



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**CD 36 GEN POLİMORFİZMİ İLE ATEROSKLEROZ
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN İNCELENMESİ**

FARUK TAMTÜRK
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. NESRİN KARTAL ÖZER

İSTANBUL-2007

TEŞEKKÜRLER

Sayın **Prof Dr. Nesrin Kartal Özer'e**

yüksek lisans eğitimim sürecinde göstermiş olduğu değerli katkı ve
yönlendirmelerinden dolayı

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalının öğretim üyeleri;

Prof. Dr. Kaya Emerk'e

Prof. Dr. Yavuz Taga'ya

Prof. Dr. A. Süha Yalçın'a

Prof. Dr.Serpil Bilsel'e

Prof. Dr. Goncagül Haklar'a

Prof. Dr. Önder Şirikçi

ve

çalışanlarına

yüksek lisans eğitimimdeki katkılarından dolayı

Academic Hospital Biyokimya laboratuvarı çalışanlarına

hasta örneklerinin toplanması sırasında yardımlarından dolayı

Amerikan Hastanesi Genetik Departmanı Başkanı Sayın Dr. Nesrin Erçelen'e

hastane laboratuvarında sağladığı imkanlardan dolayı

Amerikan hastanesi laboratuvarını kullanırken bana çok büyük yardımları bulunan

Burcu Yazar ve Havva Cömert'e

Grup arkadaşlarım **Nurgül Aytan** ve **Burak Yazgan'a** tezimin tamamlanması

sürecinde bana verdikleri destekten dolayı

ve son olarak

tüm eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen

AİLEME

desteklerinden dolayı

TEŞEKKÜR EDERİM.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	IV
ŞEKİL, RESİM VE TABLOLARIN LİSTELERİ	V
i. Şekillerin Listesi	V
ii. Resimlerin Listesi	V
iii. Tabloların Listesi	V
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1. Ateroskleroz	4
4.1.1. Aterosklerozun Patogenezi	4
4.1.2. Ateroskleroza Yol Açan Risk Faktörleri	7
4.1.3. Ateroskleroz ve Genler	10
4.2. CD36 Reseptörü	13
4.2.1. CD36 Reseptörünün Protein ve Gen Yapısı	13
4.2.2. CD36 Reseptörünün Önemi	15
5. GEREÇ VE YÖNTEMLER	20
5.1. Gereçler	20
5.1.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	20
5.1.2. Çözeltiler	20
5.1.2.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler	20
5.1.2.2. Agaroza Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler	22
5.2. Yöntemler	22
5.2.1. Deney Planı	22
5.2.2. Vücut Kitle İndekslerinin Hesaplanması	23
5.2.3. Kan Tetkiklerinin Prensipleri	23
5.2.3.1. Serum Total Kolesterol Düzeylerinin Ölçülmesi	23
5.2.3.2. Serum HDL-Kolesterol Düzeylerinin Ölçülmesi	23
5.2.3.3. Serum VLDL-Kolesterol Düzeylerinin Ölçülmesi	24
5.2.3.4. Serum LDL-Kolesterol Düzeylerinin Ölçülmesi	24

5.2.3.5. Serum Trigliserit Düzeylerinin Ölçülmesi	24
5.2.3.6. Serum Glukoz Düzeylerinin Ölçülmesi	24
5.2.4. Periferik Kandan DNA İzolasyonu	24
5.2.5. DNA Saflık Tayini	25
5.2.6. DNA Konsantrasyonunun Hesaplanması	25
5.2.7. CD36 C478T Gen Polimorfizminin Gösterilmesi	25
5.2.8. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	26
6. BULGULAR	27
7. TARTIŞMA	30
8. EKLER	33
9. KAYNAKLAR	37
10. ÖZGEÇMİŞ	47
11. ETİK KURUL ONAYI	48

KISALTMALAR

AGE	İlerlemiş glikasyon son ürünleri “Advanced Glycation End Products”
Apo E	Apolipoprotein E
BMI	Vücut kitle indeksi “Body Mass Index”
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoproteinler “High Density Lipoproteins”
ICAM-1	İntraselüler hücre adezyon molekülü-1 “Intracellular Cell Adhesion Molecule-1”
LDL	Düşük yoğunluklu lipoproteinler “Low Density Lipoproteins”
LIMP-II	Lizozomal integral zar protein II “Lysosomal Integral Membrane Protein II”
OxLDL	Okside olmuş düşük yoğunluklu lipoproteinler “Oxidized Low Density Lipoproteins”
SR-A	Çöpçü reseptör-A “Scavenger Receptor-A”
SR-BI	Çöpçü reseptör sınıf B tip I “Scavenger Receptor Class B Type I”
TGF- β	Değiştirici büyüme faktörü beta “Transforming Growth Factor Beta”
VCAM-1	Vasküler hücre adezyon molekül-1 “Vascular Cell Adhesion Molecule-1”
VLDL	Çok düşük yoğunluklu lipoproteinler “Very Low Density Lipoproteins”

ŞEKİL, RESİM VE TABLOLARIN LİSTESİ

i. ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 4.1. Yağlı çizgi lezyon gelişimindeki başlangıç olaylar

Şekil 4.2. Lezyon gelişimi

Şekil 4.3. CD36 geninin şematik gösterimi

Şekil 4.4. CD36 proteinin şematik olarak yapısı

ii. RESİMLERİN LİSTESİ

Resim 6.1. CD36 C478T gen polimorfizmine ait % 4'lük agaroz jel görüntüsü

iii. TABLOLARIN LİSTESİ

Tablo 5.1. Bilgi Formu

Tablo 6.1. Grupların genel profilleri

Tablo 6.2. İncelenen parametrelerin gruplar arası karşılaştırılması

Tablo 6.3. Genetik profillerin karşılaştırılması

1. ÖZET

Ateroskleroz ve bu hastalığın miyokardiyal enfarktüs ve iskemik inme gibi başlıca komplikasyonları, tüm dünyada hala en önemli sağlık problemlerinden biridir. Ateroskleroz, mononükleer lenfositlerin intima tabakasına infiltrasyonu, damar düz kas hücrelerinin çoğalması ve ekstrasellüler matriks birikimi ile karakterize edilen damar duvarındaki hasara cevapla gelişen kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Artmış ve değişikliğe uğramış LDL, sigaranın neden olduğu serbest radikaller, hipertansiyon, diyabet, genetik değişiklikler, artmış plazma homosistein düzeyleri, enfeksiyona neden olan mikroorganizmalar ve/veya diğer faktörlerin etkileşimlerini içeren endotele bağlı fonksiyon bozukluğunu mümkün kılan sebepler ateroskleroza yol açmaktadır. Ateroskleroza yol açan mekanizmalar tamamiyle açık olarak bilinmemektedir. Ancak aterosklerozun oluşumunda köpük hücrelerin varlığı ve CD36 çöpçü reseptörlerinin önemi üzerinde durulmaktadır. CD36, damar duvarında monositlerden oluşan makrofajlar tarafından OxLDL'nin hücre içine alınmasında rol almaktadır. CD36, yağ asit ve lipid metabolizmasında fizyolojik bir role sahiptir. Bu molekülün ekspresyonunda veya aktivitesinde genetik çeşitlilik ateroskleroz riskinde bağımsız etkiye sahiptir. CD36'da oluşabilen C478T tipi bir polimorfizm, CD36 ekspresyonunda direkt olarak anlamlı azalmalara yol açmaktadır. Bu nedenle çalışmada, erişkin kişilerde C478T (Pro90Ser) polimorfizmi analiz edilmiştir. Total kolesterol, LDL kolesterol, HDL kolesterol, trigliseritler, glukoz düzeyleri, kan basınçları ve vücut kitle indeksi gibi aterosklerozla ilişkisi olan parametreler değerlendirilmiştir. Çalışmamızda, 125 kişiden sadece birinde heterozigot CD36 mutasyonu olduğu diğerlerinde C478 homozigot (yaban tip) olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, CD36 gen polimorfizmi ve ateroskleroza neden olan lipid profili arasındaki ilişkiyi araştırmak için geniş bir hasta grubu ve aynı zamanda farklı polimorfizmlerin ve CD36 ekspresyonunun incelenmesi planlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Ateroskleroz, CD36, Çöpçü Reseptör, Polimorfizm

2. SUMMARY

CD36 GENE POLYMORPHISM AND ITS ASSOCIATION WITH ATHEROGENIC LIPID PROFILE

Atherosclerosis and its major complications such as myocardial infarction and ischemic stroke are still a major health problem in the world. Atherosclerosis is now regarded as a chronic inflammatory disease developing in response to injury in the vessel wall and is characterized by the infiltration of mononuclear lymphocytes into the intima, migration and proliferation of vascular smooth muscle cells, and accumulation of extracellular matrix. Possible causes of endothelial dysfunction leading to atherosclerosis include elevated and modified LDL, free radicals caused by cigarette smoking, hypertension, and diabetes mellitus, genetic alterations, elevated plasma homocysteine concentrations, infectious microorganisms, and combinations of these or other factors. In atherosclerotic lesions, the nature of the inciting pathogen is not entirely clear. However, researchers focused on foam cells formation and importance of the CD36 scavenger receptors in the pathogenesis of atherosclerosis. CD36 is involved in the uptake of OxLDL by monocyte derived macrophages in the vascular wall, a key molecule of majority event for the initiation of atherosclerosis. CD36 has a physiological role in fatty acid and lipid metabolism. The genetic variability in the expression or activity of this molecule may have independent impact on the risk of atherosclerosis. The C478T substitution on CD36 directly leads to the significant reduction in CD36 expression. In this study, polymorphism C478T (Pro90Ser) were analyzed. Among the parameters which is related to atherosclerosis, total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, glucose concentrations, blood pressure and body mass index (BMI) were also evaluated. In our study, we detected only one heterozygous CD36 mutation, others displayed C478 homozygous (wild type) in 125 adults. In order to investigate relation CD36 gene polymorphism and atherogenic lipid profile, we are planning to study a larger group and investigate different polymorphisms, and expression of CD36.

Keywords: Atherosclerosis, CD36, Scavenger Receptor, Polymorphism

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Ateroskleroz, bütün ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de en başta gelen ölüm nedenlerinden biridir. Ateroskleroz, endotel hücre tabakasında harabiyet, düz kas hücrelerinin mediadan intimaya göçü, proliferasyonu ve köpük hücre oluşumu ile görülen bir durumdur (75). Şu ana kadar yapılan epidemiyolojik, klinik, genetik ve hayvan çalışmalarında aterosklerozun patogenezinde pek çok risk faktöründen söz edilmiş, bunların başında hiperkolesteroleminin geldiği bildirilmiştir (16). Ateroskleroza yol açan lezyonlarda biriken okside olmuş düşük yoğunluklu lipoproteinler (“Oxidized Low Density Lipoproteins”, OxLDL), düz kas hücreleri veya makrofajlarda bulunan çöpçü reseptör olarak adlandırılan CD36 reseptörü, tarafından hücre içine alınıp köpük hücre oluşumuna neden olmaktadır (87, 99). Yapılan çalışmalarda, CD36-eksik farelerde OxLDL’lerin alınımında % 60 bir azalma gözlenmiştir. Yine aynı çalışmada, ApoE/CD36-eksik farelerde OxLDL’in alınımının azaldığı ve ateroskleroza yol açan lezyon gelişiminin engellendiği gözlenmiştir (25). Çalışmalarda CD36’nın insülin, yağ metabolizması ve lipit metabolizmasında önemli bir fizyolojik rolü olduğunun saptanması, CD 36 geninin önemini artırmıştır.

Bu çalışmada, CD36 gen polimorfizmi ve bunun ateroskleroz ile ilişkisinin araştırılmasını planladık. Bu nedenle çalışmamızda, CD36 geninin 478. nükleotit noktasında sitozinden (C) timine (T) değişimin sonucu, CD36 gen ürününün 90. kodonunda CCT (Prolin)’den TCT (Serin)’ye değişimini gerçekleştiren tek nükleotit polimorfizmini kullandık ve bu polimorfizmle kan lipit profillerini karşılaştırmayı amaçladık.

4. GENEL BİLGİLER

Ateroskleroz ve komplikasyonları bütün dünyada en başta gelen ölüm nedenlerinden biridir. Genel olarak, aterosklerozun değişime uğramış lipoproteinler, monosit-türevi makrofajlar, T hücreleri ve damar duvarının normal hücresel elementleri arasındaki etkileşimlerle sonuçlanan kronik inflamasyonun bir şekli olabileceği düşünülmektedir. Bu inflamatuvar süreç, eninde sonunda damar lümeninin içine doğru ilerleyen kompleks lezyonların veya plakların gelişimiyle sonuçlanmaktadır. Plak yırtılması ile birlikte gerçekleşen tromboz, miyokardiyal enfarktüs ve inmenin akut klinik komplikasyonları ile sonuçlanır (75). Epidemiyoloji çalışmaları, pek çok genetik ve çevresel faktör arasında artmış serum kolesterol düzeylerinin, diğer bilinen risk faktörlerinin yokluğunda bile ateroskleroz gelişimine tek başına yeterli olduğunu göstermektedir (16).

4.1. Ateroskleroz

4.1.1. Aterosklerozun Patogenezi

Aterosklerozun patogenezi için çok sayıda teori öne sürülmüştür. Öne sürülen teorileri hasara cevap teorisi (74), değişime uğramış lipoprotein teorisi (85), düşük yoğunluklu lipoproteinlerin ("Low Density Lipoproteins", LDL) tutulması teorisi (95), hemodinamik bozukluklar teorisi (40) ve ateroskleroz için immünolojik hipotez (94) olarak sıralayabiliriz. Ateroskleroz hakkında güncel düşünce birçok başlatıcı ajanın herhangi birine ve çok etkenli patolojik mekanizmalara karşı damar duvarının cevabıyla ateroskleroza yol açan plakların gelişmesi olarak düşünülmektedir. 1973 yılında Ross ve Glomset (73), kronik hasara karşı damar cevabının aterosklerozla sonuçlandığı teorisini ortaya attılar. Daha sonra Ross ve diğerleri (74), hasara uğramış endotel hücrelerindeki değişikliklerin, endotelin geçirgenlik karakteristiğinde aksamaya neden olduğunu ve böylece bunun damar duvarı ve kanın elementleri arasında bir etkileşime izin verdiğini göstermişlerdir. Endotel hücre hasarından sonra endotel hücrelerindeki biyokimyasal sinyaller, koruyucu mekanizmaları indirgeyecek şekilde regüle etmekte ve yeni oluşan plateletlerde, monositler ve lenfositlerdeki protein sentezini artıracak şekilde regüle edip, bu durum da aşırı inflamatuvar ve fibroproliferatif cevapla sonuçlanmaktadır (14).

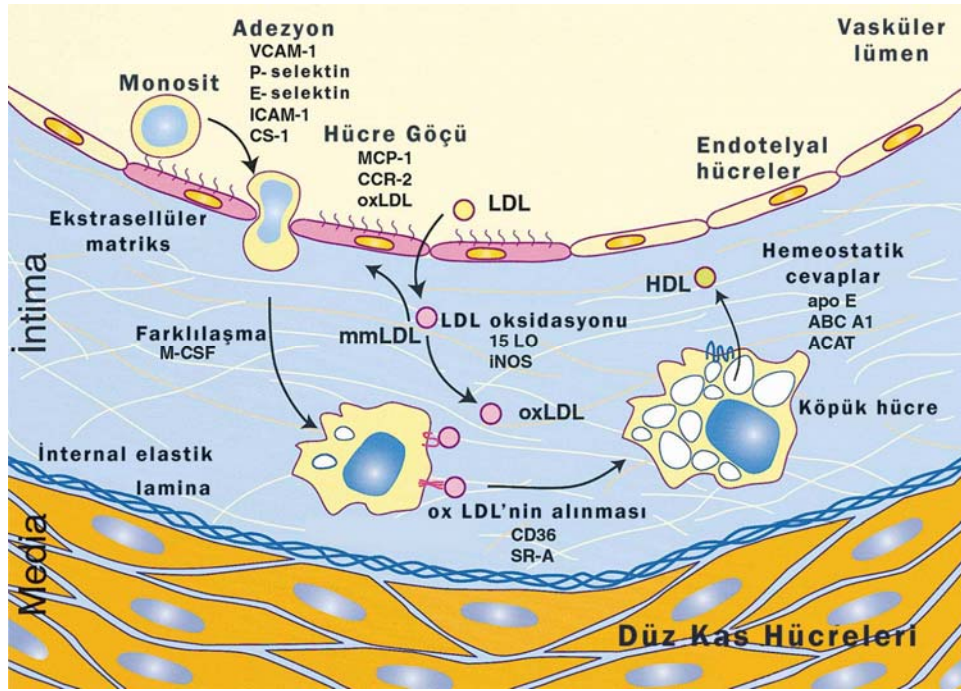
Endotel hücre hasarının nedenleri olarak, hipertansiyonla ilişkisi olan biyokimyasal ve mekaniksel güçler, diyabetle ilişkili olan glikozillenmiş proteinler, OxLDL ve sigara kullanımı bildirilmiştir. Endotel hasarına yol açan fiziksel faktörlerden “shear stress” ve kan akım türbülansı, fibroproliferatif cevabı uyarabilmekte ve ateroskleroz gelişimine neden olabilmektedir (14).

Endotel hücre hasarı sonucu endotel tabakası, kan kaynaklı elementlerin dokuların içlerine girişini sağlayabilen geçirgen bir bariyer gibi davranmaktadır. Endotel bariyerindeki bu bozulma, içeriye kolesterolce zengin lipoproteinlerin girişine de sebep olmaktadır. Aterosklerozda bir diğer fonksiyon değişikliği, endotel hücrelerinin aktivasyonu ile sitokinlerin ve adezyon moleküllerinin ekspresyonundaki artış olarak gösterilmektedir. Bu sitokinler ve adezyon molekülleri, lökositlerin damar duvarından hücrelerarası alana girişlerini düzenlemektedir (37).

Aterosklerozun ilk safhasından itibaren, LDL endotel altında bulunan matriks içerisinde birikmeye başlar (53). Doğal LDL sırayla, oksidasyon, lipoliz, proteoliz ve agregasyonu içeren değişikliklere maruz kalırlar ve bütün bu olaylar köpük hücre oluşumuna götüren inflamasyona sebep olmaktadır. Erken lezyon oluşumu için çok önemli değişikliklerden birisi, damar hücrelerinin oksidatif atıkların etkisine maruz kalmasının bir sonucu olan lipit oksidasyonudur (31).

Deneysel çalışmalarda, ateroskleroza neden olan diyetle başlanmasını takiben ışık mikroskopu altında endotel tabakasına yapışmış ve ayrıca intima tabakası ile damarın daha iç tabakalarında inflamatuvar hücrelerin bulunduğu gösterilmiştir (51). Monositleri, makrofajları ve lenfositleri (genellikle T hücreleri) içeren inflamatuvar hücreler, ateroskleroz gelişiminde kritik role sahiptir (75). Kemokinler, dolaşımdaki monositlerin ve lenfositlerin damarda endotel hasarın olduğu bölgelere yapışmalarını uyarır (55). E-selektin ve P-selektin, intrasellüler adezyon molekülleri olan damar hücre adezyon molekül-1 (“Vascular Cell Adhesion Molecule-1”, VCAM-1) ve intrasellüler hücre adezyon molekül-1 (“Intracellular Cell Adhesion Molecule-1”, ICAM-1)’i içeren endotelial adezyon molekülleri, inflamatuvar hücrelerin yuvarlanmasında, adezyonunun sağlanmasında ve bu hücrelerin damar duvarının içlerine girişinde özgül bir role sahiptir (82). İlk olarak monositler damar endotel tabakasına yapışırlar, subendotel alana doğru göç ederler ve makrofaj olabilmek için değişime uğrarlar (14).

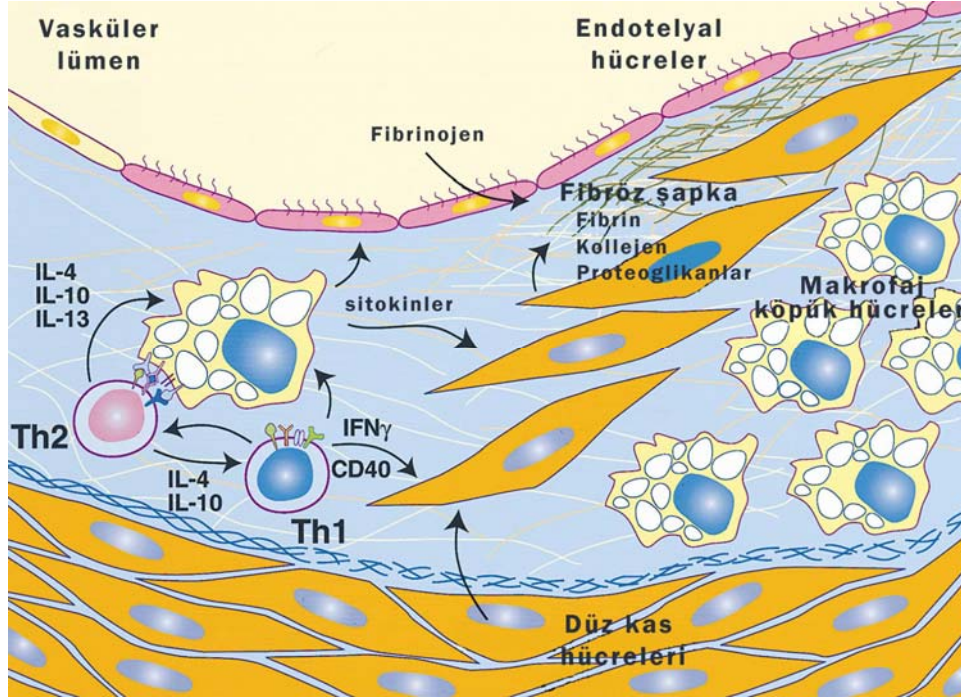
Damarın intima tabakasına geçen monositler, makrofajların morfolojik özelliklerini kazandıktan sonra köpük hücre oluşumuna neden olan bir seri değişikliğe maruz kalırlar (51). Gelişmiş makrofajlardaki köpük hücre oluşumları, yüksek miktarda kolesterol esterleri içerir ve aynı zamanda bu köpük hücreler erken ve geç lezyonların belirteçidir. Bu hücrelerde kolesterol birikimi, esas olarak LDL'in değişime uğramış formlarını tutan çöpçü reseptörler olarak adlandırılan reseptörler aracılığıyla gerçekleştirilir (99). Apo E-eksik farelerde, çöpçü reseptör-A ("Scavenger Receptor-A", SR-A) ve CD36'nın önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir. CD36/Apo E-eksik farelerde kontrol grubuna göre daha az ateroskleroz gelişimi ve lezyon alanında daha büyük azalma olduğu belirtilmiştir (Şekil 4.1) (25, 87).



Şekil 4.1. Yağlı çizgi lezyon gelişimindeki başlangıç olayları (16 no'lu kaynaktan alınmıştır)

Basit yağlı çizgiye geçiş, diğerlerine nazaran daha kompleks bir lezyondur. Yağlı çizgi, düz kas hücrelerinin sırasıyla medial tabakadan ve internal elastik laminadan geçerek subendotelin içine göçü olarak karakterize edilmektedir. İntima tabakasında bulunan düz kas hücreleri çoğalabilir ve değişime uğramış lipoproteinleri alabilir. Bunun sonucu olarak köpük hücre oluşumu ve hücrelerarası matriks proteinlerinin sentezi fibröz şapka oluşumuna neden olur (67, 75). Lezyon gelişiminin

bu safhası, monositler/makrofajlar ve T hücreleri arasındaki etkileşim sonucu oluşan hücresel ve humoral cevapların çeşitli türleri ve kronik inflamatuvar durumun birçok özelliklerinden etkilenmektedir (Şekil 4.2) (36).



Şekil 4.2. Lezyon gelişimi (16 no'lu kaynaktan alınmıştır)

Damar lümeninin daralmasının sonucu olarak iskemik semptomlar ve plak yırtılmasıyla oluşan tromboz, miyokardiyal enfarktüs ve inme gibi akut kardiyovasküler olaylara neden olabilmektedir (16).

4.1.2. Ateroskleroza Yol Açan Risk Faktörleri

İnsanlarda aterosklerozun gelişimi onlarca yıl almaktadır. Erken lezyon oluşumu adolösan dönemde başlar (49). Erişkinlerde, adolösan dönemdeki kişilerde ve genç erişkinlerde musküler ve elastik damarlarda artmış lezyonlara ve yağlı çizgilere sebep olan birçok önemli risk faktörleri saptanmıştır (58, 59, 81). Lezyon oluşum oranlarındaki farklılıklar ateroskleroz etiolojisinde birçok etkenli kompleks bir hastalık olması ve muhtemelen bu değişik faktörlere bireysel genetik yapıların farklı cevap vermesi ile açıklanmaktadır (13). Epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen veriler hiperkolesterolemi, sigara içilmesi, erkek cinsiyeti, hipertansiyon ve diyabet gibi birçok risk faktörünü geleneksel risk faktörlerinin arasında saymaktadır. Bununla birlikte, aynı

oranda önemlilik gösteren geleneksel olmayan risk faktörleri de vardır. Bunların içinde, kolesterolden başka ateroskleroza yönlendiren, baskın faktörlerden biri olan bağışıklık sistemi görülmektedir (34, 35, 38). Bu risk faktörlerinin bazılarının değerlendirme tablosunda yer alıp almayacakları hakkında tartışma vardır. Örneğin, “U.S. National Cholesterol Education Program” (NCEP)’inin benimsediği “Framingham” risk değerlendirmesine göre, geleneksel risk faktörlerinden yaş, cinsiyet, total kolesterol, LDL kolesterol, yüksek yoğunluklu lipoprotein (“High Density Lipoprotein”, HDL) kolesterol, sistolik kan basıncı ve sigara içilmesi baz alınmaktadır (91). Buna karşılık günümüzde, “Prospective Cardiovascular Münster” (PROCAM) programı yaş, LDL kolesterol, sigara kullanımı, HDL kolesterol, sistolik kan basıncı, erken miyokardiyal enfarktüsün aile geçmişi, diabetes mellitus ve trigliseritler gibi 8 değişkenden oluşan basit risk değerlendirme tablosunu benimsemektedir (9).

Önceki çalışmalar, kan lipit düzeylerinin ateroskleroza yol açan hastalıklar üzerinde artmış kötü etkilerini göstermiştir. İlk olarak, epidemiyolojik ve klinik çalışmalar total kolesterol ve koroner kalp hastalık riskleri arasında bir bağlantının olduğunu göstermektedir (21). Hem LDL hem de trigliseritçe zengin lipoproteinlerin katabolik kalıntıları olan şilomikronlar ve çok düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (“Very Low Density Lipoproteins”, VLDL) düzeylerindeki yükseliş aterosklozün kanıtıdır. Bu lipoproteinlerin düşük plazma düzeyleri bu hastalığı indirgemektedir. Artmış LDL’in kötü etkisine karşılık HDL’lerin düzeyleri ateroskloz gelişimi ile ters bağlantıya sahiptir. Hayvan çalışmaları, HDL ateroskloza yol açan bozukluklara karşı koruyucu olduğunu açıkça göstermektedir (12).

Epidemiyolojik bulgular, yüksek LDL kolesterol düzeylerinin ateroskloza yol açabileceğini göstermektedir (68, 97). “The Framingham Heart Study” (96), “Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT)” (84), ve “Lipid Research Clinics” (LRC) (52) programları, LDL kolesterol düzeyleri ile kardiyovasküler kalp hastalığına sahip olmayanlarda bu hastalığın yeni başlama oranları arasında doğrudan bir ilişki olduğunu göstermişlerdir.

Ateroskloz ilk olarak adölesan veya erken erişkinlik döneminde yapılan muayenelerde saptanmaktadır (60). Aterosklozun sonradan ortaya çıkma oranları, serum kolesterol düzeylerini de içeren çevresel risk faktörlerinin artışı ile doğru orantılıdır. Ayrıca, genç erişkinlerdeki kolesterol düzeyi sonraki hayatlarında

kardiyovasküler kalp hastalığı gelişimi hakkında bir şeyler söylemektedir. Uzun dönemde tamamlanan prospektif çalışmalar, genç erişkinlerde kolesterol düzeylerinin artması sonucu, orta yaş dönemlerine geldiklerinde artmış kardiyovasküler kalp hastalığı insidansı ile karşılaştıklarını göstermektedir (83). Artan LDL düzeylerinin kardiyovasküler kalp hastalığı oluşturma riski, hiperkolesterolemi'nin genetik formuna sahip kişilerde çok açık olarak gösterilmektedir. Bu kişilerde diğer risk faktörlerin tamamen yokluğunda bile ilerlemiş koroner ateroskleroz ve erken gelişen kardiyovasküler kalp hastalığı meydana gelmektedir. Bu bozukluk, LDL'in ateroskleroza neden olan önemli bir lipoprotein olduğunun çok güçlü bir kanıtı olduğunu göstermektedir (91).

LDL-kolesterol düzeyleri 100 mg/dL'den düşük kişiler, hayatları boyunca çok düşük kardiyovasküler kalp hastalığına yakalanma riskine sahiptirler, bu düzeyler bu toplum için optimal olarak adlandırılabilir. LDL-kolesterol düzeyleri optimal'e yakın (100–129 mg/dL) olduğu zamanlarda bile ateroskleroz ortaya çıkabilir, bundan dolayı bu düzeyler aynı zamanda optimalin yukarısı olarak da adlandırılabilir. 130–159 mg/dL arasındaki değerlerde ateroskleroz gelişimi anlamlı orana sahiptir, 160–189 mg/dL değerleri arasında ve çok yüksek (≥ 190 mg/dL) değerlerde iken ateroskleroz oluşumu çarpıcı şekilde bir ivme kazanmıştır (91).

Aterosklerozdaki inflamasyon sinyalleri damar duvarında lipit birikimine eşlik etmektedir (50). LDL oksidasyonu, endotel hasarına yol açan en önemli nedenlerdendir ve endotel hücrelerde proinflamatuvar moleküllerin ekspresyonunu uyarır. Değişime uğramış LDL'in ortadan kaldırılması, inflamatuvar cevabın davranışı için çok önemlidir (7).

Prospektif epidemiyolojik çalışmalarının birçoğunda, serum trigliserit düzeyleri ve kardiyovasküler kalp hastalıkları arasında pozitif bir bağlantının olduğu rapor edilmiştir (11). Ayrıca, artan serum trigliserit düzeyleriyle, total kolesterol, LDL kolesterol ve HDL kolesterol düzeyleri arasında anlamlı bir bağlantının bulunması oldukça şaşırtıcıdır. Ateroskleroza neden olan lipoprotein kalıntılarının yüksek düzeylerde ve trigliserit düzeylerinin ≥ 200 mg/dL olması, kardiyovasküler kalp hastalığına yakalanma oranlarında bir artışa sebep olmaktadır (86).

Epidemiyolojik bulgular, düşük serum HDL kolesterol düzeyleriyle artmış kardiyovasküler kalp hastalığı mortalitesine ve morbiditesine işaret etmektedir (96).

Buna karşın, yüksek HDL-kolesterol düzeyleri riskleri azaltmaktadır. Epidemiyolojik veriler, HDL-kolesterol düzeylerinde yüzde 1’lik bir azalışın kardiyovasküler kalp hastalığına yakalanma riskinde yüzde 2-3’lük bir artışa neden olduğunu göstermektedir (32). Bu çalışmalar, düşük HDL-kolesterol düzeylerinin kardiyovasküler kalp hastalığı için bağımsız bir risk faktörü olduğunu göstermektedir (10). Prospektif çalışmalarda, genellikle lipit risk faktörü olarak bulunan düşük düzeylerdeki HDL ile kardiyovasküler kalp hastalığı oluşma riski arasında çok yüksek bir bağlantı vardır. “Adult Treatment Panel II” (ATP II), düşük HDL-kolesterol (<35 mg/dL) düzeylerinin HDL’nin önemli risk faktörlerinden biri olan LDL-kolesterolü üzerindeki iyileştirici etkisini hafiflettiğini belirtmektedir. Düşük HDL-kolesterol düzeylerine sahip kadın ve erkeklerde aynı etkiler olmaktadır. Genetik olarak değiştirilmiş hayvanlarda yapılan çalışmalarda, yüksek HDL düzeylerinin ateroskleroza karşı koruyucu bir özellik olduğu gösterilmiştir (76, 90). *In vitro* modellerde HDL, ateroskleroza yol açan lezyonlardaki köpük hücrelerden kolesterolün geri akımını teşvik etmektedir (88). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, HDL’nin antiinflamatuvar ve antioksidan özelliklerinin ateroskleroz gelişimini engellediğini göstermektedir (93).

“The Sixth Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure” programı, ≥ 140 mmHg sistolik veya ≥ 90 mmHg diyastolik kan basınçlarını, hipertansiyon olarak tanımlamışlardır. Çok sayıda çalışmada, yüksek kan basıncının kardiyovasküler kalp hastalıkları için risk olduğu belirtilmiştir. Hipertansiyon ve yüksek serum kolesterolü sıklıkla birlikte bulunmaktadır (27, 92).

ABD’de tahmini 97 milyon kişi aşırı kiloya sahip veya obezdir. Obezite için vücut kitle indeksi ≥ 30 kg/m² ve aşırı kilo için 25–29.9 kg/m² olarak saptanmıştır. Aşırı kiloya sahip ve obez kişiler, dislipidemi (yüksek LDL-kolesterol, düşük HDL-kolesterol, yüksek VLDL ve yüksek trigliseritler), tip 2 diyabet ve hipertansiyonu içeren diğer kardiyovasküler kalp hastalığı risklerini taşımaktadır (64).

4.1.3. Ateroskleroz ve Genler

Genetik yatkınlığın, ateroskleroz için önemli bir risk faktörü olduğu öne sürülmektedir. Bazı çalışmalarda, ateroskleroz için riskin %50’si genetik yatkınlığa bağlanmaktadır (30). Bununla birlikte, bu çok etkenli bir hastalıktır ve aslında birçok gen çevreden etkilenmektedir. Ateroskleroza yatkınlığı sağlayan genleri saflaştırmamız

ve rollerini anlamamız için iki önemli deneysel yaklaşım vardır. İlk olarak, etkili genomik ve proteomik teknolojiler kullanılır ve ateroskleroza yol açan süreçte genlerin ekspresyonlarının, fonksiyonlarının ve etkileşimlerinin incelenmesinde kullanılır. Bu teknolojilerin ilerlemesiyle yaklaşık sayısı 30.000'i bulan insan genlerinin tümü ve bu genleri kodlayan proteinlerin analizleri mümkün olacaktır. Bu teknikleri hücrelere, hayvan modellerine ve insan doku örneklerine uygulanmasıyla, hastalığın başlaması ve gelişimi sırasındaki moleküler profilin saptanmasına imkan sağlayacaktır. Bu yaklaşımlar, damar duvarının moleküler yapısının açıklanmasına ve damar hastalıklarının gelişimine eşlik eden bazı değişikliklerin tanımlanmasına destek olacaktır (22).

İkinci önemli yaklaşım, insan popülasyonlarındaki genetik varyasyonların saptanmasıdır (22). Bu teknikler genlerde meydana gelen varyasyonların (genellikle tek nükleotit polimorfizmleri) analizini içermektedir. Tek nükleotit polimorfizmlerinin genom boyunca taranması ve tek nükleotit polimorfizmlerinin haritalanması gibi geliştirilmiş genotipleme teknikleri, insan genomundaki genel haplotiplerin tanımlanması, tüm genomu kapsayan lokus ilişki çalışmalarını kolaylaştırır. Bu noktada, yüksek-işlem hacimli genomik çalışmalar kullanılarak miyokardiyal enfarktüsü, prematür koroner arter hastalığı ve kalp hastalıkları için özgül aday genlerin bulunması sağlanabilir (63).

Bir tek nükleotit polimorfizminin, DNA'nın her 1000 baz çifti (bç)'nde meydana geldiği düşünülmektedir. Bu değişikliklerin birçoğunun total DNA'nın % 90'ını kapsayan kodlanmamış bölgelerdeki DNA dizilerinde bulundukları görülmektedir. Bu nedenle, genlerin içinde çok az sayıda tek nükleotit polimorfizmi bulunmaktadır. Eğer genetik kod değişmesi amino asit değişikliğine neden oluyorsa, kodlanan DNA dizilerindeki tek nükleotit polimorfizmleri belirli bir öneme sahip olabilirler. Hem intronlardaki hem de düzenleyici dizilerdeki tek nükleotit polimorfizmleri, transkripsiyonu etkileyebilir. Bazı tek nükleotit polimorfizmleri transkripsiyon düzeylerini azaltırken, diğer bazıları artırabilir (19). Polimorfizm bağlantı çalışmaları, kontrol popülasyonundaki genel bir hastalık prevalansı ile birbirleriyle bağlantılı olmayan genetik belirteç prevalansını karşılaştırır. Biyolojik yatkınlık saptanmadığı ve bilinmediği zaman, kardiyovasküler hastalık hakkında polimorfizm bağlantı çalışmaları yoluyla yorum yapabiliriz (63).

Yamada ve beraberindekiler (98), Japonya’da miyokardiyal enfarktüsli hastalarda ve kontrol hastalarda 71 aday gende 112 polimorfizmin prevalansını inceleyerek miyokardiyal enfarktüsün genetik varyantlarını saptamışlardır. Aday genler üzerindeki çalışmalar, aterosklerozla ilgili özellikler ile bu aday genlerin arasında anlamlı bir ilişkinin olduğunu göstermektedir. Hipertansiyon, diyabet ve diğer aterosklerozla ilgili özellikler için, aday genlerin birçoğunda polimorfizmlerin saptanması geniş bir çerçevede devam etmektedir (53).

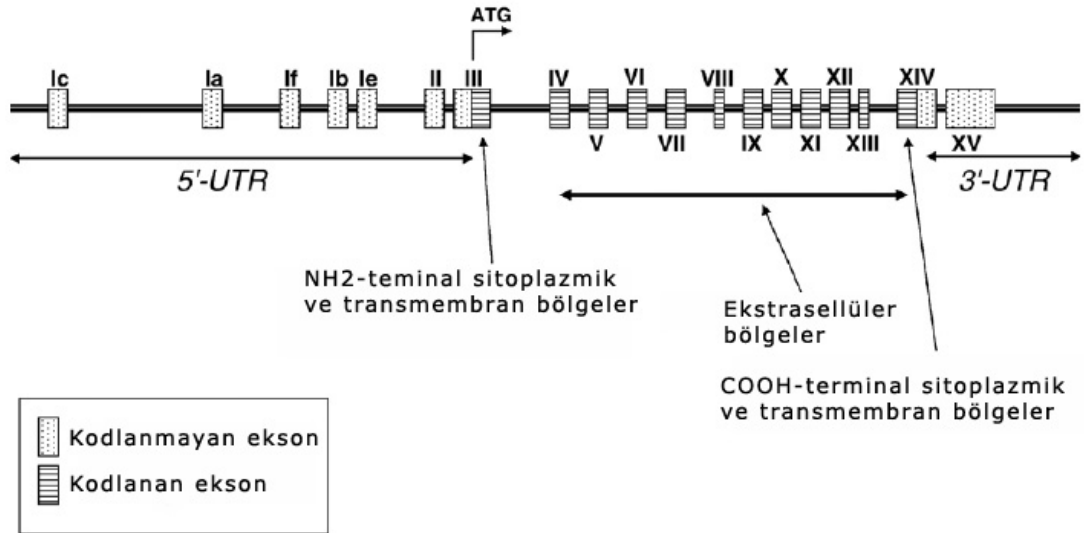
OxLDL’in CD36 aracılığıyla alınması, makrofajlarda köpük hücre oluşumunda ve ateroskleroz başlangıcında anahtar bir role sahiptir. Bu bulgular, CD36’yı diyabet ve ateroskleroz için iyi bir aday gen yapmaktadır (45). Asya ve Afrika toplumlarında CD36 eksikliğine veya ekspresyon kaybına sebep olan genetik polimorfizmler saptanmaktadır. Kashiwagi ve beraberindekiler (42), Tip II CD36-eksik bir Japon hastanın plateletlerinde CD36 geninin 478. nükleotidinde C’den T’ye yani 90. kodonundaki gen ürünleride CCT (Prolin)’den TCT (Serin)’ye değişimi saptamışlardır. Diğer bir çalışmada, Ser90 varyantına sahip hastaların kontrol grubuna göre daha yüksek serum serbest yağ asidi düzeylerine sahip olduğu gösterilmiştir, ancak serum kolesterol, serum trigliserit düzeylerinde veya insülin duyarlılığında bir değişiklik gözlenmemiştir (41). Lepretre ve beraberindekiler (46), Fransız beyaz ırk popülasyonunda, CD36 geninin 5’ dizilerinin -178 A/C pozisyonundaki tek nükleotit polimorfizm sıklığı ile diyabetik ailelerde adiponektin düzeyleri arasında bir ilişki saptamışlar ve insülin duyarlılığında zararlı bir etkisi olduğunu öne sürmüşlerdir. CD36 tek nükleotit polimorfizminin, yalnız obez diyabetik olmayan örneklerde lipid profiline zayıf katkısı bulunduğunu saptamışlardır. Obez örneklerde etkin insülin direnci olmasına rağmen, plazma trigliserit düzeylerinde polimorfizm ile anlamlı bir etki saptamamışlardır (45, 46).

Aterosklerozla birlikte adı geçen aday genlerin erken dönemde saptanması, yakın gelecekte genetik olarak hassas kişilere erken müdahale edilerek daha iyi bir risk kontrolü gerçekleştirilmesine izin verecektir. İlaç tedavisi ile genler arasındaki etkileşimler hakkında daha fazla bilgi edinilmesi gerekmektedir. Böylece farmakogenomik yaklaşımlar daha özgül ilaçların geliştirilmesi için yeni bir bakış açısı sunmaktadır (71).

4.2. CD36 Reseptörü

4.2.1. CD36 Reseptörünün Protein ve Gen Yapısı

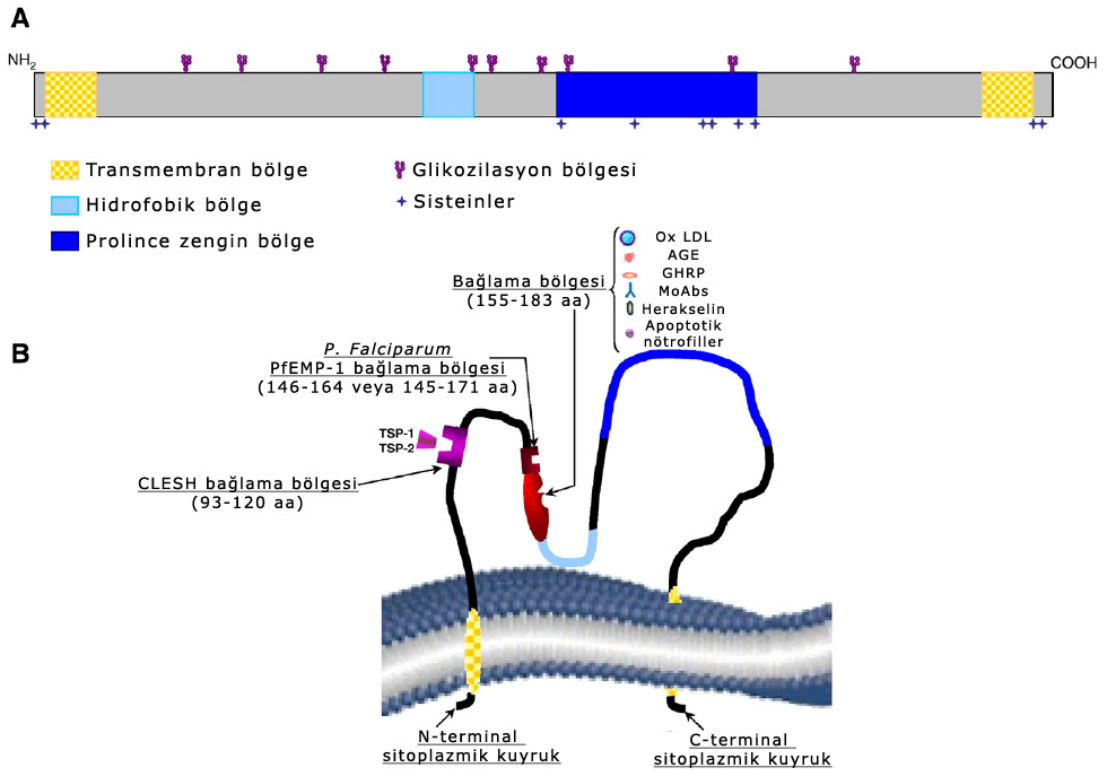
CD36, tek bir polipeptit zincirinden oluşan bir hücre yüzey glikoproteinidir. CD36 geni, insanlarda 7. kromozomun q11.2 bölgesinde, sıçanlarda 4. kromozom ve farelerde 5. kromozomda lokalize olmuştur. Bu genin nükleotit dizisinin büyük bir kısmı ekstrasellüler bölgede bulunan 471 amino asitlik bir transmembran proteini kodlamaktadır. CD36, çöpçü reseptör sınıf B tip I (“Scavenger Receptor Class B Type I”, SR-BI) ve lizozomal integral zar protein II (“Lysosomal Integral Membrane Protein II”, LIMP-II) reseptörleriyle, sınıf B çöpçü reseptör ailesini oluşturmaktadır (24).



Şekil 4.3. CD36 geninin şematik gösterimi (18 no’lu kaynaktan alınmıştır)

CD36’nın primer yapıları ve zar topografyaları son derece korunmuştur, memeli türleri arasında dizi homolojileri birbirine çok yakındır. CD36’nın, iki transmembran ve iki sitoplazmik bölgenin birleşmesi sonucu oluşan bir ekstrasellüler bölgeden oluşan ditopik konfigürasyona sahip bir protein olduğu düşünülmektedir. Tek zincirli olan proteinin karboksil ucunun hemen yakınında 27 amino asitlik hidrofobik transmembran bölge yer almaktadır. Çalışmalar iki transmembran bölge yapısı tarafında amino- ve karboksil uçlarının her ikisinin de palmitoilatlanmış sistein kalıntıları içerdiğini göstermiştir (80).

İzole edilmiş CD36 klonlarının analizleri, insanda 7. kromozomun q11.2 bandında bulunan CD36 geninin 15 ekson'dan oluştuğunu göstermiştir. İntron'ların büyüklükleri >5.9 kilobaz (kb) (intronlar III ve XIV)'dan 0.5 kb (intron II)'a değişmektedir (8). 15 eksondan oluşan genin CD36 proteinini kodlayan bölgeleri, ekson 3'ün bir parçası, ekson 4'ten ekson 13'e kadar olan eksonlar, ekson 14'ün bir parçasıdır (Şekil 4.3.) (18).



Şekil 4.4. CD36 proteininin şematik olarak yapısı. (A) CD36 proteininin primer yapısı. (B) CD36 reseptörünün hücre zarındaki gösterimi. (18 no'lu kaynaktan alınmıştır)

Ekstrasellüler bölge, N-bağlı glikozilasyon bölgelerince zengindir ve bir hidrofobik bölge (184-204 amino asitleri arasında lokalizedir) taşımaktadır. Ayrıca potansiyel olarak plazma zarı, bir proline zengin bölge (242-333 amino asitleri arasında lokalizedir) ve bazı fonksiyonel bölgeler ile etkileşebilmektedir. 155-183 amino asitleri arasında lokalize olan bir bölgeye, OxLDL, ilerlemiş glikozilasyon son ürünleri ("Advanced Glycation End Products", AGE) ve büyüme hormonu salgılayıcı peptitler olan heksarelin ve EP80317'nin bağlandığı saptanmıştır. CD36 üzerinde bulunan diğer OxLDL bağlanma bölgeleri olarak, 23-93 arasındaki amino asitleri

kapsayan bölge ve bu bölgenin yanında 120-155 arasındaki amino asitleri içeren bölgenin de olabileceği rapor edilmiştir (18). Leung ve beraberindekiler (47), 93-110 (ekson V tarafından kodlanan) ve 139-155 (birçoğu ekson VI tarafından kodlanır) amino asit bölgelerinin, trombospondin ile CD36 arasındaki etkileşimde ilişkisi olduğunu rapor etmişlerdir. Diğer taraftan, 97-110 (ekson V tarafından kodlanır) amino asitleri içeren bölge, CD36'nın *P. falciparum*-enfekte olmuş eritrositlerle bağlanmasını desteklemektedir (Şekil 4.4) (8).

Şekil 4.4.'de görüldüğü gibi sistein kümeleri, ekstremsellüler bölgenin karboksil-terminal bölgesinin bir kısmında lokalize olmuştur ve üç eksonda birbirini izleyen dağılımlar göstererek paylaşılmıştır. Bunlar, Cys-243'ün ekson VIII, Cys-272'nin ekson IX ve Cys-311, Cys-313, Cys-322, ve Cys-333'ün ekson X'dur (8).

4.2.2. CD36 Reseptörünün Önemi

CD36 reseptörü, başlangıçta bir platelet zar proteini ve trombospondin (TSP-1) reseptörü olarak tanımlanmıştır (89). Daha sonra sırasıyla, OxLDL için bir makrofaj reseptörü (20) ve adipositlerde bir yağ asit taşıyıcı olarak tanımlanmıştır (1). CD36 reseptörü, monositler/makrofajlar, plateletler, mikrovasküler endotel hücreler, adipositler, keratinositler, kardiyak ve iskelet kası hücreleri, retikülositler, mikroglia, dendritik hücreler, meme, bağırsak ve retinal pigment endotel hücreleri gibi oldukça fazla hücre ve doku tarafından sentez edilmektedir (Şekil 4.4) (18, 26). CD36, çöpçü reseptör fonksiyonları (apoptotik hücrelerin ve değişime uğramış LDL'nin tutulması), kardiyovasküler fonksiyon ve hastalıklar, kanser biyolojisi, parazitoloji, Alzheimer hastalığı, inme, lipid metabolizması ve yağ asit taşınması, adezyon, anjiyogenez, platelet biyolojisi, kas fonksiyonu ve metabolizması, inflamasyonun modülasyonu, değiştirici büyüme faktörü- β ("Transforming Growth Factor Beta", TGF- β)'nin aktivasyonu, ateroskleroz, diyabet ve kardiyomiyopati, ayrıca yiyecek seçimi gibi değişik normal ve patolojik süreçlerde göze çarpan önemli bir rol oynamaktadır (18, 26, 80).

Endemann ve beraberindekiler (20), CD36 aktarılmış insan epiteliyal böbrek hücreleri ile yaptıkları çalışmada, CD36'nın özgül olarak OxLDL bağlama kapasitesini ortaya koyarak ilk defa CD36'nın bir okside lipoprotein reseptörü olduğunu göstermişlerdir. Japon hastalardan alınan örneklerde yapılan çalışmada, bir CD36 gen polimorfizminin CD36 ekspresyon eksikliği ile sonuçlandığı gösterilmiştir. Bu hastalardan izole edilmiş monositlerden türevlenen makrofajlarda OxLDL'nin

bağlanması ve birikiminin kontrollerden türevlenen hücrelere göre %40 oranında azaldığı saptanmıştır (43). OxLDL'nin bağlanması ve hücre içine alınması düzeylerindeki düşüşü, aynı zamanda bir özgül monoklonal antikor olan OKM5'in, CD36 bağlama bölgesine OxLDL'nin bağlanmasını bloke ederek gerçekleştirdiğini saptamışlar ve OxLDL'nin normal makrofajlara bağlanmasını %50 oranında azalttığını göstermişlerdir (65). Malaud ve beraberindekiler, CD36'nın C-terminal domayininin OxLDL'nin reseptöre bağlanmasında ve hücre içine alınmasında çok önemli olduğunu göstermişlerdir (57).

Bununla birlikte değişik zaman periyotları altında yapılan çalışmalar, ateroskleroza yol açan lezyonlarda CD36'nın rolünün araştırılmasında ApoE ve CD36 eksikliğini birlikte taşıyan sıçan modellerinin oldukça önemli olduklarını göstermektedir (26). CD36'dan yoksun yapılmış sıçan peritoneal makrofajlarında, OxLDL'nin bağlanmasında ve endositozunda bir zayıflama olduğu gözlenmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, monosit/makrofajlar tarafından eksprese edilmiş CD36'nın, OxLDL endositozunda önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Makrofajlar tarafından OxLDL'nin alınması, ateroskleroz'un başlangıcı ve gelişiminin önemli bir basamağıdır. CD36 reseptörü, makrofajlar tarafından OxLDL'nin alınmasında önemli bir rol oynamaktadır ve insanlarda ateroskleroza yol açan lezyonlarda köpük hücre farklılaşması makrofajlar tarafından sağlanmaktadır (65). Ateroskleroza neden olan diyetle beslenen apo E-eksik hayvanlarda ilerlemiş lezyon gelişimi gözlenirken, hem CD36 hem de apo E eksik hayvanlarda tüm aorta boyunca lezyon alanında %77 oranında bir azalma gözlenmiştir. Normal besin ve batı tarzı diyetle beslenen hem CD36 hem de apo E eksik erkek hayvanlarda, aynı zamanda anlamlı olarak daha küçük aortik lezyonlar gelişmiştir. Bu sıçan modellerinde, CD36'nın proaterojenik lipidler için önemli bir reseptör olduğu gösterilmiştir (25).

Makrofaj/monositler tarafından OxLDL'lerin biriktirilmesindeki rolüne ek olarak CD36, uzun zincirli yağ asitleri için bir zar reseptörü/taşıyıcısı fonksiyonuna sahiptir. Yağ asit taşınmasını kolaylaştırıcı bir bileşenin varlığı ve bu süreçte CD36'nın önemli bir rolünün olduğunu destekleyen güçlü kanıtlar bulunmaktadır. Örneğin, CD36 ekspresyonu ile yağ asitinin alınması ve metabolizmasındaki hücresel aktivite arasında güçlü bir kanıt bulunmaktadır. Adipositlerin farklılaşması sırasında yağ asitlerine maruz kalmasıyla, CD36 düzeylerinde ve yağ asit taşınmasında artışların olduğu rapor

edilmiştir (23). Abumrad ve beraberindekiler (1), adipoz doku, iskelet ve kalp kası gibi CD36'nın bol miktarda bulunduğu periferik dokularda, CD36'nın yağ asitlerinin dokulara alınmasında yüksek afiniteye sahip olduğunu ve böylece yağ asit metabolizmasında aktif olduklarını göstermişlerdir. Diğer bir çalışmada, CD36-eksik (CD36^{-/-}) farelerin kalp ve adipoz dokusunda önemli ölçüde yağ asit alınımına zarar verdiği gösterilmiştir (17).

Diyabet ve insülin direncinde CD36'nın regülasyonu ve rolü bazı gruplar tarafında ortaya atılmaktadır, ama bu durum tartışmaya açık bir konudur. Mikrovasküler ve makrovasküler hastalıkların diyabetik hastalarda arttığı açıktır. Aslında tip-2 diyabetikler üç kat daha fazla koroner arteriyel hastalık gelişim riskine sahiptirler (33).

Aitman ve beraberindekiler (5), CD36'yı defektif hipertansif sıçan geni olarak tanımlamışlardır. Ayrıca bu çalışmada, transgenik farelerde CD36'nın yüksek ekspresyonunun kan trigliseritlerini ve yağ asitlerini azalttığını göstermişlerdir. Sonuç olarak, hipertansif sıçanlarda insülin direncinin, defektif yağ asit metabolizmasının ve hipertrigliserideminin altında CD36 eksikliğinin olduğunu öne sürmektedirler. Hipertansif sıçanlar, CD36'nın delesyonlu bir varyantına sahiptirler ve defektif yağ asit metabolizması, insülin direnci ve hipertansiyonu sergilemektedirler. CD36'nın transgenik olarak ekspresyonun sağlandığı hipertansif sıçanlarda insülin direnci iyileştiği ve dislipidemi geliştiği ama hipertansiyona etkisi olmadığı gösterilmiştir (69, 70). Hiperglisemi geçmişine sahip hastalarda yapılan bir çalışmada, CD36 mRNA tranlasyon veriminin glukoz aracılı artışı, makrofajlarda CD36 ekspresyonunu artırmış olduğu rapor edilmiştir. CD36'nın ekspresyonu, hiperglisemi geçmişine sahip hastalarda damar lezyonlarının da artırmıştır (33). Sampson ve beraberindekiler (78) aynı zamanda, tip 2 diyabetli hastaların monositlerinde CD36 ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir. Monosit CD36 ekspresyon ortalamasının, diyabetik hastalarda % 34 daha yüksek olduğunu gözlemişlerdir. Bununla birlikte, CD36 ekspresyonu ile plazma glukoz düzeyleri arasında bir ilişki saptayamamışlardır. Liang ve beraberindekiler (48), defektif insülin sinyalinin bir sonucu olarak makrofajların CD36 proteininde bir artış olduğunu göstermişler ve sıçan makrofajlar veya monositlerinde CD36 ekspresyonunun artışının, glukozun direkt etkisi olduğuna dayandırılmayacağını açıklamışlardır. Böylece, glukozun CD36 ekspresyonuna etkisi konusunda farklı veriler bulunmaktadır.

Koji Miyaoka ve beraberindekiler (62) tarafından yapılan çalışmalar, deney hayvanlarından elde edilmiş bulgular desteklemiş ve insanda insülin etkisinde, lipid metabolizmasında ve hipertansiyonda CD36'nın bir role sahip olduğunu öne sürmüşlerdir. Bu çalışmada, CD36-eksikliği olan 26 kişinin yüksek plazma trigliserit ve glukoz düzeyleri, düşük plazma HDL düzeyleri ve kontrollerden çok daha yüksek kan basıncına sahip olduklarını göstermişlerdir. İnsülin etkisi, CD36-eksik kişilerin beşinde bir glukoz tolerans testi ile ölçüm yapılarak gösterilmiştir. Beş kişinin tamamında insülin direncine ve aynı zamanda bu beş kişiden dördünün azalmış glukoz toleransına sahip olduklarını saptamışlardır. Bu bilgilerle, CD36-eksik fenotipteki kişilerle, genel insülin direnci bulunan metabolik ve kardiyovasküler anormallikler arasında çok sıkı bir ilişki olduğunu iddia etmişlerdir (3, 39, 62).

Savill ve beraberindekiler (79), monositten-türevlenen makrofajlarda $\alpha_v\beta_3$ integrini ile CD36 apoptotik lökositlerin bağlanmasını ve endositozu için gerekli olduğunu rapor ederek, CD36'nın çöpçü fonksiyonunu ilk olarak göstermişlerdir. Dentrik hücrelerde integrin $\alpha_v\beta_5$ ile birlikte CD36, bir fagositik fonksiyon oluşturmaktadır. Bu olayda apoptotik hücreler tarafından eksprese edilmiş internalize antijenler (viral proteinler) bazı işlemlere maruz kalıp T hücrelerine sunulmaktadır (6). Buna benzeyen bir sistem retinal pigment epitelyumunda da bulunmakta, buradan eksprese edilen CD36 $\alpha_v\beta_5$ 'la birlikte, fotoreseptör dış segmentlerinin fagositozuna katılmaktadır (77).

CD36 reseptörü, *P. falciparum*-enfekte olmuş eritrositlere karşı sitoadezyon reseptörü gibi davranmaktadır. Afrika popülasyonunda CD36 gen mutasyon sıklığı yüksek orandadır. Aitman ve beraberindekiler (4), CD36-eksikliği ve ağır seyreden malaria arasındaki bağlantıyı incelemişlerdir. Bu çalışmada, CD36-eksikliği bulunan hastaların, daha ağır seyreden malaria hastalığına sahip olduklarını bulmuşlar ve makrofajlardaki CD36 ekspresyonunun parazitli eritrositler ve enfeksiyonların önlenmesinde önemli bir temizleme mekanizması olduğunu öne sürmüşlerdir.

CD36 aynı zamanda, lipidçe zengin besinlerin seçiminde uzun zincirli yağ asitlerinin algılayıcısı gibi önemli bir rol oynamaktadır (2). Fukuwatari ve beraberindekiler (28), tat tomurcuk hücrelerinde CD36'nın apikal ekspresyonunu bildirmişlerdir. Daha sonra Laugerette ve beraberindekiler (44), CD36-eksik fareler kullanarak yaptıkları çalışmada, oral yağ algılanmasıyla ve nöral mekanizmaların

tetiklenmesiyle safra salgılanmasının nedeni olarak, CD36'nın ilgisi olduğu hakkında bir iddia ortaya atmışlardır. CD36'nın ilgi çekici özelliği diyetle alınan lipidlerin optimal kullanımı için de önemli olmasıdır.

CD36 birçok fonksiyona sahip bir membran proteindir. Bu çöpçü reseptörün, OxLDL'leri toplaması ateroskleroz sürecinde ve plak oluşumunda önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda yağ asit reseptörü olan CD36'nın, tip II diyabet ve besin seçimine bağlı olarak geliştiği düşünölen obezite ile de bağlantılı olduğu düşünülmektedir. CD36 reseptörünün bu mekanizmalar üzerindeki etkisi tam olarak aydınlatılamamış olup, reseptörün yapı fonksiyon özellikleri, ligant etkileşimleri, sinyal yolları ve patolojik süreçlerdeki etkileri üzerinde çalışmaların sürdürölmesi gerekmektedir.

5. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

5.1. GEREÇLER

5.1.1 KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER

Kimyasallar, Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar uygun kalitede ve saflıkta idi. Amonyum asetat (Sigma A-8920), potasyum bikarbonat, sodyum dodesil sülfat, sodyum hidroksit, sodyum klorür, Tris baz, proteinaz K, EDTA, metaphor agaroz (CBM), borik asit, dNTP seti, EDTA, etanol (% 99), brom fenol mavisi, etidyum bromür, Taq DNA polimeraz (Promega-Go Taq Flexi), DNA belirteci (50 bp DNA size marker), restriksiyon enzimi (Sau96I) (Bio Lab) (Kod no: R0165S), primer dizileri (IDT-Integrated DNA Technologies):

CD36 C478T için forward primer:

5'-GGCACAGAAGTTTACAGACAG-3'

revers primer:

5'-ATGGTCAAGGTAAGAGTGTC-3'

Cihazlar. Thermal cycler cihazı (TECHNE), mikrosantrifüj (Biofuge-Heraeus), elektroforez için güç kaynağı (EC Apparatus Corporation), elektroforez sistemi (EC 330 MIDICELL), otoklav, mikrosantrifüj, pH metre, pipet takımı, santrifüj, spektrofotometre, su banyosu.

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı SAĞ-YLS-290506-0090 no'lu projesi ile desteklenmiştir.

5.1.2 ÇÖZELTİLER

5.1.2.1 DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

0,5 M Disodyumetilendiamintetraasetat (EDTA)

55,83 g etilendiamintetraasetat tartılarak beher içine alındı ve 200 ml ddH₂O eklendikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürüldü. pH'sı sodyum hidroksit ile 8,0'e ayarlandı ve bir balon jojeye alınan çözelti ddH₂O ile 300 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti otoklavlanarak sterilize edildi.

4 M Sodyum Klorür (NaCl)

58,40 g sodyum klorür tartılarak balon jojeye alındı. Üzerine 100 ml ddH₂O ilave edildikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözdürüldü ve ddH₂O ile 250 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti otoklavlanarak sterilize edildi.

1 M Tris Tamponu

30,28 g Tris baz tartılarak bir balon jojeye alındı. 250 ml ddH₂O de çözdürüldü ve pH'sı 8,0'a ayarlandı. Hazırlanan çözelti otoklavlanarak sterilize edildi.

9,5 M Amonyum Asetat

73,22 g amonyum asetat tartılarak bir balon joje içine alındı. Üzerine 80 ml ddH₂O eklenerek çözüldü ve çözelti ddH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı. 0,22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edildi ve +4°C'de saklandı.

%10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)

10 g sodyum dodesil sülfat tartıldı. Bir beherde 80 ml ddH₂O eklenerek çözdürüldü ve pH'sı 7,2'ye ayarlandı. Toplam hacim 100ml tamamlandı. 0,22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

Proteinaz K

20 mg proteinaz K tartılarak steril bir gode içinde steril ddH₂O ile 1 ml'ye tamamlandı ve -20°C' de saklandı.

Eritrosit Parçalama Tamponu (x10)

43,7 g amonyum klorür, 5 g potasyum bikarbonat, 1 ml 0,5 M etilen diamin tetra asetat (EDTA)' ın tartımları yapılarak erlenin içine aktarıldı. 400 ml ddH₂O eklendi ve pH'sı 1 N sodyum hidroksit çözeltisi ile 7,4'e ayarlandı. Daha sonra balon jojeje alınarak 500 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti otoklavlanarak sterilize edildi.

Lökosit Parçalama Tamponu (x3)

37,5 ml 4 M sodyum klorür ve 75 ml 0,5 M etilen diamin tetra asetat (EDTA) balon jojeye alındı ve ddH₂O ile 500 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti otoklavlanarak sterilize edildi.

Tris-EDTA Tamponu

1,21 ml daha önce hazırladığımız tris tamponundan alındı ve üzerine 0,5 ml daha önce hazırlamış olduğumuz 0.5 M EDTA ilave edildi ve ddH₂O ile 250 ml'ye tamamlandı.

5.1.2.2 Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler

5x Tris-Borik Asit-Etilen Diamin Tetra Asetat (TBE) Tamponu (x10)

30,25 g Tris baz, 15,42 g borik asit ve 1,85 g etilen diamin tetra asetat (EDTA) balon jojeye alındı. 500 ml ddH₂O eklendi ve çözelti pH 8,3'e ayarlandı.

%4'lük Agaroz Jelin Hazırlanması

3,2 g metaphor Agaroz tartılarak erlene alındı. Üzerine 80 g 1X TBE çözeltisi eklenerek, manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak kaynatıldı. Daha sonra 4 µl etidyum bromür eklenerek karıştırıldı ve küvete döküldü. Tarak yerleştirildi ve jel soğumaya bırakıldı.

5.2. YÖNTEMLER

5.2.1. Deney Planı

Bu çalışmada, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Vakıf Hastanesi Academic Hospital'ın Biyokimya Laboratuvarı'na gelen lipit profili ve kan glukozu tetkiki yapılan ziyaretçilerden onayları ile kan alındı. Bu örneklerden iki deney grubu oluşturuldu. Birinci gruba, kan kolesterol düzeyleri 200 mg/dL'den yüksek 27-85 yaş arası 27 erkek ve 32 kadın toplam 59 denek katıldı. İkinci gruba, kan kolesterol düzeyleri 200 mg/dL'nin altında olan 27-85 yaş arası 32 erkek ve 34 kadın toplam 66 denek katıldı.

Kişiler kan alınmadan önce araştırma konusu hakkında bilgi formuyla kısaca bilgilendirildi ve bu çalışmaya gönüllü olarak katıldığına dair imzalı onayı alındı (Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu Mar-YÇ-2006-0056 no'lu onay ile). Ayrıca Tablo 5.1.'deki sorulacak soruların ve yapılacak tetkiklerin sonuçlarının yazılacağı bilgi formu hazırlandı.

Tablo 5.1. Bilgi Formu

Sorulan Sorular	Uygulanan Tetkikler
Adı Soyadı	Total-kolesterol
Cinsiyet	LDL-kolesterol
Doğum Tarihi	HDL-kolesterol
Kilo	VLDL-kolesterol
Boy	Trigliseritler
Kullandığı İlaçlar	Kan Glukoz Düzeyi
Sigara Kullanım Durumu	Sistolik Basınç
Alkol Kullanımı	Diastolik Basınç

Bu kişilerin kanları 3ml'lik EDTA'lı tüplerde toplandı ve bunlardan ayrılan periferik kan lökositlerinden elde edilen DNA örneklerinde CD36 C478T gen polimorfizmi incelendi.

Kuru tüplere alınan diğer kan örneklerinde serum total kolesterol, LDL-kolesterol, HDL-kolesterol, VLDL-kolesterol, trigliseritler, serum kan şekeri tayini COMBAS INTEGRA analizör ile ölçüldü.

5.2.2. Vücut Kitle İndeksinin Hesaplanması

Kişilerden elde edilen kilo ve boy bilgileri aşağıdaki formüle konarak vücut kitle indeksleri ("Body Mass Index", BMI) hesaplandı.

$$\text{Vücut Kitle İndeksi} = \text{Kilo(kg)} / [\text{Boy (m)}]^2$$

5.2.3. Kan Tetkiklerinin Prensipleri

Kan lipit profillerinin ve glukoz düzeylerinin saptanması Cobas INTEGRA (Roche Diagnostics) analizörle yapılmıştır.

5.2.3.1. Serum Total Kolesterol Düzeylerinin Ölçülmesi

Bu yöntemde, kolesterol esteraz kolesterol esterlerini serbest kolesterol ve yağ asitlerine hidroliz eder. Daha sonra kolesterol oksidaz kolesterolün oksidasyonunu katalizleyerek kolest-4-ene-3-one ve H₂O₂ oluşturur. Peroksidaz varlığında, oluşan H₂O₂ fenol ve 4-aminoantipirin ile oksidatif bir etkileşim sağlayarak kırmızı renkli kinonemin bileşiklerini oluşturur. Bu kinonemin bileşiklerinin absorbanları 520 nm'de ölçülerek total kolesterol miktarları belirlenmektedir.

Kullanılan reaktifler: sodyum kolat, fenol, 4-aminoantipirin, kolesterol esteraz, koesterol oksidaz, peroksidaz.

5.2.3.2. Serum HDL-Kolesterol Düzeylerinin Ölçülmesi

Bu yöntemde, polianyonların ve deterjanın etkisiyle sadece HDL'deki kolesterol çözündü. Bu çözeltide LDL, VLDL ve şilomikronlardaki kolesterol çözünmemiştir. Çözünmüş kolesterol, kolesterol esteraz ve kolesterol oksidazın katalizlediği bir dizi enzimatik reaksiyon sonucu okside edilir. Hidrojen peroksit peroksidaz varlığında N,N-bis(4-sulfubutil)-m-tolidin ve 4-aminoantipirin ile reaksiyona girerek kırmızı renkli kinonemin bileşiklerini oluşturur. Bu kinonemin bileşiklerinin absorbanları 520 nm'de ölçülerek total kolesterol miktar belirlenmektedir.

Kullanılan reaktifler: 4-aminoantipirin, magnezyum klorit, deterjan, polianiyonlar, N,N-bis(4-sulfubutil)-m-tolidin, kolesterol esterase, kolesterol oksidaz, peroksidaz, 2-(N-morfolino)etanasulfonic asit.

5.2.3.3. Serum VLDL-Kolesterol Düzeylerinin Ölçülmesi

VLDL kolesterol düzeylerini hesaplayabilmek için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\text{VLDL-kolesterol} = \text{Trigliserit} / 5$$

5.2.3.4. Serum LDL-Kolesterol Düzeylerinin Ölçülmesi

LDL-kolesterol düzeylerini hesaplayabilmek için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\text{LDL-kolesterol} = \text{Total kolesterol} - [(\text{trigliserit} / 5) + \text{HDL-kolesterol}]$$

5.2.3.5. Serum Trigliserit Düzeylerinin Ölçülmesi

Bu yöntemde, lipoprotein lipazın trigliseritleri gliserole tamamen hidroliz etmesini takiben oluşan gliserolle okside olur, dihidroksiasetonfosfat ve H_2O_2 oluşur. Daha sonra hidrojen peroksit, peroksidaz varlığında 4-aminofenazon ve 4-klorofenol ile reaksiyona girerek kırmızı renkli bileşik oluşturur. Bu kırmızı renkli bileşiğin spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle trigliseritlerin miktarı belirlenmektedir.

Kullanılan reaktifler: PIPES tampon [piperazin-N,N'-bis(2-etanosulfonik asit)], sodyum kolat, 4-aminofenazon, 4-klorofenol, potasyum heksasiyanoferrat, yağlı alkol poliglikol eter, lipoprotein lipaz, gliserol fosfat oksidaz, peroksidaz.

5.2.3.6. Serum Glukoz Düzeylerinin Ölçülmesi

Bu yöntemde, heksokinaz glukozu ATP ile fosforile ederek glukoz-6-fosfat ve ADP oluşturur. Bu reaksiyonu takiben glukoz-6-fosfat dehidrogenaz glukoz-6-fosfatın NAD^+ tarafından oksidasyonunu katalizleyerek NADH oluşturur. Oluşan NADH'ın absorbansının 340 nm'de ölçülmesiyle glukoz miktarı belirlenmektedir.

Kullanılan reaktifler: Tris-baz, NAD, Mg^{++} , heksokinaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, sodyum azit.

5.2.4. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

EDTA'lı tüplerden alınan 3 ml'lik kan örnekleri, falkon tüplere aktarıldı. Üzerlerine 1:3 (9 ml) oranında eritrosit parçalama tamponu eklenerek $+4^\circ\text{C}$ 'de 15 dk bekletildi. Daha sonra, 1500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant atılarak pellet tamamen süspansiyon haline getirildi. Üzerine tekrar 6 ml eritrosit parçalama tamponu eklendi ve örnekler $+4^\circ\text{C}$ 'de 15 dk bekletildi. Daha sonra 1500 rpm'de 10 dk santrifüj

edildi. Süpernatant atıldı ve süspansiyon haline getirilmiş karışımın üzerine, 150 µL sodyum dodesil sülfat (SDS), 23 µL Proteinaz K, 3 ml Lökosit parçalama tamponu eklendi ve 56 °C'de su banyosunda, bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 1,110 ml amonyum asetat eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra 3000 rpm'de 25 dk santrifüj edilerek proteinlerin çöktürülmesi sağlandı. Süpernatant kısmı temiz bir falkon tüpüne aktarıldı ve üzerine 1:2 oranında % 99 alkol eklendi ve DNA'nın çökmesi sağlandı. Yoğunlaşan DNA'nın alkol yüzeyine çıkması beklendi. DNA mikropipet ucuyla alınarak içinde 500µl % 70'lik alkol bulunan ependorfun içine alındı ve DNA'nın yıkanması sağlandı. Alkol DNA'nın bulunduğu ortamdan uzaklaştırıldı ve üzerine 150-200 µl Tris-EDTA (TE) tamponu eklendi. Örnekler +4 °C'de saklandı (61).

5.2.5. DNA Safılık Tayini

DNA örnekleri Tris-EDTA tamponu içerisinde 1/100 oranında sulandırıldı. 260 nm'de DNA'nın vermiş olduğu ve 280 nm'de RNA ve proteinin vermiş olduğu absorpsiyon spektrofotometrede ölçüldü. 260 nm'de okunan absorpsiyon ile 280 nm'de okunan absorpsiyon oranı ile DNA'nın saflığını tespit ettik. A_{260}/A_{280} oranı 1,7-1,8 olarak okunan DNA'lar saf olarak kabul edildi.

5.2.6. DNA Konsantrasyonunun Hesaplanması

Elde ettiğimiz DNA'nın konsantrasyonunu aşağıdaki formül ile hesapladık. Çift iplikli DNA'nın 50 µg/ml'sinin 260 nm'de vermiş olduğu absorbans 1'dir. Buna göre:

$$\text{DNA konsantrasyonu } (\mu\text{g/ml}) = \text{sulandırma katsayısı} \times A_{260} \times 50$$

5.2.7. CD36 C478T Gen Polimorfizminin Gösterilmesi

Her bir örnek için 50 mM buffer, 5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 1,25 U Taq polimeraz, 14,2 µl dH₂O, 2 µl DNA, 1 µl forward primerden ve 1 µl reverse primerden toplam hacmi 25,2 µl olan karışım hazırlandı. Örnekler, 94 °C'de 5 dakika, ardından 40 döngü 94 °C'de 30 saniye, 55 °C'de 30 saniye, 72 °C'de 30 saniye ayarlanmış "Thermal Cycler" cihazına konuldu. Döngüler tamamlandıktan sonra 72 °C'de 7 dakika tutulduktan sonra işlem tamamlandı. PCR amplifikasyonu sonucu oluşan ürünlerden 10 µl, 2,7 µl dH₂O, 1,5 µl tampon ve 0,8 U Sau96I restriksiyon enzimi eklenerek 37,5°C'de 16 saat boyunca kesim yapıldı. Restriksiyon enzimiyle kesilmiş örnekler % 4'lük metaphor agaroz jelde yürütülerek analiz edildi (41).

5.2.8. Kullanılan İstatiksel Yöntemler

Bu çalışmanın istatistiksel analizleri GraphPad yazılımı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p<0,05$ olarak alınmıştır. Değerler $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir.

BMI, sistolik ve diyastolik kan basınçları serum total kolesterol, LDL-kolesterol, HDL-kolesterol, VLDL-kolesterol, trigliseritler, serum kan şekeri düzeyleri açısından gruplar arası farklılıkların değerlendirmesinde Student t-test kullanılmıştır.

6. BULGULAR

Bu çalışma için toplanan örneklerden 59'u hiperkolesterolemi grubunu ve 66'sı da kontrol grubunu oluşturmuştur. Hiperkolesterolemi grubunda 27 erkek ve 32 kadın, kontrol grubunda ise 32 erkek ve 34 kadın bulunmaktadır. Gruplar hakkındaki genel bilgiler aşağıdaki Tablo 6.1.'de verilmiştir.

Tablo 6.1. Grupların genel profilleri

Parametreler	Kontrol grubu (n: 66)	Hiperkolesterolemi grubu (n: 59)
Cinsiyet (Erkek/Kadın)	32/34	27/32
Alkol kullanımı (Evet/Hayır)	16/50	17/42
Sigara kullanımı (Evet/Hayır)	21/45	24/35
Yaş	47.20 ± 1.5	48.51 ± 1.3
BMI (kg/m ²)	27.90 ± 0.6	26.19 ± 0.5
Total kolesterol (mg/dl)	168.3 ± 2.5	225.9 ± 2.7
HDL-kolesterol (mg/dl)	52.39 ± 1.9	56.36 ± 2.2
LDL-kolesterol (mg/dl)	93.58 ± 2.8	139.4 ± 2.9
VLDL-kolesterol (mg/dl)	21.11 ± 1.5	28.25 ± 1.5
Trigliseritler (mg/dl)	108.5 ± 7.6	153.0 ± 11.1
Kan glukoz (mg/dl)	97.95 ± 2.7	97.02 ± 2.9
Sistolik kan basıncı (mmHg)	122.0 ± 2.0	123.5 ± 2.6
Diastolik kan basıncı (mmHg)	77.73 ± 1.2	80.07 ± 1.4

(Değerler ± standart hata olarak gösterilmiştir)

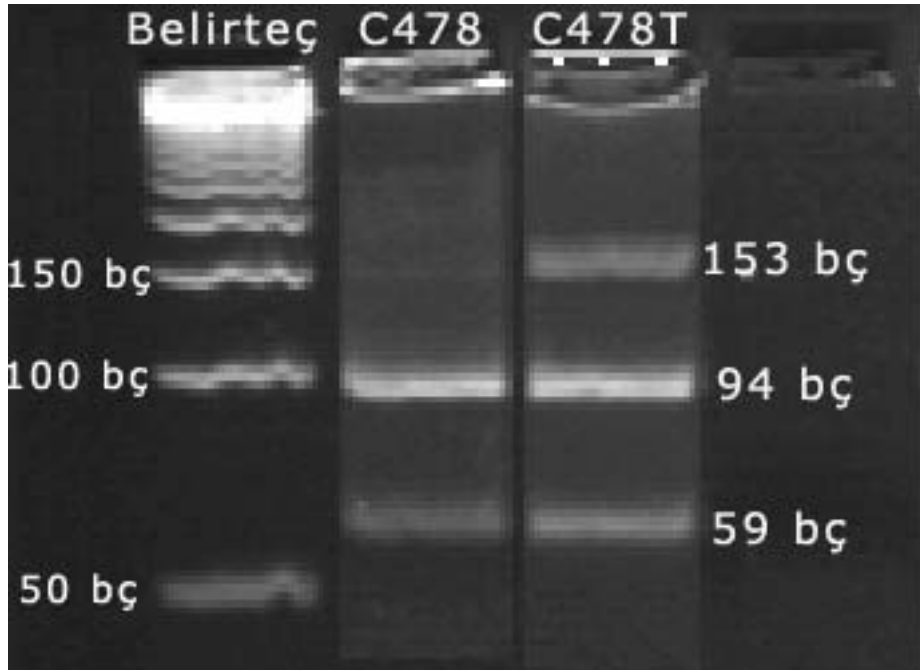
Tablo 6.2.'de incelenen parametrelerin gruplar arası karşılaştırılması ve t-testi değerleri verilmiştir. Hiperkolesterolemi grubunda total kolesterol ve LDL kolesterol düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ileri düzeyde anlamlı bir fark gözlenmiştir ($P<0.0001$). Ayrıca hiperkolesterolemi grubunun VLDL-kolesterol BMI, ve trigliserit düzeyleri, kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). İki grup arasında, sistolik kan basıncı, diyastolik kan basıncı, HDL-kolesterol, kan glukoz düzeyleri açısından bir farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$).

Tablo 6.2. İncelenen parametrelerin gruplar arası karşılaştırılması

Parametreler	Kontrol grubu (n: 66)	Hiperkolesterolemi grubu (n: 59)	t-testinin p-Değerleri
BMI (kg/m²)	27.90 ± 0.6	26.19 ± 0.5	P < 0.05
Total kolesterol (mg/dl)	168.3 ± 2.5	225.9 ± 2.7	P<0.0001
HDL-kolesterol (mg/dl)	52.39 ± 1.9	56.36 ± 2.2	P > 0.05
LDL-kolesterol (mg/dl)	93.58 ± 2.8	139.4 ± 2.9	P<0.0001
VLDL-kolesterol (mg/dl)	21.11 ± 1.5	28.25 ± 1.5	P < 0.05
Trigliseritler (mg/dl)	108.5 ± 7.6	153.0 ± 11.1	P < 0.05
Kan glukoz (mg/dl)	97.95 ± 2.7	97.02 ± 2.9	P > 0.05
Sistolik kan basıncı (mmHg)	122.0 ± 2.0	123.5 ± 2.6	P > 0.05
Diyastolik kan basıncı (mmHg)	77.73 ± 1.2	80.07 ± 1.4	P > 0.05

(Değerler ± standart hata olarak gösterilmiştir)

Resim 6.1 de Sau96I restriksiyon enzimiyle kesilmiş ve % 4'lük DNA agaroz jelde yürütülmüş fragmentler gösterilmektedir. 153 bç'lik PCR ürünlerinin Sau96I ile kesimiyle Resim 6.1 de iki örnek görülmektedir: 94- ve 59- bç'lik ürünler, C478 homozigot genotipi göstermektedir, 153-, 94- ve 59- bç'lik ürünler, C478T heterozigot genotipi göstermektedir.



Resim 6.1. CD36 C478T gen polimorfizmine ait % 4'lük agaroz jel görüntüsü.

CD36 C478T değişimine ait genetik çeşitlilik profilleri Tablo 6.3. de verilmiştir. Bu çalışmada, 125 kişinin 124'ünde C478 homozigot genotipine (yaban tip), yalnızca 1 kişide ise mutant genotip olan C478T heterozigot genotipine rastlandı. Cinsiyet açısından bakıldığında, 59 kadın ve 65 erkekte normal genotip olan C478 genotipine, 1 kadında ise, C478T heterozigot genotipi bulundu. Bu C478T heterozigot, kontrol grubuna göre daha yüksek BMI, total kolesterol, LDL-kolesterol, HDL-kolesterol, kan glukoz düzeylerine ve düşük trigliserit düzeylerine sahipti.

Tablo 6.3. Genetik profillerin karşılaştırılması

Parametreler	C478 homozigot kontrol grubu (n: 66)	C478 homozigot hiperkolesterolemi grubu (n: 58)	C478T heterozigot (mutant) (n: 1)
Cinsiyet (Erkek/Kadın)	32/34	27/31	0/1
Yaş	47.20 ± 1.5	48.4 ± 10.4	56
BMI (kg/m²)	27.90 ± 0.6	26.01 ± 3.69	35,81
Total kolesterol (mg/dl)	168.3 ± 2.5	226.03 ± 20.9	216
HDL-kolesterol (mg/dl)	52.39 ± 1.9	56.15 ± 17.2	68
LDL-kolesterol (mg/dl)	93.58 ± 2.8	139.5 ± 22.16	131
VLDL-kolesterol (mg/dl)	21.11 ± 1.5	28.5 ± 11.97	16
Trigliseritler (mg/dl)	108.5 ± 7.6	153.3 ± 85.2	81
Kan glukoz (mg/dl)	97.95 ± 2.7	96.4 ± 22.8	130
Sistolik kan basıncı (mmHg)	122.0 ± 2.0	123.5 ± 20.5	120
Diastolik kan basıncı (mmHg)	77.73 ± 1.2	80.06 ± 11.4	80

(Değerler ± standart hata olarak gösterilmiştir)

7. TARTIŞMA

Ateroskleroz, birçok genetik ve çevresel faktörlerin etkisi ile gelişen karmaşık bir etiyolojiye sahip bir hastalıktır (54). İnflamasyon, endotel fonksiyon, koagülasyon, lipit, amino asit ve karbonhidrat metabolizması gibi ateroskleroza bağlı süreçleri düzenleyen 400’den fazla gen olduğu tahmin edilmektedir. Çevresel etkiler ve bireyin genetik yapıları arasındaki etkileşimin sonucu olarak ateroskleroz gelişmektedir (29). Genetik olarak birtakım risk faktörleri saptanmış olmasına rağmen, bunlardan hangilerinin ateroskleroza yolaçtığı tam olarak bilinmemektedir. Bu mekanizmaların açıklanabilmesindeki zorluğun nedeni, toplumlardaki genetik heterojenite ve birden fazla genin rol aldığı çok etkenli hastalık olmasına bağlanabilir. Hem insanlarda hem de *in vivo* deneylerinden elde edilen bulgular, genetik varyasyonların ateroskleroza teşvik edebileceği veya ilerletebileceği hakkında geniş bir açıklama getirmemizi sağlamaktadır (71).

Epidemiyolojik çalışmalar, total kolesterol düzeyleri ile kardiyovasküler kalp hastalığından ölüm oranı arasında pozitif bir ilişki göstermektedir. Artmış serum kolesterol düzeylerinin diğer bilinen risk faktörlerinin yokluğunda bile ateroskleroz gelişiminde tek başına yeterli olduğu bilinmektedir (16).

Ateroskleroz gelişimi için önemli risk faktörü olan hiperkolesterolemi, genetik veya çevresel faktörlerin bir nedeni olabilir (15). “The Oslo Study” programında, otopsi yapılmış 150 erkekte, koroner ve serebral damarlarda artmış lezyon oranları ile total kolesterol arasında doğru orantı olarak ve HDL-kolesterol arasında ters orantılı olarak bir ilişki gözlemlenmiştir (72). “The Turkish Heart Study” programında, Türkiye’nin altı bölgesinde plazma lipitleri, lipoproteinleri ve apolipoproteinleri karakterize edilmiştir. Bu çalışmada, refah içinde yaşayanlarda ve eğitim düzeyi yüksek kişilerde artmış plazma kolesterol ve LDL-kolesterol düzeyleri gözlenmiştir. Mahley ve beraberindekiler (56) çok geniş sayıda Türk katılımcının kolesterol profillerini incelemişlerdir. Türk toplumunun düşük total kolesterol, LDL-kolesterol ve düşük HDL-kolesterol düzeylerine sahip olduklarını gözlemişlerdir. Bununla birlikte, düşük lipit profiline sahip olmasına rağmen, koroner arter hastalığına yakalanma oranı batı toplumuna göre daha fazla olarak bulunmuştur.

Son yapılan çalışmalarda, CD36’nın okside olmuş LDL ve yağ asitler için bir reseptör olduğu gösterilmiş ve aynı zamanda aterogenez ve lipit metabolizmasının bir

bölümünde de rolü olabileceği öne sürülmüştür. İnsan CD36-eksikliği Japon, Tayvan ve Afrikadaki popülasyonlarda % 2-4 oranında bulunmaktadır. CD36 eksikliği, tip-I ve tip-II olarak iki grupta toplanır. Kashiwagi ve beraberindekiler (42), tip-II CD36-eksik Japon hastalarda 478. nükleotit noktasında C'den T'ye değişimin sonucu, CD36 gen ürününün 90. kodonunda CCT (Prolin)'den TCT (Serin)'ye değişimini saptamışlardır. Buna ilaveten, C478T değişimi CD36'nın posttranslasyonel değişiklikleri sırasında olgunlaşma eksikliğine neden olarak, CD36 ekspresyonunda direkt olarak anlamlı azalmalara yol açtığını ve bu değişimin CD36-eksikliğin altında yatan önemli bir eksiklik olduğunu göstermişlerdir (43).

Ekspresyon analizi, CD36'nın 81 kD prekürsör formunun varlığını ve bu 81 kD prekürsör formunun, CD36'nın 88 kD olgun formuna dönüşümünün proteindeki amino asit değişimi tarafından bozulduğunu ve CD36 yüzey ekspresyonunda göze çarpan bir azalmaya sebep olduğunu göstermektedir (43). CD36, % 26 oranında karbonhidrat içeren yüksek derecede glukozillenmiş bir proteindir ve CD36 cDNA dizisi on potansiyel N-glukozilasyon bölgesi göstermektedir (89). N-glukozilasyon bölgesine komşu amino asitler dizisinin (AsnXSer/Thr), glikasyonun boyutunda ve oranında anlamlı etkiye sahip olabileceği bilinmektedir. Prolin90, varsayılan birinci N-glukozilasyon bölgesi (Asn79) ve ikinci N-glukozilasyon bölgesi (Asn102) arasında lokalizedir. 90. pozisyonundaki prolinden serine değişimden kaynaklanan konformasyonel değişiklik, oligosakkariltransferaz enziminin komşu glukozilasyon bölgesine erişilebilirliğini bozabilmektedir. Eğer değişim, prekürsör CD36'da büyük şekil değişikliklerine neden olursa, bu değişimden aynı zamanda Asn79 veya Asn102'den başka glikasyon bölgelerinin etkilenmesi de mümkündür (66).

Kajihara ve beraberindekilerin (41) yaptığı çalışmada, Ser90 varyantı olan hastalarda normal kontrollere göre yüksek serum serbest yağ asidi düzeyleri gözlenmiştir ama serum kolesterol düzeylerinde veya serum trigliserit düzeylerinde veya insülin hassasiyetinde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

Biz bu çalışmada, 125 kişiden sadece 1'inde CD36 geninin 478. noktasında C'den T'ye değişimini ve bu değişimin heterozigot formda olduğunu tespit ettik. Bu kişinin total kolesterol, LDL-kolesterol, HDL-kolesterol, kan glukoz düzeylerinin ve BMI'nin C478 homozigot kontrol grubundan yüksek olduğu, ayrıca trigliserit düzeyinin C478 homozigot grubuna göre düşük olduğu saptanmıştır. Ancak çalışmamızda, sadece

bir kişide polimorfizm saptadığımız için CD36 C478T polimorfizmi ile lipit profili arasında istatistiksel olarak bir ilişki araştıramadık.

Bu çalışmamızın devamında, örnek sayısını arttırarak, aterogeneze ve lipit metabolizmasında önemi olduğunu düşündüğümüz CD36 genine ait diğer polimorfizmleri ilave edip, CD36 ekspresyonunu da değerlendirerek CD36 ve aterosklerez arasındaki ilişkiyi daha detaylı incelemeyi planlıyoruz.

8. EKLER

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu Mar-YÇ-2006-0056 no'lu onayı ile çalışmaya katılan kişiler Ek-I'deki form ile çalışma hakkında bilgilendirildi. Ek-II'deki form ile onayları alındı. Sonuçlar Ek-III'deki tabloya kaydedildi.

Ek-I

HASTA BİLGİLENDİRME FORMU

Projenin adı: CD36 Gen Polimorfizmi ve Ateroskleroz Arasındaki İlişkinin İncelenmesi

Araştırmacılar: Prof. Dr. Nesrin Kartal-Özer, Faruk Tamtürk, Dr. Nesrin Erçelen

Ateroskleroz bütün ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de en başta gelen ölüm nedenlerinden biridir. Şu ana kadar yapılan pek çok çalışmada farklı risk faktörlerinden söz edilmiş bunların başında hiperkolesteroleminin geldiği bildirilmiştir. Aterosklerotik lezyonlarda biriken okside olmuş LDL, düz kas hücreleri veya makrofajlarda bulunan “scavenger receptor” olarak adlandırılan reseptörlerden, CD36 reseptörü, tarafından hücre içine alınıp köpük hücre oluşumuna neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda CD36 “knockout” farelerde okside LDL’lerin alınmasının azaldığı ve aterosklerotik lezyon gelişiminin engellendiği gözlenmiştir. CD36’nın yağ metabolizması ve lipid metabolizmasında önemli bir fizyolojik rolü olduğu saptanması ve bunun ateroskleroz ile ilişkisinin saptanması planlanmaktadır.

Sizden alınan kan örneğinde bu araştırmanın yapılmasını kabul etmeniz bilime büyük bir katkı sağlayacaktır.

Ek-II

HASTA ONAY FORMU

Projenin adı: CD36 Gen Polimorfizmi ve Ateroskleroz Arasındaki İlişkinin İncelenmesi

Araştırmacılar: Prof. Dr. Nesrin Kartal-Özer, Faruk Tamtürk, Dr. Nesrin Erçelen

Yukarıdaki çalışmaya ile ilgili bilgileri okuduktan ve sözel olarak tarafıma açıklama yapıldıktan sonra ilgili araştırmaya katılmayı kabul ediyorum.

Çalışmaya Katılanın

Adı Soyadı:

Tarih:

İmza:

Proje Yürücüsünün

Adı Soyadı:

Tarih:

İmza:

Ek-III

Tarih:

BİLGİ FORMU			
Adı Soyadı			
Cinsiyet			
Doğum Tarihi			
Kilo (kg)		BMI	
Boy (m)			
Kullandığı İlaçlar.....			
Sigara Kullanım Durumu (paket veya adet/günde)			
Alkol Kullanım (kadeh/günde)			
Sistolik Basınç (mmHg)			
Diastolik Basınç (mmHg)			

LİPİD PROFİLİ	
Total-kolesterol (mg/dl)	
HDL-kolesterol (mg/dl)	
LDL-kolesterol (mg/dl)	
VLDL-kolesterol (mg/dl)	
Trigliserit (mg/dl)	
Kan Glukoz Düzeyi (mg/dl)	

9. KAYNAKLAR

1. Abumrad N. A., el-Maghrabi M. R., Amri E. Z., Lopez E., Grimaldi P. A.: Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J Biol Chem*, 268: 17665-8, 1993.
2. Abumrad, N. A.: CD36 may determine our desire for dietary fats. *J Biol Chem*, 115: 2965-7, 2005.
3. Aitman T. J.: CD36, insulin resistance, and coronary heart disease. *Lancet*, 357: 651-2, 2001.
4. Aitman T. J., Cooper L. D., Norsworthy P. J., Wahid F. N., Gray J. K., Curtis B. R., McKeigue P. M., Kwiatkowski D., Greenwood B. M., Snow R. W., Hill A. V., Scott J.: Malaria susceptibility and CD36 mutation. *Nature*, 405: 1015-6, 2000.
5. Aitman, T.J., Glazier, A.M., Wallace, CA., Cooper, L.D., Norsworthy, P.J., Wahid, F.N., Al-Majali, K.M., Trembling, P.M., Mann, C.J., Shoulders, C.C., Graf, D., St Lezin, E., Kurtz, T.W., Kren, V., Pravenec, M., Ibrahimi, A., Abumrad, N.A., Stanton, L.W., Scott, J.: Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats. *Nat. Genet.* 21, 76– 83, 1999.
6. Albert ML, Pearce SF, Francisco LM ve beraberindekiler: Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*, 188: 1359-1368, 1998.
7. Altman R.,: Risk factors in coronary atherosclerosis athero-inflammation: the meeting point. *Thromb J*, 1: 1-11, 2003
8. Armesilla A. L., Vega M. A.: Structural organization of the gene for human CD36 glycoprotein. *J Biol Chem*, 269: 18985-91, 1994.
9. Assmann G, Cullen P, Schulte H.: Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM) study. *Circulation.*, 105: 310–315, 2002
10. Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, Huang Y.: High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk: the PROCAM

- experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis*, 124(suppl 6):S11-S20, 1996.
11. Austin MA, Hokanson JE, Edwards KL.: Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol*, 81:7B-12B, 1998.
 12. Barter P.: The inflammation: Lipoprotein cycle. *Atheroscler Suppl*, 6: 15-20, 2005
 13. Binder C. J., Chang M. K., Shaw P. X., Miller Y. I., Hartvigsen K., Dewan A., Witztum J. L: Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nat Med.*, 8: 1218-26, 2002
 14. Boyle E. M., Lille S. T., Allaire E., A., Clowes W., Verrier E. D.: Atherosclerosis. *Ann Thorac Surg*, 64: S47–56, 1997.
 15. Carmena R., Duriez P., Fruchart J. C.: Atherogenic lipoprotein particles in atherosclerosis. *Circulation*, 109: III2-7, 2004.
 16. Christopher K. G, Joseph L. W.: Atherosclerosis: The Road Ahead. *Cell*, 104: 503–516, 2001
 17. Coburn C. T., Knapp F. F., Jr., Febbraio M., Beets A. L., Silverstein R. L., Abumrad N. A. : Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *J Biol Chem*, 275: 32523-9, 2000.
 18. Collot-Teixeira S., Martin J., McDermott-Roe C., Poston R., McGregor J. L.: CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*, baskıda ,2007.
 19. Doevendans P. A., Jukema W., Spiering W., Defesche J. C., Kastelein J. J.: Molecular genetics and gene expression in atherosclerosis. *Int J Cardiol*, 80: 161-72, 2001
 20. Endemann G., L. W. Stanton, K. S. Madden, C. M. Bryant, R. T. White, A. A. Protter.: CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.*, 268: 11811–11816, 1993.
 21. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Educational Program Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. *JAMA*, 285(19): 2486–97, 2001
 22. Faxon D. P., Fuster V., Libby, P., Beckman J. A., Hiatt W. R., Thompson R. W., Topper J. N., Annex B. H., Rundback J. H., Fabunmi R. P., Robertson R. M.,

- Loscalzo J.: Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group III: pathophysiology. *Circulation*, 109: 2617-25, 2004
23. Febbraio M., Abumrad N. A., Hajjar D. P., Sharma K., Cheng W., Pearce S. F., Silverstein R. L.: A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J Biol Chem*, 274: 19055-62, 1999.
 24. Febbraio M., Hajjar, D. P., Silverstein, R. L.: CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest*, 108: 785-91, 2001.
 25. Febbraio M., Podrez E. A., Smith J. D., Hajjar, D. P., Hazen, S. L., Hoff, H. F., Sharma, K., Silverstein, R. L.: Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest*, 105: 1049-56, 2000.
 26. Febbraio M., Silverstein R. L.: CD36: Implications in cardiovascular disease. *Int J Biochem Cell Biol*, baskıda, 2007.
 27. Franklin SS, Khan SA, Wong ND, Larson MG, Levy D.: Is pulse pressure useful in predicting risk for coronary heart disease? The Framingham Heart Study. *Circulation*, 100: 354-60, 1999.
 28. Fukuwatari, T., Kawada, T., Tsuruta, M., Hiraoka, T., Iwanaga, T., Sugimoto, E., Fushiki, T.: Expression of the putative membrane fatty acid transporter (FAT) in taste buds of the circumvallate papillae in rats. *FEBS Lett.*, 414: 461-4, 1997
 29. Funke H, Assmann G.: Strategies for the assessment of genetic coronary artery disease risk. *Curr Opin Lipidol*, 10: 285–91, 1999.
 30. Goldbourt U, Neufeld HN.: Genetic aspects of arteriosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 6: 357–377, 1986
 31. Goldstein, J. L., Ho, Y. K., Basu, S. K. & Brown, M. S.: Binding sites on macrophages that mediate uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 76: 333–337, 1979.
 32. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, Jacobs DR Jr, Bangdiwala S, Tyroler HA.: High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease: four prospective American studies. *Circulation*, 79: 8-15, 1989.

33. Griffin E, Re A, Hamel N, Fu C, Bush H, McCaffrey T, Asch AS.: A link between diabetes and atherosclerosis: Glucose regulates expression of CD36 at the level of translation. *Nat Med*, 7: 840-6, 2001.
34. Hansson G.K.: Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 21: 1876–1890, 2001.
35. Hansson G.K., Libby P., Schonbeck U., Yan, Z.Q.: Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ. Res.*, 91: 281–291, 2002
36. Hansson, G.K. : Cell-mediated immunity in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 8: 301–311, 1997.
37. Henniga B., Toborek M.: Nutrition and endothelial cell function: implications in Atherosclerosis, *Nutr. Res.*, 21: 279–293, 2001
38. Hörkkö S.: Immunological responses to oxidized LDL. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1771–1779, 2000
39. Iizuka Y., Gotoda T., Ishibashi S., Yamada N.: CD36 deficiency and insulin resistance. *Lancet*, 358: 243, 2001.
40. Kadar A., Glasz T.: Development of atherosclerosis and plaque biology. *Cardiovasc Surg*, 2: 109-21, 2001
41. Kajihara S., Hisatomi A., Ogawa Y., Yasutake T., Yoshimura T., Hara T., Mizuta T., Ozaki I., Iwamoto N., Yamamoto K.: Association of the Pro90Ser CD36 mutation with elevated free fatty acid concentrations but not with insulin resistance syndrome in Japanese. *Clin Chim Acta*, 314: 125-30, 2001
42. Kashiwagi H, Honda S, Tomiyama Y, Mizutani H, Take H, Honda Y, ve beraberindekiler: A novel polymorphism in glycoprotein IV: replacement of proline-90 by serine.predominates in subjects with platelet GPIV deficiency. *Thromb Haemostasis*, 69: 481–4, 1993.
43. Kashiwagi H., Y. Tomiyama, S. Honda, S. Kosugi, M. Shiraga, N. Nagao, S. Sekiguchi, Y. Kanayama, Y. Kurata, and Y. Matsuzawa.: Molecular basis of CD36 deficiency. Evidence that a 478C→T substitution (proline90→serine) in CD36 cDNA accounts for CD36 deficiency. *J. Clin. Invest.*, 95: 1040–1046, 1995.
44. Laugerette, F., Passilly-Degrace, P., Patris, B., Niot, I., Febbraio, M., Montmayeur, J. P., Besnard, P.: CD36 involvement in orosensory detection of

- dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J Clin Invest*, 115: 3177-84, 2005.
45. Lepretre F., Cheyssac C., Amouyel P., Froguel P., Helbecque N.: A promoter polymorphism in CD36 is associated with an atherogenic lipid profile in a French general population. *Atherosclerosis*, 173: 375-7, 2004.
 46. Lepretre F., Linton K. J., Lacquemant C., Vatin V., Samson C., Dina C., Chikri M., Ali S., Scherer P., Seron K., Vasseur F., Aitman T., Froguel P.: Genetic study of the CD36 gene in a French diabetic population. *Diabetes Metab*, 30: 459-63, 2004.
 47. Leung L. L., Li W. X., McGregor J. L., Albrecht G., Howard R. J.: CD36 peptides enhance or inhibit CD36-thrombospondin binding. A two-step process of ligand-receptor interaction. *J Biol Chem*, 267: 18244-50, 1992.
 48. Liang C.P., Han S., Okamoto H., Carnemolla R., Tabas I., Accili D., Tall A.R.: Increased CD36 protein as a response to defective insulin signaling in macrophages. *J. Clin. Invest.*, 113: 764– 773, 2004.
 49. Libby P: Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med*, 247: 349-358, 2000.
 50. Libby P, Ridker PM, Maseri A: Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 105: 1135-1143, 2002.
 51. Libby P.: Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420: 868-874, 2002.
 52. Lipid Research Clinics Program. The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial results. I: Reduction in the incidence of coronary heart disease. *JAMA*, 251: 351-64, 1984.
 53. Lusis A. J.: Atherosclerosis, *Nature*, 407: 233-241, 2000.
 54. Lusis A. J.: Genetic factors in cardiovascular disease. 10 questions. *Trends Cardiovasc Med*, 13: 309-16, 2003.
 55. Luster AD.: Chemokines: chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med.*, 338: 436–445, 1998.
 56. Mahley R. W., Palaoglu K. E., Atak Z., Dawson-Pepin J., Langlois A. M., Cheung V., Onat H., Fulks P., Mahley L. L., Vakar F. ve beraberindekiler: Turkish Heart Study: lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. *J Lipid Res*, 36: 839-59, 1995.

57. Malaud E., Hourton D., Giroux L. M., Ninio E., Buckland R., McGregor J. L.: The terminal six amino-acids of the carboxy cytoplasmic tail of CD36 contain a functional domain implicated in the binding and capture of oxidized low-density lipoprotein. *Biochem J*, 364: 507-15, 2002.
58. McGill HC Jr, McMahan CA, Malcom GT, Oalmann MC, Strong JP: Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. Relation of glycohemoglobin and adiposity to atherosclerosis in youth. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 15: 431– 440, 1995
59. McGill HC Jr, McMahan CA, Tracy RE, Oalmann MC, Cornhill JF, Herderick EE, Strong JP: for the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. Relation of a postmortem renal index of hypertension to atherosclerosis and coronary artery size in young men and women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 18: 1108–1118, 1998.
60. McGill HC Jr, McMahan CA, Zieske AW, Sloop GD, Walcott JV, Troxclair DA, Malcom GT, Tracy RE, Oalmann MC, Strong JP: for the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. Associations of coronary heart disease risk factors with the intermediate lesion of atherosclerosis in youth. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20: 1998-2004, 2000.
61. Miller SA., Dykes DD, Polesky HS.: Simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res.*, 16/3: 1215, 1988.
62. Miyaoka K., Kuwasako T., Hirano K., Nozaki S., Yamashita S., Matsuzawa Y.: CD36 deficiency associated with insulin resistance. *Lancet*, 357: 686-7, 2001.
63. Nabel E G.: Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*, 349:60-72, 2003.
64. National Institutes of Health. Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults - the evidence report. *Obesity Res*, 6 (suppl 2): 51S-209S, 1998.
65. Nozaki S., H. Kashiwagi S., Yamashita T., Nakagawa, B. Kostner, Y. Tomiyama, A. Nakata, M. Ishigami, J. Miyagawa, K. Kameda-Takemura, Y. Kurata, and Y. Matsuzawa.: Reduced uptake of oxidized low density

- lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects. *J. Clin. Invest.*, 96: 1859–1865, 1995.
66. Oquendo P., Hundt E., Lawler J., Seed B.: CD36 directly mediates cytoadherence of *Plasmodium falciparum* parasitized erythrocytes. *Cell*, 58: 95–101, 1989.
 67. Paulsson, G., Zhou, X., Torrielli, M., and Hansson, G.K.: Oligoclonal T cell expansion in atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 20, 10–17, 2000.
 68. Pekkanen J, Linn S, Heiss G, Suchindran CM, Leon A, Rifkind BM, Tyroler HA.: Ten-year mortality from cardiovascular disease in relation to cholesterol level among men with and without preexisting cardiovascular disease. *N Engl J Med*, 322: 1700–7, 1990.
 69. Pravenec M., Landa V., Zidek V., Musilova A., Kren V., Kazdova L., Aitman T.J., Glazier A.M., Ibrahimi A., Abumrad N.A., Qi N., Wang J.M., St Lezin E.M., Kurtz T.W.: Transgenic rescue of defective Cd36 ameliorates insulin resistance in spontaneously hypertensive rats. *Nat. Genet.*, 27: 156–158, 2001.
 70. Pravenec, M., Landa, V., Zidek, V., Musilova, A., Kazdova, L., Qi, N., Wang, J., St Lezin, E., Kurtz, T.W.: Transgenic expression of CD36 in the spontaneously hypertensive rat is associated with amelioration of metabolic disturbances but has no effect on hypertension. *Physiol. Res.*, 52: 681–688, 2003.
 71. Puddu P., Cravero E., Puddu G. M., Muscari A.: Genes and atherosclerosis: at the origin of the predisposition. *Int J Clin Pract*, 59: 462–72, 2005.
 72. Reed D. M., Strong J. P., Resch J., Hayashi T.: Serum lipids and lipoproteins as predictors of atherosclerosis. An autopsy study. *Arteriosclerosis*, 9: 560–4, 1989.
 73. Ross R, Glomset JA.: Atherosclerosis and arterial smooth muscle cell. *Science*, 180: 1332–9, 1973.
 74. Ross R.: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 362: 801–9, 1993.
 75. Ross, R.: Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N. Eng. J. Med*, 340, 115–126, 1999.

76. Rubin EM, Krauss RM, Spangler EA, Verstuyft JG, Clift SM.: Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. *Nature*, 353: 265-7, 1991.
77. Ryeom SW, Sparrow JR, Silverstein RL.: CD36 participates in the phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelium. *J Cell Sci*, 109: 387-395, 1996.
78. Sampson, M.J., Davies, I.R., Braschi, S., Ivory, K., Hughes, D.A.: Increased expression of a scavenger receptor (CD36) in monocytes from subjects with Type 2 diabetes. *Atherosclerosis*, 167: 129–134, 2003.
79. Savill J, Hogg N, Ren, Y, Haslett C.: Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J Clin Invest*, 90: 1513-1522, 1989.
80. Silverstein R. L., Febbraio M.: CD36 and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 11: 483-91, 2000.
81. Solberg LA, Strong JP.: Risk factors and atherosclerotic lesions: a review of autopsy studies. *Arteriosclerosis*, 3: 187–198, 1983.
82. Springer TA.: Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, 76: 301–314, 1994.
83. Stamler J, Daviglus ML, Garside DB, Dyer AR, Greenland P, Neaton JD.: Relationship of baseline serum cholesterol levels in 3 large cohorts of younger men to long-term coronary, cardiovascular, and all-cause mortality and to longevity. *JAMA*, 284: 311-8, 2000.
84. Stamler J, Wentworth D, Neaton JD.: Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356 222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA*, 256: 2823-8, 1986.
85. Steinberg D, Witztum JL.: Lipoproteins and atherosclerosis: current concepts. *J Am Med Assoc*, 264: 3047–52, 1990.
86. Steiner G, Schwartz L, Shumak S, Poapst M.: The association of increased levels of intermediate-density lipoproteins with smoking and with coronary artery disease. *Circulation*, 75: 124-30, 1987.

87. Suzuki, H., Kurihara, Y., Takeya, M., Kamada, N., Kataoka, M., Jishage, K., Ueda, O., Sakaguchi, H., Higashi, T., Suzuki, T.: A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 386: 292–296, 1997.
88. Tall AR.: An overview of reverse cholesterol transport. *Eur Heart J*, 19(suppl A): A31-A35, 1998.
89. Tandon N. N., Lipsky R. H., Burgess W. H., Jamieson G. A.: Isolation and characterization of platelet glycoprotein IV (CD36). *J Biol Chem*, 264: 7570-5, 1989.
90. Tangirala RK, Tsukamoto K, Chun SH, Usher D, Puré E, Rader DJ.: Regression of atherosclerosis induced by liver-directed gene transfer of apolipoprotein A-I in mice. *Circulation*, 100: 1816-22, 1999.
91. The Expert Panel. 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. *Circulation*., 106: 3143–3421, 2002.
92. Van den Hoogen PCW, Feskens EJM, Nagelkerke NJD, Menotti A, Nissinen A, Kromhout D.: for the Seven Countries Research Group. The relation between blood pressure and mortality due to coronary heart disease among men in different parts of the world. *N Engl J Med*, 342: 1-8, 2000.
93. Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, La Du BN, Fogelman AM, Navab M.: Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response: loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest*, 96: 2758-67, 1995.
94. Wick G, Romen M, Amberger A, Metzler B, Mayr M, Falkensammer G, Xu Q.: Atherosclerosis, autoimmunity, and vascular-associated lymphoid tissue. *FASEB J*, 1199–1207, 1997.
95. Williams KJ, Tabas I.: The response to retention hypothesis of early atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15: 551– 61, 1995.

96. Wilson PWF, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB.: Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*, 97: 1837-47, 1998.
97. Wong ND, Wilson PWF, Kannel WB.: Serum cholesterol as a prognostic factor after myocardial infarction: the Framingham Study. *Ann Intern Med*, 115: 687-93, 1991.
98. Yamada Y, Izawa H, Ichihara S ve beraberindekiler: Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. *N Engl J Med*, 347: 1916-23, 2002.
99. Yamada, Y., Doi, T., Hamakubo, T., and Kodama, T.: Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system. *Cell. Mol. Life Sci.* 54: 628–640. 1998

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Faruk Tamtürk
Doğum Tarihi : 21.09.1982
Doğum Yeri : Bursa

EĞİTİM DURUMU

Lisan Eğitimi : İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans : Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya ABD
Lise : Bursa Çelebi Mehmet Lisesi

AKTİVİTELERİ

Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma ve Hayvan Laboratuvarı, Deney Hayvanı Kullanımı ve Etik Yaklaşımlar, Atölye Çalışması (25 Ekim 2005)

Amerikan Hastanesi ve European Society of Anti-Aging Medicine (ESAAM), Önleyici Genetik Tanı Kursu, (12-13 Mayıs 2006).

SFRR-Europe, International Free Radical Summer School 2006: Biomarkers of Oxidative Stress and Responses, Spetses Island, Greece, 2006.

POSTERLER

Faruk Tamtürk, Nurgül Aytan, Nesrin Erçelen, Nesrin Kartal-Özer. CD36 Gene Polymorphism and Its Association with Atherogenic Lipid Profile. II. Congress of Molecular Medicine, 24-26 Mart 2007, İstanbul.

Nurgül Aytan, Faruk Tamtürk, Tilman Grune, Nesrin Kartal-Özer. Hypercholesterolemia-Induced Oxidative Stress in the Brain: The Role of Vitamin E. II. Congress of Molecular Medicine, 24-26 Mart 2007, İstanbul.

11. ETİK KURUL ONAYI