

İsoproterenol ile miyokart infarktüsü oluşturulmuş sıçanlarda L-lizinin serum sialik asit düzeylerine etkisi

[The effect of L-lysine on serum sialic acid levels in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats]

Selda Uzgur¹,
Ufuk Usta²,
Selma Süer Gökmen¹

Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, ¹Biyokimya Anabilim Dalı,
²Patoloji Anabilim Dalı, Edirne

Yazışma Adresi
[Correspondence Address]

Prof.Dr.Selma Süer Gökmen

Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 22030, EDİRNE
Telefon: 02842357641
Faks: 02842357652
E-posta: selmasuer@hotmail.com

Kayıt Tarihi: 24 Mart 2011; Kabul Tarihi: 19 Temmuz 2011
[Registered: 24 March 2011; Accepted: 19 July 2011]

ÖZET

Amaç: L-Lizinin, isoproterenol ile oluşturulan miyokart infarktüsünde serum total ve lipide bağlı sialik asit düzeylerine etkisini incelemek ve infarktüs sonrası gözlenen sialik asit artışında hücre hasarının rolünü değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: Wistar albino cinsi erkek sıçanlar kontrol, isoproterenol ve isoproterenol+L-lizin olmak üzere rastgele 3 gruba ayrıldı. Miyokart infarktüsü, 150 mg/kg isoproterenolün intraperitoneal olarak 24 saat ara ile 2 kez verilmesi ile oluşturuldu. L-Lizin, oral olarak 5 gün boyunca 5mg/kg/gün dozunda verildi. Deneysel infarktüs oluşumu troponin I düzeylerindeki yükselme ve histopatolojik değişikliklerle kanıtlandı. Serum total ve lipide bağlı sialik asit düzeylerini belirlemek için sırasıyla Warren ve Katopodis yöntemleri kullanıldı.

Bulgular: İsoproterenol, sıçanların serum troponin I, total ve lipide bağlı sialik asit düzeylerinde anlamlı bir artışa ve kalp dokusunda miyokart infarktüsü ile uyumlu belirgin atrofi ve fibrotik değişikliğe yol açtı. L-Lizin, serumda troponin I, total ve lipide bağlı sialik asit artışını ve kalp dokusunda atrofi ve bağ dokusu gelişimini önledi.

Sonuç: Miyokart infarktüsü sonrası serumda gözlenen sialik asit artışında hücre hasarı önemli rol oynayabilir.

Tarafsızlık beyanı: Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur.

Anahtar Sözcükler: L-Lizin, total ve lipide bağlı sialik asit, troponin I, deneysel miyokart infarktüsü, hücre hasarı

ABSTRACT

Objectives: To investigate the effect of L-lysine on serum total and lipid-bound sialic acid levels in isoproterenol-induced myocardial infarction and to evaluate the role of cell damage in the elevation of sialic acid post-infarction.

Material and Methods: Male albino rats of Wistar strain were divided into three groups randomly: control, isoproterenol and isoproterenol+L-lysine. Myocardial infarction was produced with 150 mg/kg of isoproterenol administered intraperitoneally twice at an interval of 24 hour. L-Lysine was given orally (5 mg/kg/day) for 5 days. Existence of experimental infarction was confirmed by histopathological changes and the elevation of troponin I. The levels of serum total and lipid-bound sialic acid were determined by the methods of Warren and Katopodis, respectively.

Results: Isoproterenol caused a significant elevation in serum troponin I, total and lipid-bound sialic acid levels and a prominent atrophy and fibrotic changes confirming myocardial infarction in heart tissue. L-Lysine significantly prevented troponin I, total and lipid-bound sialic acid increase in serum and atrophy and connective tissue development in heart tissue.

Conclusion: Cell damage may play an important role in serum sialic acid elevation after myocardial infarction.

Conflict of interest: The authors have no conflict of interest.

Key Words: L-Lysine, total and lipid-bound sialic acid, troponin I, experimental myocardial infarction, cell damage

Giriş

Plazma membranlarının negatif yüküne eşlik eden sialik asitler, glikoprotein ve glikolipitlerin N-terminal ucunda bulunan dokuz karbonlu nöraminik asidin asetillenmiş türevleridir [1]. Total sialik asit (TSA) başlıca 2 fraksiyondan oluşur: lipide bağlı fraksiyon (lipide bağlı sialik asit, LSA) ve proteine bağlı fraksiyon (proteine bağlı sialik asit). Lipide bağlı fraksiyonu başlıca çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL), düşük dansiteli lipoprotein (LDL), yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) ve lipoprotein (a) [Lp (a)] oluşturur. Sialik asidin proteine bağlı fraksiyonunun önemli bir kısmını ise oligosakkarit yan zincirlerinin terminal pozisyonunda sialik asit kalıntıları bulunan akut faz proteinleri oluşturur [2,3].

Koroner kalp hastalığı için bir risk faktörü olarak kabul edilen sialik asit, inflamasyon ve hızlanmış aterosklerotik süreç ile ilişkilidir [4,5]. Miyokart infarktüsli hastaların da serum total ve/veya lipide bağlı sialik asit düzeylerinde bir artış vardır [6-8]. Miyokart infarktüsünün aterosklerotik koroner kalp hastalığı zemininde gelişmesi nedeniyle, akut miyokart infarktüsli hastalarda gözlenen serum sialik asit düzeylerindeki artışa aterosklerotik değişikliklerin de katkısı olabileceği açıktır. Bununla birlikte sıçanlarda oluşturulan deneysel miyokart infarktüsünün de serum sialik asit düzeylerinde bir artışa neden olduğu [9,10] ve bu artışın ateroskleroz patogenezinin bağımsız bir mekanizma ile meydana geldiği bildirilmiştir [10]. Miyokart infarktüsli hastaların serum total ve/veya lipide bağlı sialik asit düzeylerindeki artıştan, karaciğer tarafından akut faz proteinlerinin dolaşıma atılımındaki artışın [6,7] ya da hücre hasarına bağlı olarak hücreden veya hücre membranından sialik asidin dolaşıma salınmasının [8,11] sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür.

Yarı esansiyel ve bazik bir amino asit olan L-arginin, hem üre döngüsünün son enzimi olan arginazın hem de nitrik oksit (NO) üretiminden sorumlu NO sentaz'ın substratıdır. Bu nedenle arginaz, ortak substrat arginin için NO sentaz ile yarışır [12,13]. Arginaz aktivitesinin arttığı durumlarda NO sentaz için ortamda daha az arginin bulunur ve NO üretimi azalır [14]. Hem L-arginin hem de NO, serbest oksijen radikallerince uyarılan hücre hasarına karşı koruyucu etkiye sahiptir [15-18]. Esansiyel ve bazik bir amino asit olan L-lizin, L-arginin ile birçok benzer özelliğe sahiptir ancak NO sentezi için bir substrat değildir [19]. Lizin, plazma arginin ve ornitin düzeylerinde artışa [20], üre sentezinde ise azalmaya yol açar [21]. L-lizin, arginaz enziminin güçlü bir inhibitörüdür ancak NO sentaz aktivitesine etkisi yoktur [21-23]. Arginaz inhibisyonunun arginin kullanımını arginazdan NO sentaz'a kaydırarak NO üretimini artırdığı ve böylece iskemi reperfüzyonuna bağlı miyokardial infarktüsü azalttığı bildirilmiştir [24]. L-Lizin verilmesinin isoproterenol ile uyarılmış kardiyak hasara karşı koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [25].

İsoproterenol (ISO), yüksek dozlarda akut miyokart infarktüsü oluşturan bir β -adrenerjik agonisttir. ISO etki-

siyle oluşan lezyon, insanlardaki hipoksik/iskemik kalp hastalığına benzer özellikler gösterir [26]. Katekolaminler tarafından oluşturulan miyokart nekrozunun patogenezinde oksidatif stresin önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir [27].

Bu çalışmanın amacı, hücre hasarını önleyici etkiye sahip olan L-lizin'in, ISO ile oluşturulan deneysel miyokart infarktüsünde serum total ve lipide bağlı sialik asit düzeylerine etkisini incelemek ve infarktüs sonrası gözlenen sialik asit artışında hücre hasarının rolünü değerlendirmektir. Literatürde, ISO ile oluşturulan infarktüs modelinde L-lizin'in serum total ve lipide bağlı sialik asit düzeylerine etkisini inceleyen başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamız ayrıca L-lizin'in miyokarda son derece spesifik bir protein olan troponin I (TnI) düzeylerine etkisini incelemesi açısından da ilki teşkil etmektedir.

Gereç ve Yöntem

Deneysel Gruplarının Oluşturulması, Kan Ve Doku Örneklerinin Alınması

Üniversitemiz yerel etik onayı (tarih:22.06.2006, no:TÜTFEK-2006/098) alındıktan sonra, Trakya Üniversitesi Deneysel Hayvanları Birimi'nden standart koşullarda yetiştirilen 27 adet erişkin erkek Wistar albino sıçan temin edildi. Kontrol grubu, ISO grubu ve ISO+Lizin grubu olmak üzere eşit sayıda rastgele üç gruba ayrılan sıçanların ortalama ağırlıkları sırasıyla 260.75±21.43 g, 273.00±10.51 g ve 257.87±18.01 g olup aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Sıçanlar, 12 saat ışık 12 saat karanlık siklusu ile 25±2 °C'ta ve 50±15 rölatif nem koşullarında barındırıldı.

ISO grubundaki sıçanlara intraperitoneal yoldan 24 saat arayla günde 150 mg/kg olacak şekilde toplam 2 kez ISO uygulandı. ISO+L-lizin grubundaki sıçanlara ise 5 gün boyunca her gün oral yoldan 5mg/kg olacak şekilde L-lizin verildi [25]. Bu gruba 4. ve 5 günlerde aynı zamanda intraperitoneal yoldan günde 150 mg/kg olacak şekilde 24 saat arayla toplam 2 kez ISO uygulandı. Kontrol grubuna ise 24 saat arayla toplam 2 kez % 0.9'lük sodyum klorür (serum fizyolojik) uygulandı.

İnfarktüs sonrası gelişmeye başlayan bağ dokusunun histopatolojik olarak ortaya konulabilmesi için en az iki haftalık bir süreye gereksinim bulunduğundan, her gruptan rastgele seçilen birer sıçan, isoproterenol veya serum fizyolojik solüsyonunun ikinci dozundan sonra 15 gün yaşatıldı. Bu süre sonunda sıçanlar, anestezi altında sakrifiye edilerek kalp dokuları çıkartıldı. Kalp dokularının histopatolojik incelemesi Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

Miyokardial hücre hasarının belirteci olan TnI'nin infarktüs sonrası ilk 24 saat içinde pik yapması nedeniyle, geri kalan sıçanlardan isoproterenol veya serum fizyolojik solüsyonunun ikinci dozundan 24 saat sonra anestezi altında intrakardiyak kan örnekleri alınarak ötenazi uygulandı. Kan örneklerinin 1100 rpm'de 10dk santrifüj

edilmesiyle elde edilen serumlar analiz gününe kadar -80 °C'de saklandı.

TSA, LSA ve TnI Analizi

Sıçan serumlarında TnI analizi, Innotracs-Aio markalı analizörde kit kullanılarak time-resolved florometri metodu ile gerçekleştirildi. Serum TSA ve LSA düzeylerinin ölçümü için sırasıyla Warren [28] ve Katopodis [29] yöntemleri kullanıldı. Çalışmalarda kullanılan kimyasal maddelerin tümü Sigma veya Merck'ten temin edildi. TSA düzeylerinin tayininden önce serum, 0.1 N sülfürik asit ile 80°C'de 1 saat inkübe edilerek bağlı sialik asit serbestleştirildi. Total sialik asit analizi için 0,2 M sodyum meta periodat (NaIO₄), 9M fosforik asit (H₃PO₄), 0,8M sodyum arsenit (NaAsO₂), 0,5M sodyum sülfat (Na₂SO₄), 0,1M sülfürik asit (H₂SO₄) ve 0,4M *tiyobarbitürik asit* (C₄H₄N₂O₂S) kullanıldı. Ekstraksiyon için sikloheksanon kullanıldı. Değişik konsantrasyonlarda (2, 4, 6, 8 ve 10 mg/100 mL) standart N-asetilneuraminik asit çözeltileri kullanılarak kalibrasyon eğrisi elde edildi. Ölçümler 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak yapıldı.

LSA analizi için önce lipit faz ekstrakte edildi. Asidik ortamda serbestleştirilen sialik asitler, rezorsinol ile reaksiyona sokularak mavi renkli bir kompleks oluşturuldu. Renkli ürün 580 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Lipide bağlı sialik asit analizi için kloroform/metanol (2/1), 1g/ml fosfotungustik asit, butilasetat/n-butanol (85/15) ve stok rezorsinol kullanıldı.

İstatistiksel Analiz

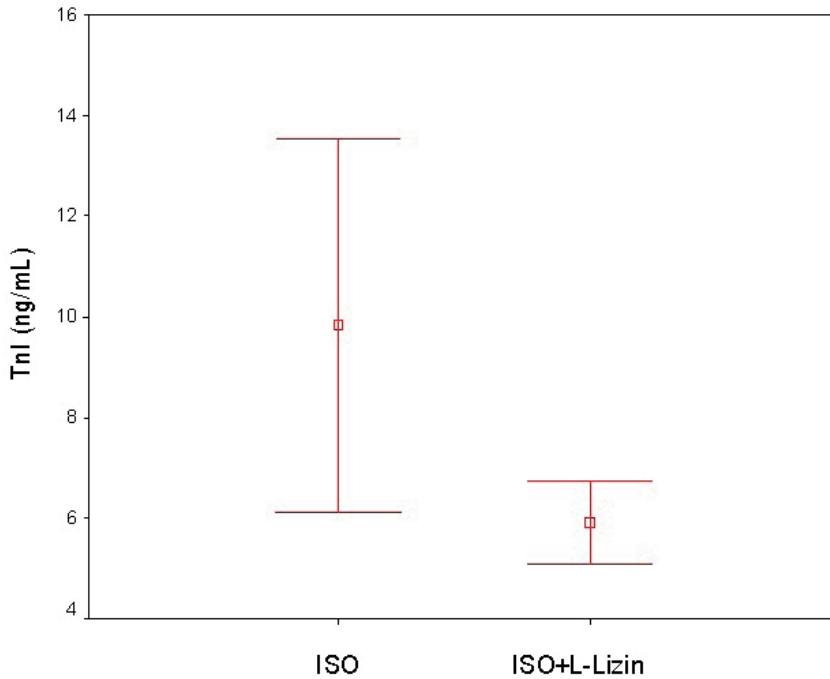
Her grupta verilerin parametrik varsayımları yerine getirip getirmediğini incelemek için normal dağılıma uygunluk ve varyans homojenliği testleri yapıldı. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verildi. Verilerin gruplar arası karşılaştırmasında One-way ANOVA testi kullanıldı. Değişkenler arasındaki ilişkinin yönünü, derecesini ve önemini ortaya koymak amacıyla Pearson korelasyon analizi yapıldı. Anlamlılık p<0.05 düzeyinde değerlendirildi.

Bulgular

Serum troponin I düzeyleri kontrol grubunda 0.01 ng/mL'nin altında iken, ISO grubunda 9.82±4.42 ng/mL, ISO+L-lizin grubunda ise 5.90±1.00 ng/mL olarak bulundu. ISO grubunun serum TnI düzeyleri ISO+L-lizin grubuna göre anlamlı olarak yüksekti (p<0.05 t=2.45) (Şekil 1).

Kontrol, ISO ve ISO+L-Lizin gruplarının serum TSA ve LSA düzeyleri Tablo 1'de görülmektedir. ISO grubunun serum TSA ve LSA düzeyleri kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu (p=0.000). ISO+L-lizin grubunun serum TSA (p=0.000) ve LSA (p=0.001) düzeyleri de kontrol grubundan yüksekti. Ayrıca ISO grubunun serum TSA (p=0.012) ve LSA (p=0.003) düzeyleri ISO+L-lizin grubundan istatistiksel olarak daha yüksek bulundu.

Kontrol grubunun değerleri 100 kabul edilerek, ISO grubunun serum total sialik asit ve lipide bağlı sialik asit düzeylerindeki "artış oranı" hesaplandı ve bu oranların



Şekil 1. ISO grubunun ve ISO+L-lizin grubunun serum TnI düzeylerinin karşılaştırılması (ISO: İsopterenol, TnI: Troponin I) (TnI ortalaması; ISO grubu için 9.82±4.42 ng/mL, ISO+L-lizin grubu için 5.90±1.00 ng/mL) (p<0.05 t=2.45)

Tablo 1. Kontrol, ISO ve ISO+L-lizin grubundaki sıçanların serum TSA ve LSA düzeylerinin karşılaştırılması.#

		TSA	LSA
	n	(mg/100 mL) (ort±SD)	(mg/100 mL) (ort±SD)
Kontrol	8	56.99±8.46†	25.23±3.14*
ISO	8	94.09±8.47‡	38.99±4.34**
ISO+L-Lizin	8	80.85±8.12	32.56±2.30

TSA: Total sialik asit, LSA: Lipide bağlı sialik asit, ISO: İsopterrenol
#: One-Way ANOVA

†: Kontrol grubu, post-hoc Tukey HSD yöntemine göre ISO grubu ve ISO+L-lizin grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel yönden anlamlı fark, p=0.000.

‡: ISO grubu post-hoc Tukey HSD yöntemine göre ISO+L-lizin grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel yönden anlamlı fark, p=0.012.

*Kontrol grubu, post-hoc Tukey HSD yöntemine göre ISO grubu (p=0.000) ve ISO+L-lizin grubu(p=0.001) ile karşılaştırıldığında istatistiksel yönden anlamlı fark.

** ISO grubu post-hoc Tukey HSD yöntemine göre ISO+L-lizin grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel yönden anlamlı fark, p=0.003.

birbirine çok yakın olduğu görüldü. ISO grubunun değerleri 100 kabul edilerek, ISO+L-lizin grubunun serum total sialik asit ve lipide bağlı sialik asit düzeylerindeki “artışın önlenme oranı” hesaplandı ve bu oranların da neredeyse birbirinin aynı olduğu görüldü (Tablo 2).

Grupların hiçbirinde serum total sialik asit, lipide bağlı sialik asit ve TnI arasında korelasyona rastlanmadı.

ISO uygulanan sıçanların 15. güne ait kalp dokusunda mikroskopik olarak kaslarda belirgin atrofi, kas demetleri arasında hafif dereceli inflamasyon ve bu inflamasyona eşlik eden, kalp kasları arasına giren fibrotik değişiklikler görüldü. L-Lizin verilen sıçanların kalp dokusunda ise hafif dereceli atrofi bulguları (hücre boyutlarında ve nükleer boyutlarda hafif dereceli küçülme) ve kalp kasları arasında dağılan hafif dereceli bağ dokusu gelişimi izlendi. Kontrol grubu kalp dokusunda ise düzenli kalp kası bulguları izlenirken, kalp kasları arasında bağ dokusu gelişimine rastlanmadı (Şekil 2-4).

Tartışma

Akut miyokart infarktüsü sonrası serum sialik asit düzeylerinde bir artış olduğu bilinmesine rağmen [6-8] bu artışın nedeni tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu çalışmada, hücre hasarını önleyici etkiye sahip L-lizinin, ISO ile oluşturulan miyokart infarktüsünde serum total ve lipide bağlı sialik asit düzeylerine etkisi incelenmiş ve infarktüs sonrası serumda gözlenen sialik asit artışında hücre hasarının rolü irdelenmiştir.

Tablo 2. Serum TSA ve LSA düzeylerindeki artış oranı ve artışın önlenme oranı

	ISO (artış oranı)	ISO+L-lizin (artışın önlenme oranı#)
TSA	165.09	85.93
LSA	154.53	83.51

*Kontrol grubu değerleri 100 kabul edilmiştir.

#ISO grubu değerleri 100 kabul edilmiştir.

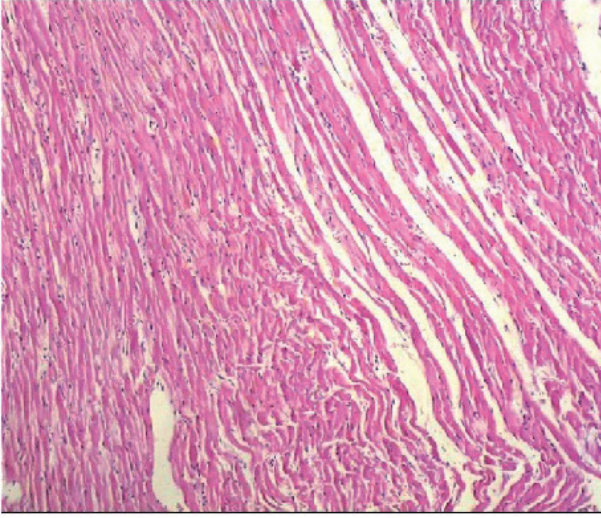
TSA: Total sialik asit, LSA: Lipide bağlı sialik asit

İsopterrenol ile uyarılan infarktüste irreversible miyosit hasarına bağlı olarak serum alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), kreatin kinaz ve laktat dehidrojenaz (LDH) enzim aktiviteleri [25] ve serum TnI ve TnT düzeyleri [27,10] artar. TnI, sadece miyokartta bulunması nedeniyle miyokart hasarının oldukça duyarlı bir indikatörü olarak kabul edilmektedir [30,31]. İnfarktüs sonrası 4-6 saatte kanda yükselmeye başlayan TnI, 11. saatte pik yapar (10-24 saat arası) ve yaklaşık 5 günde normal seviyesine döner [32]. L-Lizinin, literatürde, serum ALT, AST, CK ve LDH artışını önlediğini gösteren çalışmalar bulunmasına rağmen [25], miyokarda son derece spesifik bir protein olan troponin I (TnI) düzeylerine etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır.

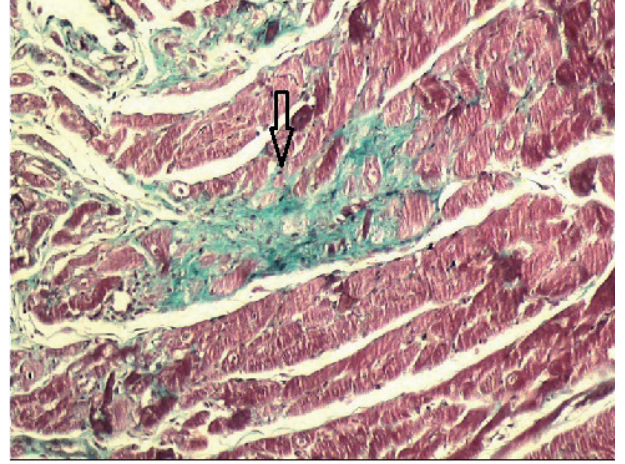
Çalışmamızda, serum TnI düzeyleri, kontrol grubunda 0.01 ng/mL'nin altında kalırken, ISO grubunda ve ISO+L-lizin grubunda infarktüsü kanıtlar biçimde belirgin artış gösterdi. Bununla birlikte ISO+L-lizin grubunun serum TnI düzeyleri ISO grubuna göre anlamlı olarak düşüktü (p<0.05 t=2.45) (Şekil 1).

Histopatolojik incelemede, ISO grubunda 15. günde kalp kaslarında miyokart infarktüsü ile uyumlu belirgin atrofi ve fibrotik değişiklik gözlenirken (Şekil 3), ISO+L-lizin grubunda ise miyokart infarktüsü ile uyumlu fakat daha hafif dereceli atrofi bulguları ve kalp kasları arasında dağılan hafif dereceli bağ dokusu gelişimi saptandı (Şekil 4). ISO+L-lizin grubunda, miyokardial hücre hasarının spesifik bir göstergesi olan serum TnI düzeylerinin ISO grubuna göre daha düşük bulunması, lizin verilen grupta miyokardial hücre hasarının daha az olduğunu, daha açık bir deyişle L-lizin verilisinin miyokardial hücre hasarını önlediğini kanıtlamaktadır. ISO+L-lizin grubunda atrofi ve bağ dokusu gelişiminin ISO grubuna göre daha hafif olması da bu bulguyu histopatolojik olarak desteklemektedir.

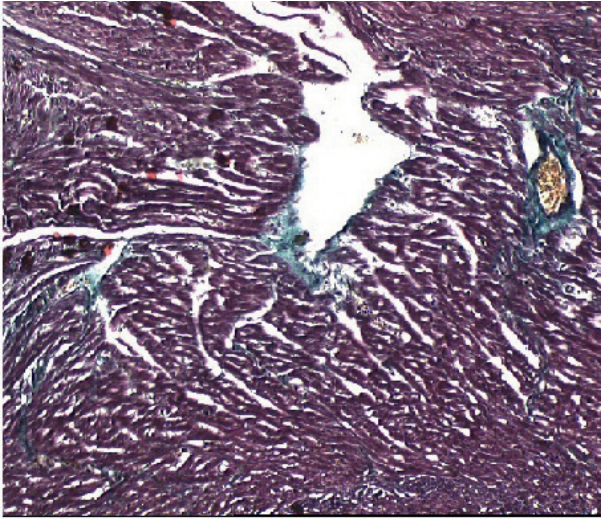
İnfarktüs sonrası serumda gözlenen sialik asit artışı için iki farklı mekanizma ileri sürülmüştür. Bu mekanizmalardan biri, sialik asit kalıntıları içeren akut faz proteinlerinin karaciğerden dolaşıma artmış atılımıdır [6,7]. Akut faz proteinleri, sialik asidin proteine bağlı



Şekil 2. Kontrol grubu kalp kasında düzenli yapı (HEx50).



Şekil 3. ISO grubunun akut miyokart infarktüsünün 15. gününe ait kalp dokusunda kalp kasları arasında giren bağ dokusu (Mason Trikomx100).



Şekil 4. ISO+L-lizin grubunun akut miyokart infarktüsünün 15. gününe ait kalp dokusunda kalp kasları arasında dağılan hafif dereceli bağ dokusu (Mason Trikomx50).

fraksiyonunu oluşturduğundan, dolaşımda artmaları sadece TSA artışına katkıda bulunabilir ve LSA'daki artışı açıklamaz. İnfarktüs sonrası sialik asit artışı için ileri sürülen diğer mekanizma ise sialik asidin hücre hasarına bağlı olarak hücre ve hücre membranlarından dolaşıma salıverilmesidir [8,11]. Yüksek dozda arseniğe maruz kalan sıçanlarda epitelyal hücre membran enzimleri ile eş zamanlı salıverilen sialik asidin kısmi membran hasarını gösterdiği ileri sürülmüştür [33]. Crook MA ve ark. [34], serum glikoprotein komponentlerindeki artışta, hücre membran glikokonjugatlarından dolaşıma sekresyonun rolü olabileceğini bildirmişlerdir. Miyokart infarktüsü geçiren bireylerde infarktüsten 24 saat sonra serum TSA artışı ile laktat dehidrojenaz artışı arasında

pozitif bir korelasyon bulunduğu bildirilmiş ve infarktüs sonrası sialik asit artışından, hasara bağlı olarak hücre veya hücre membranından sialik asidin salıverilmesinin sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür [8]. Koroner arter bypass ameliyatı olan hastalarda sialik asidin, miyokardial hücre hasarını saptamada faydalı bir belirteç olabileceği de gösterilmiştir [35].

Akut miyokart infarktüsülü hastaların serum LSA düzeylerinde önemli bir artışın bulunduğu ve bu artışın hücre ve/veya hücre membranından sialik asidin salıverilmesinin bir indikatörü olabileceği bildirilmiştir [11]. Alkolik bireylerde serum LSA'nın hepatosellüler hasarın belirteçleri olan AST ve GGT ile pozitif ilişkili olduğu ve LSA artışının karaciğer hücre hasarı ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir [36]. Miyokart infarktüsü sonrası sialik asidin hücre ve hücre membranlarından dolaşıma salıverilmesinde sialidaz enzimi [37] ya da reaktif oksijen türleri (ROS) nin rol oynayabileceği ileri sürülmüştür [38].

Çalışmamızda hem ISO grubunun hem de ISO+L-lizin grubunun serum TSA düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulduk (her ikisi için $p<0.000$). Diğer yandan, ISO+L-lizin grubunun serum TSA düzeyleri ISO grubundan anlamlı olarak düşüktü ($p=0.012$). ISO ($p=0.000$) ve ISO+L-lizin ($p=0.001$) grubunun serum LSA düzeyleri de kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu. Diğer yandan, hücre hasarını önleyici etkiye sahip L-lizin verilmesi, TSA'ya benzer biçimde, infarktüs sonrası serum LSA düzeylerindeki artışı da anlamlı olarak önledi ($p=0.003$). Literatürde, ISO ile oluşturulan infarktüs modelinde L-lizin'in serum total ve lipide bağlı sialik asit düzeylerine etkisini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bununla birlikte ISO ile uyarılan miyokart infarktüsünde karnitin [9] veya S-allilsistein [39] gibi antioksidanların verilmesiyle serum TSA düzeylerindeki artışın önlenildiği gösterilmiştir. ISO grubuna göre, ISO+L-lizin grubunda, Tnl'ya ben-

zer biçimde serum TSA ve LSA düzeylerinin de daha düşük bulunmuş olması miyokardial hücre hasarının önlenmesiyle serum sialik asit artışının da önlenebildiğini göstermektedir. Bu bulgu, miyokart infarktüsü sonrası serumda gözlenen sialik asit artışında miyokardial hücre hasarının rolü olabileceğini ileri süren çalışmaları (8,11) desteklemektedir.

Çalışmamızda, kontrol ve deney gruplarında TSA, LSA ve kardiyak hücre hasarının göstergesi olan TnI arasında anlamlı bir korelasyon bulunamadı. ISO ile oluşturulan infarktüs modelinde daha önceki bir çalışmada da TSA ve LSA ile CK-MB ve TnI arasında korelasyon bulunmadığı bildirilmiştir [10]. Aynı çalışmada, her ikisi de kardiyak hücre hasarının önemli belirteçleri olmasına rağmen ve her ikisi de isoproterenole yanıt olarak kanda belirgin bir artış göstermesine rağmen TnI ile CK-MB arasında da korelasyon bulunmadığı bildirilmektedir. Bu çelişki, isoproterenol uygulamasına verilen bireysel yanıtlardaki farklılıklardan kaynaklanabilir.

Kontrol grubunun değerleri 100 kabul edilerek ISO grubunda hesaplanan TSA'daki ve LSA'daki "artış oranı" birbirine oldukça benzer bulundu. Bu bulgu, isoproterenol ile oluşturulan hücre hasarında gözlenen serum total sialik asit düzeylerindeki artışta, lipide bağlı sialik asit fraksiyonundaki artışın önemli katkısı olduğunu göstermektedir. ISO grubunun değerleri 100 kabul edilerek ISO+L-lizin grubunda hesaplanan TSA'daki ve LSA'daki "artışın önlenme oranı" da neredeyse birbirinin aynıydı. Bu bulgu L-lizin verilışı ile serum total sialik asit düzeylerindeki artışın önlenmesinde, lipide bağlı sialik asit fraksiyonundaki artışın önlenmesinin önemli bir paya sahip olduğunu göstermektedir. Her iki bulgu da miyokart infarktüsü sonrası serumda gözlenen sialik asit artışında miyokardial hücre hasarının rolü olabileceğini ve artmış LSA düzeylerinin hücre ve/veya hücre membranından sialik asidin salıverilmesinin bir indikatörü olabileceğini ileri süren çalışmaları desteklemektedir (8,11).

Çalışmamız, ISO ile uyarılan miyokart infarktüsünde L-lizinin, serum TnI, total ve lipide bağlı sialik asit düzeylerindeki artışı ve kalp dokusunda atrofi ve bağ dokusu gelişimini önlediğini göstermiştir. L-Lizinin, serum TnI düzeylerindeki artışı ve kalp dokusunda atrofi ve bağ dokusu gelişimini önlemesi, miyokardial hücre hasarına karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğunu kanıtlamaktadır. Diğer yandan, L-lizin verilışı ile serum TSA ve LSA düzeylerindeki artışın önlenmesi miyokardial hücre hasarının önlenmesiyle serum sialik asit artışının da önlenebildiğini göstermektedir. Sonuç olarak, miyokart infarktüsü sonrası serumda gözlenen sialik asit artışında miyokardial hücre hasarının rolü olabileceğini söyleyebiliriz.

Bilgi ve Teşekkür

Bu çalışma, 21.Ulusal Biyokimya Kongresi'nde poster olarak sunulan Selda UZGUR'un Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından desteklenmiş (TÜ-

BAP-785) yüksek lisans tez projesinin bazı verileri kullanılarak hazırlanmıştır.

Tarafsız beyanı: Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur.

Kaynaklar

- [1] Byrne B, Donohoe GG, O'Kennedy R. (2007) Sialic acids: carbohydrate moieties that influence the biological and physical properties of biopharmaceutical proteins and living cells. *Drug Discov Today* 12(7-8):319-26.
- [2] Schauer R, Kamerling JP. (1997) Chemistry and biochemistry of sialic acids. In: Montreuil J, Vlieghehart JFG, Schacter H, editors. *Glycoproteins II*, s. 243-402, Elsevier, Amsterdam.
- [3] Millar JS. (2001) The sialylation of plasma lipoproteins. *Atherosclerosis* 154(1):1-13.
- [4] Gopaul KP, Crook MA. (2006) Sialic acid: a novel marker of cardiovascular disease? *Clin Biochem* 39(7):667-81.
- [5] Tseke P, Grapsa E, Stamatiopoulos K, Samouilidou E, Rammos G, Papamichael C, Zakopoulos N. (2008) Correlations of sialic acid with markers of inflammation, atherosclerosis and cardiovascular events in hemodialysis patients. *Blood Purif* 26(3):261-6.
- [6] Haq M, Haq S, Tutt P, Crook M. (1993) Serum total sialic acid and lipid-associated sialic acid in normal individuals and patients with myocardial infarction and their relationship to acute phase proteins. *Ann Clin Biochem* 30(Pt 4):383-6.
- [7] Crook M, Haq M, Haq S, Tutt P. (1994) Plasma sialic acid and acute phase proteins in patients with myocardial infarction. *Angiology* 45(8):709-15.
- [8] Gokmen SS, Kiliçli G, Ozelik F, Gulen S. (2000) Serum total and lipid-bound sialic acid levels following acute myocardial infarction. *Clin Chem Lab Med* 38:1249-55.
- [9] Mathew S, Menon PVG, Kurup PA. (1986) Effect of administration of carnitine on the severity of myocardial infarction induced by isoproterenol in rats. *Aust J Exp Biol Med Sci* 64(Pt1):79-87.
- [10] Kazezoğlu C, Usta U, Süer Gökmen S. (2009) Deneysel Miyokart İnfarktüsünde Total ve Lipide Bağlı Sialik Asit Düzeyleri. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi* 7(1):7-15.
- [11] Gokmen SS, Kazezoğlu C, Sunar B, Özçelik F, Güngör Ö, Yorulmaz F, Gülen Ş. (2006) Relationship between serum sialic acids, sialic acid-rich inflammation-sensitive proteins and cell damage in patients with acute myocardial infarction. *Clin Chem Lab Med* 44:199-206.
- [12] Morris SM Jr.(2009) Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. *Br J Pharmacol*. Jul;157(6):922-30.
- [13] Chang CI, Liao JC, Kuo L. (1998) Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *Am J Physiol* 274(1 Pt 2):H342-8.
- [14] Vanhoutte PM. (2008) Arginine and arginase: endothelial NO synthase double crossed? *Circ Res* 102(8):866-8.
- [15] Lass A, Suessenbacher A, Wölkart G, Mayer B, Brunner F. (2002) Functional and analytical evidence for scavenging of oxygen radicals by L-arginine. *Mol Pharmacol* 61(5):1081-8.
- [16] Wink DA, Hanbauer I, Krishna MC, DeGraff W, Gamson J, Mitchell JB. (1993) Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(21):9813-7.
- [17] Arnaud C, Laubriet A, Joyeux M, Godin-Ribuot D, Rochette L, Demenge P, Ribouot C. (2001) Role of nitric oxide synthases in the infarct size-reducing effect conferred by heat stress in isolated rat hearts. *Br J Pharmacol* 132(8):1845-51.

- [18] Kiziltepe U, Tunçtan B, Eyiletan ZB, Sirlak M, Arikbuku M, Tasoş R, Uysale A, Ozyurda U. (2004) Efficiency of L-arginine enriched cardioplegia and non-cardioplegic reperfusion in ischemic hearts. *Int J Cardiol* 97(1):93-100.
- [19] Smulders RA, Aarsen M, Teerlink T, De Vries PM, Van Kamp GJ, Donker AJ, Stehouwer CD. (1997) Haemodynamic and biochemical responses to L-arginine and L-lysine infusions in normal subjects: L-arginine-induced vasodilatation cannot be explained by non-specific effects of cationic amino acids. *Clin Sci (Lond)* 92(4):367-74.
- [20] Kato T, Sano M, Mizutani N. (1987) Inhibitory effect of intravenous lysine infusion on urea cycle metabolism. *Eur J Pediatr* 146(1):56-8.
- [21] Egan JM, Henderson TE, Bernier M. Arginine enhances glyco-gen synthesis in response to insulin in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol* 1995 Jul;269(1 Pt 1):E61-6.
- [22] Ashman N, Brunini TM, Mann GE, Mendes Ribeiro AC, Yaşob MM. (2006) Increased L-arginine transport via system b₀+ in human proximal tubular cells exposed to albumin. *Clin Sci (Lond)* 111(6):389-99.
- [23] Lorzynski G, Suschek CV, Kolb-Bachofen V. (2006) In hepatocytes the regulation of NOS-2 activity at physiological L-arginine levels suggests a close link to the urea cycle. *Nitric Oxide* 14(4):300-8.
- [24] Jung C, Gonon AT, Sjöquist PO, Lundberg JO, Pernow J. (2010) Arginase inhibition mediates cardioprotection during ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc Res* 85(1):147-54.
- [25] Ebenezer KK, Sathish V, Devaki T. (2003) Effect of L-arginine and L-lysine on lysosomal hydrolases and membrane bound phosphatases in experimentally induced myocardial infarction in rats. *Mol Cell Biochem* 247(1-2):163-9.
- [26] Rona G, Chappel CI, Balazs T, Gaudry R. (1959) An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. *AMA Arch Pathol* 67: 443-55.
- [27] Acikel M, Buyukokuroglu ME, Aksoy H, Erdogan F, Erol MK. (2003) Protective effects of melatonin against myocardial injury induced by isoproterenol in rats. *J Pineal Res* 35: 75-9.
- [28] Warren L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J Biol Chem* 1959; 234(8):1971-5.
- [29] Katopodis N, Hirsaut Y, Geller NL, Stock CC. (1982) Lipid-associated sialic acid test for the detection of human cancer. *Cancer Res* 42: 5270-5.
- [30] McCord J, Nowak RM, Hudson MP, McCullough PA, Tomlanovich MC, Jacobsen G, Tokarski G, Khoury N, Weaver WD. (2003) 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* 42(3): 343-50.
- [31] Lusher MS, Thygesen K, Ravkilde J, Heickendorff L. (1997) Applicability of cardiac troponin T and I for early risk stratification in unstable coronary artery disease. TRIM study group. Thrombin inhibition in myocardial ischemia. *Circulation* 96:2578-85.
- [32] Vickery J, Pincus MR, Zimmerman HJ, Henry JB. (1996) Clinical enzymology. In: Henry JB (Ed.). *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, s.268-95, 19th ed, W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- [33] Upreti RK, Kannan A, Pant AB. (2007) Experimental exposure of arsenic in cultured rat intestinal epithelial cells and cell line: toxicological consequences. *Toxicol In Vitro* 21(1):32-40.
- [34] Crook MA, Earle K, Morocutti A, Yip J, Viberti G, Pickup JC. (1994) Serum sialic acid, a risk factor for cardiovascular disease, is increased in IDDM patients with microalbuminuria and clinical proteinuria. *Diabetes Care* 17(4):305-10.
- [35] Berkan O, Sagban M. (2002) Sialic acid or troponin T to detect perioperative myocardial damage in patients undergoing elective coronary artery bypass grafting. *Circ J* 66(11):1019-23.
- [36] Cylwik B, Chrostek L, Krawiec A, Supronowicz Z, Koput A, Szmitkowski M. (2010) Lipid-bound sialic acid in alcoholics participates in increased level of total sialic acid. *Alcohol* 44(5):457-62.
- [37] Hanson VA, Shettigar UR, Loungani RR, Nadjicka MD. (1987) Plasma sialidase activity in acute myocardial infarction. *Am Heart J* 114: 59-63.
- [38] Eguchi H, Ikeda Y, Ookawara T, Koyota S, Fujiwara N, Honke K, Wang PG, Taniguchi N, Suzuki K. (2005) Modification of oligosaccharides by reactive oxygen species decreases sialyl lewis x-mediated cell adhesion. *Glycobiology* 15(11): 1094-10.
- [39] Padmanabhan M, Rajadurai M, Prince PS. (2008) Preventive effect of S-allylcysteine on membrane-bound enzymes and glycoproteins in normal and isoproterenol-induced cardiac toxicity in male Wistar rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 103(6):507-13.