

## **ÖNSÖZ**

Ateroskleroz, 21. yüzyılın önde gelen mortalite sebeplerinden biri olup farklı klinik şekillerle karşımıza çıkmaktadır. Bunlardan en yaygın olanları koroner arter hastalığı ile periferik arter hastalığıdır. Bu projede, koroner arter hastalığı ile periferik arter hastalığında rol alan inflamatuvar markerler incelenerek, periferik arter hastalığının tanısını kolaylaştıracak olası biyomarkerlar araştırılmıştır. Bu çalışma Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından NKUBAP.02.GA.16.044 Proje numarası ile desteklenmiştir.

Yrd. Doç. Dr Demet ÖZKARAMANLI GÜR

**İÇİNDEKİLER**

|                           |    |
|---------------------------|----|
| Özet .....                | 4  |
| Abstract.....             | 5  |
| Giriş.....                | 6  |
| Gereç ve Yöntem.....      | 8  |
| Bulgular.....             | 11 |
| Tartışma ve Sonuçlar..... | 15 |
| Kaynaklar.....            | 17 |

**TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ**

Tablo 1: Çalışma grubunun demografik özellikleri

Tablo 2: Sitokin düzeylerinin farklı gruplardaki hastalardaki karşılaştırılması

Tablo 3: Korelasyon analizi

Şekil 1: NOGO-B, NUS ve ADAMTS-5'in tanısal özellikleri

## ÖZET

Bu çalışmada, periferik arter hastalığına özgü patofizyolojik mekanizmaların aydınlatılması ve koroner arter hastalığı (KAH) olan hastalarda PAH olanları tanımaya yardımcı olacak biyomarkerların tesbiti amacı ile, ateroskleroza şekillendiren yeni sitokinler değerlendirildi. Stabil angina pectoris nedeni ile koroner anjiyografi yapılan hastalar arasından ardışık 180 hasta (60 KAH+PAH olan hasta, 60 yalnızca KAH olan hasta ve 60 normal koronerleri olan hasta) çalışmaya dahil edildi. Periferik arter hastalığı tanısı koymak amacı ile hastaların Ankle-Brakial indeksleri ölçüldü. Açlık serum TNF like antigen-1A(TLA1), Death Receptor-3(DR3), Reticulon 4- B(NOGO-B) ve reseptörü NUS; hsCRP, A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) 1,4, 5 ve IL-6 seviyeleri ölçüldü. Koroner ve periferik arter hastalığı olan grupta NOGO-B ve NUS seviyeleri artmış, ADAMTS-5 seviyeleri ise azalmış olarak tesbit edildi. DR3 ve TL1A konsantrasyonu ise kontrol grubuna göre hem KAH grubunda hem de KAH+PAH grubunda artmış saptandı. ABI; yaş( $r=-0.17, p=0.02$ ), Syntax( $r=-0.38, p<0.001$ ), NOGOB ( $r=-0.24, p<0.001$ ), NUS( $r=-0.38, p<0.001$ ) ve ADAMTS-5( $r=0.25, p=0.001$ ) düzeyleri ile korele idi. Çoklu regresyon analizinde ABI ile korele olduğu tesbit edilen değişkenler NUS ( $B=-0.92, p<0.001$ ), ADAMTS-5( $B=0.85, p<0.001$ ) and Syntax score( $B=-0.28, p<0.001$ ) idi. Sitokinlerin KAH+PAH olan hastalarını ayırt ediciliği ROC analizi ile değerlendirildi; NUS için AUC:0.77 ( $p<0.001$ ), NOGO-B için AUC 0.67( $p<0.001$ ) ve ADAMTS-5 için A:UC 0.39( $p=0.024$ ) olarak bulundu.

PAH tanısı koydıracak tek bir biyomarker olmamakla birlikte, ADAMTS-5, NUS ve NOGO-B nin özellikleri bunların gelecek vaat eden sitokinler olduğunu düşündürmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Koroner arter hastalığı, periferik arter hastalığı, inflamasyon, sitokin, anke brakial indeks

## ABSTRACT

We studied novel cytokines that orchestrate atherosclerosis, to elucidate the distinct pathophysiology of peripheral arterial disease (PAD) and interpret the capability of markers to diagnose PAD in patients with coronary arterial disease (CAD). 180 consecutive subjects (60 patients with CAD+PAD; 60 patients with CAD only and 60 control) were enrolled among patients with stable CAD scheduled for coronary angiography. The ankle brachial index (ABI) was determined to define PAD. Fasting serum TNF like antigen-1A (TLA1), Death Receptor-3 (DR3), Reticulon 4-B (NOGO-B) and its receptor NUS; hsCRP, A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) 1, 4, 5 and IL-6 levels were determined. Levels of NOGO-B and its receptor NUS1 were increased but ADAMTS-5 was decreased in patients with CAD+PAD. The DR3 and TL1A concentrations were higher than controls both in CAD and CAD+PAD groups. ABI was correlated with age ( $r = -0.17, p = 0.02$ ), Syntax ( $r = -0.38, p < 0.001$ ), NOGOB ( $r = -0.24, p < 0.001$ ), NUS ( $r = -0.38, p < 0.001$ ) and ADAMTS-5 ( $r = 0.25, p = 0.001$ ). Independent predictors of ABI in multivariate analysis were NUS ( $B = -0.92, p < 0.001$ ), ADAMTS-5 ( $B = 0.85, p < 0.001$ ) and Syntax score ( $B = -0.28, p < 0.001$ ). The diagnostic performance of these cytokines to discriminate CAD+PAD were AUC: 0.77 ( $p < 0.001$ ) for NUS, 0.67 ( $p < 0.001$ ) for NOGO-B and 0.39 ( $p = 0.024$ ) for ADAMTS-5. There is no single marker to identify patients with PAD among CAD patients but distinct features of ADAMTS-5, NUS and NOGOB make them promising cytokines.

**Keywords:** Coronary artery disease, peripheral arterial disease, inflammation, cytokines, ankle brachial index

## GİRİŞ

Ateroskleroz, hızlı büyüme evreleri ile kesintiye uğrayan sessiz evreler ile karakterize kronik inflamatuvar bir hastalıktır.(Bui,2009) Basit intimal kalınlaşmadan fibroaterom gelişimine kadar uzanan ateroskleroz hakkında birçok çalışma yapılmış olamakla beraber; arteryel ağacın bazı bölgelerinin öncelikli tutulumunun sebebi henüz belirlenmiş değildir.(Bui,2009; Otsuka 2015) Bazı hastalarda hastalık tek bir alana sınırlı kalmakta, bazı hastalarda ise koroner arter hastalığı, periferik arter hastalığı ve karotis arter hastalığı gibi aterosklerozun birden fazla klinik formu bir arada görülebilmektedir.

Koroner arter hastalığı(KAH) ile birlikte periferik arter hastalığı(PAH) olan hastalarda aterosklerozun daha agresif ve yaygın seyrettiği, daha kalsifik lezyonların ve daha sık koroner olayların görüldüğü bilinmektedir.(Hussein, 2011) Bunu sebebinin, KAH+PAH hastalarında farklı inflamatuvar yolların aktive olması olabileceği düşünülmektedir. Aterosklerozun mihenk taşı olan inflamasyon, endotel hücreleri ve lökositler tarafından salgılanan sitokinler aracılığı ile kontrol edilir. Biz de KAH+PAH hastalarında olası farklı inflamatuvar yolları saptayabilmek için, aterogenezin farklı basamaklarını kodlayan yeni tanımlanmış sitokinleri inceledik.

İnflamasyon; makrofajların endotel tabakasına adhezyon ve intimaya transmigasyonu ile tetiklenir.(Bui, 2009) Endoplasmik retikulumun yeni tanımlanmış bir membran proteini olan NOGO-B ve reseptörü NUS-1, lökosit adhezyonu ve transendotelial migrasyonunu Intracellular adhesion molecule-1(ICAM-1) aracılı haberleşme yolu ile kontrol eder.(Lorenzo,2011) Makrofajlar intima tabakasına yerleştiklerinde, ana inflamatuvar yollardan biri olan nuclear faktör kappa B yolağı; death receptör ve onun ligandı olan tumor necrosis factor like cytokine 1 A(TL1A) aksı tarafından aktive edilir.(Richard, 2015) Bu reseptör ligand çifti, makrofajlardan köpük hücre gelişimini sağlar, metalloproteinaz ekspresyonunu tetikleyerek apoptosisi indükler ve T hücre aktivasyonunu kolaylaştırır.( Chinnaiyan, 1996; Pashar,2017; Kanga, 2005) T hücre aktivasyonu ise bilindiği gibi bütün inflamatuvar yolların aktivasyonu ile sonuçlanır. Hep birlikte, bu sitokinler plak oluşumunu başlatarak, plağın büyümesine ve komplikasyonuna zemin hazırlarlar. Yapılan son çalışmalar, TL1A/DR3 sinyal yolunun aynı zamanda A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs(ADAMTS) 1,4,ve 5 proteinlerini

kontrol ettiğini göstermiştir.(Ashlin, 2013; Salter, 2010) Bu proteinler metalloproteinaz ailesinden salınan enzimler olup vasküler proteoglikanları parçalayarak plak stabilitesini bozarlar. NOGO-B/NUS, TL1A/DR3 ve ADAMTS 1,4,5 sitokinleri PAH da daha önce hiç çalışılmamışlardır.

Bu araştırmanın amacı, KAH veya KAH+PAH olarak ortaya çıkan ateroskleroz hastalarında, NOGO-B/NUS, TL1A/DR3 ve ADAMTS 1,4,5 sitokinlerinin serum seviyelerini inceleyerek plak progresyonu ve stabilitesini değerlendirmek ve PAH tanısında potansiyel biyomarker olacak sitokinleri belirlemektir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu kesitsel çalışmaya, stabil angina pectoris nedeni ile koroner anjiyografi planlanmış ardışık hastalar dahil edildi. Koroner anjiyografi için kliniğimize yatan hastaların demografik özellikleri ve kardiyovasküler risk faktörleri kayıt edildikten sonra PAH varlığını saptamak amacı ile ankle brakial indeksleri ölçüldü. Sonrasında alınan açlık kan örnekleri daha sonra analiz edilmek üzere  $-86^{\circ}\text{C}$ de saklandı. Standard koroner anjiyografi ile hastalarda; bir veya birden fazla epikardial koroner arterinde %50 ve üzerinde darlık olan hastalar KAH olarak tesbit edildi. Bu hastalarda KAH'nın ciddiyetinin derecelendirilmesi için, ABI ölçümlerinden bağımsız bir kişi tarafından Syntax skorları hesaplandı. Bu çalışma Etik Kurul onayı alındıktan sonra, çalışmaya katılmayı kabul eden ve bilgilendirilmiş onam veren gönüllü hastalar ile yürütüldü.

Çalışma hastaları; ABI ve koroner anjiyografi sonuçlarına göre 3 gruba ayrıldı. Buna göre 1. grupta KAH+PAH hastaları (koroner anjiyografi ile gösterilmiş KAH ile  $\text{ABI} < 0.9$  olan hastalar), 2. grupta sadece KAH hastaları (koroner anjiyografide KAH olup ABI normal olan hastalar) ve 3. grup ise kontrol grubu (koroner anjiyografide KAH olmayan ve ABI normal olan hastalar) oluşturuldu.

Son 3 ay içerisinde akut koroner sendrom geçiren, ciddi sol ventrikül disfonksiyonu olan, ciddi kapak hastalığı, herhangi bir kronik inflamatuvar hastalığı, akut enfeksiyonu, bilinen malignitesi, kronik karaciğer hastalığı olan veya tahmini glomerular filtrasyon hızı  $< 60 \text{ ml/dk/1.73m}^2$  olan hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Benzer şekilde kollabe edilemeyen arteri olan hastalar ( $\text{ABI} > 1.4$ ) da çalışmadan dışlandı.

### **Ankle Brakial İndeks (ABI) ölçümü**

Ankle brakial indeks, Doppler yöntemi ile ölçülerek 0.9 veya altında olması durumunda PAH olarak tanımlandı. Bu konuda tecrubeli bir hekim tarafından 8-10MHz Dopple cihazı kullanılarak koroner anjiyografi öncesi tüm hastaların ABI değerleri ölçüldü. Bu amaçla hastalardan sigara kullandığı bilinen hastaların o gün sigara içmemeleri öğütlendi. Yatar pozisyonda 15 dakikalık bir istirahatten sonra, uygun boyutta manşon kullanılarak ayak bileği ve kol brakial arter üzerinden sistolik kan basınçları ölçüldü. Payda dorsalis pedis veya tibialis posteriordan ölçülen ayak bileği basınçlarından yüksek olanı; paydada ise kol brakial basınçlarından yüksek olanı kullanılarak oran hesaplandı. Herhangi bir bacakta ölçülen ABI 0.9 veya altında



ile bu kişi PAH olarak değerlendirildi. ABI değerleri anormal olarak yüksek, yani 1.4 n üzerinde olan hastaların vasküler kalsifikasyon nedeni ile kollabe edilemeyen arterleri olduğu düşünülerek çalışmaya alınmadı.

### ***Biyokimyasal analizler***

Açlık kan örnekleri antekubital fossadaki bir venden, turnike kullanılmadan alınarak hemen santrifuje edildiler. Serum rnekleri biyokimyasal analizler yapılana kadar -86°C da bekletildi. NOGO-B/NUS, TL1A/DR3 ve ADAMTS 1,4,5 seviyeleri Enzymelinked immunosorbent assay(ELISA) metodu ile ölçüldü. TL1A kitinin (Human TL1A soluble ELISA kit, SunRed Biotechnology Co. Ltd. Shanghai, PCR, catalogue no:201-12-7437) inter-assay ve intra-assay CV%değeri <10 %; minimum saptanabilir human TL1A konsantrasyonu 4.857 pg/mL idi. Death receptor kitinin (Human DR3 soluble ELISA kit, SunRed Biotechnology Co. Ltd. Shanghai, PCR, catalogue no:201-12-0618) inter-assay CV% değeri 12% and intra-assay CV% değeri <10 % olup minimum saptanabilir human DR3 konsantrasyonu 0.238 ng/mL idi. ADAMTS-1 kitinin (human ADAMTS-1 ELISA kit SunRed Biotechnology Co. Ltd. Shanghai, PCR, catalogue no:201-12-1156) inter-assay CV% değeri 12% ve intra-assay CV% değeri <10 % olup minimum saptanabilir human ADAMTS-1 konsantrasyonu 0.377 ng/mL idi. ADAMTS-4 kitinin (human ADAMTS-4 ELISA kit SunRed Biotechnology Co. Ltd. Shanghai, PCR, catalogue no:201-12-3062) inter-assay CV% değeri 12% ve intra-assay CV% değeri <10 % olup minimum saptanabilir human ADAMTS-4 konsantrasyonu 0.345 ng/mL idi. ADAMTS-5 kitinin (human ADAMTS-5 ELISA kit SunRed Biotechnology Co. Ltd. Shanghai, PCR, catalogue no:201-12-3063) inter-assay CV% değeri 12% ve intra-assay CV% değeri <10 % olup minimum saptanabilir human ADAMTS-5 konsantrasyonu 2.205 ng/mL idi. NUS1 receptor kitinin(human NUS1 ELISA kit SunRed Biotechnology Co. Ltd. Shanghai, PCR, catalogue no:201-12-7317) inter-assay CV% değeri 12%, intra-assay CV% değeri <10 % olup minimum saptanabilir NUS-1 konsantrasyonu 0.068 ng/mL idi. Nogo-B kitinin (LegendMax <sup>TM</sup> Human soluble Nogo-B ELISA kit, catalogue no:432807, Biolegend,Inc. San Diego, CA) inter-assay CV% değeri 5% ve intra-assay CV% değeri <6 % olup minimum saptanabilir human Nogo-B konsantrasyonu 26.0 ± 8.7 ng/mL idi. IL-6 kitinin (affymetrix eBioscience human hsCRP ELISA kit, catalogue no:, eBioscience,Inc. Vienna, Austria) inter-assay CV%

değeri 5.2% ve intra-assay CV% değeri 3.4 % olup minimum saptanabilir human IL-6 konsantrasyonu 0.92 pg/mL idi.

### ***İstatistiksel Analiz***

İstatistiksel analiz IBM® SPSS® Statistics Version 20 Software(IBM Corp., Armonk, NY) kullanılarak yapılmıştır. Sürekli değişkenler ortalama±standard sapma veya median(interquartle range) belirtilerek sunulmuş; karegorik değişkenler ise yüzdeler ile ifade edilmiştir. Değişkenlerin normal dağılıma uyup uymadıkları Kolmogorov Smirnov testi ile test edilmiştir. Normal dağılan değişkenler için 3 grup karşılaştırması ANOVA ile normal dağılmayanlar için ise Kruskal Wallis testi ile yapılmıştır.Kategorik değişkenler ise Ki kare ile karşılaştırılmıştır.Biyomarkerler arası korelasyon için Spearman korelasyon katsayısı hesaplanmıştır. ABI bağımlı değişken olarak belirlenerek, çoklu regresyon analizi uygulanmış ve ABI ye etki eden faktörler tesbit edilmiştir.Biyokimyasal markerların tanı koydurucu özelliklerinin belirlenmesi için ROC analizi yapılmıştır.  $p<0.05$  istatistiksel anlamlılık sınırı olarak belirlenmiştir.

## BULGULAR

| Özellikler              | KAH+PAH<br>n:60  | KAH<br>n:60     | NORMAL<br>n:60  | p      | p <sup>1</sup> | p <sup>2</sup> | p <sup>3</sup> |
|-------------------------|------------------|-----------------|-----------------|--------|----------------|----------------|----------------|
| Yaş                     | 64.75±10.3       | 63.15±10.9      | 56.7±10.3       | <0.001 | 0.683          | <0.001         | 0.003          |
| Erkek cinsiyet, %(n)    | 75(45)           | 63.3(38)        | 55(33)          | 0.07   | 0.17           | 0.022          | 0.35           |
| Sigara, %(n)            | 63.3(38)         | 25(15)          | 36.7(22)        | <0.001 | <0.001         | 0.003          | 0.17           |
| Aile öyküsü, %(n)       | 46.7(28)         | 55(33)          | 50(30)          | 0.65   | 0.361          | 0.715          | 0.58           |
| Diabetes mellitus, %(n) | 43.3(26)         | 30(18)          | 23.3(14)        | 0.06   | 0.13           | 0.020          | 0.41           |
| Hipertansiyon, %(n)     | 70(42)           | 83.3(50)        | 56.7(34)        | 0.006  | 0.084          | 0.130          | 0.001          |
| Hiperlipidemi, %(n)     | 73.3(44)         | 70(42)          | 18(30)          | <0.001 | 0.685          | <0.001         | <0.001         |
| BMI                     | 28.63(20.2-43.6) | 28.2(19.5-44.6) | 27.7(17.8-44.6) | 0.790  | 0.883          | 0.671          | 0.475          |
| İlaçlar, %(n)           |                  |                 |                 |        |                |                |                |
| Beta bloker             | 36.7(22)         | 38.3(23)        | 28.3(17)        | 0.46   | 0.850          | 0.33           | 0.25           |
| ASA                     | 66.7(40)         | 56.7(34)        | 35(21)          | 0.002  | 0.26           | 0.001          | 0.017          |
| klopidogrel             | 38.3(23)         | 26.7(16)        | 3.3(2)          | <0.001 | 0.172          | <0.001         | <0.001         |
| Statin                  | 36.7(22)         | 31.7(19)        | 5(3)            | <0.001 | 0.564          | <0.001         | <0.001         |
| ACEi                    | 31.7(19)         | 28.3(17)        | 18.3(11)        | 0.22   | 0.690          | 0.092          | 0.195          |
| ARB                     | 16.7(10)         | 28.3(17)        | 21.7(13)        | 0.30   | 0.126          | 0.487          | 0.40           |
| Insulin                 | 15(9)            | 6.7(4)          | 5(3)            | 0.11   | 0.142          | 0.068          | 0.69           |
| Metformin               | 16.7(10)         | 8.3(5)          | 11.7(7)         | 0.37   | 0.168          | 0.432          | 0.54           |
| OAD                     | 1.7(1)           | 5(3)            | 5(3)            | 0.55   | 0.309          | 0.309          | 1              |
| CCB                     | 13.3(8)          | 20(12)          | 6.7(4)          | 0.10   | 0.327          | 0.224          | 0.032          |
| ABI                     | 0.70(0.21)       | 1.1(0.2)        | 1.04(0.2)       | <0.001 | <0.001         | <0.001         | 0.993          |
| Syntax                  | 15(11.5)         | 11(8.8)         | -               |        | 0.091          |                |                |

Tablo 1: Çalışma grubunun demografik özellikleri

Çalışma grubunun demografik özellikleri Tablo-1 de sunulmuştur. Kontrol grubu KAG için yönlendirilen hastalar olduğundan, kardiyovasküler risk faktörleri açısından sağlıklı bireyler değillerdi. Tablo 1' de 3 grubun kardiyovasküler risk faktörleri açısından birbirlerinden farklılıkları olduğu görülmektedir. Kardiyovasküler risk faktörlerinin serum sitokin düzeyleri üzerine etkilerinin karşılaştırmalar üzerinde olumsuz etkilerini dışlamak amacı ile öncelikle kardiyovasküler risk faktörleri ile serum sitokin düzeyleri arasındaki ilişki araştırıldı. Analiz sonucunda, risk faktörleri ile serum sitokin düzeylerinin birbiri ile ilişkisi olmadığı gösterildi. Tablo 2 de serum sitokin düzeylerinin farklı gruplardaki hastalardaki karşılaştırılması sunulmuştur.

| Biomarkerler | KAH+PAH<br>n:60  | KAH<br>n:60     | NORMAL<br>n:60  | p      | p <sup>1</sup> | p <sup>2</sup> | p <sup>3</sup> |
|--------------|------------------|-----------------|-----------------|--------|----------------|----------------|----------------|
| DDR,ng/mL    | 9.47<br>(7.3)    | 9.8<br>(4.4)    | 8.9<br>(2.74)   | 0.006  | 0.69           | 0.011          | 0.002          |
| TLA,pg/mL    | 276.3<br>(150.6) | 229.8<br>(99.7) | 188.0<br>(56.4) | 0.027  | 0.38           | 0.097          | 0.006          |
| NUS,ng/mL    | 2.83<br>(2.01)   | 1.52<br>(0.99)  | 1.99<br>(1.3)   | <0.001 | <0.001         | <0.001         | 0.023          |
| ADAMT1,ng/mL | 23.4<br>(17.6)   | 25.2<br>(8.3)   | 24.8<br>(5.0)   | 0.94   | 0.84           | 0.73           | 0.87           |
| ADAMT4,ng/mL | 21.5<br>(21.08)  | 23<br>(9.6)     | 21.7<br>(8.6)   | 0.85   | 0.58           | 0.70           | 0.86           |
| ADAMT5,ng/mL | 139.9<br>(89.6)  | 181.4<br>(78.3) | 161.8<br>(43.7) | 0.028  | 0.017          | 0.117          | 0.10           |
| NOGO-B,ng/mL | 85.5<br>(138.5)  | 30.7<br>(43.3)  | 60.4<br>(82.3)  | <0.001 | <0.001         | 0.037          | 0.04           |
| IL-6,pg/mL   | 9.7<br>(9.3)     | 8.4<br>(6.5)    | 8.3<br>(3.5)    | 0.151  | 0.214          | 0.05           | 0.52           |
| hsCRP        | 0.027<br>(0.02)  | 0.03<br>(0.04)  | 0.02<br>(0.02)  | 0.029  | 0.72           | 0.008          | 0.05           |

Tablo 2: Sitokin düzeylerinin farklı gruptaki hastalardaki karşılaştırılması

Serum ADAMTS1 ve 4 düzeyleri çalışma hastaları içerisinde benzer seviyelerde saptanmıştır. Her ne kadar IL-6 seviyesi KAH+PAH grubunda en fazla, KAH ve kontrol gruplarında sırasıyla azalarak saptanmış olsa da burada istatistiksel anlamlılık düzeyine erişememiştir. (p=0.05) TL1A, DR-3 ve hsCRP seviyeleri KAH+PAH ve KAH gruplarında (sırası ile KAH+PAH için 276.3, 9.6, 0.03 ng/mL ve KAH için 229.8, 9.8, 0.03 ng/mL) kontrol grubuna (sırası ile 188.0, 8.9, 0.02 ng/mL, p=0.027) göre daha yüksek bulundu. Fakat bu biyomarkerlerin seviyelerinde, KAH+PAH grubu ile KAH grupları arasında anlamlı farklılık bulunmadı. (p=0.38) Bir diğer reseptör ligand çifti olan NOGO-B ile NUS 1 seviyeleri, KAH+PAH grubunda (85.5 and 2.83 ng/mL) en yüksek bulunurken bunu sırası ile kontrol (60.4 and 1.99 ng/mL) ve KAH (30.7 and 1.52 ng/mL) grubu izledi. Diğer ADAMTS proteinlerinin aksine ADAMTS-5 KAH grubunda KAH+PAH a göre daha yüksek idi.

|          | Age    | ABI     | Syntax  | TL1A   | DR3    | NOGO-B  | NUS-1   | ADAMTS-1 | ADAMTS-4 | ADAMTS-5 |
|----------|--------|---------|---------|--------|--------|---------|---------|----------|----------|----------|
| Age      |        | -0.17*  | 0.32**  | 0.19*  |        |         | -0.38** |          |          |          |
| ABI      | -0.17* |         | -0.38** |        |        | -0.24** |         |          |          | 0.21**   |
| Syntax   | 0.32** | -0.38** |         | 0.20** | 0.16*  |         | 0.58**  |          |          |          |
| DR3      |        |         | 0.16*   | 0.67** |        |         | 0.47**  | 0.67**   | 0.64**   | 0.60**   |
| TL1A     | 0.19*  |         | 0.20**  |        | 0.67** |         | 0.24**  | 0.71**   | 0.73**   | 0.72**   |
| NOGO-B   |        | -0.24** |         | 0.58** |        |         |         |          |          |          |
| NUS-1    |        | -0.38** |         | 0.47** | 0.58** | 0.24**  | 0.55**  | 0.55**   | 0.52**   | 0.39**   |
| ADAMTS-1 |        |         |         | 0.70** | 0.64** |         | 0.52**  |          | 0.78**   | 0.75**   |
| ADAMTS-4 |        |         |         | 0.73** | 0.60** |         | 0.31**  | 0.78**   |          | 0.73**   |
| ADAMTS-5 |        | 0.25**  |         | 0.72** | 0.59** |         |         | 0.75**   | 0.74**   |          |
| hsCRP    |        |         | 0.17*   | 0.20*  |        |         | 0.55**  |          |          |          |
| IL-6     |        |         |         | 0.71** | 0.61** |         |         | 0.69**   | 0.60**   | 0.63**   |

Tablo 3: Korelasyon analizi

Tablo 3 de korelasyon analizinin sonuçları gösterilmiştir. Buna göre ABI ile yaş (r:-0.17, p=0.02), Syntax skoru (r:-0.38, p<0.001), NOGO-B (r:-0.24, p<0.001), NUS(r:-0.38, p<0.001) ve ADAMTS-5 seviyeleri (r:0.25, p=0.001) korele idi. Koroner aterosklerozun bir yansıması olan Syntax skoru ise yaş (r:0.32, p<0.001), ABI(r:-0.38, p<0.001), TL1A (r:0.20, p=0.01) ve DR3(r:0.16, p=0.039) ile korele saptandı. ROC analizine göre NOGO-B, NUS ve ADAMTS-5 düzeyleri KAH hastalarında PAHın ayırt edilmesi için kullanılabilir biyomarkerlar olarak tesbit edildi.(Figure 1) Çoklu regresyon analizi ile ABI üzerine etkili olası değişkenlerden yaş, syntax skoru, ADAMTS-5, NOGO-B ve NUS arasından NUS (B=-0.92, p<0.001), ADAMTS-5(B=0.85, p<0.001) ve Syntax skoru (B=-0.28, p<0.001) nun bağımsız olarak ABI yı predikte ettiği gösterilmiştir.

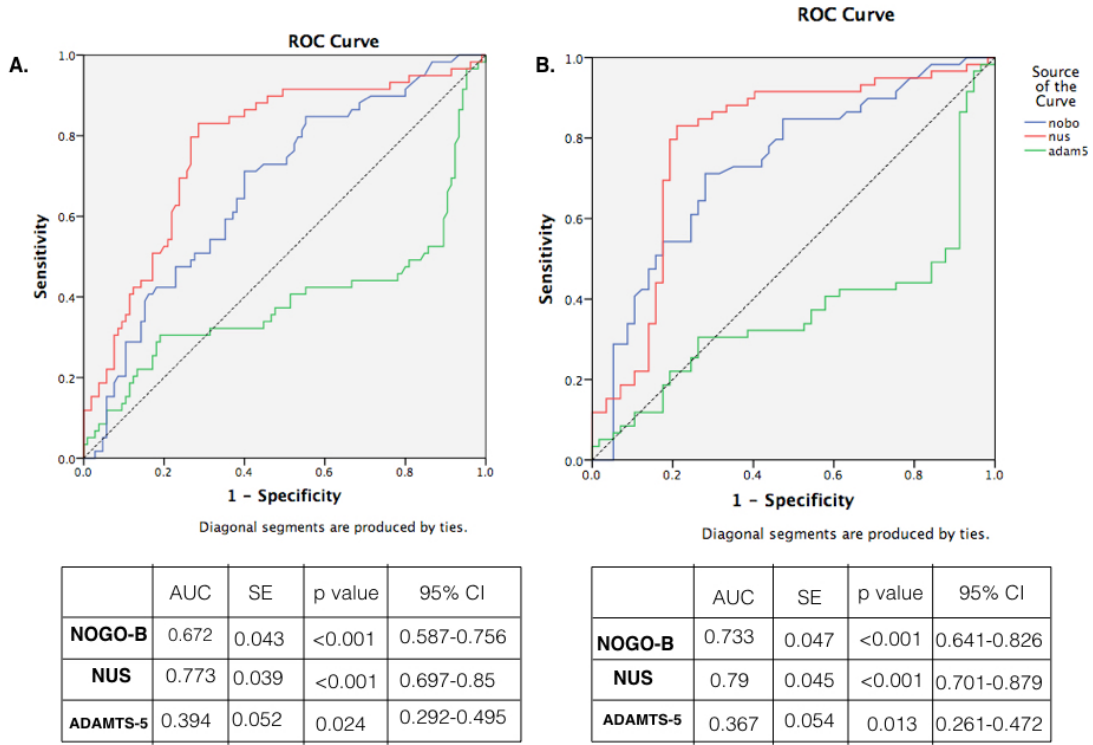


Figure 1: **A.** ROC curves of the cytokines within the study population **B.** ROC curves of the cytokines in the patients with atherosclerosis manifested as CAD with/out PAD.

Şekil 1: NOGO-B, NUS ve ADAMTS-5'in tanısal özellikleri

## TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bu çalışma ile bazı sitokinlerin serum düzeylerinin ölçümü ile kendini KAH veya KAH+PAH olarak prezente eden aterosklerotik süreç hakkında fikir sahibi olabileceğimiz gösterilmiştir. HsCRP, TL1A ve DR3 düzeylerinin yansıttığı sistemik inflamasyon; beraberinde PAH ın eşlik ettiği veya etmediği KAH hastalarında benzer düzeyde idi. NOGO-B ve reseptör düzeyleri ile PAH hastalarında artmış saptandı. Bunlar birden fazla aterosklerotik tutulumu göstermede belirteç olarak kullanılabilirler.

Aterosklerozun özel bir alt grubu olan PAH'da aynı KAH da olduğu gibi inflamatuvar belirteçlerin artmış olduğu gösterilmiştir. (Sinorelli, 2016; Agarwal, 2014) Biz de çalışmamızda hsCRP ile TL1A/DR3'ün KAH+PAH da KAH'a benzer şekilde arttığını gösterdik. TL1A/DR3 aksının yakın zamanda yapılan çalışmalarda makrofajlardan köpük hücre gelişiminde rol aldıkları gösterilmiştir. (Richard, 2015) Stamatelopoulos ve ark. KAH hastalarında TL1A seviyelerinin arttığını ve bunu Gensini skoru ile korele olduğunu göstermişlerdir. (Stamatelopoulos, 2015) Biz de bu çalışmada TL1A/DR3 düzeyleri ile Syntax skoru arasındaki korelasyonu gösterdik. Buna benzer önceki çalışmalar da TL1A seviyesinin ateromatik plak progresyonu ile yakından ilişkili olduğunu göstermişti. (Bamias, 2013) Deneysel çalışmalar ADAMTS proteazların makrofajlar üzerinde monositlerdem makrofajlara dönüşümü sırasında eksprese olduklarını göstermiştir. Bu basamakta TL1A aksının rol aldığını hatırlamak gerekiyor. Biz de çalışmamızda TL1A/DR3 ile ADAMTS proteazları arasında güçlü korelasyon saptadık.

Bu çalışma ilk kez ADAMTS proteaz düzeylerini ile KAH ve PAH hastalarında incelemiştir. Biz bu çalışma ile ADAMTS-5 seviyesinin PAH hastalarında azaldığını gösterdik. Didangelos ve ark ADAMTS-5'in murine ateroskleroz modelinde azaldığını göstermişlerdir. (Didangelos, 2012) Aterosklerozun erken evrelerinde görülen bu azalma ADAMTS-5 ile damar duvarında LDL bağlayan proteoglikanlar olan biglikan ve versican düzeylerinin artmasına sebep olur. Buna göre ADAMTS-5 azalması aterosklerozu tetikler. Diğer taraftan KAH'da yüksek ADAMTS-5 düzeyleri, bu hastalığın plak stabilitesi ile ilgili olumsuz olaylardaki fazlalığını açıklamaktadır.

NOGO-B (Rekilülön 4B) endotel ve düz kas hücrelerinin endoplazmik retikulumunda lokalize bir protein olup vasküler homeostaz ve inflamasyonla

ilişkilidir.(Sasset,2016) NOGO-B/NUS etkileşimi, sfingolipid sentezinin hız kısıtlayıcı basamağı olan serin palmitoiltransferaz enzimini inhibe ederek, endotel disfonksiyonu, hipertansiyon ve patolojik kardiyak hipertrofiyi tetikler.(Sasset, 2016) NOGO-B/NUS aterosklerozun erken evrelerinde lökositlerin endotele adhezyon ve transmigrasyonunda rol oynar.(Lorenzo,2011) Nekrotik nüvenin az olduğu erken fibroateromlarda, yoğun miktarda NOGO-B ekspresyonu saptanmış olup plak alanı büyüdükçe bu ekspresyonun azaldığı gösterilmiştir.(Lee, 2009) Rodrigues ve ark. karotis plaklarındaki NOGO-B seviyelerinin büyüyen lipid havuzu ile ters orantılı olduğunu göstermişlerdir.(Rodrigues, 2012) NOGO-B'nin KAH'da olan az sayıda çalışmasına ilave olarak PAH' da çalışması yapılmamış olup bu çalışma ilk olmaktadır. Biz çalışmamızda NOGO-B seviyesinin KAH grubuna göre KAH+PAH grubunda daha yüksek olduğunu tesbit ettik. NOGO-B nin N terminal bölgesinin kalsiyum bağlayıcı bölgelere sahip olduğu düşünülürse, bu PAH da daha yaygın görülen kalsifik lezyonlarının varlığını da açıklamaktadır.(Jozsef, 2014)

Sonuç olarak, mevcut bulgular KAH da eşlik eden PAH patogenezi aydınlatmaktadır. KAH ve PAH,ortak payda olan inflamasyonda TL1A/DR3 ve hsCRP nin de gösterdiği gibi benzer şekilde etkilenmişlerdir. KAH hastalarına kıyasla KAH+PAH'da artmış NOGO-B/NUS konsantrasyonu devam edern inflamasyonun ve erken evredeki mevcut plak yükünün fazlalığının bir ifadesidir. ADAMTS-5 konsantrasyonundaki azalma da benzer şekilde arteryel ağacın yaygın tutulumunun bir göstergesidir. Bu çalışma ile gösterilmiştir ki, NOGO-B, NUS ve ADAMTS-5 gibi sitokinlerin ölçümü ile PAH tanısı konulması yakın gelecekte mümkün olabilecektir.



## KAYNAKLAR

Agarwal S, Naderi S. Etiopathogenic differences in coronary artery disease and peripheral artery disease: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey. *Angiology*. 2014; 65(10): 883-890.

Ashlin TG, Kwan APL, Ramji DP. Regulation of ADAMTS-1, -4 and -5 expression in human macrophages: Differential regulation by key cytokines implicated in atherosclerosis and novel synergism between TL1A and IL-17. *Cytokine*. 2013;64(1):234-242.

Bamias G, Stamatelopoulos K, Zampeli E et al. Circulating levels of TNF-like cytokine 1A correlate with the progression of atheromatous lesions in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Immunol* .2013; 147: 144–150.

Bui QT, Prempeh M, Wilensky RL. Atherosclerotic plaque development. *Int J Biochem Cell B*. 2009;41:2109–2113

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Yu GL et al. Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Scienc*. 1996;274:990-992

Didangelos A, Mayr U, Monaco C, Mayr M. Novel role of ADAMTS-5 protein in proteoglycan turnover and lipoprotein retention in atherosclerosis. *Biol Chem*. 2012; 287(23):19341–19345

Hussein AA, Uno K, Wolski K et al. Peripheral arterial disease and progression of coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57:1220–1225.

Jozsef L, Tashiro K, Kuo A et al. Reticulon 4 is necessary for endoplasmic reticulum tubulation, STIM1-Orai1 coupling, and Store-operated Calcium Entry. *Biol Chem*. 2014; 289(13): 9380–9395.

Kanga YJ, Kima WJ, Baea HU et al. Involvement of TL1A and DR3 in induction of pro-inflammatory cytokines and matrix metalloproteinase-9 in atherogenesis

*Cytokine*. 2005; 29: 229-235.

Lee WS, Kim SW, Hong SA et al. Atherosclerotic progression attenuates the expression of Nogo-B in autopsied coronary artery: Pathology and virtual histology intravascular ultrasound analysis. *J Korean Med Sci*. 2009;24:596-604.

Lorenzo A, Manes TD, Davalos A, Wright PL, Sessa WC. Endothelial reticulon-4B (Nogo-B) regulates ICAM-1-mediated leukocyte transmigration and acute inflammation. *Blood*. 2011;117(7):2284-2295.

Otsuka F, Kramer MCA, Woudstra P et al. Natural progression of atherosclerosis from pathologic intimal thickening to late fibroatheroma in human coronary arteries: A pathology study. *Atherosclerosis*. 2015;(241):772-782

Pashar Y, S R Bias, Gill NS. Emerging role of various signaling pathways in the pathogenesis and therapeutics of atherosclerosis. *Rev Cardiovasc Med*. 2017;10(11)10-12.

Richard AC, Ferdinand JR, Meylan F, Hayes ET, Gabay O, Siegel RM. The TNF-family cytokine TL1A: from lymphocyte costimulator to disease co-conspirator. *J Leukoc Biol* 2015;98: 333–345.

Rodriguez-Feo JA, Hellings WE, Verhoeven BAN et al. Low levels of Nogo-B in human carotid atherosclerotic plaques are associated with an atheromatous phenotype, restenosis, and stenosis severity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:1354-1360.

Salter RC, Ashlin TG, Kwan APL, Ramji DP. ADAMTS proteases: key roles in atherosclerosis? *J Mol Med (Berl)* 2010;88:1203-1211.

Sasset L, Zhang Y, Dunn TM, Lorenzo AD. Sphingolipid de novo biosynthesis: A rheostat of cardiovascular homeostasis. *Trends Endocrin Met*. 2016; 27(11):807-819.

Signorelli SS, Anzaldi M, Libra M et al. Plasma Levels of Inflammatory Biomarkers in

Peripheral Arterial Disease: Results of a Cohort Study. *Angiology* 2016;67(9): 870-874.

Stamatelopoulos K , Georgiou S, Kanakakis I et al. Circulating levels of TNF-like cytokine 1A correlate with reflected waves and atherosclerosis extent and may predict cardiac death in patients with stable coronary artery disease. *Cytokine*. 2015;72: 102–104.