



**T.C.**

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI  
GASTROENTEROHEPATOLOJİ BİLİM DALI**

**İNFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALIĞINDA FRACTALKINE  
RESEPTÖR POLİMORFİZMLERİNİN ROLÜ**

**GASTROENTEROHEPATOLOJİ YANDAL UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Hale Gökcan**

**Ankara**

**2011**



**T.C.**  
**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**  
**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**  
**GASTROENTEROHEPATOLOJİ BİLİM DALI**

**İNFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALIĞINDA FRACTALKİNE**  
**RESEPTÖR POLİMORFİZMLERİNİN ROLÜ**

**GASTROENTEROHEPATOLOJİ YANDAL UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Hale Gökcan**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Uğur Yılmaz**

**Ankara**

**2011**

**Başkent Üniversitesi Araştırma Fonu: KA08/148**

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesindeki katkılarından dolayı aşağıda adı geçen kişilere içtenlikle teşekkür ederim.

Tez danışmanım Prof. Dr. Uğur Yılmaz'a ve hocalarım Prof. Dr. Fatih Hilmioğlu, Doç. Dr. Haldun Selçuk, Doç. Dr. Nurten Savaş'a tüm çalışma boyunca yaptıkları rehberlik, katkı ve yardımlar için, Prof Dr. İ. Feride Şahin'e, çalışmanın genetik analizinin gerçekleşmesini sağladığı için, Dr. Okan Yeloğlu'na istatistiksel analizdeki emekleri için, Başkent Üniversitesi Gastroenteroloji Bölümü hemşire ve personeline yardımları için teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana destek olan eşim Kürşat Gökcan ve aileme gösterdikleri sabır ve anlayıştan dolayı teşekkür ederim.

## ÖZET

Bir çok genetik faktörün inflamatuvar barsak hastalığına (İBH) neden olabileceği düşünülmüş, ancak sorumlu gen ya da genler ve bunlara ait mutasyonlar ya da polimorfizmler tam olarak belirlenememiştir. Fraktalkine (FKN) normal ve inflame bağırsak epitel hücrelerinde eksprese olan bir kemokin olup CX3CR1 reseptörü vasıtası ile lökosit adezyonu ve migrasyonundan sorumludur.

Bu çalışma ile aktif ve remisyonadaki İBH hastalarında normal populusyona göre CX3CR1 polimorfizmlerinin sıklığı ve klinik bulgular ile ilişkisininin araştırılması amaçlanmıştır.

67 İBH hastası (51 Ülseratif kolit, 16 Crohn) ve 80 sağlıklı kontrol grubu çalışmaya alındı. Hastaların klinik ve demografik verileri sorgulandı. Fraktalkine reseptöründeki CX3CR1 polimorfizmlerine (T280M, V249I) bakıldı. CX3CR1 polimorfizmleri ile klinik bulguları arasında ilişki incelendi. Olguların DNA örnekleri daha önce belirlenen bölgeye özgü primerler kullanılarak PCR yöntemi ile amplifiye edildi. Uygun restriksiyon endonükleazları ile kesilerek fractalkine reseptör polimorfizmleri belirlendi.

Hastaların ortalama yaşı  $44,9 \pm 15,3$  idi. Hastaların 36'sı (53,7%) erkeklerden oluşmakta idi. 67 hastanın 51'i (%76,1) ÜK, 16'sı (%23,9) Crohn hastalarından oluşmakta idi. 16 Crohn hastasından 3'ünün (%4,5) hastalığı striktür ile seyretmekte idi. 8 hastada (%11,9) perianal hastalık izlendi. Hastaların 19'unda (%28,4) bağırsak dışı tutulum görüldü. En sık görülen bağırsak dışı tutulum kas iskelet sistemi idi. İBH grubunda V249I polimorfizminde 27 hasta (%40,3) heterozigot, 4 hasta (%6) homozigot, 36 hasta (%53,7) yaban tip idi; T280M polimorfizminde 12 hasta (%17,9) heterozigot, 55 hasta (%82,1) yaban tip idi. Homozigot hasta saptanmadı. Kontrol grubunda hasta grubuna göre daha yüksek oranda T280M polimorfizmi saptandı (35%-17.9%,  $p=0.026$ ). V249I polimorfizmi açısından hasta ve kontrol grubunda fark saptanmadı. T280M ve V249I mutasyonuna göre cinsiyet, yaş, tanı anında yaş, takip süresi, bağırsakda tutulum yeri, bağırsak tutulum tipi, perianal hastalık, bağırsak dışı tutulum bakımından fark saptanmadı. T280M heterozigot hastaların hepsinde ileokolon tutulumu mevcuttu ( $P=0,07$ ). ÜK hastalarında istatistiksel olarak olmasa da sayısal olarak daha fazla T 280M heterozigotluğu saptandı ( $p=0,056$ ).

Sonuç olarak bu çalışmada İBH'nda CX3CR1 polimorfizm sıklığı sağlıklı populusyona göre daha yüksek saptanmadı. CX3CR1 polimorfizmleri ile klinik ve endoskopik bulgular arasında ilişki saptanamadı.

**Anahtar Kelimeler:** Fractalkine, CX3CR1 polimorfizmi, İnflamatuvar bağırsak hastalığı

## ABSTRACT

### **Influence of Fractalkine Receptor Polymorphism in Inflammatory Bowel Diseases**

A variety of genetic factors are supposed in the etiology of inflammatory bowel disease (IBD), and research continues to discover responsible genes and their mutations or polymorphisms. Fractalkine, a chemokine expressed by epithelial cells within normal and inflamed colorectal mucosa, induces leukocyte adhesion and migration via CX3CR1 receptor. The purpose of this study was to investigate two single-nucleotide polymorphisms of the fractalkine receptor/CXCR1 gene as a risk factor in development of IBD.

In this prospective study, 67 consecutive adult patients with IBD (51 with ulcerative colitis, 16 with Crohn disease) and 80 age and gender matched controls were recruited. Genotypes of fractalkine receptor (CX3CR1) V249I and T280M polymorphisms were identified by restriction fragment length polymorphism analyses after polymerase chain reaction. Allele frequencies between groups were compared using 2x2 contingency tables. Mean age of patients was  $44.9 \pm 15.3$ . Thirty-six of patients (53.7 %) were males, 51 had ulcerative colitis (% 76.1) and 16 had Crohn disease (% 23.9). Among Crohn patients 3 (%4.5) were found to have stricture, 8 (% 11.9) had perianal disease, and 19 (% 28.4) had extraintestinal involvement. Skeletal system was the most common extraintestinal involvement site among Crohn patients.

Genotype analyses revealed that, there were 27 heterozygote (% 40.3) and 4 homozygote (% 6) patients with V249I polymorphism and 36 patients (% 53.7) were wild type. With T280M polymorphism study, 12 patients were found to have heterozygote (% 17.9) phenotype. No patients were homozygote for T280M polymorphism and majority of patients (55 patients; % 82.1) had wild type alleles. Control group showed significantly higher rate of T280M polymorphism compared to IBD patients (35 % vs 17.9 %,  $p = 0.02$ ). However frequency of V249I polymorphism did not show any meaningful difference between groups.

There were no significant difference among following parameters between patients who had T280M and V249I polymorphisms and who were wild type: sex, age, age at the time of diagnosis, follow up time, involvement site and type in the intestines, perianal disease, extraintestinal involvement site. All patients with T280M polymorphism had ileocolon involvement ( $p=0.07$ ), and UC patients seemed to have higher amount of T280M polymorphism ( $p=0.056$ ).

As a result this study was unable to show higher amount of CX3CR1 polymorphism among IBD patients compared to healthy population. Additionally there were no correlation between CX3CR1 polymorphisms and clinical and endoscopic findings.

**Key words:** Fractalkine, CX3CR1 polymorphism, Inflammatory bowel disease

# İÇİNDEKİLER

Teşekkür	iii
Özet	iv
İngilizce Özet	v- vi
İçindekiler Dizini	vii-viii
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	ix
Şekiller	x
Tablolar	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Fractalkine Reseptör Polimorfizmlerinin Rolü	2
2.1.1. Kemokinlerin rolleri	2
2.1.2. FKN yapısı	3
2.1.3. CX3CR1 (FKN reseptörü)	3
2.1.4. FKN'nin görevleri, adezyon fonksiyonları	4
2.1.4.1. Klasik bilinen yol	5
2.1.4.2. FKN'e bağlı yol	5
2.1.5. FKN ve inflamasyon	6
2.1.6. İntestinal intraepitel lenfositler, intestinal epitel hücreler, dendritik hücreler ve FKN-CX3CR1 ilişkisi	7
2.1.7. Klinik hastalık	8
2.1.7.1. İBH	8
2.1.7.2. Ateroskleroz	9
2.1.7.3. Renal hastalıklar	9
2.1.7.4. Allograft rejeksiyonu	9
2.1.7.5. HIV	10
2.1.7.6. Diğer inflamatuvar hastalıklar	10
2.1.8. CX3CR1'i kodlayan genler	10
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	12
3.1. Hastaların Genel Özellikleri	12



3.2. Kontrol grup	12
3.3. Hastalara Yapılan Tetkikler	12
3.3.1. CX3CR1 polimorfizmleri genotiplendirilmesi ve DNA ekstraksiyonu	
3.3.1.1. DNA ekstraksiyonu	13
3.3.1.2. Restriksiyon Endonükleaz Enzim Kesimi	14
3.3.2. CX3CR1 polimorfizmleri genotiplendirilmesi ve klinik ile ilişkisi	14
3.4. İstatistiksel Yöntemler	14
4. BULGULAR	15
4.1. Hasta ve kontrol grubunda CX3CR1 polimorfizmleri	16
4.2. Hasta ve kontrol grubunda CX3CR1 polimorfizmleri alel frekansları	17
4.3. CX3CR1 polimorfizmleri ile fenotipik özellikler arasındaki ilişki	17
4.3.1. T280M genotip-fenotip ilişkisi	17
4.3.2. V249I genotip-fenotip ilişkisi	19
4.4. İBH'nda CX3CR1 polimorfizmleri dağılımı	20
5. TARTIŞMA	21
6. SONUÇLAR	24
7. KAYNAKLAR	25-28

## SİMGELER VE KISALTMALAR

AİDS	Kazanılmış immün yetmezlik sendromu
DH	Dendritik hücreler
FKN	Fractalkine
İBH	İnflamatuvar bağırsak hastalığı
İEH	İntestinal epitel hücreler
İİEL	İntestinal intraepitel lenfosit
KAH	Koronar arter hastalığı
NK	Natural killer
RA	Romatoid Artrit
ÜK	Ülseratif kolit

## ŞEKİLLER

Şekil 2.1. FKN yapısı

Şekil 2.2. Adezyon kaskatında klasik ve FKN'e bağlı yol

Şekil 2.3. FKN'nin biolojik fonksiyonu

## TABLolar

Tablo 3.1. Tablo 1. Amplifikasyon için PCR Koşulları

Tablo 3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu İçin Uygulanan Protokol

Tablo 4.1. Hastaların klinik ve demografik verileri

Tablo 4.2. CX3CR1 genotiplendirmesi

Tablo 4.3. Hastaların T280M polimorfizmine göre klinik bulguları (n=67)

Tablo 4.4. Hastaların V249I polimorfizmine göre klinik bulguları (n=67)

Tablo 4.5. ÜK be Crohn hastalarında CX3CR1 polimorfizmlerinin dağılımı

# 1.GİRİŞ

Kandaki lökositlerin hasar gören veya infeksiyon bölgesine göçü endotel hücrelerinin ve lökositlerin yüzeylerinde ifade edilen hücre adezyon molekülleri ve damar duvarı boyunca kemokinler olarak adlandırılan kemotaktik sitokinlerin varlığına bağlıdır. Fizyolojik koşullarda kemokinler adezyon molekülleri ile birlikte spesifik lökosit tipleri ve lenfositleri selektif olarak dokulara yönlendirirken, inflamatuvar olaylarda uygunsuz olarak lökosit toplanmasına neden olurlar. Kemokinler 4 sınıfa ayrılmaktadır (C,CC;CXC,CX<sub>3</sub>C). CX<sub>3</sub>C kemokin ailesinin tek üyesi Fractalkine'dir (FKN-CX<sub>3</sub>CL1). FKN'nin çözünebilir formu dolaşıma salınarak lökositlerin [Naturel killer (NK), T hücreler, monositler] inflamasyon alanına kemotaktisimini, membrana bağlı formu ise endotel adezyon moleküllerinden (integrin vs.) bağımsız olarak lökositlerin endotele adezyonunu ve göçünü sağlamaktadır. CX3CR1, FKN'nin spesifik reseptörüdür. CX3CR1, CD4+, CD8+T hücrelerde, CD14+ monosit, makrofaj, CD16+ NK hücrelerinin yüzeylerinde ifade edilir. CX3CR1 eksprese eden hücreler selektin ve integrinlerden bağımsız olarak FKN'e yüksek affinite ile bağlanırlar. İnflamasyon alanında salınan inflamatuvar sitokinler, endotel ve epitel hücrelerinde FKN ekspresyonunu artırmakta; FKN de kemotaktik ve adezyon fonksiyonları ile lökositlerin endotele bağlanma ve göçünü sağlamakta, takiben CX3CR1 eksprese eden monosit ve lenfositlerin inflame dokuya ekstravazasyonunu sağlayarak vasküler ve doku hasarı patogenezinde rol almaktadır. FKN sağlıklı bireylerde birçok dokuda eksprese olmakta, inflamatuvar hastalıklarda CX3CR1+ hücreler ile birlikte ekspresyonu artmaktadır.

Bir çok genetik faktörün inflamatuvar barsak hastalığına neden olabileceği düşünülmüş, ancak sorumlu olan gen ya da genler ve bunlara ait mutasyonlar ya da polimorfizmler tam olarak belirlenememiştir. Yapılan çalışmalarda hastalarının mukozasında FKN ekspresyonunun arttığını, periferel dolaşımında da artmış sayıda CX3CR1+ lökositlerin bulunduğu gösterilmiştir.

FKN reseptörü olan CX3CR1'i kodlayan gende çeşitli dizi varyasyonları tanımlanmıştır. T280M ve V 249I reseptör polimorfizmlerinin ateroskleroz, KAH, HIV infeksiyonuna duyarlılık, yaşa bağlı makuler dejenerasyon ve Crohn hastalığının fenotip ve lokalizasyona etkisi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışma ile aktif ve remisyonadaki İBH hastalarında normal populasyona göre CX3CR1 polimorfizmlerinin sıklığı ve klinik bulgular ile ilişkisininin araştırılması amaçlanmıştır.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Fractalkine Reseptör Polimorfizmlerinin Rolü

Lökositlerin vasküler kompartmandan inflamasyon alanına göçü dinamik bir süreçtir ve lökosit ve endotel arasındaki bir dizi kompleks etkileşim sonucu gerçekleşir. Lökositlerin endotel yüzeyi boyunca yerleşimi sonrasında lökositlerde aktivasyon, adezyon ve intertisyuma göç gerçekleşir (1). Bu hücreler arası etkileşim endotel hücrelerinin ve lökositlerin yüzeylerinde ifade edilen hücre adezyon molekülleri ile sağlanmaktadır (1,2). Lökositlerin göçü ayrıca damar duvarı boyunca kemokinler (kemotaktik sitokinler) olarak adlandırılan büyük bir aile tarafından oluşturulan kemoatraktan gradientinin varlığına da bağlıdır (3). Normal fizyolojik koşullarda kemokinler lökosit alt tiplerini selektif ve uygun olarak tüm doku ve organlara yönlendirmektedir (4). İnflamatuar bağırsak hastalığı (İBH) gibi inflamatuar olaylarda değişmiş düzey ve tiplerdeki kemokinler hedef dokularda uygunsuz olarak lökosit toplamasını sağlamaktadır.

#### 2.1.1.Kemokinlerin rolleri

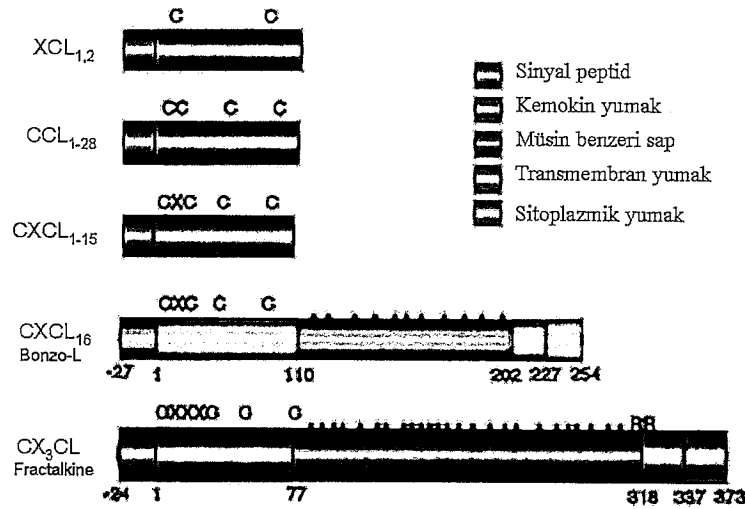
Kemokinler inflamasyon olan yerde sentezlenen kemotaktik sitokinler olup lökositlerin toplanma ve yönlendirilmesinde başlıca regülatör proteinlerdir. Lökosit göçünde kritik rolü olan endotel hücre aktivasyonunda, tüm doku ve organlarda inflamatuar cevapda merkez rolü oynamaktadırlar.

Enfeksiyon, alerji veya İBH'na neden olan inflamasyon, bağırsak mukozasındaki artmış ve aktive olmuş lökositler ile ilişkilidir. Epitel hücre kökenli kemokinler, dolaşan lökositlerin selektif olarak bağırsaktaki mukozal immün kompartmana göçünde anahtar rolü oynamaktadır (5). Örneğin kemokin olan İL-8 (CXCL8) İBH hastalarında mukozal patofizyolojik inflamasyonu başlatma ve idamesinde etkili olup, artmış düzeylerde eksprese olmaktadır (6). İBH'nın ileri evrelerinde İL-8 ekspresyonu ülseratif kolit (ÜK) hastalarının tüm mukozaları boyunca ve Crohn hastalarının kript abselerinde saptanmaktadır (5).

Şimdiye kadar 40'dan fazla kemokin tanımlanmıştır. NH<sub>2</sub>-terminal sistein kalıntısına göre kemokinler 4 sınıfa ayrılmaktadır (C,CC;CXC,CX<sub>3</sub>C). Şimdiye kadar tanımlanmış CX<sub>3</sub>C kemokin ailesinin tek üyesi Fractalkine'dir (FKN-CX<sub>3</sub>CL1). FKN geni 16. kromozomda bulunmaktadır.

### 2.1.2. FKN yapısı

Küçük ve sekrete edilen kemokinlerden farklı olarak FKN transmembran bir molekül olup, endotel adezyon moleküllerinden (integrin vs.) bağımsız olarak lökositlerin endotele adezyonunu sağlar. FKN hücre içi kuyruk (sitoplazmik yumak), 'short-membran-spanning region' (transmembran yumak), müsin benzeri sap ve sap vasıtası ile sunulan 'N-terminal kemokin' yumağından oluşmaktadır (7,8,9) (Şekil 2. 1).



**Şekil 2. 1. FKN yapısı- Umehara H. ve ark. (9)'dan alınmıştır.** FKN CX<sub>3</sub>C-kemokin olup diğerkemokinlerden yapısal olarak ayrılmaktadır (CXCL, CCL ve XCL). Sinyal peptidten başlayarak N-terminal kemokin yumağı, müsin benzeri sap, transmembran yumak ve intraseluler yumakdan oluşmaktadır. CXCL<sub>16</sub> (Bonzo ligand)'ın FKN'e benzer yapısı bulunmaktadır.

Müsin benzeri sap vasıtası ile membrana bağlı formu adezyon özelliklerini taşır. Protein, TNF- $\alpha$  dönüştürücü enzim ile sap kısmından kırılarak lökositlerin [Naturel killer (NK), T hücreler, monositler] kemotaktik aktivitesini sağlayan çözünebilir formu dolaşıma salınır (10,11). Böylece FKN kemokin ve adezyon moleküllerinin her ikisinin de özelliklerini içerir (7,8). Bu yapısı ile hücre adezyonunda diğer çözünebilir CXC, CC, C kemokinlerinden ayrılmaktadır.

### 2.1.3. CX<sub>3</sub>CR1 (FKN reseptörü)

CD4<sup>+</sup> Th ve CD8<sup>+</sup> sitotoksik hücreler (Tc) 2 sınıfa ayrılır. Th1 ve Tc 1 hücreler, hücre içi patojenlere karşı İFN $\gamma$ , TNF  $\alpha$  ve İL-2 sekrete ederler ve organ spesifik otoimmün

hastalıklar ile ilişkilidir. Tersine Th2 ve Tc2 hücreler İL4-5-6 ve İL-13 üretirler ve hücre dışı patojenlere karşı immun cevapta rol alırlar, alerjik immun cevapla ilişkilidirler. FKN daha çok Th1 sitokinler ile aktive olup, Th1 baskın hastalıklarda inflamasyon yerinde CX3CR1+ T hücre birikimine yol açmaktadır.

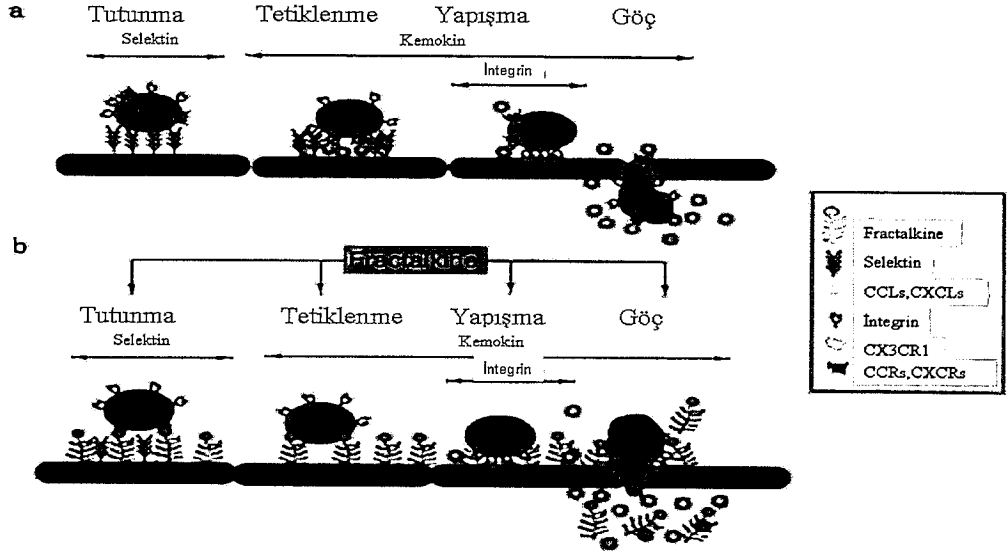
CX3CR1, FKN'nin spesifik reseptörüdür. CX3CR1, CD4+ hücrelerde (Th1 de Th2'ye göre daha fazla eksprese olur), CD8+T hücrelerde (özellikle Tc1 hücrelerinde), CD14+ monosit, makrofaj, CD16+ NK hücrelerinin yüzeylerinde ifade edilir; adezyon ve kemotaktik fonksiyonlarında rol alır (8,12). CX3CR1 daha çok sitotoksik T lenfositlerin reseptörüdür. CX3CR1 reseptörü olmayan T hücrelerinde vasküler ve doku hasarında etkili sitotoksik granüllerin olmadığı izlenmiştir.

FKN'nin çözünebilir formu NK, T hücreler, monositler için kemotaktik aktiviteye sahiptir. FKN reseptörü diğer kemokin reseptörlerinden farklı olarak spesifik olarak FKN'ne bağlanmaktadır (8,12). Şimdiye kadar bu reseptöre bağlanan veya yarışa giren kemokin bulunmamıştır. (Human herpes virüs-8 tarafından kodlanan vMIP-II proteini hariç) (12).

#### **2.1.4. FKN'nin görevleri, adezyon fonksiyonları**

Kemokinler adezyon molekülleri ile birlikte lökositlerin vücuttaki sağlıklı ve hasta dokulara uygun şekilde dağılımını kontrol eder. Lökosit göçünde 2 yol bulunmaktadır (10).

1.Klasik yol (selektinler, integrinler vasıtası ile ) 2. FKN'e bağlı yol (Şekil 2.2).



**Şekil 2. 2. Adezyon kaskatında klasik ve FKN'e bağlı yol- Umehara H ve ark. (10)'ndan alınmıştır.**

a, Klasik yol: 1. basamak zayıf, geçici selektine bağlı yoldur (tutunma). Daha sonra lökositler üzerindeki integrinler kemokinler vasıtası ile aktive olur (tetiklenme); lökositler ve endotel hücre arasında sıkı yapışma olur (adezyon). Son olarak lökositler kemokin gradientine bağlı olarak endotel yüzeyinden göç ederler (göç). b, FKN'e bağlı yol: FKN membrana bağlı olarak endotel hücre yüzeyinde eksprese olur ve selektin ve integrinlerden bağımsız olarak lökositleri yakalar. FKN ve CX3CR1 etkileşimi ayrıca integrin aktivitesini de artırarak daha sıkı şekilde adezyon sağlanır. Lökositler daha sonra kemokin gradientine bağlı olarak endotel yüzeyinden göç ederler.

#### 2.1.4.1. Klasik bilinen yol

Lökosit göçü endotel ve lökosit arasındaki selektine bağlı etkileşimler sonucu olur. Lökosit üzerindeki integrinler lokal olarak üretilen kemokinler vasıtası ile aktive olur, aktive olmuş integrinler vasıtası ile lökositlerin endotele sıkı bir şekilde adezyonu olur. Lökosit vasküler duvardan ekstravaze olup komşu dokuya geçer. FKN bulunmadan önce tüm kemokinlerin çözünebilir formda sekrete edildiği, lokal kemokin gradientini sağlanması için hücre yüzeyi proteoglikanları ile doku matriksi proteinleri ile etkileştiği (GaG gibi) düşünülmekte idi. Kemokinlerin lökosit üzerindeki spesifik reseptörleri ile etkileşimi sonucunda da adezyon molekülü olan integrin ailesininin aktive olduğu bilinirdi. (13,14).

#### 2.1.4.2. FKN'e bağlı yol

FKN endotel ve epitel hücrelerinde eksprese olur. TNF- $\alpha$ , İL-1, İFN  $\gamma$  gibi proinflamatuvar sitokinler ile ekspresyonu artmaktadır. Endotel, lökosit göçünde ilk engel



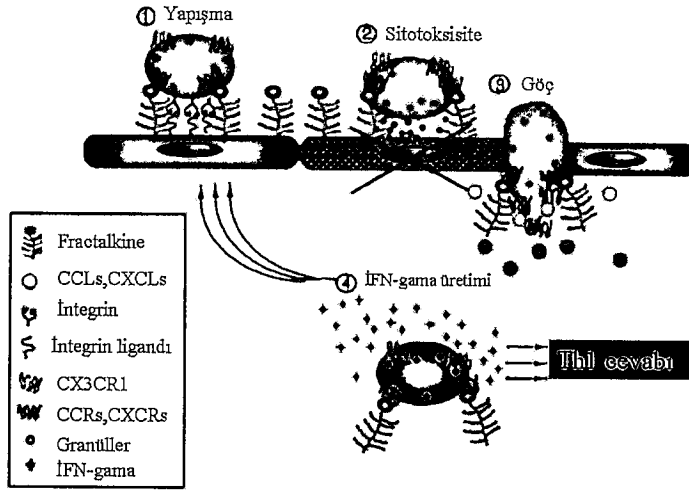
olduğu için, FKN'nin endotel üzerindeki etkisi, inflamasyon yerine lökosit göçünü kontrol etmekteki desteğidir. Membrana bağlı FKN ilk olarak inflamatuvar sitokinler (TNF- $\alpha$ , İL-1, İFN  $\gamma$ ) vasıtası ile müsin benzeri kuyruğa bağlı kemokin yumağı şeklinde endotel yüzeyinde eksprese olur. FKN bir adezyon molekülü olarak davranır, proteoglikanlara ve diğer adezyon moleküllerine ihtiyaç kalmaz. Çözünür FKN, TNF- $\alpha$  dönüştürücü enzim ile FKN proteininden kırılır. Çözünür FKN CD8+T hücreler, CD4+ T hücreler, NK ve monositler için kemotaktik aktiviteye sahiptir. CX3CR1 eksprese eden hücreler selektin ve integrinlerden bağımsız olarak FKN'e yüksek affinite ile bağlanırlar. FKN-CX3CR1 etkileşimi integrin aktivitesini de artırıp lökositlerin daha sıkı şekilde bağlanmasını sağlar. Takiben lökositler kemokin gradientine göre ekstravaze olurlar. Göç etmiş lökositlerin artmış aktivitesi de inflamasyon ve doku hasarına yol açar (7,8,15).

CXCR31 eksprese eden hücrelerin FKN'ne diğer vasküler hücre adezyon moleküllerine göre (VCAM-1) daha hızlı biçimde adezyon yaptığı izlenmiştir (11). FKN adezyon molekül fonksiyonuna ek olarak, CX3CR1 reseptörü G protein vasıtası ile sinyal göndererek integrinin ligantına bağlanmasını artırır. Böylece FKN-CX3CR1, integrin ve ligandları (ICAM, VCAM vs.) ile hücre adezyonu, her birinin tek başına yaptığı adezyondan daha yüksek olur (10,15).

Özetle proinflamatuvar sitokinler endotel hücrelerinde FKN ekspresyonunu artırmakta ve FKN de kemotaktik ve adeziv fonksiyonları ile ilk basamaktaki endotele bağlanma ve göç basamaklarında, hücre adezyonunu sağlayarak, CX3CR1 eksprese eden monosit ve lenfositlerin inflame dokuya ekstravazasyonunu sağlayarak vasküler ve doku hasarı patogenezinde rol almaktadır.

### **2.1.5. FKN ve inflamasyon**

Membrana bağlı FKN, diğer kemokinlerin (IL-8 gibi) CX3CR1 eksprese eden lenfositlerin göçü üzerindeki etkisini artırmaktadır. İnflame endotelde eksprese olan FKN, CX3CR1 eksprese eden sitotoksik efektör hücrelerini hızlıca kandan alıp dokuya göç etmesini sağlar. NK hücreleri FKN veya FKN reseptörü eksprese eden hücrelerle stimule edildiğinde NK hücresinin İFN  $\gamma$  salınımını artırdığı gözlenmiş, bunun da endotel hücrelerinde eksprese olan FKN'nin Th1 cevabı gelişiminde rolü olduğunu göstermektedir. İFN  $\gamma$  ayrıca parakrin olarak endotel hücrelerinde FKN ekspresyonu artırmaktadır (7,8,16) (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3. FKN'nin biyolojik fonksiyonu-Umehara ve ark.(9)'ndan alınmıştır.** 1. CX3CR1 ve integrinler; FKN ve integrin ligandları yardımı ile sıkı bir şekilde yapışma sağlanır. 2. CX3CR1 ekspresyen eden sitotoksik efektör hücreler (NK, CD8+T hücreleri vs.) sitoplazmik granül içerirler. Bu hücreler membrana bağlı FKN veya aktive edilmiş reseptörler vasıtasıyla aktive olurlarsa komşu alandaki endotel hücrede hasar yaratırlar. 3. Membrana bağlı FKN diğer kemokinlerin etkisini artırarak CX3CR1 ekspresyen eden hücrelerin dokuya göçünü sağlamaktadır. 4. Göç eden CX3CR1 hücreleri FKN ile aktive olarak IFN- $\gamma$  üretirler ve Th1 cevabı oluşur. IFN- $\gamma$  ayrıca endotel hücrelerinde parakrin etki olarak FKN ekspresyonunu artırmaktadır.

### 2.1.6. İntestinal intraepitel lenfositler, intestinal epitel hücreler, dendritik hücreler ve FKN-CX3CR1 ilişkisi

Bağırsaktaki damarlardan lenfositler lamina propriaya göç edip bir kısmı intestinal intraepitel lenfosit (İİEL) şeklinde kalır. İİEL patojenlere karşı ilk basamak savunmadır. Çoğu İİEL'ler CD8+ fenotipi ekspresyen ederler. İİEL'in önemli immunolojik fonksiyonları bulunmaktadır. Sitotoksik aktivite, sitokin sekresyonu, (İL-2, İL-3, İL-5, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  ve IFN- $\gamma$ ), epitel hücre proliferasyonunu ve rejenerasyonunu regüle etmektedirler (17).

İntestinal epitel hücreleri (İEH) MHC sınıf 2 molekülü ekspresyen edebilirler ve etkili invitro T hücrelerini aktive eden, antijen prezente eden hücreler gibi davranabilirler (18). İEH, supresör fonksiyonları ile (cd1 molekülü vasıtasıyla) selektif olarak T hücrelerini aktive edebilirler ve sonrasında immun cevabı 'down' regüle ederler. İEH ek olarak İL-15 ekspresyen ederler ki bu İİEL aktivasyonu ve proliferasyonu için güçlü indüktördür (19). Bütün bunlar sonucu İEH T hücrelerine regülatör sinyaller göndererek gastrointestinal yolun uygun homeostazını sağlar. Fakat İİEL'in İEH'e nasıl göç ettiği ve intestinal epitelde kaldığı net değildir.

İİEL intestinal hücrelerle etkileşim halindedir. İİEL'in %78'i CD8+, %7,6'sı CD4+ lenfositlerdir. İİEL'in %48,5'u CX3CR1 reseptörü ekspresyen ederler. İEH ve endotel

hücrelerinde FKN ekspresyonu olmaktadır. İİEL, normal şartlarda göç etmezken, çözünür FKN, İİEL'i aktive edip kemotaktik gradientine göre lenfositlerin intestinal epitele doğru göçünü, intestinal epitelde kalmasını ve İEH ile etkileşimini regüle etmektedir (20).

Dendritik hücreler (DH) antijen sunan hücrelerden olup, bağırsak epiteli ile birlikte bağırsak içi antijen ve enterik patojenlere karşı ilk basamak savunma olarak görev alır. FKN reseptörü olan CX3CR1 bağırsakta DH'de de eksprese olmaktadır (21,22). İleumdaki CX3CR1+ DH'ler lümendeki bakterilerin fagositozunda rol almaktadır (22). DH'in lümendeki antijenleri toplayabilmesi için CX3CR1 reseptörüne ihtiyacı olduğu gösterilmiştir (22). CX3CR1 eksikliği lamina propriadaki DH'in fonksiyonunu bozmakta ve bağırsak lümeninden bakteri ve invaziv patojenlerin uzaklaştırılması engellenmektedir (22).

### **2.1.7. Klinik hastalık**

FKN adezyon ve kemotaktik molekül olup CX3CR1+ hücreler ile birlikte inflamatuvar hadiselerde fazla miktarda eksprese olmaktadır. FKN sağlıklı bireylerde ince bağırsak, kolon, kalp, beyin, akciğer, böbrekler, pankreas, iskelet kasları gibi birçok dokuda eksprese olmaktadır. FKN'nin birçok dokuda eksprese olması, FKN'nin sirküle eden hücreleri dokulara çekerek sadece patojenlere karşı vücudu korumakla kalmayıp, normal fizyolojik şartlarda da hücreler iletişimi sağlamasını göstermektedir (7). İnflamatuvar hadiselerde nöronlar, glomerüller, epitel ve endotel hücreler gibi bir çok dokularda üretilip; kardiovasküler hastalıklar, ateroskleroz, renal hastalıklar (glomerulonefrit, renal tümörler, renal transplantasyon), kardiak allograft rejeksiyon, psöriasis, liken planus, romatoid artrit, sistemik skleroz, primer bilier siroz, pulmoner arter hipertansiyonu, akciğer, kolon kanserleri, akut hepatit, alerjik astma, rinit gibi birçok inflamatuvar hastalıkların patogeneğinde rol almaktadır (20,23-26). FKN'nin insan bağırsak mukozalarındaki endotel ve epitel hücrelerinde ifade edilmesi İBH'da mukozal immun cevapda FKN'nin regülasyonun rolü olduğunu düşündürmektedir (20,27,28).

#### **2.1.7.1. İBH**

İEH ve immun hücreler intestinal immun cevabın önemli komponentlerini oluşturmakta; bağırsaktaki hasar olan yere lökosit aktivasyonu, inflamasyon, kemokin ve adezyon moleküllerin ifadelenmesi yolu ile yara iyileşmesini koordine etmektedir (29). Gastrointestinal mukozada FKN ve reseptörü lökositlerin işlevlerinde gerekli olan konak

defans cevabını yönetmekte önemli rollerinin yanında, mukozal bariyerdeki epitel hücreleri ile bağırsak mukozasındaki DH arasındaki ilişkiyi sağlamaktadır. (5).

İnflamatuar bağırsak hastalarının mukozasında artmış FKN üretimi, çok sayıda CX3CR1+lökositleri inflamasyon yerine çekmektedir. Aktif Crohn ve ÜK hastalarının periferel dolaşımında artmış sayıda CX3CR1+ T hücreleri bulunmaktadır. ( CD8+T hücreleri CD4+ T hücrelerinden daha çoktur) (30). Artmış sayıda CX3CR1 eksprese eden T hücreleri klinik aktif hastalığı olan hastalarda saptanmakta, remisyonda ise sayıları sağlıklı kontrollere göre benzer olmaktadır. Yine İBH hastalarının lamina propriasında CX3CR1 pozitiflik yüzdesi normal mukozaya göre 5 kat fazla görülmektedir. Bu da artmış FKN üretimine yanıt olarak CX3CR1+ hücrelerin artmış göçü sonucu olmaktadır. Dolaşımdaki lökositlerdeki artmış CX3CR1 ekspresyonu, hedef organdaki inflamasyona ikincil, mikrosirkulasyonundaki artmış FKN üretimini göstermektedir (31).

#### **2.1.7.2. Ateroskleroz**

Aterosklerotik lezyonlarda çok sayıda makrofaj ve T hücrelerinden zengin immun hücreler bulunur ve bu hücreler inflamatuvar cevapda rol alır. Dolaşan monositler aterosklerotik lezyonlardaki köpük hücrelerinin öncüsüdür ve kemokinler monositlerin kandan damar duvarına göçünde önemli rolleri bulunmaktadır. Aterosklerotik lezyonlarda; koroner arter hastalığı (KAH), diabet gibi yüksek miktarda FKN mRNA ekspresyonu saptanmıştır. (32). Diabetik hastalarda da intimanın derininde FKN ekspresyonu gösterilmiştir (33).

#### **2.1.7.3. Renal hastalıklar** (glomerulonefrit , renal tümörler, renal transplantasyon)

FKN ekspresyonu ve CX3CR1 ekprese eden hücreler (CD16+NK vs) değişik nefropatili hastalarda gösterilmiştir (34). CX3CR1 bloke eden antikorlar ile glomerullerde lökosit infiltrasyonu, kresent oluşumunu ve böbrek fonksiyonlarında iyileşme görülmüştür (35).

#### **2.1.7.4. Allograft rejeksiyonu**

Akut allograft rejeksiyonu transplant dokuya dolaşan lökositlerin gitmesi ile karakterize hücresel immun cevaptır. Rejekte allograft vasküler doku ve endotelinde FKN ekspresyonunun arttığı, CX3CR1 bloke eden antikorlar ile allograft ömrünün uzadığı görülmüştür (36).

### 2.1.7.5. HIV

FKN HIV li hastaların beyin ve lenf nodlarında saptanmıştır. FKN'nin artmış ekspresyonu nöronları HIV 1 nörotoksininden korur fakat dendritik hücreler ile ilişkiye girip CX3CR1+Th deplesyonu yapar (37). CX3CR1, in vitro çalışmalarda HIV virusunun hücre içine girebilmesi için kofaktor olarak rol almaktadır.

### 2.1.7.6. Diğer inflamatuvar hastalıklar

FKN değişik Th1 baskın inflamatuvar hadiselerde de inflamatuvar mediatör olarak rol alır. Sinovyal doku makrofajları, fibroblastlar, endotel hücreleri, DH FKN ve CX3CR1 eksprese ederler. Romatoid Artrit (RA)'li hastaların sinovyal sıvısındaki FKN'nin invitro olarak anjiojenik aktivitesi olduğu görülmüştür (38). Liken planus ve psöriazide endotel hücre dendrositleri ve keratonositleri yüksek miktarda FKN eksprese ederler (39). İnsanlarda pulmoner arter hipertansiyonunda, akciğer kanserinde, akut hepatitte ve farelerde prediabetiklerde FKN/CX3CR1 rol almaktadır (40). Bütün bunlar göstermektedirki FKN birçok dokuda eksprese olmakta ve Th1 baskın hastalıklarda inflamasyon yerinde CX3CR1 + T hücre birikimine yol açmaktadır.

### 2.1.8. CX3CR1'i kodlayan genler

Bugüne kadar CX3CR1'i kodlayan gende çeşitli dizi varyasyonları tanımlanmıştır. Bunlar arasında T280M ve V249I polimorfizmleri güçlü bağlantı dengesizliği göstermekte ve diğer dizi varyasyonlarına göre daha sık bulunmaktadır. T280M polimorfizminde threonin yerine metionin (M280); V249I polimorfizminde valin yerine izolösin gelmektedir. (1249). Her 2 polimorfizmde ateroskleroz, KAH, HIV enfeksiyonuna duyarlılık, yaşa bağlı makuler dejenerasyon ve Crohn hastalığının fenotip ve lokalizasyona etkisi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (29,41-43).

T280M CX3CR1 polimorfizmi HIV enfeksiyonunu AIDS'e progresyonu ile ilişkilidir. Belli CX3CR1 polimorfizmleri (CX3CR1 homozigotlar) HIV pozitif kişilerde kazanılmış immun yetmezlik sendromu (AİDS)'nun hızlı progresyonuna yol açmaktadır (44). Yine bu polimorfizm ateroskleroz ve KAH'ı için risk aleli olarak bulunmuştur (45). CX3CR1 reseptör polimorfizminde (V249I, T280M) monositlerin vasküler endotele bağlanmasının azaldığı ve buna bağlı olarak aterosklerotik lezyonların ve akut koroner olayların azaldığı gösterilmiştir (41,46).

Bağırsaktaki DH'ler CX3CR1 reseptörü taşıdığı için bu reseptördeki polimorfizm sonucu DH disfonksiyonu olmaktadır. DH disfonksiyonu ile bakterilerin toplanmasının azalması sonucu bağırsak epitel hücrelerinin bakterilere artmış maruziyeti, bağırsak inflamasyonu artırmakta, homozigot V249I ve T280M polimorfizmlerinde görülen intestinal stenoza yol açtığı düşünülmektedir (22,29). Yine CX3CR1 polimorfizmleri reseptör fonksiyon bozukluğu yaratmaktadır. V249I-T280M aa yer değiştirmesinin periferik kan mononükleer hücrelerin membrana bağlı FKN'e adezyonu azalttığı yönünde çalışmalar yanında , artırdığına yönelik çalışma da bulunmaktadır (47). İBH hastalarında FKN reseptör gen polimorfizmleri çalışmalarında hastalarda tüm CXCR1 genotipleri oranında fark bulamamışlar, ancak subgrup analizlerde T280M ve V249I polimorfizmlerinin bağırsaktaki tutulum yerleri ile ilişkili olduğu (CX3CR1 polimorfizm olanlarda sıklıkla ileal hastalık komponenti olduğu) ve polimorfizmlerin bağırsaktaki tutulum tipi ile (homozigot hastalar sıklıkla stenoz ile seyretmekte) ilişkili olduğu saptanmıştır (29,43). Bu çalışmalar kemokinler ve GIS'in değişik bölgelerinde eksprese olan ligandların immun kaynaklı ve inflamatuvar hastalıklarda patofizyolojide rol oynayabileceğini göstermektedir (48).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Hastaların Genel Özellikleri

2007-2008 tarihleri arasında Başkent Üniversitesi Ankara Hastanesi gastroenterohepatoloji bölümüne başvuran, klinik, endoskopik, radyolojik ve histopatolojik kriterlere göre Crohn ve ÜK tanısı konan veya daha önce İBH tanısı konup bölümümüzce takip edilen toplam 67 hasta çalışmaya dahil edildi. 'İndetermine kolitler' çalışma dışı bırakıldı.

Çalışma için Başkent Üniversitesi Etik kurul (KA 08/156-06.08.2008) ve araştırma komitesinden (2008/746-13.9.2008) onay alındı. Hastalar Başkent Üniversitesi Etik Kurulu tarafından uygun görülen bilgilendirilmiş onay formu imzası alındıktan sonra çalışmaya alındı.

#### 3.2. Kontrol grup

Kontrol grubu olarak gastroenteroloji polikliniğine dispeptik yakınmaları ile başvuran 80 sağlıklı birey çalışmaya dahil edildi.

#### 3.3. Hastalara Yapılan Tetkikler

Öyküde hastaların yaş, İBH tanı konma zamanındaki yaş, cinsiyet, hastalık tanısından sonra geçen takip süresi, aldığı ilaçlar, semptomlar, doğduğu ve yaşadığı bölgeler, bağırsak dışı semptomlar (kas iskelet sistemi, cilt, göz, hepatobiliyer sistem) sorgulandı.

İBH tanısı için endoskopik biyopsiler alındı. Hastalarda endoskopi ve kolonoskopideki bulgular, perianal tutulum, hastalığın bağırsaktaki tutulum tipi (inflamatuar, striktür, penetre), hastalığın bağırsaktaki lokalizasyonu (ileal, ileokolon, kolon) incelendi. Hastalarda bağırsak dışı tutulumlar incelendi.

##### 3.3.1. CX3CR1 polimorfizmleri genotiplendirilmesi ve DNA ekstraksiyonu

80 sağlıklı gruba ve 67 hastaya T280M ve V249I CX3CR1 gen polimorfizmleri bakıldı.

745. nukleotidde guanin (G) yerine adenin (A) gelmesi ile 249. pozisyondaki valin, izolösine yer değiştirmekte (V249I); 839. nukleotiddeki sitozin (C) timidin (T) ile yer değiştirdiğinde, 280. pozisyondaki treonin metionine yer değiştirmektedir.

V249I polimorfizminde hastalar VV (yaban tip), VI (heterozigot), II (homozigot); T280M polimorfizmi için hastalar TT (yaban tip), TM (heterozigot), MM (homozigot) olarak gruplandırıldı.

### 3.3.1.1. DNA ekstraksiyonu

Çalışmada kullanılan DNA molekülü, hastalardan bilgilendirilmiş onam formu imzalatıldıktan sonra alınan 10 ml periferik kandan tuz çöktürme yöntemi kullanılarak izole edildi. DNA örnekleri kullanılmaya kadar -20° C de saklandı.

Polimeraz zincir reaksiyonunu (PCR) DNA üzerinde istenilen bölgenin, o bölgeye özgül primerler kullanılarak çoğaltılması esasına dayanır. Isı ile denatüre edilerek tek zincir haline getirilen DNA molekülüne primerlerin bağlanması ve bu primerlerden yeni DNA zincirinin sentezlenmesi olarak üç aşamadan (denatürasyon, primerlerin bağlanması: annealing ve yeni zincirlerin sentezlenmesi: extension) oluşur (49). Bu aşamalar 25-30 döngü ile tekrarlanarak istenilen DNA bölgesi çoğaltılmış olur. (Tablo 1). Çalışmamızda uyguladığımız PCR yöntemi için örneklerin hazırlanması Tablo 2’de verilmiştir.

**Tablo 3. 1. Amplifikasyon için PCR Koşulları**

95° C	3 dk tek döngü
72° C	10 dk tek döngü
95° C	30 sn
69 C	30 sn
72° C	30 sn

35 döngü

**Tablo 3. 2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu İçin Uygulanan Protokol**

Taq Polimeraz	1,5U
dNTP	175 µM
<b>Primer</b>	15 pmol
<b>DNA</b>	200 ng
1×buffer	
MgCl <sub>2</sub>	2.0mM
<b>Toplam</b>	<b>50 µl</b>



### 3.3.1.2. Restriksiyon Endonükleaz Enzim Kesimi

Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile DNA'nın baz dizisinde meydana gelen değişiklikleri belirlemek mümkündür. DNA da meydana gelen değişiklikler restriksiyon enziminin tanıma bölgesini ortadan kaldıracak gibi yeni bir tanıma bölgesinde yaratabilir. Çalışmamızda V249I polimorfizmi analizi için 3 U Acl I restriksiyon enzimi kullanılmıştır. 745. nukleotidde G varlığında 107 ve 204 bp uzunluğunda fragmanlar oluşurken; A varlığında kesilme olmamaktadır. T280M polimorfizmi analizi için 1,5U HpyCH4III restriksiyon enzimi kullanılmıştır. 849. nukleotidde C varlığında 107 ve 204 bp uzunluğunda fragmanlar oluşurken; T varlığında kesilme olmamaktadır. Sau 3AI restriksiyon enzimi ile H63D mutasyonunun analizi için PCR ile çoğaltılan DNA'nın 5 uL si 1,5-3 ünite enzim ile 37 ve 65 C' de 16-18 saat inkübe edildikten sonra, % 3 lük agaroz jelde analiz edilmiştir.

### 3.3.2. CX3CR1 polimorfizmleri genotiplendirilmesi ve klinik ile ilişkisi

Hastalarda T280M ve V 249I polimorfizmlerinin klinik bulgular (cinsiyet, yaş, tanı anında yaş, hastalık takip süresi, bağırsakda tutulum yeri, bağırsakdaki tutulum tipi, perianal tutulum, bağırsak dışı tutulum) ile ilişkisi incelendi.

### 3.4. İstatistiksel Yöntemler

Grup karşılaştırmaları için farklı istatistiksel analizler kullanılmıştır. Yapılan çalışmada, iki grup karşılaştırmaları için bağımsız iki örneklem t testi, ikiden fazla grup karşılaştırmalarında ise tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır. Yapılan bütün analizlerde güven düzeyi %95 olarak belirlenmiştir. Yapılan analizlerde ele alınan değişkenler kendi özellikleri itibariyle aralarında gruplandırıldı. İBH hastalarında bulunan CX3CR1 polimorfizmleri alel frekanslarının kontrol grubundan farklı olup olmadığı evren oranı önemlilik testi ile incelendi. Tablolarda, anlamlılık değeri (p değeri)  $p < 0,05$  olarak alındı

#### 4. BULGULAR

Hastaların ortalama yaşı  $44,9 \pm 15,3$  idi. Hastaların 36'sı (53,7%) erkeklerden oluşmakta idi. (Kontrol grubunun 31'i (%38,8) erkek idi.  $p=0,09$ ). Hastaların ortalama tanı konma sırasındaki yaşı  $38,9 \pm 13,1$  olup, hastalar  $6,1 \pm 7,2$  yıl (min-maks:1-37,5 yıl) süre ile takip edilmekte idi. 67 hastanın 51'i (%76,1) ÜK, 16'sı (%23,9) Crohn hastalarından oluşmakta idi. Ortalama hastalık başlama yaşı Crohn için  $37,7 \pm 14,6$ , ÜK için  $39,4 \pm 12,7$  idi. 43 hasta (%64,2) ishal (kanlı-kansız), 18 hasta (%26,8) ishal ve karın ağrısı, 1 (%1,5) hasta tenesmus, 3 (%4,5) hasta karın ağrısı ile ve 2 (%3) hasta semptomsuz başvurdu. 29 hasta (%55,8) iç anadoluda doğmuş idi. 53 hasta (% 82,8) iç anadoluda yaşıyordu. Tekli veya kombine olarak 60 hasta aminosalisilik asit, 29 hasta kortikosteroid, 1 hasta methotreksate, 24 hasta azathioprine, 1 hasta infliximab almakta idi, 4 hasta ilaçsız izleniyordu. 16 Crohn hastasından 3'ünün (%4,5) hastalığı striktür ile seyretmekte idi. 8 hastada (%11,9) perianal hastalık izlendi. (1 anal fistül, 7 anal fissür). Hastaların 19'unda (%28,4) bağırsak dışı tutulum görüldü. En sık görülen bağırsak dışı tutulum kas iskelet sistemi idi. İzole veya diğer sistem bulguları ile birlikte; 15 hastada kas iskelet sistemi (artrit, ankilozan spondilit, diğer spondiloartropatiler), 3 hastada cilt (aftöz stomatit, döküntü), 4 hastada göz (üveit, kuru göz), 2 hastada hepatobiliyer (primer sklerozan kolanjit) tutulum mevcut idi. Hastaların klinik ve demografik verileri tablo 4.1'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.1. Hastaların klinik ve demografik verileri**

Cinsiyetn(%)	
Kadın	31 (46,3)
Erkek	36 (53,7)
Yaş (yıl)	$44,9 \pm 15,3$
Ortalama $\pm$ SD	
Tanı anında yaş	$38,9 \pm 13,1$
Ortalama $\pm$ SD	
Takip süresi	$6,1 \pm 7,2$ yıl (min-maks:1-37,5 yıl)
Ortalama $\pm$ SD	

**Tablo 4.1. Hastaların klinik ve demografik verileri (Devam)**

İBH tipi n (%)	
<i>Crohn</i>	16 (23,9)
<i>ÜK</i>	51 (76,1)
Bağırsak tutulum tipi n (%)	
<i>İnflamatuvar</i>	64 (95,5)
<i>Striktür</i>	3 (4,5)
Bağırsak tutulum yeri n (%)	
<i>Terminal ileum</i>	2 (3)
<i>Kolon</i>	55 (82,1)
<i>İleokolon</i>	10 (14,9)
Perianal hastalık n (%)	8 (%11,9)
Bağırsak dışı tutulum n (%)	19 (%28,4)

#### **4.1.Hasta ve kontrol grubunda CX3CR1 polimorfizmleri**

İBH grubunda V249I polimorfizminde 27 hasta (%40,3) heterozigot, 4 hasta (%6) homozigot, 36 hasta (%53,7) yaban tip idi; T280M polimorfizminde 12 hasta (%17,9) heterozigot, 55 hasta (%.82,1) yaban tip idi. Homozigot hasta saptanmadı. V249I polimorfizmi açısından hasta ve kontrol grubunda istatistiksel fark saptanmadı. T280M polimorfizmi ise kontrol grubunda hasta grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek saptandı (p=0,026). V249I ve T280M polimorfizmleri hasta ve kontrol gruplarında tablo 4.2’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.2. CX3CR1 genotiplendirmesi**

Genotip			İBH (n=67)	Kontrol (n=80)	P değeri
V249I n%	VV (yaban tip)	GG (yaban tip)	36 (53,7)	49 (61,25)	0,504
	VI (heterozigot)	GA (heterozigot)	27 (40,3)	28 (35,0)	
	II (homozigot)	AA(homozigot)	4 (6,0)	3 (3,75)	
T280M n%	TT (yaban tip)	CC(yaban tip)	55 (82,1)	52 (65,0)	0,026
	TM (heterozigot)	CT (heterozigot)	12 (17,9)	28 (35,0)	
	MM (homozigot)	TT (homozigot)	-	-	

#### 4.2. Hasta ve kontrol grubunda CX3CR1 polimorfizmleri alel frekansları

İBH hastalarında V249I heterozigot alel frekansı (27/134) %20,15; V249I homozigot alel frekansı (8/134) %5,97; toplam V249I alel frekansı (35 /134) %26,12 olarak hesaplandı. Kontrol grubundaki heterozigot alel frekansı (28/160) %17,5; homozigot alel frekansı (6/160) % 3,75; toplam alel frekansı (34/160) %21,25 saptandı. İBH hastalarındaki V249I alel frekansı ile kontrol grubu alel frekansı arasında istatistiksel farklılık saptanmadı ( $Z= 1,623$   $p=0,23$ ;  $Z<1,96$ ).

İBH hastalarında T280M heterozigot alel frekansı (12/134) %8,96; toplam T280M alel frekansı (12 /134) %8,96 olarak hesaplandı. Kontrol grubunda heterozigot alel frekansı (28/160) %17,5; toplam alel frekansı (28/160) %17,5 idi. Kontrol grubundaki T280M alel frekansı İBH'ndeki alel frekansına göre daha yüksek saptandı ( $Z= 20,21$   $p=0,1$ ;  $Z>1,96$ ).

#### 4.3. CX3CR1 polimorfizmleri ile fenotipik özellikler arasındaki ilişki

##### 4.3.1. T280M genotip-fenotip ilişkisi

T280M mutasyonuna göre cinsiyet, yaş, tanı anında yaş, takip süresi, sigara, bağırsakda tutulum yeri, bağırsak tutulum tipi, perianal hastalık, bağırsak dışı tutulum bakımından fark saptanmadı. Crohn hastalarında T280M polimorfizmi saptanmadı. T280M heterozigot hastaların hepsinde ileokolon tutulumu mevcuttu ( $P=0,07$ ). ÜK hastalarında istatistiksel olarak olmasa da sayısal olarak daha fazla T 280M heterozigotluğu saptandı ( $p=0,056$ ). Hastaların T280M genotipi ile fenotipik özellikleri Tablo 4.3'de karşılaştırıldı.

**Tablo 4.3. Hastaların T280M polimorfizmine göre klinik bulguları (n=67)**

	TT ( <i>yaban tip</i> ) (n%)	TM ( <i>heterozigot</i> ) (n%)	p değeri
Erkek	30 (44,8)	6 (9,0)	1,0
Kadın	25 (37,3)	6 (9,0)	
Yaş(yıl) Ortalama±SD	44,8±14,7	45,7±6,1	0,8
Tanı anında yaş (yıl) Ortalama±SD	39,1±13,9	38,1±7,4	0,8
Takip süresi	6,17 ±7,5	6,11±5,4	0,9
Bağırsak tutulum yeri n (%)			
<i>Tİ</i>	2 (3,0)	0 (0,0)	0,07
<i>Kolon</i>	10 (14,9)	0 (0,0)	
<i>İleokolon</i>	43 (64,2)	12 (17,9)	
Bağırsak tutulum tipi n(%)			
<i>İnflamatuvar</i>	52 (77,6)	12 (17,9)	1,0
<i>Striktür</i>	3 (4,5)	0 (0)	
IBH tipi n (%)			
<i>Crohn</i>	16 (23,9)	0(0,0)	0.056
<i>ÜK</i>	39 (76,5)	12 (17,9)	
Perianal hastalık n (%)			
<i>yok</i>	48 (71,6)	11 (16,4)	1,00
<i>var</i>	7 (10,4)	1 (1,5)	
Bağırsak dışı tutulum n (%)			
<i>yok</i>	40 (59,7)	8 (11,9)	0,72
<i>var</i>	15 (22,4)	4 (6,0)	

#### 4.3.2. V249I genotip-fenotip ilişkisi

V249I mutasyonuna göre cinsiyet, yaş, tanı anında yaş, takip süresi, sigara, bağırsakda tutulum yeri, bağırsak tutulum tipi, İBH tipi, perianal tutulum, bağırsak dışı tutulum bakımından fark saptanmadı. Hastaların V249I genotipleri ile fenotipik özellikleri tablo 4.4’de karşılaştırıldı.

**Tablo 4.4. Hastaların V249I polimorfizmine göre klinik bulguları (n=67)**

	VV(yaban tip) (n%)	VI ve II (homozigot ve heterozigot) (n%)	p değeri
Erkek	22 (32,8)	14 (20,9)	0,2
Kadın	14 (20,9)	17 (25,4)	
Yaş(yıl) Ortalama±SD	47,4±13,2	42,2±13,6	0,1
Tanı anında yaş (yıl) Ortalama±SD	41,5±13,8	35,5±11,5	0,07
Takip süresi	2151,4±2390,6	2311,1±2885,1	0,8
Bağırsak tutulum yeri			0,5
<i>Tİ</i>	1(1,5)	1 (1,5)	
<i>Kolon</i>	28 (41,8)	27 (40,3)	
<i>İleokolon</i>	7(10,4)	3(4,5)	
Bağırsak tutulum tipi			0,5
<i>İnflamatuvar</i>	35(52,2)	29 (43,3)	
<i>Striktür</i>	1 (1,5)	2 (3,0)	
İBH tipi n (%)			0,5
<i>Crohn</i>	10 (14,9)	6(9,0)	
<i>ÜK</i>	26 (38,8)	25 (37,3)	
Perianal hastalık n (%)			0,45
<i>yok</i>	33 (49,3)	26 (38,7)	
<i>var</i>	3 (4,5)	5 (7,5)	

**Tablo 4.4. Hastaların V249I polimorfizmine göre klinik bulguları (n=67) (Devam)**

Bağırsak dışı tutulum n (%)			
yok	27 (40,4)	21(31,3)	0,5
var	9(13,4)	10 (14,9)	

#### 4.4. İBH'nda CX3CR1 polimorfizmleri dağılımı

ÜK ve Crohn hastalarında CX3CR1 polimorfizmlerinin dağılımı tablo 4.5'de gösterilmiştir. ÜK hastalarında Crohn hastalarına göre sayısal olarak daha fazla T 280M polimorfizmine rastlandı (p=0,056).

**Tablo 4.5. İBH hastalarında CX3CR1 polimorfizm dağılımları**

<i>V249I</i>	<i>ÜK</i>	<i>Crohn</i>	<i>T280M</i>	<i>ÜK</i>	<i>Crohn</i>
VV(yaban tip)	26 (38,8)	10 (14,9)	TT (yaban tip)	39 (58.2)	16 (23,9)
VI(heterezigot)	22 (32,8)	5 (7,5)	TM (heterezigot)	12 (17,9)	0 (0,0)
II(homozigot)	3 (4,5)	1 (1,5)	MM (homozigot)	-	-

## 5. TARTIŞMA

Bir çok genetik faktörün inflamatuvar barsak hastalığına neden olabileceği düşünülmüş, ancak sorumlu olan gen ya da genler ve bunlara ait mutasyonlar ya da polimorfizmler tam olarak belirlenememiştir. Yapılan çalışmalar CX3CR1-FKN sisteminin inflamatuvar hastalıklarda rolü olduğunu göstermektedir. İBH-FKN ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda aktif ve remisyondaki İBH hastalarının (özellikle Crohn hastalarının) immun histokimyasal boyamalarında İEH ve dolaşımda FKN ekspresyonunun arttığını ve dolaşımda artmış sayıda CX3CR1+ lökositlerin bulunduğu gösterilmiştir (21,29,31,50 ). FKN ekspresyonu gastrointestinal sistemin diğer yerlerine göre ileumda daha fazla eksprese olmaktadır (22). FKN'nin ileal ve ileokolik Crohn hastalarının mukozalarında arttığı, ancak izole kolon tutulumu ile giden Crohn hastalarının %35'inde artmadığı saptanması üzerine FKN reseptörü polimorfizm ekspresyonu üzerine yoğunlaşmıştır (5).

FKN reseptörü olan CX3CR1, DH vasıtası ile bağırsak lümeninden bakteri klirensinde rol almaktadır (22). CX3CR1+DH'ler bağırsak içeriğini devamlı monitorize edip, mukozal immun sistemin luminal sensörleri olarak görev yaparak lümeden bakteri toplarlar. Lamina propriadaki CX3CR1+ DH'ler dendritlerini bağırsak epiteli içine doğru uzatıp transepitel dendrit haline dönüşürler. DH'in transepitel dendritler haline gelip lümendeki bakterileri toplayabilmesi için CX3CR1 reseptörüne ihtiyacı olmaktadır (22). Transepitel dendritler sadece terminal ileumdaki villuslarda bulunur ve diğer ince bağırsak segmentlerinde saptanmazlar. Bu da bu kemokin sisteminin ileumdaki önemini gösterir. İlginç olarak CX3CR1 yoksun farelerin ileal villuslarında bu intraepitel dendritik hücre uzanımlarının olmadığı izlenmiştir.

CX3CR1 polimorfizminde V249I-T280M aa substitüsyonlarının bazı sonuçları bulunmaktadır (47). KAH, ateroskleroz gibi hastalıklarda CX3CR1 polimorfizmi varlığında; CX3CR1 reseptörünün membrana bağlı FKN'e adezyonunun azaldığı ve akut koroner olayların azaldığı saptanmıştır. İlginç olarak bu çalışmaların tersine Daudi ve ark.'nın yaptığı invitro analizde, (hangi hastalarda) homozigot V249I-T280M hastalarının kan monosit hücrelerinin membrana bağlı FKN'e, CX3CR1 polimorfizmi olmayan hastalara göre daha potent olarak bağlandığı göstermişlerdir (47). CX3CR1 polimorfizminin, CX3CR1 yoksun farelerde olduğu gibi DH disfonksiyonu ile ilişkili mi olduğu hakkında bilgiler net değildir. DH disfonksiyonu sonucu bakterilerin toplanmasının



azalması nedeni ile İEH'lerin bakterilere artmış maruziyeti, bağırsak inflamasyonu artırmakta ve homozigot V249I ve T280M polimorfizmlerinde görülen intestinal stenoza yol açtığı düşünülmektedir (29).

İBH ile ilgili M Sabate ve ark. yaptığı çalışmada V249I polimorfizminde %37,4 heterozigot, %8,8 homozigot, T280 M polimorfizminde %18,1 heterozigot, %1,3 homozigot taşıyıcılık saptanmış (43). Brand ve ark. 206 hastalık Crohn serisinde V249I polimorfizminde %33 heterozigotluk, %8,9 homozigotluk; T280M polimorfizminde %23,3 heterozigot, %4,4 homozigotluk saptanmış (29). Bizim çalışmamızda benzer olarak V249 I için %40,3 heterozigot, %6 homozigot; T 280M için %17,9 heterozigot taşıyıcılık saptandı. T280M homozigot olan hasta saptanmadı. Sabate ve ark. çalışmasında Brand ve ark. çalışmasında olduğu gibi Crohn hastalarında kontrol grubuna göre her 2 CX3CR1 polimorfizm frekansları yüksek saptanmamış (29,43). Bu sonuçlara göre Crohn hastalığında CX3CR1 polimorfizminin anahtar faktör olmadığı söylenmiş. Bizim çalışmamızda da V 249I mutasyonu bakımından hasta ve kontrol grubunda fark saptanmadı. T280M polimorfizmi kontrol grubunda hasta grubundan daha yüksek oranda saptandı. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda alt grup analizleri CX3CR1 ve FKN'in Crohn hastalığında rolü olduğunu göstermektedir (29,43).

Brand ve ark. yaptığı çalışmada T280M homozigot mutasyonu olanlarda yaban tip ve heterozigot hastalara göre daha fazla intestinal stenoz olmakta ve ileokolonik tutulum daha fazla olmaktadır. V249I homozigot hastalarda da heterozigot hastalara göre daha fazla ileokolon tutulum görülmüş ( $p=0.07$ ), intestinal stenozu olan hastalarda daha sık V 249I genotipi saptanmış ( $p=0.06$ ). T280M homozigot hastaların tümünde hastalığın ileuma kadar uzandığı izlenmiş (%89 ileokolon, %11 ileal) (29). T280M homozigot genotipi olan hastaların, ileal tutulumunun nedeninin muhtemel ileumda CX3CR1 ligand fraktalkinin yüksek ekspresyonundan kaynaklandığı düşünülmüş (20). Sabate ve ark. yaptığı çalışmada sadece 3 hastada T 280M homozigot genotipi saptanmış (2 hasta stenotik) ve bu sayının karşılaştırma için az olduğu söylenmiş. V249I polimorfizmi fibrostenoz ile giden hastalarda daha sık bulunmuş ( $p=0,03$ ) (43). Sans ve ark. çalışmasında inflamatuvar bağırsak hastalarının mukozasının mikrovasküler hücrelerinin normal mukozaya göre daha fazla FKN ürettiği ve İBH hastalarında sağlıklı bireylere ve aktif olmayan İBH hastalarına göre sirkülasyondaki T hücrelerinin daha fazla CX3CR1 ürettiği gösterilmiş (31).

Bizim çalışmamızda hasta grubunda T280M homozigot hasta saptanmadı. V249I homozigot hasta sayısı klinik korelasyon yapılması açısından az olup (4 hasta), kontrol grubu ile benzer idi (3 hasta). Bununla birlikte T 280M heterozigot hastaların tümünde

istatistiksel olmasa da ileokolon tutulumu mevcuttu ( $p=0,07$ ). V249I heterozigot hastalar ile klinik bulgular arasında ilişki saptanmadı.

CX3CR1 polimorfizmleri ile İBH tipi ilişkisi incelendiğinde bizim çalışmamızda diğer çalışmalardan farklı olarak Crohn hastalarında T280M polimorfizmi izlenmezken ÜK hastalarının %17,9'unda heterozigot taşıyıcılık saptandı.

Sigara içen Crohn hastalarında içmeyenlere göre stenoz daha sık görülmekte (51) ve stenoz için yapılan endoskopik dilatasyon sonrasında obstüktif semptomların relapsı daha fazla olmaktadır. Homozigot ikizlerde, sigara içen çiftlerde Crohn hastalığı ÜK'e göre gelişme riski daha sık olmakta, sigara içenlerin frekansı fibrostenoz ile giden Crohn ikizlerinde artmaktadır. M. Sabate ve ark. çalışmasında V249I polimorfizmi olan aktif sigara içenlerde stenoz daha sık saptanmıştır (43). Son zamanlarda sigara içiminin de dendritik hücrelerde azalma ve fonksiyonlarında supresyon yaptığı gösterilmiştir (52). Bununla birlikte bağırsak bakterilerine karşı inflamatuvar yanıt ve sigaranın ilişkisi için ek çalışmalar gerektiği söylenmiştir. Bu nedenle Sabate ve ark. yaptığı çalışmada V249I'nın Crohn hastalığı patogenezinde predizpozan faktör olmadığı, V249I polimorfizm- stenoz ilişkisinde, muhtemel stenozlu hastalarda görülen sigara içiminin fazla olmasından kaynaklanabileceği söylenmiştir (43). Bizim çalışmamızda CX3CR1 polimorfizmleri ile sigara içimi arasında ilişki saptanmadı. Stenoz ile giden hasta sayısının az olması nedeni ile sigara ve polimorfizmler ile ilişkisi incelenemedi.

Hasta grubumuzda ÜK hasta sayısının Crohn hasta sayısından fazla olması ve hasta grubumuzda kolon tutulumunun ön planda olması nedeni ile FKN'nin daha çok ileumda eksprese olması göz önüne alındığında, CX3CR1 polimorfizmleri ve alt grup analizlerinde anlamlı sonuçlar saptanmayabileceği; yine striktür ile giden hasta sayımızın da az olması nedeni ile sonuçların etkilenebileceği düşünüldü.

Bu çalışma ile İBH hastalarında CX3CR1 polimorfizmlerinin hastalığın patogenezinde ve klinik bulguları ile ilişkili olup olmadığı kendi hasta serimiz üzerinde belirlenmeye çalışıldı. Sonuç olarak hastalar ve kontrol grubunda CX3CR1 polimorfizmi bakımından farklılık saptanmaması ve genotip-fenotip ilişkisini araştıran alt grup analizlerinin sayıca yeterli olmaması nedeni ile bu polimorfizmin İBH hastalığında major hastalık prediktörü olduğu söylenemez.

## 6. SONUÇLAR

- Hasta ve kontrol grubunda V249I polimorfizmi bakımından fark saptanmadı. T280M polimorfizmi ise kontrol grubunda hasta grubuna göre daha yüksek saptandı.
- CX3CR1 polimorfizmleri ile klinik ve endoskopik bulgular arasında istatistiksel olarak ilişki saptanmadı.
- Bu sonuçlara göre İBH patogenezinde CX3CR1 polimorfizminin anahtar faktör olmadığı söylenebilir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Cooks-Mills JM, Deem TL. Active participation of endothelial cells in inflammation. *J Leukoc Biol* 2005;77:487-495.
2. Müller Wa. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol.* 2003 Jun;24(6):327-34.
3. Proudfoot AE, Power CA, Rommel C, Wells TN. Strategies for chemokine antagonists as therapeutics. *Semin Immunol.* 2003 Feb;15(1):57-65.
4. Van Buul JD, Hordijk PL. Signaling in leukocyte transendothelial migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:824-833.
5. Binion DG, Kugathasan S, Dwinell MB. Molecular stratification of Crohn's disease by chemokine receptors: fractalkine receptor polymorphisms define a fibrostenosing ileal subgroup. *Am J Gastroenterol.* 2006 Jan;101(1):107-9.
6. Daig R, Andus T, Aschenbrenner E, Falk W, Schölmerich J, Gross V. Increased interleukin 8 expression in the colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut.* 1996 Feb;38(2):216-22.
7. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature.* 1997 Feb 13;385(6617):640-4.
8. Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Nomiyama H, Schall TJ, Yoshie O. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell.* 1997 Nov 14;91(4):521-30.
9. Umehara H, Bloom ET, Okazaki T, Nagano Y, Yoshie O, Imai T. Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Jan;24(1):34-40. Epub 2003 Sep 11. Review
10. Umehara H, Bloom E, Okazaki T, Domae N, Imai T. Fractalkine and vascular injury. *Trends Immunol.* 2001 Nov;22(11):602-7.
11. Haskell CA, Clearly MD, Charo IF. Unique role of the chemokine domain of fractalkine in cell capture. Kinetics of receptor dissociation correlate with cell adhesion. *J Biol Chem.* 2000 Nov 3;275(44):34183-9.
12. Combadiere C, Salzwedel K, Smith ED, Tiffany HL, Berger EA, Murphy PM. Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1. *J Biol Chem.* 1998 Sep 11;273(37):23799-804.
13. Middleton J, Patterson AM, Gardner L, Schmutz C, Ashton BA. Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood.* 2002 Dec 1;100(12):3853-60. Review.
14. Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol.* 2001 Feb;2(2):108-15. Review.
15. Goda S, Imai T, Yoshie O, Yoneda O, Inoue H, Nagano Y, Okazaki T, Imai H, Bloom ET, Domae N, Umehara H. CX3C-chemokine, fractalkine-enhanced adhesion of THP-1 cells to endothelial cells through integrin-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol.* 2000 Apr 15;164(8):4313-20
16. Nishimura M, Umehara H, Nakayama T, Yoneda O, Hieshima K, Kakizaki M, Dohmae N, Yoshie O, Imai TJ. Dual functions of fractalkine/CX3C ligand 1 in trafficking of perforin+/granzyme B+ cytotoxic effector lymphocytes that are defined by CX3CR1 expression. *J Immunol.* 2002 Jun 15;168(12):6173-80.
17. Yamamoto M, Fujihashi K, Beagley KW, McGhee JR, Kiyono H. Cytokine synthesis by intestinal intraepithelial lymphocytes. Both gamma/delta T cell receptor-positive

- and alpha/beta T cell receptor-positive T cells in the G1 phase of cell cycle produce IFN-gamma and IL-5. *J Immunol.* 1993 Jan 1;150(1):106-14.
18. Hoyne GF, Callow MG, Kuo MC, Thomas WR. Presentation of peptides and proteins by intestinal epithelial cells. *Immunology.* 1993 Oct;80(2):204-8.
  19. Ebert EC. Interleukin 15 is a potent stimulant of intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology.* 1998 Dec;115(6):1439-45.
  20. Muehlhoefer A, Saubermann LJ, Gu X, Luedtke-Heckenkamp K, Xavier R, Blumberg RS, Podolsky DK, MacDermott RP, Reinecker HC. Fractalkine is an epithelial and endothelial cell-derived chemoattractant for intraepithelial lymphocytes in the small intestinal mucosa. *J Immunol.* 2000 Mar 15;164(6):3368-76.
  21. Brand S, Sakaguchi T, Gu X, Colgan SP, Reinecker HC. Fractalkine-mediated signals regulate cell-survival and immune-modulatory responses in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology.* 2002 Jan;122(1):166-77.
  22. Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, Vyas JM, Boes M, Ploegh HL, Fox JG, Littman DR, Reinecker HC. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science.* 2005 Jan 14;307(5707):254-8
  23. Imaizumi T, Yoshida H, Satoh K. Regulation of CX3CL1/fractalkine expression in endothelial cells. *J Atheroscler Thromb.* 2004;11(1):15-21. Review.
  24. Furuichi K, Wada T, Iwata Y, Sakai N, Yoshimoto K, Shimizu M, Kobayashi K, Takasawa K, Kida H, Takeda S, Matsushima K, Yokoyama H. Upregulation of fractalkine in human crescentic glomerulonephritis. *Nephron.* 2001 Apr;87(4):314-320.
  25. Robinson LA, Nataraj C, Thomas DW, Howell DN, Griffiths R, Bautch V, Patel DD, Feng L, Coffman TM. A role for fractalkine and its receptor (CX3CR1) in cardiac allograft rejection. *J Immunol.* 2000 Dec 1;165(11):6067-72.
  26. Nanki T, Imai T, Nagasaka K, Urasaki Y, Nonomura Y, Taniguchi K, Hayashida K, Hasegawa J, Yoshie O, Miyasaka N. Migration of CX3CR1-positive T cells producing type 1 cytokines and cytotoxic molecules into the synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002 Nov;46(11):2878-83.
  27. Ahn SY, Cho CH, Park KG, Lee HJ, Lee S, Park SK, Lee IK, Koh GY. Tumor necrosis factor-alpha induces fractalkine expression preferentially in arterial endothelial cells and mithramycin A suppresses TNF-alpha-induced fractalkine expression. *Am J Pathol.* 2004 May;164(5):1663-72.
  28. Chapman GA, Moores KE, Gohil J, Berkhout TA, Patel L, Green P, Macphee CH, Stewart BR. The role of fractalkine in the recruitment of monocytes to the endothelium. *Eur J Pharmacol.* 2000 Mar 31;392(3):189-95
  29. Brand S, Haufbauer K, Dambacher J, Schnitzler F, Staudinger T, Pfennig S, Seiderer J, Tillack C, Konrad A, Göke B, Ochsenkühn T, Lohse P. Increased expression of the chemokine fractalkine in Crohn's disease and association of the fractalkine receptor T280M polymorphism with a fibrostenosing disease Phenotype. *Am J Gastroenterol.* 2006 Jan;101(1):99-106.
  30. Faussat A, Coulomb-L'Hermine A, Gosling J, Krzysiek R, Durand-Gasselini I, Schall T, Balian A, Richard Y, Galanaud P, Emilie D. Fractalkine receptor expression by T lymphocyte subpopulations and in vivo production of fractalkine in human. *Eur J Immunol* 2000;30:87-97.
  31. Sans M, Danese S, de la Motte C, de Souza HS, Rivera-Reyes BM, West GA, Phillips M, Katz JA, Fiocchi C. Enhanced recruitment of CX3CR1+ T cells by mucosal endothelial cell-derived fractalkine in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2007 Jan;132(1):139-53. Epub 2006 Oct 12.

32. Greaves DR, Häkkinen T, Lucas AD, Liddiard K, Jones E, Quinn CM, Senaratne J, Green FR, Tyson K, Boyle J, Shanahan C, Weissberg PL, Gordon S, Ylä-Herttuala S. Linked chromosome 16q13 chemokines, macrophage-derived chemokine, fractalkine, and thymus- and activation-regulated chemokine, are expressed in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001 Jun;21(6):923-9.
33. Wong BW, Wong D, McManus BM. Characterization of fractalkine (CX3CL1) and CX3CR1 in human coronary arteries with native atherosclerosis, diabetes mellitus, and transplant vascular disease. *Cardiovasc Pathol.* 2002 Nov-Dec;11(6):332-8.
34. Ito Y, Kawachi H, Morioka Y, Nakatsue T, Koike H, Ikezumi Y, Oyanagi A, Natori Y, Natori Y, Nakamura T, Gejyo F, Shimizu F. Fractalkine expression and the recruitment of CX3CR1+ cells in the prolonged mesangial proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2002 Jun;61(6):2044-57.
35. Prevention of crescentic glomerulonephritis by immunoneutralization of the fractalkine receptor CX3CR1 rapid communication. Feng L, Chen S, Garcia GE, Xia Y, Siani MA, Botti P, Wilson CB, Harrison JK, Bacon KB. *Kidney Int.* 1999 Aug;56(2):612-20.
36. Robinson LA, Nataraj C, Thomas DW, Howell DN, Griffiths R, Bautch V, Patel DD, Feng L, Coffman TM. A role for fractalkine and its receptor (CX3CR1) in cardiac allograft rejection. *J Immunol.* 2000 Dec 1;165(11):6067-72.
37. Faussat A, Bouchet-Delbos L, Berrebi D, Durand-Gasselien I, Coulomb-L'Hermine A, Krzysiek R, Galanaud P, Levy Y, Emilie D. Deregulation of the expression of the fractalkine /fractalkine receptor complex in HIV-infected patients. *Blood.* 2001;98:1678-1686.
38. Volin MV, Woods JM, Amin MA, Connors MA, Harlow LA, Koch AE. Fractalkine: a novel angiogenic chemokine in rheumatoid arthritis. *Am J Pathol.* 2001 Oct;159(4):1521-30.
39. Sugaya M, Nakamura K, Mitsui H, Takekoshi T, Saeki H, Tamaki K. Human keratinocytes express fractalkine/CX3CL1. *J Dermatol Sci.* 2003 May;31(3):179-87.
40. Efsen E, Grappone C, DeFranco RM, Milani S, Romanelli RG, Bonacchi A, Caligiuri A, Failli P, Annunziato F, Pagliai G, Pinzani M, Laffi G, Gentilini P, Marra F. Up-regulated expression of fractalkine and its receptor CX3CR1 during liver injury in humans. *J Hepatol.* 2002 Jul;37(1):39-47.
41. McDermott DH, Fong AM, Yang Q, Sechler JM, Cupples LA, Merrell MN, Wilson PW, D'Agostino RB, O'Donnell CJ, Patel DD, Murphy PM. Chemokine receptor mutant CX3CR1-M280 has impaired adhesive function and correlates with protection from cardiovascular disease in humans. *J Clin Invest.* 2003 Apr;111(8):1241-50.
42. Tuo J, Smith BC, Bojanowski CM, Meleth AD, Gery I, Csaky KG, Chew EY, Chan CC. The involvement of sequence variation and expression of CX3CR1 in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *FASEB J.* 2004 Aug;18(11):1297-9.
43. Sabate JM, Ameziane N, Lamoril J, Jouet P, Farmachidi JP, Soulé JC, Harnois F, Sobhani I, Jian R, Deybach JC, de Prost D, Coffin B. The V249I polymorphism of the CX3CR1 gene is associated with fibrostenotic disease behavior in patients with Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2008 Aug;20(8):748-55.
44. Faure S, Meyer L, Costagliola D, Vaneensberghe C, Genin E, Autran B, Delfraissy. Rapid progression to AIDS in HIV+ individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1. *Science.* 2000 Mar 24;287(5461):2274-7.
45. Moatti D, Faure S, Fumeron F, Amara Mel-W, Seknadji P, McDermott DH, Debré P, Aumont MC, Murphy PM, de Prost D, Combadière C. Polymorphism in the fractalkine receptor CX3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease. *Blood.* 2001 Apr 1;97(7):1925-8.

46. McDermott DH, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Merrell MN, Epstein N, Quyyumi AA, Murphy PM. Association between polymorphism in the chemokine receptor CX3CR1 and coronary vascular endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Circ Res*. 2001 Aug 31;89(5):401-7.
47. Daoudi M, Lavergne E, Garin A, Tarantino N, Debré P, Pincet F, Combadière C, Deterre P. Enhanced adhesive capacities of the naturally occurring Ile249-Met280 variant of the chemokine receptor CX3CR1. *J Biol Chem*. 2004 May 7;279(19):19649-57. Epub 2004 Feb 27
48. Papadakis KA, Targan SR. The role of chemokines and chemokine receptors in mucosal inflammation. *Inflamm Bowel Dis*. 2000 Nov;6(4):303-13.
49. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*. 1987;155:335-350.
50. Kobayashi T, Okamoto S, Iwakami Y, Nakazawa A, Hisamatsu T, Chinen H, Kamada N, Imai T, Goto H, Hibi T. Exclusive increase of CX3CR1+CD28-CD4+ T cells in inflammatory bowel disease and their recruitment as intraepithelial lymphocytes. *Inflamm Bowel Dis*. 2007 Jul;13(7):837-46.
51. Louis E, Michel V, Hugot JP, Reenaers C, Fontaine F, Delforge M, El Yafi F, Colombel JF, Belaiche J. Early development of stricturing or penetrating pattern in Crohn's disease is influenced by disease location, number of flares, and smoking but not by NOD2/CARD15 genotype. *Gut*. 2003 Apr;52(4):552-7.
52. Vassallo R, Chen L. Selective suppression of dendritic cell functions by cigarette smoke extract. *Chest*. 2004 May;125(5 Suppl):107S. No abstract available

