

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
KARDİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Zeki Öngen

TLR4-Thr399İle Polimorfizmi İle Koroner Arter
Hastalığı Arasındaki İlişkinin Araştırılması

(UZMANLIK TEZİ)

Dr. Ziya İsmayıloğlu

İstanbul 2011

TEŐEKKÜR

Cerrahpaşa Tıp Fakóltesi Kardiyoloji Anabilim Dalı'nda çalıŐtıđım süre boyunca eğitimime katkıda bulunan baŐta Anabilim Dalı baŐkanı Sayın Prof. Dr. Vural Ali Vural olmak üzere tüm öğretim üyelerine, tezimin hazırlanmasında değerli katkı ve yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Zeki Öngen'e ve Sayın Prof. Dr. Nergiz Domaniç'e, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalın'dan Sayın Prof. Dr. Mehmet Güven'e ve asistanlarına, her zaman verdikleri destek nedeniyle yanımda olan çalışma arkadaşlarıma teŐekkür ederim.

Bu alıŐma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel AraŐtırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiŐtir. Proje No: 5806

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	ii
ŞEKİL ve TABLOLAR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
1.GİRİŞ	1
2.AMAÇ	4
3.GENEL BİLGİLER	5
4.MATERYEL ve METOD	17
5.SONUÇLAR	20
6.TARTIŞMA	23
7.KAYNAKLAR	26

KISALTMALAR

APC	antijen sunucu hücreler
Arg	arjinin
Asp	aspartik asit
CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5
CD14	cluster of differentiation-14
DM	diyabetes mellitus
DNA	deoksiribonükleik asit
EDA	ekstra domain A
Gln	glutamin
Gly	glisin
HMG-CoA redüktaz	3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A redüktaz
HSP	ısı şoku proteini
IFN	interferon
IL	interlökin
Ile	izolösin
IRAK	interleukin-1 receptor-associated kinase
IRF3	IFN regulatör faktör 3
KAH (CAD)	koroner arter hastalığı
KKH	koroner kalp hastalığı
KVH	kardiyovasküler hastalık
LDL	düşük yoğunluklu lipoprotein
LPS	lipopolisakkarid
LRR	lösinden zengin tekrarlara (leucine-rich repeats)
MD-2	myeloid differentiation-2
MI	myokard infaktüsü
MMP-9	matrix metallopeptidase-9
mRNA	mesajcı RNA
MyD88	myeloid differentiation primary response protein (88)
NF-κB	nükleer faktör-kapa beta
NK	doğal öldürücü hücreler
NKT	doğal öldürücü T hücreleri
Ox-PAPC	okside 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholin
PAMP	patojen ilişkili moleküler patternler
PCR	polimeraz zincir reaksiyonu
PRR	patojen tanıyıcı reseptör
RNA	ribonükleik asit
RSV	respiratuvar sinsityal virüs
SLE	sistemik lupus eritramatosus
SNP	tek nükleotid polimorfizmi
TH	yardımcı T hücre
Thr	treonin
TICAM	TIR-containing adapter molecule

TIR	Toll/Interlökin-1 reseptör
TLR	toll like reseptör
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon
VCAM	vasküler hücre adezyon molekülü

ŞEKİL ve TABLOLAR

Tablo-1. “Toll like” reseptörleri	7
Şekil-1. MyD88 bağımlı ve MyD88 bağımsız TLR sinyalizasyonunun şematik olarak gösterilmesi	8
Şekil-2. TLR4 geninin 9. kromozomdaki lokalizasyonu	9
Tablo-2. TLR4 ve ateroskleroz arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmaların özeti	15
Tablo-3. Çalışmaya alınan bireylerin koroner arter hastalığının yaygınlığı ve risk faktörlerine göre dağılımı	18
Tablo-4. Sol ana koroner hastalığı olanların risk faktörlerine göre dağılımı	18
Tablo-5. Kontrol ve hasta grubunun TLR 4 Thr399Ile polimorfizmi ile ilgili genotip ve allel sıklıklarının dağılımı	20
Tablo-6. Hastaların TLR4 polimorfizmi ve koroner hastalığı mevcudiyeti ve yaygınlığına göre dağılımı	21
Tablo-7. TLR4 Thr399Ile polimorfizmi ile risk faktörleri arasındaki ilişki	21
Tablo-8. Cinsiyet faktörüne göre kontrol ve hasta grubunun TLR 4 Thr399Ile polimorfizmi ile ilgili genotip ve allel sıklıklarının dağılımı	22

ÖZET

Giriş: TLR4 makrofaj, endotel hücreleri ve düz kas hücreleri tarafından arter duvarında eksprese edilir ve arter duvarındaki inflamatuvar olayların başlangıcında önemli rol oynar. Koroner arter hastalığının nedeni olan ateroskleroz lipitle indüklenen inflamatuvar bir hastalıktır. Doğal ve kazanılmış immün sistemin bir modülatörü olan “Toll like” reseptörleri ile kronik inflamatuvar bir hastalık olan ateroskleroz arasında ilişki olduğu düşünülmektedir.

Amaç: Koroner anjiyografi ile koroner arter hastalığının varlığı ve yokluğu doğrulanmış gruplarda TLR4-Thr399 ile polimorfizminin koroner arter hastalığı ile ilişkisini ortaya koymaktır.

Materyel ve Metod: Koroner anjiyografi yapılan 200 hasta çalışmaya alındı (150 koroner arter hastası ve 50 normal koroner arterli kontrol grubu). Koroner arter hastaları tutulan damar sayılarına göre gruplara ayrıldılar. Hastalardaki TLR4-Thr399 ile polimorfizmleri Real-time PCR yöntemiyle çalışılarak tespit edildi.

Sonuçlar: TLR 4 Thr399 ile polimorfizmindeki genotip dağılımı ile koroner arter hastalığı ($p=1,00$) ve yaygınlığı arasında ilişki bulunmadı ($p=0,941$). TLR 4 Thr399 ile polimorfizmi ile hiperlipidemi ($p=0,374$), diyabetes mellitus ($p=0,353$), obezite ($p=0,912$) ve aile öyküsü ($p=0,142$) arasında ilişki bulunmamıştır. Hipertansiyonu olanlarda TLR 4 Thr399 Thr genotipi daha fazla olarak tespit edilmiştir ($p=0,028$).

Tartışma: Yapılan çalışmalarda TLR4 Asp299Gly polimorfizmi ile ateroskleroz arasındaki ilişki birçok çalışmada gösterilmesine rağmen Thr399 ile polimorfizmi ile ateroskleroz arasındaki ilişki tartışmalıdır. Bizim çalışmamızda türk toplumunda TLR4 Thr399 ile polimorfizmi ile koroner arter hastalığı arasında ilişki tespit edilememiştir.

ABSTRACT

Introduction: TLR4 is expressed by macrophage, endothelial cells and smooth muscle cells on arterial wall and it takes an important role on the initiation of inflammatory processes. Inflammation plays a major role in the pathophysiology of atherosclerosis which is the main cause of CAD. In the previous studies a relationship was assumed between atherosclerosis process and Toll like receptor polymorphism.

Purposes : To defining the relationship between TLR4 Thr399Ile polymorphism and coronary artery disease diagnosed by coronary angiography.

Material and methods : Two hundred patients who had coronary angiography were received in the study. 150 patients had coronary artery disease and 50 were normal. Subgroup analysis was performed according to the severity of coronary artery disease. The presence of polymorphism of TLR4 Thr399Ile in patients was defined with a Real-time PCR method.

Results : Neither the presence ($p=0,794$) nor the severity ($p=0,941$) of coronary artery disease were related with TLR 4 Thr399Ile polymorphism. Hyperlipidemia ($p=0.374$), diabetes mellitus ($p=0.353$) and obesity ($p=0.912$) were also not associated with a TLR4 Thr399Ile polymorphism, but the frequency of the polymorphism was lower in patients with hypertension ($p=0.028$).

Conclusion : The presence of TLR4 Asp299Gly polymorphism with coronary artery disease was caused in previous studies, but the relationship of TLR4 Thr399Ile polymorphism and coronary artery disease is controversial. In our study we were could not find any relationship between TLR4 Thr399Ile polymorphism and coronary artery disease.

1.GİRİŞ

Bin dokuz yüz yılından önce enfeksiyöz hastalıklar ve beslenme bozukluğu en sık görülen ölüm nedenleri arasında sayılmaktaydı. Gelişmiş birçok ülkede beslenmenin iyileşmesi ve kamu sağlığı önlemleri sayesinde bu tip ölüm nedenlerinin yerini kardiyovasküler hastalık (KVH) gibi kronik hastalıklar ve kanser almıştır. İki bin yirmi yılına gelindiğinde KVH'ın yılda 25 milyon ölüme yol açacağı ve koroner kalp hastalığının (KKH) dünyada bir numaralı ölüm ve sakatlık nedeni olan enfeksiyöz hastalıkları geçeceği tahmin edilmektedir (1).

KVH, 2000 yılında, Avrupa'daki 4 milyonu aşkın ölümün doğrudan nedenidir ve her yaşta erkeklerde bütün ölümlerin %43'ünden, kadınlarda ise %55'inden sorumludur. KVH mortalite oranları yaş, cinsiyet, sosyoekonomik durum, etnik köken ve coğrafi bölgeye göre değişmektedir. Avrupa ülkeleri arasında KVH morbidite ve mortalitesi açısından büyük sosyoekonomik farklılıklar vardır ve bunlar kısmen, sigara, kan basıncı, kan kolesterolü ve glukoz gibi geleneksel risk faktörlerindeki sosyoekonomik farklılıklarla açıklanabilmektedir (2).

Moleküler biyoloji ve genetik, son yirmi yıl içinde tıbbın tüm alanları içine girerek hastalıkları anlamamızda önemli rol oynamıştır. Bilim insanları, kardiyovasküler hastalıklar hakkındaki hipotezleri sınamak ve hastaların tedavisi için yeni yaklaşımlara ulaşmak amacıyla bir dizi moleküler ve genetik araçlara başvurmuşlardır (3).

Yaygın koroner arter hastalığı çoğunlukla poligenik yatkınlığın bulunduğu bir zeminde ortaya çıkmaktadır. Ateroskleroz, zamana bağlı, çok sayıda farklı kilit biyokimyasal yolağın etkileşimini, lipoprotein metabolizmasını, koagülasyon ve inflamasyonu kapsayan çok basamaklı bir süreçtir. Bu metabolik yolların herhangi birindeki gen varyantları kilit proteinlerin fonksiyonunun değişmesine ve hemostazın hassas dengesinin bozulmasına yol açabilir. Kendileri de poligenik özellikte olan hipertansiyon, diyabet ve obezite gibi ara fenotipler etkileşerek riski değiştirmektedir (4).

Ateroskleroz lipidle indüklenen inflamatuvar bir hastalıktır (5). Romatoid artrit, inflamatuvar barsak hastalıkları, astım, sistemik lupus eritematozis ve aterosklerozis gibi kronik inflamatuvar hastalıklar bağışıklık sisteminin işleyişindeki disregülasyon ile ilişkilidir. Doğal ve kazanılmış immün sistemin bir modülatörü olan "Toll like" reseptörleri ile kronik inflamatuvar bir hastalık olan ateroskleroz arasında ilişki olduğu düşünülmektedir (6).

TLR'ler bakteri, virüs, mantar ve protozoa gibi patojenlere karşı immün sistemin oluşmasını sağlayan PRR (patojen tanıyıcı reseptör)'lerdir. TLR'lerin ekstraselüler lösin-zengin sahaları ve intraselüler Toll/İnterlökin (IL)-1 reseptör (TIR) sahaları vardır. TLR sinyalizasyonu farklı tip patojen aktivasyonu ile başlar ve reseptörün etkileştiği farklı tip adaptör proteinlerin aktive ettiği transkripsiyon faktörler ile farklı tipte sitokinlerin yapımı gerçekleşir (7). TLR aktivasyonu hematopoitik kök hücrelerin farklılaşmasında da önemli rol oynamaktadır. B ve T hücre proliferasyonu ve farklılaşması üzerine TLR aktivasyonunun etkisi vardır. Nötrofiller infeksiyon bölgesine ulaşan ilk immün hücrelerdir. Nötrofillerin kısa bir yaşam süreleri vardır, fakat bazı faktörler tarafından yaşam sürelerinin uzatılması patojenlere karşı daha etkin bir mücadele sağlar. Patojenlerin invazyonunu takiben TLR aktivasyonunun nötrofil apoptozunu önlediği ve daha uzun bir yaşam süresi sağlandığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (8).

İnsanlarda toplam 10 farklı tip TLR eksprese edilir. En fazla çalışılan TLR'lerden biri olan TLR4, gram negatif bakterilerin lipopolisakkarit komponentine ve mikobakteri, mantar ve malarya parazitlerinin yapılarına karşı immün sistemin anahtar reseptörlerinden biridir (9). TLR4, makrofalar ve dendritik hücreler gibi APC (antijen sunucu hücreler)'de eksprese olan ve insanlarda ilk olarak tanımlanan TLR'dür. TLR sinyalizasyon bozukluklarının sepsis, malarya, mantar hastalıkları, sistemik lupus eritramatosus (SLE), diyabet, kardiyomiyopati, astım, kronik tıkaçıcı pulmoner hastalık gibi farklı hastalıkların patogenezi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca TLR genlerindeki SNP (tek nükleotid polimorfizmi)'lerin bu hastalıklar ile ilişkileri de gösterilmiştir (10,11).

Ateroskleroz kronik inflamatuvar bir hastalık olarak tanımlanabilir. TLR4 makrofaj, endotel hücreleri ve düz kas hücreleri tarafından arter duvarında eksprese edilir ve arter duvarındaki inflamatuvar olayların başlangıcında önemli rol oynar (12). Bu nedenle koroner aterosklerozun gelişmesi ile ilişkili olabilir.

TLR4 ekspresyonu, eksojen faktörler dışında fibrinojen, ısı şoku proteini (hsp60) gibi endojen faktörler tarafından da uyarılabilir (13). LDL'nin makrofajlardaki TLR4 ekspresyon artışını önlediği bildirilmiştir (14). Çeşitli uyarılar ile başlatılan sinyalizasyonda intraselülerik adaptör moleküller (MyD88 veya TRIF) aktive olarak proinflamatuvar sitokinlerin (tümör nekroz faktör, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12) sentezi gerçekleşir (7,9). TLR4 ile başlayan sinyalizasyonun aterosklerotik plakta tümör nekroz faktör kapa B'yi uyardığı gösterilmiştir (15).

TLR4 geninde birçok polimorfizm tanımlanmıştır. Thr399Ile SNP'si ise genin 1196.cı pozisyondaki sitozin nükleotidinin yerine timinin geçmesinden kaynaklanmaktadır (15). Bu değişim treonin (Thr) yerine izolösin (Ile) amino asidinin geçmesine yol açar. Beyaz ırkdaki TLR4 399I allel sıklığının ise % 1.3 ile % 11 arasında olduğu tespit edilmiştir (17). TLR4 polimorfizmi ile koroner arter hastalığı arasındaki ilişki daha önce yapılan birkaç çalışmada ortaya konmuştur (18-19).

2.AMAÇ

Çalışmamızın amacı koroner anjiyografi ile koroner arter hastalığının varlığı ve yokluğu doğrulanmış gruplarda TLR4 Thr399 ile polimorfizminin koroner arter hastalığı ile ilişkisini ortaya koymaktır.

TLR4 Thr399 ile polimorfizmi ile koroner arter hastalığı arasındaki ilişkiyi belirlemek hastalığın moleküler temellerinin anlaşılmasına, yeni tedavilerin geliştirilmesine ve hastalıktan korumaya yönelik önlemler almaya olanak sağlayacaktır.

Bizim çalışmamızın diğer benzer çalışmalardan farkı, hasta popülasyonunun toplumumuza özgü olması, bu alandaki çalışmaların daha çok TLR4 Asp299Gly polimorfizmi ile gerçekleştirilmiş olması ve TLR4 Thr399Thr ile ilgili çalışmaların fazla olmamasıdır. Çalışmamızda ayrıca koroner arter hastalığı için risk faktörlerinden olan hipertansiyon, diabet gibi faktörlerin polimorfizm ile olan ilişkisi de değerlendirilecektir.

3.GENEL BİLGİLER

3.1-ATEROSKLEROZ

Aterogenezin güncel görünümü zedelenmeye-yanıt hipotezi ile açıklanmaktadır. Bu model aterosklerozu arter duvarının endotel zedelenmesine verdiği kronik inflamatuvar bir yanıt olarak gösterir. Lezyonun ilerlemesi modifiye lipoproteinler, monosit kaynaklı makrofajlar, T lenfositler ve arter duvarının normal hücresel elemanları arasındaki etkileşimler ile oluşur. İntimada lipid içeren makrofajların birikmesi “yağlı çizgilenmelere” neden olur. İlerlemenin devam etmesiyle çoğalmış düz kas hücreleri, köpüksü hücreler, ekstraselüler lipid ve hücre dışı matriks’ten oluşan fibro-yağlı aterom oluşur.

İnflamatuvar hücreler ve medyatörler ateroskleorik lezyonların başlangıcı, ilerlemesi ve komplikasyonlarında rol oynarlar. Normal damarlar inflamatuvar hücreleri bağlamazken, aterogenezin erken döneminde disfonksiyonel arter endotel hücreleri, lökosit adezyonunu artıran adezyon moleküllerini eksprese eder; özellikle vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM-1) monositleri ve T hücrelerini bağlar. Bu hücreler endotele yapıştıktan sonra lokal olarak üretilmiş kemokinlerin etkisi altında intimaya göç ederler.

Ateroskleroz esas olarak elastik arterleri (örn. aort, karotis ve iliak arterler), büyük ve orta çaplı mürsküler arterleri (örn. koroner ve popliteal arterler) etkiler. Aterosklerozdan azalan sıraya göre, en yaygın olarak etkilenen arterler alt abdominal aort, koroner arterler, popliteal arterler, karotis internalar ve Willis poligonu damarlarıdır. Üst ekstremitelelerin damarları genelde tutulmaz, mezenterik ve renal arterler de, ostiumları hariç, böyledir. Yine de bir kişinin bir arterindeki aterosklerozun şiddeti başka bir arterdeki şiddetin göstergesi değildir. Herhangi bir damardaki farklı evrelerdeki lezyonlar sıklıkla beraber bulunur.

Aterosklerotik plakların üç ana bileşeni vardır:

1. Hücreler; bunlar düz kas hücreleri, makrofajlar ve T lenfositlerdir.
2. Hücre dışı matriks; kollajen, elastik lifler ve proteoglikanları içerir
3. Hücre içi ve dışı lipid

Semptomatik aterosklerotik hastalık en sık kalbi, beyni, böbrekleri ve alt ekstremiteleleri besleyen arterleri tutar. Myokard infarktüsü, serebral infarktüs, aort anevrizmaları ve periferik damar hastalığı aterosklerozun mayor sonuçlarıdır. Bireyler ve gruplar arasında ateroskleroz ve iskemik kalp hastalığının yaygınlığı ve şiddeti birçok risk faktörüyle ilişkilidir: bunların bazıları yapısaldir (bu yüzden daha az denetlenebilir), ama diğlerleri kazanılmış ya da

davranışlar ile ilişkilidir ve potansiyel olarak idare edilmeye yatkındırlar (20). Koroner arter hastalığı risk faktörleri:

A-Değiştirilemeyen Risk Faktörleri

- Yaş
- Cinsiyet
- Genetik faktörler
(ailede erken koroner kalp hastalığı öyküsü)

B-Değiştirilebilen Risk Faktörleri

- Dislipidemi
- Hipertansiyon
- Sigara
- Diyabetes Mellitus
- Obezite
- Fiziksel inaktivite
- Aterojenik diyet (21)

3.2-“TOLL LIKE” RESEPTÖR

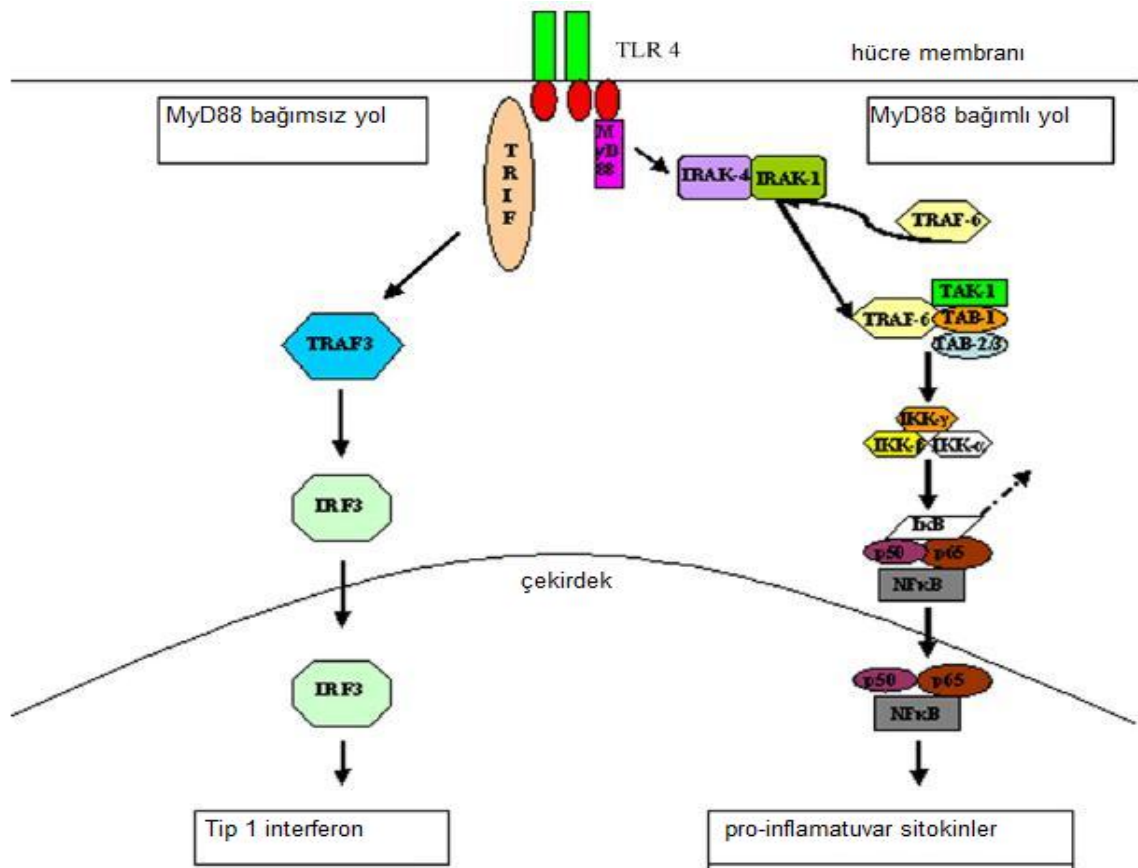
Vücuda giren patojenler immün sistemin birbiriyle bağlantılı iki yolu tarafından karşılanmaktadır. Bunlar, doğal ve edinsel bağışıklıktır. Makrofajlar, dendritik hücreler, mast hücreleri, nötrofiller, eozinofiller, doğal öldürücü hücreler (NK) ve doğal öldürücü T (NKT) hücrelerinin sorumluluğunda gerçekleşen doğal bağışıklık; bir patojenle karşılaşınca ilk cevabı doğumdan itibaren oluşturabilen, konağın kendisine ait olan ve olmayan antijenik yapıyı tanıma kapasitesine sahip savunma sistemidir. Doğal immün sistem, bunu yaparken patojenlerde ortak olan bir dizi moleküler yapıyı tanımaktadır. Bu moleküler yapılara “hastalık etkenlerine eşlik eden moleküler yapılar (pathogen associated molecular patterns, PAMP)” denir. Doğal immün sistem hücreleri üzerinde bunları (PAMP) tanıyan reseptörlere de “patojen kalıplarını tanıyan reseptör (pattern recognition receptor, PRR)” adı verilmektedir. Bu reseptörler; endositik, sekrete edilen ve sinyal ileten olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Sinyal ileten reseptör grubunu “Toll like” reseptör ailesi oluşturmaktadır. İlk olarak 1991 yılında *Drosophila melanogaster* adlı meyve sineğinde keşfedilen ve immün sistem cevabında önemli fonksiyonu olduğu ortaya konulan reseptöre “Toll geni”ne olan benzerliğinden dolayı Toll benzeri reseptör adı verilmiştir. Günümüzde insanlarda İnterlökin-1 reseptör (IL-1R)’ün homologu olan bu molekülere “Toll-like” reseptörler denilmektedir (22).

Endojen ve eksojen ligandlara bağlanan ve 10’u insanda bulunan 13 farklı “Toll like” reseptör memelilerde tespit edilmiştir. Bazıları hücre yüzeyinde (1, 2, 4, 5, 6, 10, 11), bazıları hücre içinde bulunmaktadır (3, 7, 8, 9) (5). Memelilerde saptanan ilk “Toll like” reseptörü TLR4’dür (6) (Tablo-1).

Toll like reseptör	Ligand	Lokalizasyon
TLR1	tri-açıl peptit mikobakteriyel lipoarabinomannan solübl faktörler	Hücre yüzeyi
TLR2	peptidoglikan lipoteikoik asid zymosan HSP70 glikolipidler lipopeptitler/lipoproteinler atipik LPS fenol solubl modulin mannuronik asit polimerleri mikobakteriyel lipoarabinomannan diğer membran proteinleri (porinler)	Hücre yüzeyi
TLR3	çift sarmallı RNA	Hücre içi
TLR4	lipopolisakkarit ısı şok proteinleri fibronektin-DNA heparan sülfat hialuronik asit fibrinojen minimal modifiye LDL taksol mannuronik asid polimeraz kaplama proteinleri nötrofil elastaz klamidya pnomonias HSP60	
TLR5	flajellin	Hücre yüzeyi
TLR6	di-açıl lipopeptitler fenol solübl modulin zymosin lipoteikoik asid solübl tüberküloz faktör	Hücre yüzeyi
TLR7	imiquimod, resiquimod (imidazquinoline) laxoribin (guanosen analogu) bromopirimin (pirimidinon) tek sarmal RNA	Hücre içi
TLR8	tek sarmal RNA küçük yapay karışımlar imiquimod, resiquimod (imidazquinoline)	Hücre içi
TLR9	metillenmemiş CpG DNA	Hücre içi
TLR10	bilinmiyor	Hücre yüzeyi
TLR11	profilin	Hücre yüzeyi
TLR12	bilinmiyor	?
TLR13	bilinmiyor	?

Tablo-1. “Toll like” reseptörleri (5)

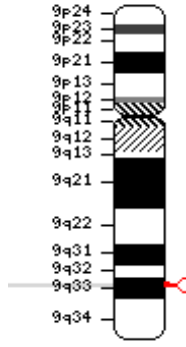
IL-1R'nin sitoplazmik kesimi ile Drosophila Toll'unun sitoplazmik kesimi birbirine benzerlik gösterir. Bu alana TIR (Toll/Interlökin-1 reseptör) alanı denir. Toll ailesinin çoğu üyesi transmembran proteindir. Ekstraselüler alanlarında ise lösinden zengin tekrarlara (leucine-rich repeats, LRR) sahiptirler. Toll ailesi proteinlerinin ekstraselüler kısmı geniş (550-980 aminoasit) olup birden çok bağlayıcı (ligand) alana sahiptir. Aynı zamanda bu ekstraselüler alan, sistinden zengin küçük alanları da içerir. LRR'ler, 20-29 aminoasitlik kısa protein modülleridirler. TLR'ler, sitoplazmik bölgelerinde yaklaşık 200 aminoasitten oluşan ve IL-1R ile benzer TIR alanına sahiptirler (22). Toll/IL-1R (TIR) olarak tanımlanan bu kısımda ve hücre içi sinyal sisteminin parçası olan 3 bölge saklıdır (5) (Şekil-1).



Şekil-1. MyD88 bağımlı ve MyD88 bağımsız TLR sinyalizasyonunun şematik olarak gösterilmesi (5)

3.3-TLR4

İnsanda en çok araştırılan ve fonksiyonu aydınlatılan "Toll like" reseptörlerden olan TLR4, gram(-) bakterilerin lipopolisakkaritlerini (LPS) tanır (22). TLR4 geni 9. kromozomda (9q33.1) bulunur (Şekil-2).



Şekil-2. TLR4 geninin 9. kromozomdaki lokalizasyonu

TLR4'ün bir LPS reseptörü olduğu ortaya çıkarılmış ve bu reseptörün fonksiyonel olarak hücre yüzeyinde; CD14, MD-2 ve LPS bağlayıcı proteini içeren bir molekül kompleksini oluşturduğu, bu moleküllerden herhangi birinin eksik olduğu farelerde LPS cevabının da eksik olduğu gözlenmiştir. TLR4'ün LPS dışında konağa ait olan ve olmayan birçok molekülü tanıyabildiği bilinmektedir. TLR4 tarafından tanınan diğer bir yabancı molekül respiratuvar sinsityal virüs (RSV)'ün füzyon proteini (F-protein)'dir. Hem endojen hem de mikrobiyal kaynaklı "ısı sok protein 60 (HSP60)"ın da TLR4 tarafından tanınması sonucu inflamatuvar sinyal oluşturduğu gösterilmiştir. TLR4 sinyalizasyonunu başlatan bir başka endojen ürün de, fibrinonektinin ekstra domain A (EDA) bölgesidir.

"Toll like" reseptör sinyal yolu; MyD88 bağımlı sinyal yolu (erken yanıt) ve MyD88 bağımsız sinyal yolu olmak üzere iki yoldan oluşmaktadır. MyD88 bağımlı yolda; TLR'ün aktivasyonu MyD88 adaptör proteininin TLR'ün hücre içindeki TIR sahasına bağlanmasına yol açar. MyD88 bağlanması IRAK-4'ün IRAK-1'i fosforile ederek aktivasyonuna ve pro-inflamatuvar sitokinlerin yapımına neden olur. Myd88 bağımsız yolda; TLR'ün aktivasyonu TICAM-1 olarak bilinen TRIF adaptör proteininin TLR'ün hücre içindeki TIR sahasına bağlanmasına yol açar. TRIF, IRF3 aktivasyonu üzerinden tip 1 interferonların gen ekspresyonunu başlatır. Yapılan çalışmalarda üçüncü bir TIR domain içeren adaptör (TRIF) bulunmuştur. Bu adaptör, TLR3 ve TLR4 ile etkileşimde bulunarak IRF3 (IFN regulatory faktör 3)'ü aktive eder ve IFN- β 'nın ekspresyonunu gerçekleştirir.

TLR'ler, mikrobiyal ürünlerin primer sensörleri gibi davranır. İmmün ve inflamatuvar genlerin sentezini başlatacak mekanizmaları devreye sokarak T ve B lenfositlerden oluşan kazanılmış (adaptif) immün yanıtı başlatırlar. TLR, liganda bağlanınca aktive olur ve intraselüler kısmı aracılığı ile nüklear faktör-kapa beta (NF- κ B) ve mitojenle aktive edilen protein kinaz ailelerini uyarır. NF- κ B; TNF- α , IL-1, IL-6 ve IL-8 gibi sitokin ve proinflamatuvar ürünlerin genlerini aktive eder. Bu süreç konağın dogal immun cevabıdır.

Patojen ile PAMP (patojen ilişkili moleküler patternler) 'ın etkileşimi dendritik hücreleri olgunlaştırır ve periferden lenf yumrularına taşınarak T hücrelerine antijen sunarlar. Böylece T ve B hücrelerin aktivasyon sürecinde rol alırlar. TLR, dendritik hücrelerin T hücrelerini daha etkin bir şekilde uyarmasını sağlayan ko-stimülan moleküllerin de seviyelerini artırır, hücre ürünlerinin (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-18) üretimini ve salınmasını düzenler. TLR ile uyarılan dendritik hücreler, IL-12 ile IL-18 salgılar ve TH1 (yardımcı T hücre) hücrelerin gelişmesini sağlar. IL-10 ve IL-4 fazla salındığında ise TH2 immün yanıtı gelişir. B hücreleri uyarılır ve antikor sentezi başlar.

TLR ilişkili NF- κ B'nin aktivasyonu ile salınan enzimler, sitokinler ve mediyatörler konağın antimikrobiyal savunmasını uyarır ve inflamatuvar olayları tetiklerler. Bu süreç patojenin ortadan kaldırılmasını sağlar. İnflamatuvar reaksiyon sınırlandırılmazsa, konak hücrelerinin harabiyetine neden olabilir. TLR aktivasyonu, patojenlerin konak hücrelerinin fagositozu için gereklidir. TLR, patojenlerin fagositozunu uyarır, fagozom içeriğine karşı gelişen inflamatuvar yanıtı güçlendirir ve fagozomun olgunlaşmasına yardımcı olur. Böylelikle fagosite edilmiş bakterinin öldürülmesi kolaylaşır (28).

Farklı memelilerin TLR4'leri arasındaki genetik varyasyon, ekstraselüler LRR bölgesinde en yüksektir. İnsanlarda TLR4 varyasyonlarının çoğu LRR'i kodlayan üçüncü eksonda yer almaktadır (23). İnsanlarda TLR4 ekson 3'de 299 cu (Asp299Gly) ve 399 cu (Thr399Ile) olmak üzere iki yerleşimde aminoasit değişimine yol açan iki tek nükleotid polimorfizmi tanımlanmıştır. Bunlar TLR4 yapısının hücre dışı kısmında 299Gly and 399Ile farklılığı ile ortaya çıkar. Bu polimorfizmlerin fonksiyonel önemi son zamanlarda anlaşılmıştır (24).

Özet olarak TLR4 kardiyomyositlerde, makrofajlarda, endotel hücrelerinde, düz kas hücrelerinde eksprese edilir ve daha önemlisi bu reseptörlerin uyarılması antimikrobiyal peptidlerin ve sitokinlerin salgılanmasını uyararak doğal ve kazanılmış immün sistemi başlatır. İnflamasyon sadece erken aterosklerozun başlangıcında rol almaz, ayrıca aterosklerozun progresyonu, plak stabilitesi ve rüptüründe de önemli rol oynar (25).

3.4-TLR4 ve ATEROSKLEROZ

Fibronektin büyük molekül ağırlıklı ekstraselüler matriks glikoproteinidir ve hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak ekstraselüler matriks yapısını düzenler. Aterosklerotik arterlerdeki yeni-intimada, aterosklerotik olmayan arterlerde bulunmayan, varyant bir fibronektin olan ekstradomain A (fibronektin-EDA) ile örülü belirgin bir fibronektin artışı

görülmektedir. Tan ve arkadaşları, fibronektin-EDA delesyonunun muhtemelen makrofajların LDL alımındaki azalmaya bağlı olarak farelerde aterosklerozda azalmaya yol açtığını göstermişlerdir. Fibronektin-EDA'nın TLR4'ü aktive etmenin yanında ekspresyonunu da artırdığı primer doku kültürlerinde gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, fibronektin-EDA aterosklerotik plaktaki makrofaj ve mast hücrelerinde TLR4 sinyalizasyonu için potansiyel proaterojenik liganttır.

Lipidler ateroskleroz patogenezinde önemli rol oynar. Subendotelyal lipid birikimi ve bunların makrofajlar tarafından alınması ki bu durum köpük hücrelerinin oluşumuna yol açar, yağlı çizgiler oluşumunda (fatty streaks) önemli rol oynar. Lipidlerin makrofajlar tarafından fagosite edilmeden önce okside olduğu düşünülmektedir. TLR4 ekspresyon ve aktivasyonunda, okside lipidlerin farklı etkileri rapor edilmiştir. Xu ve arkadaşları nativ LDL'ye kıyasla okside-LDL'nin insan monositinden türeyen makrofaj kültüründe TLR4 mRNA ekspresyonunu artırdığını göstermişlerdir. Aksine, TLR4 stimülasyonu sonrası, proinflamatuvar sitokin üretimi, hiperlipidemik dokudan köken alan dendritik hücrelerde inhibe edilmektedir. Muhtemelen, okside-LDL birikimi, çekirdeğe NFkB translokasyonu inhibe etmektedir. Keza okside-LDL'nin önemli biyoaktif komponenti olan okside 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholin (Ox-PAPC) proinflamatuvar sitokin yapımını ve dendritik hücre matürasyonunu inhibe etmektedir. Okside-LDL'nin erken formu olan minimal okside-LDL, aktin polimerizasyonunun artmasına ve makrofajların yayılmasına (dağılımına) neden olmaktadır ki, bunun TLR4 aktivasyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir. İlave olarak Miller ve arkadaşları da, minimal okside-LDL'nin indüklediği makrofaj sitokin salgılanmasının kısmen TLR4 bağımlı olduğunu göstermişlerdir. Okside-LDL, aktin polimerizasyonuna ve makrofajların yayılmasına yol açabilmektedir, ancak bunun TLR4 yolu ile kısıtlı olup olmadığı net değildir. Veriler yeterli olmadığından TLR4 sinyal yolu ile okside lipidlerin aterosklerozdaki kesin rolü tartışmalıdır.

Ateroskleroz sürecinde çeşitli ısı şok proteinleri (HSP) tanımlanmıştır. HSP'ler şaperonlardır ve protein-protein etkileşiminde önemli rol oynarlar. HSP'ler birçok hücre tarafından eksprese edilir ve ekspresyonları inflamasyon, hipertermi, hipoksi gibi hücrenin çeşitli stres durumlarına maruz kalması ile regüle edilir. Doksanlı yılların başında HSP60 ve HSP70 insanlarda aterosklerotik lezyonların gelişmesinde rol aldığı söylenmiştir fakat, mekanizması aydınlatılamamıştır. TLR4 aktivasyonu ile ilişkili birçok endojen ligand tanımlanmıştır. Fakat ateroskleroz sürecinde TLR4'ün aktivasyonunu sağlayan aday endojen ligand henüz tespit edilememiştir.

TLR4 aterosklerotik plakta bir dizi farklı tip hücrede eksprese edilir. TLR4 non-aterosklerotik arterlerdeki endotel hücrelerinde düşük düzeyde eksprese edilir, ancak aterosklerotik lezyonlarda ekspresyonunda artış görülür. Endotel hücreleri arter duvar bütünlüğünün korunmasında asıl rolü üstlenirler ve endotel hücre disfonksiyonu aterosklerozun ilk tezahürüdür.

İnsan ve fare monositlerinde TLR4 ekspresyonu gösterilmiştir ve bu ekspresyon aterosklerotik hastalıkta artar. Makrofajların farklılaşmasından sonra da, TLR4 aktivasyonu devam eder. Monosit aktivasyonu ve makrofajlara dönüşümünü okside-LDL'nin fagositozu takip eder ve köpük hücreleri oluşur. HMG-CoA redüktaz inhibitörleri ve kolesterol düşürücü ilaçlardan olan statinler, vasküler düz kas hücreleri, monositler gibi çeşitli hücrelerde NFkB aktivasyonunu inhibe ederler. Methe ve arkadaşları monositlerdeki NFkB inhibisyonunun protein prenilasyon inhibisyonunu üzerinden TLR4 down-regülasyonu ile gerçekleştiğini göstermişlerdir. Bu etki kolesterol düzeyinden bağımsızdır. Tedavi edilmeyen hiperkolesterolemik hastalar ile normal kolesterol düzeyine sahip kontrol bireylerde de, statin tedavisi TLR4 yüzey ekspresyonunda benzer düzeyde azalma yapar.

Nötrofiller aterosklerotik plakta düşük düzeyde bulunmuştur ancak, uzun zaman boyunca ateroskleroz patogenezinde rolü tam olarak anlaşılamamıştır. Nötrofiller TLR4 eksprese eder ve TLR4 aktivasyonu nötrofil migrasyonunda artışa neden olur. Kardiyovasküler hastalıklarda TLR4 ile nötrofillerin uyarılmasının yeri henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Nötrofil elastaz nötrofillerden salınan bir serin proteazdır. Düz kas hücreleri ve makrofajlar gibi çeşitli hücreler TLR4 aracılığıyla NFkB yolu ile nötrofil elastaz salgılanmasını uyarır.

Mast hücreleri geniş spektrumlu biyoaktif maddeler sekrete eder, bunlar sitokinler (örn. IL-6 ve TNF α , monositlerin göçü ve endotel hücrelerinin aktivasyonu), kimaz (remodelling ve proteinlerin degradasyonu), triptaz (endotel aktivasyonu, fibrinojen bölünmesi) ve histamindir (endotel hücre aktivasyonu). Bu maddeler inflamasyon ve aterosklerozda önmeli rol oynayan mediyatörlerdir. Bot ve arkadaşları fare modelinde mast hücrelerinin uyarılması ve adventisyal alana göçü ile plak insitabilitesi için karakteristik olan plak içi kanamada önemli artış olduğunu göstermişlerdir. İlave olarak mast hücreleri, makrofaj apoptozunun indüksiyonu, mikrovasküler alana sızıntı ve monosit adezyonunun aktivasyonu ile plak insitabilitesine neden olur. TLR4'ün fare mast hücre yüzeyinde eksprese edildiği gösterilmiş ancak, mast hücrelerinin TLR4 yolu üzerinden ateroskleroza katkısını araştıran in-vivo çalışma yapılmamıştır.

Dendritik hücreler antijen sunan hücrelerdir. Her ne kadar dendritik hücreler sağlam arterlerde seyrek saptansa da, aterosklerotik lezyonlarda birikirler ve TLR4 eksprese ederler. Yakın bir tarihte Wang ve arkadaşları, akut koroner sendromlu hastalarda sağlıklı kontrol ve stabil anginalı bireyler ile karşılaştırıldığında dendritik hücrelerde TLR4 ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir.

Stoll ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada insan aterosklerotik arterlerinin medyal düz kas hücrelerinde TLR4 ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. Otsei ve arkadaşlarının hipotezine göre; akut koroner sendromu olan ve olmayan hastalar arasında düz kas hücrelerinden TLR4 ekspresyonunda fark olamamasından dolayı, TLR4 plak instabilitesinden ziyade aterosklerozun başlaması ile ilgili olabilir. Bu düşünce plak insitabilitesine katkıda bulunan birçok hücre (dendritik hücreler, monosit ve makrofajlar, endotel hücreleri) gibi TLR4'ün rolünü dışlamaz. Bununla beraber Otsei'nin verileri, plak destabilizasyonu sırasında vasküler düz kas hücrelerinde TLR4 sinyalizasyonunun sınırlı bir rolünü işaret etmektedir.

Adventisyal tabakada bol miktarda bulunan fibroblastlar, insan aterosklerotik arterlerinde TLR4 eksprese ettikleri gösterilmiştir. İn-vivo fare deneylerinde TLR4 ile uyarılma fibroblastların intimal hiperplaziye yol açmasına neden olmuştur.

Birlikte ele alındığında aterosklerozun farklı oluşum aşamalarında çok çeşitli hücreler tarafından TLR4 bol miktarda eksprese edilir. Şu ana dek ateroskleroz gelişiminde ve plak destabilizasyonunda TLR4 ekspresyonunun hangi hücre tipinde daha önemli olduğu tam olarak bilinmemektedir.

Hollestelle ve arkadaşları, yeni intima oluşumunda LPS stimülasyonunun TLR4 noksan fareler ile kıyaslandığında dışa doğru remodellinge neden olduğunu göstermişlerdir. Kırılgan bir aterosklerotik plağın özellikleri; 65µm'den daha ince fibröz şapka, az vasküler düz kas hücresi, lipidden zengin nekrotik çekirdek ve fazla makrofaj ihtiva etmesidir. Kırılgan plağın rüptürü trombojenik nekrotik çekirdeğin ortaya çıkmasına ve trombüs oluşumu ile koroner arterin tıkanmasına neden olur. Makrofajların fibröz şapkaya infiltrasyonu MMP-9 ve diğer proteolitik enzimleri içeren metalloproteinazların salgılanmasına ve ekstraselüler matriks yıkılmasına neden olur. Vasküler düz kas hücreleri aterosklerotik plakta baskın matriks üreten hücredir ve bu nedenden dolayı düz kas hücrelerinin apoptozisi ekstraselüler matriks yapımında azalmaya yol açar. TLR4 sinyalizasyonu düz kas hücrelerinde apoptozisi başlatabilir. Akut koroner sendromlu hastalarda rüptüre plağın yanındaki monositlerde

sistemik dolaşımdaki monositler ile karşılaştırıldığında daha fazla TLR4 eksprese edildiği saptanmıştır (5,6).

Kiechl ve arkadaşları Asp299Gly TLR4 polimorfizminin akut ağır enfeksiyon riskinde artış fakat karotis ve femoral arterlerdeki aterosklerozda ve kardiyovasküler nedenlerden dolayı ölüm riskinde azalma ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Bu muhtemelen kuvvetle sistemik pro-inflamatuvar sitokinlerin, solübl adezyon moleküllerin ve akut faz reaktanlarının düzeyindeki düşümeğe bağlıdır (5).

Düşük düzeyde enfeksiyon uyarısına sistemik inflamatuvar yanıt, ateroskleroz progresyonunda önemli rol oynar. TLR4 Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmleri bu yanıtı etkileyerek (azaltarak) arter duvarındaki inflamasyon ve sonucunda oluşan ateroskleroz üzerinde etkili olur. Bu polimorfizmlere bağlı olarak ortaya çıkan inflamatuvar cevapta azalma, enfeksiyöz ajanların ortadan kaldırılmasında yetersizliğe ve progresif inflamatuvar cevabın uzamasına neden olur. Uzun süreli bu yanıt aterosklerotik plakta zararlı olabilir. Hipoteze göre böyle bir inflamatuvar yanıt aterosklerotik plaktaki hücreleri ve makrofajları aktive eder. Yapılan deneylerde bu durumun sitokinlerin gen ekspresyonunda artmaya neden olduğu gösterilmiştir. Özetle inflamasyonun uzaması ile plak rüptürüne neden olabilen 3 faktör: (1) TLR4 aktivasyonuna neden olan inflamatuvar tetikleyicinin miktarı; (2) Damar duvarında mevcut TLR4 miktarı; (3) TLR4'ün lokal inflamatuvar cevaba yol açma etkinliğidir (25).

TLR4 polimorfizmi ile ateroskleroz arasındaki ilişkiyi araştıran birçok çalışma yapılmıştır ve Asp299Gly polimorfizmi ile ateroskleroz arasındaki ilişki ortaya konmuştur (Tablo-2.)

TLR4 dışında TLR2 ile ateroskleroz arasında ilişki olduğunu gösterilmiştir. TLR2 sinyalizasyonu aterosklerozun ve stent implantasyonu sonrası restenoz gelişimine katılıyor (6). Hamann ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada TLR4 Asp299Gly polimorfizmi ile restenoz arasında ilişki bulunmazken TLR2 Arg753Gln polimorfizminde restenozun arttığı saptanmıştır (26). Shishido ve arkadaşları hasarlı damarda vasküler inflamasyonun yanı sıra sonrasında yeni intima oluşumunun regülasyonunda da endojen TLR2 aktivasyonunun rolünü fare ler üzerinde yaptığı çalışmada göstermiştir (6).

Sistemik lupus eritomatozus riskinde artışa neden olan TLR9 polimorfizmi ile aterogenez ve restenoz arasında ilişki saptanamamıştır (6,27).

Çalışma	Yıl	Polimorfizm	Sonuç
Kiechl ve ark.	2002	Asp299Gly	polimorfizm ile ateroskleroz ve karotis intima kalınlığında azalma
Ameziane ve ark.	2003	Asp299Gly	polimorfizm ile akut koroner olaylarda azalma
Boekholdt ve ark.	2003	Asp299Gly	koroner arter hastalığı progresyonu arasında ilişki saptanmadı ancak statin kullanan hastalarda düşük olay riski
Yang ve ark.	2003	Asp299Gly	polimorfizm ile koroner arter hastalığı progresyonu arasında ilişki saptanmadı
Netea ve ark.	2004	Asp299Gly	polimorfizm ile ateroskleroz progresyonu arasında ilişki saptanmadı
Edfeldt ve ark.	2004	Asp299Gly Thr399Ile	polimorfizm ile erkeklerde myokard infarktüsünde artma
Morange ve ark.	2004	Asp299Gly	polimorfizm ile koroner arter hastalığı progresyonu arasında ilişki saptanmadı
Reisman ve ark.	2004	Asp299Gly Thr399Ile	polimorfizmler ile serebral iskemi arasında ilişki bulunmamıştır
Norata ve ark.	2005	Asp299Gly Thr399Ile	polimorfizm ile karotis intima-medya kalınlığı arasında ilişki görülmedi
Hamann ve ark.	2005	Asp299Gly	polimorfizm ile restenoz arasında ilişki görülmedi
Holloway ve ark.	2005	Asp299Gly	statin kullanan hastalarda myokard infarktüsünde azalma
Zee ve ark.	2005	Asp299Gly	polimorfizm ile myokard infaktüsü ve inme arasında ilişki görülmedi
Saskia ve ark.	2005	Asp299Gly Thr399Ile	polimorfizm ile restenoz arasında ilişki görülmedi
Koch ve ark.	2006	Asp299Gly Thr399Ile	polimorfizm ile myokard infaktüsü ve inme arasında ilişki görülmedi
Hernesniemi ve ark.	2006	Asp299Gly	polimorfizm ile myokard infarktüsü arasında ilişki bulunmamıştır
Labrum ve ark.	2007	Asp299Gly Thr399Ile	polimorfizm ile karotis intima-medya kalınlığı arasında ilişki görülmedi
Hommels ve ark.	2007	Asp299Gly	polimorfizm ile aortik ateroskleroz arasında ilişki bulunmamıştır
Jussi ve ark.	2008	Asp299Gly	polimorfizm ile karotis intima-medya kalınlığı arasında ilişki görülmedi
Berg ve ark.	2009	Asp299Gly	polimorfizm ile koroner arter hastalığı arasında ilişki saptanmadı
Yuan ve ark.	2010	Asp299Gly Thr399Ile	polimorfizm ile karotis intima-medya kalınlığı arasında ilişki görülmedi
Beijk ve ark.	2010	Asp299Gly Thr399Ile	polimorfizmler ile restenoz ve hedef damar revaskülarizasyonu arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır

Tablo-2. TLR4 ve ateroskleroz arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmaların özeti (26,28-32)

TLR4-Thr399Ile polimorfizmi ile yapılan çalışmalar genellikle Asp299Gly polimorfizmi birlikte yapılmıştır ve inhale lipopolisakkaridlere dūřuk cevap, gram negatif bakteriyel enfeksiyon, erkeklerde myokard infaktüsü, diyabetik nōropatinin ve allogreft rejeksiyonunun dūřuk insidansı ile ilişkili bulunmuştur (23). TLR4-Thr399Ile polimorfizmi ile ateroskleroz arasındaki ilişkiyi araştıran birçok çalışma yapılmıştır (33-34).

Manolakis ve arkadaşlarının koroner arter hastalıęının mayor risk faktōrlerinden olan diyabetes mellitus ile TLR4 polimorfizmleri arasındaki iliřkiyi inceleyen çalıřmasında diyabetik ve non-diyabetik iskemik kalp hastalarında TLR4 Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmleri benzer bulunmuřtur (35). Solūbl P-selektin ve von Willebrand faktōrler kardiyovaskūler olay riskinde artma ile iliřkilidir. Di Nisio ve arkadaşlarının yaptıęı çalıřmada TLR4-Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmleri hiperkolesterolemik hastalarda Solūbl P-selektin ve von Willebrand faktōr dūzeylerinin daha dūřuk olması ile iliřkili bulunmuřtur (36).

4.MATERYAL ve METOD

Çalışmaya 2011 yılında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Kardioloji Anabilim Dalı, Kalp ve Damar Kateterizasyon Laboratuvarı'na başvuran ve koroner anjiyografi yapılan 200 hasta alındı. Onamı alınan hastaların risk faktörleri sorgulandı.

Koroner arter hastalığı olarak üç damarın (sol ön inen, sol sirkumfleks, sağ koroner arter) ve sol ana koroner arterin bir veya birden fazlasında %50'yi aşkın stenozu olarak tanımlandı (37). Biz çalışmamızda koroner arter hastalarını sol ön inen arter, sirkumfleks arter ve sağ koroner arterdeki anlamlı darlıklara göre 1 damar, 2 damar, 3 damar koroner arter hastası olarak gruplandırdık. Sol ana koronerde anlamlı darlığı olan hastaları ayrı bir grup olarak değerlendirdik. Sadece yan dallarda %50'yi aşkın stenozu olan ve %50'in altında koroner arterde darlığı olanlar çalışmaya alınmadı.

Çalışmaya katılan hastaların yaşları, cinsiyetleri, diğer faktörleri sorgulandı ve risk faktörünün mevcudiyetine aşağıdaki kriterlere göre karar verildi:

- Hipertansiyon: kan basıncı $\geq 140/90$ mmHg veya antihipertansif tedavi görüyor olmak
- Hiperkolesterolemi: total kolesterol ≥ 200 mg/dl, LDL kolesterol ≥ 130 mg/dl
- Diyabetes mellitus: açlık kan glukozunun 126 mg/dL'in üzerinde olması veya DM tedavisi görüyor olması
- Obezite: beden kitle indeksinin 30 kg/m^2 'in üzerinde olması
- Aile öyküsü: birinci derece akrabalarından erkekte 55, kadında 65 yaşından önce koroner arter hastalığı bulunması
- Sigara içiyor olmak (21).

Tablo-3'de çalışmaya alınan hastaların tutulan koroner arter sayısı, risk faktörleri ve yaş ortalamasına göre dağılımı gösterilmiştir.

Çalışmaya alınan 15 sol ana dal hastasının 6'sı kadın ve 9'u erkek idi. 9 erkeğin 7'si 3 damar ve 2'si 2 damar koroner arter hastası idi. 6 kadın hastanın tamamı 3 damar koroner arter hastası idi. Tablo-4'de sol ana koroner arter hastalığı olanların risk faktörleri ve yaş ortalamasına göre dağılımı gösterilmiştir.

hasta grubu	hasta sayısı	hipertansiyon	diyabet	hiperlipidemi	obezite	aile öyküsü	sigara	yaş ortalaması
normal koroner erkek	24	16 (%67)	8 (%33)	5 (%21)	11 (%46)	3 (%13)	7 (%29)	57
normal koroner kadın	26	20 (%77)	11 (%42)	9 (%35)	15 (%58)	2 (%8)	3 (%12)	57
toplam normal koroner	50	36 (%72)	19 (%38)	14 (%28)	26 (%52)	5 (%10)	10 (%20)	57
1 damar erkek	23	16 (%70)	8 (%35)	4 (%17)	6 (%26)	2 (%9)	9 (%39)	60
1 damar kadın	27	24 (%89)	13 (%48)	11 (%41)	16 (%59)	10 (%37)	2 (%7)	60
toplam 1 damar	50	40 (%80)	21 (%42)	15 (%30)	22 (%44)	12 (%24)	11 (%22)	60
2 damar erkek	22	15 (%68)	9 (%41)	7 (%32)	5 (%23)	4 (%18)	11 (%50)	58
2 damar kadın	22	18 (%82)	8 (%36)	6 (%27)	10 (%45)	5 (%23)	0 (%0)	65
toplam 2 damar	44	33 (%75)	17 (%39)	13 (%30)	15 (%34)	9 (%20)	11 (%25)	62
3 damar erkek	31	27 (%87)	9 (%29)	6 (%19)	7 (%23)	6 (%19)	12 (%39)	59
3 damar kadın	25	19 (%76)	16 (%64)	14 (%56)	14 (%56)	8 (%32)	8 (%32)	63
toplam 3 damar	56	46 (%82)	25 (%45)	20 (%36)	21 (%38)	14 (%25)	20 (%36)	61
toplam KAH erkek	76	58 (%76)	26 (%34)	17 (%22)	18 (%24)	12 (%16)	32 (%42)	59
toplam KAH kadın	74	61 (%82)	37 (%50)	31 (%42)	40 (%54)	23 (%31)	10 (%14)	63
toplam KAH	150	119 (%79)	63 (%42)	48 (%32)	58 (%39)	35 (%23)	42 (%28)	61
toplam	200	155 (%78)	82 (%41)	62 (%31)	84 (42)	40 (%20)	52 (%26)	60

Tablo-3. Çalışmaya alınan bireylerin koroner arter hastalığının yaygınlığı ve risk faktörlerine göre dağılımı

Cinsiyet	hasta sayısı	hipertansiyon	diyabet	hiperlipidemi	obezite	aile öyküsü	sigara	yaş ortalaması
erkek	9	6 (%67)	5 (%56)	6 (67)	4 (%44)	3 (%33)	3 (%33)	67
kadın	6	6 (%100)	1 (%17)	3 (%50)	0 (%0)	1 (%17)	2 (%33)	58
toplam	15	14 (%93)	6 (%40)	9 (%60)	4 (%27)	4 (%27)	5 (%33)	63

Tablo-4. Sol ana koroner hastalığı olanların risk faktörlerine göre dağılımı

TLR4 genotipleme: Hastaların TLR4-Thr399 ile polimorfizmleri Real-time PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemiyle çalışılarak tespit edildi. Thr399 ile varyantlarının tespiti Lightcycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) spesifik hibridizasyon probu ile gerçekleştirildi (38). PCR reaksiyonu ve melting curve 20 µl'lik bir final volümünde LightCycler kapillerlerde (Roche Diagnostics) gerçekleştirildi; 10 ng genomik DNA, her bir primerden 0.5 µM, her bir hibridizasyon probundan 0.15 µM, 1× LightCycler DNA Master Hybridisation Prob (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) ve 3 mM MgCl₂.

TLR4 primerleri: 5' GTTTAGAAGTCCATCGTTTG-3' (forward) 5' TAAGCCCAAGAAGTTTGAA-3' (reverse)

Thr399 ile için hibridizasyon probu :
CTTGAGTTTCAAAGGTTGCTGTTCTCAAAG-fluorescein LC Red705-
ATTTTGGGACAACCAGCCTAAAGTAT

İstatistik: Sürekli değişkenler ortalama, süreksiz değişkenler oran olarak belirtildi. İstatiksel değerlendirmede SPSS for Windows 10,0 istatistik paket programı kullanıldı. Karşılaştırmada Chi-Square testi kullanıldı. p değeri <0,05 değerinde anlamlı kabul edildi.

5.SONUÇLAR

Kontrol ve hasta grubunun TLR 4 Thr399Ile polimorfizmi ile ilgili genotip ve allel sıklıklarının dağılımı Tablo 5’te görülmektedir. Hasta (p=0.80) ve kontrol (p=1.0) grubunda gözlemlenen genotip sıklıklarının Hardy-Weinberg dengesinde olduğu tespit edildi.

	Kontrol (n=50)	KAH (n=150)
Thr/Thr Genotipi	44 (%88)	134 (%89)
Thr/Ile Genotipi	6 (%12)	14 (%9)
Ile/Ile Genotipi	0 (%0)	2 (%1)
Thr Allel Sıklığı	0.94	0.94
Ile Allel Sıklığı	0.06	0.06

Tablo-5. Kontrol ve hasta grubunun TLR 4 Thr399Ile polimorfizmi ile ilgili genotip ve allel sıklıklarının dağılımı

Çalışmaya aldığımız 200 hastanın 178 (%89)’sinde Thr/Thr genotipi, 20 (%10)’sinde Thr/Ile genotipi ve 2 (%1)’sinde Ile/Ile genotipi tespit edilmiştir. Kontrol grubunda ise Thr/Thr genotipi 44 (%88) kişide, Thr/Ile genotipi 6 (%12) kişide gözlenirken, Ile/Ile genotipi görülmemiştir. Ile/Ile genotip sıklığı çok düşük olduğu için grupların karşılaştırılmasında Ile/Ile genotipi Thr/Ile ile birlikte değerlendirilmiştir. İstatiksel değerlendirmede hasta ve kontrol grupları arasında genotip (OR=0.87, %95 CI=0.30-2.69; P=1.0) ve allel sıklıklarının (OR=1.0, %95 CI=0.27-3.65; P=0.77) dağılımı açısından anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

TLR4 Thr399Ile polimorfizmi ile koroner arter hastalarında tutulan damar sayısı açısından da herhangi bir anlamlı ilişki tespit edilmemiştir (p=0,941). 15 sol ana dal tutulumu olan hastada polimorfizm görülmedi (Tablo-6).

Çalışmamızda TLR 4 Thr399Ile polimorfizmi ile koroner arter risk faktörleri arasındaki ilişkiye bakılmış olup, polimorfizm ile hiperlipidemi (p=0,374), diyabetes mellitus (p=0,353), aile öyküsü (p=0,142) ve obezite (p=0,912) arasında ilişki bulunmamıştır. Hipertansiyonu olanlarda TLR 4 Thr399Thr genotipi daha fazla olarak tespit edilmiştir (p=0,028) (Tablo-7).

	Thr/Thr Genotipi	Thr/Ile Genotipi	Ile/Ile Genotipi
Konrol Grubu	44 (%88)	6 (%12)	0 (%0)
(Normal koroner arter)			
KAH Grubu			
1 damar	45 (%90)	5 (%10)	0 (%0)
2 damar	40 (%91)	3 (%7)	1 (%2)
3 damar	49 (%88)	6 (%11)	1 (%2)
Sol ana dal tutulumu	15 (%100)	0 (%0)	0 (%0)

Tablo-6. Hastaların TLR4 polimorfizmi ve koroner hastalığı mevcudiyeti ve yaygınlığına göre dağılımı

		Thr/Thr	Thr/Ile+Ile/Ile	Toplam	P değeri
Hipertansiyon	Var	142 (%92)	13 (%8)	155	0,028
	Yok	36 (%80)	9 (%20)	45	
Hiperlipidemi	Var	57 (%92)	5 (%8)	62	0,374
	Yok	121 (%88)	17 (%12)	138	
Diyabetes mellitus	Var	75 (%91)	7 (%9)	82	0,353
	Yok	103 (%87)	15 (%13)	118	
Aile öyküsü	Var	33 (%82)	7 (%18)	40	0,142
	Yok	145 (%91)	15 (%9)	160	
Obezite	Var	75 (%89)	9 (%11)	84	0,912
	Yok	103 (%89)	13 (%11)	116	

Tablo-7. TLR4 Thr399Ile polimorfizmi ile risk faktörleri arasındaki ilişki

Kontrol ve hasta grubunun TLR 4 Thr399Ile polimorfizmi sonuçlarını genotip (Erkek P=0.46; Kadın P= 0.65) ve allel sıklığı (Erkek P=0.79; Kadın P= 0.64) açısından cinsiyet faktörüne göre düzenlediğimizde de, istatistiksel açıdan anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Tablo-8).

	Erkek		Kadın	
	Kontrol	Hasta	Kontrol	Hasta
Thr/Thr Genotipi	20 (%83)	66 (%87)	24 (%92)	68 (%92)
Thr/Ile Genotipi	4 (%17)	10 (%13)	2 (%1)	4 (%5)
Ile/Ile Genotipi	0 (%)	0 (%)	0 (%0)	2 (%1)
Thr Allel Sıklığı	0,92	0,93	0,96	0,97
Ile Allel Sıklığı	0,08	0,07	0,04	0,03

Tablo-8. Cinsiyet faktörüne göre kontrol ve hasta grubunun TLR 4 Thr399Ile polimorfizmi ile ilgili genotip ve allel sıklıklarının dağılımı

6.TARTIŞMA

Çalışmamızda TLR4 Thr399Ile polimorfizmi ile koroner arter hastalığı ve yaygınlığı arasındaki ilişki araştırılmış ve herhangi bir ilişki tespit edilmemiştir. Literatürde KAH ile TLR4 Thr399Ile polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmaya rastlanmamıştır. Bununla beraber TLR4 Thr399Ile polimorfizmi ile ateroskleroz ve kardiyovasküler parametreler arasındaki ilişkiyi araştıran birçok çalışma mevcuttur.

Bu çalışmaların bazılarında KAH'larındaki MI riski araştırılmıştır; Edfeldt ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada TLR4 299Gly ve 399Ile polimorfizmleri ile MI arasındaki ilişki araştırılmış ve TLR4 299Gly ve 399Ile genotiplerinin kombine bulunduğu erkeklerde MI riskinde artma saptanmıştır (39). Bununla beraber, Koch ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada TLR4 Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmleri ile MI arasında ilişki tespit edilmemiştir (33).

Bu çalışmaların bazılarında ise statin kullanan KAH'larında TLR4 polimorfizmlerinin MI riskine olan etkisi incelenmiştir; Boekholdt ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, TLR4 Asp299Gly ve Thr399Ile genotip kombinasyonları ile KAH risk faktörleri ve tedaviye verilen yanıt arasında ilişki araştırılmış ve her iki genotip ile KAH risk faktörleri arasında herhangi bir ilişkisi tespit edilmemiş fakat statin kullanan 299Gly alleleline sahip hastaların kardiyovasküler olaylar açısından daha düşük bir riske sahip oldukları tespit edilmiştir (25). Benzer şekilde, Holloway ve ark. yaptığı çalışmada da KAH'ları MI riski açısından TLR4 Asp299Gly polimorfizmi yönünden değerlendirilmiş ve Boekholdt ve arkadaşlarının çalışmasındaki gibi sadece statin kullanan 299Gly alleleline sahip hastaların MI için düşük risk taşıdığı tespit edilmiştir (26).

Çalışmaların bazılarında TLR4 polimorfizmlerinin KAH'larındaki restenoz riskine olan etkisi incelenmiştir; Beijck ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada TLR4-Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmleri ile restenoz ve hedef damar revaskülarizasyonu arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır (30). Rittersma ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada TLR4 Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmleri ile restenoz ve kan sitokin düzeyleri (IL-1 β , IL-6, TNF α , ve IL-10) arasında ilişki saptanmamıştır. Bu çalışma da lezyonun total oklüde olması, erkek cinsiyet, hipertnasyon ve stabil olmayan angina pektoris restenoz için tahmin edici bulunmuştur (34).

TLR4 polimorfizmlerinin serabral iskemi ve karotis intima medya kalınlığına olan etkisini inceleyen çalışmalarda; Reisman ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Asp299Gly ve

Thr399Ile polimorfizmleri ile serebral iskemi arasında ilişki tespit edilmemiştir (28). Norata ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada TLR4 Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmleri ile karotis intima-medya kalınlığı arasında ilişki görülmemiştir (40). Yuan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada TLR4 Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmleri ile karotis intima-medya kalınlığı arasında ilişki tespit edilmemiştir (29). Labrum ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada TLR2 ve TLR4 Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmleri ile karotis intima-medya kalınlığı arasında ilişki görülmemiştir (41).

Yapılan diğer çalışmalarda farklı aterosklerotik bulgular ile TLR4 Asp299Gly polimorfizmi arasında ilişki incelenmiştir. Bu çalışmaların bazılarında TLR4 Asp299Gly polimorfizmin etkisi tespit edilmiştir; Kiechl ve ark. yaptığı çalışmada Asp299Gly polimorfizminin ateroskleroza ve karotis intima kalınlığına etkisi tespit edilmiştir (26). Ameziane ve ark. yaptığı çalışmada ise Asp299Gly polimorfizmi ile akut koroner olaylar arasında ilişki tespit edilmiştir (42).

TLR4 Asp299Gly polimorfizmi ile yapılan diğer çalışmalarda ise bu polimorfizmin herhangi bir etkisi tespit edilmemiştir. Zee ve ark. yaptığı çalışmada Asp299Gly polimorfizmi ile MI ve inme arasında ilişki görülmemiştir (26). Hernesniemi ve ark. yaptığı çalışmada da Asp299Gly polimorfizmi ile MI arasında ilişki bulunamamıştır (32). Haman ve ark. yaptığı çalışmada Asp299Gly polimorfizmi ile restenoz arasında ilişki görülmemiştir. Yang ve ark. çalışmada Asp299Gly polimorfizmi ile koroner arter hastalığı progresyonunu arasında ilişki saptanmamıştır. Morange ve ark. yaptığı çalışmada da Asp299Gly polimorfizmi ile koroner arter hastalığı progresyonu arasında ilişki görülmemiştir (26). Berg ve ark. yaptığı çalışmada TLR4 Asp299Gly polimorfizmi ile koroner arter hastalığı arasındaki ilişki saptanmamıştır (43). Netea ve ark. yaptığı çalışmada Asp299Gly polimorfizmi ile ateroskleroz progresyonu arasında ilişki saptanmamıştır (26). Hommels ve ark. 140 hipertansif bireyi abdominal aorta ve renal arterlere yapılan dijital subtraction anjiyografi ile aterosklerotik lezyonların varlığı yönünden değerlendirmiştir. Hastalığın yaygınlığına abdominal aorta sınırlı olması, tek taraflı renal arter stenozu ve çift taraflı renal arter stenozu olmasına göre karar verildiği çalışmada Asp299Gly polimorfizmi ile aortik ateroskleroz arasında ilişki görülmemiştir (44). Jussi ve ark. yaptığı çalışmada Asp299Gly polimorfizmi ile karotis intima-medya kalınlığı arasında ilişki gösterilememiştir(31).

Çalışmamızda TLR4 Thr399Ile polimorfizminde varyant allel sıklığı (399Ile) normal koroner arterli kontrol grubunda % 6 oranında saptandı. Yapılan çalışmalarda TLR4 Thr399Ile polimorfizmlerindeki varyant allel sıklığı %5-10 sıklığında görülmektedir (45,46).

Türk toplumunda ise çeşitli çalışmalardaki kontrol gruplarında varyant allel sıklığı %2-%5 sıklığında görülmektedir (47-49). Çalışmamızın kontrol grubu koroner arter risk faktörleri olan ve non-invaziv testlerde iskemi saptanan hastalar olduğu için türk toplumunu tam olarak yansıtmayabilir.

Çalışmamızda hipertansiyon dışındaki KAH risk faktörleri ile TLR4 Thr399 ile polimorfizmi arasında herhangi bir ilişki tespit edilmemiştir. Hipertansiyonu olanlarda TLR 4 Thr399Thr genotipi daha fazla olarak tespit edilmiştir (p=0,028). Hasta sayımızın az olması, çoğunluğunun koroner arter hastaları olması ve kontrol grubumuzun risk faktörleri olan, invaziv olmayan değerlendirmede iskemisi olan bireyler olmasından dolayı bu bulgunun ek hastalığı olmayan bireyler üzerinde yapılan başka bir çalışmayla doğrulanması gerekmektedir.

7.KAYNAKLAR

- 1- J. Michael Gaziano. A textbook of cardiovascular medicine-braunwald. Eighth edition. Global burden of cardiovascular disease. 2008. Philadelphia
- 2- Avrupa Klinik Uygulamada Kardiyovaskuler Hastalıklardan Korunma Kılavuzu European Heart Journal (2007)
- 3- Elizabeth G. Nabel. A textbook of cardiovascular medicine-braunwald. Eighth edition.principales of cardiovascular biology and genetics. 2008. Philadelphia
- 4-Silvia G. Priori,Carlo Napolitano, Stephen Humphries, Maria Cristina Digilio, Paul Kotwinski, Bruno Marino. ESC texbookk of cardiovascular medicine.2006.kardiyovaküler hastalıkların genetiği.
- 5- Review Toll like receptor 4 in atherosclerosis and plaque destabilization. Wijnand K. den Dekkera, Caroline Chenga, Gerard Pasterkampb, Hencricus J. Duckersa (Atherosclerosis 209 (2010) 314–320)
- 6- Toll-Like Receptors-New Therapeutic Targets for the Treatment of Atherosclerosis, Acute Coronary Syndromes, and Myocardial Failure. Benjamin Erickson, MD, Kirk Sperber, MD, William H. Frishman, MD . Cardiology in Review • Volume 16, Number 6, November/December 2008
- 7- Armant MA, Fenton M. Toll-like receptors: a family of pattern recognition receptors in mammals. Genome Biol 2002; 3:3011–16.
- 8- Mc Gettrick AF, O’Neill LA. Toll-like receptors: key activators of leucocytes and regulator of haematopoiesis. Br J Haematol. 2007; 139(2):185-93.
- 9- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol. 2004; 4:499-511.
- 10- Pesare C, Medzhitov R. Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation. Immunity 2005; 22:397–9.
- 11- Cook DN, Pisetski DS, Schwartz DA. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. Nat Immunol 2004; 5:975–79.
- 12-Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E. TLR 4 polymorpisms and atherogenesis. N Engl J Med 2002; 347:185-92

- 13-Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M. TLR 4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000;25:187-91
- 14-Xu XH, Shah PK, Faure E, Equils O, Thomas L, Fishbein MC. TLR 4 expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation* 2001;104:3103-8
- 15-Faure E, Equils O, Sieling PA, Thomas L, Zhang FX, Kirschning CJ. Bacterial lipopolysaccharide activates NF-kappaB through TLR 4 in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem* 2000;275:11058-63.
- 16- Bart Ferwerda, Matthew BB McCall, Karlijn Verheijen, Bart-Jan Kullberg. Functional Consequences of Toll-like Receptor 4 Polymorphisms. *Mol Med* 2008; 14:346-352.
- 17- Bart Ferwerda, Matthew B. B. McCalla, Santos Alonsod. TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:16645-50.
- 18- Takeishi Y, Kubota I. Role of Toll-like receptor mediated signaling pathway in ischemic heart. *Front Biosci.* 2009 Jan 1;14:2553-8
- 19-Hernesniemi J, Lehtimäki T, Rontu R, Islam MS, Eklund C, Mikkelsen J, Ilveskoski E, Kajander O, Goebeler S, Viiri LE, Hurme M, Karhunen PJ. Laboratory of Atherosclerosis Genetics, Department of Clinical Chemistry, Tampere University Hospital and the Medical School at the University of Tampere, Finland. Toll-like receptor 4 polymorphism is associated with coronary stenosis but not with the occurrence of acute or old myocardial infarctions. *Scand J Clin Lab Invest.* 2006;66(8):667-75
- 20- Robbins basic pathology. Chapter 11. Blood vessels. V. Kumar, A. Abbas, N. Fausto, Mitchell. 2008. 8th edition. Philadelphia.
- 21- Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report. National Cholesterol Education Program National Heart, Lung, and Blood Institute. National Institutes of Health, NIH Publication No. 02-52.15 September 2002

- 22- Toll-Like Reseptörler ve Protozoon Enfeksiyonlarındaki Rollerini. Abdullah INCI, Zuhâl BISKIN. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 4(2) 121-128, 2007
- 23- Single step high-throughput determination of Toll-like receptor 4 polymorphisms. van Rijn BB, Roest M, Franx A, Bruinse HW, Voorbij HA. J Immunol Methods. 2004 Jun;289 (1-2):81-7.
- 24- Lack of association between polymorphisms of the toll-like receptor 4 gene and cerebral ischemia. Peter Reismann, Christoph Lichy, Gottfried Rudofsky, Per M.Humpert, Just Genius, Tuan-Dong Si, Christof Dörfer, Armin J. Grau, Andreas Hamann, Werner Hacke, Peter P.Nawroth, Angelika Bierhaus. J Neurol (2004) 251 : 853–858
- 25- Variants of Toll-Like Receptor 4 Modify the Efficacy of Statin Therapy and the Risk of Cardiovascular Events. S. Matthijs Boekholdt, Willem R.P. Agema, Ron J.G. Peters, Aeilko H. Zwinderman, Ernst E. van der Wall, Pieter H. Reitsma, John J.P. Kastelein and J. Wouter Jukema. Circulation 2003, 107:2416-2421
- 26-Mechanisms of Disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. Stefan Frantz, Georg Ertl and Johann Bauersachs.2007.
www.nature.com/clinicalpractice/doi:10.1038/ncpcardio0938
- 27-Toll-like receptor (TLR)-9 promoter polymorphisms and atherosclerosis. Lutz Hamann, Christiane Glaeser, Axel Hamprecht, Michael Gross, Abuzeid Gomma, Ralf R. Schumann. Clinica Chimica Acta 364 (2006) 303 – 307
- 28- Lack of association between polymorphisms of the toll-like receptor 4 gene and cerebral ischemia. Peter Reismann, Christoph Lichy, Gottfried Rudofsky, Per M.Humpert, Just Genius, Tuan-Dong Si, Christof Dörfer, Armin J. Grau, Andreas Hamann, Werner Hacke, Peter P.Nawroth, Angelika Bierhaus. J Neurol (2004) 251 : 853–858
- 29- Lack of the Toll-Like Receptor 4 Gene Polymorphisms Asp299Gly and Thr399Ile in a Chinese Population. Yuan M, Xia J, Ma L, Xiao B, Yang Q. Int J Neurosci. 2010 Jun;120(6):415-20.
- 30- Toll-like receptor 4 gene polymorphisms show no association with the risk of clinical or angiographic restenosis after percutaneous coronary intervention. Beijk MA, Boekholdt SM, Rittersma SZ, Pons D, Zwinderman AH, Doevendans PA, Tio RA, Tijssen JG, Jukema JW, de Winter RJ. Pharmacogenet Genomics. 2010 Sep;20(9):544-52.

- 31- Toll-like receptor 4 gene (Asp299Gly) polymorphism associates with carotid artery elasticity. The cardiovascular risk in young Finns study. Jussi A. Hernesniemi, Olli T. Raitakari, Mika Kähönen, Markus Juonala, Nina Hutri-Kähönen, Jukka Marniemi, Jorma Viikari, Terho Lehtimäki. *Atherosclerosis* 198 (2008) 152–159
- 32- Toll-like receptor 4 polymorphism is associated with coronary stenosis but not with the occurrence of acute or old myocardial infarctions. Hernesniemi J, Lehtimäki T, Rontu R, Islam MS, Eklund C, Mikkelsen J, Ilveskoski E, Kajander O, Goebeler S, Viiri LE, Hurme M, Karhunen PJ. *Scand J Clin Lab Invest.* 2006;66(8):667-75.
- 33- Toll-like receptor 4 gene polymorphisms and myocardial infarction: no association in a Caucasian population. Werner Koch, Petra Hoppmann, Arne Pfeufer, Albert Schömig, and Adnan Kastrati. *European Heart Journal* (2006) 27, 2524–2529. doi:10.1093/eurheartj/ehl231
- 34- Relationship between In Vitro Lipopolysaccharide-Induced Cytokine Response in Whole Blood, Angiographic In-Stent Restenosis, and Toll-Like Receptor 4 Gene Polymorphisms. Saskia Z.H. Rittersma, Johanna A. Kremer Hovinga, Karel T. Koch, S. Matthijs Boekholdt, Benien E. van Aken, Arko Scheepmaker, Matthijs Bax, Carl E. Schotborgh, Jan J. Piek, Jan G.P. Tijssen, Pieter H. Reitsma, and Robbert J. de Winter¹. *Clinical Chemistry* 51:3. 516–521 (2005)
- 35- TLR4 gene polymorphisms: evidence for protection against type 2 diabetes but not for diabetes-associated ischaemic heart disease. Manolakis AC, Kapsoritakis AN, Tiaka EK, Sidiropoulos A, Gerovassili A, Satra M, Vamvakopoulou D, Tsiopoulos F, Papanas N, Skoularigis I, Potamianos SP, Vamvakopoulos N. *Eur J Endocrinol.* 2011 Aug;165(2):261-7. Epub 2011 May 31.
- 36- Effects of toll-like receptor-4 gene polymorphisms on soluble P-selectin and von Willebrand factor levels in hypercholesterolemic patients. Di Nisio M, Di Febbo C, Moretta V, Guglielmi MD, Stuppia L, Cuccurullo F, Porreca E. *Thromb Haemost.* 2007 Sep;98(3):642-6.
- 37-Jeffery J. Popma. Coronary arteriography and intravascular imaging. A textbook of cardiovascular medicine-braunwald. 8th edition. 2008. Philadelphia
- 38-Wittwer, C.T., Ririe, K.M., Andrew, R.V., David, D.A., Gundry, R.A. and Balis, U.J.,. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *BioTechniques* 1997; 22,176–181.

- 39- Association of hypo-responsive toll-like receptor 4 variants with risk of myocardial infarction. Kristina Edfeldt, Anna M. Bennet, Per Eriksson, Johan Frostegard, Björn Wiman, Anders Hamsten, Göran K. Hansson, Ulf de Faire, Zhong-qun Yan. *European Heart Journal* (2004) 25, 1447–1453
- 40- Effect of the Toll-like receptor 4 (TLR-4) variants on intima-media thickness and monocyte-derived macrophage response to LPS. G. D. Norata, K. Garlaschelli, M. Ongari, S. Raselli, L. Grigore, F. Benvenuto, F. M. Maggi & A. L. Catpano. *Journal of Internal Medicine* 2005; 258: 21–27
- 41- Toll Receptor Polymorphisms and Carotid Artery Intima-Media Thickness. Robyn Labrum, Steve Bevan, Matthias Sitzer, Matthias Lorenz and Hugh S. Markus. *Stroke* 2007, 38:1179-1184: originally published online March 1, 2007
- 42- Association of the Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism with acute coronary events. Nejma Ameziane, Tiphaine Beillat, Patrice Verpillat, Sylvie Chollet-Martin, Marie-Claude Aumont, Patrick Seknadji, Maryse Lamotte, Dominique Lebret, Véronique Ollivier, Dominique de Prost. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, 23:e61-e64: originally published online October 16, 2003
- 43- The Additive Contribution from Inflammatory Genetic Markers on the Severity of Cardiovascular Disease. K. K. Berg, H. O. Madsen, P. Garred, R. Wiseth, S. Gunnes, V. Videm. *CLINICAL IMMUNOLOGY*. 69, 36–42. 2009
- 44- The Asp299Gly Toll-like receptor 4 polymorphism in advanced aortic atherosclerosis. M.J. Hommels¹, A.A. Kroon¹, M.G. Netea, P.W. de Leeuw, C.A. Bruggeman, T. Leiner, D.A. Koster, A.F.H. Stalenhoef, A.J.A.M. van der Ven. *Netherlands- the journal of medicine*. JUNE 2007, Vol.65, No.6
- 45- Functional Consequences of Toll-like Receptor 4 Polymorphisms. Bart Ferwerda, Matthew BB McCall, Karlijn Verheijen, Bart-Jan Kullberg, André JAM van der Ven, Jos WM Van der Meer, and Mihai G Netea. www.molmed.org . doi: 10.2119/2007-00135. Ferwerda
- 46- Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. Review. Nicolas W J Schröder and Ralf R Schumann. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 156–64

47- TLR-2 Arg753Gln, TLR-4 Asp299Gly, and TLR-4 Thr399Ile polymorphisms in Henoch Schonlein purpura with and without renal involvement. Alper Soylu · Sefa Kızıldağ · Salih Kavukçu · Sultan Cingöz · Mehmet Türkmen · Belde Kasap Demir · Meral Sakızlı. Rheumatol Int (2010) 30:667–670

48- The effect of polymorphisms at the CD14 promoter and the TLR4 gene on asthma phenotypes in Turkish children with asthma. C. Saçkesen, C. Karaaslan, O. Keskin, N. Tokol, F. Tahan, E. Civelek, O. U. Soyer, G. Adalıoğ lu, A. Tuncer, E. Birben, C. Öner, O. Kalaycı. Allergy 2005; 60: 1485–1492

49- uzmanlık tezi. Dr. Özgün Kiriş Satılmış. Tez danışmanı: Prof. Dr. İlknur Kaleli. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji ABD. Böbrek transplantasyonunda TLR4 polimorfizmi ve MBL seviyelerinin değerlendirilmesi. 2011