

ARZU DOĞAN

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ İSTANBUL - 2014



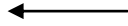
Adınızı soyadınızı giriniz



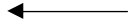
Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte**
sırt yazısı bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır
olacak

Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya

(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS
TEZİ;



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**LEPTİN G-2548A VE LEPTİN R-Q223R GEN
VARYANTLARININ İNFLAMATUAR BARSAK
HASTALIKLARI İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

ARZU DOĞAN

**DANIŞMAN
PROF. DR. BEDİA ÇAKMAKOĞLU**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI**

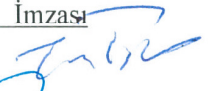
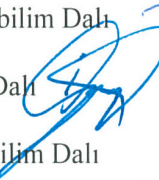
İSTANBUL-2014

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında Arzu DOĞAN tarafından hazırlanan "LeptinG-2548A ve LeptinR-Q223R Gen Varyantlarının İnflamatuvar Barsak Hastalıkları ile İlişkisinin Araştırılması" başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

03 / 03 / 2014

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı</u>	<u>Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof. Dr. Turgay İSBİR	Yeditepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	
2.Prof. Dr. İlhan YAYLIM	İ.Ü. DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı	
3.Prof. Dr. Bedi ÇAKMAKOĞLU	İ.Ü. DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı	
4.Doç Dr. Arzu ERGEN	İ.Ü. DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı	
5.Doç. Dr. Elif ÖZKÖK	İ.Ü. DETAE Sinirbilim Anabilim Dalı	

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Arzu DOĞAN



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı kurucusu, emekli öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Turgay İSBİR'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca danışmanlığımı üstlenen ve tezimin hazırlanmasında değerli katkı ve yardımlarını esirgemeyen, hocam İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Bedia ÇAKMAKOĞLU'a,

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. İlhan YAYLIM'a,

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı Öğretim görevlilerine,

Tezimin laboratuvar ve yazım aşamasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Uzm. Bio Cem HOROZOĞLU'na, Uzm. Bio Sinem BİRELLER'e ve diğer ekip arkadaşlarıma,

Tez çalışmam için hastaların seçimi, örneklerin sağlanması ve klinik süreçteki değerlendirmelerle alakalı destek ve katkılarından dolayı Sayın Uzm. Dr. Resul KAHRAMAN'a,

Tez yazım sürecinde yardım ve desteğini esirgemeyen Bio Ezgi ARSLAN'a,

Ayrıca, ilgi ve destekleriyle her zaman yanımda olan özellikle Annem olmak üzere aileme en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 31904.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İnflamatuvar Barsak Hastalığı	3
2.2. Epidemiyoloji.....	3
2.3. Etiyoloji.....	4
2.3.1. Genetik Faktörler	7
2.3.2. Çevresel Faktörler	9
2.4. Hastalığın Moleküler Mekanizmaları	9
2.5. Leptin	14
2.5.1. Gastrointestinal Sistemde Leptinin Etkisi.....	18
2.5.2. LeptinG-2548A ve LeptinR Q223R.....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1. Seçilen Örneklerin Tanımı	22
50X Tris-Asetik asit-Etilen Diamin Tetra Asetat (TAE) Tamponu	24
3.2. KULLANILAN YÖNTEMLER.....	25
3.2.1. Serum Leptin Düzeylerinin Tespiti.....	25
Serum Leptin Düzeyleri Leptin-EASIA Kap2281, (DIAsource ImmunoAssays S.A. Belgium) ELISA kiti ile çalışılmıştır. Sonuçlar ng/ml olarak verilmiştir.....	25
3.2.2. İnsülin Direncinin Değerlendirilmesi	25
3.2.3. PZR Yöntemi İle Gen Bölgelerinin Çoğaltılması :	25

3.2.3.1. Leptin Promotor Bölgesinin 5' ucunda G>A (rs 7799039) Gen varyantının Tespiti	25
3.2.3.2. Ekzon 6'da görülen A>G (rs 1137101) Gen Varyantının Tespiti....	26
3.2.4. Elektroforez Koşulları.....	28
3.2.4.1. % 3'lük Agaroz Jel Hazırlanması	28
3.2.4.2. % 5'lük Agaroz Jel Hazırlanması	29
3.2.4.3. PZR Ürünlerinin Kontrolü	29
3.2.5. LeptinG-2548A ve LeptinR Q223R Gen Bölgesinin RFLP Yöntemi ile Polimorfizm Analizi.....	29
3.2.5.1. HhaI Enzimi Kesim Ürünlerinin Kontrolü.....	30
3.2.5.2. MspI Enzimi Kesim Ürünlerinin Kontrolü	30
3.2.5.3. HhaI Enzimi Kesim Sonuçlarının Değerlendirilmesi	31
3.2.5.4. MspI Enzimi Kesim Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	31
3.2.6. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatiksel Yöntemler	32
4. BULGULAR.....	33
5.TARTIŞMA.....	42
6. KAYNAKLAR	46
ETİK KURUL KARARI	70
ÖZGEÇMİŞ	73

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri	22
Tablo 3-2: Çalışmadan Dışlanma Kriterleri.....	22
Tablo 3-3: Kullanılan Kimyasallar	23
Tablo 3-4: Kullanılan Gereçler	24
Tablo 3-5: Agaro Jel Elektroforezi’nde Kullanılan Çözeltiler.....	24
Tablo 3-6: LeptinG-2548A Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Enzim ve Kimyasal Maddeler:.....	26
Tablo 3-7: LeptinR Q223R Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Enzim ve Kimyasal Maddeler:.....	27
Tablo 3-8: LeptinG-2548A Polimorfizmine ait Amplifikasyon(çoğaltma) Şartları	28
Tablo 3-9: LeptinR Q223R Polimorfizmine ait Amplifikasyon(çoğaltma) Şartları	28
Tablo 3-10: Uygun Restriksiyon Şartları.....	29
Tablo 3-11: HhaI enzimi için Kesim Protokolü.....	30
Tablo 3-12: MspI enzimi için Kesim Protokolü	30
Tablo 4-1: Çalışma gruplarına ait demografik veriler.....	33
Tablo 4-2: Kontrol ve hasta gruplarında Leptin G-2548A polimorfizminin genotip dağılımları.....	34
Tablo 4-3: Kontrol ve Hasta gruplarında LeptinR Q223R polimorfizminin genotip dağılımları.....	37
Tablo 4-4: Kontrol ve Hasta gruplarında LeptinR Q223R polimorfizminin genotiplerine göre VKI, serum Leptin, glukoz, insülin düzeyleri ve HOMA indeksi dağılımları.....	38

Tablo 4-5: Kontrol ve Hasta gruplarında LeptinG-2548A polimorfizminin genotiplerine göre VKI, serum Leptin, glukoz, insülin düzeyleri ve HOMA indeksi dağılımları.....	40
--	----

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: İnflamatuvar Barsak Hastalığı patogeneğinde barsak epitel hücresinin rolü.....	7
Şekil 2-2: İnflamatuvar Barsak Hastalığı'nda duyarlı lokuslar	8
Şekil 2-3: İBH' da immün sistem yolları	11
Şekil 2-4: İnflamatuvar Barsak Hastalığı'nda adipokinlerin rolü	13
Şekil 2-5: Leptin reseptör yapısı	16
Şekil 2-6: Leptin reseptör sinyal yolları	17
Şekil 2-7: Gastrointestinal sistemde Leptinin etkileri	19
Şekil 3-1: LeptinG-2548A genotiplerinin %3'lük agaroz jel'de görüntülenmesi. (Marker 50 bp DNA ladder).....	31
Şekil 3-2: LeptinR Q223R genotiplerinin %5'lik agaroz jel'de görüntülenmesi.....	32
Şekil 4-1: Hasta ve kontrol grubunda LeptinG-2548A polimorfizminin G+ genotip frekans dağılımları.....	35
Şekil 4-2: Hasta ve kontrol grubunda LeptinG-2548A polimorfizminin AA genotip frekans dağılımları	35
Şekil 4-3: Hasta ve kontrol grubunda LeptinG-2548A polimorfizminin AG genotip frekans dağılımları.....	36
Şekil 4-4: Hasta ve kontrol grubunda LeptinR Q223R polimorfizminin genotiplerine göre VKI değerleri.....	38
Şekil 4-5: Hasta ve kontrol grubunda LeptinR Q223R polimorfizminin genotiplerine göre HOMA indeksleri.....	39
Şekil 4-6: Hasta ve kontrol grubunda Leptin G-2548A polimorfizminde genotiplerine göre VKI değerleri.....	40
Şekil 4-7: Hasta ve kontrol grubunda Leptin G-2548A polimorfizminin genotiplerine göre HOMA indeksler.....	41

SEMBOLLER / kısaltmalar listesi

- İBH: İnflamatuar barsak hastalığı
- PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
- RFUP: Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi
- UC: Ülseratif kolit
- RFLP: Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi
- HOMA-IR: Homeostatik model değerlendirme
- STAT3: Sinyal iletimi ve transkripsiyon aktivasyonu 3
- KRK: Kolorektal kanser
- CH: Crohn hastalığı
- GWAS: Genom boyu ilişkilendirme çalışmaları
- CARD15: Caspase recruitment domain-containing protein 15
- NOD2: Nükleotit bağlanma oligomerizasyon bölgesi
- ATG16L1: Otofaji ilişkili protein 16-1
- IL23R: İnterlökin 23 reseptörü
- IBD5: İnflamatuar barsak hastalığı 5
- IL12B: interlökin 12B
- CCNY: Siklin Y
- TLR4: Toll-like reseptör 4
- ECM1: The human extracellular matrix gene 1
- CDH1: Kadherin-1
- HNF4A: Hepatosit nüklear faktör 4 alfa
- LAMB1: Laminin
- GNA12: Guanin nükleotid bağlayan protein (G protein) alfa 12

IL7R: İnterlökin 7 reseptör

NSAIDs: Non-steroidal anti-inflamatuar ilaçlar

IL8RA: İnterlökin 8 reseptör alfa

IL8RB: Anti-İnterlökin 8 reseptör tip B

IRF5: İnterferon regülatör faktör

IL-6: İnterlökin 6

JAK/ STAT: Janus protein kinaz/ sinyal iletici ve transkripsiyon aktive ediciler

SOCS3: Sitokin sinyal supresörleri

VKİ: Vücut kitle indeksi

ÖZET

DOĞAN A. LeptinG-2548A ve LeptinR Q223R Gen Varyantlarının İnflamatuvar Barsak Hastalıkları ile İlişkisinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı. Yüksek Lisans. İstanbul 2014

İnflamatuvar barsak hastalığı (İBH) immün sistem ve vücut florası arasında karmaşık bir ilişkiden kaynaklandığı düşünülen, nedeni ve mekanizması tam olarak bilinmeyen iltihabi bir hastalıktır. Hastalığın ülseratif kolit ve Crohn hastalığı olmak üzere iki önemli tipi bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda leptinin iltihabi barsak hastalarının kolon mukozasında hücre yüzey reseptör sayısını artırarak, mukozal hücre proliferasyonunu stimüle ettiği gösterilmiştir. LeptinR Q223R polimorfizmi (rs1137101), leptin reseptör geninde glutaminin arjinine (CAG-CGG) dönüşmesi olarak bilinen tek nükleotid değişimidir. LeptinG-2548A polimorfizmi (rs7799039) ise, leptin geninin promotor bölgesinde G'den A'ye tek nükleotid değişimini ifade eden polimorfizmdir. Çalışmamızda, LeptinG-2548A ve LeptinR Q223R gen polimorfizminin İBH' da risk ve klinik parametrelerle ilişkisi istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Çalışmaya 85 İBH' sı ve 69 sağlıklı kontrol grubu dahil edilmiştir. LeptinG-2548A ve LeptinR Q223R gen polimorfizmlerini saptamak için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi (RFUP) ve Agaroze Jel Elektroforezi teknikleri kullanılmıştır. Serum leptin düzeyleri ELİSA metodu ile çalışılmıştır. Hasta ve kontrol grubu arasında polimorfizimler genotip ve allel dağılımları açısından incelenmiştir. Çalışmamızda her iki polimorfizmde de, hasta ve kontrol grubu arasında genotip ve allel dağılımları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Ancak LeptinG-2548A polimorfizminde G+ genotipli bireylerin frekansının hasta grubunda kontrol grubuna göre yüksek olduğu ve hastalık için risk oluşturabileceği izlenimi edinilmiştir. LeptinG-2548A polimorfizminde AA genotipli bireylerin frekansının kontrol grubunda hasta grubuna göre yüksek olduğu ve hastalık için koruyucu bir faktör olabileceği kanısına varılmıştır. Genotipler arası leptin düzeyleri hasta ve kontrol gruplarında incelendiğinde her üç genotipteki bireylerde hastalar kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek leptin düzeylerine sahip olarak tespit edilmiştir (p=0,000) Hasta ve kontrol grubunda LeptinG-2548A ve LeptinR Q223R genotiplerine göre HOMA indeksleri incelendiğinde HOMA indekslerinin genotiplere bağımlı olarak değiştiği gözlenmiştir.

Çalışmamızda, LeptinG-2548A ve LeptinR Q223R genotiplerinin daha geniş sayıda hasta popülasyonu kullanılarak yapılacak olan ileriki çalışmalara ışık tutacağı kanısındayız. Bu sayede ortaya konulması düşünülen genotipik ilişki, hastalık patogenezindeki moleküler mekanizmaların çözülmesine ve aday terapötik çalışmalara katkıda bulunacaktır.

Anahtar Kelimeler: Gen polimorfizmi, Leptin, Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Ülseratif Kolit, Crohn Hastalığı

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 31904

ABSTRACT

Dogan A. Investigation of the relationship between LeptinG-2548A and LeptinR Q223R gene variant and Inflammatory Bowel Disease. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp A.B.D. Yüksek Lisans/ İstanbul 2014

Inflammatory Bowel Disease (IBD) is a complex disease that has cause and mechanism that disharmonious relationship between the immune system and the commensal flora is not exactly known. There are two major forms of IBD, which are Ulcerative Colitis (UC) and Crohn's Disease (CD). According to conducted studies, leptin has been shown to be upregulated in the colonic mucosa in patients with inflammatory bowel disease. Leptin stimulates gut mucosal cell proliferation and inhibits apoptosis. Leptin is a polypeptide, which has pleiotrophic functions that acts on the brain to regulate energy balance. A LeptinR Q223R polymorphism (rs1137101), is known as single nucleotide substitution from CAG to CGG transition (glutamine to arginine substitution) in the leptin reseptor gene. A LeptinG-2548A polymorphism (rs7799039) is defined as single nucleotide substitution from G to A in the promoter region of the leptin gene. In our study, we investigated the relationship of the LeptinG-2548A and LeptinR Q223R gene variants with the risk of IBD and the clinical parameters. 85 patients with IBD and 69 healthy volunteers were enrolled in this study. Polymerase Chain Reaction (PCR) and Restriction Endonuclease Fragment Length Polymorphism (RFLP), and Agarose Gel Electrophoresis Techniques were used to determine the LeptinG-2548A and LeptinR Q223R gene polymorphisms. Serum leptin levels was studied with ELİSA metods. We furthermore performed the genotype and allele frequencies in case-control studies. According to our data, the gene polimorphisms of LeptinG-2548A and LeptinR Q223R were showed no statistical difference between cases and controls in genotype and allele distributions. Furthermore, LeptinG-2548A/ G+ was high in the groups of patients compared to healthy subjects and indicates that it may act as a risk factor. AA homozygotes of LeptinG-2548A showed high rates in the control group than patients group. There were statistically significant differences in leptin concentrations between AA, AG, GG genotypes of the patients to compared the control groups ($p=0.000$). When evaluated in terms of HOMA-IR, there were differences between the value of genotypes of LeptinG-2548A and LeptinR Q223R in the control and patient groups.

We thought this study will shed light on further researches with larger patient population to ascertain the implications of LeptinG-2548A and LeptinR Q223R polymorphisms. Consequently, genotypic association that is intended to be revealed will be analyzed molecular mechanisms into the pathogenesis of these diseases and candidate therapeutic studies.

Key Words: Gene polymorphism, Leptin, Polimerase Chain Reaction, Ulcerative Colitis ve Crohn's Disease.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project no: 31904.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnflamatuvar barsak hastalığı immün sistem ve vücut florası arasında karmaşık bir ilişkiden kaynaklandığı düşünülen nedeni ve mekanizması tam olarak bilinmeyen multifaktöryel bir hastalıktır. Beslenme ve çevre ile bağlantılı olduğu kadar, genetik ve mikrobiyal faktörlerin hastalığın patolojisinde rol oynadığı ileri sürülmektedir (1). Hastalığın ülseratif kolit ve Crohn hastalığı olmak üzere iki önemli tipi bulunmaktadır. Ülseratif kolit genel olarak kolon üzerine etki ederken, Crohn hastalığı kolona etki ettiği gibi, incebarsağın distal bölümü üzerine de etki gösterir (1-2). Daha önce yapılan çalışmalarda; bu hastalıkların insidansı incelendiğinde, Avrupa genelinde kuzey bölgesinde, güney bölgesine oranla daha sık görülmesi, bölgeler arası hastalık insidansının büyük ölçüde değişiklik gösterebileceğini ileri sürmüştür (3).

Leptin, adiposit kaynaklı ve beyinde enerji dengesinin regülasyonundan sorumlu olan pleiotropik fonksiyona sahip bir polipeptittir (4,5,6-7). Adipoz doku dışında, hipofiz bezi, iskelet kası ve mide gibi organlarda da sekresyonu gerçekleşmektedir (8-9). Bazı patolojik durumlarda, leptin, iltihabi barsak hastalarının kolon mukozasında hücre yüzey reseptör sayısını artırarak, mukozal hücre proliferasyonunu stimüle eder (10).

Adipoz dokudan üretilen bu hormon, 16 kDa büyüklüğünde olup, 167 aminoasit rezidüsü içermektedir (7). LeptinR-Q223R polimorfizmi (rs1137101), leptin reseptör geninin 6.ekzon 223. başlangıç kodonunda 668. nükleotidi olan glutaminin, arjinine (CAG→CGG) dönüşmesi olarak bilinen tek nükleotid değişimidir (11). LeptinG-2548A polimorfizmi (rs7799039), leptin geninin promotor bölgesinin 5'- ucunda, 2548 nükleotidinde G → A'e tek nükleotid değişimi ifade eden polimorfizimdir (12-13).

Marie ve arkadaşları (2012) tarafından ileri sürülen bir hipoteze göre; moleküler mekanizma tam olarak açıklanamamakla birlikte, leptin aktivasyonu aracılığıyla indüklenen STAT3 sinyal kaskadı, barsak epitel hücrelerinde gerçekleşen enfeksiyon sitotoksitesine karşı hücreyel direnci artırmaktadır. Yapılan çalışmalar, LeptinR Q223R polimorfizmin, STAT3 aktivitesini yaklaşık %21 oranında azalttığını belirtmektedir. Benzer bir durum da LeptinG-2548A polimorfizminde gözlenmekte olup, leptin aracılı sinyal sisteminde disfonksiyona neden olarak, enfeksiyona karşı duyarlılığı arttırdığı yapılan çalışmalar sonucunda ifade edilmiştir (14).

İnsanlarda leptin sinyal sistemi, enerji yetersizliği durumunda hayatta kalabilmek için yeterli enerji depolarının eldesini sağlayan mekanizmaları düzenler (15). Hipotalamik nöronlarda, leptin sinyal inhibisyonunu içeren moleküler mekanizmaların tam olarak açıklığa kavuşturulması; obez bireylerin tedavisinde leptinin etkilerini artıracak, yeni ilaçların geliştirilmesi için çok önemli bir amaç teşkil etmektedir (16).

Çalışmamızda, LeptinG-2548A ve LeptinR Q223R gen varyantları ile İBH riski arasında hastalığı destekleyici veya koruyucu yönde etkilerin ortaya konulması amaçlanmaktadır. Bu sayede ortaya konulması düşünülen genotipik ilişki, hastalık patogenezindeki moleküler mekanizmaların çözülmesine ve aday terapötik çalışmalara ışık tutacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnflamatuvar Barsak Hastalığı

İnflamatuvar barsak hastalığı, immün sistem ve vücut florası arasında karmaşık bir ilişkiden kaynaklandığı düşünülen, nedeni ve mekanizması tam olarak bilinmeyen iltihabi bir hastalıktır. Beslenme ve çevre ile bağlantılı olduğu gibi, genetik ve mikrobiyal faktörlerin hastalığın patolojisinde rol oynadığı da öne sürülmektedir (1). Hastalığın ülseratif kolit ve Crohn hastalığı olmak üzere iki önemli tipi bulunmaktadır (2).

Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı, kronik, idiyopatik ve nüksedici olarak karakterize edilen bir hastalıktır (17- 18). Hastalığın ortaya çıkışı özellikle yaşamın 2. ve 3. dekattı olarak bilinir (19). Ülseratif kolit genel olarak kolon üzerine etki ederken, Crohn hastalığı kolona etki ettiği gibi, incebarsağın distal bölümü üzerine de etki gösterir (1-2). Bundan dolayı, her iki hastalığa genetik olarak yatkınlığa sahip olan bireylerde, gastrointestinal sistemde barsak epitel duvarının tahrip olması sonucu oluşan mukozal immün yanıtın farklı olduğu düşünülmektedir (20).

Crohn hastalığı patolojisi, düzensiz dağılım ve transmural inflamasyon ile karakterizedir. CH' nin teşhisinde lamina propria'da granülomanın varlığı da önem teşkil eder (21). Ülseratif Kolit patolojisi ise, sadece lamina propria'yı etkiler ve hastalıklı segment devamlılık gösterir. ÜK' de kript abselerinin ve normal kript yapısının dejenerasyonu önemli histolojik bulgulardır (2). İleal CH' de, paneth hücrelerde α defensin yapımı azalmış olup, kolonik CH' da ise enterositlerde α defensin yapımı azalmıştır (22- 23).

Daha önce yapılan çalışmalarda; bu hastalıkların insidansı incelendiğinde, Avrupa genelinde kuzey bölgesinde, güney bölgesine oranla daha sık görülmesi, bölgeler arası hastalık insidansının büyük ölçüde değişiklik gösterebileceğini ileri sürmüştür (24-25). İBH' nin etiyolojisi ve patolojik mekanizması tam olarak bilinmemekte olup, bu yöndeki çalışmalar gastroenteroloji alanına ışık tutmaktadır.

2.2. Epidemiyoloji

İnflamatuvar barsak hastalığının insidansı bulunduğu coğrafyanın özelliğine göre değişiklik göstermektedir. Amerika Birleşik Devletleri ve İngiltere başta olmak üzere,

batılı ülkelerde çok sık görülmekle birlikte, Asya, Japonya ve Güney Amerika'da daha az sıklıkta görülür (26). İBH' nın insidansı ve prevalansında artış gelişmiş ülkelerde, gelişmekte olan ülkelere göre daha çok gözlenmektedir (27). Epidemiyolojik verilere göre Amerika Birleşik Devletleri'nde İBH insidansı, ÜK için yaklaşık 2-14/100.000 vaka iken, Crohn hastalığı için ise, 3-14/100.000 vakadır (28).

Geçmiş 50 yıl sürecinde, CH insidansı 8-10 kat artmış olmakla birlikte, ÜK insidansı stabil kalmıştır (29). İnflamatuvar barsak hastalığı her yaşta görülmesine rağmen, en sık görüldüğü yaş aralığı 15-30 olarak bilinmektedir (28). Vakaların yaklaşık % 8,5' i, 18 yaşın altındaki bireyler oluşturur (30). Migrasyon çalışmalarından alınan verilere göre; değişen çevre koşulları, çocuklarda hastalığa yakalanma riskini artırmaktadır (31). Ülseratif kolit (ÜK), daha sık erkeklerde görülürken, Crohn hastalığı (CH) ise kadınlarda daha yaygındır (28).

İBH' nın görülme sıklığı, şahıs, coğrafik lokasyon ve endüstrileşme gibi etmenlere bağlı olarak farklılık göstermektedir (32-33). ÜK ve CH Askanazi Musevilerinde diğerlerine oranla, (34) beyaz popülasyonda, siyah popülasyona oranla daha sık görülür (27-35). Vakaların prevalansının giderek yayıldığı coğrafya, kuzey bölgeler olarak gözlemlenmiş olup, özellikle Kuzey Amerika ve Avrupa riskli bölgeleri teşkil etmektedir (27, 28, 36-37).

Bazı epidemiyolojik araştırmalar, İBH' nın patogeneğinde genetik faktörlerin önemli bir rol aldığını kanıtlamaktadır. İnflamatuvar barsak hastası bireylerin birinci derece akrabaları, genel popülasyona kıyasla, çok daha yüksek risk grubuna dahil olmaktadır (38). Böylece, monozigot ikizlerde Crohn hastalığına yakalanma riski %20-50 görülürken, heterozigot ikizlerde bu oran %10'dur. Ülseratif kolit hastalığında ise, monozigot ikizler %16, heterozigot ikizler % 4 risk taşımaktadır (39-40).

2.3. Etiyoloji

İnflamatuvar barsak hastalığı multifaktöryel bir hastalıktır (41). ÜK ve CH' da hastalığın patofizyolojisi tam olarak bilinmemesine rağmen, hastalığın altında yatan sebepler benzerlik göstermektedir (42). İBH' nın ortaya çıkış aşamasında birçok faktörden etkilendiği düşünülmektedir. Bu faktörler; genetik yatkınlık, çevresel özellikler, mikrobiyota ve anormal lokal immün yanıtıdır (41).

Mikrobiyota ve bazı mikrobiyota ürünleri, epitel hücre fonksiyonunu ve immün sistem gelişimini etkilemektedir (2). Mukus, barsak florasında epitel tabakayı oluşabilecek zarardan korumak amaçlı, goblet hücreler tarafından salınan savunma hücreleridir (43). Hem komensal hem de patojenik bakteriler goblet hücre fonksiyonuna etki ederek, bu hücrelerden mukus sentez ve salınımını düzenler. Ayrıca, goblet hücre ve mukus alt türlerinde görülen değişim, T lenfosit popülasyonu ile ilişkilendirilmiştir (44).

Barsak mikroflorasının dinamik yapısı, konak-mikroorganizma ilişkilerini ve sonrasında oluşabilecek fizyolojik sonuçları düzenlemekte önemli bir rol üstlenir (1). İnsanlar, % 90 mikrobiyal hücreler ve %10 insana ait hücrelerin birlikteliğinden oluşan holobiont bir organizmadan oluşmaktadır (45-46). İnsanlarda gastrointestinal (Gİ) sistem çok geniş ve karmaşık bir mikroorganizma içeriğine sahiptir. Bu çeşitlilikte büyük oranda anaerob bakterilerden oluşmak üzere, bakteriyel flora yoğunluk teşkil eder (47). Bakteriyel çeşitlilik bireysel olarak değişkenlik göstermektedir (48). Barsak içeriğindeki total bakteri sayısı, yaklaşık olarak mide ve kalınbarsakta 10^1 - 10^3 / ml, jejunum ve ileumda 10^4 - 10^8 /ml, kolonda ise 10^{10} - 10^{13} / ml olarak ifade edilmiştir (49).

Moleküler değerlendirmeler; normal mikrobiyotayı, kompozisyon ve işlevi ile ilişkili statik ve dinamik parametrelere bağlı olarak tanımlamaktadır. Bu parametreler; yoğunluk, çeşitlilik, karmaşıklık, kompozisyon, ana türler, yapı ve fonksiyonun dinamikliğidir (50).

1970' li yıllarda anaerobik kültür teknikleri kullanılarak; insan barsağında 500'den fazla farklı bakteriyel türün bulunduğu belirtilmiştir (51). Fakat sindirim sistemi mikroflorasının kültür teknikleri kullanılarak incelenmesi, birçok engele yol açmıştır (52). Bu durum, doğal komünitenin bütünlüğünün bozulup, barsak mikroplarının yaklaşık % 60-80'inin in vitro teknikler kullanılarak yetiştirilemediğini göstermektedir (53-54). Barsak mikrobiyotasının bütünlüğünü tanımlamakta kullanılan kültür ilişkili metodların gelişimi, İBH' nın patogenezinde mikrobiyotanın işlevini açığa vurmaktadır (52).

Sağlıklı ve İBH tanısı konulmuş bireylerin bakteriyel florası önemli bir farklılık göstermemektedir (55). Yetişkin bireylerin barsak mikroflorasının önemli bir bölümü olan %80'den fazlasını Bacteroidetes, Firmicutes, and Actinobacteria filumları teşkil etmektedir (56). %2'lik filum ise, daha yaygın ve korunmuştur. Bunlar;

Faecalibacterium prausnitzii, *Eubacterium rectale*, *Ruminococcus bromii*, *Alistipes putredinis*, *Subdoligranulum* sp, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides uniformis* rel, *Parabacteroides distasonis*, *Bifidobacterium longum*, ve *Dorea formicigeneran*'dır (50). İnsan ve hayvan barsak bakteri florasını oluşturan bakteri türleri arasında en önemli cinsleri bakteroid ve bifidobakteriler oluşturmaktadır (48).

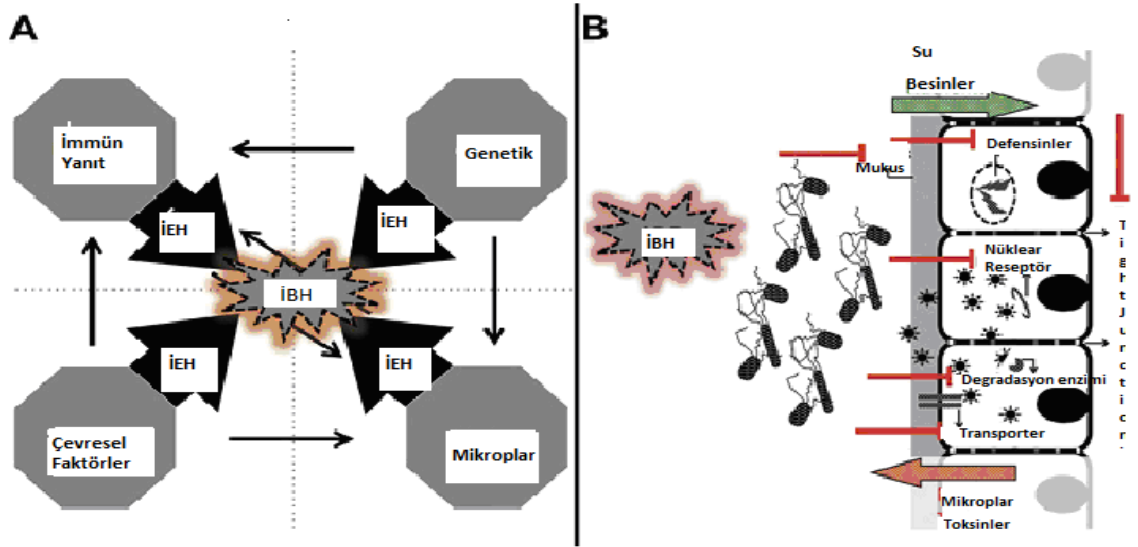
Ülseratif kolit hastası bireyin barsak mikrobiyotasında bakteriyel çeşitliliğin azaldığı, özellikle; Firmicutes filumunun anaerobik üyelerinin prevalansında azalma gözlenmektedir (57-58). Crohn hastası bireylerde de Firmicutes filumunun azalmasının yanı sıra proteobacteria filumu olan Enterobacteriaceae familyasında artış söz konusudur. Her iki hastalıkta da ortak mikrobiyal özellikler, genellikle bakteriyel çeşitliliğin azaldığı yönündedir (59, 60, 61-62). Mikroflorada baskın olarak karakterize edilen ve Firmicutes filumunun bir üyesi olan *Clostridium leptum* ve *Faecalibacterium prausnitzii* türlerinde azalma görülürken; pro-inflamatuvar mikroorganizma olarak bilinen invaziv *Escherichia coli* türünde artış görüldüğü tespit edilmiştir (63-64) Bu çalışmalar, *Clostridium leptum* ve *Faecalibacterium prausnitzii* türlerinin, hücre sistemleri ve hayvan modellerinde; anti-inflamatuvar bir özelliğe sahip olduğunu belirtmektedir (63,64-65).

Sonuç olarak; ÜK ve CH' ye ait bakteriyel profilin sağlıklı kişilerin barsak florasına oranla yaklaşık % 25 oranında daha az çeşitliliğe sahip olduğu gözlemlenmiştir. Hygiene hipotezine göre, bakteriyel ekolojideki çeşitliliğin azalması, İBH' nın gelişimine katkıda bulunabilecek faktörlerden biri olabileceği görüşü ileri sürülmüştür (1).

Normal barsak homeostasını oluşturan mikrobiyota, gen düzeyinde; insan genomundan 150 kez daha farklı gen içeriğine sahiptir (66). Bu genlerin çoğu, insan genomu tarafından kodlanan genlere tamamlayıcı işlevleri kodlar. Böylece, barsak mikrobiyata aktiviteleri; insan sağlığına yararlı olacak birçok işlevin gerçekleşmesinde rol alarak biyolojik kapasiteyi artırır (67). Bununla birlikte, mikrobiyota içeriğinde çok sayıda zararlı bileşikler ve antijenler de bulunmaktadır (68).

Barsak epitel hücreler, patojenik mikroorganizma ve konak doku arasında bir bariyer fonksiyonu oluşturarak, birçok luminal bakteri tarafından oluşabilecek mukozal penetrasyonu önler. İnvaziv bakterilerin epitel bariyeri geçerek barsak mukozasına ulaşması durumunda ise, mukozal inflamasyon oluşur ve kemotaktik mediatörlerin

salınımı söz konusudur (69-70). Dengeli bir mikrofloranın, normal barsak epitel hücre gelişimi ve homeostatik barsak mukozaya sahip olması gereklidir (71, 72-73). Barsak mikrobiyal ekosisteminin beslenme ve yaşam tarzı gibi bazı etmenlerden dolayı bozulduğu düşünülmektedir (74-75). (Şekil 2-1)



Şekil 2-1: İnflamatuvar Barsak Hastalığı patogenezinde barsak epitel hücresinin rolü (76).

2.3.1. Genetik Faktörler

Genom boyu ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) sonucunda İBH ile ilişkili, 163'den fazla genomik lokus tespit edilmiştir. Bunlardan, 90'ı CH, 73'ü ÜK ve 110'u ise her iki hastalıkta bulunmuştur (77, 78-79). ÜK ve CH, bir bölümü ortak olan genetik risk faktörleri içerir, fakat ülseratif kolit Crohn kadar kalıtsal özellik göstermez (80). Crohn hastalığında riski oluşturan genetik varyantlar, CH' nin patogenezinde fagositoz, otofaji ve doğal immünitinin önemini işaret etmektedir (81-82).

Crohn hastalığında rapor edilen en güçlü genetik ilişki, doğal immünite ile bağlantılı *CARD15/NOD-2* geni ve homeostatik mekanizmada görev alan otofaji genleri *ATG16L1* ve *IRGM*'dir (83, 84-85). Hem ülseratif kolit hem de Crohn hastalığında bulunan; *IL23R*, *IBD5*, *NKX2-3*, *BSN*, *IL12B*, *CCNY* ve *TLR4* genleri de hastalığa duyarlı lokuslardır (84-86). *CARD15/NOD2* geni, 16. kromozomda lokalize olur (87-88). Paneth hücreleri içeren barsak epitel hücreler ve monositlerden eksprese edilir ve

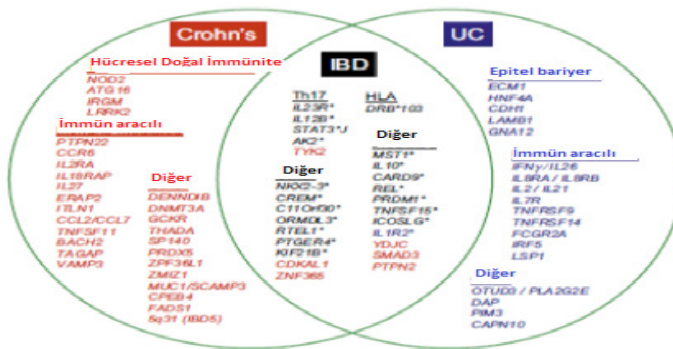
hücre içi mikrobiyal bileşikleri tespit ederek, immün yanıtın aktivasyonunu sağlar (82,89-90). Bu gende gerçekleşen mutasyonlar Crohn hastalığına karşı duyarlılığı belirtir (76).

Crohn hastalarının yaklaşık %30'unda tespit edilen *CARD15/NOD2* gen mutasyonu, nüklear faktör (*NF-kB*) olarak bilinen protein kompleksinin aktivasyonunda azalma ile karakterizedir (91-92). *DR2*, *DRB1*0103* ve *DRB1*12* allelleri ise ÜK ile pozitif ilgiye sahip olduğu rapor edilmiş ve Genom boyu ilişkilendirme çalışmalarına göre; 3, 7, 12. kromozomları ile ilişkilendirilmiştir (93-94). GWAS, çok sayıda epitel bariyer genlerinin (*ECM1*, *CDH1*, *HNF4A*, *LAMB1* ve *GNAI2*) ülseratif kolit hastalığı ile ilişkili olduğunu göstermiş olup, belirtilen bu genler Crohn hastalığı ile ilişkilendirilmemiştir (77, 95-96). Ülseratif kolit hastalığında duyarlı olan diğer spesifik genler ise; *IL7R*, *IL8RA/IL8RB*, *DAP*, *LSP1* ve *IRF5*'dir (77).

Gen-çevre ilişkisine bağlı genetik duyarlılıkta, belli besin maddeleri İBH' da risk etkeni olabilir (97). Öncelikli olarak, hastalık dağılımı ve fenotipik görünüm, etnik gruplar ve popülasyonlar arasında farklılık göstermektedir (98). Ayrıca, her genin İBH' nın gelişimine katkıda bulunması, farklı popülasyonlar arasında değişiklik gösterdiğini belirtir (99).

Yapılan birçok genetik çalışmalarda İBH'da fenotip-genotip ilişkisinin ortaya konulmadığı iddia edilmektedir (100). *IL1R2*, *REL*, *CARD9*, *NKX2.3*, *ICOSLG*, *PRDM1*, *SMAD3* ve *ORMDL3* genleri de hastalıkla ilişkili diğer duyarlı genler olarak önem teşkil etmektedir (77).

İBH ile ilişkili genler (Şekil 2-2) 'de gösterilmiştir.



Şekil 2-2: İnflamatuvar Barsak Hastalığı'nda duyarlı lokuslar (100).

2.3.2. Çevresel Faktörler

Hastalığın bir diğer etmeni olan çevresel faktörlerden sigara kullanımı ÜK' ye yakalanma riskini azaltırken, sigara içmeyenlerde risk daha fazladır. CH' da ise sigara içmek risk artırıcı bir faktör olarak bilinmektedir (101-102). Bununla birlikte, diet (103), antibiyotikler (104), steroid yapıda olmayan anti-inflamatuar ilaçlar (NSAIDs) (105) ve stress (106) gibi faktörler, direkt ya da dolaylı olarak hem immün sistem hem mikrobiyota hem de epitel mukozaya etki eder ve bu etmenlerin etkileşimi sonucunda hastalığın ortaya çıktığı bilinmektedir.

Yapılan çalışmalarda, beslenme ile ilgili öğelerin, barsak mikrobiyotasını ve homeostazını etkilediği ifade edilmektedir (107). Böylece, düşük lif içerikli gıdalar, fazla şeker, fazla miktarda hayvansal gıdaların tüketilmesi genel olarak batılılaşmış beslenme tipini sembolize eder ve İBH' ye duyarlılığı olan bireylerde tolere edilmez (108-109). Bir başka etmen olan apandisit ameliyatı, diğer faktörlerle karşılaştırıldığında CH için zayıf bir risk faktörü olarak değerlendirilebilir (99). Yapılan Meta analiz çalışmalarında, apandisit ameliyatı olan bireylerin ÜK'ye yakalanma durumu, CH' ye yakalanmasına oranla daha düşük risk taşır (110).

İnflamatuar barsak hastalığına neden olabilecek birçok faktörün açıklığa kavuşturulması için birden fazla faktörü incelemek gerekir. Bunlar; mikrobiyal değişimler, virüslerin varlığı, diet, konak DNA da küçük değişiklikler gibi faktörler olabilir. Nitekim bu faktörlerin hiçbirisi tek başına hastalığa sebep olmamaktadır (111).

2.4. Hastalığın Moleküler Mekanizmaları

Yakın zamanda gerçekleştirilen ve halen devam eden genom boyu ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), İBH ve barsak epitel hücre (IEH) fonksiyonu ile ilişkili genomda belli duyarlı lokusların sayısının arttığını ifade etmektedir (112-79). Bu zamana dek yapılan çalışmalarda, İBH ile ilişkili tüm SNP' lerin sadece küçük bir bölümü, klinik ve fonksiyonel fenotipi açıklayıcı nitelik taşımaktadır, fakat GWAS çalışmaları İEH' nin fizyolojik etkisini ortaya koymaktadır (76).

İBH sürecinde ilk aşama, bozulan barsak bariyer fonksiyonu sonucunda bakteriyel translokasyonun meydana gelmesidir. Sonrasında, bozulan barsak bariyer

fonksiyonu doğal immün sistemin baskılanmasına yol açar. Sonuç olarak, edinsel immün cevabın tetiklenmesi ile kronik inflamasyon oluşur (2).

Gastrointestinal sistemde lümene giren patojenik ajanlar ilk olarak mukozal tabakaya hareket eder. Mukozal tabakanın patojeniteye karşı oluşturmuş olduğu savunma mekanizması, patojenik ajanların gücüne ve barsak duvar içinde rol alan lokal faktörlere bağlıdır. Bu durum, immünolojik ya da immünolojik olmayan anti-inflamatuar yanıtı neden olur (113).

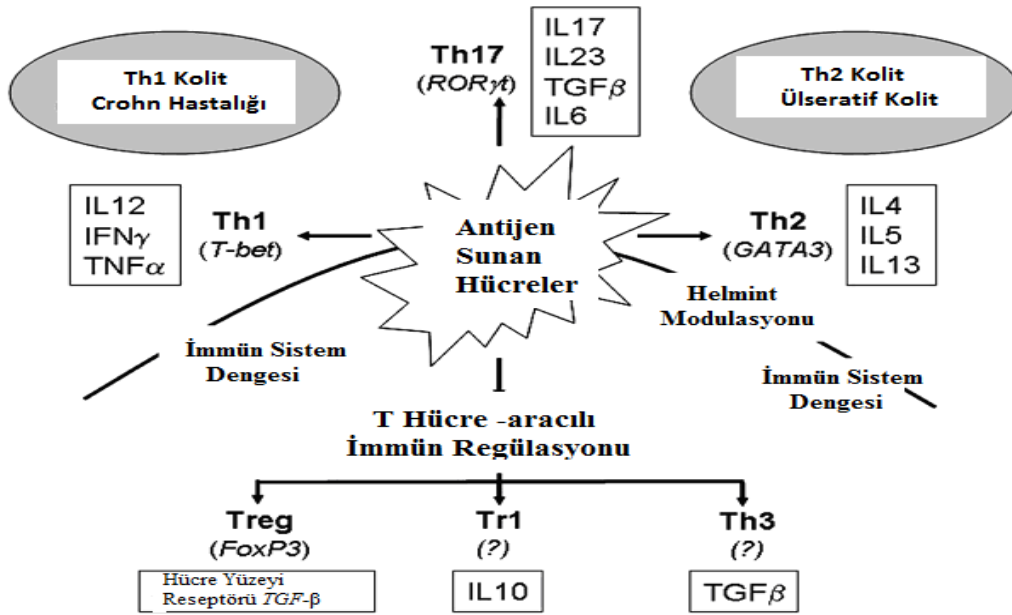
İBH' da inflamasyonu tetikleyen mekanizma tam olarak bilinmemesine rağmen, inflamatuvar yanıtı artıran medyatörlerin çoğu tanımlanmıştır. Bunlar; trombosit aktive edici faktör, biyojenik aminler, sitokinler, kemotaktik oligopeptitler, nöropeptitler ve reaktif oksijen metabolitleridir (nitrik oksit) (114-115).

İBH' da genellikle birçok cevap sitokinler aracılığıyla oluşturulmaktadır (38). Sitokinler, epitel hücre proliferasyonu ve farklılaşmayı içeren normal regülatör mekanizmada rol alarak, homeostatik dengeyi sağlar. Çeşitli sitokinler; otokrin, parakrin ve jakstakrin yolları aracılığıyla, immün mekanizma üzerine etki ederek; intestinal epitel hücre proliferasyonu, farklılaşma, fenotip ve fonksiyon gibi biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde selektif etki göstermektedir. İBH' da görülen normal sitokin ortamında oluşan dengesizlik ise, epitel hücre fonksiyonun bozulmasına neden olur (116).

CH ve ÜK' de, kolonik mukozada *IL-17*, *IL-21*, *IL-22*, *IL-23*, *ROR γ t* ve *IL23R* ekspresyonunda artış gözlenmektedir (117, 118, 119, 120, 121-122). *IL-21*, *STAT3*, *fosfo- STAT3*, *STAT4* ve *SOCS3* değerlerinde artış Crohn hastası bireylerin lamina propria hücrelerinde de görülmektedir (123-124). Bu sitokinlerin bir bölümü hastaların serum ve plazmalarında gözlenebilir (118-125). Crohn hastalarında yüksek oranda bulunan *IL-23*, *TNF α* , ve *IL-6* insan barsağında makrofaj alt ünitelerden eksprese edilmektedir (126). Fizyolojik koşullarda, *IL-23* genel olarak ince barsak mukozasında eksprese edilir (127). *IL-17* üreten hücreler ise, lenfoid yapılar ve mukozal dokularda daha fazla görülmektedir (128, 129-130). *IL-23*'ün Crohn hastalarında lamina propria mononükleer hücrelerden salınımı, sağlıklı kontrol ile karşılaştırıldığında, *IFN γ* ve *TNF α* üretiminde artış görülür ve ÜK hastaları ile karşılaştırıldığında ise; *IL-17*'de artışa neden olmaktadır (131).

İBH' da barsak inflamasyonu, doğal ve adaptif immün sistem fonksiyonu tarafından regüle edilmekte olup, adaptif immün fonksiyonu; Th1- Th17- Th2 olarak ifade edilen T lenfositleri rol almaktadır (132). *IL-17*, birçok pro-inflamatuar faktörlerin indüklenmesine neden olur ve *TNF- α* , *IL-6* ve *IL-1 β* gibi pro-inflamatuar faktörler, inflamasyonun çoğalmasında ve lokalizasyonunda önemli bir işleve sahip olduğu bilinmektedir (133-134). Bununla birlikte, Th17 hücreleri tarafından üretilen *TNF- α* ve *IL-6*, Th17 hücre gelişimini desteklediği gibi; *IL-17* ile sinerjik etki göstererek, pro-inflamatuar medyatörlerin üretimini de artırmaktadır (134). Regülatör T hücreleri CD4+CD25-Foxp3, Th 17 hücrelerinin kaynağı olarak bilinir (135). İnsan hücrelerinde *IL-1*, *IL-6* ve *IL-23* varlığında, CD4+T hücreleri farklılaşarak Th17 hücrelerine gelişir (136). İBH' da barsak doku ve serumda *IL-17*, Th17 hücreleri gibi, artmış bulunmuştur (137).

CD4 T hücre farklılaşması sonucunda gerçekleşen 4 farklı yol (Şekil 2-3)'de verilmiştir.



Şekil 2-3: İBH' da immün sistem yolları (38).

ÜK hastalığının modülatörü Th2 olarak gösterilirken, CH ile ilişkili sitokin yanıtı Th1 tarafından oluşturulur (138-139). Barsakta bulunan inflammatuar hücrelerin sayısı; hücrel iyileşme, proliferasyon, nekroz ya da apoptoz ile gerçekleşen hücre

ölümü sonucunda saptanmaktadır (18). Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler, İnflamatuar barsak hastalarında T hücrelerin apoptoza karşı direnç oluşturduğunu belirtmektedir. Direnç oluşmasını tetikleyen moleküler mekanizma, pro-apoptotik ve anti-apoptotik moleküllerin aktivitesindeki değişim sonucunda, çözünür IL-6 reseptör aracılı IL-6 trans-sinyali *BCL2* ve *BCL2L1* anti-apoptotik genleri indükleyerek apoptoza karşı T hücre direncini oluşturur (140).

IL-17 ve IL-23 ekspresyonundaki artış, anti-p40 antikolları ve steroidler ile tedavi edildikten sonra azalmaktadır (141). Bununla birlikte, İBH' da multiple T hücre yollarında bozukluk görüldüğü kanıtlanmıştır (137).

IL-6/STAT-3 yolağı İBH' da karakterize edilmektedir (142). STAT3 barsak epitel hücrelerde büyüme ve rejenerasyonu teşvik ettiği gibi, aynı zamanda anti-mikrobiyal moleküller ve inflammatuar mediyatörlerin üretiminin aktivasyonunu gerçekleştirmektedir (143-144). SOCS3, leptin sinyali inhibitörüdür. STAT3, leptin reseptörüne bağlanarak leptin sinyalini inhibe eder ve SOCS3 ekspresyonunu artırır (14). SOCS3, STAT3 regülasyonunda rol aldığı gibi, özellikle apoptozisin çeşitli oluşumlarından hücreleri korumakla görevli transkripsiyonel represördür (14-145).

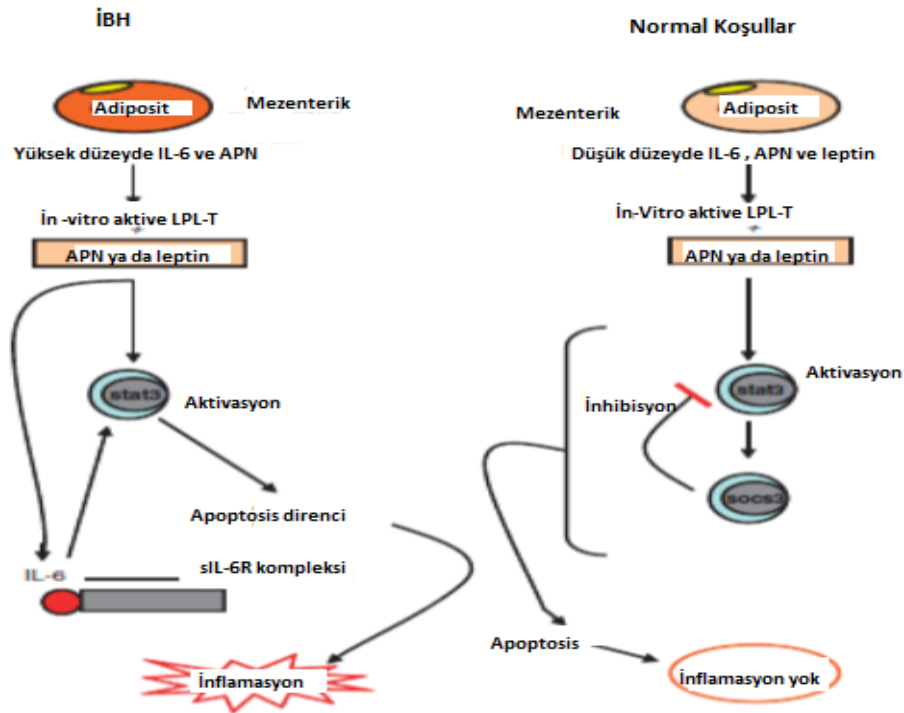
Memeli sitokin sinyali supresör (SOCS) ailesi 7 üyeden oluşmaktadır. Her üye; merkezi SH2 domeni, farklı uzunluk ve sekansta mino-terminal domen ve 40 aminoasitlik bir karboksi-terminal modülü içermektedir (2-146). SOCS3'ün SH2 domeni, protein stabilizesini artıran 35 rezidülü (prolin, glutamik asit, serine ve treonin) bir motiften oluşmaktadır (147). SOCS proteini, negatif geribildirim döngüsü oluşturarak, JAK/STAT sinyal iletimini inhibe eder. Sitokinlerin reseptöre bağlanması, JAK' ın aktivasyonuna neden olur ve aktive JAK; reseptörün sitoplazmik ucunun tirozin kalıntılarını fosforile eder (2). Böylece, STAT proteini gibi fosfo-tirozin bağlayan SH2 domenine sahip proteinler için havuzlama bölgesi oluşur (148). JAK-STAT yolağı, aktif İBH' da gerekli doku onarımı için proliferasyonu artırdığı gibi, homeostaz esnasında barsak epitel hücre proliferasyonunu sağlar (2).

Barsak epitel hücrelerde SOCS3'ün rolü, STAT3'e bağlı bazı süreçleri engellemektir. STAT3'ün barsak epitel hücrelerde en önemli görevi; inflamasyon esnasında, yara onarılırken proliferasyonun indüklenmesidir (2). STAT3 sinyalinde SOCS3'ün direkt etkisi, SOCS3'ün aşırı eksprese edildiği deri epitel hücrelerde görülür ve inflamasyonu artırarak, yara onarımını engellemektedir (149-150). Yapılan

çalışmalardan elde edilen veriler, SOCS3'ün ekspresyonu sonucunda, hiperproliferasyonla ilişkili inflamasyonun inhibe edildiği ve kolorektal kanser(KRK) riskine neden olabileceği ileri sürülmüştür (151).

Metabolik işlevler, genellikle adipoz doku tarafından üretilen medyatörler aracılığı ile regüle edilerek, kontrol edilir. 50'den fazla adipokin karakterize edilmiştir ve adipokinlerin patofizyolojik mekanizmaları; obezite, inflamatuvar durum ve uzun süreli sonuçları arasında bir bağlantı söz konusudur (152). Bazı biyolojik moleküller, hücre içi metabolik yolların kontrolünde önemli rol oynamaktadır. Bunlardan biri olan leptin, adiposit kaynaklıdır ve hormon, metabolizma ve immün hücre toleransı arasında köprü görevi üstlenmektedir (153).

Normal mukozaya sahip barsak hücre fonksiyonu ile aktif İBH'sı bireyin barsak hücre fonksiyonunda rol alan adipokinlerin işlevi (Şekil 2-4)'de gösterilmiştir.



Şekil 2-4: İnflamatuar Barsak Hastalığı'nda adipokinlerin rolü (154).

2.5. Leptin

Beyaz adipoz doku heterojen yapıya sahiptir. Bu durum, dokularda bulunan hücrelerin çeşitliliği ve her bireyin vücut yağ deposu içeriğine bağlı olarak, adipoz dokunun farklılık gösterdiğini ifade etmektedir (155). Lokal (parakrin/otokrin) ve sistemik (endokrin) düzeyde işleve sahip olan adipoz doku, adipositler olarak bilinen çeşitli biyoaktif proteinlerin salınımı ve üretiminden sorumludur (156).

Leptin, 167 aminoasit içeriğine sahip, sitokin benzeri bir peptittir (15, 157). 1994 yılında Zhang ve arkadaşları tarafından tespit edilmiştir ve özellikle adipositler tarafından salgılanmaktadır (15). Leptin, çoğunlukla adipoz doku tarafından üretilmiş olmasına rağmen, son zamanlarda çeşitli dokularda (mide, plasenta, göğüs, tükürük bezi, kolon ve karaciğer) da leptin ekspresyonu keşfedilmiştir (158, 159)

16-kDa büyüklüğündeki hormon “ob” geni tarafından kodlanır (15). 4 anti paralel α -sarmal demet motifi içeren üç boyutlu bir yapı teşkil eder (160). Leptinin C terminalinde bulunan iki sistein rezidüsü (Cys96 ve Cys146) arasında kalan disülfid bağı ve döngülerden birinin başlangıcının reseptör bağlanması, yapının katlanmasında önemli bir rol aldığını belirtmektedir. Sistein rezidülerinden birinde oluşabilecek bir mutasyon, molekülün inaktivasyonuna neden olmaktadır (157,161- 162).

Çeşitli fare modelleri üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, leptin ile ilgili olarak, hipotalamusta bulunan spesifik reseptörlere etki ederek, besin alımı ve enerji tüketiminin regülasyonunda rol aldığı ifade edilmiştir (163). Leptin düzeyi, fiziksel aktivitede olduğu gibi, vücut hacmindeki değişime bağlı olarak farklılık göstermekte olup, obez ve normal ağırlıktaki bireyler incelendiğinde; obez bireylerin serum leptin konsantrasyonu, normal ağırlıktaki bireyler ile kıyaslandığında oldukça yüksek değere sahip olduğu gözlemlenmiştir (164-165). Serum leptin düzeyi, adipoz dokuda enerji rezervlerini ifade etmektedir. Vücut yağ oranına ile ilişkilendirilmiş olup, (166) obez bireylerde bu değerde artış gözlenirken, kilo kaybı ile azaldığı bilinmektedir (167).

Leptin düzeyi açlığa yanıt olarak hızlı bir düşüş gösterir (168). Bu nedenle, yüksek düzeyde leptin, yeterli enerji rezervlerini belirtmektedir, oysa düşük leptin düzeyi enerji eksikliğini ifade eder ve fizyolojik süreçler ve farklı sistemlere enerjik rezervler bölüştürülmelidir (169).

Yeterli leptin düzeyi, besin alımını önleyerek; üreme, büyüme gibi süreçlerde enerji tüketimine izin verir. Leptin ekspresyonu; otonom sinir sistemi, immün sistem ve endokrin sistemin diğer unsurları tarafından düzenlenir (170). Aksi takdirde, leptin eksikliği iştahı artırarak, bu olaylarda enerji tüketimini inhibe eder (171, 172-173). Leptinin en önemli fizyolojik özelliklerinden biri açlık-beslenme davranışının kontrol edilmesidir (15). Açlık; leptin mRNA düzeyini azaltırken, beslenme durumunda ise artmaktadır (174). Leptin sentezinin regülasyonu, genellikle mRNA translasyon düzeyinde; insülin ve diğer enerji bağımlı mTOR yolağı etkisinde olduğu bilinmektedir (175). Bu yüzden, leptin sirkülasyon düzeyi ve sekresyonunda günlük ritimde küçük değişiklikler olmasına rağmen, leptin sirkülasyonu; leptin mRNA translasyon ve transkripsiyonunun oranına bağlı olarak değişim göstermektedir (176).

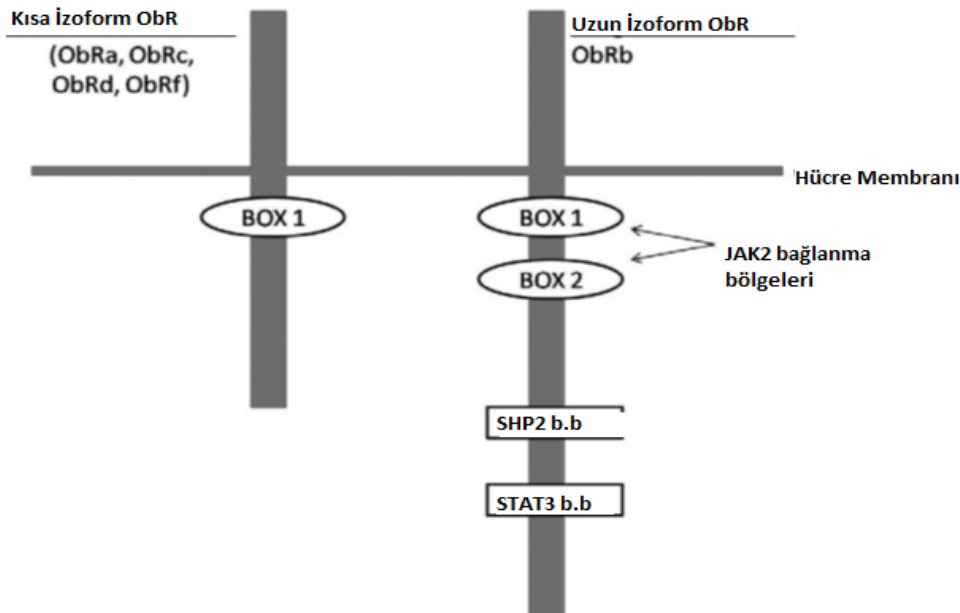
Leptin, anoreksijenik faktörler olarak bilinen, kokain ve amfetaminle regüle edilen transkript (CART) ve proopimelanokortin (POMC) hormonunun ekspresyonunu indükler ve oreksijenik nöropeptitler olan, nöropeptit Y(NPY), Agouti gen ilgili peptid (AGRP) ve orexin hormonunun inhibisyonunda rol almaktadır (177).

Multifonksiyonel hormon olarak bilinen leptin, vücut ağırlığı homeostazının düzenlenmesinde görev almasının yanı sıra, aynı zamanda nöroendokrin fonksiyon, fertilite, immün fonksiyon ve anjiogenesizde de rol almaktadır (178).

İnsanlarda, leptin salınımı pulsatil bir sirkülasyon göstermektedir. Leptin konsantrasyonu günlük bir ritme sahiptir (179). Uyku paternlerinden etkilenen leptin (180-181), gece yarısı ve sabahın erken saatleri arasında en yüksek düzeyde iken, öğleden sonra ve sabah saatleri arasında en düşük düzeydedir (182, 183-184). Leptin paterni, obez ve zayıf bireylerde benzerlik gösterse de, obez bireylerin daha fazla yağ oranına sahip olmasından dolayı daha yüksek leptin konsantrasyonuna sahiptir (165, 182, 183, 184, 185-186). Ayrıca, aynı yaş ve vücut ağırlık indeksine sahip bireyler incelendiğinde, kadınlarda leptin konsantrasyonunun erkeklerden daha fazla oranda olduğu bulunmuştur (187). Kadınlarda menstrual siklusun luteal fazında daha yüksek olabilir; fakat menapozda leptin sirkülasyonunda azalma görüldüğü belirtilmiştir (188, 189,190-191). İleri düzeyde açlık durumunda, kilo kaybından önce leptin konsantrasyonunda hızlı bir azalmaya neden olduğu bilinmektedir ve böylece, adaptif mekanizma tetiklenerek, enerji korunmuş olur (192-193).

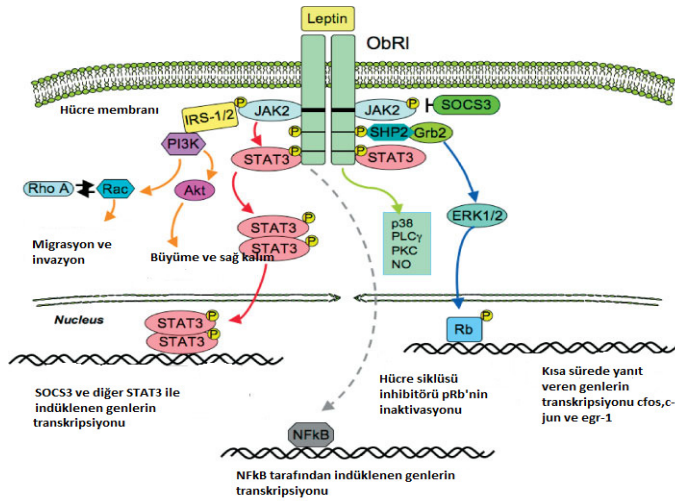
Leptin ile reseptörü arasındaki uyumun tespiti, 1995 yılında Tartaglia ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen eksprese klon stratejisi yöntemi sonucunda elde edilmiştir (194). Diyabet geni (db) tarafından kodlanan leptin reseptörü, ilk defa fare koroid pleksusundan izole edilmiştir (194-195). Leptin, periferel dokular ve merkezi sinir sisteminde lokalize, en az 6 reseptör (ObRa, ObRb, ObRc, ObRd, ObRe ve ObRf) izoformu içeren leptin reseptörlerine bağlanır (196-197).

Leptin, sınıf 1 sitokin reseptör ailesine aittir (198). Leptin reseptörleri membran boyunca yayılan glikoproteinlerdir (199). Bu reseptörler homolog domenlere sahiptir; fakat alternatif mRNA”splicing” işleminden dolayı, her reseptör farklı sekans ve uzunluğa sahiptir (195-197). Kısa izoformlar olan ObRa and ObRc’nın, kan-beyin bariyerini geçerek leptin iletiminde görev aldığı düşünülmektedir (200-201). Merkezi sinir sisteminden eksprese edilen ObRb; aktif reseptör olarak bilinen uzun izoformdur ve leptin sinyalinden sorumludur (195,197-200). ObRb, özellikle hipotalamusta; nöroendokrin ve enerji homeostazı regülasyonunda önemli işleve sahiptir (196,202,-203). Reseptör bağlanması durumunda farklı sinyal yollarının aktivasyonu indüklenmektedir (204). (Şekil 2-5)



Şekil 2-5: Leptin reseptör yapısı (204).

Leptin, üç farklı sinyal yolağı aracılığıyla etkisini gösterir. Bu yolaklar; JAK-STAT, PI3K ve MAPK'dir (205). Leptinin, leptin reseptörüne bağlanmasının ardından JAK2, oto ve çapraz fosforilasyon ile aktive edilir. Aktive JAK2, leptin reseptörünün hücre içi domenini tirozin kalıntılarından fosforiller. Fosforile reseptör, STAT faktöründe bağlanma bölgeleri oluşturur. Bu bağlanma bölgeleri özellikle JAK2' nin substratı olan STAT3 için sağlanır. STAT3, fosforillenerek homodimer ya da heterodimer oluşturmak üzere nükleusa iletilir ve sitokin ile ilişkili genlerin transkripsiyonunun modülasyonunda görev alır (206-207). (Şekil 2-6)



Şekil 2-6: Leptin reseptör sinyal yolakları (207).

Leptin sinyalini major sinyal formu olan JAK/STAT sinyal yolağı aracılığıyla gerçekleştirmesinin yanı sıra, leptin tarafından aktive edilen birtakım hücre içi sinyal yolağı bulunmaktadır (208). Bunlar; mitojen aktive eden protein kinaz (MAPK), (200-209) fosfotidilinozitol 3-kinaz (PI 3-kinaz)/Akt, (210) SH2-B (211) ve IRS-1'dir (212).

İleri çalışmalar, immün fonksiyonların modülasyonunda leptinin çok geniş bir yelpazede rol aldığını göstermektedir. Leptin fagositik aktivasyonu gerçekleştirerek (213) eikosanoidlerin sentezini uyardığı gibi, (214) makrofaj ve monositlerde; nitrik oksit ve bazı pro-inflamatuar sitokinlerin salgılanmasını da uyarır. Murin makrofajlarda, IFN-gamma artışı ile birlikte; nitrik oksit sentaz ekspresyonunu uyarır (215). Ayrıca,

kemotaksisi uyararak, nötrofillerde reaktif oksijen türlerini açığa çıkarır (216-217). Bununla birlikte, doğal katil hücrelerde; sitotoksiste, aktivasyon, farklılaşma ve proliferasyonu etkilediği belirtilmiştir (218).

Leptin adaptif immün yanıtın modülasyonunda da rol almaktadır. Sitokin üretimine bağlı Th1 ve Th2 immün yanıtları olarak sınıflandırılmaktadır. Th1 lenfositleri, hücre aracılı yanıt ve makrofaj aktivasyonunda gerekli pro-inflamatuar sitokinlerin üretiminden sorumludur. Th2 lenfositleri ise, bazofiller ve B hücrelerin aktivasyonunda önem taşıyan modülatör ve anti-inflamatuar peptitlerin salgılanmasında rol almaktadır (199).

İnflamatuar hastalıklar; sitokinler, enerji ve kilo kaybı ile ilişkili olmasına rağmen, hastalığın mekanizması tam olarak açıklığa kavuşmamıştır (219). İnflamasyon, çevresel ve immün etmenlerin etkileşimi sonucunda ortaya çıktığı bilinen bir durumdur (220). Barsak epitel hücreler, çok çeşitli pro-inflamatuar sitokinlerin (Tümör nekroz faktör (TNF- α), İnterlökin-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-8, Hücre içi adhezyon molekülü, Monosit kemoatraktan protein-1, Dönüştürücü büyüme faktörü (TGF- β) ve IL-15) salgılanması ve ekspresyonu ile barsak inflamasyonu gelişimine katkıda bulunabilir (221-222).

2.5.1. Gastrointestinal Sistemde Leptinin Etkisi

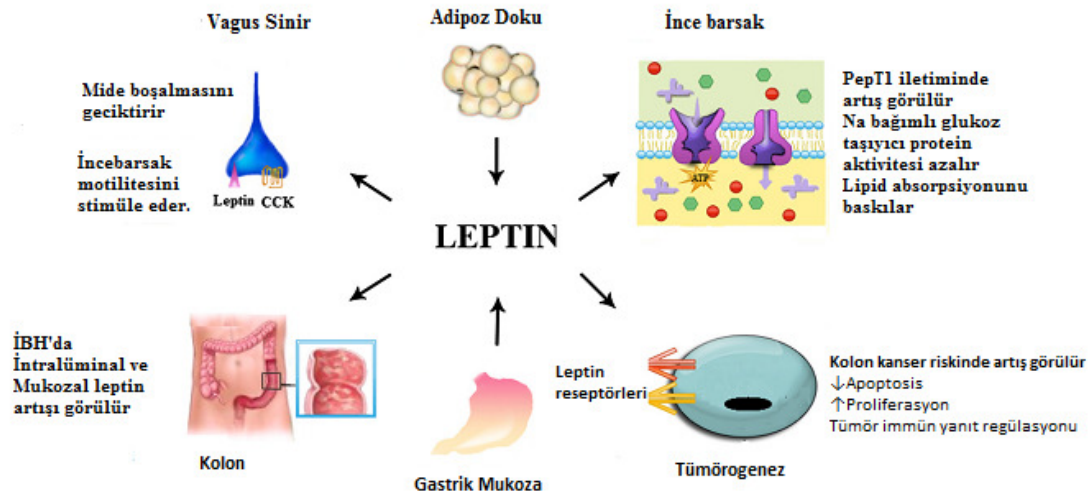
Leptin, gastro-intestinal sistemde birçok işleve sahiptir (223). Gastrik mukozada bulunan ana hücreler tarafından salgılanan leptin ve leptin reseptörünün çözülebilir izoformu, midede değişmemekle birlikte, onikiparmak barsağına proteine bağlı veya serbest olmak üzere iki şekilde ulaşır. Gastro-intestinal sistemde özellikle barsağın proksimal bölümünde birçok leptin reseptörü bulunmaktadır. Bu reseptörler, barsak hücrelerin bazolateral ve luminal yüzeyinde bulunduğu bilinmektedir (224).

Yapılan çalışmalar, leptinin Gİ sistemde tropik faktör olarak rol aldığını ve dışardan verildiğinde barsak hücre proliferasyonunu teşvik edebileceğini göstermiştir (225-226).

Bazı araştırmalar sonucunda, kolonik epitel hücrelerde leptinin bütirik asit tuzu iletimini artırdığı gözlenmiştir (227). Bütirik asit tuzu, glukoz ve glutamin ile karşılaştırıldığında önemli bir barsak yakıtı olarak bilinir. Kolon epitel hücrelerde enerji

kaynağı olarak bilinen işlevinin yanı sıra, hücresel proliferasyon, farklılaşma ve apoptozis süreçlerinde de görev almaktadır (220).

İnsanlarda PepT1 proteinin, inflamatuvar barsak hastalığında bir role sahip olduğu ileri sürülmektedir (228-229). Leptin, hPepT1 promotor aktivitesini artırır ve böylece barsakta hPepT1 mRNA ve protein ekspresyonu artışı söz konusudur (230). İltihaplı kolonik epitel hücrelere sahip ülseratif kolit hastalarında, büyük miktarda leptin ekspresyonu gözlenir ve barsak lümenine salınmaktadır. Böylece, epitel duvar hasarı ve nötrofil infiltrasyonu uyarılmış olur (220). (Şekil 2-7)



Şekil 2-7: Gastrointestinal sistemde leptinin etkileri (10).

Lüminal leptinin, kolonda musin salgılayan goblet hücrelerini aktive ettiği gösterilmiştir (231-232). Musin, kolonik savunma mekanizmasında rol aldığı gibi, epitel hücrelerde oluşabilecek fiziksel, mikrobiyal ve kimyasal hasarların önlenmesi ile ilgili süreçlerde de görev almaktadır. Bu tespitlerde, intestinal inflamasyon esnasında leptin salgılanması ile inflamasyona yanıt olarak adaptif yanıt oluşumuna neden olabilir (10).

Ayrıca leptin, fosfatidilinozitol 3-kinaz, rho ve rac bağımlı kaskadların aracılık ettiği kolonik ve renal epitel hücrelere yayılmasını desteklediği gösterilmiştir (233).

2.5.2. LeptinG-2548A ve LeptinR Q223R

Leptin geni 7q31.3 kromozomunda lokalize olmuştur (234). LeptinR Q223R polimorfizmi (rs1137101), leptin reseptör geninin 6. ekzon 223. başlangıç kodonunda 668. nükleotidi olan glutaminin, arjinine (CAG→CGG) dönüşmesi olarak bilinen tek nükleotid değişimidir (11). Kahverengi ve beyaz adipositlerde leptinin etkisi incelenmiş ve araştırmalar sonucunda leptinin gen ekspresyonu ve metabolizmada direkt etki göstererek önemli bir işleve sahip olduğu gösterilmiştir (235). LeptinG-2548A polimorfizmi ise (rs7799039), leptin geninin promotor bölgesinin 5'- ucunda, 2548 nükleotidinde G → A'e tek nükleotid değişimi ifade eden polimorfizmdir (12-13).

Leptin geninde görülen LeptinG-2548A polimorfizmi (rs7799039), laboratuvar koşullarında leptin salgılanması ve nüklear bir protein ile kompleks oluşumunu uyardığı sonucuna varılmıştır (13). Sitokin reseptör ailesinin bir üyesi olan leptin reseptörü, 1p31 kromozomunda lokalize olmuştur, (236) ve serum leptin bağlama aktivitesini etkilediği gösterilmiştir (237). İnflamatuvar barsak hastalığında, kolorektal kanser riski açısından adipokinlerde tek nükleotid polimorfizmin etkileri incelenmiştir (238).

LeptinR Q223R polimorfizminde, allel genotiplerin fonksiyonel önemi tam olarak bilinmemesine rağmen, istatistiksel modeller ya da yapılan analizler; farklı ırklar arasındaki allel frekanslarının çeşitlilik gösterdiğini ifade etmektedir (239,240-241). LeptinR Q223R polimorfizminin obezite ile ilişkilendirildiği ileri sürülmektedir (242). Tek aminoasit değişiminde nötralden pozitif değişim reseptör işlevselliğini etkilediği gibi; sinyal kapasitesini de etkilemektedir (241, 243, 244).

Leptin ve leptin reseptör gen polimorfizimleri; leptin düzeyi, obezite ve kanser ile ilişkili bağlantılar çalışılmıştır (245-246). Yapılan bir çalışmada, leptin geninde leptinG-2548A polimorfizminde (rs7799039), A aleline sahip bir kişi, yüksek düzeyde leptin reseptör ekspresyonuna sahip olduğu gibi, prostat kanser riski ile de ilişkilendirilmiştir (247-248). Leptin reseptör geninin (rs1137101), LeptinR Q223R polimorfizminin A alleli bireyinde ise, leptinin reseptörüne bağlanma aktivitesi düşük düzeyde olduğu gösterilmiştir (248).

LeptinR Q223R ya da LeptinG-2548A allellerini taşıyan vakalarda, yüksek gen ekspresyonu ve artmış leptin sirkülasyon düzeyi rapor edilmiştir (242-249). LeptinG-2548A polimorfizminin A alleli, LeptinG-2548A polimorfizminin G alleli ile karşılaştırıldığında, adipositlerden 2 kat daha fazla leptin sekresyonu ile

ilişkilendirilmiştir (13). Yapılan çalışmalar sonucunda, yüksek serum leptin düzeyi ve adipositlerde leptinin aşırı ekspresyonuna, göğüs kanseri gelişimi ve agresifliğinde rastlandığı hipotezi ileri sürülmüştür (250).

Kolon kanserinde leptinin olası etkileri, inflamasyonla ilişkili yolları kapsamaktadır (245). Adipoz doku hücre kültürü çalışmaları sonucunda, prostoglandin E2' nin leptin sekresyonunu stimüle ettiği gösterilmiş olup ve leptin üretimindeki artış da COX2 inhibitörleri tarafından önlenmiştir (251). Leptin; insülin, enerji dengesi ve inflamasyondaki işlevlerinden dolayı, kolorektal kanserde önemli bir rol almaktadır (245).

Birçok klinik çalışmada serum leptin düzeyi ve kanser riski arasındaki ilişki hedef alınmıştır (252-253). Epidemiyolojik değerlendirmelere göre vücut kitle indeksi artan hastalarda, gastrik kanserden dolayı ölüm oranında önemli bir artış gözlemlenmiştir (254). Leptin reseptör gen mutasyonu, anormal mRNA “splicing” oluşumuna neden olarak, sinyal iletiminde anormalliğe neden olduğu bilinmektedir (163-197). Cieslak ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, AA (LeptinG-2548A) genotipinde serum leptin konsantrasyonunda olduğu gibi, mRNA düzeyi de en düşük değer olarak gözlenmiştir (255).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Seçilen Örneklerin Tanımı

Çalışmamız için kullandığımız hasta ve kontrol örnekleri Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesi Gastroenteroloji kliniği tarafından takip edilen ve ülseratif kolit ve Crohn hastalığı tanılı 85 hasta (36 kadın ve 49 erkek) ve inflamatuvar barsak hastalığı tanısı konulmamış 69 kontrol grubundan oluşmaktadır. Ayrıca, çalışmada kullanılan örnekler için Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu tarafından, 2807 sayılı ve 19.02.2013 tarihli etik kurul onayı alınmış olup, Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu tarafından, 141 sayılı ve 22.09.2011 tarihli Uzman Dr. Resul Kahraman'ın "İnflamatuvar Barsak Hastalık Gelişimi Üzerine Genetik ve Çevresel Faktörlerin Etkileşim Mekanizmalarının İncelenmesi" uzmanlık tezi için vakalardan ekstrakte edilen DNA materyalleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu hastalar için çalışmaya alınma ve çalışmadan çıkarılma kriterleri şunlardır:

Tablo 3-1: Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri

1	Ülseratif kolit hastalığı ve Crohn hastalığı tanısı almış olmak
2	Hastanın anamnez bilgilerinin erişilebilir olması
3	Çalışma yaş aralığına dahil olması (18-68)
4	Ülseratif kolit hastalığı ve Crohn hastalığı patogenezini direkt ve indirekt şekilde etkileyebilecek faktörlerin olmaması

Tablo 3-2: Çalışmadan Dışlanma Kriterleri

1	Gönüllü dahil edilme kriterlerine uymama
---	--

Tablo 3-3: Kullanılan Kimyasallar

1-	Agaroz
2-	dNTP seti
3-	Etidium bromür
4-	Taq DNA polimeraz
5-	Gliserol
6-	Potasyum hidroksit
7-	DNA size marker (50bp DNA ladder,100 bp DNA ladder plus)
8-	Restriksiyon enzimleri ile LeptinG-2548A ve LeptinR-Q223R gen varyasyonlarına özgü primerler
9-	Etidyum bromür (10mg/dl)
10-	Agaroz jel yükleme tamponu (5x)
11-	1x tris- borik asit -etilen diamin tetra asetat (TBE)

Kullanılan Primerler

Leptin geninde 242 G>A ve Leptin reseptöründe 80 A>G polimorfizmini içerdiği bilinen hedef diziler spesifik primerler kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltıldı. LeptinG-2548A için promotor bölgesi ileri; (5'TTCCTGTAATTTTCCCGTGAG-3') ve geri primerler; (5'AAAGCAAAGACAGGCATAAAAA-3') ile çoğaltıldı. LeptinR Q223R için promotor bölgesi ileri; (5'-AACTCAACGACACTCTCCTT-3') ve geri primerler; (5'-TGAAGTACATTAGAGGTGAC-3') ile çoğaltıldı.

Tablo 3-4: Kullanılan Gereçler

-
- 1- Elektroforez için güç kaynağı (E-C apparatus corporation)
 - 2- Hassas terazi (Mettler)
 - 3- Polaroid camera (DS34 direct screen instant camera)
 - 4- Mikrodalga fırın (philco)
 - 5- PZR aleti (Veriti 96 well Thermal Cyclor)
 - 6- Pipet takımı (Eppendorf)
 - 7- UV trasilluminator (Stratagene UV/ White light Trasilluminator)
 - 8- Vorteks (Nuve mix)
 - 9- Elektroforez sistemi (E-C 350 MİDİCELL)
 - 10- Etuv
 - 11- Otoklav
-

Tablo 3-5: Agaroz Jel Elektroforezi'nde Kullanılan Çözeltiler

-
- 1 Etidyum Bromür (10 mg/ml)
 - 2 Agaroz jel Yükleme Tamponu (5x)
 - 3 50X Tris-Asetik asit-Etilen Diamin Tetra Asetat (TAE) Tamponu
 - 4 5X Tris Borik asit-Etilen Diamin Tetra Asetat (TBE) Tamponu
-

3.2. KULLANILAN YÖNTEMLER

3.2.1. Serum Leptin Düzeylerinin Tespiti

Serum leptin Düzeyleri Leptin-EASIA Kap2281, (DIAsource ImmunoAssays S.A. Belgium) ELISA kiti ile çalışılmıştır. Sonuçlar ng/ml olarak verilmiştir.

3.2.2. İnsülin Direncinin Değerlendirilmesi

Hasta ve kontrol grubunda bir defaya mahsus olmak üzere insülin direnci hesaplandı. İnsülin direncinin değerlendirilmesinde 1985’de Matthews (256) ve arkadaşlarının geliştirdiği HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment Insulin Resistance) indeksi kullanıldı. Laboratuvarımızda ölçülen glukoz ve birimi mg/dl, insülin birimi ise mU/L idi. Buna göre kullanılan HOMA-IR formülleri

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{Açlık plazma glukozu (mmol/L)} \times \text{Açlık plazma insülin (mU/L)}}{25}$$

25

3.2.3. PZR Yöntemi İle Gen Bölgelerinin Çoğaltılması :

3.2.3.1. Leptin Promotor Bölgesinin 5’ ucunda G>A (rs 7799039) Gen varyantının Tespiti

Genomik DNA örneklerinde LeptinG-2548A gen lokusuna ait alleller polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmıştır. DNA örneklerinin herbirinin çoğaltılması için toplam 25 µl’lik PZR karışımı hazırlanmıştır. Bu PZR karışımı 2 µl DNA, herbir leptin primerden 0,5µl, 1,5µl dNTP, 1,9µl MgCl₂ ve 0,4µl Taq DNA Polimeraz olmak üzere toplam volüm 25µl olacak şekilde reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Çoğaltma reaksiyonları Thermal Cycler’da gerçekleştirildi.

3.2.3.2. Ekzon 6’da görülen A>G (rs 1137101) Gen Varyantının Tespiti

Genomik DNA örneklerinde LeptinR-Q223R gen lokusuna ait alleller polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmıştır. DNA örneklerinin herbirinin çoğaltılması için toplam 25 µl’lik PZR karışımı hazırlanmıştır. Bu PZR karışımı 2 µl DNA, herbir primerden 0,5µl, 1,5µl dNTP, 2µl MgCl₂ ve 0,5µl Taq DNA Polimeraz olacak şekilde hazırlanmıştır. Çoğaltma reaksiyonları Thermal Cycler’da gerçekleştirildi.

Tablo 3-6: LeptinG-2548A Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Enzim ve Kimyasal Maddeler:

Malzemeler	İlk konsantrasyon	Son konsantrasyon	Kullanılan hacim
PCR Tamponu	10X	1X	2,5 µl
dNTP	1mM	1000 µl	1,5 µl
İleri primer	100 pmol/µl	4 pmol/µl	0,5 µl
Geri primer	100 pmol/µl	4 pmol/µl	0,5 µl
MgCl ₂	25 mM	1ml	1,9 µl
Taq polimeraz	5 U/ µl	1U	0,4 µl
Distile su			15,7 µl
DNA		150-200 ng	2 µl
TOTAL			25µl

Tablo 3-7: LeptinR Q223R Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Enzim ve Kimyasal Maddeler:

Malzemeler	İlk konsantrasyon	Son konsantrasyon	Kullanılan hacim
PCR Tamponu	10X	1X	2,5 µl
dNTP	1 mM	1000 µl	1,5 µl
İleri primer	100 pmol/µl	4 pmol/µl	0,5 µl
Geri primer	100 pmol/µl	4 pmol/µl	0,5 µl
MgCl ₂	25 mM	1 ml	2 µl
Taq polimeraz	5 U/µl	1 U	0,5 µl
Distile su			15,5 µl
DNA		150-200 ng	2 µl
TOTAL			25µl

Tablo 3-8: LeptinG-2548A Polimorfizmine ait Amplifikasyon(çoğaltma) Şartları

94 °C	5 Dakika	
94 °C	45 Saniye	} 35 döngü
53 °C	45 Saniye	
72 °C	45 Saniye	
72 °C	7 Dakika	

PZR ürünleri HhaI ile kesilmiş ve % 3'lük agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuştur.

Tablo 3-9: LeptinR Q223R Polimorfizmine ait Amplifikasyon(çoğaltma) Şartları

94 °C	5 Dakika	
94 °C	45 Saniye	} 35 döngü
53 °C	45 Saniye	
72 °C	45 Saniye	
72 °C	7 Dakika	

PZR ürünleri MspI ile kesilmiş ve % 5'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuştur.

3.2.4. Elektroforez Koşulları

3.2.4.1. % 3'lük Agaroz Jel Hazırlanması

6 gr agaroz, 200ml hacminde 1X TBE tamponu içinde suspense edildi. Hazırlanan karışım kaynatılıp soğutulduktan sonra uygun ısıya ulaşınca, agaroz jel içine 4 µl etidyum bromür eklendi. Hazırlanan agaroz jele, hasta ve kontrole ait pcr ürünleri, yükleme tampon ve işaretleyici(marker) ile yüklendi. Jel, 500 miliamper'de 30 dakika elektroforez edildi.

3.2.4.2. % 5'lük Agaroz Jel Hazırlanması

10 gr agaroz, 200 ml hacminde 1X TBE tamponu içinde suspense edildi. Hazırlanan karışım kaynatılıp soğutulduktan sonra uygun ısıya ulaşınca, agaroz jel içine 4 µl etidyum bromür eklendi. Hazırlanan agaroz jele, hasta ve kontrole ait pcr ürünleri, yükleme tampon ve marker ile yüklendi. Jel, 500 miliamper'de 45 dakika elektroforez edildi.

3.2.4.3. PZR Ürünlerinin Kontrolü

Elektroforez sonrası agaroz jel UV absorpsiyon cihazı tarafından hasta ve kontrol gubu açısından analiz edildi. PCR reaksiyonları sonucu LeptinG-2548A geninden 242 bp ve LeptinR Q223R geninden 80 bp'lık bir ürün elde edildi.

3.2.5. LeptinG-2548A ve LeptinR Q223R Gen Bölgesinin RFLP Yöntemi ile Polimorfizm Analizi

Tablo 3-10: Uygun Restriksiyon Şartları

Varyasyon	Restriksiyon enzimi	İnkübasyon süresi	İnkübasyon ısısı
LeptinG-2548A	HhaI	12 saat	37°C
LeptinR-Q223R	MspI	12 saat	37°C

Tablo 3-11: HhaI enzimi için Kesim Protokolü

Kimyasallar	Miktar
PZR ürünü	6 µl
Distile Su	4,5 µl.
10X Buffer	0,6 µl
Enzim: HhaI	0,35 µl

Tablo 3-12: MspI enzimi için Kesim Protokolü

Kimyasallar	Miktar
PZR ürünü	6,5 µl .
Distile Su	9 µl .
10X Buffer	0,4 µl .
Enzim: MspI	0,3 µl .

3.2.5.1. HhaI Enzimi Kesim Ürünlerinin Kontrolü

HhaI enzimi kesim ürünlerinin kontrolü için %3'lük agaroz jel hazırlanmıştır. HhaI kesim enzimi ile kesilen PZR ürününden 10 µl ve yükleme tamponundan 1 µl alınarak karıştırılmıştır ve %3'lük agaroz jel'deki kuyulara yükleme yapılmıştır. Kesim ürünleri (Fermantas 50 bp gene roller) DNA moleküler marker ile birlikte yürütüldü ve yürütme sonrası jel üzerindeki bantlar, UV ışık altında incelendi.

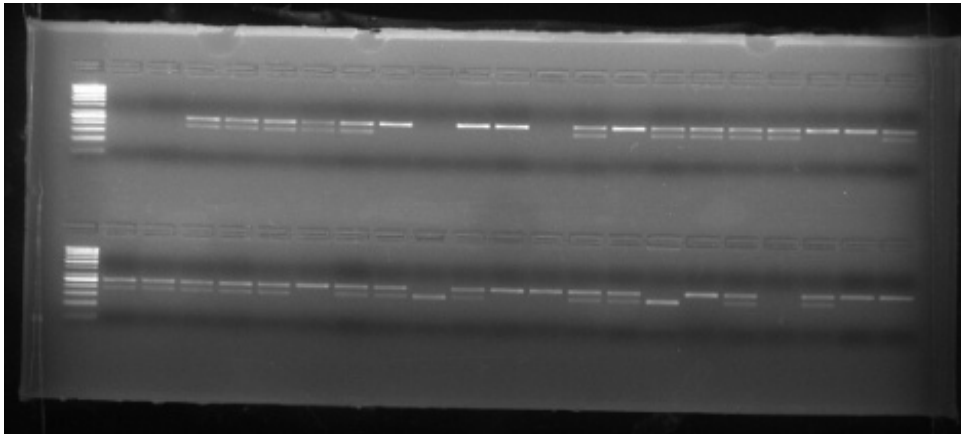
3.2.5.2. MspI Enzimi Kesim Ürünlerinin Kontrolü

MspI enzimi kesim ürünlerinin kontrolü için %5'lik agaroz jel hazırlanmıştır. MspI kesim enzimi ile kesilen PZR ürününden 10 µl ve yükleme tamponundan 1 µl

alınarak karıştırılmıştır ve %5'lik agaroz jel'deki kuyulara yükleme yapılmıştır. Kesim ürünleri (Fermantas 50 bp gene roller) DNA moleküler marker ile birlikte yürütüldü ve yürütme sonrası jel üzerindeki bantlar, UV ışık altında incelendi.

3.2.5.3. HhaI Enzimi Kesim Sonuçlarının Değerlendirilmesi

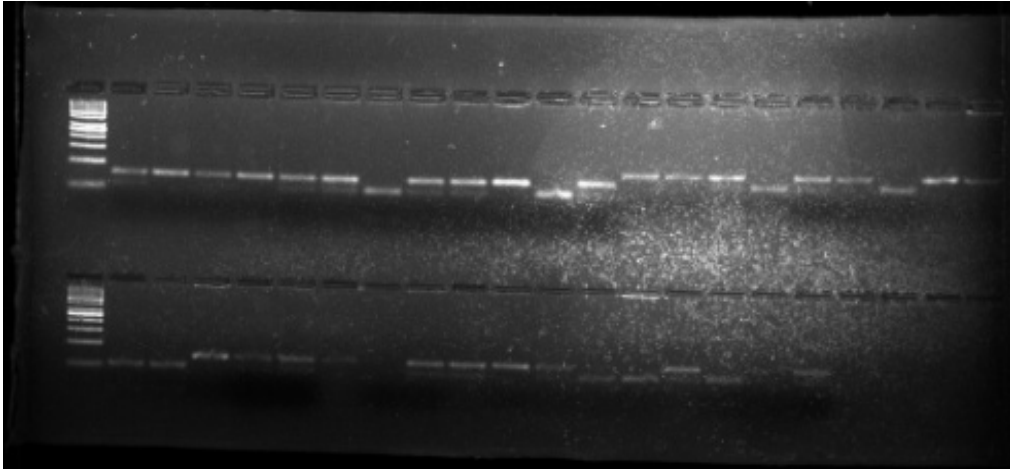
Kesim işlemi yapılmadan önce elde edilen PZR ürünlerinin bant büyüklükleri (LeptinG-2548A →242) belirlenmişti. HhaI ile kesim sonrası, 242bp, 181bp, 61bp büyüklüğünde bantlar görülmüştür. Kesim sonucu sadece 242bp'lik bant görüldüğünde AA (homozigot doğal tip), 242bp, 181bp ve 61bp'lik bantlar görüldüğünde GA (heterozigot mutant), 181 ve 61 bp'lik bant görüldüğünde ise GG (homozigot mutant) olarak değerlendirildi.



Şekil 3-1: LeptinG-2548A genotiplerinin %3'lik agaroz jel'de görüntülenmesi. (Marker 50 bp DNA ladder)

3.2.5.4. MspI Enzimi Kesim Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Kesim işlemi yapılmadan önce elde edilen PZR ürünlerinin bant büyüklükleri (LEPR-Q223R→80 bp) belirlenmişti. MspI ile kesim sonrası ; 80bp, 57bp, 23bp büyüklüğünde bantlar görülmüştür. Kesim sonucu sadece 80bp'lik bant görüldüğünde GG (homozigot doğal tip), 80, 57 ve 23 bp'lik bantlar görüldüğünde GA (heterozigot mutant), 57 ve 23 bp'lik bant görüldüğünde ise AA (homozigot mutant)olarak değerlendirildi.



Şekil 3-2: LeptinR Q223R genotiplerinin % 5'lik agaroz jel'de görüntülenmesi. (Marker 50 bp DNA ladder)

3.2.6. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatiksel Yöntemler

Bu çalışmanın istatistiksel analizinde SPSS 11 paket programı kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı $P < 0,05$ olarak alınmıştır. Genotip ve alellerin görülme sıklığının gruplar arası farklılıklarının değerlendirilmesinde Ki kare testi kullanılmıştır. İki'den fazla grupta değişkenlerin ortalamaları karşılaştırılırken ANOVA yöntemi, iki grup arasında karşılaştırma yapılırken student-t testi kullanıldı.

4. BULGULAR

Çalışma gruplarına ait demografik bilgiler Tablo 4-1’de verilmiştir. Çalışmamızda İBH larının %46. 3’si Chron hastalığı %53. 7 si Ülseratif Kolit idi. Kontrol ve hasta grupları arasında yaş ve cinsiyet dağılımı açısından istatistiksel anlamlı fark bulunmamaktadır. Ancak VKI, diabet, hipertansiyon varlığı ve serum leptin düzeyleri istatistiksel olarak anlamlıdır.

Tablo 4-1:Çalışma gruplarına ait demografik veriler

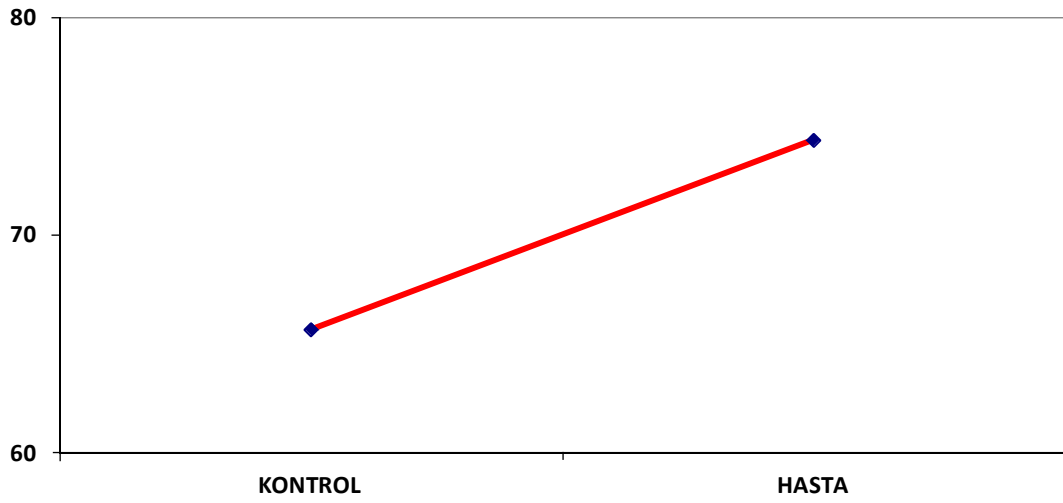
	KONTROL	HASTA	p
YAŞ (yıl)	39,54±11,06	39,83±11,91	AD
VKI(kg/m ²)	26,61±3,63	24,59±6,02	0,016
CİNSİYET (Kadın/Erkek)	31/38	36/49	AD
Tip2 Diabet varlığı (%)	0	%8,5	0,01
Hipertansiyon varlığı(%)	0	%8,5	0,01
SİGARA(%)	%28,6	%25,6	AD
LEPTİN(ng/ml)	0,15±0,10	22,81±6,94	0,000
GLUKOZ (mg/dl)	92,37±7,68	95,04±12,45	AD
İNSÜLİN(mU/L)	7,78±4,00	8,35±6,50	AD
HOMAIR	1,81±1,01	2,04±1,81	AD

Hasta ve kontrol grubu arasında Leptin G-2548A polimorfizminin G genotip ve allel dağılımları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (χ^2 :1,92; p:0,382; χ^2 :0,03; p:0,85).

Tablo 4-2: Kontrol ve hasta gruplarında Leptin G-2548A polimorfizminin genotip dağılımları

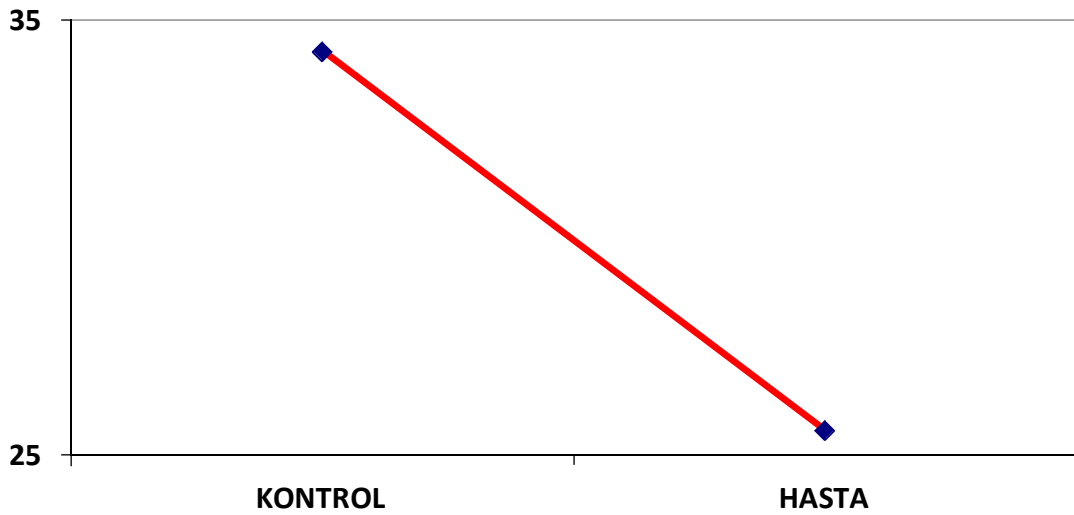
LeptinG-2548A Genotipleri	KONTROL N:69		HASTA N:85	
	N	%	N	%
AA	29	41,4	3	26,2
GG	12	17,1	13	15,5
AG	29	47,1	49	58,3
ALLELLER				
A	79	56,42	93	55,35
G	61	43,57	75	44,64

LeptinG-2548A polimorfizminin G+ genotipli bireylerin frekansının hasta grubunda (%74,4) kontrol grubuna göre (%65,7) yüksek olduğu ve hastalık için risk oluşturabileceği izlenimi edinilmiştir (p:0,24, χ^2 :1,36, OR:1,51 %95 CI:0,75-3,05).



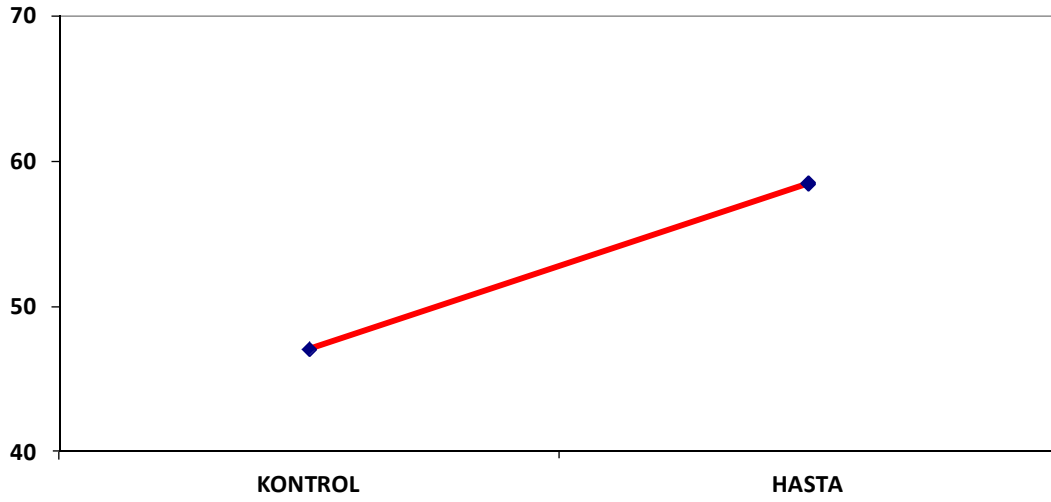
Şekil 4-1: Hasta ve kontrol grubunda LeptinG-2548A polimorfizminin G+ genotip frekans dağılımları

LeptinG-2548A polimorfizminin AA genotipli bireylerin frekansının kontrol grubunda (%34,3) hasta grubuna göre (%25,6) yüksek olduğu ve hastalık için 1,5 katlık koruyuculuk sağlayabileceği izlenimi edinilmiştir (p:1,36, χ^2 :0,24, OR:0,66 %95 CI:0,32-1,32).



Şekil 4-2: Hasta ve kontrol grubunda LeptinG-2548A polimorfizminin AA genotip frekans dağılımları

LeptinG-2548A polimorfizminin AG genotipli bireylerin frekansının hasta grubunda (%58,5) kontrol grubuna göre (% 47,1) yüksek olduğu ve hastalık için risk oluşturabileceği izlenimi edinilmiştir (p:0,166, χ^2 :1,91, OR:1,58 %95 CI:0,82-3,01).



Şekil 4-3: Hasta ve kontrol grubunda LeptinG-2548A polimorfizminin AG genotip frekans dağılımları

Hasta ve kontrol grubu arasında LeptinR Q223R polimorfizminin genotip ve allel dağılımları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (χ^2 :0,435; p:0,804; χ^2 :0,20; p:0,65).

Tablo 4-3: Kontrol ve Hasta gruplarında LeptinR Q223R polimorfizminin genotip dağılımları

LeptinR Q223R	KONTROL		HASTA	
	N:69		N:85	
	N	%	N	%
AA	29	41,4	38	46,3
GG	12	17,1	14	17,1
AG	29	47,1	30	36,6
ALLELLER				
A	87	62,1	106	64,6
G	53	37,8	58	35,3

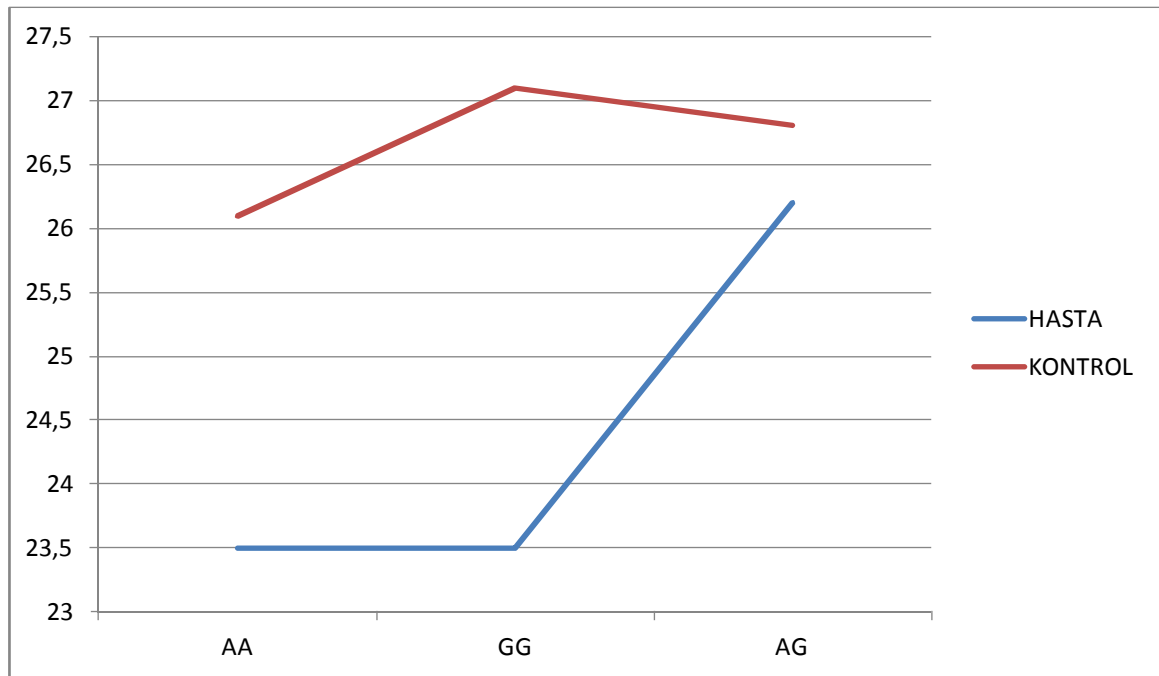
Kontrol ve Hasta gruplarında LeptinR Q223R polimorfizminin genotiplerine göre serum leptin, glukoz, insülin düzeyleri ve VKI, HOMA indeksi dağılımları Tablo 4-4'te verilmiştir. AA genotipli bireyler arasında VKI kontrol grubunda hasta grubuna göre istatistiksel anlamlı şekilde yüksektir (p:0,03).

Genotipler arası leptin düzeyleri Hasta ve kontrol gruplarında incelendiğinde her üç genotipteki bireylerde hastalar, kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek leptin düzeylerine sahip olarak tespit edilmiştir (p:0,000).

Tablo 4-4: Kontrol ve Hasta gruplarında LeptinR Q223R polimorfizminin genotiplerine göre VKI, serum leptin, glukoz, insülin düzeyleri ve HOMA indeksi dağılımları

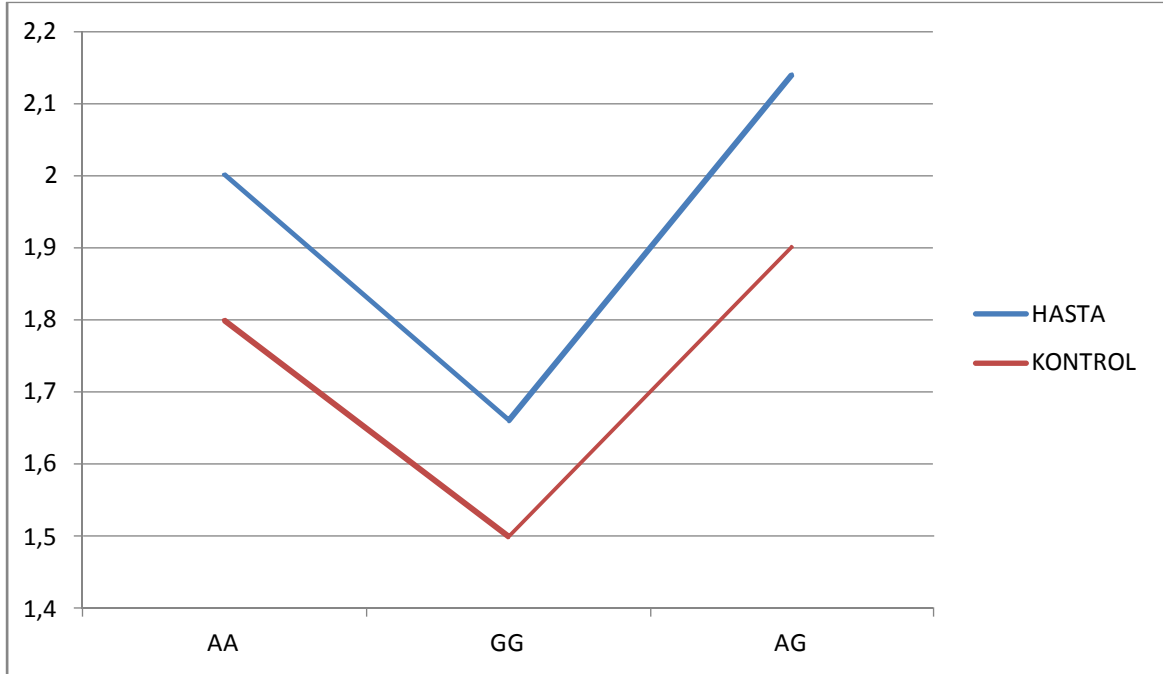
LeptinR Q223R						
HASTA				KONTROL		
	AA	GG	AG	AA	GG	AG
VKI	23,55±5,77	23,52±4,58	26,26±6,63	26,12±3,33	27,19±4,93	26,86±3,37
Leptin	23,96 ± 8,65	22,53±6,01	21,48±4,37	0,14 ± 0,11	0,14 ± 0,06	0,16 ± 0,11
Glikoz	95,39 ± 11,86	91,07 ± 12,52	96,43 ± 13,17	92,04 ± 6,73	89,91 ± 9,77	93,77 ± 7,69
İnsülin	8,51 ± 7,33	6,95 ± 4,13	8,74 ± 6,22	8,00 ± 3,69	6,62 ± 3,82	8,05 ± 4,46
HOMAIR	2,08 ± 2,00	1,66 ± 1,13	2,14 ± 1,80	1,84 ± 0,96	1,51 ± 0,91	1,90 ± 1,11

Hasta ve kontrol grubunda LeptinR Q223R polimorfizminin genotiplerine göre VKI indeksleri incelendiğinde VKI indekslerinin genotiplere bağımlı olarak değiştiği gözlenmiştir (Şekil 4-4).



Şekil 4-4: Hasta ve kontrol grubunda LeptinR Q223R polimorfizminin genotiplerine göre VKI değerleri

Hasta ve kontrol grubunda LeptinR Q223R polimorfizminin genotiplerine göre HOMA indeksleri incelendiğinde HOMA indekslerinin genotiplere bağımlı olarak değiştiği gözlenmiştir (Şekil 4-5).



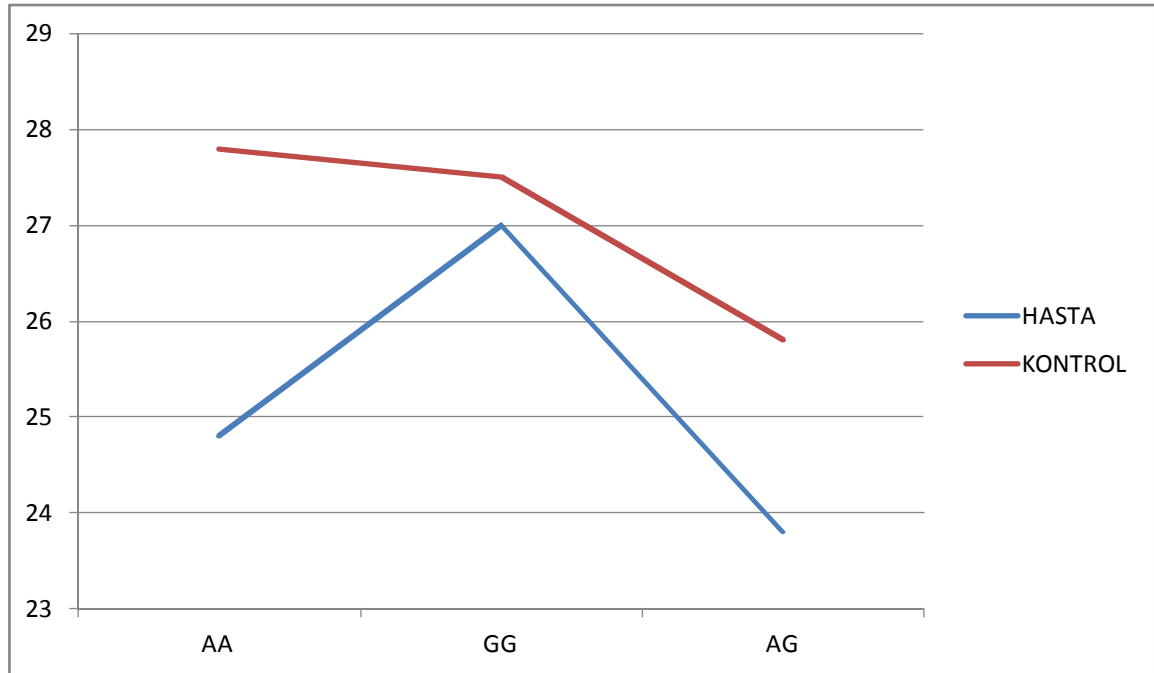
Şekil 4-5: Hasta ve kontrol grubunda LeptinR Q223R polimorfizminin genotiplerine göre HOMA indeksleri

Kontrol ve Hasta gruplarında LeptinG-2548A polimorfizminin genotiplerine göre VKI, serum leptin, glukoz, insülin düzeyleri ve HOMA indeksi dağılımları Tablo 4-5’da verilmiştir. Leptin G-2548A polimorfizminde; AA, GG, AG genotipine sahip bireylerde leptin düzeyleri hasta grubunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olarak bulunmuştur (p:0,000).

Tablo 4-5: Kontrol ve Hasta gruplarında LeptinG-2548A polimorfizminin genotiplerine göre VKI, serum leptin, glukoz, insülin düzeyleri ve HOMA indeksi dağılımları

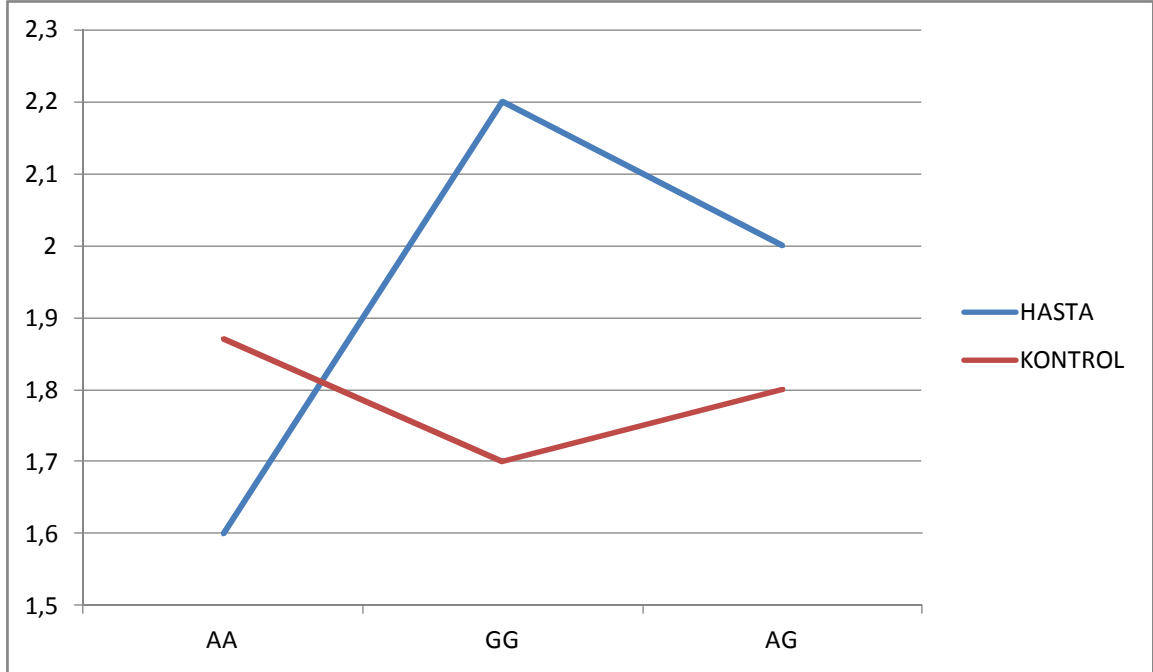
LeptinG -2548A						
HASTA				KONTROL		
	AA	GG	AG	AA	GG	AG
VKI	24,82±5,31	27,09±5,4	23,82±6,41	27,08±3,83	27,55±3,52	25,89±3,48
Leptin	24.58±9,86	21,82±4,69	22,30±5,83	0,12± 0,10	0,17±0,06	0,16±0,11
Glikoz	91,57 ± 9,99	95,23± 10,37	96,50 ± 13,77	92,18 ± 8,85	93,62 ± 6,53	91,97± 7,41
İnsülin	7,15 ± 4,55	9,21 ± 6,72	8,67 ± 7,23	8,01 ± 4,13	7,14 ± 3,71	7,89 ± 4,14
HOMAIR	1,64 ± 1,05	2,29 ± 2,08	2,15 ± 2,01	1,87 ± 1,11	1,71 ± 0,89	1,81 ± 1,01

Hasta ve kontrol grubunda Leptin G-2548A polimorfizminin genotiplerine göre VKI indeksleri incelendiğinde VKI indekslerinin genotiplere bağımlı olarak değiştiği ancak istatistiksel bir anlamlılık olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4-6).



Şekil 4-6: Hasta ve kontrol grubunda Leptin G-2548A polimorfizminde genotiplerine göre VKI değerleri

Hasta ve kontrol grubunda LeptinG-2548A polimorfizmin göre HOMA indeksleri incelendiğinde HOMA indekslerinin genotiplere bağımlı olarak değiştiği gözlenmiştir (Şekil 4-7).



Şekil 4-7: Hasta ve kontrol grubunda Leptin G-2548A polimorfizminin genotiplerine göre HOMA indeksler

5. TARTIŞMA

İBH, barsağın kronik inflamasyonundan kaynaklanan ve dünyada milyonlarca kişiyi etkileyen kronik bir hastalıktır (28, 257-258). Hastalığın mekanizması ve patogenezi halen tam açıklanamamakla birlikte, immünolojik, çevresel ve genetik faktörlerin etkili olduğu multifaktöryel bir hastalık olduğu bilinmektedir (41-259). Hastalığın gelişiminde pro-inflamatuar sitokinlerin salınımının katkıda bulunduğu gösterilmiştir (221-222). Pro-inflamatuar bir sitokin olan leptin adiposit kökenli bir hormon olup, bir çok otoimmün hastalıkta etkin rol oynamaktadır (219-259).

İBH’ da serum leptin düzeylerinin ve leptin mRNA ekspresyonlarının arttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. (219, 260-261). Tüzün ve ark. (219) tarafından yapılan çalışmada, hasta grupta serum leptin düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı belirtilmiştir. Ayrıca serum leptin düzeylerinin azaldığını gösteren çalışmalarda mevcuttur. Afify ve ark. (262) tarafından yapılan çalışmada, Mısır popülasyonunda ülseratif kolit hastası bireylerin serum leptin düzeyleri incelenmiştir. Elde edilen bulgulara, serum leptin düzeyi akut ülseratif kolit hastası bireylerde sağlıklı bireylere göre anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır. Bu sonuçlara paralel olarak Kirchgessner ve ark. (263) ve Bruun ve ark. (264) tarafından da ÜK hastası bireylerde, kontrol gruba göre anlamlı derecede azaldığı bulunmuştur. Böylece leptin düzeyinde azalma ile kronik barsak inflamasyonunun tetiklenebileceği ileri sürülmüştür.

Bizde çalışmamızda serum leptin düzeylerini hasta grubunda kontrole göre anlamlı olarak yüksek olarak tespit ettik ($p=0,000$). Bulgumuz Tüzün ve ark.nın (219) bulgularıyla uyumludur. Hasta grubumuzdaki artmış leptin düzeylerinin İBH’daki akut inflamasyon ile ilişkili olduğunu düşünmekteyiz.

Dünyadaki LeptinG-2548A polimorfizminin sağlıklı gruptaki dağılımı incelendiğinde: Genel popülasyonda A alleli sıklığı:%43, Afrika popülasyonunda %5, Amerika popülasyonunda %39, Doğu Asya popülasyonunda %75, Avrupa popülasyonunda %46 olup, genel popülasyonda G alleli sıklığı:%57, Afrika popülasyonunda %95, Amerika popülasyonunda %61, Doğu Asya popülasyonunda %25, Avrupa popülasyonunda %54 olduğu tespit edilmiştir (265).

Şahin ve arkadaşları (266) tarafından yapılan bir çalışmada, Türk popülasyonunda Leptin G-2548A ve obezite ile ilişkisi araştırılmıştır. Sağlıklı grupta genotip dağılımı GG: %20, AG: %49, 5 AA: %30 ve allel dağılımını G %44, 7 ve A

%55 olarak tespit etmişlerdir (266). Bizim çalışmamızda LeptinG-2548A genotip dağılımı hasta grubunda GG: %15,5 AG: %58,3 AA: %26,2, kontrol grubunda GG: %17,1 AG: %47,1 AA: %41,4 olduğu tespit edilmiştir. Hastaların allel frekansları G %44,64 ve A %55,35, kontrol grubu G %43,57 ve A %56,42 olduğu tespit edilmiştir. Hasta ve kontrol grubu arasında Leptin G-2548A polimorfizminin genotip ve allel dağılımları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Sağlıklı gruba ait gen frekanslarımızın Şahin ve ark.nın (266) Türk populasyonunda daha önce yaptıkları çalışmadaki dağılımla ve beyaz ırkla oldukça uyumlu olduğunu gözlemledik.

Dünyadaki LeptinR Q223R polimorfizminin sağlıklı gruptaki dağılımı incelendiğinde: Genel populasyonda A allel sıklığı: %41, Afrika populasyonunda %46, Amerika populasyonunda %58, Doğu Asya populasyonunda %13, Avrupa populasyonunda %51 olup, genel populasyonda G alleli sıklığı: 59, Afrika populasyonunda %54, Amerika populasyonunda %42, Doğu Asya populasyonunda %87, Avrupa populasyonunda %49 olduğu tespit edilmiştir (267).

Becer ve arkadaşları (268) tarafından Türk populasyonunda yapılan çalışmada LeptinR Q223R polimorfizminin obezitede lipid profilleri ile ilişkisi araştırılmıştır. Bulgulara göre, sağlıklı bireylerde genotip frekansları, AA (%44,44), AG (%30) ve GG (%25,56) olarak ifade edilmiştir. Bizim bulgularımıza göre LeptinR Q223R polimorfizminde hasta grubu genotip dağılımı AA: %46,3 AG: %36,6, GG: %17,1 olup, kontrol grubu genotip dağılımı AA: %41,4 AG: %47,1 GG: %17,1 olduğu tespit edilmiştir ($P < 0,05$). Hastaların allel frekansları A (%64,6) ve G (%35,3), kontrol grubu A (%62,1) ve G (%37,8) olduğu tespit edilmiştir. Sağlıklı gruba ait gen frekanslarımızın Becer ve ark. nın (268) Türk populasyonunda daha önce yaptıkları çalışmadaki dağılımla ve beyaz ırkla uyumlu olduğunu gözlemledik.

Hasta ve kontrol ve gruplarında LeptinR Q223R ve LeptinG-2548A genotiplerine göre VKI, serum leptin, glukoz, insülin düzeyleri ve HOMA indeksi dağılımlarını incelediğimizde VKI ve HOMA-IR değerlerinin genotiplere bağlı olarak değiştiği izlenmiştir. Genotipler arası leptin düzeyleri hasta ve kontrol gruplarında incelendiğinde her üç genotipteki bireylerde hastalar kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek leptin düzeylerine sahip olarak tespit edilmiştir ($p = 0,000$).

Özçam ve ark. (269), 2009 yılında Türk populasyonunda yapmış oldukları çalışmada, diyabetik obez ve diyabetik obez olmayan gruplarda leptin düzeylerine

bakılmış ve sonuç olarak diyabetik obez grupta, diyabetik obez olmayan gruba göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). Leptin düzeyi ile insülin direnci arasında anlamlı korelasyon bulunmamıştır. Aksine, Silha ve ark. (270)nın yapmış oldukları çalışmada leptin seviyesi HOMA-IR ve VKI ($R = 0.732$, $P < 0,001$) ile anlamlı pozitif korelasyonlu bulunmuştur. Bizim bulgularımıza göre; hasta ve kontrol grubunda genotiplere göre HOMA indekslerinin dağılımının farklılık gösterdiğini fakat istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir.

Hoffstedt ve arkadaşları yaptığı çalışmada, LeptinG-2548A polimorfizminin adipoz dokudan leptin salınımı ve leptinin gen ekspresyonunu etkileyebileceğini AA genotipli bireylerin serum leptin düzeyinin, GA/GG genotipli bireylerden daha yüksek olduğunu ileri sürmüşlerdir (13). Ribeiro ve ark. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, LeptinG-2548A A aleline sahip bir kişi, yüksek düzeyde leptin reseptör ekspresyonuna sahip olduğu gibi, prostat kanser riski ile de ilişkilendirilmiştir (246). Li ve ark.(1999) ise, LeptinR Q223R polimorfizminin A alelinde, leptinin reseptörüne bağlanma aktivitesinin düşük düzeyde olduğunu ifade etmişlerdir (247).

Sitokin reseptör ailesine ait olan LeptinR, 1,165 aa kodlayan 20 ekzon bulundurmaktadır. Reseptörün hücre dışı alt domeni sinyal iletiminden sorumludur (271). İki izoformdan oluşan LeptinR' nde, kısa olan hücre içi domen sinyal iletiminde rol alırken, uzun hücre içi domen ise JAK2 ve STAT3 aktivasyonunda ve diğer sinyal yollarında görev alır (272). Güney Hint populasyonunda 2012 yılında yapılan bir çalışmada, Anuradha ve arkadaşları, göğüs kanserinde, LeptinR Q223R polimorfizmi genotip ve allel frekanslarını incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda; LeptinR Q223R polimorfizminin RR genotip frekansı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında göğüs kanseri riskinde anlamlı bir artış gözlenmiştir. Aynı zamanda, LeptinR Q223R polimorfizminin RR genotipinin daha etkili leptin bağlama kapasitesine sahip oluşu, hücrel sinyal yolları olan JAK2 /STAT3, Ras/ERK1/2'i tetikleyerek tümör oluşumuna neden olabileceği ifade edilmiştir (271).

2012 yılında Marie ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, leptin reseptör geninde yaygın olarak görülen LeptinR Q223R polimorfizminin, insanlarda amebiyazise olan duyarlılığı arttırdığını belirtmişlerdir. Aynı zamanda, LeptinR Q223R polimorfizmi, doğal tip ile karşılaştırıldığında sinyal yolağında koruyucu işleve sahip, leptin bağımlı STAT3 aktivasyonunu %21 azalttığı gözlemlenmiştir (14).

Leptin inflamatuvar koşullarda; IL-1 α , TNF- α ve IL-6 gibi sitokinlerin salınımından sorumlu bir moleküldür (273). İnflamasyon esnasında bu sitokinlerin salınımı sistemik leptin konsantrasyonunda artış ile ilişkilendirilmiştir. Leptin otoimmün hastalıklar, enerji metabolizması, tümörogenesiz ve kardiyovasküler hastalıklar olarak bilinen birçok fizyolojik süreçte rol alır. Yapılan bu çalışmalar, leptinin özellikle İBH olmak üzere otoimmün hastalıklarda inflamasyonu indüklediğı ve leptin antagonisti tarafından leptin aktivitesinin bloklandığını ifade etmektedir (274). Bazı çalışmalar ise TNF- α antikorı ve çözünür TNF- α reseptörünün kolitin şiddetini inhibe ettiğini göstermiştir. Leptin antagonistlerinin sistemik ve mukozal inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonu, sistemik amyloid A, leptin düzeyi, STAT1 ve STAT3 aktivasyonlarını azaltarak; leptin aktivitesini blokladığı dikkat çekmektedir (274,275-276). Bu ve benzeri çalışmalarında gösterdiği gibi leptin aktivitesinin bloklanması sonucunda İBH' nın şiddetinin azaltılması, leptin molekülünün gelecekteki İBH tedavisindeki önemini ortaya koymaktadır (274).

Sonuç olarak çalışmamızda leptin genotiplerinin frekansları açısından anlamlı bir fark bulamasakta, leptin ve reseptörlerinin bir yandan leptin ekspresyonunu ve serum düzeylerini etkileyerek, diğer yandan insülin direncini etkileyerek inflamatuvar barsak hastalığının gelişiminde etkili olabileceğı izlenimini edindik. Olgı sayısının artırılması ile leptin ve reseptörlerinin İBH' nın patogenezindeki rollerinin açıklığa kavuşacağını düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

- 1) Korecka A, Arulampalam V. The gut microbiome: scourge sentinel or spectator? *Journal of Oral Microbiology* 2012; **4**: 9367 DOI:10.3402/jom.v4i0.9367
- 2) Li Y, Haar CD, Peppelenbosch MP, et al. SOCS3 in immune regulation of inflammatory bowel disease and inflammatory bowel disease-related cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2012; **23**: 127–138.
- 3) Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, et al. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 1996; **39**: 690-697.
- 4) Elmquist JK, Maratos-Flier E, Saper CB, et al. Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to Leptin. *Nature Neuroscience* 1998; **1**: 445 - 450 doi: 10. 1038/2164.
- 5) Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998; **395**: 763-770 | doi: 10.1038/27376.
- 6) Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, et al. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000; **404**:661-671 (6 April 2000) | doi: 10.1038/35007534.
- 7) Bjørnbæk C, Kahn BB. Leptin Signaling in the Central Nervous System and the Periphery. *The Endocrine Society* 2004; **59**: 305-331.
- 8) Bado A, Levasseur S, Attoub S, et all. The stomach is a source of Leptin. *Nature* 1998 Aug 20; 394(6695):790-3.
- 9) Sobhani I, Bado A, Vissuzaine C, Buyse M. Leptin secretion and Leptin receptor in the human stomach. *Gut* 2000; 47(2):178-83.
- 10) Yarandi S.S, Hebbar G, Sauer C.G, et all. , Diverse roles of Leptin in the gastrointestinal tract: Modulation of motility, absorption, growth, and inflammation. *Nutrition* 2011; **27** (3): 269–275.
- 11) Constantin A, Costache G, Sima AV, et al. Leptin G-2548A and Leptin receptor Q223R gene polymorphisms are not associated with obesity in Romanian subjects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (2010); **391**: 282–286.
- 12) Mammès O, Betoulle D, Aubert R, et all. Novel polymorphisms in the 5' region of the LEP gene: association with Leptin levels and response to low-calorie diet in human obesity. *Diabetes*. 1998; **47**(3): 487-9.

- 13) Hoffstedt J, Eriksson P, Mottagui-Tabar S, et al. Polymorphism in the Leptin promoter region (-2548 G/A) influences gene expression and adipose tissue secretion of Leptin. *Horm Metab Res.* 2002; **34**(7):355-9.
- 14) Marie CS, Verkerke HP, Paul SN, et al. Leptin protects host cells from *Entamoeba histolytica* cytotoxicity by a STAT3-dependent mechanism. *Infect Immun.* 2012; **80**(5):1934-43. doi: 10.1128/IAI.06140-11.
- 15) Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994; **372**(6505): 425-432.
- 16) Jequier E, Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Annals of the New York Academy of sciences* 2002; **967**: 379-88.
- 17) Thukkani N, Williams JL, Sonnenberg A. Epidemiologic characteristics of patients with inflammatory bowel disease undergoing colonoscopy. *Inflamm Bowel Dis.* 2011; **6**: 1333-7. doi: 10.1002/ibd.21513.
- 18) Sartor RB. Mechanisms of disease: Pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2006; **3**(7):390-407.
- 19) Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature.* 2007; **448**(7152): 427-34.
- 20) Saleh M, Elson CO. Experimental inflammatory bowel disease: insights into the host-microbiota dialog. *Immunity.* 2011; **34**(3): 293-302. doi: 10.1016/j.immuni.2011.03.008.
- 21) Andoh A, Endo Y, Kushima R, Hata K, Tsujikawa T, Sasaki M, et al. Case of Crohn's disease involving the gallbladder. *world journal of gastroenterology* 2006; **12**(6): 977.
- 22) Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, et al. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut.* 2004; **53**(11):1658-64.
- 23) Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, et al. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; **102**(50): 18129-34.
- 24) Orholm M, Munkholm P, Langholz E. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* 1991; **324**(2): 84-8.
- 25) Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, et al. Incidence and prevalence of Crohn's disease in the county of Copenhagen, 1962-87: a sixfold increase in incidence. *Scand J Gastroenterol.* 1992; **27**(7): 609-14.

- 26) Langman MJS. Epidemiological overview of inflammatory bowel disease. In: Allan RN, Rhodes JM, Hanauer SB, Keighley MRB, Alexander-Williams J, Fazio VW, eds. *Inflammatory Bowel Diseases*. New York, NY: Churchill Livingstone; 1997: 35–39.
- 27) Economou M, Pappas G. New global map of Crohn's disease: Genetic, environmental, and socioeconomic correlations. *Inflamm Bowel Dis*. 2008; **14**(5): 709-720.
- 28) Loftus EV. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004; **126**(6):1504-17.
- 29) Bach JF. The Effect of Infections on Susceptibility to Autoimmune and Allergic Diseases. *N Engl J Med* 2002; **347**:911-920.
- 30) Petritsch W, Fuchs S, Berghold A, et al. Incidence of inflammatory bowel disease in the province of Styria, Austria, from 1997 to 2007: a population-based study. *J Crohns Colitis*. 2013;**7**(1): 58-69.
- 31) Logan I, Bowlus CL. The geoepidemiology of autoimmune intestinal diseases. *Autoimmun Rev*. 2010; **9**(5):A372-8. doi: 10. 1016/j.autrev.2009.11.008.
- 32) Russel M.G, Dorant E, Volovics A. et al. High incidence of inflammatory bowel disease in The Netherlands: Results of a prospective study. The South Limburg IBD Study Group. *Dis Colon Rectum* 1998; **41**(1) 33 – 40.
- 33) Gallop J.H, Phillips S.F, Melton L.J. and Zinsmeister A.R. Epidemiologic aspects of Crohn's disease: A population based study in Olmsted County, Minnesota. *Gut* 1998; **29**: 49 – 56.
- 34) Taylor KD, Yand HY, Rotter JI. Inflammatory bowel disease. In: Rimo DL, Connor JM, Pyeritz RE, Korf B, editors. *Emery and Rimo's principles and practice of medical genetics*, 5th ed. London: Churchill Livingstone; 2007:1549 –1582.
- 35) Probert CS, Brown M, Are There Any Ethnic Groups That Are More Likely to Develop IBD? *Inflamm Bowel Dis* 2008; **14**: Number S2, A Clinician's Guide to IBD.
- 36) Loftus EV, Schoenfeld P, Sandborn WJ. The epidemiology and natural history of Crohn's disease in population-based patient cohorts from North America: a systematic review. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; **16**: 51±60.
- 37) Sonnenberg A, McCarty DJ, Jacobsen SJ. Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States. *Gastroenterology*.1991; **100**: 143–149.

- 38) İnce MN, Elliott DE. Immunologic and Molecular Mechanisms in Inflammatory Bowel Disease. *Surgical Clinics of North America* 2007; **87**(3): 681–696.
- 39) Halfvarson J, Jess T, Magnuson A, et al. Environmental Factors in Inflammatory Bowel Disease: A Co-Twin Control Study of a Swedish-Danish Twin Population. *Inflamm Bowel Dis* 2006; **12**: 925–933.
- 40) Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, et al. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2006; **12**: 3668–72.
- 41) Hugot JP, Zouali H, Lesage S, Thomas G. Etiology of the inflammatory bowel diseases. *International Journal of Colorectal Disease* 1999; **14**(1): 2-9.
- 42) Danese S, Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2006; **12**(30): 4807-4812.
- 43) Tannock GW. The normal microflora: an introduction. *Medical Importance of the Normal Microflora* 1999, pp 1-23.
- 44) Deplancke B. and Gaskins HR Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *American Society for Clinical Nutrition* 2001; **73**(6) 1131S-1141S.
- 45) Mindell, D.P, Phylogenetic consequences of symbioses: Eukarya and Eubacteria are not monophyletic taxa. *Biosystems* 1992; **27** (1): 53–62.
- 46) Lederberg, J. Infectious history. *Science* 2000; **288** (5464): 287–293.
- 47) Tannock GW. Studies of the Intestinal Microflora: A Prerequisite for the Development of Probiotics. *International Dairy Journal* 1998; **8**(5): 527–533.
- 48) Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings C.H et all. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition* 1998; **80**, Suppl. I, S147-S171.
- 49) Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, et al. Overview of gut flora and probiotics. *International journal of food microbiology*. 1998; **41**(2): 85–101.
- 50) Latella G, FiocchiC, Caprili R. News from the “5th international meeting oninflammatory bowel diseases” CAPRI 2010. *Journal of Crohn's and Colitis* 2010; **4**: 690–702.
- 51) Moore WE, Holdeman LV. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl Microbiol* 1974; **27**: 961–79.

- 52) Dave M, Higgins P.D, Middha S, and Rioux K.P. The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions. *Translational Research* 2012; **160**: 246–257.
- 53) Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y. Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. *Microbiol Immunol* 2002; **46**: 535–48.
- 54) Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature* 2007;449:811–8.
- 55) Peach S, Lock M.R, Katz D, et al. Mucosal-associated bacterial flora of the intestine in patients with Crohn's disease and in a control group. *Gut* 1978;**19**: 1034-1042 doi:10. 1136/gut.19.11.1034.
- 56) Tap, J. *et al.* Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ. Microbiol.* 2009; **11**: 2574–2584.
- 57) Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; **104**:13780–5
- 58) Lepage P, Häslér R, Spehlmann ME, Rehman A, Zvirbliene A, Begun A, et al. Twin study indicates loss of interaction between microbiota and mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2011; **141**: 227–36.
- 59) Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 2006; **55**: 205–11.
- 60) Willing BP, Dicksved J, Halfvarson J, et al. A Pyrosequencing Study in Twins Shows That Gastrointestinal Microbial Profiles Vary With Inflammatory Bowel Disease Phenotypes. *Gastroenterology*. 2010; **130**(6): 1844–1854.
- 61) Gophna U, Sommerfeld K, Gophna S, Doolittle WF, Veldhuyzen van Zanten SJ. Differences between tissue-associated intestinal microfloras of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Journal of Clinical Microbiology* 2006;**44**: 4136–41.
- 62) Scanlan PD, Shanahan F, O'Mahony C, Marchesi JR. Culture-Independent Analyses of Temporal Variation of the Dominant Fecal Microbiota and Targeted Bacterial Subgroups in Crohn's Disease. *J. Clin. Microbiol.* 2006; **44** (11): 3980-3988.

- 63) Dore J, Corthier G. The human intestinal microbiota. *Gastroenterol Clin Biol* 2010; **34**(1): S7–15.
- 64) Iliev ID, Funari VA, Taylor KD, Nguyen Q, Reyes CN, Strom SP, et al. Interactions between commensal fungi and the C-type lectin receptor Dectin-1 influence colitis. *Science* 2012; **336**:1314–7.
- 65) Round JL, Mazmanian SK. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 12204–9.
- 66) Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; **464**: 59–65.
- 67) Grice EA, Segre JA. The human microbiome: our second genome. Annual Review of Genomics and Human Genetics 2012, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-genom-090711-163814> [Epub ahead of print].
- 68) Feng T, Wang L, Schoeb TR, Elson CO, Cong Y. Microbiota innate stimulation is a prerequisite for T cell spontaneous proliferation and induction of experimental colitis. *Journal of Experimental Medicine* 2010; **207**: 1321–32.
- 69) Eckmann L, Stenson W.F, Savidge T. C, et al. Role of Intestinal Epithelial Cells in the Host Secretory Response to Infection by Invasive Bacteria. *The American Society for Clinical Investigation, Inc.* 1997; **100**(2): 296–309.
- 70) Eckmann L, Kagnoff MF, and Fierer J. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect. Immun.* 1993; **61**: 4569–4574.
- 71) Abrams GD, Schneider H, Formal SB, Sprinz H. Cellular Renewal And Mucosal Morphology In Experimental Enteritis. Infection With Salmonella Typhimurium In The Mouse. *Lab Invest.* 1963; **12**: 1241-8.
- 72) Thompson GR, Trexler PC. Gastrointestinal structure and function in germ-free or gnotobiotic animals. *Gut* 1971; **12**: 230–5.
- 73) Gordon HA, Pesti L. The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationships. *Bacteriological Reviews* 1971; **35**: 390–429.
- 74) De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; **107**: 14691–6.

- 75) Muegge BD, Kuczynski J, Knights D, Clemente JC, Gonzalez A, Fontana L, et al. Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. *Science* 2011; **332**: 970–4.
- 76) Deuring JJ, de Haar C, Kuipers EJ, The cell biology of the intestinal epithelium and its relation to inflammatory bowel disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2013; **45**: 798–806.
- 77) Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D’Amato M, Taylor KD, et al. Metaanalysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nature Genetics* 2011; **43**: 246–52.
- 78) Franke A, McGovern DP, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T, et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn’s disease susceptibility loci. *Nature Genetics* 2010; **42**: 1118–25.
- 79) Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 2012; **491**: 119–24.
- 80) Chassaing B, and Darfeuille-Michaud A. The Commensal Microbiota and Enteropathogens in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 2011; **140**: 1720–1728.
- 81) Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* 2007; **39**: 207–211.
- 82) Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn’s disease. *Nature* 2001; **411**: 603–606.
- 83) Franke A, Balschu T, Karlsen TH, Hedderich J, May S, Lu T, et al. Replication of signals from recent studies of Crohn’s disease identifies previously unknown disease loci for ulcerative colitis. *Nat. Genet.* 2008a; **40**: 713–715.
- 84) Franke A, Balschun T, Karlsen TH, Sventoraityte J, et al. Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat. Genet.* 2008b; **40**: 1319–1323.
- 85) Zhang H, Massey D, Tremelling M, Parkes M. Genetics of inflammatory bowel disease: clues to pathogenesis. *Br. Med. Bull.* 2008; **87**, 17–30.

- 86) Rodriguez-Bores L, Fonseca GC, Villeda MA, Yamamoto-Furusho JK,. Novel genetic markers in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 2007; **13**: 5560–5570.
- 87) Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996; **379**: 821–3.
- 88) Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 2001; **357**: 1925–8.
- 89) 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**: 599–603.
- 90) Perminow G, Beisner J, Koslowski M, Lyckander LG, Stange E, Vatn MH, et al. Defective paneth cell-mediated host defense in pediatric ileal Crohn's disease. *American Journal of Gastroenterology* 2010; **105**: 452–9.
- 91) Helio T, Halme L, Lappalainen M, Fodstad H, Paavola-Sakki P. et al. CARD15/NOD2 gene variants are associated with familially occurring and complicated forms of Crohn's disease . *Gut* 2003; 52(4): 558–562.
- 92) Medici V, Mascheretti S, Croucher P.J., Stoll M, et al. Extreme heterogeneity in CARD15 and DLG5 Crohn disease-associated polymorphisms between German and Norwegian populations . *Eur J Hum Genet* 2006; **14** (4): 459 – 468.
- 93) Satsangi J, Welsh KI, Bunce M, et al. Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1996; **347**:1212–7.
- 94) Farrell RJ, Peppercorn MA. Ulcerative colitis. *Lancet* 2002; **359**: 331–40.
- 95) Barrett JC, Lee JC, Lees CW, et al. Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. *Nat Genet* 2009; **41**: 1330-4.
- 96) Thompson AI, Lees CW. Genetics of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2010. 12 November 2010. [Epub ahead of print].
- 97) Ferguson LR. Nutrigenomics and inflammatory bowel diseases. *Expert Rev Clin Immunol* 2010; **6**: 573–83.

- 98) Walker DG, Williams HR, Kane SP, et al. Differences in inflammatory bowel disease phenotype between South Asians and Northern Europeans living in North West London, UK. *Am J Gastroenterol* 2011; **106**: 1281–9.
- 99) Andersena V, Olsenc A, Carbonneld F, et al. Diet and risk of inflammatory bowel disease. *Digestive and Liver Disease* 2012; **44**: 185– 194
- 100) Lees CW, Barrett JC, Parkes M, Satsangi J. New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut* 2011; **60**:1739-1753. doi:10.1136/gut.2009.199679.
- 101) Porro GB, Panza E 1985. Smoking, sugar, and inflammatory bowel disease. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1985; **291**(6500): 971–972.
- 102) Bures' J, Fixa B, Komarkova O, Fingerland A. Non-smoking: a feature of ulcerative colitis. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1982; **285**(6339): 440.
- 103) O'Morain C, Segal AW, Levi AJ Elemental diet as primary treatment of acute Crohn's disease: a controlled trial. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1984; **288**(6434): 1859–1862.
- 104) Sartor RB, Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* 2004; **126**(6): 1620–1633.
- 105) Wolfe MM, Lichtenstein DR and Singh G. Gastrointestinal Toxicity of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. *N Engl J Med* 1999; **340**: 1888-1899.
- 106) Mardini HE, Kip KE, Wilson JW. Crohn's Disease: A Two-Year Prospective Study of the Association between Psychological Distress and Disease Activity. *Digestive diseases and Sciencies*. 2004; **49**(3): 492-497
- 107) Thornton JR, Emmett P M, and Heaton K W Diet and Crohn's disease: characteristics of the pre-illness diet. *Br Med J*. 1979; **2**(6193): 762–764.
- 108) Levenstein S, Prantera C, Luzzi C, et al Low residue or normal diet in Crohn's disease: a prospective controlled study in Italian patients. *Gut* 1985; **26**: 989-993 doi:10.1136/gut.26.10.989
- 109) Burkitt DP, Walker ARP, Painter NS. Dietary Fiber and Disease. *JAMA* 1974; **229**: 1068-1074.
- 110) Kaplan GG, Jackson T, Sands BE, et al. The risk of developing Crohn's disease after an appendectomy: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2008; **103**: 2925–31.

- 111) Cadwell K, Patel KK, Maloney NS, et al. Virus-Plus-Susceptibility Gene Interaction Determines Crohn's Disease Gene *Atg16L1* Phenotypes in Intestine. *Cell* 2010; **141**(7): 1135–1145
- 112) Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nature Genetics* 2008; **40**: 955–62.
- 113) Karlinger K, Gyorke T, Mako E, Mester A. and Tarjan Z. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Radiol* 2000; **35** (3):154–167.
- 114) Han PD, Burke A, Baldassano RN. Nutrition And Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology Clinics of North America* 1999; **28**(2) 423–443.
- 115) Kucharzik T, Maaser C, Lugering A, Kagnoff M, Mayer L, Targan S, et al. Recent understanding of IBD pathogenesis: implications for future therapies. *Inflamm Bowel Dis* 2006; **12**: 1068–83.
- 116) Panja A, Goldberg S, Eckmann L. et al. The Regulation and Functional Consequence of Proinflammatory Cytokine Binding on Human Intestinal Epithelial Cells. *The Journal of Immunology*, 1998 **161**(7): 3675–3684.
- 117) Fina D, Sarra M, Fantini MC, et al. Regulation of gut inflammation and th17 cell response by interleukin-21. *Gastroenterology*. 2008; **134**: 1038–1048.
- 118) Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med*. 2007; **204**: 1849 –1861.
- 119) Saruta M, Yu QT, Avanesyan A, et al. Phenotype and effector function of CC chemokine receptor 9-expressing lymphocytes in small intestinal Crohn's disease. *J Immunol*. 2007; **178**: 3293–3300.
- 120) Andoh A, Fujino S, Bamba S, et al. IL-17 selectively down-regulates TNF- α -induced RANTES gene expression in human colonic subepithelial myofibroblasts. *J Immunol*. 2002; **169**:1683–1687.
- 121) Fujino S, Andoh A, Bamba S, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2003; **52**: 65–70.
- 122) Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, et al. IL-23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*. 2008; **57**: 1682–1689.
- 123) Caprioli F, Sarra M, Caruso R, et al. Autocrine regulation of IL-21 production in human T lymphocytes. *J Immunol*. 2008; **180**: 1800–1807.

- 124) Lovato P, Brender C, Agnholt J, et al. Constitutive STAT3 activation in intestinal T cells from patients with Crohn's disease. *J Biol Chem.* 2003; **278**: 16777–16781.
- 125) Wolk K, Witte E, Hoffmann U, et al. IL-22 induces lipopolysaccharidebinding protein in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease. *J Immunol.* 2007; **178**: 5973–5981.
- 126) Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, et al. Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *J Clin Invest.* 2008; **118**: 2269–2280.
- 127) Becker C, Wirtz S, Blessing M, et al. Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. *J Clin Invest.* 2003; **112**: 693–706.
- 128) Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell.* 2006; **126**: 1121–1133.
- 129) Kryczek I, Bruce AT, Gudjonsson JE, et al. Induction of IL-17⁺ T cell trafficking and development by IFN-gamma: mechanism and pathological relevance in psoriasis. *J Immunol.* 2008; **181**: 4733–4741.
- 130) Ivanov II, Frutos Rde L, Manel N, et al. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe.* 2008; **4**: 337–349.
- 131) Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, et al. Abnormally differentiated subsets of intestinal macrophage play a key role in Th1-dominant chronic colitis through excess production of IL-12 and IL-23 in response to bacteria. *J Immunol.* 2005; **175**: 6900–6908.
- 132) Strober W, Fuss I, and Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J. Clin. Invest.* 2007; **117**: 514–521.
- 133) Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005; **201**: 233-240.
- 134) Ruddy MJ, Wong GC, Liu XK, Yamamoto H, Kasayama S, Kirkwood KL, Gaffen SL. Functional cooperation between interleukin-17 and tumor necrosis factor-

alpha is mediated by CCAAT/enhancer-binding protein family members. *J Biol Chem* 2004; **279**: 2559-2567

135) Xu L, Kitani A, Fuss I, Strober W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol* 2007; **178**: 6725-6729.

136) Chen Z, O'Shea JJ. Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. *Immunol Res* 2008; **41**: 87-102.

137) Abraham C and Cho J. "Interleukin-23/Th17 pathways and inflammatory bowel disease." *Inflammatory bowel diseases* 2009; **15**(7): 1090-1100.

138) Niessner M, and Volk BA. "Altered Th1/Th2 cytokine profiles in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease as assessed by quantitative reversed transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR)." *Clinical & Experimental Immunology*. 1995; **101**(3): 428-435.

139) Mayer, L. Mucosal immunity and gastrointestinal antigen processing. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2000; **30**(1): S4-S12.

140) Atreya R, et al. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nature medicine* 2000; **6**(5): 583-588.

141) Schmidt C, Giese T, Ludwig B, et al. Expression of interleukin-12- related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease: elevated interleukin-23p19 and interleukin-27p28 in Crohn's disease but not in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2005; **11**: 16 –23.

142) Weaver, C T. et al. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu. Rev. Immunol*. 2007; **25**: 821-852.

143) El Kasmi, K C. et al. General nature of the STAT3-activated anti-inflammatory response. *The Journal of Immunology* 2006; **177**(11):7880-7888.

144) Hruz P, Dann, SM, and Eckmann L. STAT3 and its activators in intestinal defense and mucosal homeostasis. *Current opinion in gastroenterology*. 2010; **26**(2): 109-115.

145) Gimenez- CA, and Danial NN. Noxa: a sweet twist to survival and more. *Molecular cell* 2010; **40**(5); 687-688.

146) Piessevaux J, Lavens D, Peelman F, and Tavernier J. The many faces of the SOCS box. *Cytokine & growth factor reviews* 2008; **19**(5): 371-381.

- 147) Babon, JJ, McManus EJ, Yao S. et al. The structure of SOCS3 reveals the basis of the extended SH2 domain function and identifies an unstructured insertion that regulates stability. *Molecular cell* 2006; **22**(2): 205-216.
- 148) Hebenstreit D, Horejs-Hoeck J, and Duschl. A JAK/STAT-dependent gene regulation by cytokines. *Drug News Perspect* 2005; **18**: (4): 243-249.
- 149) Ivory CP, Wallace LE, McCafferty DM, Sigalet DL. Interleukin-10 In dependent anti-inflammatory actions of glucagon like peptide 2. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 2008; **295**: G1202-10.
- 150) Linke A, Goren I, Bösl M R, Pfeilschifter J and Frank S. The suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3 determines keratinocyte proliferative and migratory potential during skin repair. *Journal of Investigative Dermatology* 2009; **130**(3): 876-885.
- 151) Rigby RJ, Simmons JG, Greenhalgh CJ, Alexander WS, Lund P K . Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) limits damage-induced crypt hyper-proliferation and inflammation-associated tumorigenesis in the colon. *Oncogene* 2007; **26**(33): 4833-4841.
- 152) Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino J et al. Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nature clinical practice Rheumatology* 2007; **3**(12): 716-724.
- 153) Procaccini C, Galgani M, De Rosa V and Matarese G. Intracellular metabolic pathways control immune tolerance. *Trends in immunology* 2012; **33**(1): 1-7.
- 154) Ponemone V, Keshavarzian A, Brand MI et all. Apoptosis and Inflammation: Role of Adipokines in Inflammatory Bowel Disease. *Clinical and Translational Gastroenterology* 2010; **1**(10): e1.
- 155) Trayhurn P, and Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *In Proceedings-Nutrition Society of London* 2001; **60**(3): 329-339.
- 156) Kershaw EE and Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004; **89**(6): 2548-2556.
- 157) Madej T, Boguski MS and Bryant SH. Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine. *FEBS letters* 1995; **373**(1): 13-18.

- 158) Hong SJ, Kwon KW, Kim SG, et al. Variation in expression of gastric Leptin according to differentiation and growth pattern in gastric adenocarcinoma. *Cytokine* 2006; **33**(2): 66-71.
- 159) Wang SN, Yeh YT, Yang SF, Chai CY, Lee KT et al. Potential role of Leptin expression in hepatocellular carcinoma. *Journal of clinical pathology* 2006; **59**(9): 930-934.
- 160) Frühbeck G. "A heliocentric view of leptin." *Proceedings of the Nutrition Society* 2001; **60**: 301-318.
- 161) Frühbeck G, Jebb SA, and Prentice AM. Leptin: physiology and pathophysiology. *Clinical Physiology* 1998; **18**(5): 399-419.
- 162) Prolo P, Wong ML, and Licinio J. Leptin. *The international journal of biochemistry & cell biology* 1998; **30**(12): 1285-1290.
- 163) Chen H, Charlat O, Tartaglia LA. et al. Evidence That the Diabetes Gene Encodes the Leptin Receptor: Identification of a Mutation in the Leptin Receptor Gene in *db/db* Mice. *Cell* 1996; **84**(3): 491-495.
- 164) Frederich RC, Lollmann B, Hamann A et al. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to Leptin action. *Nature medicine* 1995; **1**(12): 1311-1314.
- 165) Considine R V, Sinha MK, Heiman ML et al. Serum immunoreactive-Leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *New England Journal of Medicine* 1996; **334**(5): 292-295.
- 166) Houseknecht KL, Mantzoros CS, Kuliawat R, Hadro E, Flier JS & Kahn BB. Evidence for leptin binding to proteins in serum of rodents and humans: modulation with obesity. *Diabetes* 1996; **45**(11): 1638-1643.
- 167) Ratke J, Entschladen F, Niggemann B. Leptin stimulates the migration of colon carcinoma cells by multiple signaling pathways. *Endocrine-related cancer* 2010; **17**(1): 179-189.
- 168) Sinha, MK, Opentanova I, Ohannesian JP. et al. Evidence of free and bound Leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. *Journal of Clinical Investigation* 1996; **98**(6): 1277.
- 169) Carlton ED, Demas G E and French SS. Leptin, a neuroendocrine mediator of immune responses, inflammation, and sickness behaviors. *Hormones and behavior* 2012; **62**(3): 272-279.

- 170) Louis GW, and Myers MG. The role of Leptin in the regulation of neuroendocrine function and CNS development. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 2007; **8**(2); 85-94.
- 171) Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C. et al. Role of Leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 1996; **382**: 250-252.
- 172) Lord GM, Matarese G, Howard JK et al. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 1998; **394**(6696): 897-901.
- 173) Bates SH, Myers MG. The role of Leptin receptor signaling in feeding and neuroendocrine function. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2003; **14**(10): 447-452.
- 174) Zhang Y, Matheny M, Zolotukhin S, et al. Regulation of adiponectin and Leptin gene expression in white and brown adipose tissues: influence of β 3-adrenergic agonists, retinoic acid, Leptin and fasting. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 2002; **1584**(2): 115-122.
- 175) Bradley RL, Cheatham B. Regulation of ob gene expression and Leptin secretion by insulin and dexamethasone in rat adipocytes. *Diabetes* 1999 **48**(2): 272-278.
- 176) Ahima RS, Prabakaran D, Flier JS. Postnatal Leptin surge and regulation of circadian rhythm of Leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *Journal of Clinical Investigation* 1998; **101**(5): 1020.
- 177) Lago R, Gómez R, Lago F, et al. Leptin beyond body weight regulation current concepts concerning its role in immune function and inflammation. *Cellular immunology* 2008; **252**(1): 139-145.
- 178) Guilmeau S, Buyse M, and Bado A. Gastric Leptin: a new manager of gastrointestinal function. *Current opinion in pharmacology* 2004; **4**(6): 561-566.
- 179) Scheer FA, Hilton MF, Mantzoros CS, Shea SA. Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009; **106**(11): 4453-4458.
- 180) Mullington JM, Chan JL, Van Dongen HP, et al. Sleep loss reduces diurnal rhythm amplitude of Leptin in healthy men. *Journal of neuroendocrinology* 2003; **15**(9): 851-854.

- 181) Gavrilu A, Peng CK, Chan JL, et al. Diurnal and ultradian dynamics of serum adiponectin in healthy men: comparison with Leptin, circulating soluble Leptin receptor, and cortisol patterns. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2003; **88**(6): 2838-2843.
- 182) Bluher S, Mantzoros CS. Leptin in humans: lessons from translational research. *The American journal of clinical nutrition* 2009; **89**(3): 991S-997S.
- 183) Licinio J, Mantzoros C, Negrao AB, et al. Human Leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary–adenal function. *Nature medicine* 1997; **3**(5): 575-579.
- 184) Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML, et al. Nocturnal rise of Leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *Journal of Clinical Investigation* 1996; **97**(5): 1344.
- 185) Schwartz MW, Baskin DG, Bukowski TR, et al. Specificity of Leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes* 1996; **45**(4): 531-535.
- 186) Yannakoulia M, Yiannakouris N, Bluher S, et al. Body fat mass and macronutrient intake in relation to circulating soluble Leptin receptor, free Leptin index, adiponectin, and resistin concentrations in healthy humans. *Journal of clinical endocrinology & metabolism* 2003; **88**(4): 1730-1736.
- 187) Mantzoros CS and Moschos SJ. Leptin: in search of role (s) in human physiology and pathophysiology. *Clinical endocrinology* 1998; **49**(5): 551-567.
- 188) Asimakopoulos B, Milousis A, Gioka T, et al. Serum pattern of circulating adipokines throughout the physiological menstrual cycle. *Endocrine journal* 2008; **56**(3): 425-433.
- 189) Einollahi N, Dashti N, Nabatchian F. Serum Leptin concentrations during the menstrual cycle in Iranian healthy women. *Acta Medica Iranica* 2010; **48**(5): 300-303.
- 190) Ludwig M, Klein HH, Diedrich K, Ortm O. Serum Leptin concentrations throughout the menstrual cycle. *Archives of gynecology and obstetrics* 2000; **263**(3): 99-101.ann O.
- 191) Kiess W, Petzold S, Topfer M, et al. Adipocytes and adipose tissue. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2008; **22**(1): 135-153.
- 192) Boden G, Chen X, Mozzoli M, Ryan I. Effect of fasting on serum Leptin in normal human subjects. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1996; **81**(9): 3419-3423.

- 193) Chan JL, Heist K, DePaoli AM, et al. The role of falling Leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *Journal of Clinical Investigation* 2003; **111**(9): 1409-1421.
- 194) Tartaglia L, Dembski M, Weng X *et al* Identification and expression cloning of a Leptin receptor, OB-R. *Cell* 1995; **83**(7): 1263-1271.
- 195) Tartaglia LA. The Leptin receptor. *Journal of Biological Chemistry* 1997; **272**(10): 6093-6096.
- 196) Fei H, Okano HJ, Li C, Lee GH, et al. Anatomic localization of alternatively spliced Leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1997; **94**(13): 7001-7005.
- 197) Lee GH, Proenca R, Montez JM, et al. Abnormal splicing of the Leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 1996; **379**: 632–635.
- 198) Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1990; **87**(18): 6934-6938.
- 199) Otero M, Lago R, Lago F, et al. Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights. *FEBS letters* 2005; **579**(2): 295-301.
- 200) Bjorbaek C, Elmquist JK, Michl P, Ahima RS, et al. Expression of Leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology* 1998; **139**(8): 3485-3491.
- 201) Hileman SM, Pierroz DD, Masuzaki H, et al. Characterization of short isoforms of the Leptin receptor in rat cerebral microvessels and of brain uptake of Leptin in mouse models of obesity. *Endocrinology* 2002; **143**(3): 775-783.
- 202) Elmquist JK, Bjorbaek C, Ahima RS, et al. Distributions of Leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *Journal of Comparative Neurology* 1998; **395**(4): 535-547.
- 203) Gao Q, Horvath TL. Cross-talk between estrogen and Leptin signaling in the hypothalamus. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2008; **294**(5): E817-E826.
- 204) Howard JM, Pidgeon GP, and Reynolds JV. Leptin and gastro-intestinal malignancies. *Obesity Reviews* 2010; **11**(12): 863-874.
- 205) Gao J, Tian J, Lv Y, Shi F, et al. Leptin induces functional activation of cyclooxygenase-2 through JAK2/STAT3, MAPK/ERK, and PI3K/AKT pathways in human endometrial cancer cells. *Cancer science* 2009; **100**(3): 389-395.

- 206) Gupta S, Agrawal S. and Gollapudi S. Increased activation and cytokine secretion in B cells stimulated with Leptin in aged humans. *Immunity & Ageing*, 2013; **10**(1): 3.
- 207) Garofalo C, and Surmacz E. Leptin and cancer. *Journal of cellular physiology* 2006; **207**(1): 12-22.
- 208) Carpenter LR, Farruggella TJ, Symes A, Karow ML, Yancopoulos G. Enhancing leptin response by preventing SH2-containing phosphatase 2 interaction with Ob receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998; 95(11): 6061– 6066.
- 209) Liang C, Liao J, Deng Z, Song C, Zhang J, Zabeau L, et al. Leptin attenuates lipopolysaccharide-induced apoptosis of thymocytes partially via down-regulation of cPLA2 and p38 MAPK activation. *International immunopharmacology*, 2013; **15**(3): 620-627.
- 210) Vecchione C, Maffei A, Colella S, et al. Leptin effect on endothelial nitric oxide is mediated through Akt–endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway. *Diabetes* 2002; **51**(1): 168-173.
- 211) Duan C, Li M and Rui L. SH2-B promotes insulin receptor substrate 1 (IRS1)- and IRS2-mediated activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in response to Leptin. *Journal of Biological Chemistry* 2004; **279**(42): 43684-43691.
- 212) Carvalheira JB, Ribeiro EB, Folli F, Velloso LA, Saad MJ. et al. Interaction between Leptin and insulin signaling pathways differentially affects JAK-STAT and PI 3-kinase-mediated signaling in rat liver. *Biological chemistry* 2003; **384**(1): 151-159.
- 213) Zarkesh- Esfahani H, Pockley G, Metcalfe RA, et al. High-dose Leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes. *The Journal of Immunology* 2001; **167**(8): 4593-4599.
- 214) Mancuso P, Canetti C, Gottschalk A, et al. Leptin augments alveolar macrophage leukotriene synthesis by increasing phospholipase activity and enhancing group IVC iPLA2 (cPLA2 γ) protein expression. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2004; **287**(3): L497-L502.
- 215) Raso GM, Pacilio M, Esposito E, et al. Leptin potentiates IFN- γ -induced expression of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 in murine macrophage J774A. 1. *British journal of pharmacology* 2002; **137**(6): 799-804.

- 216) Caldefie-Chezet F, Poulin A, Tridon A, et al. Leptin: a potential regulator of polymorphonuclear neutrophil bactericidal action? *Journal of Leukocyte Biology* 2001; **69**(3): 414-418.
- 217) Caldefie-Chezet F, Poulin A, and Vasson MP. Leptin regulates functional capacities of polymorphonuclear neutrophils. *Free radical research* 2003; **37**(8): 809-814.
- 218) Tian Z, Sun R, Wei H, and Gao B. Impaired natural killer (NK) cell activity in Leptin receptor deficient mice: Leptin as a critical regulator in NK cell development and activation. *Biochemical and biophysical research communications* 2002; **298**(3): 297-302.
- 219) Tuzun A, Uygun A, Yesilova Z, et al. Leptin levels in the acute stage of ulcerative colitis. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2004; **19**(4): 429-432.
- 220) Sitaraman S, Liu X, Charrier L, et al. Colonic Leptin: source of a novel proinflammatory cytokine involved in IBD. *The FASEB journal* 2004; **18**(6): 696-698.
- 221) Eckman L, Jung HC, Shurer-Maly C, et al. Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: Regulated expression of IL8. *Gastroenterology* 1993; **105**: 1689-1697.
- 222) Sadlack B, Merz H, Schorle H, et al. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted IL-2 gene. *Cell* 1993; **75**: 253-261.
- 223) Trayhurn P. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta Physiologica Scandinavica* 2005; **184**(4): 285-293.
- 224) Cammisotto PG, Renaud C, Gingras D, et al. Endocrine and exocrine secretion of Leptin by the gastric mucosa. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2005; **53**(7): 851-860.
- 225) FitzGerald AJ, Mandir N, Goodlad RA. Leptin, cell proliferation and crypt fission in the gastrointestinal tract of intravenously fed rats. *Cell Prolif* 2005; **38**: 25-33.
- 226) Hardwick JC, van den Brink GR, Offerhaus GJ, Van Deventer SJ, and Peppelenbosch MP. NF-kappaB, p38 MAPK and JNK are highly expressed and active in the stroma of human colonic adenomatous polyps. *Oncogene* 2001; **20**(7): 819-827.
- 227) Buyse M, Sitaraman SV, Liu X, Bado A, and Merlin D. Luminal Leptin enhances CD147/MCT-1-mediated uptake of butyrate in the human intestinal cell line Caco2-BBE. *Journal of Biological Chemistry* 2002; **277**(31): 28182-28190.

- 228) Merlin D, Si-Tahar M, Sitaraman SV, Eastburn K, Williams I, Liu X, Hediger MA, and Madara JL. Colonic epithelial hPepT1 expression occurs in inflammatory bowel disease: transport of bacterial peptides influences expression of MHC class 1 molecules. *Gastroenterology* 2001; **120**: 1666. 1679.
- 229) Charrier L, Merlin D. The oligopeptide transporter hPepT1: gateway to the innate immune response. *Lab Invest* 2006; **86**: 538–46.
- 230) Buyse M, Ovesjo ML, Goiot H, Guilmeau S, Peranzi G, Moizo L, et al. Expression and regulation of Leptin receptor proteins in afferent and efferent neurons of the vagus nerve. *Eur J Neurosci* 2001; **14**: 64–73.
- 231) Plaisancie P, Ducroc R, El Homsy M, Tsocas A, Guilmeau S, Zoghbi S, et al. Luminal Leptin activates mucin-secreting goblet cells in the large bowel. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; **290**: G805–12.
- 232) El Homsy M, Ducroc R, Claustre J, Jourdan G, Gertler A, Estienne M, et al. Leptin modulates the expression of secreted and membrane-associated mucins in colonic epithelial cells by targeting PKC, PI3K, and MAPK pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; **293**: G365–73.
- 233) Attoub S, Noe V, Pirola L, Bruyneel E, et al. Leptin promotes invasiveness of kidney and colonic epithelial cells via phosphoinositide 3-kinase-, rho-, and rac-dependent signaling pathways. *The FASEB Journal* 2000; **14**(14): 2329-2338.
- 234) Isse N, Ogawa Y, Tamura N, Masuzaki H, et al. Structural organization and chromosomal assignment of the human obese gene. *J Biol Chem* 1995; **270**: 27728-27733.
- 235) Siegrist-Kaiser CA, Pauli V, Juge-Aubry CE, Boss O, Pernin A, Chin WW, et al. Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation* 1997; **100**(11): 2858.
- 236) Cohen P and Friedman JM. Leptin and the control of metabolism: role for stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1). *The Journal of nutrition* 2004; **134**(9): 2455S-2463S.
- 237) Quinton ND, Alisson JL, Ross RJM, Eastell R, Blakemore AIF: A single nucleotide polymorphism (SNP) in the Leptin receptor is associated with BMI, fat mass and Leptin levels in postmenopausal Caucasian woman. *Human Genet* 2001; 108:233-236.

- 238) Pechlivanis S, Bermejo JL, Pardini B, Naccarati A, Genetic variation in adipokine genes and risk of colorectal cancer. *European journal of endocrinology*, 2009; **160**(6): 933-940.
- 239) Matsuoka N, Ogawa Y, Hosoda K, Matsuda J, et al. Human Leptin receptor gene in obese Japanese subjects: evidence against either obesity-causing mutations or association of sequence variants with obesity. *Diabetologia* 1997; **40**(10): 1204-1210.
- 240) Thompson DB, Ravussin E, Bennett PH, Bogardus C. Structure and sequence variation at the human Leptin receptor gene in lean and obese Pima Indians. *Hum Mol Genet* 1997; **6**: 675–679.
- 241) Chagnon YC, Wilmore JK, Borecki IB, et al. Associations between the Leptin receptor gene and adiposity in middle-aged Caucasian males from the HERITAGE family study. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; **85**: 29–34.
- 242) Yiannakouris N, Yannakoulia M, Melistas M et al. The Q223R Polymorphism of the Leptin Receptor Gene Is Significantly Associated with Obesity and Predicts a Small Percentage of Body Weight and Body Composition Variability. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2001; **86**(9):4434–4439.
- 243) Chagnon YC, Chung WK, Perusse L, Chagnon M, Leibel RL, Bouchard C kages and associations between the Leptin receptor (LEPR) gene and human body composition in the Quebec Family Study. *Int J Obes* **23**: 278–286.
- 244) Chung WK, Power-Kehoe L, Chua M, et al. Exonic and intronic sequence variation in the human Leptin receptor gene (LEPR). *Diabetes* 1997; **46**: 1509–1511.
- 245) Slattery ML, Wolff RK, Herrick J. et al. Leptin and Leptin receptor genotypes and colon cancer: Gene–gene and gene–lifestyle interactions. *Int. J. Cancer* 2008; **122**: 1611–1617.
- 246) Moran O, ve Phillip M. Leptin: obesity, diabetes and other peripheral effects—a review. *Pediatric diabetes*, 2003; **4**(2): 101-109
- 247) Li WD, Reed DR, Lee JH, Xu W, Kilker RL, Sodam BR, Price RA. Sequence variants in the 50 flanking region of the Leptin gene are associated with obesity in women. *Ann Hum Genet* 1999; **63**: 227–34.
- 248) Stefan N, Vozarova B, Del Parigi A, Ossowski V, Thompson DB, Hanson RL, Ravussin E, Tataranni PA. The Gln223Arg polymorphism of the Leptin receptor in Pima Indians: influence on energy expenditure, physical activity and lipid metabolism. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; **26**: 1629–32.

- 249) Le Stunff C, Le Bihan C, Schrk NJ, Bougneres P: A common Promoter Variant of the Leptin Gene Is Associated With changes in the Relationship Between Serum Leptin and Fat Mass in Obese Girls. *Diabetes* 2000, **49**: 2196-2200.
- 250) Snoussi K, Strosberg AD, Bouaouina N. Leptin and Leptin receptor polymorphisms are associated with increased risk and poor prognosis of breast carcinoma. *BMC Cancer* 2006, **6**: 38.
- 251) Fain JN, Leffler CW, Cowan GS, Jr, Buffington C, Pouncey L, Bahouth SW. Stimulation of Leptin release by arachidonic acid and prostaglandin E(2) in adipose tissue from obese humans. *Metabolism* 2001; **50**: 921–8.
- 252) Stattin P, Lukanova A, Biessy C, Soderberg S, Palmqvist R, Kaaks R, Olsson T, Jellum E. Obesity and colon cancer: does Leptin provide a link? *Int J Cancer* 2004; **109**:149–52.
- 253) Stephenson GD, Rose DP. Breast cancer and obesity: an update. *Nutr Cancer* 2003; **45**: 1-16.
- 254) Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003; **348**:1625-38.
- 255) Cieslak J, Bartz M, Stachowiak M. Effect of three common SNPs in 50-flanking region of LEP and ADIPOQ genes on their expression in Polish obese children and adolescents. *Mol Biol Rep* 2012; **39**: 3951–3955.
- 256) Matthews, D.R., et al., *Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man*. *Diabetologia*, 1985. **28**(7): p. 412-9.
- 257) Addolorato G, Capristo E, Stefanini GF, and Gasbarrini G. Inflammatory bowel disease: a study of the association between anxiety and depression, physical morbidity, and nutritional status. *Scandinavian journal of gastroenterology* 1997; **32**(10): 1013-1021.
- 258) Saleh M and Trinchieri G. Innate immune mechanisms of colitis and colitis-associated colorectal cancer. *Nature Reviews Immunology* 2010; **11**(1): 9-20.
- 259) Ingersoll SA, Ayyadurai S, Charania MA, et al. (2012). The role and pathophysiological relevance of membrane transporter PepT1 in intestinal inflammation and inflammatory bowel disease. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2012; **302**(5) G484-G492.

- 260) Otero M, Lago R, Gomez R, et al. Towards a pro-inflammatory and immunomodulatory emerging role of leptin. *Rheumatology (Oxford)* 2006;**45**: 944–950
- 261) Barbier M, Vidal H, Desreumaux P, et al. Overexpression of leptin mRNA in mesenteric adipose tissue in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterol Clin Biol* 2003;**27**: 987–991.
- 262) Afify M, Sayed M and Elhammady A. Clinical utility of biochemical markers in ulcerative colitis among Egyptian patients. *Journal of American Science* 2010; **6**(6): 146-155).
- 263) Kirchgessner TG, Uysal T, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Tumor necrosis factor- α contributes to obesity-related hyperleptinemia by regulating leptin release from adipocytes. *J Clin Invest* 1997; **100**: 2777-2782.
- 264) Bruun JM, Pedersen SB, Kristensen K, Richelsen B. Effects of pro-inflammatory cytokines and chemokines on leptin production in human adipose tissue in vitro. *Mol Cell Endocrinol.* 2002; **190**(1-2): 91-9.
- 265) Ensembl Genome Browser. Eriřim 09.02.2014, http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?r=7:127878283127879283;v=rs7799039;vdb=variation;vf=5521951.
- 266) Sahin S, Rüstemoğlu A, Tekcan A. et al. Investigation of Associations between Obesity and *LEP* G2548A and *LEPR* 668A/G Polymorphisms in a Turkish Population *Disease Markers* 2013; **35**(6) 673–677.
- 267) Ensembl Genome Browser. Eriřim 09.02.2014, http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=1:66058013-66059013;v=rs1137101;vdb=variation;vf=896473
- 268) Becer E, Mehmetçik G, Bareke H, and Serakıncı N. Association of leptin receptor gene Q223R polymorphism on lipid profiles in comparison study between obese and non-obese subjects. *Gene*, 2013; **529**(1): 16-20.
- 269) Özçam DH, And Kumbasar DD. A. B. Tip 2 diyabetli Obez ve Obez olmayanlarda leptin ve adiponektin düzeylerinin insülin direnci ile ilişkisi.
- 270) Silha JV, Krsek M, Skrha JV, et al. Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects: correlations with insulin resistance. *European Journal of Endocrinology* 2003; **149**(4): 331-335
- 271) Mohamed-Ali V, Pinkney JH, and Coppack SW. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *International journal of obesity* 1998; **22**: 1145-1158.

- 272) Mammes O, Betoulle D, Aubert R, et al. Association of the G-2548A polymorphism in the 5' region of the LEP gene with overweight. *Annals of human genetics*, 2000; **64**(5): 391-394.
- 273) Grunfeld C, Zhao C, Fuller J, et al. Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. *J Clin Invest* 1996;97: 2152–2157.
- 274) Singh UP, Singh NP, Guan H, et al. The emerging role of leptin antagonist as potential therapeutic option for inflammatory bowel disease. *International reviews of immunology* 2014; **33**(1): 23-33.
- 275) Singh UP, Singh N, Singh B, et al. Pegylated leptin antagonist ameliorates colitis by inducing regulatoryT cells (Tregs) partially mediated byTGF-beta induction. *J Immunol* 2011;186:162.4–4 (Abstract).
- 276) Singh UP, Singh NP, Guan H, et al. Leptin antagonist ameliorates chronic colitis in IL-10–/– mice. 2013; S0171-2985 (13) 00095-8. doi: 10. 1016/j.imbio.2013.04.020. [Epub ahead of print].



**T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
İstanbul İli Anadolu Kuzey Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği
Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu**

Sayı : B.10.1.TKH.4.34.H.GP.0.01/ 6

..../02/2013

Konu : Onay Yazısı

**HASTANE YÖNETİCİLİĞİNE
(Prof. Dr Bedia AĞAÇHAN'a iletmek üzere)**

14.02.2013 tarihinde yapılan Ümraniye Eğitim Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul toplantısında “Leptin G-2548A ve LEPTİNR-Q223R gen varyantlarının inflamatuvar barsak hastalıkları ile ilişkisinin araştırılması” isimli tez çalışmanızın gerçekleştirilmesinde etik açıdan bir sakınca olmadığına oy çokluğu ile karar verilmiştir.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

**Prof. Dr. Sait NADERİ
ETİK KURUL BAŞKANI**

Ek1:Form(2 sayfa)

**SAYI: 2807
TARİH: 19.02.2013
NEHAYE:**

Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesi. Etik Kurul
Adres: Kazım Karabekir Mahallesi. Adem Yavuz Caddesi. No:7 PK. 34760 Ümraniye/İSTANBUL
Tel: (0216) 632 18 18/2341 Faks: (0216) 632 71 21-24

ÖMRANİYE EAH KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	LEPTİN G-2548A VE LEPTİN-R-Q223R GEN VARYANTLARININ İNFLAMATUAR BARSAK HASTALIKLARI İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI			
	ARAŞTIRMA PROTOKÖL KODU				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Bedi Ağaçhan			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Moleküler Tıp			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ DENEYSEL TIP ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ			
	DESTEKLEYİCİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YAŞAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ	FAZ 1		☐	
		FAZ 2		☐	
		FAZ 3		☐	
FAZ 4			☐		
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon		☐		
	Yüksek Doz Araştırması		☐		
	Diğer ise belirtiniz. İlaç Dışı Deneysel Araştırma				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ	ÇOK MERKEZLİ x	ULUSAL x	ULUSLARARASI ☐	

ÜMRANIYE EAH KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Tarih: 12.02.2013		Türkçe x İngilizce ☐	Diğer ☐		
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe x İngilizce ☐	Diğer ☐			
OLGU RAPOR FORMU			Türkçe İngilizce ☐	Diğer ☐			
ARAŞTIRMA BROŐURU			Türkçe İngilizce ☐	Diğer ☐			
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama : Araőtirma protokolü, Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu Uygundur					
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐					
	SİĞORTA	☐					
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒					
	BİYOLÖJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐					
	HASTA KARTI/GÜNÜKLÜKLERİ	☐					
	ILAN	☐					
	YILLIK BİLDİRİM	☐					
	SONUÇ RAPORU	☐					
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐					
DİĞER:	☐	Anabilim dalı başkanlığından üst yazı, akademik kurul kararı, literatür kaynağı, sorumluluk paylaşım belgesi, olgu rapor formu, ilgili elemanların bilgilendirildiğine dair belge, cv, cd					
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 12	Tarih: 14.02.2013	Yukarıda bilgileri verilen deneme/araőtirma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araőtirmanın gerekeceğ, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıda katılan Etik Kurulu üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir				

ÜMRANIYE EĞİTİM ve ARAŞTIRMA HASTANESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

ALIŐIMA ESAS: Klinik Araőtirmalar Hakkında Yönetmelik, İy Klinik Uygulamaları Kılavuzu

AŐKANIN UNVANI / ADI / SOYADI: Prof.Dr.SAİT NADERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araőtirma ile İlişki		Katılım *		İmza
İOF DR. SAİT NADERİ	BEYİN CERRAHI	ÜMRANIYE EAH	☒	☐	☐	☒	☒	☐	
�� DR. NURTEN BAKAN	ANESTEZİ VE REANİMASYON	ÜMRANIYE EAH	☐	☒	☐	☒	☒	☐	
�� DR. GÖZDE KIR	PATOLOJİ	ÜMRANIYE EAH	☐	☒	☐	☒	☒	☐	
İOF DR. GÖKSEL ŐENER	FARMAKOLOJİ	MARMARA �Nİ ECZACILIK FAKÜLTESİ	☐	☒	☐	☒	☒	☐	
ZM DR. PINAR EKER	BİYOKİMYA	ÜMRANIYE EAH	☐	☒	☐	☒	☒	☐	
�� DR. FİKRET FATHİ ONOL	ÜROLOJİ	ÜMRANIYE EAH	☒	☐	☐	☒	☒	☐	
�� DR. GÜLTEN DİNÇ	DEONTOLOJİ	İSTANBUL �Nİ CERRAHPAŐA TIP FAK	☐	☒	☐	☒	☒	☐	
VUKAT FİLİZ TEMİZ ONER	AVUKAT	�MRAN HUKUK BÜROSU	☐	☒	☐	☒	☒	☐	
USEYİN SARUHAN	VATANDAŐ	TST	☒	☐	☐	☒	☒	☐	
ZM DR. ÖZGÜ KESMEZACAR	HALK SAĐLIĐI	İSTANBUL HALK SAĐLIĐI M�D	☐	☒	☐	☒	☐	☒	
�� DR. RAMAZAN KOZAN	FİZYOLOJİ	İSTANBUL MEDENİYET ÜNİ TIP FAKÜLTESİ	☒	☐	☐	☒	☐	☒	

* :Toplantıda Bulunma

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Arzu	Soyadı	DOĞAN
Doğ. Yeri	KONYA	Doğ. Tar.	14.03.1981
Uyruğu	T.C	TC Kim No	41761379288
Email	arzu.dogan81@hotmail.com	Tel	0543 245 2500

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ	
Lisans	KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ	2006
Lise	SİLİVRİ LİSESİ	1998

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	BİYOLOJİ ÖĞRETMENLİĞİ	TOKİ CUMHURİYET ANADOLU LİSESİ	2011-2012
2.	SATIS VE OPERASYON SORUMLUSU	HAMOGLU HOLDİNG- KIZKULESİ	2010- 2011

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İNGİLİZCE	ÇOK İYİ	İYİ	İYİ		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Windows XP,	İYİ
MS Word, Excel	İYİ
PowerPoint	İYİ

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri**Özel İlgi Alanları (Hobileri):**

DANS, TENİS