



T.C.  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**İNFLAMATUVAR BARSAK HASTALIĞINDA BAKTERİSİDAL  
PERMEABİLİTE ARTIRICI PROTEİN GEN POLİMORFİZMİ VE  
ÜLSERATİF KOLİT İLE CROHN HASTALIĞI ALT TIPLERİYLE  
İLİŞKİSİ**

Dr. GÜRAY CAN  
UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL 2010



**T.C.  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**İNFLAMATUVAR BARSAK HASTALIĞINDA BAKTERİSİDAL  
PERMEABİLİTE ARTIRICI PROTEİN GEN POLİMORFİZMİ VE  
ÜLSERATİF KOLİT İLE CROHN HASTALIĞI ALT TIPLERİYLE  
İLİŞKİSİ**

**Dr. GÜRAY CAN**

**UZMANLIK TEZİ**

**Prof. Dr. HÜLYA ÖVER HAMZAOĞLU**

**İSTANBUL 2010**

## ÖNSÖZ

Asistanlığım süresince eğitimime büyük katkıları olan ve desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Çetin Özener'e, bu çalışmanın her aşamasında büyük emeği geçen başta Tez Danışmanım Sayın Prof. Dr. Hülya Över Hamzaoğlu'na, MÜTFH Gastroenteroloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Cem Kalaycı'ya ve İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Gastroenteroloji Şefi Sayın Doç. Dr. Belkıs Ünsal'a teşekkür ederim. Desteklerini ve yardımlarını hiç bir zaman eksik etmeyen Sayın Uzm. Dr. Hakan Akın'a, çalışmanın laboratuvar kısmında yapmış olduğu değerlendirmeler ve göstermiş olduğu özveriden dolayı Sayın Filiz Türe Özdemir'e ve istatistiksel değerlendirmelerde yapmış olduğu yardımlardan dolayı Sayın Fatih Eren'e de teşekkürlerimi borç bilirim.

Haziran 2010

Dr. Güray CAN

## ÖZET

İnflamatuvar Barsak Hastalığı (İBH), ince ve kalınbarsağın çeşitli bölge ve katmanlarını tutabilen, etiyopatogenezi henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamış, kronik inflamatuvar bir hastalık grubudur. Birçok çevresel ve genetik faktörün hastalığın oluşumunda rol aldığı bilinmektedir. Son zamanlarda, doğal bağışıklık sisteminin İBH etiyolojisinde merkezi bir konumda yer aldığı düşüncesi giderek artmaktadır. Patojen mikroorganizmaların tanınmasında rol alan proteinlerin İBH ile ilişkileri gösterilmesinden sonra, doğal bağışıklık sisteminin bir parçası olarak, gram negatif bakterilerin (GNB) tanınip nötralize edilmesinde önemli rolü olan bakterisidal permeabilite artırıcı protein (BPI) gen polimorfizminin, İBH ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada, İBH ve subfenotipleri ile lipopolisakkarid sinyal yolağı üzerinde bulunan BPI gen polimorfizmi (BPI Lys216Glu) arasındaki ilişkinin araştırılması planlanmaktadır. Farklı merkezlerdeki İBH polikliniklerinde takip edilmekte olan hastalardan kan örnekleri ve hastalıkla ilgili klinik bilgileri toplandı. Kontrol grubu, sağlıklı gönüllülerden oluşturuldu. Çalışmaya 224 Crohn Hastalığı (CH) ve 304 Ülseratif Kolit (ÜK) olmak üzere 528 İBH hastası ve 339 sağlıklı kontrol dahil edildi. BPI Lys216Glu polimorfizmi, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hem CH hem de ÜK'de anlamlı derecede ilişkili olduğu bulundu ( $p=0,0001$ ). GG genotipi CH'da steroid kullananlar ile steroid bağımlılarında anlamlı olarak düşük saptanmıştır (sırasıyla,  $p=0,0127$ , OR:0,80 %95 CI:0,68- 0,94;  $p=0,0286$ , OR:0,75 %95 CI:0,66- 0,86). Hastalığın tutulum yerleri ve davranış paterni açısından BPI polimorfizmi ile herhangi bir ilişki gösterilemedi.

**ANAHTAR KELİMELER,** İnflamatuvar Barsak Hastalığı, Ülseratif Kolit, Crohn Hastalığı, Bakterisidal Permeabilite Artırıcı Protein, Tek Nükleotid Polimorfizmi, BPI Proteini, Toll- Benzeri Reseptör

## ABSTRACT

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic inflammatory disease with unknown etiology, that affect the small and large bowel at different levels and layers. It is known that a lot of environmental and genetic factors have a role in developing the disease. Lately, it is increasingly considered that innate immune system may have a central position in the pathogenesis of the disease. As a part of the innate immune system, BPI has an important role in the recognition and neutralization of gram negative bacteria (GNB). Proteins having a role in recognition of pathogen microorganisms, are belived to be associated with IBD pathogenesis. The aim of our study is to investigate the involvement of bactericidal permeability increasing protein (BPI) gene polymorphism (BPI Lys216Glu) in a large group of Turkish IBD patients . A total of 528 IBD patients (224 Crohn's Disease and 304 Ulcerative Colitis), and 339 healthy controls were included to the study. After statistical analyses, BPI Lys216Glu polymorphism was found to be associated with both Crohn's Disease and Ulcerative Colitis ( $p=0,0001$ ). GG genotype was found significantly lower in patients using steroid and having steroid dependence (respectively,  $p=0,0127$ , OR:0,80 %95 CI:0,68- 0,94;  $p=0,0286$ , OR:0,75 %95 CI:0,66- 0,86). Otherwise, we could not find an association between subphenotypes of IBD.

**KEYWORDS,** Inflammatory Bowel Disease, Ulcerative Colitis, Crohn's Disease, Bactericidal Permeability Increasing Protein, Single Nucleotide Polymorphism, BPI Protein, Toll- Like Receptor

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfalar</u>
UZMANLIK TEZİ .....	1
ÖNSÖZ .....	i
ÖZET .....	ii
ABSTRACT .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	v
TABLolar LİSTESİ .....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	vi
1 GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2 GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. İnflamatuvar Barsak Hastalığı (İBH).....	3
2.2. Etiyopatogenez ve Mekanizmalar .....	5
2.2.1. İntestinal bakteriyel flora .....	5
2.2.2. Epitelyal bariyer sistemi .....	6
2.2.3. Defensinler ve mukus salgısı .....	7
2.2.4. Toll benzeri reseptörler (TLR) .....	8
2.2.5. NOD benzeri reseptörler (NLRs).....	13
2.2.6. LBP ve BPI .....	17
3 GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. Hasta Seçimi ve Verilerin Toplanması.....	20
3.2. DNA Ekstraksiyonu .....	20
3.3. PCR-RFLP ile Genotip Tayini.....	21
3.4. İstatistiksel Analizler.....	22
3.5. Etik Kurul Onayı .....	22
4 BULGULAR .....	23
4.1. Hastaların Demografik Özellikleri.....	23
4.2. Genotip ve Allel Frekanslarının Karşılaştırılması.....	25
5 TARTIŞMA.....	30
6 KAYNAKÇA .....	34

## ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfalar</u>
<b>Şekil 1:</b> TLR'lerin spesifik ligantları ve hücredeki yerleşimleri.....	10
<b>Şekil 2:</b> TLR sinyal yolu.....	11
<b>Şekil 3:</b> TLR yolunun regülasyonu .....	12
<b>Şekil 4:</b> NOD sinyal yolu ve regülasyonu .....	15
<b>Şekil 5:</b> G aleli: 104 bp, A alleli: 78+26 bp .....	29

## TABLULAR LİSTESİ

<b>Tablo 1:</b> PCR'da kullanılan primer ve PCR şartları (7). .....	22
<b>Tablo 2:</b> PCR'da kullanılan restriksiyon enzimi ve oluşan fragmentler (7)...	22
<b>Tablo 3:</b> İBH hastalarının ve kontrol grubunun demografik bilgileri. ....	23
<b>Tablo 4:</b> İBH hastalarında hastalık türü ve alttiplerinin dağılımı.....	24
<b>Tablo 5:</b> İBH hastalarının klinik bilgileri. ....	24
<b>Tablo 6:</b> Genotip ve allel frekanslarının dağılımı ve karşılaştırılması. ....	26
<b>Tablo 7:</b> ÜK'in Allel frekansları açısından kontrol grubu ile karşılaştırılması	26
<b>Tablo 8:</b> ÜK ve CH'nin GG genotipi açısından kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	27
<b>Tablo 9:</b> ÜK ve CH'nin AA genotipi açısından kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	27
<b>Tablo 10:</b> ÜK ve CH tutulum yeri ile CH davranış paterninin polimorfizm açısından karşılaştırılması. ....	28
<b>Tablo 11:</b> İBH'da steroid kullanımı ve steroid bağımlılığının polimorfizm açısından karşılaştırılması. ....	28
<b>Tablo 12:</b> CH'da steroid kullanımının GG genotipi açısından karşılaştırılması	29
<b>Tablo 13:</b> CH'da steroid bağımlılığının GG genotipi açısından karşılaştırılması.....	29

## SİMGELER VE KISALTMALAR

ACCA	: Anti-chitobioside karbonhidrat antikoru
ALCA	: Anti-laminaribioside karbonhidrat antikoru
AMCA	: Anti-mannabioside karbonhidrat antikoru
ANCA	: Anti-nötrofil sitoplazmik otoantikoru
AntiTNF $\alpha$	: Anti tümör nekroz faktör- $\alpha$
ASCA	: Anti-saccharomyces cerevisiae karbonhidrat antikoru
BPI	: Bakterisidal permeabilite arttırıcı protein
CARD	: Caspase activating recruitment domain
CH	: Crohn hastalığı
CD	: Crohn's Disease
CMV	: Sitomegalovirüs
DLG5	: Drosophila discs large homologue 5 geni
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dsRNA	: Çift zincirli ribonükleik asit
E. coli	: Escherichia coli
GNB	: Gram negatif basiller
GRIM-19	: Mortaliteyi indükleyen retinoid-INF ilişkili gen 19
HBD	: Human $\beta$ -defensin
HD	: Human defensin
IBD1	: Inflammatory bowel disease-1
IKK	: I $\kappa$ B kinaz
IL-1	: Interlökin-1
INF- $\beta$	: İnterferon $\beta$
IRAK	: IL-1 reseptör ilişkili kinaz
IRF3	: İnterferon regülatör faktor 3
İBH	: İnflamatuvar barsak hastalığı
İE-DAP	: $\gamma$ -D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid
LBP	: Lipopolisakkarit bağlayıcı protein
LPS	: Lipopolisakkarit



LRR	: Lösinden zengin tekrarlar
Map	: Mycobacterium paratuberculosis
MBL	: Mannan binding lectin
MDP	: Muramil dipeptid
MDR1	: Multidrug resistance 1 geni
MUC	: Mukus geni
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
MSR	: Macrophage scavenger receptor
MyD88	: Myeloid differentiation response protein 88
Myo9B	: Myosin 9B geni
NF- $\kappa$ B	: Nükleer faktör-kappaB
NLR	: NOD benzeri reseptör
NOD	: Nucleotide binding oligomerization domain
OCTN 1/2	: Organic cation transporter 1/2 gen
PAMP	: Patojen ilişkili moleküler patern
PCR	: Polymerase chain reaction
PGN	: Peptidoglikan
PRR	: Patern tanıyıcı reseptör
PMN	: Polimorfonükleer hücre
RFLP	: Restriction fragment length polymorphism
RLR	: RIG1 benzeri reseptör
RIP1/2	: Receptor etkileşen serin/treonin protein kinaz 1/2
SIGIRR	: Single Immunglobulin IL-1 receptor related molekül
SOCS1	: Suppressor of Cytokine Signal 1
ssRNA	: Tek zincirli ribonükleik asit
ST2	: IL-1 receptor-like-1/FIT-1
sTLR	: Çözünür TLR
TAK1	: TGF- $\beta$ aktive edici kinaz 1
TBE	: Tris Borique EDTA
TBK1	: TANK bağlayıcı kinaz
TGF- $\beta$	: Tumor growth factor- $\beta$
TIR	: Toll/IL-1 reseptörü

TIRAP	: TIR domaini içeren adaptör proteini
TLR	: Toll benzeri reseptör
TOLLIP	: Toll interacting protein
TRAF6	: TNF reseptör ilişkili faktör 6
TRAM	: TRIF ilişkili adaptör protein
TRIF	: TIR domain içeren INF- $\beta$ indükleyici adaptör
UC	: Ulcerative Colitis
ÜK	: Ülseratif kolit

## 1 GİRİŞ VE AMAÇ

İnflamatuvar Barsak Hastalığı (İBH), ince ve kalınbarsağın çeşitli bölge ve katmalarını tutabilen, kronik inflamasyonla seyreden, ancak etiopatogenezi henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamış bir hastalık grubudur (1). İBH'da hastalık mekanizmasını tetikleyen olaylar çok değişken ve nonspesifiktir. Barsakta bulunan enfeksiyöz ve toksik ajanlar genetik olarak yatkın bireylerde epitelyal bariyeri aşarak inflamasyonu başlatırlar. Neden ne olursa olsun genellikle barsakta ortaya çıkan hasarda organın cevabı aynı şekilde olmaktadır. İBH'da bilinmeyen bir ajana karşı geliştirilmiş normal bir yanıt olabileceği gibi, bilinen bir ajana karşı gösterilen abartılı bir yanıt da olabilir. Bu noktada barsak geçirgenliğinin artmış olması ve normalde bu bariyeri geçemeyen antijenlerin geçerek iltihabi olayları tetiklemesi, genetik olarak duyarlı bireylerde bu inflamasyonun süregelenleşmeye meyilli olması, İBH'nın mikroorganizmalarla ilişkili olabileceği düşüncesini desteklemektedir (2).

İBH'da, hastaların yakınlarında bu hastalığın ortaya çıkma sıklığının artmış olması ve etnik farklılıkların bulunması gibi genetik yatkınlığı destekleyen birçok faktör moleküler genetik alanında yapılan çalışmalara zemin hazırlamıştır. Yapılan genom çalışmalarında, birçok kromozomda İBH ile ilişkili lokuslar tespit edilmiştir. Özellikle 16. kromozomun perisentromik bölgesinde *Inflammatory Bowel Disease-1* (IBD1) olarak isimlendirilen gen bölgesinin crohn hastalığı (CH) ile ilişkili olduğu saptanmıştır (3). Bu gen *Nucleotide binding oligomerization domain-2* (NOD2) adlı, bakterilerin peptidoglikan (PGN) yapılarını tanıyarak nükleer faktör-kappaB (NF-kB) vasıtasıyla proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını uyaran proteini kodlamaktadır (4). Devam eden çalışmalarda inflamasyonda rol alan birçok genin İBH ile ilişkisi saptanmıştır. Bunlardan biri olan bakterisidal permeabilite artırıcı proteini (BPI), gram negatif basillerin (GNB) neden olduğu enfeksiyonlarda endotokseminin oluşmasında primer etken olan lipopolisakkarit (LPS)'i bağlayarak inflamasyonun oluşmasına engel olmaktadır. Normalde LPS'i bağlayarak inflamatuvar yanıtın oluşmasını

sağlayan lipopolisakkarit bağlayıcı protein (LBP)'e ters etki göstererek bir denge oluşturmaktadır (5). Klein ve ark.(6), polimorfizm yoluyla BPI'nin fonksiyonlarında meydana gelecek bir bozukluğun, doğal bağışıklık sisteminin patojen mikroorganizmaları algılamasını değiştirerek, İBH'daki patolojik sonuçların ortaya çıkmasına neden olabileceğini iddia etmektedirler. Henüz, polimorfizmin, BPI molekülünde nasıl bir değişiklik yaptığı, fonksiyonel olarak nasıl bir sonuç ortaya çıktığı ve İBH'nın oluşum mekanizmasında nasıl bir etkisinin olduğu bilinmemektedir. Bununla ilgili henüz veri bulunmamaktadır. BPI polimorfizminin tanımlanmasından sonra İBH ile ilişkisini göstermek için bazı çalışmalar yapılmıştır. Klein'in yaptığı çalışmada sadece CH ile ilişki saptanırken (6), Török'ün çalışmasında her ikisiyle de anlamlı ilişki bulunamamıştır (7). Öbür taraftan Akın ve ark.'ın Türk popülasyonunda yapmış oldukları çalışmada hem CH hem de ÜK ile ilişkili olduğu saptanmıştır (8). En son, Yeni Zelanda'dan yapılan bir çalışmada sadece ileokolik CH ile ilişki saptanmıştır (9). BPI polimorfizmi ile ilgili çalışmalar kısıtlı olmakla birlikte mevcut literatür birbiriyle uyumlu değildir. Akın ve ark.'ının çalışmasında LPS sinyal yolundaki 6 polimorfizm incelenmiş, BPI hariç diğer 5 polimorfizmin İBH ile ilişkisi gösterilememiştir. Çalışmaya az sayıda hasta alınması nedeniyle, BPI ile İBH arasında saptanan ilişkinin daha geniş bir popülasyonda araştırılmasına ihtiyaç vardır. Biz çalışmamızda, Akın'ın çalışmasının devamı niteliğinde hasta sayısını arttırarak, BPI gen polimorfizminin İBH ve subfenotipleriyle ilişkisini daha net bir şekilde ortaya koymayı planlamaktayız.

## 2 GENEL BİLGİLER

### 2.1. İnflamatuvar Barsak Hastalığı (İBH)

İBH, gastrointestinal sistemi tutan kronik inflamatuvar bir hastalık grubudur. CH ve ÜK olmak üzere 2 klinik alt tipi bulunmaktadır. Genetik olarak duyarlı kişilerde, bazı antijenlere karşı artmış bir immün yanıt ile oluşan, etiyojisi henüz aydınlatılamamış, kronik seyirli, alevlenmelerle giden bir grup inflamatuvar hastalıktır (1). ÜK ve CH insidans ve prevalansı coğrafi dağılıma, etnik grup ve ırka göre büyük oranda varyasyonlar göstermektedir. İBH insidansında son zamanlarda özellikle Batı Dünyasında belirgin bir artış izlenmektedir (10). İBH'nın batı kaynaklı çalışmalarda insidansı 4-10/100,000 kişi/yıl iken, prevalansı 40-100/100,000 kişi olarak tespit edilmiştir (11). Ülkemizde ise İBH insidansı 4,1/100,000 kişi'dir (12). Her iki hastalık da Kuzey Amerika ve Kuzey Afrika'da sık, Güney Amerika ve Avrupa, Asya, Afrika ve Latin Amerika'da daha nadir görülmektedir (13). Ülkemizin İBH insidansı, Kuzey ve Batı Avrupadan düşük, Asya'dan yüksektir. Türk toplumu Asya ile Avrupa arasında geçiş özelliği göstermektedir (12) İBH her ırkta görülürse de, Yahudilerde insidans diğer ırklara göre çok daha yüksektir. İsrail'de, Asya ve Afrika kökenli Yahudilerde bu insidans, Avrupa ve Amerika kökenli Yahudilere kıyasla çok daha düşüktür (14). Sosyoekonomik koşulların iyi olduğu toplumlarda insidanda hafif bir artış olduğu gözle çarpılmaktadır. Özellikle kentsel alanlarda, kırsal alanlara göre insidanda belirgin artış görülmektedir. Bunun nedeni olarak gelişmişlikle paralel olarak yaşam tarzında meydana gelen değişiklikler gösterilmektedir. İBH, pik insidansını 3. ve 4. dekatta yaparken, 6. ve 8. dekadlarda da ufak bir artış görülmektedir. Cinsiyetler arasında ise kaydadeğer bir farklılık bulunmamaktadır (15).

CH ve ÜK'nin, benzer klinik prezentasyonu olması nedeniyle ortak bir mekanizmadan köken aldığı düşünülse de, bu nokta belirsizliğini korumaktadır (16-17). CH, kendini tüm sindirim kanalını segmenter tarzda ve transmural olarak tutabilen, kronik granülamatöz bir hastalık olarak gösterir.

CH, tutulum yerine göre ileal, kolik ve ileokolik, klinik davranış paternine göre ise obstrüktif, fistülizan ve inflamatuvar olarak alt fenotiplere ayrılmaktadır. Özellikle terminal ileum tutulumu sıklıkla gözlenmektedir. Hastalar en sık karın ağrısı, diyare ve kilo kaybı şikayetleri ile gelmektedir. En sık görülen komplikasyonları ise cerrahi müdahale gerektirebilen intestinal darlık ve fistül gelişimidir (1, 18). CH etiyojisi tam olarak anlaşamadığı için medikal tedavi küratif değil, hastalık aktivitesinin kontrol altına alınmasına yöneliktir. ÜK ise rektumdan itibaren proksimale doğru değişik uzunluklarda, arada sağlam kısım bırakmaksızın sadece kolon mukozasını tutar. ÜK tutulum yerine göre, sadece rektumla sınırlı ise proktit, splenik fleksuranın distalinde ise sol kolit, splenik fleksuranın proksimaline uzanım gösteriyorsa pankolit şeklinde adlandırılmaktadır. Klinik olarak sıklıkla rektal kanama, diyare ve karın ağrısı ile kendini göstermektedir. Komplikasyonları arasında toksik megakolon, darlıklar, kolorektal displazi ve kanser sayılabilir (1, 19). Medikal tedavi hastalık aktivitesini kontrol altına almakta etkili olmasına rağmen küratif tedavi cerrahidir.

İBH'nın etiyopatogenezi ve muhtemel mekanizması üzerine yapılan çalışmalarda çeşitli senaryolar ortaya atılsa da, birçok çevresel ve genetik faktörün bu hastalığın oluşumunda rol aldığı gösterilmiştir (20). Genetik çalışmalarda 70'den fazla genin ister CH, ister ÜK olsun, hastalığın oluşumunda, tedaviye cevapta ve klinik seyirde önemli etkileri olduğu bildirilmiştir. Yine de genetik altyapının İBH'nın oluşumuna katkısı %20'den fazla değildir (21). Bu da çevresel etmenlerin ne kadar önemli olduğunu gözler önüne sermektedir. Son zamanlarda intestinal floranın da bir etken olabileceği düşünülmektedir. Normal bireylerde barsaktaki kommensal bakterilere karşı immüntolerans mevcut iken, İBH hastalarında bu tolerans kaybolmaktadır. İmmüntoleransın nasıl kaybolduğu henüz aydınlatılabilmemiş değildir. Fakat, genetik yatkınlığın sorumlu olabileceği düşünülmektedir (2).

## 2.2. Etiyopatogenez ve Mekanizmalar

### 2.2.1. İntestinal bakteriyel flora

Gastrointestinal sistemde yüksek oranda kommensal bakteriler bulunmaktadır. Bu organizmalar immün sistemden bir epitel tabakası kadar uzaklıkta olmalarına rağmen oluşturdukları ciddi antijenik çevreye karşı immün yanıt oluşmamaktadır. İBH'da henüz bilinmeyen bir mekanizmayla bu immüntolerans kaybolmaktadır. Bazı araştırmacılar tarafından, intestinal mikrobiyotaya karşı immün yanıtta artış olmasının, patogeneizde kilit rol oynadığı düşünülmektedir. İmmüntoleransın hangi organizma veya organizmalara karşı kaybolduğu net bir şekilde gösterilememiştir (22). Buna rağmen CH ile ilişkili olduğu düşünülen birçok organizma gösterilmiştir; *Mycobacterium paratuberculosis (Map)* (23), invazif *Escherichia coli (E. coli)* (24), *Pseudomonas sp* (25), *Listeria monocytogenes*, *Mycoplasma sp*, *Coxiella sp*, *Streptococci*, *Chlamydia sp* (26-27), *Helicobacter pylori*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Saccharomyces cerevisiae* (28-30). Bu mikroorganizmaların hastalık patogenezindeki yerleri ile ilgili net bir veri bulunmamaktadır. Yaptığı enfeksiyonun CH'a histopatolojik olarak benzemesi nedeniyle, *Map* üzerinde çok durulmuştur. Bir ara Crohn hastalarının dokularından *Map* izole edilmesine rağmen, daha sonraki çalışmalar bunu desteklememiştir (31). Yine de etiyolojik ajan olarak tamamen dışlanamamıştır. Bazı çalışmalarda, CH hastalarının barsak mukoza örneklerinde *Yersinia enterocolitica* ve *pseudotuberculosis* tespit edilmiştir. ÜK hastalarının mukoza örneklerinde ise invazif *E. coli* suşları gösterilmiştir (32-33). Martin ve ark.da invazif *E. coli* suşlarını CH'da tespit etmişlerdir (34).

Bazı araştırmacılar tarafından, İBH'da, özellikle CH'da viral etkenlerin de etkili olabileceği düşünülmektedir. Erken kızamık enfeksiyonu ile CH arasında ilişki gösterilmesine rağmen (35), son yıllarda kızamık

enfeksiyonunun azalmasıyla birlikte, CH'da artış izlenmesi, bu ilişki üzerine şüpheler uyandırmaktadır. Bunların dışında sitomegalovirüs (CMV)'nin ÜK'de etiyolojik rolü üzerine yayınlar da bulunmaktadır (36).

Son zamanlarda dikkatler patojen ajanlardan çok kommensal bakterilere doğru yoğunlaşmıştır. İBH'nın gelişmesinde normal enterik floranın kilit rol oynadığını gösteren birçok kanıt bulunmaktadır (37). Bakteriyel komponentlerin konakçı tarafından anormal olarak tanınmasından sorumlu genetik faktörlerin keşfinden sonra, bu kanıtlar daha da belirginleşmiştir (38). İBH'da normal florada değişiklikler olduğu, *anaerob* ve *lactobacillus*'larda azalmalar olduğu rapor edilmiştir. Probiyotiklerle beslenmenin, mikrobiyal dengeyi tekrar sağlayarak İBH üzerinde faydalı etkileri olduğu gösterilmiştir (39-40). Sonuç olarak, normal enterik florada dengenin bozulmasıyla birlikte, kommensal veya patojen mikroorganizmalar, genetik olarak duyarlı kişilerde immün sistem tarafından anormal olarak algılanmaktadır. Sonrasında, bu mikroorganizmalara karşı immüntoleransın kaybolması sonucu, artmış immün yanıt oluşmaktadır.

### **2.2.2. Epitelyal bariyer sistemi**

Epitel tabakası, barsaktaki mikroplarla konakçı arasında bariyer görevi üstlenerek normal dengeyi korumaktadır. Epitel tabakası, bazal membran ve mukus tabakası ile defensinler gibi salgısal koruyucu peptitler, bu bariyer sisteminin devamlılığı için gereklidir. İBH'da artmış epitelyal geçirgenliğin, muhtemel intestinal floradan köken almış antijenlerin mukozadan penetrasyonunu kolaylaştırmada önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Böylelikle penetre olan antijenler uygunsuz immün cevabın oluşmasını tetikleyebilir. Epitel bariyer hasarlıysa, hayvan modellerinde ağır barsak inflamasyonuna meyilli olduğu gösterilmiştir (41). CH'da kommensal bakterilere karşı IgG üretiminde artış olması, mukozal bariyerin bütünlüğünün bozulduğunu veya normalde zararsız olan bakterilere karşı aşırı immün



cevabın olduğunu gösterir (42). Bunu göstermek için CH'da bazı serolojik belirteçler rapor edilmiştir; *Saccharomyces cerevisiae*'nin hücre duvarına karşı oluşan *anti-saccharomyces cerevisiae* antikoru (ASCA), *Firmicutes phylum*'un kommensal üyelerinde bulunan *flagellin*'e karşı oluşan anti-Cbir1, *Pseudomonas fluorescens*'e karşı oluşan anti-I2 (43), farklı patojenik bakteri ve fungi hücre duvarındaki karbonhidrat epitoplarına karşı oluşan *anti-laminaribioside* karbonhidrat antikoru (ALCA), *anti-chitobioside* karbonhidrat antikoru (ACCA) ve *anti-mannabioside* karbonhidrat antikoru (AMCA) (44). Bu antikoların hasarlı epitelden nonspesifik bakterilerin translokasyonu sonucu mu, yoksa primer patojenik prosesin sonucu mu olduğu henüz bilinmemektedir. Bazı çalışmalarda, bu antikoların permeabiliteden çok, tolerans kaybı sonucu oluştuğunu destekleyen kanıtlar elde edilmiştir (45-46). Hatta bir çalışmada bakterilere karşı immün cevabın penetrasyondan daha önce geliştiği bildirilmiştir (47).

### **2.2.3. Defensinler ve mukus salgısı**

Lüminal mikroorganizmaların intestinal mukozaya invazyonunu engellemek için goblet hücreleri tarafından mukus, *paneth* hücreleri tarafından da defensin salgısı yapılmaktadır. Mukus salgısı tüm mukozayı kaplayarak, koruyucu bir tabaka oluştururken, defensinler mikroorganizmaların etkisiz hale getirilmesinde rol oynar (48). Bakteriyel yıkım ürünleri, NOD2 ve toll benzeri reseptörler (TLR) yoluyla, *paneth* hücrelerinde sentezlenerek depolanan *Human Defensin 5* ve *6* (HD5, 6)'yı aktiveleştirerek salgılanmasını sağlarlar (49). CH'da, salgılanan defensinlerde relatif eksikliğin olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (50). Özellikle, ileal CH'da  $\alpha$ -defensinlerden HD5 ve 6'nın ekspresyonunda azalma izlenmektedir (51).  $\beta$ -defensinler, incebarsaktan salgılanan  $\alpha$ -defensinlerin tersine daha çok kolondan salgılanmaktadır. Kolonik CH'da *Human  $\beta$ -Defensin 2* (HBD2)'nin ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (52).

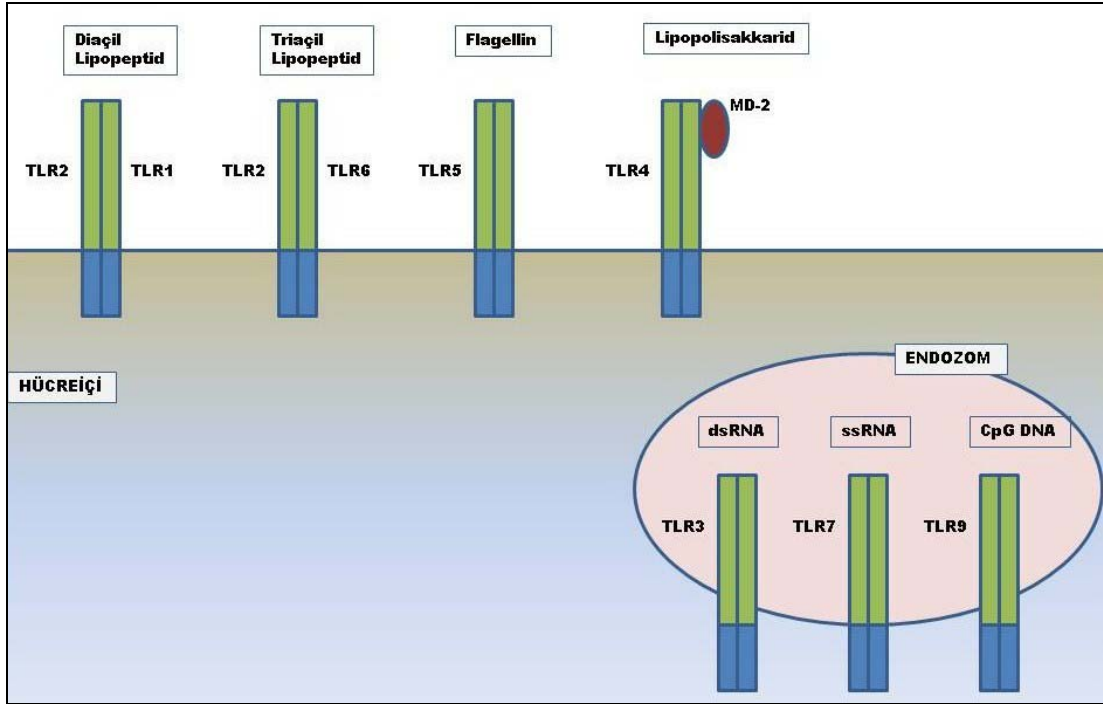
İBH'da, koruyucu fiziksel bir bariyer olarak vazife yapan kolonik mukus tabakasında incelleme olduğu gösterilmiştir (53). ÜK'de goblet hücrelerinde azalma olduğu için böyle bir sonuç ortaya çıkmış olabilir (54). İBH ile mukus salgılanmasından sorumlu mukus genleri (MUC) arasında da ilişki olduğu bildirilmiştir. ÜK'de MUC1 ve MUC3'ün, CH'da ise MUC3, MUC4 ve MUC5B'nin mesajcı ribonükleik asit (mRNA) seviyelerinin azaldığı saptanmıştır (55-56). Yalnız başka bir çalışmada, ileal CH'da MUC2 ekspresyonu haricinde diğerlerinin etkilenmediği görülmüştür. ÜK ve CH'nin herikisi ile de belirgin ilişkisi olduğu gösterilen sadece MUC3A'dır (57). Mukus ve defensinlerin yanında intestinal permeabilitede ve epitelyal yapının devamında görev alan birçok genin de İBH ile ilişkili olduğu gösterilmiştir; *Multidrug Resistance 1* (MDR1), *Drosophila Discs Large Homologue 5* (DLG5), *Organic Cation Transporter 1/2* (OCTN 1/ 2) ve *Myosin 9B* (Myo9B) (58-60).

#### **2.2.4. Toll benzeri reseptörler (TLR)**

CH'da ilk duyarlılık geni olarak NOD2'nin keşfedilmesiyle birlikte, İBH'nın patogeneziyle ilgili dikkatler doğal bağışıklık sistemi ve epitelyal bariyer sisteminin bütünlüğü üzerine yoğunlaşmıştır. Kommensal bakteriyel floranın konakçıyla etkili iletişimi için luminal mikroorganizmaların konakçı tarafından yeterli oranda tanınması gereklidir. Doğal bağışıklık sisteminin ana patern tanıyıcı reseptörleri (PRR), TLR'ler ve *Caterpillar* reseptörleri bu işlevi yerine getirmektedir. Bu reseptörler ve ligantları ile ilgili bilgiler arttıkça, doğal bağışıklık sisteminin basit bir mekanizmadan çok daha kompleks bir yapılanma gösterdiği anlaşılmaktadır (61). Doğal bağışıklık sistemi bilinenin tersine nonspesifik değildir. Kendinden olan ile yabancı olanı ayırabilme yeteneğine sahiptir (62). Doğal bağışıklık sistemi etkilerini 3 farklı çeşit reseptör aracılığı ile göstermektedir. Bunları patojenlerin opsonizasyonu için salgılanan reseptörler (*mannan binding lectin*- MBL), fagositozu kolaylaştıran reseptörler (*macrophage scavenger receptor*- MSR) ve PRR'lar olarak sıralayabiliriz (61). Burada ilgi alanımıza giren PRR'ler de 3 çeşit reseptörden

oluşmaktadır: TLR'ler, NOD benzeri reseptörler (NLR) ve RIG1 benzeri reseptörler (RLR)(63). TLR'ler bakteri, fungus, virüs ve protozoa dahil birçok motifi tanıyabilme özelliğine sahipken (64), NLR'ler sadece bakteri yıkım ürünlerini tanıyabilmektedir. RLR'ler ise hücre içi viral sensörler olarak görev yapmaktadır (63). Bütün PRR'ler, patojen ilişkili moleküler patern (PAMP) denilen ve mikroorganizmaların yaşaması için esansiyel olup, değiştirmesi zor olan mikrobiyal komponentleri tanımaktadırlar (62).

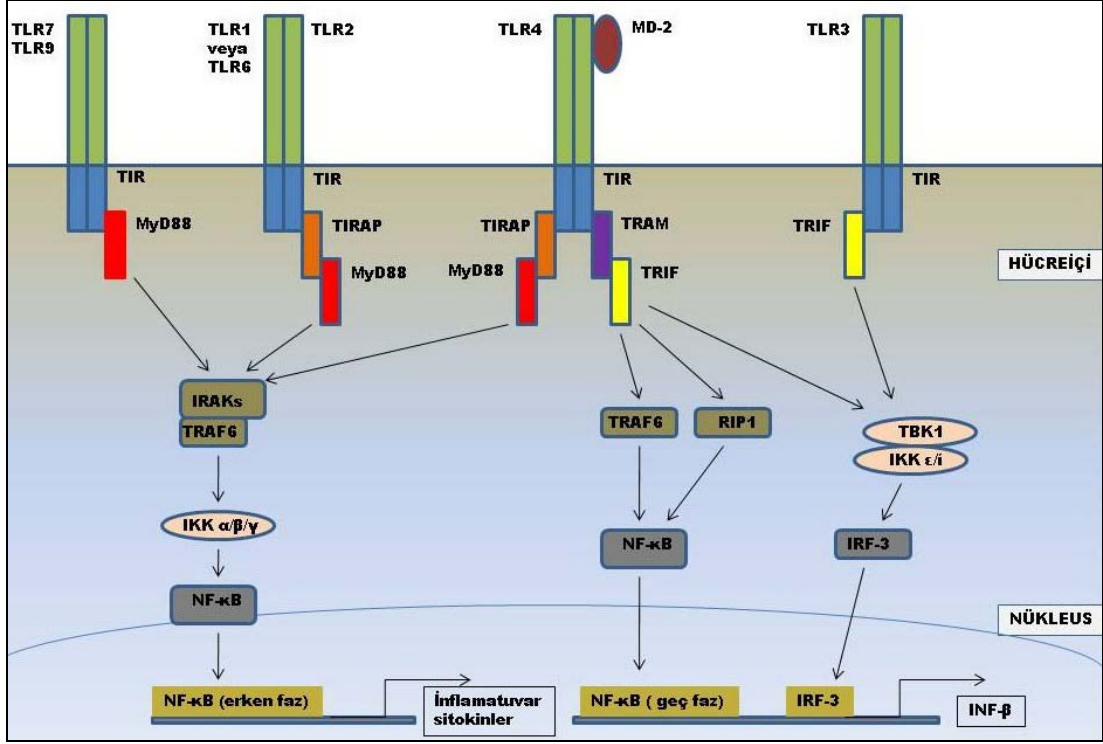
TLR'ler ilk olarak 1985 yılında sirke sineğinde tanımlanmış, daha sonra memelilerde de olduğu anlaşılmış ve Toll benzeri reseptörler diye isimlendirilmiştir. Şimdiye kadar toplamda 13 üyesi tanımlanmıştır. (65-67). Medzhitov ve ark. bu TLR'lerden birinin NF-kB yolağını aktive ettiğini keşfetmesi bu alanda dönüm noktası olmuştur. Bu da, TLR'nin doğal bağışıklık sistemi ile kazanılmış bağışıklık sistemi arasında köprü vazifesi gördüğü fikrini desteklemektedir (66). İlk olarak bakteriyel LPS'in TLR4'ün ligantı olduğu tanımlandı (68). Günümüzde 10 insan TLR'sinin ligantları tanımlanmış durumdadır (69). TLR'ler integral membran proteinleri olup, ekstraselüler domaini, değişik sayıda lösinden zengin tekrarların bulunduğu (LRR) motiflerden oluşur. Sitoplazmik sinyal domaini ise interlökin-1 (IL-1) reseptörüne homoloji gösterdiği için Toll/IL-1R homoloji (TIR) domaini ismini almıştır (62). TLR'ler birkaç altgruba ayrılabilmesine rağmen, herbiri ilişkili PAMP motifini tanıyabilmektedir (Şekil-1). TLR4 başta LPS olmak üzere birçok molekülü tanıırken, TLR1, 2 ve 6 lipitleri tanımaktadırlar (62). TLR2, TLR1 ve TLR6 ile heterodimer oluşturarak lipit kısımlarındaki küçük değişiklikleri dahi ayırdedebilme kabiliyetini arttırmaları (70). TLR3 çift zincirli RNA'yı (dsRNA), TLR7 tek zincirli RNA'yı (ssRNA)(71), TLR5 bakteriyel flagellanın ana proteini olan flagellini (72), TLR9 da bakteriyel deoksiribonükleik asitten (DNA) metillenmemiş CpG dinükleotidleri tanımaktadırlar (73). TLR3, 7, 8, 9 hücreiçinde endosomlarda bulunup, genel olarak bakteriyel nükleik asitleri algılarken, TLR1, 2, 4, 5 ve 6 ise hücre yüzeyinde bulunarak, hücre dışındaki motifleri tanımlamaktadırlar (Şekil-1) (62).



**Şekil 1:** TLR'lerin spesifik ligantları ve hücredeki yerleşimleri (74).

#### 2.2.4.1. TLR sinyal transdüksiyonu

Spesifik ligantın TLR'lere bağlanmasıyla birlikte TLR'lerde dimerizasyon meydana gelir ve sinyal iletimi başlamış olur. TLR2, TLR1 veya TLR6 ile heterodimer oluştururken, diğerleri sadece kendileriyle homodimer oluştururlar (75). Dimerizasyon sonrası oluşan konformasyonel değişiklik sonrasında TIR domaini içeren adaptör molekül aktive olur; MyD88, TIRAP, TRIF ve TRAM (67, 76-80). TLR3 hariç bütün TLR'ler MyD88 bağımlıdır. TLR reseptörlerinin seçiciliği ve meydana getirdiği fonksiyonların çeşitliliği, kullanılan hücre içi adaptör molekülleri tarafından belirlenir. (75). Sinyal yolu, kinazların aktivasyonu ile devam eder, en son olarak IKK kompleksinin parçalanması ve NF- $\kappa$ B'nin aktivasyonu ile tamamlanır. (67). MyD88'in bulunup bulunmamasına göre sinyal yolu ikiye ayrılmaktadır: MyD88-bağımlı ve MyD88-bağımsız sinyal yolu (Şekil-2).



**Şekil 2:** TLR sinyal yolu (74).

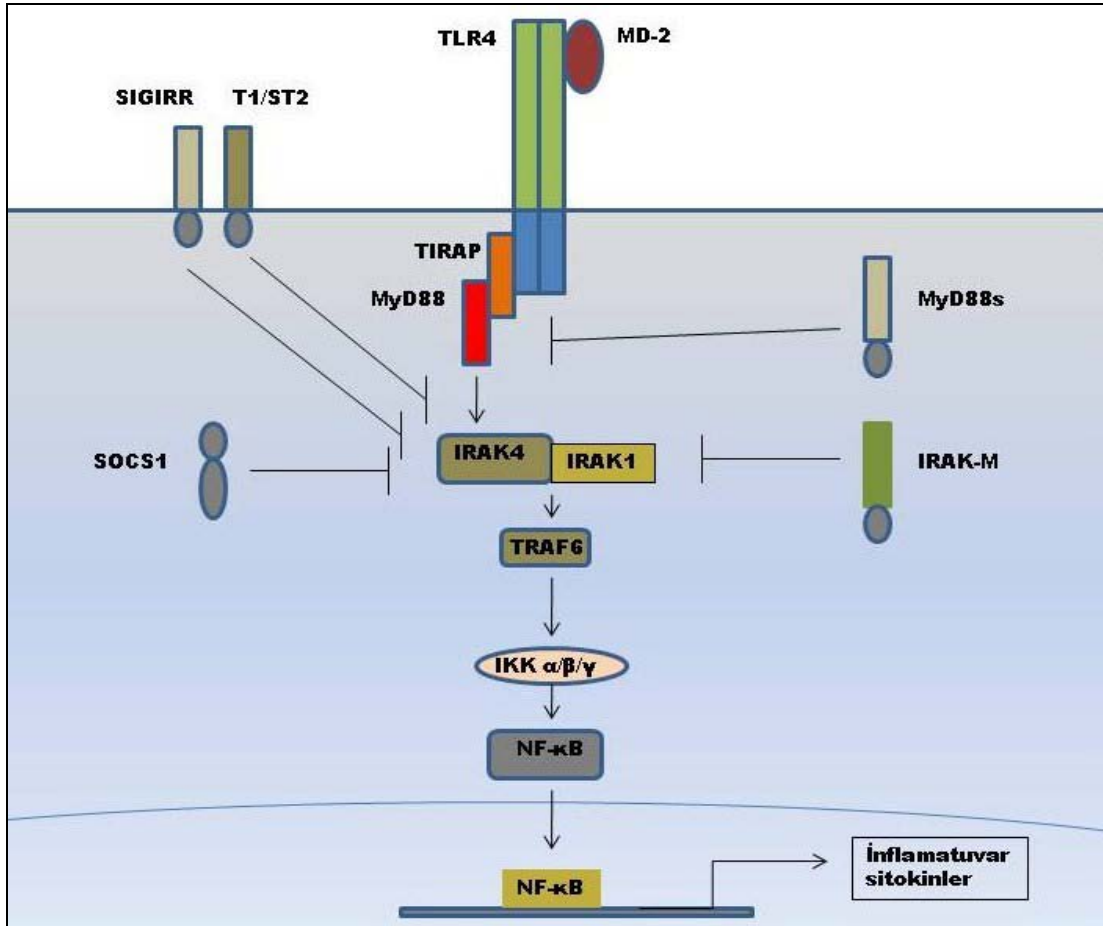
IKK: İκB kinaz, IRAK: IL-1 reseptör ilişkili kinaz, IRF3: İnterferon regülatör faktör-3, RIP1: Receptor etkileşen serin/treonin protein kinaz-1, TBK1: TANK bağlayıcı kinaz, TRAF6: TNF reseptör ilişkili faktör 6, TRAM: TRIF ilişkili adaptör protein, TRIF: TIR domain içeren INF-β indükleyici adaptör, TIRAP: TIR domaini içeren adaptör proteini, MyD88: *Myeloid differentiation response protein 88*

MyD88 bağımlı yolda, NF-κB'nin aktivasyonu (erken faz) proinflamatuvar sitokinlerin üretimi uyarılır (72, 81). MyD88 bağımsız yolda ise NF-κB aktivasyonu belli bir geçiklemeyle olmaktadır (geç faz). Bu yolağın sonunda interferon-β (INF-β)'nin üretimini indükler (82).

#### 2.2.4.2. TLR sinyal yolu regülasyonu

TLR'lerin sürekli olarak uyarılması, proinflamatuvar sitokinlerin kontrolsüz bir şekilde salgılanmasına ve ciddi sistemik hastalıklara sebebiyet verebilir. Bu dengeyi sağlayacak bazı kontrol mekanizmaları bulunmaktadır. TLR'lerin düzenlenmesi hücre dışı, transmembran, hücre içi ve nükleer seviyede olmak üzere 4 yerde olmaktadır (75). Çözünür TLR'ler (sTLR2 ve sTLR4)

kompetitif inhibisyon yoluyla mikrobiyal ürünlere karşı konakçı cavabının aşırıya kaçmasını önlerler. Transmembran düzeyinde ise ST2, SIGIRR, TRAIL gibi negatif regülatör proteinler bulunmaktadır. Hücre içinde bulunan negatif regülatörler ise MyD88s, IRAK-M, SOCS1, NOD2, PI3K, *Toll interacting protein* (TOLLIP) ve A20'dir (Şekil-3). Bu proteinler sinyal iletiminin farklı basamaklarını inhibe ederek etki göstermektedirler. Barsakta bulunan kommensal bakterilerde olduğu gibi, LPS'e sürekli maruz kalındığında TLR4 ekspresyonunda azalma sonucu LPS'e karşı tolerans gelişmektedir (83). Aynı zamanda ortamdaki antiinflamatuvar sitokinler nükleer seviyede TLR sentezini inhibe ederek regülasyona katkıda bulunmaktadır.



**Şekil 3:** TLR yolunun regülasyonu (74).

SIGIRR: *Single Immunoglobulin IL-1 receptor related molekül*, SOCS1: *Suppressor of Cytokine Signal 1*, ST2: *IL-1 receptor-like-1/FIT-1*

#### 2.2.4.3. İBH'da TLR gen polimorfizmleri

Son zamanlarda TLR4 ile İBH arasında ilişki olduğunu gösteren çalışmalarda artış mevcuttur (84). Bir çalışmada TLR ile hem CH, hem de ÜK ilişkili saptanırken, başka iki çalışmada yalnızca CH ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (85-87). TLR4 için 2 polimorfizmin İBH'ya yatkınlığı arttırdığı bilinmekle birlikte (7), genom çalışmalarında TLR2, 3, 4 ve 9'un genlerinin yerleştiği lokuslarda da İBH'ya yatkınlık gösterilmiştir (88). Yalnız, TLR1, 2, 5, 6, 7 ile ilişki saptanamamıştır. Yine de, bu TLR'lerin varyantları ile ÜK veya CH'da yaygın kolonik tutulum arasında ilişki bildirilmiştir. Özellikle, TLR1[R80T] ve TLR2[R753G] ile ÜK'de pankolit fenotipi arasında ilişki olduğu rapor edilmiştir (89). Aynı araştırmacılar TLR6[S249P] ile ÜK'de sadece proktit fenotipi ve TLR1[S602I] ile ileal tutulumlu CH arasında negatif ilişki olduğunu da bildirmişlerdir (89). Torok ve ark. ise TLR9 gen polimorfizmi ile CH arasında anlamlı derecede ilişki olduğunu göstermişlerdir (90). Bununla birlikte, yapılan genom çalışmalarında, TLR yolunun regülasyonunda görev alan proteinlerden SOCS1, SIGIRR ve TOLLIP'in bulunduğu gen lokuslarının İBH ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (88, 91-92).

#### 2.2.5. NOD benzeri reseptörler (NLRs)

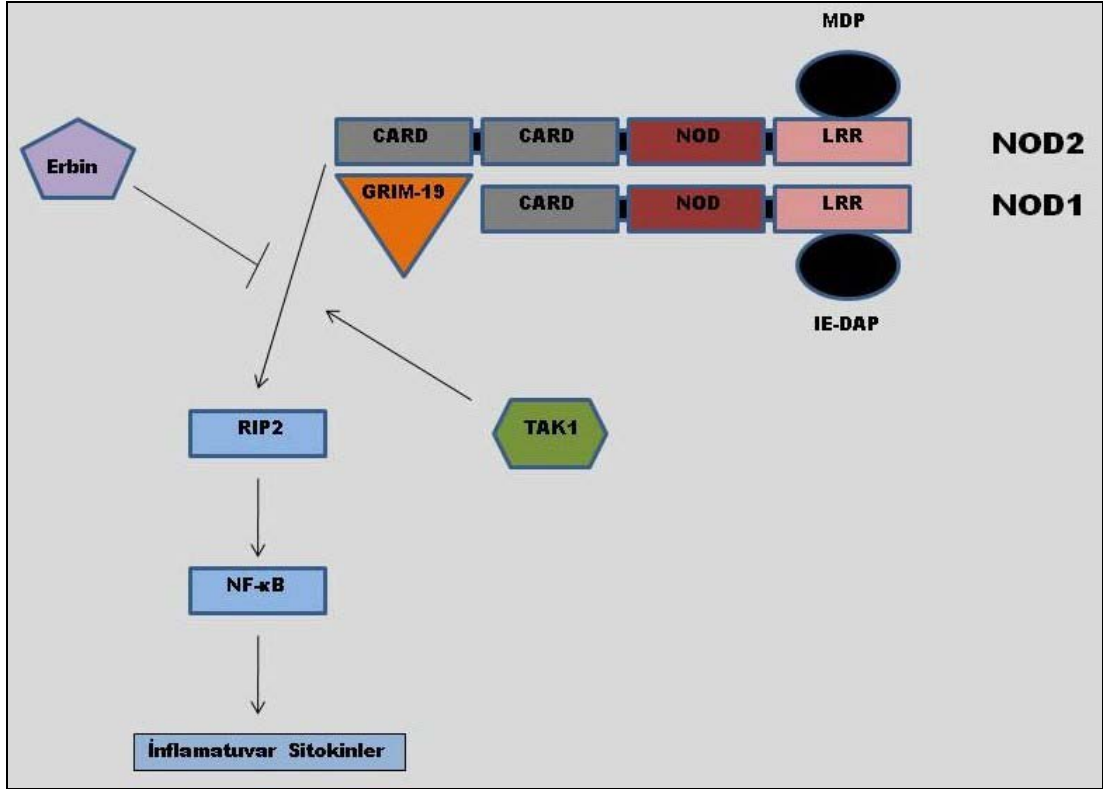
TLR'lerden sonra 2000'li yılların başlarında hücreiçi PRR'lerin yeni bir ailesi, *Caterpillar* gen ailesi tanımlandı (93-94). Genelde, bu ailenin üyeleri protein-protein etkileşen kasetlerden oluşan (*caspase activating recruitment domain-CARDs*, *pyrins*) amino-N terminal domaini, ortada NOD ve spesifik ligantın tanımlanmasında görev alan karboksi-C terminal domain'den oluşur. NOD kısmı kendiliğinden oligomerizasyon ve ATPaz aktivitesine sahiptir. Karboksi-C terminal kısmı da LRR'lerden oluşur (95). *Caterpillar* ailesi kendi içinde N-terminal domaindeki moleküle göre sınıflandırılmaktadır. Bunlar içinde CARD molekülünü içeren NOD1 ve NOD2, bakterilerin hücre duvarı komponenti

olan PGN'ları tanıyarak aktive olmaktadır (96). NOD1 sadece bir tane CARD içerirken, NOD2 iki tane CARD içermektedir. Herikisi de sitozolde bulunmaktadır (97). NOD1 birçok dokuda eksprese olmasına rağmen, NOD2 temel olarak antijen sunan hücrelerde ve epitel hücrelerinde eksprese olmaktadır (49). Bakteriyel PGN'lar NOD1 ve NOD2 için ligant olarak tanımlanmışlardır. NOD1, gram negatif bakterilerin PGN'larının yıkım ürünü olan *γ-D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid* (İE-DAP)'i tanıırken (98), NOD2 hem gram pozitif, hem gram negatif bakterilerin PGN yıkım ürünü olan muramil dipeptid (MDP)'i tanımaktadır (99). Bu PGN'lar hücreiçine fagositoz, aktif transport veya patojen kaynaklı mekanizmalar yoluyla girmektedir (95).

#### 2.2.5.1. NOD sinyal transdüksiyonu ve regülasyonu

PGN parçaları, NOD1 ve NOD2'nin LRR bölgesine doğrudan bağlanmasıyla NOD molekülü oligomerizasyonu gerçekleşir. Sonrasında CARD-CARD etkileşimi meydana gelir. Aktif hale gelen CARD domaini ile RIP2 etkileşerek RIP2'in N-terminal kısmındaki katalitik bölge aktive olur. Bunun sonucunda IKK kompleksi üzerinden NF-kB translokasyonu gerçekleşir (100). NOD2 NF-kB üzerinden sitokin sentezini indüklerken, NOD1 apoptozisi artırır (101). NOD2 sinyal yolunda da, sitokin sentezinin belli şartlar altında devam etmesi için kontrol mekanizması bulunmaktadır. Sinyal yolunun değişik basamaklarında regülasyonu sağlayan birçok molekül tanımlanmıştır: RIP2, *ErbB*, *Centaurin*, GRIM-19 ve TAK1 (4, 102-105) (Şekil-4). Aynı zamanda NOD2 yolunun kronik olarak uyarılması, NOD ve TLR'nin devam eden uyarılara karşı yanıtını azaltmaktadır (106). Aynı tolerans etkisi TLR'nin kronik uyarılmasında da bulunmaktadır. TLR ve NOD2'de oluşan bir mutasyon, kommensal bakterilerin kronik uyarısına karşı tolerans etkisini ortadan kaldırarak, kronik inflamasyona sebep olabileceği düşünülmektedir (106).





**Şekil 4:** NOD sinyal yolu ve regülasyonu (61).

GRIM-19: Mortaliteyi indükleyen retinoid-INF ilişkili gen-19, TAK1: TGF-β aktive edici kinaz-1

#### 2.2.5.2. İBH'da NOD benzeri reseptör gen polimorfizmleri

İBH'nın etiyopatogenezi ile ilgili en önemli gelişme, NOD2/CARD15'in CH için ilk duyarlılık geni olarak tespit edilmesi ile olmuştur (38). CH'na yatkınlığı sağlayan NOD2 birçok genom çalışması sonrasında tespit edilmiş ve 16. kromozomun perisentromerik bölgesine yerleşmiş olan NOD2 IBD1 geni olarak isimlendirilmiştir (38, 107-108). CH için NOD2 üzerinde 3 bağımsız ilişkili mutasyon tanımlanmıştır: Leu1007fsinsC, Arg702Trp ve Gly908Arg. Bu 3 mutasyon da LRR kısmında değişikliğe neden olmaktadır. NOD2 polimorfizmi bulunanlarda ileal tutulumlu CH ve fibrostenozla bağlı komplikasyonlar daha sık izlenmektedir (109). Yalnız ÜK ve anti-tümör nekroz faktör-α (antiTNFα)'ya cevap oranı ile ilişki saptanmamıştır (38, 107). Avrupa kökenlilerde polimorfizmler yüksek oranda tespit edilirken, Asya

kökenlilerde bulunmamaktadır. Avrupa kökenli hastaların 1/3'ünde en az bir mutasyon bulunmaktadır (110). Uyar ve ark.'ın Türk toplumunda yaptıkları çalışmada 3 polimorfizmden sadece Gly908Arg polimorfizminin CH ile ilişkili olduğu bildirilmiştir ( $p=0,0002$ , OR:36,8). Toplamda hastaların %17,9'unda en az bir mutasyon bulunmaktadır (111). NOD2'nin patojen tanıyan molekül olması, hatta mutasyonların liganın bağlandığı LRR kısmında olması nedeniyle, mutant NOD2'nin bakteriyel ürünleri algılamasının bozulduğu ve sonuç olarak hastalığın gelişimine neden olduğu düşünülmektedir (99). Yapılan çalışmalarda her 3 mutasyonda da NOD2'nin MDP'i algılama yeteneği bozulduğu saptanmıştır (110). Yalnız MDP'nin defektif olarak algılanması, NF-kB aktivasyonunu azaltmaktadır. Mutasyon sonucu inflamasyon azalmasına rağmen, CH'nin nasıl geliştiği açık değildir. Yeni gelişmelerle NOD2 mutasyonunda TLR2 ilişkili NF-kB aktivasyonunda artış olduğu tespit edilmiştir. Bu da CH'dakine benzerlik göstermektedir. Buradan NOD2 ile TLR2 arasında birbirinin etkisini düzenleyen bir ilişki olduğu, herhangi birinde oluşan bir fonksiyon kaybının, diğer taraftan inflamasyonu kontrolsüz bir şekilde arttırabildiği düşünülmektedir (112).

Genom çalışmalarında İBH duyarlılık lokusu olarak tanımlanmış NOD1, kromozom 7p14'de lokalize olmaktadır (113). NOD1'in İBH ile ilişkisine yönelik farklı sonuçlar bildirilmesine rağmen (114), McGovern ve ark. NOD1 üzerinde kompleks insersiyon/delesyon allelinin olduğunu ve erken ortaya çıkan İBH ve ekstraintestinal bulgularla ilişkili, aynı zamanda terminal eksonundaki haplotipin de İBH ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (114). NOD yolunun regülasyonunda görev alan GRIM-19, *ErbB* ve TAK1 proteinlerinin de İBH ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (88, 104, 115).

### **2.2.6. LBP ve BPI**

İnsanda birçok bölgenin florasında GNB'ler yer almaktadır. Bulunduğu bölgede, özellikle gastrointestinal sistemde kommensal bir etkileşime girmektedirler. Çoğu nonpatojen olan bu organizmaların invazyonu konakçıda bazı değişikliklere neden olmaktadır. Meydana gelen inflamatuvar hadisenin en büyük sorumlusu, GNB tarafından üretilen endotoksinlerdir (116). Endotoksinler GNB'lerin dış membranında bulunan LPS yapısında moleküller olup, çeşitli mekanizmalarla potent proinflamatuvar yanıtı indüklerler. Oluşan etkiler, kontrol altına alınmazsa ağır tablolara neden olabilir (116).

Konakçı tarafından, invaze olan patojenleri seçici olarak tanıyıp, çoğalıp, yayılmadan yok etmek için çeşitli antimikrobiyal peptitler salgılanır. Bunlar içinde en önemlilerinden biri LBP'dir (117). LBP, hepatositler tarafından sentezlenip, enfeksiyon dışı durumlarda plazmada az miktarda bulunan ve akut faz reaktanı özelliği olan bir glikopeptittir (118-119). LBP 60 kDa ağırlığında olup, 2 kısımdan oluşmaktadır; N-terminal domaini, GNB'lerin dış membranında bulunan endotoksin agregatlarını tanıyarak bağlanır. C-terminal domaini de bağlanmış olduğu endotoksin molekülünün CD14'e taşınmasını sağlar (120-122).

Oluşan endotoksin-CD14 kompleksi MD-2 yoluyla TLR4 reseptörünü aktive ederek sinyal iletimini başlatır. NF- $\kappa$ B'nin aktivasyonu ile proinflamatuvar sitokinlerin üretimi indüklenir. Salgılanan sitokin ve kemokinlere cevap olarak polimorfonükleer (PMN) hücreler patojenlerin bulunduğu dokuya göç ederler (123-124). Böylelikle akut inflamasyon süreci başlamış olur. Bu hücreler sitoplazmalarında bulunan granülleri içinde birçok antimikrobiyal molekül içermektedirler. Fagosite edilen bakterileri hücre içinde, fagosite edilemeyen patojenleri de granüllerin hücre dışı ortama salınmasıyla yok ederler. Bu şekilde bakteri ve kalıntıları ortamdan temizlenmiş olur.

LBP tarafından makrofaj ve monositlere teslim edilen endotoksinlerin büyük çoğunluğu hücreyi aktive etmeden hücre içine alınırlar (125-126). Eğer hücrede açiloksaçil hidralaz bulunuyorsa, endotoksin deaçilasyon ile detoksifikasyona uğratılır. TLR4'ü aktive etme özelliğini kaybeder (127).

Konakçı tarafından üretilen bir başka önemli antimikrobiyal peptid de BPI'dir. LBP'nin de içinde bulunduğu lipit transfer proteinleri ailesindedir. LBP ile BPI'nin primer yapıları %45 oranında birbirine benzemektedir (128). BPI, 55 kDa ağırlığında ve katyonik tek zincirli bir peptittir (129). LBP gibi BPI da iki kısımdan oluşur: N-terminal domaini, endotoksinde bulunan lipit A'ya yüksek afinite gösterir. Endotoksini bağlayarak etkisini nötralize eder. Aynı zamanda, sitotoksik ve antianjiyogenik etki de göstermektedir. Bu şekilde bakterinin yok edilmesinde ve lokal bir alanda sınırlandırılmasında etkili olur (130-132). C-terminal domaini ise, bağlanmış olduğu endotoksin molekülünü antijen sunan hücrelere teslim edilmesinde görev almaktadır (121). Normalde PMN hücreler tarafından sentezlenen BPI (129), inflamasyonun olmadığı durumlarda epitelial yüzeylerde, fibroblast ve subkutan konnektif dokuda da bulunmaktadır. Henüz nötrofiller yokken, GNB invazyonuna karşı ilk savunma hattını oluşturmaktadır. GNB'lerin dış membranındaki endotoksin agregatlarını tanıyarak bağlanır. Sitotoksik etkiyle de bakterilerin parçalanmasını sağlar. Ortama salınmış olan endotoksinleri de LBP'ye göre çok daha yüksek afiniteyle bağladığı için LBP'ye bağlanmasını engeller. BPI da bağladığı endotoksini CD14'e aktarmadığı için TLR4 sinyal yolu aktivasyonu gerçekleşmez. Sonuç olarak sistemik inflamatuvar yanıt oluşmaz ve inflamasyon lokal bir alana sınırlandırılarak patojen hızlıca yok edilir (133-135). GNB invazyonu ve endotoksin maruziyeti BPI'nin yok etme kapasitesini aşarsa, ortamdaki LBP endotoksinleri bağlayarak TLR4 vasıtasıyla proinflamatuvar sitokinlerin sentezini aktive eder. Salgılanan sitokinler sonucunda ilk önce nötrofiller, daha sonra da makrofaj ve lenfositler bölgeye göç ederek inflamasyon süreci başlatılır. PMN hücrelerin granüllerinde bulunan BPI vasıtasıyla fagosite edilen ve ortamda bulunan bakteriler, BPI'nin

sitotoksik etkisiyle parçalanır, endotoksinler de nötralize edilir. Ortamda patojen bakteri ve endotoksinler temizlendiği için akut inflamasyon daha fazla sürdürülemez ve çözülmeye başlar (127, 136-140).

### 3 GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Hasta Seçimi ve Verilerin Toplanması

Bu çalışmaya, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Balıkesir Devlet Hastanesi ve İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi İBH polikliniklerinde ve Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Genel Cerrahi kliniğinde takip edilen, daha önceden endoskopik, radyolojik, histopatolojik ve klinik olarak CH veya ÜK tanısı almış, 18 yaşından büyük hastalar dahil edildi. Bütün hastalardan bilgilendirilmiş onam alındı. İndetermine kolit olanlar ve bilgilendirilmiş onamını geri çekenler çalışma dışında bırakıldı. Sağlıklı gönüllüler de, İBH hastalığı olmayan sağlıklı kişilerden yaşa ve cinsiyete göre eşleştirilerek seçildi. Hastaların tıbbi kayıtlarından ve kendilerine yöneltilen anketten demografik ve hastalıkları ile ilgili bilgileri kaydedildi.

#### 3.2. DNA Ekstraksiyonu

Çalışmaya dahil edilen hastaların ve sağlıklı gönüllülerin herbirinden, K<sub>3</sub>EDTA solüsyonu içeren tüpler içerisine 2 cc kan örneği alındı. Polimorfizm tayini için *Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) yöntemi, alınan kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu yapmak için ise *High-Pure PCR Template Preparation Kit* (Cat. No. 11 796 828 001, ROCHE, 68298, Mannheim, Germany) isimli ticari kit kullanıldı. Herbir kan örneği için, 200 µl örnek alınarak içerisine 200 µl *Binding Buffer* ve 40 µl *Proteinase-K* eklendi ve hızlıca karıştırıldı. Karışım 70°C'de 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra 100 µl *isopropanol* eklenerek tekrar karıştırıldı. Karışım *High Pure Filter* tüpünün içine konularak 8000 devirde 1 dakika santrifüj edildi. *High Pure Filter* tüpünün altındaki toplama tüpü, içindeki biriken sıvıyla birlikte atıldı. Filtre yeni toplama tüpüne konularak içine 500 µl *Inhibitor Removal Buffer* eklendi. 8000 devirde 1 dakika santrifüj edildikten sonra tekrar içinde biriken sıvıyla birlikte toplama

tüpü atıldı. Filtre tekrar toplama tüpüne konularak bu sefer içine 500 µl *Wash Buffer* eklendi. Tekrar 8000 devirde 1 dakika santrifüj edildikten sonra toplama tüpü değiştirildi. Bu işlem *Wash Buffer* ile bir kere daha yapıldıktan sonra filtre içinde hiç sıvı kalmaması için 13000 devirde 10 saniye daha santrifüj edilerek yeni bir tüp içine konuldu. Bu sefer içine 200 µl *Elution Buffer* (70°C'de ısıtılmış) eklendi ve yine 8000 devirde 1 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan filtre atıldıktan sonra tüpün içindeki elde edilen materyal ile genomik DNA elde edilmiş oldu.

### 3.3. PCR-RFLP ile Genotip Tayini

Tek nükleotid polimorfizmi olarak BPI genindeki Lys216Glu (645 A/G) polimorfizmi çalışıldı. Toplamı 20 µl olan PCR solüsyonu içinde 100 ng genomik DNA, 1X PCR tamponu (Fermentas 830 Herrington Court, Burlington, Ontario, Canada), herbiri için 0,2 mM deoksiribonükleotidtrifosfat (*dNTP*) (Fermentas), 0,5 ünite *FastStart Taq* DNA polimeraz (Fermentas), 5 pmol primer ve 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> bulunmaktaydı. Solüsyon 12.5 µl distile su ile 20 µl'ye tamamlandı. PCR için hazırlanan solüsyon, başlangıçta 95°C'de 15 dakika ısıtıldıktan sonra, 94°C'de her döngüsü 30 saniye olan 35 siklus'a tabi tutuldu. Anneling kısmında 60°C'de 30 saniye ve 72°C'de 30 saniye bekletildi. Son olarak da 72°C'de 10 dakikayla PCR sona erdirildi. BPI'ya spesifik primer, PCR sonrasındaki bant uzunlukları ve annealing ısısı Tablo-1'de gösterilmiştir. PCR ürünleri, 37°C'de *Hind* III restriksiyon enzimi (Fermentas) ile gece boyunca inkübasyona bırakıldı (Tablo-2). Elde edilen fragmentlerin analizi için %2,5'luk standart agaroz jel kullanıldı. 2 gr toz agaroz ve 100 ml 0,5X *Tris Borique EDTA* (TBE) karıştırılarak kaynatıldı. Sonra içine 10 mg/ml'lik etidyum bromür'den 100 µl konularak kaştırıldı. Soğumaya bırakıldıktan sonra agaroz jel, TBE dolu tankın içine yerleştirildi. Restriksiyon enzimiyle muamele edilmiş PCR ürünleri bromfenol mavisile boyandıktan sonra agaroz jelde taraklarla açılan kuyucuklar içerisine yerleştirildi ve elektroforez ile 80 voltta 20 dakika yürütüldü. Elde edilen

bandlar transillüminatörde bilgisayar kullanılarak görüntülendi. Restriksiyon sonrası oluşan ürünler daha önceden bilinen primerle karşılaştırıldı. Restriksiyon fragmentlerinin uzunlukları Tablo-2'de verilmiştir.

**Tablo 1:** PCR'da kullanılan primer ve PCR şartları (7).

Gen	Polimorfizm	Primer	PCR ürünü (bp)	Anneling ısısı (°C)
BPI	Lys216Glu	F: 5'-CACTATGGGAAGACCTTACTGATTAC-3' R: 5'-CAGAGTCTGGAAATAAGGTTGAAGC-3'	104	60

**Tablo 2:** PCR'da kullanılan restriksiyon enzimi ve oluşan fragmentler (7).

Gen	Polimorfizm	Restriksiyon enzimi	Restriksiyon ısısı (°C)	Restriksiyon fragmentlerinin uzunlukları (bp)
BPI	Lys216Glu	<i>Hind</i> III	37	G alleli: 104 bp A alleli: 78+26 bp

### 3.4. İstatistiksel Analizler

Hastalara ait bilgilerin data girişi ve istatistiksel analizler için SPSS 16.0 isimli istatistik programı kullanıldı. Kategorik verileri karşılaştırmak için *Ki-kare* ( $\chi^2$ ) *testi* kullanıldı. Oranlar arasındaki fark hesaplamalarında eğer uygunsuzsa "*Fischer exact test*" tercih edildi. Anlamlı "p" değeri  $p < 0,05$  olarak kabul edildi.

### 3.5. Etik Kurul Onayı

Çalışma planlandıktan sonra, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı alındı. (İstanbul 9 no'lu Klinik Araştırmalar Etik Kurulu; Proje no: 09.2009.0018, Kabul tarihi: 07 Ocak 2010).



## 4 BULGULAR

### 4.1. Hastaların Demografik Özellikleri

Çalışmamıza 304 ÜK, 224 CH olmak üzere toplam 528 İBH hastası, 339 sağlıklı gönüllü alındı. Hastalarda ortalama yaş ÜK için ( $45,7\pm 14,9$ ), CH için ( $39,9\pm 13,4$ ), kontrol grubunda ise ( $37,6\pm 12,4$ )'idi. İBH hastalarının yaklaşık %44,5'i, kontrol grubunun ise %40'ı kadın idi. Yaş ve cinsiyet açısından gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu. Hasta populasyonumuzda, ÜK'de en sık sol kolit tutulumu (%52,6), CH'da ise en sık ileokolik tutulum (%45,1) görülmekteydi. CH davranış paterni açısından en sık inflamatuvar (%60,7) tipi bulunmaktaydı. Tüm hastaların demografik ve klinik bilgileri Tablo-3, 4 ve 5'de özetlenmiştir.

**Tablo 3:** İBH hastalarının ve kontrol grubunun demografik bilgileri.

	İBH	ÜK	CH	Kontrol	Toplam
Cinsiyet kadın% (kadın/erkek)	44,5 (235/293)	44,8 (134/170)	45,1 (101/123)	40,0 (136/203)	42,7 (371/496)
Yaş (ort $\pm$ SS)(min-mak)	43,2 $\pm$ 14,5 (18-86)	45,7 $\pm$ 14,9 (18-81)	39,9 $\pm$ 13,4 (18-86)	37,6 $\pm$ 12,4 (18-86)	41,0 $\pm$ 14,0 (18-86)

**Tablo 4:** İBH hastalarında hastalık türü ve alttiplerinin dağılımı.

		Ülseratif Kolit	Crohn Hastalığı
ÜK tutulum yeri	Proktit n(%)	45 (14,8)	
	Sol kolit n(%)	160 (52,6)	
	Pan kolit n(%)	99 (32,6)	
CH tutulum yeri	İleal n(%)		67 (29,9)
	İleokolik n(%)		101 (45,1)
	Kolik n(%)		56 (25,0)
CH davranış tipi	İnflamatuvar n(%)		136 (60,7)
	Fistülizan n(%)		51 (22,8)
	Obstrüktif n(%)		31 (13,8)
	Fist.+Obstr. n(%)		6 (2,7)

**Tablo 5:** İBH hastalarının klinik bilgileri.

	İBH	Ülseratif Kolit	Crohn Hastalığı
Steroid kullanımı n(%)	158 (32,2)	77 (26,3)	81 (40,9)
Steroid bağımlılığı n(%)	31 (6,3)	11 (3,8)	20 (10,1)
Azathioprin kullanımı n(%)	143 (29,7)	44 (15,1)	99 (52,1)
AntiTNFa kullanımı n(%)	35 (7,1)	3 (1,0)	32 (16,2)
Kolektomi varlığı n(%)	39 (8,0)	17 (5,8)	22 (11,2)
Operasyon n(%)	81 (16,8)	37 (12,7)	44 (23,2)
Ailede İBH varlığı n(%)	52 (10,8)	33 (11,1)	19 (10,0)
Amip varlığı n(%)	53 (10,1)	42 (13,8)	11 (5,0)
Sigara kullanımı n(%)	197 (41,0)	104 (35,7)	93 (48,9)
Alkol kullanımı n(%)	36 (7,5)	23 (7,9)	13 (6,8)

## 4.2. Genotip ve Allel Frekanslarının Karşılaştırılması

ÜK, CH ve kontrol grupları BPIL216G polimorfizmi açısından karşılaştırıldığında, 3 grup arasında hem genotip frekansları açısından ( $p < 0,0001$ ), hem de allel frekansları açısından ( $p < 0,0001$ ) anlamlı fark olduğu görüldü (Tablo-6). Bu ilişkinin boyutunu saptamak için yapılan analizlerde, ÜK'de G alleli anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Bu alleli taşıyanlarda ÜK görülme riski, kontrol grubuna göre 1,5 kat daha yüksek olmaktadır ( $p = 0,0003$ , OR: 1,504 %95 CI: 1,207- 1,875). A alleli ise anlamlı olarak daha düşük izlenmekle birlikte, ÜK'e karşı koruyucu etkiye sahiptir (Tablo-7). Genotiplerin karşılaştırılmasında ise GG genotipi ÜK'de anlamlı derecede yüksek bulundu. GG genotipi ÜK için normale göre 1,8 kat daha yüksek risk oluşturmaktadır ( $p = 0,0006$ , OR: 1,862 %95 CI: 1,302- 2,662) (Tablo-8). AA genotipinin ise ÜK için koruyucu olduğu tespit edildi ( $p = 0,0113$ , OR: 0,686 %95 CI: 0,422- 0,897) (Tablo-9). Allel frekanslarının karşılaştırılmasında CH ile kontrol grubu arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. Genotip frekanslarına baktığımızda ise, CH'da AA genotipini anlamlı derecede daha düşük olduğu izlendi. Bu genotipin CH karşı koruyucu etkiye sahip olduğu söylenebilir ( $p < 0,0001$ , OR: 0,4053 %95 CI: 0,2563- 0,6409) (Tablo-9). GG genotipi açısından CH ile kontrol grubu arasında anlamlı ilişki bulunamadı ( $p = 0,101$ ) (Tablo-8).

ÜK ve CH tutulum yerleri ve CH davranış paterni ile gen polimorfizmi arasında anlamlı herhangi bir ilişki saptanmadı (sırasıyla,  $p = 0,941$ ,  $0,596$  ve  $0,412$ ) (Tablo-10). İlaç kullanımı ile polimorfizm arasında da ilişki olup olmadığı araştırıldı. Steroid kullanımı ile ÜK arasında herhangi bir ilişki bulunmazken, CH ile arasında anlamlı derecede ilişki saptandı (sırasıyla,  $p = 0,447$  ve  $0,033$ ) (Tablo-11). Genotiplerle bağlantısına baktığımızda, GG genotipi steroid kullananlarda anlamlı olarak düşük görüldü ( $p = 0,0127$ , OR: 0,80 %95 CI: 0,68- 0,94) (Tablo-12). Steroid bağımlılığı için de karşılaştırdığımızda, sadece CH ile anlamlı derecede ilişkili olduğu saptandı ( $p = 0,046$ , OR: 0,75 %95 CI: 0,66- 0,86] (Tablo-11). GG genotipi steroid

kullanımı ile ilişkili olduğu için GG genotipinin steroid bağımlılığı için muhtemel ilişkisine bakıldı. GG genotipi benzer şekilde steroid bağımlılıklarında da anlamlı olarak düşük bulundu ( $p= 0,0286$ , OR:0,75 %95 CI:0,66- 0,86) (Tablo-13). *Azathioprine* ve antiTNF $\alpha$  kullanımı ile polimorfizm arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. İnflamasyon süresi, ekstraintestinal tutulum, kolektomi, operasyon, ailede İBH varlığı, aktif tüberküloz hikayesi, alkol ve sigara kullanımı, cinsiyet, yaş ve herhangi bir zamanda amip enfestasyonu ile de ilişki bulunmadı.

**Tablo 6:** Genotip ve allel frekanslarının dağılımı ve karşılaştırılması.

BPIL216G mut.	AA genotipi	AG genotipi	GG genotipi	A alleli	G alleli
ÜK n(%)	56 (18,4)	150 (49,3)	98 (32,2)	262 (43)	346 (57)
CH n(%)	29 (12,9)	136 (60,7)	59 (26,3)	194 (43)	254 (57)
Kontrol n(%)	91 (26, 8)	179 (52,8)	69 (20,4)	361 (53)	317 (47)
Toplam n(%)	176 (20,2)	465 (53,6)	226 (26,1)	817 (47,1)	917 (52,9)
	$X^2$ : 25,518 $p<0,0001$ SD: 4			$X^2$ : 98,432 $p<0,0001$ SD: 2	

**Tablo 7:** ÜK'in Allel frekansları açısından kontrol grubu ile karşılaştırılması.

BPIL216G mut.	G alleli	A alleli	Toplam	Fischer's Exact Test
ÜK n(%)	346 (26,9)	262 (20,4)	608 (47,3)	$p=0,0003$ OR=1,504 (%95CI:1,207-1,875)
Kontrol n(%)	317 (24,6)	361 (28,1)	678 (52,7)	
Toplam n(%)	663 (51,5)	623 (48,5)	1286 (100)	

**Tablo 8:** ÜK ve CH'nın GG genotipi açısından kontrol grubu ile karşılaştırılması.

BPIL216G mut.	GG genotipi	AG + AA genotipleri	Fischer's Exact Test
ÜK n(%)	98 (15)	206 (32)	p=0,0006 OR=1,862 (%95 CI:1,302-2,662)
Kontrol n(%)	69 (11)	270 (42)	
Toplam n(%)	167 (26)	476 (74)	
CH n(%)	59 (10,5)	165 (29,3)	p=0,101
Kontrol n(%)	69 (12,2)	270 (47,9)	
Toplam n(%)	128 (22,8)	435 (77,2)	

**Tablo 9:** ÜK ve CH'nın AA genotipi açısından kontrol grubu ile karşılaştırılması.

BPIL216G mut.	AA genotipi	AG + GG genotipleri	Fischer's Exact Test
ÜK n(%)	56 (9)	248 (39)	p=0,0113 OR=0,686 (%95 CI: 0,422-0,897)
Kontrol n(%)	91 (14)	248 (39)	
Toplam n(%)	147 (23)	496 (77)	
CH n(%)	29 (5)	195 (35)	p<0,0001 OR=0,4053 (%95 CI:1,256-0,640)
Kontrol n(%)	91 (16)	248 (44)	
Toplam n(%)	120 (21)	443 (79)	

**Tablo 10:** ÜK ve CH tutulum yeri ile CH davranış paterninin polimorfizm açısından karşılaştırılması.

BPIL216G mut.		AA genotipi	AG genotipi	GG genotipi	Toplam	Pearson Chi-Square Test
ÜK tutulum yeri	Proktit n(%)	7 (15,6)	23 (51,1)	15 (33,3)	45 (100)	p=0,941
	Sol kolit n(%)	32 (20)	76 (47,5)	52 (32,5)	160 (100)	
	Pan kolit n(%)	17 (17,2)	51 (51,5)	31 (31,3)	99 (100)	
CH tutulum yeri	İleal n(%)	8 (11,9)	37 (55,2)	22 (32,8)	57 (100)	p=0,596
	İleokolik n(%)	13 (12,9)	62 (61,4)	26 (25,7)	67 (100)	
	Kolik n(%)	8 (14,3)	37 (66,1)	11 (19,6)	101 (100)	
CH davranış paterni	Fistülizan n(%)	10 (19,6)	31 (60,7)	10 (19,6)	51 (100)	p=0,412
	Obstrüktif n(%)	1 (3,2)	22 (70,9)	8 (25,8)	31 (100)	
	İnflamat. n(%)	17 (12,5)	80 (58,8)	39 (28,7)	136 (100)	
	Fist.+Obstr.n(%)	1 (16,6)	3 (50)	2 (33,3)	6 (100)	

**Tablo 11:** İBH'da steroid kullanımı ve steroid bağımlılığının polimorfizm açısından karşılaştırılması.

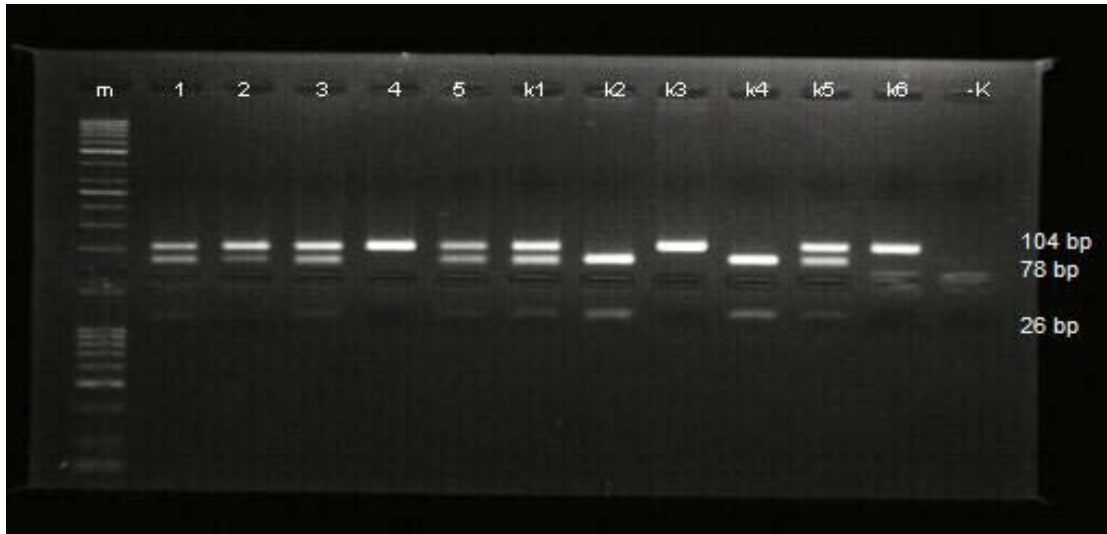
BPIL216G mutasyonu		AA genotipi	AG genotipi	GG genotipi	Pearson Chi-Square Test	
Ülseratif kolit	Steroid kullanımı	Yok n(%)	43 (19,9)	105 (48,6)	68 (31,5)	p=0,447
		Var n(%)	11 (14,3)	43 (55,8)	23 (29,9)	
Crohn hastalığı	Steroid kullanımı	Yok n(%)	14 (12,0)	65 (55,6)	38 (32,5)	p=0,033
		Var n(%)	13 (16,0)	55 (67,9)	13 (16,0)	
Kontrol	Steroid kullanımı	Yok n(%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
		Var n(%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Ülseratif kolit	Steroid bağımlılığı	Yok n(%)	51 (18,1)	145 (57,4)	86 (30,5)	p=0,291
		Var n(%)	3 (27,3)	3 (27,3)	5 (45,5)	
Crohn hastalığı	Steroid bağımlılığı	Yok n(%)	22 (12,4)	106 (59,6)	50 (28,1)	p=0,046
		Var n(%)	5 (25,0)	14 (70,0)	1 (5,0)	
Kontrol	Steroid bağımlılığı	Yok n(%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
		Var n(%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

**Tablo 12:** CH'da steroid kullanımının GG genotipi açısından karşılaştırılması.

BPIL216G mut.	GG genotipi	AG + AA genotipleri	Toplam	Fischer's Exact Test
Steroid kullanımı yok n(%)	38 (19,0)	79 (40,0)	117 (59,0)	p=0,0127 OR: 0,80 %95 CI:0,68-0,94
Steroid kullanımı var n(%)	13 (7,0)	68 (34,0)	81 (41,0)	
Toplam n(%)	51 (26,0)	147 (74,0)	198 (100)	

**Tablo 13:** CH'da steroid bağımlılığının GG genotipi açısından karşılaştırılması.

BPIL216G mut.	GG genotipi	AG + AA genotipleri	Toplam	Fischer's Exact Test
Steroid bağımlılığı yok n(%)	50 (25,0)	128 (65,0)	178 (90,0)	p=0,0286 OR: 0,75 %95 CI:0,66-0,86
Steroid bağımlılığı var n(%)	1 (1,0)	19 (10,0)	20 (10,0)	
Toplam n(%)	51 (26,0)	147 (74,0)	198 (100)	



**Şekil 5:** G aleli: 104 bp, A alleli: 78+26 bp.

## 5 TARTIŞMA

BPI ve LBP, GNB'lerin oluşturduğu enfeksiyonlara karşı doğal bağışıklık sisteminin kullandığı en etkili moleküllerdendir. Patojen tanıyıcı moleküllerdeki gen polimorfizmlerinin İBH ile ilişkileri gösterildikten sonra, GNB'lerin tanınmasında ve yok edilmesinde rol alan BPI molekülünün İBH ile ilişkisi araştırma konusu olmuştur. İnflamatuvar hadiselerde özellikle, İBH'de intestinal mukozada, İBH'nin kliniği ile doğru orantılı olarak BPI miktarının arttığı gösterilmesine rağmen (141), BPI gen polimorfizmi ile ilişkisi bilinmemektedir. BPI gen polimorfizmi tanımlandıktan sonra kronik inflamatuvar bir hastalık olan İBH ile ilgili 4 büyük çalışma yayınlanmıştır. Török'ün, 2004 yılında 98 ÜK, 102 CH hastasını dahil ettiği çalışmasında BPI ve İBH arasında hem genotip, hem de allel açısından bir ilişki gösterilememesine rağmen, başka bir patojen tanımlayan molekül olan TLR4 ile BPI (AG genotipi) gen polimorfizmi etkileşiminin CH riskini arttırdığı tespit edilmiştir ( $p=0.028$ ). Fenotip açısından değerlendirildiğinde ise herhangi bir ilişki gösterilememiştir (7). Alman popülasyonunda yapılmış diğer bir çalışma 2005 yılında yayınlanmıştır (6). Klein ve ark. 265 CH, 207 ÜK hastasında yapmış olduğu çalışmada Török'ten farklı olarak GG genotipinin CH hastalığı riskini azalttığı tespit edilmiştir ( $p<0.027$ ). Aynı popülasyondan olmasına rağmen bu farklılık çalışmaya alınan hasta sayısının farklı olmasıyla ilgili olabilir. Klein'in çalışmasında da fenotipik olarak bir ilişki gösterilememiştir. Diğer bir çalışma Akın ve ark.(8) tarafından Türk popülasyonunda yapılmıştır. Çalışma 116 CH, 122 ÜK ve 197 sağlıklı kontrolden oluşmaktadır. Hem allel, hem genotip frekansları açısından İBH ile kontrol grubu arasında anlamlı derecede fark olduğu bulunmuştur. G alleli ve GG genotipi hem ÜK, hem CH'da anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. Akın'ın çalışmasıyla ilk defa ÜK ile BPI gen polimorfizmi arasında ilişki olduğu gösterilmiştir ( $p=0,0002$ )(8). Son olarak 2009'da Petermann ve ark.(9), Yeni Zelanda popülasyonunda yaptıkları çalışmada (400 ÜK, 382 CH, 24 İndetermine kolit ve 282 kontrol) genotip ve allel frekansları açısından İBH ile kontrol grubu arasında ilişki



saptayamamışlardır. Fakat fenotipik olarak değerlendirdiklerinde ileokolik CH ile A allelinin ilişkili olduğunu bulmuşlardır ( $p=0,006$ , OR:1.6). Diğer fenotiplerle ilişki gösterilememiştir. Petermann ve ark. tarafından aynı zamanda LPS sinyal yolağındaki diğer polimorfizmler ile BPI polimorfizmi etkileşiminin İBH ile ilişkisi değerlendirilmiştir. CD14 ile BPI arasındaki etkileşimin zayıf da olsa ÜK ile ilişkili olduğu saptanırken ( $p=0,045$ ), diğerlerinde anlamlı ilişki gösterilememiştir. Genel olarak yapılan çalışmalarla birbirinden farklı sonuçlar elde edildiği gözükmektedir. Petermann çalışmasında sadece Avrupa kökenli hastaları almasına rağmen Avrupa kökenli Alman popülasyonuna benzememektedir. Türk çalışmasında ise tamamen farklı sonuçlar elde edilmiştir. Etnik farklılığın burada büyük rol oynadığı düşünülebilir.

Bizim çalışmamızda BPI gen polimorfizmi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, hem CH, hem ÜK'de ileri derecede ilişkili olduğu bulundu ( $p=0,0001$ ). ÜK ile polimorfizm arasındaki ilişki ilk defa Akın tarafından gösterildi ( $p=0.0002$ )(8). Fakat çalışma az sayıda hasta ile yapılması nedeniyle, BPI gen polimorfizmini çok merkezli olarak, daha geniş bir popülasyonda tekrar inceledik. Sonuç olarak, zayıf olan bu ilişki daha kuvvetli bir şekilde gösterilmiş oldu ( $p=0,0006$ ). Petermann ve ark.(9) tek başına BPI ile ÜK arasında ilişki saptayamazken, CD14 polimorfizmi ile birlikte değerlendirildiğinde ilişki zayıf da olsa anlamlı düzeye ulaşmaktadır ( $p=0,045$ ). ÜK ile ilişki net bir şekilde sadece Türk popülasyonunda gösterilmiş olması, diğer popülasyonlarda bu anlamlılığa ulaşılması için çok daha fazla hasta sayısına gereksinim olduğu şeklinde yorumlanabileceği gibi Türk popülasyonunda görülen ÜK'in etiyolojisinde BPI'in çok daha etkili olduğu da söylenebilir. Allel frekansları açısından bakıldığında sadece Akın'ın çalışmasında İBH ile ilişki gösterilmiştir. G alleli hem ÜK, hem de CH'da anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (sırasıyla  $p=0,0001$ ,  $p=0,0001$ )(8). Aynı popülasyonda daha fazla hastayla yaptığımız çalışmada ÜK ile ilişki anlamlılığını devam ettirirken, CH'da anlamlılığını yitirmiştir. G allelinin ÜK riskini 1.5 kat arttırdığı tespit edilmiştir ( $p=0.0003$ ). Aynı zamanda A allelinin

ÜK için koruyucu olduğu ortaya çıkmıştır. Klein ve ark.(6) GG genotipinin CH için koruyucu olduğunu belirtirken, Akın GG genotipini hem ÜK, hem de CH'da anlamlı derecede yüksek olduğunu bildirmiştir (sırasıyla  $p=0,0002$ ,  $p=0,03$ )(8). Daha geniş popülasyonda yaptığımız çalışmamızda GG genotipiyle ÜK arasındaki ilişki daha güçlü bir şekilde gösterilirken CH ile ilişkinin ortadan kalktığı bulundu (sırasıyla  $p=0,0006$ ,  $p=0,101$ ). GG genotipi çalışmamızda ÜK için 1.8 kat daha fazla risk oluşturduğu görüldü ( $p=0.0006$ ). Diğer taraftan, Akın'ın çalışmasından farklı olarak AA genotipinin CH ve ÜK için koruyucu olduğu tespit edildi (sırasıyla  $p<0.0001$ ,  $p=0,0113$ ). Diğer çalışmalarda genotip frekansları İBH ile ilişkili bulunmadı. Peterman ve ark.(9), ileokolik CH ile A alleli arasında ilişki saptarken bizim çalışmamız da dahil hiçbir çalışmada fenotipik açıdan herhangi bir ilişki saptanmadı. Görülmektedir ki, aynı allel ve genotipler, birbirinden farklı toplumlarda birinde koruyucu olurken diğerinde risk oluşturabilmektedir. Bunun nedeni henüz bilinmemektedir. Türk popülasyonunda yapılan 2 çalışmada da risk ve koruyucu alleller birbirine benzemektedir.

Daha önceki çalışmalarda ilaç kullanımıyla polimorfizm arasında ilişki bulunmazken, ilk defa CH'da steroid kullanımı ve steroid bağımlılığının polimorfizm ile ilişkili olduğu saptandı. GG genotipi CH hastalığında steroid kullananlar ile steroid bağımlılarında anlamlı olarak düşük saptanmıştır (sırasıyla,  $p=0.033$ ,  $p=0.028$ ). GG genotipi daha hafif seyirli CH ile ilişkili olduğu söylenebilir. Polimorfizmin, hastaların ilerideki tedavileri açısından yol gösterici olabileceği düşünülebilir. ÜK'de steroid kullanımı ve bağımlılığı ile polimorfizm arasında ilişki saptanmazken, diğer ilaçlar ile de böyle bir ilişki gösterilemedi. Baktığımız diğer klinik özellikler literatürden farklılık göstermiyordu (6-7, 9).

Sonuç olarak çalışmamızla birlikte, Türk popülasyonunda ÜK ve BPI gen polimorfizmi arasında ilişki daha kuvvetli bir şekilde teyit edilmiş oldu. Aynı zamanda ilk defa İBH'da steroid kullanımı ve steroid bağımlılığının BPI ile ilişkili olduğu gösterildi. BPI polimorfizmi, İBH'da tedavi açısından yol

gösterici olabilir. Alman ve Türk çalışmaları kendi içinde benzer sonuçlar göstermesiyle birlikte, genel olarak bütün çalışmalarda birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. Dört çalışma da aynı metodolojik yöntemi kullanmaktadır. Biz de Török'ün (7) kullandığı metodolojiyi çalışmamızda referans olarak aldık. Çalışmalar arasındaki farklılıklar metodolojiden değil de, 3 farklı toplumdaki çalışılması nedeniyle toplumlar arası etnik farklılıktan kaynaklanıyor olabilir. Türk toplumu İBH insidansı açısından Avrupa ile Asya arasında orta bir konumda yer almaktadır. İBH ile ilişkili diğer polimorfizmlerle birlikte değerlendirildiğinde Türk popülasyonunun Avrupa'dan da Asya'dan da farklılık arzettiği görülmektedir. Bu da etnik farklılığı desteklemektedir. Farklı etnik gruplarda yapılacak, geniş çaplı çalışmalarla BPI gen polimorfizminin İBH ile ilişkisi daha net ortaya konulabilir. BPI'nin gelecekte İBH tedavisi için potansiyel bir hedef olması açısından, BPI gen polimorfizminin hastalıkla ilişkisi, literatürde bu alanda yapılacak yeni çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

## 6 KAYNAKÇA

1. Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease, *Clin Microbiol Rev* 2002;15(1):79-94. PMID: 118061.
2. Lakatos PL, Fischer S, Lakatos L, Gal I, Papp J. Current concept on the pathogenesis of inflammatory bowel disease-crosstalk between genetic and microbial factors: pathogenic bacteria and altered bacterial sensing or changes in mucosal integrity take "toll" ?, *World J Gastroenterol* 2006;12(12):1829-41.
3. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16, *Nature* 1996;379(6568):821-3.
4. Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB, *J Biol Chem* 2001;276(7):4812-8.
5. Weiss J. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and lipopolysaccharide-binding protein (LBP): structure, function and regulation in host defence against Gram-negative bacteria, *Biochem Soc Trans* 2003;31(Pt 4):785-90.
6. Klein W, Tromm A, Folwaczny C, Hagedorn M, Duerig N, Epplen J, et al. A polymorphism of the bactericidal/permeability increasing protein (BPI) gene is associated with Crohn's disease, *J Clin Gastroenterol* 2005;39(4):282-3.
7. Torok HP, Glas J, Tonenchi L, Mussack T, Folwaczny C. Polymorphisms of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease: association of a mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative colitis, *Clin Immunol* 2004;112(1):85-91.
8. Akın H. İnflamatuvar Barsak Hastalığında Lipopolisakkarid Sinyal Kompleks Polimorfizmleri ve Toll- Benzeri Reseptör 4 Gen Mutasyonu [Yandal Uzmanlık Tezi]. İstanbul: Marmara Üniversitesi; 2008.

9. Petermann I, Huebner C, Browning BL, Gearry RB, Barclay ML, Kennedy M, et al. Interactions among genes influencing bacterial recognition increase IBD risk in a population-based New Zealand cohort, *Hum Immunol* 2009;70(6):440-6.
10. Mayberry JF, Rhodes J. Epidemiological aspects of Crohn's disease: a review of the literature, *Gut* 1984;25(8):886-99. PMID: 1432571.
11. Kirsner JB, Shorter RG. Recent developments in "nonspecific" inflammatory bowel disease (first of two parts), *N Engl J Med* 1982;306(13):775-85.
12. Tozun N, Atug O, Imeryuz N, Hamzaoglu HO, Tiftikci A, Parlak E, et al. Clinical characteristics of inflammatory bowel disease in Turkey: a multicenter epidemiologic survey, *J Clin Gastroenterol* 2009;43(1):51-7.
13. Sonnenberg A, McCarty DJ, Jacobsen SJ. Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States, *Gastroenterology* 1991;100(1):143-9.
14. Odes HS, Fraser D, Krawiec J. Incidence of idiopathic ulcerative colitis in Jewish population subgroups in the Beer Sheva region of Israel, *Am J Gastroenterol* 1987;82(9):854-8.
15. Rogers BH, Clark LM, Kirsner JB. The epidemiologic and demographic characteristics of inflammatory bowel disease: an analysis of a computerized file of 1400 patients, *J Chronic Dis* 1971;24(12):743-73.
16. Lakatos L, Lakatos PL. [Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases], *Orv Hetil* 2003;144(38):1853-60.
17. Hugot JP. Inflammatory bowel disease: causes and consequences, *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18(3):447-9.
18. Sand B. Crohn's Disease. 8th Edition ed. Feldman M, editor: Saunders; 2006.
19. Su C. Ulcerative Colitis. 8Th Edition ed. Feldman M, editor: Saunders; 2006.

20. Lakatos L, Pandur T, David G, Balogh Z, Kuronya P, Tollas A, et al. Association of extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease in a province of western Hungary with disease phenotype: results of a 25-year follow-up study, *World J Gastroenterol* 2003;9(10):2300-7.
21. Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, Lappalainen M, Farkkila M, Kontula K. Family and twin studies in inflammatory bowel disease, *World J Gastroenterol* 2006;12(23):3668-72.
22. Mahida YR, Rolfe VE. Host-bacterial interactions in inflammatory bowel disease, *Clin Sci (Lond)* 2004;107(4):331-41.
23. Burnham WR, Lennard-Jones JE, Stanford JL, Bird RG. Mycobacteria as a possible cause of inflammatory bowel disease, *Lancet* 1978;2(8092 Pt 1):693-6.
24. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, Barnich N, et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease, *Gastroenterology* 2004;127(2):412-21.
25. Graham DY, Yoshimura HH, Estes MK. DNA hybridization studies of the association of *Pseudomonas maltophilia* with inflammatory bowel diseases, *J Lab Clin Med* 1983;101(6):940-54.
26. Liu Y, van Kruiningen HJ, West AB, Cartun RW, Cortot A, Colombel JF. Immunocytochemical evidence of *Listeria*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus* antigens in Crohn's disease, *Gastroenterology* 1995;108(5):1396-404.
27. Kangro HO, Chong SK, Hardiman A, Heath RB, Walker-Smith JA. A prospective study of viral and mycoplasma infections in chronic inflammatory bowel disease, *Gastroenterology* 1990;98(3):549-53.
28. Puspok A, Dejaco C, Oberhuber G, Waldhor T, Hirschl AM, Vogelsang H, et al. Influence of *Helicobacter pylori* infection on the phenotype of Crohn's disease, *Am J Gastroenterol* 1999;94(11):3239-44.

29. Blaser MJ, Miller RA, Lacher J, Singleton JW. Patients with active Crohn's disease have elevated serum antibodies to antigens of seven enteric bacterial pathogens, *Gastroenterology* 1984;87(4):888-94.
30. Main J, McKenzie H, Yeaman GR, Kerr MA, Robson D, Pennington CR, et al. Antibody to *Saccharomyces cerevisiae* (bakers' yeast) in Crohn's disease, *BMJ* 1988;297(6656):1105-6. PMID: 1834894.
31. Chiodini RJ. Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities, *Clin Microbiol Rev* 1989;2(1):90-117. PMID: 358101.
32. Kallinowski F, Wassmer A, Hofmann MA, Harmsen D, Heesemann J, Karch H, et al. Prevalence of enteropathogenic bacteria in surgically treated chronic inflammatory bowel disease, *Hepatogastroenterology* 1998;45(23):1552-8.
33. Lamps LW, Madhusudhan KT, Havens JM, Greenson JK, Bronner MP, Chiles MC, et al. Pathogenic *Yersinia* DNA is detected in bowel and mesenteric lymph nodes from patients with Crohn's disease, *Am J Surg Pathol* 2003;27(2):220-7.
34. Martin HM, Campbell BJ, Hart CA, Mpofu C, Nayar M, Singh R, et al. Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer, *Gastroenterology* 2004;127(1):80-93.
35. Ekobom A, Wakefield AJ, Zack M, Adami HO. Perinatal measles infection and subsequent Crohn's disease, *Lancet* 1994;344(8921):508-10.
36. Hommes DW, Sterringa G, van Deventer SJ, Tytgat GN, Weel J. The pathogenicity of cytomegalovirus in inflammatory bowel disease: a systematic review and evidence-based recommendations for future research, *Inflamm Bowel Dis* 2004;10(3):245-50.
37. Guarner F, Malagelada JR. Role of bacteria in experimental colitis, *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17(5):793-804.
38. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease, *Nature* 2001;411(6837):599-603.

39. Dotan I, Rachmilewitz D. Probiotics in inflammatory bowel disease: possible mechanisms of action, *Curr Opin Gastroenterol* 2005;21(4):426-30.
40. Shanahan F. Probiotics and inflammatory bowel disease: is there a scientific rationale?, *Inflamm Bowel Dis* 2000;6(2):107-15.
41. Hilsden RJ, Meddings JB, Sutherland LR. Intestinal permeability changes in response to acetylsalicylic acid in relatives of patients with Crohn's disease, *Gastroenterology* 1996;110(5):1395-403.
42. Macpherson A, Khoo UY, Forgacs I, Philpott-Howard J, Bjarnason I. Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria, *Gut* 1996;38(3):365-75. PMID: 1383064.
43. Lodes MJ, Cong Y, Elson CO, Mohamath R, Landers CJ, Targan SR, et al. Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease, *J Clin Invest* 2004;113(9):1296-306. PMID: 398429.
44. Dotan I, Fishman S, Dgani Y, Schwartz M, Karban A, Lerner A, et al. Antibodies against laminaribioside and chitobioside are novel serologic markers in Crohn's disease, *Gastroenterology* 2006;131(2):366-78.
45. Vasiliauskas EA, Plevy SE, Landers CJ, Binder SW, Ferguson DM, Yang H, et al. Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with Crohn's disease define a clinical subgroup, *Gastroenterology* 1996;110(6):1810-9.
46. Harrer M, Reinisch W, Dejaco C, Kratzer V, Gmeiner M, Miehsler W, et al. Do high serum levels of anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies result from a leakiness of the gut barrier in Crohn's disease?, *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15(12):1281-5.
47. Walker LJ, Aldhous MC, Drummond HE, Smith BR, Nimmo ER, Arnott ID, et al. Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies (ASCA) in Crohn's disease are associated with disease severity but not NOD2/CARD15 mutations, *Clin Exp Immunol* 2004;135(3):490-6. PMID: 1808965.



48. Wehkamp J, Schmid M, Fellermann K, Stange EF. Defensin deficiency, intestinal microbes, and the clinical phenotypes of Crohn's disease, *J Leukoc Biol* 2005;77(4):460-5.
49. Lala S, Ogura Y, Osborne C, Hor SY, Bromfield A, Davies S, et al. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells, *Gastroenterology* 2003;125(1):47-57.
50. Wehkamp J, Schmid M, Stange EF. Defensins and other antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease, *Curr Opin Gastroenterol* 2007;23(4):370-8.
51. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, et al. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(50):18129-34. PMID: 1306791.
52. Fellermann K, Stange DE, Schaeffeler E, Schmalzl H, Wehkamp J, Bevins CL, et al. A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon, *Am J Hum Genet* 2006;79(3):439-48. PMID: 1559531.
53. Pullan RD, Thomas GA, Rhodes M, Newcombe RG, Williams GT, Allen A, et al. Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis, *Gut* 1994;35(3):353-9. PMID: 1374589.
54. Shirazi T, Longman RJ, Corfield AP, Probert CS. Mucins and inflammatory bowel disease, *Postgrad Med J* 2000;76(898):473-8. PMID: 1741691.
55. Myerscough N, Warren B, Gough M, Corfield A. Expression of mucin genes in ulcerative colitis, *Biochem Soc Trans* 1995;23(4):536S.
56. Buisine MP, Desreumaux P, Debailleul V, Gambiez L, Geboes K, Ectors N, et al. Abnormalities in mucin gene expression in Crohn's disease, *Inflamm Bowel Dis* 1999;5(1):24-32.

57. Kyo K, Parkes M, Takei Y, Nishimori H, Vyas P, Satsangi J, et al. Association of ulcerative colitis with rare VNTR alleles of the human intestinal mucin gene, MUC3, *Hum Mol Genet* 1999;8(2):307-11.
58. Annese V, Valvano MR, Palmieri O, Latiano A, Bossa F, Andriulli A. Multidrug resistance 1 gene in inflammatory bowel disease: a meta-analysis, *World J Gastroenterol* 2006;12(23):3636-44.
59. Vermeire S. DLG5 and OCTN, *Inflamm Bowel Dis* 2004;10(6):888-90.
60. van Bodegraven AA, Curley CR, Hunt KA, Monsuur AJ, Linskens RK, Onnie CM, et al. Genetic variation in myosin IXB is associated with ulcerative colitis, *Gastroenterology* 2006;131(6):1768-74.
61. Van Limbergen J, Russell RK, Nimmo ER, Ho GT, Arnott ID, Wilson DC, et al. Genetics of the innate immune response in inflammatory bowel disease, *Inflamm Bowel Dis* 2007;13(3):338-55.
62. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity, *Cell* 2006;124(4):783-801.
63. Creagh EM, O'Neill LA. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity, *Trends Immunol* 2006;27(8):352-7.
64. Seong SY, Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses, *Nat Rev Immunol* 2004;4(6):469-78.
65. Anderson KV, Bokla L, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product, *Cell* 1985;42(3):791-8.
66. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity, *Nature* 1997;388(6640):394-7.
67. West AP, Koblansky AA, Ghosh S. Recognition and signaling by toll-like receptors, *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006;22:409-37.
68. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene, *Science* 1998;282(5396):2085-8.

69. Mitchell JA, Fitzgerald KA, Coyle A, Silverman N, Cartwright N. TOLLing away in Brazil, *Nat Immunol* 2006;7(7):675-9.
70. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(25):13766-71. PMID: 17650.
71. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3, *Nature* 2001;413(6857):732-8.
72. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5, *Nature* 2001;410(6832):1099-103.
73. Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, et al. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome, *Nat Immunol* 2004;5(2):190-8.
74. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity, *Int Immunol* 2005;17(1):1-14.
75. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses, *Nat Rev Immunol* 2005;5(6):446-58.
76. Sanders CJ, Yu Y, Moore DA, 3rd, Williams IR, Gewirtz AT. Humoral immune response to flagellin requires T cells and activation of innate immunity, *J Immunol* 2006;177(5):2810-8.
77. Seya T, Oshiumi H, Sasai M, Akazawa T, Matsumoto M. TICAM-1 and TICAM-2: toll-like receptor adapters that participate in induction of type 1 interferons, *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37(3):524-9.
78. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, et al. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4, *Nature* 2002;420(6913):324-9.
79. Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, et al. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter

- that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling, *J Immunol* 2002;169(12):6668-72.
80. Carty M, Goodbody R, Schroder M, Stack J, Moynagh PN, Bowie AG. The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling, *Nat Immunol* 2006;7(10):1074-81.
  81. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway, *Nat Immunol* 2002;3(2):196-200.
  82. Doyle S, Vaidya S, O'Connell R, Dadgostar H, Dempsey P, Wu T, et al. IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program, *Immunity* 2002;17(3):251-63.
  83. Nomura F, Akashi S, Sakao Y, Sato S, Kawai T, Matsumoto M, et al. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression, *J Immunol* 2000;164(7):3476-9.
  84. Oostenbrug LE, Drenth JP, de Jong DJ, Nolte IM, Oosterom E, van Dullemen HM, et al. Association between Toll-like receptor 4 and inflammatory bowel disease, *Inflamm Bowel Dis* 2005;11(6):567-75.
  85. Gazouli M, Mantzaris G, Kotsinas A, Zacharatos P, Papalambros E, Archimandritis A, et al. Association between polymorphisms in the Toll-like receptor 4, CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population, *World J Gastroenterol* 2005;11(5):681-5.
  86. Ouburg S, Mallant-Hent R, Crusius JB, van Bodegraven AA, Mulder CJ, Linskens R, et al. The toll-like receptor 4 (TLR4) Asp299Gly polymorphism is associated with colonic localisation of Crohn's disease without a major role for the *Saccharomyces cerevisiae* mannan-LBP-CD14-TLR4 pathway, *Gut* 2005;54(3):439-40. PMID: 1774408.

87. Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, Pierik M, Van Steen K, Gustot T, et al. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis, *Gut* 2004;53(7):987-92. PMID: 1774122.
88. van Heel DA, Fisher SA, Kirby A, Daly MJ, Rioux JD, Lewis CM. Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs, *Hum Mol Genet* 2004;13(7):763-70.
89. Pierik M, Joossens S, Van Steen K, Van Schuerbeek N, Vlietinck R, Rutgeerts P, et al. Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases, *Inflamm Bowel Dis* 2006;12(1):1-8.
90. Torok HP, Glas J, Tonenchi L, Bruennler G, Folwaczny M, Folwaczny C. Crohn's disease is associated with a toll-like receptor-9 polymorphism, *Gastroenterology* 2004;127(1):365-6.
91. Garlanda C, Riva F, Polentarutti N, Buracchi C, Sironi M, De Bortoli M, et al. Intestinal inflammation in mice deficient in Tir8, an inhibitory member of the IL-1 receptor family, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(10):3522-6. PMID: 373495.
92. Chinen T, Kobayashi T, Ogata H, Takaesu G, Takaki H, Hashimoto M, et al. Suppressor of cytokine signaling-1 regulates inflammatory bowel disease in which both IFN $\gamma$  and IL-4 are involved, *Gastroenterology* 2006;130(2):373-88.
93. Harton JA, Ting JP. Class II transactivator: mastering the art of major histocompatibility complex expression, *Mol Cell Biol* 2000;20(17):6185-94. PMID: 86093.
94. Inohara N, Nunez G. The NOD: a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens, *Oncogene* 2001;20(44):6473-81.

95. Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2, *Nat Rev Immunol* 2006;6(1):9-20.
96. Ting JP, Kastner DL, Hoffman HM. CATERPILLERS, pyrin and hereditary immunological disorders, *Nat Rev Immunol* 2006;6(3):183-95.
97. Inohara N, Nunez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis, *Nat Rev Immunol* 2003;3(5):371-82.
98. Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jehanno M, Viala J, et al. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan, *Science* 2003;300(5625):1584-7.
99. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection, *J Biol Chem* 2003;278(11):8869-72.
100. Inohara, Chamaillard, McDonald C, Nunez G. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease, *Annu Rev Biochem* 2005;74:355-83.
101. Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L, et al. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid, *Nat Immunol* 2003;4(7):702-7.
102. McDonald C, Chen FF, Ollendorff V, Ogura Y, Marchetto S, Lecine P, et al. A role for Erbin in the regulation of Nod2-dependent NF-kappaB signaling, *J Biol Chem* 2005;280(48):40301-9.
103. Yamamoto-Furusko JK, Barnich N, Xavier R, Hisamatsu T, Podolsky DK. Centaurin beta1 down-regulates nucleotide-binding oligomerization domains 1- and 2-dependent NF-kappaB activation, *J Biol Chem* 2006;281(47):36060-70.
104. Barnich N, Hisamatsu T, Aguirre JE, Xavier R, Reinecker HC, Podolsky DK. GRIM-19 interacts with nucleotide oligomerization domain 2 and serves as downstream effector of anti-bacterial function in intestinal epithelial cells, *J Biol Chem* 2005;280(19):19021-6.

105. Chen CM, Gong Y, Zhang M, Chen JJ. Reciprocal cross-talk between Nod2 and TAK1 signaling pathways, *J Biol Chem* 2004;279(24):25876-82.
106. Hedl M, Li J, Cho JH, Abraham C. Chronic stimulation of Nod2 mediates tolerance to bacterial products, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(49):19440-5. PMID: 2148308.
107. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease, *Nature* 2001;411(6837):603-6.
108. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations, *Lancet* 2001;357(9272):1925-8.
109. Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease, *Am J Hum Genet* 2002;70(4):845-57. PMID: 379113.
110. Cho JH, Weaver CT. The genetics of inflammatory bowel disease, *Gastroenterology* 2007;133(4):1327-39.
111. Uyar FA, Over-Hamzaoglu H, Ture F, Gul A, Tozun N, Saruhan-Direskeneli G. Distribution of common CARD15 variants in patients with sporadic Crohn's disease: cases from Turkey, *Dig Dis Sci* 2006;51(4):706-10.
112. Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses, *Nat Immunol* 2004;5(8):800-8.
113. Satsangi J, Parkes M, Louis E, Hashimoto L, Kato N, Welsh K, et al. Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12, *Nat Genet* 1996;14(2):199-202.
114. McGovern DP, Hysi P, Ahmad T, van Heel DA, Moffatt MF, Carey A, et al. Association between a complex insertion/deletion polymorphism

- in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease, *Hum Mol Genet* 2005;14(10):1245-50.
115. Sato S, Sanjo H, Tsujimura T, Ninomiya-Tsuji J, Yamamoto M, Kawai T, et al. TAK1 is indispensable for development of T cells and prevention of colitis by the generation of regulatory T cells, *Int Immunol* 2006;18(10):1405-11.
  116. Van Amersfoort ES, Van Berkel TJ, Kuiper J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock, *Clin Microbiol Rev* 2003;16(3):379-414. PMID: 164216.
  117. Capodici C, Chen S, Sidorczyk Z, Elsbach P, Weiss J. Effect of lipopolysaccharide (LPS) chain length on interactions of bactericidal/permeability-increasing protein and its bioactive 23-kilodalton NH2-terminal fragment with isolated LPS and intact *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*, *Infect Immun* 1994;62(1):259-65. PMID: 186095.
  118. Ulevitch RJ, Tobias PS. Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system, *Curr Opin Immunol* 1999;11(1):19-22.
  119. Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnson DA, Kelley M, et al. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14, *J Exp Med* 1994;179(1):269-77. PMID: 2191344.
  120. Elsbach P, Weiss J. Role of the bactericidal/permeability-increasing protein in host defence, *Curr Opin Immunol* 1998;10(1):45-9.
  121. Iovine N, Eastvold J, Elsbach P, Weiss JP, Gioannini TL. The carboxyl-terminal domain of closely related endotoxin-binding proteins determines the target of protein-lipopolysaccharide complexes, *J Biol Chem* 2002;277(10):7970-8.
  122. Iovine NM, Elsbach P, Weiss J. An opsonic function of the neutrophil bactericidal/permeability-increasing protein depends on both its N- and C-terminal domains, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(20):10973-8. PMID: 23549.



123. Fierer J, Swancutt MA, Heumann D, Golenbock D. The role of lipopolysaccharide binding protein in resistance to Salmonella infections in mice, *J Immunol* 2002;168(12):6396-403.
124. Levy O, Canny G, Serhan CN, Colgan SP. Expression of BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) in human mucosal epithelia, *Biochem Soc Trans* 2003;31(Pt 4):795-800.
125. Gegner JA, Ulevitch RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide (LPS) signal transduction and clearance. Dual roles for LPS binding protein and membrane CD14, *J Biol Chem* 1995;270(10):5320-5.
126. Tobias PS, Tapping RI, Gegner JA. Endotoxin interactions with lipopolysaccharide-responsive cells, *Clin Infect Dis* 1999;28(3):476-81.
127. Weinrauch Y, Katz SS, Munford RS, Elsbach P, Weiss J. Deacylation of purified lipopolysaccharides by cellular and extracellular components of a sterile rabbit peritoneal inflammatory exudate, *Infect Immun* 1999;67(7):3376-82. PMID: 116520.
128. Kirschning CJ, Au-Young J, Lamping N, Reuter D, Pfeil D, Seilhamer JJ, et al. Similar organization of the lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and phospholipid transfer protein (PLTP) genes suggests a common gene family of lipid-binding proteins, *Genomics* 1997;46(3):416-25.
129. Weiss J, Elsbach P, Olsson I, Odeberg H. Purification and characterization of a potent bactericidal and membrane active protein from the granules of human polymorphonuclear leukocytes, *J Biol Chem* 1978;253(8):2664-72.
130. Ooi CE, Weiss J, Elsbach P, Frangione B, Mannion B. A 25-kDa NH<sub>2</sub>-terminal fragment carries all the antibacterial activities of the human neutrophil 60-kDa bactericidal/permeability-increasing protein, *J Biol Chem* 1987;262(31):14891-4.
131. Ooi CE, Weiss J, Doerfler ME, Elsbach P. Endotoxin-neutralizing properties of the 25 kD N-terminal fragment and a newly isolated 30 kD C-terminal fragment of the 55-60 kD bactericidal/permeability-

- increasing protein of human neutrophils, *J Exp Med* 1991;174(3):649-55. PMID: 2118937.
132. van der Schaft DW, Toebes EA, Haseman JR, Mayo KH, Griffioen AW. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) inhibits angiogenesis via induction of apoptosis in vascular endothelial cells, *Blood* 2000;96(1):176-81.
  133. Gazzano-Santoro H, Meszaros K, Birr C, Carroll SF, Theofan G, Horwitz AH, et al. Competition between rBPI23, a recombinant fragment of bactericidal/permeability-increasing protein, and lipopolysaccharide (LPS)-binding protein for binding to LPS and gram-negative bacteria, *Infect Immun* 1994;62(4):1185-91. PMID: 186254.
  134. Dentener MA, Von Asmuth EJ, Francot GJ, Marra MN, Buurman WA. Antagonistic effects of lipopolysaccharide binding protein and bactericidal/permeability-increasing protein on lipopolysaccharide-induced cytokine release by mononuclear phagocytes. Competition for binding to lipopolysaccharide, *J Immunol* 1993;151(8):4258-65.
  135. Heumann D, Gallay P, Betz-Corradin S, Barras C, Baumgartner JD, Glauser MP. Competition between bactericidal/permeability-increasing protein and lipopolysaccharide-binding protein for lipopolysaccharide binding to monocytes, *J Infect Dis* 1993;167(6):1351-7.
  136. Dallegri F, Ottonello L. Tissue injury in neutrophilic inflammation, *Inflamm Res* 1997;46(10):382-91.
  137. Svanborg C, Godaly G, Hedlund M. Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence, *Curr Opin Microbiol* 1999;2(1):99-105.
  138. Wilson ME. Effects of bacterial endotoxins on neutrophil function, *Rev Infect Dis* 1985;7(3):404-18.
  139. Weinrauch Y, Foreman A, Shu C, Zarembek K, Levy O, Elsbach P, et al. Extracellular accumulation of potentially microbicidal bactericidal/permeability-increasing protein and p15s in an evolving sterile rabbit peritoneal inflammatory exudate, *J Clin Invest* 1995;95(4):1916-24. PMID: 295736.

140. Katz SS, Weinrauch Y, Munford RS, Elsbach P, Weiss J. Deacylation of lipopolysaccharide in whole *Escherichia coli* during destruction by cellular and extracellular components of a rabbit peritoneal inflammatory exudate, *J Biol Chem* 1999;274(51):36579-84.
141. Monajemi H, Meenan J, Lamping R, Obradov DO, Radema SA, Trown PW, et al. Inflammatory bowel disease is associated with increased mucosal levels of bactericidal/permeability-increasing protein, *Gastroenterology* 1996;110(3):733-9.