

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

KORONER ARTER HASTALIĞINDA TGF β 1 GEN POLİMORFİZMLERİNİN
TGF β 1 VE ADAMTS-4 SERUM DÜZEYLERİ İLE İLİŞKİSİ

UZMANLIK TEZİ
Safiye ULUÇAY

Tez Danışmanı
Doç. Dr. F.Sırrı ÇAM

Manisa, 2013

ÖNSÖZ

Eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, eğitimimde gösterdiği özverili çabalar ve desteği için uzmanlık tezimin konusunun belirlenmesinden, basım aşamasına gelinceye kadar desteklerini esirgemeyen tez danışmanı değerli hocam Doç. Dr. F. Sırrı ÇAM' a teşekkür ederim.

Tezimin başlangıcından sonuna kadar çalışmalarım sırasında değerli bilgi ve desteklerini esirgemeyen Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr. Özgür Bayturan'a, Turgut Özal Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Kadir Demircan'a ve Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya öğretim üyesi Prof. Dr. Recep Sütçü'ye teşekkür ederim.

İhtisasım süresince her konuda maddi manevi desteklerini esirgemeyen Tıbbi Genetik Laboratuvarında çalışan mesai arkadaşlarıma, tezimin laboratuvar çalışmalarında primer desteğinden dolayı Araştırma Görevlisi M. Burak Batır'a teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde emeklerini yadsıyamayacağım, her zaman desteklerini yanımda hissettiğim annem, babam ve kardeşime; gerek asistanlık, gerekse tez hazırlıkları sürecinde, bana gösterdikleri sabır ve verdikleri destek için, benimle her türlü güzelliği, zorluğu, hayatı paylaşan sevgili eşim Celal Bayar Üniversitesi Adli Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Tarık ULUÇAY ve kızlarım Betül ve Zeynep'e sonsuz şükranlarımı sunarım.

Dr. Safiye ULUÇAY

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLO DİZİNİ.....	iv
ŞEKİL DİZİNİ	v
I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	3
II.1 Koroner Arter Hastalığı Tanım ve Epidemiyoloji.....	3
II.2 Koroner Arter Hastalığında Genetik Faktörler ve Aile Öyküsü	6
II.3 Koroner Arter Hastalığında Patofizyoloji.....	9
II.3.1 Kalbi Besleyen Ana Arterler	9
II.3.2 Normal damar duvarı yapısı	10
II.3.3 Ateroskleroz oluşum mekanizması	10
II.3.4 Ateroskleroz Oluşumunda Hipotezler	15
II.3.5 <i>Ekstraselüler Matris ve Ateroskleroz</i>	18
II.4 ADAMTS Ailesi ve Ateroskleroz	22
II.5 TGF β 1 ve Ateroskleroz.....	25
II.6 TGF β 1 geni polimorfizmlerinin koroner arter hastalığındaki rolü	29
II.7 Çalışmanın Amacı	31
III. GEREÇ-YÖNTEM	32
III.1 Araştırma Grubu	32
III.2 Çalışmada Kullanılan Yöntemler	32
III.2.1 TGF β 1 Ve ADAMTS-4 Serum Düzeylerinin Tespiti.....	34
III.2.2 TGF β 1 Genotiplerinin Belirlenmesi	35
IV. BULGULAR.....	43
IV.1 <i>TGFβ1 geni genotip bulguları</i>	44
IV.2 TGF β 1 ve ADAMTS-4 serum düzeyleri bulguları	49
V. TARTIŞMA.....	52
VI. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	58
VII. ÖZET	60
VIII. İNGİLİZCE ÖZET	62
IX. KAYNAKLAR	64

TABLO DİZİNİ

- Tablo 1. Koroner arter hastalığında majör risk faktörleri
- Tablo 2. Koroner arter hastalığında minör risk faktörleri
- Tablo 3. Aile öyküsü ile ilişkili kalp krizi göreceli risk oranları
- Tablo 4. Koroner arter hastalığında genetik yatkınlık varlığının karakteristik özellikleri
- Tablo 5. Koroner arter hastalığına yatkınlık genleri
- Tablo 6. Aterosklerozun histopatolojik ve radyolojik sınıflaması
- Tablo 7. Projede kullanılan makine ve teçhizatlar
- Tablo 8. PCR için kullanılan forward ve reverse primerler
- Tablo 9. Çalışmada kullanılan enzimler ve özellikleri
- Tablo 10. Çalışılan polimorfizmlerin enzim kesimi sonucu oluşan kesim ürünleri
- Tablo 11. Çalışma grubunu oluşturan olguların demografik özellikleri
- Tablo 12. Çalışma grubunu oluşturan olguların risk faktörleri verileri
- Tablo 13. TGF β 1 geni rs1800469 polimorfizmi genotip sıklıkları
- Tablo 14. TGF β 1 geni rs1800470 polimorfizmi genotip sıklıkları
- Tablo 15. TGF β 1 geni rs4803455 polimorfizmi genotip sıklıkları
- Tablo 16. Olguların rs1800469, rs1800470 ve rs480455 genotip sıklıkları
- Tablo 17. Hasta ve kontrol grubunun ikili genotip sıklıkları
- Tablo 18. Çalışma grubunun serum TGF β 1 ve ADAMTS-4 serum düzeyleri
- Tablo 19. Hastaların TGF β 1 geni genotiplerine göre TGF β 1 serum düzeyleri
- Tablo 20. ADAMTS-4 ve hastalığın şiddetinin değerlendirilmesi
- Tablo 21. Farklı toplumlarda rs1800469 ve rs1800470 genotip sıklıkları

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Temel aterogenez basamakları

Şekil 2. Normal ekstraselüler matriks yapısı

Şekil 3. Versikan yapısı ve varyantları

Şekil 4. ADAMTS ailesinin aterosklerozdaki muhtemel etkileri

Şekil 5. TGF β 1 aktivasyonunun şematik görünümü

Şekil 6. TGF β 1 sinyal yolağının şematik gösterimi

Şekil 7. TGF β 1 düzey değişikliklerinin ateroskleroz gelişimindeki olası etkileri

Şekil 8. TGF β 1 geni promotor bölge polimorfizmleri

Şekil 9. rs4803455 polimorfizm bölgesine spesifik PCR jel görüntüleri

Şekil 10. rs1800469 polimorfizm bölgesine spesifik PCR jel görüntüleri

Şekil 11. rs1800470 polimorfizm bölgesine spesifik PCR jel görüntüleri

Şekil 12. rs1800469 polimorfizm bölgesine enzim kesimi jel görüntüleri

Şekil 13. rs4803455 polimorfizm bölgesine enzim kesimi jel görüntüleri

Şekil 14. rs1800470 polimorfizm bölgesine enzim kesimi jel görüntüleri

I. GİRİŞ

Koroner arter hastalığı, diğer adıyla iskemik kalp hastalığı kardiyovasküler hastalıklar içerisinde tüm dünyada en büyük grubu oluşturan, mortalite ve morbiditesi yüksek multifaktöriyel bir hastalıktır. Hastalık sıklıkla kalbin beslenmesini sağlayan ana damarların aterom plaklarla tıkanması sonrasında oluşmaktadır. Aterom plakların oluşumunda rol alan farklı mekanizmalar mevcut olup bu alanda çalışmaların artmasıyla yeni mekanizmalar ortaya konabilmektedir. Hastalığın oluşumunda etkili risk faktörleri tanımlanmış olmakla birlikte bu faktörlerin hangi genetik değişimler varlığında hastalığın gelişimini nasıl sağladığı henüz netlik kazanmamıştır.

Multifaktöriyel kalıtım özelliği gösteren aterosklerotik kalp hastalığında aile öyküsü bağımsız risk faktörü kabul edilmekte, hastalığın genetik yatkınlık varlığında risk faktörlerinin etkisiyle oluştuğu bilinmektedir. Şimdiye kadar çok sayıda gen polimorfizminin koroner arter hastalığına yatkınlık oluşturduğu saptanmıştır.

Mevcut durumda aterosklerotik kalp hastalığı tedavisinde risk faktörlerine yönelik tedaviler ön planda olup, bu tedavilerden elde edilen etkinliğin maksimum %30 olduğu tespit edilmiştir. Hastalığın patogenezinde yer alan aterom plak gelişiminin önlenmesine yönelik tedavi şu an için mümkün olmayıp ateroskleroz gelişimini başlatan faktörlerin ortaya konması bu alanda yeni tedavi olanaklarının gelişimine katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bugün için damar duvarında ateroma gelişimini önlemeye yönelik çalışmalar özellikle inflamasyon, oksidasyon, endotel disfonksiyonu, hiperglisemi ve vasküler matriks

proteoglikanları tarafından lipid tutulumunun artması konuları üzerinde yoğunlaşmıştır.

Hastalığın patogenezinde son dönemde damar duvarı ekstrasellüler matriks değişikliklerinin aterom plak gelişiminde rolü olabileceği ve matriksin yıkımını sağlayan enzimlerin hastalığın oluşumda etkili olabileceği düşünülmektedir. Özellikle bu süreçte sorumlu olabileceği düşünülen ADAMTS metalloproteazlarla ilgili çalışmalar her geçen gün artmaktadır. TGF β ; endotel fonksiyonunun korunması, ekstrasellüler matriksin yapım ve yıkımında rol alması ve inflamatuvar süreçlerdeki fonksiyonları nedeniyle aterogenez sürecinde önemli bir sitokin olup, TGF β geni fonksiyonel polimorfizmlerinin ateroskleroz gelişimine katkı yapma potansiyeli oluşturduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada amacımız koroner arter hastalığı tanısı almış hastalarda TGF β geni polimorfizmlerini saptamak ve bu polimorfizmlerin TGF β 1 serum düzeyini ve ADAMTS ailesinden ADAMTS-4 serum düzeyi üzerine etkisini ortaya koymaktır. İki molekül arasındaki ilişkinin ortaya konması bu alanda yapılacak diğer araştırmalar için yol gösterici olacaktır.

II. GENEL BİLGİLER

II.1 Koroner Arter Hastalığı Tanım ve Epidemiyoloji

Koroner arter hastalığı (KAH), kalbin kan akımını sağlayan koroner arterleri etkileyen patolojileri kapsamakla birlikte en sık aterom adı verilen tıkaçıcı özellikte plak gelişimi ile karakterize ateroskleroz ile oluşmaktadır.

Kardiyovasküler hastalıklar içerisinde en büyük paya sahip olan KAH, tüm dünyada yaygın olarak görülen yüksek mortalite ve morbiditeye sahip bir hastalıktır. 2008 yılında 17 milyon kişinin kardiyovasküler hastalıklar nedeni ile öldüğü, 3 milyondan fazla ölümün 60 yaştan önce olduğu tespit edilmiştir. Erken yaş ölümlerinde ise kardiyovasküler nedenler gelişmiş ülkelerde %4 oranında iken gelişmekte olan ülkelerde %42 oranında görülmektedir (1). Kardiyovasküler hastalıklar içerisinde koroner arter hastalığı kadınlarda %38 erkeklerde %42 oranında en büyük grubu oluşturmaktadır. 2010 yılı Amerikan Kalp Derneği verilerine göre 20 yaş üstünde koroner arter hastalığı prevalansı %6,2 iken, myokard infarktüsü öyküsü %2,9 olarak tespit edilmiştir. Kadın ve erkeklerin yaşam boyunca koroner arter hastalığı gelişme riskinin %32 ve %49 olduğu tahmin edilmektedir (2). Ülkemizde ise yaklaşık 3,1 milyon koroner kalp hastasının bulunduğu ve bu sayının yılda %6,4 arttığı, yılda 190 bin kişinin koroner kalp hastalığından öldüğü tahmin edilmektedir (3). Türkiye 2003 hane halkı araştırmasında; 18 yaş ve üstü cevaplayıcıların %6,57'sinin bir hekim tarafından angina pectoris ya da göğüs ağrısı tanısı aldığı bulunmuştur (4)

Koroner arter hastalığı kaynaklı mortalite oranları ise gelişmiş ülkelerde risk faktörleri modifikasyonu, erken tanı ve tedavi nedeni ile azalma göstermesine rağmen AHA verilerine göre her 6 ölümden birinin nedeninin koroner arter hastalığı nedeni ile oluştuğu, her 34 dakikada bir kişinin koroner

olay nedeni ile öldüğü, hastane ölümlerinde %73 oranında koroner arter hastalığı nedeni ölümlerin bulunduğu bildirilmektedir (1, 2). 2006 yılı Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre dünyada 7.6 milyon kişi koroner arter hastalığı nedeni ile kaybedilmiştir (1). Ülkemizde ise koroner mortalite, 45-74 yaş kesimi karşılaştırılınca, Avrupa ülkeleri arasında en yüksek seviyelerdedir. Türkiye’de ulusal düzeyde %21,7 ve tüm yaş gruplarında kadınlarda % 22,9 ve erkeklerde % 20,7 ile birinci ölüm nedeni iskemik kalp hastalığıdır (4). Koroner morbidite ile mortalitenin her yıl %5 oranında yükseldiği tahmin edilmektedir. Nüfusumuz gelişmekte olan toplumlardaki gibi genç yapıdayken, ülkemizde koroner hastalık mortalitesinin, yaşlı nüfus yapısına sahip gelişmiş toplumlardaki kadar yüksek olması, hem günümüz, hem de gelecek için kaygı verici bir durumdur (3). Bu nedenlerden dolayı bu hastalığın patogenezi ve etyolojik faktörleri ile ilişkili çalışmalar her geçen gün artmakta ve yeni önleyici tedaviler geliştirilmeye çalışılmaktadır.

Koroner arter hastalığı birden fazla genin ve çevresel faktörlerin patogenezi de rol oynadığı, gen-çevre etkileşimlerinin mevcut olduğu multifaktöriyel kalıtım gösteren bir hastalıktır (5). Hastalığın oluşumunda etkili olabilecek 300’den fazla risk faktörü tanımlanmış olmakla birlikte bunlar içerisinde tüm toplumlarda en sık rastlanılan, tek başına bağımsız risk faktörü olan ve modifiye edilmesi ile koroner arter hastalığında azalma görülen risk faktörleri majör risk faktörü kabul edilmektedir (1). Tablo 1 ve 2’de Dünya Sağlık Örgütü tarafından tanımlanan majör ve minör risk faktörleri verilmiştir.

Tablo 1. Koroner arter hastalığında majör risk faktörleri

Modifiye edilebilen majör risk faktörleri	Modifiye edilemeyen majör risk faktörleri
Hiperlipidemi Diabetes mellitus Sigara kullanımı Obezite Fiziksel inaktivite Yağlı beslenme tarzı Hipertansiyon	Cinsiyet Aile öyküsü Etnik yapı Yaş

Tablo 2. Koroner arter hastalığında minör risk faktörleri

Diğer risk faktörleri
Düşük sosyekonomik düzey Psikiyatrik hastalık varlığı Psikososyal stres Alkol kullanımı Lipoprotein (a) Sol ventrikül hipertrofisi Homosistein yüksekliği İnflamatuar marker yüksekliği (CRP) Koagülasyon bozuklukları

Türk Kardiyoloji Derneği'nin 2002'de yayınladığı Koroner Kalp Hastalığı Korunma ve Tedavi Kılavuzunda yer alan koroner kalp hastalığı risk faktörleri şu şekilde tanımlanmıştır (6):

1. Yaş (erkeklerde ≥ 45 , kadınlarda ≥ 55 veya erken menopoz)
2. Aile öyküsü (birinci derece akrabalarından erkekte 55, kadında 65 yaşından önce koroner arter hastalığı bulunması)
3. Sigara içiyor olmak
4. Hipertansiyon (kan basıncı $\geq 140/90$ mmHg veya antihipertansif tedavi görüyor olmak)
5. Hiperkolesterolemi (total kolesterol ≥ 200 mg/dl, LDL-kolesterol ≥ 130 mg/dl)
6. Düşük HDL-kolesterol değeri (< 40 mg/dl)
7. Diabetes mellitus

II.2 Koroner Arter Hastalığında Genetik Faktörler ve Aile Öyküsü

Koroner arter hastalığının oluşumundan sorumlu aterosklerozun patofizyolojisinde çok sayıda biyokimyasal süreç yer almaktadır. Çevresel faktörler tarafından modifiye edilen bu süreçlerde genler tarafından kodlanan birçok enzim, reseptör ve ligand görev yapmaktadır. Sorumlu genlerdeki değişimler bu yollardaki bu yapıların fonksiyonunu değiştirerek ateroskleroz gelişimine veya hastalığın progresyonuna yol açabilmektedir (7).

Aile öyküsünün bağımsız risk faktörü kabul edildiği koroner arter hastalığında genetik yatkınlık yapılan farklı çalışmalarla ortaya konmuştur. Yapılan prospektif çalışmalarda diğer risk faktörleri dışlandığında ailede koroner arter hastalığı öyküsünün riski 1,5-2 kat arttırdığı gösterilmiştir. Vaka-kontrol

çalışmalarında ise birinci derece akrabalarda KAH öyküsünün riski 2-3 arttırdığı tespit edilmiştir. 46 yaş öncesinde koroner arter hastalığı öyküsü olan ailelerde kalıtlılabirliğin %90-100, ileri yaşlarda KAH öyküsü olan ailelerde kalıtlılabirliğin %15-30 olduğu tahmin edilmektedir (7). Tablo 3'de Chow ve ark. tarafından yapılan çalışmada tespit edilen ailede kalp krizi öyküsü varlığında KAH göreceli risk oranları verilmiştir (8).

Tablo 3. Aile öyküsü ile ilişkili kalp krizi göreceli risk oranları

KALP KRİZİ AİLE ÖYKÜSÜ	OR (%95 CI)
Aile öyküsü yok	1.00
>50 YAŞ TEK EBEVEYN	1.67 (1.55-1.81)
<50 YAŞ TEK EBEVEYN	2.36 (1.89-2.95)
>50 YAŞ İKİ EBEVEYN	2.90 (2.30-3.66)
<50 YAŞ İKİ EBEVEYN	6.56 (1.39-30.95)

Koroner anjiyografi çalışmalarında da anjiyografik olarak tespit edilen aterom plak varlığı, aile öyküsü ile ilişkili bulunmuştur (9). Sadece hastalığın oluşumunda sorumlu olabilecek genlerin değil risk faktörleri ile ilişkili genetik değişikliklerinde ailesel öyküde sorumlu olduğu düşünülmektedir. Tablo 4'de koroner arter hastalığında genetik yatkınlık varlığının karakteristik özellikleri verilmiştir (7).

Tablo 4. Koroner arter hastalığında genetik yatkınlık varlığının karakteristik özellikleri

60 yaşından önce başlamış koroner arter hastalığı varlığı
Birden fazla damar tutulumu
Birden fazla risk faktörü
Risk modifikasyonuna rağmen hastalığın progresyonu
Ailede koroner arter hastalığı öyküsü özellikle kadınlarda
Ailede risk faktörleri ile ilişkili hastalık öyküsü

Koroner arter hastalığına yatkınlık oluşturan çok sayıda gen tanımlanmış olmakla birlikte hastalığın kompleks yapısından dolayı bu alandaki çalışmalar her geçen gün artmaktadır. Tablo 5’de genetik yatkınlık oluşturan genlerin listesi verilmiştir.

Tablo 5.Koroner arter hastalığına yatkınlık genleri

GENLER	REFERANSLAR
<i>LİPİD METABOLİZMASI</i>	
Apolipoprotein (a) (LPA)	10
Apolipoprotein B	11
Apolipoprotein E	12
Kolesterol ester transfer protein	13
LDL reseptör	14
Lipoprotein lipaz	15
Paraoksanaz	16
<i>KANBASINCI REGÜLASYONU</i>	
Anjiotensinojen	17
Anjiotensin II reseptör tip1	18
ACE	19
<i>HOMOSİSTEİN METABOLİZMASI</i>	
MTHFR	20
Sistasyon beta sentaz	21
<i>KOAGÜLASYON</i>	
HPA	22
Faktör II	23
Faktör V	24
Faktör VII	25
Faktör XIII	26
<i>FİBRİNOLİZ</i>	
PAI-1	27
β Fibrinojen	28
<i>TROMBOSİT FONKSİYONU</i>	
Glikoprotein IIIa	29
<i>ENDOTEL FONKSİYONU</i>	
E-selektin	30
ENOS	31
Endotel Protein C reseptörü	32

Tanımlanan aday genlerin yanı sıra, genom tabanlı ilişkilendirme çalışmaları ile genetik yatkınlık oluşturan polimorfizmler tespit edilebilmekte ve patogenezdeki rolleri araştırılmaktadır. 2007 yılında McPherson ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada 9p21 bölgesindeki polimorfizmin koroner arter hastalığına yatkınlık oluşturduğu tespit edilmiş olup daha sonraki çalışmalarda da bu polimorfizmin diğer risk faktörlerinden bağımsız olarak koroner arter hastalığı riskini homozigotlarda %40, heterozigotlarda %20 oranında arttırdığı gösterilmiştir (33-35).

Tüm dünyada önemli sağlık sorunlarına yol açan koroner arter hastalığında genetik faktörlerin tespiti hem hastalığın patogenezinin aydınlatılmasına hem de risk faktörlerinin ve yaşam tarzının modifikasyonu ile önleyici tedavilerin geliştirilmesine imkan sağlayacaktır. Hastalığın oluşumundaki yolların patogenezdeki rollerinin tespiti ise bu yollar üzerinden ilaç tedavisi geliştirebilme imkanını sunacaktır.

II.3 Koroner Arter Hastalığında Patofizyoloji

Koroner arter hastalığı kalbi besleyen arterlerde tıkaçıcı karakterde ateroskleroz gelişimi ile oluşmaktadır. Ateroskleroz kompleks bir süreç olup çok sayıda biyokimyasal olay bu süreçte yer almaktadır.

II.3.1 Kalbi Besleyen Ana Arterler

Normal bir kalpte arteriyel dolaşım aortadan ayrılan sağ ve sol koroner arterden sağlanmaktadır. Sol ana koroner arter sol ventrikül ön yüzüne geldiğinde sol ön inen koroner arter (LAD) ve sirkumfleks arter(Cx) olmak üzere iki dala ayrılmaktadır. Sağ ana koroner arter ise kalbin apeksine doğru sağ arka inen koroner arter olarak devam etmektedir (36). Klinikte sol koroner arterin iki

ana dalı ve sağ koroner arterdeki aterosklerotik lezyona göre hastalığın şiddeti belirlenir.

II.3.2 Normal damar duvarı yapısı

Normal damar duvarı histolojik olarak üç tabakadan oluşmaktadır. *Tunika intima* damar duvarının en içteki tabakasını oluşturmaktadır. Bu tabaka üç önemli yapıdan oluşmaktadır. 1- tek sıra epitel hücrelerinden oluşan endotel tabakası 2- ekstrasellüler matriksten (ECM) oluşan endotel hücrelerinin bazal laminası 3- konnektif dokudan oluşan subendotel tabaka. *Tunika intima* tabakası doğumda çok ince bir tabaka şeklinde olup yetişkinlerde bu yapı daha kompleks ve heterojen bir yapıdadır. İlerleyen yaşla birlikte düz kas hücrelerinin(SMC) intimaya göçü ve interstisyel kollajenin fibriller formunun sentezi ile daha kompleks hale gelmektedir. Göç eden düz kas hücrelerinden ekstrasellüler matriks yapılarının sentezi artmaktadır. Bu kompleks yapının gelişen daha ileri formu diffüz intimal kalınlaşma erişkin çağı çoğu insanın damarlarında mevcuttur. Bu bölgelerin hemodinamik strese karşı gelişen adaptif değişiklik bölgeleri olduğu bilinmekle birlikte aterosklerozun diffüz intimal kalınlaşma bölgelerinde geliştiği gösterilmiştir (37-39). *Tunika media* dairesel tarzda dizilmiş düz kas hücrelerinden oluşan tabakadır. İçte ve dışta elastik lamina ile çevrilidir. En dışta yer alan *tunika adventisya* kollajen ve elastik fibrillerden oluşan konnektif doku tabakasıdır (40).

II.3.3 Ateroskleroz oluşum mekanizması

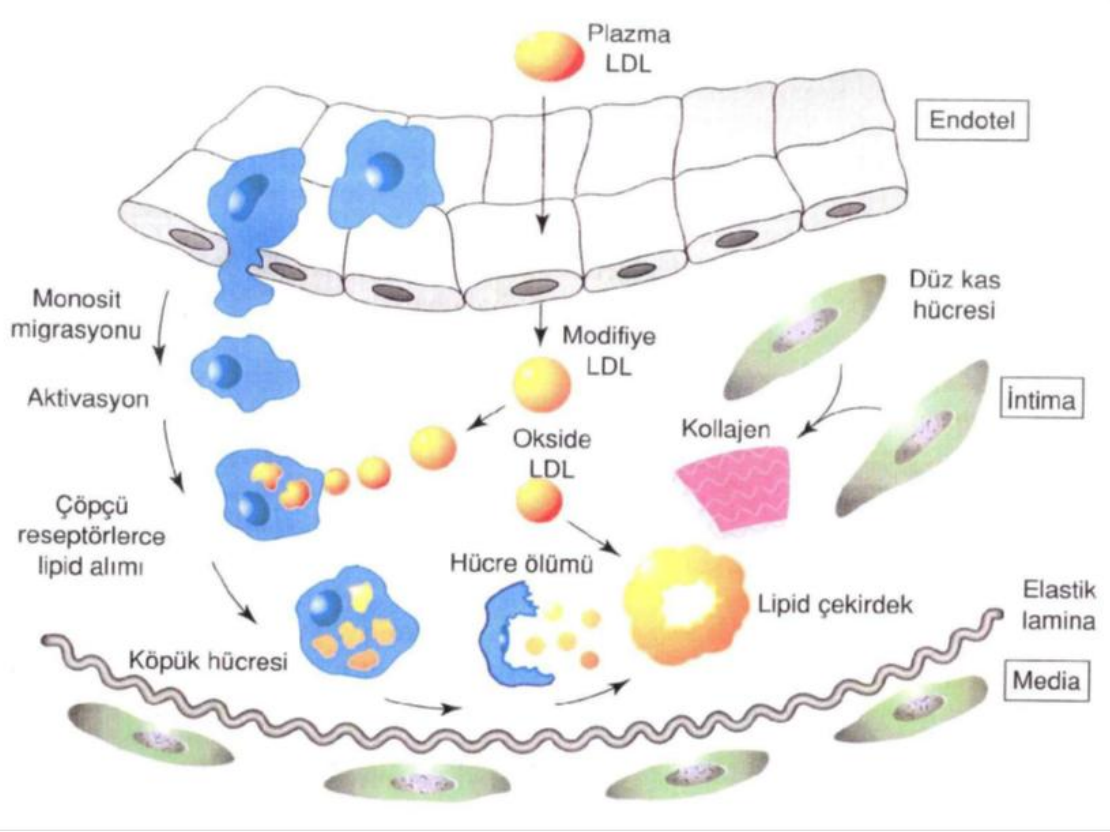
Ateroskleroz, orta ve büyük arterleri etkileyen, damar lümeninde daralmaya yol açan yama tarzında subintimal kalınlaşmayla karakterize progresif bir hastalıktır. Subendotel bölgede lipid, köpük hücreleri birikimi ile karakterize erken lezyonu *yağlı çizgilenme* olarak adlandırılmaktadır. Zamanla lezyonda apoptotik

ve nekrotik hücre debrislerinin birikimi sonucu lezyonda nekrotik kor gelişimi ile daha kompleks bir lezyon oluşmaktadır. Mevcut lezyonun farklı mekanizmalarla komplike olması sonucunda hastalık komplikasyonlarla karşımıza gelmektedir.

Ateroskleroz ilk olarak çocukluk veya adolesan dönemde başlayan yağlı çizgilenme ile başlamaktadır. Yağlı çizgilenme dolaşımda bulunan LDL partiküllerinin intima tabakasında birikimi ile oluşmaktadır. Oluşan bu ilk değişiklikler damarların hemodinamik strese maruz kaldığı, intimal kalınlaşmanın olduğu arter dallarında oluşmaktadır. İntimada biriken bu lipid partiküllerin enzimler yardımıyla modifikasyonu ve oksidasyonu ile intimada immun sistemin aktivasyonuna bağlı inflamasyon başlamaktadır (38-41).

İnflamasyonda özellikle endotel hücrelerinden salgılanan adezyon molekülleri ve düz kas hücrelerinden salgılanan kemokin ve kemotaktik moleküller sorumlu olmaktadır. İntimal düz kas hücreleri aynı zamanda ekstrasellüler matriks proteoglikan, kollajen ve elastik fibrillerin sentezini de yapmaktadır. Damar duvarı içerisine monosit, makrofaj, lenfosit, mast hücreleri ve nötrofillerin göçü ile inflamasyon artmaktadır.

İntimaya göç eden monositlerin transformasyonu sonrası oluşan makrofajlar lipid partiküllerini içine alarak köpük hücrelerine dönüşür. Aterosklerozun erken evresinin tanısında lipid birikiminin derecesi kritik süreçtir. İzole köpük hücreleri, izole ekstrasellüler matriks birikimler geri dönüşümlü olup mikroskobik olarak görülebilmektedir. Bu lezyonun önemi ise başlangıç lezyonu olup bu aşama tespit edilememekte ve lezyon ilerleyebilmesidir (42). Şekil 1'de temel aterojenik mekanizma gösterilmiştir.



Şekil 1. Temel aterogenez basamakları (43)

Yaşamın ikinci dekadında intimada hücresel birikim devam etmekte, damar içi inflamasyon giderek artmaktadır. Düz kas hücreleri tarafından sentezlenen ekstrasellüler matriks proteoglikanlarının artan lipid bağlama kapasiteleri lipid birikimi ve makrofaj ile düz kas hücrelerinin ölümü sonucu nekrotik debris oluşmaktadır. Oluşan nekrotik debris damar duvarı volümünün %30-50'sini kaplamaktadır. Yüzey endotelinin hemen altında yer alan bu yapı fibröz dokular tarafından çevrelenerek fibröz plağı oluşturur.

Yaşamın beşinci dekatından sonra oluşan fibröz plak proteolitik enzimlerin etkisiyle ince ve zayıf bir şekil alır. Direnci azalan bu fibröz plağın rüptüre olmasıyla dolaşıma salınan trombojenik faktörlerin etkisi ile trombüs oluşumu gerçekleşmektedir. *Vulnerable plak* olarak adlandırılan bu lezyon rüptür ve takibinde gelişen trombüs nedeni ile yaşamsal açıdan riskli olup hastalar kalp krizine bağlı ani kardiyak ölümle kaybedilmektedir.

Klinik olarak sessiz olan lezyonlarda rüptür ve trombüs sonrası fibröz doku sentezi ile plak tekrar kapanabilmekte ve bu şekilde tekrarlayan iyileşme evreleri sonrasında çok tabakalı iyileşme dokusu oluşmakta ve damar lümenini iyice daraltmaktadır. Sonrasında gelişen küçük bir trombüs bile kalp krizine yol açabilmektedir. Kalp krizine bağlı ölümlerde %60 olguda sessiz rüptür ve trombüs sonrası gelişen komplikasyonlar nedeni ile gelişmektedir (42,44-47).

Ateroskleroz gelişimde yer alan bu lezyonlar Amerikan kalp derneği tarafından histopatolojik olarak sınıflandırılmış bu sınıflandırma ve klinik etkileri Tablo 6'da gösterilmiştir (45, 48,49).

Tablo 6. Aterosklerozun histopatolojik ve radyolojik sınıflaması

Konvansiyonel AHA Klasifikasyonu	MR* modifiye AHA Klasifikasyonu	Büyüme paterni	Başlangıç yaşı	Klinik
Tip I: köpük hücre	Tip I-II: normal arterler	Lipid birikimi	İlk dekat	Sessiz
Tip II: yağlı çizgilenme	-	Lipid birikimi	İlk dekat	Sessiz
Tip III: preateroma	Tip III: Diffüz intimal kalınlaşma veya küçük eksentrik plak	Lipid birikimi	Üçüncü dekat sonrası	Sessiz
Tip IV: ateroma	Tip IV-V:Nekrotik çekirdek, lipid ve fibröz plak içeren lezyon	Lipid birikimi	Üçüncü dekat sonrası	Sessiz veya klinik bulgu
Tip V: fibroateroma	-	Düz kas hücreleri ve ECM artışı	Dördüncü dekat sonrası	Sessiz veya klinik bulgu
Tip VI: kompleks plak	Tip VI:kompleks plak	Trombosis, hemoraji	Dördüncü dekat sonrası	Sessiz veya klinik bulgu
Tip VII: kalsifiye plak	Tip VII: kalsifiye plak	Rüptür, iyileşme	Dördüncü dekat sonrası	Sessiz veya klinik bulgu
Tip VIII: Fibröz plak	Tip VIII: fibröz plak	Rüptür, iyileşme	Dördüncü dekat sonrası	Sessiz veya klinik bulgu

*MR: Manyetik rezonans

Aterosklerozun tüm evrelerinde meydana gelen bu değişimler lokal hemodinamik değişimleri ve kan akım paternini etkileyen risk faktörleri (sigara, hipertansiyon, diabet) tarafından anlamlı derecede etkilenmektedir. Bu risk faktörlerinin ateroskleroz oluşumunu hangi mekanizmalar üzerinden etkilediği bugün için hala araştırma konusu olup geliştirilecek tedaviler için hedef noktayı oluşturmaktadır.

II.3.4 Ateroskleroz Oluşumunda Hipotezler

Son yüzyılda aterosklerozun oluşumu sırasında meydana gelen kompleks olayların nasıl geliştiğini anlamak için birçok çalışma yapılmaktadır. Bu alanda ateroskleroz plak oluşumunu başlatan mekanizmalarla ilgili farklı görüşler ortaya konmuştur. Bugün için geçerliliğini koruyan ve araştırmaların devam ettiği üç temel hipotez mevcuttur:

- 1. Hasara yanıt hipotezi*
- 2. Lipid hipotezi*
- 3. Birikime yanıt hipotezi*

II.3.4.1 Hasara yanıt hipotezi

Ross ve Glomset tarafından ortaya konulan bu hipotezin temelinde aterosklerozu başlatan faktörün endotel tabakasının hasarlanması olduğu düşünülmektedir (50). Hasara cevap hipotezinin temelinde şu özellikler yer almaktadır;

1. Endotel geçirgenliğinde artış veya diğer endotel fonksiyon bozukluğu bulguları ile sonuçlanan genellikle hafif, fokal, kronik endotel hasarı alanları oluşması.
2. Esas olarak yüksek kolesterol içerikli LDL veya modifiye LDL ve aynı zamanda VLDL'ler olmak üzere lipoproteinlerin damar duvarı içine doğru sızmasının artması.
3. Bu hasarlanma odaklarında endotel hücreleri, monosit / makrofajlar, T lenfositler ve intima ya da medyanın düz kas hücrelerini içeren bir dizi hücresel etkileşimlerin olması.
4. Ekstraselüler matriks oluşumu ile birlikte intimadaki düz kas hücrelerinin proliferasyonu (51)

Bu hipotez aterosklerozun endotel hasarı oluşturan farklı etkenlere karşı ortaya çıkan inflamatuvar-fibroproliferatif yanıt olduğu görüşünü savunmaktadır. Metabolik, mekanik, toksik, immünolojik olaylar ile infeksiyonlar endotel işlev bozukluğuna neden olmaktadır. Bilinen risk faktörlerinin hemen hepsi (sigara, hipertansiyon, diyabet, hiperkolesterolemi) endotelde işlevsel bozukluğa yol açabilmektedir. Endotel hücre hasarı sonucu bariyer geçirgenliğinde artma, tromboz eğiliminde artış, kemotaktik ve vazoaaktif maddelerin salınımında artış gibi mekanizmalar aktive olmaktadır. Tüm bunların sonucu endotel hücreleri, monosit/makrofajlar, trombositler, lenfosit ve düz kas hücrelerinin yer aldığı bir dizi inflamatuvar ve proliferatif olaylar zinciri, aterosklerotik lezyon oluşumuna neden olmaktadır. Endotel geçirgenliğindeki değişiklikler, endotele lökosit adezyonunun artması, vazoaaktif madde ve büyüme faktörlerinin salınması endotel işlev bozukluğunu gösterir. Endotel hasarı endotel işlevini değiştirirken, önemli hücrel etkileşimlere neden olmakta ve aterosklerotik lezyon gelişimine yol açmaktadır (43).

II.3.4.2 Lipid Hipotezi

İlk olarak 1913 yılında Anitschkow tarafından hayvanlarda kolesterol yüksekliğinin damarda aterosklerotik değişimlere neden olduğunun gösterilmesi ile ortaya konulan bu hipotezde aterosklerozun oluşumunda kolesterol yüksekliği sorumlu tutulmaktadır (52). Kronik hiperkolesteroleminin endotel hücre membranında kolesterol moleküllerinin sayısını artırarak endotel hasarına neden olduğu, endotelial plazma membranında kolesterol/fosfolipid oranı yükselmesi sonucu membran viskozitesi arttırdığı gösterilmiştir. Daha viskoz ve daha rijit olan endotelial yüzey, akım değişikliklerinin neden olduğu strese karşı koyamaz hale gelmektedir. Bu da endotel hücrelerinin birbirinden ayrılmasına, hücrelerin retraksiyonlarına neden olmaktadır. Hiperkolesterolemi ayrıca monosit- endotel adezyonunda da değişikliğe yol açabilmektedir. Monositler hasara uğrayan

endotelin olduğu bölgelerde toplanmaktadır. Endotel hücreleri ve onlara yapışmış monositlerden oluşan mikroçevredeki düşük moleköl ağırlıklı lipoprotein (LDL) n bu aktive hücrelerce oluşturulmuş serbest radikallere maruz kaldığı varsayılmaktadır. Serbest oksijen radikallerinin LDL'nin dış kısmındaki fosfolipitlere etki etmesi ile lipid peroksidasyon ürünleri oluşur. Lipid peroksidasyon ürünleri, LDL'nin apolipoprotein-B (apo-B) bileşeni ile reaksiyona girerek onları bozmakta ve reseptör bağlama özelliklerini değiştirmektedir. Bu oksidatif olarak modifiye olmuş LDL, çöpçü reseptör (scavenger reseptörü) denilen bir reseptör sınıfı aracılığı ile makrofajlar tarafından alınmaktadır. Çöpçü reseptör doğal LDL reseptörü gibi aşağı regülasyona uğramaz ve makrofajlar tarafından düzensiz alımın devam etmesi ile hücre lipidle dolu hale gelmekte ve köpük hücreleri oluşmaktadır. Oluşan modifiye LDL'inde inflamasyonu tetikleyerek daha sonraki lezyonların oluştuğu düşünölmektedir (43, 52, 53).

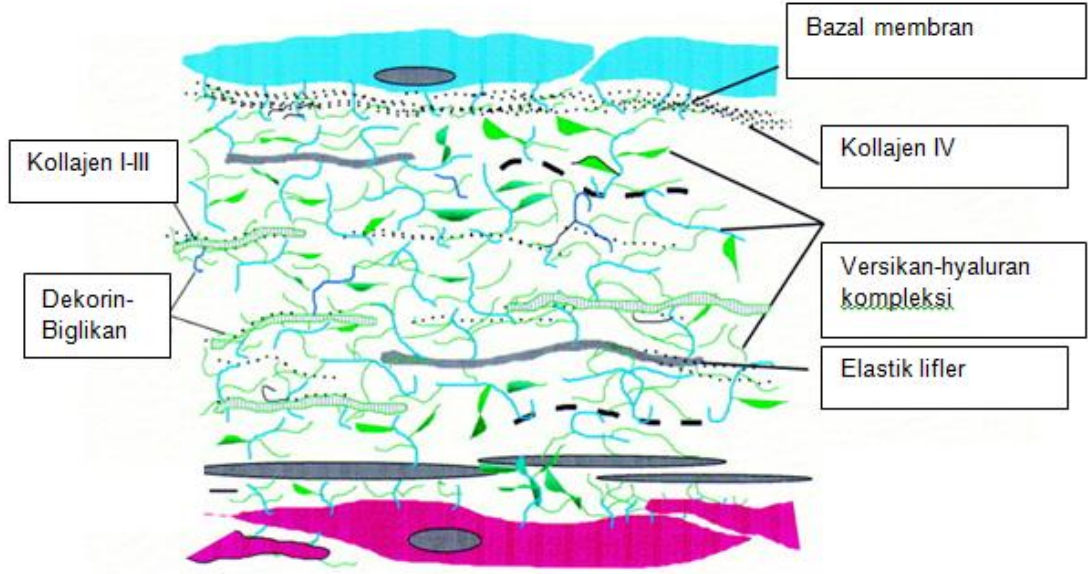
II.3.4.3 Birikime Yanıt Hipotezi

Tabas ve Williams tarafından 1995 yılında ortaya atılan bu hipotezde erken dönem ateroskleroza başlatan olayın arteriyel intimada ekstraselöler matriks komponentleri ile etkileşime giren LDL ve diğer aterojenik lipoproteinlerin birikimi olduğu savunulmaktadır (54-56). Yapılan diğer çalışmalarda ise lipoprotein kapasitesi yüksek proteoglikan sentezinin mekanik gerilim veya sitokin sentezi gibi predispozan faktörler varlığında uyarıldığı gösterilmiştir (57-60). İntimada biriken aterojenik lipoproteinlerin oksidasyona eğiliminin arttığı, okside LDL'nin inflamasyonu tetikleyerek aterosklerozun gelişimini sağladığı kabul edilmektedir (55).

Her üç hipotezde de aterom plak gelişiminde ortak olan endotel hasarı ve damar duvarı tarafından lipoprotein tutulumunun artması bugün için aterogenezde üzerinde çalışmaların devam ettiği alanı oluşturmaktadır.

II.3.5 Ekstraselüler Matriks ve Ateroskleroz

Ekstraselüler matriks, hücreleri çevreleyen ve destekleyen kompleks yapısal bağ dokusu bileşeni olup hücreler arası iletişimde önemli bir yapıdır. Temel olarak yapısal protein olan elastik ve kollajen fibriller ile destek maddesinden oluşmaktadır. Bu destek maddesi proteoglikanlar ve adeziv glikoproteinlerden oluşmaktadır (61). Ateroskleroz oluşumunda sorumlu olduğu düşünülen proteoglikanlar, ECM'nin küçük bir kısmını oluşturan, glukozaminoglikan (GAG) adı verilen polianyonik şeker zinciri içeren negatif yüklü proteinlerdir. Proteoglikanların bu negatif yükü ve viskositesine bağlı su bağlama özelliği jel yapısı oluşumu sağlayarak dokulara destek ve mekanik dayanıklılık kazandırmaktadır. Proteoglikanlar aynı zamanda büyüme faktörleri, sitokin ve enzimlerin aktivitesini düzenlemekte ve hücre sinyalleri, adezyonu, proliferasyonu ve migrasyonu gibi dinamik süreçlerde yer almaktadır (62). Şekil 2'de ekstraselüler matriks yapısı gösterilmektedir.

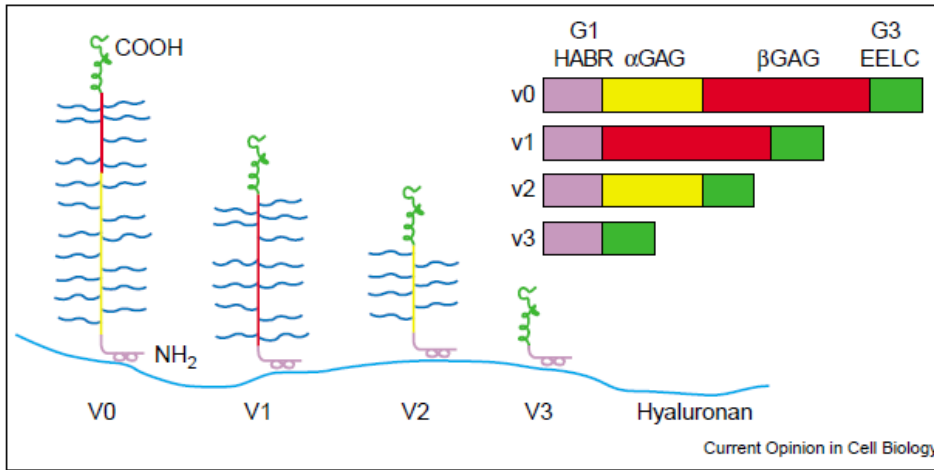


Şekil 2. Normal ekstraselüler matriks yapısı (63)

Proteoglikanlar içermiş oldukları negatif yükten dolayı aterosklerozun gelişiminde LDL'nin bağlanmasında sorumlu moleküller olarak bilinmektedir. Proteoglikan ve LDL etkileşimi iyonik bağlanma şeklinde olup proteoglikanların negatif yüklü GAG zincirleri ile LDL partikülü içerisinde yer alan pozitif yüklü apolipoprotein rezidüleri arasında gerçekleşmektedir (64). Proteoglikanlar içerdiği GAG zincirine bağlı olarak farklı gruplara ayrılmaktadır (65,66). Özellikle kondroitin sülfat proteoglikanların lipoprotein birikiminde sorumlu oldukları in vitro çalışmalarda gösterilmiştir (67).

Versikan, vasküler hücreler tarafından sentezlenen biglikan, dekorin ve perlekan ile birlikte intertisyel alanda damar duvarı ekstraselüler matriksin proteoglikan grubunu oluşturmaktadır (68). Uzun zincirli bir glukozaminoglikan olan hyaluranı bağlama bölgesi bulunan versikanın orta bölgesinde yer alan kor proteini, versikanın kondroitin sülfat bağlanma bölgelerini belirleyen iki büyük

ekson tarafından kodlanmaktadır. Ekson 7 ve 8 tarafından kodlanan bu bölgenin farklı splising işlemleri sonrasında 4 farklı mRNA transkripti oluşturduğu bilinmektedir. GAG bağlama bölgeleri olan alfa GAG bölgesi ekson 7, beta GAG bölgesi ekson 8 tarafından kodlanmaktadır. V0, hem ekson 7 hem de ekson 8 bölgesini; V1, sadece ekson 8 bölgesini içeren; V2 ise sadece ekson 7 bölgesini içeren transkriptleri oluşturmaktadır. V3 varyantı ekson 7 ve 8 bölgesini içermeyen buna bağlı olarak GAG bağlama bölgesi içermeyen glikoprotein olabileceği düşünülen varyantı oluşturmaktadır. Şekil 3'de versikan varyantları ve yapısı gösterilmektedir.



Şekil 3. Versikan yapısı ve varyantları (69)

Yapılan çalışmalarda versikanın sadece yapısal destek fonksiyonunun olmadığı aterosklerozda önemli süreçler olan hücre adezyonu, hücre proliferasyonu ve migrasyonunda da yer aldığı gösterilmiştir (70). Normal damar duvarında subintimal versikan hyaluran ile etkileşime girerek damar duvarı yapısının korunmasında görev alır. Hasar sonrası hızlı bir şekilde oluşan hyaluran –versikan kompleksi damar düz kas hücrelerinin o bölgeye migrasyonu ve proliferasyonunu sağlamaktadır. Bu etki damar düz kas hücrelerinden

salgılanan Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) aracılı gerçekleşmektedir. Hyaluran-versikan kompleksinin aynı zamanda inflamatuvar hücrelerin birikimini ve adezyonu etkilemektedir. Versikanın kondroitin sülfat zincirleri ise makrofajların migrasyonunu etkileyen L-selektin ve P-selektin gibi adezyon molekülleri ile etkileşime girmektedir (71). Aynı zamanda in vitro çalışmalarda da V1 versikanın aterosklerozda önemli fonksiyonları olan damar düz kas hücrelerinde proliferasyona neden olduğu gösterilmiştir (72).

Versikan ekspresyonu PDGF, transforming growth faktör β (TGF β 1) ve interlökin 1 β (IL-1 β) gibi farklı sitokinlerle düzenlenmektedir (73). Schönherr ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada TGF β ve PDGF'nin maymun damar düz kas hücrelerinde versikan mRNA ekspresyonunu arttırdığı, Lemire ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise IL-1 β 'nin versikan ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (74,75).

İleri evre ateroskleroz plaklarında versikanın lezyon sınırına yakın bölgelerde lipoproteinlerle birlikte birikiminin gösterilmesi versikan ve versikan komplekslerinin inflamatuvar hücrelerin yanısıra lipoprotein birikiminde de rolü olduğunu düşündürmektedir (76). Versikanın ve diğer proteoglikanların kondroitin sülfat zincirleri bu bağlanmada rol almaktadır. Vasküler hasarlanma sonrasında versikanın kondroitin sülfat zincirlerinin arttırarak LDL bağlama kapasitesini arttırdığı gösterilmiştir (76). Versikan-hyaluran komplekslerinin de makrofaj ve damar düz kas hücreleri tarafından lipoprotein alımının arttırdığı, versikan-LDL komplekslerinin de makrofajlar tarafından hızlıca hücre içine alındığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (73,76).

Son çalışmalarda versikanın enzimatik parçalanması sonucu oluşan ürünlerinde da normal ve aterosklerotik damarda birikime uğradığı gösterilmiştir. Bu ürünlerinde biyolojik olarak aktif olabileceği ve ateroskleroz gelişiminde rol

alabileceği düşünülmektedir (69). Versikanın protein çekirdeğinde yer alan G1 domain'in çözünür formda hücre proliferasyonunu uyardığı, endotel hücrelerinin migrasyonunu arttırdığı, damar düz kas hücreleri için kemotaktik faktör olan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) sentezini uyardığı gösterilmiştir (77). G3 domain'inin de çözünür formda endotel ve fibroblastların proliferasyonunu uyardığı gösterilmiştir (78). Versikan protein çekirdeğinin proteolizisi sonucunda aynı zamanda art arda fragman kaybına bağlı kondroitin sülfat içeriği değişebilmekte, GAG aracılı fonksiyonlarını da (kemokin sekresyonu vs.) etkileyebilmektedir (79).

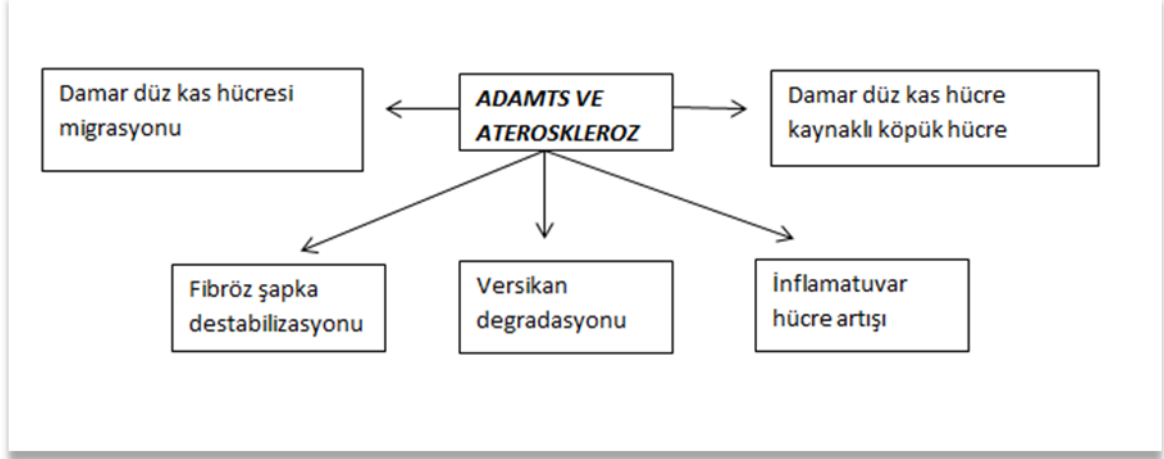
II.4 ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif) Ailesi ve Aterokleroz

ADAMTS proteaz ailesi, yapıları ve substratları benzer olan matriks proteinazlarla ilişkili proteaz grubunu oluşturmaktadır. Multidomain yapıda olan bu sekretuar enzim ailesi, prokollajen, proteoglikanlar, hyalektin ve kartilaj oligometrik protein(comp) gibi ekstraselüler matriks yapılarının parçalanmasında görevlidir (80). Şimdiye kadar en belirgin yapıya ADAMTS-13 ile %20 ile %40 arasında homolojiye sahip 18 farklı üye tanımlanmıştır (81-83).

ADAMTS ailesi üyeleri, zimojen enzimler olarak salgılanmakta ve proprotein konvertaz enzimi ile aktif forma dönüştürülmektedir (81). ADAMTS ailesi yapısal ve fonksiyonel özelliklerine göre proteoglikanazlar (ADAMS-1,-4,-5,-8,-9 ve -15), prokollajen-N-peptidazlar (ADAMTS-2, -3, -14), von willebrand ayırma faktörü(ADAMTS-13) ve fonksiyonu henüz bilinmeyenler (ADAMTS-6, -7, -10, -12, -16 -17, -18 ve -19) olmak üzere dört farklı gruba ayrılmaktadır. Proteoglikanazlar içerisinde ADAMTS-1, -4, -5, -9'un damar duvarı proteoglikanı versikanı degrade ettiği bilinmekte; ADAMTS-8 ve-15'in de sekans benzerliği nedeni ile bu grup içerisinde yer aldığı düşünülmektedir (69).

Sandy ve arkadaşları tarafından ilk kez insan aortasında versikanın ADAMTS-1 ve -4 ile parçalanması sonucu oluşan versikan fragmentlerinin gösterilmesi ile başlayan süreçte yapılan çalışmalarda oluşan fragmentlerin damar düz kas hücrelerinin migrasyonunu sağladığının ortaya konması ile bu ailenin ateroskleroz gelişiminde etkisi olabileceği görüşünü ortaya koymuştur. ADAMTS-1 ve -4'ün versikanın V0 ve V1 izoformlarını Glu441-Ala442/Glu1428-Ala1429 bölgesinden ayırması ve diğer matriks metalloproteinazların bu yarıklanmadan ziyade protein degradasyonu şeklinde etki etmesinden dolayı ADAMTS ile oluşan ürünlerin biyolojik aktif moleküller olabileceği görüşünü desteklemiştir (73,84).

ADAMTS ailesinden ilk olarak hayvan deneylerinde in vivo lipopolisakkarit(LPS) uygulaması sonrası böbrek ve kalpte ADAMTS-1 ekspresyonunun artışının saptanmasının ardından in vitro ortamda endotel hücrelerinde lipopolisakkarit ve tümör nekroz faktör alfa ile ADAMTS-1 ekspresyonunu arttırdığının gösterilmesi inflamasyondaki aktif rollerini ortaya koymuştur (73). Hayvan deneylerinde ise; ApoE eksikliği olan farelerde ADAMTS-1 overekspresyonunun arteriyel intimada kalınlaşmaya neden olduğu, ADAMTS-4 ekspresyonunun aterom plak gelişimi sırasında arttığı gösterilmiştir (85,86). İmmunohistokimyasal çalışmalarda da karotis lezyonlarında ve ilerlemiş koroner lezyonlarda ADAMTS-1, -4, -5 ve -8'in varlığı gösterilmiş olup en yüksek oranda ADAMTS-1 ve -4 tespit edilmiştir (73). Özellikle ADAMTS-4,-5 ve -8'in makrofajlarla, ADAMTS-1'in ise endotel ve damar düz kas hücreleri ile birlikte yerleşim gösterdiği görülmüştür. Tüm bu çalışmalar ADAMTS proteazların aterosklerozda özellikle inflamatuvar süreçlerde önemli rollerinin olduğunu desteklemiştir. Klinik çalışmalarda ise koroner arter hastalarında yapılan çalışmalarda da ADAMTS-4 serum düzeyinin kontrollere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (82,83).



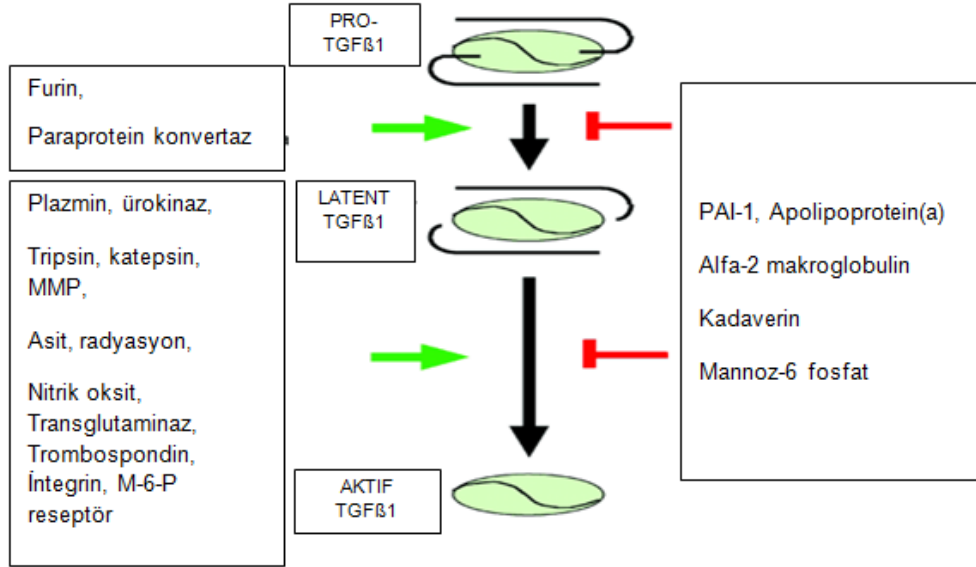
Şekil 5. ADAMTS ailesinin aterosklerozdaki muhtemel etkileri

ADAMTS proteaz ekspresyonunun düzenlenmesiyle ilgili literatürde az sayıda çalışma ve farklı sonuçlar bulunmaktadır. Özellikle aterom plakta makrofajlarla birlikte yerleşim gösteren ADAMTS-4 ile ilgili Wågsäter ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada makrofajlardan ADAMTS-4 ekspresyonunun proinflamatuvar sitokinler olan TNF-alfa ve IFN-gama tarafından artırıldığı ortaya konmuştur (85). Ashlin ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise IFN-gamanın ADAMTS-1 ekspresyonunu azalttığı, ADAMTS-4 ve -5 üzerine etkisinin olmadığı gösterilmiştir (87). Bir başka önemli sitokin olan TGF β ile ilgili Ashlin ve Salter tarafından yapılan iki farklı çalışmada, anti aterojenik sitokin olduğu kabul edilen TGF β 'nin ADAMTS-4 ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiş, Salter tarafından bu inhibisyonun Smads, "p38 mitogen-activated protein kinase" and c-Jun yolları üzerinden gerçekleştirildiği ortaya konmuştur (88).

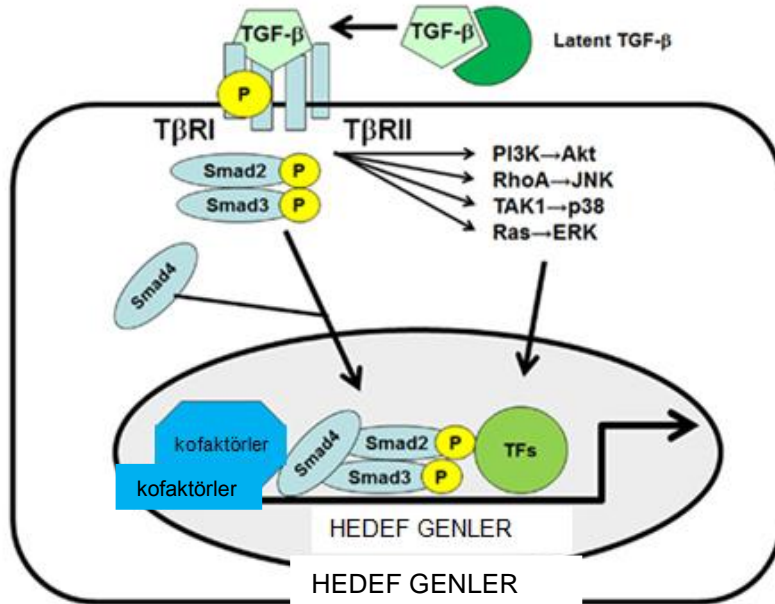
II.5 TGF β 1 (transforming growth factor β 1) ve Ateroskleroz

TGF β , farklı organ sistemlerinde ECM sentezi, hücre büyümesi, farklılaşması, migrasyonu ve apoptoz gibi kritik süreçlerde yer alan TGF β süper ailesinin bir üyesidir (89). Farklı genler tarafından kodlanan TGF β 1, TGF β 2 ve TGF β 3 olmak üzere üç farklı izoformu bulunmaktadır. Bu izoformlar içerisinde TGF β 1 kardiyovasküler sistem yer alan ve endotel hücreleri, damar düz kas hücreleri ve myofibroblastlar tarafından sentezlenen izoformudur (90).

TGF β 1, latent protein(LAP) adı verilen propeptitle bağlı şekilde sentezlenmekte, hücre içinde bu bölge ayrılarak küçük latent kompleksi oluşturmaktadır. Küçük latent kompleks latent TGF bağlayan protein ile birleşerek büyük latent kompleksi oluşturmaktadır. Bu kompleks biyolojik olarak inaktif olup reseptörleri aktive edememektedir. Farklı proteazların etkisi ile aktif forma dönüştürülen TGF β 1, hücre yüzeyinde TGFBRII reseptörüne bağlanarak TGF β 1 reseptörü ile kompleks oluşturularak hücre içi sinyali başlatmaktadır. TGF β 2-TGF β 1 reseptör kompleksi serin-treonin kinaz üzerinden Smad yolunu aktive etmekte ve Smadlar aracılı transkripsiyon faktörleri aktive ederek etki oluşturmaktadır (91). Şekil 6 ve 7'de TGF β 1'in aktive olma ve sinyal yolağın aktivasyonu gösterilmektedir.



Şekil 6. TGFβ1 aktivasyonunun şematik görünümü (92)



Şekil 7. TGFβ1 sinyal yolağının şematik gösterimi (93)

Vasküler sistemde endotel hücreleri, damar düz kas hücreleri, mezenşimal hücreler, makrofaj ve lenfositler tarafından TGFB2 ve TGFB1 reseptörlerini eksprese olmakta ve Smad bağımlı veya bağımsız yollarla bu hücreler üzerine etkisini göstermektedir (90).

TGF β , yapılan hücre kültür çalışmalarında damar düz kas hücreleri üzerine ortaya konulan etkileri nedeni ile koruyucu sitokin olarak tanımlanmış TGF β heterozigot susturulan farelerde yapılan çalışmada yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde damar duvarında lipid lezyon oluşumuna eğilimin arttığı gösterilmiştir (92,94). Yapılan ilk hücre kültür çalışmalarında da TGF β 'nin damar düz kas hücre proliferasyonu, migrasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Hayvan deneylerinde ise, TGF β susturulan farelerde, tüm organlarda lökosit birikimi ile karakterize yaygın inflamasyon sonrası perinatal ölüm görülmüştür (95). Bu sonuçlar aterosklerozun erken evre lezyonlarında tespit edilen lökosit birikimini düşük TGF β düzeyi ile ilişkili olabileceği hipotezini geliştirmiştir (92).

İlerleyen çalışmalarda TGF β 'nin antiinflamatuvar etkilerinin yanı sıra vasküler endotelden proinflamatuvar adezyon moleküllerinin(ICAM) sentezini baskıladığı, kültüre makrofajlarda köpük hücre oluşumunu azalttığı gösterilmiştir (96,97).

Aterogenezde sorumlu tutulan ekstraselüler matriks üzerine etkileri araştırılan TGF β 'nin plakta damar düz kas hücreleri tarafından matriks oluşumunu arttırarak fibröz başlığın stabilizasyonunu sağladığı ve lezyon stabilizasyonunda etkili olduğu gösterilmiştir (92). TGF β 'nin aterojenik olduğu düşünülen ECM degradasyonunda görevli ADAMTS-4 düzeyini baskılamasının yanısıra; McCaffrey ve arkadaşları tarafından TGF β 'nin antiaterojenik sitokin olduğu ile ilişkili farklı bir mekanizma ortaya konmuştur (88,98).Yapılan bu çalışmada lezyonlu damarlarda, damar düz kas hücrelerinde tip 1 (TGFB1) reseptör ekspresyonunun, normal damarda ise tip 2 (TGFB2) reseptör ekspresyonunun yüksek olduğu saptanmış bu iki reseptör farklılığının fonksiyonel

etkilerini ortaya koymak için yapılan in vitro çalışmada tip 1 reseptör aktivasyonunun damar düz kas hücrelerinde masif ECM sentezine yol açtığı gösterilmiştir. Normal damar duvarında elde edilen hücrelerin in vitro ortamda TGF β uygulaması sonrasında Tip 2 reseptörün eksprese ettiği ve damar düz kas hücrelerinden ECM sentezi yerine kontraktıl proteinlerin sentezinin arttığı, TGF β uygulanmadığında ise Tip 2/Tip 1 reseptör oranının azaldığı gösterilmiş bu hücrelerin TGF β 'ya yanıtı ise ECM sentezi olarak görülmüştür (92,98).

Ortaya konulan bu hipotezde TGF β aktivasyonunun azalması reseptör oranlarını etkileyerek ECM sentezini uyardığı, buna bağlı oluşan ekstraselüler matriks değişikliklerinin normal damar yapısını bozarak ateroskleroz gelişimine yol açtığı öngörülmektedir. TGF β aktivasyonunun düşük devam etmesi lökositlerin plakta birikimine yol açması ve damar düz kas hücrelerinden ECM sentezinin azalmasıyla stabil olmayan plak oluşumuna neden olarak rüptür gelişimine yol açtığı düşünülmektedir.



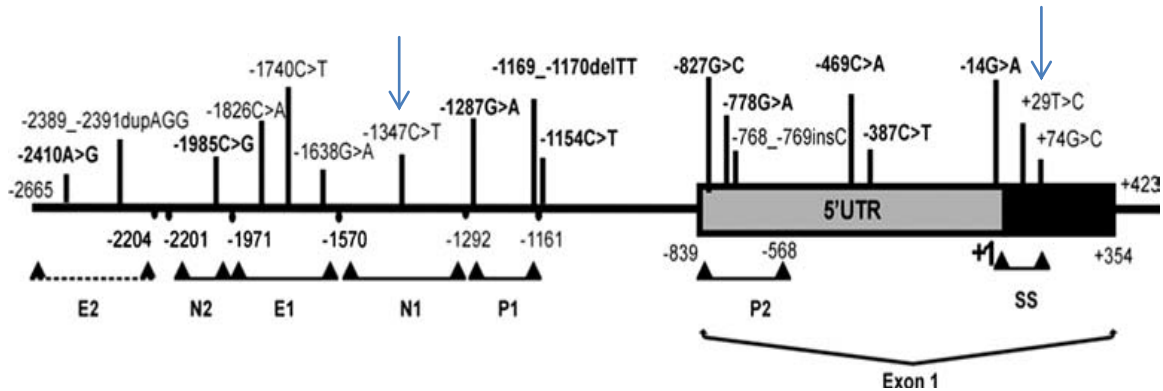
Şekil 8. TGF β 1 düzey değişikliklerinin ateroskleroz gelişimindeki olası etkileri

TGF β 1 ateroskleroz gelişim evrelerinin tümünde mevcut antiaterojenik fonksiyonları nedeni ile bugün için antiaterojenik bir sitokin olarak kabul edilmektedir. TGF β 1 düzeyini azaltan faktörlerin ateroskleroza yatkınlık oluşturacağı hipotezini ortaya koymaktadır.

II.6 TGF β 1 geni polimorfizmlerinin koroner arter hastalığındaki rolü

Ateroskleroz gelişiminde rolü olduğu düşünülen TGF β 1 serum düzeyinin ağırlıklı olarak genetik kontrol altında olduğu ve kalıtılabilirliğinin %56 olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (99)

TGF β 1, 19q13.1 bölgesinde lokalize 7 eksondan oluşan TGF β 1 geni tarafından kodlanmaktadır. TGF β 1 geni promotor bölgesinin translasyon başlama noktasından önceki yaklaşık 2,6 kb uzunluğunda DNA dizisini kapsadığı gösterilmiştir. Özellikle distal segmentin (-2,665----- -2,204) güçlü enhancer etkisi olduğu bilinmektedir. Bu bölgede ayrıca birinci ve ikinci promotor bölgesi (P1,P2), iki adet negatif regülatuar bölge (N1,N2) ve bir enhancer bölgesi (E1) bulunmaktadır (Şekil 9). Bu bölgede yer alan polimorfizmlerin TGF β 1 serum düzeyini etkilediği bilinmektedir (100,101).



Şekil 9. TGFβ1 geni promotor bölge polimorfizmleri (101)

rs1800469 (-509C-T, c.-1347C>T) polimorfizmi proksimal negatif regülatuar bölgede yer alan TGFβ1 ekspresyonunu etkilediği bilinen bir polimorfizmdir. -1347T allelini taşıyan bireylerin daha yüksek TGFβ1, -1347C allelinin ise daha düşük serum TGFβ1 düzeyleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Farklı çalışmalarda da T allelinin koroner arter hastalığı riski taşıdığı bildirilmektedir (100,102).

rs1800470 (+869T-C, c.+29T>C, p.Pro10Leu) polimorfizmi ise ekzon 1'de yer alan 10. kodonda lösin aminoasidinin yerine prolin aminoasidinin kodlandığı, peptid sinyal sekansı içinde yer alan bir polimorfizmdir. Preprotein olarak sentezlenen TGFβ'in endoplazmik retikuluma transportunu etkileyerek serum düzeyini değiştirdiği düşünülmektedir.(103-107). Yapılan çalışmalarda +29C alleli taşıyan bireylerin daha yüksek serum TGFβ1 düzeyine sahip olduğu gösterilmiştir(103).

İntron 2'de yer alan rs4803455 (c.517-740G>T) polimorfizmi ile rs1800470 polimorfizmi bağlantı dengesizliği (LD) çalışmalarında, yüksek skor almış polimorfik bölgelerdir. Deng ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada karotisteki aterom plak varlığı ile ilişkisi tespit edilmiştir. Bunların yanında literatürde koroner arterler açısından yapılan bir çalışma bulunmamaktadır (104).

Bu çalışmada TGFβ1 serum düzeyini etkilediği bilinen rs1800469, rs1800470 ve karotiste ateroskleroz oluşumuna yatkınlık oluşturduğu düşünülen rs4803455 polimorfizmlerinin koroner arter hastalığındaki sıklığı ve serum TGFβ1 düzeylerinde farklılık olup olmadığı ortaya konmaya çalışılacaktır.

II.7 Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada ekstrasellüler matriksin yapılanmasında görevli ve aterosklerozla ilişkili olduğu bilinen TGF β 1 ve ADAMTS-4 'ün aterosklerotik hastalardaki rolünü ortaya koymak amaçlanmıştır. Elde edilen verilerle;

-TGF β 1 rs1800469, rs1800470 ve rs4803455 polimorfizmlerinin koroner arter hastalığında sıklığını ve koroner arter hastalığı risk faktörleri ile olan ilişkisi,

-Bu polimorfizmlerin TGF β 1 serum düzeyi ile olan ilişkisi,

-Koroner arter hastalarında serum TGF β 1 düzeyleri,

-Koroner arter hastalarında serum ADAMTS-4 düzeyleri,

-İn vitro çalışmalarda gösterilen TGF β 1'in ADAMTS-4 arasındaki ilişkisi in vivo ortamda değerlendirilecektir.

III. GEREÇ-YÖNTEM

III.1 Araştırma Grubu

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji servisine koroner arter hastalığı ön tanısı ile başvuran olgulardan koroner anjiyografi endikasyonu bulunan 40 yaş üstü 156 olgu çalışmaya dahil edildi. Koroner anjiyografide aterom plak tespit edilen 84 olgu hasta grubuna, anjiyografisi normal 72 olgu kontrol grubuna eklenerek bu hastaların demografik özellikleri, KAH için belirlenen sigara, diabet, dislipidemi, hipertansiyon ve aile hikayesi risk faktörleri sorgulanarak, aydınlatılmış (bilgilendirilmiş) onamları ile kan örnekleri alınmıştır. Koroner anjiyografi sonrası hastaların lezyon yüzdeleri ve tutulan damar sayısı kaydedilmiştir.

III.2 Çalışmada Kullanılan Yöntemler

Çalışmamızda TGF β 1 ve ADAMTS-4 serum düzeyleri ELİSA yöntemi ile, TGF β 1 geni polimorfizmleri polimeraz zincir reaksiyonu sonrası restriksiyon enzim kesimi yöntemi ile belirlenmiştir. Tablo 8'de projede kullanılan makine ve teçhizatlar verilmiştir.

Tablo 7. Projede kullanılan makine ve teçhizatlar

ADI	PROJEDE KULLANIM AMACI
Derin dondurucu	Kimyasalların saklanması
Manyetik karıştırıcı	Solüsyonların hazırlanması
Elektroforez güç kaynağı	PCR reaksiyonlarının analizi
Elektroforez jel sistemi	PCR reaksiyonlarının analizi
pH metre	Tampon hazırlanması
Hassas tartı	Küçük ölçeklerle çalışılacak kimyasalların tartılması
PCR cihazı	DNA fragmanlarının üretimi
Buzdolabı	Kimyasalların saklanması
Mikropipet seti	Araştırmanın tüm deneylerinde pipetleme amacı ile
Mikrodalga fırın	Agaroz jel yapımı
Fotoğraf makinesi	Jel görüntülerinin kaydedilmesi
Nanodrop cihazı	DNA kalite ve yoğunluk belirlenmesi
UV transluminator	DNA profilinin görüntülenmesi
Mikrosantrifüj	DNA izolasyonu
Isıtıcı blok	Kesim enzimlerinin inkübasyonunda ve DNA izolasyonu

III.2.1 TGFβ1 Ve ADAMTS-4 Serum Düzeylerinin Tespiti

Olgulardan alınan periferik venöz kan örnekleri 3200 rpm'da 10 dakika santrifüjlenerek serumları ayrılmıştır. Temiz tüpe ayrılan serum örneklerinin analizinde nonkompetitif ELİSA (sandwich ELİSA) yöntemi kullanılmıştır. TGFβ1 ve ADAMTS-4 antikoları ile kaplanmış platelerin kullanıldığı, biotin konjuge sekonder antikor ve enzim işaretli antikor (avidin-peroksit) eklenmesi ile oluşan spesifik antijen antikor komplekslerinin tespitine dayanan bu yöntem ile enzim spesifik substratın(TMB) eklenmesi ile oluşan renk değişiminin 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümü sonrası standart grafik ile karşılaştırılarak serum TGFβ1 ve ADAMTS-4 düzeyleri belirlenmiştir. Çalışmada "USCN Life Science (USCNK)" TGFβ1 ve ADAMTS-4 ELISA kiti kullanılmıştır.

ELİSA PROTOKOLÜ

A.Örneklerin aktivasyonu

Hastaların serumlarında mevcut latent TGFβ1'lerin immunoreaktif forma dönüştürülmesini sağlar.

-125 µl serum ile 25 µl 1 N HCL karıştırılarak oda ısısında 10 dk inkübe edilir.

-25 µl 1.2 N NaOH/0.5 M HEPES ile nötralizasyon sonrası 800 µl standart dilüent eklenir.

***Bu aşama sadece TGFβ1 çalışmasında kullanılmıştır.

B. Örneklerin ve reaktiflerin eklenmesi

-Kuyucuklara 100 µl Standart ve serum örneklerinin eklenmesi. 37 °C'de 2 saat inkübasyon

-100 µl tespit solüsyonu A eklenmesi. 37 °C'de 1 saat inkübasyon sonrası 3 kez yıkama

- 100 µl tespit solüsyonu B eklenmesi. 37 °C'de yarım saat inkübasyon sonrası 5 kez yıkama

C.Substrat eklenmesi

-90 µl substrat solüsyonu eklenmesi. 37 °C'de 15-25 dakika inkübasyon

F. Reaksiyonun durdurulması

-50 µl durdurma solüsyonu eklenmesi

G. Renk değişiminin 450 nm'de spektrofotometrik ölçümü

III.2.2 TGFβ1 Genotiplerinin Belirlenmesi

Olgulardan alınan periferik venöz kan örneklerinden 200 µl alınarak spin kolon yöntemine dayanan *Invitrogen* DNA izolasyon kiti ile hasta DNA'ları elde edilmiştir. Nanodrop cihazında DNA ölçümleri yapılan örneklerin DNA miktarı 30 ng/µl altında olan örneklerden izolasyon işlemi tekrarlanmıştır.

Elde edilen DNA örneklerinden PCR-RFLP yöntemi kullanılarak genotipler belirlenmiştir.

III.2.2.1 PCR işlemleri

Olguların DNA örneklerinden 200 ng/µl olacak miktarda alınarak PCR bileşenlerinden 25 µl standart PCR reaksiyonu kurulmuştur. Tablo 8'de her bir bölge için kullanılan primerler gösterilmiştir.

Tablo 8. PCR için kullanılan primerler

POLİMORFİZM	KULLANILAN PRİMERLER	PCR ürünü
rs1800469	F: 5'-ACAGGTGTCTGCCTCCTGAC-3' R: 5'-CCTCTTTCTCTGGTGACCCA-3'	223 bç
rs1800470	F: 5'-TTCAAGACCACCCACCTTCT-3' R: 5'-ATCGACATGGAGCTGGTGAA-3'	368 bç
rs4803455	F: 5'-CAGGCTCTAGAAGTGGAAATCTTG-3' R: 5'-TCAGGGTGTCAAATTTGCAGAAC-3'	460 bç

PCR Bileşenleri

- 10x reaksiyon tamponu
- 2.5 mM MgCl₂
- 20 µM dNTPs
- Primer Forward (10 pmol/ µl)
- Primer Reverse (10 pmol/ µl)
- 5U/µL Hot Start Taq polimeraz

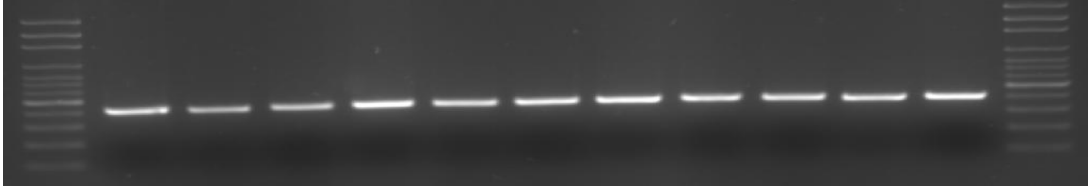
Öngörülen PCR döngü koşulları; PCR (Isı döngü cihazı) cihazının kapak sıcaklığı 105 °C olacak biçimde 35 döngü (denatürasyon, bağlanma ve uzama işlemi) ısı döngü cihazında gerçekleştirilmiştir.

PCR döngü sayıları ve sıcaklıkları aşağıda belirtilmiştir.

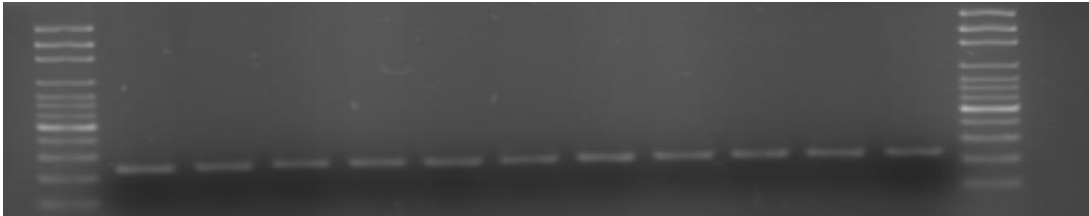
- 94 C'de 15 dakika ön denatürasyon
 - 94 C'de 45 saniye (denatürasyon)
 - 60 C'de 45 saniye (bağlanma)
 - 72 C'de 1 dakika 45 saniye (uzama)
 - 72 C'de 10 dakika (son uzama)
- } 35 döngü

Elde edilen PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek 100 bp DNA Ladder ile birlikte amplifikasyon ürünlerinin kontrolü yapılmıştır. Şekil 10,11 ve 12'de 10 olgudan elde edilen PCR ürünlerinin jel görüntüleri verilmiştir.

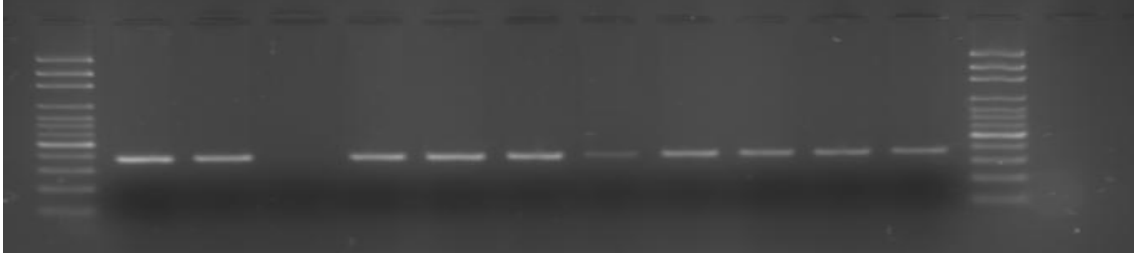
Şekil 10. rs4803455 polimorfizm bölgesine spesifik PCR jel görüntüleri



Şekil 11. rs1800469 polimorfizm bölgesine spesifik PCR jel görüntüleri



Şekil 12. rs1800470 polimorfizm bölgesine spesifik PCR jel görüntüleri



III.2.2.2 Restriksiyon Enzim Kesim Uygulaması

Ddel ve MluCI enzim kesimleri için 13,3 µl PCR ürünü, 0,2 µl enzim ve 1,5 µl 10X tampon solüsyon toplam 15 µl olacak şekilde hazırlanan karışım 2 saat 37 °C'de inkübasyonun ardından 65°C'de 20 dakika inaktivasyon yapılarak işlem sonlandırıldı.

MspA1I enzim kesimi için 8 µl PCR ürünü, 0,3 µl enzim, 0,15 µl BSA ve 1,5 µl 10x tampon solüsyonu üzerine toplam hacim 15 µl olacak şekilde moleküler grade su eklenerek 2 saat 37 °C'de inkübasyonun ardından 65°C'de 20 dakika inaktivasyon yapılarak işlem sonlandırıldı. Tablo 9'da kullanılan enzimler ve özellikleri verilmiştir.

Tablo 9. Çalışmada kullanılan enzimler ve özellikleri

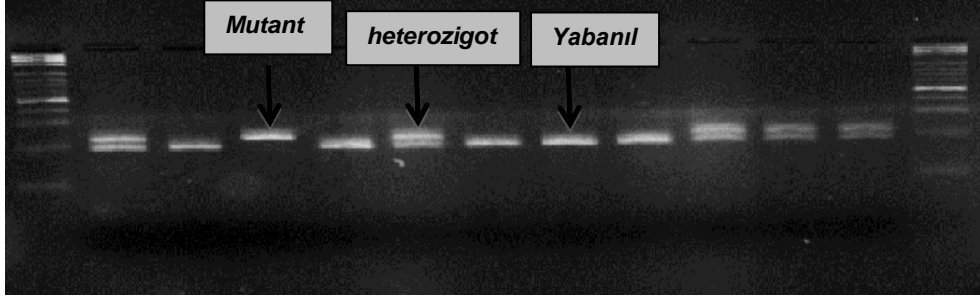
<i>POLİMORFİZM</i>	<i>ENZİM</i>	<i>KESİM BÖLGESİ</i>	<i>AKTİVASYON</i>	<i>İNAKTİVASYON</i>
rs1800469 C>T	Ddel	5'...C [^] T(N)AG...3' 3'...GA(N)T [^] C...5'	37°C' 2 saat	65°C'de 20 dk.
rs1800470 T>C	MspA1I	5'...CMG [^] CKG...3' 3'...GKC [^] GMC...5'	37°C' 2 saat	65°C'de 20 dk.
rs4803455 C>A	MluCI	5'...AATT [^] ... 3' 3'...AATT [^] ... 5'	37°C' 2 saat	65°C'de 20 dk.

Elde edilen ürünler %3,5'lik agaroz jel elektroforezinde 150 dk 110 V'da yürütülerek bandlar değerlendirilmiştir. Tablo 10 'da enzim kesimi sonrasında elde edilen ürünleri ve şekil 13,14 ve 15'de bu ürünlerin jel elektroforez görüntüleri verilmiştir.

Tablo 10. Çalışılan polimorfizmlerin enzim kesimi sonucu oluşan kesim ürünleri

Polimorfizm	PCR ürünü	Enzim	Kesim ürünleri		
			Yaban tip	Heterozigot	Mutant tip
rs1800469	223 bç	Ddel	TT	CT	CC
			223	223	
				192	192
				31	31
rs1800470	368bç	MspA1I	CC	CT	TT
			273	285	285
			43	273	43
			40	43	40
			12	40	12
				12	
rs4803455	460bç	MluCI	AA	AC	CC
			217	217	217
			168	168	147
			47	147	47
			21	47	21
			14	21	14
			14	14	14
				14	

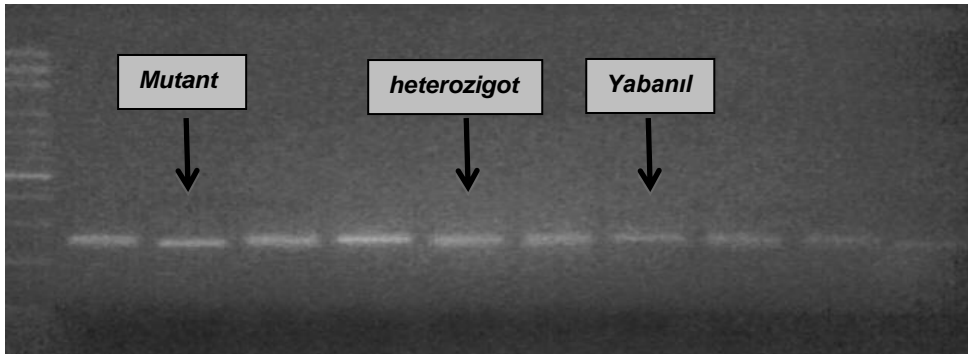
Şekil 13. rs1800469 polimorfizm bölgesine enzim kesimi jel görüntüleri



Şekil 14. rs4803455 polimorfizm bölgesine enzim kesimi jel görüntüleri



Şekil 15. rs1800470 polimorfizm bölgesine enzim kesimi jel görüntüleri



III.2.2.3 İstatistiksel Deęerlendirme

İstatistiksel açıdan TGF β 1 geni rs1800469, rs1800470 ve rs4803455 genotip dağılım ve sıklığının gruplar arası farklılıkları ki-kare testi ile, allelik dağılım ve sıklığının gruplar arası farklılıkları da tek yönlü varyans analizi ile değerlendirildi, yüzdeleri ve p değerleri hesaplandı. Serum TGF β 1 ve ADAMTS-4 düzeylerinin ortalamaları bağımsız gruplarda t testi ve iki serum düzeyi arasındaki değerlendirme Pearson korelasyon analizi ile yapılarak korelasyon katsayısı ve p değerleri hesaplanarak yapıldı. Serum düzeyleri ile risk faktörleri ve genotipler arasındaki ilişkinin tespitinde çok yönlü varyans analizi ile kullanıldı. ADAMTS-4 serum cut off değerinin tespiti ROC analizi ile belirlendi. p <0.05 değerleri istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.

IV. BULGULAR

Çalışmamızda koroner anjiyografi ile aterom plak tespit edilen 84 koroner arter hastalığı bulunan hasta ile anjiyografisinde aterom plak tespit edilmeyen 72 sağlıklı kontrol olgusu değerlendirilmiştir. Olguların demografik özellikleri tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11. Çalışma grubunu oluşturan olguların demografik özellikleri

Çalışma grubu	Hasta grubu (n=84)	Kontrol grubu (n=72)	p değeri	Toplam (n=156)
Yaş	60,254±10,11	51,80±7,9	10 ⁻³	51,74±8,4
Erkek	44(%52,4)	26(%63,9)	10 ⁻³	76(%44,9)
Kadın	40(%47,6)	46(%36,1)	10 ⁻³	86(%55,1)

Hasta ve kontrol olguları koroner arter hastalığı risk faktörleri incelendiğinde diyabet, hipertansiyon ve dislipidemi ile koroner arter hastalığı arasında anlamlı ilişki saptanmış olup bu risk faktörleri hasta olgularda daha yüksek oranda tespit edilmiştir. Tablo 12'da olguların koroner arter hastalığı risk faktörleri açısından elde edilen verileri gösterilmiştir.

Tablo 12. Çalışma grubunu oluşturan olguların risk faktörleri verileri

Risk Faktörü	Hasta grubu (n=84)	Kontrol grubu (n=72)	p değeri	Toplam (n=156)
DM	32(%38,1)	11(%15,3)	0,001	43(%27,5)
DL	35(%41,7)	12(%16,7)	0,001	47(%30)
HT	40(%47,6)	25(%34,7)	10⁻³	79(%50)
AÖ	24(%28,6)	15(%20,8)	*NS	33(%21)
Sigara	19(%22,6)	14(%19,4)	*NS	39(%25)

DM: diabetes mellitus, DL: dislipidemi, HT: hipertansiyon, AÖ: aile öyküsü

*p<0,05 için anlamlı ilişkili tespit edilmemiştir.

IV.1 TGFβ1 geni genotip bulguları

Olguların TGFβ1 geni rs1800469, rs1800470 ve rs4803455 polimorfizm bölgeleri açısından genotipleri belirlenmiş olup hasta ve kontrol grupları arasında üç genotip ve allel sıklıkları açısından farklılık olmadığı tespit edilmiştir. Tablo 13,14 ve 15’de hasta ve kontrollerin genotip verileri sunulmuştur.

Tablo 13. TGF β 1 geni rs1800469 polimorfizmi genotip sıklıkları

rs1800469	Hasta grubu	Kontrol grubu	p değeri
Genotip dağılımı ve sıklığı			
CC	24(%28,6)	22(%30,6)	0.224*
CT	43(%51,2)	28(%38,9)	
TT	17(%20,2)	22(%30,6)	
Allel sıklığı ve dağılımı			
C alleli	91(%54,2)	72(%50)	0.462*
T alleli	77(%45,8)	72(%50)	

p < 0.05 düzeyinde anlamlı fark bulunmamıştır.

Tablo 14. TGF β 1 geni rs1800470 polimorfizmi genotip sıklıkları

rs1800470	Hasta grubu	Kontrol grubu	p değeri
Genotip dağılımı ve sıklığı			
CC	30(%35,7)	26(%36,1)	0.162*
CT	24(%28,6)	12(%16,7)	
TT	30(%35,7)	34(%47,2)	
Allel sıklığı ve dağılımı			
C alleli	84(%50)	64(%44,4)	0.327*
T alleli	84(%50)	80(%55,6)	

p < 0.05 düzeyinde anlamlı fark bulunmamıştır.

Tablo 15. TGF β 1 geni rs4803455 polimorfizmi genotip sıklıkları

rs4803455	Hasta grubu	Kontrol grubu	p değeri
Genotip dağılımı ve sıklığı			
CC	32(%38,1)	33(%45,8)	0.606*
CA	39(%46,4)	30(%41,7)	
AA	13(%15,5)	9(%12,5)	
Allel sıklığı ve dağılımı			
C alleli	103(%61,3)	96(%66,7)	0.326*
A alleli	65(%38,7)	48(%33,3)	

p < 0.05 düzeyinde anlamlı fark bulunmamıştır.

Hasta ve kontrollerin üç polimorfizm açısından yapılan üçlü genotip analizinde hasta ve kontrol olgularında en sık **TCC** genotipi tespit edilmiş olup bu genotip kontrol grubunda daha yüksek saptanmış fakat istatistiksel anlamlı sonuç elde edilememiştir(p=0,08). **CCA** genotipi hasta olgularda anlamlı düzeyde daha fazla tespit edilmiştir. Bu genotipi taşıyan kişiler taşımayanlara göre 3,26 kat daha fazla koroner arter hastalığı riski taşımaktadır. (Tablo 16)

Tablo 16. Olguların rs1800469, rs1800470 ve rs480455 genotip sıklıkları

HAPLOTİP	Hasta grubu	Kontrol grubu	p değeri	OR(%95CI)
CCC	14.9(%0.8)	8.38(%0.058)	0.306	1.57 (0.65-3.71)
CCA	19.12(%11)	5.46(%0.38)	*0.013	3.26 (1.22-8.68)*
CTC	19.02(%11,3)	16.91(%11,7)	0.908	0.96 (0.47-1.9)
CTA	37.95(%22)	41.24(%28)	0.221	0.72 (0.43-1.21)
TCC	43.67(%26)	50.16(%34.8)	0.089	0.65 (0.40-1.06)
TTC	25.41(%15)	20.55(%14,3)	0.829	0.65 (0.40-1.06)
TTA	1.61(%0.1)	1.30(%0,009)	-	1.072 (0.57-2.01)
TCA	6.31(%0.38)	0.00	0.018*	-

*p<0.05 anlamlı fark tespit edilmiştir.

Olguların ikili genotip sıklık analizinde rs1800469 ve rs1800470 ikili genotiplerinden hasta ve kontrollerde en sık **CT** genotipi tespit edilmiş, bu genotip kontrol grubunda daha sık tespit edilmiş fakat anlamlı farklılık saptanmamıştır. **CC** genotipi ise hastalarda anlamlı düzeyde daha fazla tespit edilmiştir.

rs1800469 ve rs4803455 ikili genotiplerinde **CA** genotipi hastalarda daha sık bulunmakla birlikte anlamlı sonuç elde edilememiştir. TA genotipi hastalarda anlamlı daha sık tespit edilmiştir.

rs1800470 ve rs4803455 ikili genotiplerinde **CA** genotipi hasta grubunda anlamlı düzeyde daha sık tespit edilmiştir. Tablo 17'de ikili genotip sıklıkları verilmiştir.

Tablo 17. Hasta ve kontrol grubunun ikili genotip sıklıkları

rs1800470 rs4803455	Hasta grubu	Kontrol grubu	p değeri	OR(%95CI)
C C	57.87(%34,4)	58.18(%40)	0.278	0.775 (0.489-1.229)
C A	26.13 (%15,6)	5.82(%0.40)	*0.00083	4.369(1.727-11.052)
T C	45.13(%26)	37.82(%26)	0.905	1.031 (0.623-1.707)
T A	38.87(%23.1)	42.18(%29,3)	0.216	0.727(0.438-1.207)
rs1800469 rs1800470	Hasta grubu	Kontrol grubu	p değeri	OR(%95CI)
C C	34,21(%20,4)	14,07(%0,9)	*0,0099	2,36(1,21-4,59)
C T	56,79(%33,8)	57,93(%40,2)	0,24	0,75(0,47-1,20)
T C	49,79(%29)	49,93(%34)	0,34	0,79(0,49-1,2)
T T	27,21(%16)	22,07(%15,3)	0,83	1,068(0,57-1,96)
rs1800469 rs4803455	Hasta grubu	Kontrol grubu	p değeri	OR(%95CI)
C C	33,8(%20,1)	25,18(%17,5)	0,55	1,18(0,67-2,10)
C A	57,18(%34)	46,82(%32,5)	0,77	1,07(0,66-1,71)
T C	69,188(%41,2)	70,82(%49,2)	0,15	0,72(0,46-1,13)
T A	7,82(%0,4)	1,18(%0,08)	*0,043	5,92(0,84-41,64)

*p<0,05 anlamlı fark tespit edilmiştir.

IV.2 TGF β 1 ve ADAMTS-4 serum düzeyleri bulguları

Hasta ve kontrol gruplarında yapılan TGF β 1 ve ADAMTS-4 serum düzeylerinin analizinde TGF β 1 serum düzeyleri açısından hasta ve kontrol grubunda anlamlı fark tespit edilmemekle birlikte TGF β 1 serum düzeyi ortalaması hasta grubunda daha düşük saptanmıştır. Tablo 18'de olguların serum TGF β 1 ve ADAMTS-4 serum düzeyleri verileri sunulmuştur.

Tablo 18. Çalışma grubunun serum TGF β 1 ve ADAMTS-4 serum düzeyleri

Serum düzeyi	Hasta grubu (n=84)	Kontrol grubu (n=72)	p değeri
TGF β 1 (ng/mL)	19,12 \pm 12,2	20,62 \pm 15,5	0,50
ADAMTS-4 (ng/mL)	203,4\pm128,2	105,4\pm82,5	*10⁻³

*p<0,05 anlamlı fark tespit edilmiştir.

TGF β 1 serum düzeyleri ile risk faktörleri arasında anlamlı ilişki tespit edilmemiştir. Tutulan damar sayısı ve lezyon yüzdesi ile TGF β 1 serum düzeyleri arasında anlamlı korelasyon olmadığı bulunmuştur. (r=0,078, p=0,33)

TGF β 1 genotipleri ile TGF β 1 serum düzeyleri arasında anlamlı ilişkili olmadığı saptanmıştır (Tablo 19).

Tablo 19. Hastaların TGFB1 geni genotiplerine göre TGFB1 serum düzeyleri

<i>rs1800469</i>	<i>TGFB1 serum düzeyi(ng/mL)</i>	<i>p değeri</i>
CC	17,08	0,20
CT	21,12	
TT	16,6	
<i>rs1800470</i>	<i>TGFB1 serum düzeyi(ng/mL)</i>	<i>p değeri</i>
CC	17,3	0,41
CT	18,7	
TT	21,04	
<i>rs4803455</i>	<i>TGFB1 serum düzeyi(ng/mL)</i>	<i>p değeri</i>
CC	16,1	0,15
CA	21	
AA	20,3	

*p = 0.05 düzeyinde anlamlı fark bulunmamıştır.

ADAMTS-4 serum düzeyleri ise hasta grubunda istatistiksel olarak daha yüksek saptanmıştır.(Tablo 18) Aynı zamanda serum ADAMTS-4 düzeyleri diabetik hastalarda anlamlı düzeyde daha yüksek saptanmıştır.(p<0,05) ADAMTS-4 serum düzeyi ile tutulan damar sayısı ve lezyon yüzdesi arasında pozitif korelasyon olduğu görülmüştür. Hasta grubunda ADAMTS-4 düzeyi arttıkça hastalığın şiddeti artmaktadır. (Tablo 18, 20)

Tablo 20. ADAMTS-4 ve hastalığın şiddetinin değerlendirilmesi

ADAMTS serum düzeyi	Tutulan damar sayısı	Lezyon yüzdesi
r değeri	0,38	0,25
p değeri	*10⁻³	*0,001

p<0,05 anlamlı fark tespit edilmiştir.

Tüm olgular değerlendirildiğinde TGFβ1 ve ADAMTS-4 serum düzeyleri arasında korelasyon görülmemiş fakat hasta grubunda yapılan analizlerde TGFβ1 düzeyi arttıkça ADAMTS-4 düzeyinin arttığı gözlenmiştir.(p=0,07)

Yapılan ROC analizinde ADAMTS-4, **101,130 ng/mL** serum düzeyi %76,2 duyarlılık ve %67,7 seçicilik düzeyi ile koroner arter hastalığının taramasında cut off değeri olarak belirlenmiştir.

V. TARTIŞMA

Koroner arter hastalığı, yüksek morbidite ve mortalite oranları ile tüm dünyada yaygın sağlık sorunudur. Genetik yatkınlık ile çevresel faktörlerin etkileşimi sonrasında ortaya çıkan koroner arter hastalığı kompleks multifaktöriyel bir hastalıktır (105). Genetik epidemiyolojik çalışmalarda farklı genlerdeki değişimlerin koroner arter hastalığı riskini arttırdığı gösterilmiştir (106). Hastalığın oluşumundaki risk faktörleri tanımlanmış olmakla birlikte genetik değişimlerin bu risk faktörleri ile etkileşimi ve patogenezdaki rolleri henüz netlik kazanmamıştır.

Gen dizi değişimlerinin koroner arter hastalığına yatkınlık oluşturduğu düşünülen TGF β 1, çok sayıda dokuda eksprese olan farklı fizyolojik ve patolojik süreçlerde sorumlu multifonksiyonel bir sitokindir. TGF β 1, vasküler sistemde de birçok fizyolojik ve patolojik süreçte yer almaktadır. Ateroskleroz gelişim süreçlerinin birçok basamağında farklı fonksiyonları olduğu tespit edilmiştir (89-100). Bu özelliğinden dolayı TGF β 1 gen dizi değişimlerinin ve TGF β 1 serum düzeylerinin koroner arter hastalığında patogeneзде rolü olabileceği hipotezini ortaya koymuştur.

Yapılan gen dizi değişimi çalışmalarında TGF β 1 ekspresyonunu etkileyen promotor bölge polimorfizmleri araştırılmış, çalışmalar özellikle serum düzeyini etkilediği bilinen rs1800468, rs1800469, rs1800470, rs1800471, rs1800472 polimorfizmleri üzerine yoğunlaşmıştır.

Bu çalışmada bireyler arası TGF β 1 ekspresyon farklılıklarına yol açtığı bilinen rs1800469, rs1800470 polimorfizmleri ve rs1800470 ile yüksek LD skoruna sahip, aterom plak lezyon derinliği ile anlamlı ilişki tespit edilen rs4803455 polimorfizmi değerlendirilmiştir. Üç polimorfizm ayrı ayrı

değerlendirildiğinde allel ve genotip sıklıkları açısından hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı farklılık tespit edilmemiştir. İkili genotip analizinde rs1800469 ve rs1800470 polimorfizmi açısından CC genotipi hasta grubunda anlamlı düzeyde daha sık olduğu görülmüştür. Literatürde TGF β 1'in gen değişimlerinin koroner arter hastalığındaki rolü ile ilgili yapılan çalışmalardan, Koch ve ark. rs1800469 T allelinin ve rs1800470 T allelinin myokard infarktüsü riskini arttırdığı gösterilmiştir (107). Diğer çalışmalarda da benzer yönde bulgular elde edilmiş fakat anlamlı sonuç elde edilememiştir (Tablo 21). Lu ve ark. tarafından yapılan TGF β 1 polimorfizm meta analiz çalışmasında TGF β 1 rs1800469 ve 1800470 T allelinin koroner arter hastalığı ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (101). Yapılan bu çalışmalarda TGF β 1'in aterosklerozun farklı evrelerinde farklı fizyolojik etkilerinin olması nedeni ile, hasta grubunun myokard infarktüsü geçiren olguların çalışmaya alınması T allelinin plak destabilizasyonunda sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. Literatürde ateroskleroz plak varlığı ile T allel sıklıkları açısından hasta ve kontroller arasında anlamlı ilişki tespit edilmemiştir.

Bu çalışmada hasta grubunun infarktüs öyküsü olmayan ateroskleroz plak tespit edilen hastalar olması nedeni ile hasta grubunda anlamlı yüksek tespit edilen CC haplotipinin (rs1800469 C alleli ve rs1800470 C allel birlikteliği) Türk toplumunda ateroskleroz plak gelişimine yatkınlık oluşturabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada CC genotipinin ateroskleroz plak gelişim riskini 2,36 kat arttırdığı görülmüştür. Üçlü genotip analizinde CCA genotipinin hastalarda anlamlı düzeyde daha sık saptanmış ve ateroskleroz plak gelişimi açısından 3,26 kat risk artışı tespit edilmiştir. CC genotipinin hastalığın oluşumundaki etkisinin doğrulanması için Türk toplumuna ait hasta ve kontrol sayısının artırılarak bu genotip ve eşlik eden diğer TGF β 1 geni dizi değişimlerinin değerlendirilmesi uygun olacaktır. Bu çalışmada değerlendirilen rs483455 polimorfizmi allel sıklıkları gruplar arasında farklılık göstermemekle birlikte rs1800470 polimorfizmi ile birlikte değerlendirildiğinde hasta grubunda CA haplotipi daha sık saptanmış ve koroner arter hastalığı riskini 4,4 kat arttırdığı görülmüştür.

Tablo 21. Farklı toplumlarda rs1800469 ve rs1800470 genotip sıklıkları(101)

Polimorfizm	referans	Hasta grubu	Kontrol grubu	OR	%95CI	p değeri	Klinik
rs1800469 T allel	Syrris ark	655	244	1,215	0,90-1,63	0,194	CAD
	Cambien ark	563	629	0,96	0,76-1,21	0,776	MI
	Koch ark.	3657	1211	1,14	1,00-1,30	*0,042	MI
	Crobu ark.	201	201	1,32	0,88-1,98	0,17	MI
rs1800470 T allel	Syrris ark	655	244	1,22	0,90-1,65	0,18	CAD
	Cambien ark	563	629	1,17	0,92-1,46	0,18	MI
	Koch ark.	3657	1211	1,19	1,04-1,36	*0,01	MI
	Crobu ark.	201	201	1,38	0,90-2,12	0,13	MI
	Yokota ark	315	591	0,85	0,62-1,16	0,32	MI

CAD: Koroner arter hastalığı, MI: myokard infarktüsü

Olguların değerlendirilen serum TGF β 1 düzeyleri açısından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı farklılık olmadığı saptanmıştır. Yapılan analizlerde koroner arter hastalığı risk faktörleri ile TGF β 1 serum düzeyleri arasında anlamlı ilişki tespit edilmemiştir. (105). Literatürde koroner arter hastalığı ve TGF β 1 serum düzeyleri ile ilgili yapılan çalışmalarda; Najar ve ark. tarafından yapılan çalışmada, TGF β 1 serum düzeyleri myokard infarktüsü olgularında kontrollere göre daha yüksek saptanırken Grainger ve ark. yapmış olduğu çalışmada ilerlemiş lezyonlarda serum TGF β 1 düzeyi düşük olduğu görülmüştür(105,108).

Myokard infarktüsü öyküsü olmayan hastalardan yapılan bu çalışmada aterom plak gelişiminin serum TGF β 1 düzeyleri ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir fakat TGF β 1 sinyal azalmasının aterom plak gelişimindeki rolü değerlendirilememiştir. Aterogenezin birçok basamağında görevli olan ve antiaterojenik bir sitokin olduğu düşünülen TGF β 1 ile ilgili ortaya çıkan bu sonucun, TGF β 1'in etkisinin TGF β 1'in lokal düzeyi ve reseptör yoğunluğuna bağlı olması; koroner arter hastalığının farklı patofizyolojik evrelerinde birçok biyolojik süreçte yer alması ve serum düzeyinin vasküler interstisyel alandaki TGF β 1 konsantrasyonunu yansıtmamasına bağlı olabileceği düşünülmektedir (99). TGF β 1'in reseptör düzeyinde etkilerinin başlaması için gerekli olan latent formdan aktif forma dönüşümü etkileyen faktörlerin de TGF β 1 yolağı sinyal azalmasına neden olabileceği bu yüzden aktif formunun ve doku ya da hücre içi ekspresyonunun değerlendirilmesi daha uygun olduğu düşünülmektedir (92).

Bu çalışmada TGF β 1 genotipleri ile serum düzeyleri arasında da anlamlı ilişki tespit edilmemiştir. Literatürde serum TGF β 1 düzeyleri ile genotipler arasında Najjar ve ark. yapmış olduğu çalışmada myokard infarktüsü öyküsü olan hastalarda rs1800469 bölgesi T, rs1800470 bölgesi C allelinin daha yüksek serum düzeyleri anlamlı ilişkisi saptanmıştır (105). Shah ve ark tarafından yapılan allelik fonksiyon çalışmasında ise iki polimorfizm açısından genotipe göre serum düzeyleri üç gruba ayrılarak, CC haplotipinin bu gruplardan orta düzey serum TGF β 1 düzeyi ile ilişkilendirilmiş, CT haplotipinin düşük TGF β 1 ile, TC haplotipinin ise yüksek serum düzeyleri ile seyretmesi gerektiği savunulmuştur (101). Bu çalışmada hastalarda sık tespit edilen CC haplotipinin serum düzeyine nasıl yansıdığı tespit edilememiştir.

ADAMTS-4, damar duvarı majör proteoglikanı versikanın V1 izoformunu Glu441-Ala442 bağlantı noktasından ayırarak G1 versikan fragmanının oluşumunu sağlamaktadır. Oluşan versikan fragmanlarının sadece vasküler matriksi fizyolojik yapılanma sürecinde değil, vasküler patolojilerde de sorumlu

olabileceği düşünülmektedir (69). ADAMTS-4'ün ateroskleroz gelişimindeki rolünü ortaya koymak amacı ile yapılan çalışmalarda koroner arter hastalığı tanısı almış hastalarda hasta grubunun ADAMTS-4 düzeyleri daha yüksek oranda saptanmış, hastalığın şiddeti ile serum düzeyleri arasında korelasyon tespit edilmiştir(109). ADAMTS-4 düzeyleri arttıkça hastalığın şiddeti artmakta olduğu görülmüştür. Zha ve ark. tarafından yapılan çalışmada da plazma ADAMTS-4 düzeyi ile periferik kan monosit ADAMTS-4 ekspresyonunun aterosklerozlu hastalarda daha yüksek olduğu saptanmıştır(82).

Bu çalışmada hasta grubunda serum ADAMTS-4 düzeyleri kontrollere göre daha yüksek tespit edilmiş olup yapılan ROC analizinde ADAMTS-4, **101,130 ng/mL** serum düzeyi %76,2 duyarlılık ve %67,7 seçicilik düzeyi ile koroner arter hastalığı taramasında cut off değeri olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, ADAMTS-4'ün koroner arter hastalığında tarama testi olarak kullanılabilirliği konusunda olumlu bir bulgu ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada ADAMTS-4 serum düzeyi arttıkça hastalarda tutulan damar sayısı ve lezyon yüzdesi arttığı gösterilmiştir. Hastalığın şiddeti serum ADAMTS-4 düzeyi ile birlikte artmaktadır. Bu sonuçlar ADAMTS-4'ün hastalığın tüm evrelerinde etkili olduğunu, damar duvarı ekstrasellüler matriks proteoglikanlarının aterogenezde aktif rollerinin olabileceği göstermiştir.

Diabetik hastalarda serum ADAMTS-4 düzeyleri daha yüksek tespit edilmiştir. Bu hastalardaki ADAMTS-4 yüksekliğinin aterom plak gelişiminde etkili bir faktör olabileceği düşünülmektedir. Diabetik hastaların kan şekeri düzeylerinin tedavi ile kontrol altında olması nedeni ile bu çalışmada serum kan şekeri değerleri ile ADAMTS-4 değerleri arasındaki ilişki değerlendirilememiştir.

Çalışmaların üzerinde yoğunlaştığı diğer bir alan ise ADAMTS proteazların ekspresyon kontrolünde yer alan moleküllerdir. ADAMTS proteazlar inflamasyon

kontrollü enzimler olup karotis plaklarda makrofaj ve damar düz kas hücresinde yüksek oranda eksprese olduğu gösterilmiştir. İnflamasyonda rol alan sitokinlerin ADAMTS enzimleri üzerine etkileri in vitro çalışmalarda araştırılmaktadır. Bu çalışmalardan Ashlin ve Salter tarafından TGF β ile ilgili yapılan iki farklı çalışmada, TGF β 'nın ADAMTS-4 ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir (87,88).

Bu çalışmada hasta grubunda artan TGF β 1 düzeyinin ADAMTS-4 düzeyini arttırdığı gösterilmiştir. İn vitro çalışmalarda gösterilenin aksine TGF β 1'in ADAMTS-4 düzeyini arttırması iki molekülün ateroskleroz oluşumunda ve ilerlemesinde birlikte rol alabileceklerini düşündürmektedir. Literatürde bildirilen yüksek TGF β 1 serum düzeyine sahip T allelinin koroner arter hastalığında anlamlı düzeyde daha sık saptanması bu görüşü desteklemektedir fakat bu çalışmada TGF β 1 düzeyi ile hastalık arasında ilişki tespit edilememiştir. İn vivo ortamda doku düzeyinde yapılacak çalışmaların bu iki molekül arasındaki ilişkinin daha net ortaya konmasında yol gösterici olacaktır.

VI. SONUÇ ve ÖNERİLER

Ateroskleroz gelişimde yer alan patolojik süreçler bugün için koroner arter hastalığına bağlı mortalite ve morbidite oranını azaltmaya yönelik hedef noktayı oluşturmaktadır. Genetik ve çevresel faktörlerin birarada olduğu bu hastalıkta patogeneze katkıda bulunan faktörlerin ortaya konması oldukça önemlidir.

Bu çalışmada TGF β 1 serum düzeyi ve ADAMTS-4 düzeyi arasındaki ilişki ilk kez in vivo ortamda değerlendirilmiş ve koroner arter hastalarında ADAMTS-4 düzeyinin TGF β 1 düzeyi ile birlikte artış gösterdiği tespit edilmiştir. Ortaya konan bu sonuç hastalığın oluşumu ve ilerlemesine yönelik yapılacak çalışmalar için yol gösterici olacaktır. Bununla birlikte TGF β 1'in ADAMTS-4 düzeyini doku düzeyinde nasıl etkilediği cevaplanması gereken diğer bir sorudur.

Antiaterojenik olduğu düşünülen TGF β 1'in artan serum düzeylerinin hastalığın oluşumuna direk katkıda bulunup bulunmadığı veya reseptör veya diğer TGF β 1 sinyal yolağındaki moleküllerdeki defekte sekonder sinyal azalmasına bağlı olup olmadığı yapılacak diğer çalışmalarla ortaya konmalıdır.

Bu çalışmada tespit edilen koroner arter hastalarındaki yüksek ADAMTS-4 düzeyi ve hastalığın şiddeti ile artan serum değerleri aterosklerozun oluşumu ve ilerlemesinde ADAMTS-4'ün rolünü için önemli bir veri olarak değerlendirilmektedir. Bunun yanında damar duvarı versikanın yıkımında görevli diğer ADAMTS ailesi üyelerinin koroner arter hastalarında değerlendirilmeleri hem versikanın patogeneze rolünü ortaya koyacak hem de koroner arter hastalığı tarama testinde birlikte kullanılmaları testin duyarlılığı ve seçiciliğini arttırmaya yardımcı olacaktır. Diabetik hastalarda tespit edilen artan ADAMTS-4 düzeyinin de yapılacak çalışmalarla desteklenmesi ve kan şekeri düzeyleri ile olan ilişkinin araştırılması gerekmektedir.

TGF β 1 geni anlamlı farklılık tespit edilen haplotiplerin olgu sayısının daha da arttırılarak Türk toplumundaki sıklığı ve hastalığın oluşumundaki katkısı belirlenmelidir. TGF β 1 ekspresyonunu etkileyebilecek diğer genetik değişimlerin tümünün ortaya konması adına tüm gen dizi değişimlerinin ve doku düzeyinde TGF β 1 düzeyinin değerlendirilmesi uygun olacaktır.

Bu çalışmanın sonucunda elde edilen verilerle şu sonuçlara ulaşılmıştır:

1. TGF β 1 rs1800469, rs1800470 ve rs4803455 polimorfizmlerinin CCA genotipinin ateroskleroz oluşumuna yatkınlık oluşturabileceği, fakat daha fazla sayıda olguda değerlendirilmesi gerektiği vurgulanmıştır.
2. TGF β 1 serum düzeyleri ile değerlendirilen polimorfizmler arasında anlamlı bir ilişki olmadığı görülmüş, serum düzeyi üzerine etkili diğer faktörlerin araştırılması gerekliliği ortaya koymuştur.
3. Tek başına serum TGF β 1 serum düzeyinin hastalığın oluşumu ile ilişkili olmadığı, doku ekspresyon ve TGF β 1 sinyal yolağı ile ilgili çalışmaların yapılması gerektiği vurgulanmıştır.
4. Koroner arter hastalarında saptanan yüksek serum ADAMTS-4 düzeylerinin hastalığın oluşumu ve progresyonunda etkili olabileceği gösterilmiştir.
5. Hasta grubunda ADAMTS-4 düzeylerinin TGF β 1 serum düzeyi ile birlikte artış göstermesi bu iki molekülün hastalığın ilerlemesinde birlikte rol oynayabilecekleri düşündürmektedir.
6. Diabetik olgularda tespit edilen yüksek ADAMTS-4 serum düzeyleri, bu hastalık grubunda artmış ateroskleroz riskinin bu molekül ile ilişkili olabileceğini, ileri araştırmalarla bu hipotezin desteklenmesi gerektiğini ortaya koymuştur.

VII. ÖZET

KORONER ARTER HASTALIĞINDA TGF β 1 GEN POLİMORFİZMLERİNİN TGF β 1 VE ADAMTS-4 SERUM DÜZEYLERİ İLE İLİŞKİSİ

Koroner arter hastalığı, tüm dünyada yüksek mortalite ve morbiditeye sahip kalbi besleyen ana damarlardaki tıkaçıcı özellikteki ateroskleroz gelişimi ile karakterize multifaktöriyel bir hastalıktır. Ateroskleroz gelişimine neden olan risk faktörleri tanımlanmış olsa da bu hastalığın patogenezi net olarak aydınlatılamamıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda düşük molekül ağırlıklı lipoproteinlerin(LDL) damar duvarında aşırı birikiminin aterosklerozdaki temel mekanizma olduğunu destekleyen bulgular bulunmaktadır. Bu birikimde subendotelial ekstrasellüler matriksin temel bileşeni olan proteoglikanların artmış LDL bağlama kapasitesi sorumlu tutulmaktadır. Ekstrasellüler matriksin yapım ve yıkımını etkileyen faktörlerin bu süreçte sorumlu olabileceği öngörülmektedir.

Bu çalışmada ekstrasellüler matriksin yapılanmasında görevli ve aterosklerozla ilişkili olduğu bilinen TGF β 1 ve ADAMTS-4 'ün aterosklerotik hastalardaki rolünü ortaya koymak amaçlanmıştır.

Bu amaçla Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji servisine koroner arter hastalığı ön tanısı ile başvuran olgulardan koroner anjiyografide aterom plak tespit edilen 84 olgu hasta grubuna, koroner anjiyografisi normal tespit edilen 72 olgu kontrol grubuna dahil edilmiştir. Olguların alınan kan örneklerinden TGF β 1 ve ADAMTS-4 serum düzeyleri ve TGF β 1 rs1800469, rs1800470 ve rs4803455 polimorfizmleri açısından genotipleri belirlenmiştir.

Yapılan analizlerde TGF β 1 üçlü genotipinde CCA genotipi hasta grubunda anlamlı düzeyde daha sık tespit edilmiştir. TGF β 1 serum düzeyleri açısından

hasta ve kontrol grubunda farklılık tespit edilmemiştir. Koroner anjiyografide aterom plak saptanan olgularda ADAMTS-4 serum düzeyleri anlamlı düzeyde yüksek tespit edilmiş olup tutulan damar sayısı ve lezyon yüzdesinin ADAMTS-4 düzeyi ile artış gösterdiği saptanmıştır. Diabetik hastalarda tespit edilen artmış ADAMTS-4 düzeyinin yanısıra hasta grubunda ADAMTS-4 düzeyinin TGF β 1 düzeyi ile birlikte artış gösterdiği görülmüştür.

Sonuç olarak, ADAMTS-4'ün ateroskleroz fizyopatolojisinde aktif rolü olduğu ancak hastalığın progresyonunda tespit edilen TGF β 1 ile olan korelasyonun ekspresyon çalışmaları ile desteklenmesi gerekmektedir. Hasta grubunda daha sık tespit edilen üçlü TGF β 1 genotiplerinin hastalığın oluşumundaki etkisinin ortaya konması için daha fazla sayıda olguda yapılacak analizlere ihtiyaç bulunmaktadır.

Anahtar kelimeler: ateroskleroz, ekstraselüler matriks, TGF β 1, ADAMTS-4, polimorfizm

VIII. İNGİLİZCE ÖZET

THE RELATIONSHIP BETWEEN TGFB1 GENE POLYMORPHISM AND TGFB1, ADAMTS-4 SERUM LEVELS IN CORONARY ARTERY DISEASE

Coronary heart disease is a multifactorial disease which is responsible for morbidity and mortality in all of the world and is characterized obstructive atherosclerosis in vessel wall. Although the risk factors that cause atherosclerosis are determined, the pathogenesis of this disease can't be explained completely. Recent years there are supporting datas that low density lipoprotein's excessive deposition in vessel wall is the basic mechanism of atherosclerosis(1-2). In this deposition increasing LDL binding capability of proteoglycans that is the basic structure of subendotelial extracellular matrix is charged. Although the predisposition factors that increase LDL binding to proteoglycans have not been determined yet it is speculated these factors that are manufacturing or destruction of extracellular matrix can be responsible in this process.

In this study, it was aimed to investigate the role of TGF β 1 and ADAMTS-4 in atherosclerotic patient, which are responsible for structuring of extracellular matrix and associated with atherosclerosis.

In this study designed above mentioned aims, from cases referred to cardiology department who have coronary heart disease prediagnosis, 84 case inserted in patient group which have atheroma plaque in coronary angiography and 72 cases which coronary angiography is normal inserted in control group. Blood samples from cases were taken for analysis of TGF β 1, ADAMTS-4 serum levels and TGF β 1 rs1800469, rs1800470 and rs4803455 polymorphisms.

According to our results, from TGF β 1 triple genotypes CCA genotype is more frequent in the patient. There was no difference between patient's and control's level of serum TGF β 1. In patients ADAMTS-4 serum levels were higher than controls and ADAMTS-4 levels increased with lesion percentage and vessel number. ADAMTS-4 levels were higher in diabetic cases as well as TGF β 1 correlated with ADAMTS-4 levels in patient.

In conclusion, it was demonstrated that ADAMTS-4 may have a major role of physiopathology of atherosclerosis, but the correlation between TGF β 1 levels in patients should be supported with expression study. The genotype which is detected more frequent in patients, should be investigated in more patients for determining the development of atherosclerosis

Keywords: atherosclerosis, extracellular matrix, TGF β 1, ADAMTS-4, polymorphism

IX. KAYNAKLAR

1. Prevalence of coronary heart disease--United States, 2006-2010. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2011 Oct 14;60(40):1377-812.WHO

http://www.who.int/cardiovascular_diseases/resources/atlas/en/

2. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin E et al. ; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. Circulation. 2013 Jan 1;127(1):e6-e245

3. Onat A, Dursunođlu D, Bulur S, Kűcűkdurmaz Z, Kaya Z, Ordu S ve ark. TEKHARF alıřması 2009 taraması. <http://tekharf.org/2009.html>

4. Sađlık Bakanlıđı Temel Sađlık Hizmetleri Genel Műdűrlűđű Tűrkiye Kalp ve Damar Hastalıklarını nleme ve Kontrol Programı. Birincil, İkincil ve cűncűl Korumaya Yűnelik Stratejik Plan ve Eylem Planı (2010-2014) www.sgb.saglik.gov.tr

5. Shah SH. Gene polymorphisms and susceptibility to coronary artery disease. Pediatr Blood Cancer. 2007 Jun 15;48(7):738-41

6. Türk Kardiyoloji Derneği Koroner Kalp Hastalığı Korunma ve Tedavi Klavuzu 2002. www.tkd.org.tr

7. Scheuner MT. Genetic predisposition to coronary artery disease. *Curr Opin Cardiol.* 2001 Jul;16(4):251-60

8. 4. Chow CK, Islam S, Bautista L et al. Parental history and myocardial infarction risk across the world: the INTERHEART Study. *J Am Coll Cardiol.* 2011;57:619–627.

9. Sharp SD, Williams RR, Hunt SC, Schumacher MC. Coronary risk factors and the severity of angiographic coronary artery disease in members of high-risk pedigrees. *Am Heart J.* 1992 Feb;123(2):279-85

10. Kraft HG, Lingenhel A, Kochl S, et al.: Apolipoprotein(a) kringle IV repeat number predicts risk for coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996, 16:713–719.

11. Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Meinertz H, et al.: Association of mutation in the apolipoprotein B gene with hypercholesterolemia and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med* 1998, 338:1577–1584.

- 12.** Lambert J-C, Brousseau T, Defosse V, et al.: Independent association of APOE gene promoter polymorphism with increased risk of myocardial infarction and decreased APOE plasma concentrations—the ECTIM study. *Hum Molec Genet* 2000, 9:57–61.

- 13.** Zhong S, Sharp DS, Grove JS, et al.: Increased coronary heart disease in Japanese-American men with mutation in the cholesterol ester transfer protein gene despite increased HDL levels. *J Clin Invest* 1996, 97:2917–2923.

- 14.** Day INM, Whittall RA, O'Dell SD, et al.: Spectrum of LDL receptor gene mutations in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1997, 10: 116–127.

- 15.** Jukema JW, van Boven AJ, Groenemeijer B, et al.: The asp9asn mutation in the lipoprotein lipase gene is associated with increased progression of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1996, 94:1913–1918.

- 16.** Sanghera DK, Aston CE, Saha N, et al.: DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease. *Am J Hum Genet* 1998, 62:36–44.

- 17.** Gardemann A, Stricker J, Humme J, et al.: Angiotensinogen T174M and M235T gene polymorphisms are associated with the extent of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1999, 145:309–314.

- 18.** Tiret L, Bonnardeaux A, Poirier O, et al.: Synergistic effects of angiotensin-converting enzyme and angiotensin-II type 1 receptor gene polymorphisms on risk of myocardial infarction. *Lancet* 1994, 344:910–913.
- 19.** Keavney B, McKenzie C, Parish S, et al.: Large-scale test of hypothesized associations between the angiotensin-converting-enzyme insertion/deletion polymorphism and myocardial infarction in about 5000 cases and 6000 controls. *Lancet* 2000, 355:434–442.
- 20.** Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al.: A candidate genetic risk factor for vascular disease: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genet* 1995, 10:111–113.
- 21.** Franken DG, Boers GHJ, Blom HJ, et al.: Prevalence of familial mild hyperhomocysteinemia. *Atherosclerosis* 1996, 125:71–80.
- 22.** Böttiger C, Kastrati A, Koch W et al. HPA-1 and HPA-3 polymorphisms of the platelet fibrinogen receptor and coronary artery disease and myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 2000 Apr;83(4):559-62.
- 23.** Psaty BM, Smith NL, Lemaitre RN, et al.: Hormone replacement therapy, prothrombotic mutations, and the risk of incident nonfatal myocardial infarction in postmenopausal women. *JAMA* 2001, 285:906–913

- 24.** Le W, Yu J-D, Lu L, et al.: Association of the R485K polymorphism of the factor V gene with poor response to activated protein C and increased risk of coronary artery disease in the Chinese population. *Clin Genet* 2000,57:296–303.
- 25.** Di Castelnuovo A, D’Orazio A, Amore C, et al.: The decanucleotide insertion/deletion polymorphism in the promoter region of the coagulation factor VII gene and the risk of familial myocardial infarction. *Thromb Res* 2000,98:9–17.
- 26.** Yucel O, Karahan O, Zorlu A, Manduz S. Familial genetic risk factors in premature cardiovascular disease: a family study. *Mol Biol Rep.* 2012 May;39(5):6141-7.
- 27.** Gruzdeva O, Uchasova E, Dyleva Y et al. Plasminogen activator inhibitor-1, free fatty acids, and insulin resistance in patients with myocardial infarction. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2013 Aug 13;6:293-301.
- 28.** Lee AJ, Fowkes FG, Lowe GD et al. Fibrinogen, factor VII and PAI-1 genotypes and the risk of coronary and peripheral atherosclerosis: Edinburgh Artery Study. *Thromb Haemost.* 1999 Apr;81(4):553-60.
- 29.** Nikolajević-Starčević J, Petrovič D. The a1/a2 polymorphism of the glycoprotein IIIa gene and myocardial infarction in Caucasians with type 2 diabetes. *Mol Biol Rep.* 2013 Mar;40(3):2077-81.

- 30.** Lampka M, Grabczewska Z, Krajewska M et al. Soluble selectins in myocardial infarction. *Pol Merkur Lekarski*. 2013 Apr;34(202):188-91.
- 31.** Tian GX, Zeng XT, Wang XB et al. Association between the endothelial nitric oxide synthase gene Glu298Asp polymorphism and coronary heart disease: a meta-analysis of 39 case-control studies. *Mol Med Rep*. 2013 Apr;7(4):1310-8.
- 32.** Kallel C, Cohen W, Saut N et al Association of soluble endothelial protein C receptor plasma levels and PROCR rs867186 with cardiovascular risk factors and cardiovascular events in coronary artery disease patients: the Athero Gene study. *BMC Med Genet*. 2012 Nov 8;13:103.
- 33.** McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, et al. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science* 2007;316:1488–1491.
- 34.** Superko HR, Roberts R, Garrett B, Pendyala L, King S 3rd. Family coronary heart disease: a call to action. *Clin Cardiol*. 2010 Dec;33(12):E1-6. doi: 10.1002/clc.20684.
- 35.** Ruth McPherson. Chromosome 9p21.3 Locus for CAD: How little we know. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(15):1382-1383

- 36.** Zeev Vlodaver, Robert F. Wilson , Daniel J. Garry Coronary Heart Disease Clinical, Pathological, Imaging, and Molecular Profiles. Springer Science Business Media, 2012:1-7
- 37.** Tabas I, Williams KJ, Borén J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation*. 2007 Oct 16;116(16):1832-44
- 38.** Bui QT, Prempeh M, Wilensky RL. Atherosclerotic plaque development. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Nov;41(11):2109-13.
- 39.** Sary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb*. 1992 Jan;12(1):120-34.
- 40.** Ross, Michael H. *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*/Michael H. Ross, Wojciech Pawlina.—6th ed. 2006:173-178
- 41.** William Insull. The Pathology of Atherosclerosis: Plaque Development and Plaque Responses to Medical Treatment. *Am J Med*. 2009 Jan;122(1 Suppl):S3-S14

- 42.** Insull W Jr. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *Am J Med.* 2009 Jan;122(1 Suppl):S3-S14
- 43.** Dr. Gül Babacan Abanonu. Koroner arter hastalığı majör risk faktörleri ve C-reaktif proteinin değerlendirilmesi. Sağlık bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2005
- 44.** Eugene Braunwald, MD, MD(Hon), ScD(Hon), FRCP. *Braunwald's Heart Disease: A textbook of cardiovascular medicine.* Elsevier. 2012:897-904
- 45.** Chilton RJ. Pathophysiology of coronary heart disease: a brief review. *J Am Osteopath Assoc.* 2004 Sep;104(9 Suppl 7):S5-8.
- 46.** Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation.* 2005 Jun 28;111(25):3481-8.
- 47.** Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 Sep;32(9):2045-51
- 48.** Cai JM, Hatsukami TS, Ferguson MS. Classification of human carotid atherosclerotic lesions with in vivo multicontrast magnetic resonance imaging. *Circulation.* 2002 Sep 10;106(11):1368-73.

49. Stary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 May;20(5):1177-8.

50. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). *N Engl J Med.* 1976 Aug 19;295(8):420-5.

51. Kumar & Robbins & Cotran Temel Patoloji 2000 Çeviri editörü Uğur Çevikbaş altıncı edisyon. Bölüm 10 -Sayfa 284

52. Steinberg D. In Celebration of the 100th Anniversary of the Lipid Hypothesis of Atherosclerosis. *J Lipid Res.* 2013 Aug 23.

53. Keizer HG. The "Mevalonate hypothesis": a cholesterol-independent alternative for the etiology of atherosclerosis. *Lipids Health Dis.* 2012 Nov 5;11:149

54. Borén J, Gustafsson M, Skålen K et al. Role of extracellular retention of low density lipoproteins in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2000 Oct;11(5):451-6.

- 55.** Nakashima Y, Wight TN, Sueishi K. Early atherosclerosis in humans: role of diffuse intimal thickening and extracellular matrix proteoglycans. *Cardiovasc Res.* 2008 Jul 1;79(1):14-23.
- 56.** Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:551–561.
- 57.** Tabas I, Williams KJ, Bore´n J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis. Update and therapeutic implications. *Circulation* 2007;116:1832–1844.
- 58.** Chait A, Wight TN. Interaction of native and modified low-density lipoproteins with extracellular matrix. *Curr Opin Lipidol* 2000;11: 457–463.
- 59.** Lee RT, Yamamoto C, Feng Y et al. Mechanical strain induces specific changes in the synthesis and organization of proteoglycans by vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2001;276:13847–13851.
- 60.** Little PJ, Tannock L, Olin KL. Proteoglycans synthesized by arterial smooth muscle cells in the presence of transforming growth factor-b1 exhibit increased binding to LDLs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22: 55–60.

61. Annika Asplund. The effect of hypoxia on macrophage proteoglycans: potential role in atherosclerosis Wallenberg Laboratory for Cardiovascular Research Department of Molecular and Clinical Medicine Sahlgrenska Academy. 2009

62. Gandhi NS, Mancera RL.. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem Biol Drug Des.* 2008 Dec;72(6):455-82

63. Didangelos A, Stegemann C, Mayr M. The -omics era: proteomics and lipidomics in vascular research. *Atherosclerosis.* 2012 Mar;221(1):12-7

64. Nakashima, Y, H. Fujii, S. Sumiyoshi et al. Early human atherosclerosis: accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 May;27(5):1159-65

65. Evanko, S.P., E.W. Raines, R. Ross et al. Proteoglycan distribution in lesions of atherosclerosis depends on lesion severity, structural characteristics, and the proximity of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta. *Am J Pathol,* 1998. 152(2): p. 533-46.

66. O'Brien, K.D, K.L. Olin, C.E. Alpers. Comparison of apolipoprotein and proteoglycan deposits in human coronary atherosclerotic plaques: colocalization of biglycan with apolipoproteins. *Circulation,* 1998. 98(6): p. 519-27.

- 67.** Williams KJ. Arterial wall chondroitin sulfate proteoglycans: diverse molecules with distinct roles in lipoprotein retention and atherogenesis. *Curr Opin Lipidol.* 2001 Oct;12(5):477-87
- 68.** Wight TN, Merrilees MJ. Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis: key roles for versican. *Circ Res.* 2004 May 14;94(9):1158-67
- 69.** Kenagy RD, Plaas AH, Wight TN. Versican degradation and vascular disease *Trends Cardiovasc Med.* 2006 Aug;16(6):209-15
- 70.** Wight TN. Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr Opin Cell Biol.* 2002 Oct;14(5):617-23.
- 71.** Kawashima H, Hirose M, Hirose J et al. Binding of a large chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan, versican, to L-selectin, P-selectin, and CD44. *J Biol Chem.* 2000 Nov 10;275(45):35448-56.
- 72.** Sheng W, Wang G, Wang Y et al. The roles of versican V1 and V2 isoforms in cell proliferation and apoptosis. *Mol Biol Cell.* 2005 Mar;16(3):1330-40. Epub 2005 Jan 5.
- 73.** Salter RC, Ashlin TG, Kwan AP, Ramji D ADAMTS proteases: key roles in atherosclerosis? *J Mol Med (Berl).* 2010 Dec;88(12):1203-11

74. Schönherr E, Järveläinen HT, Kinsella MG Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta 1 differentially affect the synthesis of biglycan and decorin by monkey arterial smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb.* 1993 Jul;13(7):1026-36.

75. Lemire JM, Chan CK, Bressler S. Interleukin-1beta selectively decreases the synthesis of versican by arterial smooth muscle cells. *J Cell Biochem.* 2007 Jun 1;101(3):753-66.

76. Tortorella MD, Malfait F, Barve RA, Shieh HS, Malfait AM A review of the ADAMTS family, pharmaceutical targets of the future. *Curr Pharm Des.* 2009;15(20):2359-74. Review

77. Yang BL, Zhang Y, Cao L, et al. Cell adhesion and proliferation mediated through the G1 domain of versican. *J Cell Biochem.* 1999; 72:210–220.

78. Zhang Y, Cao L, Yang BL et al. The G3 domain of versican enhances cell proliferation via epidermal growth factor-like motifs. *J Biol Chem.* 1998; 273:21342–21351.

79. Hirose J, Kawashima H, Yoshie O, et al. Versican interacts with chemokines and modulates cellular responses. *J Biol Chem.* 2001; 276:5228–5234.

- 80.** Ashlin TG, Kwan AP, 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 Oct;64(1):234-42.
- 81.** Apte SS. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motifs: the ADAMTS family. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Jun;36(6):981-5.
- 82.** Zha Y, Chen Y, Xu F. Elevated level of ADAMTS4 in plasma and peripheral monocytes from patients with acute coronary syndrome. *Clin Res Cardiol*. 2010 Dec;99(12):781-6.
- 83.** Zha Y, Chen Y, Xu F et al. ADAMTS4 level in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndromes. *Biomed Pharmacother*. 2010 Mar;64(3):160-4.
- 84.** Sandy JD, Westling J, Kenagy RD Versican V1 proteolysis in human aorta in vivo occurs at the Glu441-Ala442 bond, a site that is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4. *J Biol Chem*. 2001 Apr 20;276(16):13372-8.
- 85.** Wågsäter D, Björk H, Zhu C. ADAMTS-4 and -8 are inflammatory regulated enzymes expressed in macrophage-rich area of human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*, Volume 196, Issue 2, February 2008, Pages 514–522

- 86.** Jonsson-Rylander AC, Nilsson T, Fritsche-Danielson R et al. Role of ADAMTS-1 in atherosclerosis: remodelling of carotid artery, immunohistochemistry, and proteolysis of versican. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:180–5
- 87.** Ashlin TG, Kwan AP, 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 Oct;64(1):234-42.
- 88.** Salter RC, Arnaoutakis K, Michael DR et al. The expression of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4 in human macrophages is inhibited by the anti-atherogenic cytokine transforming growth factor- β and requires Smads, p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011 May;43(5):805-11
- 89.** Khan R, Agrotis A, Bobik A. Understanding the role of transforming growth factor-beta1 in intimal thickening after vascular injury. *Cardiovasc Res*. 2007 May 1;74(2):223-34.
- 90.** Ghosh J, Murphy MO, Turner N. Et al. The role of transforming growth factor beta1 in the vascular system. *Cardiovasc Pathol*. 2005 Jan-Feb;14(1):28-36.

- 91.** Singh NN, Ramji DP The role of transforming growth factor-beta in atherosclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006 Dec;17(6):487-99.
- 92.** Grainger DJ Epub 2003 Dec 29. Transforming growth factor beta and atherosclerosis: so far, so good for the protective cytokine hypothesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Mar;24(3):399-404
- 93.** Ozaki I, Hamajima H, Matsushashi S, Mizuta T. Regulation of TGF- β 1-Induced Pro-Apoptotic Signaling by Growth Factor Receptors and Extracellular Matrix Receptor Integrins in the Liver. *Front Physiol.* 2011 Oct 24;2:78
- 94.** Grainger DJ, Mosedale DE, Metcalfe JC et al. Dietary fat and reduced levels of TGFbeta1 act synergistically to promote activation of the vascular endothelium and formation of lipid lesions. *J Cell Sci.* 2000 Jul;113 (Pt 13):2355-61
- 95.** Kulkarni AB, Huh CG, Becker D et al. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Jan 15;90(2):770-4.
- 96.** Gamble JR, Khew-Goodall Y, Vadas MA Transforming growth factor-beta inhibits E-selectin expression on human endothelial cells. *J Immunol.* 1993 May 15;150(10):4494-503.

97. Argmann CA, Van Den Diepstraten CH, Sawyez CG. Transforming growth factor-beta1 inhibits macrophage cholesteryl ester accumulation induced by native and oxidized VLDL remnants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001 Dec;21(12):2011-8.

98. McCaffrey TA, Consigli S, Du B, Falcone DJ et al. Decreased type II/type I TGF-beta receptor ratio in cells derived from human atherosclerotic lesions. Conversion from an antiproliferative to profibrotic response to TGF-beta1. *J Clin Invest.* 1995 Dec;96(6):2667-75.

99. Lu Y, Boer JM, Barsova RM, Favorova O, Goel A, Müller M, Feskens EJ; PROCARDIS CARDIoGRAM Consortium. TGFB1 genetic polymorphisms and coronary heart disease risk: a meta-analysis. *BMC Med Genet.* 2012 May 18;13:39.

100. Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, et al. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type β 1. *Hum Mol Genet.* 1999;8:93–97.

101. Shah et al. Allelic diversity in the TGFB1 regulatory region: characterization of novel functional single nucleotide polymorphisms. *Hum Genet* (2006) 119: 61–74

102. Crobu et al. Role of TGF- β 1 haplotypes in the occurrence of myocardial infarction in young Italian patients. *BMC Medical Genetics* 2008, 9: 13

103. Yokota et al. Association of a T29-->C polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with genetic susceptibility to myocardial infarction in Japanese. *Circulation*. 2000 Jun 20;101(24):2783-7.

104. Deng HB, Jiang CQ, Tomlinson B et al. A polymorphism in transforming growth factor- β 1 is associated with carotid plaques and increased carotid intima-media thickness in older Chinese men: the Guangzhou Biobank Cohort Study-Cardiovascular Disease Subcohort. *Atherosclerosis*. 2011 Feb;214(2):391-6

105. Najar et al. Association of Transforming Growth Factor-_1 Gene Polymorphisms With Genetic Susceptibility to Acute Myocardial Infarction. *Am J Med Sci* 2011;342(5):365–370

106. Winkelmann BR, Hager J. Genetic variation in coronary heart disease and myocardial infarction: methodological overview and clinical evidence. *Pharmacogenomics*. 2000 Feb;1(1):73-94.

107. Koch W, Hoppmann P, Mueller JC et al. Association of transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms with myocardial infarction in patients with angiographically proven coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 May;26(5):1114-9

108. Grainger DJ, Kemp PR, Metcalfe JC et al. The serum concentration of active transforming growth factor-beta is severely depressed in advanced atherosclerosis. *Nat Med*. 1995 Jan;1(1):74-9.

109. Chen L, Yang L, Zha Y, Cui L. Association of serum a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif 4 levels with the presence and severity of coronary artery disease. *Coron Artery Dis.* 2011 Dec;22(8):570-6.