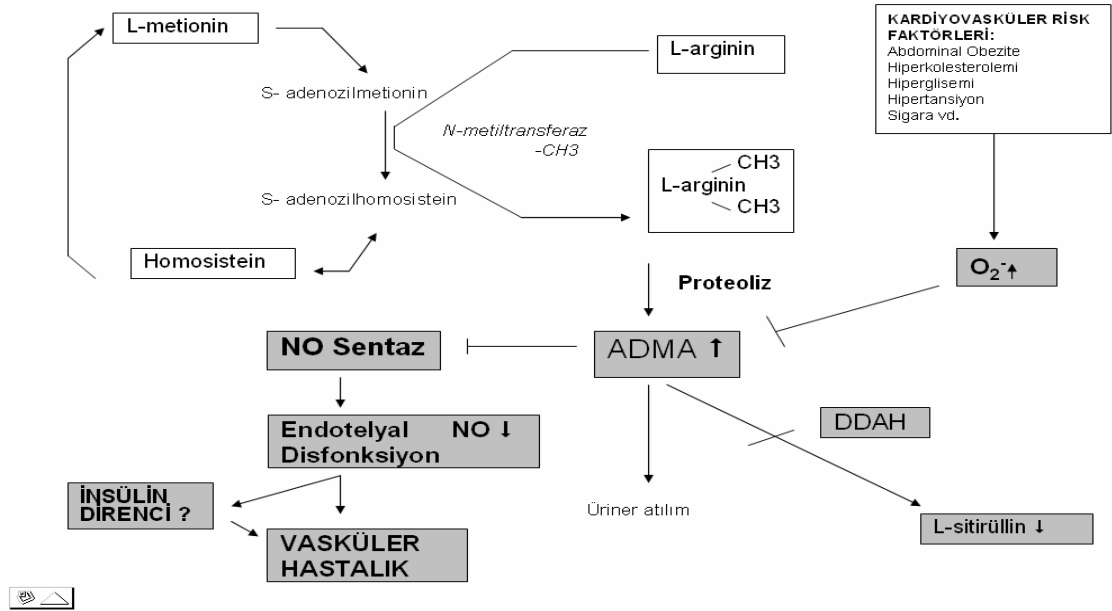
Farklı proteinlere özgüllük gösteren birkaç tip I PMRT mevcuttur.¹³⁰ Tip II PMRT’ nin bilinen tek substratı “myelin temel proteini”dir. Bu proteinler hidrolize olduklarında metilenmiş arjinin rezidüleri serbest kalır. Endojen metilarjininlerin kimyasal yapısı şekil 2’de gösterilmiştir.



Şekil 2. Endojen metilarjininlerin kimyasal yapısı¹³

Metillenmiş arjininler, idrarla ekskrese edilir.⁸⁷ Bu durum renal yetmezlikli hastalardaki yüksek plazma ADMA düzeylerini açıklamaktadır. Metilenmiş arjininler metabolize de edilebilirler. Küçük bir miktar dimetilarjinin pirüvat transferaz ile böbrekte, bir kısım da asetilasyon ile karaciğerde metabolize edilir. Bununla birlikte ADMA için ana

metabolik yol dimetilarjinin dimetilaminohidrolazdır (DDAH).¹³⁷ Bu enzim ADMA' yı dimetilamin ve L-sitrüllin'e parçalar. Böylelikle DDAH normal protein dönüşümü sonucu dokuda sürekli üretilmekte olan ADMA' nın birikmesini önler. Memeli hücrelerinde iki ayrı izoformu gösterilmiştir. Her iki izoform da bütün hücre tiplerinde bulunur. DDAH-I tipik olarak nNOS eksprese eden dokularda bulunurken DDAH-II ise özellikle eNOS içeren dokularda (endotel gibi) bulunur.¹⁰⁵ DDAH ve NOS' ın endotelde birlikte lokalize oluşları hücre içi ADMA konsantrasyonunun NO oluşturan hücrelerde aktif ve hücreye spesifik şekilde düzenlendiği hipotezini desteklemektedir.¹⁹² ADMA' nın sentezi ve yıkımı şekil 3'te sunulmuştur.



Şekil 3. ADMA Sentezi, Yıkılımı ve Etkileri¹⁹⁸

DDAH, ADMA düzeylerinin düzenlenmesinde önemli rol oynar. SDMA intravenöz olarak enjekte edildiğinde, %60'ı idrarla geri atılır. Ama intravenöz uygulamanın ardında ADMA'nın sadece %5'i idrarla atılır.¹²⁰ Ayrıca renal yetmezlikte plazma SDMA oranındaki artış plazma ADMA oranındaki artıştan çok daha fazladır.¹¹² Bu veriler DDAH'nın substratının, SDMA değil ADMA olduğunu açıkça ortaya koymaktadır.¹³⁷

İzole vasküler segmente bir DDAH inhibitörü olan 4124W eklenmesi vazokonstriksiyona neden olmakta; bu etki ortama L-arjinin eklenmesi ile geri dönmektedir.¹¹¹ Bu bulgu ADMA'nın normal protein döngüsü esnasında sabit olarak üretildiği görüşü ile de uyumludur. ADMA üretimi DDAH ile metabolize edilmesiyle dengelenir. Bundan dolayı DDAH aktivitesinin inhibisyonu, vazokonstriksiyonu uyarmaya yeterli miktarda ADMA'nın birikmesine neden olur. Hiperkolesterolemi, hiperglisemi ve oksidatif stres, DDAH aktivitesini inhibe eder.

Birçok biyolojik aktiviteye sahip olan NO' nun kan ve/veya doku düzeylerinin belirli aralıkta tutulması gerekir ki hücre üzerine zararlı etkileri önlenebilsin. Bu da ADMA gibi hücreye spesifik endojen NOS inhibitörleri ile sağlanır. Bu endojen inhibitörlerin varlığı L-arjinin paradoksunu da açıklar. Arjinin paradoksu, NO sentezinin arjinine duyarlılığı ile ilgili invivo ve invitro gözlemler arasındaki uyumsuzlukla ilgilidir. NO aminoasit öncülü olan L-arjinin memeli organizmalarda hız sınırlayıcı enzim NOS' ın Km değerini geçecek konsantrasyonlarda bulunur. Yapılan hücre çalışmaları, NOS' ın L-arjinin için Km'si mikromolar düzeyinde bulunmuştur.¹⁵⁴ Buna göre L-arjinin NO sentezi için hız kısıtlayıcı olmamalıdır, çünkü plazmada 50 mikromol civarında bulunur ve endotel hücrelerde de milimolar düzeyinde bulunur. Bu nedenle teorik olarak, L-arjinin verilmesi NO oluşumunu artırmamalıdır, denilebilir. Ama birçok invivo çalışma

göstermiştir ki L-arjinin verilmesi, NO üretimini artırmaktadır.¹⁸ Bu da olasılıkla verilen L-arjininin endojen NOS inhibitörlerinin etkisini antagonize etmesiyle gerçekleşmektedir.

2.5.1. Yüksek Kan Glukozu, Bozulmuş Glukoz Toleransı ve ADMA

Diyabetik rat modelinde, plazma ADMA düzeylerinin arttığı ve yüksek konsantrasyonda glukozu maruz kalan insan hücrelerinde, DDAH aktivitesinin bozulduğu gözlenmiştir.¹⁰⁸ DDAH aktivitesinin bozulmasının altında yatan mekanizmanın glukozu bağlı oksidatif stres olduğu düşünülmektedir. Diyabetik bireylerde, plazma ADMA düzeyi, bireyin insülin duyarlılığı ile korelasyon gösterirken, kan glukoz düzeyi ile korelasyon göstermemektedir.¹⁷⁹ Diyabetik bireylerde plazma ADMA düzeyleri ile ilgili çalışma sonuçları çelişkilidir. Bazı çalışmalarda ADMA düzeyi yükselmiş bulunurken, bazılarında azalmış olduğu gözlenmektedir.¹⁴⁷

2.5.2. Oksidatif Stres ve ADMA

Oksidatif stres, DDAH aktivitesini bozarak, plazma ADMA düzeylerini yükseltebilir.¹⁸² DDAH katalitik fonksiyonu için önemli olan 4 tane redoks sensitif sistein grubu taşır.^{139,183} Oksidize LDL'nin DDAH aktivitesini azalttığı⁸³ ve hücrel ADMA salınımını artırdığı bulunmuştur. Okside LDL hücre kültüründe, PMRT ve hücrel ADMA sentezinin artmasına neden olur.²³ Bu etki antioksidanlarla engellenebilmektedir.

Bununla birlikte vitamin C ve E ya da n-asetil-sistein gibi antioksidanların plazma ADMA düzeyleri üzerine etkisinin olmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur.^{47,146,164}

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ve GATA Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Çalışmaya; Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalı polikliniğine Mayıs ile Ağustos 2006 tarihleri arasında başvuran 25 PKOS tanısı konulmuş hasta dahil edildi. Hastaların yaşları 18-35 (ortalama $\pm$ standart sapma: 23,6 $\pm$ 4,9) arasında idi.

PKOS tanısı klinik olarak: Kronik oligomenore ve/veya hirsutizm, ve bunlara ek olarak;

1. Ultrasonografide bilateral büyük overler, kortikal olarak inci kolyesi tarzında dizilimli 10'dan fazla 2-8 mm'lik folliküler ve stromanın artması ve/veya

2. LH/FSH oranının 1.5' un üzerinde olması

3. Serumda artmış androjen düzeyleri saptanmasıyla konuldu.

İnsülin direnci tanısı; HOMA-IR: Açlık Plazma Glukozu X Açlık Serum İnsülin / 405 ile konuldu.

Dışlama kriterleri ise oligomenoresi ve/veya hirsutizmi olup: Son 6 ay içinde herhangi bir nedenle steroid veya seks hormonları içeren bir ilaç alan hastalar, son 6 ay içinde hirsutizmle ilişkisi olduğu bilinen herhangi bir ilaç alan hastalar, hiperprolaktinemisi olan hastalar, konjenital adrenal hiperplazisi olan veya 17- α hidroksiprogesteronu patolojik düzeyde yüksek olan hastalar, Cushing sendromu olan, tiroid hastalığı olan hastalar, hiperandrojenemiye neden olabilecek fonksiyonel tümörü olan hastalar, olarak belirlendi.

Ayrıca hipertansiyonu, sigara içme öyküsü ve bozulmuş glukoz toleransı ve/veya diyabeti bulunan hastalar da çalışma dışı bırakıldı.

Kontrol grubunu anamnezlerinde herhangi bir hastalık ve menstrüel düzensizlik bulunmayan, hiperandrojenemisi olmayan ve USG’ de polikistik over görüntüsü olmayan sağlıklı kadınlar oluşturdu. Kontrol grubunu oluşturan sağlıklı gönüllülerin yaşları 23-33 (ortalama±standart sapma: $25,7 \pm 8,2$) arasında idi.

Çalışmamıza katılan tüm kadınlara, çalışma hakkında ayrıntılı açıklama yapılarak onayları alındı. Bu kadınların ayrıntılı anamnezlerini takiben kilo ve boyları ölçülerek vücut kütle indeksleri (VKİ) kg/m^2 olarak hesaplandı ve 25 kg/m^2 şişmanlık sınırı olarak alındı.

Çalışmaya katılan tüm kadınların ultrasonografik incelemeleri yapıldı.

3.1. Çalışma Düzeni

Venöz kan ön koldan sabah saat 08.00 ile 10.00 arasında, 8 saatlik açlığı takiben alındı. Alınan kanlarda asimetrik dimetil arjinin (ADMA), nitrik oksit (NO), luteinizan hormon (LH), folikül stimulan hormon (FSH), prolaktin (PRL), östradiol, androstenedion, total testosteron, serbest testosteron, progesteron, β -hCG, 17 hidroksiprogesteron, dihidroepiandrostenedion sülfat (DHEAS), açlık kan şekeri (AKŞ), açlık insülin ve lipit profili ölçümleri yapıldı. Tüm hastalara 75 gramlık oral glukoz tolerans testi (OGTT) uygulandı.

3.2. Biyokimyasal Ölçümler

OGTT glukoz düzeyleri otoanalizöre (Abbott Aeroset) uyarlanmış olan heksokinaz yöntemi ile ölçüldü. Serum kolesterol ölçümünde otoanalizöre (Abbott Aeroset)

uyarlanmış olan kolesterol esteraz kullanıldı. Serum HDL düzeyi fotometrik eliminasyon yöntemi ile ölçüldü (Abbott Aeroset). Serum trigliserit düzeyleri otoanalizöre uyarlanmış fotometrik yöntemle çalışıldı. Serum LDL düzeyi Friedewald formülü ile hesaplanır:

$LDL-K = \text{Kolesterol} - (\text{HDL-K}) - (\text{VLDL-K})$. Serum VLDL düzeyi serum trigliserit düzeyinin beşe bölünmesiyle hesaplanır: $VLDL-K = TG/5$. Serum üre nitrojen (BUN) düzeyleri otoanalizöre (Abbott Aeroset) uyarlanmış enzimatik üreaz yöntemiyle çalışıldı. Serum kreatinin düzeyleri otoanalizöre (Abbott Aeroset) uyarlanmış renk oluşturma reaksiyonu olan pikrat reaksiyonu ile ölçüldü. Serum albumin düzeyleri de yine otoanalizöre (Abbott Aeroset) uyarlanmış renk oluşturma reaksiyonu olan bromkresol yeşili reaksiyonu ile ölçüldü.

3.3. Hormonal Ölçümler

Serum LH, FSH, total testosteron, PRL, östradiol, progesteron ve DHEAS düzeyi ticari kite uyarlanmış kemilüminesans mikropartikül immunoassay yöntemi ile çalışıldı (Abbott Architect). Serum total östriol, serbest testosteron, androstenedion, $17\alpha\text{-OH}$ progesteron, düzeyi radyoimmunoassay (RIA) yöntemi ile çalışıldı.

3.4. Deneyde Uygulanan Yöntemler

3.4.1. Serum glukoz düzeylerinin çalışılması

3.4.1.1. Prensip

Serum açlık glukoz düzeylerinin ölçümünde otoanalizöre (Abbott Aeroset) uyarlanmış olan heksokinaz (Glukoz Reagent Kit, List No. 7D66) kullanıldı.

Glukoz, adenzin trifosfat (ATP) ve magnezyum iyonlarının varlığında glukoz-6-fosfat (G-6-P) ve adenzin difosfat (ADP) oluşturmak üzere heksokinaz ile fosforile edilir. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G-6-PD) spesifik olarak G-6-P'ı 6-fosfoglukonata oksidize eder. Bu reaksiyon esnasında nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP) indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit fosfata (NADPH) dönüşür. Tüketilen her mikromol glukoz için bir mikromol NADPH üretilir. NADPH 340 nm de absorbe edilen ışık üretir. Absorbansdaki artış spektrofotometrik olarak ölçülebilir.

3.4.1.2. Uygun Numuneler

Glukoz düzeyi serum, plazma, idrar ve beyin omurilik sıvısında (BOS) ölçülebilir.

3.4.1.3. Referans Aralığı

Amerika Diyabet Topluluğu açlık glukoz konsantrasyonunun 'normal' değerinin üst sınırının 109 mg/dl (6.0 mmol/L) olarak kullanılmasını önermektedir.^{57,163} Popülasyon referans aralıkları çeşitli metinlerde ve yayınlarda farklılık göstermektedir. Açlık serum glukoz düzeylerinin erişkindeki referans aralığı 70 – 105 mg/dl (3.89 – 5.83 mmol/L) dir.

3.4.1.4. Linearite

Serum glukozu 761 mg/dl (42.24 mmol/L) 'ye kadar lineerdir.

3.4.1.5. Dedeksiyon Limiti

0.3 mg/dl (0.017 mmol/L) dir.

3.4.1.6. İnterferans

Hiperbilirubinemi, hiperlipidemi ve hemoliz varlığında yanlış düşük veya yanlış yüksek sonuçlar ölçülebilir.

3.4.1.7. Birim

mg/dl veya mmol/L dir.

3.4.2. Serum İnsülin Düzeylerinin Çalışılması

3.4.2.1. Prensip

Serum açlık insülin düzeyleri ticari kitle uyarlanmış kemilüminesans mikropartikül immunoassay yöntemi (CMIA) ile çalışıldı (Abbott Architect).

Tek basamak immunoassay olan bu yöntemde ilk aşamada anti-insülin (fare, monoklonal) kaplı paramanyetik mikropartiküller ve anti-insülin akridinyum işaretli konjugat birleştirilir. Numunede var olan insülin anti-insülin kaplı paramanyetik mikropartiküller ve anti-insülin akridinyum işaretli konjugata bağlanır. Yıkamanın ardından reaksiyon karışımına %1.32 (w/v) hidrojen peroksit içeren Pre-Trigger ve 0.35 N sodyum hidroksit içeren Trigger solüsyonları eklenir; oluşan kemilüminesans reaksiyonu bağlı ışık üniteleri (RLUs) ile ölçülür. Numunedeki insülin miktarı ile Architect immunoassay optik sisteminin okuduğu RLUs arasında direk ilişki mevcuttur.

3.4.2.2. Uygun Numuneler

İnsülin düzeyi serum ve plazmada ölçülebilir.

3.4.2.3. Analitik Sensitivite

Sensitivite sıfırdan farklı ölçülebilir en düşük insülin düzeyini yansıtır. Bu metot için 1.0 $\mu\text{U/mL}$ ’ den iyi olduğu ölçülmüştür.

3.4.2.4. Spesifite

Spesifite aşağıdaki maddeleri içeren serum örneklerinin test edilmesiyle değerlendirilmiştir. Bu maddeler %10 dan düşük interferans göstermişlerdir.

Test bileşeni	Test konsantrasyonu
Bilurubin	20 mg/dl
Hemoglobin	500 mg/dl
Total protein	12 g/dl
Trigliserit	3000 mg/dl

3.4.2.5. İnterferans

Hemolizli numunelerde yanlış düşük insülin düzeyi sonuçları alınabilir. Fare monoklonal antikoları ile hazırlanmış bileşikler tedavi amacıyla kullanan ya da insülin kullanan hastalarda yanlış düşük veya yanlış yüksek sonuçlar alınabilir.

3.4.2.6. Birim

$\mu\text{U/mL}$ veya pmol/L dir.

3.4.3. Serum NO Düzeylerinin Çalışılması

3.4.3.1. Prensip

Hasta ve kontrol grubunun serum nitrat düzeyleri Griess reaksiyonu temeline dayanan diazotizasyon metodu ile ölçüldü.¹²³

3.4.3.2. Reaktifler

- 1 Vanadyum III Chloride (VaCl_3): 80 mg VaCl_3 + 10 ml 1 M HCl
- 2 Griess Solüsyonu: sülfanilamide + NEDD
- 3 Sülfanilamid: 1 gr sülfanilamid + %5 lik 50 ml HCl de
- 4 N-(1-Naphythyl) ethylenediamine dihydrochloride (NEDD): %0,1'lik olacak şekilde, 50 mg NEDD + 50 ml deiyonize suda
- 5 Standartlar

3.4.3.3. Standartlar

85 mg sodyum nitrat (NaNO_3) tartılıp üzerine 10 ml deiyonize su eklenerek 100 mM'lık stok NaNO_3 hazırlandı. 100 mM NaNO_3 standart stok solüsyondan 10 mM, 1 mM, 100 μM , 50 μM , 25 μM , 10 μM , 5 μM , 1 μM nitrat standartları hazırlandı.

Tablo 2. Serum NO düzeylerinin çalışılması için gerekli reaktif ve gereçler

1	Sodyum nitrat (NaNO_3)	Merck 6535
2	Vanadyum(III) klorid (VaCl_3)	Aldrich 08728JC-384
3	Sülfanilamide	Sigma S9251 %99
4	N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NEDD)	Sigma
5	Hidrojen klorür (HCl)	Sigma H7020
6	Etanol	Merck
7	Spektrofotometre	Biokit ELx 800
8	Santrifüj	MLPW-350R
9	Terazi	Shimadzu AX 200
10	Vortex	Reamix 2789
11	pH metre	Jenway 3510
12	ELİSA plağı	96 çukurlu
14	Otomatik pipetler	Genex

3.4.3.4. Numunelerin Hazırlanması

Serum örneklerini deproteinize etmek için 1 birim serum + 2 birim etil alkol eklenir ve +4 °C de 30 dk beklenir. Numuneler vortexlenir ve 14 000 rpm de 5 dk santrifüj edilir.

3.4.3.5. Deneyin Çalışılması

Serum örneklerinin deproteinizasyon ve çöktürme işlemlerinden sonra 96 çukurlu ELISA plağına standart solüsyonları ve numuneler her birinden çift tekrar olacak biçimde 100 µl konur. Üzerine $VaCl_3$ yine 100 µl olacak şekilde konur. Daha sonra 100 µl Griess solüsyonu (0,5 birim sülfanilamid + 0,5birim NEDD karışımı) eklenir. 37 °C etüvde 30 dk bekletilir. 540–550 nm dalga boyunda ELİSA okuyucusunda okunur. ELİSA okuyucusu tarafından standart solüsyonlara karşılık gelen absorbansların oluşturduğu doğrusal regresyon grafiklerine göre numunelerimiz değerlendirilmektedir.

Elde edilen absorbans değerleri standart grafikleri yardımı ile konsantrasyonları hesaplanır ve sonuçlar 1/3 dilüsyondan ötürü 3 ile çarpılır.

3.4.3.6. Birim

µmol/L

3.4.4. Plazma ADMA Düzeylerinin Çalışılması

3.4.4.1. Prensip

Hasta ve kontrol grubunun plazma ADMA konsantrasyonları Chen ve arkadaşlarının tarif ettiği yüksek performans sıvı kromatografi yöntemiyle çalışıldı.³⁶ Bu metotta numuneler önce katı 5-sulfosalisilik asit (5-SSA) ile deproteinize edilir. o-fitaldialdehit (OPA) florojenik reaktif olarak kullanılır.

3.4.4.2. Reaktifler ve Standartlar

Amino asitler ve ADMA Sigma'dan (St. Louis, MO, USA) alındı. Stok standart solüsyonu (0.5 mM) 0,1 M HCl içinde hazırlandı ve buzdolabında bekletildi. Çalışma standart solüsyonu (50 µM) stok solüsyonunun 0.1 M HCl ile dilüe edilmesiyle hazırlandı. o-fitaldehit (OPA) ve 2-merkaptoetanol Sigma'dan alındı. Analitik-grade reaktifleri olarak tetrahidrofuran (THF), sodyum asetat ve asetik asit kullanıldı. Mobil fazın hazırlanmasında HPLC-grade metanol ve Milli-Q kalite su kullanıldı.

3.4.4.3. Gereçler

Kromatografik çalışma iki pompa, otoenjektör, kolon fırını, floresans detektör ve veri işlemcisiinden oluşan HPLC Agilent 1100 sistemi kullanılarak yapıldı. Ayrıştırma partikül çapı 5 µm olan 150x4.6 mm Phenomenex C18 ODS kolonu ile yapıldı. Analitik kolon C18 guard-pak kartuş (Waters, Millipore, Milford, MA, ABD) ile korundu.

Tablo 3. Plazma ADMA düzeylerinin çalışılması için gerekli reaktif ve gereçler

1	Metanol HPLC Grade	Merck 1.06007
2	Tetra Hidro Furan HPLC Grade	MERCK 1.08114 Extra Pure
3	Merkapto Etanol HPLC Grade	Sigma M 6250
4	5-Sülfosalisilik Asit	Merck S4447591
5	Dimetil Arginin Hidro Klorid (ADMA)	Sigma D 4268
6	Fitaldialdehit (OPA)	Sigma P 0657
7	Sodyum Asetat Trihidrat	Sigma
8	Borik Asit	Sigma B 0394
9	Numune Süzme Filtresi	ALLTECH 13mm 0.2µm PTFE
10	Kolon	Phenomenex Hypersil Partikül Çapı 5 U C18 ODS 150X4,6 Mm
11	Koruyucu Kolon	C18 Guard-Pak Cartridge (Waters, Millipore) 5 Li Mm

3.4.4.4. Kromatografik Koşullar

50 mM sodyum asetat (pH 6.8), metanol ve THF (A, 82:17:1; B, 22:77:1) den oluşan mobil faz kullanılmadan önce ultrasonik yolla degase edildi. Mobil fazın her bileşeni 0.2-µm lik filtrelerden geçirildi. Ayırıştırma 27°C’ de ve 1.0 ml/dakiklık akım hızında yapıldı. Gradientler tablo 6’da verildi. Floresans detektörü dalga boyu eksitasyon

ve emisyon için 338 nm ve 425 nm olarak tayin edildi. Ölçümde elde edilen pik alanları kullanıldı.

Tablo 4. OPA-ADMA ve OPA-AAs türevlerinin ayrıştırılması için gradient programı

Zaman (dakika)	A (%)	B (%)
0	95	5
6	88	12
16	60	40
28	25	75
32	0	100
34	0	100
35	95	5

Çözücüler: A=50 mM sodyum asetat pH 6.8-metanol-THF (82:17:1, v/v); B=50 mM sodyum asetat pH 6.8-metanol-THF (22:77:1, v/v).

3.4.4.5. Numunelerin Hazırlanması

Hasta ve kontrol grubundan heparinize tüplere venöz tam kan alındı. Alınan kanların 3000 g de 5 dakika çevrilmesi ile plazmalar elde edildi. 1.0 ml plazmaya 20 mg 5-SSA eklendi ve karışım 10 dakika buz banyosunda bekletildi. Numuneler 2000 g' de 10 dakika santrifüj edilerek çökmüş olan proteinler uzaklaştırıldı. Elde edilen süpernatantlar analiz için 0.2 µm' lik filtrelerden geçirildi. Recovery deneyi için 1–20 nmol ADMA 1.0 ml plazmaya eklenip, deproteinizasyon yukarda tarif edildiği şekilde yapıldı.

3.4.4.6. OPA Reaktifi ve ADMA Derivatizasyonu

OPA (10 mg) 0.5 ml metanol ve 2 ml, 0.4 M borat tamponu (potasyum hidroksit ile pH'ı 10 a ayarlanmış 0.4 M borik asit) içinde çözüldü ve 30 µl merkaptotanol eklendi. Bu solüsyon sadece 2 gün bekleyebilir. Derivatizasyon 10 µl örnek veya çalışma standart solüsyonu ve 100 µl OPA reaktifinin karıştırılması ile yapıldı ve kolona otoenjeksiyon yapılmadan önce 3 dakika reaksiyon için beklendi.

3.4.4.7. ADMA' nın Plazmadaki Diğer Aminoasitlerden Ayırıştırılması

Sağlıklı bir insanda ADMA' nın plazmadaki konsantrasyonu diğer amino asitlerden çok daha düşüktür (arjinin için yaklaşık 1:50). Eğer çalışma şartları uygun değilse diğer amino asit piklerinin özellikle de arjinin pikinin interferansından dolayı iyi ve doğru bir ölçüm yapmak mümkün olmayabilir. Mobil faz ve gradientlerin optimal olması ADMA çözünürlüğünün artması için önemlidir. ADMA piki arjinin ve aminobütirik asit (GABA) piki arasında çıkar. Arjinin ve sitrüllin yapısal olarak ADMA'ya çok benzedikleri için interferans verme olasılığı en yüksek olan amino asitlerdir. Mobil fazdaki THF oranı ADMA ayırıştırılması için çok önemlidir. Oranı %1 den az olursa arjinin ve ADMA ayırıştırılması yapılamaz. Oran %1 den fazla olursa seriler arasındaki amino asit retansiyon zamanı çok fazla değişiklik gösterir.

3.4.4.8. Birim

µmol/L

3.5. İstatistiksel Değerlendirme

Tüm veriler ortalama±standart sapma (mean±SD) olarak verildi. İstatistiksel hesaplamalar ve grafiklerin çiziminde, istatistik paket programı SPSS (Statistical Package for the Social Sciences Program, for windows 10.01) ile Microsoft Excel (for windows XP) programları kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırmalar için her değişken için normal dağılıma uygunluğu tek örnek Kolmogorov Smirnow Testi ile değerlendirilmiş, olgu ve kontrol gruplarının karşılaştırması normal dağılıma uygun olan değişkenlerde t testi ile normal dağılıma uymayan değişkenlerde Mann Whitney U testi ile yapılmıştır. Korelasyon katsayıları pearson ve spearman korelasyon ile hesaplanmıştır. $p<0,05$ olan değerler istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Polikistik over sendromu tanısı konulan 25 hasta olgu grubu olarak ve 25 sağlıklı olgu kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi.

Araştırma grubunun tümü değerlendirildiğinde ortalama yaş $25,48 \pm 4,48$, vücut kitle indeksi (VKİ) $24,40 \pm 5,83$, saptandı (Tablo 5).

Tablo 5. Araştırma Grubunun Bazı Tanımlayıcı İstatistikleri

	Ortalama $\pm$ SS	Ortanca	Minimum	Maksimum
Yaş (yıl)	$25,48 \pm 4,48$	25,50	19,00	36,00
VKİ (kg/m ²)	$24,40 \pm 5,83$	23,05	16,48	39,55
BUN (mg/dl)	$9,26 \pm 2,15$	9,00	6,00	17,00
Kreatinin (mg/dl)	$0,76 \pm 0,09$	0,80	0,50	1,00
Albumin (g/dl)	$4,69 \pm 0,32$	4,70	3,00	5,10
HDL (mg/dl)	$44,70 \pm 7,83$	44,00	30,00	68,00
TG (mg/dl)	$99,12 \pm 42,06$	89,00	37,00	185
T. KOL. (mg/dl)	$155,00 \pm 26,04$	158,00	75,00	195,00
LDL (mg/dl)	$92,46 \pm 20,61$	96,00	52,00	127,00
Glukoz (mg/dl)	$89,36 \pm 9,01$	89,5	70	105
İnsulin (U/ml)	$9,59 \pm 5,27$	7,44	3,30	26,20
HOMA	$2,14 \pm 1,23$	1,55	0,64	6,21
ADMA (mikromol/L)	$0,97 \pm 0,51$	0,88	0,28	2,51
NO (mikromol/L)	$18,42 \pm 20,34$	13,39	0,49	105,73

Hastaların yaşları 19–36 (ortalama $\pm$ standart sapma: $24,64 \pm 4,93$) arasında idi. Kontrol grubunu oluşturan sağlıklı gönüllülerin yaşları ise 20–34 (ortalama $\pm$ standart sapma: $26,32 \pm 3,89$) arasında idi.

Tüm olguların VKİ' leri hesaplandı. Hasta grubunun VKİ' leri 16,48–39,55 kg/m² (ortalama $\pm$ standart sapma: $26,35\pm7,05$), kontrol grubununkiler ise 17,10–29,06 kg/m² (ortalama $\pm$ standart sapma: $22,46\pm3,43$) arasında bulundu.

Tüm olgularda insülin direnci parametresi olarak HOMA değeri hesaplandı. Yine tüm olgularda serum NO düzeyleri ve plazma ADMA düzeyleri çalışıldı. Kontrol grubunun sonuçları ile karşılaştırıldığında PKOS' lu olgularda HOMA-IR anlamlı yüksek ($p<0.01$), ADMA anlamlı yüksek ($p<0.01$)ve NO anlamlı düşük ($p<0.05$) saptandı. Diğer kan değerleri bakımından iki grup arasında istatistiksel fark bulunmadı. Tüm parametrelerin sonuçları tablo 6 ve şekil 4 ve 5 de sunulmuştur.

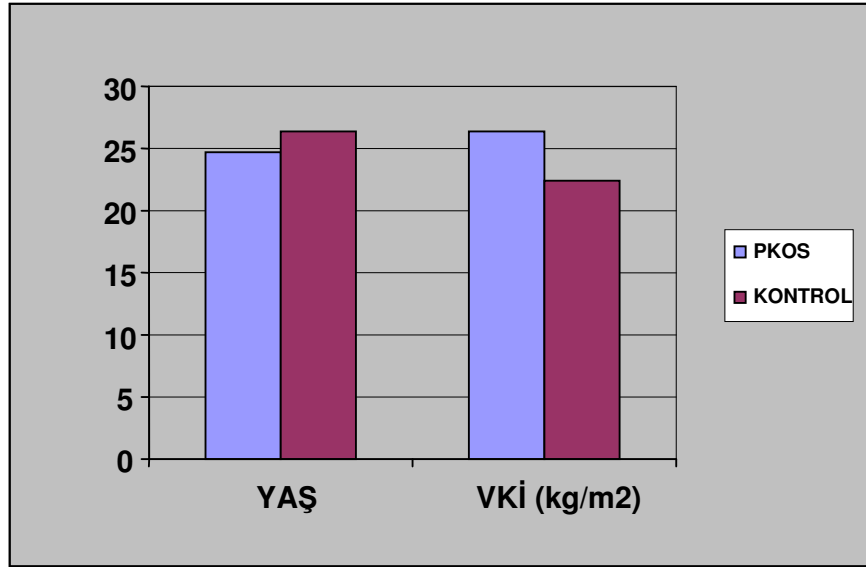
Tablo 6. Araştırma Grubunda Olgu ve Kontrol Gruplarının Karşılaştırmaları

	Olgu		Kontrol		
	Ort±SS	Ortanca (Min.-Maks.)	Ort±SS	Ortanca (Min.-Maks.)	P
Yaş (yıl)	24,64±4,93	23,00 (19,00-36,00)	26,32±3,89	26,00 (20,00-34,00)	†0,188
VKİ (kg/m ²)	26,35±7,05	24,40 (16,48-39,55)	22,46±3,43	21,32 (17,10-29,06)	‡0,510
BUN (mg/dl)	9,36±2,36	9,00 (6,00-17,00)	9,16±2,15	9,00 (6,00-16,00)	‡0,804
Kreatinin (mg/dl)	0,78±0,07	0,80 (0,70-0,90)	0,76±0,11	0,80 (0,50-1,00)	‡0,482
Albumin (g/dl)	4,74±0,19	4,70 (4,50-5,10)	4,65±0,41	4,70 (3,00-5,10)	‡0,710
HDL (mg/dl)	46,36±7,66	45,00 (34,00-68,00)	43,04±7,80	43,00 (30,00-63,00)	‡0,075
TG (mg/dl)	100,00±48,63	83,00 (37,00-185,00)	98,24±35,29	96,00 (44,00-178,00)	†0,884
T. KOL. (mg/dl)	159,56±28,93	167,00 (75,00-195,00)	150,44±22,54	148,00 (110,00-185,00)	‡0,121
LDL (mg/dl)	96,04±20,87	97,00 (52,00-127,00)	88,88±20,13	87,00 (55,00-12,00)	†0,223
Glukoz (mg/dl)	90,48±7,60	90,00 (80,00-103,00)	88,24±10,26	89,00 (70,00-105,00)	†0,385
İnsulin (U/ml)	12,27±5,88	11,40 (3,39-26,20)	6,92±2,71	6,30 (3,30-15,70)	†0,001*
HOMA	2,76±1,37	2,65 (0,79-6,10)	1,52±0,66	1,42 (0,64-3,30)	‡0,001*
ADMA (mikromol/L)	1,20±0,47	1,07 (0,43-2,51)	0,75±0,45	0,73 (0,28-2,27)	‡0,001*
NO (mikromol/L)	10,66±9,55	5,99 (0,49-35,74)	25,85±24,96	16,23 (2,74-105,73)	‡0,008*

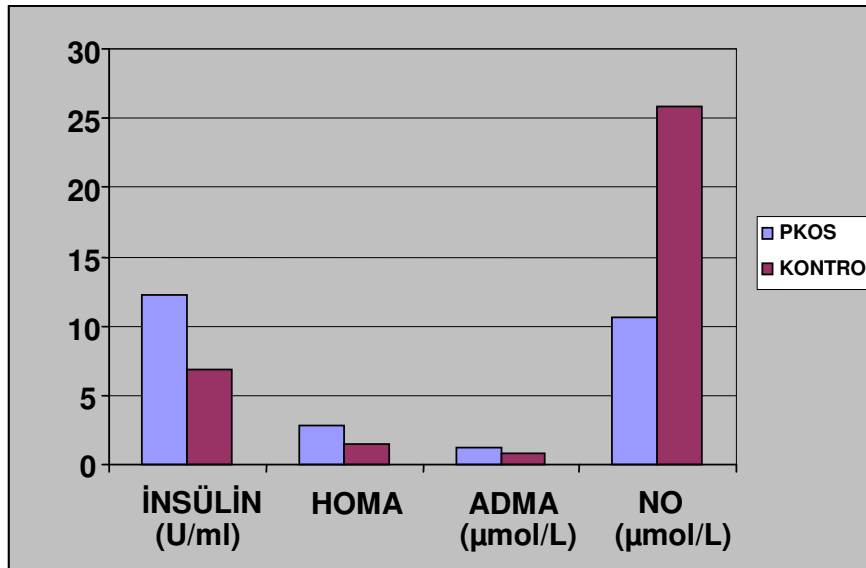
‡ Mann Whitney U test

† t test

* p<0,05



Şekil 4. PKOS ve Kontrol Grubunun Yaş ve VKİ Değerleri

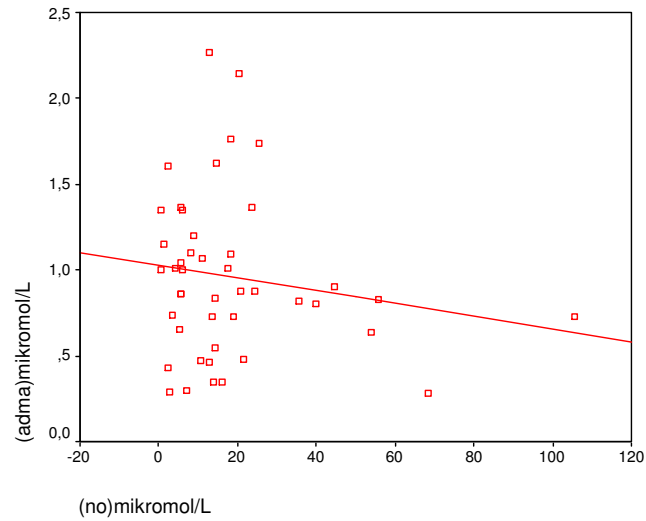


Şekil 5. PKOS ve Kontrol Gruplarının Bazı Kan Değerleri

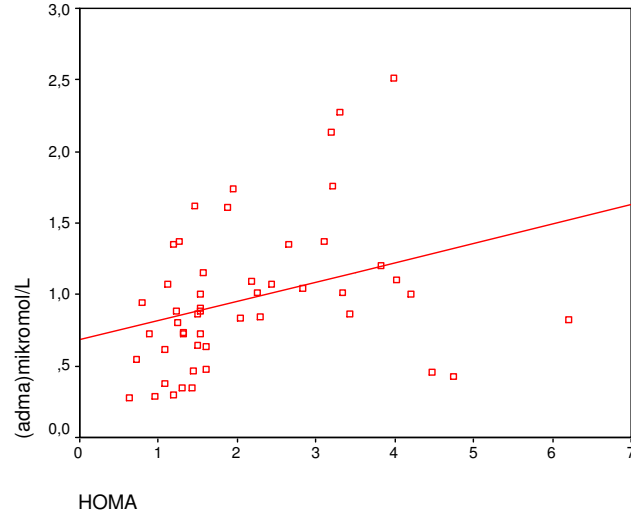
İnsülin, HOMA, ADMA ve NO arasındaki korelasyonlar incelendiğinde de sadece insülin ile HOMA arasında istatistiksel olarak anlamlı ve güçlü bir korelasyon bulunmuş diğer değişkenler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır. (Tablo 7 ve Şekil 6-7-8)

Tablo 7. Bazı Veriler Arasındaki Korelasyon

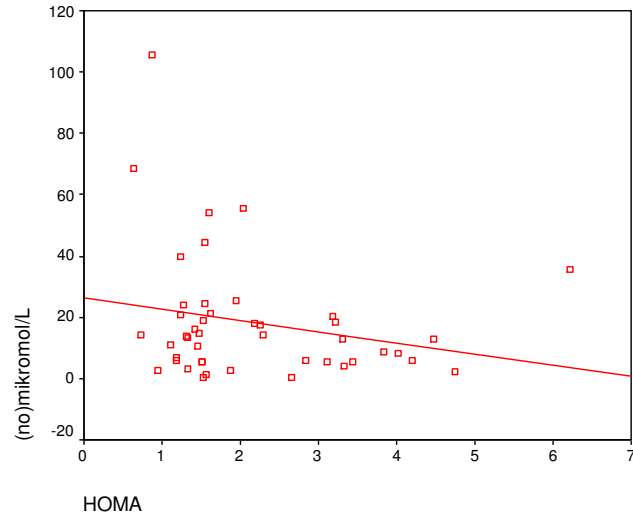
		İnsulin (U/ml)	HOMA	ADMA (mikromol/L)	NO (mikromol/L)
İnsülin (U/ml)	R				
	p				
HOMA	R	,983			
	p	,000			
ADMA (mikromol/L))	R	,348	,328		
	p	,013	,020		
NO (mikromol/L)	R	-,215	-,222	-,160	
	p	,156	,143	,295	



Şekil 6. ADMA ve NO Arasındaki Korelasyon ($p > 0,05$)



Şekil 7. ADMA ve HOMA Arasındaki Korelasyon ($p>0,05$)



Şekil 8. NO ve HOMA Arasındaki Korelasyon ($p>0,05$)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

PKOS reproduktif dönemdeki kadınların ortalama %7'nde ortaya çıkan yaygın endokrin-metabolik bir bozukluktur.¹¹ PKOS aynı zamanda endotelial hasarın erken dönem işaretlerini de içeren⁹² ve kardiyovasküler hastalık riskini artıran çeşitli değişikliklerle karakterize bir sendromdur.^{8,184} Çok çeşitli şekillerde klinik tablo oluşturabilen bu sendromun ana karakteristikleri kronik anovulasyon, hiperandrojenizm ve insülin direncidir.⁵² PKOS'a kardiyovasküler hastalık riskini artıran birçok faktör eşlik edebilir. Bu faktörler arasında arteriyel hipertansiyon³⁸, bozulmuş glukoz toleransı ve/veya tip 2 diyabet¹⁰², dislipidemi¹⁰¹, obezite²⁹ sayılabilir.

Bu nedenlerden dolayı, özellikle genç hasta popülasyonunu etkileyen ve oldukça yaygın bir endokrinopati olan PKOS'ta erken dönem kardiyovasküler risk belirteci olabileceği düşünülen plazma ADMA düzeylerini ve endotel disfonksiyonunu yansıtabileceği düşüncesiyle de serum NO düzeylerini çalışmayı amaçladık. Bunun için, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı polikliniğine başvuran 25 genç PKOS'lu hasta ve benzer yaş grubundaki 25 sağlıklı kadından oluşan bir çalışma grubu düzenledik. Çalışma grubu düzenlenirken, yukarıda kardiyovasküler risk faktörleri olarak sayılan arteriyel hipertansiyon, bozulmuş glukoz toleransı ve/veya tip 2 diyabet ve dislipidemi dışlama kriteri olarak belirledik.

Bilinen bir kardiyovasküler risk faktörü olan obezite PKOS'lu hastalarda sık rastlanan bir klinik tablodur.⁷⁷ Obezitenin varlığı bu hastaların kardiyovasküler, endokrin ve metabolik özelliklerini etkileyebilir.⁹³ Bizim çalışmamızda PKOS'lu grubu oluşturan hastalar arasında obez olguların çok olması nedeniyle obezite dışlanamadı. Buna rağmen hasta grubu ile kontrol grubu arasında VKİ bakımından anlamlı bir fark olmayışı obezitenin interferans vermesini engellemiştir.

Obezite neden olduğu diğerk tıbbi problemlerin yanında tip 2 diyabet gelişimi, hipertansiyon, dislipidemi ve kardiyovasküler hastalıkla açıkca ilişkilidir.¹⁵³ Obezitenin tüm bu metabolik ve vasküler hastalıkların gelişimindeki rolü insülin direncinin ortaya çıkmasına bağlıdır.²⁷ İnsülin direnci iskelet kası, yağ doku ve karaciğerk gibi periferel dokulardaki insülin etkisinin azalması olarak tarif edilebilir. Yağ hücre kaynaklı ürünler (IL-6, resistin gibi) insülin etkisini etkileyebilir. Bu adipositokinler karaciğerk ve iskelet kasında insülin duyarlılığını azaltabilir ve direk ve/veya indirek mekanizmalarla endotel fonksiyonunu bozabilirler. Serbest yağ asitlerindeki artış da insülin sinyalizasyon yollarını etkileyerek insülin duyarlılığını azaltabilir.^{69,153} Benzer şekilde bu serbest yağ asitleri ve adipositokinler endotel disfonksiyonuna neden olabilirler.^{176,203}

İnsülin direnci obezitenin derecesine bağlı olarak genel popülasyonun %25'ini etkilemektedir.¹⁴⁵ İnsülin direnci PKOS'ta hem neden hem de sonuç olarak rol almaktadır ve PKOS' lu hastaların yaklaşık %50-70'ini etkilemektedir.¹⁴⁵ Bizim çalışmamızda, çalışmaya dahil edilen olguların VKİ' leri birbiriyle anlamlı farklılık göstermediğı halde hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek HOMA değerkleri bulunmuştur. Bu da göstermektedir ki obezite dışında PKOS da insülin direnci için ayrı bir risk faktörü olabilir.

İnsülin direncinin nasıl endotelial disfonksiyona neden olduğı konusu halen tartışmalıdır. Bu konuyla ilgili ilginç veriler bulunmaktadır. Quebec Kardiyovasküler Çalışmasında diyabetik olmayan bireylerde insülin direnci varlığının belirteci olan hiperinsülineminin kardiyovasküler hastalık için bağımsız bir risk faktörü olduğı ortaya konmuştur.⁴⁶ İnsülin direncinin vasküler yapı üzerinde direk etkileri olduğı da düşünülmektedir. Bu görüşe göre insülin direnci varlığında insülinin nitrik oksit üretimini uyarma özelliğı bozulmaktadır.²⁷ Bunların dışında serbest radikaller²⁸,

inflamasyon²⁰³, renin-anjiotensin sisteminin aktivasyonu⁶⁰ da insülin direnci ile endotelial disfonksiyon arasındaki ilişkinin nedenleri arasında sayılmaktadır. Özetle söylemek gerekirse obezite, insülin direnci ve endotelial disfonksiyon arasında karmaşık bir ilişki bulunmaktadır.

PKOS' lu hastalardaki kardiyovasküler mortalite ve morbidite ile ilgili çalışmalar birbirleriyle çelişkili sonuçlar gösterse^{103,151,201} de, yakın dönemde yapılmış çalışmalar bu hasta grubunda kardiyovasküler hastalık riskinin arttığını ortaya koymaktadır.^{17,37,187,201} 1930 ile 1979 yılları arasında ovaryan wedge rezeksiyon yapılan 786 PKOS' lu olgunun dahil edildiği İngiliz epidemiyolojik çalışmasında yaş ve cinsiyete göre beklenen mortalite oranları ile karşılaştırıldığında bu olgularda kardiyovasküler mortalite riskinde artış bulunmamıştır.¹⁵¹ Daha geniş bir olgu grubunda yapılan çalışmada ise düzensiz menstrüel siklusları olan kadınlarda koroner kalp hastalığı riskinde 1.53 rölatif risk artışı olduğu saptanmıştır.¹⁷⁴ Orio ve arkadaşlarının genç PKOS' lu kadınlarda yaptığı çalışmada hasta grubunun sol ventriküler kitle indeksinin ve diyastolik fonksiyonun artmış olduğu bulunmuştur.¹⁴³ Diğer bir çalışmada kardiyak kateterizasyon uygulanan 143 hastanın %42'nde ultrasonda polikistik over görünümü tespit edilmiş ve bu hastalarda koroner arter hastalığı görülme sıklığının daha fazla olduğu görülmüştür.¹⁷ Lakhani ve arkadaşları PKOS'lu hayvan modelinde aortada sertlik indeksinin arttığını ve kompliyansın azaldığını göstermişlerdir.¹⁰⁰

Kardiyovasküler risk faktörlerinin aterosklerozun erken dönem belirteci⁴⁴ olan endotelial disfonksiyonla ilişkili olduğu bilinmektedir. Endotelial disfonksiyon ateromatöz hastalık gelişiminde en iyi anlaşılmış başlangıç basamaklarından biridir. Endotelial disfonksiyon, vasküler anormalliklerin sadece erken ve olasılıkla geri dönüşümlü belirteci olmayıp aynı zamanda gelecekteki kardiyovasküler morbidite için

tanısal belirteçtir.¹⁷⁵ Metabolik sendromu oluşturan kriterlerin her biri endotelyal disfonksiyonla bağlantılıdır. Bu nedenle vasküler anormallikler metabolik sendrom ve metabolik sendromla aynı kardiyovasküler risk faktörlerini paylaşan PKOS için de erken dönemdeki karakteristiklerdendir.

Vasküler endotelyal fonksiyon değerlendirilmesi kardiyovasküler risk faktör yükünün indeksi olarak kullanılabilir.⁴³ Endotel fiziksel ve kimyasal uyarılara cevap olarak NO gibi vazodilatatör ve endotelin gibi vazokonstriktör maddeler salgılayarak vasküler tonüsü düzenler.⁹⁷ Endotel aracılı vazodilatasyonda (FMD) artmış kan akımı önemli bir uyarandır. FMD yüksek frekanslı ultrason kullanılarak hiperemik akıma yanıt olarak oluşan brakial arter çapındaki değişikliklerin ölçülmesi ile değerlendirilir. Hiperemik akım el bileğinde 5 dakikalık basınçla arteriyel oklüzyon oluşturularak sağlanır. Hiperemi esnasında oluşan değişiklikler endotelyal NO salınımına bağlı olarak ortaya çıkar.⁴⁸ Brakiyal arter FMD' si kardiyovasküler olayların bağımsız bir belirteci olduğu gösterilen¹⁶⁵ koroner dolaşımdaki endotelyal fonksiyonun ölçümü ile korelasyon gösterir.⁹ FMD' nin azalması endotelyal disfonksiyona işaret eder. Bu çalışmayı sınırlayan noktalardan biri hastalarda FMD' yi ölçmemiş olmamızdır.

Bizim çalışmamızda PKOS' lu hasta grubunun serum NO değerleri, sağlıklı kontrol grubunun NO değerleri ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Bu sonuç PKOS'lu hastalarda erken dönem endotel disfonksiyonu hakkında fikir vermesi açısından önemlidir.

PKOS' lu hastalarda endotelyal fonksiyonla ilgili yapılmış çalışmalar birbiriyle çelişebilmektedir. Mather ve arkadaşları¹¹⁷ PKOS'lu hastalarda normal endotelyal fonksiyon göstermişken, Paradisi ve arkadaşları¹⁴⁸ vasküler düzeyde endotelyal disfonksiyon ve insülin direnci varlığını ortaya koymuşlardır. Orio ve arkadaşları

metabolik veya kardiyovasküler hastalığı olmayan genç, normal ağırlıktaki PKOS' luların endotelial fonksiyonlarında erken dönemde bozulma olduğunu bildirmişlerdir.¹⁴²

Sorensen ve arkadaşları yaptıkları çalışmada endotelial disfonksiyonun yaş, VKİ ve total kolesterol düzeylerinden bağımsız olarak PKOS' la ilişkili olduğunu göstermişlerdir.¹⁷⁵ Bickerton ve arkadaşları yaptıkları çalışmada PKOS' lu hastalarla, yaş ve kilo bakımından eşleştirilmiş kontrol grupları arasında endotel fonksiyonu yönünden bir fark olmadığını saptamışlardır.¹⁵ Bu çalışmada gruplar arasında fibrinojen, sialik asit, CRP gibi yeni kardiyovasküler risk belirteçleri bakımından da fark bulunamamıştır. Kelly ve arkadaşları PKOS' lu hastalarda artmış vasküler sertlik ve insülinin vasküler etkisinde fonksiyonel bozulma saptamışlardır.⁹⁰ Talbott ve arkadaşları karotis intima-media duvar kalınlığının yaşlı PKOS hastalarında, aynı yaştaki normal kontrollere göre farklı olduğunu göstermişlerdir.¹⁸⁶

Bu çalışmalar da göstermektedir ki en sık rastlanan endokrinopatilerden biri olan PKOS' ta kardiyovasküler disfonksiyonun yapısını ve derecesini açıklayan çalışmaların artırılması bir zorunluluktur.

Endotelial disfonksiyonun ana nedenlerinden biri vasküler endotelde L-arjininden eNOS etkisi ile sentezlenen ve güçlü vazodilatatör etkiye sahip olan NO' nun üretiminde/salınımındaki azalmadır.¹⁹⁸ NO vazodilatasyonda, antitrombotik süreçlerde, büyümenin inhibisyonunda ve inflamasyonda rol alan kritik bir medyatördür.¹⁹⁸ ADMA endojen olarak sentezlenen metilarjininlerden biridir ve NOS' un yarışmalı inhibitörüdür.²⁰⁰

Vallance ve arkadaşları 1992'de renal yetmezlikli hastalarda plazma ADMA konsantrasyonunun arttığını göstermişlerdir.²⁰⁰ Artmış plazma ADMA konsantrasyonları aterosklerozis ve metabolik sendromda gözlenen vasküler patofizyolojiye neden olur ve bu

sendromda görülen hipertrigliseridemi, hiperglisemi ve hipertansiyon gibi anormalliklerle ilişkilidir.

Metillenmiş arjininlerin idrarla ekskresyona uğradığı uzun zamandır bilinmektedir.⁸⁷ Vallance ve arkadaşları endojen ADMA'nın endotele bağlı vazodilatasyonu antagonize ettiğini ilk defa göstermişlerdir.²⁰⁰ Renal yetmezlikli hastalarda plazma ADMA düzeylerinin 9 kat arttığını gözlemlemişlerdir. Bu hastaların plazmaları in vitro olarak vasküler halkalarda vazokonstriksiyona yol açmış ve bu etki ortama L-arjinin eklenmesiyle geriye döndürülmüştür. Plazma ADMA düzeylerindeki belirgin artış renal yetmezlikli hastalardaki ciddi endotel hasarını açıklayabilir. Renal yetmezlikli hastalarda diyaliz yapılması veya L-arjinin verilmesi endotel fonksiyonlarını düzeltebilmektedir.^{73,91}

Vasküler hastalığı olanlarda veya vasküler hastalık için risk faktörleri bulunanlarda da plazma ADMA düzeylerinin arttığı bulunmuştur.^{19,20,61,75,181,195} L-arjinin verilmesi ile plazma ADMA yüksekliği tersine döndürebilmektedir. Xiao ve arkadaşlarının insanlarda yaptığı çalışmada kronik renal hastalığı olanlarda, sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, plazma ADMA düzeyleri 4 kat artmış olarak bulunmuş ve yine hasta kanlarının ex vivo kültür hücrelerinde NO üretimini belirgin olarak inhibe ettiği gösterilmiştir.²⁰²

Renal yetmezlik plazma ADMA düzeylerinde yanlış yüksek sonuçlara neden olabileceği için bu çalışmada, çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol grubunda renal yetmezlik olmadığını göstermek amacıyla serum BUN ve kreatinin düzeyleri de çalışıldı. Hastaların serum BUN ve kreatinin değerleri ile kontrol grubunun değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Yine hasta grubunun serum BUN ve kreatinin değerleri ile plazma ADMA ve serum NO düzeyleri arasında anlamlı bir korelasyon saptanmadı.

Plazma ADMA düzeyleri NO sentezinin oranı ile düzenlenebilmekte ve bu oranla korelasyon göstermektedir. Ratlarda tuzdan zengin diyet uygulandığında üriner ADMA ekskresyonunda ve kan basıncında artış olduğu görülmektedir.¹¹⁸ Tuza duyarlı hipertansiyonu olan insanlarda, tuzdan zengin diyet uygulanması plazma ADMA düzeylerini ve kan basıncını artırmakta ve üriner NO' i azaltmakta; tuzdan fakir diyet ise bu anormallikleri geriye döndürmektedir.⁶¹ Bu çalışmada yukarıdaki çalışmaların tersine olgu grubunda ADMA düzeyleri ile NO düzeyleri arasında anlamlı bir korelasyonun saptanmamış oluşu çalışma grubunun sayısının düşük oluşu ile açıklanabilir.

Lin ve arkadaşları 48 saat boyunca yüksek glukoz konsantrasyonlarına maruz kalan vasküler düz kas hücreleri ve insan endotelial hücrelerinin hücre süpernatantlarında ADMA konsantrasyonunun artmış, DDAH aktivitesi ve cGMP formasyonunun ise azalmış olduğunu göstermişlerdir.¹⁰⁸ Abbasi ve arkadaşları tip 2 diyabet hastalarında plazma ADMA konsantrasyonunun arttığını göstermişlerdir.¹

ADMA nondiyabetik ve normotansif bireylerde insülin aracılı glukoz düzenlemesinin bozulması ile pozitif korelasyon göstermektedir.¹⁷⁹ ADMA konsantrasyonları insülin direnci olan bireylerde hipertansiyondan bağımsız olarak artmış bulunmaktadır. Hipertansiyonu olan ve insülin direnci gözlenen bireylerde rosiglitazone tedavisi insülin sensitivitesini artırmakta ve plazma ADMA konsantrasyonlarını azaltmaktadır. Tip 2 diyabetli hastalarda uygulanan metformin tedavisi de aynı zamanda dolaşımdaki ADMA konsantrasyonlarını azaltmaktadır.¹⁰ Birçok çalışma rosiglitazone^{152,162} veya metformin^{88,116} tedavisinin insan ve kemiricilerde endotel disfonksiyonunu düzelttiğini göstermektedir. Bu tedavilerin ardından ADMA konsantrasyonlarının azalması insülin sensitivitesi ve azalmış oksidatif strese bağlı olabilir.

Yapılan çalışmalar yağdan zengin diyetin de plazma ADMA düzeylerini artırdığını da göstermiştir.⁵⁸ Bir hayvan çalışmasında hiperkolesterolemik tavşanlarda hem vasküler hem de nonvasküler dokularda DDAH aktivitesinin azaldığı ve plazma ADMA düzeylerinin arttığı bulunmuştur.⁸³ Chan ve arkadaşları hiperkolesterolemik kişilerde mononükleer hücre adezyonunun artmış plazma ADMA konsantrasyonları ile anlamlı korelasyon gösterdiğini bulmuşlardır.³² Hücre kültüründe bu hücrelerin adezyonu ADMA ile uyarılmış vasküler endotelial hücrelerin kültüre eklenmesiyle artmaktadır.

Bu çalışmada ise hastalarda dislipidemi tablosunun bulunmayışı ve lipit profili bakımından hasta grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmamış olması, PKOS' lu hasta grubundaki serum lipit düzeylerinin ADMA yüksekliği üzerine etkilerini dışlamıştır.

Renal yetmezlik, karaciğer yetmezliğinden başlayıp ateroskleroz, hipertansiyon ve pre-eklampsie kadar uzanan birçok klinik tabloda plazma ADMA konsantrasyonlarının yükseldiği bulunmuştur.^{75,200} 225 hemodiyaliz hastasında yapılan prospektif çalışmada, 33.4 aylık takip esnasında ADMA ve yaşı kardiyovasküler olaylar ve total mortalitenin en güçlü prediktörü olduğu bulunmuştur. Bu hastalar arasında ADMA düzeyi en yüksek olan gruptaki ölüm oranı en düşük olan gruptan 3 kat fazla bulunmuştur.²⁰⁸

Nijveldt ve arkadaşları ADMA'nın yoğun bakımdaki hasta ölümünün en güçlü prediktörü olduğunu bulmuşlardır.¹³⁴ Bu hastalarda ADMA düzeyi en yüksek olanlardaki mortalite en düşük olan gruptakinden 17 kat fazla olarak bulunmuştur.

Endojen ADMA'nın ateroskleroza hızlandırdığına dair kanıtlar mevcuttur. Örneğin L-arjininin kronik uygulaması vasküler lezyon gelişim sürecini yavaşlatabilmekte hatta geri döndürebilmektedir.^{39,169} İnsan ve hayvan modellerinde endojen ADMA düzeyleri vasküler lezyon oluşumunun habercisi olabilir. Valkonen ve

arkadaşları orta yaşlı, sigara içmeyen Finli bireylerde yaptıkları prospektif çalışmada ADMA düzeyleri en yüksek olan grupta akut koroner olay riskinin diğer gruplar ile kıyaslandığında 3.9 kat arttığını göstermişlerdir.¹⁹⁷ Achan ve arkadaşları randomize, çift kör, plasebo kontrollü bir çalışmada sağlıklı gönüllülerde ADMA' nın kardiyovasküler etkilerini incelemişlerdir.² İntravenöz ADMA enjeksiyonunun kalp hızını ve kardiyak atım volümünü anlamlı şekilde azalttığını göstermiştir (sırasıyla %9.2 ve %14.8). Yine bu bireylerde kan basıncı ve sistemik vasküler dirençte artış izlenmiştir. Kardiyovasküler hastalığı olan ve ADMA düzeyleri yükselmiş bireylerde kardiyak atım volümü azalmış ve sistemik vasküler direnç artmıştır.⁴⁰

Piatti ve arkadaşları kardiyak sendrom X' li (normal koroner anjiyogramlı anjina pectoris) hastalarda ADMA düzeyini kontrol grubuna göre daha yüksek bulmuşlardır.¹⁵⁰ Hori ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da vazospastik anjinalı hastalarda ADMA düzeyleri artmış, koroner dolaşımdaki NO düzeyleri ise azalmış olarak bulunmuştur.⁷⁸ Endotelial disfonksiyonun koroner arter hastalık gelişimi sürecinde temel fenomen olduğu iddiasıyla^{63,205} birlikte değerlendirildiğinde ADMA' nın kardiyovasküler risk için güçlü bir belirteç olduğu söylenebilir.

Miyazaki ve arkadaşlarının 116 sağlıklı insanda yaptığı çalışmada ise kan ADMA düzeylerinin yaş, ortalama kan basıncı ve glukoz intoleransı ile pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur.¹²⁴ Daha çarpıcı bir sonuç olarak bu bireylerde plazma ADMA düzeyleri karotid arter intima-media kalınlığı ile de anlamlı korelasyon göstermiştir. Giderek artan sayıda çalışma da göstermektedir ki artmış kan ADMA düzeyleri ile kardiyovasküler mortalite ve morbidite arasında güçlü bir korelasyon bulunmaktadır.^{20,41,124,197}

ADMA halen hakkında birçok soru işareti olan bir yapıdır ama şurası kesindir ki endojen NOS inhibitörleri yeni ve önemli bir biyolojik araçlar sınıfını oluşturmaktadır. Fizyolojileri, patolojik rolleri ve düzenlenmelerinin daha iyi anlaşılması yeni tedavi alanları açabilir. Ayrıca çalışmalardan elde edilen bulgular ADMA' nın hastalık belirteci olmak dışında hastalığın oluşumunda rol oynayan bir faktör olduğunu düşündürmektedir. Bu da ADMA' yı aynı zamanda yeni bir ilaç hedefi haline getirmektedir.

Bizim çalışmamız PKOS' lu hastalarda plazma ADMA düzeylerinde anlamlı yükselme göstermiştir. Bu da PKOS' ta ADMA düzeylerinin tanı ve tedavide faydalı olabileceği olasılığını akla getirmektedir.

Metilarjininlerin miktarı hücrelerin protein dönüşümü ve metabolik aktivite ilişkilidir. Metilarjininler kısmen böbrekle metabolize edilse de, ADMA' nın asıl metabolize edilme yolu DDAH enzimi ile yıkılmasıdır..^{111,120,129} DDAH' nın inhibisyonu ADMA' nın birikmesine^{83,111,194} ve bunun sonucunda da NO aracılı endotele bağlı kan damarı genişlemesinin inhibe olmasına yol açar.

ADMA' yı metabolize eden enzim olan DDAH ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. ADMA' nın PKOS' lu hastalardaki yüksekliği bu hastalarda insülin direncine bağlı gelişen endotel disfonksiyonu ile açıklanabilir. Aynı zamanda bu hastalarda hiperkolesterolemi, hiperglisemi ve hiperhomosisteinemi bulunma olasılığı sağlıklı bireylere göre daha yüksektir. Sayılan bu patolojik tablolar DDAH' ı inhibe ederek plazma ADMA düzeylerinin yükselmesine neden olabilirler. Dayoub ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada insan DDAH geni transfer edilen transgenik farelerde artmış DDAH aktivitesinin kan ADMA konsantrasyonlarını azalttığı ve buna paralel olarak kan basıncını düşürdüğü gösterilmiştir.⁴⁵ İto ve arkadaşları hiperkolesterolemili veya aterosklerozisli bireylerde DDAH disregülasyonunun endotelial disfonksiyon için bir mekanizma

olabileceğini düşünmüşlerdir.⁸³ Kültüre edilmiş endotelial hücrelerin DDAH aktivitesi oksidize LDL' ye maruziyeti halinde azalmaktadır ve bu da ADMA yükselmesiyle sonuçlanmaktadır.¹⁹³ DDAH aktivitesi tip 2 diyabet hastalarında⁵⁹, homosisteinin yükseldiği durumlarda¹⁸⁰ ve oksidatif strese maruziyetde de azalır.¹⁹³ Bu veriler de göstermektedir ki DDAH aktivitesi kardiyovasküler risk faktörleri ile düzenlenme potansiyeli taşımaktadır.

Sonuç olarak:

1. Yaşları ve VKİ'leri birbirine yakın PKOS'lu kadın hastalar ve sağlıklı gönüllüler arasında yapılan çalışmamızda hasta grubunun plazma ADMA düzeyleri ve HOMA değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.
2. PKOS' lu hasta grubunun serum NO değerleri ise kontrol grubunun serum NO değerleri ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük bulunmuştur..
3. Plazma ADMA düzeyleri, HOMA değerleri ve serum NO değerleri arasında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır. Bu durum çalışmayı sınırlandıran faktörlerden biri olan çalışma grubunun sayısındaki azlığa bağlı olabilir.
4. Bununla birlikte HOMA değerleri ile insülin düzeyleri arasında beklenen doğrultuda anlamlı korelasyon saptanmıştır.
5. Bu çalışma, çalışmayı sınırlayan bazı faktörlerin varlığına rağmen PKOS 'lu hastalarda ADMA düzeyleri ile ilgili yapılmış ilk çalışma oluşu nedeniyle başlangıç olarak kabul edilebilir.

PKOS, obezite, insülin direnci, endotel disfonksiyonu ve endotel disfonksiyonuna neden olan kardiyovasküler risk faktörleri arasındaki ilişki ilginç ve karmaşık özellikler taşımaktadır. İleri çalışmalar yapılarak bu ilişkinin netleştirilmesi sadece PKOS için değil diğer metabolik, endokrin ve kardiyovasküler hastalıkların tanı ve tedavisinde de yeni bakış açıları sağlayabilecektir.

6. ÖZET

Oldukça geniş bir kadın popülasyonu etkileyen ve metabolik sendromla olan ilişkisi nedeniyle gelecekteki ciddi endokrin, metabolik ve kardiyovasküler klinik tablolar için zemin hazırlayan PKOS'un hasta için oluşturduğu risklerin belirlenmesi ve özellikle koruyucu önlemler başta olmak üzere tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi önemli bir sorundur. Bu risklerin erken dönemde engellenebilir ve böylelikle uzun vadede hasta morbidite ve mortalitesini azaltabilecek oluşu konuyla ilgili çalışmaların gerekliliğini vurgulamaktadır. Bu düşünceden yola çıkarak bu çalışmada PKOS'lu hastalarda kardiyovasküler risk belirteci olabilecek plazma ADMA düzeylerini çalıştık.

PKOS'lu olgu grubunun plazma ADMA düzeyleri benzer yaş ve ağırlıktaki sağlıklı kontrol grubunun ADMA düzeylerine göre anlamlı olarak yüksek bulundu.

Plazma ADMA düzeylerine ek olarak çalışılan serum NO düzeyleri de olgu grubunda kontrol grubundan anlamlı olarak düşük bulundu.

İnsülin direnci parametresi olarak kabul edilen HOMA değerleri de beklenen doğrultuda olgu grubunda daha yüksek bulundu.

Olgu grubunun VKİ'si ile kontrol grubunun VKİ'si arasında anlamlı bir fark olmayışı ve her iki grupta da dislipidemi, hipertansiyon, bozulmuş glukoz toleransı ve/veya diyabet ve sigara içiciliği gibi kardiyovasküler risk faktörlerinin dışlanmış olması bu faktörlerin çalışılan parametrelerle interferans vermesini engelleyerek sonuçların güvenilirliğini artırmaktadır.

Sonuç olarak PKOS'lu hastalarda, bu hastalarda daha önce hiç çalışılmamış olan, plazma ADMA düzeylerinin yüksek bulunmuş olması PKOS'ta plazma ADMA düzeyleri ve rolü ile ilgili yapılacak yeni çalışmalar için bir ön çalışma niteliği taşıyabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Abbasi F, Asagami T, Cooke JP et al: Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 88: 1201–203, 2001.
2. Achan V, Broadhead M, Malaki M et al: Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 1455–1459, 2003.
3. Acien P, Quereda F, Matallin P et al: Insulin, androgens and obesity in women with and without polycystic ovary syndrome: a heterogeneous group of disorders. *Fertil Steril* 72(1):32–40, 1999.
4. Adams J, Polson DW, Franks S: Prevalence of polycystic ovaries in women with anovulation and idiopathic hirsutism. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 9; 293(6543): 355-359, 1986.
5. Ahles BL: Toward a new approach: primary and preventive care of the women with polycystic ovarian syndrome. *Prim Care Update Ob/Gyns* 7: 275-278, 2000.
6. Alderton WK, Cooper CE, Knomles RG: Nitric oxide synthases structure, function and inhibition. *Biochem J* 357: 593–615, 2001.
7. Aleem FA, Predanic M: transvaginal color Doppler determination of the ovarian and uterine blood flow characteristics in polycystic ovary disease. *Fertil Steril* 65: 510-6, 1996.
8. Amowitz LL, Sobel BE: Cardiovascular consequences of polycystic ovary syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 28: 439–458, 1999.
9. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Knab S, Delagrang D, Lieberman EH, Ganz P, Creager MA, Yeung AC, Selwyn AP, Meredith IT: Close correlation of

- endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* 26: 1235–1241, 1995.
10. Asagami T, Abbasi F, Stuehlinger M et al: Metformin treatment lowers asymmetric dimethylarginine concentrations in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 51: 843–46, 2002.
 11. Azziz R, Marin C, Hoq L, Badamgarav E, Song P: Healthcare-related economic burden of the polycystic ovary syndrome (PCOS) during the reproductive lifespan. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 4650–4658, 2005.
 12. Bayer S, Seibel M, Gates G, Moses A, Flier J: Identification of insulin-like growth factor receptors in human granulosa cells. (Abs. 94) Presented at the 33 rd Annual Meeting of the Society of Gynecologic Investigation, Toronto, March 19 to 21, 1986.
 13. Beltowski J, Kedra A: Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a target for pharmacotherapy. *Pharmacological Reports* 58: 159-178, 2006.
 14. Bhagat K, Vallance P: Nitric oxide 9 years on. *J R Soc Med* 89: 667–678, 1996.
 15. Bickerton AST, Clark N, Meeking D, Shaw KM, Crook M, Lumb P, Turner C, Cummings MH: Cardiovascular risk in women with polycystic ovarian syndrome (PCOS). *J Clin Pathol* 58: 151-154, 2005.
 16. Billiard TR, Curran RD, Stuehr DJ, Stadler J, Simmons RL, Muvray SA. Inducible cytosolic enzyme activity for the production of nitrogen oxides from L-arginine in hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 168: 1034–1040, 1990.
 17. Birdsall MA, Farquhar CM, White HD: Association between polycystic ovaries and extent of coronary artery disease in women having cardiac catheterisation. *Ann Intern Med* 126: 32–35, 1997.

18. Bode-Boger SM, Boger RH, Kienke S et al: Elevated L-arginine/dimethylarginine ratio contributes to enhanced systemic NO production by dietary L-arginine in hypercholesterolemic rabbits. *Biochem Biophys Res Commun* 219: 598–603, 1996.
19. Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP: Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 98: 1842–1847, 1998.
20. Boger RH, Bode-Boger SM, Thiele W, Junker W, Alexander K, Frolich JC: Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 95: 2068–2074, 1997.
21. Bonner FT, Stedman G: The chemistry of nitric oxide and redox-related species. In: *Methods in nitric oxide research*. Feelisch M, Stamler JS, (Eds.): Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd, 3–18, 1996.
22. Boucher JL, Moali C, Tenu JP: Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol Life Sci* 55: 1015–1028, 1999.
23. Böger RH, Sydow K, Borlak J et al. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res* 87: 99–105, 2000.
24. Böger RH: The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovascular Research* 59: 824 – 833, 2003.
25. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed R, Snyder SH: Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351: 714–718, 1991.

26. Buyalos RP, Geffner ME, Bersch N, Judd HL, Watanabe RM, Bergman RN, Golde DW: Insulin and insulin-like growth factor-1 responsiveness in polycystic ovarian syndrome. *Fertil Steril* 57: 796–803, 1992.
27. Caballero AE: Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: a road to diabetes and heart disease. *Obes Res* 11(11): 1278-1289, 2003.
28. Cai H, Harrison DG: Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases. The role of oxidant stress. *Circ Res* 87: 840–844, 2000.
29. Carmina E, Longo RA, Rini GB, Lobo RA: Phenotypic variation in hyperandrogenic women influences the findings of abnormal metabolic and cardiovascular risk parameters. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 2545–2549, 2005.
30. Cefalu W. Minireview: Insulin resistance: cellular and clinical concepts. *Experimental Biology and Medicine* 226: 13-26, 2001.
31. Center DM, Kornfeld H, Cruikshank WW: Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand. *Immunol Today* 17(10): 476-481, 1996.
32. Chan JR, Boger RH, Bode-Boger SM et al: Asymmetric dimethylarginine increases mononuclear cell adhesiveness in hypercholesterolemic humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1040–1046, 2000.
33. Chan NN, Chan JCN: Asymmetric dimethylarginine (ADMA) : a potential link between endothelial dysfunction and cardiovascular diseases in insulin resistance syndrome? *Diabetologia* 45: 1609 – 1616, 2002.
34. Chang RJ, Nakamura RM, Judd HL, Kaplan SA: Insulin resistance in nonobese patients with polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 57: 356-72, 1983.

35. Chang RJ: A practical approach to the diagnosis of polycystic ovary syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 191(3):713-717, 2004.
36. Chen B-M, Xia L-W, Zhao R-Q: Determination of NC,NG-dimethylarginine in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* 692: 467-471, 1997.
37. Christian RC, Dumesic DA, Behrenbeck T, Oberg A, Sheedy PF, Fitzpatrick L: Prevalence and predictors of coronary artery calcification in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 2562–2568, 2003.
38. Cibula D, Cifkova R, Fanta M, Poledne R, Zivny J, Skibova J: Increased risk of non-insulin dependent diabetes mellitus, arterial hypertension and coronary artery disease in perimenopausal women with a history of the polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 15: 785–789, 2000.
39. Cooke JP, Singer AH, Tsao PS, Zera P, Rowan RA, Billingham ME: Anti-atherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J Clin Invest* 90: 1168 –1172, 1992.
40. Cooke JP: Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker? *Circulation* 109: 1813–18, 2004.
41. Cooke JP: Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:2032.-2037, 2000.
42. CooperH, Spellacy W, PremK, Cohen W: Hereditary factolISin the Stein-leventhal syndrome. *Am J obstet Gynecol* 100:371, 1968.
43. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J,

- Vogel R: Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery. *J Am Coll Cardiol* 39: 257–265, 2002.
44. Davignon J, Ganz P: Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 109(Suppl III): 27–32, 2004.
 45. Dayoub H, Achan V, Adimoolam S, Jacobi J, Stuehlinger MC, Wang BY, Tsao PS, Kimoto M, Vallance P, Patterson AJ, Cooke JP: Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. *Circulation* 108(24): 3042–3047, 2003.
 46. Depres JP, Lamarche M, Mauriege P, et al: Hyperinsulinemia as an independent risk factor for ischemic heart disease. *N Engl J Med*. 334: 952–957, 1996.
 47. Doshi S, McDowell IF, Goodfellow J et al: Relationship between S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, asymmetric dimethylarginine and endothelial function in healthy human subjects during experimental hyper- and hypohomocysteinemia. *Metabolism* 54: 351–360, 2005.
 48. Doshi SN, Naka KK, Payne N, Jones CJ, Ashton M, Lewis MJ, Goodfellow J: Flow-mediated dilatation following wrist and upper arm occlusion in humans: the contribution of nitric oxide. *Clin Sci (Colch)* 101: 629–635, 2001.
 49. Dun NJ, Dun SL, Wu SY, Förstermann U: Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat superior cervical ganglia and adrenal glands. *Neurosci Lett* 158: 51–54, 1993.
 50. Dunaif A, Segal K, Futterweit W, Dobrjansky A: Profound peripheral insulin resistance independent of obesity in polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 38: 1165–74, 1989.

51. Dunaif A, Segal KR, Shelley DR, Green G, Dobrjansky A, Licholai T: Evidence for distinctive and intrinsic defects in insulin action in polycystic ovary syndrome. *Diabetes*. Oct;41(10):1257–66, 1992.
52. Dunaif A: Hyperandrogenic anovulation (PCOS): a unique disorder of insulin action associated with an increased risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Med* 98: 33S–39S, 1995.
53. Dunder K: Clinical manifestations of coronary heart disease and the metabolic syndrome. A population-based study in middle-aged men in Uppsala. *Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine* 1354. 73 pp, Uppsala, 2004.
54. Earl S. Ford ES, Giles WH, Mokdad AH: Increasing Prevalence of the Metabolic Syndrome Among U.S. Adults. *Diabetes Care* 27(10): 2444-2449, 2004.
55. Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, van der Vliet A: Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 391(6665): 393-397, 1998.
56. Elkind-Hirsch KE, Valdes CT, McConnell TG, Malinak LR: Androgen responses to acutely increased endogenous insulin levels in hyperandrogenic and normal cycling women. *Fertil Steril* 55: 486-87 ,1991.
57. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 20(7): 1183- 1197, 1997.
58. Fard A, Tuck C, Donis J, Sciacca R, DiTullio M, Wu H, Bryant T, Chen N, Torres Tamayo M, Ramasamy R, Berglund L, Ginsberg H, Homma S, Cannon P: Acute elevations of plasma asymmetric dimethylarginine and impaired endothelial

function in response to a high-fat meal in patients with type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* In press. *Vasc Biol* 20: 2039–2044, 2000.

59. Fard A, Tuck CH, Donis JA, et al. : Acute elevations of plasma asymmetric dimethylarginine and impaired endothelial function in response to a high-fat meal in patients with type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 2039–2044, 2000.
60. Folli F, Saad MJ, Velloso L et al: Crosstalk between insulin and angiotensin II signaling systems. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 107:133–139, 1999.
61. Fujiwara N, Osanai T, Kamada T, Katoh T, Takahashi K, Okumura K: Study on the relationship between plasma nitrite and nitrate level and salt sensitivity in human hypertension: modulation of nitric oxide synthesis by salt intake. *Circulation* 101:856–861, 2000.
62. Futterweit W: Polycystic Ovary Syndrome: Clinical Perspectives and Management. *Obstet Gynecol Survey* 18: 403-413, 1999.
63. Gage JE, Hess OM, Murakami T, Ritter M, Grimm J, Krayenbuehl HP: Vasoconstriction of stenotic arteries during dynamic exercise in patients with classic angina pectoris: reversibility by nitroglycerin. *Circulation* 73: 865–876, 1986.
64. Gammon MD, Thompson WD: Polycystic ovaries and the risk of breast cancer. *Am J Epidemiol* 134: 818-827, 1991.
65. Garvey EP, Oplinger JA, Tanoury GJ, Sherman PA, Fowler M, Marshall S, Harmon MF, Paith JE, Furfine ES: Potent and selective inhibition of human nitric oxide synthases. Inhibition by non-amino acid isothioureas. *J Biol Chem* 269: 2666–26676, 1994.

66. Ghosh SK, Paik WK, Kim S: Purification and molecular identification of two protein methylases I from calf brain. Myelin basic protein and histone specific enzyme. *J Biol Chem* 263: 19024–19033, 1998.
67. Gokce N, Keaney JF Jr, Frei B, Holbrook M, Olesiak M, Zachariah BJ, Leeuwenburgh C, Heinecke JW, Vita JA: Long-term ascorbic acid administration reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation* 99: 3234 –3240, 1999.
68. Govers R, Rabelink TJ: Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol* 280: F193-F206, 2001.
69. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline SW et al: Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C θ and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 48: 1270–1274, 1999.
70. Groves JT, Wang CC: Nitric oxide synthase: models and mechanisms. *Curr Opin Chem Biol* 4: 687–695, 2000.
71. Guzick DS: Polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol.* 103(1):181-193, 2004. Erratum in: *Obstet Gynecol.* 103(4):799, 2004.
72. Hacıhanefioğlu B: Polyeystics ovary syndrome nomenclature: chaos? *Fertil Steril.* 73:6, 2000.
73. Hand MF, Haynes WG, Webb DJ: Hemodialysis and L-arginine, but not D-arginine, correct renal failure-associated endothelial dysfunction. *Kidney Int* 53: 1068 –1077, 1998.
74. Hevel JM, White KA, Marletta MA: Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 266: 22789–22791, 1991.

75. Holden D, Fickling S, Whitley G, Nussey S: Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine, a natural inhibitor of nitric oxide synthase, in normal pregnancy and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 178: 551–556, 1998.
76. Holm P: Nitric oxide and peroxymitrite production by NO –donors and inflammatory cells. PhD thesis University of Tampere, October 21st, 2000.
77. Hopkinson ZEC, Sattar N, Fleming R, Greer IA: Polycystic ovarian syndrome: the metabolic syndrome comes to gynaecology. *BMJ* 317: 329–332, 1998.
78. Hori T, Matsubara T, Ishibashi T et al: Significance of asymmetric dimethylarginine (ADMA) concentrations during coronary circulation in patients with vasospastic angina. *Circ J* 67: 305–311, 2003.
79. Huang A, Vita JA, Venema RC, Keaney J: Ascorbic acid enhances endothelial nitric oxide synthase activity by increasing intracellular tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem* 275:17399 –17406, 2000.
80. Hugheston PE: Morphology and the morphogenesis of the Stein-Leventhal ovary. *Obstet Gynecol Surv* 37: 59-62, 1982.
81. Ignarro L.J., Cirino G., Casini A., Napoli C: Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: An overview. *J Cardiovasc Pharmacol* 34: 879–886, 1999.
82. Ignarro LJ: Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. *Biosci Rep* 19: 51–71, 1999.
83. Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP: Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation*. 99: 3092–3095, 1999.
84. Janero D.R: Nitric oxide (NO)-related pharmaceuticals: contemporary approaches to therapeutic NO modulation. *Free Radic Biol Med* 28: 1495-1506, 2000

85. Joseph W, Goldzieher, Ronald L, Young: Selected aspects of polycystic ovarian disease. *Endocrinology and Metabol. Clin. of North America*. 21 (1): 141–171, 1992.
86. Jubelin BC, Gierman JL: Erythrocytes may synthesize their own nitric oxide. *Am J Hypertens* 9: 1214–1219, 1996.
87. Kakimoto Y, Akazawa S: Isolation and identification of NG, NG-, and NG, N9G-dimethyl-arginine, N-mono-, di-, and trimethyllysine, and glucosylgalactosyl-, and galactosyl-d-hydroxylysine from human urine. *J Biol Chem*. 245: 5751–5758, 1970.
88. Katakam PV, Ujhelyi MR, Hoenig M, Miller AW: Metformin improves vascular function in insulin-resistant rats. *Hypertension* 35: 108–12, 2000.
89. Kazer RR, Kessel B, Yen SSC: Circulating luteinizing hormone pulse frequency in woman with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 65: 233–6, 1989.
90. Kelly CJG, Speirs A, Gould GW, Petrie JR, Lyall H, Connell JMC: Altered vascular function in young women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 742–746, 2002.
91. Kielstein J, Boger R, Bode-Boger S, Schaeffer J, Barbey M, Koch K, Frolich J: Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: relationship to treatment method and atherosclerotic disease. *J Am Soc Nephrol* 10: 594–600, 1999.
92. Ki-Jarvinen H: Insulin resistance and endothelial dysfunction. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 17: 411–430, 2003.
93. Kim SH, Abbasi F, ReavenGM: Impact of degree of obesity on surrogate estimates of insulin resistance. *Diabetes Care* 27: 1998–2002, 2004.

94. Kobzik L, Brecht DS, Lowenstein CJ, Drazen J, Gastone B, Sugarbaker D, Stamler JS: Nitric oxide synthases in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9: 371–377, 1993.
95. Kodama H, Fujita M, Yamaguchi I: Development of hyperglycaemia and insulin resistance in conscious genetically diabetic (C57BL/KsJ-db/db) mice. *Diabetologia* 37: 739–744, 1994.
96. Koshland DE. Jr: The molecule of the year. *Science* 258: 1861, 1992.
97. Kravariti M, Naka KK, Kalantaridou SN, Kazakos N, Katsouras CS, Makrigiannakis A, Paraskevaidis AE, Chrousos GP, Tsatsoulis A, Michalis LK: Predictors of endothelial dysfunction in young women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 90(9): 5088-5095, 2005.
98. Kubes P, Granger DN: Nitric oxide modulates microvascular permeability. *Am J Physiol* 262: H611-H615, 1992.
99. Kubes P, Suzuki M, Granger DN: Nitric oxide an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4651–4655, 1991.
100. Lakhani K, Leonard A, Seifalian AM, Hardiman P: Microvascular dysfunction in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Rep* 20(11): 3219-3224, 2005.
101. Legro RS, Azziz R, Ehrmann D, Fereshetian AG, O’Keefe M, Ghazzi MN: Minimal response of circulating lipids in women with polycystic ovary syndrome to improvement in insulin sensitivity with troglitazone. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 5137–5144, 2003.
102. Legro RS, Kusanman AR, Dodson WC, Dunaif A: Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary

- syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 165–169, 1999.
103. Legro RS: Polycystic ovary syndrome and cardiovascular disease: a premature association? *Endocr Rev* 24: 302–312, 2003.
 104. Leiper J, Murray-Rust J, McDonald N, Vallance P: S-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 13527–13532, 2002.
 105. Leiper JM, Santa Maria J, Chubb A, MacAllister RJ, Charles IG, Whitley GS, Vallance P: Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem J*. 343(pt 1): 209 –214, 1999.
 106. Lewandowski KC, Szosland K, Callaghan CO, Tan BK, Randeva HS, Lewinski A: Adiponectin and resistin serum levels in women with polycystic ovary syndrome during oral glucose tolerance test: A significant reciprocal correlation between adiponectin and resistin independent of insulin resistance indices. *Molecular Genetics and Metabolism* 85: 61 – 69, 2005.
 107. Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL: Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 270: 319 –324, 1995.
 108. Lin KY, Ito A, Asagami T et al: Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 106: 987–92, 2002.

109. Lloyd-Jones DM, Bloch KD: The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. *Annu Rev Med* 47: 365-375, 1996.
110. Lunde O, Magnus P, Sandvik L, Hogloss: Familial clustering in the polycystic ovarian syndrome, *Gynecol Obstet Invest* 28,23,1989.
111. MacAllister RJ, Parry H, Kimoto M, Ogawa T, Russell RJ, Hodson H, Whitley GS, Vallance P: Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Br J Pharmacol* 119: 1533–1540, 1996.
112. MacAllister RJ, Rambausek MH, Vallance P, Williams D, Hoffman KH, Ritz E: Concentration of dimethyl-L-arginine in the plasma of patients with end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 11: 2449–2452, 1996.
113. Marin J, Rodriguez-Martinez MA: Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacol Ther* 75: 111–134, 1997.
114. Martin E, Davis K, Bian K, Lee YC, Murad F: Cellular signaling with nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate. *Semin Perinatol* 24: 2–6, 2000.
115. Mateo A.O, de Artinano MA: Nitric oxide reactivity and mechanisms involved in its biological effects. *Pharmacol Res* 42: 421–427, 2000.
116. Mather KJ, Verma S, Anderson TJ: Improved endothelial function with metformin in type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 37: 1344–50, 2001.
117. Mather KJ, Verma S, Corenblum B, Anderson TJ: Normal endothelial function despite insulin resistance in healthy women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 1851–1856, 2000.
118. Matsuoka H, Itoh S, Kimoto M, Kohno K, Tamai O, Wada Y, Yasukawa H, Iwami G, Okuda S, Imaizumi T: Asymmetrical dimethylarginine, an endogenous nitric

- oxide synthase inhibitor, in experimental hypertension. *Hypertension* 29 (pt 2): 242–247, 1997.
119. McCall TB, Boughton-Smith NK, Palmer RMJ: Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. *Biochem J* 261: 298–296, 1989.
120. McDermott JR: Studies on the catabolism of N^g-methylarginine, N^g, N^g-dimethylarginine and N^g, N^g-dimethylarginine in the rabbit. *Biochem J* 154: 179–184, 1976.
121. Merrill E. W: Rheology of blood. *Physiol Rev* 49: 863–888, 1969.
122. Metabolik Sendrom Araştırma Grubu. METSAR sonuçları. XX. Ulusal Kardiyoloji Kongresi. Antalya, 2004.
123. Miranda KM, Espey MG, Wink DA: A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 5(1): 62–71, 2001.
124. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP et al: Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 99: 1141–1146, 1999.
125. Mohandas N, Chasis JA: Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Semin Hematol* 30: 171–192, 1993.
126. Moncada S: Nitric oxide. *J Hypertens* 12: S35–S39, 1994.
127. Mugge A, Elwell JH, Peterson TE, Hofmeyer TG, Heistad DD, Harrison DG: Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. *Circ Res* 69: 1293–1300, 1991.
128. Murphy MP, Packer MA, Scarlet CL, Martin SW: Peroxynitrite: a biologically significant oxidant. *Gen Pharmacol* 31: 179–186, 1998.

129. Murray-Rust J, Leiper J, McAlister M et al: Structural insights into the hydrolysis of cellular nitric oxide synthase inhibitors by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Nat Struct Biol* 8: 679–683, 2001.
130. Najbauer J, Johnson BA, Young AL, Aswad DW: Peptides with sequences similar to glycine, arginine-rich motifs in proteins interacting with RNA are efficiently recognized by methyltransferase(s) modifying arginine in numerous proteins. *J Biol Chem.* 268:10501–10509, 1993.
131. Nathan C: Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Faseb J* 6(12): 3051-3064, 1992.
132. Nestler JE, Jakubowicz DJ: Decreases in ovarian cytochrome P450c17 alpha activity and serum free testosterone after reduction of insulin secretion in polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med.* Aug 29;335(9):617–23, 1996.
133. Nestler JE: Polycystic ovary syndrome: a disorder for the genarilist. *Fertil Steril* 70: 811-2 1998.
134. Nijveldt RJ, Teerlink T, Van der Hoven B, Siroen MP, Kuik DJ, Rauwerda JA et al: Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) in critically ill patients: high plasma ADMA concentration is an independent risk factor of ICU mortality. *Clin Nutr* 22: 23–30, 2003.
135. Nonami Y: The role of nitric oxide in cardiac ischemia-reperfusion injury. *Jpn Circ J* 61: 119–132, 1997.
136. Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, LuscherTF: Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation* 97: 2494 –2498, 1998.

- 137.Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K: Occurrence of a new enzyme catalyzing the direct conversion of NG,NG-dimethyl-L-arginine to L-citrulline in rats. *Biochem Biophys Res Commun*.148: 671– 677, 1987.
- 138.Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K: Dimethylarginine:pyruvate aminotransferase in rats: purification, properties, and identity with alanine: glyoxylate aminotransferase. *J Biol Chem* 265: 20938 –20945, 1990.
- 139.Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K: Purification and properties of a new enzyme, NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. *J Biol Chem* 264:10205–10209, 1989.
- 140.Oğuz A: Kardiyovasküler Hastalıkların Patogenezinde, Önlenmesinde ve Tedavisinde Doku Renin Anjiotensin Sistemi, Mas Matbaacılık, İstanbul, 2002.
- 141.Onat A, Sansoy V: Halkımızda koroner hastalığın başsuçlusu metabolik sendrom: sıklığı, unsurları, koroner risk ile ilişkisi ve yüksek risk kriterleri. *Türk Kardiyol Dern Arş*; 30: 8-15, 2002.
- 142.Orio F, Palomba S, Spinelli L, Cascella T, De Simone B, Di Biase S, Russo T, Labella D, Zullo F, Lombardi G, Colao A: Early impairment of endothelial structure and function in young normal-weight women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 4588–4593, 2004.
- 143.Orio F, Palomba S, Spinelli L, Cascella T, Tauchmanova L, Zullo F, Lombardi G, Colao A: The cardiovascular risk of young women with polycystic ovary syndrome: an observational, analytical, prospective case-control study. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 3696–3701, 2004.
- 144.Osorio J.C, Recchia FA: The role of nitric oxide in metabolism regulation: from basic sciences to the clinical setting. *Intensive Care Med* 26: 1395–1398, 2000.

- 145.Ovalle F, Azziz R: Insulin resistance, polycystic ovary syndrome, and type 2 diabetes mellitus. *Fertil Steril* 77: 1095–1105, 2002.
- 146.Päivä H, Lehtimäki T, Laakso J et al: Dietary composition as a determinant of plasma asymmetric dimethylarginine in subjects with mild hypercholesterolemia. *Metabolism* 53: 1072–1075, 2004.
- 147.Päivä H, Lehtimäki T, Laakso J 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* 52: 303–307, 2003.
- 148.Paradisi G, Steinberg HO, Hempfling A, Cronin J, Hook G, Shepard MK, Baron A: Polycystic ovary syndrome is associated with endothelial dysfunction. *Circulation* 103:1410–1415, 2001.
- 149.Pfeilschifter J: Signalling pathways of nitric oxide. *Kidney Blood Press Res* 23. 159-161, 2000.
- 150.Piatti PM, Fragasso G, Monti LD: Acute intravenous L-arginine infusion decreases endothelin-1 levels and improves endothelial function in patients with angina pectoris and normal coronary arteriograms: correlation with asymmetric dimethylarginine levels. *Circulation* 107: 429–436, 2003.
- 151.Pierpoint T, McKeigue P, Isaacs A, Jacobs H: Mortality of women with polycystic ovary syndrome at long-term follow-up. *J Clin Epidemiol* 51: 581–586, 1998.
- 152.Pistrosch F, Passauer J, Fischer S, Fuecker K, Hanefeld M, Gross P: In type 2 diabetes, rosiglitazone therapy for insulin resistance ameliorates endothelial dysfunction independent of glucose control. *Diabetes Care* 27: 484–90, 2004.

153. Pi-Sunyer FX: The obesity epidemic: pathophysiology and consequences of obesity. *Obes Res* 10(Suppl 2): 97S–104S, 2002.
154. Pollock JS, Forstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M, Murad F: Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 10480–10484, 1991.
155. Poretsky L, Grigorescu F, Seibel M, Moses AC, Flier JS: Distribution and characterization of insulin and insulin-like growth factor I receptors in normal human ovary. *J Clin Endocrinol Metab.* Oct;61(4):728–34, 1985.
156. Poretsky L: On the paradox of insulin-induced hyperandrogenism in insulinresistant states. *Endocrin Rev.* 1991 ; 12:3-9
157. Radomski M.W., Palmer R.M., Moncada S: Characterization of the Larginine/nitric oxide pathway in human platelets. *Br J Pharmacol* 101: 325-328, 1990.
158. Ramasamy S, Drummond GR, Ahn J, Storek M, Pohl J, Parthasarathy S, Harrison DG: Modulation of expression of endothelial nitric oxide synthase by nordihydroguaiaretic acid, a phenolic antioxidant in cultured endothelial cells. *Mol Pharmacol* 56:116 –123, 1999.
159. Rawal N, Rajpurohit R, Paik WK, Kim S: Purification and characterization of S-adenosylmethionine-protein-arginine N-methyltransferase from rat liver. *Biochem J* 300: 483-489, 1994.
160. Reaven GM: Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37: 1595-1607, 1988.

161. Rosenbaum D, Haber RS, Dunaif A: Insulin resistance in polycystic ovary syndrome: decreased expression of GLUT-4 glucose transporters in adipocytes. *Am J Physiol.* Feb;264(2 Pt 1):E197–202, 1993.
162. Ryan MJ, Didion SP, Mathur S, Faraci FM, Sigmund CD: PPAR(gamma) agonist rosiglitazone improves vascular function and lowers blood pressure in hypertensive transgenic mice. *Hypertension* 43: 661–66, 2004.
163. Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE: Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* 48(3): 436-472, 2002.
164. Saran R, Novak JE, Desai A et al: Impact of vitamin E on plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) in chronic kidney disease (CKD): a pilot study. *Nephrol Dial Transplant* 18: 2415–2420, 2003.
165. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM: Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 101: 1899–1906, 2000.
166. Schindler H, Bogdan C: NO as a signaling molecule: effects on kinases. *Int Immunopharmacol* 1: 1443–1455, 2001.
167. Schmidt HH, Gagne GD, Nakane M, Pollock JS, Miller MF, Murad F: Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH-diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitricergic signal transduction. *J Histochem Cytochem* 40: 1439–1456, 1992.

168. Schmidt HH, Warner TD, Ishii K, Sheng H, Murad F: Insulin secretion from pancreatic β cells caused by L-arginine-derived nitrogen oxides. *Science* 255: 721–723, 1992.
169. Schwarzacher SP, Lim TT, Wang B, Kernoff RS, Niebauer J, Cooke JP, Yeung AC: Local intramural delivery of L-arginine enhances nitric oxide generation and inhibits lesion formation after balloon angioplasty. *Circulation* 95: 1863–1869, 1997.
170. Shinde UA, Mehta AA., Goyal RK: Nitric oxide: A molecule of the millennium. *Indian J Exp Biol* 38: 201–210, 2000.
171. Silveri NG, Mazzone M, Portale G, Carbone I: Nitric oxide A general review about the different roles of this innocent radical. *Minerva Med* 92:167–171, 2001.
172. Slowey MJ: Polycystic ovary syndrome: new perspective on an old problem. *South Med J*. 94:190-196, 2001.
173. Smith S, Ravnkar VA, Barbieri RL: Androgen and insulin response to an oral glucose challenge in hyperandrogenic women. *Fertil Steril* 48: 72-5 , 1987.
174. Solomon C, Hu F, Dunaif A, Rich-Edwards J, Stampfer M, Willett W, Speizer F, Manson J: Menstrual cycle irregularity and risk for future cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2013–2017, 2002.
175. Sorensen MB, Franks S, Robertson C, Pennell DJ, Collins P: Severe endothelial dysfunction in young women with polycystic ovary syndrome is only partially explained by known cardiovascular risk factors. *Clin Endocrinol* 65: 655–659, 2006.
176. Steinberg HO, Baron AD: Vascular function, insulin resistance and fatty acids. *Diabetologia* 45: 623–634, 2002.

177. Stephen Franks: Polycystic ovary syndrome. *The N. Engl J Medicine*. 333 (13): 853–861, 1995.
178. Stuehr DJ: Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37 : 339-359, 1997.
179. Stühlinger MC, Abbasi F, Chu JW et al: Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *JAMA* 287: 1420–26, 2002.
180. Stühlinger MC, Tsao PS, Her JH, et al: Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 104: 2569–2575, 2001.
181. Surdacki S, Nowicki M, Sandmann J, Tsikas D, Boeger R, Bode-Boeger S, Kruszelnicka-Kwiatkowska O, Kokot F, Dubiel J, Froelich J: Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 33: 652– 658, 1999.
182. Sydow K, Münzel T: ADMA and oxidative stress. *Atheroscler Suppl* 4(4): 41–51, 2003.
183. synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 13527–13532, 2002.
184. Takeda K, Kamanaka M, Tanaka T, Kishimoto T, Akira S: Impaired IL-13-mediated functions of macrophages in STAT6-deficient mice. *J Immunol* 157(8):3220-3222, 1996.
185. Talbott E, Guzick D, Clerici A, Berga S, Detre K, Weimer K, Kuller L: Coronary heart disease risk factors in women with polycystic ovary syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 821-826, 1995.

186. Talbott EO, Guzick DS, Sutton-Tyrrell K et al: Evidence for association between polycystic ovary syndrome and premature carotid atherosclerosis in middle-aged women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 2414–2421, 2000.
187. Talbott EO, Guzick DS, Sutton-Tyrrell K, McHugh-Pemu KP, Zborowski JV, Remsberg KE, Kuller LH: Evidence for association between polycystic ovary syndrome and premature carotid atherosclerosis in middle-aged women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 2414–2421, 2000.
188. Taylor AB: Polycystic ovary syndrome. *Endocrinol and Metab Clin North America* 27:877-902, 1998.
189. Taylor Ann E: Polycystic Ovary Sendrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 27:877 903, 1998.
190. Taylor SI, Dons RF, Hernandez E, Roth J, Gorden P: Insulin resistance associated with androgen excess in women with autoantibodies to the insulin receptor. *Ann Intern Med.* Dec;97(6):851–5, 1982.
191. Taylor SI, Gama A, Acilci D, et al: Mutation in the insulin receptor gene. *Endocrinol Rev.* 13: 566–595, 1992.
192. Tojo A, Welch WJ, Bremer V et al: Colocalization of demethylating enzymes and NOS and functional effects of methylarginines in rat kidney. *Kidney Int* 52: 1593–1601, 1997.
193. Tran CTL, Leiper JM, Vallance P: The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler Supp* 4: 33-40, 2003.
194. Ueda S, Kato S, Matsuoka H et al: Regulation of cytokineinduced nitric oxide synthesis by asymmetric dimethylarginine: role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circ Res* 92: 226–233, 2003.

195. Usui M, Matsuoka H, Miyazaki H, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T: Increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with congestive heart failure. *Life Sci* 62: 2425–2430, 1998.
196. Utiger RD: Insulin and the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*. Aug 29;335(9):657–8, 1996.
197. Valkonen VP, Päivä H, Salonen JT, Lakka TA, Lehtimäki T, Laakso J, et al: Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* 358: 2127–2128, 2001.
198. Valkonen VP, Tuomainen TP, Laaksonen R: DDAH gene and cardiovascular risk. *Vasc Med* 10: 45–48, 2005.
199. Vallance P, Hingorani: Endothelial nitric oxide in humans in health and disease. *Int J Exp* 80: 291–303, 1999.
200. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S: Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 339: 572–575, 1992.
201. Wild S, Pierpoint T, McKeigue P, Jacobs H: Cardiovascular disease in women with polycystic ovary syndrome at long-term follow-up: a retrospective cohort study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 52: 595–600, 2000.
202. Xiao S, Wagner L, Schmidt RJ et al: Circulating endothelial nitric oxide synthase inhibitory factor in some patients with chronic renal disease. *Kidney Int* 59: 1466–1472, 2001.
203. Yudkin SJ, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppock SW: C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance and endothelial dysfunction: a

potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 972–978, 1999.

- 204.Zaman, F: Polikistik over sendromlu olgularda insülin rezistantının insülin tolerans testi ile araştırması, uzmanlık tezi. T.C. Dicle Üni. Tıp. Fak. Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalı Diyarbakır 2002
- 205.Zeiher AM, Krause T, Schächinger V, Minners J, Moser E: Impaired endothelium dependent vasodilation of coronary resistance vessels is associated with exercise-induced myocardial ischemia. *Circulation* 91: 2345–2352, 1995.
- 206.Zhang LH, Rodriguez H, Ohno S, Miller WL: Serine phosphorylation of human P450c17 increases 17,20-lyase activity: implications for adrenarche and the polycystic ovary syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. Nov 7;92(23):10619–23, 1995.
- 207.Zoccali C, Bode-Böger SM, Mallamaci F, Benedetto FA, Tripepi G, Malatino L, et al: Asymmetric dimethylarginine (ADMA): an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase predicts mortality in end-stage renal disease (ESRD). *Lancet* 358: 2113–117, 2001.