

**ANALYSIS OF THE SERUM LEVELS OF THE CYTOKINES TNF- $\alpha$ , RANKL, OPG AND IL-6 IN PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME AND INFLAMMATORY JOINT DISEASE**

**Velichka Popova**

Medical University Plovdiv, Faculty of Medicine, Department of Rheumatology UMHAL "Kaspella"  
drvpopova@gmail.com

**Zaprin Vazhev**

Medical University Plovdiv, Faculty of Medicine, Department of Cardiac and Vascular Surgery, UMHAT  
"St. Georgi" vazhev@dir.bg

**Mariela Geneva-Popova**

Medical University Plovdiv, Medical Faculty, Department of Rheumatology, UMHAT "St. George"  
"genevapopova@yahoo.com

**Abstract:** Chronic IJD associated with an increased incidence of cardiovascular disease, subclinical atherosclerosis, earlier manifestations of endothelial dysfunction leading to pathological remodeling of the arterial wall. This contributes to an earlier manifestation of atherosclerosis and its complications with manifestations of ACS. Activated proinflammatory cells synthesize different cytokines that take part in local and systemic inflammation. 95 patients with ACS were studied in the following groups: patients with ACS and BSC (N = 46), of whom 23 were RA-8 (35%) were women and 15 (65%) were men and 23 were PsA - 1 (4.4%) is a woman and 22 (95.6%) are men, there are no patients with ankylosing spondylitis group with ACS and no BPH - (N = 49), of which 11 (22.5%) are women 38 (77.5%) are men; control group - healthy - (N = 40), of which 30 (75%) men and 10 (25%) women. All patients were tested for serum levels at 24 and 48 hours of the following cytokines: TNF- $\alpha$ , RANKL, OPG, IL-6. From the comparative analysis, serum levels of TNF- $\alpha$  (48 h) and IL-6 (48 h) were found to have a predominant prognostic significance and mediated the risk of BPH in patients with ACS. They distinguish the group with the CBA and the BCA from the missing one.

**Keywords:** acute coronary syndrome (ACS), inflammatory joint disease (IJD), RA-rheumatoid arthritis, PsA- psoriatic arthritis, tumor necrosis factor alpha-TNF- $\alpha$ , interleukins- IL

**АНАЛИЗ НА СЕРУМНИТЕ НИВА НА ЦИТОКИНИТЕ TNF-A, RANKL, OPG И IL-6 ПРИ ПАЦИЕНТИ С ОСТЪР КОРОНАРЕН СИНДРОМ И ВЪЗПАЛИТЕЛНО СТАВНО ЗАБОЛЯВАНЕ. ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА СПЕЦИФИЧЕН ЦИТОКИН ЗА ПАЦИЕНТИТЕ С ВЪЗПАЛИТЕЛНО СТАВНО ЗАБОЛЯВАНЕ**

**Величка Попова**

Медицински университет Пловдив, Медицински факултет, Клиника по ревматология  
УМБАЛ "Каспела" drvpopova@gmail.com

**Заприн Въжев**

Медицински университет Пловдив, Медицински факултет, Катедра по сърдечна и съдова  
хирургия, УМБАЛ "Св. Георги" vazhev@dir.bg

**Мариела Генева-Попова**

Медицински университет Пловдив, Медицински факултет, Клиника по ревматология, УМБАЛ "Св.  
Георги" genevapopova@yahoo.com

**Абстракт:** Хроничните ВСЗ се асоциират с повишена честота от сърдечно - съдови заболявания , субклинична атеросклероза, по- ранни прояви на ендотелна дисфункция, водещи до патологично ремоделиране на артериалната стена. Това допринася за по- ранна проява на атеросклерозата и нейните

усложнения с прояви на ОКС. Активираният проинфламаторни клетки синтезират различни цитокини, които вземат участие в локалното и системно възпаление. Изследвани бяха 95 пациенти с ОКС, разпределени в следните групи: пациенти с ОКС и ВСЗ (N=46), от които 23 са с RA- 8 (35%) са жени и 15 (65%) са мъже и 23 са с PsA – 1 (4.4%) е жена и 22 (95.6%) са мъже, липсваха пациенти с анкилозиращ спондилит, група с ОКС и без ВСЗ – (N=49), от които 11 (22.5%) са жени, 38 (77.5%) са мъже; контролна група- здрави – (N=40), от които 30 (75%) мъже и 10 (25%) жени. На всички пациенти се изследваха серумните нива на 24 и 48 – ми час на следните цитокини: TNF- $\alpha$ , RANKL, OPG, IL-6. От проведения сравнителен анализ се установи, че серумните нива на TNF- $\alpha$  (48 h) и IL-6 (48 h) имат водещо прогностично значение и опосредстват риска от наличие на ВСЗ при пациентите с ОКС. Те отграничават групата с ОКС и ВСЗ от тази с липсващо такова.

**Ключови думи:** остър коронарен синдром (ОКС), възпалително ставно заболяване (ВСЗ), RA-ревматоиден артрит, PsA- псориазичен артрит, тумор некрозис фактор алфа- TNF- $\alpha$ , интерлевкени- IL-6

3) медицински науки и здравеопазване

## 1. ВЪВЕДЕНИЕ

Изучаването на ролята на биомаркерите сред циркулиращите проинфламаторни цитокини като опосредстващи различни причини за ранна смърт е в основата на множество проучвания [1]. Според Ridker и сътр. повишаването на нивата на IL-6 и TNF- $\alpha$  може до два пъти да увеличи риска от ОМИ. Участието на TNF- $\alpha$  в патогенезата на ОКС и високите му нива при активно възпалително ставно заболяване, би могло да обясни по-високият СС риск при тези болни. Епидемиологичните и физиологичните модели доказват директното му участие в съдовата патофизиология. [2] Публикуваните данни съобщават за повишен с 50% риск от сърдечно-съдова смъртност при пациентите с RA, спрямо останалата популация. Освен това са налице нови данни за участието не само на IL-6 при ВСЗ, но и на останалите цитокини като TNF- $\alpha$  и IL-1, които имат про-възпалителна активност, особено изразена при пациентите с PsA. [3] Те въздействат на ендотела, като по този начин подпомагат окислителния стрес, струпването на левкоцити в атеросклеротичните плаки и изявата на ендотелна дисфункция. IL-6 притежава прокоагулантна активност, подпомага адхезията на моноцитите и левкоцитите към съдовия ендотел, индуцира ендотелна дисфункция. [4] Разрушаването или дестабилизирането на плаката е резултат от взаимодействията между компонентите на плаката и провъзпалителните медиатори, цитокини и хемокини, частично регулирани от азотния оксид (NO). [5, 6, 7]

## ЦЕЛ

Да се изследват серумните нива на TNF- $\alpha$ , RANKL, OPG, RANKL/OPG и IL-6 при пациенти с ОКС и ВСЗ, за да се установят цитокини, характерни за пациенти с двете заболявания.

## 2. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Изследването включва 135 участника, разпределени в три групи както следва: 1) пациенти с ОКС и ВСЗ (N=46), със средна възраст 68.74 години ( $\pm 7$ ); 2) пациенти с ОКС без ВСЗ (N=49), със средна възраст 70.39 ( $\pm 7.40$ ); 3) контролна група здрави (N=40), със средна възраст 66.93 ( $\pm 5.93$ ). Половото разпределение на пациентите беше сходно, като във всички групи преобладаваха мъжете.

Всички участници бяха запознати с изследването и попълниха информирано съгласие в съответствие с изискванията на декларацията Хелзинки (1964г). Серумните нива на цитокините бяха измерени с лабораторни китове както следва: TNF  $\alpha$  чрез TNF  $\alpha$  Tumor Necrosis Factor ELISA Kit (TNF) на фирмата RayBiotech, минимално ниво на детекция 20 pg/ml, максимално -10 ng/mL; RANKL с TNFSF11 ELISA Kit (Tumor Necrosis Factor (Ligand) Superfamily, Member 11) на фирмата Elabscience, минимална сензитивност 1.875 ng/ml, ниво на детекция 3.125-200 ng/ml, максимално ниво-200 ng/ml; OPG (Osteoprotegerin) с Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 19 (TNFRSF19) ELISA Kit- Human Sandwich ELISA, на фирмата RayBiotech, ниво на детекция 50 pg/ml – 400 ng/ml; IL-6 с китове за изследване са Human IL 6 ELISA Kit, на фирма AVIVA Systems BIOLOGY, чувствителност на теста 2 pg/ml. Съотношението RANKL/OPG беше изчислено въз основа на стойностите на двете величини. Кръвните изследвания са направени на 24 и 48 час съгласно протокола на фирмата производител. Серумите на болните след центрофугиране са съхранени в хладилна камера при t -20 -80°C до обработването им без повторни цикли на замразяване и размразяване.

**Статистически методи:** Статистическият анализ на данните беше извършен със софтуерната програма SPSS, версия 24. Заради несиметричност на серумните нива на цитокините извън допустимите граници (-/+1), използвахме непараметричния тест на Крушкел-Уолис (Kruskal-Wallis). При наличие на статистическа значимост, бяха проведени *постхок* анализи по двойки чрез теста на Ман-Уитни Ю (Mann-Whitney U). За определянето на цитокини, характеризиращи за пациентите с ВСЗ и ОКС беше проведена бинарна логистична регресия. Статистическа значимост се отчете при ниво на допустима грешка от 5% ( $\alpha = 0.05$ ).

### 3. РЕЗУЛТАТИ: СЪПОСТАВКА НА ГРУПИТЕ ОТНОСНО СЕРУМНИТЕ НИВА НА ЦИТОКИНИТЕ

**TNF- $\alpha$  на 24-ия и 48-ия час:** Между трите групи се отчете значима разлика в нивата на TNF- $\alpha$  на 24-ия час ( $p=0.032$ ) и 48-ия час ( $p<0.001$ ). Постхок анализът по двойки показва, че между групата с ВСЗ и тази без ВСЗ не съществува значима разлика в нивото на TNF- $\alpha$  на 24 h,  $p=0.690$ . Средните стойности на TNF- $\alpha$  при двете групи са много сходни: 9.77 ng/ml при групата с ВСЗ и 9.48 ng/ml при групата без ВСЗ. Освен това и двете групи показаха значително по-високи стойности от контролната група (5.07 ng/ml),  $p<0.001$ . Най-високо ниво на TNF- $\alpha$  48-часа беше отчетено в групата с ВСЗ (9.98 ng/ml), със значителна разлика от тази без ВСЗ (5.01 ng/ml),  $p<0.001$ , както и от контролната група (5.24 ng/ml),  $p<0.001$ . Между групата без ВСЗ и контролната група не се установи значима разлика в нивото на TNF- $\alpha$  48 часа,  $p=0.947$ . Най-висока е стойността при групата с ВСЗ. При групата без ВСЗ и контролната стойностите са сходни, без значима разлика.

**RANKL на 24-ия и 48-ия час:** Резултатите от теста на Крушкел-Уолис показват, че между групите съществува значима разлика в нивото на RANKL до 24-ия час ( $p=0.019$ ) и на 48-ия час ( $p=0.004$ ). Чрез теста на Ман-Уитни Ю се установи, че групата с ВСЗ има значително по-високо серумно ниво на RANKL на 24-ия час (121.33 ng/ml) в сравнение с групата без ВСЗ (51.67 ng/ml),  $p=0.030$ , както и от контролната група (36.94 ng/ml),  $p=0.014$ .

Същият резултат се повтаря по отношение нивото на RANKL на 48-ия час. При групата с ВСЗ се отчете значително по-високо серумно ниво на RANKL (89.21 ng/ml) от групата без ВСЗ (36.95 ng/ml),  $p=0.001$ , както и от контролната група (36.84 ng/ml),  $p=0.001$ . Нивото на RANKL на 24-ия час е най-високо в групата с ВСЗ. При групата без ВСЗ и контролната стойностите са сходни, без значима разлика.

**OPG на 24-ия и 48-ия час:** Най-висока стойност беше отчетена в групата с ВСЗ (207.71 ng/ml) и разликата между тази група и групата без ВСЗ (99.30 ng/ml) е значителна,  $p<0.001$ . Втората значителна разлика е между ВСЗ групата и контролната (111.91 ng/ml),  $p=0.020$ . Между групата без ВСЗ и контролната не се установи значима разлика,  $p=0.829$ . Серумното ниво на OPG на 48-ия час беше с най-висока стойност в групата с ВСЗ (143.36 ng/ml) със значима разлика от групата без ВСЗ (69.38 ng/ml),  $p=0.002$ . От друга страна, между ВСЗ групата и контролната (109.53 ng/ml) не се отчете значима разлика,  $p=0.513$ . Най-ниска стойност беше отчетена при групата без ВСЗ (69.38 ng/ml), но разликата с контролната група не достигна статистическа значимост,  $p=0.060$ . Серумното ниво на OPG на 24 часа.

**RANKL/OPG на 24-ия и 48-ия час:** Установихме междугрупови различия от висока статистическа значимост,  $p<0.001$ . Постхок анализът показва, че и при двете групи пациенти с ОКС с и без ВСЗ, стойностите са значително по-високи от тези на контролната група здрави. В групата с ВСЗ стойността на съотношението RANKL/OPG беше 0.85, а при контролната 0.33 със значима разлика,  $p<0.001$ . Групата без ВСЗ показва RANKL/OPG стойност (0.90) значително по-висока от тази на контролната група,  $p<0.001$ . Между двете групи пациенти не се установи значителна разлика,  $p=0.782$ . Резултатите от груповите съпоставки относно RANKL/OPG на 48 часа са сходни на описаните по-горе. Стойността при групата с ВСЗ (0.63) беше значително по-висока от контролната група (0.34),  $p<0.001$ . Групата без ВСЗ показва значително по-висока стойност (0.60) от контролната (0.34),  $p<0.001$ . Между двете групи, с и без ВСЗ, разликата не беше значима,  $p=0.376$ .

**IL-6 на 24-ия и 48-ия час:** Установихме междугрупови различия и при двете измервания (IL-6 на 24-ия и 48-ия час),  $p<0.001$ . Постхок анализът показва, че на 24-ия час, между групата с ВСЗ (82.85 pg/ml) и без ВСЗ (80.90 pg/ml) не съществува значима разлика,  $p=0.975$ . И двете групи имаха статистически по-висока стойност от контролната група (14.72 pg/ml),  $p<0.001$ . На 48-ия час нивата в групата без ВСЗ (25.16) беше значително по-ниска от тази на групата с ВСЗ (95.51,  $p<0.001$ ) и близка до тази на контролната група (14.37 ng/ml), без значителна разлика,  $p=0.885$ . От друга страна, стойността на IL-6 при групата с ВСЗ беше значително по-висока от тази на контролната група,  $p < 0.001$ .

**Индентифициране на проинфламаторни цитокини, които имат определяща роля за пациенти с ВСЗ и ОКС спрямо пациенти с ОКС без ВСЗ.** Първоначално включихме всичките шест цитокина, които в предходния анализ показаха статистически значима разлика между ОКС пациенти с ВСЗ и без ВСЗ както следва: TNF- $\alpha$  48 h, RANKL 24 h, RANKL 48 h OPG 24 h, OPG 48 h и IL-6 48 h. Чрез проведената бинарна логистична регресия при четири от шестте цитокина, упоменати по-горе, нямат статистически значима прогностична роля в регресионния модел: серумните нива на RANKL на 24 h ( $p=0.534$ ); RANKL на 48 h ( $p=0.203$ ); OPG на 24 h ( $p=0.414$ ) и OPG на 48 h ( $p=0.081$ ). Редуцираният регресионен анализ е направен на двете измерения със значима прогностична роля- TNF- $\alpha$  48 h и IL-6 48 h. Редуцираният регресионен модел е статистически значим,  $\chi^2=90.469$ ,  $p<0.001$ . Според коефициентът на Nagelkerkes, 85.1% от вариацията в променливата величина (с и без ВСЗ) може да бъде обяснена с регресионния модел. На базата на стойностите на TNF- $\alpha$  48 ч и IL-6 48 ч, 88.4% от пациентите са правилно класифицирани в групата с ВСЗ, 93.5% са правилно класифицирани в групата без ВСЗ, с 91% общо правилно класифицирани пациенти. Стойностите на коефициентите са статистически значими и за двете независими величини: TNF- $\alpha$  48 h,  $B = 0.588$ ,  $p=0.001$ ; IL-6 48 h,  $B=0.099$ ,  $p=0.002$ . Стойността на константата е също статистически значима ( $B=-7.814$ ,  $p<0.001$ ). Увеличението на стойността на TNF- $\alpha$  (48h) с една единица се увеличава с 1.80 пъти вероятността пациентът да има придружаващо ВСЗ, а увеличение на IL-6 (48h) с една единица увеличава тази вероятност 1.10 пъти. Тези коефициенти на риска имат роля на амплифициращи фактори.

### 3. ОБСЪЖДАНЕ

Серумните нива на цитокините като предиктори на остри сърдечно-съдови прояви и сърдечна недостатъчност при пациенти с ОКС все още остават недобре проучени в световен мащаб. Липсват международни стандартни величини на повечето нови биомаркери. Проблемите и неяснотите се усложняват още повече от връзката и прогнозната стойност на съдовите маркери при комбинация с ВСЗ, вида на провежданото лечение, коморбидните състояния от една страна, а от друга страна наличието на различни възрастови и етнически кохорти. На базата на резултатите от нашето проучване, се очертават следните тенденции:

- 1) Шест цитокина имат значимо по-високи стойности при ОКС пациентите с ВСЗ в сравнение с ОКС пациенти без ВСЗ, включително: TNF- $\alpha$  48 ч, RANKL 24 ч, RANKL 48 ч, OPG 24 ч, OPG 48 ч и IL-6 48 ч.
- 2) От тях TNF- $\alpha$  (48 ч) и IL-6 (48 ч) показват статистически значима прогностична способност за определяне наличието на ВСЗ при ОКС пациенти. Стойности на TNF- $\alpha$  (48 ю) по-високи от 10 и стойности на IL-6 (48 ч) около 70 или по-високи се асоциират с наличието на ВСЗ при ОКС пациенти. Акуратността на прогнозата е 91%.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Серумните нива на TNF- $\alpha$  (48 h) и IL-6 (48 h) могат да бъдат използвани като предиктори за наличието на ВСЗ при пациенти с ОКС.

### ЛИТЕРАТУРА

- [1] Kaplan, J. (2010), Cardiovascular complications of rheumatoid arthritis: assessment, prevention and treatment, *Rheumatic Disease Clinics of North America*, Vol. 36, No 2, pp. 405 – 426.
- [2] Ridker, P., Rifai, N., Pfeffer, M., Sacks, F., Lepage, S., and Braunwald, E. (2000). Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction, *Circulation*, Vol. 10, pp. 2149 – 53.
- [3] Rus H., Vlaicu R., and Niculescu F. (1996). Interleukin-6 and interleukin-8 protein and gene expression in human arterial atherosclerotic wall, *Atherosclerosis*, Vol. 127, pp. 263 –271.
- [4] Ivanova M., Manolova I., Ganeva M., Gancheva R, Stoilov R., and Stanilova S. (2016), Elevated serum levels of Th17-related cytokines in patients with ankylosing spondylitis, *Journal of the Balkan Tribological Association*, Vol. 22, No 3, pp. 2244 – 2257.
- [5] Kruithof, K. (2008). Regulation of plasminogen activator inhibitor type 1 gene expression by inflammatory mediators and statins, *Thrombosis and Haemostasis*, Vol. 100, pp. 969 – 975.
- [6] Lee, D. (2011). Vascular calcification: Inducers and inhibitors, *Materials Science and Engineering*, Vol. 176, No 15, pp. 1133 – 114.
- [7]. Lerman, A. and Zeiher A. (2005). Endothelial function: cardiac events, *Circulation*, Vol. 111, pp. 363–368.