

# Koroner Kalp Hastalarında *PPARG* ve *PPAR-B/D* Gen Varyasyonlarının Serum LDL Alt-fraksiyonlarına Etkilerinin İncelenmesi

## Study on the Effects of *PPARG* and *PPAR-B/D* Gene Variations on Serum LDL Subfractions in Patients with Coronary Heart Disease

Deniz KANCA,<sup>a,b</sup>  
Bengü TOKAT,<sup>a</sup>  
Zehra BUĞRA,<sup>c</sup>  
Uzay GÖRMÜŞ,<sup>d</sup>  
Oğuz ÖZTÜRK,<sup>a</sup>  
Hülya YILMAZ-AYDOĞAN<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Moleküler Tıp AD,  
İstanbul Üniversitesi  
Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma  
Enstitüsü,

<sup>b</sup>Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü,  
Haliç Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi,  
<sup>c</sup>Kardiyoloji AD,  
İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi,  
<sup>d</sup>Biyokimya AD,  
İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
İstanbul

Geliş Tarihi/Received: 26.10.2016  
Kabul Tarihi/Accepted: 16.02.2017

Yazışma Adresi/Correspondence:  
Hülya YILMAZ AYDOĞAN  
İstanbul Üniversitesi  
Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma  
Enstitüsü,  
Moleküler Tıp AD, İstanbul,  
TÜRKİYE/TURKEY  
hulyayilmaz6@gmail.com

**ÖZET Amaç:** Son yıllarda yapılan çalışmalarda lipoprotein alt fraksiyonlarından büyük-LDL'nin antiaterojenik, küçük-yoğun LDL'nin (sdLDL) aterosjenik olduğu ve tüm LDL alt fraksiyonlarının karakterinin aynı şekilde aterosjenik olmadığı gözlemlenmiştir. Peroksisom-Proliferatör Aktive Reseptör (PPAR) beta/delta (*PPAR-B/D*) ve gama (*PPARG*) genlerindeki sekans değişimlerinin serum lipid düzeyleriyle ilişkili oldukları bilinmektedir. Ancak lipoprotein alt fraksiyonları üzerindeki etkileri kesin değildir. Bu çalışmanın amacı, söz konusu genetik varyasyonlarla serum LDL alt fraksiyonları arasındaki olası ilişkinin koroner kalp hastalığı (KKH)'nda ve normolipidemik kontrollerde incelenmesi hedeflenmiştir. **Gereç ve Yöntemler:** Çalışmamızda İstanbul Üniversitesi Kardiyoloji AD tarafından 2008-2009 yılları arasında takip edilen 58 KKH tanılı statin tedavisi almakta olan hastada ve 63 sağlıklı kontrolde *PPARG* ve *PPAR-B/D* genlerine ait varyasyonlar PZR-RFUP tekniği ile incelendi. Serum lipid düzeyleri enzimatik yöntemle ölçüldü. LDL alt toplama Lipoprint Sistemi (Quantimetrix, CA, USA) ile gerçekleştirildi. İstatistiksel analiz SPSS 20.0 paket programı ile yapıldı. **Bulgular:** *PPARG* P12A (rs1801282) ve *PPAR-B/D* +294T/C (rs52016520) varyasyonlarının çalışma gruplarındaki dağılımı benzerdir ( $p>0.05$ ). *PPARG* C161T (rs3856806) CC genotip frekansı KKH hasta grubunda yüksektir ( $p=0.029$ ). Serum LDL alt fraksiyonları sadece P12A varyasyonundan etkilenmiştir. Kontrol grubunda *PPARG* P12A heterozigot ProAla genotipi yüksek büyük-LDL alt fraksiyonu ile ilişkili iken ( $p=0.024$ ), homozigot ProPro genotipi yüksek HDL-kolesterol düzeyleri ile ilişkilidir ( $p=0.033$ ). KKH grubunda *PPARG* P12A normal ProPro genotipi yüksek triaçilgliserol ve LDL-kolesterol (LDL-K) düzeyleri (sırasıyla  $p=0.031$  ve  $p=0.010$ ) ve *PPAR-B/D* +294T/C minör C alleli yüksek LDL-K düzeyleri ile ilişkili bulunmuştur ( $p=0.038$ ). KKH grubunda ise, *PPARG* P12A varyasyonunun lipoprotein alt fraksiyon düzeylerine etkisi bulunmamıştır. **Sonuç:** KKH hastalarında *PPARG*-P12A ve *PPAR-B/D* +294T/C varyasyonlarının serum LDL-K düzeylerinde etkili iken LDL alt fraksiyon dağılımında etkili olmadıkları ve normolipidemik sağlıklı bireylerde ise alt fraksiyon dağılımında etkili oldukları tespit edilmiştir. Sonuç olarak, *PPAR* gen varyasyonlarının lipid ve LDL alt fraksiyonları üzerindeki etkilerinin kardiyometabolik durumdan etkilendiği söylenebilir.

**Anahtar Kelimeler:** PPAR gama; PPAR-beta; genler; lipoproteinler; LDL

**ABSTRACT Objective:** Recently, it was observed that while large-buoyant low density lipoprotein (LDL) subfractions have an antiatherogenic character, small-dense LDL (sdLDL) subfractions have an atherogenic character and thus not all LDL subfractions have the same atherogenic character. It is shown that DNA sequence changes in Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (*PPAR*) beta/delta (*PPAR-B/D*) and gamma (*PPARG*) genes affect lipid profile. Little is known about the effects of the PPAR variations on LDL subfractions. Purpose of the present study was to examine the presence of a potential association between aforementioned genetic variations and serum LDL subfractions in patients with coronary heart disease (CHD) and in normolipidemic controls. **Material and Methods:** This study comprised 63 healthy controls and 58 patients with coronary heart disease receiving statin therapy, attending the Department of Cardiology, Istanbul University School of Medicine in Istanbul between 2008 and 2009. The variations of the *PPARG* and *PPAR-B/D* genes were determined by PCR-RFLP technique. Serum lipid levels were measured enzymatically. The serum LDL subfractioning was carried out with the Lipoprint System (Quantimetrix, CA, USA). Statistical analyses was performed by SPSS for windows version 20.0. **Results:** The allelic and genotypic frequencies of the *PPARG* P12A (rs1801282) and *PPAR* +294T/C (rs52016520) variations were not different between the study groups ( $p>0.05$ ), while *PPARG* C161T (rs3856806) CC genotype frequency was higher in the CHD patient group ( $p=0.029$ ). The Serum LDL subfractions were observed to be only affected by the *PPARG* P12A variation. While *PPARG* P12A heterozygous ProAla genotype was associated with increased large-buoyant LDL subfractions ( $p=0.024$ ), homozygous ProPro genotype was associated with high HDL cholesterol levels ( $p=0.033$ ) in the control group. The *PPARG* Pro12Ala normal ProPro genotype was associated with increased triacylglycerol and LDL cholesterol levels ( $p=0.031$  and  $p=0.010$ , respectively) and *PPAR-B/D* +294T/C minor C allele was associated with high LDL cholesterol levels ( $p=0.038$ ) in the CHD group. There was no effect of the *PPARG* P12A variation on the lipoprotein subfractions in the CHD group. **Conclusion:** We observed that the *PPARG* Pro12Ala normal ProPro genotype and *PPAR-B/D* +294T/C minor C allele show a detrimental effect on serum LDL-K levels, while they are not effective on the distribution of LDL subfractions in the CHD patients. However, it was observed that the *PPARG* ProAla genotype contribute the antiatherogenic large-buoyant LDL subfraction in normolipidemic subjects. As a result, it is possible that the effects of genetic variations of the PPARs on lipid and LDL subfractions may have been affected by cardiometabolic circumstances.

**Keywords:** PPAR gamma; PPAR-beta; genes; lipoproteins, LDL

**A**teroskleroz, arter duvarında çevresel, metabolik ve genetik risk faktörlerinin etkisiyle gelişen endotel fonksiyon bozukluğu sonucu subendotelyal alanda okside LDL moleküllerinin, fibröz elementlerin ve inflamatuvar moleküllerin arter duvarında birikimiyle karakterize otoimmün ve inflamatuvar bir hastalıktır.<sup>1-5</sup> Aterojenik dislipidemi ise, artmış triaçilgliserol (TAG), total ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), küçük-yoğun LDL (sdLDL) ve düşük yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) seviyeleri ile karakterizedir.<sup>6,7</sup>

Kardiyovasküler hastalık (KVH) gelişiminde rol alan lipid fonksiyon bozuklukları detaylı incelendiğinde, lipoprotein alt fraksiyonlarının aterojenik süreçlere farklı şekilde etki ettiğini ortaya koymaktadır. LDL partikülleri fizikokimyasal özellikleri, metabolik davranış ve aterojenitesine göre büyük LDL (LDL 1-2) ve küçük-yoğun LDL (LDL 3-7 veya sdLDL) alt fraksiyonu olarak gruplandırılmaktadır. Yapılan çalışmalar, sdLDL alt tipinin daha aterojenik olduğunu göstermektedir.<sup>8</sup>

Lipid ve glukoz metabolizması ile inflamatuvar homeostazın sağlanmasında görev alan nükleer hormon reseptörleri bu işlevleriyle aterosklerotik hastalıkların patogenezinde rol almaktadırlar.<sup>9</sup> Peroksizom proliferatör aktive reseptörler (*PPAR*) nükleer reseptör süper ailesine dahil olan, enerji homeostazı ve metabolik fonksiyonların düzenlenmesinden sorumlu, lipid türevli substratları ligand olarak kullanan transkripsiyon faktörleridir.<sup>10,11</sup> *PPAR* izotipleri olan *PPAR*alfa, *PPAR* beta/delta ve *PPAR* gama glukoz, lipid ve kolesterol metabolizmasında önemli rol oynayan genlerin anlatımlarını düzenlerler. Enerji metabolizmasında gösterdikleri etkilerindeki dengesizlik bu nedenle obezite, tip 2 diyabet, metabolik sendrom ve KVH'ye neden olabilmektedir.<sup>10</sup> *PPAR*'ların dokulardaki dağılımı farklı olup tüm vücuttaki lipid ve glukoz metabolizması üzerinde birbirinden farklı, ancak zaman zaman örtüşen görevler üstlenen alfa, beta/delta ve gama olarak adlandırılmış üç izoformu bulunmaktadır.<sup>10,12,13</sup> *PPAR* ailesi, uzun zincirli yağ asitlerinden ökozonoidlere çeşitli endojen ligandlarla aktive edilebilmektedir. Bu özellikleri nedeniyle dislipidemi, diyabet, obezite, adiposit

farklılaşması, inflamasyon ve kanser gibi çok sayıda hastalığın tedavisine yönelik terapötik amaçlı sentetik *PPAR* ligandları üretilmiştir.<sup>14</sup>

*PPAR*'ların aterosklerotik lezyonların gelişiminde önemli etki gösterdikleri bilinmektedir.<sup>10,15-17</sup> Aterosklerozda damar cidarında gelişen köpük hücrelerinde *PPAR* gama (*PPARG*) anlatımının yüksek olması aterosklerotik lezyonları şiddetlendirdiğinin işareti olarak önerilmiştir.<sup>18,19</sup> *PPARG* adiposit farklılaşması, lipid metabolizması ve glukoz homeostazının yer aldığı yollarda çok sayıda hedef genin ekspresyonlarının düzenlenmesine katılmaktadır.<sup>14,15</sup> Bu nedenle *PPARG*; lipid/glukoz düzeyleri, obezite, insülin direnci ve inflamatuvar değişimlerle ilişkili değişimlerin yer aldığı koroner kalp hastalığı (KKH) riskini etkileyebilecek aday genler arasında yer almaktadır.<sup>9,20</sup>

En yaygın *PPARG* gen mutasyonu proteinde prolin-alanin değişimiyle sonuçlanan ekzon B kodon12 C-G değişimidir (rs1801282).<sup>21</sup> Vasküler risk faktörü olarak P12A mutasyonu ayrıca tip 2 diyabet, vücut kitlesi ve kan basıncı düzeyleri ile ilişkili gösterilmiştir.<sup>17,21-24</sup> *PPARG* geninde tanımlanan diğer yaygın bir varyasyon C161T (rs3856806) değişimidir. Wang ve ark. beyaz ırkta minör T allel taşıyanlarda kardiyovasküler riskin azaldığını bildirirken, Blüher ve ark. *PPARG* C161T gen varyasyonu ile KKH riski arasında ilişki olmadığını öne sürmüştür.<sup>16,19</sup> Daha önce yine Türk toplumunda gerçekleştirdiğimiz çalışmada ise, *PPARG* C161T CC genotipi artmış KKH riski ve yüksek serum TAG düzeyleri ile ilişkili bulunmuştur.<sup>17</sup> Metabolik hastalıklarda ve sağlıklı koşullarda *PPARG* gen varyasyonlarının serum lipid düzeylerine etkisi yoğun olarak araştırılmasına karşın, lipoprotein alt fraksiyon düzeyleri ile ilişkisi sadece bir çalışmada incelenmiştir. Japon popülasyonunda *PPARG* P12A varyasyonunun sdLDL düzeylerindeki artışın genetik alt yapısını oluşturduğu önerilmiştir.<sup>25</sup>

*PPAR* beta/delta (*PPAR-B/D*) ise değişik düzeylerde hemen her dokuda eksprese edilmektedir.<sup>20</sup> *PPAR-B/D*'nin hücre proliferasyonu ve apoptozu ile yağ asit katabolizmasının düzenlenmesinde önemli görevleri mevcuttur. Ayrıca *PPAR* beta/delta'nın kalp ve iskelet kasında yağ asitleri-

nin kullanımında yer alan genlerin ekspresyonunu arttırarak, iskelet kası fibril tipini glikolitikten oksidatifte değiştirerek yağ asit oksidasyonunu aktive ettiği keşfedilmiştir.<sup>26</sup> *PPAR-B/D* agonistleri ile yapılan alışmalar *PPAR-B/D*'nin lipid profili, ateroskleroz, obezite ve insülin direnci üzerinde yararlı metabolik etkileri olduğunu göstermiştir.<sup>27,28</sup> *PPAR-B/D* geni 5'-UTR bölgesinde tanımlanan +294T/C tek nükleotit polimorfizmi (SNP) (rs52016520) minör C alleli ile yüksek LDL kolesterol (LDL-K) ve apoB düzeyleri, vücut kitlesi ve düşük HDL kolesterol (HDL-K) düzeyleri ilişkili olarak aterojenik etkili bulunmuştur.<sup>13,29-33</sup> Ancak bazı çalışma sonuçları çelişkilidir.<sup>34-36</sup> *PPAR-B/D* +294T/C minör C allelinin yüksek HDL-K düzeyleri ile ilişkili olduğunu ya da serum lipid düzeylerine etkisiz olduğunu öne süren çalışmalar da mevcuttur.<sup>34-36</sup>

Son alışmalarda, *PPAR-B/D* agonisti MBX-8025'in lipoprotein alt fraksiyonları üzerinde etki göstererek aterojenik dislipidemi tedavisinde statin tedavisine komplementer olumlu iyileşme sağladığı bildirilmiştir.<sup>37</sup> Fakat literatürde *PPAR-B/D* +294T/C varyasyonunun serum lipoprotein alt fraksiyonları üzerindeki etkilerini inceleyen bir araştırma bulunmamaktadır. Çalışmamız literatürde *PPAR-B/D*+294T/C varyasyonunun serum lipoprotein alt fraksiyonlarına etkisini inceleyen ilk araştırmadır.

Çalışmamızda, *PPARG* geni P12A ve C161T ile *PPAR-B/D* geni +294T/C gen varyasyonlarının koroner kalp hastalarında ve normolipidemik sağlıklı kontrollerde LDL alt fraksiyonları üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

### ÇALIşMA GRUPLARININ KARAKTERİSTİKLERİ

Çalışmamız İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı tarafından 2008-2009 yılları arasında takip edilen 58 KKH tanısı konmuş hasta (16 kadın, 42 erkek) ve 63 sağlıklı kontrol (23 kadın, 40 erkek) gruplarından oluşturulmuştur. Anjiyografik inklüzyon kriterleri  $\geq$ 50 stenoz ve miyokardiyal infarktüs, perkütanöz translüminal anjiyoplasti veya en az bir major koroner arterde

koroner arter by-pass ameliyatı gibi ateroskleroza bağlı vasküler olaylara göre belirlenmiştir. Hasta grubunu oluşturan KKH tanısı almış bireylerin tümü ortalama 2,3 yıl süre olmak üzere statin tedavisi almaktaydı. Rutin klinik görüşmeler esnasında hasta veya kontrol grubuna dahil edilmek üzere uygun olduğu düşünölen bireylere proje hakkında bilgi verilmiştir. Bilgi verilen adaylar çalışmaya katılmak üzere gönüllü olmuşlarsa kendilerine "bilgilendirilmiş gönüllü olur formu" imzalatılarak kan örnekleri alınmıştır. Kontrol grubu ise kendisi ve ailesi kalp hastalıkları için asemptomatik bireylerden oluşturulmuştur. Ancak bu bireylere koroner anjiyografi uygulanmamıştır.

LDL alt gruplarının düzeylerinde çeşitli genetik ve çevresel metabolik faktörler rol oynamaktadır. Alt grup düzeylerinin belirlenmesinde yaş, cinsiyet etkenleri önemlidir. Bu nedenle çalışmamızı küçük olmasına karşın yaş ve cinsiyet açısından aralarında farklılık olmayan hasta ve kontrol örneklem gruplarında gerçekleştirdik.

Çalışma protokolü "İstanbul Üniversitesi Etik Komitesi" tarafından onaylı ve Dünya Tabipleri Birliği Helsinki Bildirgesi (2008)'nin "İnsanlar Üzerinde Yapılan Tıbbi Araştırmalarla İlgili Etik İlkelere"ne uyumludur.<sup>38</sup>

### PPARG VE PPARG GEN VARYASYONLARININ ANALİZİ

EDTA'lı tüplere alınan periferik kan örneklerinden DNA izolasyonları yapıldı.<sup>39</sup> *PPARG* P12A, *PPARG* C161T ve *PPAR-B/D*+294T/C genetik varyasyonları Polimeraz Zincir Reaksiyonu- Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (PZR-RFUP) metodları ile belirlendi.<sup>16,36,40</sup>

### LİPOPROTEİN ALT FRAKSİYON ANALİZİ

Kan örnekleri gece boyu açlığı takiben serum tüpüne alındı ve 10 dakika 1500 rpm'de santrifüj edilerek serum kısmı ayrıldı. Serum örnekleri enzimatik serum lipid düzey ölçümlerinin yapılacağı zamana kadar -20°C'de muhafaza edildi. Total kolesterol (TC) düzeyleri kolesterol oksidaz-peroksidaz aminoantipirin (CHOD-PAP) enzimatik kolorimetrik testi ile ölçöldü. Serum yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol (HDL-K) düzeyleri fosfatotungstik asit ve magnezyum iyonları ile

apolipoprotein B-içeren lipoproteinlerin presipitasyonunu takiben CHOD-PAP testi ile ölçüldü. Serum TAG düzeyleri ise gliserol fosfat oksidaz-peroksidaz-aminoantipirin (GPO-PAP) enzimatik kolorimetrik testi ile ölçüldü. Ölçümler Shimadzu UV-1208 spektrofotometre cihazında 500 nm dalga boyunda yapıldı. Son olarak, serum düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (LDL-K) düzeyleri Friedewald formülü ile hesaplandı.

Alt-fraksiyonlama analizinde LDL molekülleri boyut, yoğunluk, fizikokimyasal özellikler, metabolik davranış ve aterosklerozüne göre fenotip A ve B olarak sınıflandırılmaktadır.<sup>8</sup> Buna göre, LDL molekülleri boyutları >26,5 nm (265 Å) ise "LDL alt tip 1-2" olarak adlandırılırken, <26,5 nm (265 Å) ise "LDL alt tip 3-7" olarak adlandırılmıştır. LDL alt tip 1-2 (fenotip A) büyük, ve daha az ateroskleroz bir LDL fraksiyonu iken, LDL alt tip 3-7 (fenotip B) ise, küçük, yoğun ve ateroskleroz LDL fraksiyondur.<sup>8,11</sup>

Bu çalışmada LDL alt fraksiyonları, serum örneğinden Lipoprint Sistemi (Quantimetrix, CA, USA) ile ölçüldü. Lipoprint Sistemi, lipoprotein partiküllerini yüksek çözünürlüklü gradient olmayan poliakrilamid jel elektroforezi ile çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL), ara yoğunluklu lipoprotein (IDL) ve LDL 1-2 (büyük, patern A) ve LDL 3-7 (küçük-yoğun, patern B) alt fraksiyonları olarak adlandırılmış iki alt fraksiyonu olan LDL olarak sınıflandırmayı sağlamaktadır.

## İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analiz SPSS 20.0 paket programı (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) ile gerçekleştirilmiştir. Koroner kalp hasta ve kontrol grupları arasında *PPARG* ve *PPAR B/D* SNP'lerinin genotip ve allel dağılımı ki-kare istatistik testi ile değerlendirilmiştir. Klinik laboratuvar verileri ortalama  $\pm$ SD ile ifade edilmiştir. Hasta ve kontroller için ortalama değerler non-parametrik Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı  $p < 0,05$  olarak kullanılmıştır.

## BULGULAR

Çalışma gruplarına ait demografik ve metabolik özellikler Tablo 1'de verilmiştir. Hasta ve kontrol grupları arasında yaş ortalaması ve cinsiyet dağı-

**TABLO 1: Çalışma gruplarının karakteristik özellikleri.**

	Gruplar		
	Kontrol (n=63)	KKH Hasta (n=58)	P değeri
Yaş (yıl)	54,21±11,90	56,00±9,37	0,349
Cinsiyet (K/E)	23/40	16/42	0,135
BKİ (kg/m <sup>2</sup> )	25,25±3,73	26,04±3,26	0,222
Total-K (mmol/L)	4,48±1,27	4,90±1,55	0,099
Triaçilgliserol (mmol/L)	1,77±0,89	1,59±0,85	0,256
HDL-K (mmol/L)	1,07±0,32	0,95±0,30	0,044
LDL-K (mmol/L)	2,73±1,11	3,04±1,24	0,138
LDL 1-2 (büyük LDL)	0,40±0,22	0,48±0,29	0,333
LDL 3-7 (küçük-yoğun LDL)	0,10±0,12	0,16±0,13	0,276
VLDL-K (mmol/L)	0,72±0,25	0,70±0,39	0,813
Sigara Kullanımı (%)	%50,79	%81,03	0,001
KKH Aile hikayesi varlığı (%)	%31,74	%43,1	0,338

KKH: Koroner kalp hastalığı; BKİ: Beden kitle indeksi; Total-K: Total-kolesterol; TAG: Triaçilgliserol; HDL-K: HDL-kolesterol; LDL-K: LDL-kolesterol; VLDL-K: VLDL-kolesterol; n: Örnek sayısı.

lımları benzerdir ( $p > 0,05$ ). KKH hasta grubunda sigara kullanım oranı ( $p = 0,001$ ) kontrol grubuna kıyasla yüksek iken, serum HDL-K düzeyi düşük gözlenmiştir ( $p = 0,044$ ). KKH Hasta grubunu oluşturan bireylerin %31,03'ü hipertansif, %13,8'i tip 2 diyabetiktir.

Kontrol ve hasta gruplarında *PPARG* genindeki P12A ve C161T ve *PPAR-B/D* genindeki +294 T/C varyasyonlarının genotip ve allel dağılımları ile Hardy-Weinberg Eşitliği (HWE)'ne uyumları Tablo 2'de gösterilmiştir. Kontrol ve hasta gruplarında *PPARG* ve *PPAR-B/D* varyasyonlarının dağılımı HWE'ye uyumludur ( $p > 0,05$ ). *PPARG* P12A ve *PPAR-B/D* +294T/C varyasyonlarının çalışma gruplarındaki dağılımı benzerdir ( $p > 0,05$ ). *PPARG* C161T CC genotip frekansı ise KKH hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla yüksek gözlenmiştir ( $p = 0,029$ , ki-kare=4,745 (OR=1,599, %95GA=1,032-2,477)).

Kontrol ve hasta gruplarında *PPARG* ve *PPAR-B/D* varyasyonlarının serum lipoprotein profili, LDL alt fraksiyonları ve beden kitle indeksi (BKİ) üzerindeki etkisi incelendiğinde, KKH grubunda *PPARG* P12A SNP ProPro genotipi yüksek TAG ve LDL-K düzeyleri ile ilişkili bulunmuştur (sırasıyla  $p = 0,031$  ve  $p = 0,010$ ). *PPAR-B/D* geni +294T/C SNP minör C alleli de yüksek LDL-K dü-

**TABLO 2:** Çalışma gruplarında *PPAR* SNP dağılımları.

<i>PPAR</i> gama Geni	Çalışma Grupları	
	Kontrol (n=63)	KKH Hasta (n=58)
<b>P12A Genotipleri</b>		
ProPro	53 (%84,1)	47 (%81,0)
AlaAla	-	-
ProAla	10 (%15,9)	11 (%19,0)
HWE	p=0,49	p=0,42
<b>P12A Allelleri</b>		
Pro12	116 (%92,06)	105 (%90,52)
Ala12	10 (%7,94)	11 (%9,83)
<b>C161T Genotipleri</b>		
CC	30 (%47,6)	39 (%67,2)*
TT	2 (%3,2)	3 (%5,2)
CT	31 (%49,2)	16 (%27,6)
HWE	p=0,07	p=0,43
<b>C161T Allelleri</b>		
C161	91(%72,22)	94 (%81,03)
T161	35 (%27,78)	22 (%18,97)
<b><i>PPAR</i> beta/delta Geni</b>		
<b>+294T/C Genotipleri</b>		
TT	33 (%54,2)	29 (%50,0)
CC	3 (%4,8)	6 (%10,3)
TC	27 (%42,9)	23 (%39,7)
HWE	p=0,39	p=0,66
<b>C161T Allelleri</b>		
T294	93 (%73,81)	81 (%69,83)
C294	33 (%26,19)	35 (%30,17)

n: örnek sayısı; HWE: Hardy-Weinberg Eşitliği.

\*, p=0,029; ki-kare=4,745 (OR=1,599, %95GA= 1,032-2,477).

zeyleri ile ilişkili tespit edilmiştir ( $p=0,038$ ) (Tablo 3). Kontrol grubunda ise, *PPAR-G* P12A ProPro genotipinin yüksek HDL-K düzeyleri ( $p=0,024$ ) ve P12A SNP ProAla genotipinin yüksek büyük-LDL alt fraksiyonu ile ilişkili olduğu gözlenmiştir.

## TARTIŞMA

Nükleer transkripsiyon faktörleri arasında yer alan *PPAR*'lar lipid metabolizması üzerindeki direkt etkileri nedeniyle son yıllarda gelişiminde lipid metabolizma bozukluğu olan hastalıklarda risk etkileri ve agonist/antagonistleri aracılığıyla tedaviye katkıları yoğun olarak araştırılmaktadır.<sup>9,14</sup> İnflamatuvar yanıtın düzenlenmesi, makrofaj farklılaşması ve apoptozun indüklenmesinde görev alan *PPAR* gama (*PPARG*), okside LDL alımı ile köpük hücre oluşumunu stimüle ederek, aterosklerotik plak destabilizasyonundan sorumlu MMP9 gibi matriks

metalloproteinazların anlatımını azaltarak ateroskleroz patojenezine de katılmaktadır.<sup>18</sup> Aterojenik okside LDL partikülleri *PPARG* aktivasyonu ve köpük hücre oluşumuna götüren CD36 anlatımını arttırarak kendilerinin monosit/makrofaj bünyesine alımlarını tetikleyebilirler.<sup>15,18</sup> Buna karşılık, *PPARG* ATP bağlayan kaset taşıyıcı proteini A1 (ABCA1) yoluyla kolesterolün uzaklaştırılması ve IL-6, IL-1b, tümör nekroz faktörü alfa, jelatinaz ve çöpçü reseptör anlatımını stimüle eden forbol esterlerinin baskılanması ile anti inflamatuvar karaktere de sahiptir. Yapılan çalışmalar *PPARG* agonistlerinin (Tiazolidinedion-TZD) tip 2 diyabetiklerde karotid arter duvarı kalınlaşmasını azalttığını göstermektedir.<sup>19</sup>

*PPAR* gama, obezite ve diyabet gibi risk faktörleriyle ilişkisi üzerinden aterogenezde ve arteriyel duvar makrofaj köpük hücrelerinin hücre altı metabolizmasında rol oynamaktadır. Rol aldığı yollarla itibariyle genin varyasyonları metabolik hastalıklara ve KVH'ye sebep olmaktadır, ancak araştırma sonuçları çalışılan topluma göre farklılık göstermektedir.<sup>15,18,20</sup> Fin popülasyonunda düşük BKİ ve yüksek insülin duyarlılığı ile ilişkili bulunan *PPARG* P12A Ala allelinin tip 2 diyabet di-renci ile de ilişkili olduğu gözlenmiştir. P12A varyantı beyaz ırkta ise yüksek BKİ değerleri ve obezite ile ilişkili bulunmuştur.<sup>41</sup> Yine *PPARG* geninde bulunan C161T değişimi, obez Fransız bireylerde düşük plazma leptin seviyeleri ile ilişkili iken, Avustralya beyaz ırkta azalmış koroner arter hastalık riski ile ilişkili bulunmuştur. Japon çocuklarda yapılan bir çalışmada da *PPARG* C161T varyasyonunun lipid metabolizması, leptin düzeyleri ve obezite ile ilişkili olduğu görülmüş ancak bu çocuklarda *PPARG* P12A varyantına rastlanmamıştır.<sup>12</sup> Bir başka çalışmada ise, KVH'si olan ve olmayan tip 2 diyabetiklerde *PPARG* P12A ve C161T varyasyonlarının yüksek BKİ değerleriyle ilişkili olmalarına rağmen KVH gelişimi üzerine etkilerinin olmadığı gözlenmiştir.<sup>19</sup> Buna karşılık, *PPARG* P12A ve C161T varyasyonları nefropatik diyabet hastalarındaki kardiyovasküler olaylar için belirteç olarak önerilmiş ve *PPARG* P12A minör Ala alleli ve C161T minör T alleli de kardiyovasküler risk artışından sorumlu olarak bildirilmiştir.<sup>42</sup>

**TABLO 3:** Çalışma gruplarında *PPARG* ve *PPAR B/D* gen varyasyonlarının serum lipid alt fraksiyon ve obezite parametreleriyle ilişkisi.

	Gruplar					
	<i>PPARG</i> P12A		<i>PPARG</i> C161T		<i>PPAR-B/D</i> +294T/C	
	P12P	P12A	CC-161	T-161	294-TT	294-C
Total-K	5,24±1,52	4,15±1,18	5,03±1,65	5,03±1,20	4,77±1,34	5,29±1,66
TAG	1,64±0,89 *	1,56±0,72	1,70±0,85	1,48±0,88	1,66±0,92	1,58±0,79
HDL-K	1,00±0,29	0,86±0,30	0,99±0,32	0,98±0,23	1,02±0,31	0,94±0,27
LDL 1,2	0,35±0,12	0,45±0,17	0,36±0,12	0,50±0,18	0,37±0,13	0,41±0,16
LDL 3,7	0,21±0,24	0,08±0,06	0,16±0,22	0,10±0,07	0,26±0,33	0,09±0,05
VLDL-K	0,72±0,40	0,69±0,37	0,73±0,40	0,70±0,39	0,77±0,42	0,67±0,36
BKİ	26,03±3,40	25,84±2,98	26,26±3,50	25,51±2,92	26,45±3,63	25,54±2,93
LDL-K	3,28±1,29 &	2,44±0,77	3,12±1,38	3,09±0,96	2,78±1,00	3,47±1,40 *
	Kontrol Grubu (n=63)					
	<i>PPARG</i> P12A		<i>PPARG</i> C161T		<i>PPAR-B/D</i> +294T/C	
	P12P	P12A	CC-161	T-161	294-TT	294-C
Total-K	4,51±1,32	4,54±1,11	4,66±1,45	4,38±1,12	4,57±1,40	4,46±1,16
TAG	1,72±0,90	2,08±0,97	1,75±0,93	1,80±0,90	1,92±1,13	1,61±0,56
HDL-K	1,10±0,32 <sup>†</sup>	0,86±0,30	1,03±0,26	1,09±0,38	1,06±0,30	1,06±0,36
LDL 1,2	0,36±0,19	0,70±0,04 <sup>‡</sup>	0,36±0,23	0,45±0,17	0,33±0,13	0,45±0,23
LDL 3,7	0,08±0,09	0,03±0,01	0,08±0,11	0,05±0,02	0,04±0,03	0,09±0,07
VLDL-K	0,70±0,25	0,80±0,30	0,69±0,23	0,74±0,29	0,71±0,28	0,72±0,24
BKİ	25,14±3,72	26,09±4,31	25,78±3,71	24,84±3,88	25,03±4,33	24,73±3,12
LDL-K	2,75±1,17	2,86±0,81	2,96±1,37	2,59±0,79	2,77±1,23	2,77±1,00

Tablodaki değerler Ortalama±SD olarak verilmiştir. Total-K: Total kolesterol, TAG: triağiliserol, HDL-K: HDL-kolesterol, LDL 1.2: Büyük LDL, LDL 3.7: Küçük-yoğun LDL, VLDL-K: VLDL-kolesterol, BKİ: Beden kitle indeksi, VYA: Vücut yüzey alanı, n=örnek sayısı.

\* , p=0,031; & , p=0,010; # , p=0,038; † , p=0,033; ‡ , p=0,024.

Kanada yerlilerinde yapılan bir çalışmada *PPARG* P12A ve C161T (c.1431C>T) polimorfizmlerinin karotid intima kalınlaşması (IMT) ve karotid plak hacmi (TPV) üzerine etkileri incelenmiş olup *PPARG* P12A varyasyonu taşıyıcılarında A12 allelinin düşük karotid IMT ile ilişkili iken, *PPARG* C161T varyasyonu minör T allelinin ise daha yüksek TPV ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar *PPAR* gama genotipleri ile karotid arteryal fenotiplerinin ilişkili olduğuna ve A12 allelinin agresif fenotipe karşı koruyucu etkili olduğuna işaret etmektedir.<sup>43</sup>

Literatürde bazı vaka ve aile tabanlı çalışmalarda *PPARG* P12A polimorfizminin A12 allelinin anlamlı şekilde düşük tip 2 diyabet ve miyokard infarktüsü (MI) riski ile ilişkili olduğu, buna karşın *PPARG* C161T minör T allelinin obezite ve KKH riskine daha düşük oranda etki ettiği gösterilmiştir.<sup>43</sup>

Bu örneklerde görüldüğü üzere, *PPAR* gen varyasyonlarının HDL-K ve LDL-K düzeylerine olan etkisi lipid metabolizmasıyla ilişkili metabolik ve kardiyovasküler sistem hastalıklarında pek çok toplumda çalışılmıştır.<sup>12,19,41-43</sup> Buna karşılık, lipoprotein alt fraksiyonları üzerine etkisini araştırılan sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

Japon populasyonunda sdLDL partikülleri, hücrelerin LDL reseptörlerine düşük bağlanma kapasiteleri ve daha kolay oksitlenmeleri nedeniyle koroner arter hastalığı için risk faktörü olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada ayrıca, P12A SNP minör Ala allelinin yüksek sdLDL fraksiyonu (LDL4-7) (p=0,002) ve TAG (p=0,001) düzeyleriyle ilişkili olduğu bildirilmiş (p=0,04) ve varyasyonun sdLDL düzeylerindeki artışın hastalığın genetik alt yapısına katkıda bulunduğu önerilmiştir.<sup>25</sup>

*PPAR-B/D* geninin transkripsiyonel aktivitesini etkilediği bilinen +294T/C polimorfizminin

KKH olan ve olmayan kadın hiperlipidemik bireylerde incelenmesi sonucu polimorfizmin KKH ve plazma lipid düzeyleri ile ilişkili olduğu gözlenmiştir.<sup>13</sup> Bu çalışmanın bulgularına göre göre, *PPAR-B/D+294T/C* polimorfizmi yüksek VLDL ve LDL düzeyleriyle ilişkilidir. Bununla birlikte, minör C allelinin düşük plazma HDL düzeyleri üzerinden KKH ve BKİ ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir.<sup>13</sup> Çalışmanın bulguları, daha önce Skogberg ve ark. (2003) tarafından İsveç erkek hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada elde edilen ve minör C allelinin düşük plazma HDL düzeyleri ile ilişkili olduğu yönündeki sonuçları kadın hasta grubu için desteklemektedir.<sup>29</sup> Normolipidemik Tunus popülasyonunda yapılan bir çalışmada ise, C alleli koroner arter hastalarında kontrollere kıyasla daha yüksek oranda gözlenmiştir.<sup>35</sup>

Çalışmaya katılan hasta ve kontrol gruplarının sayıca az olması, retrospektif ve nispeten küçük çaplı olması çalışmamızın sınırlılıkları olarak sayılabilir. Ayrıca retrospektif olması nedeniyle, hasta grubunun LDL-alt grup düzeylerini etkileyen lipid-düşürücü statin grubu ilaç kullanımını da çalışmamızın sınırlılıkları arasındadır.

Çalışmamızda, koroner kalp hastalarında *PPARG* P12A yaygın ProPro genotipinin yüksek TAG ve LDL-K düzeyleriyle ve *PPAR-B/D+294T/C* varyasyonu minör C allelinin yüksek LDL düzeyleriyle ilişkili olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar *PPARG* P12A ve C161T varyasyonlarının KKH hastalarında lipid metabolizmasındaki etkilerini destekler niteliktedir. Buna karşılık, kontrol grubunda, *PPARG* P12A ProPro genotipinin yüksek HDL-K ve ProAla büyük-LDL düzeyleriyle ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Koroner kalp hastaları ve sağlıklı kontrollerde *PPARG* varyasyonlarının lipid metabolizması üzerinde gösterdiği bu farklı etkilerin kardiyometabolik değişimlerden kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca serum sd-LDL düzeyleri statin kullanımından etkilenmektedir. Ancak çalışmamızda koroner kalp hastası ve sağlıklı kontrol olmak üzere iki grup kullanılmıştır. Serum LDL alt fraksiyonları sadece kontrol grubunda ve sadece *PPAR* gama P12A varyasyonundan etkilenmiştir. Kontrol grubunda *PPARG*

P12A heterozigot ProAla genotipi yüksek büyük-LDL alt fraksiyonu ile ilişkili iken ( $p=0,024$ ), homozigot ProPro genotipi yüksek HDL-kolesterol düzeyleri ile ilişkilidir ( $p=0,033$ ). Buna karşılık, KKH grubunda *PPARG* P12A varyasyonunun lipoprotein alt fraksiyon düzeylerine etkisi bulunmamıştır. Kontrol grubunda gözlemlediğimiz *PPARG* P12A genotipi ve yüksek serum büyük-LDL alt fraksiyonu ilişkisinin KKH hasta grubunda gözlenmemesi, gerçekte statin kullanımından kaynaklı olabilir. Bu bağlamda, KKH hasta grubunda *PPAR* genotipleri ve LDL alt fraksiyon düzeyleri arasında sağlıklı kontrollerden farklı olarak ilişki olmadığını gösteren bulgumuzu, KKH hastalarında statin grubu ilaç kullanımına da atfedebiliriz. Sonuç olarak, araştırmamızı daha büyük ölçekli bir çalışmaya taşıyarak bulgularımızı güçlendirmeyi hedeflemekteyiz.

## SONUÇ

Genetik ve çevresel etkenlere bağlı lipid metabolizması bozuklukları günümüzde sağlıklı beslenme ve hareketsiz yaşam tarzıyla giderek yaygınlaşan ve aterosklerotik sürecin bir ürünü olan KVH'nin gelişiminde rol oynamaktadır. Aterojenik dislipidemi TAG, LDL-K ve HDL-K düzeyleri arasındaki dengenin bozulmasıyla gelişir. Son yapılan çalışmalarda lipoproteinlerin aterojenik sürece katkılarının lipoprotein alt fraksiyonları araştırılarak daha doğru değerlendirilebileceği gösterilmiştir. Literatürde *PPAR*'ın lipoprotein metabolizma bozuklukları ile ilişkili hastalıklarda risk etkileri yoğun olarak araştırılmasına karşın, lipoprotein alt fraksiyonları düzeyleri ile ilişkilerini araştırılan sınırlı çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle, çalışmamız kapsamında KKH'de hiperlipidemi ve ateroskleroz patogenezinde rol oynadığı bilinen *PPARG* geni P12A, C161T ve *PPAR B/D* geni +294T/C varyasyonlarının LDL alt fraksiyon düzeylerine etkisi araştırılmıştır. KKH hastalarında kontrol grubuna göre *PPARG* C161T CC genotip frekansı yüksektir. KKH grubunda *PPARG* P12A ProPro genotipinin yüksek TAG ve LDL-K düzeyleri, *PPAR-B/D+294T/C* varyasyonu minör C allelinin ise yüksek LDL-K düzeyleriyle ilişkili olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubunda ise *PPARG* P12A

varyasyonu yüksek HDL-K ve büyük-LDL düzeyleriyle ilişkili bulunmuştur. Bulgularımız, PPAR gen varyasyonlarının lipoprotein metabolizması ve LDL alt fraksiyonları üzerinde etkili olduklarına ve lipid/lipoprotein alt fraksiyon üzerindeki etkileri aracılığıyla bağımsız KKH risk artışına katkılarına işaret etmektedir.

### Çıkar Çatışması

*Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.*

### Finansal Destek

*Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 946.*

### Yazar Katkıları

**Fikir/Kavram:** Hülya Yılmaz Aydoğan; **Tasarım:** Uzay Görmüş; **Denetleme/Danışmanlık:** Oğuz Öztürk; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Zehra Buğra, Deniz Kanca; **Analiz ve/veya Yorum:** Hülya Yılmaz Aydoğan, Zehra Buğra; **Kaynak Taraması:** Bengü Tokat; **Makalenin Yazımı:** Hülya Yılmaz Aydoğan, Deniz Kanca.

## KAYNAKLAR

1. Dimmeler S. Cardiovascular disease review series. *EMBO Mol Med* 2011;3(12):697.
2. Kelly BB, Fuster V. Promoting Cardiovascular Health in the Developing World: A critical Change to Achieve Global Health. 1<sup>st</sup> ed. Washington, DC: The National Academies Press; 2010. p.482.
3. Mehta JL, Chen J, Hermonat PL, Romeo F, Novelli G. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1(LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and related disorders. *Cardiovasc Res* 2006;69:36-45.
4. Sayols-Baixeras S, Lluís-Ganella C, Lucas G, Elosua R. Pathogenesis of coronary artery disease: focus on genetic risk factors and identification of genetic variants. *Appl Clin Genet* 2014;7:15-32.
5. Ambrose JA, Singh M. Pathophysiology of coronary artery disease leading to acute coronary syndromes. *F1000Prime Rep* 2015;7(8): 1-5.
6. Rizzo M, Berneis K. Low-density lipoprotein size and cardiovascular risk assessment. *QJM* 2006;99(1):1-14.
7. Todur SP, Ashavaid TF. Association of CETP and LIPC Gene Polymorphisms with HDL and LDL Sub-fraction Levels in a Group of Indian Subjects: A Cross-Sectional Study. *Indian J Clin Biochem* 2013;28(2):116-23.
8. Austin MA, King MC, Vranizan KM, Krauss RM. Atherogenic lipoprotein phenotype: A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation* 1990;82(2):495-506.
9. Beaven SW, Tontonoz P. Nuclear receptors in lipid metabolism: targeting the heart of dyslipidemia. *Annu Rev Med* 2006;57:313-29.
10. Fruchart JC. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha): at the crossroads of obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2009;205(1):1-8.
11. Hoogeveen RC, Gaubatz JW, Sun W, Dodge RC, Crosby JR, Jiang J, et al. Small dense low-density lipoprotein-cholesterol concentrations predict risk for coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34(5):1069-77.
12. Arashiro R, Katsuren K, Fukuyama S, Ohta T. Effect of Trp64Arg mutation of the beta3-adrenergic receptor gene and C161T substitution of the peroxisome proliferator activated receptor gamma gene on obesity in Japanese children. *Pediatr Int* 2003;45(2):135-41.
13. Aberle J, Hopfer I, Beil FU, Seedorf U. Association of the T+294C polymorphism in PPAR delta with low HDL cholesterol and coronary heart disease risk in women. *Int J Med Sci* 2006;3(3):108-11.
14. Tyagi S, Gupta P, Saini AS, Kaushal C, Sharma S. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J Adv Pharm Technol Res* 2011;2(4):236-40.
15. Marx N, Schönbeck U, Lazar MA, Libby P, Plutzky J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1998; 83(11):1097-103.
16. Flavell DM, Jamshidi Y, Hawe E, Pineda Torra I, Taskinen MR, Frick MH, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene variants influence progression of coronary atherosclerosis and risk of coronary artery disease. *Circulation* 2002;105(12):1440-5.
17. Yılmaz-Aydoğan H, Kurnaz O, Kurt O, Akadam-Teker B, Kucukhuseyin O, Tekeli A, et al. Effects of the PPARγ P12A and C161T gene variants on serum lipids in coronary heart disease patients with and without Type 2 diabetes. *Mol Cell Biochem* 2011;358(1-2):355-63.
18. Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, et al. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-gamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(13): 7614-9.
19. Blüher M, Klemm T, Gerike T, Krankenberg H, Schuler G, Paschke R. Lack of association between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-2 gene variants and the occurrence of coronary heart disease in patients with diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 2002;146(4):545-51.
20. Kota BP, Huang TH, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res* 2005;51(2):85-94.
21. Temelkova-Kurktschiev T, Hanefeld M, Chinetti G, Zawadzki C, Haulon S, Kubaszek A, et al. Ala12Ala genotype of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 protects against atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(9):4238-42.
22. Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, et al. The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 2000;26(1):76-80.
23. Masud S, Ye S; SAS Group. Effect of the peroxisome proliferator activated receptor-gamma gene Pro12Ala variant on body mass index: a meta-analysis. *J Med Genet* 2003;40(10):773-80.
24. Ostgren CJ, Lindblad U, Melander O, Melander A, Groop L, Råstam L. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma Pro12Ala polymorphism and the association with blood pressure in type 2 diabetes: skaraborg hypertension and diabetes project. *J Hypertens* 2003;21(9):1657-62.
25. Hamada T, Kotani K, Tsuzuki K, Sano Y, Murata T, Tabata M, et al. Association of Pro12Ala polymorphism in the peroxisome



- proliferator-activated receptor gamma2 gene with small dense low-density lipoprotein in the general population. *Metabolism* 2007;56(10):1345-9.
26. Tesse A, Andriantsitohaina R, Ragot T. PPAR $\delta$  activity in cardiovascular diseases: A potential pharmacological target. *PPAR Res* 2009;2009:745821.
  27. Dressel U, Allen TL, Pippal JB, Rohde PR, Lau P, Muscat GE. The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. *Mol Endocrinol* 2003;17(12):2477-93.
  28. Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S, Asaba H, Hamura H, Ikeda Y, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(26):15924-9.
  29. Skogsberg J, McMahon AD, Karpe F, Hamsten A, Packard CJ, Ehrenborg E; West of Scotland Coronary Prevention Study. Peroxisome proliferator activated receptor delta genotype in relation to cardiovascular risk factors and risk of coronary heart disease in hypercholesterolaemic men. *J Intern Med* 2003;254(6):597-604.
  30. Aberle J, Hopfer I, Beil FU, Seedorf U. Association of peroxisome proliferator-activated receptor delta +294T/C with body mass index and interaction with peroxisome proliferator-activated receptor alpha L162V. *Int J Obes (Lond)* 2006;30(12):1709-13.
  31. Chen S, Tsybouleva N, Ballantyne CM, Gotto AM Jr, Marian AJ. Effects of PPARalpha, gamma and delta haplotypes on plasma levels of lipids, severity and progression of coronary atherosclerosis and response to statin therapy in the lipoprotein coronary atherosclerosis study. *Pharmacogenetics* 2004;14(1):61-71.
  32. Nikitin AG, Chistiakov DA, Minushkina LO, Zateyschikov DA, Nosikov VV. Association of the CYBA, PPARGC1A, PPARG3, and PPARD gene variants with coronary artery disease and metabolic risk factors of coronary atherosclerosis in a Russian population. *Heart Vessels* 2010;25(3):229-36.
  33. Yilmaz-Aydogan H, Kucukhuseyin O, Kurnaz O, Akadam-Teker B, Kurt O, Tekeli A, et al. Investigation of polymorphic variants of PPARD and APOE genes in Turkish coronary heart disease patients. *DNA Cell Biol* 2012;31(5):867-75.
  34. Robitaille J, Gaudet D, Pérusse L, Vohl MC. Features of the metabolic syndrome are modulated by an interaction between the peroxisome proliferator-activated receptor-delta -87T>C polymorphism and dietary fat in French-Canadians. *Int J Obes (Lond)* 2007;31(3):411-7.
  35. Jguirim-Souissi I, Jelassi A, Hrira Y, Najah M, Slimani A, Addad F, et al. +294T/C polymorphism in the PPAR-delta gene is associated with risk of coronary artery disease in normolipidemic Tunisians. *Genet Mol Res* 2010;9(3):1326-33.
  36. Gouni-Berthold I, Giannakidou E, Faust M, Berthold HK, Krone W. The peroxisome proliferator-activated receptor delta +294T/C polymorphism in relation to lipoprotein metabolism in patients with diabetes mellitus type 2 and in non-diabetic controls. *Atherosclerosis* 2005;183(2):336-41.
  37. Choi YJ, Roberts BK, Wang X, Geaney JC, Naim S, Wojnoonski K, et al. Effects of the PPAR- $\delta$  agonist MBX-8025 on atherogenic dyslipidemia. *Atherosclerosis* 2012;220(2):470-6.
  38. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* 2013;310(20):2191-4.
  39. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16(3):1215.
  40. Yen CJ, Beamer BA, Negri C, Silver K, Brown KA, Yarnall DP, et al. Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma (hPPARgamma) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR gamma 2 missense mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;241(2):270-4.
  41. Beamer BA, Yen CJ, Andersen RE, Muller D, Elahi D, Cheskin LJ, et al. Association of the Pro12Ala variant in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene with obesity in two Caucasian populations. *Diabetes* 1998;47(11):1806-8.
  42. Szeto CC, Chow KM, Poon PY, Kwan BC, Li PK. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene polymorphism and risk of cardiovascular disease in patients with diabetic nephropathy. *Am J Nephrol* 2008;28(5):715-22.
  43. Al-Shali KZ, House AA, Hanley AJ, Khan HM, Harris SB, Zinman B, et al. Genetic variation in PPARG encoding peroxisome proliferator-activated receptor gamma associated with carotid atherosclerosis. *Stroke* 2004;35(9):2036-40.