

Orijinal Makale

Koroner Kalp Hastalarında Asimetrik Dimetil Arjinin (ADMA) Düzeyleri ve Dimetilarjinin Dimetilamino Hidrolaz (DDAH E.C. 3.5.3.18) Enziminin (DDAH1) T87M Mutasyonunun İncelenmesi

(Investigation of the (DDAH1) T87M mutation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH E.C. 3.5.3.18) (DDAH 1) enzyme and the levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in patients with coronary heart disease)

Sedat ABUŞOĞLU¹, Ali ÜNLÜ¹, Hüseyin Tuğrul ÇELİK², Alpaslan TANER¹, Mehmet KAYRAK³, Mehmet ÖÇ⁴

¹ Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, KONYA

² Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya, ANKARA

³ Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı, KONYA

⁴ Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, KONYA

ÖZET

Amaç: Koroner kalp hastalığı olan bireylerde genetik olarak polimorfizm olması kardiyovasküler olaylara yatkınlığı artırabilir. Dimetilarjinin Dimetilamino Hidrolaz (DDAH) enziminde bu genetik değişimin saptanması ile bu hastalık grubunda daha ileri tedavi protokolleri geliştirilmesine katkı sağlamak için koroner kalp hastalarında Asimetrik Dimetil Arjinin (ADMA) seviyeleri ve DDAH 1 (E.C. 3.5.3.18) enziminin T87M mutasyonu incelendi.

Materyal ve Metot: Konya bölgesinde yaşayan 50 koroner kalp hastası ve 50 kontrol bireyi çalışmaya dahil edilmiştir. Serum örneklerinden ADMA yüksek performanslı sıvı kromatografisi, tam kan örneklerinden izole edilen DNA örneklerinden DDAH 1 T87M mutasyonu PCR yöntemi ile çalışıldı.

Bulgular: ADMA düzeyleri hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuş olup Arjinin/ADMA oranlarında istatistiksel olarak bir farklılık gözlenmemiştir (Sırasıyla $p < 0,001$ ve $p = 0,08$). Hasta grubunda trigliserid düzeyleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek ($p = 0,033$), Yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL)-kolesterol seviyeleri ise düşük tespit edilmiştir ($p < 0,001$). Hasta grubundan bir kişide DDAH 1 T87M gen polimorfizmi "heterozigot" bulunurken "homozigot" varyant hiçbir katılımcıda gözlenmemiştir. Diğer katılımcılarda genin ilgili bölgesi "wild tip" olarak belirlenmiştir.

Sonuçlar: Daha geniş bir toplum kesimi ile yapılacak polimorfizm çalışmaları ve bu polimorfik bireylerde risk etmenlerinin detaylı olarak incelenmesi yüksek ADMA düzeylerinin kardiyovasküler olaylardaki rolünü netleştirilmesi adına katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Koroner kalp hastalığı; dimetilarjinin dimetilamino hidrolaz; genetik polimorfizm; risk değerlendirmesi

ABSTRACT

Background: Genetic polymorphism may enhance the predisposition to cardiovascular events in patients with coronary heart disease (CHD). The aim of this study is to contribute further treatment protocol development via investigation serum ADMA levels and dimethylarginine dimethylaminohydrolase DDAH 1 (E.C. 3.5.3.18) T87M mutation of CHD patients.

Material and Methods: 50 CHD patients and 50 healthy volunteers from Konya region were included to this study. Serum ADMA levels were analyzed by high performance liquid chromatography. DDAH (E.C. 3.5.3.18) T87M mutation were determined by PCR from extracted whole blood DNA samples.

Results: ADMA levels were significantly higher in patient group compared to control group and there was no statistically difference between groups for Arginine / ADMA ratio ($p < 0.001$, $p = 0.08$ respectively). Triglyceride levels were significantly higher in patient group compared to control group ($p = 0.033$) and HDL-cholesterol levels were significantly lower in patient group compared to control group ($p < 0.001$). In DDAH 1 T87M polymorphism gene analysis, there was only one heterozygote patient, the other participants were wild-type.

Conclusions: Polymorphism studies with wider population and detailed investigation of risk factors in these polymorphic subjects will contribute to ensure the role of high ADMA levels in cardiovascular diseases.

Key Words: Coronary heart disease; dimethylarginine dimethylaminohydrolase; genetic polymorphism; risk assesment

GİRİŞ

Kardiyovasküler hastalıklar tüm dünyada farklı etnik gruplardaki erkek ve kadınlarda önde gelen

ölüm nedenlerinden biridir. Kardiyovasküler hastalıklara yol açan durumlardan birisi koroner arterlerin daralmasına neden olan aterosklerozdur¹⁻³.

Son yıllarda aterosklerozda inflamasyonun rolüne dair kanıtlar artmaktadır². İnflamasyonun ateroskleroz, ateromatöz plak büyümesi ve plak

Yazışma adresi

Sedat ABUŞOĞLU
Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, KONYA
e-mail: sedatabusoglu@yahoo.com
Yazının geldiği tarih : 01.04.2014
Yayına kabul tarihi : 20.05.2014

kopmasındaki rolünün daha iyi anlaşılması ileriki dönemde kardiyovasküler hastalık riski altında olan bireylerin tanımlanabilmesi için dolaşımında bulunan yangı biyobelirteçlerine olan ilgiyi tetiklemiştir⁴. ADMA, serbest L-arjininin metillenmesi ile oluşmamaktadır. ADMA, hücre çekirdeğinde baskın olarak bulunan birtakım proteinler aracılığıyla L-arjininin posttranslasyonel düzenlenmesi ile açığa çıkar. Arjinin kalıntılarının metilasyonu, protein arjinin N-metiltransferazlar (PRMT) denen birtakım enzimlerce gerçekleştirilmektedir.

Proteinler yıkıma uğradığında serbest metilarjininler açığa çıkmaktadır.

İki tip PRMT aktivitesi bildirilmiştir. Tip 1, ADMA'ı oluştururken Tip 2, Simetrik dimetil arjinin (SDMA)'i meydana getirmektedir⁵. ADMA, Endotelial Nitrik oksit sentaz (eNOS)'ın aktivitesini azaltmak suretiyle vasküler yapıyı etkileyebilir.³⁵ Hasar görmüş damar duvarını örten endotelial hücreler, artmış hücre içi ADMA seviyelerine sahip olup bozulmuş endotel bağımlı vazodilatasyon gösterirler^{6,7}. ADMA seviyesindeki yükseklikler, aterogenezdaki klinik süreçlerle ilişkilidir. Değişik seviyelerde risk taşıyan Japon bireylerde yapılan bir çalışmanın çoklu değişken analizleri, ADMA düzeyi ve yaşın, karotis intima-media kalınlığının tek bağımsız belirteci olduğunu bildirmektedir⁸. ADMA'nin (fakat SDMA'nin değil) yıkımı büyük oranda DDAH enzimi tarafından gerçekleştirilir^{9,10}. DDAH enziminin DDAH 1 ve DDAH 2 olmak üzere 2 benzer şeklinin olduğu, azalmış DDAH enzim etkisine yol açabilecek polimorfizmlerin ADMA birikimi ile sonuçlanabileceği ve NO sinyal iletiminde düşüşe yol açabileceği bildirilmektedir.

Araştırmacılar bu nedenle baskın şekil olan DDAH 1 enzim şeklinin hastalık araştırmalarında aday bir gen olabileceğini bildirmektedirler¹¹. DDAH 2-ADMA yolağının kardiyak Nitrik Oksit (NO) üzerine etkilerinin olduğu fakat normal koşullarda kan basıncına ılımlı etkiler sağladığını gösterdiğini bildirmişlerdir¹².

Çalışmamızda koroner kalp hastalarında arjinin metabolizmasında ortaya çıkan değişikliklerin araştırması amaçlanmıştır. Bu çalışmada çalışmaya gönüllü olarak katılan koroner kalp hastalarında ADMA seviyeleri ve DDAH (EC 3.5.3.18) enziminin genetik değişimi incelenmiştir. Koroner kalp hastalığı olan bireylerde genetik olarak polimorfik olması kardiyovasküler olaylara yatkınlığı arttırabilir.

DDAH enziminde bu genetik değişimin saptanması ile bu hastalık grubunda daha ileri tedavi protokolleri geliştirilmesine katkı sağlaması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Konya bölgesindeki ateroskleroz tanısı almış olan 50 birey ve koroner ateroskleroz bulunmayan 50 kontrol bireyi çalışmaya dahil edilmiştir. Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında yapılmış olup Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Etik kurulundan onay alınmış (23.07.2007 başvuru tarih ve 2007/161 karar numarası) ve hastalara bilgilendirici onam formu verilmiştir.

ADMA ve Arjinin için hastalar oturur pozisyonda iken iki ayrı düz tüpe venöz kan örnekleri alındı. ADMA ve Arjinin örnekleri hemen soğuk zincire riayet edilerek soğutmalı santrifüj ile +4 °C de 2000 x g de 5 dakika santrifüj edildikten sonra serumları ayrıldı. Ayrılan serumlar sülfosalisilik asit ile uygulanan protein uzaklaştırılması işleminden sonra ADMA ve Arjinin çalışmaları için ependorf tüplere aktarılıp 80 °C de çalışma gününe kadar muhafaza edildi. DDAH gen polimorfizm çalışmaları için aynı hasta ve kontrol grubundan K₂-EDTA içeren tam kan tüplerine kan örnekleri alındı.

ADMA Standardı (Calbiochem, Lot: 311204, US), Arjinin Standart (Merck, 519-K 538944, Darmstadt Germany), HCl (Merck, K 25039614-814 Darmstadt Germany), Metanol (Merck, K 26301108-914 Darmstadt Germany), Sodyum Asetat (CH₃COONa(H₂O)₃, Merck, 9023840A Darmstadt Germany), Tetrahidrofuran (Merck, K 34870914 529 Darmstadt Germany), Sülfosalisilik Asit (Merck 53656684 Darmstadt Germany), O-Fitaldialdehit (Merck S 30064448 Darmstadt Germany), Borik Asit (Sigma, B 7660), 2-Merkap-toetanol (Merck, Schuchardt), Potasyum Hidroksit (Sigma, 97H08531 Steinheim Germany)

ADMA ve arjinin düzeyleri, floresans dedektörlü (Eksitasyon:338 nm, Emisyon: 425 nm) HPLC cihazında (HP Agilent 1100) 250x4,6 mm uzunluğunda Supelcosil marka 5µm çapında C18 kolon yardımıyla analiz süresi 35 dakika olacak şekilde ayarlanarak ve "gradient pompa" kullanılarak analiz edildi¹³. Hareketli faz olarak A (82/17/1) (v/v/v) sodyum asetat (CH₃COONa (H₂O)₃) çözeltisi (pH=6,8)/metanol/THF ve B (22:77:1) (v/v/v) sodyum asetat (CH₃COONa (H₂O)₃) çözeltisi (pH=6,8) metanol/THF kullanıldı. Hareketli fazlar 0,45 µm filtreler kullanılarak süzüldü ve gaz alınma işlemi gerçekleştirildi. 0. Dakikada %5 oranında B mobil fazından başlanarak 32. Dakikada %100 oranında B mobil fazına geçiş yapıldı ve kolonun tekrar şartlanması için 3 dakika %5 oranında B mobil fazından akış sağlandı.

Hastalardan düz tüplere alınan kanlar bekletilmeden 2000 x g devirde 4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi. Ayrılan serumdan 1 mL alınıp 20 mg sülfosalisilik asit ilave edilip 10 dakika buz banyo-

sunda bekletildi. Tekrar 2000 x g devirde 4 °C' de 10 dakika santrifüj edildi.

Proteinlerin uzaklaştırılması işleminden sonra üstte kalan sıvı kısımdan ADMA ve arjinin analizi yapıldı. Üstte kalan sıvı kısımlar 0,22 çaplı enjektör tipi süzgeçlerden süzülerek sisteme verildi.

Standartlar ve numuneler o-fitaldialdehid (OPA) kullanılarak türevleştirildi. Türevleştirme için 10 mg OPA, 0,5 mL metanol ve 2 mL 0,4 M borat tamponunda (pH=10) çözüldü. Hazırlanan çözeltiye 30 µL merkaptolanol eklendi. Bu çözeltinin dayanıklılığı 2 gün olduğundan her analiz öncesi taze olarak hazırlandı. 10 µL numune üst sıvı kısmı 100 µL OPA ile karıştırılıp 3 dakika oda ısısında bekletilip analiz için cihaza verildi. Bulunan alan yardımıyla standart grafiğinden faydalanılarak örneklerin ADMA ve Arginin değerleri hesaplandı.

Çalışmaya dahil edilen bireylerden her iki EDTA'lı tüpe 2'şer mL kan alındı. Tüplerden biri hastaların DNA ayrımlarını yapmak için kullanıldı. Tam kandan DNA ayrımı DNA ayırım kiti kullanılarak (High Pure PCR Template Preparation kit, Roche Diagnostic, Germany) yapıldı ve DNA numuneleri -20° C' de saklandı. DDAH 1 T87M gen polimorfizmi, Light Cycler türeşim belirleme primer-prob düzeneği (TIB Molbiol Syntheselabor, GmbH, Berlin, Germany) kullanılarak Light Cycler cihazında eş zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi (RT-PCR) ile saptandı. LightCycler Floresan PCR Yöntemi ile gen polimorfizm analizinde, "Light-Cycler floresan PCR" yöntemi (Roche, Mannheim, Almanya) alışımlı polimeraz zincir tepkimesinin floresans ölçüm sistemi ile bir araya getirerek, DNA çoğalmasının eş-zamanlı izlenmesini sağlamaktadır. Bu yöntemde, normal PCR'da kullanılan öncüllere ek olarak, floresans işaretli iki prob kullanılmıştır. Problardan bir tanesi, polimorfizm içeren bölgeye has tasarlanırken, diğeri hemen bunun yakınında (1 baz çifti uzaklıkta) yerleştirilmiştir. Bu yöntemde genotiplerin ayırt edilmesi erime eğrisi analizi (melting curve analysis) ile gerçekleştirilmektedir. Bunun için, PCR'da DNA yükseltmesinin tamamlanmasından sonra, sıcaklık çok yavaş bir şekilde yükselttilerek her bir örnek için erime eğrisi oluşturulmuştur. Sıcaklık yükseltilmesi sırasında normal dizi ile polimorfizm içeren dizinin ayrımı gerçekleşmektedir.

Polimorfizm içeren dizi ile floresans işaretli prob arasında oluşan dupleks yanlış bir eşleşme (mismatch) içerdiğinden, normal dizi ile prob arasında oluşan duplekse oranla daha az dayanıklıdır. Bu durum, çok biçimlilik içeren dupleksin daha düşük bir erime noktasına (melting point) sahip olmasına ve dolayısıyla sıcaklık yükseltilmesi sırasında daha düşük bir sıcaklıkta ayrışmasına yol açmaktadır.

Matematiksel bir çevrim kullanılarak erime eğrilerinden floresans değerinin negatif türevinin sıcaklığa göre değişimini veren eğriler elde edilmekte ve değişik allellere ait farklı erime sıcaklıkları gösteren tepeler izlenmektedir.

Çalışmamızda polimorfizm analizi için periferik lenfositlerden "proteinaz K/izopropanol yöntemi" ile elde edilen genomik DNA ve TIB Molbiol (Syntheselabor, GmbH, Berlin, Almanya) tarafından tasarlanan floresan-ışaretili proplar kullanıldı.

Hibridizasyon karışımı (Taq polimeraz, reaksiyon tamponu, nükleotid karışımı), MgCl₂, primerler, proplar ve genomik DNA toplam 20 µL hacimde karıştırılarak kapillerlere aktarıldı. PCR koşulları daha önce tanımlandığı gibi gerçekleştirildi.

Yükseltmenin tamamlanmasından sonra, sıcaklığın saniyede 0,2 °C artırılarak 40 °C'den 85 °C'ye yükseltilmesiyle erime eğrileri oluşturuldu. Floresan/sıcaklık negatif türevinin sıcaklığa göre çizilmesiyle de, erime eğrileri, erime tepelerine dönüştürüldü.

SPSS v15 programı kullanılarak gerçekleştirildi. Normal dağılım gösteren parametreler arasında gruplar arasındaki farklılık bağımsız örneklem t testi ile incelendi. Normal dağılım göstermeyen parametreler ise Mann Whitney U testi ile analiz edildi. Çalışmamızda gruplara ait bulgular ortalama ±standart sapma şeklinde verildi.

Bulgular arasındaki ilişki Pearson korelasyon testi ile değerlendirilirken p<0,05 olan sonuçlar önemli olarak değerlendirmeye alındı.

BULGULAR

Araştırmaya dahil olan hasta grubu ve sağlıklı kontrollere ait demografik ve biyokimyasal veriler Tablo 1'de sunulmuştur. SPSS programında yapılan bağımsız örneklem testi ile ADMA düzeyleri hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuş olup Arjinin/ADMA oranlarında istatistiksel olarak bir farklılık gözlenmemiştir (Sırasıyla p<0,001 ve p=0,08).

Total kolesterol ve Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL)-kolesterol konsantrasyonlarında anlamlı bir farklılık gözlenmez iken Triglicerid (TG) ve Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein (HDL)-kolesterol düzeyleri hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak farklı bulunmuştur (Sırasıyla p=0,955 ve p=0,960; p=0,027 ve p<0,001).

ADMA düzeylerindeki bu anlamlı fark grafiksel olarak şekilde gösterilmiştir (Şekil 1). ADMA ile Total kolesterol ve LDL-kolesterol arasında herhangi bir ilişki saptanamamıştır. Total kolesterol ile LDL kolesterol arasında ise pozitif bir ilişki bulunmaktadır (Tablo 2). Çalışmamıza dahil edilen 50 koroner arter hastasından sadece bir bireyde DDAH 1 gen heterozigot polimorfizm saptanmıştır.

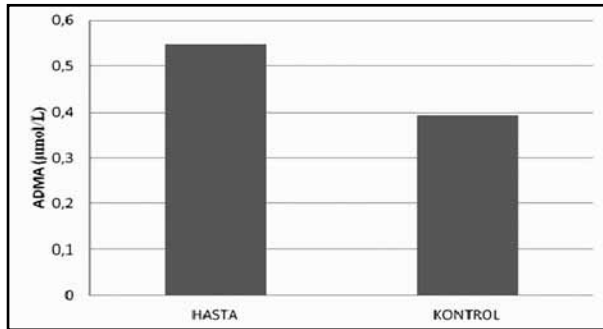
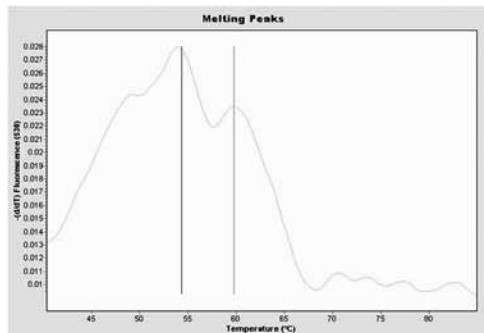
Tablo 1. Hasta ve Kontrol Grubuna Ait Veriler NS=önemsiz

	Hasta Grubu (n=50)	Kontrol grubu (n=50)	p değeri
Yaş	63,7±12	56,9±10	0,005
Cinsiyet (Bayan/Bay)	16/34	20/30	0,520
Sigara Kullanan Sayısı	35	24	0,025
Diabetes Mellitus	22	10	0,010
Kan Basıncı Yüksekliği	33	24	0,070
Pozitif Aile Öyküsü	14	3	0,003
Total Kolesterol (mg/dL)	186,3±51,1	185,8±38,8	NS
LDL-Kolesterol (mg/dL)	114,8±44,6	115,2±32,4	NS
HDL-Kolesterol (mg/dL)	34,2±10,8	44,4±12,1	<0,001
Trigliserid (mg/dL)	190,4±171	131,3±72	0,027
ADMA (µmol/L)	0,54±0,084	0,39±0,10	<0,001
Arjinin (µmol/L)	158±47	142±29	NS
Arjinin/ADMAoranı	291±85	318±28	NS

Tablo 2. Hasta Grubunda ADMA, Total Kolesterol ve LDL-Kolesterol Arasındaki İlişki Grafiği

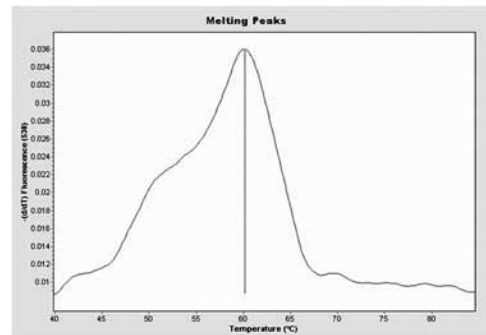
	ADMA	Total Kolesterol
Total kolesterol	.167	
ldl-kolesterol	.121	.899 (**)

** p<0,01 * p<0,05

**Şekil 1.** Hasta ve kontrol grubuna ait ADMA seviyelerinin ortalamaları**Şekil 2.** Hasta grubundan DDAH 1 "heterozigot" bireyin genomik DNA görüntüsü

Hasta grubunda homozigot polimorfik bir yapı gözlenmemiştir. Şekil 2'de heterozigot polimorfik hastanın erime eğrisi grafiği gösterilmiştir. Polimorfik baz, 54 °C'de ayrılma göstermiştir.

Kontrol ve hasta grubunda diğer bireyler ise DDAH 1 polimorfizmi açısından wild tip olarak saptanmıştır (Şekil 3). Wild type baz çiftinin ayrılması 60 °C'de gerçekleşmektedir.

**Şekil 3.** DDAH 1 "wild tip bireyin" genomik DNA görüntüsü

TARTIŞMA

Arterin endoteli aşırı miktarda LDL-kolesterol, glukoz veya homosisteine maruz kaldığı zaman vazodilatasyonu uyararak bozulmuş geçirgenlik gibi çeşitli işlev kayıpları baş göstermektedir. Bu işlev kaybı çok faktörlü olup kesin olan bir bulgu varsa o da yükselmiş ADMA düzeylerinin bu olayda bir rolü olduğudur¹⁴. Artmış ADMA'nın kan basıncı yüksekliği ve ateroskleroz gibi kardiyovasküler hastalıkların patofizyolojisinde bulunduğu ve endotele bağlı disfonksiyonda anahtar rol oynadığına dair çok sayıda literatür bilgisi mevcuttur.^{15,16}

ADMA, ateroskleroz, kardiyovasküler ölüm ve koroner kalp hastalığı olan bireylerde, böbrek yetmezliği olanlarda bağımsız bir risk faktörü olarak bildirilmektedir¹⁷. Arjininden NO oluşumu ADMA gibi çeşitli arjinin bileşikler tarafından baskılanır. Bu bileşikler, pıhtı oluşumu ve ateroskleroz gelişimine sebep olabilir. Akut koroner sendromlu olgularda yapılan çalışmalarda ADMA seviyeleri yüksek olarak bulunmuştur, bu hastaların tıbbi tedavi sonrası ADMA seviyelerinin azaldığı gözlenmiştir¹⁸. Masuda ve ark. karotis arterlerine balon uygulanan tavşanların yenilenen endoteliumunda sağlıklı olanlara göre düşük hücre içi arjinin ve yüksek ADMA seviyeleri bulmuşlardır⁷.

Bu bulgular yenilenen endotelyumda DDAH etkinliğinin düşük olduğunu ve arjinin seviyesinin yetersiz olduğunu düşündürmektedir¹⁹.

ADMA seviyeleri kalp yetmezliği olan hastalarda da artar. ADMA'nın ventrikül kasılması ve kalp hızını azaltma yeteneği vardır. ADMA'nın kardiyak işlevdeki rolü ve kalp yetmezliğindeki endotel işlevindeki rolü tam aydınlatılamamıştır²⁰.

Yüksek ADMA düzeylerinin kardiyovasküler olay sıklığının artması yanında konsantrik sol ventriküler hipertrofi ve karotis arter intima media kalınlığının artması ile de kuvvetli bir ilişki gösterdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir²¹.

Karotis intima media kalınlığı güçlü kardiyovasküler risk belirticidir²². Plazma ADMA konsantrasyonları klinik aşkar aterosklerozu olanlarda olmayanlara göre yüksek olarak bulunmuştur²³.

Kardiyovasküler hastalık için tedavinin amacı artmış ADMA'nın etkilerini ortadan kaldırmak veya ADMA seviyelerini azaltmaktır. Teorik olarak arjinin ADMA'nın yerini alabilir, NOS aktivitesini tamir edebilir. Arjininin kolesterol yüksekliği olan hastalarda endotel disfonksiyonu ve periferel damar hastalığı olan hastalarda yürüme zorluğunu düzelttiği gözlenmiştir. Bu hastalarda ADMA düzeylerini azaltmada diğer bir yol, DDAH üretimini veya enzim işlevini artırmaktır²⁴.

Bizim çalışmamızda da literatürde ki çalışmalara benzer olarak koroner arter hasta grubunda ADMA düzeyleri yüksek olarak tespit edilmiştir ($p < 0,001$).

Maymunlar ve tavşanlar ile yapılan deneysel çalışmalarda kolesterol ağırlıklı diyetin kendi başına ADMA düzeylerini arttırdığı ve endotel disfonksiyonunu tetiklediği bildirilmiştir²⁵.

İnsanlarda yapılan çalışmalarda ADMA seviyeleri ile kolesterol seviyeleri arasında pozitif ilişki rapor etmektedir. Aynı yaş grubunda kolesterol yüksekliği olan bireylerde kolesterol düzeyleri normal olanlara kıyasla ADMA seviyeleri yaklaşık iki kat yüksek bulunurken LDL-kolesterol düzeyleri ile pozitif ilişki saptanmıştır²⁴. Bizim çalışmamızda koroner arter hasta grubunun ADMA düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek olmasına rağmen her iki grup arasında Total kolesterol ve LDL-kolesterol düzeylerinde anlamlı bir farklılık bulunmadığı gibi bizim bulgularımız literatürdeki bazı çalışmalara ile aynı yöndedir²⁶.

Bu çalışmanın kısıtlılıkları arasında hasta grubunun kullandığı ilaçların net olarak bilinmemesi yer alabilir. Öyle ki 2010 yılında yapılan bir çalışmada antioksidanlar, östrojen, A vitamini, ACE baskılayıcıları, AT1 reseptör antagonistleri, lipid düşürücü, hipoglisemik ve beta adrenoreseptör bloke edici ilaçların ADMA düzeylerini düşürdüğü bildirilmektedir²⁷. Koroner arter hasta grubunda

söz konusu ilaçların kullanımı yaygın olmakla birlikte lipid düzeyleri kontrol grubunun değerlerine yakın olarak saptanmıştır. Fakat buna rağmen ADMA düzeylerindeki düşüş her halükarda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın sürmesine mani olamamıştır fakat ADMA ile lipid düzeyleri arasında ilişki saptanamamasının sebebi olabilir. ADMA düzeylerinin tespitinde bu çok yönlü değişkenlerin dikkate alınarak daha büyük bir hasta grubu ile yapılacak çalışmalar bu değişkenin kardiyovasküler hastalıkları öngörmeye bir belirteç olarak kullanılmasına imkan sağlayabilir. Yapılan bir çalışmada plazma ADMA düzeylerinin 2,4 µmol/L sınırında bir eşik değer alınması yavaş koroner akım fenomeni için %65,4 duyarlık ve %74,2 özgüllüğe sahip olunmasını sağladığı rapor edilmiştir²⁸. ADMA düzeylerinin artmasının en yaygın nedeni bozulmuş DDAH işlevidir.

DDAH enzimi aktif bölgesinde bir reaktif sülfidril grubu içerdiğinden oksidatif strese duyarlıdır¹⁰.

Endotelin yüksek oranda LDL-kolesterol gibi oksidatif stresi tetikleyen bir aracı moleküle maruz kalması DDAH işlevini azalttığı gibi ADMA seviyelerini yükseltebilir²⁹. İnsan dokularında bugüne dek DDAH enziminin iki adet şekli saptanmış olup (DDAH 1 ve DDAH 2) bu enzimlerin doku dağılımları kısmen örtüşmektedir. DDAH 2 birçok dokuda DDAH aktivitesinin sadece çok az bir kısmına katkı sağlarken DDAH 1 enziminin azaltılması ADMA birikimine ve nitrik oksit sinyal yolağının aksamasına yol açmaktadır³⁰. DDAH 1 enzim şeklinin serum ADMA düzeyleri için belirleyici bir rolü olduğu, DDAH 2'nin ise endotelin nitrik oksit aracılı işlevlerini düzenlediği öne sürülmektedir³¹. DDAH gen polimorfizminin insanlarda kardiyovasküler hastalık riskine aracılık edebileceğine dair çok az çalışma olmakla birlikte etnik olarak bu polimorfizmin saptandığı çalışma sayısı da çok azdır. Biz çalışmamızda koroner arter hastalığı olan bireylerde DDAH 1 gen polimorfizmini araştırdık ve bir hastada heterozigot bir değişken tespit ettik.

Bizim çalışmamızdan önce DDAH 2 geninde fonksiyonel insersiyon/delesyon bildiren bir çalışma mevcuttur³⁴. 2009 yılında ise DDAH 2 başlatma bölgesinde 1151 A/C [(tek nükleotid çok biçimliliği (SNP) 1] ve -449 G/C (SNP 2) polimorfizmi kan basıncı yüksekliği sıklığı ile birliktelik gösterecek şekilde araştırılmıştır³².

Yine yapılan bir çalışmada 48 rastgele seçilen Çinli bireyden alınan örneklerden DDAH 1 geni sekanslanmış biri başlatıcı bölgede, biri ekzon 4'te, 5'i intronik bölgelerde ve 2,3 okunmayan bölgelerde olmak üzere 9 adet polimorfizm saptanmıştır. Bu değişkenlerden birisinde yüksek ADMA düzeyleri tespit edilmiş olup yüksek kardiyovasküler hastalık riski oluşumu DDAH 1 başlatıcı

bölgesinin baskılanmasına bağlanmıştır³³. Bizim çalışmamızda da heterozigot olarak saptanan bireyin ADMA düzeyi kontrol grubuna göre yüksektir. Türk toplumunda bu enzimin polimorfizminin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır.

Daha geniş bir toplum kesimi ile yapılacak polimorfizm çalışmaları ve bu polimorfik bireylerde risk faktörlerinin detaylı olarak incelenmesi yüksek ADMA düzeylerinin kardiyovasküler olaylardaki rolünü netleştirilmesi adına katkı sağlayacaktır.

REFERANSLAR

- Murray CJ, Lopez AD. Global mortality disability and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease study. *Lancet* 1997;349:36-42.
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis. *NEJM* 1986;314:488-512.
- Tousoulis D, Davies G, Stefanadis C, Toutouzas P, Ambrose JA. Inflammatory and thrombotic mechanisms in coronary atherosclerosis. *Heart* 2003;89:93-7.
- Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice. A statement for healthcare professionals from the centers for disease control and prevention and the american heart association. *Circulation* 2003;107:499-511.
- Tran CT, Leiper JM, Vallance P. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler Suppl* 2003; 4:33-40.
- Weidinger FF, McLenachan JM, Cybulsky MI, et al. Persistent dysfunction of regenerated endothelium following balloon angioplasty of rabbit iliac artery. *Circulation* 1990;81:1667-79.
- Masuda H, Goto M, Tamaoki S, Azuma H. Accelerated intimal hyperplasia and increased endogenous inhibitors for NO synthesis in rabbits with alloxan-induced hyperglycaemia. *Br J Pharmacol* 1999;126:211-8.
- Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, et al. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 1999;99:1141-6.
- McDermott JR. Studies on the catabolism of NG-methylarginine, NG, N-G dimethylarginine and NG,NG-dimethylarginine. *Biochem J* 1976;154:179-84.
- Murray-Rust J, Leiper J, McAlister M, et al. Structural insights into the hydrolysis of cellular nitric oxide synthase inhibitors by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Nat Struct Biol*. 2001;8:679-83.
- Pankaj S, Paul B. Candidate Gene-Based Studies Still Have Value in A World Dominated By Whole Genome Approaches. *Circ Res* 2010;106:1019-21.
- Hasegawa K, Wakino S, Tatematsu S, et al. Role Of Asymmetric Dimethylarginine In Vascular Injury In Transgenic Mice Overexpressing Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase 2. *Circulation Research* 2007; 101:2-10.
- Chen BM, Xia LW, Zhao RQ. Determination of NG,NG dimethylarginine in human plasma by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 1997;692:467-71.
- Stühlinger MC, Oka RK, Graf EE, et al. Endothelial dysfunction induced by hyperhomocysteinemia: Role of ADMA. *Circulation* 2003;108:933-8.
- Leiper JM, Santa Maria J, Chubb A, et al. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology to microbial arginine deiminases. *Biochem J* 1999;343:209-14.
- Böger RH, Cooke JP, Vallance P. ADMA: an emerging cardiovascular risk factor. *Vasc Med* 2005;10:1-2.
- Schnabel R, Blankenberg S, Lubos E, et al. Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the AtheroGene Study. *Circ Res* 2005;97:53-9.
- Bae SW, Stühlinger MC, Yoo HS, et al. Plasma Asymmetric Dimethylarginine Concentrations in Newly Diagnosed Patients With Acute Myocardial Infarction or Unstable Angina Pectoris During Two Weeks of Medical Treatment. *Am J Cardiol* 2005;95:729-33.
- Mark FM. Vascular endothelium is the organ chiefly responsible for the catabolism of plasma asymmetric dimethylarginine-an explanation for the elevation of plasma ADMA in disorders characterized by endothelial dysfunction. *Medical Hypotheses* 2004;63:699-708.
- Vallance P, Leiper J. Cardiovascular Biology of the Asymmetric Dimethylarginine: Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase Pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1023-30.
- Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G. Novel Cardiovascular Risk Factors in End-Stage Renal Disease. *Journal of the American Society of Nephrology* 2004;15:77-80.
- Hodis HN, Mack WJ, LaBree L, et al. The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events. *Ann Intern Med* 1998;128:262-9.
- Kielstein JT, Böger RH, Bode-Böger SM, et al. Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: Relationship to treatment method and atherosclerotic disease. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:594-600.
- Böger RH, Sydow K, Borlak J, et al. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res* 2000;87:99-105.
- Yu XJ, Li YJ, Xiong Y. Increase of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in serum of high cholesterol fed rabbits. *Life Sci* 1994;54:753-8.
- Päivä H, Laakso J, Ruokonen I, et al. Plasma concentrations of asymmetric-dimethyl-arginine in type 2 diabetes associate with glycemic control and glomerular filtration rate but not with risk factors of vasculopathy. *Metabolism* 2003;52:303-7.
- Trocha M, Szuba A, Merwid-Lad A, et al. Effect of selected drugs on plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels. *Pharmazie* 2010;65:562-71.
- Selcuk MT, Selcuk H, Temizhan A, et al. Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations and L arginine/asymmetric dimethylarginine ratio in patients with slow coronary flow. *Coron Artery Dis* 2007;18:545-51.
- Lin KY, Ito A, Asagami T, et al. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: Role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 2002;106:987-92.
- Leiper J, Nandi M, Torondel B, et al. Disruption of methylarginine metabolism impairs vascular homeostasis. *Nat Med* 2007;13:198-203.
- Wang D, Gill PS, Chabrashvili T, et al. Isoform-specific regulation by N(G),N(G)- dimethylarginine dimethylaminohydrolase of rat serum asymmetric dimethylarginine and vascular endothelium-derived relaxing factor/NO. *Circ Res* 2007;101:627-35.
- Maas R, Erdmann J, Lüneburg N, et al. Polymorphisms in the promoter region of the dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 gene are associated with prevalence of hypertension. *Pharmacol. Res* 2009;60:488-93.
- Ding H, Wu B, Wang H, et al. A Novel Loss-of-Function DDAH1 Promoter Polymorphism Is Associated With Increased Susceptibility to Thrombotic Stroke and Coronary Heart Disease. *Circulation Research* 2010;106:1145-52.
- Jones LC, Tran CT, Leiper JM, Hingorani AD, Vallance P. Common genetic variation in a basal promoter element alters DDAH2 expression in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310:836-43.
- An H, An S, Tiryakioğlu H, Huysal K, Koca V, Bozat T. Koroner Kollateral Gelişimine Plazma Asimetrik Dimetilargininin Düzeylerinin Etkisi. *Türkiye Klinikleri J Cardiovasc Sci* 2009;21:226-32.