T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Selma SÜER GÖKMEN

İSOPROTERENOL İLE MİYOKART İNFARKTÜSÜ OLUŞTURULAN SIÇANLARDA KAFEİK ASİT FENETİL ESTERİNİN ARGİNİN METABOLİZMASINA ETKİSİNİN İNCELENMESİ

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Barış PERSİL

EDİRNE - 2017

TEŞEKKÜRLER

Uzmanlık eğitimim süresince her konuda bilgi ve tecrübeleri ile yanımda olan değerli danışman hocam Biyokimya AD öğretim üyesi Prof. Dr. Selma SÜER GÖKMEN'e, Biyokimya AD Başkanı Prof. Dr. Erol ÇAKIR'a, Biyokimya AD öğretim üyeleri Prof. Dr. Sevgi ESKİOCAK'a Prof. Dr. Hakan ERBAŞ'a, Prof. Dr. İlker DIBIRDIK'a, Yrd. Doç. Dr. Eray ÖZGÜN'e, Öğr. Gör. Dr. Gülben SAYILAN ÖZGÜN'e, Patoloji AD öğretim üyesi Prof. Dr. Ufuk USTA'ya, Biyoistatistik AD Başkanı Prof. Dr. Necdet SÜT'e, M.Sc. Selda ŞENTÜRK UZGUR'a ve laboratuvar çalışmalarıma katkı veren tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

- **AKUT MİYOKART İNFARKTÜSÜ** 3
- **ARGİNİN METABOLİZMASI** 6
- **KAFEİK ASİT FENETİL ESTER** 11
- **İSOPROTERENOL** 13

GEREÇ VE YÖNTEMLER 15

BULGULAR 23

TARTIŞMA 39

SONUÇLAR 46

ÖZET 48

SUMMARY 50

KAYNAKLAR 52

EKLER

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADMA : Asimetrik dimetilarginin
cAMP : Siklik adenozin monofosfat
CAPE : Kafeik asit fenetil ester
cGMP : Siklik guanozin monofosfat
CK : Kreatin kinaz
DDAH : Dimetilarginin dimetilaminohidrolaz
DMSO : Dimetil sülfoksit
EKG : Elektrokardiyogram
IL-1 : İnterlökin-1
ISO : İsoproterenol
ISPF : α-İsonitrosopropiofenon
LDH : Laktat dehidrojenaz
LDL : Düşük dansiteli lipoprotein
L-NMMA : NG-Monometil-L-arginin
NF-kappa B : Nükleer faktör kappa B
NO : Nitrik oksit
NOS : Nitrik oksit sentaz
eNOS : Endotelyal nitrik oksit sentaz
iNOS : İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
nNOS : Nöronal nitrik oksit sentaz
ODC : Ornitin dekarboksilaz
PRMT : Protein arginin metiltransferaz

SDMA : Simetrik dimetilarginin

SOD : Süperoksit dismutaz

Tn : Troponin

TNF-α : Tümör nekroz faktör-α

GİRİŞ ve AMAÇ

Koroner arter hastalığı dünyada ve ülkemizde ölüm sebepleri arasında birinci sırada yer almaktadır. Türkiye İstatistik Kurumu'nun verilerine göre dolaşım sistemi hastalıklarından ölüm oranı kadınlarda % 44.4, erkeklerde % 36.2'dir (1).

Akut miyokart infarktüsünde, koroner arterin trombotik tıkanması sonucu kan akımının ani kesilmesi ile geri dönüşümsüz hücre ve hücre membran hasarı görülür ve bu hasara bağlı olarak miyokart hücre içeriği kan dolaşımına salıverilir. Dolaşıma salıverilen bazı enzim ve proteinler miyokart infarktüsünün tanısında klinik olarak önemli rol oynarlar (2). Miyokart infarktüsü tanısında biyokimyasal belirteçlerin yanında, hastanın klinik bulguları ve elektrokardiyografisi (EKG) yol göstericidir (3).

Arginaz, L-argininin üre ve ornitine hidrolizinden sorumlu olan üre döngüsünün son enzimidir. Arginazın substratı olan L-arginin, hücrede nitrik oksit sentaz (NOS) aracılığı ile nitrik oksit (NO) oluşumunda da öncül maddedir (4). Arginazın L-arginin için NOS ile yarışarak NO sentezini inhibe ettiği gösterilmiştir (5). Hem L-arginin hem de NO'nun radikal tutucu yeteneğe ve hücre hasarına karşı koruyucu etkiye sahip olduğu bilinmektedir (6,7). Bununla birlikte NO'nun oksidatif etkisi de bulunmaktadır (8). Proteinlerdeki arginin kalıntılarının metillenmesiyle oluşan asimetrik dimetilarginin (ADMA) ise NOS enziminin inhibitörüdür (9).

Aterosklerozda ve miyokart infarktüsünde arginaz aktivitesinde bir artışın olduğu bildirilmiştir. Arginaz aktivitesindeki artışın, NO üretimi için gerekli L-argininin tüketilmesine ve dolayısıyla oksidatif stresin daha da artmasına neden olduğu, böylece endotel disfonksiyonuna yol açtığı ileri sürülmüştür (10,11,12).

Yıldırım ve ark. (13) akut miyokart infarktüslü bireylerde serum NO düzeylerinin arttığını ve bu artışın oksidatif strese karşı bir savunma mekanizması olarak rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir. Akut miyokart infarktüslü bireylerde NO düzeylerinin ve NO sentaz aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (14,15). Arginaz inhibisyonunun, NO üretiminde artışla sonuçlandığı bildirilmiştir (16).

Artmış ADMA düzeylerinin koroner arter hastalığı riskinde artış ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir (17). Deneysel miyokart hasarında serum ADMA düzeylerinde bir artış, endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) ekspresyonunda ise bir azalma olduğu, antioksidan tedavi ile ADMA düzeylerinin azaldığı, oysa eNOS ekspresyonunun arttığı ileri sürülmüştür (18,19). ADMA düzeyleri yüksek bireylerde, dışarıdan L-arginin verilişinin L-arginin/ADMA oranını artırarak endotelyal disfonksiyonu düzelttiği de gösterilmiştir (20).

Bal arıları tarafından bitkilerin çiçek, yaprak ve tomurcuklarından toplanan propolis, güzel kokulu reçinemsi maddelerin genel adıdır (21). İçerisinde polifenoller, kafeik asit esterleri, terpenoidler, steroidler, aminoasitler ve inorganik asitler bulunan propolisin antimikrobik, antienflamatuar, immünmodülatör, antioksidan, antiproliferatif ve antikanser etkilere sahip olduğu bilinmektedir (21,22). Bu etkilerin çoğundan propolisin etken maddelerinden biri olan kafeik asit fenetil esterinin (CAPE) sorumlu olduğu gösterilmiştir (23). CAPE'nin bir analoğu olan kafeik asit fenetil amidin koroner arterde NO düzeylerini artırdığı ileri sürülmüştür (24). Propolis ailesinden olan antioksidan sinnamid türevlerinin arginazı inhibe ettiği gösterilmiştir (25). Bununla birlikte CAPE'nin etki mekanizması tam olarak aydınlatılmamıştır.

İsoproterenol (ISO), yüksek dozlarda deneysel miyokart infarktüsü oluşturan bir β-adrenerjik agonisttir (26). β-Adrenerjik agonistler ile uyarılan nekrozda, siklik adenozin monofasfat (cAMP) düzeylerindeki artışın önemli rol oynadığı bildirilmiştir (27). ISO aynı zamanda serbest radikal üretimini ve lipit peroksidasyonunu da uyarır, bu da miyokardiyal membranların irreversibl hasarına neden olur (28). ISO ile uyarılmış lezyon, miyokardiyal nekroz olarak tanımlanır ve insanlarda miyokart infarktüsü sonrası oluşan değişikliklere benzer özellikler gösterir (29).

Bu çalışmanın amacı, deneysel miyokart infarktüsünde antioksidan CAPE'nin serum arginin metabolizmasına etkisini araştırmaktır. Bu amaçla Wistar albino cinsi ratlarda ISO ile deneysel miyokart infarktüsü oluşturularak, CAPE'nin, serum arginaz aktivitesi, ornitin, ADMA ve NO düzeylerine etkisi incelenmiştir.

GENEL BİLGİLER

AKUT MİYOKART İNFARKTÜSÜ

Dünya Sağlık Örgütü, önümüzdeki yirmi yılda aterosklerotik kalp hastalıklarına bağlı ölümlerin, kadınlarda % 120, erkeklerde % 137 oranında artacağını öngörmektedir. Türkiye İstatistik Kurumu'nun yaptığı çalışmaya göre dolaşım sistemi hastalıkları % 39.9'luk bir oranla ölüm nedenleri arasında birinci sıradadır. Aterosklerotik kalp hastalığı prevalansının 1990 yılına kıyasla 50 yaş üstü grupta % 80 oranında arttığı gösterilmiştir. Yaklaşık 95.000 ölüm olayının akut koroner sendroma bağlı olarak geliştiği ve bunun da yıllık % 32 mortaliteye karşılık geldiği bildirilmiştir. Bu mortalite oranı Avrupa oranlarından yüksektir (1).

Koroner arterlerin kısmi veya tam tıkanması sonucu, koroner kan akımının azalması, kardiyak iskemi olgularının % 90'ından fazlasını oluşturur (30). Koroner arterlerin kısmi veya tam tıkanmasının başlıca nedeni aterosklerozdur (30,31). Bu nedenle, ateroskleroz patofizyolojisinin ve risk faktörlerinin bilinmesi, aterosklerozun ve ateroskleroza bağlı ölümlerin önlenmesi için önemlidir (Tablo 1) (30,32).

Ateroskleroz; orta çaptaki elastik arterler başta olmak üzere tüm damarları etkileyen, endotel disfonksiyonu ile karakterize ilerleyici sistemik bir hastalıktır (31). Klinik bulgularını orta ve ileri yaşlarda gösteren ateroskleroz aslında çocukluk çağlarında yağlı çizgilenmelerin oluşmasıyla başlar (32). Aterosklerozda, intima tabakasında düz kas hücre birikimi ve çoğalması, makrofaj ve T lenfositlerin infiltrasyonu ve hücre içerisinde serbest kolesterol ve kolesterol esterleri biçiminde lipit depolanması belirgindir (30).

Ateroskleroz patogenezi için ileri sürülen ilk hipotezler: Zedelenmeye yanıt ve tutulmaya yanıt hipotezleridir. En son ileri sürülen ise oksidatif modifikasyon hipotezi ise

LDL (düşük dansiteli lipoprotein) oksidasyonu ile oluşan okside LDL'nin aterosklerozu başlatan en önemli neden olduğunu kabul eder. LDL, doğal formunda aterojenik değildir. Ancak artan oksidatif stres, LDL oksidasyonunda artışa neden olur (33,34). Okside LDL ise makrofajlarda bulunan çöpçü reseptör aracılığıyla kontrolsüzce alınır ve makrofajlar kolesterol yüklü köpük hücreleri haline dönüşür (31). Diğer yandan okside LDL, monositler ve T lenfositler için kemotaktiktir. Ayrıca düz kas hücrelerinin proliferasyonunu uyarır ve immunojenik etki gösterir (33,34). İntima tabakasında biriken makrofajlar aterosklerotik plak gelişiminde önemli rol oynar. Özellikle aktive olmuş endotel hücrelerinden salınan makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF) bu bölgede makrofaj artışına neden olur (35). Makrofajlar tarafından okside LDL'nin sürekli alınması nedeniyle daha fazla sayıda köpük hücre oluşumu gözlenir (31).

Tablo 1. Aterosklerotik kalp hastalığı için risk faktörleri (32)

Modifiye Edilemeyen Risk Faktörleri	Modifiye Edilebilen Risk Faktörleri	Yeni Risk Faktörleri
Yaş	Sigara	Homosistein
Cinsiyet	Hipertansiyon	Lipoprotein (a)
Irk	Hiperlipidemi	Fibrinojen, PAI-1, vWF antijen
Aile Öyküsü	Diyabet, insülin rezistansı	Oksijen radikalleri/inflamasyon
	Obezite/bel çevresi	Apo A1, Apo B
	Sedanter yaşam	Küçük yoğun LDL, okside LDL
	Mental stres, depresyon	Hipertrigliseridemi, trans yağlar

PAI-1: Plazminojen aktivatör inhibitörü; **vWF:** von Willebrand faktör; **Apo:** Apolipoprotein; **LDL:** Low density lipoprotein.

Köpük hücresi aterosklerozun prototip hücresidir (35). Düz kas hücrelerinde kollajen sentezi artışı ve subendotelyal matriks üretimindeki artış, aterom plağı oluşumuna katkıda bulunur (30,36). Bununla birlikte medya ve adventisya tabakalarında da sekonder değişikliklere rastlanır (31,32). Lezyonlar heterojenik yapıda olduğundan, aterosklerotik plak içeriği de değişkenlik gösterir (32). Aterosklerotik plaklar, hem çeperde daralmaya hem de yırtılarak aterotromboza neden olabilir (36).

Ateroskleroz, miyokart infarktüsünün patogenezinde önemli rol oynar (35). Akut miyokart infarktüsü; genellikle koroner arterlerde akut trombotik daralma nedeniyle oluşan, uzamış iskemi ile birlikte geri dönüşümsüz kalp dokusu hasarıdır (2). Tanısında hastanın kliniği, EKG, biyokimyasal ve patolojik belirteçler yol göstericidir (3). Akut iskemik dönemde hücre sitoplazma ve membranında kimyasal ve yapısal değişiklikler olur. İskemi nedeniyle dokudaki kanlanmanın azalması ve/veya kesilmesine bağlı olarak hücrede oksidatif fosforilasyon azalır. Dolayısı adenozin trifosfat (ATP) ve fosfokreatin sentezi azalır. Sonuç olarak hücre membranında bulunan Na^+/K^+-ATPaz pompası görev yapamaz hale gelir ve hücre içinde Na^+ ve Ca^{2+} iyon konsantrasyonları artar. Hücre içinde Ca^{2+} iyon konsantrasyonunun artışı hücre için sitotoksiktir (37). Bütün bu değişiklikler hücrede proinflamatuar sitokinlerin salınımını ve lökosit adezyon moleküllerinin yapımını artırırken, antioksidan enzimlerin aktivitesini ve ekspresyonunu azaltır (38). Sonuç olarak oksidatif stres ve inflamasyon, miyokart infarktüsünün gelişmesine katkıda bulunur (39). Akut miyokart infarktüsü tanısı için hastanın kliniği, EKG, biyokimyasal ve patolojik belirteçlerden yararlanılmaktadır (2,3).

Kreatin kinaz (CK)'ın üç sitozolik (CK-MM, CK-BB, CK-MB) ve iki mitokondriyal izoenzimi (CK-Mt) vardır (40,41). İzoenzimler; M (kas) veya B (beyin) zincirlerinden oluşur. Birçok dokuda CK-MM izoenzimi bulunur. CK-BB izoenzimi daha çok beyin ve gastrointestinal sistemde bulunur. CK-MB izoenzimi kalp için oldukça spesifik olmakla birlikte iskelet kası hasarına bağlı olarak da yükselebilir. CK-MB'nin ölçümü uzun yıllar boyunca altın standart olarak kullanılmıştır (40). CK, 6-8 saat içinde serumda yükselmeye başlar, 24 saat içinde pik yapar ve infarktüs sonrası 3–4 gün içinde normale döner. Serum CK aktivitesi, müsküler distrofiler, inflamatuvar kas hastalıkları, alkol intoksikasyonu, konvülsiyonlar ve intramüsküler enjeksiyonda da yükselebilir (42).

Aspartat aminotransferaz (AST); göğüs ağrısı ortaya çıktıktan sonra 8-12 saat içinde yükselmeye başlar, 18-36 saatte pik değerine ulaşır ve 3-4 gün içinde normal değerine döner. Miyokart infarktüsü dışında, hepatik konjesyon, karaciğer parankim hasarı, iskelet kası hastalığı, pulmoner emboli, akut pankreatit, perikardit, oral kontraseptif, klofibrat ve yüksek doz salisilat gibi bazı ilaçların kullanımı gibi durumlarda da yükseldiği saptanmıştır (41,42).

Laktat dehidrogenaz (LDH); miyokart infarktüsünü takiben 24-48 saat içinde yükselmeye başlar, 3-6. günlerde pik yapar ve 8-14. günlerde içinde normal değerlerine döner (42). Hemolizli hastalar, megaloblastik anemi, lösemi, karaciğer hastalığı, renal hastalık, maligniteler, pulmoner emboli, miyokardit, iskelet kası hastalığı ve şok durumlarında da LDH

seviyeleri artar (42,43). LDH'ın 5 izoenzimi bulunur. Akut miyokart infarktüsünü takiben serum LDH-1 aktivitesinin artışı, total LDH aktivitesinin artışından önce görülür (40). Miyokart infarktüsüne takiben başlıca artan izoenzim LDH-1 iken, infarktüsün eşlik etmediği konjestif kalp yetmezliğinde ise LDH-5 belirgin olarak artar. Akut miyokart infarktüsü sonrası gözlenen izoenzim artışı, LDH-2 ve LDH-3 artışı ile karakterize olan akut pulmoner embolizm sonrası nadiren görülür (42).

Miyoglobin; akut miyokart infarktüsünü takiben hasara uğrayan miyokart hücreleri tarafından ilk 2 saat içinde dolaşıma salınır, 3-15 saat içinde pik yapar, yaklaşık 24 saatte normal düzeye döner (40). Akut miyokart infarktüsünde serum miyoglobin düzeyi CK'dan çok önce doruk değerlere ulaşır, CK'nın aksine molekül ağırlığı düşük olduğu için hızlı bir şekilde idrarla atılır (44).

Troponinler (Tn); iskelet ve kalp kaslarının kasılmasını düzenleyen yapısal proteinlerdir. Bu düzenlemede tropomiyozin ile birlikte görev yaparlar. T, I ve C olmak üzere üç tip troponin vardır (40). Troponin T, I ve C; troponin kompleksini oluştururlar. Kardiyak troponin I (TnI) ve T (TnT); aktin ve miyozinin kalsiyum aracılıklı etkileşimini kontrol eden kardiyak regülatör proteinlerdir (45). TnI, neonatal gelişimin hiçbir safhasında kalp dışında saptanamamaktadır (46). Aksine, TnT iskelet kasında az miktarda bulunur (47).

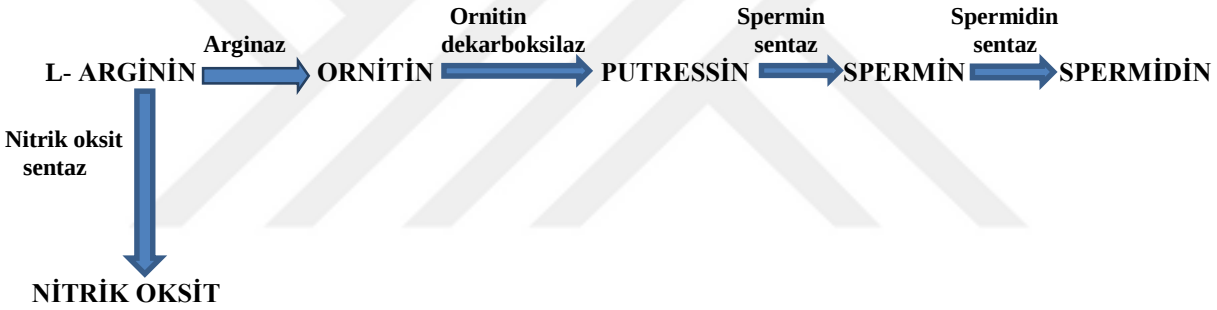
Kardiyak Tn'ler; kalp kası hasarına oldukça duyarlı ve spesifiktir. Bu yüksek duyarlılık; Tn'lerin diğer belirteçlere oranla kalp dokusunda yüksek düzeyde bulunmalarından ve sağlıklı kişilerin dolaşımında çok düşük düzeyde olmalarından kaynaklanır (48). Tn'lerin spesifikliği ise T ve I izoformlarının sadece kalp kasında bulunmasından kaynaklanır. İskelet kası hasarlarında CK ve CK-MB enzimleri artarken, kardiyak Tn'lerde artış gözlenmemektedir (45). TnI ve TnT'nin kardiyak hasarın saptanmasında eşit duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu belirtilmiştir (49). Tn'ler akut miyokart infarktüsünde 4–8 saat sonra yükselmeye başlar ve 12–24 saatler arasında doruk düzeylerine ulaşmaktadır. TnT dolaşımda 10–14 gün süre ile yüksek saptanırken, TnI'da görülen yüksek değerler 5–7 gün kadar devam etmektedir (45).

ARGİNİN METABOLİZMASI

Arginin; pozitif yüklü, bazik, nötral pH'da guanidinyum grubu içeren bir aminoasittir. D ve L olmak üzere iki formu bulunmakla birlikte proteinleri yapısındaki L-arginindir. Vücutta sitrülinden, glutamattan ve proteinlerin yıkılımından sentezlenmektedir (50). Arginin iki yolla metabolize olabilir. Bunlardan biri; üre döngüsünün son enzimi olan arginaz

tarafından L-argininin, üre ve ornitine hidrolizidir. Diğeri ise NOS tarafından L-argininden sitrullin ve NO sentezidir (5). Hem arginaz hem de NO sentaz enzimlerinin ortak substratı olan L-arginin için bu iki enzim arasında yarışma söz konusudur (4).

Arginazın tip 1 ve tip 2 olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır. Tip 1 arginaz başlıca karaciğerde bulunan sitozolik formdur ve üre siklusunda görev alır. Arginaz 2'nin katalizlediği reaksiyon sonucu oluşan üre, böbrek yolu ile atılırken, ornitin ise poliamin sentezinde rol oynar (10). Ornitin, ornitin dekarboksilaz (ODC) enzimi aracılığıyla putressine dönüşür. Putressin ise, daha sonra spermidin sentaz ile spermidine, spermidin de spermin sentaz ile spermini oluşturur. ODC enzimi poliamin biyosentezinde hız kısıtlayıcı basamak olup yüksek arginaz enzim konsantrasyonu ODC enzimini aktive eder (Şekil 1) (5). Poliaminler, deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) sentezini uyararak hücre büyümesinde, gelişmesinde ve farklılaşmasında rol oynarlar (50).



Şekil 1. L-Arginin metabolizması (5)

Tip 2 arginaz mitokondriyal form olup özellikle böbrek, beyin, testis, gastrointestinal sistem, prostat, dolaşım sistemi gibi karaciğer dışı dokularda bulunur (10,50). Tip 2 arginazın rolü tam olarak bilinmemekle birlikte, L-arginin homeostazisinin düzenlenmesi ile ve prolin ve poliamin sentezine L-ornitin sağlanması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (10). Ayrıca endotel hücrelerinde, vasküler düz kas hücrelerinde ve kardiyomiyositlerde her iki arginaz izoformunun da bulunduğu gösterilmiştir (51).

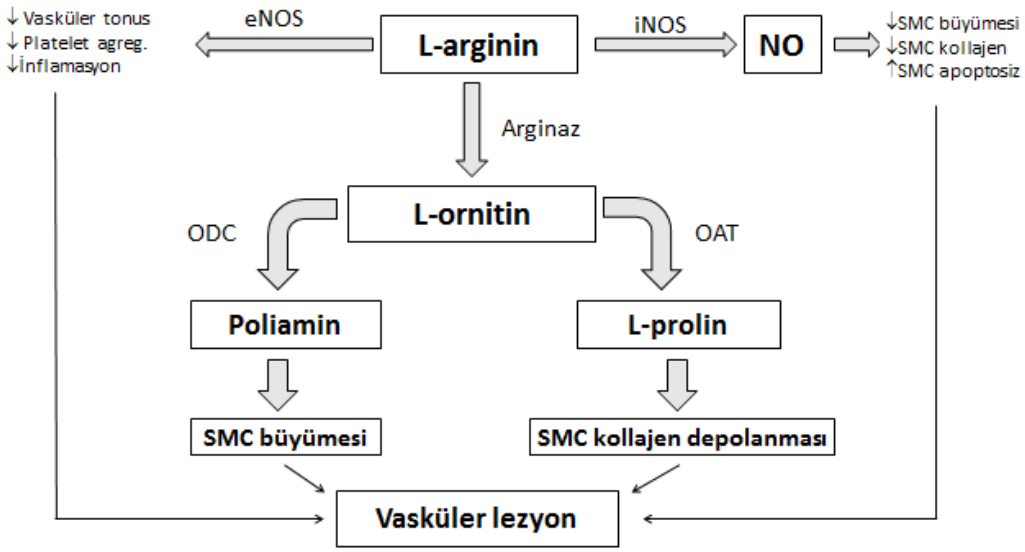
Nitrik oksit, tüm memelilerde L-argininden NOS enzimi aracılığı ile sentezlenmektedir. NOS'un üç izoformu bulunmaktadır (Tablo 2) (52). Nöronal NOS (nNOS), başlıca sinir ve iskelet hücrelerinde, eNOS ise başlıca endotel hücrelerinde eksprese edilirken, her iki form az miktarda diğer hücre tiplerinde de eksprese edilir. İndüklenebilir NOS (iNOS) normal koşullarda lökositlerde eksprese edilir, bununla birlikte ekspresyonu, inflamasyon ve diğer stres sinyallerine yanıt olarak çeşitli hücrelerde de uyarılır. eNOS ve nNOS, artan sitozolik kalsiyum iyonuna yanıt olarak NO üretir oysa iNOS sürekli aktiftir (8).

Tablo 2. Nitrik oksit sentaz izomerleri (52)

İZOMERLER	BULUNDUĞU YER	FONKSİYONU
Nöronal NOS (nNOS, NOS1)	Nöron	Nörotransmitter
Endotelyal NOS (eNOS, NOS3, cNOS)	Endotel	Vazodilatasyon
İndüklenebilir NOS (iNOS, NOS2)	Makrofaj, miyosit	Oksidatif stres

nNOS: Nöronal nitrik oksit sentaz; **eNOS:** Endotelyal nitrik oksit sentaz; **iNOS:** İndüklenebilir nitrik oksit sentaz.

Nitrik oksit; güçlü bir vazodilatatör ve antioksidan etkili bir moleküldür (7,52). eNOS tarafından üretilen NO, komşu düz kas hücrelerine difüze olarak vasküler fonksiyonu düzenler ve kan basıncının korunmasını sağlar (Şekil 2) (5, 52). NO, çözünür guanilat siklaz'ı aktive ederek etkisini gösterir. Aktive guanilat siklaz; siklik guanozin monofosfat (cGMP) üretimini katalizler, cGMP ise cGMP-bağlı protein kinaz'a bağlanarak aktivasyonunu sağlar. cGMP-bağlı protein kinaz ise hücre içindeki önemli proteinleri fosforilleyerek düz kas gevşemesine ve kan akımının artmasına neden olur (53). NO; bir yandan vazodilatör etki gösterirken diğer yandan vasküler hastalıkların patogenezinde önemli rol oynayan lökosit adezyonunu, trombosit agregasyonunu ve vasküler düz kas proliferasyonunu da inhibe eder (8). NO'nun antioksidan etkisi, süperoksit radikalinin üretimini ve dolayısıyla LDL'nin oksidasyonunu azaltmasıyla ilişkilidir (54).



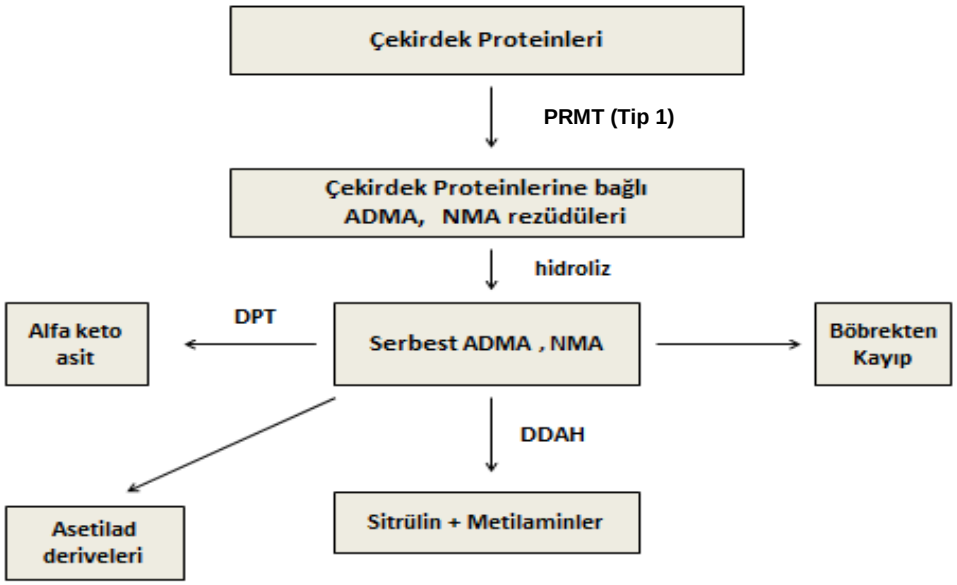
Şekil 2. Arginin metabolizması (5)

eNOS: Epitelyal nitrik oksit sentaz; **iNOS:** İndüklenebilir nitrik oksit sentaz; **NO:** Nitrik oksit; **OAT:** Ornitin transkarbamilaz; **ODC:** Ornitin dekarboksilaz; **SMC:** Düz kas hücresi.

Proteinlerdeki arginin kalıntıları, protein arginin metiltransferaz (PRMT) enzimleri tarafından metillendiği zaman ADMA sentezlenir. Proteinlerdeki argininin metilasyonu, argininin guanidin azotlarına bir veya iki metil grubunun eklendiği post-traslasyonal bir modifikasyondur (55). İki tip PRMT bulunur. PRMT tip 1; ADMA oluşumunu katalizler, PRMT tip 2 ise guanidino azotlarının her ikisini birden metiller ve simetrik dimetilarginin (SDMA) oluşumu ile sonuçlanır. PRMT enzimlerinin her ikisi de monometilasyon yapabilir ve NG-monometil-L-arginin (L-NMMA) oluşumunu katalizleyebilir (9). Özellikle kalp hücrelerinde ve endotelde PRMT tip 1 enzimi bulunmaktadır (56).

Simetrik dimetilargininin neredeyse tamamı renal yolla atılırken, ADMA ve L-NMMA metabolize edilir (9). Metillenmiş argininlerin az bir kısmı böbrekte dimetilarginin piruvat transferaz aracılığıyla ve muhtemelen karaciğerde asetilasyon aracılığıyla metabolize edilir (Şekil 3) (57,58).

NG-monometil-L-arginin ve ADMA için başlıca metabolik yol dimetilarginin dimetilaminohidrolaz (DDAH) enzimi tarafından aracılığıyla gerçekleşir (55). Yüksek organizmalarda DDAH enziminin 2 izoformu tanımlanmıştır (9). DDAH Tip 1 enzimini kodlayan gen, 1. kromozomda lokalize olmuş iken, DDAH Tip 2 enzimini kodlayan gen 6. kromozomda lokalizedir (59). Bu iki izoform benzer aktiviteye sahiptir. Özellikle kardiyovasküler sistemde DDAH Tip 2 ekspresyonun çok daha fazla olduğu gösterilmiştir. Bozulmuş DDAH aktivitesi, dolaşımdaki ADMA düzeylerinde artışa yol açar (9).



Şekil 3. ADMA sentez ve yıkılımı (57)

ADMA: Asimetrik dimetilarginin; **NMA:** Monometilarginin; **PTMT:** Protein arginin metiltransferaz; **DDAH:** Dimetilarginin dimetilaminohidrolaz; **DPT:** Dimetilarginin piruvat aminotransferaz.

Asimetrik metillenmiş argininler; ADMA ve L-NMMA, NOS inhibitörüdürler. Oysa SDMA, NOS inhibitörü değildir (9,55). Yüksek konsantrasyonlarda ADMA ve SDMA, Y^+ transporter sistemi aracılığıyla transport için arginin ile yarışabilir. Yüksek konsantrasyondaki ADMA, NOS inhibisyonu yanı sıra L- argininin hücre içine transportunu engelleyerek de NO sentezini azaltır (56).

Asimetrik dimetilarginin düzeylerindeki artış ile kardiyovasküler hastalıklar arasında yakın bir ilişki vardır (60). Hiperkolesterolemi, hipertansiyon, diyabet, hiperhomosisteinemi, gibi koroner kalp hastalığına risk oluşturan durumlarda ADMA düzeylerinin artmış olduğu saptanmıştır (61). ADMA düzeylerindeki küçük değişikliklerin bile vasküler NO üretiminde, vasküler tonusta ve sistemik vasküler dirençte anlamlı değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir (56).

Miyokardiyal iskemi, ateroskleroz ve diyabette arginaz ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (10). Miyokart infarktüslü bireylerin eritrosit ve serum arginaz aktivitesinde ve ADMA düzeylerinde bir artış olduğu gösterilmiştir (11,12,62,63). Yıldırım ve ark. (13) akut miyokart infarktüslü bireylerde serum NO düzeylerinin arttığını ve bu artışın oksidatif strese karşı bir savunma mekanizması olarak rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir. Diğer yandan akut miyokart infarktüslü bireylerde serum NO düzeylerinin azaldığı da bildirilmiştir (14). Miyokart infarktüsünde arginaz aktivitesinin belirgin olarak artarken, NO sentaz aktivitesinin azaldığı da gösterilmiştir (16). Deneysel miyokart iskemi/reperfüzyon modelinde önceden koruyucu olarak verilen arginaz inhibitörlerinin infarkt alanında küçülmeye neden olduğu gösteren çalışmalar mevcuttur (64).

Hücrenin normal fonksiyonu sırasında ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri normal şartlar altında enzimatik ve/veya nonenzimatik antioksidan mekanizmalarla hücreden uzaklaştırılır (65). Aterosklerozda, oksidan/antioksidan dengenin bozulduğu ve oksidatif strese bağlı güçlü radikal reaksiyonlarının meydana geldiği bilinmektedir. Artan oksidatif stres, ateroskleroz patogenezinde rol oynayan okside LDL oluşumunu artırır (66). Okside LDL'nin ise arginaz aktivitesini artırdığı gösterilmiştir. Arginaz aktivitesindeki artış, eNOS aracılığıyla nitrik oksit üretimi için gerekli L-argininin tüketimine ve böylece endotelyal disfonksiyona yol açar (10). Normal koşullarda NO, reaktif oksijen radikallerini temizleyerek LDL'nin oksidasyonunu önler (7,67,68). Hem L-arginin hem de NO radikal tutucu yeteneğe ve hücre hasarına karşı koruyucu etkiye sahiptir (7,68,69).

Aterosklerozda arginaz aktivitesinin artması, NO üretimi için gerekli L-argininin tüketilmesi aracılığıyla NO düzeylerinin azalmasına ve dolayısıyla oksidatif stresin daha da artmasına neden olur (10).

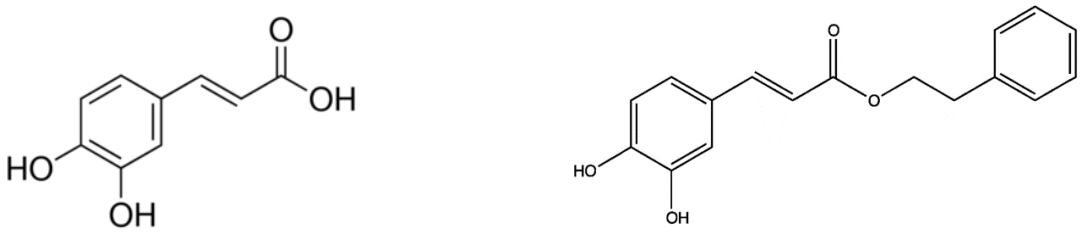
Oral yoldan alınan L-argininin, NO üretimini artırdığı bildirilmiştir (50). Yang ve ark. (70) sıçanlara 13 hafta boyunca oral L-arginin verilmesinin plazma arginin, ornitin ve NO düzeylerinde artışa yol açtığını bildirmişlerdir. Bu artışta L-arginin tarafından eNOS enziminin uyarılmasının ya da eNOS için substrat (L-arginin) kullanılabilirliğinin artmasının sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür (71). Oral L-argininin, koroner arter hastalığı olanlarda miyokardiyal iskemiyi önlediği ve esansiyel hipertansiyonu olan hastalarda kan basıncını ve renal vasküler direnci azalttığı gösterilmiştir (72,73). Stabil anjinalı hastalarda oral L- arginin preparatlarının egzersiz toleransını arttırdığı bildirilmiştir (74). Kalp yetmezliği olan hastalarda altı haftalık oral L-arginin tedavisinin kardiyak fonksiyonları olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir (73). Balon yöntemi ile damar duvarı hasarlanmış sıçanlara L- arginin verilişinin, vasküler düz kas hücre proliferasyonunu ve apopitozisi azalttığı ve buna bağlı olarak damar lümen açıklığının korunmasına yardım ettiği saptanmıştır (75).

Asimetrik dimetilarginin düzeylerindeki artışın da NO üretiminde bir azalma ile sonuçlanabileceği bildirilmiştir (57). Akut miyokart infarktüslü hastaların serum ADMA düzeylerinin yüksek olduğu gösterilmiştir (63). ADMA, L-arginin ile yarışarak NOS'u inhibe eden endojen bir maddedir. ADMA düzeyi yüksek bireylerde oral yoldan alınan L-argininin, L-arginin/ADMA oranını artırdığı ve endotel disfonksiyonunu düzelttiği gösterilmiştir (20).

KAFEİK ASİT FENETİL ESTER

Propolis, bitkilerin çiçek, yaprak ve tomurcuklarından bal arıları tarafından toplanan, güzel kokulu, reçinemsi maddenin genel adıdır. Arılar, propolisi kovanların iç yüzünün kaplanmasında, hasarlanan yerlerin tamirinde, petek gözlerinin dezenfeksiyonunda, kovanın içine giren zararlı mikroorganizmalar ve böceklerin mumyalanarak etkisiz hale getirilmesinde kullanırlar (21). Propolisin içerisinde polifenoller (flavonlar, flavononlar ve flavonoller gibi flavonoidler, fenolik asitler ve esterleri), kafeik asit esterleri (kafeik asit benzil ester, salisilik asit benzil ester, sinnamik asit benzil ester ve kafeik asit fenetil ester), terpenoidler, steroidler, aminoasitler ve inorganik asitler bulunur (21,76). Propolisin antimikrobik, antienflamatuar, immünmodülatör, antioksidan, antiproliferatif ve antikanser özellikleri keşfedilmiştir. Bu etkilerin çoğunun propolisin etken maddelerinden biri olan CAPE'ye bağlı olduğu gösterilmiştir (23).

Kafeik asit fenetil ester, yapısında bulunan fenil ve polihidrokarbon zinciri ile birlikte taşıdığı iki adet hidroksil grubu nedeniyle membranları rahatlıkla geçebilmektedir. CAPE'nin kuvvetli antioksidan özelliği, yapısında yer alan iki hidroksil grubundan kaynaklanmaktadır (Şekil 4) (22).



Kafeik asit **Kafeik asit fenetil ester (CAPE)**

Şekil 4. Kafeik asit ve kafeik asit fenetil esterin molekül yapısı (22)

Nükleer faktör kappa B (NF-kappa B); immun, inflamatuar yanıt ve büyüme kontrolü ile ilgili hücresel genlerin transkripsiyonunu düzenleyen onkogenik bir proteindir (77). Yapılan çalışmalarda NF-kappa B yolunun ateroskleroz etiyolojisinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir. NF-kappa B, çeşitli ateroskleroz risk faktörleri tarafından aktive edilir (78). Örneğin tümör nekroz faktör-α (TNF-α) ve interlökin-1 (IL-1), NF-kappa B'yi aktive edebilir (79). CAPE'nin NF-kappa B aktivasyonu üzerine güçlü inhibitör etkileri olduğu bildirilmiştir (78, 80). NF-kappa B, hücrenin redoks dengesiyle kontrol edilebilen bir transkripsiyon faktörüdür ve oksidatif stres, NF-kappa B aktivasyonunda önemli bir basamaktır (79). Diğer yandan, süperoksit anyonlarını toplayan NO ise NF-kappa B yolunu inhibe eder. Bu, aterosklerozun önlenmesinde antioksidan besinlerin ve ilaçların potansiyel etkinliğinin önemini ortaya koyar (78). Okside LDL'nin NF-kappa B'yı aktive ettiği bilinmektedir (80). CAPE ise gerek okside LDL'yi gerekse NF-kappa B'yi inhibe ederek iskemik kalp hastalığını önlemede önemli rol oynamaktadır (78, 81).

Ksantin oksidaz sistemi, radikallerin potansiyel bir kaynağıdır (76). CAPE, nötrofillerde ksantin oksidaz sistemi tarafından uyarılan serbest oksijen radikallerinin üretimini tamamıyla bloke eder (82). Propolis ekstraktının, serbest radikalleri toplama yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir (23). CAPE'nin serbest radikal toplayıcısı özelliği nedeniyle miyokardiyal iskemi/reperfüzyon hasarında da koruyucu etkiye sahip olabileceği gösterilmiştir (83). İlhan ve ark. (84) iskemik dokuda CAPE'nin lökositlerin iskemi alanına göçünü engelleyerek serbest oksijen radikallerinin üretimini azalttığını ve bu yolla

antioksidan etki gösterdiğini ileri sürmüşlerdir. CAPE, hücre membranlarından araşidonik asit salıverilişini önleyerek, ayrıca siklooksijenaz-1 ve siklooksijenaz-2 aktivitesini direkt olarak inhibe ederek prostoglandin sentezini baskılamakta böylece antiinflamatuvar etki göstermektedir (85).

Kafeik asit fenetil ester, lipit peroksidasyonunu azaltır. CAPE gibi flavonoidlerin lipit peroksidasyonunun başlangıcında rol alan peroksit radikalini temizlediği ileri sürülmüştür. Flavonoidlerin lipit peroksidasyonunda görev alan diğer radikalleri de uzaklaştırma yeteneği vardır (86). CAPE'nin, ornitin dekarboksilaz üzerinde de güçlü inhibitör etkileri olduğu kanıtlanmıştır (87). Ayrıca CAPE' nin, hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki artışı inhibe ettiği gösterilmiştir (88).

Kumaran ve ark. (86) ISO ile oluşturulan miyokart infarktüsünde, kalp dokusunda süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz enzimlerinin aktivitesinde bir azalmanın olduğunu bildirmişlerdir. Parlakpınar ve ark. (89) ise CAPE'nin SOD ve katalaz enzim aktivitelerinde artışa yol açtığını göstermişlerdir. Diğer yandan renal iskemi/reperfüzyon modeli oluşturulan sıçanlarda CAPE tedavisinin, NO düzeylerinde bir artışa neden olduğu gösterilmiştir (82).

Kafeik asit fenetil ester, iskemi/reperfüzyonda kaspaz 3 aktivasyonunu ve dolayısıyla hücre ölümünü önler. Yapılan çalışmalarda infarkt alanında kaspaz 3 aktivitesinin olduğu ve CAPE'nin mitokondride kalsiyumla uyarılan sitokrom C'yi inhibe ederek kaspaz 3 aktivitesini engellediği gösterilmiştir (90,91).

Bilimsel çalışmalarda kullanılan CAPE'nin, -20^{o}C'de depolanması gereklidir aksi halde tüm biyolojik aktivitesini kaybeder. Kapalı formülü $C_{17}H_{16}O_4$ olan liyofilize haldeki bu ürünün molekül ağırlığı 284.31 gr/mol' dür. Etil asetat, dimetil sülfoksit (DMSO) ve etanolde tamamen çözünmektedir (22).

İSOPROTERENOL

İsoproterenol, β1 ve β2 adrenerjik reseptörlere etkili non-selektif sentetik katekolamin analoğudur. ISO, ratlarda deneysel olarak miyokart infarktüsü oluşturmak için yaygın olarak kullanılır (26,29). Yüksek dozdaki ISO, miyokardiyal hasarı tetikler, submiyokardiyal dokuda iskemi, hipoksi ve nekroza yol açar, miyokardiyal esneklikte azalma ve sistolik ve diyastolik fonksiyonlarda inhibisyon oluşturur (26,92). ISO'nun oluşturduğu nekroz, membran geçirgenliğini değiştirerek miyokart membran bütünlüğünün ve fonksiyonunun kaybına yol açar. ISO ile uyarılan miyokart infarktüsü sonrası sıçan kalbinde gözlenen patofizyolojik değişiklikler, insanlarda miyokart infarktüsü sonrası oluşan değişikliklere benzer (29).

İsoproterenol ile uyarılan miyokart infarktüsünün mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte cAMP düzeylerindeki artış, intrasellüler kalsiyum artışı ve yüksek enerjili fosfatların tüketilmesi gibi çeşitli faktörlerin rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (27). Ayrıca katekolaminlerin oksidatif metabolizmasından kaynaklanan serbest radikallerin aşırı üretimi de ISO'nun mekanizmasında rol oynayabilir (93).

İsoproterenol, sıçan miyokart kasında oksidatif strese neden olarak yoğun ve mikroskobik infarkt meydana getirir. ISO, serbest radikal üretimini ve lipit peroksidasyonunu uyarır ve geri dönüşümsüz miyokart membran hasarına yol açar (29).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Araştırmada Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi'nden sağlanan sağlıklı yetişkin erkek Wistar albino sıçanlar kullanıldı. Standart diyet ile beslenen sıçanlar, % 60 nem oranına sahip, 22±2°C oda sıcaklığında, 12 saat ışık 12 saat karanlık siklusu ile barındırıldı. Çalışmaya başlamadan ve çalışma sonunda hayvanların tartımları yapıldı. Serum arginaz aktivitesi, serum ornitin, ADMA, NO ve TnI düzeylerinin ölçümü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda yapıldı. Kalp dokularının histopatolojik incelemesi Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Çalışma, Trakya Üniversitesi Etik Kurulu tarafından 29.01.2016 tarihinde 2016/02 sayılı oturumda TÜHADYEK-2016/06 protokol ile onaylandı (Ek 1).

DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

Deneyde 40 adet Wistar albino sıçan; kontrol grubu, ISO grubu, CAPE grubu, ISO+CAPE grubu olmak üzere eşit sayıda rastgele 4 gruba ayrıldı. Tüm sıçanlara her sabah saat 10.00'da enjeksiyon yapıldı.

Kontrol grubuna yedi gün boyunca intraperitoneal olarak 1 mL % 0.5 DMSO içeren % 0.9 NaCI çözeltisi uygulandı.

CAPE grubuna yedi gün boyunca intraperitoneal olarak 1 mL % 0.5 DMSO içeren % 0.9 NaCI çözeltisi içinde çözülmüş CAPE (10 μmol/kg/gün) uygulandı.

ISO grubuna ilk beş gün boyunca intraperitoneal olarak 1 mL % 0.5 DMSO içeren % 0.9 NaCI çözeltisi verildi. Altıncı ve yedinci günlerde 1 mL % 0.5 DMSO içeren % 0.9 NaCI çözeltisi içerisinde çözülmüş ISO (150 mg/kg/gün) intraperitoneal olarak verildi.

ISO+CAPE grubuna beş gün boyunca intraperitoneal olarak 1 mL % 0,5 DMSO içeren % 0.9 NaCI çözeltisi içinde çözülmüş CAPE (10 μmol/kg/gün) uygulandı. Altıncı ve yedinci günlerde 1 mL % 0,5 DMSO içeren % 0.9 NaCI çözeltisi içerisinde çözülmüş isoproterenol (150 mg/kg/gün) ve CAPE (10 μmol/kg/gün) intraperitoneal olarak verildi.

KAN VE DOKU ÖRNEKLERİNİN ALINMASI

Tüm gruplardan sekizinci günde anestezi altında kardiyak kan örnekleri alındı. Anestezik ilaç olarak 5 mg/kg rompun (Ksilazin) ve 50 mg/kg ketalar (Ketamin) kullanıldı. Serum arginaz aktivitesi, serum ornitin, ADMA, NO ve TnI düzeylerini belirlemek için alınan kanlar biyokimya tüplerine kondu. Kan örnekleri 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Serumlar ependorflara konularak analiz gününe kadar -80^{o}C'de saklandı.

Tüm hayvanlar, kardiyak kan örneklerinin alınmasını takiben sakrifiye edildi ve kalp dokuları çıkarıldı. Dokular histopatolojik olarak incelenmek üzere formol ile tespit edilip, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na gönderildi.

KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

L-Arginin (Sigma)
Üre (Sigma)
Manganez II klorür (Sigma)
α-İsonitrosopropiofenon (Sigma)
Tris-HCl (Sigma)
Ninhidrin (Sigma)
Etanol (Merck)
Asetik asit (Sigma)
İsoproterenol (Sigma)
Kafeik asit fenetil ester (Sigma)
Dimetil sülfoksit (Sigma)
O-Fosfortik asit (Merck)
Sülfürik asit (H_2SO_4) (Merck)
Hidroklorik asit (HCI) (Merck)
Potasyum nitrat (KNO_3) (Sigma)
Sodyum borat ($Na_2B_4O_7$) (Sigma)
Sodyum hidroksit (NaOH) (Sigma)

KULLANILAN CAM MALZEME VE LABORATUAR GEREÇLERİ

ELISA (BioTek)

Santrifüj (Rotofix-32,Hettich)

Otomatik pipetler (Eppendorf, Socorex, Microlit)

Hassas terazi (Sartorius)

Su banyosu (GFL 1083)

Vorteks (VELP)

Manyetik karıştırıcı (IKA)

Spektrofotometre (Unicam)

Distile su cihazı (Nüve NS245)

Deney tüpleri

Balon jojeler

Erlen

Baget

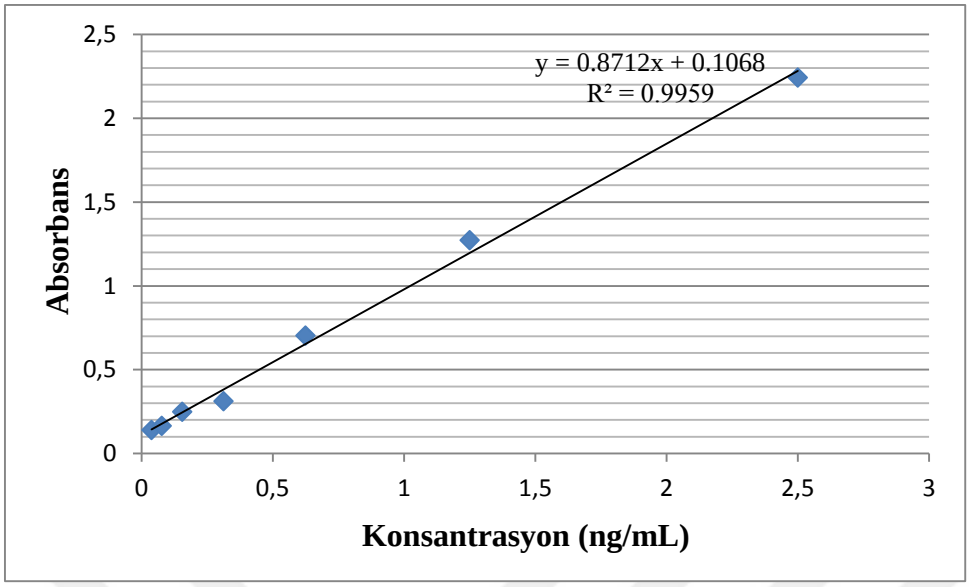
Puar

Portüp

TROPONİN I DÜZEYİ ÖLÇÜMÜ

Serum TnI düzeyleri, sıçan serumu ile uyumlu Life Diagnostics marka kit (Rat Cardiac TnI, CTNI-2-US) yardımıyla ELISA metodu kullanılarak yapıldı. Sonuçlar, 0.039, 0.078, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25 ve 2.50 ng/mL'lik konsantrasyonlarda TnI içeren standart çözeltiler kullanılarak standart grafiği oluşturuldu. Grafikten TnI düzeyleri ng/mL olarak hesaplandı (Şekil 5). TnI standart grafiğinin denklemi y=0.8712x+0.1068 olarak belirlendi.

Deney prensibi mikroplate kuyucuklarına konan sıçan serumundaki TnI'nın, kuyucukların içindeki tavşan anti troponin I poliklonal antikorlarına bağlanmasına dayanır. Oluşan antijen-antikor kompleksine ikincil antikor olarak yaban turbu peroksidazı bağlanır ve tetrametilbenzidin eklenmesi ile mavi renk oluşturulur. Oluşan mavi renk, 1N hidroklorik asit eklendiğinde sarıya dönüşür ve 450 nm dalga boyunda mikroplate spektrofotometre ile okunur.



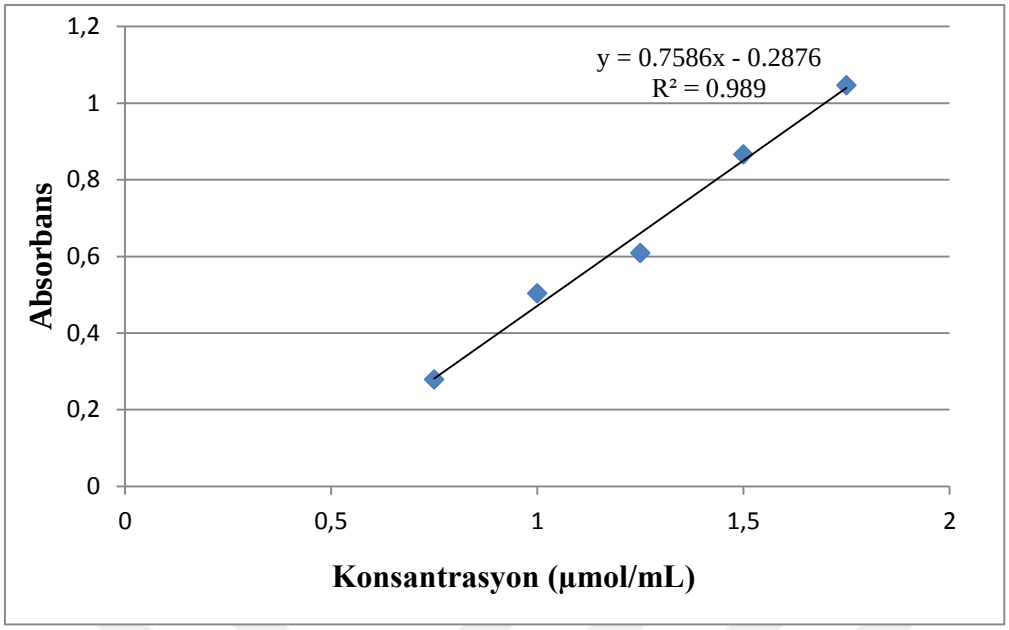
Şekil 5. Troponin I standart grafiği

SERUM ARGİNAZ AKTİVİTESİ ÖLÇÜMÜ

Serum arginaz aktivitesinin ölçümü için Corraliza ve ark. (94) tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı. Deney prensibi ortama konulan arginin substratından serumdaki arginaz aracılığıyla oluşan ürünün, α-isonitrosopropiofenon (ISPF) ile oluşturduğu pembe-mor renkli kompleksin kolorimetrik olarak ölçümüne dayanır.

Arginaz aktivitesinin tayini için serum üzerine tampon (10 mM $MnCl_2$, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) ilave edilerek enzim (arginaz) 55 ºC'de 10 dakika aktive edildi. Aktive edilmiş lizattan 25 µL alındı ve üzerine 25 µL 0.50 M arginin (pH 9.7) ilave edildi. 37 ºC'ta 60 dakika inkübe edilerek arginin hidrolizi gerçekleştirildi. Reaksiyon, H_2SO_4:H_3PO_4:H_2O (1:3:7) içeren 400 µL asit karışımı ilavesiyle durduruldu. Karışıma, %100 etanolde çözünmüş % 9 ISPF ilave edilerek 100 ºC'de 45 dakika ısıtıldı. Ardından 10 dakika karanlıkta bekletildi ve oluşan üre 540 nm'de kolorimetrik olarak tayin edildi.

0.75, 1, 1.25, 1.50 ve 1.75 µmol/mL konsantrasyonlarında üre içeren standart çözeltiler kullanılarak standart grafiği oluşturuldu (Şekil 6). Regresyon analizinden saptanan formül kullanılarak numunelerdeki arginaz düzeyleri hesaplandı ve U/L olarak verildi. Bir arginaz ünitesi; 37 ºC'de 1 dakikada 1 µmol üre oluşturan enzim miktarı olarak tanımlandı. Arginaz standart grafiğinin denklemi y= 0.7586x-0.2876 olarak belirlendi.



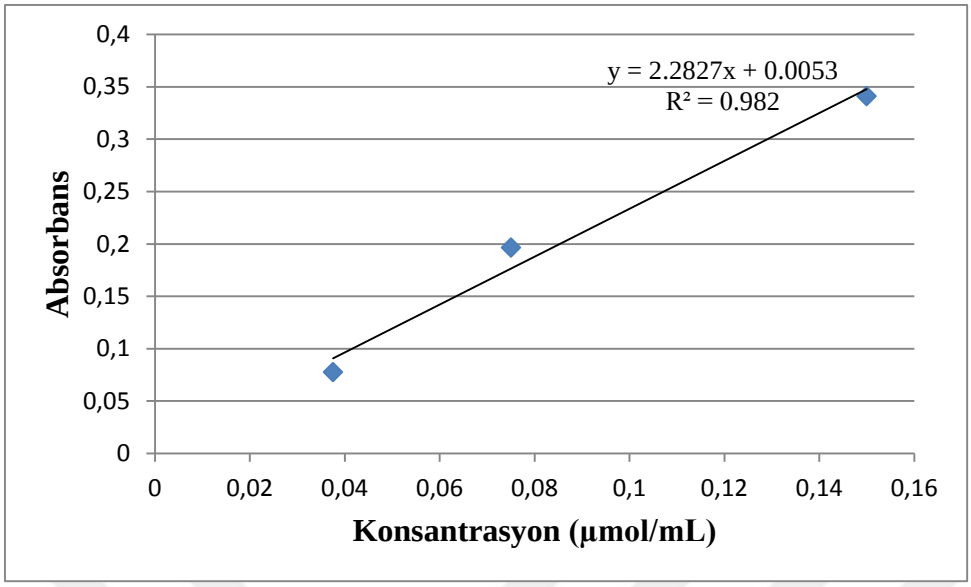
Şekil 6. Arginaz standart grafiği

SERUM ORNİTİN DÜZEYİ ÖLÇÜMÜ

Serum ornitin düzeyinin ölçülmesinde Chinard tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı (95). Deneyin prensibi ornitinin, ninhidrin varlığında oluşturduğu mor renkli ürünün 515 nm dalga boyunda ölçülmesine dayanır.

Renk reaksiyonu için dereceli ve kapaklı tüpteki 1 mL örnek üzerine eşit miktar glasiyel asetik asit ve reaktif çözeltisi (mililitresinde 0.4 mL 6M H_3PO_4, 0.6 mL glasiyel asetik asit ve 25 mg ninhidrin içeren) ilave edildi ve karıştırıldı. Örnek körü; 1 mL örnek üzerine, eşit miktar glasiyel asetik asit ve ninhidrinsiz reaktif çözeltisi ilave edilerek hazırlandı. Reaktif körü; 1 mL reaktif çözeltisi, 1 mL glasiyel asetik asit ve 1 mL distile su karıştırılarak hazırlandı. Tüplerin ağzı kapatılarak 100 ^oC'ta 60 dakida ısıtıldı ve sonra oda sıcaklığına gelinceye dek soğutuldu. Tüplere 1'er mL glasiyel asetik asit eklendi ve oda ısısına gelmeleri sağlandı. Tüplerdeki sıvı hacimleri glasiyel asetik asitle 5 mL'ye tamamlandı. 515 nm'de absorbansları okundu.

Standart eğrisinin hazırlanması için 0.0375, 0.075 ve 0.15 µmol/mL konsantrasyonlarında ornitin içeren standart çözeltiler kullanıldı (Şekil 7). Regresyon analizinden saptanan formül kullanılarak örneklerdeki ornitin miktarı hesaplandı ve µmol/L olarak verildi. Ornitin standart grafiğinin denklemi y= 2.2827x+0.0053 olarak belirlendi.

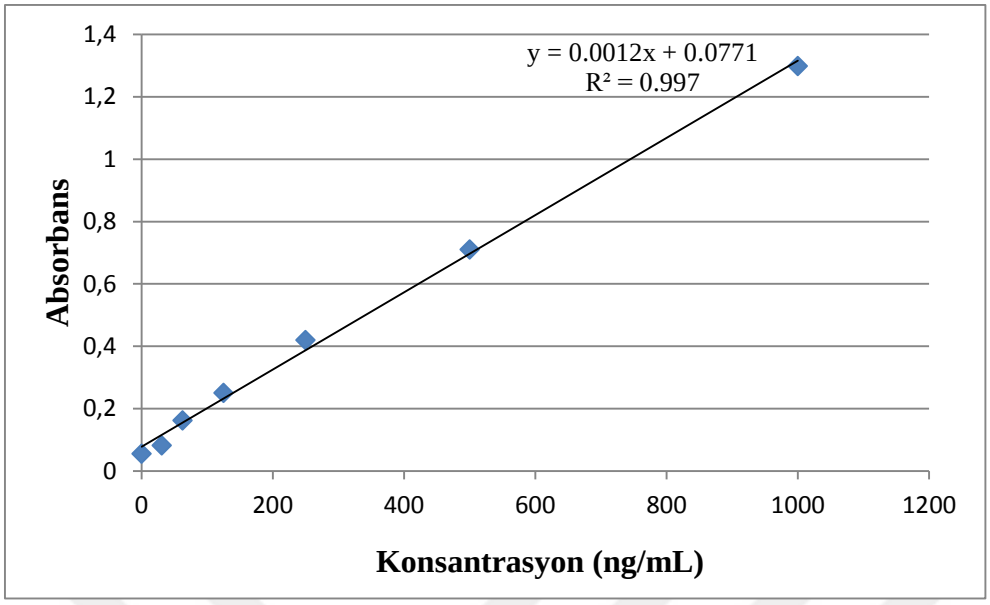


Şekil 7. Ornitin standart grafiği

SERUM ADMA DÜZEYİ ÖLÇÜMÜ

Rat serumlarındaki ADMA düzeyi, sıçan serumu ile uyumlu MyBiosource (MBS094282, USA) marka kit yardımıyla ELISA metodu kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar 31.2, 62.5, 125, 250, 500 ve 1000 ng/mL konsantrasyonlarda ADMA içeren standart çözeltiler kullanılarak standart grafiği oluşturuldu. Grafik kullanılarak hesaplanan ADMA düzeyleri µmol/L olarak verildi (Şekil 8).

Deney prensibi, sıçan serumundaki ADMA'nın, mikroplate kuyucuklarında anti-ADMA antikorlarına bağlanarak oluşturduğu antijen-antikor kompleksine, ikincil antikor olarak yaban turbu peroksidazının bağlanması ile oluşan ürünün renklendirilmesi esasına dayanır. Oluşan mavi renkli kompleks, stop solüsyon ilavesiyle sarı renge dönüştürülür ve 450 nm dalga boyunda mikroplate spektrofotometre ile okunur. ADMA standart grafiğinin denklemi y= 0.0012x + 0.0771 olarak belirlendi.



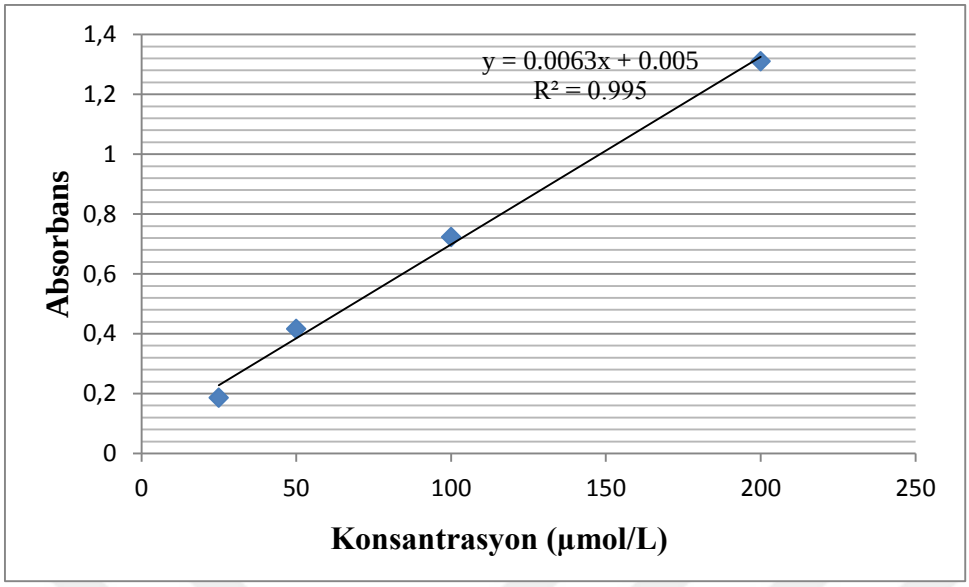
Şekil 8. Asimetrik dimetilarginin standart grafiği

SERUM NİTRİK OKSİT DÜZEYİ ÖLÇÜMÜ

Serum NO düzeyleri Cortas ve Wakid yöntemi kullanılarak ölçüldü (96). Deney prensibi, nitrik oksidin kadmiyum granülleriyle, daha kararlı bir molekül olan nitrit haline dönüştürülerek, oluşan pembe renkli çözeltinin spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanır.

Nitrik oksit düzeylerinin tayini için 0,5 mL serum üzerine $ZnSO_4$ ve NaOH çözeltileri eklenerek proteinler çöktürüldü. Süpernatant alındı ve kadmiyum granülleri kullanılarak, nitrat molekülleri nitrite dönüştürüldü. Nitrit moleküllerinin Gries ayıracı ile oluşturduğu pembe renkli bileşik 545 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı.

10 mM KNO_3 stok standart, 10 mM sodyum borat ($Na_2B_4O_7$) çözeltisi içinde çözüldü. Daha sonra bu stok standart çözeltisinden 25, 50, 100, 200 µmol/L konsantrasyonlarında standart çözeltileri hazırlandı. Regresyon analizi ile kalibrasyon eğrisinin denklemi bulunarak serum örneklerindeki NO düzeyleri hesaplandı ve µmol/L olarak verildi (Şekil 9). NO standart grafiğinin denklemi y= 0.0063x+ 0.005 olarak belirlendi.



Şekil 9. Nitrik oksit standart grafiği

DOKULARIN HİSTOPATOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ

Kalp dokuları % 10'luk nötral formaldehit solüsyonu içinde 24 saat tespit edildi. Dokular vakum uygulaması eşliğinde sırasıyla artan derişimlerde alkol, ksilen ve erimiş parafin basamaklarını içeren doku takibine tabi tutuldu ve parafine gömüldü. Ardından dokulardan hazırlanan parafin bloklardan 5 mikron kalınlığında kesitler alınarak hematoksilen-eozin ile boyandı. Preparatlar kör bakışla ışık mikroskobunda değerlendirildi. Ayrıca, her biri yine 5 mikron kalınlığında alınan kesitlere, fibrozisi değerlendirmek için Masson trikrom ve Van Gieson boyaları, miksoid değişikliği değerlendirebilmek için de PAS-Alcian blue boyası uygulandı. Değerlendirmede kalp kas lifleri arasındaki nötrofil lökosit infiltrasyonu, kalp kasındaki miksoid değişiklikler ve fibrozis değerleri, semikantitatif olarak 0 ile 3 arasında (0; yok, 1; hafif dereceli, 2; orta dereceli 3; şiddetli) skorlandı.

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

İstatistiksel değerlendirme, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'na kayıtlı SPSS 20. 0 (Lisans no: 10240642) istatistik programı kullanılarak yapıldı. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verildi. TnI, arginaz, ornitin, ADMA ve NO değerlerinin gruplar arası karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Çoklu karşılaştırma testi olarak Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi yapıldı.

BULGULAR

İsoproterenol grubundaki bir sıçanın ADMA değeri ölçülemediğinden bu grupta istatistiksel analiz, ADMA ve ADMA/NO değerleri için 9 sıçan üzerinden gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu, CAPE grubu, ISO grubu ve ISO+CAPE grubuna ait sıçanların ilk ağırlıkları Tablo 3, deney sonu ağırlıkları Tablo 4'te gösterilmiştir. Sıçan gruplarına ait tüm kan parametreleri ise Tablo 5'te gösterilmiştir.

Sıçanların ilk ve son ağırlıklarının ortalamaları Tablo 6'da görülmektedir. Sıçanların ilk ağırlıklarının ortalaması kontrol grubunda 261.70±8.43 g, CAPE grubunda 261.00±9.40 g, ISO grubunda 261.30±9.63 g ve ISO+CAPE grubunda 261.70±9.59 g olarak bulundu. Grupların arasında ilk ağırlıkları bakımından istatiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=0.995$).

Sıçanların son ağırlıklarının ortalaması kontrol grubunda 266.40±8.63 g, CAPE grubunda 266.00±9.18 g, ISO grubunda 266.10±7.42 g ve ISO+CAPE grubunda 266.10±8.76 g olarak bulundu. Grupların arasında son ağırlıkları bakımından istatiksel olarak fark yoktu ($p>0.998$).

Tablo 3. Sıçanların ilk ağırlıkları

	İlk Ağırlık (g)			
	Kontrol	**CAPE**	**ISO**	**ISO+CAPE**
1	276	258	256	260
2	265	263	268	254
3	263	261	253	252
4	257	253	249	268
5	248	275	270	274
6	258	278	264	266
7	270	248	272	265
8	255	253	248	254
9	269	261	259	276
10	256	260	274	248

CAPE: Kafeik asit fenetil ester; **ISO:** İsoproterenol.

Tablo 4. Sıçanların son ağırlıkları

	Son Ağırlık (g)			
	Kontrol	**CAPE**	**ISO**	**ISO+CAPE**
1	280	263	261	265
2	268	269	271	260
3	270	264	260	258
4	261	258	255	272
5	255	280	275	276
6	260	283	269	270
7	277	255	275	271
8	258	258	258	256
9	274	265	264	279
10	261	265	273	254

CAPE: Kafeik asit fenetil ester; **ISO:** İsoproterenol.

Tablo 5. Sıçan gruplarına ait kan parametreleri

GRUP	TnI (ng/mL)	Arginaz (U/L)	Ornitin (µmol/L)	ADMA (µmol/L)	NO (µmol/L)	ADMA/NO	NO/Ornitin
KONTROL							
1	0.60	11.74	209.47	0.344	6.12	0.056	0.029
2	0.52	8.59	226.71	0.339	1.50	0.227	0.007
3	0.71	12.04	173.26	0.348	4.68	0.074	0.027
4	0.65	11.35	206.02	0.266	1.97	0.135	0.010
5	0.57	11.64	219.81	0.381	4.36	0.087	0.020
6	0.76	12.64	168.09	0.344	4.05	0.085	0.024
7	0.59	10.16	236.19	0.433	4.05	0.107	0.017
8	0.65	11.84	210.33	0.312	4.84	0.064	0.023
9	0.62	10.26	223.26	0.336	4.52	0.074	0.020
10	0.68	10.76	208.13	0.257	2.13	0.121	0.010
CAPE							
1	0.63	12.63	334.46	0.315	5.003	0.063	0.015
2	0.66	12.53	305.15	0.390	4.046	0.096	0.013
3	0.60	10.16	278.43	0.260	2.930	0.089	0.011
4	0.72	9.28	326.70	0.442	5.800	0.076	0.018
5	0.77	12.53	341.35	0.418	1.655	0.252	0.005
6	0.53	9.67	271.53	0.200	3.727	0.054	0.014
7	0.65	11.25	286.18	0.330	4.524	0.073	0.016
8	0.60	8.59	327.56	0.357	2.452	0.146	0.007
9	0.57	12.14	313.77	0.350	3.727	0.094	0.012
10	0.81	11.35	302.56	0.442	4.524	0.098	0.015
ISO							
1	7.41	14.31	260.32	0.636	10.263	0.062	0.039
2	3.60	15.20	280.15	0.555	7.394	0.075	0.026
3	5.98	15.79	255.15	0.555	8.669	0.064	0.034
4	5.02	14.01	273.25	0.502	8.590	0.058	0.031
5	8.33	14.84	248.26	0.584	8.590	0.068	0.035
6	3.87	15.39	297.39	0.627	7.394	0.085	0.025
7	4.65	14.70	241.36	0.496	8.988	0.055	0.037
8	5.01	15.59	266.36	0.555	8.191	0.068	0.031
9	3.78	14.84	239.64	0.487	6.915	0.070	0.029
10	2.49	13.72	251.70		10.901		0.043
ISO+CAPE							
1	4.18	11.15	306.01	0.402	4.68	0.0858	0.015
2	5.89	12.63	293.94	0.484	6.92	0.0700	0.024
3	4.79	11.94	267.22	0.316	12.18	0.0260	0.046
4	3.87	9.37	317.22	0.368	9.78	0.0376	0.031
5	3.36	11.94	277.56	0.366	9.31	0.0393	0.034
6	6.49	12.43	257.74	0.19	9.63	0.0197	0.037
7	1.84	10.46	312.04	0.368	14.25	0.0258	0.046
8	2.30	12.14	299.98	0.418	7.39	0.0565	0.025
9	3.18	11.74	281.87	0.396	5.80	0.0683	0.021
10	4.44	10.07	262.05	0.368	11.54	0.0319	0.044

CAPE: Kafeik asit fenetil ester; **ISO:** İsoproterenol; **TnI:** Troponin I; **ADMA:** Asimetrik dimetilarginin; **NO:** Nitrik oksit.

Tablo 6. Sıçan gruplarının ilk ve son ağırlıklarının karşılaştırılması

GRUP	n	İlk ağırlık (g) ort±SD	Son ağırlık (g) ort±SD
Kontrol	10	261.70±8.43	266.40±8.63
CAPE	10	261.00±9.40	266.00±9.18
ISO	10	261.30±9.63	266.10±7.42
ISO+CAPE	10	261.70±9.59	266.10±8.76
p		0.995	0.998

CAPE: Kafeik asit fenetil ester; **ISO:** İsoproterenol.
İstatiksel değerlendirme Kruskal-Wallis testi ile yapıldı.

Sıçan gruplarının serum troponin I, arginaz ve ornitin ortalamaları Tablo 7'de görülmektedir. Sıçanların serum TnI düzeyleri ortalaması kontrol grubunda 0.64±0.07 ng/mL, CAPE grubunda 0.65±0.089 ng/mL, ISO grubunda 5.01±1.79 ng/mL ve ISO+CAPE grubunda 4.03 ±1.46 ng/mL olarak bulundu. Kontrol grubunun ve CAPE grubunun serum TnI düzeyleri, ISO grubundan (her ikisi için $p<0.001$) ve ISO+CAPE grubundan (her ikisi için $p<0.01$) anlamlı olarak daha düşüktü. Kontrol grubu ile CAPE grubu arasında ve ISO grubu ile ISO+CAPE grubu arasında serum TnI düzeyleri bakımından istatiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).

Sıçanların serum arginaz ortalaması, kontrol grubunda 11.06±1.13 U/L, CAPE grubunda 11.01±1.49 U/L, ISO grubunda 14.84±0.67 U/L ve ISO+CAPE grubunda 11.39± 1.08 U/L olarak bulundu. Kontrol grubu, CAPE grubu ve ISO+CAPE grubunun serum arginaz ortalaması ISO grubundan anlamlı olarak düşük saptandı (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.01$ ve $p<0.01$). Kontrol grubu, CAPE grubu ve ISO+CAPE grubu arasında serum arginaz ortalamaları bakımından istatiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).

Sıçanların serum ornitin düzeyleri ortalaması kontrol grubunda 208.13±21.92 µmol/L, CAPE grubunda 308.77±24.24 µmol/L, ISO grubunda 261.36±18.23 µmol/L ve ISO+CAPE grubunda 287.56±21.34 µmol/L olarak bulundu. Kontrol grubunun serum ornitin düzeyleri, CAPE grubundan ve ISO+CAPE grubundan anlamlı olarak daha düşüktü (her ikisi için $p<0.001$). CAPE grubunun serum ornitin düzeyleri, ISO grubundan anlamlı olarak daha yüksekti ($p<0.05$). ISO+CAPE grubunun serum ornitin düzeyleri, ISO grubundan ve CAPE grubundan farksız bulundu ($p>0.05$). Kontrol grubu ile ISO grubu arasında serum ornitin düzeyleri bakımından da anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).

Tablo 7. Sıçan gruplarının serum troponin I, arginaz ve ornitin ortalamalarının karşılaştırılması

GRUP	n	TnI (ng/mL) (ort±SD)	Arginaz (U/L) (ort±SD)	Ornitin (µmol/L) (ort±SD)
Kontrol	10	0.64±0.07 ^{a***} ^{b**}	11.06±1.13 ^{a***}	208.13±21.92 ^{b***}^{c***}
CAPE	10	0.65±0.089 ^{a***}^{b**}	11.01±1.49 ^{a**}	308.77±24.24 ^{a*}
ISO	10	5.01±1.79	14.84±0.67	261.36±18.23
ISO+CAPE	10	4.03±1.46	11.39±1.08 ^{a**}	287.56±21.34
p		0.000	0.000	0.000

CAPE: Kafeik asit fenetil ester; **ISO:** İsoproterenol; **TnI:** Troponin I.
İstatiksel değerlendirme Kruskal-Wallis testi ile yapıldı.
a: ISO grubu ile karşılaştırıldı.
b: ISO+CAPE grubu ile karşılaştırıldı.
c: CAPE grubu ile karşılaştırıldı.
*: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$.

Sıçan gruplarının serum ADMA ve NO ortalamaları Tablo 8'de görülmektedir. Sıçanların serum ADMA düzeyleri kontrol grubunda 0.34±0.05 µmol/L, CAPE grubunda 0.35±0.07 µmol/L, ISO grubunda 0.56±0.05 µmol/L ve ISO+CAPE grubunda 0,37±0.08 µmol/L olarak bulundu. ISO grubunun serum ADMA düzeyleri, kontrol grubundan, CAPE grubundan ve ISO+CAPE grubundan daha yüksekti (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.01$ ve $p<0.05$). Kontrol grubu, CAPE grubu ve ISO+CAPE grubu arasında serum ADMA düzeyleri bakımından anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).

Sıçanların serum nitrik oksit düzeyleri kontrol grubunda 3.82±1.47 µmol/L, CAPE grubunda 3.84±1.23 µmol/L, ISO grubunda 8.59±1.25 µmol/L ve ISO+CAPE grubunda 9.15±2.99 µmol/L olarak bulundu. Kontrol grubunun ve CAPE grubunun serum nitrik oksit düzeyleri, ISO grubundan ve ISO+CAPE grubundan anlamlı olarak daha düşüktü (tümü için $p<0.01$). Kontrol grubu ile CAPE grubu arasında ve ISO grubu ile ISO+CAPE grubu arasında serum nitrik oksit düzeyleri bakımından istatiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).

Tablo 8. Sıçan gruplarının serum asimetrik dimetilarginin ve nitrik oksit ortalamalarının karşılaştırılması

GRUP	ADMA (µmol/L) (ort±SD)	NO (µmol/L) (ort±SD)
Kontrol	0.34±0.05 ^{a***} (n=10)	3.82±1.47 ^{a**b**} (n=10)
CAPE	0.35 ± 0.07 ^{a**} (n=10)	3.84 ± 1.23 ^{a**b**} (n=10)
ISO	0.56±0.05 (n=9)	8.59±1.25 (n=10)
ISO+CAPE	0.37±08 ^{a*} (n=10)	9.15±2.99 (n=10)
p	0.000	0.000

CAPE: Kafeik asit fenetil ester; **ISO:** İsoproterenol; **ADMA:** Asimetrik dimetilarginin; **NO:** Nitrik oksit.
İstatiksel değerlendirme Kruskal-Wallis testi ile yapıldı.
a: ISO grubu ile karşılaştırıldı.
b: ISO+CAPE grubu ile karşılaştırıldı.
*: $p<0.05$, **: $p<0.01$ ***: $p<0.001$.

Sıçan gruplarının serum ADMA/NO ve NO/ornitin ortalamaları Tablo 9'da görülmektedir. Sıçanların ADMA/NO ortalamaları kontrol grubunda 0.103±0.050, CAPE grubunda 0.104±0.057, ISO grubunda 0.067±0.008 ve ISO+CAPE grubunda 0.046±0.022 olarak bulundu. Kontrol grubunun ve CAPE grubunun serum ADMA/NO değerleri, ISO+CAPE grubundan anlamlı olarak daha yüksek (her ikisi için $p<0.01$), ISO grubundan ise farksızdı ($p>0.05$). Kontrol grubu ile CAPE grubu arasında ve ISO grubu ile ISO+CAPE grubu arasında serum ADMA/NO değerleri bakımından anlamlı fark yoktu ($p>0.05$) .

Sıçanların NO/ornitin ortalamaları kontrol grubunda 0.019±0.007, CAPE grubunda 0.013±0.003, ISO grubunda 0.033±0.005 ve ISO+CAPE grubunda 0.032±0.010 olarak bulundu. Kontrol grubunun NO/ornitin değerleri, ISO grubundan anlamlı alarak düşüktü ($p<0.05$). CAPE grubunun NO/ornitin değerleri, ISO grubundan ve ISO+CAPE grubundan anlamlı olarak daha düşüktü (sırasıyla $p<0.001$ ve $p<0.01$). Kontrol grubu ile CAPE grubu arasında ve kontrol grubu ile ISO+CAPE grubu arasında NO/ornitin değerleri bakımından istatiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0.05$). ISO grubu ile ISO+CAPE grubu arasında NO/ornitin değerleri bakımından istatiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).

Tablo 9. Sıçan gruplarının serum asimetrik dimetilarginin/nitrik oksit ve nitrik oksit/ornitin ortalamalarının karşılaştırılması

GRUP	ADMA/NO (ort±SD)	NO/ornitin (ort±SD)
Kontrol	$0.103\pm0.050^{b**}$ (n=10)	$0.019\pm0.007^{a*}$ (n=10)
CAPE	$0.104\pm0.057^{b**}$ (n=10)	$0.013\pm0.003^{a***b**}$ (n=10)
ISO	0.067±0.008 (n=9)	0.033±0.005 (n=10)
ISO+CAPE	0.046±0.022 (n=10)	0.032±0.010 (n=10)
p	0.001	0.000

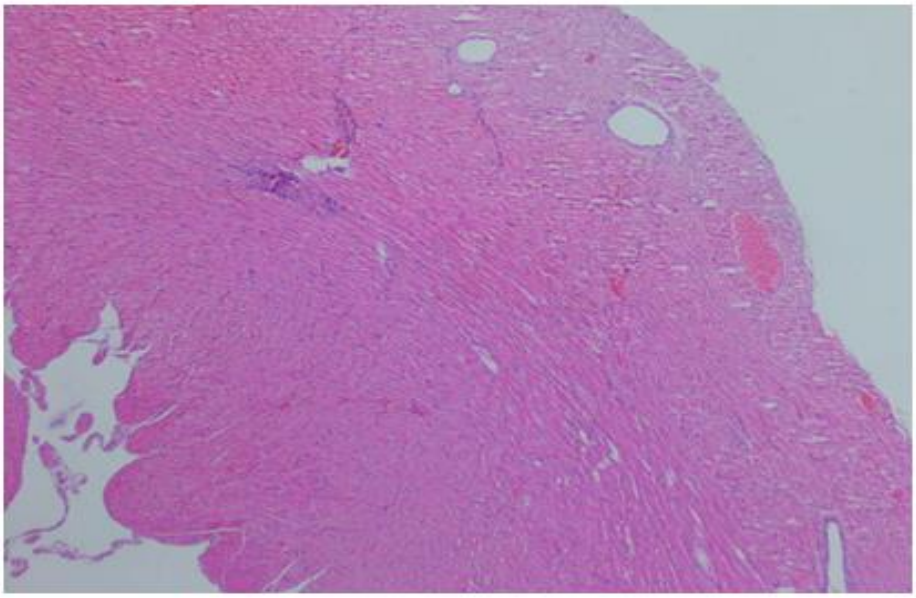
CAPE: Kafeik asit fenetil ester; **ISO:** İsoproterenol; **ADMA:** Asimetrik dimetilarginin; **NO:** Nitrik oksit.
İstatiksel değerlendirme Kruskal-Wallis testi ile yapıldı.
a: ISO grubu ile karşılaştırıldı
b: ISO+CAPE grubu ile karşılaştırıldı.
*:$p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$.

Sıçanların kalp dokularının histopatolojik olarak incelenmesi sonucunda, kontrol grubuna (Şekil 10, 11, 12 ve 13) ve CAPE grubuna ait (Şekil 14, 15, 16 ve 17) miyokart dokularında herhangi bir fibrotik değişiklik saptanmadı.

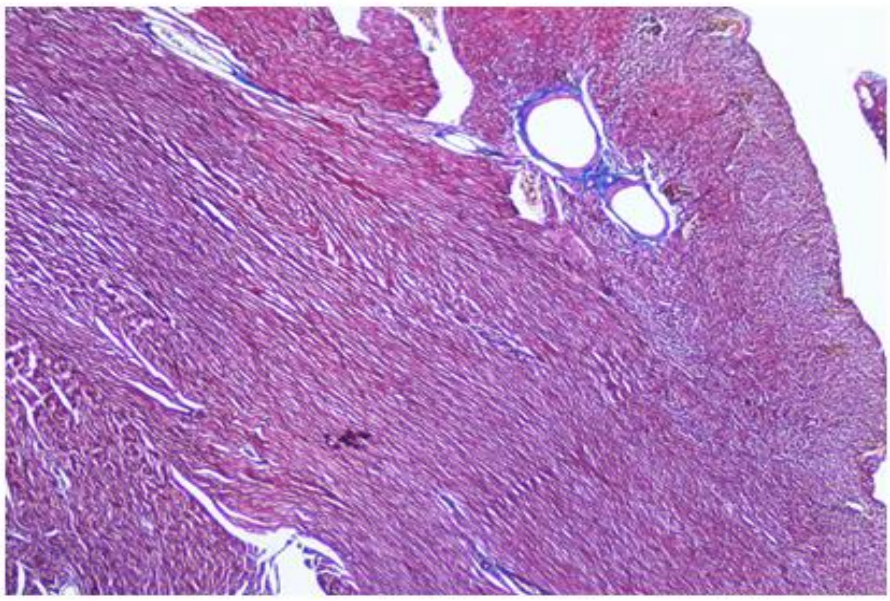
ISO grubunda; miyokart lifleri arasında miksoid değişikliklerin eşlik ettiği şiddetli akut inflamasyon, miyokart lifleri arasında yaygın olarak miksoid alanlar ve beraberinde hafif dereceli fibrozis saptandı (Şekil 18, 19, 20 ve 21).

ISO+CAPE grubunda ise miyokart lifleri arasında hafif-orta dereceli miksoid değişikliklerin eşlik ettiği hafif-orta dereceli inflamasyon ve özellikle endokartta ve periarteriolar alanda belirginleşen hafif dereceli fibrozis görüldü (Şekil 22, 23, 24 ve 25).

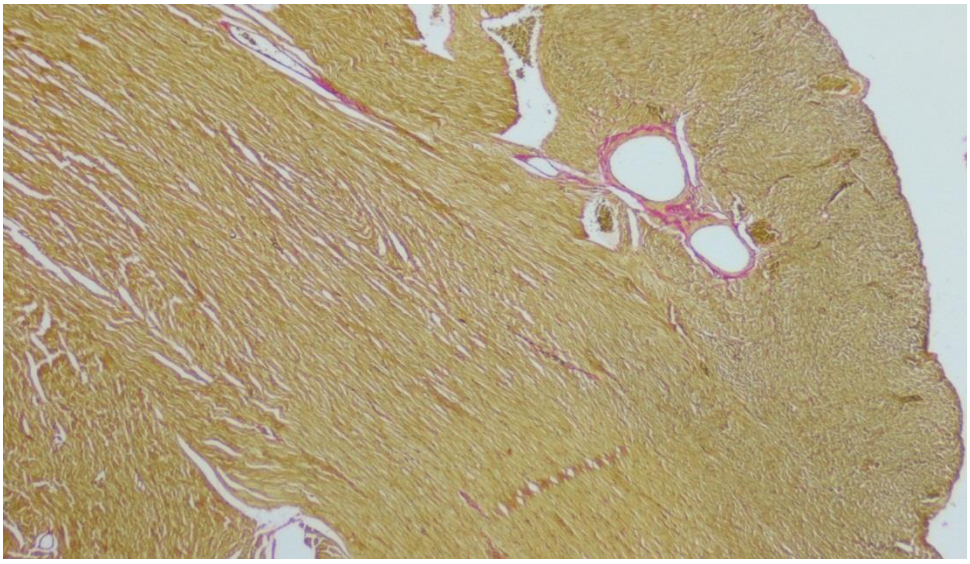
Ayrıca kalp kas lifleri arasındaki nötrofil lökosit infiltrasyonu, kalp kasındaki miksoid değişiklikler ve fibrozis değerleri, semikantitatif olarak 0 ile 3 arasında (0; yok, 1; hafif dereceli, 2; orta dereceli, 3; şiddetli) skorlanarak değerlendirildi (Tablo 10, 11 ve 12).



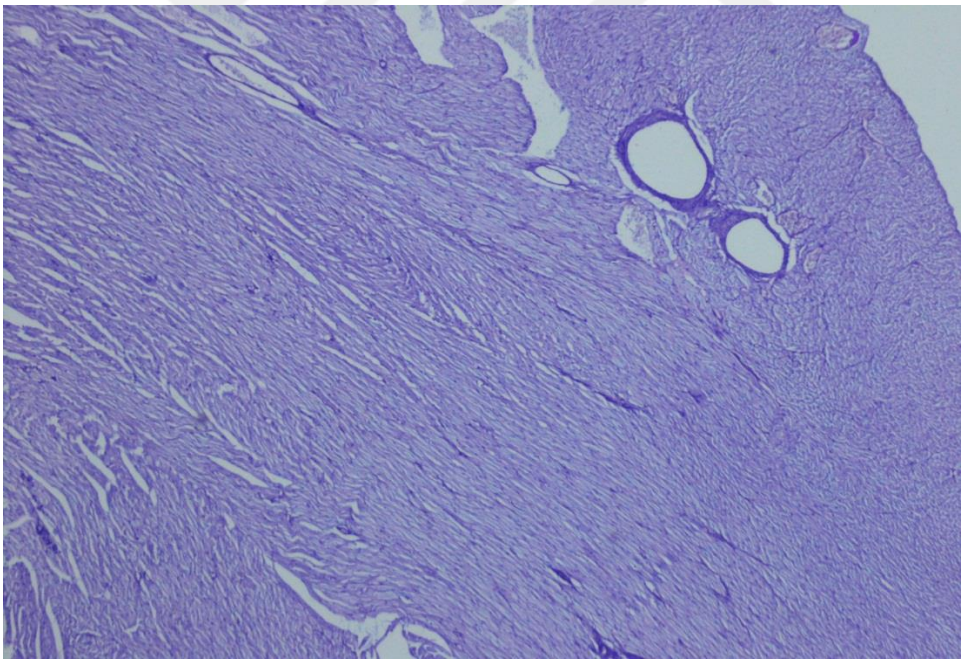
Şekil 10. Kontrol grubunda kalp dokusunda düzenli yapı (Hematoksilen-eozin, X40)



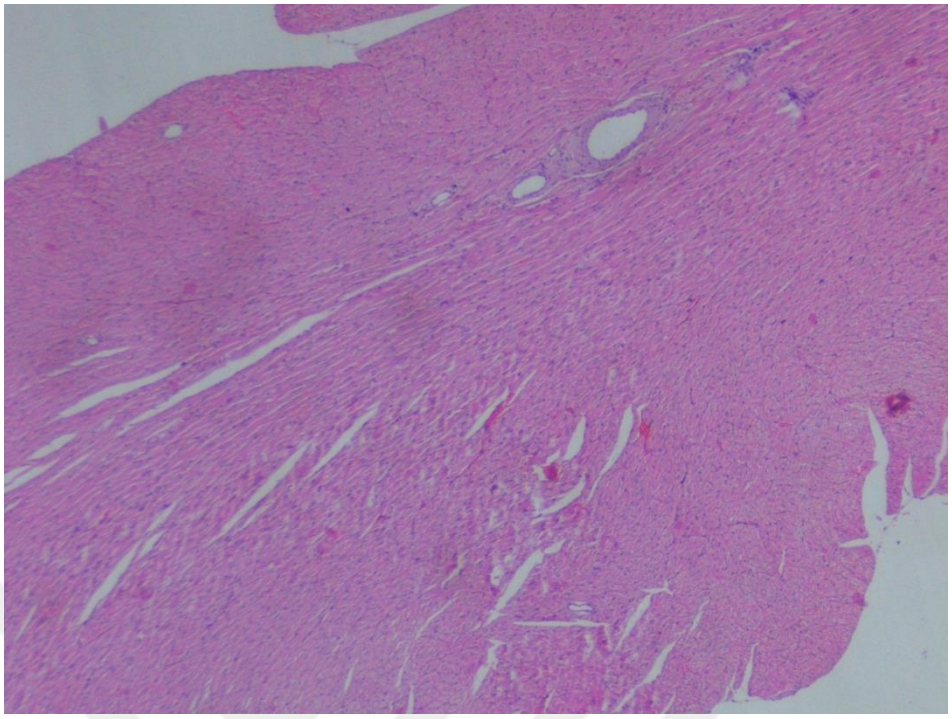
Şekil 11. Kontrol grubunda kalp dokusunda düzenli yapı (Masson's Trichrome, X100)



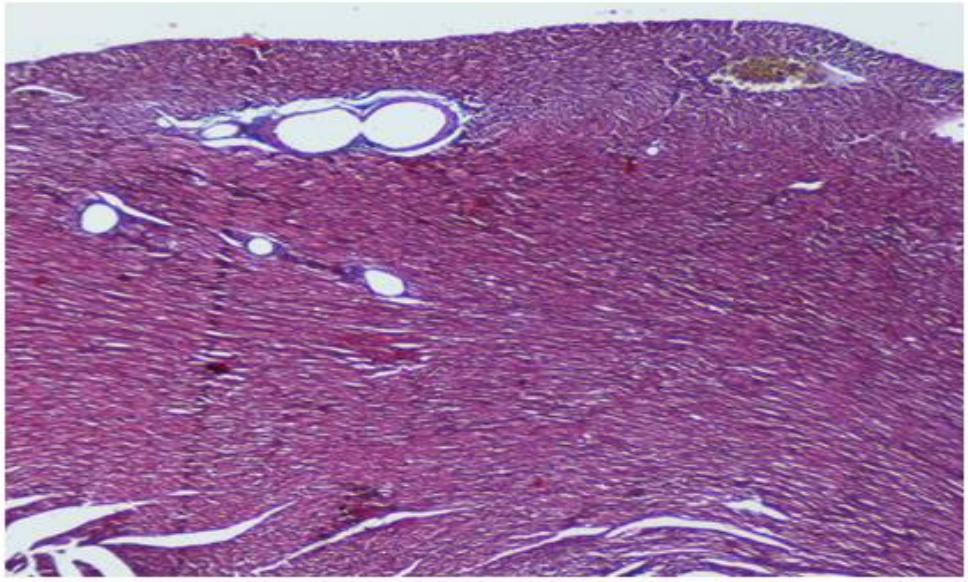
Şekil 12. Kontrol grubunda kalp dokusunda düzenli yapı (Van Gieson, X100)



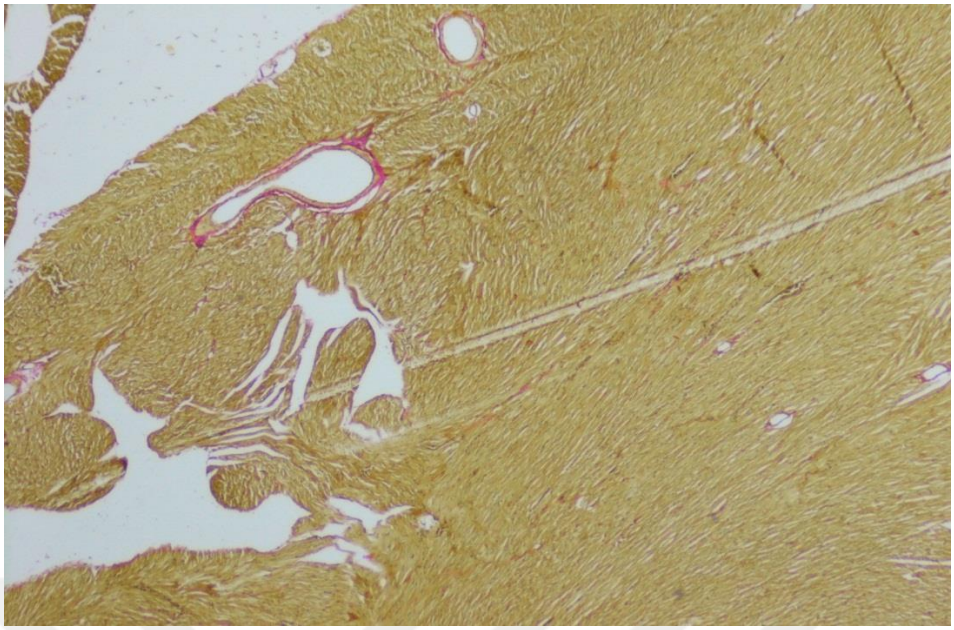
Şekil 13. Kontrol grubunda kalp dokusunda düzenli yapı (PAS-Alcian blue, X100)



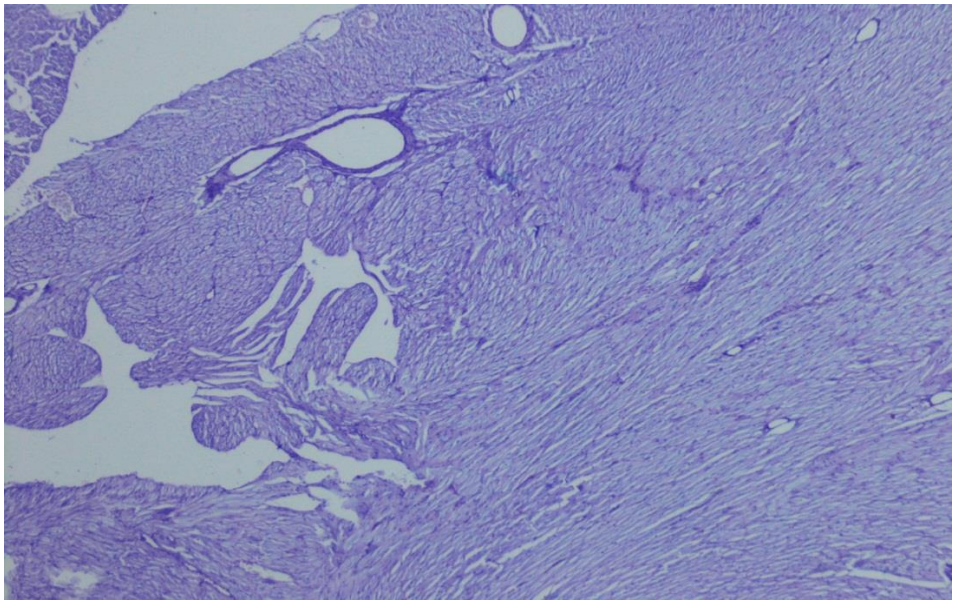
Şekil 14. Kafeik asit fenetil ester grubunda kalp dokusunda düzenli yapı (Hematoksilen-eozin, X40)



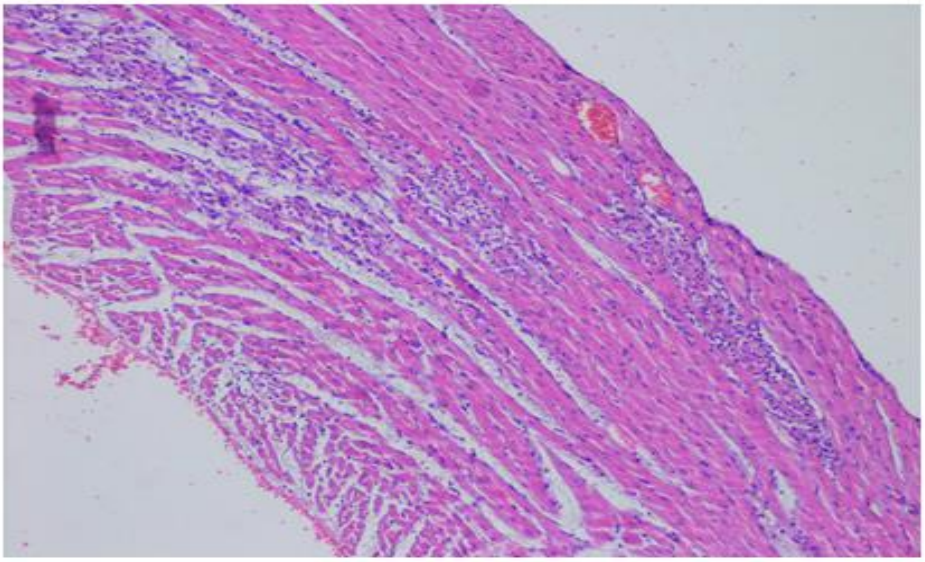
Şekil 15. Kafeik asit fenetil ester grubunda kalp dokusunda düzenli yapı (Masson's Trichrome, X100)



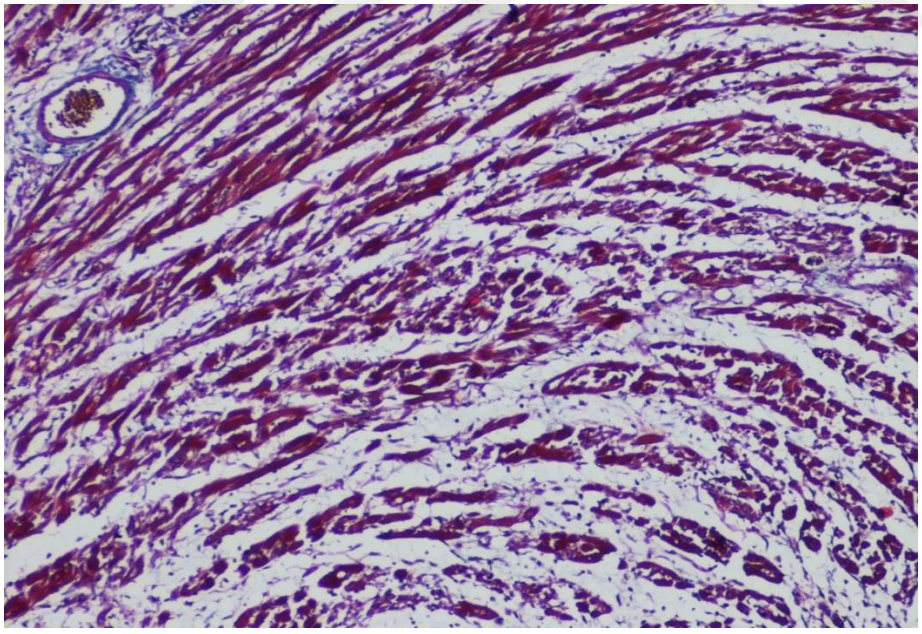
Şekil 16. Kafeik asit fenetil ester grubunda kalp dokusunda düzenli yapı (Van Gieson, X100)



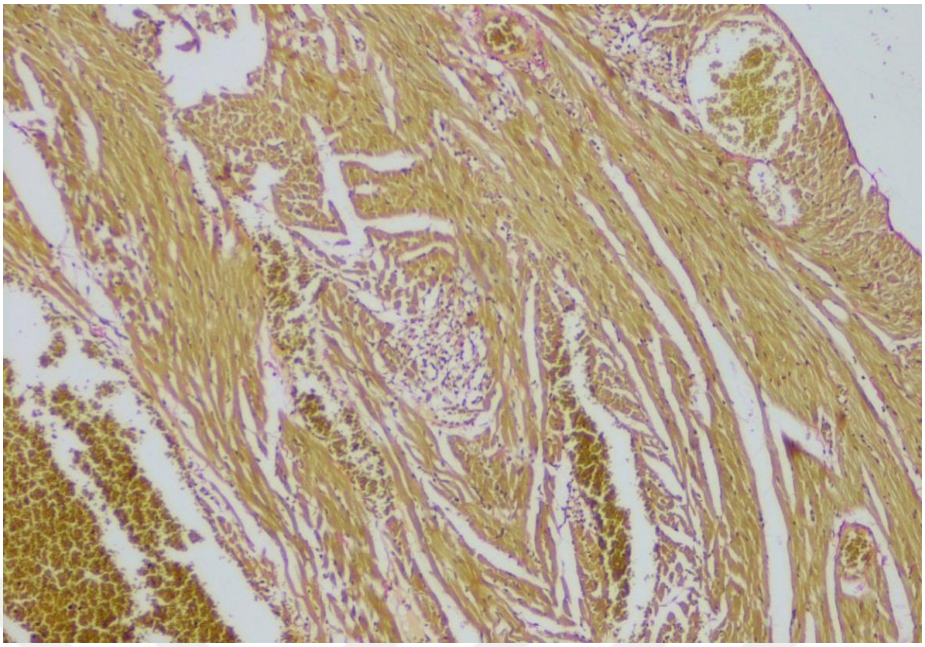
Şekil 17. Kafeik asit fenetil ester grubunda kalp dokusunda düzenli yapı (PAS-Alcian blue, X100)



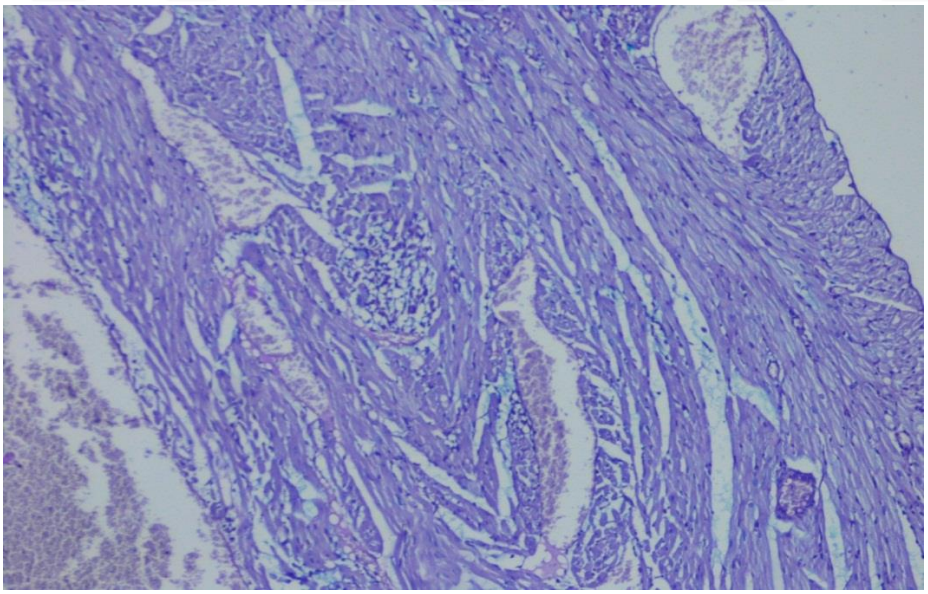
Şekil 18. İsoproterenol grubunda miyokart lifleri arasında miksoid değişikliklerin eşlik ettiği şiddetli akut inflamasyon (Hematoksilen-eozin, X40)



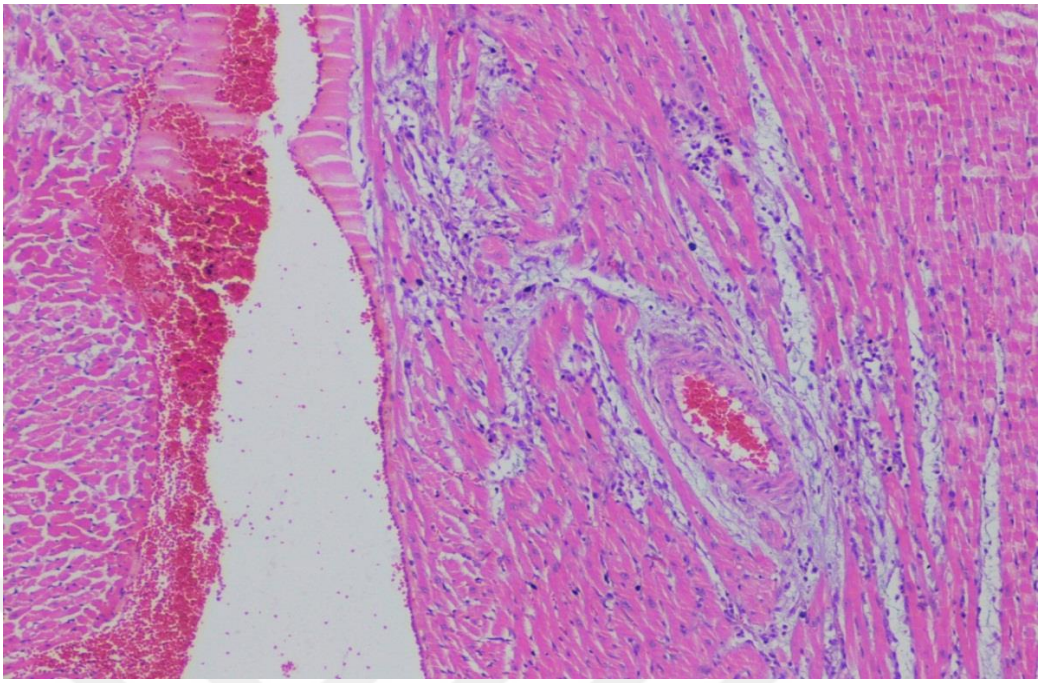
Şekil 19. İsoproterenol grubunda miyokart lifleri arasında yaygın olarak miksoid alanlar beraberinde gözlenen hafif dereceli fibrozis (Masson'sTrikrome, X100)



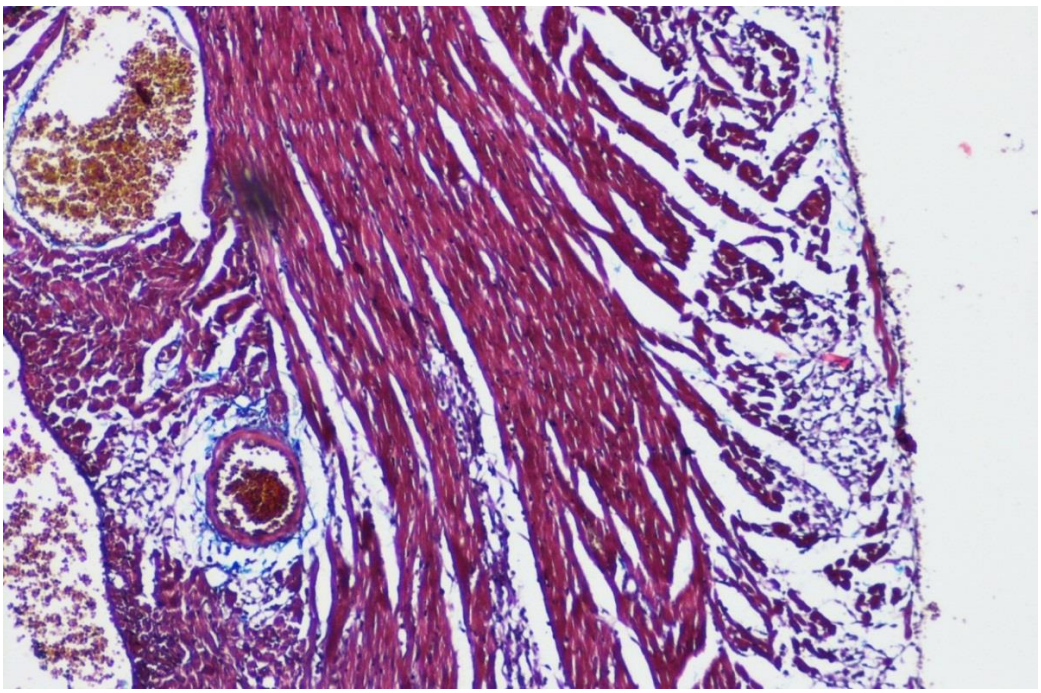
Şekil 20. İsoproterenol grubunda miyokart lifleri arasında yaygın olarak miksoid alanlar beraberinde gözlenen hafif dereceli fibrozis (Van Gieson, X100)



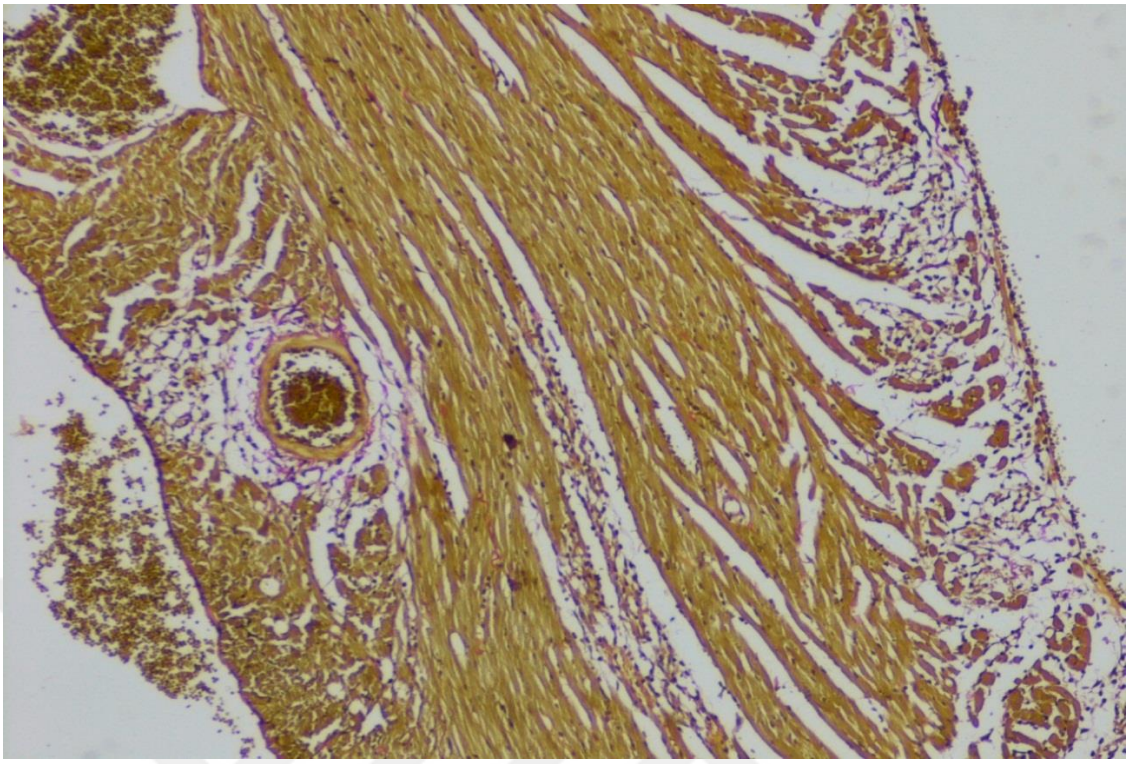
Şekil 21. İsoproterenol grubunda miyokart lifleri arasında yaygın olarak inflamasyon eşliğinde izlenen miksoid dejenerasyon (PAS- Alcian Blue, X100)



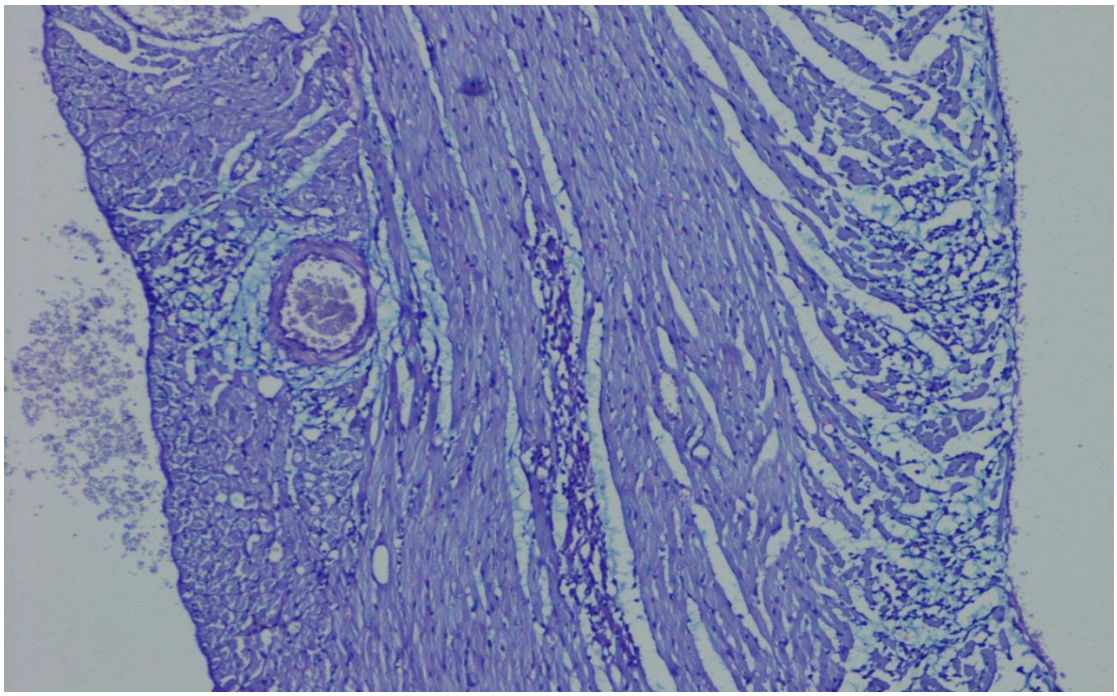
Şekil 22. İsoproterenol+kafeik asit fenetil ester grubunda miyokart lifleri arasında hafif-orta dereceli miksoid değişikliklerin eşlik ettiği hafif-orta dereceli inflamasyon (Hematoksilen-eozin, X40)



Şekil 23. İsoproterenol+kafeik asit fenetil ester grubunda miyokart lifleri arasında özellikle endokartta ve periarteriolar alanda belirginleşen hafif dereceli fibrozis (Masson'sTrikrome, X100)



Şekil 24. İsoproterenol+kafeik asit fenetil ester grubunda miyokart lifleri arasında özellikle endokartta ve periarteriolar alanda belirginleşen hafif dereceli fibrozis (Van Gieson, X100)



Şekil 25. İsoproterenol+kafeik asit fenetil ester grubunda miyokart lifleri arasında özellikle subendokardial ve periarteriolar alanda belirginleşen orta dereceli miksoid değişiklik (PAS-Alcianblue, X100)

Tablo 10. Kalp kasının mikroskopik değerlendirme kriterleri

Skor	Fibrosiz	Müsinöz Dejenerasyon	Akut inflamasyon
0	Yok	Yok	Yok
1	Hafif dereceli	Hafif dereceli	Hafif dereceli
2	Orta dereceli	Orta dereceli	Orta dereceli
3	Şiddetli	Şiddetli	Şiddetli

Tablo 11. İsoproterenol grubunda kalp kasının mikroskopik skorlarının dağılım yüzdeleri

Skor	Fibrosiz (n=10)	Müsinöz Dejenerasyon (n=10)	Akut inflamasyon (n=10)
0	% 10	yok	yok
1	% 90	yok	yok
2	yok	% 30	% 20
3	yok	% 70	% 80

Tablo 12. İsoproterenol+kafeik asit fenetil ester grubunda kalp kasının mikroskopik skorlarının dağılım yüzdeleri

Skor	Fibrosiz (n= 10)	Müsinöz Dejenerasyon (n=10)	Akut inflamasyon (n=10)
0	% 30	yok	yok
1	% 70	% 10	% 10
2	yok	% 70	% 40
3	yok	% 20	% 50

TARTIŞMA

Dünyada ve ülkemizde ölüm nedenleri arasında birinci sırada yer alan (1) akut miyokart infarktüsü; genellikle koroner arterlerde akut trombotik daralma nedeniyle oluşan, uzamış iskemi ile birlikte geri dönüşümsüz kalp dokusu hasarıdır (2). Ateroskleroz, miyokart infarktüsünün patogenezinde yer alan önemli bir faktördür (35). Aterosklerozun patogenezinde yer alan çeşitli faktörler arasında oksidatif stres ve buna bağlı LDL oksidasyonu ve lipit peroksidasyonu önemli rol oynar (30,35).

Son yıllarda aterosklerozun önlenmesinde antioksidanların rolü ile ilgili çalışmalar artmıştır (66). LDL'nin oksidasyondan korunması, başlıca endojen antioksidanlar tarafından sağlanır (65,68). Antioksidanlar, aterosklerozu önlemek için direkt olarak LDL'ye ya da indirekt olarak hücresel oksidatif mekanizmalara etki ederler (66,68).

Bitkilerin çiçek, yaprak ve tomurcuklarından bal arıları tarafından toplanan, güzel kokulu, reçinemsi madde olarak bilinen propolisin antienflamatuar, immünmodülatör ve antioksidan gibi çeşitli etkilere sahip olduğu ve miyokart hasarını önleyebileceği ileri sürülmüştür (21,22). Bu etkilerin çoğunun propolisin etkin maddelerinden biri olan CAPE'ye bağlı olduğu gösterilmiştir (23).

Deneysel miyokart infarktüsü oluşturmak için yaygın olarak kullanılan ISO, β1 ve β2 adrenerjik reseptörlere etkili non-selektif sentetik katekolamin analoğudur (26). Yüksek dozdaki ISO'nun oluşturduğu miyokardiyal hasar, insanlardaki miyokart infarktüsüne benzer değişikliklere yol açmaktadır (29).

Çalışmamızda ISO ile miyokart infarktüsü oluşturulmuş sıçanlarda antioksidan etkiye sahip CAPE'nin serum arginin metabolizmasına etkisini araştırmak amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, ISO ile oluşturulan deneysel miyokart infarktüsü modelinde, kalp dokusundaki hasarı gösterebilmek için serum TnI düzeylerini ölçtük. Literatürde ISO ile oluşturulan deneysel miyokart infarktüsü modelinde, serum TnI düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (19,91). Çalışmamızda da ISO ve ISO+CAPE gruplarındaki sıçanların serum TnI düzeyleri, kontrol ve CAPE grubundaki sıçanlara göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Histopatolojik inceleme sonucu, kontrol ve CAPE gruplarındaki sıçanların kalp dokularında herhangi bir fibrotik değişiklik saptanmazken, ISO ve ISO+CAPE gruplarındaki sıçanların kalp dokularında inflamasyon ve fibrotik değişiklikler görüldü.

Literatürde, gerek iskemi/reperfüzyon modelinde, gerekse ISO ile oluşturulan deneysel miyokart infarktüs modelinde, CAPE tedavisinin serum TnI düzeylerindeki artışı önlediği bildirilmiştir (29,91). CAPE'nin kardiyoprotektif etkisinin, serbest oksijen radikallerini toplayıcı ve lipit peroksidasyonunu inhibe edici fonksiyonundan kaynaklandığı ileri sürülmüştür (29).

Çalışmamızda ise ISO+CAPE grubunun serum TnI düzeyleri, ISO grubuna göre daha düşük olmasına rağmen, istatiksel olarak anlamlı değildi. ISO grubu ile ISO+CAPE grubu arasında serum TnI düzeyleri bakımından istatistiksel bir fark bulunamamış olması, kullanılan CAPE dozu, uygulama yolu ve uygulama süresinin farklılığından kaynaklanmış olabilir. Bununla birlikte ISO grubundaki sıçanların kalp dokularındaki inflamasyon ve fibrotik değişiklikler, ISO+CAPE grubuna göre daha belirgindi.

Tratsiakovch ve ark. (16) iskemi/reperfüzyon modelinin, kalp dokusunda arginaz aktivitesinde bir artışa neden olduğunu göstermişlerdir. Jung ve ark. (64) ise iskemi/reperfüzyonda arginaz 1 ekspresyonunun arttığını kanıtlamışlardır. Literatürde, ISO ile oluşturulan miyokart infarktüs modelinde serum arginaz aktivitesini inceleyen bir çalışmaya rastlayamadık.

Propolis türevlerinin serum arginaz aktivitesine etkisiyle ilgili literatürde farklı görüşler bulunmaktadır. Zhai ve ark. (97) bir propolis türevi olan ekinezyanın serum arginaz aktivitesini arttırdığını ileri sürmüşlerdir. Kafeik asit ve sinnamid gibi bazı propolis türevlerinin ise arginazı inhibe ettiği ileri sürülmüştür (25,98).

Daha önceki çalışmalarla uyumlu olarak çalışmamızda ISO verilişi serum arginaz aktivitesinde anlamlı bir artışa neden oldu (99,100). ISO ile miyokart infarktüsü oluşturulan sıçanlara CAPE verilişi ise serum arginaz aktivitesindeki bu artışı önledi. Sağlıklı grupta CAPE, serum arginaz aktivitesini değiştirmedi.

Bernard ve ark. (99) ISO gibi katekolaminlerin, makrofajlarda, β-adrenoreseptör aktivasyonu aracılığıyla makrofaj arginaz aktivitesini artırdığını kanıtlamışlardır. Yapılan in vitro çalışmalarda makrofaj arginaz aktivitesinin ve ekspresyonunun lipopolisakkaritler, okside LDL, trombin, sitokinler ve cAMP analogları tarafından artırıldığı gösterilmiştir (10). Diğer yandan koroner arter tıkanması ile iskemik miyokartta adrenerjik reseptör sayısının arttığı ve adenilat siklaz aktivasyonu ile birlikte cAMP konsantrasyonlarında bir artışın başladığı da bilinmektedir (101,102). Dolayısıyla ISO ile miyokart infarktüsü oluşturulan sıçanların serum arginaz aktivitesinde gözlediğimiz artıştan adenilat siklaz aktivasyonu sorumlu olabilir.

Flavon, chrysin ve apigenin gibi flavonoidlerin, siklooksijenaz yolunu baskılayarak trombosit agregasyonunu inhibe ettikleri, bir kısmının ise adenilat siklaz inhibisyonu aracılığıyla prostoglandin I2'ye yanıtı azalttıkları gösterilmiştir. Myricetin ve quercetin gibi flavonoidlerin ise başlıca lipoksijenaz aktivitesini inhibe ettikleri ve prostoglandin I2 aracılıklı trombosit cAMP artışını uyardıkları gösterilmiştir. Bu flavonoidlerin antiagregan etkileri için fosfodiesteraz aktivitesinin inhibisyonu aracılığı ile trombosit cAMP metabolizmasının modifikasyonu olası mekanizma olarak ileri sürülmüştür (103).

Arginaz inhibitörleri tarafından arginaz ekspresyonunun baskılanmasının iskemi/reperfüzyonda kardiyoprotektif etkiye aracılık ettiği kanıtlanmıştır (64). İskemi reperfüzyon modelinde arginaz inhibisyonu ile endotel disfonksiyonunu önlendiği ve infarkt hacminin küçüldüğü gösterilmiştir (104).

Çalışmamızda ISO ile miyokart infarktüsü oluşturulan sıçanlarda CAPE verilişiyle serum arginaz aktivitesindeki artışın önlenmesinden adenilat siklaz inhibisyonu sorumlu olabilir.

Ornitin, üre siklusunun son enzimi olan arginaz tarafından L-argininin hidrolizi sonucu oluşur. L- Arginin ayrıca NOS tarafından sitrullin ve NO'ya da dönüştürülebilir (5). Hem arginaz hem de NOS enzimlerinin ortak substratı olan L-arginin için bu iki enzim arasında yarışma söz konusudur (105).

Literatürde ISO'nun serum ornitin düzeylerine etkisini inceleyen sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Giordano ve ark. (106) ISO'nun ODC ekspresyonunda bir artışa ve buna bağlı olarak doku ornitin düzeylerinde bir azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir. Tipnis ve ark. (107) da ISO'nun sıçanlarda ODC aktivitesini artırdığını göstermişlerdir. Çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sağlıklı sıçanlara ISO verilişi ile serum ornitin düzeylerinde bir artma eğilimi görüldü. ISO'nun arginaz aktivitesini artırdığı bilinmektedir

(100). Bu nedenle arginaz aktivitesindeki artışın ornitin düzeylerinde de bir artışa neden olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Literatürde CAPE'nin serum ornitin düzeylerine etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlayamadık. Bununla birlikte böbrek iskemi/reperfüzyona maruz kalan sıçanların böbrek dokusu ornitin düzeylerinde bir değişiklik olmadığı ancak antioksidan tedavisinin doku ornitin düzeylerini artırdığı ileri sürülmüştür (108). Lin ve ark. (109) ISO ile kardiyak hipertrofi oluşturulan sıçanlara verilen antioksidan difloromet ilornitinin, ODC aktivasyonunu ve ekspresyonunu inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda ISO ile miyokart infarktüsü oluşturulan sıçanlara CAPE verilişi ile serum ornitin düzeyleri değişmedi. Sağlıklı sıçanlarda CAPE, serum ornitin düzeylerinde anlamlı bir artışa neden oldu. Çalışmamızda sağlıklı sıçanlara CAPE verilişi ile serum ornitin düzeylerinde gözlenen artıştan ODC enziminin inhibisyonu sorumlu olabilir. Çünkü ODC'nin CAPE tarafından inhibe edildiği bildirilmiştir (87).

İsoproterenol ile oluşturulan deneysel miyokart infarktüsü modelinde serum ADMA düzeylerinin arttığı, antioksidan kullanımı ile bu artışın önlendiği gösterilmiştir (18,19). Literatürde ISO ile oluşturulan deneysel miyokart infarktüsü modelinde CAPE'nin serum ADMA üzerine etkisini inceleyen çalışmaya rastlayamadık. Bununla birlikte Karadağ ve ark. (110) hipertiroidili sıçanlara verilen CAPE tedavisinin plazma ADMA seviyesini düşürdüğünü bildirmişlerdir. Çalışmamızda ISO verilişi sıçanların serum ADMA düzeylerinde anlamlı bir artışa neden oldu. ISO ile miyokart infarktüsü oluşturulan sıçanlara CAPE verilişi ise serum ADMA düzeylerindeki bu artışı önledi. Sağlıklı grupta CAPE, serum ADMA düzeylerini değiştirmedi.

İsoproterenolun, ADMA sentezinde rol oynayan PRMT1 gen ekspresyonunu artırarak, oysa ADMA yıkılımında rol oynayan DDAH2 enzimin ekspresyonunu azaltarak serum ADMA düzeylerinde bir artışa yol açtığı ileri sürülmüştür (18,19). Oksidatif veya nitrozatif stresin DDAH aktivitesinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (60,111). ISO ile miyokart infarktüsü oluşturulan sıçanlarda antioksidan matrin veya oksimatrin verilişinin DDAH ekspresyonunda bir artışa, böylece ADMA düzeylerinde bir azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (18,19).

Parlakpınar ve ark. (89) miyokart iskemi/reperfüzyon modelinde CAPE'nin süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini arttırdığını ve bu yolla miyokart hücrelerini oksidatif stresten koruduğunu göstermişlerdir. Oksidatif stresin azalması, DDAH aktivasyonunun ve dolayısıyla ADMA yıkılımının artmasına neden olur (56).

Çalışmamızda ISO ile miyokart infarktüsü oluşturulan sıçanlarda CAPE verilişi ile serum ADMA düzeylerindeki artışın önlenmesinde, ADMA yıkılımındaki artış sorumlu olabilir.

Asimetrik dimetilarginin, L-arginin ile yarışarak NOS'u inhibe ettiğinden (9), artmış ADMA düzeyleri, arginaz tarafından L-arginin kullanımının artmasına yol açabilir. İskemi/reperfüzyonda arginaz ekspresyonunun arttığı, NO seviyesinin ise azaldığı bildirilmiştir (112). Artan arginaz aktivitesinin endotel disfonksiyonunda ve arteriyel hasarda rol oynadığı gösterilmiştir (10). NOS inhibitörü olan ADMA'nın endotelyal disfonksiyonda rol oynayabileceği ve yüksek ADMA düzeylerinin akut koroner olaylarda ve kronik böbrek yetmezliğinde kardiyovasküler mortalite için bir belirteç olabileceği ileri sürülmüştür (111).

Nitrik oksit, L-argininden NOS tarafından sentezlenen güçlü endojen vazodilatördür (8). Desrois ve ark. (113) ISO ile miyokart infarktüsü oluşturulan sıçanlarda, doku NO düzeylerinin arttığını göstermişlerdir. Serebral iskemide de plazma NO düzeylerinde bir artışın olduğu bildirilmiştir (114,115). Çalışmamızda ISO verilişi serum NO düzeylerinde artışa neden oldu. Diğer yandan CAPE verilişi ile miyokart infarktüslü sıçanların serum NO düzeylerinde bir artma eğilimi olmakla birlikte bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. CAPE verilişi, sağlıklı sıçanların serum NO düzeylerini değiştirmedi.

Literatürde CAPE'nin NO üzerine etkisi ile ilgili çelişkili çalışmalar bulunmaktadır. Altuğ ve ark. (116) tavşanlarda fokal serebral iskemi modelinde, plazma NO düzeylerinde bir azalmanın olduğunu, CAPE verilişi ile bu azalmanın önlendiğini göstermişlerdir. Khan ve ark. (114) da sıçanlarda, fokal serebral iskemi modelinde CAPE'nin plazma NO düzeylerini arttırdığını kanıtlamışlardır**.** Eşrefoğlu ve ark. (117) ise miyokardiyal iskemi/reperfüzyonla uyarılan testikular hasarlı sıçanlarda serum NO düzeylerinin arttığını, oysa CAPE verilişi ile bu artışın önlendiğini göstermişlerdir. Diğer yandan Tsai ve ark. (115) ise fokal serebral iskemiye maruz kalan sıçanların plazma NO düzeylerinde bir artışın olduğunu, CAPE verilişi ile plazma NO düzeylerinin daha da arttığını bildirmişlerdir.

Diğer yandan Cağlı ve ark. (118) sıçanlarda iskemi/reperfüzyon sonrası NO düzeylerinde bir artışın olduğunu, CAPE tedavisi ile NO düzeylerindeki bu artışın önlendiğini bildirmişlerdir. Türköz ve ark. (119) ise proliferatif retinopati oluşturulan tavşanların vitröz humorunda, CAPE tedavisinin NO seviyesini düşürdüğünü göstermişlerdir.

Desrois ve ark. (113) ISO'nun eNOS ekspresyonunu uyararak doku NO düzeylerini arttırdığını bildirmişlerdir. Krenek ve ark. (120) ISO ile kalp yetmezliği oluşturulan sıçan dokusunda NO üretiminden sorumlu eNOS ve iNOS aktivitelerinin arttığını kanıtlamışlardır.

Bununla birlikte Li ve ark. (18) ISO'lu sıçanlarda doku eNOS ekspresyonunda bir azalma olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda ISO ile uyarılan miyokart infarktüslü sıçanlarda gözlenen serum NO düzeylerinin artışından, NO üretiminde rol oynayan eNOS ekspresyonundaki artış sorumlu olabilir. Gün ve ark. (121) CAPE'nin doku eNOS üretimini artırdığını bildirmişlerdir.

Fizyolojik rolü vasküler tonusu düzenlemek olan NO, ayrıca trombosit agregasyonunu, lökosit göçünü, hücresel adezyonu ve vasküler düz kas proliferasyonunu inhibe eder (8,53). NO'un zararlı etkisi ise inflamatuvar ve oksidan özelliğine bağlıdır (122). CAPE'nin, NO'nun süperoksit anyonu ile etkileşimini bloke ederek oksidatif hasarı önleyebileceği gösterilmiştir (115).

Koroner arter hastalarının serum ADMA düzeylerinde bir artış, serum NO düzeylerinde ise bir azalma olduğu gösterilmiştir (52,123). Ayrıca Vallance ve ark. (9) ADMA'nın NOS inhibisyonu yaparak NO sentezini azalttığını bildirmişlerdir. Koroner arter hastalarının serum ADMA/NO oranının sağlıklı bireylere göre daha yüksek olduğu da bildirilmiştir (124).

İsoproterenolun, ADMA sentezinde rol oynayan PRMT1 gen ekspresyonunu artırıcı, oysa ADMA yıkılımında rol oynayan DDAH2 enzim ekspresyonunu azaltıcı ve buna bağlı olarak serum ADMA düzeylerini artırıcı bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir (18,19). ISO'nun doku eNOS ekspresyonunu ve buna bağlı olarak NO düzeylerini artırıcı bir etkiye sahip olduğu da bilinmektedir (113). Yukarıdaki çalışmalarla tutarlı olarak çalışmamızda sağlıklı sıçanlara ISO verilişi, hem serum ADMA hem de serum NO düzeylerinde bir artışa neden olmuştur.

Çalışmamızda sağlıklı sıçanlara ISO verilişi ile serum ADMA/NO oranında her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bir azalma eğilimi görülmüştür. ISO grubunda serum ADMA/NO oranında gözlenen bu azalma eğilimi, serum NO düzeylerindeki artışın serum ADMA düzeylerindeki artıştan daha fazla olmasından kaynaklanabilir.

İsoproterenol ile oluşturulan miyokart infarktüslü sıçanlara CAPE verilişi ile sadece ADMA düzeylerinde anlamlı bir azalma olduğu oysa NO düzeylerinin değişmediği (yüksek kaldığı) görülmüştür. Çalışmamızda ISO grubu ile kıyaslandığında, ISO+CAPE grubunun da serum ADMA/NO oranlarında her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bir azalma eğilimi görülmüştür. ISO+CAPE grubunun serum ADMA/NO oranlarında gözlenen bu azalma eğilimi, NO üretiminin hem ISO hem de CAPE tarafından uyarılmasına bağlı olabilir (113,114).

Çalışmamız, sağlıklı sıçanlar ile kıyaslandığında, ISO ve CAPE'nin ancak birlikte verilmesi durumunda serum ADMA/NO oranını anlamlı olarak azalttığını gösterdi.

Sağlıklı sıçanlara CAPE verilişi ile istatistiksel olarak anlamlı olmasa da serum NO/ornitin oranında bir azalma eğilimi görülmüştür. CAPE grubunun serum NO/ornitin oranında gözlenen bu azalma eğiliminden, CAPE'nin ODC inhibisyonu yapmasına bağlı olarak serum ornitin düzeylerinin artması sorumlu olabilir (87).

Çalışmamızda ISO verilişi, kontrol grubu ve CAPE grubu ile kıyaslandığında serum NO/ornitin oranında anlamlı bir artışa neden oldu. ISO verilişi ile serum NO/ornitin oranında gözlenen bu artıştan, ISO grubunda artmış serum NO düzeyleri sorumlu olabilir. ISO'nun doku eNOS ekspresyonunu uyardığı ve buna bağlı olarak NO düzeylerini artırdığı bilinmektedir (113).

Çalışmamızda CAPE grubu ile kıyaslandığında, ISO+CAPE grubunun da serum NO/ornitin oranlarında istatiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür. ISO+CAPE grubunun serum NO/ornitin oranlarında gözlenen bu artıştan, NO üretiminin hem ISO hem de CAPE tarafından uyarılması sorumlu olabilir (113,114). Ayrıca CAPE grubunun yükselmiş serum ornitin düzeyleri de CAPE grubu ile ISO grubu arasında serum NO/ornitin oranları bakımından gözlenen bu farka katkıda bulunmuş olabilir.

Diğer yandan ISO'nun arginaz aktivitesini artırdığı da bilinmektedir (99). Buna rağmen çalışmamızda sağlıklı sıçanlara ISO verilmesi ile serum ornitin düzeylerinde artma eğilimi olmakla birlikte bu artış istatiksel olarak anlamlı değildi. Bu bulgu ISO'nun eNOS ekspresyonunu uyarıcı etkisinin arginaz aktivitesini artırıcı etkisinden daha güçlü olduğuna işaret etmektedir (99,113).

Çalışmamız, CAPE'nin, ISO ile uyarılmış miyokart infarktüsünde, serum arginaz aktivitesinin ve ADMA düzeylerinin artmasını önleyici bir etkiye sahip olduğunu ortaya koydu. Sonuç olarak, arginaz ve ADMA yüksekliğinin ateroskleroz patogenezi ile ilişkili olması ve miyokart infarktüsü için bir risk oluşturması nedeniyle, CAPE'nin kardiyoprotektif tedavide önemli rol oynayabileceğini söyleyebiliriz.

SONUÇLAR

Deneysel miyokart infarktüsünde CAPE'nin serum arginin metabolizmasına etkisini araştırmak amacıyla Wistar albino cinsi erkek sıçanlar; kontrol, CAPE, ISO ve ISO+CAPE olmak üzere 4 gruba ayrılarak serum TnI, arginaz aktivitesi, ADMA, ornitin, NO düzeyleri ile NO/ornitin ve ADMA/NO oranları incelendi. Çalışmada elde edilen sonuçlar şunlardır:

1. Sıçanların kalp dokularının histopatolojik olarak incelenmesi sonucunda, kontrol ve CAPE gruplarının miyokart dokularında herhangi bir fibrotik değişiklik saptanmadı. ISO+CAPE grubunda miyokart lifleri arasında hafif-orta dereceli miksoid değişikliklerin eşlik ettiği hafif-orta dereceli inflamasyon ve özellikle endokartta ve periarteriolar alanda belirginleşen hafif dereceli fibrozis görüldü. ISO grubunda miyokart lifleri arasında miksoid değişikliklerin eşlik ettiği şiddetli akut inflamasyon, miyokart lifleri arasında yaygın olarak miksoid alanlar ve beraberinde hafif dereceli fibrozis saptandı.
2. Kontrol grubunun ve CAPE grubunun serum troponin I düzeyleri, ISO grubundan ve ISO+CAPE grubundan anlamlı olarak daha düşüktü. Kontrol grubu ile CAPE grubu arasında ve ISO grubu ile ISO+CAPE grubu arasında serum troponin I düzeyleri bakımından istatiksel olarak anlamlı fark yoktu.
3. Kontrol grubunun, CAPE grubunun ve ISO+CAPE grubunun serum arginaz ortalaması ISO grubundan anlamlı olarak düşük saptandı.
4. Kontrol grubu, CAPE grubu ve ISO+CAPE grubu arasında serum arginaz ortalamaları bakımından istatiksel olarak anlamlı fark yoktu.
5. Kontrol grubunun serum ornitin düzeyleri, ISO+CAPE grubundan ve CAPE grubundan anlamlı olarak daha düşüktü.

6. CAPE grubunun serum ornitin düzeyleri, ISO grubundan anlamlı olarak daha yüksekti.
7. ISO+CAPE grubunun serum ornitin düzeyleri, ISO grubundan ve CAPE grubundan farksızdı.
8. Kontrol grubu ile ISO grubu arasında serum ornitin düzeyleri bakımından anlamlı fark yoktu.
9. ISO grubunun serum ADMA düzeyleri, kontrol grubundan, CAPE grubundan ve ISO+CAPE grubundan daha yüksekti.
10. Kontrol grubu, CAPE grubu ve ISO+CAPE grubu arasında serum ADMA düzeyleri bakımından anlamlı fark yoktu.
11. Kontrol grubunun ve CAPE grubunun serum nitrik oksit düzeyleri, ISO grubundan anlamlı olarak daha düşüktü.
12. Kontrol grubunun ve CAPE grubunun serum nitrik oksit düzeyleri, ISO+CAPE grubundan anlamlı olarak daha düşüktü.
13. Kontrol grubu ile CAPE grubu arasında ve ISO grubu ile ISO+CAPE grubu arasında serum nitrik oksit düzeyleri bakımından anlamlı fark yoktu.
14. Kontrol grubunun ve CAPE grubunun serum ADMA/NO değerleri, ISO+CAPE grubundan anlamlı olarak daha yüksekti.
15. Kontrol grubunun ve CAPE grubunun serum ADMA/NO değerleri ISO grubundan farksızdı.
16. Kontrol grubu ile CAPE grubu arasında ve ISO grubu ile ISO+CAPE grubu arasında serum ADMA/NO değerleri bakımından anlamlı fark yoktu.
17. Kontrol grubunun NO/ornitin değerleri, ISO grubundan anlamlı alarak düşüktü.
18. CAPE grubunun NO/ornitin değerleri, ISO grubundan ve ISO+CAPE grubundan anlamlı olarak daha düşüktü.
19. Kontrol grubu ile CAPE grubu arasında, kontrol grubu ile ISO+CAPE grubu arasında ve ISO grubu ile ISO+CAPE grubu arasında NO/ornitin değerleri bakımından istatiksel olarak anlamlı fark yoktu.

Çalışmamız, ISO ile oluşturulan deneysel miyokart infarktüsü modelinde serum arginaz aktivitesinin ve ADMA düzeylerinin arttığını, yedi gün boyunca 10 μmol/kg/gün dozunda uygulanan CAPE tedavisinin ise serum arginaz aktivitesindeki ve ADMA düzeylerindeki artışı önlediğini gösterdi.

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, isoproterenol ile miyokart infarktüsü oluşturulan sıçanlarda kafeik asit fenetil esterinin serum arginin metabolizmasına etkisini incelemektir.

Wistar albino cinsi erkek sıçanlar; kontrol, kafeik asit fenetil ester, isoproterenol ve isoproterenol+kafeik asit fenetil ester olmak üzere eşit sayıda rastgele 4 gruba ayrıldı. Kafeik asit fenetil ester (10 mikromol/kg/gün), % 0.5 dimetil sülfoksit içinde çözülerek, kafeik asit fenetil ester ve isoproterenol+kafeik asit fenetil ester gruplarına yedi gün boyunca intraperitoneal olarak verildi. Miyokart infarktüsü oluşturmak için isoproterenol ve isoproterenol+kafeik asit fenetil ester gruplarına altıncı ve yedinci günlerde isoproterenol (150 mg/kg/gün) intraperitoneal olarak uygulandı.

Tüm sıçanların isoproterenol enjeksiyonundan 24 saat sonra intrakardiyak kan örnekleri alındı ve sakrifikasyonla kalp dokuları çıkarıldı. Serum arginaz aktivitesi, troponin I, ornitin ve nitrik oksit düzeyleri ölçüldü. Asimetrik dimetilarginin/nitrik oksit ve nitrik oksit/ornitin oranları hesaplandı.

Sağlıklı sıçanlara isoproterenol verilişi serum arginaz aktivitesi, troponin I, asimetrik dimetilarginin, nitrik oksit düzeyleri ve nitrik oksit/ornitin oranlarında anlamlı bir artışa yol açtı. İsoproterenol ile miyokart infarktüsü oluşturulan sıçanlara kafeik asit fenetil ester verilişi ise serum arginaz aktivitesinin ve asimetrik dimetilarginin düzeylerinin artmasını anlamlı olarak önledi.

Bu bulguları destekler biçimde sıçanların miyokart dokularının histopatolojik incelemesi de isoproterenol grubundaki miyokart infarktüsünü kanıtlayan değişikliklerin isoproterenol+kafeik asit fenetil ester grubundan daha belirgin olduğunu ortaya koydu.

Çalışmamız, kafeik asit fenetil esterin, isoproterenol ile uyarılmış miyokart infarktüsünde, serum arginaz aktivitesinin ve asimetrik dimetilarginin düzeylerinin artmasını önleyici bir etkiye sahip olduğunu gösterdi. Sonuç olarak, arginaz ve asimetrik dimetilarginin yüksekliğinin ateroskleroz patogenezi ile ilişkili olması ve miyokart infarktüsü için bir risk oluşturması nedeniyle, kafeik asit fenetil esterin kardiyoprotektif tedavide önemli rol oynayabileceğini söyleyebiliriz.

Anahtar kelimeler: Kafeik asit fenetil ester, isoproterenol, miyokart infarktüsü, asimetrik dimetilarginin, arginaz.

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF CAFFEIC ACID PHENETHYL ESTER ON ARGININ METABOLISM IN ISOPROTERENOL-INDUCED MYOCARDIAL INFARCIONT IN RATS

SUMMARY

The aim of this study is to investigate the effect of caffeic acid phenethyl ester on arginine metabolism in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats.

Wistar albino male rats were divided randomly into 4 groups for the experiment: control group, caffeic acid phenethyl ester group, isoproterenol group and isoproterenol+caffeic acid phenethyl ester group. Caffeic acid phenethyl ester (10 micromol/kg/day) solved in % 0.5 dimethyl sulfoxide was given intraperitoneally to caffeic acid phenethyl ester and isoproterenol+caffeic acid phenethyl ester groups for seven days. On the sixth and seventh days, isoproterenol (150 mg/kg/day) was given intraperitoneally to isoproterenol and isoproterenol+caffeic acid phenethyl ester groups to induce myocardial infarction.

Following the taken of intracardiac blood from all rats 24 hours after the last isoproterenol injection, the rats were sacrificed. Serum arginase activity, troponin I, ornithine, asymmetric dimethylarginine and nitric oxide levels were measured. Asymmetric dimethyl arginine/nitric oxide ratio and nitric oxide /ornithine ratio were calculated.

Administration of isoproterenol to healthy rats caused in a significant increase in serum arginase activity, troponin I, asymmetric dimethylarginine, nitric oxide levels and nitric

oxide/ornithine ratios. Administration of caffeic acid phenethyl ester to rats with isoproterenol-induced myocardial infarction preventedan increase in serum arginase activity and asymmetric dimethylarginine levels significantly.

In keeping with these findings, histopathological examinations of the myocardial tissues of rats also revealed that the changes confirming myocardial infarction in isoproterenol group are more prominent than those in isoproterenol+caffeic acid phenethyl ester group.

Our study showed that caffeic acid phenethyl ester has a preventative effect against to an increase in serum arginase activity and asymmetric dimethylarginine levels in isoproterenol induced myocardial infarction.

In conclusion, we can report that caffeic acid phenethyl ester may play an important role in cardioprotective treatment because the increase in arginase and asymmetric dimethylarginine is associated with the pathogenesis of atherosclerosis and a risk for myocardial infarction.

Keywords: Caffeic acid phenethyl ester, isoproterenol, myocardial infarction, asymmetric dimethylarginine, arginase

KAYNAKLAR

1. Özkan AA. Akut koroner sendromlar: Epidemiyoloji. Türk Kardiyol Dern Arş 2013;4(1):l-3.

2. McCord J, Nowak RM, Hudson MP, McCullough PA, Tomlanovich MC, Jacobsen G et al. The prognostic significance of serial myoglobin, troponin I, and creatine kinase-MB measurements in patients evaluated in the emergency department for acute coronary syndrome. Ann Emerg Med 2003;42(3):343-50.

3. Thygesen K, Alpert JS, White HD, Jaffe AS, Apple FS, Galvani M et al. Universal definition of myocardial infarction. Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. Eur Heart J 2007;28(20):2525-38.

4. Getz GS, Reardon CA. Arginine/arginase NO NO NO. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006;26:237-39.

5. 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.

6. 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.

7. Kumar S, Singh RK, Bhardwaj TR. Therapeutic role of nitric oxide as emerging molecule. Biomed Pharmacother 2017;85:182-201.

8. Çekmen MB, Turgut M, Türköz Y, Aygün AD, Gözükara EM. Nitrik oksit (NO) nitrik oksit sentaz (NOS)'ın fizyolojik ve patolojik özellikleri. T Klin Pediatri 2001;10:226-35.

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

10. Pernow J, Jung C. Arginase as o potential target in the treatment of cardiovascular disease: reversal of arginine steal. Cardiovasc Res 2013;98:334-43.

11. Gökmen SS, Yıldız R, Özçelik F, Aktaş Z, Gülen Ş. Akut miyokart infarktüsünde eritrosit arjinaz aktivitesinin önemi. Turk J Biochem 2006;31(3):115–23.

12. Bekpınar S, Gurdol F, Unlucerci Y, Develi S, Akar, Yılmaz A. Serum levels of arginase I are associated with left ventricular function after myocardial infarction. Clin Biochem 2011;44:1090–3.

13. Yıldırım H, Görür A, Fidancı ŞB, Ünal ND, Çamsarı A, Tamer L. Akut miyokart infarktüsü malondialdehit, total antioksidan kapasite ve nitrik oksit düzeyleri arasındaki ilişki. Mersin Üniv Sağlık Bilim Derg 2012;5(1):13-6.

14. Yazıcı M, Demircan S, Durna K. Association between nitric oxide levels on myocardial injury in non-ST elevation acute coronary syndromes. J Thromb Thrombolysis 2007;24:145-51.

15. Yang Z, Li J, Kong J, Wu S. Impairment of vascular endothelial function following reperfusion therapy in patients with acute myocardial infarction. J Int Med Res 2013;41(4):1074-8.

16. Tratsiakovich Y, Gonon AT, Krook A, Yang J, Shemyakin A, Sjöquist PO et al. Arginase inhibition reduces infarct size via nitric oxide, protein kinase C epsilon and mitochondrial ATP-dependent K+ channels. Eur J Pharmacol 2013;712:16-21.

17. Xuan C, Tian QW, Li H, Zhang BB, He GW, Lun LM. Levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA), an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, and risk of coronary artery disease: Ameta-analysis based on 4713 participants. Eur J Prev Cardiol 2016;23(5):502-10.

18. Li X, Wang X, Guo Y, Deng N, Zheng P, Xu Q et al. Regulation of endothelial nitric oxide synthase and asymmetric dimethylarginine by matrine attenuates isoproterenol-induced acute myocardial injury in rats. J Pharm Pharmacol 2012;64(8):1107-18.

19. Zhang W, Zhang J, Liu YK, Kang Y, Liu J, Wang X et al. Cardioprotective effects of oxymatrine on isoproterenol-induced heart failure via regulation of DDAH/ADMA metabolism pathway in rats. Eur J Pharmacol 2014;745:29-35.

20. Brinkmann SJ, Wörner EA, Buijs N, Richir M, Cynober L, van Leeuwen PAM et al. The Arginine/ADMA ratio is related to the prevention of atherosclerotic plaques in hypercholesterolemic rabbits when giving a combined therapy with atorvastatine and arginine. Int J Mol Sci 2015;16:12230-42.

21. Albayrak S, Albayrak S. Propolis doğal antimikrobiyal madde. Ankara Ezc Fak Derg 2008;37(3):201-15.

22. Akyol S, Armutçu F, Yiğitoğlu MR. Propolisin aktif bileşenlerinden kafeik asit fenetil ester'in (Cape) bazı nörolojik hastalık ve acillerde kullanılması. Spatula DD 2011;1(1):37-42.

23. Zhang P, Tang Y, Li NG, Zhu Y, Duan JA. Bioactivity and chemical synthesis of caffeic acid phenethyl ester and ıts derivatives. Molecules 2014;19:16458-76.

24. Ho YJ, Chen WP, Chi TC, Chan Chien CC, Lee AS, Chiu HL et al. Caffeic acid phenethyl amide improves glucose homeostasis and attenuates the progression of vascular dysfunction in Streptozotocin-induced diabetic rats. Cardiovasc Diabetol 2013;12:99.

25. Pham TN, Bordage S, Pudlo M, Demougeot C, Thai KM, Girard-Thernier C. Cinnamide Derivatives as Mammalian Arginase Inhibitors: Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Docking. Int J Mol Sci 2016;17(10):1656.

26. Rona G, Chappel CI, Balazs T, Gaudry R. An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. AMA Arch Pathol 1959;67:443–55.

27. Bhagat B, Sullivan JM, Fischer VW, Nadel EM, Dhalla NS. cAMP activity and isoproterenol-induced myocardial injury in rats. Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab 1976;12:465-70.

28. Chattopadhyay A, Biswas S, Bandyopadhyay D, Sarkar C, Datta AG. Effect of isoproterenol on lipid peroxidation and antioxidant enzymes of myocardial tissue of mice and protection by quinidine. Mol Cel Biochem 2003;245:43-9.

29. Benjamin IJ, Jalil JE, Tan LB, Cho K, Weber KT, Clark WA. Isoproterenol-induced myocardial fibrosis in relation to myocyte necrosis. Circ Res 1989;65(3):657-70.

30. Koplay M, Erol C. Koroner arter hastalığı. Trd Sem 2013;1:57-69.

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

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

33. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis an update. N Engl J Med 1986:314(8):488-500.

34. Stocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. Physiol Rev 2004;84(4):1381-478.

35. Kurmaz Ö, Aydoğan HY. Okside LDL reseptörü-1 (LOX-1) ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisi. Tıp Araştırmaları Dergisi 2014:12(3):145-52.

36. Tokgözoğlu L. Dislipidemi, ateroskleroz ve hassas plaklar: Atorvastatinin ateroskleroz ve plak yapısına etkisi. Türk Kardiyol Dern Arş 2009;37(2):11-6.

37. Xu KY, Zweier JL, Becker LC. Hydroxyl radical inhibits sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase function by direct attack on the ATP binding site. Circ Res 1997;80:76-81.

38. Bagatini MD, Martins CC, Battisti V, Gasparetto D, da Rosa CS, Spanevello RM et al. Oxidative stress versus antioxidant defenses in patients with acute myocardial infarction. Heart Vessels 2011;26(1):55-63.

39. Sawyer DB, Siwik DA, Xiao L, Pimentel DR, Singh K, Colucci WS. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. J Mol Cell Cardiol 2002;34(4):379-88.

40. Adams JE, Abendschein DR, Jaffe AS. Biochemical markers of myocardial injury. Is MB creatine kinase the choice for the 1990s? Circulation 1993;88(2):750-63.

41. Schlattner U, Tokarska-Schlattner M, Wallimann T. Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. Biochim Biophys Acta 2006;1762(2):164–80.

42. Sobel BE, Shell WE. Serum enzyme determinations in the diagnosis and assessment of myocardial infarction. Circulation 1972;45(2):471-82.

43. Huijgen HJ, Sanders GT, Koster RW, Vreeken J, Bossuyt PM. The clinical value of lactate dehydrogenase in serum: a quantitative review. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1997;35(8):569-79.

44. Şahin M, Pirim İ, Şahin YN, Ateşal S. Alp N. Akut miyokard infarktüsü'nün erken tanısında serum miyoglobin artışının tanı değeri ve kreatin kînaz, laktad dehidrogenaz ve izoenzimleri ile karşılaştırılması. T Klin Kardiyoloji 1994;7:195-9.

45. Habif S. Kardiyak troponinler. T Klin J Med Sci 2003;23:74-80.

46. Bodor GS, Porterfield D, Voss EM, Smith S, Apple FS. Cardiac troponin-I is not expressed in fetal and healthy or diseased adult human skeletal muscle tissue. Clin Chem 1995;41(12):1710-5.

47. Jaffe AS, Vasile VC, Milone M, Saenger AK, Olson KN, Apple FS. Diseased skeletal muscle: a noncardiac source of increased circulating concentrations of cardiac troponin T. J Am Coll Cardiol 2011;58(17):1819-24.

48. Babuin L, Jaffe AS. Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury. CMAJ 2005;173(10):1191-202.

49. Kristensen SD, Knuuti J, Saraste A, Anker S, Bøtker HE, Hert SD et al. 2014 ESC/ESA Guidelines on non-cardiac surgery: cardiovascular assessment and management: The Joint Task Force on non-cardiac surgery: cardiovascular assessment and management of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Anaesthesiology (ESA). Eur Heart J 2014;35(35):2383-431.

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

51. Tratsiakovich Y, Yang J, Gonon AT, Sjöquist PO, Pernow J. Arginase as a target for treatment of myocardial ischemia-reperfusion injury. Eur J Pharmacol 2013;720(1-3):121-3.

52. Li H, Förstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. J Pathol 2000;190(3):244-54.

53. Atalık KE, Doğan N. Nitrik oksit ve fizyolojik etkileri. Genel Tıp Derg 1997;7(3):167-9.

54. Wang JM, Chow SN, Lin JK. Oxidation of LDL by nitric oxide and its modification by superoxides in macrophage and cell-free systems. FEBS Lett 1994;342(2):171-5.

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

56. Işıklar ÖÖ, Mutaf I. Asimetrik dimetilarginin ve klinik önemi. Türk Klinik Biyokimya Derg 2010;8(2):75-89.

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

58. Cooke JP. Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker? Circulation 2004; 109(15):1813-8.

59. Erdem S, Ünlü A. Asimetrik dimetilarjinin ve klinik önemi. Selçuk Tıp Derg 2009;25 (2):107-15.

60. Alaçam H, Dikmen ZG, Doğan P. Asimetrik dimetil arjinin (ADMA) metabolizması ve ADMA'nın oksidatif hasar, endotel hasarı ve çeşitli hastalıklarla ilişkisi. Hacettepe Tıp Dergisi 2010;41:75-81.

61. Böger RH, Ron ES. L-Arginine improves vascular function by overcoming deleterious effects of ADMA, a novel cardiovascular risk factor. Altern Med Rev 2005;10(1):14-23.

62. Korandji C, Zeller M, Guilland JC, Vergely C, Sicard P, Duvillard L et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and hyperhomocysteinemia in patients with acute myocardial infarction. Clin Biochem 2007;40(1-2):66-72.

63. Bergheanu SC, van der Laarse A, van der Bom JG, van der Hoeven BL, le Cessie S, de Jong MG et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels display a morning peak in patients withacute myocardial infarction. Dis Markers 2011;30(5):245–52.

64. Jung C, Gonon AT, Sjöquist PO, Lundberg JO, Pernow J. Arginase inhibition mediates cardioprotection during ischaemia-reperfusion. Cardiovasc Res 2010;85 (1):147-54.

65. Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. J Clin Exp Invest 2015;6(3):331-6.

66. Goyal T, Mitra S, Khaidakov M, Wang X, Singla S, Ding Z et al. Current concepts of the role of oxidized LDL receptors in ateroscleroses. Curr Atherosclerosis Rep 2012;14:150-9.

67. Hogg N, Kalyanaraman B, Joseph J, Struck A, Parthasarathy S. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis. FEBS Lett 1993;334(2):170-4.

68. Carr AC, McCall MR, Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000;20(7):1716-23.

69. Ahmad A, Sattar MZ, Rathore HA, Hussain AI, Khan SA, Fatima T et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of L-arginine and nahs: a comparative in vitro study. Acta Pol Pharm 2015;72(2):245-52.

70. 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.

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

72. Preli RB, Klein KP, Herrington DM. Vascular effects of dietary L-arginine supplementation. Atherosclerosis 2002;162(1):1-15.

73. Tousoulis D, Antoniades C, Tentolouris C, Goumas G, Stefanadis C, Toutouzas P. L-arginine in cardiovascular disease: dream or reality? Vasc Med 2002;7(3):203-11.

74. Egashira K, Hirooka Y, Kuga T, Mohri M, Takeshita A. Effects of L-arginine supplementation on endothelium-dependent coronary vasodilation in patients with angina pectoris and normal coronary arteriograms. Circulation 1996;94(2):130-4.

75. Holm AM, Andersen CB, Haunsø S, Hansen PR. Effects of L-arginine on vascular smooth muscle cell proliferation and apoptosis after balloon injury. Scand Cardiovasc J 2000;34(1):28–32.

76. Parlakpınar H, Örüm MH, Acet A. Kafeik asit fenetil ester (KAFE) ve miyokardiyal iskemi reperfüzyon (Mİ/R) hasarı. İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 2012;1:10-5.

77. Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF-kB, inflammation, and metabolic disease. Cell Metab 2011;13(1):11-22.

78. Hishikawa K, Nakaki T. NF-κB as a therapeutic target for cardiovascular disease. Heart Drug 2002;2:303–11.

79. Dąbek J, Kułach A, Gąsior Z. Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB): a new potential therapeutic target in atherosclerosis? Pharmacol Rep 2010;62(5):778-83.

80. Li D, Saldeen T, Romeo F, Mehta JL. Oxidized LDL upregulates angiotensin II type 1 receptor expression in cultured human coronary artery endothelial cells: the potential role of transcription factor NF-kappa B. Circulation 2000;102(16):1970-6.

81. Li D, Mehta JL. Upregulation of endothelial receptor for oxidized LDL (LOX-1) by oxidized LDL and implications in apoptosis of human coronary artery endothelial cells: evidence from use of antisense LOX-1 mRNA and chemical inhibitors. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000;20(4):1116-22.

82. Ozyurt H, Irmak MK, Akyol O, Sögüt S. Caffeic acid phenethyl ester changes the incides of oxidative stress in serum of rats with renal ischemia–reperfusion injury. Cell Biochem. Funct 2001;19(4):259–63.

83. Ozer MK, Parlakpinar H, Acet A. Reduction of ischemia–reperfusion induced myocardial infarct size in rats by caffeic acid phenethyl ester (CAPE). Clin Biochem 2004;37(8):702-5.

84. Ilhan A, Koltuksuz U, Ozen S, Uz E, Ciralik H, Akyol O. The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits. Eur J Cardiothorac Surg 1999;16(4):458–63.

85. Michaluart P, Masferrer JL, Carothers AM, Subbaramaiah K, Zweifel BS, Koboldt C et al. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation. Cancer Res 1999;59(10):2347–52.

86. Kumaran KS, Prince PS. Protective effect of caffeic acid on cardiac markers and lipid peroxide metabolism in cardiotoxic rats: an in vivo and in vitro study. Metabolism 2010;59(8):1172-80.

87. Frenkel K, Wei H, Bhimani R, Ye J, Zadunaisky JA, Huang MT et al. Inhibition of tumor promoter-mediated processes in mouse skin and bovine lens by caffeic acid phenethyl ester. Cancer Res 1993;53(6):1255-61.

88. Cicala C, Morello S, Iorio C, Capasso R, Borrelli F, Mascolo N. Vascular effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on isolated rat thoracic aorta. Life Sci 2003;73 (1):73-80.

89. Parlakpınar H, Sahna E, Acet A, Mizrak B, Polat A. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on myocardial ischemia–reperfusion-induced apoptotic cell death. Toxicology 2005;209(1):1–14.

90. Tolba MF, Azab SS, Khalifa AE, Abdel-Rahman SZ, Abdel-Naim AB. Caffeic acid phenethyl ester, a promising component of propolis with a plethora of biological activities: a review on its anti-inflammatory, neuroprotective, hepatoprotective, and cardioprotective effects. IUBMB Life 2013;65(8):699-709.

91. Tan J, Ma Z, Han L, Du R, Zhao L, Wei X et al. Caffeic acid phenethyl ester possesses potent cardioprotective effects in a rabbit model of acute myocardial ischemia-reperfusion injury. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005;289(5):2265–71.

92. Bloom S, Davis DL. Calcium as mediator of isoproterenol-induced myocardial necrosis. Am J Pathol 1972;69(3):459-70.

93. Singal PK, Beamish RE, Dhalla NS. Potential oxidative pathways of catecholamines in the formation of lipid peroxides and genesis of heart disease. Adv Exp Med Biol 1983;161:391-401.

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

95. Chinard FP. Photometric estimation of proline and ornithine. J Bil Chem 1952;199(1):91-95.

96. 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.

97. Zhai Z, Solco A, Wu L, Wurtele ES, Kohut ML, Murphy PA, Cunnick JE. Echinacea increases arginase activity and has anti-inflammatory properties in RAW 264. 7 macrophage cells, indicative of alternative macrophage activation. J Ethnopharmacol 2009;122(1):76-85.

98. Orsolic N, Kunstic M, Kukolj M, Gracan R, Nemrava J. Oxidative stress, polarization of macrophages and tumour angiogenesis: Efficacy of caffeic acid. Chem Biol Interact 2016;256:111-24.

99. Bernard AC, Fitzpatrick EA, Maley ME, Gellin GL, Tsuei BJ, Arden WA et al. Beta adrenoceptor regulation of macrophage arginase activity. Surgery 2000;127:412-8.

100. Barksdale AR, Bernard AC, Maley ME, Gellin GL, Kearney PA, Boulanger BR et al. Regulation of arginase expression by T-helper II cytokines and isoproterenol. Surgery 2004;135:527-35.

101. Schömig A, Richardt G, Kurz T. Sympatho-adrenergic activation of the ischemic myocardium and its arrhythmogenic impact. Herz 1995;20(3):169-86.

102. Thandroyen FT, Muntz KH, Buja LM, Willerson JT. Alterations in beta-adrenergic receptors, adenylate cyclase, and cyclic AMP concentrations during acute myocardial ischemia and reperfusion. Circulation 1990;82(3):30-7.

103. Landolfi R, Mower RL, Steiner M. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations. Biochem Pharmacol 1984;33(9):1525-30.

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

105. Kövamees O, Shemyakin A, Pernow J. Effect of arginase inhibition on ischemia-reperfusion injury in patients with coronary artery disease with and without diabetes mellitus. PLoS One 2014 Jul 29;9(7):e103260.

106. Giordano E, Hillary RA, Vary TC, Pegg AE, Sumner AD, Caldarera CM et al. Overexpression of ornithine decarboxylase decreases ventricular systolic function during induction of cardiac hypertrophy. Amino Acids 2012;42(2-3):507–18.

107. Tipnis UR, He GY, Li S, Campbell G, Boor PJ. Attenuation of isoproterenol-mediated myocardial injury in rat by an inhibitor of polyamine synthesis. Cardiovasc Pathol 2000;9(5):273-80.

108. Erbas H, Aydogdu N, Kaymak K. Effects of N-acetylcysteine on arginase, ornithine and nitric oxide in renal ischemia-reperfusion injury. Pharmacol Res 2004;50(5):523- 7.

109. Lin Y, Zhang X, Wang L, Zhao Y, Li H, Xiao W et al. Polyamine depletion attenuates isoproterenol-induced hypertrophy and endoplasmic reticulum stress in cardiomyocytes. Cell Physiol Biochem 2014;34(5):1455-65.

110. Karabağ F, Sözbilir NB. Effects of caffeic acid phenethyl ester on plasma homocysteine, asymmetric dimethylarginine, nitric oxide, levels in rats constituted hyperthyroidism. J Appl Biol Sci 2011;5(3):1-5.

111. Sydow K, Münzel T. ADMA and oxidative stress. Atheroscler Suppl 2003;4(4):41-51.

112. Hein TW, Zhang C, Wang W, Chang CI, Thengchaisri N, Kuo L. Ischemia-reperfusion selectively impairs nitric oxide-mediated dilation in coronary arterioles: counteracting role of arginase. FASEB J 2003;17(15):2328–2330.

113. Desrois M, Kober F, Lan C, Dalmasso C, Cole M, Clarke K et al. Effect of isoproterenol on myocardial perfusion, function, energy metabolism and nitric oxide pathway in the rat heart –a longitudinal MR study. NMR Biomed 2014;27(5):529-38.

114. Khan M, Elango C, Ansari MA, Singh I, Singh AK. Caffeic acid phenethyl ester reduces neurovascular inflammation and protects rat brain following transient focal cerebral ischemia. J Neurochem 2007;102(2):365-77.

115. Tsai SK, Lin MJ, Liao PH, Yang CY, Lin SM, Liu SM et al. Caffeic acid phenethyl ester ameliorates cerebral infarction in rats subjected to focal cerebral ischemia. Life Sci 2006;78(23):2758-62.

116. Altuğ ME, Serarslan Y, Bal R, Kontaş T, Ekici F, Melek IM ve ark. Caffeic acid phenethyl ester protects rabbit brains against permanent focal ischemia by antioxidant action: a biochemical and planimetric study. Brain Res 2008 27;1201:135-42.

117. Eşrefoğlu M, Gül M, Parlakpinar H, Acet A. Effects of melatonin and caffeic acid phenethyl ester on testicular injury induced by myocardial ischemia/reperfusion in rats. Fundam Clin Pharmacol 2005;19(3):365–72.

118. Cagli K, Bagci C, Gulec M, Cengiz B, Akyol O, Sari I ve ark. In vivo effects of caffeic acid phenethyl ester on myocardial ischemia-reperfusion injury and apoptotic changes in rats. Ann Clin Lab Sci 2005;35(4):440-8.

119. Turkoz Y, Er H, Borazan M, Yılmaz H, Mızrak B, Parlakpınar H ve ark. Use of caffeic acid phenethyl ester and cortisone may prevent proliferative vitreoretinopathy. Mediators Inflamm 2004;13(2):127-30.

120. Krenek P, Kmecova J, Kucerova D, Bajuszova Z, Musil P, Gazova A et al. Isoproterenol-induced heart failure in the rat is associated with nitric oxide-dependent functional alterations of cardiac function. Eur J Heart Fail 2009;11(2):140-6.

121. Gün A, Özer MK, Bilgiç S, Kocaman N, Ozan G. Effect of caffeic acid phenethyl ester on vascular damage caused by consumption of high fructose corn syrup in rats. Hindawi Publishing Corporation. Oxid Med Cell Longev 2016 Article ID 3419479. http://dx.doi.org/10.1155/2016/3419479 (Erişim Tarihi: 08.02.2016)

122. Türköz Y, Özerol E. Nitrik Oksit'in Etkileri ve Patolojik Rolleri. Journal of Turgut Özal Medical Center 1997;4(4):453-61.

123. Sibal L, Agarwal SC, Home PD, Boger RH. The Role of Asymmetric dimethylarginine (ADMA) in endothelial dysfunction and cardiovascular disease. Curr Cardiol Rev 2010;6(2):82-90.

124. Shivkar RR, Abhang SA. Ratio of serum asymmetric dimethyl arginine (ADMA)/nitric oxide in coronary artery disease patients. J Clin Diagn Res 2014;8(8):4-6.

EKLER

Ek 1

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(Trakya University, Local Ethics Committee of Animal Experiments)

Oturum Sayısı: 2016/02 **Karar Tarihi: 29.01.2016**

KARAR NO: 2016.02.03

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Selma SÜER GÖKMEN'in yaptığı, Arş. Gör. Dr. Barış PERSİL'in uzmanlık tezi olarak planlanan TÜHADYEK-2015/44 protkol nolu "**Isoproterenol ile miyokart infarktüsü oluşturulan sıçanlarda kafeik asit fenetil esterinin arginin metabolizmasına etkisinin incelenmesi**" başlıklı çalışmada değişiklik yapılmasını öneren TÜHADYEK-2016/06 protokol nolu çalışma görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri yerel etik kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Doç. Dr. Enis ULUÇAM
Başkan
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐evet ☐ hayır

Vet. Hekim Ziya ÇUKUR
Vet. Hek. Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Yrd. Doç. Dr. Beytullah ÖZKAN
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒yok
Toplantı Katılım: ☒ evet ☐ hayır

-Katılmadı-

Doç. Dr. Y. Atakan SEZER
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Doç. Dr. Tevfik AKTOZ
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Doç. Dr. Hakan GÜRKAN
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☑ evet ☐ hayır

Yrd. Doç. Dr. Elvan BAKAR
Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒yok
Toplantı Katılım: ☒ evet ☐ hayır

Ecz. F. Uygar GÜLER
Sivil Toplum Kuruluşu Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐evet ☐ hayır

-Mazeretli-

Osman GÜLTEKİN
Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır