T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Selma SÜER GÖKMEN

L-ARGİNİN VE L-LİZİNİN DENEYSEL ATEROSKLEROZ GELİŞİMİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

(Doktora Tezi)

Selda UZGUR

EDİRNE-2022

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Selma SÜER GÖKMEN

L-ARGİNİN VE L-LİZİNİN DENEYSEL ATEROSKLEROZ GELİŞİMİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

(Doktora Tezi)

Selda UZGUR

Destekleyen Kurum: TÜBAP 2012/71

Tez No:

EDİRNE-2022

T. C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde ve Prof. Dr. Selma SÜER GÖKMEN danışmanlığında doktora öğrencisi Selda UZGUR tarafından tez başlığı "L-ARGİNİN VE L-LİZİNİN DENEYSEL ATEROSKLEROZ GELİŞİMİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 30.06.2022 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından "**Doktora Tezi**" olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Selma SÜER GÖKMEN
JÜRİ BAŞKANI

Prof. Dr. Hakan ERBAŞ
JÜRİ ÜYESİ

Prof. Dr. Zeynep Banu GÜNGÖR
JÜRİ ÜYESİ

Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ
JÜRİ ÜYESİ

Dr. Öğr. Üyesi Aliye ÇELİKKOL
JÜRİ ÜYESİ

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Tammam SİPAHİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince her konuda bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren danışmanım Prof. Dr. Selma SÜER GÖKMEN'e, Tıbbi Biyokimya AD öğretim üyeleri merhum Prof.Dr. Erol ÇAKIR'a, emekli öğretim üyesi Prof. Dr. Sevgi ESKİOCAK'a, Tıbbi Biyokimya AD Başkanı Prof. Dr. Hakan ERBAŞ'a ve Doç. Dr. Gülben SAYILAN ÖZGÜN'e, Tıbbi Farmokoloji AD öğretim üyesi Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ'e, Tıbbi Patoloji AD öğretim üyesi Doç. Dr. Şemsi YILDIZ'a ve anlayış ve destekleri için Medikal Onkoloji BD'da çalışan tüm çalışma arkadaşlarıma ve Merkez Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim. Ayrıca çalışmamızı destekleyen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ……1
GENEL BİLGİLER……3
ATEROSKLEROZ……3
ATEROSKLEROZ VE OKSİDATİF STRES……5
ATEROSKLEROZ VE ARGİNİN METABOLİZMASI……7
DENEYSEL ATEROSKLEROZ MODELİ……..17
GEREÇ VE YÖNTEMLER……19
BULGULAR……26
TARTIŞMA……48
SONUÇLAR……59
ÖZET……63
SUMMARY……64
KAYNAKLAR……66
ŞEKİLLER LİSTESİ……77
TABLOLAR LİSTESİ……78
ÖZGEÇMİŞ……80
EKLER

SİMGE VE KISALTMALAR

ABTS : 2,2′-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat)
ADMA : Asimetrik Dimetil Arginin
AGAT : Arginin:glisin amidinotransferaz
eNOS : Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
FAD : Flavin adenin dinükleotit
FMN : Flavin Mononükleotit
HDL : High Density Lipoprotein
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
iNOS : İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
LDL : Low Density Lipoprotein
NADPH : Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
nNOS : Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
NO : Nitrik Oksit
NOS : Nitrik Oksit Sentaz
ODC : Ornitin Dekarboksilaz
OSİ : Oksidatif Stres İndeksi
ROS : Reactive Oxygen Species
TAS : Total Antioxidant Status
TOS : Total Oxidant Status
VLDL : Very Low Density Lipoprotein

GİRİŞ ve AMAÇ

Dünyadaki ölümlerin yaklaşık üçte biri aterosklerozun rol aldığı kardiyovasküler hastalıklar nedeniyledir (1). Ateroskleroz, büyük ve orta büyüklükteki arterlerde lipid birikimi ile karakterize çok odaklı, sinsi bir hastalıktır (2). Aterosklerozun patogenezinde birden çok faktör bulunmakla beraber oksidatif stresin ve düşük dansiteli lipoprotein (LDL) oksidasyonunun önemli bir rolü olduğu bilinmektedir (3).

Son yıllarda arginaz enzim aktivitesindeki artışın da ateroskleroz patogenezi ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (4). Dahası, ateroskleroz gelişiminde önemli rolü olan okside LDL'nin arginaz aktivitesini arttırdığı ve bu artışın endotelyal nitrik oksit (NO) sentezini azaltarak reaktif oksijen türlerinin artmasına ve endotelyal fonksiyon kaybına neden olduğu gösterilmiştir (5).

L-Arginin hem arginaz hem de nitrik oksit sentaz (NOS) enzimlerinin ortak substratıdır. L-Arginin, arginaz aracılığı ile üre ve ornitine hidroliz olurken, NOS aracılığı ile de NO oluşumunu sağlar (6). Arginazın L-arginin için NOS ile yarışarak NO sentezini inhibe ettiği bildirilmiştir (7). Dışarıdan verilen L-argininin, NOS için substrat (L-arginin) kullanılabilirliğini artırarak NO üretiminde artışa neden olduğu bildirilmiştir (8). Proteinlerdeki arginin kalıntılarının metillenmesiyle oluşan asimetrik dimetilarginin (ADMA) NOS enziminin inhibitörüdür (9). ADMA, endojen bir NOS inhibitörüdür ve dışarıdan verilen L-arginin, ADMA ile yarışarak NOS'un inhibisyonunu önler. ADMA düzeyleri yüksek bireylerde, dışarıdan L-arginin verilişinin L-arginin/ADMA oranını artırarak endotelyal disfonksiyonu düzelttiği gösterilmiştir (10,11).

Hem L-arginin (12) hem de NO'nun (13) radikal tutucu yeteneğe ve hücre hasarına karşı koruyucu etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda arginaz inhibisyonunun, NO sentezinde artışa neden olarak aterosklerozu önleyebildiği gösterilmiştir (14-16). Esansiyel bir aminoasit olan L-lizin, arginaz enziminin güçlü bir kompetitif inhibitörüdür ve L-arginin'den arginaz aracılığı ile üre oluşumunu bloke ederek L-rgininin, NO sentezi için kullanılmasını sağlar (17).

Birçok oksidan ve antioksidan molekülün serum veya plazma düzeylerini ölçen çeşitli analitik yöntemler bulunmaktadır. Ancak bu moleküllerin ayrı ayrı ölçülmesi zaman alıcıdır, zordur ve ekonomik yönden de zorlayıcıdır. Bu nedenle "Total Antioxidant Status (TAS)" ya da "Total Oxidant Status (TOS)" ölçümü bir örnekteki oksidan ve antioksidan molekülün ayrı ayrı ölçülmesinden daha pratiktir (18-20). Oksidatif stres indeksi (OSİ) ise TOS'un TAS'a oranıdır (21).

Bu çalışmanın amacı sağlıklı ve aterosklerozlu sıçanlarda tek başına ve birlikte verilen L-arginin ve L-lizin'in, arginin metabolizmasına etkilerini incelemek ve aterosklerozun önlenmesindeki rollerini ortaya koymaktır. Bu amaçla hem sağlıklı sıçanlarda hem de kolesterol ve kolik asit verilerek deneysel ateroskleroz oluşturulmuş sıçanlarda, L-arginin ve L-lizin'in, serum arginaz, ADMA, ornitin, arginin, NO, TAS, TOS, lipit-lipoprotein düzeylerine ve OSİ ve ateroskleroz indeksine etkisi incelenmiştir.

GENEL BİLGİLER

ATEROSKLEROZ

Ateroskleroz, büyük ve orta büyüklükteki arterlerde lipit birikimi ile karakterize çok odaklı, sinsi ve immün-inflamatuar bir hastalıktır (2).

Yaşam süresinin artmasında, gelir ve eğitim düzeyindeki artış, beslenme alışkanlıklarının değişmesi ve bulaşıcı hastalıkların kontrolü gibi faktörler önemli rol oynamıştır. Yaşam süresi uzarken ona paralel olarak, bulaşıcı olmayan hastalıkların görülme sıklığı da artmıştır (22).

Dünya sağlık örgütü verilerine göre 2016 yılında yaklaşık 56.9 milyon ölümün % 71'i kalp ve damar hastalıkları, kanser, diyabet ve kronik akciğer hastalıkları gibi bulaşıcı olmayan hastalıklar nedeniyledir. Bu ölümlerin 17.9 milyonu (yaklaşık %44'ü), kardiyovasküler hastalıklar nedeniyledir (23).

Ülkemizde de, dolaşım sistemi hastalıkları (%40.4), iyi huylu ve kötü huylu tümörler (%20.7), solunum sistemi hastalıkları (%10.7), endokrin-beslenme ve metabolizma ile ilgili hastalıklar (%5.1), yaralanma nedenleri ve zehirlenmeler (%4.3), sinir sistemi ve duyu organları hastalıkları (%4.4) gibi bulaşıcı olmayan hastalıklar, ölüm nedenlerinin başında yer almaktadır (22).

Koroner Arter Hastalığı için başlıca risk faktörleri aşağıda verilmiştir (24):

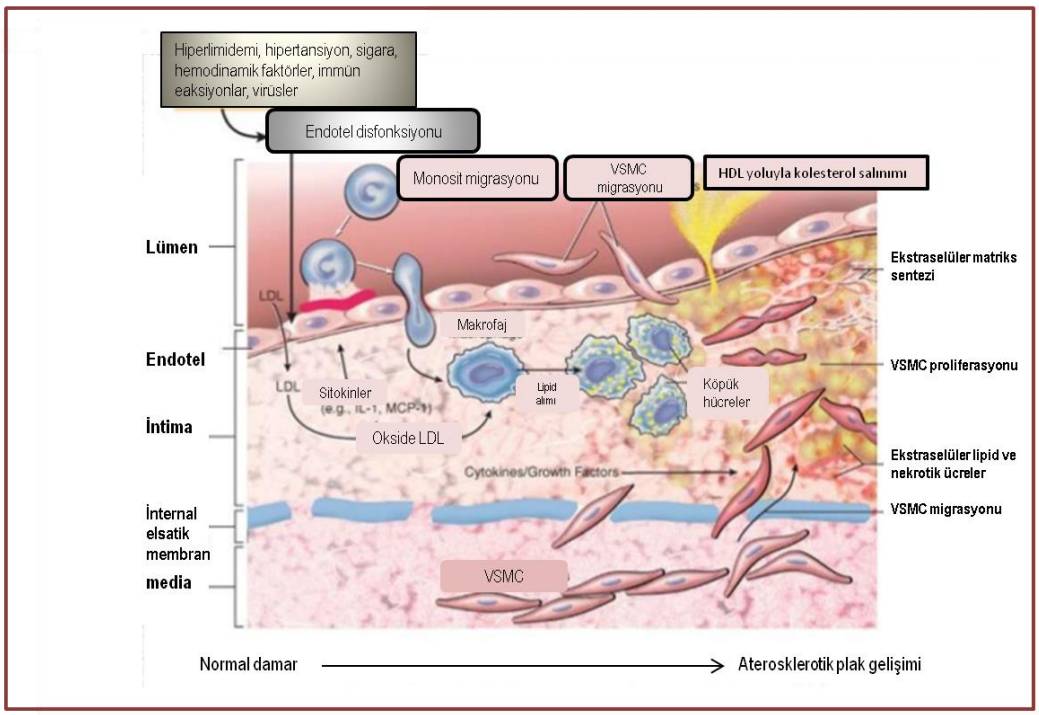
- Modifiye Edilemeyen Risk Faktörleri: Yaş, cinsiyet, aile öyküsü.
- Modifiye Edilebilen Risk Faktörleri: Sigara, hipertansiyon, hiperlipidemi, diyabet, insülin rezistansı, obezite/bel çevresi kalınlığı, sedanter yaşam tarzı, mental stres, depresyon.
- Yeni Risk Faktörleri: Homosistein, lipoprotein (a), fibrinojen, oksijen radikalleri/inflamasyon, Apo A1, Apo B, küçük yoğun LDL, okside LDL, hipertrigliseridemi, trans yağlar.

Kardiyovasküler hastalık riskini belirleyen çeşitli lipoprotein oranları veya "ateroskleroz indeksleri (aterojenik indeksler)" tanımlanmıştır. Bu ateroskleroz indekslerinden biri, "non-HDL kolesterol/HDL kolesterol" oranıdır ve aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır (25):

Ateroskleroz indeksi: (Total kolesterol- HDL kolesterol) / HDL kolesterol

Aterosklerotik lezyonlar, oluşum sürecine göre yağlı çizgilenmeler, fibröz plak oluşumu ve komplike lezyonlar olarak sınıflandırılabilir. Çocukluk çağında bile ortaya çıkabilen ve makroskobik olarak kan akımına paralel sarı çizgiler şeklinde görülen lezyonlar, yağlı çizgilenmeler olarak adlandırılır. Aterosklerozun başlangıcı olan yağlı çizgilenme aşamasında, intima tabakasında, köpük hücre denilen yağ damlacıklarıyla yüklü makrofaj birikimi meydana gelir. Daha sonraki aşamada intimada çok sayıda düz kas hücresi, makrofajlar, T lenfositler birikmeye başlar ve fibröz plak oluşumu gözlenir. Fibröz plaklar damar lümenini önemli oranda daraltırlar ancak sağlam kaldıkları sürece klinik olaylara yol açmazlar. Fibröz plağa, kanama, kalsifikasyon ya da tromboz eşlik ettiğinde komplike lezyon ortaya çıkar. Plak yırtılması ve trombüs oluşumu sonucunda akut koroner sendromlar gelişir (Şekil 1) (26-29).

Ateroskleroz patogenezi için üç farklı hipotez ileri sürülmüştür. Birbirini destekleyen bu hipotezler; zedelenmeye yanıt hipotezi, tutulmaya yanıt hipotezi ve oksidatif modifikasyon hipotezi olarak bilinmektedir (30,31). Oksidatif modifikasyon hipotezi günümüzde geçerli hipotez olarak kabul edilmektedir. Arter duvarında LDL'nin makrofaj aracılıklı oksidatif modifikasyonu, ateroskleroz patogenezinde önemli bir role sahiptir (3,32).



Şekil 1. Aterosklerotik plak gelişiminde rol oynayan süreçler (29)

VSMC: Vasküler düz kas hücresi.

ATEROSKLEROZ VE OKSİDATİF STRES

Mitokondride, oksijen, genellikle enerji (ATP) üretimi ve oksidatif fosforilasyon için kullanılır. Mitokondriyal elektron transferi sırasında zararlı reaktif oksijen türleri ortaya çıkar (33). Reaktif oksijen türleri; oksijen içeren kimyasal olarak reaktif moleküllerdir. Süperoksit radikali, hidroksil radikali ve lipit radikalleri gibi ortaklanmamış elektrona sahip reaktif oksijen türleri serbest radikal olarak bilinir. Hidrojen peroksit, peroksinitrit ve hipokloröz asit gibi reaktif oksijen türleri ise serbest radikal değildir ancak oksidatif stres ile sonuçlanan oksitleyici etkiye sahiptirler (34).

Hücrede ortaya çıkan reaktif oksijen türleri normal şartlarda enzimatik ve/veya nonenzimatik antioksidan mekanizmalarla uzaklaştırılır. Sağlıklı bir organizmada, serbest oksijen radikalleri oluşumu ile antioksidan savunma sistemleri arasında bir denge vardır. Reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi ve/veya antioksidanların düzeyindeki azalmaya bağlı olarak oksidan/antioksidan denge bozulur ve oksidatif stres denilen durum ortaya çıkar (35).

Patolojik koşullarda damar duvarında reaktif oksijen türleri üretiminin arttığı bilinmektedir (33). Doğal formunda aterojenik olmayan LDL, oksidatif strese bağlı olarak modifiye olur. Oluşan okside LDL oldukça aterojeniktir. Okside LDL'ler

makrofaj membranındaki çöpçü reseptörler aracılığıyla hücre içine kontrolsüz bir şekilde alınarak kolesterol esteri olarak depolanırlar (32, 36). Makrofajlar lipit yüklü köpük hücrelere dönüşürler (30). Okside LDL, çeşitli sitokinlerin yapımını uyararak bölgeye daha fazla monosit göçünü sağlar ve atersoklerotik süreç başlamış olur (26).

Hipoksi ya da iskemi gibi durumlarda, mitokondriyal elektron transportu dengesi bozulur, sonuç olarak ATP tüketimi, asidoz, mitokondriyal depolarizasyon, zararlı metabolitlerin birikimi, hücre içi kalsiyum artışı ve hücre ölümü meydana gelir (33).

Antioksidan durum ve oksidatif stres parametrelerinin serum ya da plazma düzeylerini ölçen birçok yöntem bulunmasına karşın bu moleküllerin ayrı ayrı ölçümü karmaşık, zaman alıcı, iş yükü fazla ve pahalıdır. Bu nedenle TAS ve TOS ölçülmesi çok daha pratiktir (37). TAS ifadesi yerine antioksidan durum (38), antioksidan güç (39) veya serum antioksidatif aktivite (40) ifadeleri de kullanılmaktadır. TAS ölçüm yöntemlerinin temelinde, bir radikal üretimi ve bu radikale karşı örneğin antioksidan etkinliğinin ölçümü yer alır. Birçok yöntemde 2,2′-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat) (ABTS) kullanılır. Renksiz indirgenmiş ABTS molekülü okside olarak mavi-yeşil renkli $ABTS^{\bullet+}$ radikaline dönüşür. Renkli $ABTS^{\bullet+}$ radikali oksitlenebilecek herhangi bir madde ile karıştırıldığında tekrar orijinal renksiz ABTS formuna indirgenirken reaksiyona giren madde ise okside olur (37,41,42).

Çeşitli yöntemlere göre, indirgenmiş ABTS molekülü, potasyum persülfat (42), MnO_2 (43) ve 2,2′-azo-bis (2-aminopropan; ABAP) (44) gibi oksidanlarla okside edilebilir. ABTS oksidasyonu için H_2O_2 ve peroksidaz enzimini beraber kullanan yöntemler de bulunmaktadır (45). Erel ve ark. (37) tarafından geliştirilen yöntemde ise peroksidaz enzimi kullanılmaz. ABTS molekülü, hidrojen peroksit kullanılarak yarılanma ömrü daha uzun ve daha stabil bir $ABTS^{\bullet+}$ molekülüne okside edilir.

TOS ifadesi yerine, total peroksit (46), serum oksidan aktivite (47) ve reaktif oksijen metabolitleri (48) gibi ifadeler de kullanılmaktadır. TOS ölçümü için de farklı kolorimetrik yöntemler kullanılmasına rağmen bu yöntemler, bazı analitik problemler ve teknik kısıtlamalara sahiptir. Erel ve ark. (49) TOS ölçümü için kolay, güvenilir, hassas, reaktifleri uzun süre dayanıklı, otomatik ve ucuz bir metot geliştirmişlerdir. Bu metot, peroksitlerin varlığında, serbest radikallerin bazı geçiş metallerini okside etmesi sonucu ortaya çıkan renk değişikliğinin spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır.

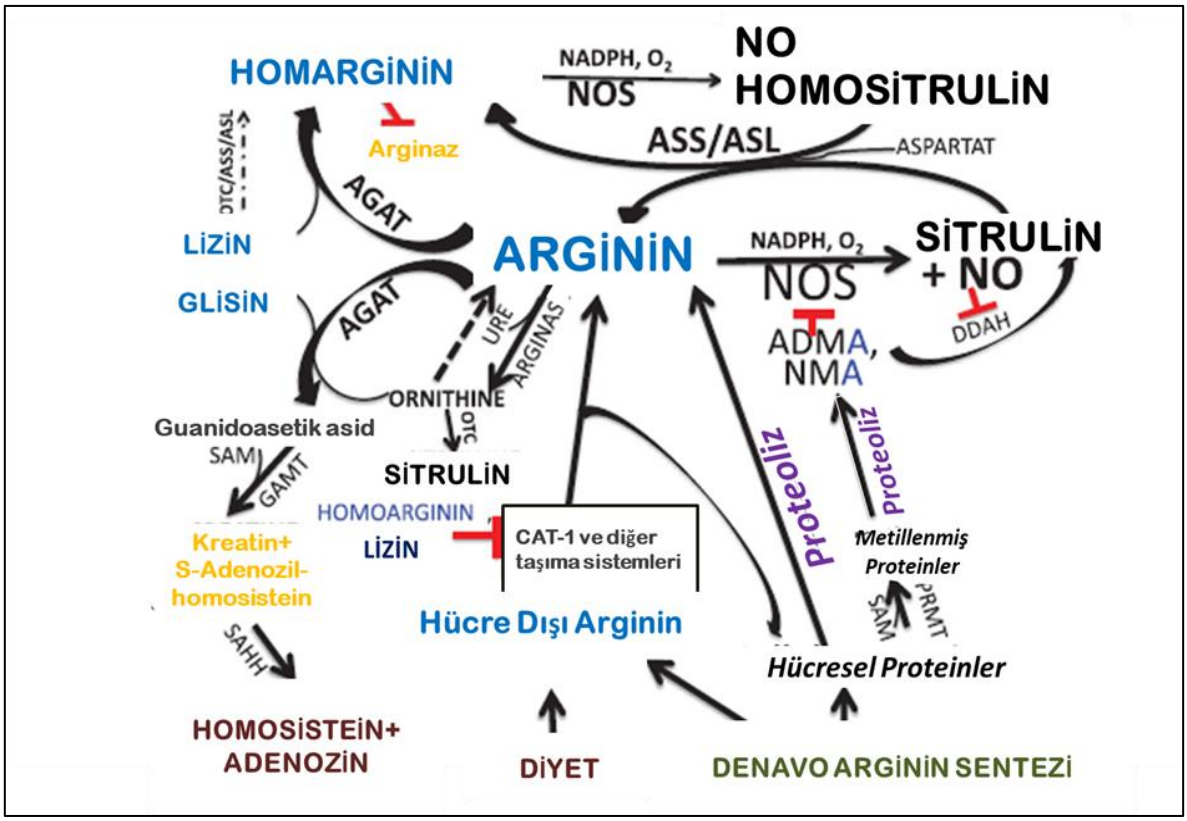
TOS değerinin TAS değerine oranı OSİ olarak adlandırılır. OSİ hesaplanırken TAS'ın birimi µmol Trolox Ekivalent/L'ye çevrilir (21, 46).

$$\text{OSİ} = \frac{\text{TOS (µmol } H_2O_2 \text{ ekivalent/L)}}{\text{TAS (µmol Trolox ekivalent/L)}} \times 100$$

ATEROSKLEROZ VE ARGİNİN METABOLİZMASI

Arginin birçok fizyolojik ve patofizyolojik olayın metabolik süreçlerinde kritik rol oynayan yarı esansiyel bir aminoasittir. Argininin D ve L olmak üzere iki izomeri bulunmaktadır fakat proteinlerin yapısındaki L-arginindir. Genel formülü $C_6H_{14}N_4O_2$' dir ve moleküler ağırlığı 174 daltondur. (Şekil 2) (50-53). Endojen arginin sentezi, sitrülinden (böbrek, karaciğer ve ince bağırsakta), glutamattan veya proteinlerin yıkılımından olmak üzere üç şekilde gerçekleşir (54). L-Arginin hem arginaz hem de NOS enziminin ortak substratıdır. Arginaz ve NOS enzimleri, L-arginin için yarışırlar (6,55).

Diğer yandan arginin, mitokondriyal bir enzim olan Arginin:glisin amidinotransferaz (AGAT) enzimi aracılığı ile glisin ile reaksiyona girerek guanido süksinik asit oluştururken yine AGAT aracılığıyla lizin ile reaksiyona girerek homoarginin oluşturur. Düşük homoarginin konsantrasyonları kardiyovasküler hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Çünkü homoarginin çok etkin olmasa da NOS için bir substrat gibi görev yapar ve aynı zamanda zayıf bir arginaz inhibitörüdür. Dolayısıyla homoarginin NO sentezini artırarak kardiyovasküler hastalıklar için faydalı olabilir. Yüksek homoarginin düzeylerinin kardiyovasküler hastalıklar için yararlı olabileceği öne sürülmüştür (56-58).

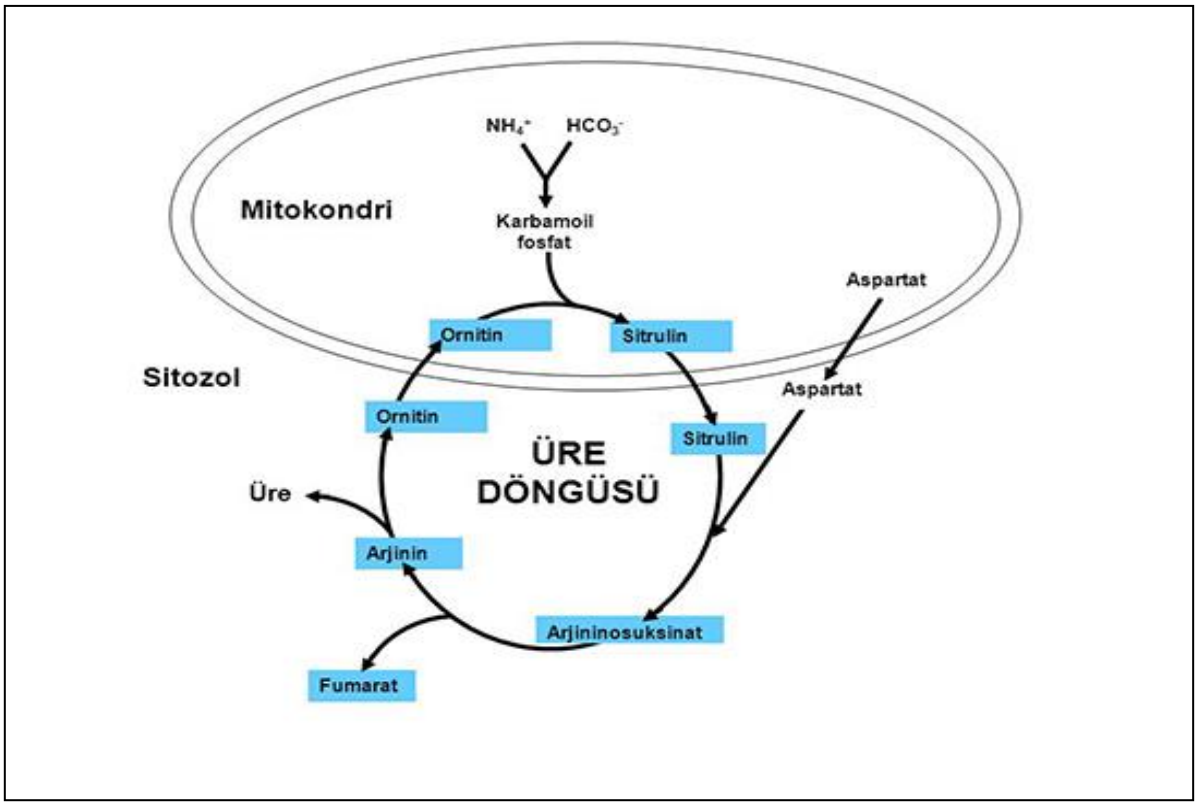


Şekil 2. Memelilerde arginin metabolizması (50)

ADMA: Asimetrik dimetilarginin; **NMMA:** NG-Monometilarginin; **SAM:** Simetrik dimetilargininin; **AGAT:** Arginin:glisin amidinotransferaz; **ASL:** Arginosuksinat liyaz; **ASS:** Arginosuksinat sentaz, **DDAH:** Dimetil diaminoarginin hidrolaz; **NO:** Nitrik oksit; **NOS:** Nitrik oksit sentaz; **OTC:** Ornitin transkarbamilaz; **PRMT:** Protein arginin metil transferaz.

Arginaz ve Arginin-Ornitin Metabolik Yolağı

Arginaz (L-arginin amidinohidrolaz; E.C.3.5.3.1), enzimi hepatik üre döngüsünün son enzimi olarak görev yapar. Üre döngüsü memelilerde karaciğerde amonyağın detoksifikasyonundan sorumludur. Arginaz argininin üre ve ornitine hidrolizini katalizler. Karaciğer, arginaz enzim aktivitesince en zengin organdır. Arginaz daha az miktarlarda böbrek, beyin, barsak, meme bezi, eritrositler ve ciltte bulunur (Şekil 3) (59-61).



Şekil 3. Üre döngüsü ve arginaz enzimi (60)

Arginaz enzimi aktivite gösterebilmek için divalent katyonlara ihtiyaç duyar. Arginazın fizyolojik aktivatörü mangan (Mn^{2+}) elementidir. Bununla birlikte bazı arginazların Co^{2+}, Ni^{2+}, Fe^{2+} ve Cd^{2+} iyonları ile de aktive olduğu gösterilmiştir (62).

Arginaz enziminin arginaz I ve II olmak üzere iki izoformu vardır. Bu iki enzim, aynı biyokimyasal reaksiyonları katalizlemesine rağmen hücresel ekspresyonu, regülasyonu ve hücresel lokalizasyonları bakımından farklılık gösterir. Arginaz I (AI) (hepatik arginaz) sitozolik bir enzimdir, karaciğerde lokalize olmuştur ve total arginaz aktivitesinin büyük bir kısmını oluşturur. Arginaz I, başlıca üre sentezi ve amonyağın detoksifikasyonunda rol oynar. Arginaz II (AII) (ekstrahepatik arginaz) ise mitokondride lokalize olmuştur (62, 63). Böbrek ve prostat başta olmak üzere birçok ekstrahepatik dokuda bulunur. (7,62,64). Arginaz II, ornitin, prolin, glutamat sentezi gibi biyosentezlerde rol alır (63).

Ornitin, glutamik asit, prolin ve poliaminlerin sentezinde önemli bir metabolittir (65). Ornitin, ornitin dekarboksilaz (ODC) aracılığıyla, spermin ve spermidin gibi poliaminlerin sentezine katılır. ODC enzimi poliamin biyosentezinde hız kısıtlayıcı basamaktır ve yüksek arginaz enzim konsantrasyonu ile aktive olur (66,67).

Poliaminler, deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) sentezini uyararak hücre büyümesinde, gelişmesinde ve farklılaşmasında rol oynarlar (65,66).

Nitrik Oksit Sentaz ve Arginin-NO Metabolik Yolağı

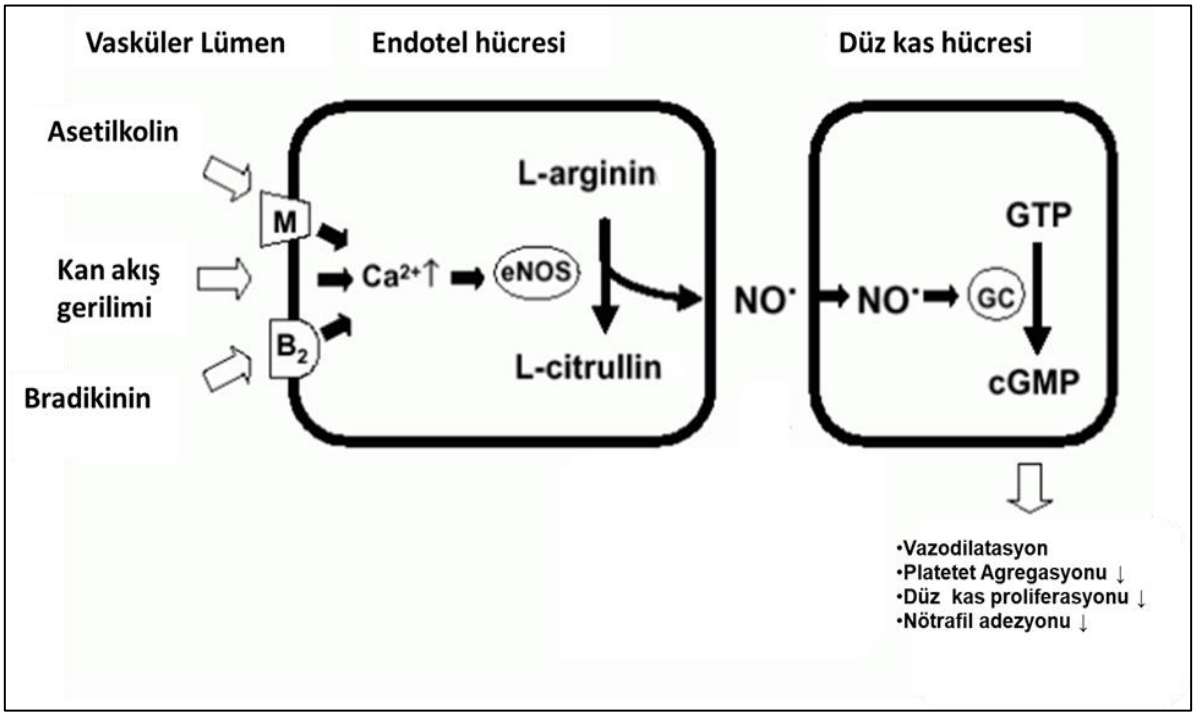
L-Arginin aynı zamanda NOS aracılığıyla sitrulin ve NO'e de çevrilir. NOS'ın 3 izoenzimi tanımlanmıştır. Bunların hepsi substrat olarak L-arginin, kosubstrat olarak moleküler oksijen ve indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) kullanır. Flavin adenin dinükleotit (FAD), flavin mononükleotit (FMN) ve (6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiyopterin (BH4) tüm NOS izoenzimlerinin kofaktörüdür. Tüm NOS izoenzimleri kalmodulin bağlar ve hem içerir. NOS proteinleri homodimer olarak fonksiyon görür (68).

Nöronal NOS (nNOS, NOS I), başlıca santral sinir sisteminin spesifik nöronlarında ifade edilir. Enzimin aktivitesi kalsiyum/kalmodulin ile regüle edilir (69). İndüklenebilir NOS (iNOS; NOS II), genellikle hücrelerde ifade edilmez, ancak ekspresyonu bakteriyel lipopolisakkarit, sitokinler ve diğer ajanlar tarafından indüklenir. İlk olarak makrofajlarda tanımlanmış olmasına rağmen enzimin ekspresyonu hemen hemen her hücre veya dokuda indüklenebilir. Eksprese edildiğinde iNOS, sürekli olarak aktiftir ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonu ile regüle edilmez. Endotelyal NOS (eNOS, NOS III) başlıca endotelyal hücrelerde eksprese olur (70,71). nNOS'a benzer şekilde eNOS aktivitesi de kalsiyum/kalmodulin tarafından regüle edilir ve birçok kardiyovasküler fonksiyon için düzenleyici role sahiptir (72).

Endotelde L-argininden NOS aracılığıyla üretilen NO, normal vasküler fonksiyon için gereklidir (7). Kuvvetli bir vazodilatördür ve koroner kan akımını arttırır. NO'nun reaktif oksijen türleri aracılığı ile oluşan doku hasarını azalttığı ve bu yolla kalbi koruyucu etki gösterdiği ileri sürülmüştür (73).

NO, düz kas hücrelerine hızlıca difüze olarak NO-duyarlı guanilat siklaz'ı aktive eder ve ikinci haberci cGMP üretimini artırır. Bunun sonucunda düz kas hücreleri gevşer, trombosit agregasyonu ve adezyonu inhibe olur (Şekil 4) (74,75). Ayrıca düz kas proliferasyonu ve matriks moleküllerinin üretimini uyaran trombosit kaynaklı büyüme faktörlerinin salınımı da inhibe olur (68). NO aynı zamanda bir serbest radikal ve zayıf bir oksidandır. Hem L-arginin (12) hem de NO'nun (13) radikal tutucu yeteneğe ve hücre hasarına karşı koruyucu etkiye sahip olduğu bilinmektedir.

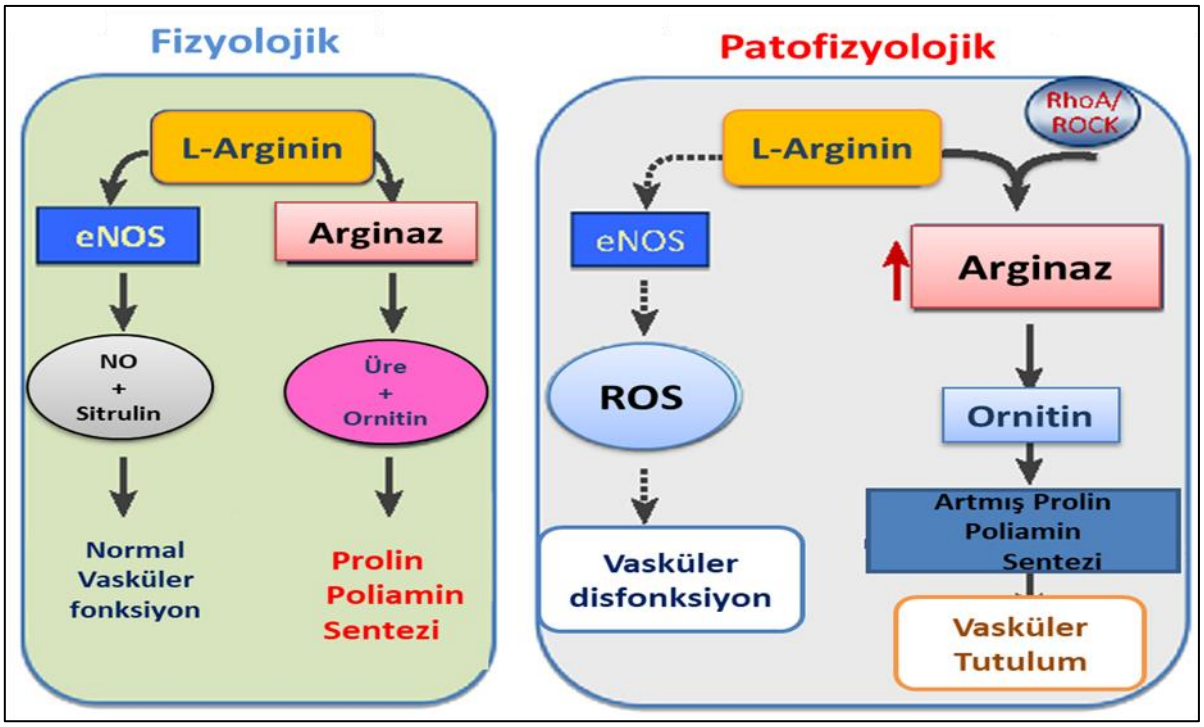
NO radikali (NO•), süperoksit radikali ($O2^{\bullet -}$) ile hızlıca reaksiyona girerek, radikal olmayan reaktif peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşturur (76).



Şekil 4. Endotelyal hücrelerde üretilen nitrik oksidin vasküler düz kas hücreleri üzerine etkisi (75)

eNOS: Endotelyal nitrik oksit sentaz; **cGMP:** Siklik guanozin monofosfat; **Ca**: Kalsiyum; **GC:** Guanilat siklaz; **GTP:** Guanozin trifosfat.

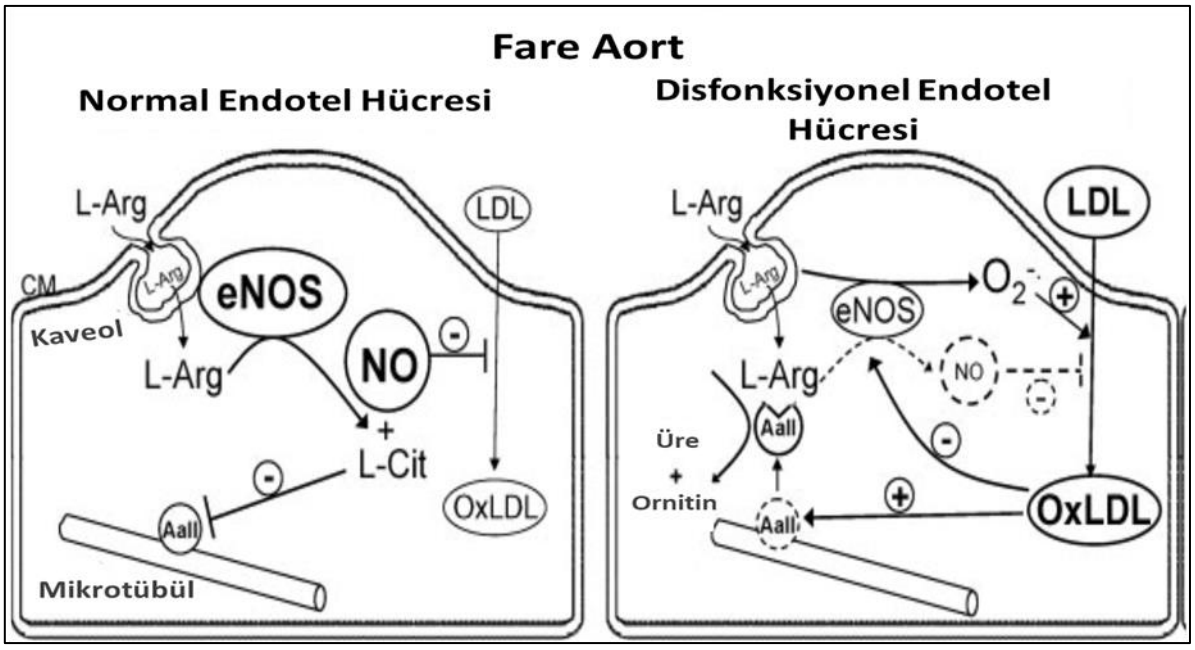
Arginaz, L-arginin için NOS ile yarışarak NO sentezini inhibe edebilir. NOS'un (Km : ~2-20 µM) L-arginin'e afinitesi, arginaz'dan (Km : ~1-5 mM) çok daha yüksek olmasına rağmen arginazın maksimum aktivitesi NOS'tan 1000 kat daha yüksektir. Bu nedenle arginin, fizyolojik koşullarda NOS ve arginaz tarafından eşit oranda kullanılır (7). Arginaz enziminin aktivitesindeki artış, aynı zamanda eNOS'un substratı olan argininin doku ve hücre düzeylerinde azalmaya neden olur. Böylece eNOS aracılığıyla NO üretimi azalır. NO üretimindeki azalmaya bağlı olarak süperoksit düzeyleri artar. Artmış arginaz aktivitesi, vasküler disfonksiyon ile karakterize olan ateroskleroz da dahil birçok hastalık ile ilişkilendirilmiştir (Şekil 5) (77,78).



Şekil 5. Fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerde arginaz ve eNOS enzim aktiviteleri (78)

eNOS: Endotelyal nitrik oksit sentaz; **ROS:** Reaktif oksijen türleri; **NO:** Nitrik oksit; **ROCK:** RhoA kinaz

Ryoo ve arkadaşları (5) sağlıklı fare endotel hücresinin mikrotübüllerinde, arginaz II enziminin inaktif halde tutulduğunu, dolayısıyla ortak substrat L-arginin'in NOS tarafından NO'e dönüştürüldüğünü, bunun da LDL'nin okside LDL'ye dönüşmesini inhibe ettiğini göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar bu reaksiyonun yan ürünü olan sitrulinin de mikrotübüllerde arginaz II enzimini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, hiperkolesterolemik farelerin hasarlı aortik endotel hücresinde biriken okside LDL'nin mikrotübüllerden arginaz II'nin ayrılmasına ve sitozolde enzim aktivitesinin artmasına neden olduğu bildirilmiştir. Arginase II aktivitesindeki artışın ise ortak substrat L-arginin için NOS ile yarışarak NO üretiminin azalmasına, dolayısıyla süperoksit anyonlarının artmasına ve okside LDL üretiminin daha da artmasına yol açtığı bildirilmiştir (Şekil 6) (79).



Şekil 6. Hiperkolesterolemik farede endotel fonksiyon bozukluğu modeli (79)

CM: Hücre membranı; **L-Arg:** L-Arginin; **L-Cit:** L-sitrulin; **eNOS:** Endotelyal nitrik oksit sentaz; **LDL:** Düşük yoğunluklu lipoprotein; **oxLDL:** Okside LDL; **AaII:** Arginaz II; **NO:** Nitrik oksit.

Arginaz aktivitesi artışı, NOS'un da substratı olan L-argininin tüketilmesine yol açar. L-Arginin düzeylerinin azalmasına bağlı olarak NO üretimi azalır. Bu da reaktif oksijen türlerinin ve dolayısıyla ateroskleroz patogenezinde önemli rol oynayan okside LDL oluşumunun artmasına neden olur (5).

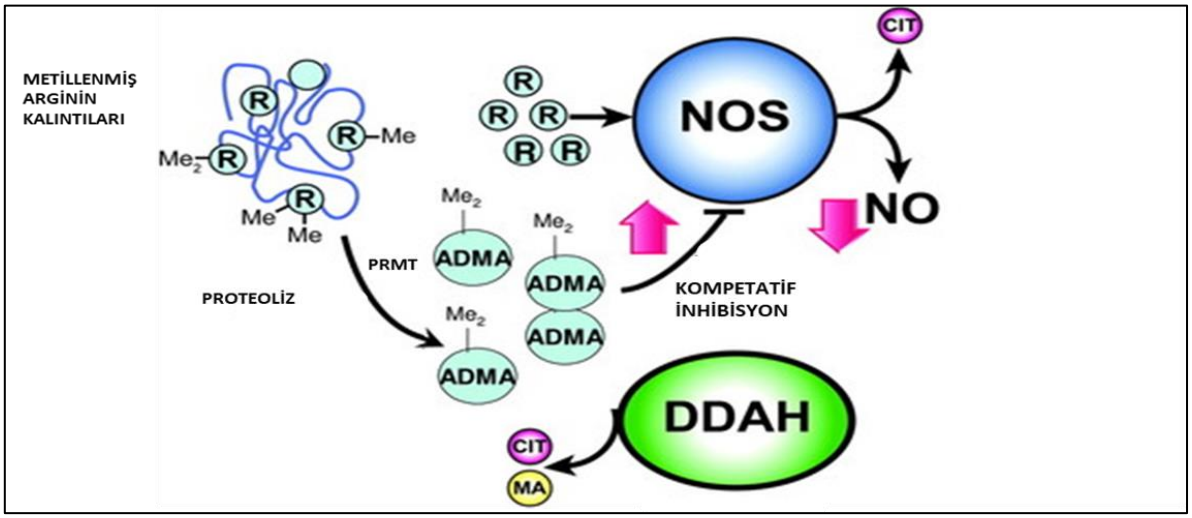
Oral yoldan verilen L-argininin, sıçanlarda, serum arginin, ornitin ve NO düzeylerinde belirgin bir artışa yol açtığı (80) ve bu artıştan L-arginin aracılığıyla eNOS enziminin ekspresyonunun artırılmasının sorumlu olabileceği bildirilmiştir (81).

Asimetrik Dimetilarginin

Asimetrik dimetilarginin, plazmada, dokuda ve idrarda bulunan metilenmiş bir aminoasittir ve ilk olarak 1970 yılında tanımlanmıştır (82). ADMA düzeylerindeki artışın da NO üretiminde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. ADMA, L-arginin ile yarışarak NOS'u inhibe eder (Şekil 7) (83).

ADMA, proteinlerin arginin kalıntılarının protein arginin metiltransferaz (PRMT) enzimi aracılığıyla metillenmesiyle üretilir. Bu metilasyon, argininin guanidin nitrojenlerine bir ya da iki metil grubu ekleyen post-traslasyonal bir modifikasyondur. PRMT'nin PRMT 1 ve PRMT 2 olmak üzere iki tipi vardır. PRMT 1, ADMA'nın oluşumunu katalizlerken, PRMT 2 ise her iki guanidin nitrojeni metilleyerek simetrik

dimetilargininin (SDMA) oluşumunu katalizler. NG-monometil-L-arginin (L-NMMA) ise monometilasyon ile PRMT enzimlerinin her ikisi tarafından üretilebilir (9). SDMA'nın büyük bir kısmı böbrekler yoluyla atılırken ADMA ve L-NMMA ise metabolize edilir (84). ADMA başlıca dimetilarginin dimetilaminohidrolaz (DDAH) enzimi tarafından sitrulin ve dimetilaminlere yıkılır. Reaksiyon, ADMA molekülünün guanidino kısmına, enzimin tersiyer yapısında aktive edilmiş durumda tutulan bir sistein kalıntısı tarafından nükleofilik bir saldırı aracılığıyla gerçekleşir (9,84).



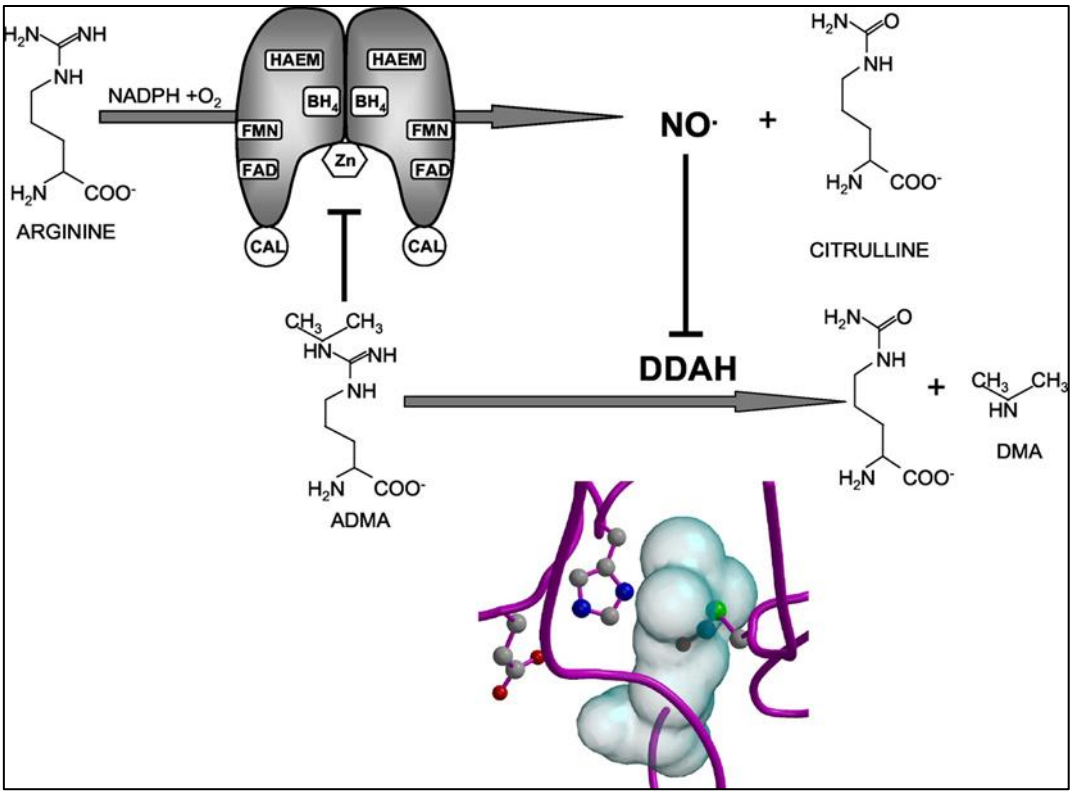
Şekil 7. ADMA oluşumu (83)

PRMT: Protein arginin metil transferaz; **DDAH**: Dimetilarginin dimetilamino hidrolaz; **NO:** Nitrik oksit; **NOS:** Nitrik oksit sentaz; **ADMA:** Asimetrik dimetil arginin, **CIT:** Sitrulin; **MA**: Dimetilamin.

Yüksek organizmalarda ADMA yıkılışında anahtar rol oynayan DDAH enziminin DDAH 1 ve DDAH 2 olmak üzere iki izoformu bulunur. İki izoform da farklı doku dağılımlarına sahiptir ancak benzer aktivite gösterir (85). Her iki izoform da kardiyovasküler sistemde tanımlanmış olmasına rağmen DDAH 2'nin kardiyovasküler sistemde mRNA düzeyinde daha fazla eksprese edildiği gösterilmiştir (86). DDAH enzim aktivitesindeki azalma, dolaşımda ADMA düzeylerinde artışa yol açar (87). Oksidatif streste, DDAH enzimi inhibe olur. Bu inhibisyonun geri dönüşümlü olup olmadığı açık değildir (9). Ito ve arkadaşları (88), endotel hücrelerinde okside LDL veya TNF-α'nın neden olduğu oksidatif stresin, DDAH aktivitesini azalttığını gösterdiler.

Vallance ve ark. (89) L-arginin'e yapısal benzerlik gösteren ADMA ve LNMA'nın, NOS'un endojen inhibitörü olduğunu, bununla birlikte plazmada LNMA çok düşük düzeylerde bulunduğundan asıl endojen NOS inhibitörünün ADMA olduğunu

bildirmişlerdir. Diğer yandan NO, aktif bölgedeki sistein kalıntılarının S-nitrozilasyonu aracılığıyla DDAH enzimini direkt olarak inhibe eder. DDAH inhibisyonu, NOS inhibisyonu ve ADMA birikimi ile sonuçlanır (Şekil 8) (9,90).



Şekil 8. Metillenmiş arginin metabolizmasının NO ile düzenlenmesi (9)

DDAH: Dimetilarginin dimetilamino hidrolaz; **NO•:** Nitrik oksit radikali;
ADMA: Asimetrik dimetil arginin.

Hiperkolesterolemi, ateroskleroz, hipertansiyon, kronik böbrek yetmezliği ve kronik kalp yetmezliği olan insanların plazma ADMA düzeylerinde bir artış söz konusudur. Yüksek ADMA düzeyleri, NO sentezinin azalmasına neden olur, bu da endotele bağlı vazodilatasyonda bozulmaya yol açar (91). Deney hayvanlarında, hiperkolesterolemik diyetin plazma ADMA düzeylerinde bir artışa neden olduğu bildirilmiştir (92,93). Hiperkolesterolemik bireylerde de plazma ADMA düzeylerinde bir artışın olduğu gösterilmiştir (94).

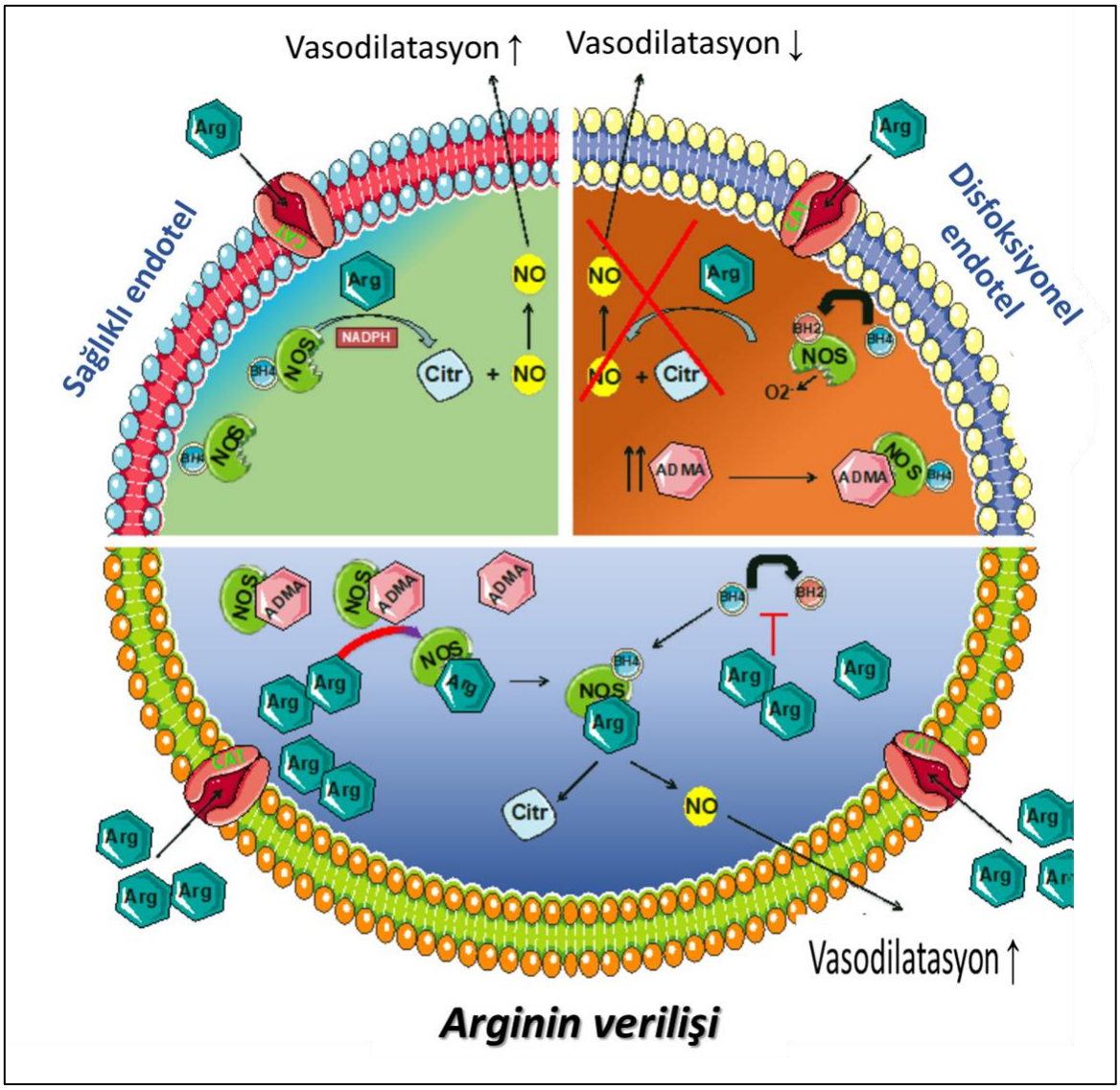
Dışarıdan verilen L-arginin, NO üretimini artırır. L-Arginin verilişi ile NO üretiminin artmasından iki faktör sorumludur. Birincisi L-argininin NOS'un substratı

olmasıdır. Oral L-arginin tedavisinin NO üretiminde artışla sonuçlandığı (14, 95) ve bu artışın, NO üretiminden sorumlu eNOS enziminin L-arginin tarafından uyarılmasından (81) ve/veya eNOS için substrat (L-arginin) kullanılabilirliğinin artmasından kaynaklanabileceği bildirilmiştir (8). L-arginin'in damar sisteminde koruyucu bir etkiye sahip olduğu da ileri sürülmüştür (96).

İkincisi ise argininin, NOS inhibitörü ADMA ile yarışarak NOS inhibisyonunu önlemesidir. Endotelyal hücrelerde eNOS'un substrat ile satüre olduğu, bu nedenle normal şartlarda dışarıdan verilen argininin, NO üretimini arttırmaması beklenir. Bununla birlikte, in vitro ve in vivo çalışmalar, hücre içinde satüre edici arginin konsantrasyonuna rağmen, fizyolojik koşullar altında vasküler endotelyal hücreler tarafından NO üretiminin dışarıdan arginin verilmesi ile arttırılabileceğini göstermiştir (97-99). NOS enzimlerinin hücre içinde L-arginin ile satüre olmalarına rağmen hücre içi NO üretiminin dışarıdan verilen L-arginin ile artması "arginin paradoksu" olarak adlandırılır (100). Dışarıdan verilen L-argininin, endotelyal disfonksiyonu, yüksek ADMA düzeylerine sahip bireylerde düzelttiği ancak normal ADMA düzeylerine sahip sağlıklı bireylerde etkilemediği bildirilmiştir (Şekil 9) (10,11,97).

Esansiyel bir aminoasit olan L-lizin, bazik amino asitler grubunda yer alır ve oral yolla alınan gıda takviyesi ürünlerinde yaygın olarak bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda oral L-lizin kullanımının, çocuklarda ve menopoz sonrası kadınlarda kalsiyumun kullanılabilirliğini arttırarak kemik gelişimine katkıda bulunduğu, birçok kardiyovasküler hastalıkta tedaviye destek olarak fayda sağladığı bildirilmiştir (101,102).

L-lizin, arginaz enziminin güçlü bir kompetitif inhibitörüdür (103). Lizin, arginin ile aynı hücre içi transport sistemini kullanır (104). L-lizin, L-arginin'den arginaz aracılığı ile üre oluşumunu bloke eder ve L-argininin, NO sentezi için kullanılmasına olanak sağlar (103). L-lizin'in argininden en önemli farkı, NO sentezi için bir substrat olmamasıdır (105). Arginaz'ın inhibisyonu, arginin düzeyinde ve kreatinin sentezinde artışa neden olur (106). Arginaz inhibisyonunun, NO sentezinde de artışa neden olduğu ve böylece aterosklerozu önleyebildiği gösterilmiştir (14-16). Fico ve ark. (107), lizinle beslenen ratlarda arginazın kompetitif inhibisyonuna bağlı olarak üre sentezinin inhibe olduğunu, oysa arginin ilavesiyle arginaz inhibisyonunun %90'ının ortadan kaldırıldığını ileri sürmüşlerdir.



Şekil 9. Endotelyal (dis)fonksiyonda arginin rolü (97)

Arg: Arginin**; BH4:** 7,8-dihidrobiopterin**; CAT:** Katyonik amino acit taşıyıcısı; **NO:** Nitrik oksit; **NOS:** Nitrik oksit sentaz; **Cit:** Sitrulin; **NADPH:** Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat.

DENEYSEL ATEROSKLEROZ MODELİ

Klinik çalışmalar, kolesterol düzeylerindeki her %1'lik azalmanın kardiyovasküler hastalık riskinde %2'lik bir azalma ile sonuçlanabileceğini göstermiştir (108). Bu nedenle birçok araştırmacı, deney hayvanlarının diyetine kolesterol ekleyerek deneysel ateroskleroz modeli oluşturmayı hedeflemişlerdir (109-111). Bir kısım araştırmacı kolesterolün emilimini arttırmak amacıyla kolesterol diyetine bir safra asidi olan kolik asit de eklemişlerdir (111).

Sıçanların kolik asit ve kolesterol ile beslenmesinin, karaciğerde kolesterolden safra asitlerinin üretiminde hız kısıtlayıcı enzim olan kolesterol-7-alfa-hidroksilaz (CYP7A1)'in transkripsiyonunu azalttığı gösterilmiştir (112). Bu enzimin üretimindeki azalma, kolesterolün safra asitlerine dönüşümünde azalmaya, dolayısıyla kolesterol düzeylerinin artmasına neden olur.

Kolesterolden zengin diyetin, oksidatif stresi uyardığı, kan kolesterol ve oksisterol düzeylerinde artışa neden olduğu (109) ve antioksidan tedavi ile bu artışın önlenebildiği gösterilmiştir (8,113-115). Oksidatif stresle üretimi artan oksisterollerin, hücre içi kolesterol sentezini baskıladığı, kolesterol sentezi için kullanılamayan yağ asitlerinin bu nedenle triaçilgliserol sentezine yöneldiği ileri sürülmüştür (116,117). Tavşanlarda hiperkolestroleminin serbest radikal oluşumuna neden olduğu, serbest radikallerin ise hemoglobinin oksidasyonuna ve konsantrasyonunun azalmasına yol açtığı bildirilmiştir (118).

Yüksek kolesterol diyeti ile NO üretiminin inhibe olduğu ve buna bağlı olarak aterosklerotik sürecin hızlandığı gösterilmiştir (119,120). Dolayısıyla NOS için substrat (L-arginin) sağlanarak NO üretimini artırmak aterosklerozun önlenmesine olanak sağlar (81).

Alturfan ve ark.(110), yüksek kolesterol diyetiyle beslenen ratların plazma total kolesterol ve trigliserit düzeylerinin arttığını, plazma TAS düzeylerinin ise azaldığını bildirmişlerdir (110). Normal diyetine kolik asit ve kolesterol eklenmiş sıçanların plazma total kolesterol seviyelerinin arttığı bildirilmiştir (111). Hiperkolesterolemik tavşanlarda ADMA seviyeleri kontrol hayvanlarına göre yüksek gözlenmiştir (93). Bazal diyetlerine %2 kolesterol eklenen sıçanların karaciğer ve plazma arginaz düzeylerinin yanı sıra aterojenik indekslerinin de kontrol grubuna göre arttığı bildirilmiştir (121). Aterojenik diyetle beslenen sıçanların serum NO seviyelerinde kontrol grubuna göre önemli derecede azalma olduğu bildirilmiştir (122).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma; Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul onayı alınarak Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Çalışma Trakya Üniversitesi Etik Kurulu tarafından 10.02.2021 tarihinde 01 sayılı oturumda TÜHDYEK 2012/02 protokol ile onaylandı (Ek 1).

ANALİZLERDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Asetonitril (Merck)
Asimetrik dimetilarginin (Sigma)
Bakır sülfat (Merck)
Folin Ciocalteus Phenol reaktifi (Sigma)
Glasiyel asetik asit (Merck)
Hidroklorik asit (%37) (Merck-Almanya)
Homoarginin (Sigma)
Kadmiyum granül (Sigma)
Kolesterol (Sigma)
Kolik asit (Sigma)
L-Arginin (Sigma)
L-Lizin (Sigma)
3-Merkaptopropionik asit (Sigma)
Monometilarginin (MMA) (Sigma)
Ninhidrin (Merck)

o-Fosforik asit (Riedel de Haën)

Ortofitalaldehit (OPA) (Sigma)

Siklohekzanon (Lab-san)

Simetrik dimetilarginin (SDMA) (Sigma)

Sodyum karbonat (Sigma)

Sodyum m-arsenit (Sigma)

Sodyum m-periyodat (Merck)

Sodyum potasyum tartarat (Merck)

Sodyum sülfat (Merck)

Sülfirik asit (Riedel de Haën)

Tiyobarbitürik asit (Merck)

ANALİZLERDE KULLANILAN LABORATUVAR MALZEMELERİ

Baget

Balon jojeler

Deney tüpleri

Distile su cihazı (Nüve NS245)

Erlen

Guard kolon (Waters 3.9x20 mm)

Hassas terazi (Sartorius)

HPLC cihazı (Waters 2690 Alliance, Seperations Module, ABD)

Manyetik karıştırıcı (IKA)

Otomatik pipetler (Eppendorf, Socorex, Microlit)

Portüp

Puar

Santrifüj (Rotofix-32,Hettich)

Spektrofotometre (Unicam)

Su banyosu (GFL 1083)

Vorteks (VELP)

DENEY HAYVANI PROTOKOLÜ

Çalışmada Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi'nden standart koşullarda yetiştirilen ortalama 300 gr ağırlığında toplam 80 adet erişkin Wistar albino erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar, 22±2°C oda ısısı, %55 nem oranı, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ritim sağlanarak barındırıldı. Sıçanlar, tedavi almayan kontrol grubu, lizin verilen kontrol grubu, arginin verilen kontrol grubu, lizin+arginin verilen kontrol grubu, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubu, lizin verilen ateroskleroz grubu, arginin verilen ateroskleroz grubu ve lizin+arginin verilen ateroskleroz grubu olmak üzere eşit sayıda rastgele 8 gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki sıçanlar bazal diyet ile beslenirken ateroskleroz modeli oluşturmak için hayvanların normal diyetine 12 hafta süresince %3 kolesterol+%1 kolik asid eklendi. Arginin verilen gruplardaki sıçanların içme suyuna 10 hafta boyunca %3 oranında L-arginin katıldı. Lizin verilen gruplardaki sıçanların içme suyuna 10 hafta boyunca 12 mg/kg olacak şekilde L-lizin katıldı. Deney sonunda ksilazin (10 mg/kg) ve ketamin (50 mg/kg) enjeksiyonuyla anestezi uygulanan sıçanların batın ön duvarı insizyonla açılıp diyaframdan kalbe ulaşıldı ve ponksiyonla kanları alınarak sakrifiye edildi. Alınan aort dokuları %0,9'luk soğuk serum fizyolojik ile yıkanarak formole konuldu ve histopatolojik inceleme için Patoloji Anabilim Dalı'na gönderildi. Alınan kan örnekleri 11000 rpm' de 10 dk santrifüj edildi. Serum örnekleri analiz gününe kadar −80°C'de saklandı. Çalışmada ateroskleroz modelinin oluşup oluşmadığı lipid-lipoprotein düzeyleri ölçülerek ve histopatolojik olarak ortaya konuldu. Prosedür sonunda serum arginaz aktivitesi, NO, TAS, TOS, ornitin, ADMA, ornitin ve L-arginin düzeyleri ölçüldü. OSİ, ateroskleroz indeksi ve VLDL düzeyleri formül kullanılarak hesaplandı.

HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

Dokuların histopatolojik incelemesi Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Arcus ve abdominal aorta dokuları %10'luk formol solusyonunda bekletildi. Dokulardan uzun eksenine paralel olarak alınan kesitler yan-dik olarak rutin doku takibine alındı. Rutin doku takibi sonucu parafine gömüldü. Parafin bloklardan 5 mikron kalınlığında alınan kesitler Hematoksilen Eosin ile boyanarak ışık mikroskobunda değerlendirildi.

BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER

Serum Arginaz Aktivitesi Ölçümü

Serum arginaz aktivitesinin ölçümü için Corraliza metodu kullanıldı (123). Serum üzerine tampon (10 mM $MnCl_2$, 50 mM Tris-HCl, pH:7.5) ilave edilerek enzim (arginaz) 55 ^{0}C'ta 10 dk aktive edildi. Buradan alınan 25 μL aktive edilmiş lizata aynı miktar 0.5 M arginin ilave edildi ve 37 ^{0}C'ta 60dk inkübe edilerek arginin hidrolizi gerçekleştirildi. Reaksiyon H_2SO_4, H_3PO_4 ve H_2O (1:3:7) içeren 400 μL asit karışımı ilavesiyle durduruldu. %9 ISPF (%100 etanolde çözünmüş) ilave edilerek 100 ºC'ta 45dk ısıtıldı. Ardından 10 dk karanlıkta bekletildi ve oluşan üre 540 nm'de kolorimetrik olarak tayin edildi. 1 mL'sinde 0.75-1.75 μmol arasında üre içeren standart çözeltiler kullanılarak standart grafiği oluşturuldu. Bir arginaz ünitesi; 37ºC de 1 dakikada 1μmol üre oluşturan enzim miktarı olarak tanımlandı.

Serum ADMA ve Arginin Ölçümü

Serum ADMA ve arginin düzeylerinin ölçümü Teerlink metodu kullanılarak HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi) yöntemiyle ölçüldü (124). ADMA ölçümü için gerekli ön hazırlık işlemleri Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim dalı laboratuvarında ölçüm işlemi ise Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirildi. ADMA ve arginin düzeylerinin ölçümü için Waters Alliance 2690 XE Seperation Module HPLC cihazı, Model 474 fluoresan dedektör ve Milennium 32 Software kullanıldı. Arginin, homoarginin, ADMA, SDMA, MMA stok solüsyonları ile fostat tamponu, potasyum borat buffer ve OPA stok-final çözeltileri hazırlandı. Mobil faz A (pH'ı 6,5 200 mM KH_2PO_4 tamponuna 95,3 mL asetonitril eklendi) ve mobil faz B (Su+ asetonitril 50/50 oranında karıştırılarak) hazırlandı. Kalibrasyonda kullanılmak üzere 10 mM HCl içinde 100 μM L-arginin ve 10 μM homoarginin, ADMA ve SDMA içeren bir kombine çalışma standardı oluşturuldu. Örnek saflaştırma işlemleri yapıldı ve serum örnekleri ve standardlara solid faz ekstraksiyonu (SPE) uygulandı. Kromatografi işlemi için Symmetry C18 kolon (3,9 x150 mm; 5 μm partikül büyüklüğü; 100 Å por büyüklüğü) ve 3,9 x 20 mm Sentry Symmetry C18 guard kolon kullanıldı. Seperasyon 30 °C kolon sıcaklığı 1,1 mL/dak hız ve %100 mobil faz A ile izokratik koşullarda yapıldı. Son analitin çıkısından sonra bileşikler güçlü solvent akımı (%50 B 20-22 dakikalar arası) ile adsorbe edildi. 22. ve

23. dakikalar arasında gradient başlangıç değerlerine döndürülerek kolon 7 dakika daha dengelenmeye bırakıldı böylece çalışma süresi her örnek için 30 dakika oldu. Fluoresans eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 340 ve 455 nm olarak ayarlanarak elde edilen pikler, pik alanlarında göre değerlendirildi. Pik alanları, internal standardın pik alanına oranlanarak hesaplandı.

Serum Ornitin Ölçümü

Serum ornitin düzeylerinin ölçümü için Chinard metodu kullanıldı (125). Serum üzerine eşit miktar glasiyel asetik asit ve reaktif çözeltisi (0.4 mL 6M H_3PO_4, 0.6 mL glasiyel asetik asit, 25 mg ninhidrin) ilave edildi ve karıştırıldı. Örnek körünün hazırlanması için reaktif çözeltisi yerine aynı miktar asit karışımı (0.4 mL 6M H3PO4, 0.6 mL glasiyel asetik asit ve 25 mg ninhidrin) konuldu. Reaktif körünün hazırlanması için serum yerine aynı miktar distile su konuldu. Kapaklı tüplerde 100 ^oC'ta 60 dk ısıtıldı ve sonra oda sıcaklığına gelinceye dek soğutuldu. Tüplere glasiyel asetik asit eklendi ve 515 nm'de absorbansları okundu. Standart eğrisinin hazırlanması için 1mL'sinde 0.3-0.00375 μmol arasında ornitin içeren standart çözeltiler kullanıldı. Regresyon analizinden saptanan formül kullanılarak örneklerdeki ornitin miktarı hesaplandı.

Serum NO Ölçümü

NO analizi, nitratın nitrite dönüşümü kadmiyum granülleriyle sağlandıktan sonra Griess ayıracı kullanılarak Cortas ve ark. (126)'nın tanımladıkları metoda göre spektrofotometrik olarak yapıldı.

Serum TAS Ölçümü

Total antioksidan durum ölçümü için TAS kiti (Rel Assay Diagnostic, Türkiye) kullanıldı. Yöntemin prensibi, örnekteki antioksidanların, koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikalini, renksiz ABTS formuna indirgemesine dayanır (37). Öncelikle spektrofotometre (Shimadzu UV 1700A) 25 ^oC'ye ayarlandı, 500 mL reaktif 1 (ölçüm tamponu) ve 30 mL serum karıştırılıp 660 nm'de absorbansı ölçüldü. Karışıma 75 mL reaktif 2 (renkli ABTS solüsyonu) eklenerek 10 dk. inkübe edildi ve tekrar 660 nm'de absorbans ölçüldü. Serum yerine 0 (standart 1) ve 1 (standart 2) milimolar Trolox ekivalan/litre (mmol Trolox Eq/L) konsantrasyonlarındaki standart çözeltileri kullanılarak standart çalışıldı. İkinci ve ilk ölçümler arasındaki farktan absorbans

değişimi (ΔAbs) hesaplandı. Serumlardaki TAS düzeyleri (mmol Trolox Eq/L) aşağıdaki formülle hesaplandı:

TAS = [(ΔAbs standart 1) - (ΔAbs numune)] / [(ΔAbs standart 1) - (ΔAbs standart 2)]

Serum TOS Ölçümü

Total oksidan durum ölçümü için TOS kiti (Rel Assay Diagnostic, Türkiye) kullanıldı. Yöntemin prensipi, örnekteki oksidanların ferröz iyon-şelatör kompleksini ferrik iyonlara okside etmesine ve oluşan ferrik iyonların asidik ortamda kromojen madde ile renk oluşturması esasına dayanır (49). Öncelikle spektrofotometre (Shimadzu UV 1700A) 25 ^{o}C'ye ayarlandı, 500 mL reaktif 1 (ölçüm tamponu) ve 75 mL serum karıştırılıp 530 nm'de absorbansı ölçüldü. Karışıma 25 mL reaktif 2 (pro-kromojen solüsyon) eklenerek 10 dk. inkübe edildi ve tekrar 530 nm'de absorbansı ölçüldü. Kitin kalite değerlendirilmesi için numune yerine deiyonize su kullanılarak çalışılan reaktif körünün absorbansı 0.500'den küçüktü. Serum yerine 20 mikromolar hidrojen peroksit (H_2O_2) ekivalan/litre (mmol H_2O_2Eq/L) içeren dilue standart çözeltisi kullanılarak standart, çalışıldı. İkinci ve ilk ölçümler arasındaki farktan absorbans değişimi (ΔAbs) hesaplandı. Serumlardaki TOS düzeyleri (mmol H_2O_2Eq/L) aşağıdaki formülle hesaplandı:

TOS= [(ΔAbs serum) / (ΔAbs standart)] x 20

Serum Total Kolesterol, Trigliserit ve HDL Kolesterol Ölçümü

Serum total kolesterol, trigliserit ve HDL kolesterol düzeyleri Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda bulunan otoanalizörde (Abbott Architect c16000 Clinical Chemistry Analyser, ABD) orijinal kitleri (Abbott) kullanılarak ölçüldü**.**

Serum LDL ve VLDL Kolesterol Düzeylerinin Belirlenmesi

LDL ve VLDL kolesterol düzeyleri Friedewald formülü ile hesaplandı (127).

LDL kolesterol: Total kolesterol - (HDL kolesterol + VLDL kolesterol)

VLDL kolesterol: Trigliserit/5

Oksidatif Stres İndeksinin Hesaplanması

TAS'ın birimi µmol Trolox ekivalent/L'ye çevrildi ve aşağıdaki formül kullanılarak OSİ hesaplandı (21,46).

$$OSİ = \frac{TOS\ (\mu mol\ H_2O_2\ ekivalent/L)}{TAS\ (\mu mol\ Trolox\ ekivalent/L)} \times 100$$

Aterojenik İndeksin Hesaplanması

Aterojenik indeks aşağıdaki formülle hesaplandı (25).

Ateroskleroz indeksi: Total kolesterol-HDL kolesterol / HDL kolesterol

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

İstatistiksel değerlendirme için Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı'nın SPSS 22.0 lisanslı paket programı kullanıldı. Her grupta verilerin parametrik varsayımları yerine getirip getirmediğini inceleyebilmek için normal dağılıma uygunluk ve varyans homojenliği testleri uygulandı. Gruplar arasındaki farklılıklar One-way ANOVA varyans analizi ile değerlendirildi. Çoklu karşılaştırma testi olarak Tukey ya da Tamhane post-hoc testleri kullanıldı. Grup içi ilk ve son ağırlık karşılaştırmalarında Paired-Samples T testi kullanıldı. Elde edilen değerler ortalama±standart sapma (Ort±SS) olarak ifade edildi ve $p<0.05$'in altındaki farklılıklar istatistiksel anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Sıçanların başlangıç ve son ağırlıklarının ortalamaları Tablo 1 ve Tablo 2'de görülmektedir. Sıçanların ilk ağırlıklarının ortalaması tedavi verilmeyen kontrol grubunda 312,70±14,01 g, lizin verilen kontrol grubunda 321,89±11,59 g, arginin verilen kontrol grubunda 320,89±27,16 g, lizin+arginin verilen kontrol grubunda 318,60±19,86 g, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunda 320,87±21,64 g, lizin verilen ateroskleroz grubunda 326,50±17,51 g, arginin verilen ateroskleroz grubunda 320,50±16,58 g ve lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunda 318,44±18,58 g olarak bulundu. Grupların arasında başlangıç ağırlıkları bakımından istatiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0,05$).

Sıçanların son ağırlıklarının ortalaması tedavi verilmeyen kontrol grubunda 350,10±10,10 g, Lizin verilen kontrol grubunda 356,11±15,42 g, arginin verilen kontrol grubunda 353,67±8,85 g, lizin+arginin verilen kontrol grubunda 352,80±14,90 g, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunda 361,12±10,68 g, lizin verilen ateroskleroz grubunda 359,10±16,67 g, arginin verilen ateroskleroz grubunda 353,00±11,55 g ve lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunda 356,44±5,36 g olarak bulundu. Grupların arasında son ağırlıkları bakımından istatiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0,05$).

Tablo 1. Grupların başlangıç ağırlıkları

GRUP	TEDAVİ			
	Yok	Lizin	Arginin	Lizin+Arginin
Kontrol	312,70±14,01 (n=10)	321,89±11,59 (n=9)	320,89±27,16 (n=9)	318,60±19,86 (n=10)
Ateroskleroz	320,87±21,64 (n=8)	326,50±17,51 (n=10)	320,50±16,58 (n=10)	318,44±18,58 (n=9)

İstatiksel değerlendirme Tek Yönlü (ANOVA) ile yapıldı.

Tablo 2. Grupların son ağırlıkları

GRUP	TEDAVİ			
	Yok	Lizin	Arginin	Lizin+Arginin
Kontrol	350,10±10,10 (n=10)	356,11±15,42 (n=9)	353,67±8,85 (n=9)	352,80±14,90 (n=10)
Ateroskleroz	361,12±10,68 (n=8)	359,10±16,67 (n=10)	353,00±11,55 (n=10)	356,44±5,36 (n=9)

İstatiksel değerlendirme Tek Yönlü (ANOVA) ile yapıldı.

Sıçanların Arcus ve abdominal aorta dokuları mikroskobik olarak incelendiğinde, kontrol grubundaki sıçanların hiçbirinde ateroskleroz bulguları (endotel düzensizliği, aterom plağı ya da komplike aterom plağı) gözlenmedi. Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubundaki bir sıçanda aterom plağı, diğerlerinde ise endotelyal düzensizlik gözlendi. Lizin verilen ateroskleroz grubundaki bir sıçanda aterom plağı, üçünde “endotelyal düzensizlik” görülürken, geri kalan sıçanlarda endotel düzenli olarak saptandı. Arginin verilen ateroskleroz grubundaki altı sıçanda “endotelyal düzensizlik” görülürken, geri kalan sıçanlarda endotel düzenli olarak saptandı. Lizin+arginin verilen ateroskleroz grubundaki 9 sıçandan üçünde “endotelyal düzensizlik” görülürken, geri kalan 6 sıçanda endotel düzenli olarak saptandı (Tablo 3).

Tablo 3. Aterosklerotik sıçanların kalp dokularının histopatolojik bulguları

SKOR	Endotel düzenli	Endotelyal düzensizlik	Aterom plağı	Komplike aterom plağı
TEDAVİ YOK (n= 8)	0	7	1	0
LİZİN (n=10)	6	3	1	0
ARGİNİN (n=10)	4	6	0	0
LİZİN + ARGİNİN (n=9)	6	3	0	0

Sıçanların serum arginaz aktiviteleri (U/L) Tablo 4'te görülmektedir. Sıçanların serum arginaz aktiviteleri (U/L) tedavi verilmeyen kontrol grubunda 21,18±1,73 U/L, lizin verilen kontrol grubunda 15,75±2,31 U/L, arginin verilen kontrol grubunda 20,39±2,62 U/L, lizin+arginin verilen kontrol grubunda 18,22±4,79 U/L, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunda 30,62±4,41 U/L, lizin verilen ateroskleroz grubunda 16,14±5,16 U/L, arginin verilen ateroskleroz grubunda 18,44±3,97 U/L ve lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunda 12,75±2,19 U/L olarak bulundu. Lizin verilen kontrol grubunun serum arginaz aktivitesi, tedavi verilmeyen kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı (p=0,036). Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunun serum arginaz aktivitesi tedavi verilmeyen kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı (p<0,001). Lizin, arginin ya da lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunun serum arginaz aktivitesi, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak azaldı (Tümü için p<0,001). Lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunun serum arginaz aktivitesi, arginin verilen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak azaldı (p=0,024).

Tablo 4. Serum arginaz aktiviteleri (U/L)

GRUP	TEDAVİ			
	Yok	Lizin	Arginin	Lizin+Arginin
Kontrol	21,18±1,73*,† (n=10)	15,75±2,31 (n=9)	20,39±2,62 (n=9)	18,22±4,79 (n=10)
Ateroskleroz	30,62±4,41 (n=8)	16,14±5,16† (n=10)	18,44±3,97†,‡ (n=10)	12,75±2,19† (n=9)

İstatiksel değerlendirme Tek Yönlü (ANOVA) ile yapıldı.

*: Lizin verilen kontrol grubu ile karşılaştırıldı, p=0,036.

†: Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p<0,001.

‡: Lizin+Arginin verilen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p=0,024

Sıçanların serum ADMA (μmol/L) düzeyleri Tablo 5'te görülmektedir. ADMA düzeyi tedavi verilmeyen kontrol grubunda 0,42±0,013 μmol/L, lizin verilen kontrol grubunda 0,43±0,065 μmol/L, arginin verilen kontrol grubunda 0,59±0,085 μmol/L, lizin+arginin verilen kontrol grubunda 0,41±0,029 μmol/L, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunda 0,65±0,048 μmol/L, lizin verilen ateroskleroz grubunda 0,60±0,084 μmol/L, arginin verilen ateroskleroz grubunda 0,69±0,042 μmol/L ve lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunda 0,37±0,069 μmol/L olarak bulundu. Arginin verilen kontrol grubunun ADMA düzeyleri, tedavi verilmeyen (p<0,001), lizin (p=0,001) ya da lizin+arginin (p<0,001) verilen kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı. Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunun ADMA düzeyleri tedavi verilmeyen kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı (p<0,001). Lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunun ADMA düzeyleri, tedavi verilmeyen (p= 0,001), lizin (p<0,001) ya da arginin (p<0,001) verilen ateroskleroz gruplarına göre anlamlı olarak azaldı. Arginin verilen ateroskleroz grubunun serum ADMA düzeyleri, lizin verilen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak arttı (p=0,013).

Tablo 5. Serum ADMA düzeyleri (μmol/L)

GRUP	TEDAVİ			
	Yok	Lizin	Arginin	Lizin+Arginin
Kontrol	0,42±0,013* (n=9)	0,43±0,065† (n=9)	0,59±0,085 (n=9)	0,41±0,029* (n=10)
Ateroskleroz	0,65±0,048‡,§ (n=8)	0,60±0,084‖,¶ (n=10)	0,69±0,042¶ (n=10)	0,37±0,069 (n=9)

İstatiksel değerlendirme Mann Whitney U testi ile yapıldı.

*: Arginin verilen kontrol grubu ile karşılaştırıldı, p<0,001.

†: Arginin verilen kontrol grubu ile karşılaştırıldı, p=0,001.

‡: Tedavi verilmeyen kontrol grubu ile karşılaştırıldı, p<0,001.

§: Lizin+Arginin verilen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p=0,001.

‖: Arginin verilen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p= 0,013.

¶: Lizin+Arginin verilen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p<0,001.

Sıçanların serum ornitin düzeyleri Tablo 6'da görülmektedir. Serum ornitin düzeyleri, tedavi verilmeyen kontrol grubunda 128,93±13,77 μmol/L, lizin verilen kontrol grubunda 132,74±1,12 μmol/L, arginin verilen kontrol grubunda 150,00±24,08 μmol/L, lizin+arginin verilen kontrol grubunda 134,67±7,29 μmol/L, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunda 224,13±29,67 μmol/L, lizin verilen ateroskleroz grubunda 151,10±19,52 μmol/L, arginin verilen ateroskleroz grubunda 136,80±10,86 μmol/L ve lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunda 145,73±8,54 μmol/L olarak bulundu.

Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunun serum ornitin düzeyleri, tedavi verilmeyen kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı (p<0,001). Aterosklerozlu sıçanlara lizin (p=0,002), arginin (p=0,001) ya da lizin+arginin (p=0,003) verilmesi serum ornitin düzeylerindeki artışı önledi.

Sıçanların serum arginin düzeyleri Tablo 7'de görülmektedir. Arginin düzeyleri, tedavi verilmeyen kontrol grubunda 90,55±9,75 μmol/L, lizin verilen kontrol grubunda 89,00±10,43 μmol/L, arginin verilen kontrol grubunda 130,27±3,37 μmol/L, lizin+arginin verilen kontrol grubunda 103,82±4,74 μmol/L, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunda 87,95±12,05 μmol/L, lizin verilen ateroskleroz grubunda 97,45±16,65 μmol/L, arginin verilen ateroskleroz grubunda 171,90±23,86 μmol/L ve lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunda 132,20±28,50 μmol/L olarak bulundu.

Tablo 6. Serum ornitin düzeyleri (μmol/L)

GRUP	TEDAVİ			
	Yok	Lizin	Arginin	Lizin+Arginin
Kontrol	128,93±13,77* (n=10)	132,74±1,12 (n=9)	150,00±24,08 (n=9)	134,67±7,29 (n=10)
Ateroskleroz	224,13±29,67 (n=8)	151,10±19,52† (n=10)	136,80±10,86‡ (n=10)	145,73±8,54§ (n=9)

İstatiksel değerlendirme Tek Yönlü (ANOVA) ile yapıldı.

*: Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p<0,001.

†: Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p=0,002.

‡: Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p=0,001.

§: Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p=0,003.

Tablo 7. Serum arginin düzeyleri (μmol/L)

GRUP	TEDAVİ			
	Yok	Lizin	Arginin	Lizin+Arginin
Kontrol	90,55±9,75*† (n=9)	89,00±10,43*,‡ (n=9)	130,27±3,37 (n=9)	103,82±4,74* (n=10)
Ateroskleroz	87,95±12,05§,‖ (n=8)	97,45±16,65§,¶ (n=10)	171,90±23,86 (n=10)	132,20±28,50** (n=9)

İstatiksel değerlendirme Mann Whitney U testi ile yapıldı.

*: Arginin verilen kontrol grubu ile karşılaştırıldı, p<0,001.

†: Lizin+Arginin verilen kontrol grubu ile karşılaştırıldı, p= 0,001.

‡: Lizin+Arginin verilen kontrol grubu ile karşılaştırıldı, p= 0,002.

§: Arginin verilen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p<0,001.

‖: Lizin+Arginin verilen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p=0,002.

¶: Lizin+Arginin verilen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p=0,007.

**: Arginin verilen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p=0,004.

Sağlıklı sıçanlara arginin verilmesi serum arginin düzeylerini anlamlı olarak arttırdı (p<0,001). Lizin+arginin verilen kontrol grubunun serum arginin düzeyleri, tedavi verilmeyen (p=0,001) ve lizin verilen (p=0,002) kontrol gruplarına göre anlamlı olarak arttı. Arginin (p<0,001) ya da lizin+arginin (p=0,002) verilen ateroskleroz

gruplarının serum arginin düzeyleri, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak arttı. Arginin (p<0,001) ya da lizin+arginin (p=0,007) verilen ateroskleroz gruplarının serum arginin düzeyleri, lizin verilen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak arttı. Arginin verilen ateroskleroz grubunun serum arginin düzeyleri, lizin+arginin verilen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak arttı (p=0,004).

Sıçanların serum NO düzeyleri Tablo 8 'de görülmektedir. Serum NO düzeyleri, tedavi verilmeyen kontrol grubunda 9,56±0,75 μmol/L, lizin verilen kontrol grubunda 9,73±2,43 μmol/L, arginin verilen kontrol grubunda 12,84±1,24 μmol/L, lizin+arginin verilen kontrol grubunda 9,74±1,39 μmol/L, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunda 10,21±0,61 μmol/L, lizin verilen ateroskleroz grubunda 11,21±1,41 μmol/L, arginin verilen ateroskleroz grubunda 12,00±2,83 μmol/L ve lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunda 10,96±1,02 μmol/L olarak bulundu.

Tablo 8. Serum NO düzeyleri (μmol/L)

GRUP	TEDAVİ			
	Yok	Lizin	Arginin	Lizin+Arginin
Kontrol	9,56±0,75* (n=8)	9,73±2,43 (n=9)	12,84±1,24 (n=9)	9,74±1,39† (n=10)
Ateroskleroz	10,21±0,61 (n=8)	11,21±1,41 (n=10)	12,00±2,83 (n=10)	10,96±1,02 (n=9)

İstatiksel değerlendirme Tek Yönlü (ANOVA) ile yapıldı.

*: Arginin verilen kontrol grubu ile karşılaştırıldı, p<0,001.

†: Arginin verilen kontrol grubu ile karşılaştırıldı, p=0,002.

Arginin verilen kontrol grubunun serum NO düzeyleri, hem tedavi verilmeyen kontrol grubuna göre (p<0,001) hem de lizin+arginin verilen kontrol grubuna göre (p=0,002) anlamlı olarak arttı.

Sıçanların serum TAS düzeyleri Tablo 9'da görülmektedir. TAS düzeyleri, tedavi verilmeyen kontrol grubunda 0,62±0,007 mmol Trolox Ekivalent/L, lizin verilen kontrol grubunda 0,63±0,050 mmol Trolox Ekivalent/L, arginin verilen kontrol grubunda 0,83±0,055 mmol Trolox Ekivalent/L, lizin+arginin verilen kontrol grubunda 0,62±0,12 mmol Trolox Ekivalent/L, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunda 0,41±0,105 mmol Trolox Ekivalent/L, lizin verilen ateroskleroz grubunda 0,51±0,089 mmol Trolox

Ekivalent/L, arginin verilen ateroskleroz grubunda 0,69±0,237 mmol Trolox Ekivalent/L ve lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunda 1,08±0,288 mmol Trolox Ekivalent/L olarak bulundu.

Tablo 9. Serum TAS düzeyleri (mmol Trolox Ekivalent/L)

GRUP	TEDAVİ			
	Yok	Lizin	Arginin	Lizin+Arginin
Kontrol	0,62±0,007* (n=10)	0,63±0,050* (n=9)	0,83±0,055† (n=9)	0,62±0,12 (n=10)
Ateroskleroz	0,41±0,105‡ § (n=8)	0,51±0,089 (n=10)	0,69±0,237‖, ¶, (n=10)	1,08±0,288**, †† (n=9)

İstatiksel değerlendirme Mann Whitney U testi ile yapıldı.

*: Arginin verilen kontrol grubu ile karşılaştırıldı, p<0,001.

†: Lizin+Arginin verilen kontrol grubu ile karşılaştırıldı, p=0,002.

‡: Lizin+Arginin verilen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p=0,001.

§: Tedavi verilmeyen kontrol grubu ile karşılaştırıldı, p<0,001.

‖: Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p= 0,005.

¶: Lizin verilen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p= 0,049.

**: Lizin verilen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p<0,001.

††: Arginin verilen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p= 0,018.

Arginin verilen kontrol grubunun serum TAS düzeyleri, tedavi verilmeyen (p<0,001), lizin (p<0,001) ya da lizin+arginin (p=0,002) verilen kontrol gruplarına göre anlamlı olarak arttı. Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunun serum TAS düzeyleri, tedavi verilmeyen kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu (p<0,001). Arginin (p=0,005) ya da lizin+arginin (p=0,001) verilen ateroskleroz grubunun serum TAS düzeyleri, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak arttı. Arginin (p=0,049) ya da lizin+arginin (p<0,001) verilen ateroskleroz grubunun serum TAS düzeyleri, lizin verilen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak arttı. Lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunun serum TAS düzeyleri, arginin verilen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak arttı (p=0,018).

Sıçanların serum TOS düzeyleri Tablo 10'da görülmektedir. TOS düzeyleri, tedavi verilmeyen kontrol grubunda 10,51±2,57 μmol H_2O_2 Ekivalent/L, lizin verilen kontrol grubunda 9,35±0,79 μmol H_2O_2 Ekivalent/L, arginin verilen kontrol grubunda

10,06±0,66 μmol H_2O_2 Ekivalent/L, lizin+arginin verilen kontrol grubunda 9,39±0,56 μmol H_2O_2 Ekivalent/L, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunda 14,55±0,77 μmol H_2O_2 Ekivalent/L, lizin verilen ateroskleroz grubunda 10,60±1,14 μmol H_2O_2 Ekivalent/L, arginin verilen ateroskleroz grubunda 9,83±1,45 μmol H_2O_2 Ekivalent/L ve lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunda 10,46±1,07 μmol H_2O_2 Ekivalent/L olarak bulundu.

Tablo 10. Serum TOS düzeyleri (μmol H_2O_2 Ekivalent/L)

GRUP	TEDAVİ			
	Yok	Lizin	Arginin	Lizin+Arginin
Kontrol	10,51±2,57*,†,‡ (n=10)	9,35±0,79§ (n=9)	10,06±0,66‖ (n=9)	9,39±0,56 (n=10)
Ateroskleroz	14,55±0,77 (n=8)	10,60±1,14¶ (n=10)	9,83±1,45¶ (n=10)	10,46±1,07¶ (n=9)

İstatiksel değerlendirme Mann Whitney U testi ile yapıldı.

*: Lizin verilen kontrol grubu ile karşılaştırıldı, p= 0,040.

†: Lizin+arginin verilen kontrol grubu ile karşılaştırıldı, p= 0,012.

‡: Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p= 0,001.

§: Arginin verilen kontrol grubu ile karşılaştırıldı, p= 0,037.

‖: Lizin+arginin verilen kontrol grubu ile karşılaştırıldı, p= 0,040.

¶: Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p<0,001.

Lizin (p=0,040) ya da lizin+arginin (p=0,012) verilen kontrol gruplarının serum TOS düzeyleri, tedavi verilmeyen kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı. Lizin (p=0,037) ya da lizin+arginin (p=0,040) verilen kontrol gruplarının serum TOS düzeyi, arginin verilen kontrol grubuna göre de anlamlı olarak azaldı. Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunun serum TOS düzeyi, tedavi verilmeyen kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış bulundu (p=0,001). Lizin, arginin ya da lizin+arginin verilen ateroskleroz gruplarının serum TOS düzeyleri, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak azaldı (p<0,001).

Sıçanların OSİ düzeyleri Tablo 11'de görülmektedir. OSİ düzeyleri, tedavi verilmeyen kontrol grubunda 1,69±0,41, lizin verilen kontrol grubunda 1,50±0,16,

arginin verilen kontrol grubunda 1,22±0,12, lizin+arginin verilen kontrol grubunda 1,56±0,26, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunda 3,81±1,12, lizin verilen ateroskleroz grubunda 2,14±0,43, arginin verilen ateroskleroz grubunda 1,59±0,62 ve lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunda 1,05±0,36 olarak bulundu. Arginin verilen kontrol grubunun OSİ düzeyi, lizin verilen kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu (p=0,023). Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunun OSİ düzeyi, tedavi verilmeyen kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı (p=0,021). Arginin (p= 0,013) ya da lizin+arginin (p=0,004) verilen ateroskleroz gruplarının OSİ düzeyleri, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak azaldı. Lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunun OSİ düzeyi, lizin verilen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu (p<0,001).

Tablo 11. Grupların OSİ düzeyleri

GRUP	TEDAVİ			
	Yok	Lizin	Arginin	Lizin+Arginin
Kontrol	1,69±0,41* (n=10)	1,50±0,16† (n=9)	1,22±0,12 (n=9)	1,56±0,26 (n=10)
Ateroskleroz	3,81±1,12‡,§ (n=8)	2,14±0,43‖ (n=10)	1,59±0,62 (n=10)	1,05±0,36 (n=9)

İstatiksel değerlendirme Tek Yönlü (ANOVA) ile yapıldı,

*: Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p= 0,021.

†: Arginin verilen kontrol grubu ile karşılaştırıldı, p= 0,023.

‡: Arginin verilen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p= 0,013.

§: Lizin+Arginin verilen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p= 0,004.

‖: Lizin+Arginin verilen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p<0,001.

Sıçanların serum total kolesterol düzeyleri Tablo 12'de görülmektedir. Total kolesterol düzeyleri, tedavi verilmeyen kontrol grubunda 49,44±2,13 mg/dL, lizin verilen kontrol grubunda 52,32±3,89 mg/dL, arginin verilen kontrol grubunda 51,55±3,71 mg/dL, lizin+arginin verilen kontrol grubunda 51,10±4,07 mg/dL, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunda 67,75±3,58 mg/dL, lizin verilen ateroskleroz grubunda 54,30±7,09 mg/dL, arginin verilen ateroskleroz grubunda 67,44±2,60 mg/dL ve lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunda 57,89±3,53 mg/dL olarak bulundu.

Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunun serum total kolesterol düzeyi, tedavi verilmeyen kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (p<0,001). Lizin ya da lizin+arginin verilen ateroskleroz gruplarının serum total kolesterol düzeyleri, tedavi verilmeyen ya da arginin verilen ateroskleroz gruplarına göre anlamlı olarak düşük bulundu (Tümü için p<0,001).

Tablo 12. Serum total kolesterol düzeyleri (mg/dL)

GRUP	TEDAVİ			
	Yok	Lizin	Arginin	Lizin+Arginin
Kontrol	49,44±2,13* (n=9)	52,32±3,89 (n=9)	51,55±3,71 (n=9)	51,10±4,07 (n=10)
Ateroskleroz	67,75±3,58 (n=8)	54,30±7,09*,† (n=10)	67,44±2,60‡ (n=9)	57,89±3,53* (n=9)

İstatiksel değerlendirme Mann Whitney U testi ile yapıldı.

*: Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p<0,001.

†: Arginin verilen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p<0,001.

‡: Lizin+arginin verilen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p<0,001.

Sıçanların serum trigliserit düzeyleri Tablo 13'de görülmektedir. Trigliserit düzeyleri, tedavi verilmeyen kontrol grubunda 55,11±2,47 mg/dL, lizin verilen kontrol grubunda 49,40±6,92 mg/dL, arginin verilen kontrol grubunda 67,11±13,74 mg/dL, lizin+arginin verilen kontrol grubunda 49,00±5,87 mg/dL, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunda 73,37±8,00 mg/dL, lizin verilen ateroskleroz grubunda 41,20±6,36 mg/dL, arginin verilen ateroskleroz grubunda 49,40±10,01 mg/dL ve lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunda 50,33±6,78 mg/dL olarak bulundu. Arginin verilen kontrol grubunun serum trigliserit düzeyi, tedavi verilmeyen (p=0,047), lizin (p<0,001) ya da lizin+arginin (p<0,001) verilen kontrol gruplarına göre anlamlı olarak arttı. Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunun serum trigliserit düzeyi, tedavi verilmeyen kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (p<0,001). Lizin, arginin ya da lizin+arginin verilen ateroskleroz gruplarının serum trigliserit düzeyi, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak azaldı (p<0,001).

Tablo 13. Serum trigliserit düzeyleri (mg/dL)

GRUP	TEDAVİ			
	Yok	Lizin	Arginin	Lizin+Arginin
Kontrol	55,11±2,47*,† (n=9)	49,40±6,92‡ (n=9)	67,11±13,74 (n=9)	49,00±5,87‡ (n=10)
Ateroskleroz	73,37±8,00 (n=8)	41,20±6,36† (n=10)	49,40±10,01† (n=9)	50,33±6,78† (n=9)

İstatiksel değerlendirme Tek Yönlü (ANOVA) ile yapıldı.

*: Arginin verilen kontrol grubu ile karşılaştırıldı, p= 0,047.

†: Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p<0,001.

‡: Arginin verilen kontrol grubu ile karşılaştırıldı, p<0,001.

Sıçanların serum HDL kolesterol düzeyleri Tablo 14'de görülmektedir. HDL kolesterol düzeyleri, tedavi verilmeyen kontrol grubunda 26,00±1,22 mg/dL, lizin verilen kontrol grubunda 29,11±1,76 mg/dL, arginin verilen kontrol grubunda 27,00±2,06 mg/dL, lizin+arginin verilen kontrol grubunda 28,00±3,56 mg/dL, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunda 25,75±3,69 mg/dL, lizin verilen ateroskleroz grubunda 32,63±5,75 mg/dL, arginin verilen ateroskleroz grubunda 44,33±2,63 mg/dL ve lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunda 33,50±2,16 mg/dL olarak bulundu. Lizin verilen kontrol grubunun serum HDL kolesterol düzeyi, tedavi verilmeyen kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı (p<0,001). Lizin (p=0,013), arginin (p=0,001) ya da lizin+arginin (p<0,001) verilen ateroskleroz gruplarının serum HDL kolesterol düzeyleri, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak arttı. Arginin verilen ateroskleroz grubunun serum HDL kolesterol düzeyi, lizin ya da lizin+arginin verilen ateroskleroz gruplarına göre daha yüksek bulundu (Her ikisi için p<0,001).

Tablo 14. Serum HDL kolesterol düzeyleri (mg/dL)

GRUP	TEDAVİ			
	Yok	Lizin	Arginin	Lizin+Arginin
Kontrol	26,00±1,22* (n=9)	29,11±1,76 (n=9)	27,00±2,06 (n=9)	28,00±3,56 (n=10)
Ateroskleroz	25,75±3,69†,‡,§ (n=8)	32,63±5,75‖ (n=10)	44,33±2,63 (n=9)	33,50±2,16‖ (n=9)

İstatiksel değerlendirme Mann Whitney U testi ile yapıldı.

*: Lizin verilen kontrol grubu ile karşılaştırıldı, p<0,001.

†: Lizin verilen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p= 0,013.

‡: Arginin verilen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p= 0,001.

§: Lizin+Arginin verilen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p<0,001.

‖: Arginin verilen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p<0,001.

Sıçanların serum LDL kolesterol düzeyleri Tablo 15'de görülmektedir. LDL kolesterol düzeyleri, tedavi verilmeyen kontrol grubunda 12,42±2,06 mg/dL, lizin verilen kontrol grubunda 12,48±3,00 mg/dL, arginin verilen kontrol grubunda 12,25±3,79 mg/dL, lizin+arginin verilen kontrol grubunda 11,25±2,38 mg/dL, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunda 27,32±5,90 mg/dL, lizin verilen ateroskleroz grubunda 16,16±2,64 mg/dL, arginin verilen ateroskleroz grubunda 13,23±2,05 mg/dL ve lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunda 15,41±1,95 mg/dL olarak bulundu. Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunun serum LDL kolesterol düzeyi, tedavi verilmeyen kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (p=0,003). Lizin (p=0,020), arginin (p=0,004) ya da lizin+arginin (p=0,015) verilen ateroskleroz gruplarının serum LDL kolesterol düzeyi, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu

Tablo 15. Serum LDL kolesterol düzeyleri (mg/dL)

GRUP	TEDAVİ			
	Yok	Lizin	Arginin	Lizin+Arginin
Kontrol	12,42±2,06* (n=9)	12,48±3,00 (n=9)	12,25±3,79 (n=9)	11,25±2,38 (n=10)
Ateroskleroz	27,32±5,90†,‡,§ (n=8)	16,16±2,64 (n=10)	13,23±2,05 (n=9)	15,41±1,95 (n=9)

İstatiksel değerlendirme Tek Yönlü (ANOVA) ile yapıldı.

*: Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p= 0,003.

†: Lizin verilen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p= 0,020.

‡: Arginin verilen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p= 0,004.

§: Lizin+Arginin verilen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p= 0,015

Sıçanların serum VLDL kolesterol düzeyleri Tablo 16'da görülmektedir. VLDL kolesterol düzeyleri, tedavi verilmeyen kontrol grubunda 11,02±0,49 mg/dL, lizin verilen kontrol grubunda 9,88±1,38 mg/dL, arginin verilen kontrol grubunda 13,42±2,75 mg/dL, lizin+arginin verilen kontrol grubunda 9,80±1,17 mg/dL, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunda 14,67±1,60 mg/dL, lizin verilen ateroskleroz grubunda 8,24±1,27 mg/dL, arginin verilen ateroskleroz grubunda 9,89±2,00 mg/dL ve lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunda 10,07±1,36 mg/dL olarak bulundu. Arginin verilen kontrol grubunun serum VLDL kolesterol düzeyi, tedavi verilmeyen ($p=0,047$), lizin ($p<0,001$) ya da lizin+arginin ($p<0,001$) verilen kontrol gruplarına göre anlamlı olarak arttı. Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunun serum VLDL kolesterol düzeyi, tedavi verilmeyen kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı ($p<0,001$). Lizin, arginin ya da lizin+arginin verilen ateroskleroz gruplarının serum VLDL kolesterol düzeyi, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0,001$).

Tablo 16. Serum VLDL kolesterol düzeyleri (mg/dL)

GRUP	TEDAVİ			
	Yok	Lizin	Arginin	Lizin+Arginin
Kontrol	11,02±0,49*,† (n=9)	9,88±1,38‡ (n=9)	13,42±2,75 (n=9)	9,80±1,17‡ (n=10)
Ateroskleroz	14,67±1,60 (n=8)	8,24±1,27† (n=10)	9,89±2,00† (n=9)	10,07±1,36† (n=9)

İstatiksel değerlendirme Tek Yönlü (ANOVA) ile yapıldı.

*: Arginin verilen kontrol grubu ile karşılaştırıldı, p= 0,047.

†: Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p<0,001.

‡: Arginin verilen kontrol grubu ile karşılaştırıldı, p<0,001.

Sıçanların aterojenik indeks düzeyleri Tablo 17'de görülmektedir. Aterojenik indeks düzeyleri, tedavi verilmeyen kontrol grubunda 0,90±0,11, lizin verilen kontrol grubunda 0,80±0,11, arginin verilen kontrol grubunda 0,92±0,17, lizin+arginin verilen kontrol grubunda 0,85±0,26, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunda 1,69±0,51, lizin verilen ateroskleroz grubunda 0,68±0,17, arginin verilen ateroskleroz grubunda 0,52±0,08 ve lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunda 0,74±0,18 olarak bulundu.

Tablo 17. Grupların aterojenik indeks düzeyleri

GRUP	TEDAVİ			
	Yok	Lizin	Arginin	Lizin+Arginin
Kontrol	0,90±0,11*,† (n=9)	0,80±0,11 (n=9)	0,92±0,17 (n=9)	0,85±0,26 (n=10)
Ateroskleroz	1,69±0,51‡ (n=8)	0,68±0,17§ (n=10)	0,52±0,08†,‖ (n=9)	0,74±0,18† (n=9)

İstatiksel değerlendirme Mann Whitney U testi ile yapıldı.

*: Lizin verilen kontrol grubu ile karşılaştırıldı, p= 0,024.

†: Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p= 0,001.

‡: Lizin verilen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p<0,001.

§: Arginin verilen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p= 0,027.

‖: Lizin+Arginin verilen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldı, p= 0,012.

Lizin verilen kontrol grubunun aterojenik indeksi, tedavi verilmeyen kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı (p=0,024). Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunun aterojenik indeksi, tedavi verilmeyen kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (p=0,001). Lizin (p<0,001), arginin (p=0,001) ya da lizin+arginin (p=0,001) verilen ateroskleroz gruplarının aterojenik indeksi, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak azaldı. Arginin verilen ateroskleroz grubunun aterojenik indeksi, lizin (p=0,027) ya da lizin+arginin (p=0,012) verilen ateroskleroz gruplarına göre anlamlı olarak düşük bulundu.

Kontrol gruplarının tüm biyokimyasal parametreleri Tablo 18, 19 ve 20'de, ateroskleroz gruplarının tüm biyokimyasal parametreleri Tablo 21, 22 ve 23'de verilmiştir.

Tablo 18. Kontrol gruplarının arginaz, ADMA, ornitin, arginin ve NO düzeyleri

GRUP	Arginaz	ADMA	Ornitin	Arginin	NO
TEDAVİ YOK	(U/L)	(mmol/L)	(mmol/L)	(mmol/L)	(mmol/L)
1	23,44	0,42	128,93	85,89	8,83
2	17,13	0,42	112,8	90,55	9,60
3	21,94	0,44	128,93	100,38	9,56
4	21,33	0,42	128,93	68,28	8,34
5	23,14	0,40	111,2	90,55	9,56
6	21,18	0,44	158,4	99,36	10,73
7	21,18	0,41	134,4	90,55	9,56
8	21,18	0,42	117,6	90,55	10,31
9	21,18	0,42	139,2	98,86	
10	20,13		128,93		
LİZİN					
1	15,75	0,47	134,40	85,62	14,32
2	14,72	0,35	134,40	94,48	9,73
3	15,75	0,51	131,20	89,00	6,58
4	17,43	0,52	132,27	88,58	9,73
5	15,75	0,37	132,27	89,00	11,57
6	19,53	0,38	133,60	94,87	6,15
7	12,62	0,43	132,27	89,00	9,73
8	17,73	0,44	132,00	104,79	10,02
9	12,47	0,36	132,27	65,66	9,73
ARGİNİN					
1	20,39	0,60	119,20	133,60	12,84
2	17,13	0,62	123,20	131,73	10,80
3	24,64	0,53	144,00	130,27	12,84
4	20,39	0,49	187,20	130,27	12,84
5	18,18	0,64	149,60	134,47	13,97
6	20,58	0,78	166,40	129,84	13,47
7	18,93	0,60	180,00	122,59	10,87
8	24,49	0,52	130,40	130,27	13,75
9	18,78	0,60	150,00	129,42	14,18
LİZİN+ARGİNİN					
1	16,38	0,36	134,67	97,63	9,74
2	14,12	0,38	134,67	109,80	9,53
3	28,40	0,39	134,67	103,82	9,74
4	18,22	0,46	143,20	103,82	9,74
5	12,62	0,41	127,20	97,43	9,74
6	16,98	0,43	141,60	111,73	10,66
7	18,22	0,39	124,00	101,33	8,27
8	14,72	0,43	145,60	101,40	9,11
9	24,34	0,41	126,40	107,44	7,91
10	18,22	0,41	134,67	103,82	12,98

ADMA: Asimetrik Dimetil Arginin; **NO:** Nitrik Oksit.

Tablo 19. Kontrol gruplarının TAS, TOS ve OSİ düzeyleri

GRUP	TAS	TOS	OSİ
TEDAVİ YOK	(mmol Trolox Ekivalent/L)	(mmol H2O2 Ekivalent/L)	
1	0,62	10,51	1,69
2	0,63	13,69	2,19
3	0,62	10,51	1,70
4	0,62	11,24	1,81
5	0,62	10,51	1,70
6	0,63	10,88	1,73
7	0,62	13,69	2,22
8	0,62	9,09	1,46
9	0,62	4,48	0,72
10	0,64	10,51	1,64
LİZİN			
1	0,63	9,33	1,48
2	0,62	9,81	1,58
3	0,58	9,87	1,71
4	0,74	9,44	1,28
5	0,63	10,58	1,68
6	0,65	9,33	1,44
7	0,57	8,43	1,48
8	0,59	9,44	1,60
9	0,63	7,89	1,25
ARGİNİN			
1	0,83	11,12	1,34
2	0,83	10,94	1,32
3	0,83	10,10	1,22
4	0,80	8,91	1,11
5	0,84	10,06	1,20
6	0,84	10,06	1,20
7	0,71	10,06	1,41
8	0,92	9,63	1,05
9	0,85	9,69	1,14
LİZİN+ARGİNİN			
1	0,62	8,55	1,38
2	0,64	9,39	1,47
3	0,57	9,03	1,58
4	0,45	9,39	2,07
5	0,62	10,34	1,67
6	0,54	9,39	1,73
7	0,53	8,73	1,65
8	0,62	9,39	1,51
9	0,67	10,22	1,53
10	0,91	9,45	1,03

TAS: Total Antioksidan Durum; **TOS:** Total Oksidan Durum **OSİ:** Oksidatif Stres İndeksi.

Tablo 20. Kontrol gruplarının lipit profili ve aterojenik indeks düzeyleri

GRUP	Total Kolesterol	Trigliserit	HDL Kolesterol	LDL Kolesterol	VLDL Kolesterol	Aterojenik İndeks
TEDAVİ YOK	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	
1	50,00	56,00	27,00	11,80	11,20	0,85
2	47,00	53,00	26,00	10,40	10,60	0,81
3	47,00	56,00	26,00	9,80	11,20	0,81
4	48,00	56,00	23,00	13,80	11,20	1,09
5	54,00	56,00	26,00	16,80	11,20	1,08
6	50,00	55,00	27,00	12,00	11,00	0,85
7	50,00	50,00	27,00	13,00	10,00	0,85
8	49,00	55,00	26,00	12,00	11,00	0,88
9	50,00	59,00	26,00	12,20	11,80	0,92
LİZİN						
1	51,00	54,00	28,00	12,20	10,80	0,82
2	52,30	34,00	28,00	17,50	6,80	0,87
3	50,00	49,40	29,00	11,12	9,88	0,72
4	59,00	49,40	29,00	12,48	9,88	1,03
5	48,00	49,40	28,00	10,12	9,88	0,71
6	52,30	49,40	29,00	13,42	9,88	0,80
7	48,00	59,00	27,00	9,20	11,80	0,78
8	58,00	46,00	32,00	16,80	9,20	0,81
9	52,30	54,00	32,00	9,50	10,80	0,63
ARGİNİN						
1	46,00	67,00	26,00	6,60	13,40	0,77
2	51,00	67,00	29,00	8,60	13,40	0,76
3	52,00	69,00	29,00	9,20	13,80	0,79
4	59,00	80,00	27,00	16,00	16,00	1,19
5	53,00	50,00	25,00	18,00	10,00	1,12
6	54,00	51,00	29,00	14,80	10,20	0,86
7	48,00	67,00	24,00	10,60	13,40	1,00
8	50,00	94,00	29,00	12,25	18,80	0,72
9	51,00	59,00	25,00	14,20	11,80	1,04
LİZİN+ARGİNİN						
1	50,00	51,00	30,00	9,80	10,20	0,67
2	47,00	54,00	24,00	12,20	10,80	0,96
3	58,00	46,00	28,00	11,25	9,20	1,07
4	51,00	41,00	34,00	8,80	8,20	0,50
5	48,00	49,00	23,00	15,20	9,80	1,09
6	51,00	61,00	25,00	13,80	12,20	1,04
7	51,00	49,00	32,00	9,20	9,80	0,59
8	58,00	49,00	26,00	11,25	9,80	1,23
9	51,00	49,00	28,00	13,20	9,80	0,82
10	46,00	41,00	30,00	7,80	8,20	0,53

HDL: Yüksek dansiteli lipoprotein; **LDL:** Düşük dansiteli lipoprotein; **VLDL:** Çok Düşük dansiteli lipoprotein

Tablo 21. Ateroskleroz gruplarının arginaz, ADMA, ornitin, arginin ve NO düzeyleri

GRUP	Arginaz	ADMA	Ornitin	Arginin	NO
TEDAVİ YOK	(U/L)	(mmol/L)	(mmol/L)	(mmol/L)	(mmol/L)
1	23,44	0,69	224,13	70,56	10,21
2	30,62	0,69	232,00	83,98	9,32
3	36,66	0,63	267,20	87,95	10,94
4	34,25	0,62	238,40	103,65	10,21
5	25,39	0,73	197,60	87,95	10,94
6	33,35	0,65	224,13	75,09	10,21
7	30,62	0,59	168,80	89,68	10,45
8	30,62	0,61	240,80	104,78	9,39
LİZİN					
1	11,12	0,40	168,00	109,50	10,87
2	13,52	0,60	168,80	97,45	8,69
3	26,89	0,57	114,40	82,48	11,78
4	12,17	0,60	145,60	97,45	10,87
5	18,03	0,69	120,80	116,74	10,87
6	9,62	0,60	159,20	60,05	11,29
7	16,14	0,60	162,40	99,76	12,00
8	21,63	0,72	151,10	116,13	14,32
9	16,14	0,60	151,10	97,45	10,59
10	16,14	0,60	169,60	97,45	10,87
ARGİNİN					
1	24,49	0,58	136,80	146,99	16,78
2	17,88	0,67	136,80	133,94	14,95
3	20,88	0,72	152,00	186,52	12,00
4	18,44	0,69	136,80	204,14	8,97
5	21,33	0,72	136,80	196,41	9,46
6	10,97	0,73	152,80	143,41	10,52
7	18,44	0,71	144,00	191,85	12,00
8	12,92	0,69	128,00	171,90	9,74
9	20,58	0,69	120,00	171,90	9,95
10	18,44	0,69	124,00	171,90	15,65
LİZİN+ARGİNİN					
1	13,97	0,47	152,80	185,10	10,96
2	11,12	0,41	149,60	159,40	12,14
3	12,75	0,37	145,73	119,65	11,43
4	15,32	0,37	153,60	92,39	9,74
5	12,75	0,28	128,00	97,90	12,35
6	9,16	0,29	145,73	132,20	11,55
7	10,82	0,47	153,60	138,78	11,36
8	12,75	0,32	136,80	132,20	9,53
9	16,08	0,37	145,73	132,20	9,60

ADMA: Asimetrik Dimetil Arginin; **NO:** Nitrik Oksit.

Tablo 22. Ateroskleroz gruplarının TAS, TOS ve OSİ düzeyleri

GRUP	TAS	TOS	OSİ
TEDAVİ YOK	(mmol Trolox Ekivalent/L)	(mmol H2O2 Ekivalent/L)	
1	0,26	14,55	5,51
2	0,55	14,53	2,66
3	0,44	13,93	3,20
4	0,39	16,02	4,09
5	0,41	14,55	3,55
6	0,41	14,95	3,65
7	0,53	13,33	2,50
8	0,27	14,55	5,33
LİZİN			
1	0,44	12,02	2,72
2	0,51	11,54	2,26
3	0,65	11,96	1,84
4	0,51	10,04	1,97
5	0,55	8,79	1,61
6	0,65	9,57	1,47
7	0,52	10,60	2,04
8	0,40	9,39	2,32
9	0,44	11,54	2,61
10	0,42	10,60	2,55
ARGİNİN			
1	0,44	9,99	2,27
2	0,69	8,25	1,20
3	0,99	8,91	0,90
4	0,54	11,60	2,15
5	1,09	9,83	0,90
6	0,45	8,25	1,83
7	0,69	8,19	1,19
8	0,43	11,66	2,70
9	0,90	11,78	1,31
10	0,69	9,83	1,42
LİZİN+ARGİNİN			
1	1,06	11,06	1,05
2	1,38	8,97	0,65
3	0,88	10,70	1,21
4	0,67	10,46	1,57
5	0,82	11,78	1,43
6	1,40	10,46	0,75
7	1,28	8,61	0,67
8	0,85	11,66	1,37
9	1,40	10,46	0,75

TAS: Total Antioksidan Durum; **TOS:** Total Oksidan Durum **OSİ:** Oksidatif Stres İndeksi.

Tablo 23. Ateroskleroz gruplarının biyokimyasal parametreleri

GRUP	Total Kolesterol	Trigliserit	HDL Kolesterol	LDL Kolesterol	VLDL Kolesterol	Aterojenik İndeks
TEDAVİ YOK	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	
1	68,00	69,00	29,00	25,20	13,80	1,34
2	64,00	74,00	25,00	24,20	14,80	1,56
3	74,00	79,00	21,00	37,20	15,80	2,52
4	68,00	73,00	20,00	33,40	14,60	2,40
5	71,00	74,00	25,00	31,20	14,80	1,84
6	68,00	86,00	28,00	22,80	17,20	1,43
7	66,00	58,00	30,00	24,40	11,60	1,20
8	63,00	74,00	28,00	20,20	14,80	1,25
LİZİN						
1	61,00	29,00	36,00	19,20	5,80	0,69
2	57,00	44,00	35,00	13,20	8,80	0,63
3	59,00	40,00	33,00	18,00	8,00	0,79
4	54,00	41,00	39,00	16,16	8,20	0,38
5	61,00	41,00	35,00	17,80	8,20	0,74
6	59,00	33,00	32,63	19,77	6,60	0,81
7	54,00	45,00	32,63	12,37	9,00	0,65
8	54,00	48,00	38,00	16,16	9,60	0,42
9	44,00	41,00	23,00	12,80	8,20	0,91
10	40,00	50,00	22,00	16,16	10,00	0,82
ARGİNİN						
1	66,00	59,00	43,00	11,20	11,80	0,53
2	72,00	67,00	44,33	14,27	13,40	0,62
3	67,00	49,40	44,33	12,79	9,90	0,51
4	68,00	49,40	41,00	17,12	9,90	0,66
5	71,00	49,40	48,00	13,12	9,90	0,48
6	64,00	50,00	43,00	11,00	10,00	0,49
7	67,00	49,40	44,33	12,79	9,90	0,51
8	65,00	38,00	42,00	15,40	7,60	0,55
9	67,00	33,00	49,00	11,40	6,60	0,37
LİZİN+ARGİNİN						
1	62,00	50,00	33,50	18,50	10,00	0,85
2	58,50	63,00	31,00	14,90	12,60	0,89
3	58,50	50,00	31,00	17,50	10,00	0,89
4	49,00	37,00	36,00	15,41	7,40	0,36
5	58,50	49,00	33,50	15,20	9,80	0,75
6	59,00	51,00	33,50	15,30	10,20	0,76
7	58,00	48,00	36,00	12,40	9,60	0,61
8	58,50	55,00	31,00	16,50	11,00	0,89
9	59,00	50,00	36,00	13,00	10,00	0,64

HDL: Yüksek dansiteli lipoprotein; **LDL:** Düşük dansiteli lipoprotein; **VLDL:** Çok Düşük dansiteli lipoprotein

TARTIŞMA

Dünya sağlık örgütü verilerine göre 2015 yılında meydana gelen ölüm nedenlerinin önemli bir kısmını kardiyovasküler hastalıklar oluşturmaktadır (23). Kardiyovasküler hastalıkların patogenezinde yer alan başlıca faktör aterosklerozdur. Aterosklerozun patogenezinde birden çok faktör bulunmakla beraber oksidatif stresin ve LDL oksidasyonunun önemli bir rolü olduğu bilinmektedir (3).

Arginaz enzimi, hepatik üre siklusunda rol oynar ve arginini ornitin ve üreye metabolize eder (63). Arginaz enziminin çeşitli patolojik süreçlerde endotel disfonksiyonu ile ilişkili olduğunu gösteren birçok çalışma vardır. Yüksek kan basıncı ve endotelyal disfonksiyonda arginaz enziminin aktivitesinin arttığı kanıtlanmıştır (7). Arginaz enzim aktivitesindeki artışın ateroskleroz patogenezinde de rol oynayabileceği bildirilmiştir (4).

L-Argininden NOS aracılığı ile üretilen NO, hem vasküler tonusu düzenleyerek vasküler homeostazın sürdürülmesine katkıda bulunur hem de aterosklerozun patogenezinde yer alan trombosit agregasyonu, vasküler düz kas hücre proliferasyonu gibi süreçleri engeller (128).

Hem L-arginin (12) hem de NO'nun (13) radikal tutucu yeteneğe ve hücre hasarına karşı koruyucu etkiye sahiptir. NO üretimindeki azalmaya bağlı olarak süperoksit düzeyleri artar (77) ve ateroskleroz patogenezinde önemli rol oynayan okside LDL oluşumunun artmasına neden olur (5,79).

Azalmış NO üretimini artırmak amacıyla arginaz inhibitörlerinin kullanımı, birçok hastalık için potansiyel bir tedavi seçeneğine dönüşmüştür (55). Gonon A. ve arkadaşları, iskemi reperfüzyon modelinde arginaz inhibitörlerinin arginaz enzimini inhibe ettiğini ve infarkt alanının küçüldüğünü göstermişlerdir (129). Arginaz enziminin güçlü bir kompetitif inhibitörü olan L-lizin, L-arginin'den arginaz aracılığı ile üre oluşumunu bloke eder ve L-argininin, NO sentezi için kullanılmasını sağlar (17).

Bu çalışmada sağlıklı ve aterosklerozlu sıçanlarda tek başına ve birlikte verilen L-arginin ve L-lizin'in, aterosklerozun önlenmesindeki rollerini ortaya koymak amaçlanmıştır.

Çalışmamızda hem sağlıklı hem de aterosklerozlu sıçanlara, bir yandan NOS ve arginaz için ortak subsrat olan L-arginin vererek NO üretimini artırmayı hedeflerken, diğer yandan ise arginaz enziminin güçlü bir inhibitörü olan L-lizin vererek, L-argininin, NO sentezi için kullanılmasını hedefledik.

Çalışmamızda, sıçanların normal diyetine 12 hafta süresince %3 kolesterol ve %1 kolik asid eklenerek ateroskleroz modeli oluşturduk. Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubundaki bir sıçanda aterom plağı, diğerlerinde ise endotelyal düzensizlik gözlenirken kontrol gruplarındaki sıçanların hiçbirinde ateroskleroz bulguları (endotel düzensizliği, aterom plağı ya da komplike aterom plağı) görülmedi. Lizin verilen ateroskleroz grubundaki bir sıçanda aterom plağı, üçünde "endotelyal düzensizlik" görülürken, geri kalan sıçanlarda endotel düzenli olarak saptandı. Arginin verilen ateroskleroz grubundaki altı sıçanda "endotelyal düzensizlik" görülürken, geri kalan sıçanlarda endotel düzenli olarak saptandı. Lizin+arginin verilen ateroskleroz grubundaki 9 sıçandan üçünde "endotelyal düzensizlik" görülürken, geri kalan 6 sıçanda endotel düzenli olarak saptandı. Standart diyetine %1 kolesterol ve %15 doymuş yemeklik yağ ilave edilen sıçanlarla yapılan bir çalışmada, bu gruptaki sıçanların aort dokularında aterosklerotik lezyonların başlangıcında ortaya çıkan endotel dejenerasyonu, tunika intima kalınlaşması ve köpük hücre oluşumu gözlenmiştir (130). Bu çalışma bizim çalışmamızı destekler niteliktedir.

Endotelyal hücrelerde argininden eNOS aracılklı NO üretimi yeterli ve devamlı bir arginin tedarikine bağlıdır (98). Normal şartlarda hücrelerde eNOS için hücre içi arginin seviyesi satüre edici düzeydedir. Bu nedenle hücre dışı argininin arttırılması, NO üretimini daha fazla arttırmaması beklenir (131). Bununla birlikte, bir dizi invitro ve in vivo çalışma, hücre içi arginin konsantrasyonu satüre edici düzeyde olmasına

rağmen, fizyolojik koşullar altında vasküler endotelyal hücreler tarafından NO üretiminin ekstrasellüler arginin ile arttırılabileceğini göstermektedir (97-99).

Fico ve ark (107), lizinle beslenen sıçanlarda arginazın kompetitif inhibisyonuna bağlı olarak üre sentezinin inhibe olduğunu, oysa arginin ilavesiyle arginaz inhibisyonunun %90'ının ortadan kaldırıldığını ileri sürmüşlerdir.

Hücre fonksiyonu sırasında üretilen reaktif oksijen türleri, normal koşullarda enzimatik ya da non-enzimatik antioksidatif mekanizmalarla uzaklaştırılır. Oksidan/antioksidan dengenin bozulduğu durumlarda ise çeşitli moleküllerin oksidatif hasarına neden olan güçlü radikal reaksiyonları başlar (35).

Çalışmamızda sıçanların oksidan ve antioksidan durumunu göstermek amacıyla, TAS ve serum TOS düzeylerini ölçtük ve TOS değerini TAS değerine oranlayarak sıçanların oksidatif stres indekslerini hesapladık. Çalışmamız, kontrol grubuna göre aterosklerozlu sıçanların serum TAS düzeyinde anlamlı bir azalma, TOS ve OSİ düzeylerinde ise anlamlı bir artış olduğunu kanıtladı.

2018 yılında yüksek kolesterol diyeti ile beslenen sıçanlarla yapılan bir çalışmada hem karaciğer hem de aort dokularında antioksidan belirteci olan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon S transferaz (GST) enzimlerinin önemli derecede düştüğü gösterilmiştir (130).

Ellidağ ve ark. (132) sağlıklı bireylere göre kronik iskemik kalp hastalarının serum TOS düzeylerini ve OSİ değerlerini yüksek, serum TAS düzeylerini ise düşük bulmuşlardır. Çalışmamız literatürdeki bu bulgularla uyumludur. Aterosklerozun, oksidatif durumu yansıtan çeşitli parametreler üzerine etkisi çalışılmış olmasına karşın literatürde aterosklerozun direkt olarak TAS/TOS/OSİ düzeylerine etkisini gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Sağlıklı sıçanların serum TAS düzeyleri, arginin tedavisi ile anlamlı olarak artarken lizin tedavisi ve lizin+arginin tedavisi ile değişmedi.

Sağlıklı sıçanlarda serum TOS düzeyleri, arginin tedavisi ile değişmezken, lizin tedavisi ve lizin+arginin tedavisi ile anlamlı olarak azaldı.

Antioksidan tedavi verilen sağlıklı sıçanların OSİ değerleri, tedavi verilmeyen gruba göre daha düşük bulunmasına rağmen istatistiksel olarak farklı değildi. Bunun nedeni tedavi verilmeyen sağlıklı sıçanların OSİ değerlerine ait standart sapmanın yüksek bulunması olabilir. Arginin verilen sağlıklı sıçanların OSİ değeri ise lizin verilen sağlıklı sıçanlara göre anlamlı olarak daha düşük bulundu. Sağlıklı sıçanlara L-Arginin

verilişinin serum TAS düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir. Sağlıklı sıçanlara hem L-Arginin hem de bir NOS inhibitörü olan N(G)-Nitro-L-arginine-metil-ester (L-NAME) uygulanmış ve L-arginin verilen sıçanların serum TAS düzeyleri artarken, arginaz inhibitörü verildiğinde serum TAS düzeyinin azaldığı bildirilmiştir (133).

Çalışmamızda, aterosklerozlu sıçanların serum TAS düzeylerini arginin tedavisi ve lizin+arginin tedavisi anlamlı olarak artırdı ancak lizin tedavisi etkilemedi. Serum TAS düzeylerini artırmada lizin+arginin tedavisinin, arginin tedavisinden daha etkili olduğu görüldü.

Aterosklerozlu sıçanların serum TOS düzeyleri hem lizin tedavisi, hem arginin tedavisi ve hem de lizin+arginin tedavisi ile anlamlı olarak azaldı. Aterosklerozlu sıçanların OSİ düzeyleri ise arginin tedavisi ve lizin+arginin tedavisi ile anlamlı olarak azalırken, lizin tedavisinden etkilenmedi.

Bulgularımızdan, aterosklerozlu sıçanlarda L-argininin hem serum TAS düzeylerini artırıcı hem de serum TOS düzeylerini düşürücü bir etkiye sahip olduğu, lizinin ise daha çok TOS düzeylerini düşürücü etkiye sahip olduğu görülmektedir. Çalışmamız ayrıca lizinin, arginin ile birlikte kullanıldığında, argininin serum TAS düzeylerini artırıcı etkisini potansiyalize ettiğini de göstermektedir.

Arginin, ateroskleroz gelişimi ile bağlantılı süreçlerin çoğunda yer alır ve NO üretiminden sorumlu olan NOS enziminin substratıdır (6). L-argininin akut ve kronik uygulamasının, hayvan hiperkolesterolemi ve ateroskleroz modellerinde endotel fonksiyonunu iyileştirdiği gösterilmiştir (79,80).

Serbest radikal süpürücü bir antioksidan olan N-asetilsistein (NAC), ve N-asetilsistein-amid (NACA) verilen sıçanların, iskemi grubunda oksidatif stres indekslerinin (OSİ) önemli derecede azaldığı gözlenmiştir (134).

Miyokart enfarktüsü oluşturulan sıçanlara bir antioksidan olan melatonin verilişi ile TOS ve OSİ düzeylerinin düştüğü gösterilmiştir (135). Bu bulgular çalışmamızı desteklemektedir. Ateroskleroz patofizyolojisinde serbest radikallerin rol oynadığı göz önünde bulundurulduğunda, antioksidan takviye bu hastalığın tedavisi için potansiyel bir strateji olabilir.

Kolesterolden zengin diyetin, oksidatif stresi uyardığı, kan kolesterol ve oksisterol düzeylerinde artışa neden olduğu (50) ve antioksidan tedavi ile bu artışın önlenebildiği gösterilmiştir (51-54). Oksidatif stresle üretimi artan oksisterollerin, hücre

içi kolesterol sentezini baskıladığı, kolesterol sentezi için kullanılamayan yağ asitlerinin bu nedenle triaçilgliserol sentezine yöneldiği ileri sürülmüştür (116,117).

Çalışmamızda aterosklerozlu sıçanların serum trigliserit, total kolesterol, VLDL kolesterol ve LDL kolesterol düzeyleri sağlıklı sıçanlara göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Diğer yandan, çalışmamızda aterosklerozlu sıçanlar ile sağlıklı sıçanlar arasında serum HDL kolesterol düzeyleri bakımından anlamlı bir fark yoktu.

Deneysel ateroskleroz oluşturulmuş sıçanlarda serum trigliserit, total kolesterol, LDL kolesterol düzeylerinin sağlıklı sıçanlara göre arttığı gösterilmiştir (8,113-115). Literatürde deneysel hiperkolesterolemide serum HDL kolesterol düzeylerinin azaldığını (114) ya da arttığını (136) bildiren çalışmalar bulunmaktadır.

Sağlıklı sıçanlarda, lizin tedavisi serum HDL kolesterol düzeylerinde, arginin tedavisi ise serum trigliserit ve VLDL kolesterol düzeylerinde anlamlı bir artışa neden olurken lizin+arginin tedavisinin serum lipid düzeylerine bir etkisi gözlenmedi.
Sugano ve ark. (137) sağlıklı ratlara lizin verilmesinin serum trigliserit düzeylerinde artışa, arginin verilmesinin ise azalmaya yol açtığını, oysa arginin ya da lizin verilişinin kolesterol düzeylerini etkilemediğini bildirmişlerdir.

Aterosklerozlu sıçanlarda, lizin tedavisi ve lizin+arginin tedavisi, serum trigliserit, total kolesterol, VLDL kolesterol ve LDL kolesterol düzeylerinde azalmaya, serum HDL kolesterol düzeylerinde ise artışa neden oldu.

Aterosklerozlu sıçanlarda, arginin tedavisi, serum trigliserit, VLDL kolesterol ve LDL kolesterol düzeylerini anlamlı olarak düşürdü, serum total kolesterol düzeylerini etkilemedi, serum HDL kolesterol düzeylerinde ise anlamlı bir artışa neden oldu. Aterosklerozlu sıçanların serum HDL kolesterol düzeylerini artırmada arginin tedavisinin diğer tedavilerden daha etkili olduğu gözlendi.

Hiperkolesterolemik hayvanlarda, antioksidan tedavi ile serum trigliserit, total kolesterol, LDL kolesterol ve VLDL kolesterol düzeylerinin azaldığı, HDL kolesterol düzeylerinin ise arttığı bildirilmesine rağmen (114), argininin serum lipit/lipoprotein düzeylerine etkisi ile ilgili literatürde çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Hiperkolesterolemik hayvanlarda oral L-arginin tedavisinin, serum lipit/lipoprotein düzeylerini azalttığını (8) ya da etkilemediğini (138) hatta hem sağlıklı hem de hiperkolesterolemik hayvanlarda özellikle serum total kolesterol düzeylerini artırdığını ileri süren çalışmalar bulunmaktadır (139). Lian ve ark. (122) ise, aterosklerotik sıçanlarda serum total kolesterol, LDL kolesterol ve trigliserit seviyelerinin önemli

ölçüde arttığını, ancak serum HDL kolesterol seviyelerinin önemli ölçüde azaldığını, bir biflavonoid olan ginkgetin kullanımı ile doza bağlı olarak serum total kolesterol, LDL kolesterol ve trigliserit seviyelerinin azaldığını ve serum HDL kolesterol seviyelerinin arttığını göstermişlerdir.

Kardiyovasküler hastalık riskini belirleyen çeşitli lipoprotein oranları veya "ateroskleroz indeksleri (aterojenik indeksler)" tanımlanmıştır. Bu ateroskleroz indekslerinden biri, "non-HDL kolesterol/HDL kolesterol" oranıdır ve total kolesterolden HDL kolesterol çıkarılarak sonucun HDL kolesterole oranlanması ile hesaplanır. Bu oran, koroner ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalık riskini yansıtır (25).

Çalışmamızda sağlıklı sıçanlara lizin verilişi aterojenik indeksi azalttı. Aterosklerozlu sıçanların ise, sağlıklı sıçanlara göre aterojenik indeksinde anlamlı bir artış olurken antioksidan tedavi bu artışı önledi. Aynı zamanda aterosklerozlu sıçanlarda arginin tedavisi aterojenik indeksi azaltmada lizin ya da lizin+arginin tedavisinden daha başarılı oldu.

Deneysel ateroskleroz oluşturulmuş sıçanlarda aterojenik indeksin arttığı gösterilmiştir (121). Amom ve ark. (140) kolesterolden zengin diyetle beslenen tavşanların aterojenik indekslerinin arttığını ve bu artışı bir antioksidan olan alfa lipoik asitin önlediğini göstermiştir. Bu çalışmalar bizim çalışmamızı desteklemektedir.

Aterosklerozlu sıçanların serum HDL kolesterol düzeylerinde bir değişiklik saptanmamasına rağmen HDL dışı kolesterol/HDL kolesterol formülü ile hesaplanan aterojenik indeksin arttığı görülmektedir. Bu bulgu, ateroskleroz indeksinin, ateroskleroz riskini göstermede, serum HDL kolesterol düzeylerinden daha iyi bir belirteç olabileceğine işaret etmektedir.

Hepatik üre döngüsünde rol alan arginaz enziminin çeşitli patolojik süreçlerde özellikle de aterosklerozda arttığı bilinmektedir (4). Çalışmamız, aterosklerozlu sıçanların serum arginaz aktivitesinde anlamlı bir artış olduğunu gösterdi.

Arginaz enziminin aktivitesindeki artış, aynı zamanda eNOS'un substratı olan argininin düzeylerinde azalmaya neden olarak eNOS aracılığıyla NO üretiminde azalmaya neden olur. NO üretimindeki azalmaya bağlı olarak süperoksit düzeyleri artar. Literatürde, artmış arginaz aktivitesinin ateroskleroz da dahil olmak üzere birçok hastalıkla ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (77,78).

Okside LDL'nin arginaz aktivitesini arttırarak, endotelyal NO üretiminde azalmaya, reaktif oksijen türlerinin artmasına ve endotelyal fonksiyon kaybına neden olduğu gösterilmiştir (5).

Aterosklerozlu sıçanların serum arginaz aktivitesinde anlamlı bir artış olduğunu gösteren bulgumuz literatürdeki çalışmaları desteklemektedir. Çalışmamızda sağlıklı sıçanların serum arginaz aktivitesi lizin tedavisi ile anlamlı olarak azalırken, arginin tedavisinden ve lizin+arginin tedavisinden etkilenmedi.

Literatürde, esansiyel bir aminoasit olan L-lizin'in, arginaz enziminin kompetitif bir inhibitörü olduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur (17,104). L-Lizin, L-arginin'den arginaz aracılığı ile üre oluşumunu bloke ederek L-argininin, NO sentezi için kullanılmasına olanak sağlar (17). L-Lizin'in argininden en önemli farkı, NO sentezi için bir substrat olmamasıdır (105). Fico ve ark (107), arginazın kompetitif inhibisyonuna bağlı olarak lizinle beslenen sıçanların üre sentezinin azaldığını ileri sürmüşlerdir. Çalışmamızda, sağlıklı sıçanlara L-lizin verilişi ile serum arginaz enzim aktivitesinin azaldığını gösteren bulgumuz L-lizin'in arginazın güçlü bir kompetitif bir inhibitörü olduğunu kanıtlayan çalışmaları desteklemektedir.

Lizin, arginin ve lizin+arginin tedavilerinin üçü de aterosklerozlu sıçanların serum arginaz aktivitesindeki artışı önledi.

Endotelyal hücrelerde NO üretimi için eNOS'un substrat (L-arginin) ile satüre olduğu bilinmektedir. Bu nedenle dışarıdan verilen argininin, NO üretimini arttırmaması beklenir. Bununla birlikte in vitro ve in vivo çalışmalar, fizyolojik koşullar altında, vasküler endotelyal hücrelerde NO üretiminin dışarıdan arginin verilmesi ile arttırılabileceğini göstermiştir (97-99). Bu durum "arginin paradoksu" olarak adlandırılır (100).

Çalışmamızda, aterosklerozlu sıçanlara L-arginin vererek NO sentaz için substrat düzeyini arttırmayı, L-lizin vererek ise arginaz enzimini inhibe etmeyi ve her iki yol aracılığı ile de NO düzeylerini arttırmayı hedefledik.

Sıçanlara 13 hafta boyunca oral L-arginin verilmesinin plazma arginin, ornitin ve NO düzeylerinde artışa yol açtığı bildirilmiştir (80). Oral L-arginin tedavisinin NO üretiminde artışla sonuçlandığı (14,95) ve bu artışın, NO üretiminden sorumlu eNOS enziminin L-arginin tarafından uyarılmasından (81) ve/veya eNOS için substrat (L-arginin) kullanılabilirliğinin artmasından kaynaklanabileceği bildirilmiştir (8).

Arginaz inhibisyonunun, NO sentezinde de artışa neden olduğu ve böylece aterosklerozu önleyebildiği gösterilmiştir (14-16).

L-lizin verilen hem sağlıklı hem de aterosklerozlu sıçanların serum arginaz aktivitesinin anlamlı olarak azaldığını gösteren bulgumuz, lizinin, hem normal koşullarda hem de ateroskleroz koşullarında arginaz inhibitörü olarak fonksiyon gördüğünü kanıtlamaktadır. Bu bulgular, lizin tedavisinin hem normal koşullarda hem de ateroskleroz varlığında, arginin tedavisinin ve lizin+arginin tedavisinin ise sadece ateroskleroz varlığında serum arginaz aktivitesini azaltmada ya da arginaz aktivitesindeki artışı önlemede etkili olduğunu göstermektedir. Çalışmamız ayrıca aterosklerozlu sıçanların serum arginaz aktivitesindeki artışı önlemede, lizin+arginin tedavisinin, L-arginin tedavisinden daha etkili olduğunu da ortaya koydu. Bu bulgu, aterosklerozda arginaz aktivitesinin kontrol altına alınmasında arginaz inhibitörü kullanımının, ortama substrat sağlanmasından daha etkili olabileceğine işaret etmektedir.

Çalışmamızda aterosklerozlu sıçanlarda serum arginin düzeyleri değişmedi. Ayrıca hem sağlıklı sıçanlarda hem de aterosklerozlu sıçanlarda L-arginin tedavisi ve lizin+arginin tedavisi serum arginin düzeylerini anlamlı olarak artırdı. Çalışmamız, tek başına arginin tedavisinin, serum arginin düzeylerini artırmada lizin+arginin tedavisinden daha etkili olduğunu gösterdi.

Ornitin, üre döngüsünün son basamağında arginaz enzimi aracılığıyla L-argininin hidrolizi sonucu oluşur (7). Çalışmamızda, aterosklerozlu sıçanların serum ornitin düzeyleri sağlıklı sıçanlara göre anlamlı olarak arttı. Ateroskleroz grubundaki sıçanların serum ornitin düzeylerinde gözlenen artıştan, argininden ornitin üretimini katalizleyen arginaz enzimindeki artış sorumlu olabilir.

Sağlıklı sıçanlarda antioksidan tedavi serum ornitin düzeylerini etkilemedi. Aterosklerozlu sıçanlarda lizin tedavisi, arginin tedavisi ve lizin+arginin tedavisi serum ornitin düzeylerinde artışı önledi. Bulgumuz, aterosklerozda dışarıdan verilen lizinin, arginazı inhibe ederek artmış ornitin üretiminin normale dönmesini sağladığına, dışarıdan verilen argininin ise ornitin üretiminden ziyade NO sentaz tarafından NO üretimi için kullanıldığına işaret etmektedir. Bu bulgu aynı zamanda aterosklerozlu sıçanların serum arginaz aktivitesindeki artışın arginin tedavisi, lizin tedavisi veya lizin+arginin tedavisi ile önlendiğini gösteren bulgumuzu da desteklemektedir.

Arginin tedavisinin sağlıklı sıçanlarda serum NO düzeyini artırdığını gösteren bulgumuz, dışarıdan verilen L-argininin, arginazdan ziyade NO sentaz tarafından substrat olarak kullanıldığını göstermektedir. NO, L-arginin'den NOS enzimi aracılığı ile sentezlenen güçlü endojen bir vazodilatördür (95). Hem L-arginin (12) hem de NO'nun (13) aynı zamanda radikal tutucu yeteneğe ve hücre hasarına karşı koruyucu etkiye sahip olduğu bilinmektedir.

L-Arginin kaynaklı NO üretimindeki azalmanın endotelyal disfonksiyonla sonuçlanması, kardiyovasküler risk faktörleri bulunan hastalarda yaygın bir patofizyolojik bulgu olarak kabul edilmektedir (78).

Çalışmamızda aterosklerozlu sıçanların serum NO düzeylerinde anlamlı bir değişiklik görülmedi. Aterojenik diyetle beslenen sıçanların serum NO seviyelerinde anlamlı azalma olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (122). NO, endotelde anti-aterosklerotik özellik gösterir ve deneysel çalışmalarda NOS inhibisyonunun ateroskleroza neden olduğu gösterilmiştir (141).

Literatürden farklı olarak, çalışmamızda aterosklerozlu sıçanların serum NO düzeyleri değişmedi. Çalışmamızda yüksek kolesterol diyeti ile beslenen sıçanların çoğunda aterosklerozun başlangıç evresi olarak kabul edilen endotelyal düzensizlik saptanmıştır. Sıçanların aterosklerozun başlangıç evresinde olmaları serum NO düzeylerinin değişmemesinden sorumlu olabilir. Çalışmamız, sağlıklı sıçanların serum NO düzeylerinin, arginin tedavisi ile anlamlı olarak arttığını ancak lizin tedavisinden ve lizin+arginin tedavisinden etkilenmediğini kanıtladı.

Yang ve ark. (4) sağlıklı ratlara 13 hafta boyunca oral L-arginin verilmesinin plazma NO düzeylerinde belirgin bir artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. Oral yoldan verilen L-argininin, sıçanlarda, serum NO düzeylerinde artışa yol açtığı (80) ve bu artışın eNOS enziminin ekspresyonundaki artışa bağlı olabileceği ileri sürülmüştür (81). iNOS ekspresyonunun ve dolayısıyla NO üretiminin, hücre dışı ortamdan hücreye taşınan arginin tarafından uyarıldığı da bildirilmiştir (100).

Dışarıdan verilen argininin, hücre içi arginin düzeyleri yeterli olsa bile NO üretimini yönlendirdiği ileri sürülmüş ve bu durum arginin paradoksu olarak adlandırılmıştır. (100). Dışarıdan verilen arginin ile ADMA gibi endojen NOS inhibitörlerinin etkisinin ortadan kalkıyor olabileceği ve bunun da NO üretiminde bir artışla sonuçlanabileceği bildirilmiştir (6). Sağlıklı sıçanların serum NO düzeylerinin L-

arginin tedavisi ile anlamlı olarak arttığını gösteren bulgumuz yukarıdaki çalışmaları desteklemektedir.

Çalışmamız, lizin tedavisinin, sağlıklı sıçanların serum arginaz aktivitesini anlamlı olarak azaltmasına rağmen NO üretimini değiştirmediğini gösterdi. Bu bulgu, arginaz inhibisyonu ile NO üretiminin artırılamayacağı, bir başka deyişle endojen arginin birikiminin NO üretimine katkısı olmadığı düşüncesini ve arginin paradoksu teorisini desteklemektedir.

Çalışmamızda, sağlıklı sıçanların serum NO düzeyleri lizin+arginin tedavisinden etkilenmedi. Bu bulgu lizinin, argininin hücre içine taşınmasını engellemiş olabileceğini akla getirmektedir. Bu düşüncemizi destekler biçimde Luiking ve ark. (142) lizin ve argininin hücre içine taşınma için yarıştığını ve lizin fazlalığının dolaylı olarak arginin metabolizmasını etkileyebildiğini göstermiştir.

Dışarıdan verilen L-argininin, hiperkolesterolemik tavşanlarda NO üretimini artırarak ve/veya NO'i süperoksit anyonları tarafından inaktivasyondan koruyarak endotel fonksiyonunu geri kazandırdığı gösterilmiştir. Bununla birlikte fizyolojik konsantrasyonlarda bunun mümkün olamayacağını belirtmişlerdir (143).

Çalışmamızda aterosklerozlu sıçanların serum NO düzeylerinde lizin, arginin ve lizin+arginin tedavileri ile bir artış eğilimi olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu sonuç, hayvan sayısının azlığından ve buna bağlı standart sapmanın yüksek olmasından kaynaklanmış olabilir.

Metilenmiş bir aminoasit olan ADMA, NOS'ın endojen ve yarışmalı bir inhibitörüdür. Hiperkolesterolemi, ateroskleroz, hipertansiyon, kronik böbrek yetmezliği ve kronik kalp yetmezliği olan insanların plazma ADMA düzeylerinde bir artış olduğu gözlenmiştir. Yüksek ADMA düzeyleri, NO sentezinin azalmasına neden olur ve dolayısıyla bozulmuş endotel bağımlı gevşeme ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür (91). Hiperkolesterolemik tavşanlarda da plazma ADMA konsantrasyonu yüksek bulunmuştur (92). Dört hafta boyunca % 1 kolesterol ile zenginleştirilmiş diyet uygulanan tavşanlarda ADMA düzeyleri kontrol hayvanlarına göre yüksek gözlenmiştir (93). ADMA'nın endotel disfonksiyonu ve aterosklerozla ilişkili olabileceği ve koroner arter hastalığı için bağımsız bir risk belirteci olduğu bildirilmiştir (144). Bu çalışmaları destekler biçimde biz de aterosklerozlu sıçanların serum ADMA düzeylerini sağlıklı sıçanlarla göre anlamlı olarak yüksek bulduk. Serum ADMA düzeylerindeki artıştan, hiperkolesterolemiye bağlı oksidatif stres artışı sorumlu olabilir.

Çalışmamızda sağlıklı sıçanların serum ADMA düzeyleri, arginin tedavisi ile anlamlı olarak arttı, lizin tedavisinden ve lizin+arginin tedavisinden etkilenmedi. Literatürde L-Arginin verilişi ile ADMA düzeylerinin arttığı ya da azaldığını bildiren çalışmalar mevcuttur. Böger ve ark. (145) arginin takviyesi sonrası ADMA seviyelerinin düştüğünü bildirirken, Jabecka ve ark. (146) yaptığı çalışmada ise 28 günlük L-arginin tedavisi ile plazma ADMA seviyelerinde artış gözlendiği bildirilmiştir. L-Arginin verilen sağlıklı sıçanların serum ADMA düzeylerinde gözlenen artışta proteinlerdeki arginin kalıntılarının ADMA sentezinde kullanılıyor olması nedeniyle (147) dışarıdan arginin verilişine bağlı olarak protein metabolizmasındaki artış rol oynamış olabilir. Sağlıklı sıçanlara dışarıdan arginin verilişiyle serum ADMA düzeylerinde artış olduğunu gösteren bulgumuz, amino asit veya antioksidan içeren destek ürünlerinin kontrollü kullanılmasının önemine işaret etmektedir.

Çalışmamızda aterosklerozlu sıçanların serum ADMA düzeylerindeki artışı, lizin+arginin tedavisi önledi ancak diğer tedaviler etkilemedi. Dışarıdan L-arginin verilerek, bozulmuş endotel fonksiyonunun önemli derecede düzeldiği, ADMA'nın zararlı etkilerinin geri döndürülebileceği gösterilmiştir (10,11). ADMA ve arginin benzer yapılara sahip olmaları nedeniyle eNOS'a bağlanmada birbiriyle yarışır. Diğer yandan ADMA ve arginin hücreye aynı katyonik amino asit taşıyıcısı (CAT, aynı zamanda "y+ sistemi" olarak da bilinir) aracılığıyla taşınır ve dolayısıyla bu nokta da birbirleriyle rekabet halindedirler (97). Dışarıdan verilen L-arginin, arginin/ADMA oranını artırarak NO üretimini artırır. Diğer bir deyişle, dışarıdan L-arginin verilmesiyle birlikte, arginin eNOS'a bağlanmak için ADMA ile daha fazla yarışır. Artmış ADMA düzeylerine sahip bireylere dışarıdan verilen argininin, ADMA düzeylerini düşürmede daha etkili olduğu bildirilmiştir (148).

Sonuç olarak, çalışmamız, aterosklerozun sıçanlarda oksidatif strese, lipid düzensizliğine, arginaz aktivitesinde ve ADMA düzeylerinde artışa yol açtığını, tek başına ya da birlikte verilen lizin ve argininin aterosklerozun önlenmesinde etkili olabileceğini göstermiştir.

SONUÇLAR

Tek başına ve birlikte verilen L-arginin ve L-lizin'in, arginin metabolizmasına etkilerini incelemek ve deneysel aterosklerozun önlenmesindeki rollerini ortaya koymak amacı ile Wistar albino cinsi erkek sıçanlar; tedavi almayan, lizin verilen, arginin verilen ve lizin+arginin verilen kontrol grupları, tedavi verilmeyen, lizin verilen, arginin verilen ve lizin+arginin verilen ateroskleroz grupları olmak üzere 8 gruba ayrıldı. Tüm gruplarda serum arginaz, ADMA, ornitin, arginin, NO, TAS, TOS, lipit-lipoprotein düzeyleri, OSİ ve ateroskleroz indeksi incelendi. Çalışmada elde edilen sonuçlar şunlardır:

1. Sıçanların Arcus ve abdominal aorta dokuları mikroskobik olarak incelendiğinde; kontrol grubundaki sıçanların hiçbirinde ateroskleroz bulguları gözlenmedi. Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubundaki bir sıçanda aterom plağı, diğerlerinde ise endotelyal düzensizlik gözlendi. Lizin verilen ateroskleroz grubundaki bir sıçanda aterom plağı, üçünde "endotelyal düzensizlik" görülürken, geri kalan sıçanlarda endotel düzenli olarak saptandı. Arginin verilen ateroskleroz grubundaki altı sıçanda "endotelyal düzensizlik" görülürken, geri kalan sıçanlarda endotel düzenli olarak saptandı. Lizin+arginin verilen ateroskleroz grubundaki 9 sıçandan üçünde "endotelyal düzensizlik" görülürken, geri kalan 6 sıçanda endotel düzenli olarak saptandı.

2. Lizin verilen kontrol grubunun serum arginaz aktivitesi, tedavi verilmeyen kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunun serum arginaz aktivitesi tedavi verilmeyen kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı, lizin, arginin ya da lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunun serum arginaz aktivitesi,

tedavi verilmeyen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak azaldı, lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunun serum arginaz aktivitesi, arginin verilen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak azaldı.

3. Arginin verilen kontrol grubunun serum ADMA düzeyleri, tedavi verilmeyen, lizin ya da lizin+arginin verilen kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı. Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunun serum ADMA düzeyleri tedavi verilmeyen kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı. Lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunun serum ADMA düzeyleri, tedavi verilmeyen, lizin ya da arginin ($p<0.001$) verilen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak azaldı. Arginin verilen ateroskleroz grubunun serum ADMA düzeyleri, lizin verilen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak arttı.

4. Sağlıklı sıçanlara arginin verilmesi serum arginin düzeylerini anlamlı olarak arttırdı. Lizin+arginin verilen kontrol grubunun serum arginin düzeyleri, tedavi verilmeyen ve lizin verilen kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı. Arginin ya da lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunun serum arginin düzeyleri, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak arttı. Arginin ya da lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunun serum arginin düzeyleri, lizin verilen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak arttı. Arginin verilen ateroskleroz grubunun serum arginin düzeyleri, lizin+arginin verilen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak arttı.

5. Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunun serum ornitin düzeyleri, tedavi verilmeyen kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı. Aterosklerozlu sıçanlara lizin, arginin ya da lizin+arginin verilmesi serum ornitin düzeylerini anlamlı olarak azalttı

6. Arginin verilen kontrol grubunun serum NO düzeyleri, hem tedavi verilmeyen kontrol grubuna göre hem de lizin+arginin verilen kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı.

7. Arginin verilen kontrol grubunun serum TAS düzeyleri, tedavi verilmeyen, lizin ya da lizin+arginin verilen kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı. Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunun serum TAS düzeyleri, tedavi verilmeyen kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı. Arginin ya da lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunun serum TAS düzeyleri, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak arttı. Arginin ya da lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunun serum TAS düzeyleri, lizin verilen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak arttı. Lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunun serum TAS düzeyleri, arginin verilen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak arttı.

8. Lizin ya da lizin+arginin verilen kontrol gruplarının serum TOS düzeyleri, tedavi verilmeyen kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı. Lizin ya da lizin+arginin (verilen kontrol grubunun serum TOS düzeyi, arginin verilen kontrol grubuna göre de anlamlı olarak azaldı. Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunun serum TOS düzeyi, tedavi verilmeyen kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı. Lizin, arginin ve lizin+arginin verilen ateroskleroz gruplarının serum TOS düzeyleri, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak azaldı.

9. Arginin verilen kontrol grubunun OSİ düzeyi, lizin verilen kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu. Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunun OSİ düzeyi, tedavi verilmeyen kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı. Arginin (ya da lizin+arginin verilen ateroskleroz gruplarının OSİ düzeyleri, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu. Lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunun OSİ düzeyi, lizin verilen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu.

10. Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunun serum total kolesterol düzeyi, tedavi verilmeyen kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Lizin ya da lizin+arginin verilen ateroskleroz gruplarının serum total kolesterol düzeyleri, tedavi verilmeyen ya da arginin verilen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu.

11. Arginin verilen kontrol grubunun serum trigliserit düzeyi, tedavi verilmeyen, lizin ya da lizin+arginin verilen kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı. Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunun serum trigliserit düzeyi, tedavi verilmeyen kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı. Lizin, arginin ya da lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunun serum trigliserit düzeyi, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu.

12. Lizin verilen kontrol grubunun serum HDL kolesterol düzeyi, tedavi verilmeyen kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı. Lizin, arginin ya da lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunun serum HDL kolesterol düzeyleri, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak arttı. Arginin verilen aterosklerozlu sıçanların serum HDL kolesterol düzeyi, lizin ya da lizin+arginin verilen aterosklerozlu sıçanlara göre daha yüksek bulundu.

13. Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunun serum LDL kolesterol düzeyi, tedavi verilmeyen kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Lizin, arginin

ya da lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunun serum LDL kolesterol düzeyi, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu.

14. Arginin verilen kontrol grubunun serum VLDL kolesterol düzeyi, tedavi verilmeyen, lizin ya da lizin+arginin verilen kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı. Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunun serum VLDL kolesterol düzeyi, tedavi verilmeyen kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı. Lizin, arginin ya da lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunun serum VLDL kolesterol düzeyi, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu.

15. Lizin verilen kontrol grubunun aterojenik indeksi, tedavi verilmeyen kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı. Tedavi verilmeyen ateroskleroz grubunun aterojenik indeksi, tedavi verilmeyen kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı. Lizin, arginin ya da lizin+arginin verilen ateroskleroz grubunun aterojenik indeksi, tedavi verilmeyen ateroskleroz grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu. Arginin verilen ateroskleroz grubunun aterojenik indeksi, lizin ya da lizin+arginin verilen ateroskleroz gruplarına göre anlamlı olarak düşük bulundu.

ÖZET

Bu çalışmanın amacı; L-arginin ve/veya L-lizinin aterosklerozun önlenmesindeki rolünü ortaya koymaktır.

80 adet Wistar albino erkek sıçan; tedavi verilmeyen, lizin verilen, arginin verilen ve lizin+arginin verilen kontrol ve ateroskleroz grupları olmak üzere eşit sayıda rastgele 8 gruba ayrıldı. Deneysel ateroskleroz modeli oluşturmak için hayvanlara 12 hafta süresince %3 kolesterol ve %1 kolik asit içeren diyet uygulandı. Arginin %3 oranında, lizin 12 mg/kg olacak şekilde sıçanların içme suyuna katılarak 12 hafta boyunca verildi.

Ateroskleroz modeli, lipid-lipoprotein düzeyleri ölçülerek ve histopatolojik olarak ortaya konuldu. Serum trigliserit, total kolesterol ve HDL kolesterol düzeyleri otoanalizörde kit kullanılarak ölçüldü**.** Serum arginaz aktivitesi Corraliza metodu, serum ornitin düzeyleri Chinard metodu, serum ADMA/arginin düzeyleri Teerlink metodu ve NO düzeyleri Cortas metodu ile ölçüldü. Serum TAS ve TOS, Rel Assay Diagnostic kiti kullanılarak ELISA yöntemi ile ölçüldü. OSİ, aterojenik indeks, LDL ve VLDL kolesterol düzeyleri formül kullanılarak hesaplandı.

Lizin ve/veya arginin tedavisi deneysel aterosklerozda gözlenen lipid düzensizliğini, oksidatif stresi, arginaz aktivitesindeki ve ADMA düzeylerindeki artışı önledi. Sonuç olarak, sıçanlarda tek başına ya da birlikte verilen lizin ve argininin aterosklerozun önlenmesinde etkili olduğu bulundu.

Anahtar kelimeler: L-Arginin, L-lizin, arginase, asimetrik dimetilarginin, oxidative stress

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF L-ARGININE AND L-LYSINE ON THE DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL ATHEROSCLEROSIS

SUMMARY

The aim of this study is to reveal the role of L-arginine and/or L-lysine in the prevention of atherosclerosis.

Eighty Wistar albino male rats were randomly divided into 8 groups in equal numbers as untreated, lysine-treated, arginine-treated, and lysine+arginine-treated control and atherosclerosis groups. To establish an experimental atherosclerosis model, animals were fed a diet containing 3% cholesterol and 1% cholic acid for 12 weeks. Arginine 3% and lysine 12 mg/kg were added to the drinking water of the rats and given for 12 weeks.

Atherosclerosis model was determined by measuring lipid-lipoprotein levels and histopathologically. Serum triglyceride, total and HDL cholesterol levels were measured in an autoanalyzer using kit. Serum arginase activity was measured by the method of Corraliza, ornithine by Chinard, ADMA/arginine by Teerlink and NO levels by Cortas. Serum TAS and TOS were measured by ELISA method using Rel Assay Diagnostic kit. OSI, atherogenic index, LDL and VLDL cholesterol levels were calculated using the formula.

Lysine and/or arginine treatment prevented the lipid dysregulation, oxidative stress, increase in arginase activity and ADMA levels observed in experimental

atherosclerosis. In conclusion, it was found that lysine and arginine administered alone or together were effective in preventing atherosclerosis in rats.

Keywords: L-Arginine, L-lysine, arginase, asymmetric dimethylarginine, oxidative stress

KAYNAKLAR

1. Cannon B. Cardiovascular disease: Biochemistry to behaviour. Nature 2013;31;493(7434):2-3.

2. Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. J Am Coll Cardiol 2006;47(8 Suppl):7 - 12.

3. Singh U, Jialal I. Oxidative stres and atherosclerosis. Pathophysiology 2006;13(3):129-42.

4. Yang Z, Ming XF. Endothelial arginase: a new target in atherosclerosis. Curr Hypertens Rep 2006;8(1):54-9.

5. Ryoo S, Lemmon CA, Soucy KG, Gupta G, White A R, Nyhan D, et al. Oxidized low-density lipoprotein-dependent endothelial arginase II activation contributes to impaired nitric oxide signaling. Circ Res 2006;99(9):951-60.

6. Getz GS, Reardon CA. Arginine/Arginase NO NO NO. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006;26:237-9.

7. Durante W, Johnson FK, Johnson RA. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. Clin Exp Pharmacol Physiol 2007;34(9):906-11.

8. El-Kirsh AA, Abd El-Wahab HM, Abd-Ellah Sayed HF. The effect of L-arginine or L-citrulline supplementation on biochemical parameters and the vascular aortic Wall in high-fat and high-cholesterol-fed rats. Cell Biochem Funct 2011;29(5):414-28.

9. Vallance P, Leiper J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine: dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004;24:1023–30.

10. Böger RH. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor. J Nutr 2004;134:2842-7.

11. Li H, Förstermann U. Prevention of atherosclerosis by interference with the vascular nitric oxide system. Curr Pharm Des 2009;15(27):3133-45.

12. Lass A, Suessenbacher A, Wölkart G, Mayer B, Brunner F. Functional and analytical evidence for scavenging of oxygen radicals by L-arginine. Mol Pharmacol 2002;61(5):1081-8.

13. Wink DA, Hanbauer I, Krishna MC, DeGraff W, Gamson J, Mitchell JB. Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. Proc Natl Acad Sci U S A 1993;90(21):9813-7.

14. Hey C, Boucher JL, Vadon-Le Goff S, Ketterer G, Wessler I, Racke K. Inhibition of arginase in rat and rabbit alveolar macrophages by N -hydroxy-D,L-indospicine, effects of L-arginine utilization by nitric oxide synthase. Br J Pharmacol 1997;121:395–400.

15. Chicoine LG, Paffet ML, Young TL, Nelin LD. Arginase inhibition increases nitric oxide production in bovine pulmonary arterial endothelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004;287:60–8.

16. Tenu JP, Lepoivre M, Moali C, Brollo M, Mansuy D, Boucher JL. Effects of the new arginase inhibitor N(omega)-hydroxy-nor-L-arginine on NO synthase activity in murine macrophages. Nitric Oxide 1999;3(6):427-38.

17. Kato T, Sano M, Mizutani N. Inhibitory effect of intravenous lysine infusion on urea cycle metabolism. Eur J Pediatr 1987;146(1):56–8.

18. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V and Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clin Sci 1993;84:407–12.

19. Koracevic D, Koracevic G, Djordjevic V, Andrejevic S, Cosic V. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. J Clin Pathol 2001;54(5):356-61.

20. Cesarone MR, Belcaro G, Carratelli M, Cornelli U, De Sanctis MT, Incandela L, Barsotti A, Terranova R, Nicolaides A. A simple test to monitor oxidative stress. Int Angiol 1999;18(2):127-30.

21. Harma M, Harma M, Erel O. Increased oxidative stress in patients with hydatidiform mole. Swiss Med Wkly 2003;133(41-42):563-6.

22. T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü. Türkiye Kalp ve Damar Hastalıklarını Önleme ve Kontrol Programı. Ankara:Sağlık Bakanlığı;2015-2020.

23. World Health Organization. Global Health Observatory (GHO) data, noncommunicable diseases (NCDs) mortality and morbidity;2015.

https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/indicator-groups/indicator-group-details/GHO/gho-ghe-ncd-mortality-and-morbidity Erişim Tarihi:11.01.2016.

24. Buğran B, Çelik T. Koroner arter hastalığı risk faktörleri. J Clin Anal Med 2014;5(2):159-63.

25. Millán J, Pintó X, Munoz A, Zuniga M, Rubiés-Prat J, Pallardo LF. Lipoprotein ratios: Physiological significance and clinical usefulness in cardiovascular prevention. Vasc Health Risk Manag 2009;5:757-65.

26. Öngen Z, Yılmaz Y. Aterosklerozun Patogenezi. J Int Med Sci 2006;2(7):1-9.

27. Zengin H. Pathogenesis of atherosclerosis. J Exp Clin Med 2012;29:101-6.

28. Baykal Y, Tüzün A, Kocabalkan F. Aterosklerozun Patogenezi. J Med Sci 1998;18(6):360-8.

29. https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcTrwiU-iADOxCvO8F0QyDGTducqxyzpDaI73WzwhaH05Ugf9ta6

Erişim Tarihi: 11.03.2022.

30. Stocker R ve Keaney JF Jr. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. Physiol Rev 2004;84:1381–1478.

31. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts).N Engl J Med 1976;19;295(8):420-5.

32. Stocker R, Keaney JF Jr. New insights on oxidative stress in the artery wall. J Thromb Haemost 2005;3(8):1825-34.

33. Panth N, Paudel KR, Parajuli K. Reactive Oxygen Species: A Key Hallmark of Cardiovascular Disease. Adv Med 2016; 2016:9152732.

34. Bayir H. Reactive oxygen species. Crit Care Med 2005;33(12):498-501.

35. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. Am J Med 1991;91(3C):14-22.

36. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, and Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. Proc Natl Acad Sci 1979;76:333–7.

37. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clin Biochem 2004;37(4):277-85.

38. Koch TR, Telford GL, Walgenbach-Telford S, Kendall WF Jr, Opara EC. Total antioxidant capacity following extrinsic denervation and small intestinal transplantation in the rat. Neurosci Lett 2003;342(1-2):135-7.

39. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of ‘‘antioxidant power’’: the FRAP assay. Anal Biochem 1996;239:70– 6.

40. Rice-Evans C, Miller NJ. Total antioxidant status in plasma and body fluids. Methods Enzymol 1994;234:279–93.

41. Janaszewska A, Bartosz G. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. Scand J Clin Lab Invest 2002;62(3):231-6.

42. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med 1999;26(9-10):1231-7.

43. Miller NJ, Sampson J, Candeias LP, Bramley PM, Rice-Evans CA. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. Fed Eur Biochem Soc Lett 1996;384:240–2.

44. Campos AM, Escobar J, Lissi EA. The total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of Ilex paraguayensis extracts and red wine. J Braz Chem Soc 1996;7(1):43-9.

45. Laight DW, Gunnarsson PT, Kaw AV, Anggård EE, Carrier MJ. Physiological microassay of plasma total antioxidant status in a model of endothelial dysfunction in the rat following experimental oxidant stress in vivo. Environ Toxicol Pharmacol 1999;7(1):27-31.

46. Kosecik M, Erel O, Sevinc E, Selek S. Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking. Int J Cardiol 2005;100(1):61–4.

47. Nakamura K, Endo H, Kashiwazaki S. Serum oxidation activities and rheumatoid arthritis. Int J Tissue React 1897;9(4):307–16.

48. Ceylan E, Gulsun A, Gencer M, Aksoy N. A new parameter in the detection of tuberculosis activity: reactive oxygen metabolites. Respiration 2005;72(2):156–9.

49. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. Clin Biochem 2005;38(12):1103-11.

50. Michel T. R is for arginine: metabolism of arginine takes off again, in new directions. Circulation 2013;128(13):1400-4.

51. Barbul A. Arginine: biochemistry, physiology, and therapeutic implications. JPEN 1986;10:227-38.

52. Carcillo JA. Does arginine become a "near" essential amino acid during sepsis? Critical Care Medicine 2003;31:657-9.

53. Morris SM. Recent advances in arginine metabolism. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2004;7:45-51.

54. Barış N, Turgan N, Ersöz B. Argininin tıpsal biyokimyadaki önemi. Türk Klinik Biyokimya Derg 2004;2(2):83-90.

55. Morris SM Jr. Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. Br J Pharmacol 2009;157(6):922-30.

56. Karetnikova ES, Jarzebska N, Markov AG, Weiss N, Lentz SR, Rodionov RN. Is Homoarginine a Protective Cardiovascular Risk Factor?. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2019;39(5):869-75.

57. Tsikas D, Wu G. Homoarginine, arginine, and relatives: analysis, metabolism, transport, physiology, and pathology. Amino Acids 2015;47(9):1697-1702.

58. Haghikia A, Yanchev GR, Kayacelebi AA, Hanff E, Bledau N, Widera C, et al. The role of L-arginine/L-homoarginine/nitric oxide pathway for aortic distensibility and intima-media thickness in stroke patients. Amino Acids 2017;49(6):1111-21.

59. Berüter J, Colombo JP, Bachmann C. Purification and properties of arginase from human liver and erythrocytes. Biochem J 1978;175(2):449-54.

60. Straus B, Borcic O. Inhibitory action of some amino acids on arginase from human liver, kidney, mammary gland and erythrocytes. Acta Pharm Jugosl 1976;26:149-53.

61. Box VL, Brown VK. Comparison of the arginase activities of skin from some mammalian species. Comp Biochem Physiol B 1973;46(4):847-50.

62. Ash DE. Structure and function of arginases. J Nutr 2004;134(10 Suppl):2760-4.

63. Jenkinson CP, Grody WW, Cederbaum SD. Comparative properties of arginases. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 1996;114(1):107-32.

64. Munder M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. Br J Pharmacol 2009;158(3):638-51.

65. Morgan, D.M.L. Polyamines. Mol Biotechnol 1999;11(3):229-50.

66. Pegg AE. Mammalian polyamine metabolism and function. IUBMB Life 2009;61(9):880-94.

67. Verma AK, Boutwell RK. Characterization of arginase activity from mouse epidermis and its relation to ornithine decarboxylase induction by the tumor-promoting agent, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. Biochim Biophys Acta 1981;12;677(2):184-9.

68. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. Eur Heart J 2012;33(7):829-37.

69. Zhou L, Zhu DY. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. Nitric Oxide 2009;20:223–30.

70. Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. Hypertension 1994;23:1121–31.

71. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. Eur Heart J 2012;33(7):829-37.

72. Hemmens B, Mayer B. Enzymology of nitric oxide synthases. Methods Mol Biol 1998;100:1–32.

73. Suessenbacher A, Lass A, Mayer B, Brunner F. Antioxidative and myocardial protective effects of L-arginine in oxygen radical-induced injury of isolated perfused rat hearts. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2002;365(4):269-76.

74. Russwurm M, Koesling D. NO activation of guanylyl cyclase. EMBO J 2004;23(22):4443-50.

75. https://noramib.files.wordpress.com/2013/12/fig4.gif Erişim Tarihi: 09.04.2022.

76. Radi R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. Proc Natl Acad Sci U S A 2018;115(23):5839-48.

77. Kaesemeyer WH, Ogonowski AA, Jin L, Caldwell RB, Caldwell RW. Endothelial nitric oxide synthase is a site of superoxide synthesis in endothelial cells treated with glyceryl trinitrate. Br J Pharmacol 2000;131(5):1019-23.

78. Caldwell RB, Toque HA, Narayanan SP, Caldwell RW. Arginase: an old enzyme with new tricks. Trends Pharmacol Sci 2015;36(6):395-405.

79. Vanhoutte PM. Arginine and arginase: endothelial NO synthase double crossed?. Circ Res 2008;102(8):866-8.

80. Yang Y, Wu Z, Jia S, Dahanayaka S, Feng S, Meininger CJ et al. Safety of long-term dietary supplementation with L-arginine in rats. Amino Acids 2015;47(9):1909-20.

81. Javanmard SH, Nematbakhsh M, Mahmoodi F, Mohajeri MR. l-Arginine supplementation enhances eNOS expression in experimental model of hypercholesterolemic rabbits aorta. Pathophysiology 2009;16(1):9–13.

82. Kakimoto Y, Akazawa S. Isolation and identification of N-G,N-G- and N-G,N'-G-dimethyl-arginine, N-epsilon-mono-, di-, and trimethyllysine, and glucosylgalactosyl- and galactosyl-delta-hydroxylysine from human urine. J Biol Chem 1970;245(21):5751-8.

83. Leiper J, Vallance P. New tricks from an old dog: nitric oxide-independent effects of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006;26(7):1419-20.

84. Leiper JM, Vallance P. The synthesis and metabolism of asymmetric dimethyl arginine (ADMA). Eur J Clin Pharmacol 2006;62:33-8.

85. Leiper JM, Santa Maria J, Chubb A, MacAllister R J, Charles I G, Whitley G, et al. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. Biochem J 1999;343:209-14.

86. Jones LC, Tran CT, Leiper JM, Hingorani AD, Vallance P. Common genetic variation in a basal promoter element alters DDAH2 expression in endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 2003;310(3):836-43.

87. Chan NN, Chan JC. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a potential link between endothelial dysfunction and cardiovascular diseases in insulin resistance syndrome?. Diabetologia 2002;45(12):1609-16.

88. Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. Circulation 1999;99(24):3092-5.

89. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. Lancet 1992;339(8793):572-5.

90. 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 2002;99(21):13527-32.

91. Böger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. Cardiovasc Res 2003;59(4):824-33.

92. Bode-Böger SM, Böger RH, Kienke S, Junker W, Frölich JC. Elevated L-arginine/dimethylarginine ratio contributes to enhanced systemic NO production by dietary L-arginine in hypercholesterolemic rabbits. Biochem Biophys Res Commun 1996;219(2):598-603.

93. Böger RH, Bode-Böger SM, Brandes RP, Phivthong-ngam L, Böhme M, Nafe R, et al. Dietary L-arginine reduces the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: comparison with lovastatin. Circulation 1997;96(4):1282-90.

94. Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao P S, Chan J R, Tangphao O, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. Circulation 1998;98(18):1842-7.

95. Ignarro LJ, Napoli C. Novel features of nitric oxide, endothelial nitric oxide synthase, and atherosclerosis. Curr Atheroscler Rep 2004;6(4):281-7.

96. Marchesi S, Lupattelli G, Siepi D, Roscini AR, Vaudo G, Sinzinger H, Mannarino E. Oral L-arginine administration attenuates postprandial endothelial dysfunction in young healthy males. J Clin Pharm Ther 2001;26(5):343-9.

97. Gambardella J, Khondkar W, Morelli MB, Wang X, Santulli G, Trimarco V. Arginine and Endothelial Function. Biomedicines 2020;8(8):277.

98. Creager MA, Gallagher SJ, Girerd XJ, Coleman SM, Dzau VJ, Cooke JP. L-arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. J Clin Invest 1992;90(4):1248-53.

99. Eddahibi S, Adnot S, Carville C, Blouquit Y, Raffestin B. L-arginine restores endothelium-dependent relaxation in pulmonary circulation of chronically hypoxic rats. Am J Physiol 1992;263(2 Pt 1):L194-L200.

100. Lee J, Ryu H, Ferrante RJ, Morris SM Jr, Ratan RR. Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100(8):4843-8.

101. Li P, Ge J, Li H. Lysine acetyltransferases and lysine deacetylases as targets for cardiovascular disease. Nat Rev Cardiol 2020;17(2):96-115.

102. Civitelli R, Villareal DT, Agnusdei D, Nardi P, Avioli LV, Gennari C. Dietary L-lysine and calcium metabolism in humans. Nutrition 1992;8(6):400-5.

103. Cittadini D, Pietropaolo C, Decristofaro D, D'Ayjello CM. In vivo effect of L-lysine on rat liver arginase. Nature 1964;203:643–4.

104. Arancibia-Garavilla Y, Toledo F, Casanello P, Sobrevia L. Nitric oxide synthesis requires activity of the cationic and neutral amino acid transport system y1L in human umbilical vein endothelium. Exp Physiol 2003;88:699–710.

105. Ebenezar KK, Sathish V, Devaki T. Effect of L-arginine and L-lysine on lysosomal hydrolases and n-membrane bound phosphatates in experimentally induced mycardial infarction in rats. Mol Cell Biochem 2003;247(1-2):163-9.

106. Visek WJ. Arginine needs, physiological state and usual diets. A reevaluation. J Nutr 1986;116(1):36-46.

107. Fico ME, Hassan AS, Milner JA. The influence of excess lysine on urea cycle operation and pyrimidine biosynthesis. J Nutr 1982;112(10):1854-61.

108. Davis CE, Rifkind BM, Brenner H, Gordon DJ. A single cholesterol measurement underestimates the risk of coronary heart disease. An empirical example from the Lipid Research Clinics Mortality Follow-up Study. JAMA 1990;264(23):3044-6.

109. Mahfouz MM, Kummerow FA. Cholesterol-rich diets have different effects on lipid peroxidation, cholesterol oxides, and antioxidant enzymes in rats and rabbits. J Nutr Biochem 2000;11(5):293-302.

110. Alturfan AA, Emekli-Alturfan E, Uslu E. Consumption of pistachio nuts beneficially affected blood lipids and total antioxidant activity in rats fed a high-cholesterol diet. Folia Biol (Praha) 2009;55(4):132-6.

111. Lee S, Lee MS, Chang E, Lee Y, Lee J, Kim J, et al. Mulberry Fruit Extract Promotes Serum HDL-Cholesterol Levels and Suppresses Hepatic microRNA-33 Expression in Rats Fed High Cholesterol/Cholic Acid Diet. Nutrients 2020;12(5):1499.

112. Xu G, Pan LX, Li H, Shang Q, Honda A, Shefer S, et al. Dietary cholesterol stimulates CYP7A1 in rats because farnesoid X receptor is not activated. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2004;286(5):730-5.

113. de Souza MO, Silva M, Silva ME, Oliveira Rde P, Pedrosa ML. Diet supplementation with acai (Euterpe oleracea Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. Nutrition 2010;26(7-8):804-10.

114. El-Beshbishy HA, Singab AN, Sinkkonen J, Pihlaja K. Hypolipidemic and antioxidant effects of Morus alba L. (Egyptian mulberry) root bark fractions supplementation in cholesterol-fed rats. Life Sci 2006;78(23):2724-33.

115. Amin KA, Abd El-Twab TM. Oxidative markers, nitric oxide and homocysteine alteration in hypercholesterolimic rats: role of atorvastatine and cinnamon. Int J Clin Exp Med 2009;2(3):254-65.

116. Schoonjans K, Brendel C, Mangelsdorf D, Auwerx J. Sterols and gene expression: control of affluence. Biochim Biophys Acta 2000;1529(1-3):114-25.

117. Nelson DL, Cox MM. Lipid biosynthesis. In: Lehninger Principles of Biochemistry. 5th ed. USA: WH Freeman and Company, 2008.

118. Abdelhalim MAK. The potential influence of high cholesterol diet-induced oxidative stress on composition and properties of red blood cells in rabbits. Afr J Microbiol Res 2010;4(9):836–43.

119. Cayatte AJ, Palacino JJ, Horten K, Cohen RA. Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. Arterioscler Thromb 1994;14(5):753-9.

120. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. Free Radic Biol Med 1998;25(4-5):434-56.

121. Akinyemi AJ, Oboh G, Ademiluyi AO, Boligon AA, Athayde ML. Effect of Two Ginger Varieties on Arginase Activity in Hypercholesterolemic Rats. J Acupunct Meridian Stud 2016;9(2):80-7.

122. Lian N, Tong J, Li W, Wu J, Li Y. Ginkgetin ameliorates experimental atherosclerosis in rats. Biomed Pharmacother 2018;102:510-6.

123. Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. J Immunol Methods 1994;174(1-2):231-5.

124. Teerlink T. Determination of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine in biological samples by HPLC. Methods Mol Med 2005;108:263-74.

125. Chinard FP. Photometric estimation of proline and ornithine. J Biol Chem 1952;199:91-5.

126. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. Clin Chem 1990;36(8 Pt 1):1440-3.

127. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clinical Chemistry 1972;18:499-502.

128. Landmesser U, Drexler H. The clinical significance of endothelial dysfunction. Curr Opin Cardiol 2005; 20:547-51.

129. Gonon AT, Jung C, Katz A, Westerblad H, Shemyakin A, Sjöquist P, et al. Local arginase inhibition during early reperfusion mediates cardioprotection via increased nitric oxide production. PLoS One 2012;7(7):e42038.

130. Naik HS, Srilatha C, Sujatha K, Sreedevi B, Prasad TNVKV. Supplementation of whole grain flaxseeds (Linum usitatissimum) along with high cholesterol diet and its effect on hyperlipidemia and initiated atherosclerosis in Wistar albino male rats. Vet World 2018;11(10):1433-9.

131. McDonald KK, Zharikov S, Block ER, Kilberg MS. A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric-oxide synthase may explain the "arginine paradox". J Biol Chem 1997;272(50):31213-6.

132. Ellidag HY, Eren E, Yılmaz N, Cekin Y. Oxidative stress and ischemia-modified albumin in chronic ischemic heart failure. Redox Rep 2014;19(3):118-23.

133. Krauss H, Jablecka A, Sosnowski P, Bogdanski P. Influence of L-arginine on the nitric oxide concentration and level of oxidative stress during ischemia-reperfusion injury in a rat model. Int J Clin Pharmacol Ther 2009;47(8):533-8.

134. Erol G, Kartal H, Comu FM, Cetin E, Demirdas E, Sicim H, Unal CS, Gunay C, Oz BS, Bolcal C. Effects of N-Acetylcysteine and N-Acetylcysteine Amide on Erythrocyte Deformability and Oxidative Stress in a Rat Model of Lower Extremity Ischemia-Reperfusion Injury. Cardiol Res Pract 2020;2020:6841835.

135. Özgün E. İsoproterenol ile deneysel miyokart infarktüsü oluşturulan sıçanlarda melatoninin serum paraoksonaz aktivitesine etkisi (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2013.

136. De Keyzer D, Karabina SA, Wei W, Geeraert B, Stengel D, Marsillach J, et al. Increased PAFAH and oxidized lipids are associated with inflammation and atherosclerosis in hypercholesterolemic pigs. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2009;29(12):2041-6.

137. Sugano M, Ishiwaki N, Nagata Y, Imaizumi K. Effects of arginine and lysine addition to casein and soya-bean protein on serum lipids, apolipoproteins, insulin and glucagon in rats. Br J Nutr 1982;48(2):211-21.

138. Khazaei M, Mobarakeh JI, Rahimi AA, Razavi MR. Effect of chronic L-Arginine supplementation on aortic fatty streak formation and serum nitric oxide

concentration in normal and high-cholesterol fed rabbits. Acta Physiol Hung 2012;99(1):87-93.

139. Kumar P, Kumar A, Tiwari S. L-Arginine supplementation increases serum cholesterol level. Indian Journal of Pharmacology 2005;37:183.

140. Amom Z, Zakaria Z, Mohamed J, Azlan A, Bahari H, Baharuldin MTH, et al. Lipid lowering effect of antioxidant alpha-lipoic Acid in experimental atherosclerosis. J Clin Biochem Nutr 2008;43(2):88-94.

141. Aluko EO, Omobowale TO, Oyagbemi AA, Adejumobi OA, Ajibade TO, Fasanmade AA. Reduction in nitric oxide bioavailability shifts serum lipid content towards atherogenic lipoprotein in rats. Biomed Pharmacother 2018;101:792-7.

142. Luiking YC, Deutz NE. Biomarkers of arginine and lysine excess. J Nutr 2007;137(6 Suppl 2):1662-8.

143. Böger RH, Bode-Böger SM, Mügge A, Kienke S, Brandes R, Dwenger A, Frölich JC. Supplementation of hypercholesterolaemic rabbits with L-arginine reduces the vascular release of superoxide anions and restores NO production. Atherosclerosis 1995;117(2):273-84.

144. Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? Arterioscler Thromb. Vasc Biol 2000;20(9):2032-7.

145. Böger GI, Rudolph TK, Maas R, Schwedhelm E, Dumbadze E, Bierend A, et al. Asymmetric dimethylarginine determines the improvement of endothelium-dependent vasodilation by simvastatin: Effect of combination with oral L-arginine. J Am Coll Cardiol 2007;49(23):2274-82.

146. Jabecka A, Ast J, Bogdaski P, Drozdowski M, Pawlak-Lemaska K, Cielewicz AR, et al. Oral L-arginine supplementation in patients with mild arterial hypertension and its effect on plasma level of asymmetric dimethylarginine, L-citruline, L-arginine and antioxidant status. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2012;16(12):1665-74.

147. Erbil M, Kurt Y, Yaman H, Cakir E, Akgul E, Cayci T. Metabolism of asymmetric dimethylarginine and its clinical significance. Turkish Journal of Biochemistry 2012;37:99-105.

148. Strobel J, Muller F, Zolk O, Endress B, Konig J, Fromm M.F, Maas R. Transport of asymmetric dimethylarginine (ADMA) by cationic amino acid transporter 2 (CAT2), organic cation transporter 2 (OCT2) and multidrug and toxin extrusion protein 1 (MATE1) Amino Acids 2013;45:989–1002.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekiller Sayfa No

Şekil 1. Aterosklerotik plak gelişiminde rol oynayan süreçler 5

Şekil 2. Memelilerde arginin metabolizması 8

Şekil 3. Üre döngüsü ve arginaz enzimi 9

Şekil 4. Endotelyal hücrelerde üretilen nitrik oksidin vasküler düz kas hücreleri üzerine etkisi 11

Şekil 5. Fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerde arginaz ve eNOS enzim aktiviteleri 12

Şekil 6. Hiperkolesterolemik farede endotel fonksiyon bozukluğu modeli 13

Şekil 7. ADMA oluşumu 14

Şekil 8. Metillenmiş arginin metabolizmasının NO ile düzenlenmesi 15

Şekil 9. Endotelyal (dis)fonksiyonda arginin rolü 17

TABLOLAR LİSTESİ

Tablolar	Sayfa No
Tablo 1. Grupların başlangıç ağırlıkları	27
Tablo 2. Grupların son ağırlıkları	27
Tablo 3. Aterosklerotik sıçanların kalp dokularının histopatolojik bulguları	28
Tablo 4. Serum arginaz aktiviteleri	29
Tablo 5. Serum ADMA düzeyleri	30
Tablo 6. Serum ornitin düzeyleri	31
Tablo 7. Serum arginin düzeyleri	31
Tablo 8. Serum NO düzeyleri	32
Tablo 9. Serum TAS düzeyleri	33
Tablo 10. Serum TOS düzeyleri	34
Tablo 11. Grupların OSİ düzeyleri	35
Tablo 12. Serum total kolesterol düzeyleri	36
Tablo 13. Serum trigliserit düzeyleri	37

Tablo 14. Serum HDL kolesterol düzeyleri 38

Tablo 15. Serum LDL kolesteroldüzeyleri 39

Tablo 16. Serum VLDL kolesterol düzeyleri 40

Tablo 17. Grupların aterojenik indeks düzeyleri 41

Tablo 18. Kontrol gruplarının arginaz, ADMA, ornitin, arginin ve NO düzeyleri 42

Tablo 19. Kontrol gruplarının TAS, TOS ve OSİ düzeyleri 43

Tablo 20. Kontrol gruplarının lipit profili ve aterojenik indeks düzeyleri 44

Tablo 21. Ateroskleroz gruplarının arginaz, ADMA, ornitin, arginin ve NO düzeyleri 45

Tablo 22. Ateroskleroz gruplarının TAS, TOS ve OSİ düzeyleri 46

Tablo 23. Ateroskleroz gruplarının lipit profili ve aterojenik indeks düzeyleri 47

ÖZGEÇMİŞ

27.03.1983 yılı İstanbul doğumluyum. İlköğrenimimi Yeşilyuva İlkokulu, orta ve lise öğrenimimi Florya Tevfik Ercan Lisesi'nde tamamladım. Üniversite öğrenimimi Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde 2001-2005 yılları arasında tamamladım. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda 2005-2008 yılları arasında yüksek lisans eğitimimi tamamladım. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD'da 2009 yılında doktora eğitimime başladım ve hala sürdürmekteyim. 2012 yılından beri Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Medikal Onkoloji bölümünde uzman biyolog olarak çalışmaktayım.

EKLER

Ek 1

Yerel Etik Kurul Onayı

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

EDİRNE

Oturum Sayısı: 01 **Karar Tarihi: 10.02.2012**

KARAR NO: **2012.01.02**
Yürütücülüğünü Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof.Dr. Selma SÜER GÖKMEN'in yürütücülüğünü yaptığı Selda UZGUR Doktora tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2011/65 eski protokollü TÜHDYEK-2012/02 yeni protokol nolu "L-Arginin ve L-Lizin'in Deneysel Ateroskleroz Gelişimine Etkisinin İncelenmesi" başlıklı çalışma hakkında görüşüldü; araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemler dikkate alınarak incelenmesi sonucunda: Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Ünvani/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
Yrd.Doç.Dr. Burhan AKSU Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Yrd.Doç. Dr. Hayati ARDA Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Vet.Hek. Ziya ÇUKUR Veteriner Hekim	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Hüseyin KOÇ Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivi Üye	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
İlyas ÖZMEN Sivil Üye	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Yrd.Doç.Dr. Beytullah ÖZKAN Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Yrd.Doç.Dr. S. Arzu VARDAR Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Doç. Dr. Nilda TURGUT Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Yrd.Doç.Dr. Ruşen COŞAR-ALAŞ Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☒ yok	☒ evet ☐ hayır	
Yrd.Doç.Dr. Y. Atakan SEZER Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	