

Periferik arter hastalarında yükselmiş serum homositrulin düzeyleri

Elevated serum homocitrulline levels in patients with peripheral artery disease

Duygu ERYAVUZ ONMAZ¹ (ID), Canan AYDOĞAN² (ID), Nazif AYGÜL² (ID), Abdullah SİVRİKAYA¹ (ID), Sedat ABUŞOĞLU¹ (ID), Ali ÜNLÜ¹ (ID)

ÖZET

Amaç: Periferik arter hastalığı (PAH) arteriyel stenoz veya oklüzyon ile karakterize, kronik, progresif bir hastalıktır. Ateroskleroz PAH'ın en yaygın nedenidir (>90%). Karbamilasyon, proteinlerin post translasyonel modifikasyon mekanizmalarından birisi olup ateroskleroz için yeni bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır. Bilinen en yaygın karbamilasyon ürünü ise homositrulindir. Bu çalışmamızda PAH'lı hastalar ile benzer yaş, cinsiyet dağılımı ve risk faktörlerine sahip PAH'ı olmayan bireylerde serum homositrulin düzeylerini ölçerek homositrulinin PAH tanısındaki rolünün aydınlatılmasına katkıda bulunmak ve çeşitli biyolojik parametreler ile homositrulin düzeyleri arasındaki ilişkiyi araştırmak amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmaya, 70 PAH'lı hasta ve 65 PAH'ı olmayan birey dahil edilmiştir. Serum homositrulin ve lizin düzeyleri AB Sciex API 3200 (Applied Biosystems/MDS Sciex) likit kromatografi-tandem kütle spektrometri (LC-MS/MS) cihazıyla geliştirmiş olduğumuz geçerli kılınmış yöntemle ölçülmüştür. Hastalara ait çeşitli hematolojik ve biyokimyasal parametreler sırasıyla Beckman Coulter LH 780 ve Beckman Coulter AU 5800 (Beckman Coulter,

ABSTRACT

Objective: Peripheral arterial disease (PAH) is a chronic, progressive disease characterized by arterial stenosis or occlusion. Atherosclerosis is the most common cause of PAH (>90%). Carbamylation is one of the post-translational modification mechanisms of proteins and has been identified as a new risk factor for atherosclerosis. The most common carbamylation product known is homocitrulline. Our aim in this study was to contribute to the elucidation of the role of homocitrulline in the diagnosis of PAH.

Methods: 70 patients with PAH and 65 individuals without PAH were included in the study. Serum homocitrulline and lysine levels were measured by AB Sciex API 3200 (Applied Biosystems/MDS Sciex) liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) device. Various hematological and biochemical parameters of the patients were measured in Beckman Coulter LH 780 and Beckman Coulter AU 5800 (Beckman Coulter, Brea, USA) autoanalyzers, and C-reactive protein (CRP) levels were measured in IMMAGE 800 (Beckman Coulter, Brea, USA) device,

¹Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Konya,
²Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kardiyoloji Anabilim Dalı, Konya



İletişim / Corresponding Author : Duygu ERYAVUZ ONMAZ

Selçuk Üni. Tıp Fakültesi, Biyokimya AD Akademi Mah. Yeni İstanbul Cad. No: 313 Alaeddin
Keykubat Kampüsü Selçuklu/Konya - Türkiye E-posta / E-mail : duygu_eryavuz@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 29.08.2021
Kabul Tarihi / Accepted : 02.11.2021

DOI ID : 10.55051/TurkHijyen.2022.76402

Eryavuz Onmaz D, Aydoğan C, Aygül N, Sivrikaya A, Abuşoğlu S, Ünlü A. Periferik arter hastalarında yükselmiş serum homositrulin düzeyleri. Turk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(1): 103 - 114

Brea, USA) otoanalizörlerinde, C-reaktif protein (CRP) düzeyleri ise IMMAGE 800 (Beckman Coulter, Brea, USA) cihazında ölçülmüştür.

Bulgular: PAH'lı hastaların serum homositrulin konsantrasyonları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0.001$). Homositrulinin PAH'ı öngörme gücünü değerlendirmek için Receiver Operating Characteristic (ROC) analizi yapıldığında ise optimal serum homositrulin cut-off değeri, %71.4 sensitivite ve %86.7 spesifiteyle 165.1 $\mu\text{mol} / \text{mol}$ lizin ($p<0.001$) olarak saptanmıştır. Eğri altında kalan alan (AUC) değeri 0.873 olup %95 güven aralığı 0.804-0.925 idi. Spearman korelasyon analizine göre ise serum homositrulin düzeyleri ile üre, CRP, nötrofil lenfosit oranı (NLO) ve platelet lenfosit oranı (PLO) düzeyleri arasında pozitif korelasyon vardı.

Sonuç: Sonuç olarak bulgularımız, homositrulin düzeylerinin PAH'lı hastalarda önemli ölçüde yükseldiğini, homositrulinin PAH'ın erken teşhisinde yararlı bir göstere olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Periferik arter hastalığı, ateroskleroz, enflamasyon, karbamilasyon, homositrulin

respectively.

Results: Serum homocitrulline concentrations of patients with PAH were statistically significantly higher than the control group ($p<0.001$). Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis showed that the optimal serum homocitrulline cut-off value was 165.1 $\mu\text{mol} / \text{mol}$ lysine ($p<0.001$) (sensitivity, 71.4% and specificity, 86.7%) for PAH. The area under curve (AUC) value was 0.873 (95% confidence interval: 0.804-0.925). There was a positive correlation between serum homocitrulline and urea, CRP, the neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) and the platelet-lymphocyte ratio (PLR) levels.

Conclusion: Our findings show that homocitrulline levels are significantly elevated in patients with PAH, and homocitrulline may be a useful marker in the early diagnosis of PAH.

Key Words: Peripheral arterial disease, atherosclerosis, inflammation, carbamylation, homocitrulline

GİRİŞ

Periferik arter hastalığı (PAH) kalbi yada beyni besleyen damarlar dışındaki orta ve büyük çaptaki arterlerin daralması yada tıkanıklığı ile karakterize olan progresif bir kardiyovasküler hastalıktır (1). PAH, alt ekstremiteleri üst ekstremitelere damarlarından daha sık etkilemektedir ve alt ekstremitelerde PAH'ı, kladikasyon intermitant olarak bilinen tekrarlayan yorgunluk, kramp hissi ve ağrıya yol açabilmektedir (2). Dünya çapında 200 milyondan fazla bireyin PAH'dan etkilendiği bilinmektedir (3). Gençlerde nispeten daha nadir görülmeyle birlikte prevalansı yaşla birlikte artmaktadır ve özellikle 65 yaş üstü

bireylerde daha yaygındır (4). 50 yaş altı bireylerde prevalansı %4 ile %7 arasında değişirken, 80 yaş üstünde %20'nin üzerine çıkmaktadır. Erkeklerde ise kadınlara göre yaklaşık 1,5 kat daha sık görülmektedir (5). PAH, tromboembolizm, vaskülit ve dejenerasyon gibi birçok nedenle ortaya çıkabilmektedir, bununla birlikte PAH'a neden olan en yaygın durum aterosklerozdur (6). Sigara, alkol, hipertansiyon, böbrek ve kalp yetmezliği, dislipidemi, obezite, hiperhomosisteinemi, yaş, erkek cinsiyet, siyah ırk, yüksek C-Reaktif Protein (CRP) ve fibrinojen düzeyleri PAH için tanımlanmış risk faktörleridir (2, 7). PAH artmış kardiyovasküler, serobrovasküler hastalık, amputasyon gerektiren sekel riski ve mortalite

riskiyle ilişkili progresif, klinik seyri sessiz bir hastalık olduğundan erken tanısına yönelik biyobelirteçlerin saptanması ve tedaviye erken başlanması oldukça önemlidir (8).

Üreminin kardiyovasküler hastalıklar için bir risk faktörü olduğu ortaya konmuş ve ilişkili mekanizmaları araştıran çalışmalar artmış üre düzeylerinin proteinlerde karbamilasyona yol açarak proteinlerin yapısını ve işlevini değiştirdiğini göstermiştir. Ayrıca son yıllarda, aterogenez sürecine dahil olan enflamasyon ve oksidatif stresin artmış protein karbamilasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (9). Karbamilasyon siyanatın primer amin veya tiyol grubu içeren moleküllere bağlanarak karbamil grupları oluşturduğu non-enzimatik bir post translasyonel modifikasyondur (PTM) (10). Protein karbamilasyonu ürenin degradasyonu yada tiyosiyanatın miyeloperoksidaz (MPO) aracılı katabolizmasıyla oluşan izosiyanik asitin proteinlerin serbest amino gruplarına post-translasyonel bağlanmasıyla gerçekleşmektedir (11). MPO aracılı katabolizmayla izosiyanik asitin diğer kaynağı olan tiyosiyanatın serum düzeyleri ise diyet ve sigaradan etkilenmektedir (12). MPO hem içeren bir enzim olup, lökositlerde (hem nötrofil hemde makrofajlarda) en bol bulunan proteindir ve aterosklerotik lezyonlarda katalitik olarak aktiftir. MPO insanlarda ateroskleroz ve rupture eğilimli plak gelişimiyle ilişkilidir (13). Homositrulin (karbamile lizin) global olarak protein karbamilasyonunun en güvenilir belirteci olarak kabul edilmekte ve izosiyanik asitin lizin rezidülerinin ϵ -NH₂ gruplarına bağlanmasıyla oluşmaktadır (14). MPO aktivitesi, yüksek üre düzeyleri ve protein karbamilasyonunun ateroskleroz patogenezindeki rolü düşünüldüğünde çalışmamızdaki amacımız en karakteristik karbamilasyon ürünlerinden birisi olan homositrulin düzeylerini PAH'lı hastalarda ve benzer yaş, cinsiyet dağılımı ile risk faktörlerine sahip PAH'ı olmayan bireylerde ölçerek PAH'ın erken tanısındaki ve progresyonundaki rolünün aydınlatılmasına katkıda bulunmak ve serum homositrulin düzeyleri ile çeşitli biyolojik parametreler arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hastalar

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji polikliniğine başvuran PAH teşhisi alan 70 birey ile benzer yaş ve cinsiyet dağılımı ile risk faktörlerine sahip PAH'ı olmayan 65 birey dahil edilmiştir. PAH teşhisi, invaziv periferik anjiyografi, BT/MR anjiyografi, USG ile klinisyenler tarafından konulmuştur. Kontrol grubunda ise PAH tanısı yine klinisyenler tarafından fizik muayane ve el dopleri ile dışlanmıştır. Karaciğer yetmezliği, kronik böbrek yetmezliği, aktif sistemik enfeksiyöz hastalığı, dekompanse kalp yetmezliği olan bireyler, kanser hastaları, nörolojik, psikiyatrik hastalıkları olan, romatizmal hastalıkları olan bireyler ve son üç ay içerisinde akut koroner sendrom geçiren bireyler çalışmaya alınmamıştır. Tüm katılımcılar çalışma hakkında önceden bilgilendirilerek yazılı onamları alınmıştır. Çalışmamız, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul Başkanlığının 22/04/2020 tarih ve 2020/168 sayılı etik kurul kararıyla onaylanmıştır.

Etik kurul onayını takiben katılımcılardan serum separatör jelli ve EDTA'lı tüplere totalde 6 mL kan örneği alınmış, jelli tüplere alınan kanlar 3500 g'de 10 dakika santrifüj edilerek serum örneklerinde rutin biyokimya tetkikleri analiz edildikten hemen sonra kalan serum örnekleri ayrılmış ve homositrulin, lizin düzeylerinin analizine kadar -80°C'de saklanmıştır. PAH'lı hastalardan alınan kan örnekleri ilk başvuru sırasında yani hastalara herhangi bir tedavi başlanmadan önce alınan kan örnekleriydi.

Rutin Laboratuvar Parametrelerinin Ölçümü

EDTA'lı tüplere alınan tam kan örneklerinde lökosit (WBC), hemoglobin (HGB), hematokrit (HCT), platelet (PLT), eritrosit dağılım genişliği (RDW), nötrofil (NEU), lenfosit (LYM), monosit (MONO), eozinofil (EOS), bazofil (BA) sayısı Beckman Coulter LH 780 (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) otoanalizöründe ticari kitler kullanılarak üretici talimatlarına göre ölçülmüştür. Nötrofil lenfosit (NLO) ve platelet

lenfosit oranları (PLO) ise ölçülen nötrofil, platelet ve lenfosit düzeylerinden hareketle hesaplanmıştır.

Serum örneklerinde ise, kreatinin (CREA), glikoz (GLU), trigliserit (TG), total kolesterol (TC), yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL), düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT), üre düzeyleri Beckman-Coulter AU 5800 (Beckman Coulter, Brea, USA) cihazında ticari kitler kullanılarak üretici talimatlarına göre ölçülmüştür. C-reaktif protein (CRP) düzeyleri immunofelometrik yöntemle IMMAGE 800 (Beckman Coulter, Brea, USA) cihazında tespit edilmiştir.

Kimyasallar

Kimyasal maddeler; L-Homocitrulline (CAS Numarası: 1190-49-4), L-Citrulline-4,4,5,5-d4 (MDL numarası MFCD09842626), n-butanol (CAS Numarası:71-36-3), hidroklorik asit (CAS Numarası: 7647-01-0), formik asit (CAS Numarası: 64-18-6), L-Lizin (CAS Numarası:56-87-1), L-Lizin-3,3,4,4,5,5,6,6-d8 hidroklorür (MDL numarası MFCD01074062), HPLC analizlerine uygun saflıkta asetonitril (CAS Numarası: 75-05-8), metanol (CAS Numarası: 67-56-1), su (CAS Numarası: 7732-18-5) Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, MO, ABD) kullanılmıştır.

Serum Homositrulin ve Lizin Düzeylerinin Analizi Ön İşlem Basamakları

Homositrulin ve lizin seviyeleri, Dietzen ve ark. (15). tarafından bildirilen yöntemle göre ölçülmüştür. Kısaca, 200 µl serum örneği ependorf tüplere alınarak üzerine iç standart olarak 50 µl d4-L-sitrülin, 50 µl d8-L-lizin ve protein presipitasyonu için 850 µl metanol eklenerek 30 saniye vortekslenmiş ve daha sonra bu karışım oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, ependorf tüp 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant temiz cam tüplere alındıktan sonra azot gazı altında 65°C'de buharlaştırılmıştır. Buharlaştırma tamamlandıktan sonra 200 µl 3N HCl/n-butanol karışımı eklenmiş ve tüpler ağız kapalı olarak 65°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra azot gazı ile tekrar buharlaştırılmıştır. Buharlaştırma sonrası, tüplerdeki kalıntılar 200 µl %0,1 formik asit içeren asetonitril: su

(20:80; %v:v) karışımında çözülmüş ve 30 µl'si sisteme enjekte edilmiştir.

Cihaz Koşulları

Serum homositrulin ve lizin düzeyleri AB Sciex API 3200 (Applied Biosystems/MDS Sciex) likit kromatografi-tandem kütle spektrometri (LC-MS/MS) cihazıyla pozitif elektroprey iyonizasyon modunda ölçülmüştür. Kromatografik ayırım, Phenomenex C18 HPLC kolonu (50 mm x 4.6 mm) kullanılarak, mobil faz olarak ise %0,1 formik asit içeren su ve asetonitril karışımının (80:20; %v:v) izokratik elüsyonla uygulanmasıyla sağlanmıştır. Akış hızı 1 mL/dakika olup, kolon fırını sıcaklığı 40°C'ye ayarlanmıştır. Toplam analiz süresi her bir örnek için 5 dakika olmuştur.

Homositrulin, lizin, d4-L-sitrülin ve d8-L-lizin için Q1/Q3 iyon geçişleri sırasıyla 246.0/127.0, 203.0/84.0, 236.0/74.0 ve 211.0/84.0 olmuştur. İyon spray voltajı, interface heater sıcaklığı, iyon kaynağı (GS1), iyon kaynağı (GS2), curtain ve collision gaz değerleri sırasıyla 5000 V, 400°C, 40, 60, 20, 5 psi olarak ayarlanmıştır.

İstatistiksel analiz

İstatistiksel değerlendirmeler, 'Statistical Packages for the Social Sciences' (SPSS) versiyon 21.0 programı kullanılarak yapılmıştır. Sürekli değişkenlerin dağılımı Kolmogorov-Smirnov testi ile analiz edilmiştir. Ortalama ve medyan değerler arasındaki istatistiksel kıyaslamalar ise sırasıyla Independent Samples t ve Mann Whitney χ^2 -testleri kullanılmıştır. Korelasyonlar, Spearman's korelasyon testi ile değerlendirilmiştir. Parametrik ve non-parametrik değişkenlere ait istatistiksel bulgular sırasıyla ortalama \pm standart sapma ve ortanca (minimum-maksimum) olarak belirtilmiştir. Homositrulinin hastalığı ön görme gücü receiver operating characteristic (ROC) eğrisi kullanılarak eğri altında kalan alandan (AUC) hareketle tespit edilmiştir. Kategorik değişkenler (cinsiyet, sigara, hiperlipidemi, koroner arter hastalığı, hipertansiyon ve diyabet öyküsü) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olup olmadığı ise Ki-Kare analizi ile test edilmiştir. P<0,05 düzeyi istatistiksel olarak anlamlı farklılık düzeyi olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

Klinik ve Demografik Bulgular

Çalışmaya, 70 PAH hastası ve 65 kontrol dahil edilmiştir. Grupların yaş ortalaması sırasıyla 63,17±10,60 ve 62,08±9,20 olup, yaş ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p=0.524). Ayrıca hasta ve kontrol

grubunda cinsiyet dağılımları (p=0,841), sigara (p=0,573), hipertansiyon (p=0,855), hiperlipidemi (p=0,857), diyabet (p=0,939), koroner arter hastalığı öyküsü (p=0,604), sistolik (p=0,712) ve diyastolik kan basınçları (p=0,832) bakımından da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Hasta ve kontrol grubuna ait temel klinik ve demografik veriler Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. PAH ve kontrol grubuna ait demografik ve temel klinik veriler

Parametreler	PAH (n=70)	Kontrol (n=65)	p
Yaş (yıl)	63,17±10,60	62,08±9,20	0,524
Cinsiyet (Erkek, n (%))	58 (% 82,3)	53 (% 81,5)	0,841
Hipertansiyon n (%)	42 (% 60)	40 (% 61,5)	0,855
Hiperlipidemi n (%)	60 (% 85,7)	55 (% 84,6)	0,857
Diyabet n (%)	34 (% 48,5)	32 (% 49,2)	0,939
KAH n (%)	50 (% 71,4)	49 (% 75,3)	0,604
Sigara n (%)	40 (% 57,1)	34 (% 52,3)	0,573
Sistolik kan basıncı (mmHg)	120,9±14,7	120±11,9	0,712
Diyastolik kan basıncı (mmHg)	72,8±7,5	72,6±6,4	0,832
Tedavi			
Medikal n (%)	5 (%7,1)		
Perkütan girişim n (%)	50 (%71,4)		
Cerrahi n (%)	15 (%21,4)		

KAH, koroner arter hastalığı.

Laboratuvar parametreleri ve homositrulin, lizin düzeyleri

KPAH'lı hasta ve kontrol grubuna ait çeşitli biyolojik parametreler kıyaslandığında PAH'lı hastaların NEU, MONO, RDW, CRP düzeyleri ile NLO'ları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bulunurken, LYM, HGB ve HDL düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu görülmüştür. İki

grubun ALT, AST, WBC, EOS, BA, HCT, PLT, GLU, üre, CREA, TC, LDL, TG düzeyleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p>0,05).

PAH'lı hastaların serum homositrulin düzeyleri ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir (p<0,001). Katılımcılara ait biyolojik parametrelerin ve serum homositrulin düzeyleri Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. PAH ve kontrol grubuna ait laboratuvar parametrelerinin kıyaslanması

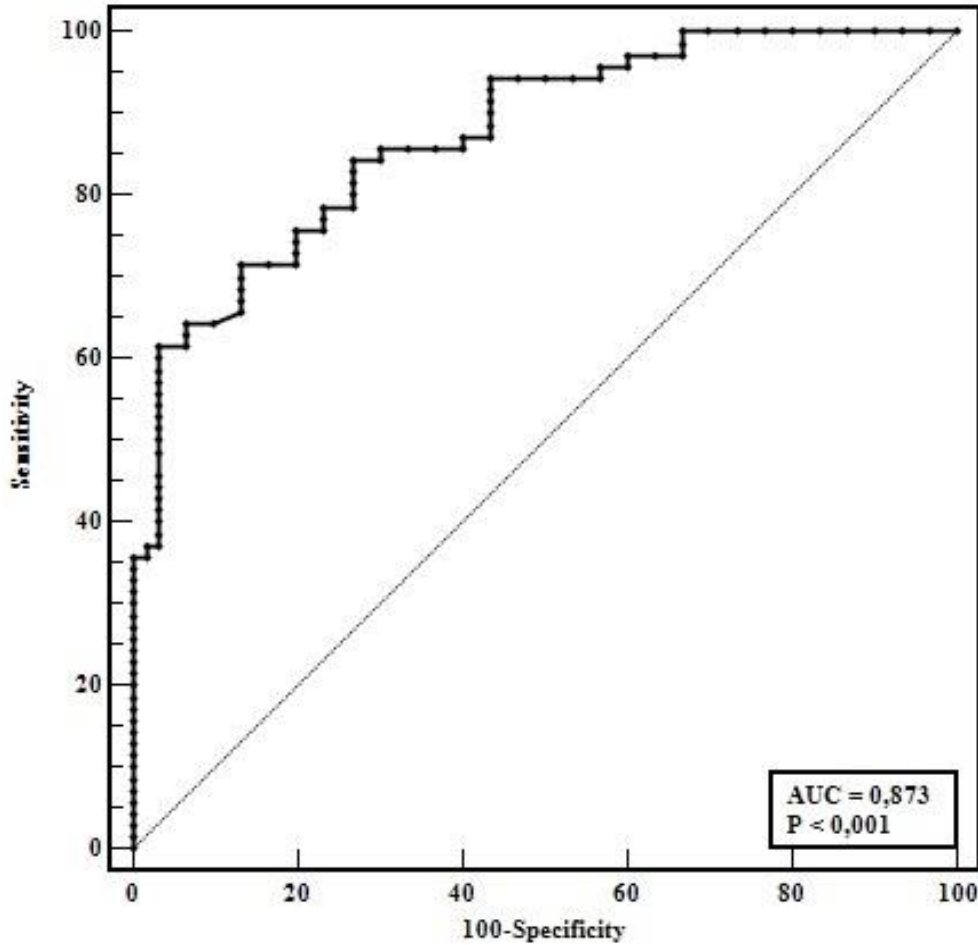
Parametreler	PAH (n=70)	Kontrol (n=65)	p
WBC (10 ⁹ /L)	8,54±1,96	8,0±2,33	0,147
LYM (10 ⁹ /L)	1,9±0,64	2,15±0,75	0,040
NEU (10 ⁹ /L)	5,66±1,76	4,96±1,83	0,025
MONO (10 ⁹ /L)	0,71±0,22	0,61±0,27	0,024
EOS (10 ⁹ /L)	0,22±0,16	0,18±0,10	0,142
BA (10 ⁹ /L)	0,054±0,049	0,048±0,10	0,670
PLO	121,7 (56,9-706,0)	115,5 (49,5-460,1)	0,205
NLO	3,0 (0,93-9,50)	2,3 (1,01-9,20)	0,001
HCT (%)	38,62±6,75	38,90±3,79	0,784
RDW (%)	15,37±2,89	14,44±1,57	0,025
HGB (g/L)	12,86±2,18	14,04±1,58	<0,001
PLT (10 ⁹ /L)	259,51±92,5	255,82±79,6	0,805
ALT (U/L)	23,68±15,85	21,23±13,41	0,407
AST (U/L)	29,75±19,04	22,54±11,45	0,177
GLU (mg/dL)	116,40±49,2	107,60±29,8	0,262
Üre (mg/dL)	31,86±8,36	30,40±6,31	0,302
CREA (mmol/L)	0,88±0,23	0,84±0,17	0,092
TC (mg/dL)	164,41±42,1	173,53±51,4	0,261
TG (mg/dL)	170,44±115,6	161,92±91,9	0,638
LDL (mg/dL)	94,02±35,9	99,1±41,6	0,448
HDL (mg/dL)	36,41±9,27	42,47±9,54	<0,001
CRP (mg/L)	5,6 (1,0-12,2)	4,0 (0,6-8,7)	0,002
Homositrülin (µmol / mol lizin)	285,7±135,2	187,1±61,0	<0,001

ALT, alanin aminotransferaz; AST, aspartat aminotransferaz; BA, bazofil; CREA, kreatinin; CRP, C-reaktif protein; EOS, eozinofil; GLU, glikoz; HCT, hematokrit; HDL, yüksek yoğunluklu lipoprotein; HGB, hemoglobin; LDL, düşük yoğunluklu lipoprotein; LYM, lenfosit; MONO, monosit; NEU, nötrofil; NLO, nötrofil lenfosit oranı; PLO, platelet lenfosit oranları; PLT, platelet; RDW, eritrosit dağılım genişliği; TC, total kolesterol; TG, trigliserit; WBC, lökosit.

Spearman korelasyon analizi, serum homositrulin düzeyleri ile üre ($r=0,394$, $p<0,001$), CRP ($r=0,236$, $p=0,008$), NLO ($r=0,207$, $p=0,018$) ve PLO ($r=0,175$, $p=0,047$) düzeyleri arasında pozitif korelasyon olduğunu gösterirken diğer biyolojik parametreler ile homositrulin düzeyleri arasındaki korelasyonlar

istatistiksel olarak anlamlı görülmemiştir.

ROC analizi ise PAH için homositruline ait optimal cut-off değerinin %71,4 sensitivite ve %86,7 spesifiteyle $165,1 \mu\text{mol} / \text{mol}$ lizin ($p<0,001$) olduğunu göstermekteydi. AUC değeri $0,873$ olup %95 güven aralığı $0,804-0,925$ bulunmuştur.



Şekil 1. Serum homositrülin düzeylerinin PAH'ı ön görme gücüne ait ROC eğrisi
AUC, eğri altında kalan alan;
ROC, alıcı işletim karakteristik eğris

TARTIŞMA ve SONUÇ

Proteinler *in vivo* yaşamları boyunca çeşitli PTM'lere uğramaktadır. PTM protein sentezi sırasında veya sonrasında proteinlere fonksiyonel grupların genellikle enzimatik reaksiyonlarla kovalent olarak eklenmesidir ve bu reaksiyonların çoğu polipeptit zincirinin reaktif amino yada karboksil gruplarını içeren reaktif uçlarında gerçekleşir (16). Bilinen 400'den fazla farklı tip PTM vardır ve bu reaksiyonlar şekerler, dikarbonil bileşikler, reaktif oksijen türevleri gibi küçük metabolitlerle protein zincirindeki amino asitlerin etkileşimleri sonucunda gerçekleşmektedir. Bu modifikasyonlar proteinlerin yapısını, fonksiyonlarını, yaşam sürelerini, protein-protein etkileşmelerini, hücre-hücre ve hücre matrisi etkileşmelerini, sinyalizasyon mekanizmalarını, çözünürlüklerini ve lokalizasyonlarını etkilemekte olup proteinlerin davranış ve karakteristikleri üzerinde geniş bir etkiye sahiptir (17). Giderek artan kanıtlar PTM'lerin kanser, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların patogeneze dahil olduğunu göstermektedir (18-21). Bu reaksiyonlardan oksidasyon ve glikasyonun ateroskleroz patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir (22, 23). Okside-LDL hücre yüzeyinde adezyon moleküllerinin ekspresyonunu tetikleyerek endotel hücrelerini aktive etmektedir. Bu adezyon molekülleri kemokinlere yanıt olarak endotelyuma göç eden lökositlerin intimaya adezyonuna aracılık etmektedir. Makrofaj aktivasyonunun bir sonucu olarak ise matrisi degradasyonuna yol açan proenflamatuvar sitokinlerin salınımı, reaktif oksijen türevlerinin (ROS) sentezi ve proteolitik enzimlerin üretimi artar. Ayrıca, okside-LDL endotelial nitrik oksit (eNOS)'u inhibe ederek endotelial nitrik oksit (NO) üretimini azaltır. Dolayısıyla, okside-LDL'nin makrofaj scavenger reseptörleri ile etkileşiminin ateroskleroz başlangıcında kilit bir rol oynadığı düşünülmektedir (24). Aynı fenomen glisemik-LDL içinde tanımlanmıştır ve ileri glikasyon son ürünlerinin

(AGEs) artmış serum düzeylerinin kardiyovasküler olaylarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. AGE prekürsörleri makrofaj apoptozu ile ilişkilidir ve rüptüre eğilimli aterosklerotik plaklara neden olmaktadır (25).

Son yıllarda, ateroskleroz ve diğer kardiyovasküler hastalıkların patogeneze dahil olduğu gösterilmiş olan diğer önemli bir PTM ise karbamilasyondur. Protein karbamilasyonunun moleküler yaşlanmayla ve birçok patolojik durumla ilişkili olduğu kabul edilmektedir (26). Çalışmamızda PAH'lı hastalarda en karakteristik karbamilasyon ürünü olan homositrulin düzeylerini ölçerek karbamilasyon ile PAH patogenezi arasındaki ilişkiyi ve homositrulinin bu hastalığı tanımladığını araştırmayı hedeflemiştir. Elde edilen sonuçlarımız, PAH'lı hastalarda, benzer yaş, cinsiyet dağılımı ve risk faktörlerine sahip kontrol grubuna göre serum homositrulin düzeylerinin yüksek olduğunu göstermiştir (Tablo 2). Homositrulinin kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisinin araştırılmasına yönelik kısıtlı sayıda çalışma mevcuttur. Wang ve ark. (27) tarafından yapılan çalışmada, karbamilasyonun aterosklerotik plaklarda MPO-bağımlı mekanizmalar aracılığıyla amplifiye edilebileceğini ve serum homositrulin konsantrasyonlarının kardiyovasküler olaylarla pozitif korele olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada, serum homositrulin düzeyleri PAH'ı veya koroner arter hastalığı olan bireylerde kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Ayrıca PAH'lı hastaların serum homositrulin düzeyleri koroner arter hastalığı olan bireylere göre hafif daha yüksek olduğu görülmüştür. Tang ve ark. (28) ise, kronik sistolik kalp yetmezliği olan hastalarda protein karbamilasyonunun sol ventriküler disfonksiyondan ziyade bozulmuş renal fonksiyonla ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Jaisson ve ark. (29) ise koroner arter hastalığı olan bireylerde serum homositrulin düzeylerinin kontrol grubuna [0.21 (0.17-0.25) vs 0.14 (0.10-0.17) mmol/mol lizin, $p < 0.001$] göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğunu, Gensini skoruyla serum homositrulin düzeyleri arasında pozitif korelasyonu

bildirmiştir. Dolayısıyla homositrulin düzeylerinin koroner arter hastalığı boyunca yükseldiğini ve aynı zamanda hastalık şiddetiyle homositrulin düzeyleri arasında pozitif korelasyon olduğunu belirtmiştir (29). Bizde çalışmamızda, benzer şekilde PAH'lı hastalarda serum homositrulin düzeylerini kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulmuş [285,7±135,2 187,1±61,0 µmol / mol lizin, p<0,001]. Dolayısıyla, bulgularımız önceki çalışmalarla uyumlu olduğu görülmüştür. Jaisson ve ark. (29) homositrulinin koroner arter hastalığını öngörme gücünü değerlendirmek için yaptıkları ROC analizinde homositrulin için optimal cut-off değerini 0,16 mmol / mol lizin (%78,9 sensitivite ve %78,8 spesifiteyle) olarak, AUC değerini ise 0,908 olarak bildirmiştir. Çalışmamızda ise homositrulinin periferik arter hastalığını öngörme gücünü değerlendirmek amacıyla ROC analizi yaptığımızda AUC değerini 0,873 olarak, optimal cut-off değerini ise %71,4 sensitivite ve %86,7 spesifiteyle 165,1 µmol homositrulin/ mol lizin (p<0,0001) olarak tespit edilmiş, %95 güven aralığı 0,804-0,925 bulunmuştur.

Homositrulin ürenin spontan degradasyonu ve da hidrojen peroksit varlığında MPO aracılığıyla tiyosiyanattan hareketle sentezlenmektedir. Dolayısıyla homositrulin düzeylerindeki yükseklik bu iki yolla açıklanmaktadır. Çalışma grubumuzdaki tüm hastaların renal fonksiyonları normal olup, serum kreatinin düzeyleri 1,1 mg/dl'nin altında, üre düzeyleri ise 17-50 mg/dl'nin aralığındaydı. Kontrol grubuyla PAH grubunun serum kreatinin ve üre düzeyleri arasındaki farklılıkta istatistiksel olarak anlamsız olduğu belirlenmiştir (p>0,05). Bu bulgular, PAH'lı hastalardaki yüksek homositrulin düzeylerinin MPO-bağımlı yolakla ilişkili olduğunu düşündürmekteydi. Degranülasyon esnasında nötrofillerden salınan en önemli enzimlerden birisi MPO'dur ve çeşitli çalışmalarla artmış MPO düzeylerinin kardiyovasküler olaylardaki artışla ilgili olduğu gösterilmiştir (30-32). MPO aterosklerotik lezyonlar dahil enflamasyon bölgelerinde yüksek düzeylerde ekspresse edilerek oksidatif hasarı

desteklemektedir. Aterosklerotik lezyonlarda MPO hipokloröz asit oluşturabilmek için ekstraselüler matriksle etkileşime girmektedir. Aterosklerotik lezyonlarda MPO'nun varlığı endotelyum apoptozu, yüzeysel erozyon ve lezyon rüptürü ile ilişkilidir. MPO, bir dizi ROS oluşumunu katalize eden lökosit türevli bir enzim olup doğuştan gelen bağışıklık yanıtının ayrılmaz bir bileşenidir. Ancak, MPO'dan türetilen oksidanların enflamasyon sırasında doku hasarına katkıda bulunduğu dair kanıtlar ortaya çıkmıştır ve MPO katalizli reaksiyonların ateroskleroz patogenezinde dahil olduğu düşünülmektedir (33). Dolayısıyla çalışmamızda, PAH'lı hastalarda yükselmiş homositrulin düzeylerinin aterosklerotik lezyonlarda MPO'nun artmış ekspresyonuna bağlı olarak karbamilasyon reaksiyonlarının amplifikasyonu ile ilişkili olduğunu düşünmekteyiz. Hızlanmış karbamilasyon reaksiyonları sonucunda lizine ekolarak diğer birçok proteinde karbamilasyona uğramaktadır. Bunlardan karbamile LDL (c-LDL) ve HDL (c-HDL)'nin kardiyovasküler hastalıklardaki rolü kanıtlanmıştır. Son yıllarda, c-LDL'nin lektin benzeri okside LDL reseptörü-1 aktivasyonu yoluyla endotelial disfonksiyonu indüklediği, ROS sentezini arttırdığı ve eNO sentezini azalttığı gösterilmiştir. Dahası, c-LDL'nin makrofaj scavenger reseptörlere bağlanarak kolesterol birikimi ve köpük hücrelerin oluşumuna yol açtığı, vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu arttırarak aterojenik özellik gösterdiği düşünülmektedir (9). HDL ateroskleroza karşı koruyucu rol oynasa da *in vitro* kanıtlar c-HDL'nin artmış düzeylerini endotele monositlerin adezyonunu kolaylaştırarak aterosklerotik plakların oluşmasını kolaylaştırabileceğini göstermektedir (34). Şuana kadar tanımlanmış en karakteristik ve en yaygın karbamilasyon ürünü homositrulin olduğundan çalışmamızda total karbamilasyonu değerlendirmek amacıyla homositrulin düzeyleri ölçülmüştür. Dolayısıyla artmış homositrulin düzeyleri diğer proteinlerinde karbamilasyonunun artmış olduğunu ve oluşan karbamilasyonun PAH patogenezinde önemli bir rol oynadığı bulgusunu desteklemektedir.

Sonuç olarak, bulgularımız serum homositrulin düzeylerinin PAH'lı hastalarda kontrol grubuna göre önemli ölçüde yüksek olduğunu, homositrulinin PAH'ın erken teşhisinde yararlı bir markır olabileceğini ve 165,1 μmol / mol lizin düzeyinin PAH hastalığını eşit oranlarda risk faktörlerine sahip fakat PAH'ı olmayan bireylerden ayırt etmede kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak bu konuda daha geniş bir popülasyonda ileri çalışmalara gereksinim vardır. Çalışmamız, PAH'lı hastalarda benzer risk faktörlerine sahip bireylere karşı

homositrulin düzeylerinin çeşitli klinik ve biyolojik parametrelerle birlikte araştırılmasını hedefleyen kapsamlı bir çalışma olması ve homositrulinin kardiyovasküler hastalıkların patogenezindeki rolünün aydınlatılmasına yönelik çalışmalara katkı sağlaması bakımından avantajlıdır, ancak kısıtlı hasta sayısı, MPO aktivitesinin ölçülmemiş olması çalışmamızın dezavantajlarıydı. Daha geniş bir hasta grubunda homositrulin yolağıyla ilgili tüm parametreleri kapsamlı bir şekilde araştırmaya yönelik yeni çalışmalara gereksinim vardır.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul Başkanlığı'nın onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih: 22.04.2020 ve Karar No: 2020/168).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Shu J, Santulli G. Update on peripheral artery disease: Epidemiology and evidence-based facts. *Atherosclerosis*, 2018; 275:379-81.
2. Criqui MH, Aboyans V. Epidemiology of peripheral artery disease. *Circ Res*, 2015; 116(9):1509-26.
3. Solomon C, Kullo I, Rooke T. Peripheral artery disease. *N Engl J Med*, 2016; 374:861-71.
4. Signorelli SS, Marino E, Scuto S, Di Raimondo D. Pathophysiology of peripheral arterial disease (PAD): a review on oxidative disorders. *Int J Mol Sci*, 2020; 21(12).
5. Eid MA, Mehta KS, Goodney PP. Epidemiology of peripheral artery disease. *Semin Vasc Surg*, 2021; 34(1):38-46.
6. Soyoye DO, Abiodun OO, Ikem RT, Kolawole BA, Akintomide AO. Diabetes and peripheral artery disease: A review. *World J Diabetes*, 2021; 12(6):827-38.
7. Serra R, Abramo A, Ielapi N, Procopio S, Marino P. Environmental pollution and peripheral artery disease. *Risk Manag Healthc Policy*, 2021; 14:2181-90.
8. Kim C, Yang YS, Ryu GW, Choi M. Risk factors associated with amputation-free survival for patients with peripheral arterial disease: a systematic review. *Eur J Cardiovasc Nurs*, 2021; 20(4):295-304.
9. Verbrugge FH, Tang WHW, Hazen SL. Protein carbamylation and cardiovascular disease. *Kidney Int*, 2015; 88(3):474-8.
10. Shi J, van Veelen PA, Mahler M, Janssen GM, Drijfhout JW, Huizinga TW, et al. Carbamylation and antibodies against carbamylated proteins in autoimmunity and other pathologies. *Autoimmun Rev*, 2014; 13(3):225-30.
11. Delanghe S, Delanghe JR, Speeckaert R, Van Biesen W, Speeckaert MM. Mechanisms and consequences of carbamylation. *Nat Rev Nephrol*, 2017; 13(9):580-93.
12. Delanghe S, Delanghe JR, Speeckaert R, Van Biesen W, Speeckaert MM. Mechanisms and consequences of carbamylation. *Nat Rev Nephrol*, 2017; 13(9):580-93.
13. Teng N, Maghzal GJ, Talib J, Rashid I, Lau AK, Stocker R. The roles of myeloperoxidase in coronary artery disease and its potential implication in plaque rupture. *Redox Rep*, 2017; 22(2):51-73.
14. Jaisson S, Desmons A, Doué M, Gorisse L, Pietrement C, Gillery P. Measurement of homocitrulline, a carbamylation-derived product, in serum and tissues by LC-MS/MS. *Curr Protoc Protein Sci*, 2018; 92.
15. Dietzen DJ, Weindel AL, Carayannopoulos MO, Landt M, Normansell ET, Reimschisel TE, et al. Rapid comprehensive amino acid analysis by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: comparison to cation exchange with post-column ninhydrin detection. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008; 22(22):3481-8.
16. Chen L, Kashina A. Post-translational modifications of the protein termini. *Front Cell Dev Biol*, 2021; 9:719590.
17. Ramazi S, Zahiri J. Post-translational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. *Database*, 2021; 2021:1-20.
18. Zhang H, Han W. Protein post-translational modifications in head and neck cancer. *Front Oncol*, 2020; 10(2124).
19. Chatterjee B, Thakur SS. Investigation of post-translational modifications in type 2 diabetes. *Clin Proteomics*, 2018; 15(32):1-11.

20. Gupta R, Sahu M, Srivastava D, Tiwari S, Ambasta RK, Kumar P. Post-translational modifications: Regulators of neurodegenerative proteinopathies. *Ageing Res Rev*, 2021; 68:101336.
21. Marquez J, Lee SR, Kim N, Han J. Post-translational modifications of cardiac mitochondrial proteins in cardiovascular disease: not lost in translation. *Korean Circ J*, 2016; 46(1):1-12.
22. Gao S, Zhao D, Wang M, Zhao F, Han X, Qi Y, et al. Association between circulating oxidized LDL and atherosclerotic cardiovascular disease: a meta-analysis of observational studies. *Can J Cardiol*, 2017; 33(12):1624-32.
23. Zimmermann R, Panzenböck U, Wintersperger A, Levak-Frank S, Graier W, Glatter O, et al. Lipoprotein Lipase Mediates the Uptake of Glycated LDL in Fibroblasts, Endothelial Cells, and Macrophages. *Diabetes*, 2001; 50(7):1643-53.
24. Poznyak AV, Nikiforov NG, Markin AM, Kashirskikh DA, Myasoedova VA, Gerasimova EV, et al. Overview of OxLDL and its impact on cardiovascular health: focus on atherosclerosis. *Front Pharmacol*, 2020; 11:613780.
25. de Vos LC, Lefrandt JD, Dullaart RP, Zeebregts CJ, Smit AJ. Advanced glycation end products: An emerging biomarker for adverse outcome in patients with peripheral artery disease. *Atherosclerosis*, 2016; 254:291-9.
26. Gorisse L, Pietrement C, Vuiblet V, Schmelzer C, Köhler M, Duca L, et al. Protein carbamylation is a hallmark of aging. *Proc Natl Acad Sci*, 2015; 113:201517096.
27. Wang Z, Nicholls SJ, Rodriguez ER, Kummu O, Hörkkö S, Barnard J, et al. Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. *Nat Med*, 2007; 13(10):1176-84.
28. Tang WHW, Shrestha K, Wang Z, Borowski AG, Troughton RW, Klein AL, et al. Protein carbamylation in chronic systolic heart failure: relationship with renal impairment and adverse long-term outcomes. *J Card Fail*, 2013; 19(4):219-24.
29. Jaisson S, Kerkeni M, Santos-Weiss IC, Addad F, Hammami M, Gillery P. Increased serum homocitrulline concentrations are associated with the severity of coronary artery disease. *Clin Chem Lab Med*, 2015; 53(1):103-10.
30. Ramachandra CJA, Ja KPMM, Chua J, Cong S, Shim W, Hausenloy DJ. Myeloperoxidase as a multifaceted target for cardiovascular protection. *antioxidants & redox signaling*, 2019; 32(15):1135-49.
31. Kimak E, Zięba B, Duma D, Solski J. Myeloperoxidase level and inflammatory markers and lipid and lipoprotein parameters in stable coronary artery disease. *Lipids Health Dis*. 2018;17(1):71.
32. Roth Flach RJ, Su C, Bollinger E, Cortes C, Robertson AW, Opsahl AC, et al. Myeloperoxidase inhibition in mice alters atherosclerotic lesion composition. *PLoS One*, 2019; 14(3):e0214150.
33. Nicholls SJ, Hazen SL. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005; 25(6):1102-11.
34. Chen Z, Ding S, Wang YP, Chen L, Mao JY, Yang Y, et al. Association of carbamylated high-density lipoprotein with coronary artery disease in type 2 diabetes mellitus: carbamylated high-density lipoprotein of patients promotes monocyte adhesion. *J Transl Med*, 2020; 18(1):460.