

756073

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İNFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALARINDA CARD15/NOD2 GENİ
3020 insC MUTASYONU VE SİTOKİN GEN POLİMORFİZİMLERİNİN
İNCELENMESİ

Bilim Uzmanı (Biyolog) İlhami GÖK

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“Doktor”

Ünvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 05.01.2004

Tezin Savunma Tarihi : 09.02.2004

Tezin Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Fahri UÇAR

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Turgay İSBİR

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ali Osman BELDÜZ

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Neşe KAKLIKKAYA

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Yusuf AYVAZ

Trabzon 2004

ÖNSÖZ

“İnflamatuvar Bağırsak Hastalarında CARD15/NOD2 Geni Mutasyonları ve Sitokin Gen Polimorfizimlerinin İncelenmesi” adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Türk toplumunda ilk kez araştırılan bu konuyu seçmemde titizlik gösteren, doktora çalışmalarım süresince sürekli desteklerini esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım tez danışmanım sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Fahri UÇAR’a gönülden teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca doktora tez çalışmalarım süresince bilimsel deneyimlerinden yararlandığım Biyoloji Bölüm Başkanı sayın Doç. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e, deneysel çalışmalarım esnasında her türlü maddi ve teknik destek veren İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı ve Hematoloji Bilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Ercüment OVALI’ya, vakaların klinik tanımlarını titizlikle gerçekleştiren ve bizleri teşvik eden sayın Doç. Dr. Orhan ÖZGÜR’e teşekkür ederim.

Deneyimlerinden yararlandığım Biyoloji Bölümü öğretim üyeleri sayın Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ ve Prof. Dr. Asım KADIOĞLU’na, sonuçların istatistik değerlendirmelerindeki yardım ve katkıları için sayın Prof. Dr. Hakkı YAVUZ’a, tez izleme komitesindeki katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Neşe KAKLIKKAYA’ya teşekkür ederim. Yardımları için, Dr. Ahmet ALVER’e ve Arş. Gör. Halil İbrahim ŞAHİN’e teşekkür ederim

Öğrenim hayatım boyunca beni yalnız bırakmayan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen anneme, babama ve kardeşlerime hoşgörülerinden dolayı müteşekkir olduğumu belirtmek isterim.

İlhami GÖK

Trabzon, Ocak 2004

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	V
SUMMARY.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLolar DİZİNİ.....	VIII
SEMBOLLER DİZİNİ.....	IX
1.GENEL BİLGİLER.....	1
1.1.Giriş.....	1
1.2. Genetik Hastalıkların Sınıflandırılması.....	2
1.2.1 Genetik Hastalıklar ve Mutasyonların Moleküler Düzeyde Analizi.....	4
1.2.1.1 Bilinen Mutasyon Analizleri.....	5
1.2.1.2.İndirekt Mutasyon Analizleri.....	5
1.2.1.3. Mutasyon Tarama Yöntemleri.....	6
1.3. İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları.....	7
1.3.1. Crohn Hastalığı.....	9
1.3.2. Ülseratif Kolit.....	10
1.4. İnflamatuvar Bağırsak Hastalıklarında Gen Mutasyonları.....	11
1.4.1. Lokuslar ve Genetik Bağlantı İncelemeleri.....	11
1.4.2. İkiz İncelemeleri.....	14
1.4.3. HLA Gen Bölgesi İncelemeleri.....	14
1.5. CARD15/NOD2(MİM:605956) Geni ve Ürünü.....	14
1.6. İBH' da Mukozal İmmunolojik Sistem.....	16
1.7. Sitokinler.....	20
1.7.1 Sitokin Reseptörleri.....	20
1.7.2. İnflamatuvar Bağırsak Hastalıklarında Sitokinlerin Rolü.....	24
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	31
2.1. Materyal.....	31
2.1.1. Çalışma Grubu.....	31

2.1.2. Kimyasallar.....	32
2.1.3. Gereçler	33
2.1.4. Solüsyonlar	34
2.1.4.1. DNA İzolasyon Solüsyonları.....	34
2.1.4.2. Agaroz Jel Elektroforez Solüsyonları.....	35
2.2. Metotlar	36
2.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu (Salting - Out Yöntemi)	36
2.2.2. DNA'nın Spektrofotometrede Konsantrasyonunun Ölçümü	37
2.2.3. CARD15/NOD2 geni 3020 insC Mutasyonunun Analizi (Allel Spesifik multipleks PCR)	37
2.2.3.1. CARD15/NOD2 Geni 3020insC Mutasyonunun Kontrol Taranması.....	38
2.2.4. Sitokin Gen Polimorfizmlerinin PCR-SSP Metodu ile Belirlenmesi.....	39
2.2.4.1. İBH'de Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Belirlenmesi (PCR-SSP).....	40
2.2.4.2. Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kontrol Gruplarında Belirlenmesi.....	40
2.3. İstatistik Analizler	41
3. BULGULAR	44
3.1. CARD15/NOD2 3020 insC Mutasyonu ile İlgili Bulgular	44
3.2. Sitokin Gen Polimorfizmi ile İlgili Bulgular	46
3.2.1. İBH'de Sitokin Gen Polimorfizmi ile İlgili Bulgular.....	46
3.2.2. Crohn Hastalarında Sitokin Gen Polimorfizmi ile İlgili Bulgular.....	49
3.2.3. ÜK'de Sitokin Gen Polimorfizmi ile İlgili Bulgular	52
4. İRDELEME.....	55
5. SONUÇLAR.....	68
6. ÖNERİLER	70
7. KAYNAKLAR.....	71
ÖZGEÇMİŞ.....	87

ÖZET

İnflamatuvar bağırsak hastalıkları, [(İBH: MIM:601458), (Crohn Hastalığı, CH: MIM: 266600) ve Ülseratif Kolit (UK: MIM: 191390)] genetik ve çevresel ajanların etkileşimiyle ortaya çıkan kompleks, genetik heterojenite gösteren hastalıklardır. Hastalıkla ilişkili olduğu tartışılan CARD15/NOD2 geni mutasyonları ve sitokin gen polimorfizmleri dünyadaki çeşitli ırklarda farklı dağılımlar göstermektedir. Türk toplumundaki inflamatuvar bağırsak hastalarının CARD15/NOD2 geni 3020insC mutasyonu ve sitokin gen polimorfizmi dağılımlarını belirlemek amacıyla; 69 inflamatuvar bağırsak hastasında [18 Crohn hastası (10 E, 8 K, yaşları 37 ± 11), 51 Ülseratif kolit (24 E, 27 K, yaşları 39 ± 12) ve kontrol grubu olarak 50 sağlıklı bireyde (23 E, 27 K, yaşları 36 ± 11) mutasyonların analizleri yapıldı. CARD15/NOD2 geni 3020insC mutasyonu analizi allel spesifik multipleks PCR yöntemiyle, sitokin gen polimorfizmlerinin analizi ise PCR-SSP (sekans spesifik primer) metodu ile tayin edildi.

Türk toplumunda CARD15/NOD2 geni 3020 nsC mutasyon oranları inflamatuvar bağırsak hastalarında % 28.9 (CH. %38 ve ÜK.%25) ve sağlıklı bireylerde % 4 olarak tespit edildi. Sitokin gen polimorfizmlerinin dağılımları, sağlıklı bireyler ile karşılaştırıldığında; inflamatuvar bağırsak hastalarında sitokin genlerinden , **IL-1 RA**, **IL- 4RA**, **TGF β** ve **TNF α** kontrol grubuna göre artma ($p < 0.05$), **IL -1 α** , **IL-1 β** , **IL- 12** , **IFN γ** , **IL -2**, **IL- 4**, **IL- 6** ve **IL -10**'da azalma ($p < 0.05$), Crohn hastalarında; **IL-1**, **IL-4RA**, ve **TNF α** 'da artma ($p < 0.05$), **IL-1**, **IL-4RA**, **IFN- γ** , **TGF β** , **TNF**, **IL-2**, **IL-4**, **IL-6** ve **IL-10**'da azalma ($p < 0.05$), ülseratif kolitlilerde ise; **IL β** , **IL- 1 RA**, **IL- 4RA**, **IL-12**, **TGF β** ve **TNF α** artma ($p < 0.05$), **IL-1 α** , **IFN γ** , **IL-2** , **IL-4**, **IL-6** ve **IL-10**'da azalma tespit edildi ($p < 0.05$). Diğerlerinde herhangi bir değişim gözlenmedi.

Sonuç olarak; Türk toplumunda CARD15/NOD2 geni 3020 insC mutasyonunun sadece Crohn hastalarına özgü olmayıp, ülseratif kolitli hastalarda da bulunduğunu, klinik tanılarda tek başına belirleyici olamayacağını, fakat sitokin gen polimorfizmlerinde artma ve azalma yönündeki değişimlerinin klinik tanıda kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: İBH, Crohn hastalığı, Ülseratif kolit, CARD15/NOD2 Geni, Sitokin Gen Polimorfizmi, PCR-SSP, Allel Spesifik Multipleks PCR

SUMMARY

Investigation of 3020 insC Mutation in the CARD15/NOD2 Gene and Cytokine Gene Polymorphisms with Patients of Inflammatory Bowel Diseases

Inflammatory bowel diseases (IBD: MIM:601458), including Crohn Disease, (CD: MIM: 266600) and Ulcerative colitis (UC: MIM: 191390), appear as a result of the interaction between genetic and environmental factors; thus showing complex and genetic heterogeneous characteristics. With a purpose to identify the frequency of cytokine gene polymorphisms and also the mutation of 3020 insC of CARD15 /NOD2 gene, an analysis was carried out to find out the mutation rates of the Turkish population: 69 cases with inflammatory bowel diseases [(18 cases with Crohn disease; (10 M, 8 F , ages 37±11) ; 51 Ulcerative colitis (24 M, 27 F, ages 37±12)]; and 50 healthy individuals (23 M, 27 F, ages 36 ±11) as the control group. In this study we used PCR based techniques.

In the Turkish population with inflammatory bowel diseases, the mutation rate of 3020 insC of CARD15 /NOD2 gene was IBD 28.9 %, CD 38 % , and UC 25% and the related rate was 4 % concerning the healthy individuals. When compared with the cytokine genes of healthy individuals, the frequency of cytokine gene polymorphism in inflammatory bowel diseases increased in genes IL-1 RA, IL- 4RA, TGFβ and TNFα ($p < 0.05$) but decreased in genes IL -1α , IL-1β , IL- 12 , IFN γ , IL -2, IL- 4, IL- 6 and IL -10 ($p < 0.05$); in Crohn diseases it increased in genes IL-1, IL-4RA, and TNFα of ($p < 0.05$) but decreased in genes IL-1, IL-4RA, IFN-γ, TGFβ, TNF, IL-2, IL-4, IL-6 and IL-10; in Ulcerative colitis it increased in genes IL β, IL- 1 RA, IL- 4RA, IL-12, TGFβ and TNFα ($p < 0.05$) but decreased in genes IL-1α , IFN γ , IL-2 , IL-4, IL-6 and IL-10 ($p < 0.05$); there was no difference in other genes. In sum, in the Turkish population the mutation of 3020 insC of CARD15/NOD2 gene is not unique to Crohn disease, but this mutation is present in Ulcerative colitis as well. We are of the opinion that this mutation is not itself the only determining factor for clinical diagnoses; however, it can be used in the clinical diagnosis of IBD in order to determine the low level or high level variations in cytokine gene polymorphism.

Key Words: Inflammatory Bowel Disease, Crohn Disease, Ulcerative Colitis, CARD15/NOD2 Gene, Cytokine Gene Polymorphism, PCR-SSP, Specific Multiplex PCR

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. CARD15(NOD2) geni yapısı	15
Şekil 2. Çevresel ajanlar ve immün sistem genomunun etkileşimi	17
Şekil 3. Çevresel faktörlerle ile sitokinlerin etkileşimi.....	23
Şekil 4. IBH'de CARD15/NOD2 3020insC mutasyonunun jel görünümü	45
Şekil 5. IBH'de ve kontrol grubunda sitokin polimorfizm allelik frekansları.....	47
Şekil 6. Crohn hastalarında sitokin gen polimorfizmlerinin jel resimleri.....	49
Şekil.7. Chron Hastaları ve kontrol grubunda sitokin polimorfizm allelik frekansları	50
Şekil 8. Ülseratif kolitlilerde sitokin gen polimorfizimlerinin jel resimleri	52
Şekil.9. ÜK'da ve kontrol grubunda sitokin polimorfizm allelik frekansları.....	53

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. İBH’de, Ülseratif kolit ve Crohn hastalığının bazı ülkelerdeki yıllara göre insidansları.....	8
Tablo 2. İBH lokusları ve ilgili kromozomlardaki lokuslar.....	12
Tablo 3. İBH’de NOD2/CARD15 geniyle ilişkili tanımlanan bağlantılı lokuslar	18
Tablo 4. İBH’de NOD2/CARD15 geninin analiziyle tanımlanan bazı mutasyonlar.....	19
Tablo 5. Sitokinlerin özellikleri ve aktiviteleri	22
Tablo 6. CARD15/NOD2 geni 3020 insC mutasyonunu belirlemek için kullanılan allel spesifik primerleri ve PCR reaksiyonunun bileşenleri ..	39
Tablo 7. Sitokin genleri analizinde bir hasta için gerekli mastermiks’in miktarı	41
Tablo 8. Sitokin genleri için PCR döngü programı	41
Tablo 9. Protrans Sitokin gen polimorfizmleri analiz cetveli	42
Tablo 10. İnflamatuvar bağırsak hastaları ve kontrol grubunun demografik dağılımları.....	44
Tablo 11. İnflamatuvar bağırsak hastalarında CARD15/NOD2 3020 insC mutasyon analizi sonuçları	45
Tablo 12. Sitokin pleytlerinde bulunan gen primerlerinin içeriği.....	46
Tablo 13. İBH’de ve kontrol grubunun karşılaştırılmasıyla elde edilenistatistiksel parametreler	48
Tablo 14. Crohn hastalığı ve kontrol grubunun karşılaştırılmasıyla elde edilen istatistiksel parametreler	51
Tablo.15. Ülseratif kolitliler ve kontrol grubunun karşılaştırılmasıyla elde edilen istatistiksel parametreler	54

SEMBOLLER DİZİNİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
APAF	: Apoptotik Proteinaz Aktive Edici Faktör
ASO	: Allel Spesifik Oligonükleotit
CARD15	: Caspase recruitment domain 15
CH	: Crohn Hastalığı/ Crohn Hastaları
cM	: Santimorgan
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
GALT	: İntestinal Sistemin Lenf Dokusu
G-CSF	: Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör
GM-CSF	: Granülosit Monosit Koloni Uyarıcı Faktör
HLA	: İnsan Lökosit Antijenleri
IFN α	: İnterferon Alfa
IFN β	: İnterferon Beta
IFN γ	: İnterferon Gamma
IL-1	: İnterlökin 1
IL-1 α	: İnterlökin 1 Alfa
IL-1 β	: İnterlökin 1 Beta
IL-1R	: İnterlökin 1 Reseptörü
IL-1RA	: İnterlökin 1 Reseptör Antagonisti
IL-4RA	: İnterlökin 4 Reseptör Antagonisti
İBH	: İnflamatuar Bağırsak Hastalıkları / Hastaları
İCAM	: Hücre İçi Adhesyon Molekülleri
insC	: İnsersiyon C
kb	: Kilobaz:1000 nükleotitden oluşan birim
kDa	: Kilodalton
LPS	: Lipopolisakkarit
LRR	: Lösince zengin tekrarlar
Mb: Megabaz	: 1000.000 nükleotitden oluşan uzunluk birimi

M-CSF	: Monosit Koloni Uyarıcı Faktör
MHC	: Doku Uygunluğu Antijenleri
MIM	: İnsanda Mendeliyel Kalıtım
MUC	: Yaygın Bağırsak Mucin Genleries
NDB	: Nükteotit Bağlanma Domaini
NFkB	: Nükleer Faktör Kappa B
NOD2	: Nükleotit Bağlanma Oligomerizasyonu
OD	: Optik Dansitite
P	: Olasılık değeri
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R Protein	: Direnç proteinleri
RE	: Restriksiyon Enzimleri
RFLP	: Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
RNA	: Ribonükleik Asit
SNP	: Tek Nükleotit Polimorfizmi
SSP	: Sekans Spesifik Primer
TGF α	: Transforming Growth Faktör Alfa
TGF β	: Transforming Growth Faktör Beta
Th1	: T-Lenfosit Yardımcı Hücresi 1
Th2	: T-Lenfosit Yardımcı Hücresi 2
TLR	: Toll benzeri reseptörler
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
TNF α	: Tümör Nekroz Faktör Alfa
TNF β	: Tümör Nekroz Faktör Beta
ÜK	: Ülseratif Kolit
VNTR	: Sayısı Değişken Ardışık Tekrarlar

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları (İBH: MIM:601458), abdominal kramp, rektal kanama ve diyare gibi belirtileri olan kronik iltihabi hastalıklar grubundandır (Hampe, vd., 2002a). Crohn hastalığı (CH: MIM: 266600) ve ülseratif kolit (ÜK: MIM: 191390) genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimiyle ortaya çıkan multifaktöriyel kalıtım özelliği gösteren inflamatuvar bağırsak hastalığının iki ana formudur (Yang, vd., 2001). İlk kez 1859 yılında Samuel Wilks ülseratif kolitten ölen bir hastada otopsi sonucu bu hastalığı tanımladı. 1932’de ise Crohn ve arkadaşları terminal ileumun transmural iltihabını “regional ilitis” olarak tanımladılar ve ülseratif kolitisten ayrı bir hastalık olduğunu belirttiler (Hampe, vd., 1999a). O zamandan bu yana yaklaşık 70 yıldır klinik, patolojik, endoskopik, radyolojik anatomik ve histolojik olarak farklı olan bu iki olgu, tüm bilimsel gelişmelere rağmen birbirine karışmaya ve tedavideki zorluklarıyla hekime meydan okumaya devam etmektedir. Vakaların %10-15’inde bu iki hastalık birbirine karıştırılabilmektedir. ÜK ve CH Amerika, Japonya ve Batı Avrupa ülkeleri gibi ekonomik olarak gelişmiş ülkelerde daha sık görülmektedir. ABD ve Avrupa ülkelerinde CH ve ÜK’nin görülme oranının 1970 yılından günümüze kadar yaklaşık iki kat arttığı çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilmektedir (Rioux, vd., 2000). Ülkemizde de İBH’nin insidansı ve prevalansının son yıllarda belirgin artış göstermesi dikkati çekmektedir. Her iki hastalığın dağılımı; yaş, coğrafya, ırk, etnik ve sosyal sınıflar açısından benzerdir (Brignola, vd., 2000; Hugot, vd., 1999a).

Klinik seyirlerinde; genetik faktörlerle birlikte çevresel faktörler, infeksiyon ajanları, mukus abnormaliteleri, incebağırsakta permeabilitenin artması, otoimmün cevaplar ve otoantikorların etkili olduğu bildirilmektedir (Bianchi, vd., 1999; Brignola, vd., 2000; Van Montfrans, vd., 2002). İBH’nin genetik, çevresel, iklimsel ve enfeksiyöz ajanlarla ilişkisini saptayarak hastalığın etiyopatogenezindeki karanlık noktalara ışık tutmak, toplum sağlığı açısından önemini vurgulamak, böylece hastalığın ve komplikasyonlarının yol açtığı iş gücü ve ekonomik kayıpları en az düzeye indirmek epidemiyolojik araştırmaların başlıca amacıdır. Son yirmi yılda yaygın genom araştırmaları ile ülseratif kolit ve Crohn hastalığının hassas olduğu lokusların kromozomlarla olan bağlantısı tespit edilmiş (Hampe,

vd., 2001a; Hugot, vd., 1999b; Ogura, vd., 2001a) ve 2001 yılında yapılan moleküler düzeyde mutasyon taramaları ile CARD15/NOD2 gen mutasyonunun Crohn hastalığı ve ülseratif kolit ile bağlantısı olduğu Hugot ve Cho tarafından tespit edilmiştir (Hugot, vd., 2001b; Ogura, vd., 2001b). Crohn ve ülseratif kolit hastalığı ile ilişkili genlerin bir diğeri de immun sistemi düzenleyen proteinleri kodlayan 6. kromozomun kısa kolundaki MHC genleridir. MHC bölgesinde içinde bulunan çoğunluğu III. sınıf genlere dahil edilen sitokinler bağırsak immün sisteminde önemli role sahiptir (Hacker, vd., 1997; Lombardi, vd., 2001; Yang, vd., 1999). Günümüzde olumsuz çevre şartlarının sitokin gen ekspresyonlarını inflamatuvar bağırsak hastalıklarını artıracak yönde etki ettiği ileri sürülmektedir (Autschbach, vd., 2002; Tagore, vd., 1999).

Son yıllarda rekombinant DNA teknolojilerindeki gelişmeler tıpta daha geniş uygulama alanı bulmuş ve birçok hastalığın ayırıcı tanısında rekombinant DNA teknolojisi rutin laboratuvarlarda daha sıklıkla kullanılır hale gelmiştir. Araştırmalarımızda rekombinant DNA teknolojisinde kullanılan polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) dayalı metodları kullanarak inflamatuvar bağırsak hastalıklarının iki ana formu olan Crohn hastalığı ve ülseratif kolitin genetik yapılarının tanımlanması ve hastalığın bölgemiz ve ülkemizdeki mutasyon profilinin dağılımını belirlemeyi amaçlıyoruz. Amacımız CARD15/NOD2 gen mutasyon taramaları yaparak ve sitokin gen polimorfizmlerini belirleyerek bu iki hastalığın birbirlerinden ayırıcı tanısında genetik kriterleri belirlemektir.

1.2. Genetik Hastalıkların Sınıflandırılması

Genetik materyalin mutasyonlara uğrama sıklığına ve çevresel faktörlerden etkilenme durumlarına göre genetik hastalıkları; kromozomal, multifaktöriyel ve tek gen mutasyonları olarak üç ana grup altında sınıflandırma mümkündür.

Kromozomal hastalıklar, kromozomlardaki sayısal ve yapısal değişiklikler sonucu ortaya çıkmaktadır. En sık gözlenen kromozom bozuklukları, büyüme geriliği, mental bozukluk, çeşitli konjenital anomaliler ve dismorfik özelliklerle alakalıdır. Kromozomal bozukluklar sitogenetik seviyede olup, oldukça yaygındır. Canlı doğan çocukların yaklaşık % 0.7'sinde ve ilk üç aydaki spontan düşüklerin yaklaşık %50'sinde kromozomal anomaliler görülmektedir (Pasternak, 1999; Karban, vd., 2002).

Multifaktöriyel (poligenik veya kompleks) hastalıklar; bir araya gelmiş birden fazla küçük genetik varyasyonlar sonucu oluşmakla birlikte, çevresel faktörler de bu genetik varyasyonların oluşmasında önemli rol oynamaktadır. Yetişkin dönemde görülen diabetes mellitus, koroner kalp hastalıkları, hipertansiyon, şizofreni ve doğumda görülen nöral tüp defektleri, konjenital kalp hastalıkları, yarı damak ve dudak gibi defektler multifaktöriyel hastalıklara örnek olarak verilmektedir. Multifaktöriyel hastalıklar aile içinde tekrarlama eğilimi göstermelerine rağmen bilinen tek gen kalıtım kalıplarından hiçbirine uymazlar.

Tek gen hastalıkları (Mendeliyen hastalıklar) homolog kromozomlar üstünde bulunan ve birbirlerinin alternatifleri olan allellerden birinin veya her ikisinin mutasyona uğraması sonucu oluşmaktadır. Günümüzde yaklaşık 5.000' den fazla sayıda tek gen hastalığı bilinmektedir. Her 1000 canlı doğumdan 10'unda tek gen hastalıklarından biri görülmekte ve çocukluk dönemi ölümlerinin %5-10'una tek gen mutasyonları neden olmaktadır (Sudbery, 2003). Bu mutasyonların majör etkisi yeni doğan ve çocukluk döneminde kendini göstermesine rağmen, yetişkin dönemde de önemi gittikçe artmaktadır. Tek gen hastalıklarına neden olan mutasyonlar etki mekanizmalarına bağlı olarak oldukça geniş bir çeşitliliğe sahiptir. Tek bir bazın değişmesi sonucu oluşan mutasyonlara "nokta mutasyonu" denir. Bir veya daha fazla bazın kaybolması "delesyon", artması ise "insersiyon" olarak adlandırılır. Delesyon ve insersiyonlar oldukça geniş bir bölgeyi kapsayacak şekilde de gerçekleşmektedir. Ayrıca, son yıllarda keşfedilen trinükleotit tekrarlarındaki artışların tek gen hastalıklarına neden olduğu bildirilmektedir. Nokta mutasyonunda yer değiştirmeye katılan bazlar dikkate alındığında transisyon ve transversiyon olmak üzere iki tip yer değiştirme vardır. Transisyon, baz değişikliğinin pürinden pürine ($A \leftrightarrow G$) veya pirimidinden pirimidine ($T \leftrightarrow C$) dönüşmesi durumudur. Transversiyon ise baz değişikliğinin pürinden pirimidine ($A \rightarrow T / A \rightarrow C / G \rightarrow T / G \rightarrow C$) veya pirimidinden pürine ($T \rightarrow A / T \rightarrow G / C \rightarrow A / C \rightarrow G$) dönüşmesi durumudur. Nokta mutasyonları fenotipik sonuçlarına göre farklı sınıflandırılabilir (Gelehrter ve Collings, 1998).

Genetik polimorfizmler, genomdaki hayati öneme haiz DNA dizileri sürekli korunurken, bazı DNA dizilerinde kısıtlı değişiklikler sonucu oluşmaktadır. Bu tip değişikliklerin olduğu DNA dizileri polimorfik bölge, bu kısımdaki DNA dizisi ise polimorfizm olarak adlandırılır. İnsan genomundaki lokuslarda bir değişikliğin polimorfizm olarak adlandırılabilmesi için belli popülasyondaki bireylerin %1'inde ilgili DNA bölgesinde değişiklik olması ve genomdaki polimorfik lokusların sıklığı %28,

heterozigotluk oranının da %6.8 civarında olduğu tanımlanmaktadır. Polimorfizmleri mutasyondan ayıran en önemli fark meydana gelen genetik değişikliklerin protein sentezine yansımamasıdır (Watts ve Satsangi, 2002). Mutasyonlar polimorfizme göre çok daha nadir olup sonuçları itibarı ile organizmalara zararlı olabilmektedirler. İki tip polimorfizm bulunmaktadır. 1-Her 1000 bazda bir görülen tek nükleotid polimorfizmi (Single Nucleotid Polymorphisms; SNP). 2- Kısa DNA dizilerinin duplikasyonu ve orta sıklıkta tekrarlanan DNA dizileri (Variable number tandem repeats; VNTRs) polimorfizmleridir. Pratik olarak, bir lokusta en sık bulunan allelin diğer bütün allellerin %99' undan daha az sıklıkta bulunması halinde polimorfizmin varlığından söz edilebilir (Gelehrter, vd., 1998). Bir çok genin kodlayıcı bölgelerinde polimorfizmler vardır. Fakat, kodlama yapmayan bölgelerde, DNA da polimorfik değişiklikler daha sıktır. Bu polimorfizmler bir proteinin yapısı veya sentezine etki etmeyen basit DNA işaretleyicileridir ve günümüzde de kromozomal bölgelerin klonlanması sırasında şüpheli kromozomal bölgenin daraltılması için kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda bazı SNP'nin hastalık duyarlılığı ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Örneğin, inflamatuvar bir bağırsak hastalığı olan Crohn hastalığına tutulmuş olguların mikroorganizma tanınması ile ilgili CARD15/ NOD2 gen bölgesinde bulunan üç SNP'ten en az birini kontrollere göre daha sık taşıdığı gösterilmiştir (Bidwell, vd., 2001). Bireyin taşıdığı bu kötü SNP' lerin kopya sayısı arttıkça hastalık riski de artmaktadır (Klug ve Cummings, 2000).

1.2.1. Genetik Hastalıklar ve Mutasyonlarının Moleküler Düzeyde Analizi

Mutasyonların analizi DNA veya RNA molekülü üzerinde yapılabilir. Analizin yapılabilmesi için bu moleküllerin hücre ve dokulardan çeşitli yöntemlerle izole edilmesi gerekir. Bir hastalık incelenirken nükleik asit analizinden sonra uygulanacak yöntem o hastalığın moleküler düzeydeki nedeninin araştırılmasıdır. Hangi mutasyonun hangi hastalığa neden olduğu biliniyorsa tanı için o mutasyonun belirlenmesi gereklidir. Bilinen mutasyonların araştırılmasında direkt analiz yöntemleri kullanılır. Hastalıkla ilişkili olan gen biliniyor, fakat bu gendeki değişik mutasyonlar bilinmiyor ise ilgili genin içinde veya yakınında bulunan polimorfik bölgeler analiz edilir. Dolaylı yöntem olarak adlandırılan bu yöntemde tüm aile bireylerinin incelenmesiyle hastalık taşıyan kromozom belirlenebilir (Hill, 2001).

1.2.1.1. Bilinen Mutasyonların Analizi

a) **Southern Blot:** 1970'lerin sonlarında restriksiyon endonükleazlar vasıtasıyla kesilen DNA parçalarının analizinde standart bir yol olarak geliştirilmiştir. Southern Blot, klonlanmış DNA markerleri kullanılarak bir DNA örneği araştırmada kullanılır. Bir genin olup olmadığının veya kabaca yapı olarak normal olup olmadığının cevabını verir.

b) **Allele Spesifik Oligonükleotid (ASO): Dot Blot:** Nükleik asitlerin elektroforez kullanılmadan, membrana doğrudan transferleriyle hedef dizinin varlığı veya yokluğunu gösterebilir, ama yapısal bilgi vermez. ASO veya Dot blot / slot yöntemleri bilinen mutasyonların varlığının araştırılmasında kullanılır. Bu yöntemde normal ve mutant allele özgül olan oligo nükleotit probalar kullanılır.

c) **Northern Blot:** Transfer ve hibridizasyon yöntemleri ile RNA molekülünün analizi de mümkündür. İzole edilen RNA molekülünün jel elektroforez ile parçalarının ayırımından sonra membrana transferine Northern blot adı verilir. Otoradyogram analizlerinde mRNA'nın sinyal vermesi hedef DNA bölgesinin eksprese olup mRNA kopyalandığını gösterir. Bilinen kontrollerde sinyalin karşılaştırılması ise ekspresyon düzeyi hakkında bilgi verir.

1.2.1.2. İndirekt Mutasyon Analizleri

Kişiler arası değişkenlik gösteren bölgelerin incelenmesi ile doğrudan mutasyon gösterilmez. Ancak DNA üzerinde bulunan bu polimorfizmler yardımıyla mutant ve normal alleller saptanır ve hastalık takip edilebilir.

a) **Restriksiyon Fragment Length Polimorfiz (RFLP) :** RFLP analizinde restriksiyon enzimleri ile gen bölgesindeki uzunluk polimorfizmleri incelenir. RFLP iki şekilde uygulanabilir. İlgili DNA uygun RE'i ile kesilir ve southern blot ile membrana transfer edilir. Denatürasyonla tek zincirli hale getirilir. İncelenen bölgenin yanındaki tek kopya diziyeye komplementer olan işaretli proba hibridize edilir.

b) CA- Tekrar Analizi: Bazı polimorfizmler 2, 3, 4 nükleotidin peş peşe tekrarından oluşur. RFLP'lere göre daha çok bilgi vericidir. Çünkü tekrar sayısındaki çeşitliliğe bağlı olarak çok sayıda farklı allel oluşabilir.

1.2.1.3. Mutasyon Tarama Yöntemleri

a) SSCP (Single strand conformational polymorphism): Bazen hastalığa neden olabilen mutasyon sayısı çok fazladır. Bilinmeyen mutasyonun araştırılması gerekir. Bunun için en yaygın kullanılan yöntemlerden birisi SSCP'dir. Mutasyonu aranacak olan genin, parçalar halinde çoğaltılması ve baz dizisinin sağlıklı kontrollerden farklı olup olmadığının araştırılması prensibine dayanır (Cho, vd., 1998).

b) DGGE (Denatüre Gradient Jel Elektrofrezisi): Bilinmeyen mutasyonların taranmasında yaygın olarak kullanılan bir başka yöntemde DGGE'dir. Tek zincirli işaretli prob ds DNA ile aynı ortamda denatüre ve renatüre edildikten sonra DGGE uygulanır.

c) Hetero dupleks Analizi: Bu yöntemle nokta mutasyonlarının %50'si gösterilebilir. Çift zincirli DNA ve işaretli tek zincirli RNA molekülleri aynı ortamda denatüre ve renatüre edilirler. Mutasyon nedeniyle baz eşleşmesi yapmayan bölge tek zincirli kalır. Tek zincir kesen RNAaz enzimiyle kesim yapılır. Sonra elektroforeze alınır. Kesimin varlığı mutasyonun göstergesi olarak takip edilir (Rapley ve Walker, 2000).

d) DNA Dizi Analizi: Bilinen mutasyonların analizinde uygulanabildiği gibi bilinmeyenlerin araştırılması için de kullanılan bir yöntemdir. Genellikle SSCP ve DGGE gibi tarama yöntemleri ile mutasyon taşıyan bölge belirlendikten sonra uygulanır. Dizi analizi direkt olarak PCR ile çoğaltılan DNA parçasında veya indirekt olarak M13 fajına kullanılarak yapılır. Amplifiye edilen DNA parçalarının denatüre akrilamid jeldeki hareketine göre kalıp DNA zincirinin dizi analizi gerçekleştirilir. Dizinin 5' ucundaki baz jelde molekül ağırlığı dikkate alınarak bazlar otoradyografide aşağıdan yukarıya doğru okunurlar. Günümüzde floresan boyalarla otomatize edilmiş teknikler kullanılmaktadır. DNA dizi analiziyle 2000 yılında insan genom projesi çerçevesinde insan genom dizisi %99,9 doğrulukta tanımlanmıştır (Rapley ve Walker, 1998; Kalay, 2002).

1.3. İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları

İnflamatuvar bağırsak hastalıkları (İBH) grubunda tanımlanan Ülseratif Kolit (ÜK) ve Crohn Hastalığı (CH) genel klinik seyirleri birbirlerine benzeyen ve aynı tedavi yöntemlerine benzer cevap veren kronik ve iltihabi yangıyla tanımlanan bağırsak tutulumları gösteren hastalıklardır. Ancak, komplikasyonları, bağırsağın farklı bölgelerine lokalize olmaları, klinik muayenede ilk tanı ve histopatolojileri açısından da birbirinden çok farklı heterojenite gösterebilen hastalıklardır (Hugot, vd., 1999; Tözün, 2002). Günümüzde en geçerli olan kavram her iki hastalığın da genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimiyle çeşitli antijenlere ya da dış faktörlere karşı kişide meydana gelen aşırı bir immün yanıt ile ilgili olduğudur (Tözün, 2002; Papadakis ve Targan, 2000).

İnflamatuvar bağırsak hastalıklarının coğrafi dağılımı ve seyri önemli ölçüde değişkenlik göstermektedir. Hastalığın nispeten seyrek görülmesi ve klinik tablolara bakılmayan olgularda diğer hastalıklardan kolay ayırdedilmeyecek kadar hafif olabilmesi, genelde hastalığı başlatan etkenle hastalığın tanısının konması arasında uzunca bir süre geçmesine yol açmakta ve epidemiyolojik çalışmaların yapılmasını güçleştirmektedir (Tözün, 2002). Öte yandan hastalığın kesin tanısının radyoloji, kolonoskopi ve özellikle de histopatoloji ile konması, bu tetkiklerin birinci basamak tanı merkezlerinde bulunmayıp özellikle gelişmiş hastanelerde bulunması, enfeksiyöz kolitlerin bu hastalıklarla karışabilmesi ve CH/ÜK ayırımının kolay yapılamaması epidemiyolojik çalışmalarda karşılaşılan diğer güçlüklerdir. Güvenilir bir insidans ve prevalans çalışması yapabilmek için; a) vakaların tanısının kesin olması, b) etkin ve yeterli tanı yöntemlerinin kullanılması ve c) yeni coğrafi bölgeler ve topluluklar hakkında sağlıklı bilgi sağlanması gerekir (Tözün, 2002; Loftus vd., 1998; Trallori vd., 2003; Munkholm, vd., 1992,). İBH'nin insidansı ülkelere, çevresel faktörlere ve yıllara göre değişiklik göstermektedir. Genetik faktörler dışında hastalığın epidemiyolojisini etkileyen çevresel ajanlar ve diğer değişkenler arasında sigara, doğum kontrol ilaçları, enfeksiyonlar, beslenme alışkanlıkları, ilk ve sonraki enfeksiyonlar, geçirilmiş appandektomi, sosyo-ekonomik durum, meslek, eğitim, stres gibi etkenler sayılabilir (Tözün, 2002).

Genetik bilimcilerin inflamatuvar bağırsak hastalıklarının patogeneze yaklaşımları farklılık göstermekle beraber kısaca aşağıdaki gibi özetlenmiştir (Hampe, vd., 1999a; Hampe, vd., 2001a; Murillo, vd., 2002; Yang, vd., 1999).

1. Crohn hastalığı ve ülseratif kolitin genetikle ilişkisi ve bu hastalıklarla ilgili bir çok şüpheli genin diğer bazı yaygın hastalıklarla da ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, Crohn hastalarının akrabalarında Crohn hastalığı ve ülseratif kolit görülme riski yüksektir.
2. Crohn hastalığında genetik faktörlerin rolü ülseratif kolitten daha fazladır.
3. Deney hayvanları üzerinde yapılan genetik çalışmalarda Crohn hastalığı ve ülseratif kolite benzer semptomların tıpkı insanlarda olduğu gibi benzer genetik heterojeniteye sahip olduğu ve farklı genetik faktörlerin birleşmesiyle klinik patolojik sonuçların ortaya çıktığı tahmin edilmektedir.
4. Tek yumurta ikizleri için genetik uyum oranları Crohn hastalarında %22-48, ÜK. %6-16 olarak gözlenmiştir. Çevresel faktörler hastalığın tahmin edilen penetransını azaltmaktadır.
5. Ayrı yumurta ikizlerindeki genetik uyum, Crohn hastalarında %0-6 ve ülseratif kolitlerde %3'tür (Kato, vd., 1998; Lesage, vd., 2000).
6. Tek ya da basit bir genetik model inflamatuvar bağırsak hastalıklarının kalıtım modelini açıklayamaz. Genetik faktörler intestinal mukoza içinde immun cevaplar şeklinde farklı seviyede düzenlenir. Bundan başka, hastalığın ortaya çıkışında şüpheli olduğu düşünülen genler ve Crohn hastalığına spesifik etkileri ve tedavilere cevabı, hastalığın etkinliği, klinik fenotiplerde tanımlananlardan farklılıkları gösterilmiştir.

Tablo 1. İBH dan Ülseratif kolit ve Crohn's hastalığının bazı ülkelerdeki yıllara göre insidansları (Tözün, 2002)

Popülasyon	ÜK İnsidansı 1/100.000 kişide	CH İnsidansı 1/100.000 kişide	Yıllar
Danimarka	13,2	4,6	1981-92
Norveç	12,8	5,8	1983-86
İngiltere	6,3	5,9	1978-90
İspanya	2,4	-	1983- 88
Yugoslavya	1,5	0,7	1980-89
Fransa	4	1,5	1978-91
İtalya	6,8	2,8	1989-92
İsrail	6,3	2,98	1979-90

1.3.1. Crohn Hastalığı

Crohn hastalığı ilk kez 1932 yılında Crohn, Gingburg ve Oppenheimer tarafından tanımlanmıştır (Hugot, vd., 1999; Shanahan, 2002). Crohn hastalığı, gastrointestinal sistemde ağızdan anüse kadar olan tüm kesimlerinde oluşabilen, inflamasyon özelliği gösteren, bağırsak duvarının tamamen tutulması ve kalınlaşması, lümenin daralması ile şiddetli bağ dokusu lezyonları sonucu oluşan kronik granülomatoz inflamatuvar bir hastalıktır. Daha çok terminal ileumun tutulması nedeniyle “terminal ileit” olarak da adlandırılan bu hastalık ayrıca “rejonel ileit”, “granülomatöz enterit”, “transmüral enterit” gibi isimlerle de anılmıştır. Olayın sadece ince bağırsağı ilgilendirdiği ortaya çıktığından ve bu isimler ile hastalık yeterince tanımlanamadığından dolayı günümüzde Crohn hastalığı olarak adlandırılmaktadır (Shanahan, 1994).

Crohn hastalığının normal populasyonlardaki prevalansı 27-106/100.000 ve insidansı 0,8-9,8/100.000 dir. Crohn hastalığının insidansı ABD’de 100.000’de 3-6 oranında olduğu bildirilmektedir (Parkes, vd., 1998; Rioux, vd., 2000). Etiyolojide çevresel faktörlerin ve beslenme alışkanlıklarının önemli olduğu düşünülmektedir. Birinci derece akrabalarında Crohn hastalığı bulunan insanların, bu hastalığa yakalanma riskleri normal popülasyona göre daha fazladır (Duerr, vd., 1998).

Hastalığın mekanizması kesin olarak bilinmemekle birlikte, infeksiyonlar, immün olaylar, çevresel faktörler, gıdalara bağlı faktörler ve genetik faktörler üzerinde durulmuştur. Crohn hastalığında değişik immün anormallikler saptanmıştır. Ancak bunların hastalığın sebebi olmadığı, bu değişikliklerin asıl mekanizmanın birer yan ürünü olduğu kanısı kuvvetlenmiştir. Saptanabilen en önemli risk faktörünün, şahsın bir akrabasında Crohn hastalığı bulunması araştırmaları genetik faktörler üzerine yoğunlaştırmıştır (Kato, vd., 2000; Jewell, 1998).

Hastalığın ilk aşamasında histolojik olarak mukozal ve submukozal ödem görülür. İleri dönemlerde, bağırsak duvarında ve lenf folliküllerinde kazeifikasyon göstermeyen, Langhans dev hücreleri içeren granülomlar saptanır. Bağırsak duvarı sert ve ödemlidir. Mezenterik yağın bağırsağı saracak şekilde ilerlemesi Crohn hastalığı için tipik bir bulgudur. Tutulmuş barsak kesiminin mezenterisi de ileri derecede kalınlaşmıştır (Dunn, vd., 1999, Carter, vd., 2001; Hill, 2001). Crohn hastalığında mikroperforasyonlar, abse oluşumu, internal ve eksternal fistüller de tipik bulgulardandır.

1.3.2. Ülseratif Kolit

Günümüzde gelişmiş ülkelerde ve toplumun refah düzeyi yüksek kesimlerinde daha sık görülen bir hastalık olan ülseratif kolit, özellikle toksik megakolon ve kolon kanseri gelişme riski gibi ciddi sorunları beraberinde getiren ve tedaviden başarılı sonuç alınabilmesi için etkin bir hekim-hasta işbirliği gerektiren bir hastalıktır (Canavaugh, vd.,2001, Hampe, vd., 2001; Hampe, vd., 1999b). Her yaşta rastlanabilirse de daha çok genç erişkinlerin hastalığı olarak bilinir, cinsiyet ayrımı gözetmez. Ülseratif kolitin normal popülasyonlardaki prevalansı 80-157/100.000 ve insidansları 1,5-25/100.000 dir. İnsidans 20-30 yaş grubunda 7-11/100.000, altmış yaşın üzerindekielerde ise %15 civarındadır (Brignola, vd., 2000; Yamazaki, vd., 2002; Yang, vd., 1999).

Uzun süreden beri bilinen bir hastalık olmasına rağmen, etyolojisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Psikosomatik olduğu, hipersensitivite, otoimmün faktörler, süt ve süt ürünlerine ve bağırsak mukozasına karşı dolaşan antikorların hastalığın ortaya çıkmasında etkili olduğu bildirilmektedir. Ancak, sabit ve kesin bir neden üzerinde anlaşmak mümkün olamamıştır (Weitzman, 2001; Shanahan, 2002). Özellikle, atipik antinötrofil sitoplazmik antikorların belirlenmesi önem taşımakta ve hümmoral mekanizmalar üzerinde durulmaktadır (Annese, vd., 2002; Bouma, vd., 1999). Kolonik otoantikorların bulunması ise, son yıllarda dikkati çeken bir faktör olarak yorumlanmaktadır (Dunn, vd., 1999; Donaldson, vd., 2001; Nemetz, vd., 1999).

Hastalık, vakaların hemen tümünde rektumdan başlar ve proksimale doğru ilerler. Tüm kolonun tutulduğu vakalarda appendiks ve terminal ileumun da tutulması mümkündür. Hastalığın erken döneminde mukozada vaskülarite artışı ve ödem, kripta lumeni içine polimorfonükleer infiltrasyon görülür ve yüzey epiteli tahrip olur. Ülserasyonlar lineer yayılma gösterirken, aralarında kalan sağlam ancak, ödemli mukoza adacıkları adeta birer çıkıntı, psödopolip görüntüsü alır. İyileşme döneminde oluşan fibrozis iltihabi olayın şiddetine göre daha az belirgindir. İnflamasyon ve ülserasyonla seyreden bu süreç sadece mukozayı tutar. Ancak, akut seyirli vakalarda ülserasyonlar derinleşir, serozaya kadar gelir, perforasyonlar görülebilir. Uzun süren ülseratif kolit vakalarında mukozanın kıvrımları kaybolur ve atrofik bir görünüm alır. Kolonlar normal boylarının yaklaşık yarısına kadar kısalabilir. Yine de uzun süren vakalarda atipik epitel proliferasyonları görülür. Anal fissürler ülseratif kolitli hastalarda görülen bir diğer patolojik değişikliktir.

1.4. İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkların'da Gen Mutasyonları

Günümüzde inflamatuvar bağırsak hastalıkları multipl genlerin etkisi altındaki kompleks genetik hastalıklar içerisinde incelenmektedir. Bağlantı çalışmalarında İBH'dan şüpheli genler içeren kromozom bölgeleri analizleri yapılmış, CH ve ÜK'in diğer genetik hastalıklar ile uyum içinde olup olmadığı araştırılmıştır. En iyi uyum CH' da 16. kromozomun kısa koluna lokalize olan (16q) IBH1 lokusunda mutasyona uğrayan Crohn hastalığına duyarlı CARD15/NOD2 geni olduğu bildirilmektedir (Bonen, vd., 2003a). CARD15/NOD2 geni periferik kanın monositlerinde ifade edilmekte ve yapısı bitkilerde konakçı bakteriyel patojenlerin dirençliliğini gösteren R proteini ile yapısal benzerlik göstermektedir. Bu proteinin CARD15/NOD2 geni tarafından kodlanan CARDS, NBD ve LLR adında üç önemli domaini olduğu bilinmektedir (Bonen, vd., 2003b). CARD15 /NOD2 allel riski taşıyan İBH'da erken dönemde ilial yerleşimde bir fenotipik değişime sebep olabileceği ileri sürülmektedir (Pavli, vd., 2003)

İBH de genlerin analizi ile ilgili olarak lokuslardaki bağlantılar, markırlar kullanılarak hastalıklara neden olan genlerinin izolasyonu ve identifikasyonu yapılmaktadır. Araştırmalarda genetik ilişkiler her bir kontrol grubu ile hastaların allelik frekanslarındaki farklılıkları karşılaştırılarak test edilmektedir. Genetik bağlantı çalışmalarında tipik olarak açık genomik bölgelerdeki potansiyel genlerin miktarı göreceli olarak değişmektedir. İzole populasyonlardaki tipik hastalık ilişkisi çok daha sınırlı bölgeler içerdiği, sadece bir ya da çeşitli aday gen bölgelerinin fonksiyonunda olduğu gözlenmiştir. Bir çok İBH'da fonksiyonel olabileceği düşünülen aday genler incelenmiştir. Hastalıklara duyarlı genlerin inflamasyon ve immün sistemin düzenlenmesinde oynadıkları rol ve çevresel ajanlarla etkileşimleri önem kazanmıştır.

1.4.1. Lokuslar ve Genetik Bağlantı İncelemeleri

Kompleks bir hastalık olan İBH multipl genlerin etkisinde oluşan bir hastalık olup bu hastalığa sebep olan şüpheli genlerin tek tek izolasyonunda fazla sayıda güçlüklerle karşılaşmaktadır. Bu güçlüklerin bağlantı çalışmaları ile geçilebileceği düşünülmüş fakat, İBH da var olan genetik heterojenite lokuslarda yapılan bağlantı incelemelerinin tutarlı

sonuçlar vermediği gözlenmiştir. Genetik heterojeniteyi azaltmanın tek yolu çok homojen populasyonlarda araştırmaların yoğunlaştırılmasını ya da etnik ve coğrafik karakterleri yaygın olarak ifade eden karakteristik bilgilere sahip olmasını veya alt grupların tanımlanmasını gerektirmektedir. Ayrıca, çoğu risk taşıyan ailelerin önceden tahmin edilebildiği kompleks hastalıklar için çok kullanılan allelik frekans değeri değişken olabilir (Tablo 2). 1996 Yılında Hugot ve arkadaşları tarafından yapılan çok sayıdaki genom araştırmaları ile İBH'na duyarlı bir çok lokusun tespiti yapılmıştır (Hendrickson, vd., 2002; Neut, vd., 2002; Lawrance, vd., 2001).

İBH 1 Lokusu: 1996 yılında Hugot ve arkadaşları tarafından yapılan genom taramalarında İBH 1 lokusunun 16. kromozomunun perisentromerik bölgesinde yerleşimi CH'larında bağlantı çalışmaları ile pozitif ilişkisi olduğu gösterilmiştir fakat K'lilerde bağlantısı belirlenememiştir (Hendrickson, vd., 2002). Daha sonraki yıllarda İBH1 lokusunun bağlantıları konusunda uluslararası genetik konsorsiyumu çalışmaları sonucu 8 farklı ülkeden inceleme grupları tesbit edilmiş, her bir grup 12 bölüme ayrılarak çok sayıda gen havuzu oluşturulmuş ve CH ile İBH 1 lokusunun bağlantısı doğrulanmıştır. Bu araştırmalarda İBH 1 lokusundaki genlerin dağılımı Yahudi ve Yahudi olmayan ailelerde birbirine yakın değerde bulunmuştur (Brant, vd., 2000).

Tablo 2. İBH'da tespit edilen duyarlı genler ve ilgili kromozomlardaki lokuslar

BH Lokusları	Kromozom 1 Yerleşim	Araştırmacı	Tanı	şüpheli genler yada lokuslar
İBH1	16q12	Hugot	CH	NOD2/CARD15
İBH2	12q13	Satsangi	K	VDR, IFN-γ
İBH3	6p13	Hampe	CH, K	MHC I ve II, TNF-α
İBH4	14q11	Ma Duerr	CH	TCR α/δ kompleksi
İBH5	5q31-33	Rioux	CH	IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, CSF-2
İBH6	19p13	Rioux	CH, K	ICAM-1
Diğer Lokuslar	1p36	Cho	CH, K	TNF-R Ailesi, CASP9
Diğer Lokuslar	7q	Satsangi	CH, K	MUC-3
Diğer Lokuslar	3p	Satsangi	CH, K	HGFR

İBH 2 Lokusu: Bugünkü bağlantı incelemelerinde akrabalar içinde CH ile ÜK karşılaştırıldığında bağlantı bölgelerinin varlığı CH-CH'dan etkilenenlerde daha fazla olduğu karşımıza çıkmaktadır. Burada dikkate değer bir istisna İBH2 lokusu 12. kromozomda yerleşmesidir. CH ile ÜK genetik uyum açısından karşılaştırıldığında çelişkili sonuçlar ortaya çıkmıştır (Rioux, vd., 2001; Kosiewicz, vd., 2001). İBH 2 lokusu ile ilgili bağlantıların varlığı uluslararası konsorsiyumlarda tahmin edilenden CH ve ÜK'lerde daha az olduğu belirlenmiştir (Ahmad, vd., 2002).

İBH 3 Lokusu: İBH3 lokusu 6 nolu kromozomda MHC kompleksi olarak bilinen CH ve ÜK'de yapılan bağlantı incelemelerinde ilişkisi olduğu gösterilmiştir (Sperber, vd., 2000, Brignola, vd., 2000). Ayrıca, bu hastalıkların patogenezinde epidemiyolojik incelemelerle ilgili bağlantı bilgileri HLA bölgesinin genetik risk olarak katkısı tanımlanmış dağılımlar ÜK'ler için %64-%100 ve CH'ler için %10, %33 olduğu rapor edilmiştir (Stephan, vd., 2001; Pimentel, vd., 2000). Ayrıca bu bölge TNF geni de içerir ki, bu genin TNF ekspirasyonlarının promotör polimorfizmlerini etkilediği rapor edilmektedir (Annese, vd., 2002; Hoffman, vd., 2002).

İBH 5 Lokusu: Geniş genom incelemelerinde Kanadalı ailelerde belirlenen bağlantılarda 5q31-q3 kromozom bölgesinin CH'de hastalığın erken dönemde başlamasında katkıları olduğu belirlenmiştir. Rioux ve arkadaşları (2001) bağlantı araştırmalarında 5q31 bölgesinde 250 kb uzunlukta bir bağlantının olduğunu göstermişlerdir (Yang, vd., 2002). Risk grubu ailelerde heterozigot taşıyıcılarda CH görülmesi 2 kat artarken, homozigot taşıyıcılarda bu risk altı kat artmaktadır. Genetik farklılıkların birleşmesi göreceli olarak allel frekanslarında farklılıklara neden olabilir. Fakat gen ilişkileri özel risk gruplarında şimdiye kadar tam açıklanamamıştır. İBH 5 lokusu ile CH ve UK ile ilişkisi sadece Kafkas kökenli ailelerde tespit edilmiştir. Fakat, Asya populasyonlarında ve Afrika kökenli Amerikalılarda yapılan incelemelerde aynı sonuçlar elde edilememiştir. İBH 5 bölgesi çok sayıda immun sistem düzenleyicisi sitokin genlerini içerir. Sitokin genleri de CH ve ÜK patofizyolojisinde potansiyel aday genler olarak bilinirler (Rogler ve Andus, 1998; Pera, vd., 2000).

1.4.2. İkiz İncelemeleri

Aile bireyleri paylaştıkları genetik bilgiyi çevresel faktörlerin etkisinde kalarak da fenotiplerine yansıtırlar. İBH'nın patogeneğinde hem genetik hem de çevresel faktörlerin etkilerini ayırt etmek için özellikle CH' da ikiz uyum çalışmaları yapılmıştır. CH için monozigotik ikizlerdeki uyum % 22-48 olarak rapor edilmesine rağmen, dizigotik yumurta ikizleri arasında yapılan çalışmalarda normal bireylerden önemli bir fark bulunamamıştır. ÜK için tek ve çift yumurta ikizleri arasındaki uyum sırasıyla %6, %16, ve %3, %6 arasında tanımlanmıştır (Breslin, vd., 1997).

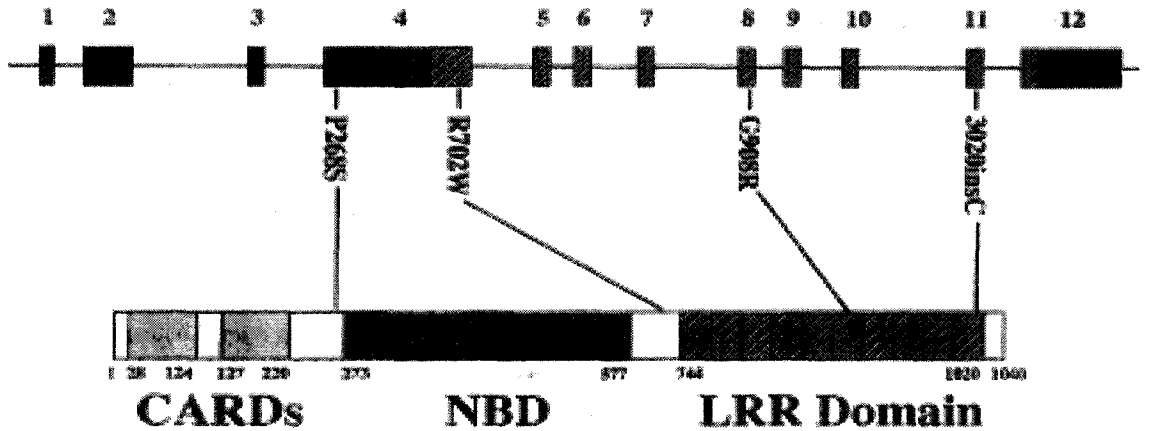
1.4.3. İBH'da HLA Gen Bölgesi İncelemeleri

Crohn hastalığı ve ülseratif kolitin her ikisinde HLA gen bölgesi ile ilişkili olduğu tanımlanmıştır. Japon ve Yahudilerde ÜK'de HLA-DR2 genotipine, Kuzey Avrupa ve beyaz ırkta HLA-DRB1-0103, DR12 genotipine rastlanmaktadır. Ayrıca, HLA-DR3, DQ2 genotipleri ilial kolitte primer olarak daha sık görülmektedir. Diğer HLA-DRB1-0103 polimorfizimleri CH'da azdır. HLA-A2, HLA-DR4, HLA-DR1-DQ5, HLA-11, HLA-DR3 genotiplerinde ise CH saptanmamıştır. HLA polimorfizimlerinin İBH'de bağırsak epitel antijenine karşı artmış sitotoksitesisi bildirilmiştir. HLA genleri içeren kromozom 16'nın perisentromerik bölgesi 1p, 4q ve 6p İBH'ya yatkınlık lokusu olarak tanımlanmıştır. Ayrıca 3., 7. ve 12. kromozomda hem ÜK hem CH ile ilgili loküsler olduğu öne sürülmüştür (Bouma, vd., 1999; Lechler ve Warrens, 2000).

1.5. CARD15/NOD2 (MIM:605956) Geni ve Ürünü

CARD15/NOD2 geni 16. kromozomun perisentromerik bölgesinde (İBH1) yer alan, 4470 nükleotit büyüklüğünde, 12 ekson içeren ve periferik monositlerden ifade edilen bir genidir. Hugot ve arkadaşları (2001) tarafından ÜK ve CH ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir. CARD15/NOD2 geninden ifade edilen proteinin bitkilerdeki konakçının patojen mikroorganizmalara karşı direncini düzenleyen R-proteinleri ile yapısal benzerliği olduğu gösterilmiştir. CARD15/NOD2 geninden ekspresye edilen proteinin üç önemli bölgesi vardır. Birinci bölge N terminalinde CARDs domaini olarak bilinen bölge

proteinin diğer proteinlerle etkileşimini düzenler. Ortada yer alan ikinci bölge NBD bölgesi olup proteinin oligomerizasyonunda görev alır. C terminalinde yer alan üçüncü bölge lösince zengin tekrarları içeren LRR bölgesidir. Bu bölge bakteriyel ürünleri tanıyan reseptör vazifesi görür. Ayrıca bu protein LRR bölgesiyle bakteriyel ürünleri tanıyıp NF_κB aracılığı ile anti-inflamatuar sitokinlerin salınımını artırır. LRR bölgesi 3020 insC proteininde mutasyon 1007 sıradaki amino asitleri değiştirip stop kodunu oluşturur. Anti-inflamatuar sitokin salınımını azaltır (Şekil 1). Mikrobiyal ürünleri tanıyamayan protein dolayısıyla monositler bu etkenlere karşı doğru immünolojik yanıtı oluşturamaz. CARD15/NOD2 geni 3020 insC mutasyonu taşıyan olgularda, inflamasyonu uyaran sitokinler salındığından, hücreler tahrip olur ve inflamasyon oluşur (Bonen, vd., 2003; Hampe, vd., 2001; Murillo, vd., 2002). Bu mutasyonu İBH'da heterozigot taşıyanlar, riskli grup olup bu genin kopyasından normal bireylere göre iki kat daha fazla bulundurlar. Araştırmalarda Crohn hastalarında mutasyon riski populasyonun hem genotipik akrabalarıyla hem de populasyonlardaki allel frekanslarıyla ilgili olduğu rapor edilmiştir. CARD15/NOD2 geni LRR'deki yapısal varyantların değişimi Crohn hastalarında çevre-hastalık etkileşimine önemli bir örnek gösterilebilir (Pera, vd., 2000; Ogura, vd., 2001a; Cuthbert, vd., 2002).



Şekil 1. CARD15/NOD2 geni yapısı

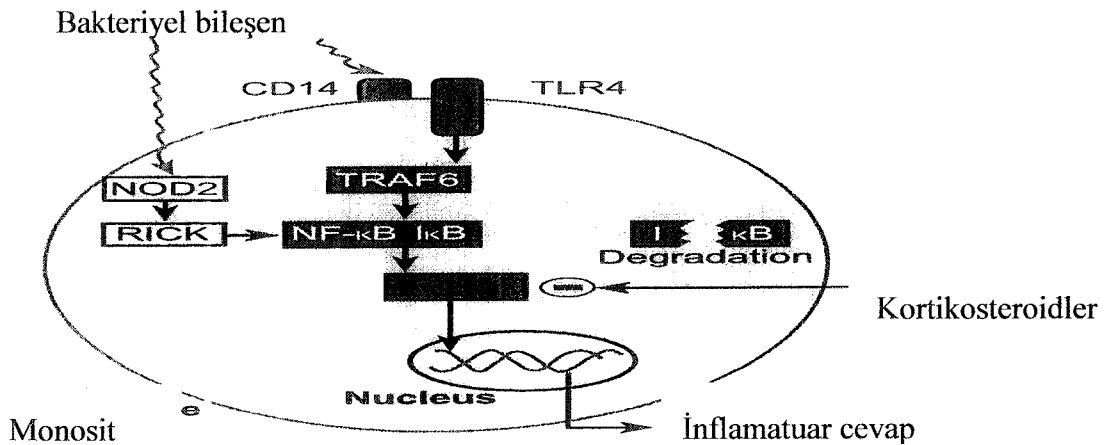
1.6. İBH' da Mukozal İmmunolojik Sistem

İnflamatuvar bağırsak hastalıklarıyla ilgili genetik araştırmalar hayvanlarda yapılan çalışmalarda bağırsak inflamasyonlarının immünolojik ve kompleks genetik faktörlerin bakteriyel ürünlerle etkileşiminin sonucunda oluştuğu gösterilmiştir (Eric, vd., 2003). Bağırsak inflamasyonlarında defekt oluşumlarının sınıflandırılması, sağlıklı bağırsak florası bakımından mukozal bütünlüğün, özellikle flora arasındaki biyolojik etkileşim ile bağırsak epitel bariyerleri immün sistem arasında bütünlük olduğu bilinmektedir (İnohara, vd., 2001).

Bağırsak sistemindeki bilgi iletişimde çok farklı sayıdaki genlerin her birindeki mutasyonlar mukozal immün sistemin homeostasisini bozabilir. Örneğin, CARD15/NOD2 genindeki mutasyonların artması sonucunda, dentritik hücreler ya da monosit / makrofajlardan NF-kB ifadesinin (bakteri ve mikroorganizmalara maruz kaldıktan sonra) artması, çeşitli sitokin proinflamasyonlarının dalgalanmasına neden olabilir (Tözün, 2002). Böylece, mukozal mikro çevrenin normal homeostazisi bozular. Yeterli miktarda mukus tabakalarının oluşumunu sağlayan epitelial bariyerlerdeki her bir farklılık, bağırsak mukozal immün sistemin bağırsak mikro organizmalarına maruz kalmasıyla değişebilir. Bir araştırmada ÜK'li Japonlarda ve Kafkas kökenlilerde Mucin 3 geninde bu değişimin meydana geldiği gösterilmiştir (Akolkar, vd., 2001).

Ortaklaşa yapılan araştırmalarda inflamatuvar bağırsak hastalıklarında normal bağırsak mikrofloralarından elde edilen lümen antijenlerine karşı mukozal immün cevabın genetik determinantlarının düzensiz olduğuna dair önemli kanıtlar vardır (Vidal, vd., 2003). Bağırsak sisteminde çok sayıda bakteri normal koloni olarak bulunur. Bu koloniler bağırsak mukozasında bakteriler lumene yapışık ya da serbest olarak bulunabilirler. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda bağırsak mukoza sisteminde farklı bakteriyel antijenlerin bulunduğu inflamatuvar bağırsak hastalıklarında tespit edilmiştir (Negoro, vd., 1999). Bu antijenlerin farklılığı bakteri türlerine göre değişebilmekte, buna bağlı antijenler CH hastalığının nüks etmesine neden olmaktadır. Bu sebepten genetik faktörler hem bakteriyel penetrasyonun hem de bakteriyel ürünlerin artmasına sebep olmakta ve aynı zamanda mikrobiyal salgılara karşı mukozal inflamasyon cevabı değiştirebilmektedir (Heliö, vd., 2003). CARD15/NOD2 geninin değişik bakteri ürünlerine farklı cevap verdiği gözlenmiştir. İnflamatuvar bağırsak hastalıklarının geniş izahı için sindirim sisteminin çeşitli hücre tiplerinin multiple gen ekspirasyonlarının tespitini yapılması gereklidir.

İnflamasyonlarda önemli olan, genetik yapı değişimleri ve bağırsak sistemin bulunan mikrobiyal floranın bulunduğu çevreyi etkileyerek, hasta için konukçu cevabını özel bir şekilde etkilemesine sebep olmasıdır (Tablo 3 , 4). Bu araştırmalar, inflamatuvar bağırsak hastalıkları mukozal immün sistemin hücreleri arasındaki ilişkisi ile normal bağırsak mikroflorası arasındaki etkileşimlerin mekanizmasının nasıl değiştiğini izah eder (Hampe, vd., 2002b). CARD15/NOD-2 geni ürünü monosit/makrofaj serisi hücrelerde bulunan ve ortamdaki bakteriyel yapılara yanıt oluşumunda yer alan sitozolik bir proteindir. Bu proteinin özellikle LPS'e karşı bir reseptör işlevi gördüğü ve inflamatuvar sitokinlerin salınımını stimüle eden bir transkripsiyon faktörü NFκB'yi uyardığı bilinmektedir. CH tedavisinde kullanılan steroid anti-inflamatuvar ilaçlar ve sulfalazinler de NFκB aktivasyonunu engelleyerek işlev göstermektedir. CARD15/NOD-2 proteininin lösince zengin tekrar bölgesi, hem LPS bağlanması hem NFκB uyarımı ve hem de bu uyarımın düzenlenmesi için gereklidir. Bu bölgenin bir insersiyon 3020 insC sonucu eksprese edilememesi, beklenenin aksine artmış NFκB aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Bunun nedenleri arasında, LPS'nin ayrıca Toll-benzeri reseptör 4 (TLR4) aracılığıyla da NFκB'yi uarması ve hücresel bağışık yanıt için inhibitör etkili bir sitokin olan IL-10 salınımı için CARD/NOD2'nin ifade edilememesidir. Bu uyarımın kontrolsüz kalması ya da NOD-2'nin önemli bir protein olması ve bu sitokinin salınımının azalması ile inflamatuvar cevabın artmasına neden olabilmektedir (Şekil 2). Burada ilgili gen ekspresyonundaki düzensizlik sebepleri arasındadır (Hampe, vd., 2002a).



I_κB=NF-κB inhibitörü, LPS= lipopolisakkarit, NF-κB= Nükleer faktör-κB, RICK= RIP-CLARP kinaz, TRAF6= TNF reseptör tanıyıcı faktör 6

Şekil 2. Çevresel ajanlar ve immün sistem genomunun etkileşimi

Tablo 3. İBH'da NOD2/CARD15 geniyle ilişkili tanımlanan bağlantılı lokuslar.

Araştırmacı	Yıl	Etnik grup	Kalıtım şekli	IBH duyarlı lokuslar	CH duyarlı lokuslar	ÜK.d.lokus
Hugot, J.P.	1996	Kafkas CH	otosom		16q(IBH1)+	
Satsangi, J.	1996	Kuzey Avrupalı IBH	otosom	7+, 12+, 3iÀ	7, 12, 3iÀ	7+
Cho, J.H.	1998	Amerikan IBH	Genom	(3q+,1p)(non-Jewish),(3q,4q) ^e	16iÀ	--
Ma, Y.	1999	Amerikan CH	Genom		14q,17qiÀ ^e ,5qiÀ ^e	
Hampe, J.	1999	Avrupalı IBH	Genom	1, 6, XiÀ	10, 12, 16iÀ	4, XiÀ
Duerr, R.H.	2000	Amerikan CH	Genom		14q+	
Rioux, J.D.	2000	Kanadalı IBH	Genom	19p+, 5q+, 3p, 6piÀ	5q+f, 19p+	19piÀ
Fisher, S.A.	2002	Avrupalı IBH	Genom	(6p+,1+,14+,18+)	6p+	6p+
Brant, S.R.	1998	Amerikan CH	3,7,12,16		16q(IBH1)iÀ	
Rioux, J.D.	1998	Torontolu IBH	3,7,12,16	--	--	--
Curran, M.E.	1998	Avrupalı IBH	12,16	--	12qiÀ	--
Annese, V.	1999	İtalyan IBH	3,6,7,12,16	16qi	16qiÀ	16qiÀ
Vermeire, S.	2000	Belçikalı CH	3,7,12,16		--	
Dechairo, B.	2001	Avrupalı IBH	3,6,7,	6p+	--	--
Paavola, P.	2001	Finlandiyalı IBH	1,3,7,12,14,16	--	--	--
Gavanaugh, J.	2001	IBH	12,16	16q+	16q+	--
Ohmen, J.D.	1996	Amerikan IBH	16	--	16q	--
Parkes, M.	1996	İngiliz İBH	16	--	16qiÀ	--
Cavanaugh, J.A.	1998	Avusturyalı CH	16		16q+(IBH1)	
Mirza, M.M.	1998	Kuzey Avrupalı ÜK	16			16q IBH1
Porabosco, P.	2000	İtalyan IBH	16	16q+	16q+	16q+
Brant, S.R.	2000	Amerikan CH	16		16q+, 16qiÀ	
Akollar, P.N.	2001	Yahudi CH	16		16q+f	
Van Heel, D.A.	2002	Avrupalı CH	16		--	
Zouali, H.	2001	Avrupalı CH	16		16q+	
Hampe, J.	2002	Avrupalı İBH	16	16piÀ	16q+, 16piÀ	--
Satsangi, J.	1996	Avrupalı İBH	6(MHC-II)	--	--	6p(MHC-II)+
Silverber, M.S.	1999	Canadalı CH	6 Avrupalı İBH		6p(MHC-II) iÀ	
Hampe, J.	1999	Kuzey Avrupalı IBH	6	6p+	6p+	6p+
Yang, H.	1999	Amerikan CH	6		6p(MHC)+	
Duerr, R.H.	1998	Kuzey amerikalı IBH	12	12qiÀ	--	--
Yang, H.	1999	Amerikan IBH	12	--	12qiÀ	--
Lesage, S.	2000	Kuzey Avrupalı CH	12		--	
Parkes, M.	2000	Amerikan IBH	12	12q+	--	12q +
Hampe, J.	2001	Kuzey Avrupalı IBH	3	--	--	--
Duerr, R.H.	2000	Amerikan IBH	3	3p+	--	--
Rioux, J.D.	2001	Amerikan CH	5q		5q+	
Vermeire, S.	2001	Belçikalı CH	X		XqiÀ	

Tablo 4. İBH'de CARD15 /NOD2geninin analiziyle tanımlanan bazı mutasyonlar

Araştırmacı Yılı	Vaka	NOD2/CARD15 geni allelleri
Hugot, J.P., 2001	Avrupa CH, ÜK	A. P241S, R432R, R675W, G881R, IVS8-133delA 980fs
Hugot, J.P., 2001		B. R675W, G881R, 980fs CH ve, ÜK olmayan
		C. CD-GRR 3.0, 38.0, 44.0
Ogura, Y., 2001	Amerikan CH	A. 3020insC CH
Ogura, Y., 2001		B. CD-GRR 1.5, 17.6.
	Alman, İngiliz	A. 3020insC, CH, ÜK olmayan
Hampe, J., 2002	ÜK	B. CD-GRR 2.6, 42.1
	Avrupa CH	A. 67 dizi variantları, 9 gen frekansları >5 %
Lesage, S., 2002		B. R702W, G908R, 3020insC CH, ÜK olmayan
		C. Support gene-dosage effect
	Avr. ÜK, CH	A. R702W, G908R, 3020insC özellikle CH, ileum CH, ÜK'da yok
Cuthbert, A.P., 2002		B. P628S bağlantılı üç mutasyon
		C. CD-GRR 3.0, >22.0
		D. Mutasyon frekansları: ailesel CD > sporadik CD
	Alman CH	A. 3020insC CH, G2722C, CH'de yok
Murillo, L., 2002		B. Klinik fenotiplerle ilişkili olmayan
	Alman, Norveç	A. R675W, G881R, 980fs CH
Hampe, J., 2002	CH	B. özellikle ileum CH
	Kanada CH	A. R702W, G908R, 1007fs CH, özellikle ileum CH
Vermeire, S., 2002		B. Ailesel CH ve sporadik CH arasında fark yok.
	Alman, CH	A. 3020insC CH, ÜK olmayan
Radlmayr, M., 2002		B. Fistül oluşumu gözlenen İBH'da
		Japon CH, UK A. R675W, G881R, 3020insC CH ve ÜK'da olmayan
Inoue, N., 2002	Avrupa CH	A. R675W, G881R, 3020insC CH
Vermeire, S., 2002		B. inflamasyon görülmeyen hastalarda
	Amerikan CH	A. R702W, G908R, 1007fs CH
Abreu, M.T., 2002		B. fibrostenosislerde
	İngiliz CH	A. R702W, G908R, 1007fs CH
Ahmad, T., 2002		B. 3020insC erken dönem CH
		C. CD-GRR 2.4, 9.8, 29.3
	Avrupalı CH	A. R702W, 1007fs CH, bağlantılı lokuslar P628S

1.7. Sitokinler

Sitokinler, immün ve inflamatuvar olaylara katılan hücrelerin etkinliklerini arttıran ve uyarılmış lenfositler, monositler, makrofajlar ile diğer bazı hücrelerde sentezlenen 20-30 kD molekül ağırlığında bir grup peptid veya glikoprotein yapısındaki çözünebilir maddelerdir (Abbas, vd., 2000; Rogler ve Andus, 1998). Sitokinler sentezlendikten sonra çevresindeki hücrelere (parakrin) veya salındıkları hücreler üzerine doğrudan (otokrin) etkilidirler. Sitokinler, antijen için spesifik olmamakla beraber, antijenlerle ortaya çıkan sitokin profilinin oluşmasında yönlendirici etkisi olabilmektedir ve oluşmaları ile hedef hücreleri etkilemeleri çoğunlukla bir stimülasyonu gerektirmektedir (Hacker, vd., 1997; Stokkers, vd., 1998). Tablo 5’de sitokinlerin özellikleri ve aktiviteleri verilmiştir.

Bazıları uzak mesafelerde de etkili olabilir ve etkileri çeşitli faktörlerle modüle edilebilir. Sitokinler, 100’den fazla sayıda farklı molekülden oluşmaktadır. Bunların bir kısmı henüz çok iyi incelenmemiştir ve bilgilerde karışıklıklar vardır. Fizyolojik açıdan sitokinlere, hücreler arasında mesaj (sinyal) ileten biyolojik mediyatörler gibi bakılabilir. Aktive T lenfositleri tarafından sentezlenip salınan sitokinler lenfokin (lymphokine); aktive monosit ve makrofajlardan sentezlenip salınan sitokinlere monokin (monokine) ve lökositler arasında etkileşim yapan sitokinlere interlökin (interleukin) adı verilmektedir. Son yirmi yıl içindeki gelişmelerle sayıları 17’ye ulaşan interlökinlerin bir kısmının, lökositlerin dışında başka hücreler tarafından da yapıldığı ve lökosit olmayan hücreleri de etkilediği anlaşılmıştır (Hanada ve Yoshimura, 2002).

1.7.1. Sitokin Reseptörleri

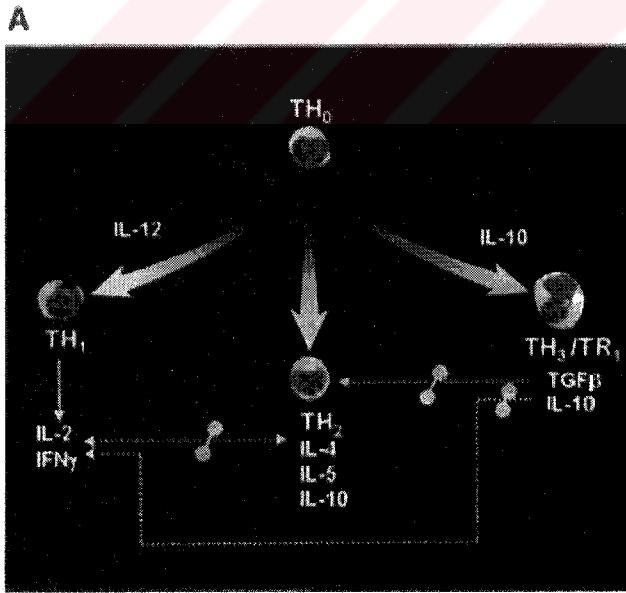
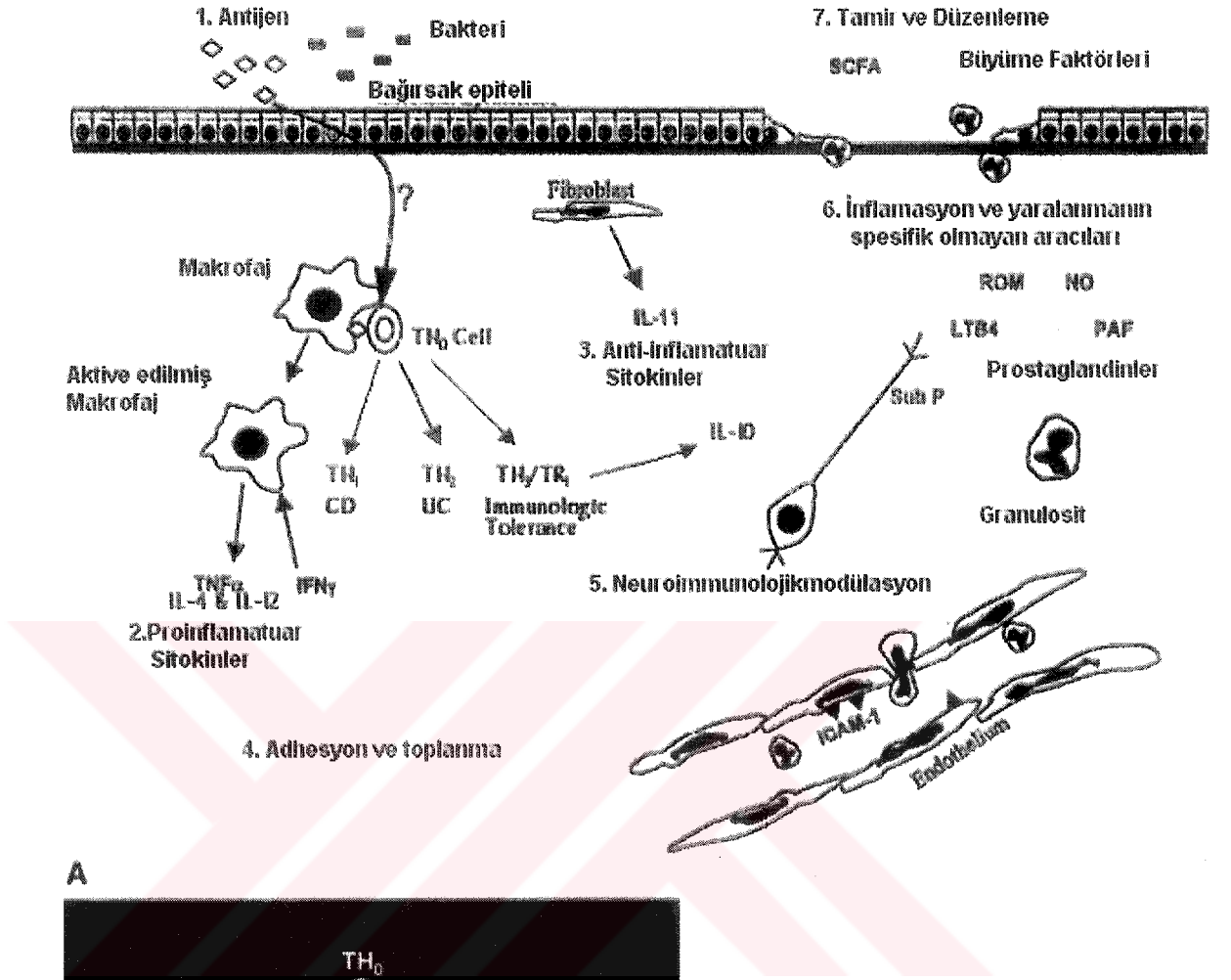
Sitokinler, etkilerini hücre yüzeyinde yer alan spesifik reseptörlere bağlanarak gösterirler. Birçok farklı sitokin reseptörünün ekstraselüler domainleri bir ölçüde benzerlik göstermekle beraber, intraselüler domainleri farklıdır. Sitokin reseptörlerinin geniş bir grubu hemotopietik büyüme faktör reseptörleri familyası içinde yer alır. Sitokinler etkilerini hücre zarındaki transmembran yapısında reseptörler aracılığıyla yaparlar. Hücre yüzeyinde reseptör artışı yoğun sinyalizasyondan sonra meydana gelir. Supresör etkiler ise reseptör sentezini ve sayısını azaltır (Shanahan, vd.,1994). Reseptör moleküller membrana bağlı oldukları gibi serbest (solubl) halde de bulunabilirler. Sitokinler, hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlere yüksek afinite ile bağlanırlar. Bu bağlanma reseptör moleküllerde

konformasyonel değişiklik yapar. Hücre içine sinyal iletimi farklı 3 değişik tipte sitokin reseptörü bulunduğu düşünölmektedir:1- Tirozin kinaz aktivitesine sahip olanlar (CSF-1 reseptörü), 2-Ligand ile ilişki kurunca tirozin kinazlara bağlananlar (T hücresi büyüme faktörü reseptörleri), 3- Fosfolipaz C aktivasyonu ile fosfatidilinositol trifosfat yolunu kullananlar Örneğin, IL-8 reseptörü üç çeşittir. Bunlar; granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF), monosit koloni uyarıcı faktör (M-CSF) ve monosit-granülosit koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) lerdir. IL-3, IL-4, IL-2 , IL-5, IL-6 ve IL-7 reseptörleri ise İmmünglobülin süperfamilyası içinde, IL-1, IL-6, M-CSF, PDGF, EGF ve IGF reseptörleri içinde yer alır. TNF/NGF familyasında ise, TNF, NGF ve CD40 gibi bazı yüzey molekülleri için reseptörler bulunur. IFN- γ reseptörü gibi bazıları ise henüz belli bir familyaya sokulamamıştır (Abbas, vd, 2000).

Sinyalizasyonda bazı reseptör zincirlerinin, reseptörler arasında ortak olarak kullandıkları bilinmektedir. Mesela IL-6 familyası içinde yer alan IL-6, TF, ve IL-11, gp 130 transmembran sinyal iletim molekülünü aktive ederler. IL-2 reseptörünün γ zinciri, IL-4, IL-7, IL-9 sinyalleşmesinde yer alır. IL-15 benzer biçimde IL-2 reseptörünün β zincirini kullanır. Yine IL-13 reseptörü IL-4 için de fonksiyonel bulunmuştur (Şekil 3).

Tablo 5. Sitokinlerin özellikleri ve aktiviteleri (Abbas, vd, 2000)

Sitokin	Mol. Ağ. (kD)	Kaynağı	Aktivitesi
IL-1 α , β	17,5	Makrofaj, T/B lenfositleri,	İmmüniteyi artırma, T/B lenfosit farklılaşması
IL-2	15,5	T _{H1} ve büyük granüllü lenfositler	T/B ve NK lenfositlerin gelişme faktörü
IL-3	14-25	T lenfositler, makrofajlar	Hemotopoitik gelişme faktörü
IL-4	20	T _{H2} lenfositler	T/B lenfosit gelişme faktörü
IL-5	18	T _{H2} lenfositler	B lenfosit ve eozinofil stimülasyonu
IL-6	22,3	T _{H2} lenfositler	İnflamasyon
IL-7	25	Stromal hücre	Lenfosit gelişme faktörü
IL-8	8,8	Makrofajlar, T lenfositler	Nötrofil ve T lenfosit kemotaksisi
IL-9		T lenfositler	T lenfosit proliferasyonu
IL-10		T _{H2} lenfositler	Sitokin sentez inhibitörü
IL-11		Fibroblast	Hemotopoitik etkili
IL-12	35-40	Makrofajlar	Hemotopoitik etkili
IL-13		Aktif T lenfositleri	Hemotopoitik etkili
G-CSF	18-22	Monosit, fibroblastlar	Miyeloid gelişme faktörü
M-CSF	70-90	Monosit, fibroblastlar	Makrofaj gelişme faktörü
GM-CSF	14-35	T _{H1} , T _{H2} lenfositler, monositler	Monomiyelotik gelişme faktörü
INF- α	18-20	Lökositler	Antiviral etki
INF- β	25	Fibroblastlar	Antiviral etki
INF- γ	20-25	T _{H1} lenfositler, NK	İmmünomodülatör
TNF- α	17	T _H lenfositler	İnflamasyon, tümörisidal
TNF- β	18	T _{H1} lenfositler	Tümörisidal
TGF- β	25	makrofajlar	immünosupresyon



B

Şekil 3. Çevresel faktörler ile sitokinlerin etkileşimi

1.7.2. İnflamatuvar Bağırsak Hastalıklarında Sitokinlerin Rolü

Bağırsak immün sistemin düzenlenmesinde merkezi rol oynayan sitokinler, T-lenfositlerden, makrofajlar, monositler, granülositler, epitel hücreleri ve endotel hücreleri tarafından sentezlenirler. Fonksiyon açısından sitokinler proinflamatuvar sitokinler ve antiinflamatuvar sitokinler olarak gruplandırılır. Proinflamatuvar sitokinler IL-1, TNF, IL-6, IL-8 ve IL-12 dir. Proinflamatuvar sitokinlerin üretimi, inflamasyonu artırma yönünde etkisi olduğu bilinmektedir (Ahmad, vd., 2001; Van Hell, vd., 2002).

Anti-inflamatuvar sitokinler, IL-1RA, IL-4, IL-10 ve IL-11'dir. İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında inflamasyonlara aracılık eden sitokinlerin immün sistemde bir çok fonksiyonu olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, sitokinlerin İnflamatuvar bağırsak hastalıklarının patogeneğinde önemli olabileceği araştırmacılar tarafından tespit edilmiştir. İnsan sindirim sisteminde bağırsak lümeni içinde bulunan çeşitli antijenlerin sitümlasyonlarına karşı bir koruma sistemi bulunur ki buna GALT (Gut – Associated Lymphoid Tissue) denir. Eğer bağırsak immün sistemin homeostazisi GALT tarafından bozulursa, yani bilinmeyen yabancı maddeler tarafından olumsuz etkilenirse bağırsak sisteminde inflamasyon oluşabilmektedir. Bazen inflamasyon olumlu etkiye de neden olabilir. Çünkü inflamasyon hücrelerin yabancı maddeleri tanımalarını teşvik edebilmektedir. Fakat inflamasyonun sürekli olması durumunda hücre yüzeyinin bozulması olabilir (Abbas, vd., 2000; Kelly ve Locksley, 2000).

Araştırmalarda inflamasyon esnasında hücrelerde pro-inflamanter sitokinlerin salınmasının arttığı gözlenmiştir. Inohara ve arkadaşları (1999) inflamasyon esnasında Crohn hastaları ve Ülseratif kolitli hastalarda bağırsak mukozalarında TNF α ve interlökinlerden IL-1, IL-2, IL-6, IL-8'in üretiminin önemli oranda arttığı açıklanmıştır. Sitokinlerdeki bu artış Ülseratif Kolitlilerde endoskopik incelemelerde de histolojik olarak gösterilmiştir.

İnterlökin –1

IL-1 α ve IL-1 β olarak kodlanan iki farklı gen yapısına sahiptir. IL-1 α ; 12 kb, IL-1 β ; 9,7 kb nükleotit içerir, her ikisi de yedi eksona sahiptirler. İnsan gen haritasında IL-1 α , 2q13, IL-1 β ; 2q13-q21' kromozonlarına yerleşmişlerdir. IL-1 α geni, (17 kDa) 159 a.a.lik, IL-1 β geni (17 kDa) 153 a.a'lik bir ürün verirler. İnterlökin 1 (IL-1) bir çok inflamasyon

ve immün hücrelerini aktive eden güçlü bir mediatördür (Biannchi, vd, 1999) IL-1 monositler, makrofajlar, nötröfiller ve endotel hücreleri gibi çeşitli hücrelerde üretilir. IL-1 sistemi karmaşıktır. Bu sistem IL-1 reseptör tip I ve IL-1 reseptör tip II olarak adlandırılan hedef hücrelerin üzerindeki iki tip IL-1 reseptörüne bağlanan IL-1 α ve IL-1 β 'dan oluşmuştur. Sinyal üretimine sadece IL-1 reseptörü tip I aracılık eder. IL-1'in etkileri aynı hücreler tarafından kendi IL-1 etkilerini baskılamak için üretilen bir IL-1 reseptör antagonisti tarafından kontrol edilir. IL-1 reseptör antagonistinin IL-1'in in vivo ve in vitro bir çok biyolojik aktivitelerini engellediği gösterilmiştir. Diğer kontrol mekanizmaları da çözünebilir IL-1 tip II reseptörü ve inaktive eder ve IL-1 presürkürlerinin IL-1 β converting enzimce kesilmesidir (Brignola, vd., 2000).

IL-1'in ekspirasyonu İBH'nın inflamatuvar lezyonlarda artmıştır (Duerr, vd., 2000). IL-1 reseptör antagonisti de artmıştır ancak, bu artış IL-1 artışı ile aynı oranda değildir. Bu inflamasyona uğramış mukozada IL-1 ve IL-1 reseptör antogonisti arasındaki lokal bir dengesizlik olduğu gözlenmiştir (Brown, vd., 2000; Cho, vd., 2001). Bu durum aynı zamanda divertiküllerin iltihabı ile ciddi infeksiyöz kolitisli hastalarda da bulunduğu için bu hastalıklara özgü gibi görünmemektedir. IL-1 başlıca inflamasyona uğramış bağırsak mukozasındaki makrofajlar tarafından üretilir halbuki IL-1 RA'nın önemli bir kaynağı bağırsak epitel hücreleri olarak görünmektedir (Duerr, vd., 1998). İnsan genomunda IL-1RA geni 4 eksonu ve 1,4 kb nükleotit içerir ve kromozom haritasında 2q13-14.1 yerleşmiştir. IL-1RA geni 152 a.a lik proteini kodlamaktadır. IL-1R geni 2,7 – 5 kb lik nükleotit uzunluğuna sahip bir yapısının varlığı gözlenir.

İnterlökin-2

İnsan genomunda IL-2 geni dört ekson içerir, kromozom haritasındaki yerleşimi 4q26-28'dir ve 133 a.a.lik bir proteini kodlamaktadır. İnterlökin-2, lenfositlerin alt grubu olan Th1 ve Th2 yardımcı hücreleri tarafından üretilir. IL-2 T hücrelerinin proliferasyonunu otokrin bir mekanizma ile uyarır ancak, diğer hücreler üzerinde de etkileri vardır. IL-2 epitel hücrelerinin onarımını hızlandırır. Crohn hastalığı Th1 aracılığı ile oluşan bir hastalık olarak kabul edilir. Bu crohn hastalarının inflamasyona uğramış mukozalarındaki artış IL-2 seviyeleri ile uyumludur (Dunn, vd., 1999; DavanHELL, vd., 2001; Farrel ve Peppercorn, 2002). ÜK'de, IL-2 seviyeleri azalmış gibi görünmektedir (Hampe, vd., 2001). IL-2 knockout farelerin gelişimi için T hücrelerine gerek duyan doğal bir kolonik

inflamasyon gösterirler. Bu bulgular, ÜK ve Crohn hastalığının patogenisindeki farklılıkları göstermektedir.

İnterlökin-4

İnsan genomunda IL-4 geni 10 kb.'lik nükleotit dizisine ve 4 eksona sahiptir. Kromozom haritasındaki yerleşimi 5q23-31'dir. 129 a.a. gen ürünü vermektedir. IL-4 B-lenfosit hücrelerini uyarıcı olarak bilinir ve aktive edilmiş lenfositler tarafından sentez edilir. IL-4 immüno-regülasyon ve antiinflamatuvar etkiye sahiptir. Bağırsak sistemi immünolojisinde önemli rol oynayabilir (Hugot, vd., 1999). IL-4 hem B hem de T hücreleri için uyarıcı bir faktördür. IL-4 lenfosit fonksiyonların farklı olarak etkiler ve çeşitli monositlerin fonksiyonunu zayıflatır. IL-4 insan makrofaj koloni oluşumunu, monositlerden H_2O_2 üretimini ve TNF veya IL-1 gibi inflamatuvar mediatörlerin salgılanmasını engellerken, IL-1 RA'yı uyarır (Hampe, vd., 2000). Yakın geçmişte, IBH'de ve diğer inflamatuvar hastalıklarda IL-4 karşı aktifleşmiş mononükleer fagositlerin cevabında bir azalma olduğu gösterilmiştir (Hampe, vd., 1999). IL-4 seviyesi ve IL-4 mRNA'sının IBH'li hastalarda azaldığı bulunmuştur. Bu durum anti inflamatuvar ve immüno-supresif bozukluklara neden olabilir ve inflamasyona neden olan patojenik silsileye katkıda bulunabilir (Hampe, vd., 2002a). IL-4'ün Crohnlu hastalarda, ÜK'lı hastalara göre daha çok azaldığı gözlenmiştir. Bu da bu iki hastalığın farklı immunopatogenik mekanizmalarını göstermektedir.

İnterlökin-5

IL-5'in başlıca kaynağı, Th hücrelerinin alt grubu olan Th2 hücreleri tarafından üretilir. IL-5'in mukozal bağışıklık sistemindeki rolü tam anlamıyla belirlenememiştir ve hala üzerinde araştırma yapılmaktadır. ÜK'te IL-5 seviyesinin artması , ÜK'de baskın inflamatuvar tipinin Th2'nin olabileceği hipotezini destekler gibi görünmektedir (İnohara ,vd., 2001)..

İnterlökin-6

IL-6'nın insan genomunda nükleotit uzunluğu 5 kb olup, beş eksonu vardır. Kromozom haritasındaki yerleşimi 7p 21-p14'tür. Bu gen 185 a.a'lik bir protein ürünü vermektedir. IL-6 çok farklı hücre tarafından üretilmektedir ve akut faz cevabı sırasında indüklenmektedir. Bağırsak sisteminde IL-6'nın başlıca kaynağı makrofajlar iken, epitel hücreleri tarafından IL-6 salgılanması ile ilgili sonuçlar tartışmalıdır (Duerr, vd., 1998, Itoh, vd, 2001; Kato, vd., 1998). IBH'nı serumlarında ve mukozal biyopsilerinde IL-6 seviyelerinde yükselme olduğu bildirilmiştir (Hampe, vd., 2001; Hacker, vd., 1997; Jewell, vd., 1998). Kortikosteroid tedavisi almayan hastalarda serum IL-6 konstranstrasyonu hastalığın aktivitesi ile ilişkilidir.

İnterlökin-8

Bağırsak mukozasındaki IL-8'in kaynağı makrofajlar, epitel hücreleri ve fibroblastlardır. Bu alanda çok sayıda yapılan araştırmalarda hastalığa tutulmuş mukozadaki IL-8 seviyesinin arttığı gösterilmiştir (Nemetz, vd., 1999; Louis, vd, 2000). IL-8 güçlü bir nötrofil kemoatraktantı ve aktivatörüdür. Bağırsaklardaki IL-8'in seviyeleri özellikle crypt abselerinde çok sayıda nötrofiller bulunan ÜK'li hastaların lokal inflamasyonun makroskopik derecesi ile ilişkilidir. (Miesfeld, vd., 1999; Murillo, vd., 2002). Bağırsaklardaki IL-8 seviyesi mukozal dokulardaki nötrofil sayıları ile de ilişkilidir. Bu nedenle IBH'lerde bağırsak duvarına nötrofillerin infiltrasyonunda, IL-8 ve onun düzenleyici sitokinleri IL-1 ve TNF α bir rolü olduğu ileri sürülmüştür.

İnterlökin-10

IL-10 insan genomunda 2,3 kb baz büyüklüğünde olup dört ekson içermektedir. Gen haritasındaki yeri 1. kromozom olarak tanımlanmıştır. IL-10, 160 a a'lik bir ürün vermektedir. İnterlökin-10 T hücrelerinde, B hücrelerinde veya LPS lerce aktive edilen monositlerde üretilir. IL-10 antijen sunan hücrelerin varlığını gerektiren şartlar altında aktifleşen Th1 hücrelerince sitokin üretimini baskılar. IL-10, class II MHC gen ifadesini baskılamak yoluyla monositlerin antijen sunma kapasitelerini azaltarak antijen spesifik T hücrelerinin proliferasyonunu kuvvetli bir şekilde baskılar. Ayrıca, IL-10 aktive edilmiş

makrofajlardan sitokin üretimini de baskılar (Pimentel, vd., 2000). Böylece IL-10, sadece T- lenfositlerin aktivasyonun düzenlenmesinde değil, aynı zamanda akut inflamatuvar cevabın baskılanmasında da rol oynar.

Son zamanlarda, IBH'de yapılan araştırmalarda IL-10'un antiinflamatuvar özelliğine odaklanılmıştır. Bağırsak immün sistemi homeostasisi için IL-10'un önemi IL-10 eksiliği olan farelerde IL-10 uygulanması ile engellenen kronik enterokolitis gelişimi ile gösterilmiştir (Pena, vd., 1998). IBH'de IL-10 tarafından mononükleer monositlerin aktivasyonunun down-regulasyonu in vitro olarak gösterilmiştir. (Murillo, vd., 2002).

İnterlökin -11

IL-11 çeşitli hemopoetik kök hücelere, hepatositlere ve atasal hücelere çok yönlü etkileri olan bir pleotropik sitokindir. Ayrıca, IL-11'in intestinal epitel hüceleri koruma etkisi vardır. Transgenik farelerde yapılan denemelerde, bunlar 10 gün 5- florourasil ile aşırı miktarda uyarıldığında bağırsak sistemi villuslarının yapısını bozulduğu hücelerin öldüğu gözlenmiştir. Bu farelere rekombinant insan IL-11 verildiğinde ise canlılıklarını devam ettirmişlerdir ve intestinal mukozaları hızlıca gelişerek mitoz aktiviteleri artmıştır (Segain, vd., 2000) .

İnterlökin-12

İnsan genomunda kodlanabilen p 40 alt ünitesi olup kromozom haritasında 5q31-q33 bölgesine lokalize olmuştur ve IL-12A olarak adlandırılır. Diğer alt grup IL-12 B ise p35 alt ünite olup kromozom haritasında 3p12-q13.2 bölgesine yerleşmiştir. IL-12 A, 197 a.a'lik ve IL-12B, 306 a.a.'lik bir ürün verirler. IL-12 aktive edilmiş makrofajlardan sentez edilir ve Crohn hastalığında merkezi rol oynayan Th hücelerinin Th1'lerin farklılaşmasını tetikler. Crohn'lu hayvan modellerinde, IL-12'nin antikorlarca nötrale edilmesi mukozal inflamasyonda azalmaya neden olmuştur (Simmons, vd., 2000). Araştırmalarda dekstansülfat ile kolitis oluşturulan farelerde IL-12 antikorlarının uygulanması ile histolojik sonuçta önemli derecede iyileşme bulunmuştur.

Tümör Nekrozis Faktör (TNF)

İnsan genomunda TNF α geni 4 ekson ve üç intron içeren 3,6 kb uzunluğunda olup, kromozom haritasındaki yerleşimi 6p21.3 tür. TNF α geninin çeşitli allellik varyasyonlar gösteren, çeşitli kompleks hastalıklara hassasiyeti vardır. TNF inflamasyonda önemli bir mediatördür. TNF proinflamatuvar aktivitesini IL-1 ile paylaşırlar. TNF sistemi IL-1 gibi komplekstir ve düzenleme mekanizmasında da benzerlik gösterir. Molekül kütlesi 55 kDa; (p55) ve 75 kDa (p75) olan iki farklı çözünebilen TNF reseptörü vardır. Çözünebilen reseptörler membrana bağlı reseptörlerin proteolitik olarak kesilmesi ile oluşur. Her iki çözünebilen TNF reseptörleri TNF 'ün reseptörlerine bağlanmasını engeller ve doza bağımlı bir şekilde TNF 'nin biyolojik etkilerini azaltır. IL-1 aksine, İBH'da TNF nin ekspresyonu ile ilgili raporlar biraz tartışmalıdır. Bazı araştırmacılar İBH'da TNF seviyelerinin arttığını gösterirken, diğer araştırmacılar TNF ekspresyonunda herhangi bir artış gösterememişlerdir (Sashio, vd., 2002). İBH'de yöntemin zorluğuna bakmaksızın mukozal TNF seviyeleri spesifik anti-TNF ajanlarla test edilmelidir.

İnterferonlar (IFN)

İnterferonlar ilk kez immün yanıtın oluşumunda etkisini gösteren antiviral proteinler olarak tanımlanmışlardır. Tip 1 interferonlar, iki farklı protein grubundan oluşurlar. Birinci grubu oluşturan IFN α , yaklaşık 18 kDa ağırlığında ve 20 civarında polipeptidin dahil olduğu bir ailedir. IFN α başlıca mononükleer fagositler tarafından üretilir. İkinci grubu oluşturan IFN β , başlıca fibroblastlarda tek genden üretilen glikoprotein yapısında ve 20 kDa ağırlığındadır. IFN α ve IFN β aynı reseptöre bağlanırlar. IFN β , IFN α 'dan daha yüksek bağlanma afinitesine sahiptir. IFN β ve IFN α viral replikasyonu ve hücre proliferasyonu engeller; Natural Killer (NK) hücrelerin litik potansiyeli güçlendirir ve MHC molekül ifadesini düzenlerler (Louis, vd., 1996; Meenagh, vd., 2002).

IFN γ veya immün interferon olarak adlandırılan tip II interferon 21-24 kDa ağırlığındaki alt birimlerden oluşan bir homodimerik glikoproteindir. İnsan genomunda nükleotit büyüklüğü yaklaşık 6 kb.kadardır. γ IFN geni dört ekson içerir ve kromozom haritasındaki yeri 12 q 24.1'dir. IFN γ geni; 146 amino asitlik alt ünitesi olan homodimerik bir glikoprotein içeren 25 kDa. ürünü verdiği bilinmektedir. IFN γ NK hücreleri ve Th1 lenfositleri tarafından üretilir. IFN γ tip I interferonlardan farklı reseptörlere bağlanırlar.

Antiviral ve antiprofilatik etkiye sahiptirler. Mononükleer fagositlerin en güçlü aktivatörlerinden biri olup, MHC klas I ve II ifadesini artırır, T ve B hücrelerinin farklılaşmasını uyarırlar ve nötrofillerini, NK hücrelerini ve vasküler endotel hücreleri aktive ederler. Crohn hastalığında IFN α ve özellikle IFN γ , bağırsak mukozalarında yüksek bulunmasına rağmen, dolaşımda konsantrasyonunun arttığı gösterilememiştir (Satsangi, vd., 1998).

Transforming Growth Faktör (TGF β)

İnsan genomunda TGF β geninin nükleotit uzunluğu 100 kb' büyüklüğünde olup yedi eksona sahiptir. Kromozom haritasındaki yerleşimleri TGF β 1 için 19q13, 399. aa, TGF β 2, 1q41 ve 412 a.a. , TGF β 3 14q24 ve 412 a.a. ürün verirler. TGF β immun sistemde hem uyarıcı hem de inhibe edici etki gösterir. Monositler ve fibroblastlar için kemostatik bir ajan olup monositlerin yüzeyinde CD16 ekspresyonunu artırır. Diğer yandan TGF β monositler için kuvvetli bir deaktive edici ajandır. TGF β oksijen radikallerinin üretimini bozar ve immun yanıtta diğer sitokinlerin sentezi için uyarıcı etki yapar (ör: endotoksin salınımı). Ayrıca, TGF β lenfosit proliferasyonunun güçlü bir düzenleyicisidir. TGF β , B ve T hücrelerinin proliferasyonunu ve sitotoksik T hücrelerinin ve linfokinle aktifleşen killer hücrelerinin çoğalmasını inhibe eder (Uthoff, vd., 2002; Uboldi de Capei, vd., 2003).

2.YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışma Grubu

Bu çalışma, Şubat 2002 – Mayıs 2003 tarihleri arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farabi Hastanesi Gastroenteroloji ve Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji polikliniklerinde, inflamatuvar bağırsak hastalığı tanısı alan 69 vakanın kan örnekleri alınarak KTÜ Farabi Hastanesi Hematoloji Bilim Dalı Laboratuvarında yapıldı.

Çalışmada bireylerin klinik muayeneleri, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı Öğretim üyesi Doç. Dr.Orhan ÖZGÜR ve Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji bilim dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ömer ŞENTÜRK tarafından yapıldı. İnflamatuvar bağırsak hastalığı tanısı, hastaların şikayetlerine göre fizik muayene, radyolojik, endoskopik ve patolojik test kriterleri kullanılarak belirlendi. İnflamatuvar bağırsak hastaları için bilgilendirme dosyaları oluşturulup, yaş, cinsiyet, aile ve akrabaları ile ilgili bilgiler dosyalara uzman hekimler tarafından yazıldı. İnflamatuvar bağırsak hastalarındaki lezyonların sindirim organlarındaki yerleşimine ve hastalığın davranış tipine göre sınıflandırılma yapılmadı. Araştırmalarımızda, hastalığın o bireyde ilk kez mi görüldüğü yoksa tedaviden sonra ikinci defa mı oluştuğu dikkate alınmadı.

Çalışmaya dahil edilen her bir hastadan EDTA'lı tüpe 8 ml kan alındı. Çalışmamızda inflamatuvar bağırsak hastası olmayan 50 birey kontrol grubu olarak kullanıldı ve her bir bireyden EDTA'lı, tüpe 10 ml kan alındı. DNA'ları izole edilip -30 °C'de saklandı.

2.1.2. Kimyasallar

Çalışmamızda kullanılan kimyasal maddeler, kitler ve sarf malzemeleri değişik firmalardan temin edildi.

Tris baz (Tris-base) (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Appllichem, A2264.1000
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merk, 1.06462
Sodyum klorür (NaCl)	Merk, 1.01540.0500
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Merk,
Hidroklorik asit (HCl)	Merk, 1.00314.2500
Ksilen siyanol (C ₂₅ H ₂₇ N ₂ O ₆ S ₂ Na)	Merk, 1.12007.2500
Bromfenol mavisi (C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S)	Merk, 1.08122.0005
Tris hidroklorit (C ₄ H ₁₂ ClNO ₃)	Merk, 1.01547.0100
Borik asit (H ₃ BO ₃)	Merk, 1.00160.
Etil alkol (C ₂ H ₅ OH)	Tekel, Türkiye
Gliserol (%99)	Sigma, G-7757
Amonyum persülfat ((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	Sigma, A9164
Agaroz	Sigma, A-0169
İzopropanol (% 100)	Sigma I-9516
Etidyum bromit (C ₁₂ H ₂₀ N ₃ Br)	Sigma, E-7637
Etilen diamintetra-asetik asit (EDTA)	Sigma, E-5134
Sodyum tiyosulfat (Na ₂ S ₂ O ₃)	Sigma, S-1648
Proteinaz K	Promega, V3021
Deoksi nükleotit trifosfat (dNTP)	Promega, U1240
Oligonükleotit primerleri	Promega
Taq DNA Polimeraz	Promega, M1661
φX174 DNA/Hinf I Marker	Promega, E3511
Ammonyum asetat (NH ₄ C ₂ H ₃ O ₂)	Sigma, A-1542
Sitokin gen primerleri	Protrans

2.1.3. Gereçler

Çalışmada kullanılan araç ve gereçler değişik firmalardan sağlandı.

<u>Cihazlar</u>	<u>Marka</u>
Termo saykıl	Techne Genius, İngiltere
Otomatik pipet seti	Rainin, ABD
Epondorf tüpler	Axygene, ABD
Yatay elektroforez düzeneği	EC-250-90
Doğru akım güç kaynağı (250 volt)	EC-250-90
Yüksek devirli santrifüj	Hettich, Almanya
Vorteks	Nüve NM110, Türkiye
Ultraviyole transillüminatör	Vilbert Lourmat, Fransa
Polaroid kamera	Gel Cam, İngiltere
Polaroid kamera filmleri	Sigma, ABD
Spektrofotometre	Beckman/Coulter, ABD
Hassas terazi	Sartorius, Almanya
pH metre	Hanna, Portekiz
Manyetik karıştırıcı	IKA, USA
Deiyonize su sağlayıcı	Barnstead, ABD
Buz makinesi	Scotman, İngiltere
Mikrodalga fırın	Beko, Türkiye
Distile su cihazı	Şimşek labor teknik, Türkiye
Pastör fırını	Nüve, Türkiye
Etüv	Memmert, Almanya
Otoklav	Medexport, Rusya
Derin dondurucu (-35)	Arçelik, Türkiye
Buz dolabı	Arçelik, Türkiye
Laminar air flow	Powtech, Türkiye

2.1.4. Solüsyonlar

2.1.4.1. DNA izolasyon solüsyonları

1. Nuclei Lizis Tamponu (pH 8.2)

10 mM Tris base, =(1.21 g Tris base)

400 mM NaCl, = (23.4 g NaCl)

2 mM Na₂EDTA =(0.74 g Na₂EDTA)

2. Proteinaz K seyreltme tamponu (pH 8.0)

0.05 M Tris HCl = (0.788 g Tris HCl)

1 mM CaCl₂ = (0.011 g CaCl₂)

3. Proteinaz K çözeltisi (10 mg/ml)

100 mg Proteinaz K

10 ml Proteinaz K seyreltme tamponu

4. %10'luk (w/v) sodyum dodesil sülfat (SDS, 100 ml)

10 g SDS

5. Amonyum asetat (9 M, 100 ml)

74 g amonyum asetat

6. 0.1M Na₂ EDTA (pH 8.0, 1 L)

37,22 g Na₂ EDTA

7. 1M Tris-HCl (pH 7.4, 1 L)

157.6 g Tris-HCl

8. TE Tamponu (Tris-EDTA, pH 8.0, 500 ml)

10 mM Tris HCl

1 mM Na₂EDTA

9. 5X Retikülosit Salin Çözeltisi (1L)

Nacl : 40,1 g

KCl : 1, 8 g

MgCl₂.6H₂O : 7,15 g**2.1.4.2. Agaroz Jel Elektroforezi Solüsyonları****1. TBE elektroforez tamponu (Tris-borik asit-EDTA, (pH ~8.0)**

108 g Tris baz

55 g Borik asit

40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

1X çalışma solüsyonu

89 mM Tris baz

89 mM Borik asit

2 mM EDTA

2. TAE elektroforez tamponu (pH 8.5, 1 L)

242 g Tris base

37,2 g Na₂EDTA·2H₂O

57,1 ml Glacial asetik asit

TAE-1X çalışma solüsyonu:

40 mM Tris asetat

2 mM EDTA

3. Etidium bromide solüsyonu (10mg/ml)**4. Non-denatüre yükleme tamponu**

% 50 (w/v) Sükroz

% 0,1 (w/v) Bromfenol mavisi

% 0,1 (w/v) Xylene cyanole

50 mM Na₂ EDTA (pH: 8)

2.2. Metotlar

Çalışmamızda öncelikle 2001 yılında CARD15/NOD2 geni üzerinde tanımlanan 3020 insC mutasyonu analizi için ve 6. kromozomun üzerinde bulunan MHC geninin klas III bölgesindeki sitokin gen polimorfizmlerinin belirlenmesi amacıyla hastalardan ve kontrol grubundan 8 ml periferel kan örnekleri alınarak DNA izolasyonu yapıldı.

2.2.1. Periferel Kandan DNA İzolasyonu (Salting – Out Yöntemi)

1. Hastalardan ve kontrol grubundan alınan 8 ml. EDTA'lı tam kan 2500 x g'de 15 dakika santrifüj edilip, plazması ayrıştırıldı.

2. Elde edilen çökelti 50 ml'lik plastik tüplere aktararak 1X Retikülosit salin çözeltisi ile düşük hız santrifüjde 2500 x g'de +4 °C de üçer kez yıkandı, süpernatant atıldı.

3. Çökeltiye, soğuk parçalayıcı (Lizat) çözelti eklenerek 15 dakika soğukta buz içinde bekletildi. Sonra bir ya da iki kez 2500 x g'de 15 dakika santrifüj edildi.

4. Eritrositi patlamış olan materyalin süpernatantı atıldı. Çökeltiye bu kez (10 ml tam kan için) 20 ml soğuk STE çözeltisi, 1/20 olacak şekilde % 10'luk sodyum dodesil sülfat (SDS, yaklaşık 1 ml) ve 100 µg/ml olacak şekilde (yaklaşık 200 µl) Proteinaz K ilave edildi. Hafifçe karıştırılıp, su banyosunda +37 °C'de bir gece bekletildi. Ertesi gün gelindiğinde hala tüpteki materyal homojen değilse karıştırılarak homojen oluncaya dek su banyosunda bekletildi.

5. Homojen tüp materyaline, kendisi kadar doymuş fenol eklenir. 2500 x g'de +4 °C'de 15 dakika santrifüj edildi.

6. Üst faz başka bir tüpe alarak bu işlem bir kez daha tekrarlandı. Üst faz alındı.

7. Bu aşamada fenol, kloroform, izoamil alkol, 25:24:1 karışımından, kendisi kadar ilave edildi. 2500 g'de 15 dakika bir kez daha santrifüj edildi.

8. Üst faz dikkatlice bir erlendeki soğuk saf etanoia aktarıldı (Alttan fenol alınmaması önemlidir) DNA çökünceye kadar yavaşça karıştırıldı. Birkaç dakika içinde DNA çökertildi.

9. İpliksi görünüm alan DNA, pastör pipeti yardımı ile steril bir ependorf tüpüne aktarıldı. Ependorf tüpünde DNA % 70'lik etanol ile yıkandı. DNA, santrifüj edildi ve içindeki alkol uçuruldu.

10. Bu şekilde yıkanan, steril DNA, genellikle 1 ml steril TE tamponunda çözüldü.

11. Bu aşamada da elde edilen DNA'nın derişimi hesaplandı. 20 µl DNA, 980 µl'ye dabil distile su ile 1 ml seyreltildi ve 260 nm dalga boyunda Shimadzu spektrofotometrede optik yoğunluğu okundu (Rapley, vd., 2000).

2.2.2. DNA'nın Spektrofotometrede Konsantrasyonunun Ölçümü

İzole edilen DNA'ların 1/50 dilüsyonları hazırlandı ve 260 nm dalga boyundaki absorban değerleri okundu. 1 OD'nin 50 ng/µl DNA miktarına eşitliğinden gidilerek 260 nm dalga boyunda okunan absorban değerlerinden, örneklerdeki DNA konsantrasyonu hesaplandı. Polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) kullanılmak üzere DNA'lar steril deiyonize su ile 50 ng/µl olacak şekilde sulandırıldı.

2.2.3. İBH'da CARD15/NOD2 Geni 3020 insC Mutasyonunun Analizi (Allel Spesifik Multipleks PCR)

Kary Mullis tarafından 1986'da geliştirilmiş olan polimeraz zincir reaksiyonu, bir DNA dizisinin tamamen in vitro koşullarda oluşturulan kimyasal reaksiyonlar ile istenilen miktarlarda çoğaltılmasını sağlar (Mullis, vd., 1986). Bu metot ilk önce insan DNA dizileri için kullanılmıştır ve daha sonraları ökaryotik ve prokaryotik genomların analizi için bakteriyel vektörlerin (plazmit vs.) klonlanmasında alternatif bir yöntem olarak geniş uygulama alanı bulmuştur. PCR yöntemi saflaştırılmış çok küçük genomik DNA parçalarını bile kullanarak istenilen miktarda yeni DNA oluşturulmasına olanak sağlar. Örneğin; PCR amplifikasyonu için ağız çalkalaması sonucu ortama düşen bukkal mukoza hücreleri, tek bir saç teli, tek bir spermium, tek bir lenfosit, fikse edilmiş patolojik örnekler, kurumuş kan damlaları, yeni doğan taramalarında kullanılan Guthrie kartlarına kadar değişik kaynaklı pek çok materyal yeterli olabilmektedir. Dezavantajı ise amplifiye edilmek istenen DNA parçasının her ucu için spesifik bir proba gereksinim olmasıdır. Bir diğer önemli sorun ise ekzojen orjinli DNA parçalarının karışması sonucu yanlış sonuçların görülmesi olasılığıdır. Bu yüzden reaksiyon ortamının çok iyi kontrol edilmesi gereklidir.

Allel spesifik multipleks PCR herhangi bir restriksiyon enzimi kesme bölgesi değişimine neden olmayan nokta mutasyonlarının tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Yöntemin temeli, mutasyonun bulunduğu bölgeye özgü, ya da bir

başka deyişle, allele özgü “primer” kullanmaya dayanmaktadır. Ayrıca, amplifikasyonun kontrolü için hem normal hem de mutasyonlu bireylerde bant veren kontrol bölgeye ait bir çiftten fazla primer kullanılır. İncelenen örnek mutasyonu taşıyorsa, hem kontrol bölge hem de mutasyona özgü bölgede PCR ürünü oluşur ve jel elektroforezi ile varlığı kolaylıkla saptanabilir. İncelenen örnek mutasyonu taşımıyor ise, sadece kontrol bölgede PCR ürünü oluşur. Heterozigot bireylerde, allellerden birinde mevcut olan mutasyon sebebi ile amplifikasyon sonucu mutasyona özgü PCR ürünü oluşur. Böyle bir mutasyon için fenotipik olarak hasta olan çocuğun ebeveyninin taşıyıcı olduğu anlaşılır (Mullis, vd, 1986; Ogura, vd., 2001a; Linde, vd., 2003).

Araştırmalarımızda öncelikle 2001 yılında CARD15/ NOD2 geni üzerinde tespit edilen 3020 insC mutasyonunun allel spesifik multipleks PCR metodu ile analiz edebilmek için gerekli olan ve aşağıda tabloda verilen oligonükleotit primerleri Promega firmasından sipariş verilerek satın alındı. PCR koşulları belirlenerek master mikslere hazırlandı. Hazırlanan master mikslere alikotlara bölünerek -30 °C’de saklandı. Hastaların DNA örneklerinden uygun konsantrasyonda 2 µl master mikslere eklenerek (Tablo 6) termo cycle cihazında [1X: 94°C (5 dak); 35X: 94°C (30 s), 60°C(30 s), 72°C (1 dak); 1X: 72°C 10 dak] siklusa tabi tutuldu. Amplifiye edilen PCR ürünlerinin elektroforezde yürütülmesi için 1X TBE tamponlu %2’lik agaroz jel hazırlandı. Örnekler yükleme tamponuyla karıştırılıp (2 µl yükleme tamponu + 10 µl PCR ürünü) jelle yüklenerek 1X TBE’li tampon ortamında, 70V, 55A’de 60 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Sonuçlar UV transilluminatörde değerlendirilerek polaroid kamera ile fotoğraflandı. Mutasyon çeşidinin homozigot ya da heterozigotluğunun ayrımı ise elektroforez jellerindeki PCR ürünlerinin büyüklüğüne göre moleküler markırlar kullanılarak tespit edildi.

2.2.3.1. CARD15/NOD2 Geni 3020insC Mutasyonunun Kontrol Grubunda Taranması

Kontrol gruplarında mutasyon taramasında sağlıklı bireylerden rastgele seçimle yapılarak kan örnekleri alınarak DNA’ları izole edildi. Mutasyon taramaları ise inflamatuvar bağırsak hastalarında CARD15/NOD2 geni analizlerinde gerçekleştirilen metot ve yöntemlerin aynısı uygulandı. Tablo. 6’daki PCR amplifikasyon koşulları sağlandı. Sonuçlar UV transilluminatörde değerlendirilerek jeller fotoğraflandı (Şekil 4).

Tablo 6. CARD15/NOD2 geni 3020 insC mutasyonunu belirlemek için kullanılan alel spesifik primerleri ve PCR reaksiyonunun bileşenleri (25 µl)

Stok Konsantrasyonu	Final Konsantrasyon	Toplam 25 µl	Primer Sekansı (5'-3')
10xPCR tamponu	1X	5,0 µl	
25 mM mgCl ₂	2.5 mM	1.5 µl	
25 mM dNTP Mix	0.2 mM	1.5 µl	
Kontrol-F (100 µM)	0.25 µM	1.5 µl	5'.GTGAGCCTTTGTTGATGAGC.3'
Kontrol-R (100 µM)	1 µM	1.5 µl	5'. TCTTCAACCACATCCCCATT. 3'
Allel-spesifik(wt)-F (100 µM)	1 µM	1.5 µl	5'.CAGAAGCCCTCCTGCAGGCCCT.3'
Allel-spesifik(insC)-R (100 µM)	0.25 µM	1.5 µl	5'. CGCGTGTCATTTCCTTTCATGGGGC. 3'
Taq Pol (5U/µl)	0.03 U/µl	1.0 µl	
Genomic DNA		2.0 µl	
Steril Saf Su		8.0 µl	

Döngü Parametreleri: 1X: 94°C (2 dak); 35X: 94°C (30 s), 60°C(30 s), 72°C (1 dak); 1X: 72°C 10 dak

2.2.4. Sitokin Gen Polimorfizmlerinin (PCR-SSP) Metodu ile Belirlenmesi

PCR-SSP, tek bir baz çifti dahil olmak üzere genetik değişkenlikleri tesbit edebilecek çok güçlü bir tekniktir. Bu tekniğin temeli PCR reaksiyonunda 3' ucunda birkaç uyumsuzluğu olan primerler yerine, tam uyumlu primerlerin kullanılması temeline dayanır. Bir primer çiftinin iki primeri aynı kromozomda lokalize olan uyumlu dizilerin motiflerini bulduğu zaman amplifikasyon gerçekleşeceği için bu tekniğin rezolüsyonu çok yüksektir. Aynı zamanda en hızlı genomik tipleme yöntemidir. Çünkü bu teknikte amplifikasyon sonrası aşamada, amplifikasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği, agaroz jel elektroforezi ile

kolayca saptanabilir. PCR-SSP ile HLA doku tiplendirmeleri ve bazı polimorfik genlerdeki mutasyonlar taranmaktadır (Perrey, vd., 1998; Hutchinson, vd., 1998).

2.2.4.1. İBH'da Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Belirlenmesi (PCR-SSP)

Sitokin gen polimorfizmlerinin tespiti için Protrans firmasından temin edilen PCR-SSP sitokin gen paneli 13 farklı sitokinin 22 polimorfik çeşidinin tespitinde kullanıldı. Protrans sitokin gen paneli 3 farklı alt bileşenden [a) oligonükleotid primerleri emdirilmiş 96'lı pleytler, b) R tamponu ve c) Y tamponu] meydana gelmektedir (Tablo 7). Sistemin kullanımı benzer yöntemlere göre daha avantajlıdır. Her bir hastanın PCR-SSP amplifikasyonu için 521,3 µl toplam hacmi olan master- miks ve DNA karışımı [Buffer R 138 µl, Buffer Y 280 µl, Genomik DNA (50-300 ng/µl) veya 100 µl ve Taq Pol. (5U/µl): 3,3 µl] hazırlandı. Hazırlanan mastır mikslar hafifçe vortekste karıştırıldı ve her bir hasta için pleytlerdeki 48 kuyucuğa 10'ar µl paylaştırıldı. Tablo 8'de verilen PCR döngü programında amplifiye edildi. Amplifiye edilen PCR ürünlerinin elektroforezde yürütülmesi için 1XTBE tamponlu %2'lik agaroz jel hazırlandı. Örnekler, her bir hasta için 48 kuyucuk, 2 hasta için toplam 96 kuyucuk sistemine sahip jele yüklenerek 1X TBE'li tampon ortamında, 75V, 50A'de 35 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Sonuçlar UV transilluminatörde değerlendirilmesinde her bir kuyucukta bulunan pozitif kontrollerin çalışıp çalışmadığı kontrol edilerek çift bant gösteren kuyucuklar pozitif kabul edildi ve polaroid kamera ile fotoğraflandı (Şekil 4). Protrans sitokin 2 cyclus pleyt sistem analiz cetvelinde bulunan 48 primerler kontrol gruplarıyla kıyaslanarak hastaların hangi sitokin polimorfizmlerinde değişimlerin seviyeleri saptandı (Lechler, vd. , 2000; Perrey, vd., 1998). Tablo 7 - 8 mastır miks bileşenleri ve PCR döngüsü programı verildi.

2.2.4.2. Kontrol Gruplarında Sitokin Gen Polimorfizimlerinin Belirlenmesi

Kontrol grubu 50 sağlıklı birey popülasyonundan rastgele seçilerek , EDTA'lı tüplere 8 ml kanları alındı. DNA'ları izole edildi. İnflamatuar bağırsak hastalarında sitokin gen polimorfizmlerinin tanımlanmasında kullanılan aynı metotla polimorfizmler tayin edildi.

Tablo 7. Sitokin genleri analizinde bir hasta için gerekli mastermiks'in miktarı.

Buffer R	138 µl
Buffer Y	280 µl
DNA (50-300 ng/ µ l)	100 µl
Tag Pol. (5u/ µl)	3,3 µl
Toplam hacim	521.3 µl

Hazırlanan bu master miks nazikçe karıştırılır ve 48 kuyucuğa 10' µl paylaşılır.

Tablo 8. Sitokin genleri için PCR döngü programı

Başlangıç denatürasyonu	94°C	2 dakika	10 siklus
Denatürasyon	94°C	10 saniye	
Annealing-extansiyon	65°C	1 dakika	
Denatürasyon	94°C	10 saniye	30 siklus
Annealing	61°C	50 saniye	
Extansiyon	72°C	30 saniye	
Hold	4°C	Süresiz	

2.3. İstatistik Analizler

Sitokin gen polimorfizmlerinin istatistik analizi (Statistical package for social science: SPSS Windows 9.0) programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki istatistik önemlilik Pearson'ın düzeltilmiş Ki- kare ve Fisher'in kesin Ki- kare testleri kullanılarak hesaplandı. Kontrol grupları ile hastaların istatistiki karşılaştırmalarında önem düzeyi (α : 0.05 seçilerek hesaplamalar yapıldı . Buna göre adı geçen testlerden uygun olan seçilerek dört gözlü çapraz tablolar oluşturuldu ve kontrol gruplarıyla hasta gruplarının karşılaştırmalı istatistik olasılık düzeyleri (P) hesaplandı.

Tablo 9. Protrans sitokin gen polimorfizmi analiz cetveli

1. Pleyt	2. Pleyt	Sitokin Geni	Allelik özellik	Allel	Baz uzunluğu
1	49	IL-1 α	T at pos -889	T	220
2	50	IL-1 α	C at pos -889	C	220
3	51	IL-1 β	C at pos -511	C	220
4	52	IL-1	T at pos -511	T	220
5	53	IL-1	T at pos +3962	T	340
6	54	IL-1 β	C at pos +3962	C	340
7	55	IL-1R	C at pos mpst 11970	C	290
8	56	IL-1R	T at pos mpst 11970	T	290
9	57	IL-1R	T at pos mspa111100	T	300
10	58	IL-1R	C at pos mspa111100	C	300
11	59	IL-4RA	G at pos +1902	G	140
12	60	IL-4RA	A at pos +1902	A	140
13	61	IL-12	C at pos 1188	C	800
14	62	IL-12	A at pos 1188	A	800
15	63	IFN- γ	A at pos UTR5644	A	280
16	64	IFN- γ	T at pos UTR5644	T	280
17	65	TGF- β	C at pos kodon 10	Cg	80
18	66	TGF-	C at pos kodon 10	CC	80
19	67	TGF- β	T at pos kodon 10	Tg	80
20	68	TGF- β	T At pos kodon 10	TC	80
21	69	TGF- β	C at pos kodon 10	C	200
22	70	TGF- β	T at pos kodon 10	T	200
23	71	TNF- α	T at pos -308	Gg	110
24	72	TNF- α	A at pos -308	Ag	110

Tablo 9'un devamı

1. Pleyt	2. Pleyt	Sitokin Geni	Allelik özellik	Allel	Baz uzunluğu
25	73	TNF- α	G at pos -308	gA	110
26	74	TNF- α	A at pos -308	AA	110
27	75	IL-2	T at pos -330	Tg	570
28	76	IL-2	G at pos -330	gg	570
29	77	IL-2	G at pos 166	GT	570
30	78	IL-2	T at pos 166	TT	570
31	79	IL-4	T at pos -1098	TT	560
32	80	IL-4	T at pos -1098	TC	560
33	81	IL-4	G at pos -1098	gT	560
34	82	IL-4	G at pos -1098	gC	560
35	83	IL-4	T at pos -590	TT	610
36	84	IL-4	T at pos -590	TC	610
37	85	IL-4	C at pos -590	CT	610
38	86	IL-4	C at pos -590	CC	610
39	87	IL-6	G at pos -174	gg	430
40	88	IL-6	C at pos -174	Cg	430
41	89	IL-6	G at pos nt565	gA	430
42	90	IL-6	C at pos nt565	CA	430
43	91	IL-10	G at pos -1082	gC	300
44	92	IL-10	G at pos -1082	gC	300
45	93	IL-10	G at pos -819	AC	300
46	94	IL-10	A at pos -819	AT	300
47	95	IL-10	A at pos -592	AC	300
48	96	IL-10	A at pos -592	AA	300

3. BULGULAR

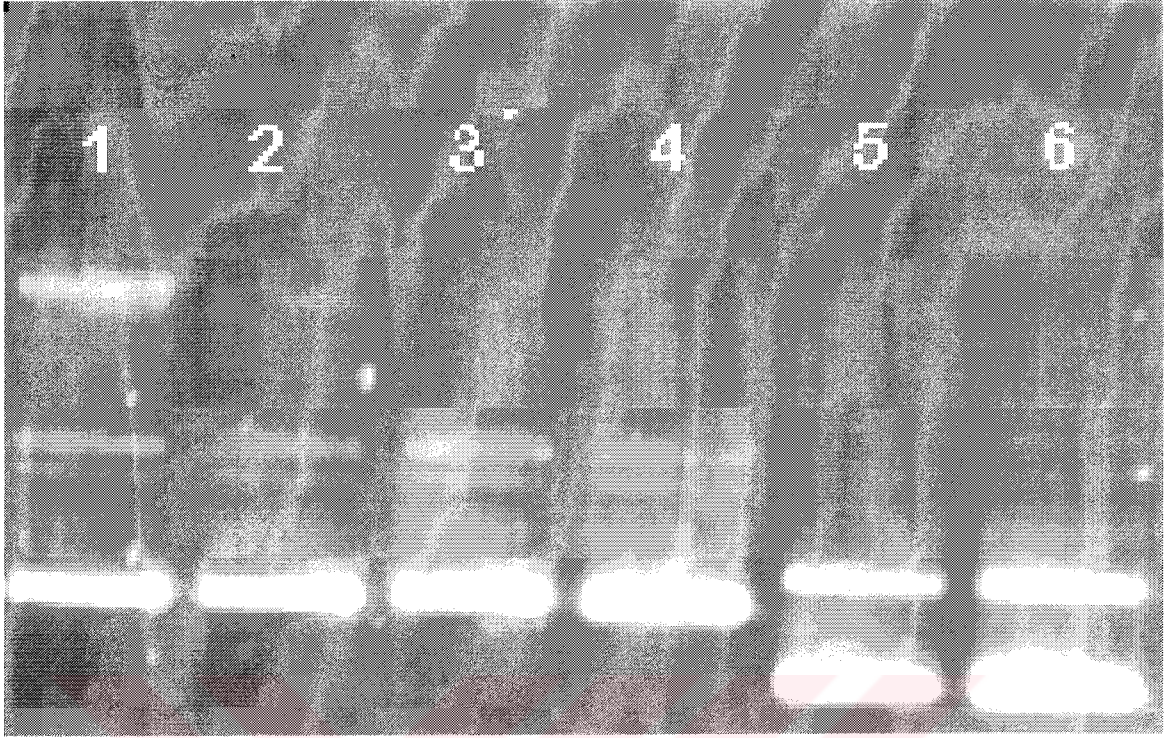
Çalışmamızda İstanbul, Kocaeli ve Trabzon'da polikliniklere müracat eden 69 inflamatuvar bağırsak hastasının klinik ve fizik muayenelerini uzman hekimler tarafından yapıldı. Tetkiklerin sonuçlarına göre; 18 olgunun Crohn hastası, 51 olgunun da ülseratif kolit olduğu uzman hekimlerce tespit edildi. Çalışmaya dahil edilen 69 hastanın 34 tanesi erkek 35 tanesi kadın yaş ortalamaları 39 olup hastaların 18 tanesi Crohn hastası (10 erkek, 8 i kadın) ve hastaların 51 tanesi Ülseratif Kolit (24 erkek, 27 kadın)'dı (Tablo 10).

Tablo 10. İnflamatuvar bağırsak hastaları ve kontrol grubunun demografik dağılımları

Hastalık adı	Yaş ort.	Cinsiyeti erkek	Cinsiyeti kadın	Toplam
Kontrol	36	23	27	50
Crohn	37	10	8	18
ÜK	39	24	27	51
IBD (Genel)	39	34	35	69

3.1. CARD15/NOD2 3020 insC Mutasyonu ile İlgili Bulgular

Çalışma kapsamında 69 İBH'nin ve 50 sağlıklı kontrol gruplarının DNA örneklerinden CARD15/NOD2 geni 3020 insC mutasyonu allel spesifik multipleks PCR yöntemi kullanıldı. Ülseratif Kolitli hastaların 13 tanesinde CARD15/NOD2 3020 insC mutasyonu heterozigot olarak tespit edildi. Crohn hastalarının ise, 7 tanesinde CARD15/NOD2 3020 insC mutasyonu heterozigot olarak tesbit edildi. Çalışmaya, sağlıklı 23 erkek, 27 kadın oluşan 50 kontrol grubu dahil edildi. Kontrol gruplarının 2'sinde mutasyon heterozigot olarak tespit edildi. Gerek hasta grubunda gerekse kontrollerde CARD/15 NOD2 insC mutasyonuna homozigot olarak rastlanmadı (Şekil 4, Tablo 11).



Şekil 4. İBH'de CARD15/NOD2 3020insC mutasyonunun jel görünümü
(1-4 Normal 5,6 Heterozigot)

Tablo 11. İnflamatuvar bağırsak hastalarında CARD15/NOD2 3020 insC mutasyon analizi sonuçları

	Klinik vaka (n)	CARD15/NOD2 3020insC Mut. Negatif Sayısı	CARD15/ NOD2 3020insC Mut. Pozitif Sayısı	Heterozigot Allel Frekansı
Kontrol	50	48	2	2/50: %4
Crohn	18	11	7	7/18: %38
ÜK	51	38	13	13/51: %25
IBD (Genel)	69	49	20	20/69: %28,9

3.2. Sitokin Gen Polimorfizmi ile İlgili Bulgular

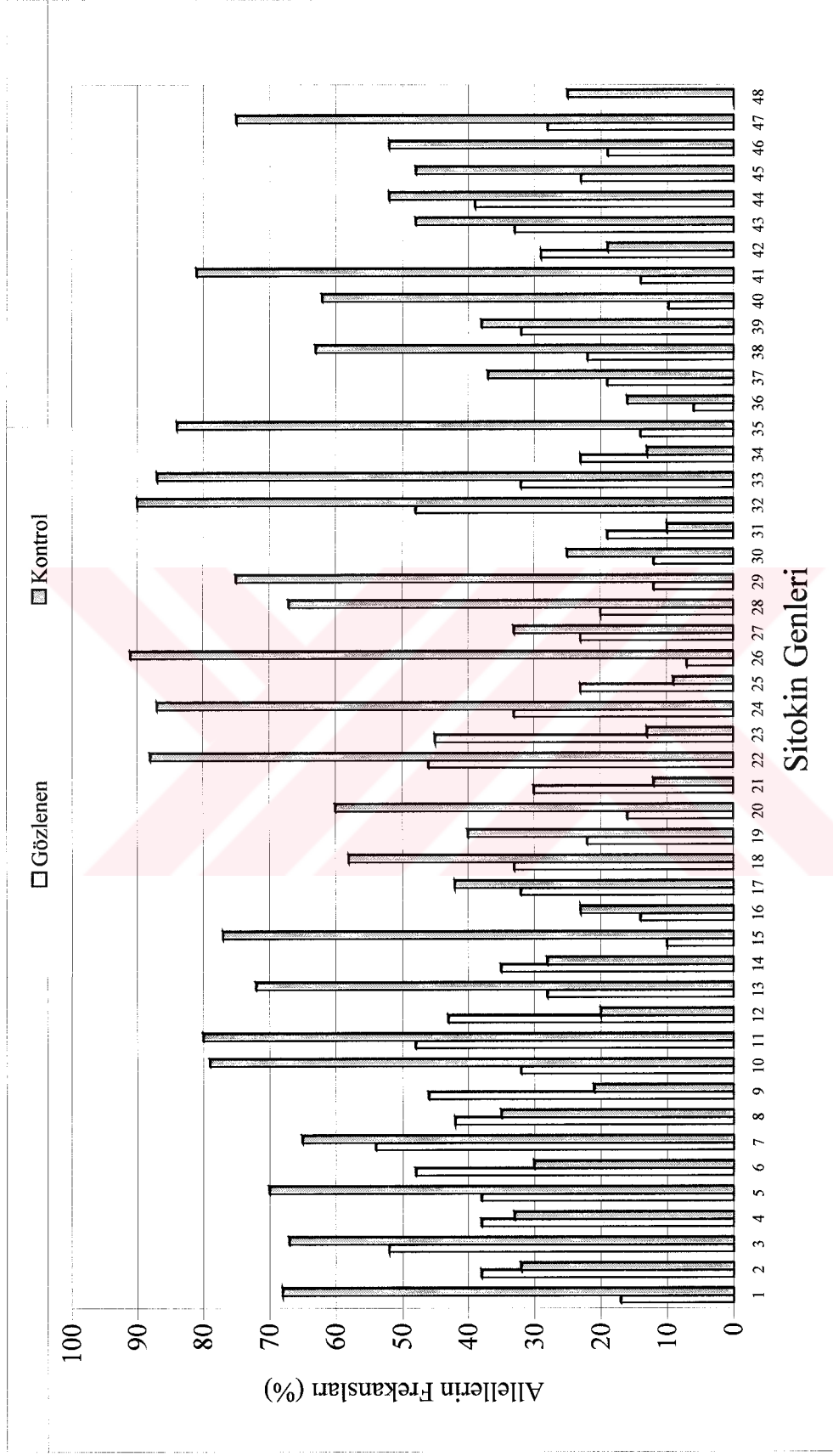
Hastaların ve kontrollerin DNA örneklerinde 13 farklı sitokin geninin 22 farklı polimorfizmi 48 gen primeri hazır pleytler kullanılarak, PCR-SSP yöntemiyle çalışılması sonucunda elde edilen bulgular verilmiştir.

3.2.1.İBH'da Sitokin Gen Polimorfizmi ile İlgili Bulgular

Atmış dokuz İBH'de sitokin gen polimorfizmlerinde **IL 1 RA** mspa 111100T, **IL 4RA +1902A**, **TGF β** kodon 10C ve **TNF α -308G** kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artma gözlemlendi ($p < 0.05$). **IL 1 α -889T**, **IL β +3962T**, **IL 1RA** mspa 111100T, **IL 4RA +1902G**, **IL 12 -1188C**, **IFN γ UTR 5644A**, **TGF β** kodon 10C, **TGF β** kodon 10T, **TGF β** kodon 10T, **TNF α -308A**, **TNF α -308G**, **IL 2 -330G**, **IL 2 166T**, **IL 4 -1098T**, **IL 4 -1098G**, **IL 4 -590 T**, **IL 4 -590 C**, **IL 6 -174 C**, **IL 6 nt565 G**, **IL 10 -819A**, **IL 10 -819A** , **IL 10 -592A** ve **IL 10 -592 A** azalma gözlemlendi ($p < 0.05$). Diğer polimorfizmlerde ise, kontrol gruplarına göre anlamlı bir istatistiksel değişim gözlenmedi. Çalışmamızda kullandığımız 48 gen primeri içeren pleytin tamamı değerlendirildiğinde, sitokin gen polimorfizimleri değişimleri % 56 ve bunlardan % 48'i kontrollere göre azalma; % 8 'nin ise artma olduğu gözlemlendi (Tablo 12 ve 13).

Tablo 12. Sitokin pleytlerinde bulunan gen primerlerinin içeriği

1	IL-1α -889 T	17	TGF-β kodon 10 C	33	IL-4-1098G
2	IL-1β -889 C	18	TGF-β kodon 10 C	34	IL-4-1098G
3	IL-1β -511 C	19	TGF-β kodon 10 T	35	IL-4-590T
4	IL-1 -511T	20	TGF-β kodon 10 T	36	IL-4-590T
5	IL-1 +3962 T	21	TGF-β kodon 10 C	37	IL-4-590C
6	IL-1β +3962 C	22	TGF-β kodon 10T	38	IL-4-590C
7	IL-1R mpst 11970 C	23	TNF-α-308G	39	IL-6-174G
8	IL-1R mpst 11970T	24	TNF-α-308A	40	IL-6-174C
9	IL-1R mspa111100T	25	TNF-α-308G	41	IL-6 nt565G
10	IL-1R mspa111100C	26	TNF-α-308A	42	IL-6 nt565C
11	IL-4RA +1902G	27	IL-2-330T	43	IL-10-1082G
12	IL-4RA +1902A	28	IL-2-330G	44	IL-10-1082G
13	IL-12 1188C	29	IL-2166G	45	IL-10-819A
14	IL-12 1188A	30	IL-2166T	46	IL-10-819A
15	IFN-γ UTR5644A	31	IL-4-1098T	47	IL-10-592A
16	IFN-γ UTR5644T	32	IL-4-1098T	48	IL-10-592A



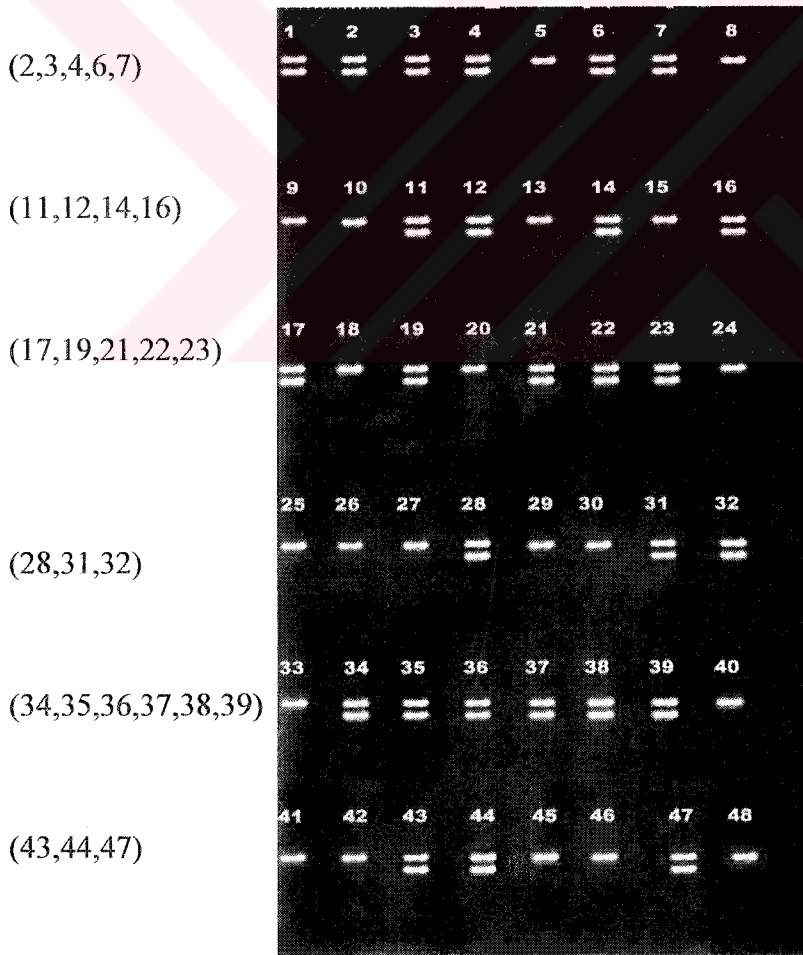
Şekil 5.İBH' de ve kontrol grubunda sitokin polimorfizm allelik frekansları

Tablo 13. İBH ve kontrol grubunun karşılaştırılmasıyla elde edilen istatistiksel parametreler

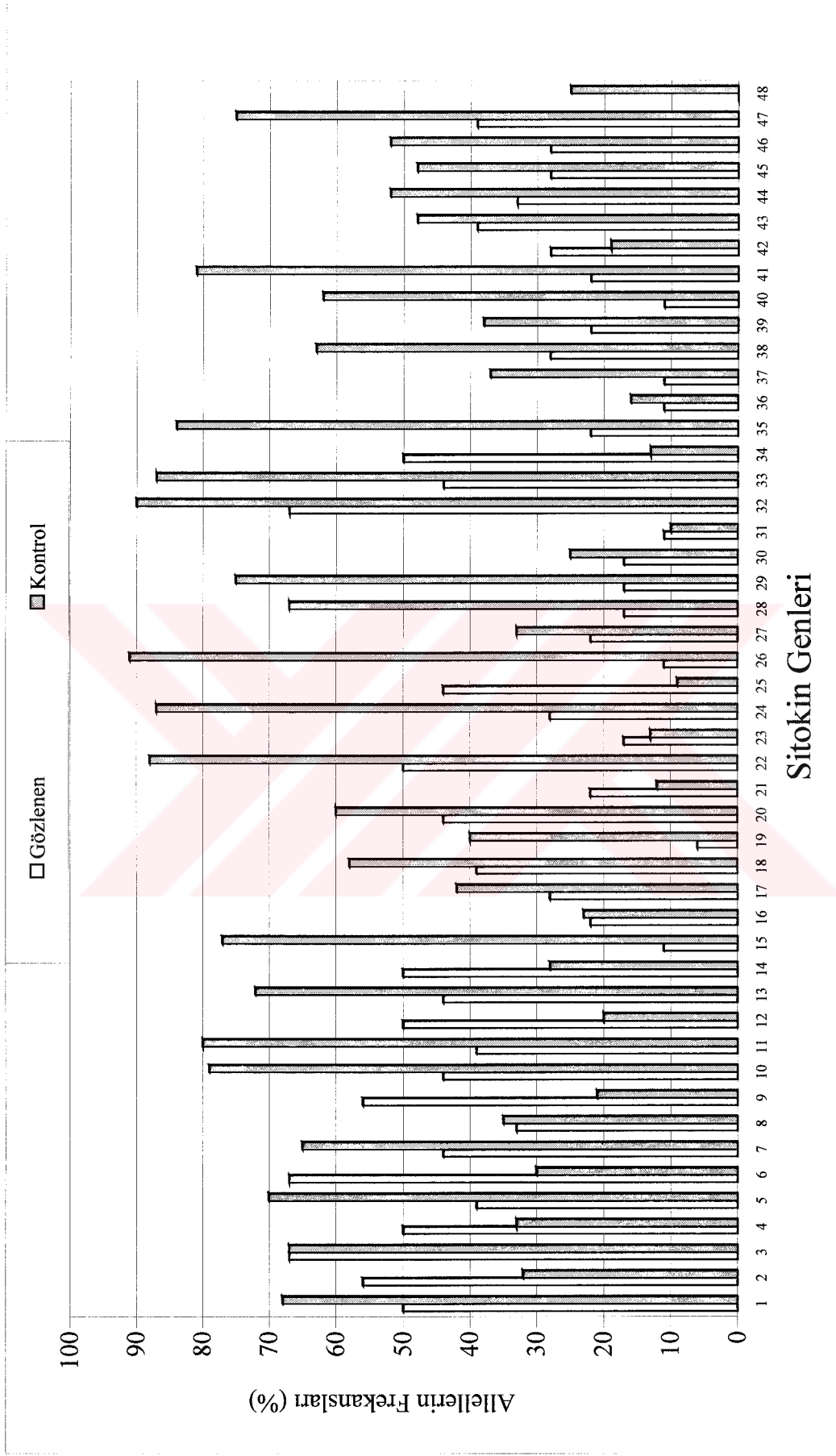
	sitokin gen	Pozisyon	Allel	bp	Kontrol	IBH	Ki-kare	Fişher	P değeri	Sonuç
1	IL-1 α	-889	T	220	68	17	29.2		0.00	azalma
2			C	220	32	38	0.199		0.656	farksız
3	IL-1 β	-511	C	220	67	52	2.38		0.123	farksız
4			T	220	33	38	0.199		0.656	farksız
5		+3962	T	340	70	38	10.861		0.001	azalma
6			C	340	30	48	3.123		0.077	farksız
7	IL-1R	pst11970	C	290	65	37	0.851		0.345	farksız
8			T	290	35	42	0.225		0.635	farksız
9	IL-1RA	mspa111100	T	300	21	46	7.715		0.005	yükselme
10			C	300	79	32	25.002		0.000	azalma
11	IL-4RA	+1902	G	140	80	48	11.335		0.001	azalma
12			A	140	20	43	6.148		0.013	artma
13	IL-12	-1188	C	800	72	28	21.305		0.000	azalma
14			A	800	28	35	0.341		0.559	farksız
15	IFN- γ	UTR5644	A	280	77	10	53.467		0.000	azalma
16			T	280	23	14	1.165		0.280	farksız
17	TGF- β	kodon 10	C	80	42	32	0.885		0.347	farksız
18			C	80	58	33	6.202		0.013	azalma
19		kodon 10	T	80	40	22	2.012		0.156	farksız
20			T	80	60	16	23.007		0.000	azalma
21		kodon 10	C	200	12	30	4.615		0.032	artma
22			T	200	88	46	19.999		0.000	azalma
23	TNF- α	-308	G	110	13	45	11.375		0.001	artma
24			A	110	87	33	30.458		0.000	azalma
25		-308	G	110	9	23	3.759		0.053	farksız
26			A	110	91	7	81.611		0.000	azalma
27	IL-2	-330	T	570	33	23	0.741		0.389	farksız
28			G	570	67	20	25.547		0.000	azalma
29	IL-2	166	G	570	75	12	45.397		0.000	azalma
30			T	570	25	12	3.208		0.073	farksız
31	IL-4	-1098	T	560	10	19	1.144		0.285	farksız
32			T	560	90	48	21.004		0.000	azalma
33		-1098	G	560	87	32	32.105		0.000	azalma
34			G	560	13	32	1.036		0.000	farksız
35	IL-4	-590	T	610	84	14	54.141		0.000	azalma
36			T	610	16	6	2.298		0.130	farksız
37		-590	C	610	37	19	3.585		0.058	farksız
38			C	610	63	22	19.935		0.000	azalma
39	IL-6	-174	G	430	38	32	0.248		0.619	farksız
40			C	430	62	10	33.520		0.000	azalma
41		nt565	G	430	81	14	48.412		0.000	azalma
42			C	430	19	20	0.000		1.000	farksız
43	IL-10	-1082	G	300	48	33	2.032		0.135	farksız
44			G	300	52	39	1.458		0.227	farksız
45		-819	A	300	48	23	6.925		0.009	azalma
46			A	300	52	19	13.003		0.000	azalma
47		-592	A	300	75	28	23.292		0.000	azalma
48			A	300	25	00	17.757		0.000	azalma

3.2.2. Crohn Hastalarında Sitokin Gen Polimorfizmi ile İlgili Bulgular

On sekiz Crohn hastasında sitokin gen polimorfizmlerinde IL-4 -1098T, IL-4RA +1902 ve TNF- α 308A; kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı bir artma gözlemlendi ($p < 0.05$). IL-1 β +3962C, IL-1R mspa111100T, IL-4RA +1902A, IFN UTR5644A, TGF- β kodon 10G , TGF- β kodon 10T , TNF- α 308A, TNF- α 308G, IL-2-330G , IL-2 166G , IL-4 -1098G , IL-4 -590T , IL-4 -590C , IL-6 -174G , IL-6 nt565A , IL-10 19C , IL-10 -819T ve IL-10 592A, azalma gözlemlendi ($p < 0.05$). Diğer polimorfimlerde ise kontrol gruplarına göre anlamlı bir istatistiksel değişim gözlenmedi. Çalışmamızda kullandığımız 48 gen primeri içeren pleytin tamamı değerlendirildiğinde, sitokin gen polimorfizimleri değişimleri % 44 ve bunlardan % 8'i kontrollere göre azalma % 36'nin ise artma olduğu gözlemlendi (Tablo 14 ve Şekil 6, 7).



Şekil 6. Crohn hastalarında (çift bant veren primerler yanlarında verilen rakamlarla belirtilmiştir) sitokin gen polimorfizimleri resimleri



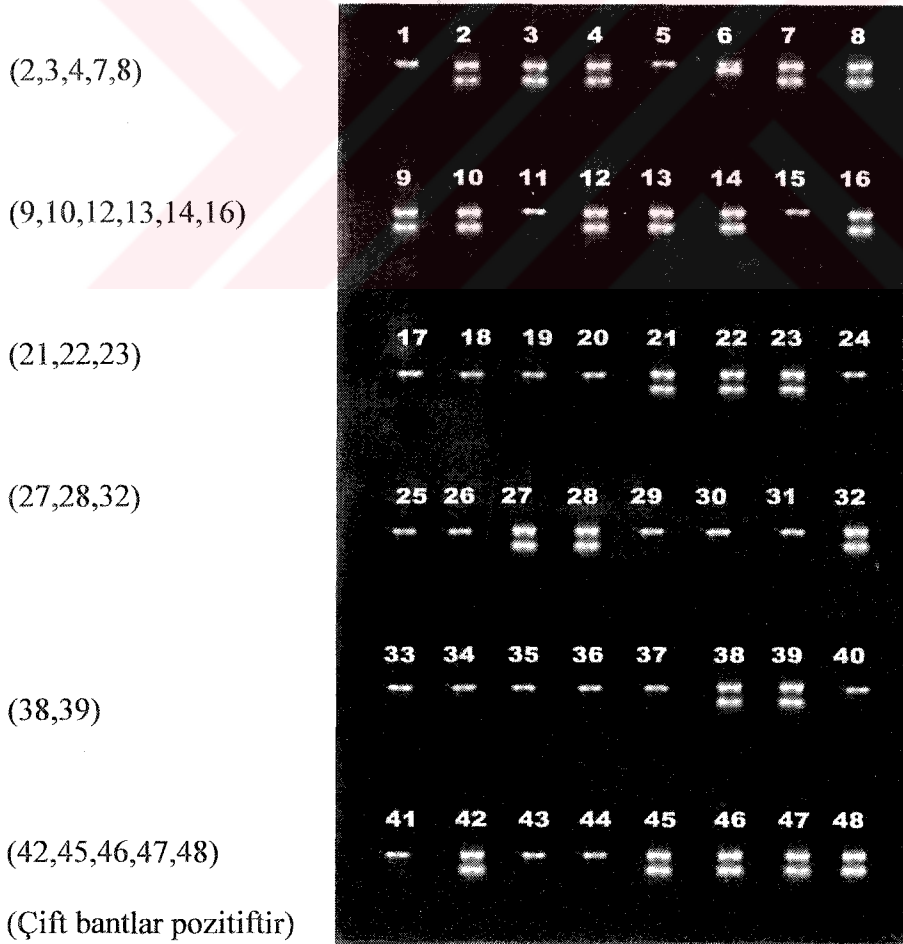
Şekil 7. Chron Hastaları ve kontrol grubunda sitokin polimorfizm allelik frekansları

Tablo 14. Crohn hastaları ve kontrol grubunun karşılaştırılmasıyla elde edilen istatistiksel parametreler.

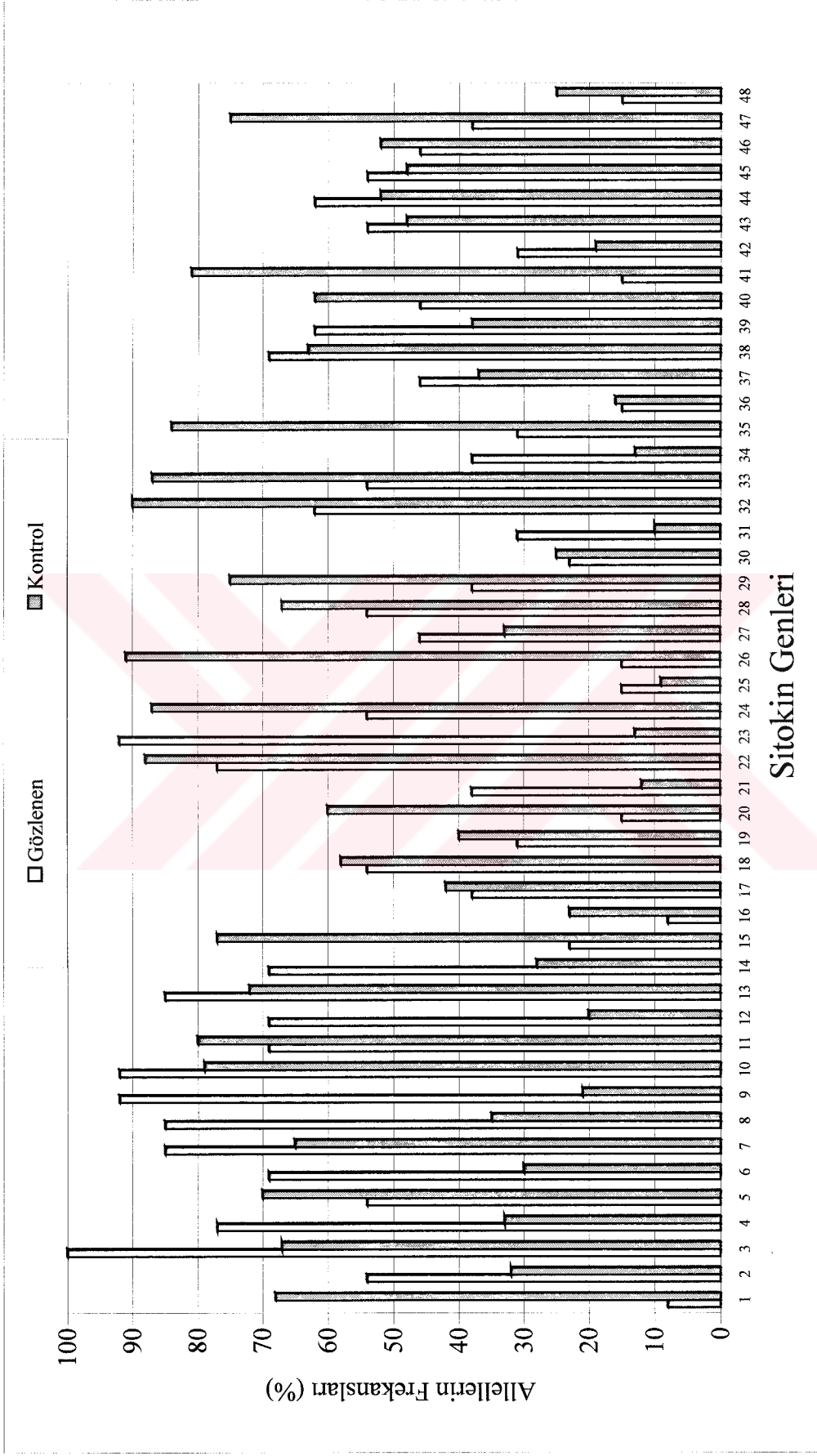
	sitokin geni	Allel	Pozisyon	bp	Kontrol	Crohn	Ki-değeri	Fişher	P değeri	Sonuç
1	IL-1 α	-889	T	220	68	50	1.200		0.000	farksız
2			C	220	32	56	0.081		0.139	farksız
3	IL-1 β	-511	C	220	67	64	0.000		1.000	farksız
4			T	220	33	50	1.52		0.254	farksız
5		+3962	T	340	70	39	4.187		0.041	azalma
6			C	340	30	67	5.980		0.014	farksız
7	IL-1R	pst11970	C	290	65	44	1.360		0.243	farksız
8			T	290	35	33	3.881		0.049	farksız
9	IL-1RA	mspa111100	T	300	21	56	6.438		0.011	artma
10			C	300	79	44	6.438		0.011	azalma
11	IL-4RA	+1902	G	140	80	39	8.642		0.003	azalma
12			A	140	20	50	4.520		0.034	artma
13	IL-12	-1188	C	800	72	44	3.277		0.070	farksız
14			A	800	28	50	1.963		0.161	farksız
15	IFN- γ	UTR5644	A	280	77	11	22.020		0.000	azalma
16			T	280	23	22	..	*	1.000	farksız
17	TGF- β	kodon 10	C	80	42	28	0.611		0.434	farksız
18			C	80	58	39	1.249		0.264	farksız
19		kodon 10	T	80	40	6	5.831		0.016	azalma
20			T	80	60	44	0.745		0.388	farksız
21		kodon 10	C	200	12	22	..	*	0.437	farksız
22			T	200	88	50	..	*	0.000	azalma
23	TNF- α	-308	G	110	13	17	..	*	0.717	farksız
24			A	110	87	28	18.897		0.000	azalma
25		-308	G	110	9	44	..	*	0.002	artma
26			A	110	91	11	37.907		0.000	azalma
27	IL-2	-330	T	570	33	22	0.230		0.632	farksız
28			G	570	67	17	11.025		0.001	azalma
29	IL-2	166	G	570	75	17	15.673		0.000	azalma
30			T	570	25	17	..	*	0.529	farksız
31	IL-4	-1098	T	560	10	11	..	*	1.000	farksız
32			T	560	90	67	..	*	0.055	farksız
33		-1098	G	560	87	44	..	*	0.001	azalma
34			G	560	13	50	..	*	0.004	artma
35	IL-4	-590	T	610	84	22	20.344		0.000	azalma
36			T	610	16	11	..	*	1.000	farksız
37		-590	C	610	37	11	2.841		0.092	farksız
38			C	610	63	28	5.617		0.016	azalma
39	IL-6	-174	G	430	38	22	0.851		0.356	farksız
40			C	430	62	11	11.760		0.000	azalma
41		nt565	G	430	81	22	16.900		0.000	azalma
42			C	430	19	28	..	*	0.519	farksız
43	IL-10	-1082	G	300	48	39	0.152		0.697	farksız
44			G	300	52	33	1.178		0.278	farksız
45		-819	A	300	48	28	1.463		0.226	azalma
46			A	300	52	28	2.230		0.135	azalma
47		-592	A	300	75	39	5.690		0.017	azalma
48			A	300	25	00	..	*	0.015	farksız

3.2.3. ÜK Hastalarda Sitokin Gen Polimorfizmi ile İlgili Bulgular

Elli bir ÜK 'da sitokin gen polimorfizmlerinde , IL -1 β -511C, IL-1 β -511T, IL β +3962T, IL 1 RA mspa 111100C, IL 4RA +1902G, IL-12-1188C, TGF β kodon 10C ve TNF α -308G kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artma gözlemlendi ($p < 0.05$). IL 1 α -889C, IFN γ UTR 5644A, IL β +3962C, IL 1RA mspa 111100T, IL 4RA +1902A, , TGF β kodon 10C, TGF β kodon 10T, , TNF α -308A, TNF α -308G, IL 2 +166G, IL 4 -1098G, IL 4 -1098G, IL 4 -590C, IL 6 nt565 ve IL 10 -592A ise anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p < 0.05$). Diğer polimorfizmlerde ise kontrol gruplarına göre anlamlı bir istatistiksel değişim gözlenmedi. Çalışmamızda kullandığımız 48 gen primeri içeren pletinin tamamı değerlendirildiğinde, sitokin gen polimorfizimleri değişimleri % 42 ve bunlardan % 25'i kontrollere göre azalma, %17'de ise artma olduğu gözlemlendi (Tablo 15 ; Şekil 8, 9)



Şekil 8. Ülseratif kolitlilerde sitokin gen polimorfizimlerinin jel resimleri



Şekil 9. Ülseratif kolitli ve kontrol grubunda sirtin polimorfizmleri allelik frekansları

Tablo 15. Ülseratif kolitlilerde ve kontrol grubunun karşılaştırılmasıyla elde edilen istatistiksel parametreler

	sitokin geni	Pozisyon	Allel	bp	Kontrol	UK	Ki-kare	Fişher	P-değeri	Sonuç
1	IL-1 α	-889	T	220	68	08	15.10		0.000	azalma
2			C	220	32	54	..	*	0.198	farksız
3	IL-1 β	-511	C	220	67	100	..	*	0.027	artma
4			T	220	33	77	..	*	0.009	artma
5		+3962	T	340	70	54	6.837		0.329	farksız
6			C	340	30	69	..	*	0.022	artma
7	IL-1R	pst11970	C	290	65	85	..	*	0.196	farksız
8			T	290	35	85	..	*	0.196	farksız
9	IL-1RA	mspa111100	T	300	21	92	..	*	0.000	artma
10			C	300	79	92	..	*	0.433	farksız
11	IL-4RA	+1902	G	140	80	69	..	*	0.461	farksız
12			A	140	20	69	..	*	0.001	artma
13	IL-12	-1188	C	800	72	85	..	*	0.486	farksız
14			A	800	28	69	..	*	0.009	artma
15	IFN- γ	UTR5644	A	280	77	23	..	*	0.000	azalma
16			T	280	23	08	..	*	0.270	farksız
17	TGF- β	kodon 10	C	80	42	38	..	*	1.000	farksız
18			C	80	58	54	..	*	1.000	farksız
19		kodon 10	T	80	40	31	..	*	0.750	farksız
20			T	80	60	15	6.529		0.011	azalma
21		kodon 10	C	200	12	38	..	*	0.040	artma
22			T	200	88	77	..	*	0.376	azalma
23	TNF- α	-308	G	110	13	92	..	*	0.000	artma
24			A	110	87	54	..	*	0.019	azalma
25		-308	G	110	9	15	..	*	0.596	artma
26			A	110	91	15	..	*	0.000	azalma
27	IL-2	-330	T	570	33	46	..	*	0.350	farksız
28			G	570	67	54	..	*	0.522	farksız
29	IL-2	166	G	570	75	38	..	*	0.023	azalma
30			T	570	25	23	..	*	1.000	farksız
31	IL-4	-1098	T	560	10	31	..	*	0.078	farksız
32			T	560	90	62	..	*	0.025	azalma
33		-1098	G	560	87	54	..	*	0.019	azalma
34			G	560	13	38	..	*	0.105	farksız
35	IL-4	-590	T	610	84	31	..	*	0.000	azalma
36			T	610	16	15	..	*	1.000	farksız
37		-590	C	610	37	46	..	*	0.535	farksız
38			C	610	63	69	..	*	1.000	farksız
39	IL-6	-174	G	430	38	62	1.472		0.225	farksız
40			C	430	62	46	0.515		0.473	farksız
41		nt565	G	430	81	15	..	*	0.000	azalma
42			C	430	19	31	..	*	0.461	farksız
43	IL-10	-1082	G	300	48	54	0.004		0.949	farksız
44			G	300	52	62	0.091		0.762	farksız
45		-819	A	300	48	54	0.004		0.763	farksız
46			A	300	52	46	0.004		0.949	farksız
47		-592	A	300	75	38	..	*	0.023	azalma
48			A	300	25	15	..	*	0.716	farksız

4. İRDELEME

İnflamatuvar bağırsak hastalıkları bütün dünyadaki topluluklarda mevcut olup, biyocoğrafik dağılımları homojen değildir. Türkiye’de IBH epidemiyolojisini saptamak amacıyla 1995-1999 yılları arasında 21 merkezin katıldığı retrospektif bir çalışma yapılmıştır (Tözün, 2002). Türkiye’nin 6 bölge ve 10 büyük şehirde yapılan bu araştırma bugüne kadar yapılan en geniş kapsamlı araştırma olması ve ülkemizin profilini yansıtması açısından önemlidir. 21 merkezden 1107 IBH hastası (854 ÜK, 234 CH, 19 indetermine kolit) üzerinde yapılan bu çalışmada varılan sonuçlara göre, ülkemizde ÜK insidansı 4,4/100.000 CH’nın ise 2,2/100.000 tir. Bu çalışmaya göre, ülkemizdeki ÜK ve CH insidanslarının, Kuzey ve Batı Avrupa’dakilerinden daha az, Ortadoğu ülkelerine daha yakın bir düzeyde olduğu; ÜK erkeklerde, CH’nın ise kadınlarda daha sık görüldüğü; şehirde oturanlarda heriki hastalığın daha fazla olduğu vurgulanmaktadır (Tözün, 2002), fakat Türkiyede İnflamatuvar bağırsak hastalıklarının komple genetik araştırması henüz yapılmamış olup bu çalışma bir başlangıç teşkil etmektedir.

Çevresel ve etnik faktörler, popülasyonların genetik yapısı, ayrıca göçlerin İBH’de rol oynadığı önerilmektedir. Hastalığın görülme sıklığı Avrupa’da, Kuzey Amerika’da ve güney yarım kürede nadirdir (Canavaugh, vd., 2001, Rioux, vd., 2000). Dünyanın aynı coğrafik bölgelerinde yaşayan etnik gruplar arasındaki farklı insidansların bulunması, Avrupa orijinli beyaz popülasyonlarında en yüksek riskin görülmesi, Amerika’daki ya da Güney Afrika’daki siyahlar ile Yeni Zelanda’daki Maoriler arasında farkların gözlenmesi bu görüşü desteklemektedir (Cho, 2003; Hampe, vd., 2001; Hampe, vd., 1999). Bu etnik eğilimlere, kültürel faktörler, sosyo-ekonomik durum ve genetik çeşitliliklerde dahil edilmektedir.

Crohn hastalıklı aile topluluklarında yapılan gözlemlerde gençlerde başlama yaşı daha erkendir. Kuzey Fransa bölgesinde yapılan çalışmalarda hastalığın başlama yaşı sporadik vakalarda 26, aile vakalarında ise 22 olarak gösterilmiştir (Hugot, vd., 1999; Hugot, vd., 2001). Öncelikle, hem Crohn hastalığı hem de ülseratif kolit 15 ile 30 yaş arasındaki gençlerde çok düşük bir insidanstadır. Araştırma grubu olarak seçtiğimiz vakaların yaşlarında 30 ve daha yukarı yaşlardır. Bu tercihimizin gerçek dağılım oranlarını elde etmede önemli bir tercih olduğunu düşünmekteyiz. Epidemiyolojik incelemeler IBH’nin

insidans ve prevalansındaki çeşitliğin coğrafi yerleşimlere bağlı olarak ırksal ve etnik geçmişe dönük olduğunu göstermektedir.

Batılı ülkelerde İBH'nin son 30 yıl içinde insidansının artmış olduğu belirtilmektedir. Bazı bölgelerde yüksek insidans seviyesinde 6/100.000 (ABD, Loftus, vd., 1998) 3,4/100000 (İtalya, Trallori, vd., 1996) diğer ülkelerde gösterilen artışlar ise 4,1/100.000 (Danimarka, Munkholm, vd., 1992) 5,9/100.000. (İngiltere, Thomas vd., 1995) ve 14,6 /100.000 (Kanada, Bernstein vd., 1999) dır. Bunun aksine Ülseratif kolitler için batılı ülkelerde gözlenen artış seviyeleri (Danimarka), 8,1/100.000 (Amerika) 8,3/100.000. ve (Kanada) 14,3/100.000 dir. Genel olarak gelişmekte olan ülkelerde görülen çevre kirliliği, sosyal ve ekonomik seviyedeki değişimler gelişmiş ülkelere göre az olduğundan bu ülkelerde hastalığın insidansında daha az bir artış vardır. İnsidanslar düşük coğrafik riskli bölgelere göç edenlerde, yüksek coğrafik riskli bölgelerde yaşayanlardan daha düşük oranda olabilmektedir. (Andres vd., 1999; Andus ve Gross, 2000).

Amerika'da yaşayan ve Kafkas kökenli olmayanlar arasında IBH prevalans oranları düzenli şekilde düşük olduğu rapor edilmiştir. Sağlık örgütlerince yapılan taramalarda Crohn'lu hastalar için prevalans oranları 100.000'de, Kafkaslar kökenliler arasında 43,6, Afrikalı Amerikalılar arasında 29,8, İspanyol asıllılar arasında 4,1, (Yang vd., 2001a), Asyalılar arasında 5,6'dır. Geçmiş 10 yılda, Afrika kökenli Amerikalıların çocukları arasında yapılan prospektif çalışmalarda (Georgia eyaletinde yaşayanlarda) CH'nin insidansı 100.000 de 7-12'dir. Prospektif çalışmalarda gözlenen insidansları düşüktür. Bu bilgiler, Afrikalı Amerikalılar arasındaki insidans ve prevalansların öncekinden daha yüksek olduğunu göstermektedir. Etnik gruplar arasında, Amerika'da yaşayan Yahudilerin inflamatuvar bağırsak hastalıklarına yakalanma riskinin Yahudi olmayan Kafkasyahlara göre 2 ile 4 kat daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Russel, vd., 1997; Orholm, vd., 1991). Bazen bu prevalans oranları 2-9 kat daha yüksek olabilmektedir (Sugimura, vd., 2003). Ashkenazi Yahudi populasyonlarında inflamatuvar bağırsak hastalıklarının artış oranı, farklı zaman periyotlarında olduğu kadar farklı coğrafik bölgelerde de Yahudi olan populasyonlarda Yahudi olmayanlardan daha yüksek oranda gelişme ve ilerleme gösterdiği gözlenmiştir.

İlk epidemiyolojik çalışmalar, ÜK ve CH'nin insidanslarının İngiltere, Kuzeybatı Avrupa, Kuzey Amerika ve Avustralya gibi sanayide ileri ülkelerde daha yüksek; Asya, Japonya Güney Amerika ve Güney Avrupa'da ise daha düşük olduğunu göstermektedir (Brignola, vd., 2000, Brown, vd., 2000). Ancak, son yıllarda yapılan çalışmalar, Güney

Avrupa’da bu hastalıkların hiç de nadir olmadığını ortaya koymuştur. Yirmi Avrupa ülkesinin dahil edildiği 2 yıl süren IBH epidemiyolojisi çalışmasında da hastalığın insidansındaki coğrafi farklılığın giderek azalmaya yüz tuttuğu ortaya konmuştur. Ülseratif kolitin insidansı Crohn hastalığından daha fazladır. ABD’de yapılan bir epidemiyolojik araştırmada 1970’lere kadar ÜK insidansının arttığı ve hastalığın genç erkeklerde daha sık görüldüğü bildirilmiştir. Crohn hastalığı ise 1960-1980 yılları arasında, tüm dünyada, özellikle yüksek insidanslı bölgelerde 3-6 kat arttığı kaydedilmiştir. Buna örnek olarak İngiltere, İskoçya, diğer Avrupa ülkeleri ve İsrail gösterilebilir (Ahmad, vd., 2001).

IBH’ları artışında değişen çevre koşullarının insanın genetik yapısını olumsuz etkileyeceği düşünülmüş ve bu konudaki araştırmalar moleküler genetik yöntemlerin gelişmesiyle hız kazanmıştır. İBH’nin genetik mekanizmasının araştırılması son on yılda ağırlık kazanmıştır. Araştırmalarımızda benzer moleküler genetik yöntemleri kullandık.

Bu çalışma, yaptığımız literatür taramaları neticesine göre inflamatuvar bağırsak hastalıklarında (CH ve ÜK) CARD15/NOD2 geni 3020insC mutasyonu ve sitokin gen polimorfizmi araştırmaları dikkate alındığında Türkiye’deki ilk çalışmadır. İBH sınıflandırılmasında bir çok yöntem kullanılmaktadır. Araştırmalarda kullandığımız moleküler analizler hastalığın kesin tanısına giden yolda genetik yaklaşımı sergilemektedir. Çalışmamızda öncelikle 2001 yılında CARD15/NOD2 geni üzerinde tespit edilen 3020 insC mutasyonunu allel spesifik multipleks PCR metodu ile analiz yaptık. Metod herhangi bir restriksiyon enzimi kesme bölgesi değişimine neden olmayan nokta mutasyonlarının tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Yöntemin temeli, mutasyonun bulunduğu bölgeye özgü, ya da bir başka deyiş ile, allele özgü “primer” kullanmaya dayanmaktadır. Ayrıca, amplifikasyonun kontrolü için hem normal hem de mutasyonlu bireylerde bant veren kontrol bölgeye ait bir çiftten fazla primer kullanıldı. İncelenen örnek mutasyonu taşıyorsa, hem kontrol bölge hem de mutasyona özgü bölgede PCR ürünü oluşur ve jel elektroforezi ile varlığı kolaylıkla saptanabilmektedir. İncelenen örnek mutasyonu taşıyor ise, sadece kontrol bölgede PCR ürünü oluşur. Heterozigot bireylerde, allellerden birinde mevcut olan mutasyon sebebi ile amplifikasyon sonucu mutasyona özgü PCR ürünü oluşur. Böyle bir mutasyon için fenotipik olarak hasta olan çocuğun ebeveyninin taşıyıcı olduğu anlaşılır. Fakat, kardeşlere ve diğer aile bireyelerine taşıyıcılık tanısı verilememektedir. Bu mutasyon ilk tanımlandığından itibaren allel spesifik multipleks PCR yöntemiyle güvenilir bir şekilde tüm dünya laboratuvarlarında

kullanılmaktadır (Ogura, vd., 2001a). Bazı çalışmalarda da DNA sekans analizi kullanılmıştır. Teknik imkansızlıklardan dolayı DNA sekans analizi yapılamamıştır.

İnflamatuvar bağırsak hastalarında yaptığımız çalışmada CARD15/NOD2 geni 3020insC mutasyonu sonuçlarına göre 69 hastanın 20 tanesinde (% 28,9) heterozigot allel frekansı bulundu. Kontrol grubu (50 sağlıklı birey) DNA'larından yapılan çalışma sonucunda 2 tanesinde (% 4) aynı mutasyon heterozigot olarak saptandı İBH'nın alt grubu olan Crohn hastalarında yapılan çalışmada ise 18 hastanın 7 tanesinde (% 38) CARD15/NOD2 3020insC mutasyonu heterozigot olarak tespit edilmiştir. Diğer form olan ülseratif kolitlilerde aynı mutasyon 51 hastanın 13 tanesinde (% 25) düzeyinde heterozigot pozitif olarak tespit edilmiştir. Ne kontrol grubunda ne de inflamatuvar bağırsak hastaları (CH, ÜK) gruplarında CARD15/NOD2 3020insC mutasyonuna homozigot olarak rastlanmamıştır. Kontrol grubu insidansımız Avrupadaki bazı toplumlarla aynı seviyede bulunmuştur (Hugot, vd, 2001).

Orijinal kullanımında bu mutasyon Crohn hastaları ile ülseratif kolit hastalarını birbirinden ayırmak için ayırıcı tanıda kullanılır (Cho, 2003). Ancak çalışmamızda hem Crohn hastalarında hem de ülseratif kolitlilerde aynı mutasyon gözlenmiştir. Metodun yanlış uygulanabileceği kanaatinden sonra aynı çalışmalar kontrollü bir şekilde tekrarlanmıştır. Sonuçta aynı bulgular elde edilmiştir. Metodun güvenilirliği bertaraf edildikten sonra akla gelen soru; acaba klinik tanılar mı yanlış? Klinik doktorlarıyla yapılan görüşmelerde tanıların doğru olduğu ancak ülseratif kolit grubuna dahil edilen üç hastanın miks grup denilen her iki hastalığın semptomlarını veren gruba dahil olduğunu diğerlerinin Crohn ve Ülseratif kolit olduğunu teyid ettiler. Sonuç olarak CARD15/NOD2 geni 3020ins C mutasyonu Türk Crohn hastaları için ayırıcı tanıda kullanılabilir mi? Bu karışık ve kompleks soruya cevap verebilmek için dünya coğrafyasında ırkların yerleşimi, yaşayışlarını, en önemlisi de insanlığın eski dönemlerden günümüze kadar yapmış oldukları göçlerin incelenmesi gereklidir. Çünkü Batı toplumlarında ayırıcı tanı özelliği olan bu mutasyon maalesef dünyadaki bütün ırklarda gözlenmemektedir. Yamazaki ve arkadaşlarının (2002) Japonyada yaptıkları çalışmada böyle bir mutasyona rastlamadıklarını belirtmişlerdir. Bazı bulgular, popülasyonlarda nadir görülen CARD15/NOD2 geni mutasyonlarından, Arg702Trp, Gly908Arg ve Leu1007fsinsC 'nin Kafkas kökenli ve Amerikada yaşayan Crohn hastalarının mutasyonları taşıyan risk olduğunu desteklemektedir (İnoe, vd., 2002). Ancak, bazı etnik popülasyonlarda CARD15/NOD2 geni hastalığa duyarlılık ölçüsü hastalıkla ilişkilendirilememiştir. Örneğin,

Kafkas kökenlilerin aksine, Japon populasyonlarında Crohn'lu hastalar arasında yapılan araştırmalarda bu üç önemli alleli hiç kimsenin taşımadığı anlaşılmıştır (Zhou, vd., 2002). Afrika kökenli Amerikan Crohn hastalarında bu üç allelin bulunma frekansının Kafkas kökenli Crohn'lu vakalara göre çok daha az olduğu gözlenmiştir (Sartor, vd., 2003). Ayrıca CARD15/NOD2 geni LRR bölgesindeki amino asit polimorfizmlerinin Afrika kökenli Amerikan populasyonlarında Arg790g!n varyantlarının nadir olduğu gözlenmiştir (Sartor, vd., 2003). Araştırmacılar daha nadir olarak aynı mutasyonu ülseratif kolitlilerde tanımlamışlardır (Heliö, vd, 2003). Bu bilgiler ve literatürlerin ışığında mutasyonların ırklara, toplumlara göre görülme sıklığı değişkendir. CARD15/NOD2 geni 3020insC mutasyonu insidansı, Avrupa toplumlarındaki Crohn hastalarında ortalama % 12 (Bonen, vd., 2003a; Hugot, vd, 2001), Kafkas kökenli Amerikalılarda % 8.4 (Bonen, vd., 2003b), Alman toplumunda % 16 (Hampe, vd, 2001), Kanadalılarda % 7.7-10.3 (Satsangi, vd., 2003; Vermeire, vd, 2002), İtalyanlarda % 11.6 (Hassan, vd, 2003) , İngilizlerde % 9.4 (Present, vd., 1999) Hollandalılarda %10.9 (Heliö, vd., 2003) ve ABD de yaşayan Ashkenazi Yahudilerinde % 7.8-8.4 (Sugimura, vd. 2003) civarındadır. Çalışmamızda Crohn hastalarında 3020 insC mutasyonu, % 38 olup Avrupa toplumlarından daha yüksek frekansla bu mutasyonu taşımaktayız. Riskli allellerin tek bir kopyasını taşıyan şahıslarda Crohn hastalığı taşıma riski nispeten daha azdır (kontrollere göre 2-4 kat fazla), halbuki risk allellerinin iki kopyasına sahip olan şahıslarda hastalık gelişme ihtimali 20 ile 40 kat daha yüksektir (Bonen, vd., 2003b). Bu da bize CARD15/NOD2 genlerinin otozomal resesif kalıtım gösterdiğini işaret eder. Yaklaşık olarak CH'nin %7 ile %18'i CARD15/NOD2 risk allellerinin 2 kopyasını taşırlar (Karşılaştırılan Kafkas kontrol gruplarında %1 den azdır). Ayrıca Crohn hastalarının yaklaşık % 27 - % 32 si bu üç temel risk allellerinden sadece bir kopya taşır (Steer, vd., 2003; Lesage, vd., 2000).

CARD15/NOD2 geninin Crohn hastalığı ile ilişkilendirilmesinde bu genin NF-kByi aktive etmek için Serin Tironin kinaz enzimi ile CARD15/NOD2 proteinlerinin fonksiyonun olabileceği tahmin edilmektedir (Arend, vd., 2002; Suryamin, vd., 2003). Peptidoglikanlar ve LPS'nın her bir tedavisinde doğal CARD15/NOD2 ile transfekte edilen hücrelerde NF-kB aktivasyonunun arttığı gözlenmiştir (Cariappa, vd., 1998). Fakat, bu gende frameshift mutasyonlarında Leu1007finsC'nin proteininin %3 oranında kısaldığı, LPS tedavileri ile NF-kB aktivasyonunun düştöğü belirtilmektedir (Tözün, 2002). Aksine Arg702Trp ve Gly908Arg varyantlarında frameshift mutasyonlarında ise LPS'ye immün sistemden daha aktif cevaplar gelebilir. Fakat, LPS tedavileri ile NF-KB nin aktive

edilmesinin önemli oranda azalma özelliği tam açıklanamamıştır (Bonen, vd., 2003b). Bu nedenle, 3 önemli mutasyon olan bu alleller, Gly908Arg, Arg702Trp ve Leu1007fsinsC Crohn'nun temel ilişkileri için birleştirme mekanizmalarına yarar sağladığı bakteriyel birleşiklerin, NF_kB aktivasyonuna olan cevabının eksikliğinden kaynaklanmaktadır. Ön görülen inflamatuvar barsak hastalıkları lokusu ve 16. kromozomun perisentromerik bölgesindedir (Canavaugh, vd., 2001). Araştırmalarda CARD15/NOD2 geninin bu bölgesindeki mutasyon Crohn hastalığı ile kesin olarak birleşim ortaya çıkmaktadır. CARD15/NOD2 proteinleri patojenik bakteri sinyalleri için sistolik reseptör oldukları düşünülmektedir (Canavaugh, vd., 2001, Duerr, vd., 2000, Rioux, vd., 2000). Çünkü, CARD15/NOD2 varyantları için seçilip araştırılan kromozomları ve yakın komşuları içinde duyarlı diğer aday genlerden Crohn hastalarının % 20'sinden daha az olduğu gösterilmektedir (Davanhell, vd., 2001; Hugot, vd., 2001).

Araştırmalarda, CARD15/NOD2 geni mutasyonunun nasıl oluştuğu, NF-kB aktivasyonunun nasıl zayıfladığı ve Crohn hastalığındaki duyarlılığın nasıl arttığı tartışılmaktadır. CARD15/NOD2 geni yapısında lokalize olan, lösince zengin tekrarlar dizileri yapısal benzerlik bakımından bitkilerde mikrobiyal patojenlere dirençli proteinlerle homolog hücre içi protein ailesi üyeleri olabileceği tahmin edilmektedir (Ogura, vd., 2001b). Bu sebeple bir bağırsak sistemindeki mikroorganizmaların doğuştan var olan immün sistemin cevabını düzenleyen alıcılar CARD15/NOD2 geni ürünlerini ve hücre dışındaki patternleri tanıdığı belirlenmiştir (Petronis ve Petroniene, 2000). Organizmanın korunması için patojenlere karşı cevabı NF-kB'nin bu sinyal yolunda aktivasyonunu ile olabilmektedir. Örneğin, TNF ya da Toll-like receptör sinyali nakavt farelerde NF-KB aktivasyonunun azaldığı patojenlerin hücum duyarlılığının arttığı sergilenmiştir (Sartor, 2003). Araştırmalarda tespit edilen CARD15/NOD2 geni mutasyon tipleri Tablo 3'te verilmiştir (Zheng, vd., 2003).

Kafkas kökenli Crohnlu hastalarda ve kontrollerde Arg 702 Trp, Gly 908 Arg ve Leu 1007 finsC yüksek oranda allelik frekanslar içermesi Crohn hastalığının CARD15/NOD2 geni ile ilişkilerini destekler niteliktedir (Ahmad, vd., 2001; Inoue, vd., 2002).

CARD15/NOD2 geni, frameshift mutasyonu sonucu oluşan Leu1007fsinsC'nin Yahudilerde allel frekansları % 7,3 ve Yahudi olmayan Crohn'lu hastalarda ise % 8,4 olarak gözlenmiştir (Bonen, vd., 2003). Aksine CARD15/NOD2 geni Gly908Arg CH na tutulan Yahudilerde alel frekansları %10,2 Yahudi olmayan Crohn'lu hastalarda ise % 4,3 (P= 0,002) olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, Gly908Arg allel frekanslarının Yahudi kökenli

CH hastalarında % 8,7, kontrol gruplarında % 3,2, Yahudi olmayan hastalarda % 4,3 ve kontrollerde ise %1,6 olduğu gözlenmiştir. Ashkenazi Yahudileri arasında Crohn allellerinin yüksek oranda olması prevalanslarının etkinliğini gösterir (Cho, vd., 2000). Yahudi olmayan Crohn'lu hastalarda Arg702Trp için %10,7 kontrollerde ise allel frekansların % 2,6 olduğu bildirilmiştir. Ayrıca hücre içinde artan diğer bileşiklere karşı proinflamatuvar sitokinler, barsak inflamasyonlarında mukozal hücrelerin ilişkilerinin immun sistem tarafından cevaplanmasıyla ortaya çıkmaktadır.

Araştırmamızda sitokin gen polimorfizmlerini analizleri için, PCR-SSP metodu kullanmayı tercih ettik. Bu metot aynı zamanda en hızlı genomik tiplendirme yöntemidir, çünkü bu teknikte amplifikasyon sonrası aşamada, amplifikasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği, agaroz jel elektroforezi ile kolaylıkla tespit edilebilir. PCR-SSP ile HLA doku tiplendirmeleri, sitokin gen polimorfizmleri ve bazı polimorfik genlerdeki mutasyonlar taranmaktadır.

İBH'nin sitokin gen polimorfizmlerinde **IL 1 RA** mspa 111100T, **IL 4RA** +1902A, **TGF β** kodon 10C ve **TNF α** -308G kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artma gözlenmiştir ($p < 0.05$). **IL 1 α** -889T, **IL β** +3962T, **IL 1RA** mspa 111100T, **IL 4RA** +1902G, **IL 12** -1188C, **IFN γ** UTR 5644A, **TGF β** kodon 10C, **TGF β** kodon 10T, **TGF β** kodon 10T, **TNF α** -308A, **TNF α** -308G, **IL 2** -330G, **IL 2** 166T, **IL 4** -1098T, **IL 4** -1098G, **IL 4** -590 T, **IL 4** -590 C, **IL 6** -174 C, **IL 6** nt565 G, **IL 10** -819A, **IL 10** -819A , **IL 10** -592A ve **IL 10** -592 A azalma gözlenmiştir ($p < 0.05$). İBH'da incelenen diğer polimorfik bölgelerde ise kontrol gruplarına göre herhangi bir anlamlı istatistiksel değişim gözlenmemiştir. Araştırmamızda, Cyler Pleyt 200096 sistemiyle yapılan analiz değerlendirmeleri sonucunda tüm primerler dikkate alırsa, sitokin polimorfizm değişimleri % 56 ve bunlardan % 48'i kontrollere göre azalma % 8 'nin ise artma olduğu tespit edilmiştir (Tablo 13).

Crohn hastasında sitokin gen polimorfizmlerinde, **IL-1** -1098T, **IL-4RA** +1902A ve **TNF-α** 308A; kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artma gözlenmiştir ($p < 0.05$). **IL-1β** +3962C, **IL-1RA** mspa111100T, **IL-4RA**+1902A, **IFN-UTR**5644A, **TGFβ** kodon 10G , **TGFβ**-kodon 10T , **TNF-α** -308A, **TNFα** -308, **IL-2**-330G , **IL-2** 166G , **IL-4** -1098G , **IL-4** -590T , **IL-4** -590C , **IL-6** -174G , **IL-6** nt565A , **IL-10** 819C , **IL-10** -819T ve **IL-10** -592A azalma gözlenmiştir ($p < 0.05$). Diğer sitokin gen polimorfizmlerinde ise, kontrol gruplarına göre herhangi bir anlamlı istatistiksel değişim gözlenmemiştir. Araştırmamızda, Cyler Pleyt 200096 sistemiyle yapılan analiz

değerlendirmeleri sonucunda tüm primerler dikkate alırsa, sitokin polimorfizm değişimleri % 44 ve bunlardan % 38'i kontrollere göre azalma % 6 'nin ise artma olduğu tespit edilmiştir (Tablo 14).

ÜK hastasının sitokin gen polimorfizmlerinde , **IL β -511C**, **IL β -511T**, **IL β +3962T**, **IL 1 RA mspa 111100C**, **IL 4RA +1902G**, **IL-12-1188C**, **TGF β kodon 10C** ve **TNF α -308G** kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artma gözlenmiştir (**p < 0.05**). **IL 1 α -889C**, **IFN γ UTR 5644A**, , **TGF β kodon 10C**, **TGF β kodon 10T**, **TNF α -308A**, **TNF α -308G**, **IL 2 +166G**, **IL 4 -1098G**, **IL 4 -1098G**, **IL 4 -590C**, **IL 6 nt565** , **IL 10 -592A**, azalma gözlenmiştir (**p < 0.05**). ÜK'li hastalarda incelenen diğer polimorfik bölgelerde ise , kontrol gruplarına göre anlamlı bir istatistiksel değişim gözlenmemiştir. Araştırmamızda, Cycler Pleyt 200096 sistemiyle yapılan analiz değerlendirmeleri sonucunda tüm primerler dikkate alırsa, sitokin polimorfizm değişimleri % 42 ve bunlardan % 25'i kontrollere göre azalma % 17 'de ise artma olduğu tespit edilmiştir (Tablo 15).

Aday genlerin polimorfik lokuslarındaki çeşitli allellerin frekanslarının karşılaştırılması hastalar ve kontrol grupları arasında yapılmakta eğer, istatistiksel değerlendirmelerde bu iki grup arasında önemli derecede farklılıklar gözleniyorsa, bu allellerin hasta gruplarındaki yaygınlığı çok ise hastalıkla ilişkili olduğu belirtilmektedir. Genom incelemelerinde de aday genlere yaklaşımlar ilk seçilen genlerdeki polimorfizmler ve hasta bireyler arasındaki tespit edilen duyarlı genler ya da bağlantılı lokuslar gen hastalık ilişkisini ifade etmektedir. NOD2/CAD15 geni ve sitokin geni mutasyonlarının başka diğer genlerde gelecekte Crohn hastalığından şüphe edilen bakteriyel ürünlerle birleşebileceği vasıtalar düşünülmektedir . Tümör nekrosis faktörün (TNF) α üretimindeki değişim inflamatuvar bağırsak hastalıklarında çok iyi şekilde tanımlanmış ve son zamanlarda iki anti-(TNF) α monoklonal antikolar ile CH'da ispat edilmiştir. MHC gen kompleksi içinde yer alan bu genler, (TNF α ve TNF β) araştırmacıların bir çok inceleme yapmalarına neden olmuştur (Kato, vd., 1998; Sashio, vd., 2002).TNF- α 'ki genler potansiyel olarak ekspirasyon seviyelerinin inflamasyondan etkilediği gösterilmiştir. TNF- α promotorları kalıtım örnekleri karmaşıktır ve evrimsel değişimin seçici güç örneklerinde karmaşık bir bağımlılık vardır. TNF- α 'nın inflamatuvar bağırsak hastalıklarında önemli aday bir gendir (Kato, vd., 1998; Louis, vd., 2000). TNF- α promotorun yüksek allelik değişimleri bazı CARD15/NOD2'de gözlenenlerde de uyumludur. Potansiyel olarak genotipik uyumluluk riski düşüktür. Çünkü, potansiyel popülasyonlara yüklenen risk TNF-

α 'nın promotor değişimlerinde geniş çaplı çalışmalarla inflamatuvar bağırsak hastalıklarının ilişkilerini göstermek önemlidir. Crohn hastalarında, anti TNF- α tedavileri ile bağırsak lezyonlarını azaldığı gözlenmiştir (Steer, 2003). Bizim çalışmamızda İBH'de TNF α -308A artma, TNF α -308G azalma ve TGF β ise değişim olmamıştır. Crohn hastalarında ise TNF α -308A hem artma hemde azalma gözlenirken, TGF β polimorfizmlerinde değişim olmamıştır. Ülseratif kolitlilerde ise TNF α -308A, artma, TNF α -308G azalma, TGF β ise değişim olmamıştır.

Klinik çalışmalar ve hayvan modelleri IL-1 α ve IL-1 β sitokin proinflamatorleri arasındaki dengenin varlığını ispat etmiştir. IL-1 ve onların endojen inhibitörü sindirim sistemi inflamasyonlarını düzenleyen önemli bir faktördür. IL-1'in artış oranıyla, (IL-1 α ve IL-1 β) bağırsak hastalarının mukozalarda inflamasyon bulunmaktadır fakat sağlıklı bireylerde bu böyle değildir (Schulte, vd., 2001). IL-1 α , IL-1 β ve IL-1RA genleri 2 nolu kromozomun uzun koluna yerleşmişlerdir. Mitchison ve arkadaşları (2001) IL-1RA 2 allelinin Crohn hastalarının İngiltere'deki popülasyonlarda kontrollerden daha çok bulunduğu % 35-% 24 rapor etmişlerdir (Rogler ve Andus, 1998; Sashio, vd., 2002). Makul olarak tarif edilenlerin üstünde IL-1RA2 genotipleri bazen doğrulanabilmiştir fakat takip eden tüm incelemelerde bu böyle değildir. Polimorfizmler Ta_qI RFLP 5 eksonunda IL-1 β eni içinde tanımlanmıştır fakat inflamatuvar barsak hastalarında IL-1 β allelik frekansı kontrollerden farklı değildir (Hampe, vd., 2000; Kato, vd., 1998). Araştırmamızda, İBH 'da IL 1RA mspa 111100T artma, IL 1 α -889T, IL β +3962T, IL 1RA mspa 111100T azalma diğerlerinde değişim belirlenememiştir. Crohn hastalarındaki sitokin polimorfizimleri , IL-1 -1098T, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artma, IL-1 +3962 C, IL-1R mspa111100T azalma diğerlerinde değişim belirlenememiştir. ÜK hastasının sitokin gen polimorfizmlerinde, IL β -511C, IL β -511T, IL β +3962T artma, IL 1 α -889C, IL β +3962C, IL 1RA mspa 111100T azalma belirlenirken diğerlerinde değişim tayin edilememiştir.

Duyarlı iki önemli aday genin analizi ve şüpheli genleri araştırmak için Crohn hastalığında geniş genom taramaları yapılmıştır (Hampe, vd., 1999; Murillo, vd., 2002; Rioux, vd., 2001). İBD'de genlerin duyarlılığı araştırmak amacıyla genlerin kromozomlardaki yerleşimleri, sistematik genom araştırmalarıyla daha çok polimorfik DNA markırları kullanılarak yapılmaktadır. Crohn hastalığı için duyarlı olan lokuslara, farklı metotlar ile tanı yapmak dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır.

MHC içindeki HLA genlerinin ilk kez Japonya'da Musevi kökenli hastalarda HLA DRB1* 1502 bölgesinin Crohn hastalığı ile duyarlılığı analiz edilmiştir. Diğer etnik gruplardaki ilk çalışmalarda sonuçlardaki zıtlıklar açığa çıkarılmıştır. Ancak, son dönemlerde HLA-DRB1-* 0103'nün ülseratif kolitli beyaz popülasyonlardaki ilişkisi gösterilmiştir (Cariappa, vd., 1998; Bouma, vd., 1998). Crohn hastalığında HLA'nın etkisine ait bulguları ülseratif kolitlilerden daha da çelişkili durumundadır (Lombardi, vd., 2001; Stokkers, vd., 1999). İnflamatuar barsak hastalarının vaka ve kontrol incelemelerinde HLA genlerinden başka TNF genleri, IL-1 gen kümesi, T hücresi reseptörleri, Mucin genleri, IL-2, IL-10, Intraseluler adhezyon molekül1, Motilin, Vitamin D reseptörü genleri de araştırılmaktadır (Kato, vd., 1998; Jewell, vd., 1998). Çalışmamızda HLA klas I ve II genleri araştırılmamıştır.

Rapor edilen genom incelemelerinde İBH ile bağlantısı olan diğer bölgeler teşhis edilmiştir. 19p13 nin İBH ile bağlantısı Kanadalı kardeş-aile gruplarında gözlenmiştir. 16. kromozomun bu bölgesindeki çeşitli aday genler hücre içi adhezyon moleküllerinin ifade edildiği bölgelerdir. 1p kromozomunda bağlantının varlığı bütün aileler için gözlenmiştir. Genlerin yerleşimleri İBH de Amerikada yaşayan Iraklı Keldani ailelerde homozigot haritalama kolleksiyonları ile başarılmıştır (Annese, vd., 2001). Ailelerdeki bu bağlantı bölgeleri İBH1'lerde daha fazla olduğu da gösterilmiştir. Bu öneriler iki lokus arasındaki genin genle olan ilişkileriyle mümkündür. Araştırmalarımızda genlerin yerleştiği MHC bölgelerinde, kromozomlarında önerilen bağlantılar ile ilgili bağlantı araştırmaları yapılmamıştır.

Arend ve arkadaşlarının (2002) yaptıkları İBH modeli hayvan deneylerinde, IL-1 ve IL-1RA'nın bağırsak sisteminde seviyesinin artmasının inflamasyonu ile doğru orantılı olduğu gözlenmiştir. Negoro ve araştırma grubu (2003) ÜK'lı hayvan modeli deneylerinde IL-1 β ve IL-1RA seviyesinin artmasının bağırsak mukozalarında granülomların oluşumuna neden olduğunu gösterdiler, aynı etki daha sonraki çalışmalarda İBH, ÜK, CH hastalarında da benzer şekilde olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmalarımızda, hem Mccall ve arkadaşlarının hem de Cominelli ve arkadaşlarının bulguları ile paralellik göstermektedir. İBH'da proinflamatuvar sitokinlerden olan IL-1 α , IL-1 β ve IL-1RA'nın dengesi değişebilir ve İBH' tanısında IL-1 ve IL-1 RA seviyelerinin değişmesi önemli delil olarak gösterilebilir (Craven, vd. 20001; Curran, vd., 1998).

ÜK'de IL-1 RA geni 86 bazdaki polimorfizmler önemli oranda artmıştır. Bu artış Los Angeles eyaletinde Aşkenazi yahudiler üzerinde yapılan araştırmalar ile gözlenmiştir (Targan, vd, 1997). İBH'de ise genotiplerdeki polimorfizmlerde azalma olduğu gösterilmiştir (Mayer, 2000). Romagnani ve arkadaşları (1997) ÜK ve CH'li yaptıkları araştırmalarında IL-1RA'nın önemli derecede arttığı gözlemişlerdir. Cho ve arkadaşlarının (2001) incelemelerinde aynı özellik İBH'li hastalarda da gösterilmiştir. Chiago eyaletinde Crohn hastalarında 2 yıl boyunca yapılan IL-1RA tedavilerinde hastalarında bağırsaklarında görülen fistüllerde % 70-50 gerileme izlenmiştir (Eric, vd, 2003). ÜK ve CH'da multipl genlerin çevresel ajanların etkisinde kaldığı hastalığın heterojenitezini anlamada genetik çeşitliliği anlamak klinisyenlerin tedavilerinin gelecek basamaklarını oluşturacaktır. Bazı araştırmalar, İBH'da bazı proinflamatuvar sitokinlerin (IL-1 ve IL-1RA) hastalığın oluşumunda ve inflamasyonun gelişiminde rol oynamakta olduğunu gösterdiler (Canavaugh, vd., 2001).

Carter ve arkadaşları (2001) CH'li ve ÜK'li hastalarda yaptığı araştırmalarda IL-1RA'nın önemli derecede artarak lezyon oluşumlarını artırdığını gözlemişlerdir. İBH'da ise periferik kandaki IL-1RA'nın klinik olarak önemli parametre olduğunu ÜK ve CH'liler de yaptıkları testler ile göstermişlerdir. Raggi ve arkadaşları, ÜK, CH ve kontrol gruplarında yaptıkları IL-1 ve IL-1RA ölçümlerinde IL-1/IL-1RA oranından önemli bir azalmanın olduğunu göstermişlerdir (Eric, vd, 2003). İBH'da patogenisinde sitokinlerin büyük rolünün olduğu bilinmektedir (Kato, vd., 1998).

İBH'de proinflamatuvar sitokinlerin (IL-1, TNF α , IFN γ , IL-12, IL-18 ve IL-6) ve anti-inflamatuvar sitokinlerin (IL-4, IL-10, IL-13 ve IFN α) düzensizliği (artma veya azalma) belirtilmektedir. (Reinecker, vd., 1993). İBH'da bağırsak mukozasında TNF α , IL-1, IL-2, IL-6 ve IL-8 ekspresyonlarında artış gözlenmiştir (Haukim, vd., 2002). Son zamanlarda yapılan araştırmalarda sitokinler vasıtasıyla İBH'nin tedavi edilebileceği, bu amaçla bağırsak mukozası immün sistemindeki hedef hücrelerdeki sitokin sinyal yolları ve sitokinlerin aktivitesi, salgılanması ve sentezlenmesi engellenebilir.

SNP çalışmalarında Crohn hastalığının patogenisinden immünitinin düzenlenmesini sağlayan sitokinler IL-4, IL-5 ve IL-13 dir. Pena ve arkadaşları (1998) Japon populasyonlarında ÜK'de ve CH'da bağırsak mukozalarında TNF α ve IL-1, IL-2, IL-6 ve IL-8'nin sentezinin önemli oranda arttığını bildirmektedirler. Ayrıca bu sitokinlerin inflamasyona ve hücre bağlantılarının bozulmalarına neden olduklarını rapor etmişlerdir. (Suryamin, vd, 2003). Crohn hastaları ve ülseratif kolitlerde IL-2, IFN gamma

tedavilerinde moleküllerin hücrelere adheyonunu ve akyuvar kan hücrelerinin inflamasyondan diğer bölgelere göç etmelerini engellediği rapor edilmektedir (Eric, vd, 2003). Kato ve arkadaşlarının Japon populasyonlarında yaptıkları çalışmalarda İBH'li Karaciğer hastalarda IL-1 β , IL-6 ve TNF α seviyelerinin arttığını göstermişlerdir. Bizim araştırmamızda, İBH, CH ve ÜK'da IL-2, IL-4, IL-6 polimorfizmlerinde yukarıda verilen literatür bilgilerinin aksine artma değil azalma şeklinde gerçekleşmiştir.

Orchard ve arkadaşları (2000), İngiliz populasyonlarındaki çalışmalarında ÜK'de IL-4 R'nin allelik frekanslarını % 58-% 95 arasında, Crohn hastalarında ise % 70 ile % 97 arasında olduğunu göstermişlerdir. Biz çalışmamızda Türk toplumundaki ÜK 'de IL-4R allelik frekansın % 60-69 arasında, Crohn hastalarında ise , % 39-50 olarak bulduk.

Ancak, tek bir allelin hastalık oluşumundaki şüphesi haplotip sınıflandırmaları için desteklenmesi zordur (Kromozomlardaki genlerin %2-4'ü haploit yapıdadır). Çünkü sitokin gen kümelerinin HLA gen bölgeleri ile zayıf bağlantılı olabileceği düşünülebilir. HLA' bölgelerindeki benzer haplotiplerin bir çok hastalıklarla ilişkileri son on yılda gösterilmiştir (Rioux. vd., 2001). Çalışmalarımızda HLA gen bölgeleri ile araştırmalar yapılmamıştır.

Nemetz ve arkadaşları (1999) Avrupa populasyonlarında yaptığı araştırmalarda IL-1 β ve IL-1 RA genlerinin etkilerini araştırmışlar, ÜK, CH, ve sağlıklı kontrol gruplarından genotipler PCR metodu ile araştırmışlar ve sonuçta CH'lilerde IL-1 β geni için 1 pozitif allel, IL-1RA geni için iki pozitif allel polimorfizmin % 72 olduğunu, sağlıklı bireylerde ise polimorfizminin %28 olduğu gösterdiler. Carter ve Arkadaşları (2001) Kuzey Avrupada yaşayan Kafkas kökenlilerde yaptıkları araştırmalarda IL-1 RA geni kontrol grubu allel frekansları % 26-% 44, ÜK'de allel frekanslarını % 30 -% 52 olarak gösterdiler. Hacker ve arkadaşlarının (1997) Almanya'daki araştırmalarında IL-1 RA geni için iki allel sağlıklı kontrol gruplarında allel frekanslarını % 27-69, Crohn hastalarında % 28-72 ve ÜK'da % 21-77 olarak tesbit etmişlerdir. Bizim sonuçlarımız Türk toplumundaki vakalarda, IL-1 beta allel frekansları Crohn hastalarında % 50-64, ÜK'de % 77-100, IL-1RA allelleri dağılımları sırasıyla, CH'de % 44-56, ÜK 'de % 92 olduğunu göstermektedir.

Bouma ve arkadaşları ABD'de yaptıkları araştırmalarda TNF- α -308 geninin allel frekanslarını Crohn' hastalarında % 29-% 79 oranında sağlıklı bireylerde % 29-% 65 arasında olduğunu gösterdiler (Bouma, vd. 1998). Biz Crohn hastalarında TNF- α -308 geninin allel frekanslarını % 17-% 44, sağlıklı bireylerde % 13- % 87 arasında bulduk.

Nemetz ve arkadaşlarının (1999) Macar toplumlarından yaptıkları araştırmalarda CH'da IL-1 β 3953 pozisyonundaki polimorfizm allel frekanslarını % 69 ile % 31, ÜK, % 38- 54, kontrol % 26-74 arasında olduğu belirlenmiştir. Sashio ve araştırma ve grubu (2002) tarafından yapılan bir çalışmada CH'da TNF-308 G/G alleli frekansı % 96, -%94, arasındadır. Araştırmalarımız Türk toplumundaki vakalar için, CH'da IL-1 β 3962 pozisyonundaki polimorfizm allel frekanslarını % 39 ile % 67, ÜK, % 54-% 69 kontrollerde % 30-% 70 arasında olduğu belirlenmiştir.

Schulte ve arkadaşlarının (2001) Alman popülasyonlarındaki araştırmalarında TGF β 1 geni – 509 polimorfizm “T” allel frekanslarının kontrol gruplarında % 26-% 46, IBH'de % 34 ile % 96, Crohn hastalarında % 42 ile % 66 ve ÜK'da % 30 ile % 35 olduğu gösterilmiştir. Deneysel sonuçlarımızda Türk toplumundaki vakalar için, TGF β 1 geni kodon polimorfizm “T” allel frekanslarının kontrol gruplarında % 23- 58, IBH'da %14 ile % 46, Crohn hastalarında % 22 ile % 44 ve ÜK'da % 15 ile % 77 olarak bulunmuştur.

Stokkers ve grubunun (1998) IBH'de Hollanda'da RFLP yapmış oldukları analizlerde IL-1 β geni Taq 1 enzimi ile kesimleri sonucunda kontrollerde polimorfizm oranları % 6 ile % 57, CH'da % 4,6 ile % 72, ÜK'de % 7,4 - 42 arasında olduğu tesbit edilmiştir. Araştırmalarımızda restriksiyon enzimleri ile ilgili çalışmalar yapılamamıştır.

Tagore ve arkadaşlarının (1999) Danimarkada IBH'da gruplarda yaptıkları incelemelerde IL-10 – 1082 G alleli frekansları, IBH % 41, ÜK %37, CH, % 46 ve kontrollerde % 51; IL-10-1082A 'da ise IBH'de % 59, ÜK % 63, CH'da % 54 ve kontrollerde % 49 olarak bulunmuştur. İncelemelerimizde Türk toplumundaki IBH'de gruplarda yaptıkları incelemelerde IL-10 – 1082 G alleli frekansları, IBH % 33, ÜK % 44, CH, % 39 ve kontrollerde % 48; IL-10-1082A da ise IBH'de % 33, ÜK % 62, CH'de % 39 ve kontrollerde % 52 olarak bulunmuştur. Romagnani ve arkadaşları (1997) İtalyan popülasyonlarında CH'de yapılan incelemelerde IL-12 sentezinin önemli miktarda arttığını rapor etmişlerdir. İncelemelerimizde Türk toplumundaki CH'de yapılan incelemelerde IL-12 sentezinin değişmediğini belirledik.

Sonuç olarak; Türk toplumunda CARD15/NOD2 geni 3020 insC mutasyonunun sadece Crohn hastalarına özgü olmayıp, ülseratif kolitli hastalarda da bulunduğunu, klinik tanılarda tek başına belirleyici olamayacağını, fakat sitokin gen polimorfizmlerinde artma ve azalma yönündeki değişimlerin inflamatuvar bağırsak hastalarının klinik tanısında kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

5. SONUÇLAR

Çalışma kapsamında 69 İBH'nin ve 50 sağlıklı kontrol gruplarının DNA örneklerinden CARD15/NOD2 geni 3020 İnsC mutasyonu allel spesifik multipleks PCR yöntemiyle çalışıldı. Ülseratif Kolitli hastaların 13 tanesinde CARD15/NOD2 3020 insC mutasyonu heterozigot olarak tespit edildi. Crohn hastalarının ise 7 tanesinde CARD15/NOD2 3020 insC mutasyonu heterozigot olarak tespit edildi. Çalışmaya hiçbir şikayeti olmayan sağlıklı 50 kontrol grubu birey 23 Erkek, 27 Kadın birey dahil edildi. Kontrol gruplarının 2' sinde mutasyon heterozigot olarak tespit edildi. Gerek hasta grubunda gerekse kontrollerde CARD/15 NOD2 insC mutasyonuna homozigot olarak rastlanmadı.

Atmış dokuz İBH'sı ve 50 sağlıklı bireyde 13 sitokin geni araştırılmış olup; sitokin genlerinin polimorfizm dağılımları, **IL 1 RA** mspa 111100T, **IL 4RA** +1902A, **TGF β** kodon 10C ve **TNF α** -308G kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artma gözlenmiştir ($p < 0.05$). **IL 1 α** -889T, **IL β** +3962T, **IL 1RA** mspa 111100T, **IL 4RA** +1902G, **IL 12-** 1188C, **IFN γ** UTR 5644A, **TGF β** kodon 10C, **TGF β** kodon 10T, **TGF β** kodon 10T, **TNF α** -308A, **TNF α** -308G, **IL 2** -330G, **IL 2** 166T, **IL 4** -1098T, **IL 4** -1098G, **IL 4** -590 T, **IL 4** -590 C, **IL 6** -174 C, **IL 6** nt565 G, **IL 10** -819A, **IL 10** -819A , **IL 10** -592A ve **IL 10** -592 A azalma gözlenmiştir ($p < 0.05$). İBH'da incelenen diğer polimorfik bölgelerde ise kontrol gruplarına göre herhangi bir anlamlı istatistiksel değişim gözlenmemiştir. Araştırmamızda, Cyler Pleyt 200096 sistemiyle yapılan analiz değerlendirmeleri sonucunda tüm primerler dikkate alınırca, sitokin polimorfizm değişimleri % 56 ve bunlardan % 48'i kontrollere göre azalma % 8 'nin ise artma olduğu tespit edilmiştir (Tablo 13).

On sekiz Crohn Hastası ve 50 sağlıklı bireyde, aynı sitokin genleri incelenmiş ve sitokin polimorfizmleri, **IL-1** -1098T, **IL-4RA** +1902A ve **TNF-α** 308A; kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artma gözlenmiştir ($p < 0.05$). **IL-1β** +3962C, **IL-1RA** mspa111100T, **IL-4RA** +1902A, **IFN-UTR5644A**, **TGFβ** kodon 10G, **TGFβ**-kodon 10T, **TNF-α** -308A, **TNFα** -308, **IL-2-330G**, **IL-2** 166G, **IL-4** -1098G, **IL-4** -590T, **IL-4** -590C, **IL-6** -174G, **IL-6** nt565A, **IL-10** 819C, **IL-10** -819T ve **IL-10** -592A azalma gözlenmiştir ($p < 0.05$). Diğer sitokin gen polimorfizmlerinde ise, kontrol

gruplarına göre herhangi bir anlamlı istatistiksel değişim gözlenmemiştir. Araştırmamızda, Cyclex Pleyt 200096 sistemiyle yapılan analiz değerlendirmeleri sonucunda tüm primerler dikkate alınırca, sitokin polimorfizim değişimleri % 44 ve bunlardan % 38'i kontrollere göre azalma % 6 'nin ise artma olduğu tespit edilmiştir (Tablo 14).

Elli bir ÜK 'li vaka ve 50 sağlıklı bireyde, sitokin gen polimorfizmi ile ilgili sonuçlarımız, 13 sitokin geni için , **IL β -511C, IL β -511T, IL β+3962T, IL 1 RA mspa 111100C, IL 4RA +1902G, IL-12-1188C, TGF β kodon 10C ve TNF α -308G** kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artma gözlenmiştir ($p < 0.05$). **IL 1 α -889C, IFN γ UTR 5644A, TGF β kodon 10C, TGF β kodon 10T, TNF α -308A, TNF α -308G, IL 2 +166G, IL 4 -1098G, IL 4 -1098G, IL 4 -590C, IL 6 nt565, IL 10 -592A**, azalma gözlenmiştir ($p < 0.05$). ÜK'li hastalarda incelenen diğer polimorfik bölgelerde ise, kontrol gruplarına göre anlamlı bir istatistiksel değişim gözlenmemiştir. Araştırmamızda, Cyclex Pleyt 200096 sistemiyle yapılan analiz değerlendirmeleri sonucunda tüm primerler dikkate alırsa, sitokin polimorfizim değişimleri % 42 ve bunlardan % 25'i kontrollere göre azalma % 17 'de ise artma olduğu tespit edilmiştir (Tablo 15).

6. ÖNERİLER

Bu çalışmalar Trabzon ve Kocaeli illerinden farklı hastanelerde inflamatuvar bağırsak hastalığı tanısı almış, hastalardan ilgili akademik birimlerin yardımıyla alınan kan örneklerinden izole edilen DNA'lardan yapılmıştır. Çalışmalar sonucunda, hastalara ve kontrol grubuna ait CARD15/NOD2 geni 3020insC mutasyonunun taşıyıp taşımadıkları incelenmiştir. Ayrıca, aynı hastalık grubunda sitokin gen polimorfizmleri Cyler Pleyt 200096 sistemiyle yapılan analiz değerlendirmelerinde polimorfizmlerin teknik imkanlar ölçüsünde belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar, Türk insanının bu mutasyonlara ait örneklem bir profilini temsil etmektedir. Elde edilen mutasyon dağılımları, Trabzon ve Kocaeli'yi temsil ettiğinden, daha sağlıklı sonuçlar elde etmek için diğer bölgelerde de İnflamatuvar Bağırsak hastalıkları ile benzer incelemelerin yapılması gerekmektedir. Çalışmanın planlanması ve seyri sırasında iki farklı mutasyon tarama metodu kullanılmıştır. Yakın gelecekte yapılacak farklı mutasyon analizleri ve yüksek teknoloji ile Türk toplumunun genomu hakkında daha fazla bilgi sahibi olabileceğiz. Bu manada sağlık alanında moleküler hastalıkların tanısında doğru kararlar verilmesi sağlanarak toplumumuz daha doğru bilgiler ile aydınlatılacaktır. Literatürler incelendiğinde altıncı kromozoma ağırlıklı olmak üzere farklı kromozomlarda lokuslara yerleşen MHC III sınıf sitokin genlerinin sayıları ve alt grupları da dikkate alındığında yüzden fazla olduğunu görmekteyiz. Aynı zamanda sitokin genleri polimorfik genler olup uzunluklarının 1,5 –5 kb arasında değişiklik gösterdiği bilinmektedir. Biz incelemelerimizde 13 farklı genin, 150-850 baz çifti fragment gen primerlerini kullandık. Bu alanda DNA bankaları oluşturularak daha çok araştırma yapılması gerektiği düşüncemiz her zaman vardır. Türk toplumundaki sitokin gen polimorfizmlerinin dağılımlarının tanımlanması inflamasyon sonucu oluşan kanser hastalıkları, otoimmün hastalıklar ve kompleks genetik hastalıkların tanılarında katkıda bulunacaktır. Genom taramaları genlerin kromozomlar üzerindeki yerleşimleri hakkında da bilgi verecektir.

CARD15/NOD2 geninde tanımlanan 3020 insC mutasyonundan tanımlanan başka mutasyonlar da mevcuttur. DNA sekans analizleri ve farklı metotlar kullanarak, CARD15/NOD2 genindeki diğer mutasyonların Türk toplumu için dağılımları tespit

edilmelidir. Her mutasyonun sitokin gen polimorfimleri ile bağlantılarının olup olmadığının belirlenmesini araştırmalarımızın devamı niteliğinde düşünmekteyiz.



7. KAYNAKLAR

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. ve Pober, J.S., 2000. Cellular and Molecular Immunology. W.B. Saunders Company, New York, London, St.Louis, Sidney.
- Ahmad, T., Armuzzi, A, Bunce, M., Mulcahy-Hawes, K., Marchall, S.E., Orchard, T.R., Crawshaw, J., Large, O., de Silva ,A., Cook ,J.T., Barnardo, M., Cullen, S., Welsh, K.I. ve Jewell, D.P., 2002. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease, Gastroenterology., 122,854-856
- Ahmad, T., Satsangi, J., MCGovern, D., Bunce, M.ve Jewell, D.P., 2001. Review Article: The Genetic of İnflammatory Bowel Disease, Aliment Pharmacol Ther., 15, 731-748.
- Akolkar, P.N., Akolkar, B.G., Lin, X.Y., Zhou, Z., Daly, M., Katz, S., Levine, J., Present, D., Gelb, B., Desnick, R., Mayer, L. ve Silver, J. , 2001. The IBD1 locus for susceptibility to Crohn's disease has a greater impact in Ashkenazi Jews with early onset disease, American Journal of Gastroenterology., 96, 1127-1132.
- Andres, P.G. ve Friedman, LS., 1999. Epidemiology and the natural course of inflammatory bowel disease, Gastroenterol Clin North Am. , 28, 255-281.
- Andus ,T. ve Gross, V., 2000. Etiology and pathophysiology of inflammatory bowel disease environmental factors, Hepatogastroenterology , 47, 29-43.
- Annese, V., Andreoli, A., Andriulli, A., Gionchetti, P., Lationa, A., Lombardi, G., Piepoli, A., Poulain., D., Sendid, B. ve Colombel, J.F., 2001. Familial Expression of Anti-Saccharomyces Cerevisiae Mannan Antibodies in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis : A GISC Study, Am. J. Gastroenterology., 96, 2606-2615.
- Annese, V., Andreoli, A., Astegiano, M., Campieri, M., Caprilli, R., Cucchiana, S., Inca, R.D., Reigler, G., Valpiani,D., Giaccari, S., Iaquinto, G., Lombardi, G., Napolitano, G., Pera, A., Reigler, G. ve Andriulli, A., 2002. Clinical Features in Familial Cases of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis in Italy : A GISC Study. Am. J. Gastroenterology., 96 , 3347- 3957.
- Arend, W.P. , 2002. The Balance Between IL-1 and IL-1Ra in Disease, Cytokine and Growth Factor Reviews., 13, 323-340.
- Autschbach, F., Giese, T., Gassler, N., Sido, B., Heuschen, G., Heuschen, U., Zuna, I., Schulz, P., Weckauf, H., Berger, I., Otto, H.F. ve Meuner, S.C., 2002. Cytokine / Chemokine Messenger RNA Expression Profiles in Ulcerative colitis and Crohn's Disease, Virchows Arch., 441, 500-513.

- Bernstein, C.N., Blanchard, J.F., Rawsthorne, P. ve Wajda, A., 1999. Epidemiology of Crohn's disease and ulcerative colitis in a central Canadian province: a population-based study, Am J Epidemiol. , 149, 916-924.
- Bianchi, M.B., Vecchi, M. ve Franchis, R., 1999. The Role of autoantibody determination in Inflammatory Bowel Disease, Tech. Coloproctol., 3 , 185-188.
- Bidwell, J.L., Smith, A.J.P., Keen, L.J., Gallagher, G., Kimberly, R., Huizinga, T., McDermott, M.F., Oksenberg, J., McNicholl, J., Pociot, F., Hardt, C., Alfonso, S.D., 2001. Cytokine gene polymorphism in human disease: On-line databases, Supplement 1, Genes and Immunity., 2, 61-70.
- Bonen, D.K. ve Cho, J.H. , 2003a. The Genetic of Inflammatory Bowel Disease. Gastroenterology., 124, 521-536.
- Bonen, D.K., Ogura, Y., Nicolae, D.L., Inohara, N., Saab, L., Tanabe, T., Chen, F.F., Foster, S.J., Duerr, R.H., Brant, S.R., Cho, J.H. ve Nunez, G. 2003b. Crohn's Disease – associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolisaccharide and peptidoglycan, Gastroenterology., 124: 140-146.
- Bonen, D.K., Nicolae, D.I., Moran, T., Turkyilmaz, M.A, Ramos, R, Karaliukas, R., Brant, S.R., Duerr, R.H., Kirschner, B.S., Hanauer, S.B. ve Cho, J.H., 2002. Racial differences in NOD2 variation: characterization of NOD2 in African-Americans with Crohn's disease (abstr), Gastroenterology., 122 (Suppl):A-29.
- Bouma, G., Crusius, B.A., Garcia-Gonzalez, M.A., Meijer B.U.G.A., Hellemans, H.P.R., Hakvoort, R.J., Schreuder, G.M., Kostense, P.J., Meuwissen, S.G.M. ve Pena, A.S., 1999. Genetic Marker in Clinically Well Defined Patients with Ulcerative Colitis (U.C) Clin, Exp. Immunol., 115 , 294-300.
- Bouma, G., Poen, A.C., Garcia-Gonzalez, M.M., Schreuder, G.M., Felt-Bersma, R.J.F., Meuwissen, S.G.M. ve Pena, A.S., 1998. HLA-DRB1*03, but not the TNF-308 Promoter Gene Polymorphism, Confer Protection Against Fistulising Crohn's Disease, Immunogenetics., 47 , 451-455.
- Brant, S.R, Panhuysen, C.I., Bailey-Wilson, J.E., Rohal, P.M, Lee, S., Mann, J., Ravenhill, G., Kirschner, B.S., Hanauer, S.B., Cho, J.H. ve Bayless, T.M., 2000. Linkage heterogeneity for the IBD1 locus in Crohn's disease pedigrees by disease onset and severity, Gastroenterology. , 119, 1483-1490.
- Breslin, N.P., Todd, A., Kilgallen, C. ve Morain, C.D., 1997. Monozygotic Twins with Crohn's Disease and Ulcerative Colitis: A Unique Case Report, Gut., 41 , 557-560.
- Brignola, C., Belloli, C., Ardizzone, S., Astegiano, M., Cottone, M. ve Trallori, G., 2000. The Relationship Between Heritability and Smoking Habit in Crohn's Disease, Am. J. Gastroenterology., 95 , 9270-9274.

- Brown, S.M., 2000. *Bioinformatics : A Biologist's Guide to Biocomputing and the Internet*, Eaton Publishing , New York, NY, USA.
- Canavaugh, J.A., Adams, K.E., Quak, E.J., Byrce, M.E., O'Collaghan, N.J., Rodgers, H.J., Magarry, G.R., Butle -Cardon, L.R., Jewell, D.P. ve Van Heel, D., 2001. Analysis of the IBD5 locus and potential gene – gene interaction in Crohn's disease, Gut., 52, 541-546.
- Cariappa, A., Sands, B., Forcione, D., Finkelstein, D., Podolsky, D.K. ve Pillai, S., 1998. Analysis of MHC Class II DP, DQ and DR Alleles in Crohn's Disease, Gut., 43, 210-215.
- Carter, M.J., Di Giovine, F.S., Jones. S., Mee, J., Camp. N.J., Lobo, A.J. ve Duff, G.W. 2001. Association of the Interleukin 1 Receptor Antagonist Gene with Ulcerative Colitis in Northern European Caucasians, Gut., 48 , 461-467.
- Cho, J.H., 2003. Significant Role of Genetics in IBD: The NOD2 Gene, Rev. Gastroenterological Disorders., 18, 18-22.
- Cho, J.H., Nicolae, D.L., Ramos, R., Fields, C., Canavaugh, J.A., Vermeire, S., Rioux, J.D., Hugot, J.P., Paavola, P., Annese, V., Van Heel, D., Brant, S.R., Yang, H., Duerr, R.H. ve Daly, M.J., 2001. International Collaboration Provides Convincing Linkage Replication in Complex Disease Through Analysis of a Large Pooled Data Set : Crohn Disease and Chromosome 16, Am. J. Hum. Genet., 68 ,1165-1171.
- Cho, J.H., 2000. The NOD2 Gene in Crohn's Disease: Implication for Future Research in to Genetic and Immunology of Crohn's Disease, Inflammatory Bowel Diseases., 7(3) , 271-275.
- Cho, J.H., Nicolae, D.L., Gold, L.H., Fields, C.T., LaBuda, M.C., Rohal, P.M., Pickles, M.R., Qin, L., Fu, Y., Mann, J.S., Kirschner, B.S., Jabs, E.W., Weber, J., Hanauer, S.B., Bayless, T.M. ve Brant, S.R., 1998. Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q, and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1, Proc Natl Acad Sci ,95: 7502-7507.
- Craven, N.M., Jackson, C.W., Kirby, B., Perrey, C., Pravica, V., Hutchinson, I.V. ve Griffiths, C.E.M., 2001. Cytokine gene polymorphism in psoriasis, British journal of Dermatology., 144, 849-853.
- Curran, M.E., Lau ,K.F., Hampe, J., Schreiber, S., Bridger, S., Macpherson, A.J, Cardon, L.R., Sakul, H., Harris, T.J., Stokkers, P., Van Deventer, S.J., Mirza, M., Raedler, A., Kruis, W., Meckler ,U., Theuer, D., Hermann, T., Gionchetti, P., Lee, J., Mathew, C. ve Lennard-Jones, J.,1998. Genetic analysis of inflammatory bowel disease in a large European cohort supports linkage to chromosomes 12 and 16, Gastroenterology. , 115, 1066-1071.

- Cuthbert, A.P., Fisher, S.A., Mirza, M.M., King, K., Hampe, J., Croucher, J.F., Mascheretti, S., Sanderson, J., Forbes, A., Mansfield, J., Schreiber, S., Lewis, C.M. ve Mathew, C.G. , 2002. The Contribution of NOD2 Gene Mutation to the Risk and Sife of Disease in Inflammatory Bowel Disease, Gastroenterology, 122, 867-874.
- Davanhell,D.P.M.ve Jewaell, T.D., 2001. NOD2 (CARD15), the First Susceptibility Gene for Crohn's Disease, Gut, 49 , 752-754.
- Donaldson, P., Agarwal, K., Craggs, A. Craig, W., James, O. ve Jones, D., 2001. H.L.A. and Interlukein Gene Polymorphism in Primary Billiary Cirrhosis : Association with Disease Progression and Disease Susceptibility, Gut, 48 , 397- 402.
- Duerr, R.H., Barmada, M.M., Zhang, L., Davis, S., Preston, R.A., Chensny, L.J., Brown, J.L., Dunn, G.D., Weeks, D.E. ve Aston,C.E., 1998. Linkage, and Association Between Imflamatory Bowel Disease and a Locus on Chromosome 12, Am. J. Hum. Genet., 63 , 95-100.
- Duerr, R.H., Barmada, M.M., Zhang, L., Pfutzer, R. ve Weeks, D.E., 2000. High Density Genome Scan in Crohn Disease Shows Confirmed Linkage Chromosome 14q 11-12, Am. J. Hum. Genet., 66 , 1857-1862.
- Dunn, D.K., Boursier, L., Hackett, M., Spencer, J. ve Biased J. 1999. Usage in Plasma Cell Immunoglobulin Gene Sequences from Colonic Mucosa in Ulcerative Colitis but not in Crohn's Disease, Gut, 44 , 382- 386.
- Eric, B. ve Staros, M.D. , 2003. Molecular discoveries alter our view of inflammatory bowel disease, Am. J. Clin. Pathol., 119: 524-539.
- Erlich, H.A., 1992. PCR Technology Principles and Applications for DNA Amplification, W.H. Freeman and Company, New York.
- Farrel, R.J. ve Peppercorn, M.A., 2002. Ulcerative Colitis, Lancet, 359 , 331-340.
- Gelehrter, T.D.ve Collings, F.S., 1998. Principles of Medical Genetics, Williams and Wilkings, Baltimore, London, U.S.A .
- Hacker, U.T., Gomolka, M., Keller, E., Eigler, A.,Folwaczny, C., Fricke, H., Albert, E., Loeschke, K. ve Enders, S., 1997. Lack of Association Between an Interlukein-1 Receptor Antagonist Gene Polymorphism and Ulcerativ Colitis, Gut, 40 , 623-627.
- Hampe, I., Grebe, J., Nikolaus. S., Solberg, C., Croucher, P.I.P., Mascheretti, S., Jahsen, J., Moum, B., Klump B., Krawczak, M., Mirza, M.M., Foelsch, U.R., Vatn, M. ve Schreiber, S., 2002a. Association of NOD2 (CARD15) Genotype With Clinical Course of Crohn's Disease : A Cohort Study, Lancet, 359 , 1661-1665.

- Hampe, J., Frenzel, H., Mirza, M.M., Croucher, P.J.P., Cuthbert, A., Mascheretti, S., Huse, K., Platzer, M., Britger, S., Meyer, B., Nürnberg, P., Stokkers, P., Krawczak, M., Mathew, C.G., Curran, M. ve Schreiber, S., 2002b. Evidence for a NOD2 independent susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16 p, Genetics., 99, 321-326.
- Hampe, J., Cuthbert, A., Croucher, P.J.P., Mirza, M.M., Mascheretti, S., Fisher, S., Frenzel, H., King, K., Hasselmeyer, A., MacPherson, A.J.S., Bridger, S., Van Deventer, S., Forbes, A., Nikolaus, S., Jones, J.E.L., Foels, U.R., Krawczak, M., Lewis, C. Scheiber, S. ve Mathew, C.G., 2001a. Association Between Insertion Mutation in NOD2 Gene and Crohn's Disease in German and British Populations, Lancet., 357, 1925-1928.
- Hampe, J., Lynch, N.J., Daniels, S., Bridger, S., MacPherson, A.J.S., Stokkers, P., Forbes, A., Lennard-Jones, J.E., Mathew, C.G., Curran, M.E. ve Schreiber, S. 2001b. Fine Mapping of the Chromosome 3p susceptibility Locus in Inflammatory Bowel Disease. Gut., 48, 194-198.
- Hampe, J., O'Lavesen, M.G., Mirza, M.M., Lewis, C.M., Bridger, S., Teare, d., Easton, D.F., Hermann, T., Scott, G., Hirst, J., Sanderson, J., Hodgson, S.V., Lee, J., Macpherson, A., Schreiber, S., Lennard-Jones, J.E., Curran, M.E. ve Mathew, C.G., 2000. Analysis of Single-Nucleotide Polymorphism in the Interleukin-4 Receptor Gene for Association with Inflammatory Bowel Disease, Immunogenetics., 51, 1-9.
- Hampe, J., Schreiber, S., Shaw, S.H., Lau, K.F., Bridger, S., MacPherson, A.J.S., Cardon, L.R., Sakul, H., Harris, T.J.R., Buckler, A., Hall, J., Stokker, P., Van Deventer, S.J.H., Nürnberg, P., Mirza, M.M., Lee, C.J.W., Jones, E.L., Mathew, C.G. ve Curran, M.E, 1999a. A Genome Analysis Provides Evidence for Novel Linkages in Inflammatory Bowel Disease in Large European Cohort, Am. J. Hum. Genet., 64, 808-816.
- Hampe, J.J., Shaw, S.H., Saiz, R., Leysens, N., Lanterman, A., Mascheretti, S., Lynch, N.J., MacPherson, A.J.S., Bridger, S., VanDeventer, S., Stokker, P., Morin, P., Mirza, M.M., Forbes, A., Jones, J.E.L., Mathew, G.G., Curran, M.E. ve Schreiber, S, 1999b. Linkage of Inflammatory Bowel Disease to Human Chromosome 6P, Am. J. Human. Genet., 65, 1647-1655.
- Hanada, T. ve Yoshimura, A., 2002. Regulation of cytokine signaling and Inflammation., Cytokine & Growth Factor Reviews., 13: 413-421.
- Hassan, M.I., Aschner, Y., Manning, C.H., Xu, J. ve Aschner, J.L., 2003. Racial differences in selected cytokine allelic and genotypic frequencies among healthy pregnant women in North Carolina. Cytokines., 21:10-16.
- Haukim, N., Bidwell, J.L., Smith, A.J.P., Keen, L.J., Gallagher, G., Kimberly, R., Huizinga, T., McDermott, M.F., Oksenberg, J., McNicholl, J., Pociot, F., Hardt, C., Alfonso, S.D., 2002. Cytokine gene polymorphism in human disease: On-line databases, Supplement 2, Genes and Immunity., 3, 313-330.

- Heliö, T., Halme, L., Lappalainen, M., Fodstad, H., Paavolasakki, P., Turunen, U., Förkkilä, M., Krusius, T. ve Kontula, K., 2003. CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease, Gut., 52, 558-562.
- Hendrickson, B.A., Gokhale, R. ve Cho, J.H., 2002. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease, Clin Microbiol Rev., 15, 79-94.
- Hill, A.V.S., 2001. Immunogenetics and Genomics, Lancet., 357, 2037-2041.
- Hoffmann, S.C., Stanley, E.M., Cox, E.D., Di Mercurio, B.S., Koziol, E.D., Harlan, A.D., Kirk, D., Blair, J.B., 2002. Ethnicity greatly influences cytokine gene polymorphism distribution, American Journal of Transplantation., 2, 560-567.
- Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J.P., Belaïches, J., Almer, S., Tysk, C., Morain, C.A.D. Gassul, M., Binder, V., Finkel, Y., Cartot, A., Modigliani, R., Puig, P.L., Rousseau, C.G., Macry, J., Colombel, J.F., Sahbatou, M. ve Thomas, G., 2001. Association of NOD2 Leucine-rich Repeat Variants with Susceptibility to Crohn's Disease, Nature., 411, 599-603.
- Hugot, J.P., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Olson, J.M., Lee, J.C., Beaugerie, L., Naom, I., Dupas, J.L., Van Gossum, A., Orholm, M., Bonaiti Hugot, J.P., Laurent-Puig, P., -Pellie, C., Weissenbach, J., Mathew, C.G., Lennard-Jones, J.E., Cortot, A., Colombel, J.F. ve Thomas, G., 1996. Mapping of susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16, Nature., 379, 821-823.
- Hugot, J.P., Zouali, H., Lesage, S. ve Thomas, G., 1999. Etiology of the Inflammatory Bowel Diseases, Int.J. Colorect. Dis., 14, 2-9.
- Hutchinson, I.V., Turner, D., Sankaran, D., Awad, M., Pravica, V., Sinnott, P., 1998. Cytokine genotype and allograft rejection: Guidelines for immunosuppression, Transplantation Proceedings., 30:3991-3992.
- Inohara, N., Koseki, T., Del Peso, L., Hu, Y., Yee, C., Chen, S., Carrio, R., Merino, J., Liu, D., Ni, J. ve Nunez, G., 1999. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor- κ B, J Biol Chem, 274, 14560-14567.
- Inohara, N., Ogura, Y., Chen, F.F., Muto, A. ve Nunez, G. 2001. Human NOD1 Confer Responsiveness to Bacterial Lipopolysaccharides, J. Biol. Chemistry., 276 : 2551-2554.
- Inoue, N., Tamura, K., Kinouchi, Y., Fukuda, Y., Takahashi, S., Ogura, Y., Inohara, N., Nunez, G., Kishi, Y., Koike, Y., Shimosegawa, T. ve Shimogama, T., 2002. Lack of Common NOD2 Variants in Japanese Patients with Crohn's Disease, Gastroenterology., 123, 86-91.

- Itoh, J., De La Motte, C., Strong, S.A., Levin, A.D. ve Flocchi, C. , 2001. Decreased Bax Expression by Mucosal T Cells Favour Resistance to Apoptosis in Crohn's Disease, Gut., 49 , 35-41.
- Jewell, D.P., 1998. Ulcerative Colitis and Crohn Disease Susceptibility Genes and Clinical Patterns, J. Gastroenterology., 33 , 458-462.
- Kalay, E., 2002. Otozomal Resesif Non-Sendromik İşitme Kayıplı Bireylerde GJB2 Gen Mutasyonlarının SSCP ve DNA Dizi Analizi ile Belirlenmesi, Doktora Tezi, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Karban, A., Eliakim, R ve Brant, S.R., 2002. Genetic of inflammatory bowel disease, İMAJ., 4, 798-802.
- Kato, J., Mogi, Y., Kohgo, Y., Takimoto, R., Kobune, M., Hisai, H., Nakamura, T., Takada, K. ve Nittsu, Y., 1998. Suppressive Effect of Ethanol on the Expression of Hepatic Asialoglycoprotein Receptors Augmented by Interleukin-1 β , Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor- α , J. Gastroenterology., 33 , 855-859.
- Kato, T., Rabenau, K., Corradino, S., Brant, S.R., Espinosa, R., LeBeau, M., Hanauer, S.B., Bodzin, J. ve Bonen, D.K. , 2000. Linkage and Linkage Disequilibrium in Chromosome Band 1p36 American Chaldeans with Inflammatory Bowel Disease, Hum. Mol. Genet., 9 , 1425-1432.
- Kelly, B.L. ve Locksley, R.M., 2000. Coordinate regulation of the IL-4, IL-13, IL-5 Cytokine cluster in Th2 clones revealed by allelic expression patterns, American Assoc. Immunol., 23, 2982-2986.
- Klug, W.S. ve Cummings, M.R., 2000. Concepts of Genetic, Prentice Hall, New Jersey.
- Kosiewicz, M.M., Nast, C.C., Krishnan, A., Rivera-Nieves, J., Moskaluk, C.A., Matsumoto, S., Kozaiwa, K. ve Cominelli, F., 2001. Th1-type responses mediate spontaneous ileitis in a novel murine model of Crohn's disease, J Clin Invest, 107, 695-702.
- Lawrance, I.C., Flocchi, C. ve Chakravarti, S., 2001. Ulcerative colitis and Crohn's disease: distinctive gene expression profiles and novel susceptibility candidate genes, Hum Mol Genet ,10, 445-456.
- Lechler, R. ve Warrens, A. , 2000. HLA in Health and Disease, Academic Press, U.K.
- Lesage, S., Zouali, H., Colombel, J.F., Belaiche, J., Cezard, J.P., Tysk, C., Almer, S., Gassull, M., Binder, V., Chamailard, M., Le Gall, I., Thomas, G. ve Hugot, J.P. 2000. Genetic Analysis of Chromosome 12 Loci in Crohn's Disease, Gut., 47 , 787-791.

- Lesage, S., Zoula, H., Cezard, J.P., Colombel, J.F., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Modigliani, R., Rousseau, C.G., Macry, J., Merlin, F., Chamailard, M., Jannat, A.S., Thomas, G. ve Hugot, J.P., 2002. CARD15/NOD2 Mutational Analysis and Genotype – Phenotype Correlation in 612 Patients with Inflammatory Bowel Disease, Am. J.Hum. Genet., 70, 845-849.
- Linde, K., Patrick, P.C., Boor, B.S., Jearine, J., Kuipers, J., Wilson, J.H. ve Felix, W.M. , 2003. CARD15 and Crohn's Disease: Healthy Homozygous Carriers of the 3020 INSC Frameshift Mutation, The American Journal of Gastroenterology., 98, 613-618.
- Loftus, E.V. J., Silverstein, M.D., Sandborn. W.J., Tremaine, W.J., Harmsen .W.S. ve Zinzmeister, AR., 1998. Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence, and survival, Gastroenterology ,114, 1161-1168.
- Lombardi, M.L., Pirozzi, G., Luongo, V., Mercurio, O., Pace, E., Vecchio, G.B., Cozzolino, A., Errico, S., Fusco, C. ve Castiglione, F., 2001. Crohn Disease: Heterogeneity Revealed by HLA Genotyping, Human Immunology., 62 , 701-704.
- Louis, E., Peeters, M., Franohimont, D., Seidel, L., Fontana, F., Demolin, G., Croes, F., Dupont, P., Davin, L., Omri, S., Rutgeerts, P. ve Belaiche, J., 2000. Tumour Necrosis Factor (TNF) Gene Polymorphism in Crohn's Disease : Influence on Disease Behaviour, Clin. Exp. Immunology., 110 , 64-70.
- Louis, E., Satsangi, J., Roussomoustakaki, M., Parkes, M., Fanning, G., Weish, K., Jewell, D., 1996. Cytokine gene polymorphism in inflammatory bowel disease,Gut.,39,705-710.
- Mayer,L., 2000. IBD:Immunologic research at the Mount Sinai Hospital, The Mount Sinai Journal of Medicine., 67, 208-213.
- Meenagh, A., Williams, F., Ross, O.A., Patterson, C., Gorodezky, C., Hammod, M., Leheny, W.A., Middleton, D., 2002. Frequency of cytokine polymorphism inpopulations from Western Europe,Africa,Asia,the Middle East and South America, Human Immunology., 63, 1055-1061.
- Miceli-Richard, C., Zouali, H., Lesage, S., Thomas ,G., Hugot, J.P., Said-Nahal, R., Breban, M.,2002, CARD15/NOD2 analyses in spondylarthropathy, Arthritis Rheum ,46, 1405-1406.
- Mitchison, N.A., 2001. Polymorphism in regulatory gene sequences, Genome Biology., 2, 1-5.
- Mullis, K., Falaona, F.ve Scharf, S., 1986. Specific enzymatic amplication of DNA in vitro the polymerase chain reaction, Cold Spring Harbour Symposium of Quantitative Bilology., 51, 263-273.

- Munkholm, P., Langhoiz, E., Nielsen, O.H., Kreiner, S. ve Binder, V., 1992. Incidence and prevalence of Crohn's disease in the county of Copenhagen, 1962-87: a sixfold increase in incidence, Scand J Gastroenterol ,27, 609-614.
- Murillo, L. Bart, J., Crusius, A., VanBodegraven, A.A., Alizadeh, B.Z. ve Pena, A.S., 2002. CARD15 Gene and Classification of Crohn's Disease, Immunogenetics, 54, 59-61.
- Negoro, K., Kinouchi, Y., Hiwatashi, N., Takahashi, S., Takagi, S., Satoh, J., Shimosegawa, T. ve Toyoto, T., 1999. Crohn's disease is associated with novel polymorphisms in the 5'-flanking region of the tumor necrosis factor gene. Gastroenterology , 117, 1062-1068.
- Negoro, K., McGovern, D.P.B., Kinouchi, Y., Takahashi, S., Lench, N.J., Shimosegawa, T., Carey, A., Nenmetz, A., Köpe, A., Molnar, T., Kovacs, A., Feher, J., Tulassay, Z., Nagy, F. ve Pena, A.S., 2003. Significant differences in the interleukin-1 beta and IL-1RA Gene polymorphism in a Hungarian population with IBD, Scand J. Gastroenterol., 34, 174-179.
- Nemetz, A., Nosti-Escanilla, M.P., Molnar, T., Köpe, A., Kovacs, A., Feher, J., Tulassay, Z., Nagy, F., Garcia-Gonzalez, M.A. ve Pena, A.S., 1999. IL1B Gene Polymorphism Influence the Course and Severity of Inflammatory Bowel Disease, Immunogenetics, 49 , 527-531.
- Neut, C., Bulois, P., Desreumaux, P., Membre, J.M., Lederman, E., Gambiez, L., Cortot, A., Quandalle, P., van Kruiningen, H. ve Colombel, J.F., 2002. Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease, Am J Gastroenterol ,97, 939-946.
- Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duer, R.H., Achkar, J.P., Brant, S.R., Bayless, T.M., Kirschner, B.S., Hanauer, S.B., Nunez, G. ve Cho, J.H., 2001a. A Frameshift Mutation in NOD2 Associated with Susceptibility to Crohn's Disease, Nature, 411 , 603-606.
- Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F.F., Yamaoka, S. ve Nunez, G., 2001b. NOD2 a NOD1/A paf-1 Family member That Is Restricted to Monocytes and Activates NF- κ B, The Journal of Biological Chemistry, 276, 4812-4818.
- Orchard, T.R., Satsangi, J., Van Heel, D., Jewell, D.P., 2000. Genetic of Inflammatory Bowel Disease: Reappraisal, Scand. J. Immunol., 51, 10-17.
- Papadakis, K.A. ve Targan, S.R., 2000. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease, Annu. Rev. Med., 51, 289-298.
- Parkes, M., Satsangi, J., Jewell, D.P. ve Bell, J.I., 1998. Genetic of Inflammatory Bowel Disease, Clinical Science, 94, 473-478.

- Pasternak, J.J., 1999. Human Molecular Genetics, Fitzgerald Science Press, Bethesda, Maryland, U.S.A.
- Pena, A.S., Bart, J. ve Crusius, A. 1998. Genetic of Inflammatory Bowel Disease : Implications for the Future, World J. Surg., 22 , 390-393.
- Pera, A., Sostegni, R., Daperno, M., Ercola, E., Laudi, C., Rocca, R., Rigazo, C., Astegiano, M., Rocca, G., 2000. Genotype- Phenotype Relationship in Inflammatory Bowel Disease Eur, 1. Int. Med., 11 , 204-209.
- Perrey, C., Pravica, V., Sinnott, P.J., Hutchinson, I.V., 1998. Genotyping for polymorphism in interferon gamma, interleukin-10, TGF beta-1 and TNF-alfa genes: a technical report, Transplant Immunology, 6, 193-197.
- Petronis, A. ve Petroniene, R., 2000. Epigenetic of Inflammatory Bowel Disease, Gut., 47, 302-306.
- Pimentel, M.D., Chang, B.A., Evelyn, J., Chow, B.A., Siamak, M.D., Viorelia, M.D., Stephan, R., Targan, M.D. ve Lin, C. , 2000. Identification of Prodromal Period in Crohn's Disease but Not-ulcerative Colitis, Am. J. Gastroenterology., 95 , 2157-2157.
- Present, D.H., Rutgeerts, P., Targan, S., Hanauer, S.B., Mayer, L., van Hogezaand, R.A., Podolsky, D.K., Sands, B.E., Braakman ,T., Dewoody ,K.L., Schaible, T.F. ve Van Deventer, S.J., 1999. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease, N Engl J Med ,340, 1398-1405.
- Pavli, P., Wilson, S.R. ve Callen, D.F., 2003. CARD15/NOD2 Risk alleles in development of Crohn disease in the Australian population, Annals of Human Genetics.,67,35-41.
- Rapley, R. ve Walker, J.M. , 1998. Molecular Biomehtods Handbook Humana Press, Totowa, New Jersey, U.S.A.
- Rapley, R. ve Walker, J.M., 2000. The Nucleic Acid Protocol Handbook Humana Press, Totowa, New Jersey, U.S.A.
- Reinecker, H.C., Steffen, M., Witthoef, T., Pflueger, I., Schreiber, S., MacDermott, R.P. ve Raedler, A., 1993. Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease, Clin Exp Immunol., 94,174-181.
- Rioux, J.D., Daly, M.J., Silverberg ,M.S., Lindblad, K, Steinhart, H., Cohen, Z., Delmonte, T., Kocher, K, Miller, K., Guschwan, S., Kulbokas, E.J., O'Leary, S., Winchester, E., Dewar, K., Green, T., Stone, V., Chow, C., Cohen, A., Langelier, D., Lapointe, G., Gaudet, D., Faith ,J., Branco, N., Bull, S.B., McLeod, R.S., Griffiths, A.M., Bitton, A, Greenberg ,G.R., Lander, E.S., Siminovitch, K.A. ve Hudson, T.J., 2001. Genetic variation in the 5q31

- cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease, Nat Genet. , 29 , 223-228.
- Rioux, J.D., Silverberg, M.S., Daly M.J., Steinhart, A.H., Mcleod, S.R., Griffiths, A.M., Green, T., Brettin, T.S., Stone, V., Bull, S.B., Bitton, L., Williams, C.N., Greenberg, G.R., Cohen, Z, Lander, E.S., Hudson, T.J. ve Siminovitch, K.A., 2000. Genomewide Search in Canadian Families with Inflammatory Bowel Disease Reveals Two Novel Susceptibility Loci, Am. J. Hum. Genet., 66 , 1863-1870.
- Rogler, G. ve Andus, T., 1998. Cytokines in Inflammatory Bowel Disease, World J. Surg. 22 , 382-389.
- Romagnani, P., Annunziato, F., Baccari, M. ve Parronchi, P., 1997. Cells and Cytokines in Crohn's Disease, Current Opinion in Immunology., 9, 793-799.
- Russel, M.G., Pastoor, C.J., Janssen, K.M., van Deursen ,C.T., Muris, J.W., van Wijlick, E.H. ve Stockbrugger, RW., 1997. Familial aggregation of inflammatory bowel disease: a population-based study in South Limburg, The Netherlands. The South Limburg IBD Study Group, Scand J Gastroenterol Suppl. , 223,88-91.
- Sashio, H., Tamura, K., Ito, R., Yamamoto, Y., Bamba, H., Kosaka, T., Fukui, S., Sawada, K., Fukuda, Y., Tamura, K., Satomi, M., Shimoyama, T.ve Furuyama, J., 2002. Polymorphism of the TNF Gene and the TNF Receptor Superfamily Member 1B Gene are Associated with Susceptibility to Ulcerative Colitis and Crohn's Disease, Respectively, Immunogenetics., 53 , 1020-1027.
- Sartor, R.B., 2003. Clinical Applications of Advances in the Genetic of IBD, Rev. Gastroenterol Disord., 3, 9-17.
- Satsangi, J., Landers, C.J, Welsh, K.I., Koss, K., Targan, S., Jewell, D.P.,1998, The peresence of anti-neutrophil antibodies reflects clinical and genetic heterogeneti within inflammatory bowel disease, Inflamm Bowel Dis. , 4,18-26.
- Satsangi, J., Morecroft, J., Shah, N.B.ve Nimmo, E. 2003. Genetic of Inflammatory bowel disease: Scientific and Clinical Implications, Best Parctice δ Research Clinical Gastro enterology, 17, 3-18.
- Satsangi, J., Welsh, K.I., Bunce, M., Julier, C., Farrant, J.M., Bell, J.I. ve Jewel, D.P. 1996. Contribution of Genes of the Major Histocompatibility Complex to susceptibility and disease phenotype in Inflammatory Bowel Disease, Lancet., 347 , 1212-1217.
- Schulte, C.M.S., Gobel, Roher, H.D. ve Schulte. K.M., 2001. C-509T Polymorpyhism in the TGFB1 Gene Promotor: Impacton Crohn's Disease Susceptibility and Clinical Course, Immunogenetics., 53 , 178-182.

- Segain, J.P., Raingeard, D., Bourreille, A., Leray, V., Gervois, N., Rosales, C., Ferrier, L., Bpnnnet, C., Bloottiere, H.M. ve Galmiche, J.P., 2000. Butyrate Inhibits Inflammatory Responses though NF κ B Inhibition :Implication for Crohn's Disease, Gut., 47 , 397-403.
- Shanahan , F.,1994. Neutrophil autoantibodies in inflammatory bowel disease: are they important, Gastroenterology. , 107, 586-589.
- Shanahan, F. , 2002. Crohn's Disease, Lancet., 359 : 62-69.
- Simmons, J.D., Mullighan, C., Welsh, K.I. ve Jewell, D.P. , 2000. Vitamin D Receptor Gene Polymorphysm : Association with Crohn's Disease Susceptibility, Gut., 47 , 211-214.
- Sperber, A.D., Rotem, A.Y., Fich, A., Roitman, G., Schreiber, G. ve Avissar, S. G, 2000. Protein Levels and Function as an Objective Measure of Depression in Patients with Fonctional Bowel Disorders, Int. J. Colorectal. Dis., 15 , 218-224.
- Steer, S., Fisher, A., Fife, M., Curhbert, A., Newton, J., Wordsworth, P., Lewis, C.M., Mathew, C.G. ve Lanchbury, S., 2003. Development of Rheumatoid Arthritis is Not Associated With. Two Polymorphism in the Crohn's Disease Gene CARD 15, Rheumatology., 42, 304-307.
- Stephan, B., Hanauer, M.D. ve Sandborn, W.D., 2001. Management of Crohn's Disease, Am. J. Gastroenterology., 96 , 2234-2241.
- Stokkers, P.C.F., Reirisma, P.H., Tygat, G.N.J. ve Van Devender, S.J.H., 1999. HLA-DR and DQ Phenotypes in Inflammatory Bowel Disease: A Meta-analysis, Gut., 45, 395-401.
- Sttokkers, P.C.F., Van Aken, B.E., Basoski, N., Reitsma, P.H., Tytgat, G.N.J.ve Van Deventer, S.J.H. 1998. Five Genetic Markers in the Interlukein 1 Family in Relation to Inflammatory Bowel Disease, Gut., 43 , 33-39.
- Sudbery, P., 2003. Human Molecular Genetics, Prentice Hall, London ,New York,UK.
- Sugimura, K., Taylor, K.D., Lin, Y.C., Hang, T., Wang, D., Tang, Y.M., Ghodsian, N.F., Targan, S.R., Rotter, J.I.ve Yang, H., 2003. A Novel CARD15/NOD2 Haplotype Confering Risk for Crohn Disease in Ashkenazi Jews, Am. J. Hum. Genet., 72: 509-518.
- Suryamin, M.ve Rani, A.A, 2003. The Role of Cytokines in İnflammatory Bowel Disease. [http:// www.interna.fk.ui.ac.id/ ami-online / ami 3303/Review article 2.htm](http://www.interna.fk.ui.ac.id/ami-online/ami3303/Review%20article2.htm). 20. 09. 2003.
- Sutton, C.L., Yang, H., Rotter, J.I., Li, Z., Targan, S.R.ve Braun, J. , 2000. Familial Expression of Anti-saccharomyces Cerevisiae mannan Antibodies in Affected and Unaffected Relatives of Patients with Crohn's Disease, Gut., 46 , 58-63.

- Tagore, A., Gonsalkorale, W.M., Pravica, V., Hajeer, A.H., McMahon, R., Whorwell, P.J., Sinnott, P.J. ve Hutchinson, I.V. 1999. Interleukin -10 (IL-10) Genotypes in Inflammatory Bowel Disease, Tissue Antigens., 54, 386-390.
- Targan, S.R., Hanauer, S.B., van Deventer, S.J., Mayer, L., Present, D.H., Braakman, T., DeWoody, K.L., Schaible, T.F. ve Rutgeerts, P.J., 1997. A shortterm study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease Crohn's Disease cA2 Study Group, N Engl J Med., 337,1029-1035.
- Thomas, G.A., Millar-Jones, D., Rhodes, J., Roberts, G.M., Williams, G.T. ve Mayberry J.F., 1995. Incidence of Crohn's disease in Cardiff over 60 years: 1986-1990 an update, Eur J Gastroenterol Hepatol., 7, 401-405.
- Tözün, N., 2002. İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları, T.Klin.J., Gastroenterohepatol. 13: 1-8.
- Trallori, G., Palli, D., Saieva, C., Bardazzi, G., Bonanomi, A.G., Albasio, G., Galli, M., Vannozzi, G., Milla, M., Tarantino, O., Renai, F., Messori, A., Amorosi, A., Pacini, F. ve Morettini, A., 1996. A population-based study of inflammatory bowel disease in Florence over 15 years (1978-92). Scand J Gastroenterol. 31: 892-899.
- Uboldi de Capei, M., Dametto, E., Fasano, M.E., Rendine, S. ve Curtioni, E.S., 2003. Genotyping for cytokine polymorphism: allele frequencies in the Italian population, European Journal of Immunogenetics., 30, 5-10.
- Uthoff, S.M.S., Crawford, N.P.S., Eichenberger, M.R., Hamilton, C.J., Petras, R.E., Martin, E.R. ve Galandiuk, S., 2002. Association of ulcerative colitis with the inflammatory bowel disease susceptibility locus IBD2 in non-Jewish Caucasians and evidence of genetic heterogeneity among racial and ethnic population with Crohn disease, American Journal of Medical Genetics., 113, 242-249.
- Van Heel, D.A., Udalova, I.A., De Silva, A.P., McGovern, D.P., Kinouchi, Y., Dull, J, Lench, N.J., Cardon, L.R., Carey, A.H, Jewell, D.P. ve Kwiatkowski, D., 2002. Inflammatory bowel disease is associated with a TNF polymorphism that affects and interaction between the OCT1 and NF-kB. Transcription factors., Hum Mol Genet., 11,1281-1289.
- Van Montfrans, C., Peppelenbosch, M., Velde, A.A. ve Van Deventer, S., 2002. Inflammatory Signal Transduction in Crohn's Disease and Novel Therapeutic Approaches, Biochemical Pharmacology., 7294 : 1-7.
- Vermeire, S., Wild, G., Kocher, K., Cousineau, J., Dufresne, L. ve Bitton, A., 2002. Langelier, D., Pave, P., Lapointe, G., Cohen, A., Daly, M.J. Rioux, J.D. CARD15 Genetic Variation in Quebec Population: Prevalence, Genotype Phenotype Relationship and Haplotype Structure, Am. J. Hum. Genet., 71, 74-83.

- Vidal, F., Meijide, J.G., Carreira, P., Barros, P., Carrocedog, A., Reino, J.J.G.ve Ganzalez, A., 2003. The three most common CARD15 mutation associated with Crohn's disease and the chromosome 16 susceptibility locus for systemic lupus erythematosus, Rheumatology., 42, 570-574.
- Watts, D.A.ve Satsangi, J. , 2002. The genetic Jigsaw of inflammatory bowel disease., Gut., 50, (suppl III), 31-36.
- Weitzman, J.B., 2001. Bowel Disease gets the Nod, Trends in Mol. Med., 8 , 335 336.
- Williams, C.N., Kocher, K., Lander, E.S., Daly, M.J.ve Rioux, J.D. , 2002. Using a Genome – Wide Scan and Meta – Analysis to Identify a Novel IBD Loci, Inflammatory Bowel Diseases., 86, 375-3781.
- Yamazaki, K. , Takazoe, M., Tanaka, T., Kazumori, T.ve Nakamura, Y., 2002. Absence of Mutation in the NOD2/CARD15 Gene Among 483 Japanese Patient With Crohn's Disease, J.Hum. Genet., 47, 469-472.
- Yang, H., Plevy, S.E., Taylor, K., Tiyan, D., Fischel-Ghodsian, N., McElre, C., Targan, S.R.ve Rotter, J.I. 1999. Linkage of Crohn's Disease to the Major Histocopatibility Copmlex Region is Detected by Multiple Non-parametric Analyses, Gut., 44, 519-526.
- Yang, H., Taylor ,K.D.ve Rotter, J.I., 2001a. Inflammatory bowel disease. I. Genetic epidemiology, Mol Genet Metab. , 74,1-21.
- Yang, H., Taylor, K.D.ve Rotter, J.I. 2001b. Inflammatory Bowel Disease II. Gene Mopping, Molecular Genetic and Metabolism., 74, 22-44.
- Yang, V.X.ve Lichtenstein, G.R., 2002. Corticosteroids in Crohn's Disease, Am. J. Gastroenterology., 97 , 3952-3957.
- Zheng, C., Zheng Hu, G., Zeng, Z.S., Lin,L.J.ve Gin-Ge, G., 2003. Progress in gene searching for susceptibility for inflammatory bowel disease by positional cloning, R World J Gastroenterol . , 9 (8), 1646-1656.
- Zhou, Z., Lin, X., Akolkar, P.N., Akolkar, B.G., Levine, J., Katz, S.ve Silver, J., 2002. Variation at NOD2/CARD15 in Familial and Sporadic Cases of Crohn's Disease in the Ashkenazi Jewish Population, The American Journal of Gantroenterology., 97, 3095-3101.

ÖZGEÇMİŞ

1962 yılında Denizli'nin Çameli ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Denizli'de tamamladıktan sonra 1983-84 öğretim yılında Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimine başladı. Bu bölümden 1987 yılında mezun oldu ve M.E.B.'da biyoloji öğretmeni olarak göreve başladı. 1988 yılında KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans programına başladı. 1991 yılında KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisansını tamamladıktan sonra 1996 yılında SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsünde doktora eğitimine başladı. 2002 yılında KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalına yatay geçiş yaptı. Halen Trabzon Merkez Atatürk Lisesinde biyoloji öğretmeni olarak görev yapmaktadır.

