

T.C  
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI

TOLL-LİKE RESEPTÖR 4 POLİMORFİZMİ İLE KAROTİS ARTER  
ATEROSKLEROZU ARASI İLİŞKİNİN SAPTANMASI

Dr. Neslihan ÇÖMEZ  
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI:  
Prof. Dr. Suat Topaktaş

SİVAS  
2007

T.C

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

NÖROLOJİ ANABİLİM DALI

TOLL-LİKE RESEPTÖR 4 POLİMORFİZMİ İLE KAROTİS ARTER  
ATEROSKLEROZU ARASI İLİŞKİNİN SAPTANMASI

Dr. Neslihan ÇÖMEZ

UZMANLIK TEZİ

SİVAS

2007

C.Ü. TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

İş bu çalışma, jürimiz tarafından Nöroloji Anabilim Dalı'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ OLARAK kabul edilmiştir.

BAŞKAN:

ÜYE :

ÜYE :

ÜYE :

ÜYE :

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

.../ ../2006

DEKAN

Prof. Dr. Okay BULUT

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fakülte Kurulu'nun 12.03.2002 tarih ve 2002/1 sayılı kararı ve Cumhuriyet Üniversitesi Rektörlüğü'nün 28.03.2002 tarih ve 463 sayılı yazısı ile uygun görülen 'Tez Yazım Klavuzu'na göre hazırlanmıştır.

## TEŞEKKÜR.

Eğitimim süresince engin bilgi, beceri ve deneyimlerinden yararlandığım, hiçbir zaman destek ve imkanlarını esirgemeyen, iyi bir hekim olmanın ancak iyi ve erdemli bir insan olmakla mümkün olabileceğini kendisini tanıdıkça öğrendiğim Anabilim Dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Suat Topaktaş'a, Anabilim Dalımızın değerli öğretim üyelerinden uzmanlık yaşantım boyunca daima örnek alacağım Sayın Prof. Dr. Kamil TOPALKARA'ya ve Sayın Doç. Dr. Ertuğrul BOLAYIR'a uzmanlık eğitimim boyunca yaptıkları akademik katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca, hasta grubunun toplanması sırasındaki yardımlarından dolayı anabilim dalımızda görevli tüm çalışma arkadaşlarıma, örneklerin değerlendirilmesindeki yardımlarından dolayı Sayın Prof. Dr.Öztürk ÖZDEMİR'e, çalışma verilerinin istatistiği konusundaki yardımlarından dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Ziyet ÇINAR'a teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi uzmanlık eğitimim boyunca ve bu çalışmam sırasında da beni sürekli manevi açıdan destekleyen eşim Fatih ÇÖMEZ'e ve oğlum Ufuk ÇÖMEZ'e sonsuz teşekkür ederim.

## **ÖZET:**

**AMAC:** Aterogenezde genetik yatkınlık ve immünitinin çok önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. Toll-like reseptörler hem eksojen hem endojen ligandlarla immüniteyi başlatan bir reseptör ailesidir. Ateroskleroz üzerine yapılan bazı çalışmalarda TLR 4 polimorfizminin inflamasyonu ve buna bağlı olarak aterogenezi azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada seçilmiş populasyonda TLR4 polimorfizminin yaygınlığını ve karotis aterosklerozu ile bu polimorfizm arası ilişkiyi saptamayı amaçladık

**Yöntem:** Cumhuriyet Üniversitesi Nöroloji Radyoloji ve Halk Sağlığı klinikleri tarafından yürütülen ‘Sivas Populasyonunda Karotis Aterosklerozu Sıklığı ve Beslenme İle İlişkisi’ isimli çalışma içerisinde 50 aterosklerozu olan ve 45 olmayan birey rastgele örneklem yoluyla seçildi. Tüm vakalardan EDTA’lı tüpe alınan kan örneklerinden DNA izole edildi. TLR 4 gen bölgesi PCR yöntemi ile çoğaltıldı. Elde edilen PCR ürünlerinde TLR 4 Asp299Gly polimorfizmini belirlemek için restriction fragment length polimorfizm yöntemi kullanıldı.

**Sonuçlar:** RFLP ile yaptığımız bu çalışmamızda TLR 4 için çoğaltığımız gen bölgesinde hem karotis aterosklerozu olan hem olmayan grupta TLR 4 Asp299Gly polimorfizmine rastlamadık.

**Yorum:** TLR 4 polimorfizminin ülkemizdeki sıklığına dair sağlıklı veriler bulunmamaktadır. Biz daha önce Hollanda’da yapılmış bir çalışmada belirtilen % 6 polimorfizm sıklığını esas alarak çalışma grubumuzu belirledik. Çalışma grubumuzun azlığı bir gen polimorfizmi araştırmasında en büyük sorunu oluşturmaktadır. TLR 4 Asp299Gly polimorfizmi üzerine yapılan çalışmalar daha çok enfeksiyonlara yatkınlık artışı gösterir şeklindedir. TLR 4 immünite ile ilişkili fakat aterogenezdaki inflamasyonla ilişkisiz olabilir. Aterogenezde immünitinin rolü ve genetik yatkınlık ile immünitinin ilişkisi daha geniş populasyonlarda araştırılması gereken bir konudur

**Anahtar Kelimeler:** Ateroskleroz, İmmünite, Toll-like reseptör 4

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No:T-305).

## **Summary**

**Objective:** It is known that genetic predisposition and immunity has an important role in atherogenesis. Toll-like receptors are receptors that start immunity with both exogenous and endogenous ligands. Some experimental studies indicate that TLR 4 polymorphism might decrease inflammation and atherogenesis. In this study we aimed to investigate TLR 4 polymorphism incidences and the relation between TLR 4 polymorphism in a selected population.

**Methods:** 50 subjects having carotid atherosclerosis and 45 subjects without atherosclerosis are selected from the study called 'Carotid atherosclerosis incidences in Sivas population and its relation with style of digestion' that is validated by Neurology, Radiology, and common population health clinics of Cumhuriyet University. DNA is isolated from the blood samples of all subjects. Then TLR 4 gene region is amplified by PCR. Restriction fragment length polymorphism technique is used to determine TLR 4 Asp299Gly polymorphism from PCR products.

**Results:** In this study that we used RFLP, we did not find out TLR 4 polymorphism in both carotid atherosclerosis and control group.

**Conclusion:** There is not definite data about the incidences of TLR 4 polymorphism in our country. We determined our study group using 6% polymorphism incidences from a recent study from Netherlands. The most important bias is the size of our study population. In most of the previous studies it is shown that TLR 4 Asp299Gly polymorphism increases the susceptibility to infections. There may be a relation between TLR and immunity but not inflammation in atherogenesis. The role of immunity and genetic predisposition must be investigated in large size population studies.

**Key Words:** Atherosclerosis, Toll like receptor 4, Immunity

This study was supported by Cumhuriyet University Scientific research projects committee. (Grant no:T-305)

## **SİMGELER VE KISALTMALAR**

TLR: Toll-like reseptör

PRR: Patojen tanıyıcı reseptör (Pathogen Recognition Receptor)

LPS: Lipopolisakkarit

RSV: Respiratuar Sinsityal Virüs

HSP: Isı şok proteini (heatshock protein)

ASP: Aspartat

GLY: Glisin

M-CSF: Makrofaj koloni stimule edici faktör

NF-κB: Nükleer faktör kapa B

NO: Nitrik oksit

TIR: Toll/IL-1 reseptör homoloğu

IRAK: IL-1 reseptörü ile ilişkili kinaz (IL-1 receptor associated kinase)

TRAP: TIR içeren adaptör protein (TIR domain containing adaptör protein)

IL-1: İnterlökin-1

RFLP: Restriction Fragment Length Polimorphism

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

DNA: Deoksiribonükleik asit

CCA: Common carotid arter

ICA: Internal carotid arter

ECA: External carotid arter



## **TABLolar**

Tablo 1: Karotis ateroskleroðu olan ve olmayan grupların yaşı ve cinsiyet açısından karşılaştırılması

Tablo 2: Her iki gruptaki bireylerin kan parametrelerinin karşılaştırılması

Tablo3: Sigara içimi açısından her iki grubun karşılaştırılması

Tablo 4: Ateroskleroz risk faktörlerinden hipertansiyon ve diabet açısından grupların karşılaştırılması .

## **ŞEKİLLER:**

Şekil 1: Endotel hasarı ve disfonksiyonu

Şekil 2: MyD88 bağımlı yol

Şekil 3:TLR 4 ligandları ve fonksiyonel önemi

Şekil 4:Hinf-1 enzimi ile inkübe edilmiş DNA örneklerinin jel elektroforez görüntüsü .

Şekil 5:1-7 arası hastalardan elde edilen PCR ürünlerinin Hinf-1 enzimi ile inkübasyonundan sonraki jel elektroforez görüntüsü.

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR

ÖZET

İNGİLİZCE ÖZET

SİMGE VE KISALTMALAR

TABLolar

ŞEKİLLER

GİRİŞ VE AMAÇ

GENEL BİLGİLER

1. KAROTİS ATEROSKLEROZU

1.1. Tanımı

1.2. Tarihçe

1.3. Türkiye’de Aterosklaeroza Bağlı Olayların İnsidans ve Prevelansı

1.4. Aterosklerozun Genetiği

1.5. Aterosklerozun İmmunopatogenezi

2. TOLL-LİKE RESEPTÖRLER

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu

3.2. Klinik Muayne ve Anamnez Alımı

3.3. Aterosklerozun Değerlendirilmesi

3.4. POLİMORFİZM ANALİZİ

3.4.1. DNA İzolasyonu

3.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

3.4.3. Agaroz Jel Elektroföresi 1

3.4.4. RFLP (Restriction Fragment Length Polimorfizm)

3.4.5. Agaroz Jel Elektroforezi 2

3.4.6. İstatiksel Analiz

BULGULAR

TARTIŞMA

SONUÇLAR

KAYNAKLAR

## GİRİŞ VE AMAÇ

Ateroskleroz endüstrileşmiş toplumlarda en sık rastlanan ve en fazla sakatlanma ve ölüme neden olan bir hastalıktır(1).Ateroskleroz yağlı çizgilenme ile başlar sonra fibröz plağa geçiş olur. Plağın kendisi büyüyerek damarı tıkayabileceği gibi rüptüre olarak terminal trombus yapabilir(2). Oluşan inme yüksek mortalite ve morbiditesinden dolayı medikal ekonomik ve sosyal sorunlar oluşturur. Bu risk faktörlerinin giderilmesi önemlidir. Ülkemiz için sağlıklı veriler olmaması ve ilimizde bu konuda yapılmış bir çalışma olmamasına rağmen Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi nöroloji kliniğine yatan iskemik inme olgu sayısına bakarak (yılda ortalama 300 yeni olgu) ilimizde iskemik inme oranının yüksek olduğunu düşünebiliriz.

Toll-like reseptörler (TLR), birçok patojene karşı doğal immün cevabın oluşmasını sağlayan bir grup transmembran 1 proteinidir(3). Aynı zamanda adaptif immün cevabın da aktive olmasını sağlayarak konak immünesinde çok önemli bir role sahiptirler. İmmün sistem doğal ve adaptif olarak ayrılan iki kısımda incelenen bir savunma sistemidir. Bu iki sistem birbiriyle çok hassas bir denge içerisinde ve yardımlaşma ile çalışarak konağı patojenlere karşı korumaktadır. Doğal immünite bir patojenle karşılaşınca ilk cevabı doğumdan itibaren oluşturabilen ve konağın kendisine ait olan ve olmayan antijenik yapıyı tanıma kapasitesine sahip bir savunma sistemidir. Doğal immün sistem patojenlerde ortak olan bir dizi moleküler yapıyı tanıyabilmekte ve böylece konağa ait olan ve böylece konağa ait olan ve olmayanı belirleyerek savunma yapabilmektedir. Doğal immün sistem hücreleri üzerinde bu molekülleri tanıyan reseptörlere Pathogen Recognition Receptor (PRR) adı verilmektedir.Bu reseptörler endositik, sekrete edilen ve sinyal ileten olarak 3 gruba ayrılır.Sinyal ileten reseptör grubunu TLR ailesi oluşturmaktadır (4). Günümüzde 10 tane TLR tanımlanmıştır.İlk tanımlanan TLR-1 olmasına rağmen fonksiyonu ilk belirlenen TLR 4 dür.Her bir TLR'nin ligand spesifitesi farklıdır.TLR 4 daha çok endotelial hücreler, monosit, nötrofil, ve dentritik hücrelerde exprese olur. TLR4 kromozom 9q32-33 lokalizasyonunda bulunur.TLR 4 için exojen ligandlar LPS, RSV endojen ligandlar hsp60, hsp70 ,doymuş ve doymamış yağ asitleri hiyaluronik asit sürfaktan protein A dır.

Uzun zamandır aterogeneze inflamasyonun etkisi düşünülmektedir. Fakat son zamanlarda yeterli deliller elde edilmeye başlandı. TLR 4 için ligand çeşitleri olan hsp 60, hsp 70, ve fibrinojenin aterosklerosisi indüklediği bilinmektedir. Ek olarak TLR 4 sağlam damar duvarı ile karşılaştırıldığında aterosklerotik plaklarda daha fazla bulunmakta ve ekspresyonu oksidize LDL ile artmaktadır(5). Bu veriler aterogenezin patogenezindeki inflamatuvar stimulus için TLR 4'ün major bir reseptör olabileceğini gösterir. TLR 4'ün damar duvarında inflamasyona sebep olan sinyalleri düzenlediği düşünülürse daha az yanıtı TLR4'ün aterogeneze sorumlu inflamasyonu azaltacağı hipotezi kurulabilir. Son zamanlarda TLR4 Asp299gly polimorfizminin lipopolisakkaritlere cevap azlığına neden olduğu bazı araştırmacılarca gösterilmiştir, bu da enfeksiyonlara yatkınlığı arttırmaktadır(6).

Kiehl ve arkadaşları tarafından sunulan diğer bir çalışmada ise TLR 4 polimorfizmi ile aterogeneze riskinin azalması arasında bir bağlantı gösterildi(7). Yapılan diğer birkaç çalışmada ise aynı ilişki koroner ateroskleroz için gösterilmiştir(29). Asp299gly polimorfizmini incelemek aterogeneze immünitinin rolünü belirleme açısından önemli bir fırsattır.

Şu ana kadarki bilgilerimiz ışığında TLR 4 Asp299gly polimorfizmi ile karotis aterosklerozu arası ilişki henüz net değildir. Bu nedenle karotis aterosklerozu olan ve olmayan gruplar arasında bu polimorfizmi araştıran toplum bazlı bir çalışma planladık.



## **GENEL BİLGİLER**

### **KAROTİS ATEROSKLEROZU:**

#### **1.1. Tanımı**

Arter duvarlarında sertleşme anlamına gelen arterioskleroz başlığı altında morfolojik olarak farklı arter ve arteriyol değişiklikleri yer alır. Bu değişikliklerin hepsinde arter duvarında elastikliğin kaybı ve kalınlaşma görülür. Bu farklı morfolojilerden biri de aterosklerozdur. Ateroskleroz büyük ve orta büyüklükteki arterlerde intimal kalınlaşma ve lipid depolanması ile karakterize bir değişikliktir. Hastalığın multisistemik bir doğası vardır. Anatomik olarak belli bir yerde neden geliştiğine ait açıkça bilgi olmamakla beraber, tümünde patolojik süreçler birbirine çok benzerdir. Aterosklerotik bir hastada ilk myokard, serebral veya periferik damar hastalığına ait bulgudan sonra, aynı sistemde veya başka bir damarsal sistemde bir olayın gelişme ihtimali yüksektir(8).

Karotis aterosklerozu a.karotis internada aterom plağı oluşmasıyla tanımlanan bir tablodur. Semptomatik veya asemptomatik olabilir. Bulguları aynı taraftaki göze ait amorozis fugax veya karşı beden yarısına ait GİA'lar veya iskemik inme ile karakterizedir. (1).

#### **1.2. Tarihçe**

Eski Yunanca'da 'karotis', derin uyku, koma, asfiksi gibi anlamlarda kullanılırdı. Bu karotis ve fonksiyonları ile ilgili bilgilerin çok eskilere gittiğini göstermektedir. Rekonstrüktif karotis cerrahisi yakın zaman öncesinde başlamış olmasına karşın, karotis hastalığı ile ilgili bilinenler 200 yıl öncesine kadar gitmektedir. Hunterian Museum of the Royal Collage of Surgeons'ta ülsere bir karotis arter plağı spesimeni sergilenmektedir. Aynı müzede gene John Hunter tarafından diseke edilmiş bir karotis arter anevrizması da sergilenmektedir. 1800'de Sir Gilbert Blane 64 yaşında bir kadında geçici iskemik atağı ve geçici körlüğü tarif etmiştir. 1905'de Chiari ilk kez karotis içi trombüsü göstermiştir. Takip eden 400 otopside karotis içinde trombüsü 7 spesimende görmüştür. Bunlardan 4

tanesi serebral embolizm nedeniyle ölmüş insanlardır. Egas Moniz 1927'de serebral anjiyoyu tarif etmiş ve 537 anjiyoda 4 trombüs görüntülemiştir. Karotise bağlı serebral embolizm ilk kez 1963'te Julian tarafından mekanizma olarak aydınlatılmıştır.1979'da Imparato plak içi kanamayı tarif etmiştir.İlk endarterektomi 1953'te De Bakey tarafından gerçekleştirilmiştir.1974'de G.I. Thomas'ın duplex scan yöntemini kullanmaya başlaması ile karotis ateroskerozu kolaylıkla teşhis edilen ve bugün yaygın olarak kolayca tedavi edilen bir hastalık haline gelmiştir.(1)

### **1.3. Türkiye'de Ateroskleroza Bağlı Olayların İnsidans ve Prevalansı:**

Ülkemizde epidemiyolojik verilere göre aterosklerotik kalp hastalığı prevalansı %3.8'dir (erkeklerde %4.1, kadınlarda %3.5 dir.)Koroner kalp hastalığından ölüm oranı erkeklerde 8.7/1000, kadınlarda ise 6.3/1000 kişi/yıldır(9). Aterosklerotik inme prevalansı yaşla birlikte artar. Örneğin , inmeli hastaların %75'i 65 yaş üzerindedir. Batı ülkelerinde inme prevalansı 8/1000, Japonya 'da 20 /1000'dir. Ülkemizde sağlıklı veriler olmamakla birlikte, inme insidansı için yapılan çalışmalarda 17.6/1000/yıl gibi bir oran bulunmuştur(1). İnme alt tipleri arasında aterosklerozun oranı değişik oranlarda olmakla birlikte, Ege İnme veri tabanında , iskemik inme tüm inmelerin %77'sini oluşturmaktadır,bunun da %37'si ateroskleroza bağlı inmedir(1).Ülkemizde ve dünyada karotis aterosklerozunun prevalans veya insidansına ait herhangi sağlıklı bir veri bulunmamaktadır.Fakat karotis aterosklerozu ile inme riskinin artışına dair bir çok çalışma vardır.ACAS (Asymptomatik Carotid Aterosclerosis Study) çalışmasında %50 darlık derecesi altı ve %50 üzeri lezyonlarda %0.7-1'e karşın %1.7-4.8 gibi nerdeyse 4 kat fazla inme riski oranı saptanmıştır.(11). NASCET yapılan en önemli ve kapsamlı çalışmadır. Bu çalışmada %70 üzeri darlıklarda yıllık %13 gibi bir inme riski bildirilmiştir(12).

### **1.4. Aterosklerozun Genetiği**

Bugünkü bilgilerimize göre aterosklerotik damar hastalığı tipik bir çevre –gen etkileşimidir. Çevresel risk faktörleri günümüzde açıkça tanımlanmış, genetik risk faktörleri ise yeni yeni aydınlatılmaya başlanmıştır. Genetik risk faktörleri hem ateroskleroza yatkınlık sağlamakta hem de çevresel faktörlere olan yanıtı



belirlenmektedir. Prematür aterosklerotik damar hastalığının kalıtsal kökenli olduğu gösterilmiştir. Bu kalıtım kısmen klasik risk faktörlerini düzenleyen genlerdeki mutasyonlarla açıklanabilir. Ancak bazı kişilerde hiçbir klasik ya da yeni koroner risk faktörü olmaksızın kalıtsal bir eğilim olabilmektedir.

Aterosklerotik damar hastalığı genetiği ile ilgili günümüzde bilinen genetik değişiklikleri birkaç grup halinde inceleyebiliriz.(1)

1.Klasik risk faktörlerini etkileyen genetik değişiklikler :

- a.Lipoprotein metabolizması
- b.Hipertansiyon
- c.Diabetes mellitus ve insülin rezistansı

2.Yeni risk faktörlerini etkileyen genetik değişiklikler:

- a.Homosistein
- b.Koagülasyon ve trombozu etkileyen genler

3.Damar duvarı ve inflamatuvar yanıtı etkileyen genler

### **1.5.Aterosklerozun İmmünopatogenezi**

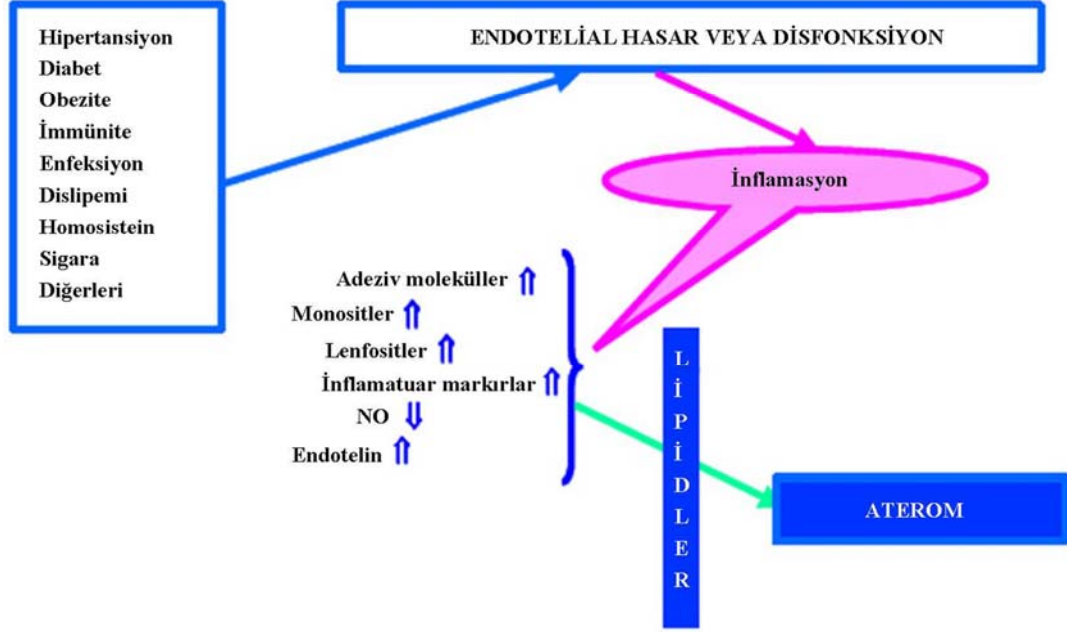
Endotel disfonksiyonunun, aterosklerotik hastalık prosesinin en erken klinik belirtilerinden biri olduğu bilinmektedir.Endotel hasarı; plazma proteinlerine karşı geçirgenliğin artması, NO biyoyararlılığının azalması, kandaki lökositlerin aşırı yapışkanlığı ve yerel pro- ve anti- trombotik faktörler, büyüme stimulatör ve inhibitörleri ve vasoaktif maddelerin fonksiyonel dengesizliğini kapsayan, yerel, akut ve kronik değişikliklere neden olabilir.Okside LDL'nin endotel disfonksiyonuna neden olma ve aterosklerozu başlatmada önemli ve erken bir rolü vardır. LDL ilk olarak hafif biçimde okside olup mmLDL'e (minimal ölçüde okside olmuş=minimally modified LDL) dönüştüğü subendotelyal boşlukta birikir.Bu mmLDL yerel damar hücrelerini, monositleri arter duvarının bir yanından öbür yanına göç etmeye, bir araya toplanmaya teşvik eden kemokinleri üretmek üzere

uyarır. Monositler bir kez intimaya girince olgunlaşarak ,fagositoz yeteneğine sahip makrofajlara dönüşür ve etkinleşerek büyüme faktörleri ve stokinleri salgırlar. Aterosklerotik lezyonlarda monosit ve makrofajların etkinleşme çoğalma ve yaşamlarını sürdürmelerine bir büyüme faktörü olan makrofaj-koloni stimule edici faktör aracılık eder (M-CSF). M-CSF monositleri etkinleştirir, onların büyüme başkalaşım ve yaşamlarını sürdürmelerine aracılık eder. Kemoatraktan özelliği de vardır. Ortaya çıkışı kısmen, bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör kappa B'nin (NFκB) aktivasyonu yoluyla indüklenir.

İntimada toplanan monosit ve makrofajlar LDL'nin peroksidasyonunun daha da ilerlemesini sağlar. Tümüyle okside olan LDL (oxLDL) makrofajlar üzerindeki avcı(scavenger) reseptörlerce tanınır, hücre içine alınır ve onları köpük hücrelerine dönüştürür. Arter intimasında köpük hücrelerinin oluşmasıyla aterom fibröz bir plağa dönüşmeye başlar. Düz kas hücrelerinin mediadan intimaya göç etmeleri ve çoğalmalarına, damar duvarı hücreleri veya infiltre olan lökositlerin ürettiği trombosit kökenli büyüme faktörü aracılık eder. Negatif kontroller ise düz kas hücre çoğalmasını inhibe eder. Örneğin, transforme edici büyüme faktörü-β çoğalmayı yavaşlattığı halde ekstrasellüler matriks üretimini uyarır. Birbirine karşıt uyarıcı ve inhibe edici güçler arasında var olan bir denge olgun bir aterosklerotik plağın gelişmesini belirler(1).

Aterosklerozda temel mekanizmaların işlemlerini kolaylaştıran bazı hazırlayıcı faktörler vardır. Bunlardan hipertansiyon, biyomekanik değişmelere ve lökosit adezyonunun artmasına, diabet proteinlerin enzimatik olmayan glikolizasyonu ile endotel disfonksiyonu ve lipid peroksidasyon ürünlerinin artmasına yol açarak etkili olur. Hiperkolesterolemi, LDL düzeylerini artırarak, sigara, lökositlerin endotele yapışmalarını arttırarak, artmış homosistein düzeyleri de endotele toksik proteolitik mekanizma ile etkilerini gösterir(13). Enfeksiyonlardan özellikle klamidya pnomonia enfeksiyonu endotel disfonksiyonuna yol açarak etkili olur(14). Sistemik lupus eritematozis, antifosfolipid sendromu, romatoid artrit ve ve vaskülit gibi otoimmün hastalıklarında AS progresyonunu hızlandırdığı saptanmıştır. Bu da plak oluşumunda inflamatuvar ve immün mekanizmaların rol aldığı görüşünü desteklemektedir. Tüm bu

etkenlerle gelişen endotel hasarı lipidlerin ve inflamatuvar hücrelerin (monositler ve T lenfositler) arter duvarına girmesini sağlayan ilk basamaktır.

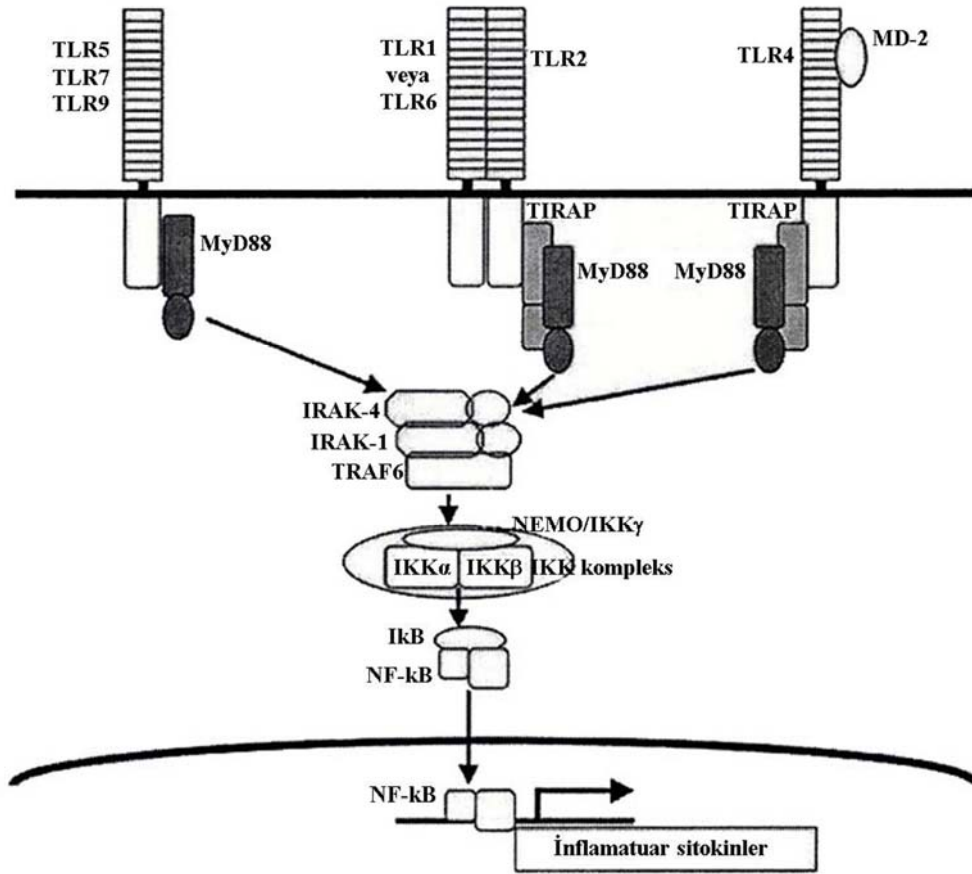


**Şekil 1: Endotel hasarı ve disfonksiyonu (32)**

Ateroskleroz multifaktoriyel bir süreçtir. Aterosklerotik hastalık süreci, birçok değişik özelliğin olduğu bir immün yanıtı içermektedir. Önce makrofaj ve diğer hücrelerin aktive olmasını içeren doğal immün yanıt oluşur. Bu, inflamatuvar mediatörlerin açığa çıkışına ve etkilenen arter duvarında inflamatuvar yanıtın oluşmasına yol açar. Bundan sonra aterosklerotik dokunun bazı spesifik molekülleri ‘yabancı’ olarak tanınınca adaptif immünite oluşur. Spesifik T hücreleri proliferasyon olarak sitokinleri oluşturur ve yabancı moleküller üzerindeki epitoplara bağlayabilecek antikorlar sentezlenir (1).

Doğal immünite, spesifik adaptif mekanizmalar devreye girmeden ortaya çıkan immün savunmanın ilk safhasını oluşturmaktadır. Doğal immüntenin oluşmasında önemli olan anahtar hücreler makrofajlar ve naturel killer hücrelerdir. Adaptif immüntenin T ve B hücrelerine benzer şekilde bu hücreler belli bir moleküler hedef ile karşılaştıklarında yanıt oluştururlar fakat spesifik adaptif immüntenin daha azdır. Makrofajlar pattern tanıyıcı reseptörler (PRR) taşımaktadır. Bu reseptörler endositik, sekrete edilen ve sinyal ileten olmak üzere üç gruba ayrılır.

Sinyal ileten reseptör grubunu TLR ailesi oluşturmaktadır.(3)Ligandla bağlandıktan sonra NF- $\kappa$ B (nükleer faktör B) transkripsiyon faktörünü aktive eden intraselüler kinaz kaskadı başlar. İlk önce MyD88 TLR'nin stoplazmik TIR parçası ile birleşir ve IRAK'ı etkiler. IRAK TRAF6'ı aktive eder takiben IKK kompleksinin aktivasyonu gerçekleşir. IKK kompleksi I $\kappa$ B'i fosforile eder bu ise NF- $\kappa$ B'nin nükleer translokasyonu ile sonuçlanır(33). NF- $\kappa$ B aterogenezde rol oynayan çeşitli sitokin ve adezyon moleküllerinin üretimini imdükleyen bir grup genin ekspresyonuna neden olur. Bunlar myeloperoksidaz, nitrik oksit sentetaz, siklooksijenaz, tümör nekroz faktör, interlökin-1, vasküler adezyon molekülü-1 (VCAM-1) ve diğerleridir(15).



Şekil 2: MyD88-bağımlı yol (33)

NF $\kappa$ B inflamatuvar ve oksidatif stres yollarının kesiştiği noktada yer alır.Yeni araştırmalar NF $\kappa$ B'nin dinlenme durumundaki hücrelerde gen ekspresyonunu

düzenleyebildiği mekanizmayı aydınlatmış ve NFκB'nin etkisinin IκB ailesinden bir inhibitöre bağlı olduğu anlaşılmıştır. IκB fosforile olduğu zaman parçalanmakta ve bu parçalanma sonucunda NFκB'nin p65 ve p50 subüniteleri açığa çıkmaktadır. Bu subünitler nükleusa gidip spesifik gen ekspresyonlarına neden olmaktadır

## **2. TOLL-LİKE RESEPTÖRLER:**

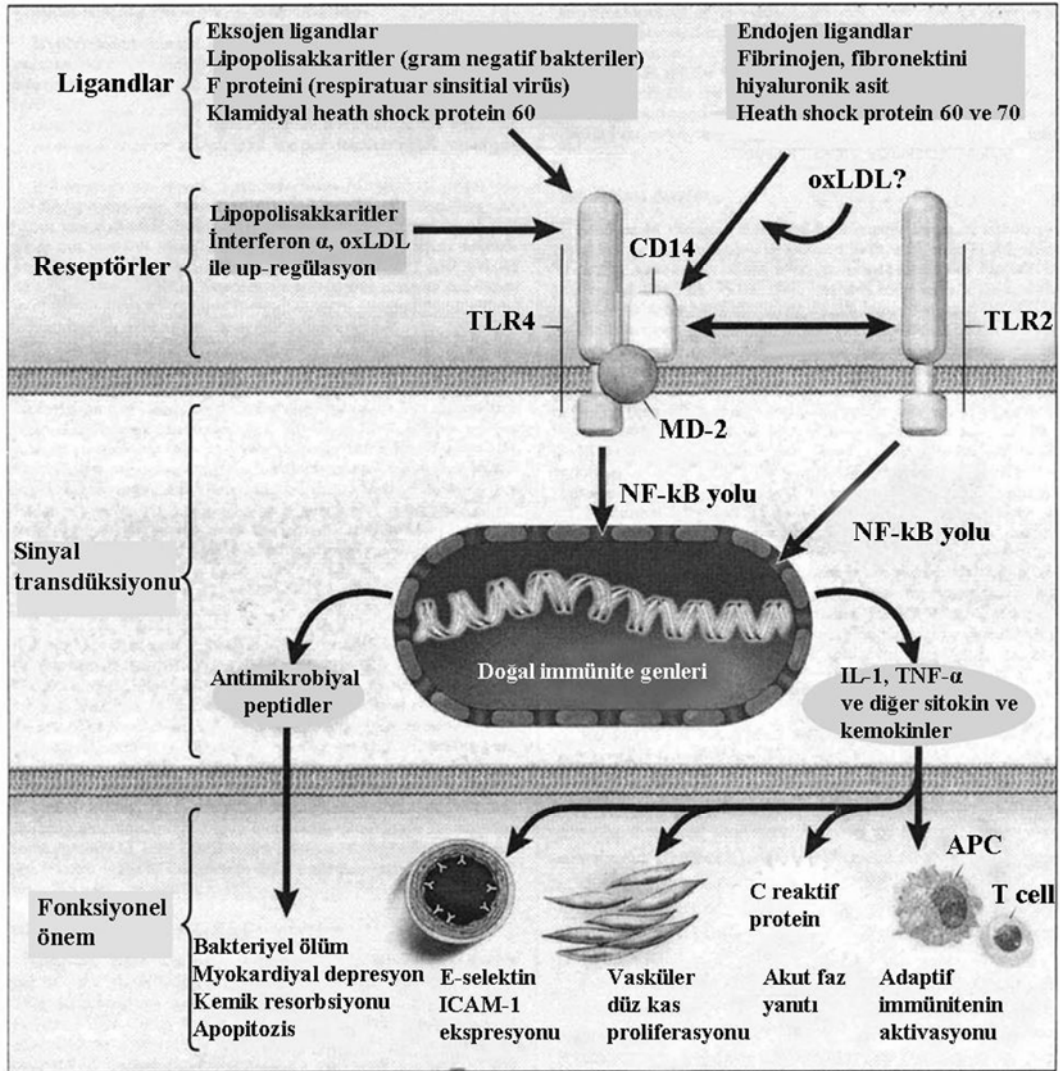
Toll ilk kez bir *Drosophila* geni olarak bulunmuştur. Gen ürünü sinyal transdüksiyon reseptör rolü gösteren bir transmembran proteinidir. *Drosophila*daki tollun rolü daha farklıdır. *Drosophila* embryosundaki dorso-ventral aksisin kuruluşunu ve fungilere doğal immun yanıtı düzenler. Bu proteinin fonksiyonu üzerine ilk çalışmalar ilk olarak bu gelişim sürecindeki rolü üzerine odaklanmıştır. *Drosophila* toll yolu ile memeli IL 1 yolunun benzerliği fark edilerek immünite üzerine çalışmalar başlatılmıştır(16). Organizmanın infeksiyonlarla mücadelesinde hem evrimsel olarak eski hem de oldukça evrensel olan doğal immün sistem , spesifik immünite ile kıyaslandığında patojenleri tanıyan reseptörler açısından daha kısıtlı bir repertuara sahiptir. Adaptif immün sistemin, antijen tanıma kapasitesi çok geniş bir reseptör repertuarıyla spesifiteyi sağlarken, doğal immün sistem patojenlerde ortak olan bir dizi moleküler yapıyı tanıyabilmekte böylece konağa ait olan ve olmayanı belirleyerek savunmayı başlatabilmektedir. Patojenler üzerinde bu evrimsel olarak korunmuş moleküler yapılara 'hastalık etkenlerine eşlik eden moleküler yapılar (PAMP- pathogen associated molecular patterns)' denilmektedir. Doğal immün sistem hücreleri üzerinde bunları tanıyan reseptörlere de Pathogen Recognition Receptor (PRR) adı verilmektedir. Bu reseptörler, endositik, sekrete edilen ve sinyal ileten olmak üzere üç gruba ayrılır. Sinyal ileten reseptör grubunu TLR ailesi oluşturmaktadır(3).

İlk insan toll homoloğu 1997 yılında tanımlanmıştır. İlk tanımlanan TLR-1 olmasına rağmen bu reseptörlerden fonksiyonu ilk belirlenen TLR 4 dür. TLR'ler hem lenfoid hem de nonlenfoid dokularda eksprese olmaktadır. TLR-1 monosit, nötrofil, B hücreleri ve natural killer hücrelerde, TLR-2 monosit, nötrofil ve dentritik hücrelerde, TLR-3 dentritik hücrelerde, TLR-4 ün endotelial hücreler, monosit,

nötrofil ve dentritik hücrelerde, TLR-5'in ise monosit ve dentritik hücrelerde eksprese olduğu gösterilmiştir(17,18).Herbir TLR'nin ligand spesifitesi farklıdır.TLR 4 gram negatif bakteri membranındaki lipopolisakkaritlere karşı bir reseptör olarak bilinmektedir. TLR-4'ün diğer eksojen ligandı RSV (respiratuar sinsityal virüs)'dür. Arbour ve arkadaşları TLR-4 geninde bir nokta mutasyonunun insanlarda lipopolisakkaridlere karşı cevap azlığına sebep olduğunu gösterdiler(19). Bu şekilde daha az yanıtı TLR-4'ün enfeksiyonlara yatkınlığı arttırdığına dair bir çok çalışma bulunmaktadır(20,21,22) .

Sadece ekzojen ligandlar değil endojen ligandlar da TLR-4'ü aktive eder.Bu endojen ligandlar genelde stres ve hücre hasarı sonucu oluşur.Bu endojen ligandların en iyi bilinenleri HSP60, HSP70, doymuş ve doymamış yağ asitleri, hiyalüronik asit, sürfaktan protein A, fibronektin' dir(3). Heatshock protein sentezi selüler stres durumunda dramatik olarak artar. Bir çalışmada TLR 4 genindeki nokta mutasyonu ile HSP60 ile indüklenen makrofaj aktivasyonuna karşı nonfonksiyonel TLR 4 cevabı gösterildi(23).

Aterosklerotik lezyon gelişiminde TLR 4'ün rolüne ait artan sayıda deliller bulunmaktadır.TLR 4 için ligand çeşitleri olan klamidyal lipopolisakkarit , HSP60 ,HSP70 ve fibrinojenin aterosklerosizi indüklediği bilinmektedir.TLR 4 sağlam damar duvarı ile karşılaştırıldığında aterosklerotik plaklarda daha fazla bulunmakta ve ekspresyonu oksidize LDL ile artmaktadır(24). TLR 4 aktivasyonu mononukleer fagositlerden damar duvarında monosit ve T lenfosit yoplanmasını sağlayan kemokinlerin salınımını sağlar(25). TLR 4 aktivasyonu sonucu indüklenen sitokinlerin üretimi vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu ve migrasyonunu etkiler.(26) Ek olarak TLR 4 aktivasyonu MMP-2 ,MMP-9 ve katepsinlerin daha yüksek oranda ekspresyonunu sağlar(27).



Şekil 3: TLR 4 ligandları ve fonksiyonel önemi (7)

Aterosklerozda TLR 4 'ün rolünü inceleyen birçok çalışma bulunmaktadır. Bu konu üzerine yapılan çalışmalarda çoğunlukla TLR 4 nokta mutasyonları ile koroner arter aterosklerozu arası ilişkiyi araştırılmıştır (28,29,30). Karotis aterosklerozu ile TLR 4 polimorfizmi arası ilişkiyi araştıran çalışmalar göreceli daha kısıtlı sayıdadır(31,13). Bu çalışmalarda TLR 4 nokta mutasyonlarının ateroskleroz riskini azaltarak koruyucu rol oynadığı gösterilmiştir. Bu çalışmalar aterosklerozun gelişiminde immünitinin rolünü belirleme açısından önemlidir.

Tüm bu veriler ışığında biz Sivas ilinde karotis aterosklerozu sıklığını araştıran toplum bazlı çalışmadan, rastgele dağılım metodu ile seçilen 50 karotis aterosklerozu olan ve 50 olmayan kişide TLR4 Asp299Gly polimorfizm sıklığını araştırdık.TLR 4'ün damar duvarında inflamasyona sebep olan sinyalleri düzenlediğini düşünerek daha az yanıtlı TLR4' n aterogenezden sorumlu inflamasyonu azaltacağı hipotezini kurduk



## **GEREÇ VE YÖNTEM**

Bu çalışma Şubat 2007 - Ağustos 2007 tarihleri arasında Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji ve Genetik Anabilim dallarında yapılmıştır. Çalışmaya başlamadan önce Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanlığı'ndan 06.12.2005 tarih ve b.30,2.CUM.O.1H.OO. OO/ 2005/06 sayı ile onay alınmıştır.

### **3.1. Çalışma Grubu**

'Sivas il merkezinde karotis arter aterosklerozunun yaygınlığı ' çalışması karotis aterogenezinin epidemiyolojisi ve patogenezi üzerine yapılmış toplum bazlı prospektif bir çalışmadır. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Kliniği tarafından yürütülen bu çalışmada Sivas il merkezinde yaşayan 30 yaş üzeri 500 kişiye karotis doppler USG uygulandı ve ateroskleroz risk faktörleri ve beslenme alışkanlıkları kaydedildi. Populasyon karotis aterosklerozu olan ve olmayan grup olarak ayrıldı. Biz çalışmamız için karotis aterosklerozu olan ve olmayan gruptan rastgele örneklem yöntemi ile 50' şer kişi seçildi. Böylece toplam 100 kişiden alınan kan örneklerinde DNA izolasyonu , PCR takiben RFLP ile TLR4 AspGly299 polimorfizmi araştırıldı.Çalışma öncesi bireyler bilgilendirilerek yazılı onamları alındı.

### **3.2. Klinik Muayene ve Anamnez Alımı**

Çalışmaya alınan hem kontrol grubu hem de ateroskleroz grubu DM , HT ve hiperkolesterolemi açısından değerlendirildi. HT 3 ölçümün ortalaması 140/90 ve üzeri, ve / veya antihipertansif ajan kullanımıyla tanımlandı.Vakalar açlık kan düzeyi 126 üzeri ise diabet olarak kabul edildi.Geçirilmiş koroner arter hastalığı, inme ve periferik arter hastalığı kaydedildi.

### **3.3 Aterosklerozun Değerlendirilmesi**

Çalışmamızda hastanemizin Radyoloji Bölümünde bulunan Toshiba Power Vision 6000 marka USG cihazı ile 49 Hz görüntüleme probu kullanılarak bilateral CCA, ICA ve ECA'yı incelendi. Her 3 damarda plak oluşumunu plakların yapısını , darlık yüzdelerini ve intima media kalınlıklarını kaydedildi. Damar duvarında

aterosklerotik plağı bulunan veya intima media kalınlığı >1.1 olan vakalar ateroskleroz grubuna alındı.

### **3.4. POLİMORFİZM ANALİZİ:**

Çalışmamızda TLR Asp299Gly polimorfizm analizi için RFLP yöntemini tercih edildi. Bu yöntemde 1.basamak olarak periferik kandan DNA izole ettik. Takiben PCR yöntemi ile ilgili gen bölgesi invitro olarak çoğaltıldı. Son basamakta ise çoğaltılan gen bölgesi uygun restriksiyon enzimi ile mumale edilerek RFLP yöntemini kullanıldı.

#### **3.4.1. DNA İzolasyonu:**

Bütün hastalardan genomik DNA izolasyonu periferik kan dokusundan yapıldı. Bunun için Invitex Invisorb Spin Blood DNA İzolasyon Kiti kullanıldı. Yaklaşık 200µl periferik kan dokusunun kullanıldığı teknik sonrasında 30–50 ng /µl ultrapür genomik DNA izole edilmektedir ( $A_{260}:A_{280}$  oranı 1,7- 2 arası). İzolasyon için kullanılan 50 hastalık kit içeriğı aşağıdaki gibidir;

- 1) Proteinaz K, 1ml(10µg/µl)
- 2) Liziz tamponu (Lysis Buffer A), 15ml
- 3) Bağlanma tamponu (Binding Buffer B6), 30ml
- 4) Elüsyon tamponu (Eluotion Buffer D), 15ml
- 5) Yıkama Tamponu I, 30ml (Kullanılmadan önce 30ml %100'lük etil alkol eklenir)
- 6) Yıkama Tamponu II,18ml (Kullanılmadan önce 42ml %100'lük etil alkol eklenir)
- 7) 2.0ml'lik toplama tüpleri, 100 adet
- 8) 1.5ml'lik toplama tüpleri, 50 adet
- 9) Filtreler, 50 adet

Kan Dokusundan DNA İzolasyonu Protokolü:

Çalışmadan önce örnek sayısına yetecek kadar elüsyon tamponu (eluotion buffer D) 56°C'ye ısıtıldı.

Kodlaması yapıldıktan sonra 1,5'luk ependorf tüpe 200µl EDTA'lı kan, 200µl liziz tamponu (lysis buffer A) ve 20µl proteinaz K konuldu. Kapağı kapatılarak tüp 10 sn vortekslendi ve 56°C'de 10dk inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrası tüp ortamına 400µl bağlama tamponu (binding buffer B6) tüpe eklendi, 3-4 kez pipetaj yapıldıktan sonra lizatın tamamı filtrelili toplama tüpüne aktarıldı. Filtre toplama tüpü daha sonra 3dk oda sıcaklığında inkübe edildi ve 12 000rpm'de 2dk santrifüj edildi.

Filtre yeni bir toplama tüpüne aktarıldı, üzerine 500µl yıkama tamponu 1 (wash buffer I) eklendi ve 12000rpm'de 1dk santrifüj edildi. Toplama tüpü tekrar değiştirildi, filtre üzerine 800µl yıkama tamponu 2 (wash buffer II) eklenerek ve 12 000rpm'de 1dk santrifüj edildi. Filtre üçüncü kez olarak 2ml'lik yeni bir toplama tüpüne aktarıldı, 14 000rpm'de 5 dk santrifüj edilerek yıkama tamponlarından gelen alkolden arındırıldı. Alkolden tamamen arındırmak için filtre dördüncü ve son kez yeni 1,5'luk tüpe yerleştirildi ve 3 dk kapağı açık biçimde oda sıcaklığında bekletildi.

Daha sonra filtre membranının tam ortasına 200µl elüsyon tamponu (elution buffer-D) eklendi, 5dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Filtrelili tüp 10.000rpm'de 1 dk santrifüj edildi, filtredeki DNA çözeltisi toplama tüpüne aktarıldı, etiketlendi ve -20°C'de çalışılmak üzere muhafaza edildi.

### **3.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu**

PCR (Polymerase chain reaction) ya da polimeraz zincir reaksiyonu ,moleküler biyolojide uygulanan bir teknik olup, basitçe tüpte nükleik asitlerin tüpte uygun koşullarda çoğaltılması olarak tanımlanabilir. PCR bir çeşit invitro klonlamadır. PCR reaksiyonu DNA'nın iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılmasını (denatürasyon); daha sonra sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanmasını (hibridizasyonu); sonra zincirin uzamasını (polimerizasyonu)ve çift iplikçikli DNA'nın sentezlenmesi ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır. Bu üç adım (denatürasyon / primer bağlanması / DNA sentezi ) bir PCR siklusunu oluşturur. Her adım farklı ısılarda gerçekleştirilir . PCR tekniği tek veya çift iplikçikli DNA'yı RNA'ya hedef olarak kullanabilir. Bu teknikle; bir DNA hedefini 106-1012 arasında çoğaltmak mümkündür.Yöntemin temeli, çoğaltılmak

istenen bölgenin iki ucuna özgü bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı bir çift sentetik oligonükleotid primer (18-20 baz uzunluğunda) kullanılarak ; bu iki primer ile sınırlandırılan genin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır. PCR tekniği çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlamaktadır. PCR teknolojisi için :

1- DNA örneği

2-Çoğaltılacak olan bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen bir çift sentetik primer

3-dNTP'ler (A,T,C,G)

4-Isıya dayanıklı DNA-Polimeraz enzimi

5-Uygun pH ve iyon koşullarını (Mg<sup>2+</sup>) sağlayan tampon karışımı gereklidir.

Toll-like reseptör 4 geninin Asp 299 Gly polimorfizmi için primerler:

F-5'-GATTAGCATACTTAGACTACTACCTCCATG-3'

R-5'-GATCAACTTCTGAAAAAGCATTCCCAC-3'

İlgili bölgelerinin çoklu (multipleks) amplifikasyonu için Fermentas marka PCR Master Mix amplifikasyon kiti kullanıldı. Kit, Taq DNA Polymerase , Mg Cl ve dNTP içermektedir.

PCR anakarışım, her hasta için etiketlenmiş 0.2 ml eppendorf tüp ortamı;

Amplifikasyon karışımı : 15µl

Forward Primer : 1 µl

Reverse Primer : 1µl

Kalıp DNA : 2µl

Distile su :8.5

Toplam hacim : 25 µl şeklinde hazırlandı.

Multipleks PCR koşulları aşağıdaki gibi ayarlandı:

95°C'de.....4 dk (ilk denaturasyon)

95°C'de.....30sn (denaturasyon)

55°C'de.....30sn (bağlanma)

72°C'de.....30sn (uzama)

35 döngüden sonra elde edilen PCR ürünleri strip test tekniğinde değerlendirilmek üzere +4°C'de saklandı.

### 3.4.3. Agaroz Jel Elektroforezi 1

RFLP işleminden önce elde edilen PCR ürünleri (4 µl) %1'lik elektroforezde başarılı amplifikasyonlar açısından değerlendirildi. Başarılı amplifikasyon elde edilen PCR ürünlerinden 2 µl ürün RFLP analizi için kullanıldı.

### 3.4.4.RFLP ( Restriction Fragment Length Polimorphism)

Bir populasyonda mevcut olan genetik çeşitliliğe polimorfizm denir. Bu doğal farklılıklar kuşaktan kuşağa Mendel yasalarına göre aktarılırlar. İnsan genomunda tek baz değişiklikleri çok sıktır. Bazılarına göre bu sıklık her 100 baz çiftinde bir ortaya çıkmaktadır. Bu nükleotid değişikliklerinin büyük çoğunluğu zararsızdır. DNA polimorfizmi, DNA üzerinde hastalığa neden olmayan, suskun nükleotid değişimleri olarak tanımlanır. Eğer bu polimorfizmler, bir restriksiyon enzimi bölgesinin yok olmasına ya da yeniden oluşmasına neden olurlarsa kolaylıkla saptanabilirler. DNA bu enzimlerle kesildiğinde farklı uzunlukta parçalar oluşur ve analizlerde değişik pozisyonlarda görülürler. Bunlara 'Restriction fragment length polimorphism' (RFLP) / 'Kesim enzimi uzunluk polimorfizmleri' denir.

Biz bu yöntem için Hinf-1 restriksiyon enzimini kullandık. İlk olarak enzimimizin aktivasyonunu değerlendirmek için PCR ürünümüzden önce izole ettiğimiz birkaç DNA örneğini Hinf-1 enzimi ile bir gece oda sıcaklığında inkübe ettik. Enzim ile DNA'nın fragmanlara ayrıldığını görerek , enzimimizin aktif olduğuna karar verdik. Bu işlemi takiben PCR ürünümüzü oda sıcaklığında bir gece Hinf-1 enzimi ile inkübe ettik

RFLP Koşulları:

PCR ürünü : 2 µl

Enzim : 2 µl

10 x Reaction Buffer	: 5 µl
100 x BSA	: 0.5 µl
Distile su	: 40.5 µl
Toplam Hacim	: 50 µl şeklinde hazırlandı.

### **3.4.5. Agaroz Jel Elektroforezi 2**

RFLP işleminden sonra elde edilen ürünler (20µl) %2'lik elektroforezde yürütülerek değerlendirildi.

### **3.4.6. İSTATİKSEL ANALİZ**

Çalışmamızın verileri SPSS (Ver:14.0) programına yüklenerek değerlendirildi. Bu değerlendirmede iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi, Khi-kare testi ODDS oranı kullanılmıştır. Verilerimiz tablolarda ortalama ± Standard sapma, denek sayısı ve % şeklinde belirtilip yanılma düzeyi 0.05 olarak alınmıştır.

## BULGULAR

Çalışmaya aldığımız 95 bireyin 50'i karotis ateroskleroza olan, 45'i ise karotis ateroskleroza olmayan bireylerden oluşmaktadır. Karotis ateroskleroza olan grupta bireylerin 26'sı (%52) erkek, 25'i (%48) kadın, ateroskleroz olmayan grupta ise bireylerin 20'si (%44.4) erkek, 25'i (%55.6) kadındır. Yaşlar ateroskleroz grubunda  $60.62 \pm 8.33$  ve ateroskleroz olmayan grupta  $57.53 \pm 8.56$  olarak bulunmuştur. Karotis ateroskleroza olan ve olmayan grup yaş ve cinsiyet açısından karşılaştırıldığında aralarında bir fark yoktu (Tablo 1).

**Tablo 1: Karotis ateroskleroza olan ve olmayan grupların yaş ve cinsiyet açısından karşılaştırılması**

	Yaş	Erkek (%)	Kadın (%)
<b>Karotis ateroskleroz olan (n=50)</b>	60.62±8.33	26 (52)	24 (48)
<b>Karotis ateroskleroza olmayan (n=45)</b>	57.53±8.56	20 (44.4)	25 (55.6)
	t=1.77, p=0.07 p>0.05	p=0.462; p>0.05	

Çalışmaya alınan hem kontrol grubu hem de ateroskleroz grubu DM, HT ve hiperkolesterolemi açısından değerlendirildi. HT, 3 ölçümün ortalaması 140/90 ve üzeri, ve / veya antihipertansif ajan kullanımıyla tanımlandı. Vakalar açlık kan düzeyi 120 üzeri ise diyabet olarak kabul edildi. Geçirilmiş koroner arter hastalığı ve inme kaydedildi.

**Tablo 2:Her iki gruptaki bireylerin kan parametrelerinin karşılaştırılması:**

Değişkenler	Grup1 X± S	Grup 2 X±S	Sonuç
Kolesterol	200.70±53.68	204.40±43.56	t=0.36,p=0.715,p>0.05
HDL	37.54±9.79	42.15±12.86	t=1.97,p=0.055,p>0.005
LDL	133.30±45.54	132.77±34.28	t=0.06,p=0.950,p>0.05
Trigliserid	129.14±62.18	120.46±63.50	t= 0.67,p=0.53,p>0.05

Her iki gruptaki bireylerin kolesterol HDL,LDL ve TG değerleri karşılaştırıldığında gruplar arası farklılık önemsizdir.

**Tablo 3:Sigara içimi açısından grupların karşılaştırılması**

Gruplar	Sigara var	Sigara yok
Ateroskleroz grubu	S 20 % 40	S 30 % 60
Ateroskleroz olmayan grup	S 7 % 15,6	S 38 % 84.4
Toplam	S 27 % 28.4	S 68 % 71.6

Sigara içme yönünden gruplar karşılaştırıldığında  $X=6.95,p=0.008,p<0.05$  ve koroner arter hastalığı için  $X=9.38,p=0.002,p<0.005$  idi. Her iki gruptaki bireyler sigara içme açısından karşılaştırıldığında farklılık önemli bulunmuştur. ( $p<0.005$ )Sigara içenlerin karotis ateroskleroz olma oddsu içmeyenlere göre 3.62 kez daha fazladır.



**Tablo 4: Ateroskleroz risk faktörlerinden hipertansiyon ve diabet açısından grupların karşılaştırılması .**

Gruplar	Diabet var	Diabet yok	Hipertansiyon var	Hipertansiyon yok
Ateroskleroz grubu	S 12 % 24	S 38 % 76	S 27 % 54	S 23 % 46
Ateroskleroz olmayan grup	S 6 % 13.3	S 39 % 86.7	S 22 % 48.9	S 23 % 51.1
Toplam	S 18 % 18.9	S 77 % 81.1	S 49 % 51.6	S 46 %48.4

DM ve HT açısından gruplar karşılaştırıldığında DM için  $X=1.75, p=0.185, p>0.05$  ; HT için  $X =0.24, p=0.619, p>0.05$  idi. Gruplar için farklılıklar önemsiz bulunmuştur.

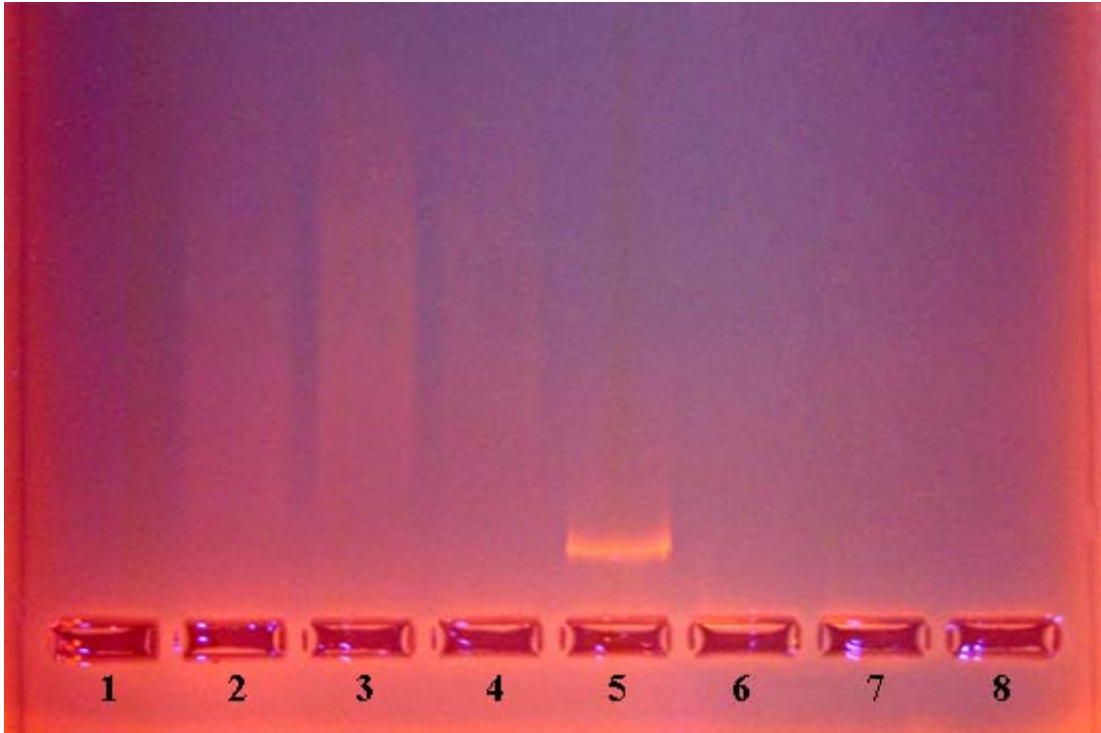
Çalışmamızda TLR Asp299Gly polimorfizm analizi için RFLP yöntemini tercih ettik. Bu yöntemde 1. basamak olarak periferik kandan DNA izole ettik. Takiben PCR yöntemi ile ilgili gen bölgesi invitro olarak çoğalttık. Son basamakta ise çoğaltılan gen bölgesini uygun restriksiyon enzimi ile mumale ederek RFLP yöntemini kullandık.

DNA polimorfizmi, DNA üzerinde hastalığa neden olmayan, suskun nükleotid değişimleri olarak tanımlanır. Eğer bu polimorfizmler, bir restriksiyon enzimi bölgesinin yok olmasına ya da yeniden oluşmasına neden olurlarsa kolaylıkla saptanabilirler. DNA bu enzimlerle kesildiğinde farklı uzunlukta parçalar oluşur ve analizlerde değişik pozisyonlarda görülürler. Bunlara 'Restriction fragment length polymorphism' (RFLP) / 'Kesim enzimi uzunluk polimorfizmleri' denir.

Biz bu yöntem için Hinf-1 restriksiyon enzimini kullandık. İlk olarak enzimimizin aktivasyonunu değerlendirmek için PCR ürünümüzden önce izole

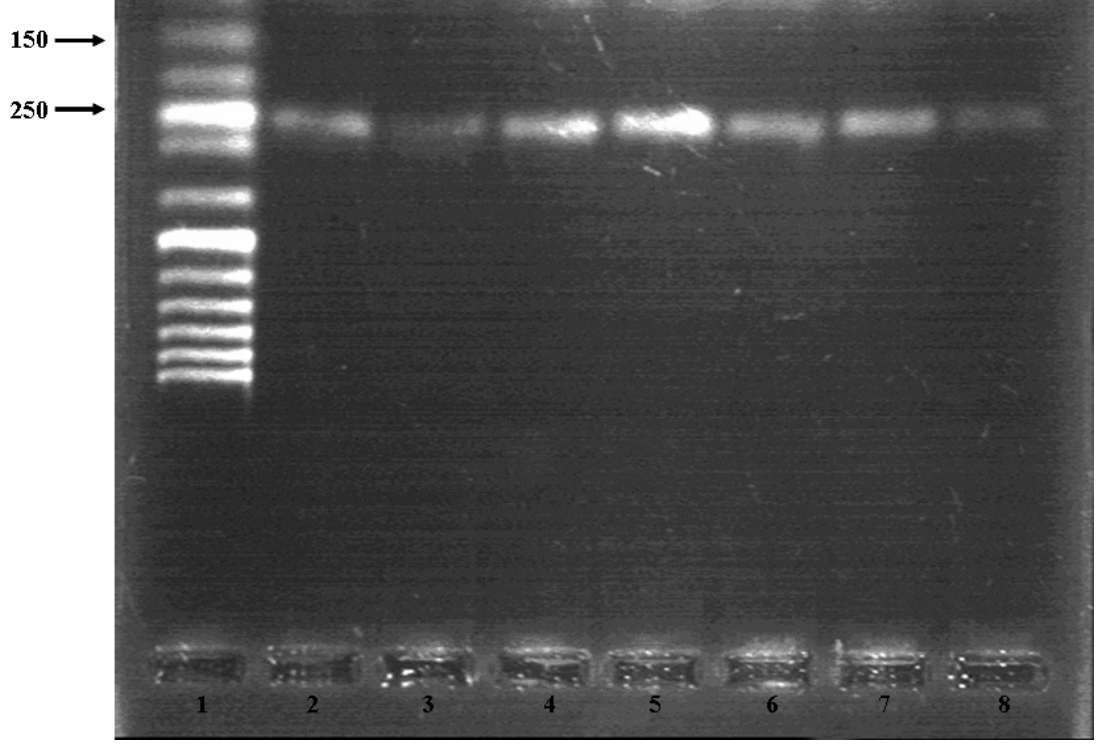
ettiğimiz birkaç DNA örneğini Hinf-1 enzimi ile bir gece oda sıcaklığında inkübe ettik. Enzim ile DNA'nın fragmanlara ayrıldığını görerek , enzimimizin aktif olduğuna karar verdik.

**Şekil 1:**Hinf-1 enzimi ile inkübe edilmiş DNA örneklerinin jel elektroforez görüntüsü .( 5. kuyucuğa enzim konmamış diğerlerine konmuştur.)



Hinf 1 enzimine uygun primerler yardımıyla çoğalttığımız PCR ürünlerimizi enzimimizle bir gece oda sıcaklığında inkübe ettik RFLP işleminden sonra elde ettiğimiz ürünleri %2'lik elektroforezde yürüterek değerlendirdik. İncelememiz sonucunda PCR ürünlerimizde herhangi bir kesimin olmadığını gördük. Sonuç olarak hem karotis ateroskerozu olan hem de olmayan grupta TLR 4 Asp299Gly polimorfizminin bulunmadığını gördük.

**Şekil 2:** 1-7 arası hastalardan elde edilen PCR ürünlerinin Hinf-1 enzimi ile inkübasyonundan sonraki jel elektroforez görüntüsü. (250 bp büyüklüğündeki PCR ürünlerinin hiçbirinde Hinf-1 enzimi ile kesim görülmemiştir.)



## TARTIŞMA

Daha önce yapılan yayınlar ağırlıklı olarak TLR 4 Asp299Gly polimorfizminin enfeksiyon hastalıklarına yatkınlığı arttırdığını göstermiştir (34,35,36,37,38,39,40). TLR'ler bazı belirli mikroorganizma gruplarındaki ortak moleküler yapıları tanırlar. Bunlar patojenle ilişkili moleküler patternler olarak adlandırılırlar. Patojenitede etkili olan toksinler TLR'ler tarafından tanınmazlar. Mikroorganizma ile ilişkili moleküler paternler (MAMP) konakçıda bulunmazlar ve non-self olarak davranırlar. Gram(-) bakteri hücre duvarı yapısında bulunan LPS, TLR ligandı olarak ilk tanımlanmış yapıdır(33). TLR 4 kalmıdy pnomonia ve helikobakter pylori gibi sık görülen gram (-) bakteriler için bir transmembran lipopolisakkarit reseptörüdür. Bu iki patojenin aterogenez üzerine etkileri bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Epidemiyolojik olarak MI ve koroner arter hastalığının c.pnomoniaya karşı yüksek antikor içeren kişilerde sağlıklı kontrollere göre daha yüksek olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır(41,42). Ek olarak bir çalışmada c.pnomoniae ateromatöz plaklardan elde edilmiştir (43).

Toll-like receptor 4 Asp299Gly polimorfizminin enfeksiyonlara yatkınlığı arttırdığı hemen hemen yapılan tüm çalışmalarda ortak görüştür. Toll-like reseptör 4 Asp299Gly polimorfizmi ile aterogenez arası ilişkiyi gösteren çalışmalar göreceli daha az sayıdadır ve çoğu koroner ateroskleroz ve MI üzerine yapılmış çalışmalardır. TLR 4 kardiyomyosit, makrofaj, solunum epitel, endotel ve düz kas hücreleri ve küçük oranlarda diğer dokularda bulunur, ve aterogenezde rolleri olduğu bilinen heatshockprotein 60, heatshockprotein 70, fibrinojen, fibronektin ve oksidize LDL gibi endojen ligandlar için de bir reseptördür.(13)

TLR 4 Asp299Gly polimorfizmi ile karotis aterosklerozu arası ilişkiyi araştırmak, aterogenezde immünitinin rolünü belirleme açısından önemli bir fırsattır. Çalışmamızda, incelediğimiz karotis aterosklerozu olan (26 erkek, 24 kadın) ve olmayan (20 erkek, 25 kadın) gruplarda cinsiyet açısından anlamlı fark yoktu( $p=0.462$ ). Karotis aterosklerozu olan ( $60.6\pm 8.3$ ) ve olmayan ( $57.53\pm 8.56$ ) grupların yaş ortalamaları arasında anlamlı fark yoktu( $p=0.07$ ). Her iki gruptaki

bireylerin total kolesterol HDL, LDL ve TG değerleri karşılaştırıldığında gruplar arası farklılık önemsizdi.

Ateroskleroz olan grupta sigara içme oranı anlamlı derecede daha fazla bulundu( $p=0.008$ ).Her iki gruptaki bireyler koroner hastalık yönünden karşılaştırıldığında farklılık önemli bulundu( $p=0.002$ ). Karotis aterosklerozu olan grupta koroner kalp hastalığı daha fazla bulundu.

PCR ürünlerimiz Hinf-1 enzimi ile inkübe edildikten sonra herhangi bir kesimin olmadığı görüldü. Sonuç olarak hem karotis aterosklerozu olan hem de olmayan grupta TLR 4 Asp299Gly polimorfizmi saptanmadı.

Bu verilere göre bizim verilerimiz karotis aterosklerozu ile TLR 4 Asp299Gly polimorfizminin ilişkili olmadığını göstermektedir. Aterogenezle TLR 4 polimorfizminin ilişkisini araştıran çalışmalar aterogenezini arttırdığı azalttığı veya etkilemediğini gösterir şekilde birbiri ile çelişkilidir. Christine De Staerke ve arkadaşları Amerika'da yürüttükleri büyük ölçekli bir çalışmada TLR 4 polimorfizmi ile MI arası ilişkinin anlamlı olmadığını gösterdiler(44). Bunun benzeri sonuçlar John W. ve arkadaşları tarafından İngiltere'de ve Werner Koch ve arkadaşları tarafından Almanya'da yayınlandı(45,46). Kristina Edfelt ve arkadaşları ise İsveç'de, daha az yanıtı TLR 4 variantlarının artmış MI riski ile ilişkili olduğunu gösterdiler (29). Bu İsveç çalışmasında SHEEP çalışmasına katılan bireylerin genotiplenmesi ile erkek MI hastalarında erkek kontrollere göre artmış Asp299Gly polimorfizmi gösterildi.TLR 4 gen değişikliklerinin tek başına MI riskini göstermese de TLR 4 Asp299Gly polimorfizminin MI riskini arttıran bir doğal immün cevap değişikliğine neden olduğunu savunuldu. Bu durum TLR 4 Asp299Gly allelinin kardiyovasküler olaylar için yüksek risk nedeni olduğunu ifade eden Balistreri ve arkadaşlarının çalışmasında da vurgulanmıştır.(47)

İlginç olarak aynı TLR 4 polimorfizmi CCA ve ICA'nın intima media kalınlığı ölçülerek yapılan bir çalışmada da ateroskleozla ilişkili bulundu. Fakat bu çalışmada Asp299Gly allel taşıyıcılığı daha düşük oranda inflamatuvar marker seviyesi ve daha az karotid intima media kalınlığı ile ilişkiliydi(13).Yine Matthew J. Kolek ve arkadaşlarının Amerika'dan yayınladıkları bir çalışmada, TLR 4Asp299Gly

polimorfizmi azalmış anjiyografik koroner arter hastalığı ve azalmış vasküler inflamasyonla ilişkiliydi(48).REGRESS çalışmasından gelen bir yayında da statin tedavisi alan Asp299Gly polimorfizmi olan hastaların olmayanlara göre daha düşük kardiyovasküler risk taşıdığı gösterildi(49).

TLR 4 Asp299Gly polimorfizmi ile karotis aterosklerozu arası ilişkiyi araştıran Kieschel ve arkadaşları anlamlı derecede azalmış intima media kalınlığı ile polimorfizmin ilişkili olduğunu savundular(13).Ayrıca çalışmalarında bu gen polimorfizmi dolaşımdaki düşük seviyedeki inflamatuvar marker seviyesi ve enfeksiyonlara artmış yatkınlık ile ilişkiliydi.Sonuçlarını şu şekilde açıkladılar:TLR 4Asp299Gly polimorfizmi ile hipofonksiyonlu bir reseptör ortaya çıkmakta, inflamasyon azalmakta buna bağlı olarak enfeksiyonlara yatkınlık artmaktaydı.Takiben uzun dönemde intravasküler inflamatuvar yanıt azalarak aterogeneze koruyuculuğu sağlamaktaydı.TLR4 ile karotis arter arası ilişkiyi araştıran başka iki çalışmada ise ilişki anlamsız bulundu ve Kieschel'in çalışmasını desteklemedi(50,51).

Daha önce yapılan bir fare çalışmasında LPS ile vasküler duvardaki TLR 4 aktivasyonunda neointima gelişiminin tetiklendiği ve bu etkinin TLR 4 defektli farelerde bozulduğu gösterildi(52).Benzer şekilde iliak arterde balon hasarı yapılan tavşanlarda yapılan bir çalışmada LPS ile indüklenen neointimal formasyonun TLR 4 kompleksinin engellenmesi ile bozulduğu gösterildi(53).Birlikte ele alındığında bu sonuçlar TLR ile elde edilen doğal immün yanıtın sadece enfeksiyonlara karşı savunmanın değil arter duvarındaki bir sürecin de bir parçası olduğunu göstermektedir.

TLR 4 Asp299Gly polimorfizmi ile MI riskinde artışı gösteren Kristina Edfeldt ve arkadaşları bu durumu hastalığın altında yatan değişik patojenik mekanizmalarla açıkladılar: MI bir çok vakada aterosklerotik plakların rüptürü ile gerçekleşir.Lezyon büyümesine etki eden faktörlerin plak stabilizasyonuna neden olduğu aynı zamanda plak büyümesini inhibe eden faktörlerin de instabiliteye ve plak rüptürüne neden olabileceğine dair bir teori geliştirdiler.Çalışmalarında buldukları TLR 4 polimorfizimli bireylerdeki artmış MI riski fakat azalmış lezyon boyutunu TLR 4'ün mikrobiyal ürünlerle veya tanımlanmamış ligandlarla

aktivasyonu ile damar duvarında düz kas hücre proliferasyonunu sağlayarak aterosklerotik lezyonda stabilize edici bir kapak oluşturacağı fikrine dayandırdılar.

Biz çalışmamızda ateroskleroz olan ve olmayan her iki grupta da TLR 4 Asp299Gly polimorfizmine rastlamadık. Çalışmamızın en büyük sınırlaması çalışma grubumuzun sayıca azlığıdır. Ülkemizde TLR 4 Asp299Gly polimorfizminin sıklığı üzerine yeterli veriler bulunmadığı için biz %11 gibi bir polimorfizm sıklığı gösteren bir Hollanda çalışmasını temel alarak sayımızı belirledik. Türkiye’de yapılan periodontitli bireylerle TLR 4 Asp299Gly polimorfizminin ilişkisini araştıran bir çalışmada ise 86 hasta 106 sağlıklı kontrolde polimorfizm sıklığı ortalama %2 bulunmuş(54). Yine Çin’de yapılan bir çalışmada 491 bireyin hiçbirinde TLR 4 Asp299Gly polimorfizmine rastlanmamış(55).

Çalışma grubumuzu ‘Sivas il merkezinde karotis arter aterosklerozunun yaygınlığı’ çalışması içerisinde 50 aterosklerozu olan ve 45 olmayan bireyi rastgele örneklem yoluyla seçerek belirledik. Çalışma grubumuzu belirlerken başka risk faktörü saptamadığımız aterosklerozu olan ve olmayan bireyleri seçebiliriz. Böyle bir seçim diğer risk faktörlerini elimine ederek aterosklerozla TLR 4 arası ilişkiyi daha kolay belirlememizi sağlayacağı düşünülebilir. Fakat TLR 4 damar duvarında hasara yol açan risk faktörleri sonucu oluşan ligandlar için bir reseptör olduğundan ve aterogenez üzerine etkisini bu yolla sağladığından dolayı vakalarımızı rastgele örneklem yoluyla risk faktörlerini elimine etmeden seçtik. Daha önceki yayınlarda bu metodu desteklemektedir. Kristina ve arkadaşlarının çalışmasında da sigara ile TLR 4 Asp299Gly arasında MI risk artışı üzerine sinerjistik bir etki gösterildi(29).

Çalışmamızda Toll-like receptor 4 Asp299Gly polimorfizmini belirlemek için RFLP yöntemini tercih ettik. RFLP gen polimorfizm analizleri için göreceli olarak ucuz kolay ve güvenilir bir yöntemdir. Aynı polimorfizmin aynı bireylerden Single Stranded Confirmation Polimorfizm analizi gibi farklı yöntemlerle de belirlemeye çalışmak çalışmanın güvenilirliğini artırmak için önemlidir.

Sonuç olarak biz TLR 4 Asp299Gly polimorfizmi ile karotis aterosklerozu arası bir ilişki saptamadık. Daha büyük ölçekli yapılacak çalışmalarla ve birkaç

genetik yöntemi bir arada kullanarak daha güvenilir sonuçlar elde etmek mümkündür.



## **SONUÇLAR:**

Aterogenezin patolojisinde genetik yatkınlık ve immüitenin çok önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. Toll-like reseptörler hem eksojen hem endojen ligandlarla immüiteyi başlatan bir reseptör ailesidir. Ateroskleroz üzerine yapılan bazı çalışmalarda TLR 4 polimorfizminin inflamasyonu ve buna bağlı olarak aterogenezi azalttığı gösterilmiştir .Bu çalışmada seçilmiş populasyonda TLR4 polimorfizminin yaygınlığını ve karotis aterosklerozu ile bu polimorfizm arası ilişkiyi saptamayı amaçladık

RFLP yöntemi kullanarak yaptığımız bu çalışmamızda TLR4için çoğalttığımız gen bölgesinde hem karotis aterosklerozu olan hem de olmayan grupta TLR 4 Asp299Gly polimorfizmine rastlamadık.

## KAYNAKLAR

- 1.E.Kumral .Ateroskleroz ve serebral hastalıklar .Editörler E.Kumral ,B.İnce .Argos yayıncılık ,İzmir 2003
- 2.Steinberg D.Diabetes and aterosklerosis.In :Ellenberg and Rifkin's diabetes mellitus.Eds:PorteD,SherwinRS.AppletonS lange .Stamford ,Connecticut,1997p.193-206
- 3.Tuba Turul ,Fügen Ersoy .Dostu düşmanı ayıran bir doğal immünite bileşeni :toll-like reseptörler(TLR)Hacettepe Tıp Dergisi 2004;35:114-118
- 4.Underhill DM,Ozinsky A.Toll-like receptors :key mediators of microbe detection Curr Opin immunol 2002 ;14:103-10
- 5.Tapping RI ,Akashi S,Miyake K ,Tlr 4 is a signalling receptor for escherichia and salmonella ,J Immunol 2000;165:5780-7
- 6.Schmitt C ,Humeny,Becker CM ,Polimorphisms of TLR 4 :rapid genotyping and reduced response to LPS of mutant TLR 4 alleles Clin Chem 2002 ;48:1661-7
- 7.Kiehl S,Lorenz E,Reindal M,Toll-like reseptör 4 polimorfizm and atherogenesis .N Eng.J Med 2002;347:185-92
- 8.Schoen FJ. Blood vessels.In:Pathological Basis of Disease Cotran RS,Kumar V,Robbins SL .W.B. Saunders Company,Philadelphia 1994:467-517
- 9.Onat A.Erişkinlerimizde kalp hastalıkları prevalansı ,yeni koroner olaylar ve kalpten ölüm sıklığı .TEKHARF:Türk Erişkinlerinde Kalp Sağlığının Dünü ve Bugünü (Edit:Onat A ve ark.)BMS.1996:15-27
- 10.Kumral E,Özkaya B, The Ege Stroke Registry :A hospital-based study in the Aegean Region ,İzmir Turkey Analysis of 2000 stroke patients. Cerebrovasc Dis.1998;8:278-288
- 11.The Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study Group :Study design for randomized prospective trial of carotid endarterectomy for asemptomatic atherosclerosis Stroke 1989 ;20:844-849

12. NASCET :Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high grade stenosis N.England .J Med. 1991;325:445-453
13. Ross.R.Atherosclerosis-an inflammatory disease.New Engl. J.Med.1994;340:115-126.
14. George Trisiplanis Inflammation in Atherosclerosis and Other Conditions: A Response to Danger. Kidney Blood Pres Research 2005; 211-217
15. G. Pastercamp. Role of Toll-like receptor in the initiation and progression of atherosclerotic disease European J.of Clinical Investigation (2004) 34,328-334
16. Medzhitov R, A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity.Nature 1997 ;388:394-7
17. Muzio M, Bosisio D,Differential expression and regulation of toll-like receptors in human leucocytes:selective expression of TLR-3 in dendritic cells.J Immunol 2000;164:5998-6004
18. Tapping RI,Akashi S,Toll-like receptor 4 ,but not Toll-like receptor 2 is a signalling receptor for escherichia and salmonella lipopolysaccharides. J Immunol 2000 165:5780-7
19. Arbour NC.TLR-4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. Nat Genet 2000 ;25:187-91
20. Montesa A.H.,Asensi Victor, Alvarez Victoria,The toll-like receptor 4 (Asp299Gly) polymorphism is a risk factor for gram-negative and hematogenous osteomyelitis Clinical and experimental immunology, 2006, 143;404-413
21. Suganya Viriyakasol ,Michael A,Toll-like receptor 4 protects against lethal leptospira interrogans serovar , Infect Immun 2006 February 74(2);887-895
22. Takashi Hirano ,Saturo Kodama ,Role of Toll-like receptor 4 in innate immune responses in a Mouse model of acute otitis media. FEMS Immunology and medical microbiology Volume 49 Issue 1 Page 75 February 2007
23. Ohashi K, Burkart V,Heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor 4 complex. J Immunol 2000;164:558-61

- 24.M.G.Netea,A.Hijmans Toll-like reseptor-4 Asp299Gly polymorphism does not influence progression of atherosclerosis in patients with familial hypercholesterolaemia *European Journal of Clinical Investigation* (2004) 34,94-99
- 25.Reape TJ,Groot PH. Chemokins and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1999 ;147:213-25
- 26.Sasu S,La Verda D. Chlamidya pneumonia and heat shock protein 60 stimulate proliferation of human vascular smooth muscle cells via TLR 4 and p44 / p42 mitogen activated protein kinase activation. *Circ Res* 2001;89:244-50
- 27.Okamura Y. Rose at all. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4 *J Biol Chem* 2001;276:10229-33
- 28.Edfelt K, Swedenburg J., Hanson GK, Yan ZQ .Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions : a possible pathway for plaque activation . *Circulation* . 2002 ; 105 : 1158-1161
- 29.Kristina Edfelt , Anna M Benner ,Per Eriksson, Association of hyporesponsive toll-like receptor 4 variants with risk of myocardial infarction . *Clinical Research* January 28 2004
- 30.Ian A. Yang, Holloway , Shu Ye, TLR 4 Asp299Gly polymorphism is not sociated with coronary arter stenosis. *Atherosclerosis* Volume 173 Issu 1 March
- 31.Inflammation and carotid artery risk for atherosclerosis study (ICARAS) *Circulation* 2005 May 3;111(17):2203-9
- 32.Raul Altman . Risk factors in coronary atherosclerosis atheroinflammation:the meeting point , *Thrombosis Journal* 2003 , 1:4
- 33.Kiyoshi Takeda. Toll-like reseptors and their adaptors in innate immunity *Curr.Med.Chem.-Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents*,2005,4,3-11
- 34.Leen Moens, Jan Verhaegen, Marie Pierik, Severine Vermiere. Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 polymorphism in invasive pneumococcal disease. *Microbes and infection* 2007; 9 (1):15-20

35. Kai Ding, Akiko Shibui, Yi Wang. Impaired recognition by Toll-like receptor is responsible for exacerbated murine pneumocystis pneumonia . *Microbes and Infection* 2005;7(2): 195-203
36. Awomogi Agnes A, Rallbhandi P, Loenz E. Association of TLR 4 polymorphisms with symptomatic respiratory syncytial virus infection in high risk infants and young children. *Journal of Immunology* 2007;179(5) 31
37. Ferwarda B, Kibiki GS, Netea MG, Dolmans WMV. The Toll-like receptor 4 Asp299Gly variant and tuberculosis susceptibility in HIV infected patients in Tanzania. *AIDS* 2007;21(10):1375-1377
38. Carvalho A, Marques A, Maciel P, Rodrigues F. Study of disease-relevant polymorphisms in the TLR 4 and TLR 9 genes : A novel method applied to the analysis of the portuguese population. *Molecular and Cellular Probes* 2007;21(4):316-320
39. Montes AH, Asensi V, Alvarez V. The Toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism is a risk factor for gram negative and haematogenous osteomyelitis. *Clinical and Experimental Immunology* 2006;143(3):404-413
40. Gao HK, Zhou ZG, Li Y. Toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism is associated with an increased risk of pancreatic necrotic infection in acute pancreatitis - A study in Chinese Population. *Pancreas* 2007;34(3):295-298
41. Muhlestein JB, Anderson JL, Hammond EH. Infection with chlamydia pneumoniae accelerates the development of atherosclerosis and treatment with azithromycin prevents it in a rabbit model. *Circulation* 1998;97:633-636
42. Mayr M, Kiechl S, Willeit J, Wick G. Infections, immunity, and atherosclerosis: associations of antibodies to chlamydia pneumoniae, helicobacter pylori, and cytomegalovirus with immun reactions to heat-shock protein 60 and carotid or femoral atherosclerosis. *Circulation* 2000;102:833-839
43. Faure E, Thomas L, Xu H, Medvedev A. Bacterial lipopolysaccharide and INF induced Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells : Role of NF- $\kappa$ B activation. *J Immunol.* 2001 ;166:2018-2024

44. Christine De Staercke, Lathy Lally, Harland Austin, Carla Winston, Nicole Dawling, Byron Williams, W. Craig Hooper. The lack of association between four point mutations in the promoter region of the toll-like 4 receptor gene and myocardial infarction. *Thrombosis Research* 2007;119:105-110
45. Ian A. Young, John W. Holloway, Shu Ye. TLR 4 Asp299Gly polymorphism is not associated with coronary artery stenosis. *Atherosclerosis* 2003(170) 187-190
46. Werner Koch, Petra Hoppman, Arne Pfeufer, Albert Schomig, Adnan Kastrati. Toll-like receptor 4 gene polymorphisms and myocardial infarction: No association in a Caucasian population. *European Heart Journal* 2006 ;(27):2524-2529
47. Balistreri CR, Candore G, Calonna-Romano G, Lio D. Role of Toll-like receptor 4 in acute myocardial infarction and longevity. *JAMA* 2004; (292):2339-2340
48. Matthew J. Kolek, John F, Joseph S, Muhlestein MD, Bryant M. Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism is associated with reductions in vascular inflammation, angiographic coronary artery disease, and clinical diabetes. *American Heart Journal* 2004;( 148-6):1034-1040
49. Boekholdt SM, Agema WRP, Peters R, et al for the REGRESS Study Group. Variants of toll-like receptor 4 modify the efficacy of statin therapy and the risk of cardiovascular events. *Circulation* 2003;(107):2416-2421
50. Labrum R, Bevan S, Sitzer M, Lorenz M, Markus HS. Toll receptor polymorphisms and carotid intima media thickness. *Stroke* 2007;38(4):1179-1184
51. Reisman P, Lichy C, Rudofsky G, Humpert PM, Genius J, Dörfer C, Lack of association between polymorphisms of the toll-like receptor 4 gene and cerebral ischemia. *J Neurol* ;251(7):853-858
52. Vink A, Schoneveld AH, Van der Meer JJ. In vivo evidence for a role of toll-like receptor 4 in the development of intimal lesions. *Circulation*. 2002;106:1985-1990
53. Danenberg HD, Welt FG, Walker M. Systemic inflammation induced by lipopolysaccharide increases neointimal formation after balloon and stent injury in rabbits. *Circulation*. 2002 ;105: 2917-2922

54. Berdeli A, Emingil g, Han Saygan B, Gürkan A, Atilla G, Köse T, Baylas H. TLR 2 Arg753Gly, TLR 4 Asp299Gly and Thr339Ile gene polymorphisms are not associated with chronic periodontitis in a Turkish population. *J. Clin. Perodontal* 2007;34:551-557

55. Yi-Chun Lin, Ying-Ming Chang. Toll-like receptor 4 gene C119A but not TLR 4 Asp299Gly polymorphism is associated with ischemic stroke among ethnic Chinese in Taiwan. *Atherosclerosis* 180(2005)305-309