

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**İLTİHABİ BARSAK HASTALIKLARINDA İNTERLÖKİN 23 RESEPTÖR
VE ATG16L1 GEN POLİMORFİZMLERİ VE KLİNİKLE İLİŞKİSİ**

Uz. Dr. Gökhan KABAÇAM

GASTROENTEROLOJİ BİLİM DALI
YAN DAL UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Murat TÖRÜNER

ANKARA

2011

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasında bana destek ve yardımlarını esirgemeyen,yol gösteren tez danışmanım Prof.Dr.Murat Törüner'e, gastroenteroloji uzmanı olarak yetişmemde katkıları olan başta Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Kadir Bahar olmak üzere bilim dalının değerli öğretim üyeleri Ali Özden, Abdülkadir Dökmeçi, Necati Örmeci, Selim Karayalçın, Cihan Yurdaydın, Ali Reşit Beyler, Hasan Özkan, Hülya Çetinkaya, Murat Palabıyıköğlü, Hakan Bozkaya, İrfan Soykan, Ramazan İdilman, Kubilay Çınar ve Mehmet Bektaş'a, laboratuvar çalışmalarında özverili yardımlarını esirgemeyen Hepatoloji Enstitüsü'nden Prof. Dr Mithat Bozdayı ve Biyolog Senem Ceren Karataylı'ya, klinik çalışmalarında ve bu çalışma için kontrol grubu gerektiğinde bana çok yardımları dokunan başta Hepatoloji Polikliniği sekreterleri Filiz Güzel ve Seyhan Ocakoğlu olmak üzere tüm gastroenteroloji ve dahiliye asistanları, hemşireler, sekreterler ve klinik personeline, beni yetiştirip bugünlere gelmemi sağlayan aileme, desteğini ve varlığını hep yanımda hissettiğim sevgili eşim Gülşah'a ve doğumundan beri ışığımız olan biricik kızım İlay'a teşekkürü borç bilirim.

Uz. Dr. Gökhan KABAÇAM

İÇİNDEKİLER

Önsöz ve Teşekkür	ii
İçindekiler	iii
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini.....	v
Şekiller Dizini.....	vii
Tablolar Dizini	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. İltihabi Barsak Hastalıkları	2
2.1.1. İltihabi Barsak Hastalıkları'nda Etyoloji	2
2.1.2. İltihabi Barsak Hastalıkları'nda Genetik ve immünopatogeneze Yenilikler	4
2.1.3. Otofaji.....	5
2.2. Gen Polimorfizmleri.....	8
2.2.1. İnterlökin 23 Reseptör Gen Polimorfizmi.....	8
2.2.2. ATG16L1 Gen Polimorfizmi	9
2.2.3. Ülkemizdeki durum	10
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	11
3.1. Verilerin Toplanması	11
3.2. DNA Eldesi ve Gen Polimorfizmlerinin Tespiti	12
3.2.1. Primerler	12
3.2.2. Kimyasallar	13
3.2.3. Restriksiyon Endonükleazlar	13
3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Malzemeleri.....	14
3.2.5. Standart Çözeltiler ve Tamponlar.....	14
3.2.6. DNA İzolasyonu	15
3.2.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	16
3.2.8. Restriksiyon Endonükleaz Analizi	17
3.2.9. Agaroz Jel Elektroforezi	17
3.2.10. Genotipler	17
3.3. İstatistiksel Değerlendirme	18

4. BULGULAR.....	19
5. TARTIŞMA.....	25
6. SONUÇLAR.....	29
ÖZET.....	30
SUMMARY.....	31
KAYNAKLAR.....	32

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- İBH:** İltihabi Barsak Hastalıkları
IL23R: Interlökin 23 Reseptörü
ATG16L1: Autophagy 16 – like 1
ÜK: Ülseratif Kolit
CH: Crohn Hastalığı
HLA: Human Leucocyte Antigen
NOD2: Nitrik Oksit Dismutaz 2
CARD15: Caspase Recruitment Domain 15
TNF α : Tümör Nekrozis Faktör α
IRGM: Immunity Related GTPase related family, M
Th: T yardımcı hücresi
INF- γ : Interferon γ
TLR: Toll Like Reseptörler
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
DNA: Deoksiribonükleik Asit
PSK: Primer Sklerozan Kolanjit
AS: Ankilozan Spondilit
EN: Eritema Nodosum
PG: Pyoderma Gangrenozum
RFLP: Restriksiyon parçacığı uzunluk polimorfizmi
PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA: Ribonükleik Asit
RE: Restriksiyon endonükleaz
G: Guanin
A: Adenin
HWD: Hardy Weinberg Dengesi
Hb: Hemoglobin
PLT: Trombosit
BK: Beyak küre
ESR: Eritrosit Sedimentasyon Hızı

CRP: C – Reaktif Protein
ALT: Alanin – amino transferaz
AST: Aspartat – amino transferaz
ALP: Alkalen Fosfataz
GGT: Gama – Glutamil transpeptidaz
5 – ASA: 5 – Aminosalisilat
CS: Corticosteroid
AZA: Azathioprin
6MP: 6 – Merkaptoprin
Anti – TNF: Anti – Tümör Nekrozis Faktör
CSA: Siklosporin A
MTX: Metotreksat.
TGF: Transformin Growth Factor

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Otofajinin basamakları	7
Şekil 1.2. İnterlökin 23 reseptör kompleksi ve intraselüler etkileri	9

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan primer dizileri	12
Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan restriksiyon endonükleazlar	14
Tablo 3.3 Çalışmada kullanılan çözeltilerin ve tamponların içerikleri	15
Tablo 3.4 Uygulanan PZR içeriği ve koşulları	16
Tablo 3.5. Her iki gen için belirlenen genotipler	17
Tablo 4.1. Katılımcıların demografik özellikleri ve hastalık karakteristikleri	20
Tablo 4.2. Hastaların akut faz reaktanları, hematolojik ve biyokimyasal değerleri	21
Tablo 4.3. Hastaların kullandıkları tedaviler	21
Tablo 4.4. Grupların genotip ve alel frekansları ve hastalık ilişkisi	22
Tablo 4.5. İBH'da IL23R ve ATG16L1 Genotip – Fenotip etkileşimleri.....	23

1. GİRİŞ ve AMAÇ

İltihabi Barsak Hastalıkları (İBH) immün sistem ve barsaktaki bakteriler gibi lüminal faktörlerin etkileşiminde bozulma sonrası oluşan kronik iltihabi hastalıklardır. Kesin etyolojileri bilinmese de, çeşitli çalışmalarda güçlü bir genetik yatkınlık olduğu tespit edilmiştir. Son yıllarda gelişen teknolojinin de desteğiyle tüm genomda yapılan ilişki çalışmaları sonucunda hastalıkla kuvvetli şekilde ilişkili bulunan bazı gen polimorfizmleri tespit edilmiştir. Bunlardan Interlökin 23 reseptör (IL23R) geni kromozom 1p31 bölgesinde yer alır ve proinflamatuvar bir sitokin olan IL – 23’ün reseptörünü kodlar. Bu gendeki R381Q polimorfizmi, Crohn hastalığı ve ülseratif kolitle koruyucu yönde ilişkili bulunmuştur. Bir diğer polimorfizm ise Autophagy 16 – like 1(ATG16L1) geninde bulunmuştur. Kromozom 2q37.1 bölgesinde yerleşen bu genin ürünü, bakteri ve viral partiküllerin ürettiği proteinlerin doğal immün yanıt aracılığıyla hedeflenip yok edilmesini sağlar. Bu gendeki T300A polimorfizminin, Crohn hastalığı riskini arttırdığı gösterilmiştir. Genetik faktörlerle ilgili çalışmalar, değişik toplumlarda farklı sonuçlar vermektedir. Bu alanda ülkemizde yapılmış bir çalışma yoktur.

Bu çalışmanın amacı, İBH’da IL23R ve ATG16L1 gen polimorfizmi sıklığında normal popülasyona göre fark olup olmadığını tespit etmek ve bu polimorfizmlerin birbiriyle ilişkisinin yanı sıra hastalık seyri, şiddeti, tutulumu, tedavi yanıtı gibi klinik parametreler üzerine olan etkisini değerlendirmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İltihabi Barsak Hastalıkları

İltihabi Barsak Hastalıkları (İBH), kolon ve ince barsak başta olmak üzere tüm gastrointestinal sistemde kronik, tekrarlayıcı iltihabi değişikliklerle seyreden hastalıklardır. Başlıca Ülseratif Kolit (ÜK) ve Crohn Hastalığı (CH) olmak üzere iki klinik formu vardır. Bu iki hastalığın patolojik ve klinik özellikleri birbirinden ayrıdır. Patogenezleri de henüz netlik kazanmamıştır.

Ülseratif Kolit insidansı, Kuzey Amerika, İskandinavya, İngiltere gibi ülkelerde fazlayken, sıcak iklimli ve az gelişmiş ülkelerde daha az rapor edilmektedir. Amerika ve Norveç'ten bildirilen verilere göre insidans 100,000'de 15 ile 12.8'dir (1,2). Ülkemizde bu alanda yapılmış en önemli çok merkezli çalışmanın sonuçlarına göre ise ÜK insidansı 4.4/100,000 bulunmuştur (3). Yine Trakya bölgesinden yapılan bir başka çalışmada ise insidans, 0.69/100.000, prevalans kentsel kesimlerde daha fazla olmak üzere 4.9/100.000 bulunmuştur (4). Literatürde gelişmiş ülkelerden bildirilen ÜK prevalansı ise 37 – 246/100,000 aralığındadır (5).

Son yıllarda ÜK insidansı sabit kalır veya düşerken, Crohn Hastalığı'nda giderek artış olduğu bildirilmektedir (6 – 8). CH'de ÜK gibi kuzey ülkeleri ve gelişmiş toplumlarda daha yaygın görülmektedir. İnsidansı 4.3 ile 5.8/100,000 oranında bildirilmiştir. Prevalans ise geniş serilerde 26 – 201/100.000 olarak ifade edilmektedir (5).

Bu denli sık görülen ve sıklığı son yıllarda giderek artan İBH'nin etyolojisi ile ilgili çeşitli teoriler vardır.

2.1.1. İltihabi Barsak Hastalıkları'nda Etyoloji

İBH'nin etyolojisi henüz net olarak bilinmese de, genetik yatkınlığı olan bireylerin intestinal floradaki mikroorganizmalar gibi çevresel bazı faktörlerle karşılaşması sonucu olduğu düşünülmektedir. Risk faktörleri arasında şunlar vardır:

Etnik ve Irksal Faktörler: Yahudi ırkında her iki hastalık da daha sık bildirilmektedir. Avrupa ve Amerika doğumlu yahudilerde Asya ve Afrika doğumlulara göre daha sık

olması, muhtemelen genetik zeminde çevresel faktörlerin de rol oynadığını düşündürmektedir (9). Beyaz olmayan ırkta daha az görülen hastalık, şehirleşmeyle birlikte giderek artmaktadır (10).

Yaş ve Cinsiyet: Çoğu vakada hastalık, 15 – 40 yaşları arasında başlarken, 50 – 80 yaşları arasında insidans ikinci bir tepe yapmaktadır (Bimodal dağılım) (3, 11). Erkeklerde hastalık, kadınlardan daha sık görülmektedir.

Genetik Faktörler: Etkilenen bireylerin % 10 – 25’inde 1. derece aile fertlerinde hastalık saptanmaktadır. Bu hastalarda, hastalık lokalizasyonu ve ciddiyeti bile benzer özellikler taşımaktadır (12, 13). Monozigot ikizlerde konkordansın arttığı bildirilmiştir. HLA çalışmalarında ise ÜK ile DR2’nin, CH ile DR1 – DQ5’in ilişkili olduğu gösterilmiştir (14, 15).

İBH’de hastalıkla ilişkisi konfirme edilen ilk gene IBD1 adı verilmiştir. On altıncı kromozomda yer alan bu genin kodladığı NOD2(CARD15), CH hastalarının % 42’sinde pozitif saptanmış ve erken hastalık gelişimi ile ilişkili bulunmuştur (16). NOD2 geninin yanı sıra, Interlökin (IL)-1 β , IL-10, TNF α and IL-1Reseptör antagonisti, gibi bazı çalışmalarda hastalıkla ilişkisi gösterilmiş genlerle ilgili ülkemizde yapılan araştırmalarda, anlamlı ilişki saptanmamıştır (17, 18).

Son yıllarda IL - 23 Reseptör geni, otofaji ile ilişkili genler olan ATG16L1 ve IRGM gibi genlerle ilişkili çok sayıda çalışma yapılmıştır (19, 20) ve ayrıntılı olarak değinilecektir.

Turner sendromu, Hermansky – Pudlak Sendromu, Glikojen depo hastalığı Tip 1b gibi hastalıklarda daha sık İBH geliştiği bildirilmiştir (21 – 23).

Enfeksiyonlar ve İntestinal Mikroflora: İBH lezyonlarının çoğunlukla bakteri yoğunluğu fazla olan bölgelerde olduğu bilinmektedir. Akut gastroenteritlerden, özellikle de Salmonella, Campilobakter gibi ajanlara bağlı olanlardan sonraki ilk yılda bir miktar risk artışı olduğu gösterilmiştir. CH ile kızamık virusu, Mycobacterium paratuberculosis ve paramyxovirus gibi ajanlar arasında henüs kanıtlanamamış bir ilişki olduğu düşünülmektedir (24).

Sigara: Halen sigara içenlerde ÜK riski % 40 az iken, sigarayı bırakmışlarda hiç içmeyenlere göre risk 1.7 kat artmıştır (25). Öte yandan, sigara içmek CH riskini 2 kattan fazla artırmaktadır (26).

Diyet: Batı tipi beslenmenin en önemli karakteristikleri olan işlenmiş, kızartılmış ve şekerli gıda ürünlerinin İBH riskini artırdığı kabul edilmektedir. İnek sütüne karşı duyarlılık, rafine şekerlerin çok tüketilmesi, azalmış lifli gıda ve sebze tüketimi, yüksek oranda yağ, özellikle de hayvansal yağların tüketilmesi de riski artırdığı gösterilen beslenme faktörleridir. Akut ataklar sırasında oluşan immünolojik alevlenmenin kontrol edilebilmesi için oral alımın kesilmesinin rasyoneli de budur (27, 28).

İlaçlar: Oral kontraseptiflerle İBH riskinin 2.5 kata kadar arttığını bildiren yayınlar olduğu gibi, anlamlı ilişki gösterilmemiş yayınlar da mevcuttur. Non – steroid anti – inflamatuvar ilaçlarla riskin arttığı yönünde bildirimler vardır (29, 30).

Psikososyal Faktörler: Hastalığın oluşması veya aktivasyonu ile ilişki bulunmasa da muhtemelen enterik sinir sisteminin alevlenmesi yoluyla semptomların artışına neden olabilmektedir(31).

Apendektomi: Genç yaşlarda yapılan apendektominin ÜK gelişiminden koruduğu bildirilmiştir(32).

2.1.2. İltihabi Barsak Hastalıkları'nda Genetik ve İmmünopatogeneze Yeni Yorumlar

Güncel veriler ışığında, ÜK ve CH'nin patogenezi immün sistem ve barsak lümeniyle ilgili faktörler önem taşımaktadır. Kalıtım modelleri kompleks ve İBH'ler için risk yaratan bazı ortak yatkınlık genleri vardır. Yapılan çalışmalarda yaklaşık 30 yatkınlık geni tespit edilmiştir (33). Bu genetik faktörlerin, çevresel faktörlerle, birbirleriyle ve immün sistemle nasıl etkileşimleriyle ilgili çalışmalar devam ederken, hastalığı daha iyi anlamamıza ve tedavi etmemize olanak sağlayacak gelişmeler olmaktadır.

Barsak mukozası, mikroptan zengin lümen ve steril diğer dokular arasında bariyer oluşturmaktadır. Bu aşamada, mukozal immün sistemin, normal lümenal floraya

yönelik uygunsuz artmış aktivasyonu, İBH'deki kronik intestinal inflamasyona neden olmaktadır. İmmün sistemin uygunsuz artmış aktivitesinin nedeni, epitel bariyerde, doğal ve kazanılmış immünitedeki defektlerden kaynaklanabilir.

Doğal immünite, antijen sunan dendritik hücreler, makrofajlar ve doğal öldürücü hücreler ile invazyon yapan mikroorganizmalara karşı ilk kontağı kurar. Daha sonra bunların saldığı medyatörlerle T hücre aktivasyonu (kazanılmış immünite) olur. Aktive olan T hücreleri salgıladıkları pro ve anti – inflamatuvar ajanlara göre isimlendirilirler. Th1 (T yardımcı – 1) hücreleri, IL12, IL2, INF - γ ; Th2 hücreleri ise IL4, 5, 10 ve 13 salgılar. İnsanda, CH'nin Th1, ÜK'nin ise Th2 aracılıklı hastalıklar olduğu düşünülmektedir. Son yıllarda, IL17 ve 6 salgılayan yeni bir T hücre tipi bulunmuştur. Th17 adı verilen bu hücreler, intestinal inflamasyonda anahtar rol oynamaktadır. Bu hücrelerin aktive olması için yeterli IL23 etkisine gereksinimi vardır (34).

2.1.3. Otofaji

Kelime anlamı hücrenin “Kendisini yemesi”dir. En basit örneğı, uzamış açlıkta hücrenin kendi metabolik ihtiyaçlarını gidermek için bazı organel ve yapılarını sindirmesidir (35). Otofajinin; mikrootofaji, makrootofaji, şaperon – aracılıklı otofaji gibi, mekanizma ve fonksiyonları farklı subtipleri olduğu bilinmektedir (Şekil 2.1.).

Otofajinin Fizyolojik Fonksiyonları(36):

- Metabolik stresten korunma; besin eksikliği, büyüme faktörü azlığı, hipoksi gibi durumlara adaptasyon.
- Hücrenin temizlikçisi görevi; defektif protein ve organellerin eliminasyonu, anormal protein birikiminin önlenmesi, intraselüler patojenlerin ortadan kaldırılması (Xenofaji).
- Genomik instabilitenin önlenmesi; DNA hasarı ve kromozomal instabilitenin azaltılması.
- Hücre ölümü; apoptozis dışında programlı hücre ölümüne aracılık edilmesi.

Otofaji ve Barsak İmmünitesi:

Otofaji ve doğal immünite, patojenlere karşı en eski savunma yöntemlerinden olduğu ve bazı ortak mekanizmalar kullandıkları bilinmektedir (37). *Toll like* reseptörler (TLR), intestinal homeostaz, hasar tamiri ve patojene maruziyet durumlarında gerekli

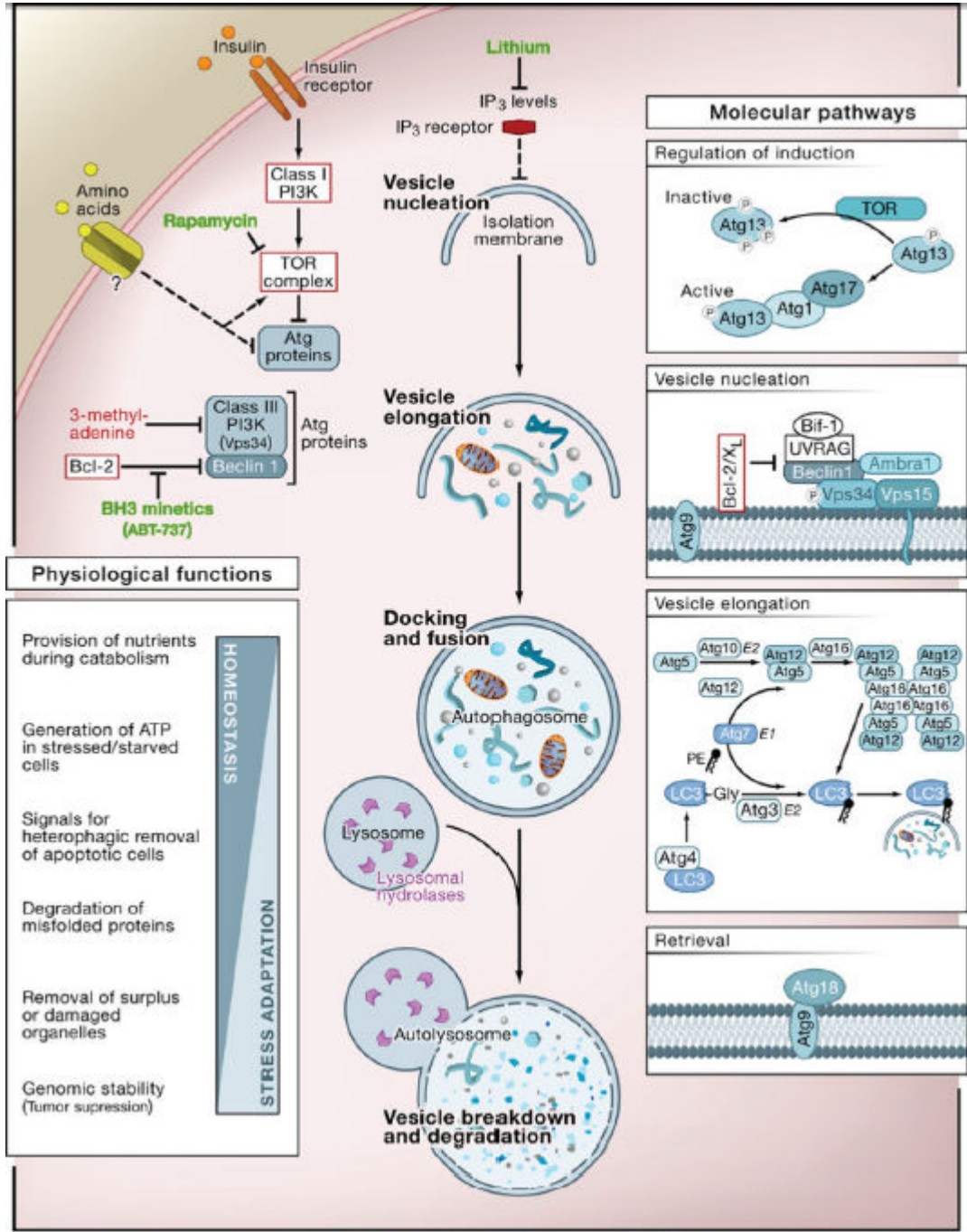
bir doğal immün yanıt bileşenidir. Son yıllarda, otofaji, TLR sinyalleri ve fagositoz arasında direk bir bağlantı olduğu gösterilmiştir (38).

Barsakta, otofaji ve doğal immüitenin bulunduğu en önemli hücre “Paneth” hücreleridir. Bu hücreler, kripta tabanlarında yer alır ve patojenle karşılaştığında, onları reseptörler aracılığıyla tanır ve otofaji mekanizmasıyla elimine ederler, ayrıca salgıladıkları defensin gibi medyatörlerle mukoza ile lümendeki yüksek kommensal bakteri yükü arasında bariyer oluşturarak, aşırı inflamatuvar yanıt oluşmasını önlerler (39).

Çeşitli ATG proteinleri, ki bunların arasında ATG16L’de vardır, bir kompleks oluşturarak, otofagozom yapısına katkıda bulunurlar. Hayvan modellerinde, ATG16L defektinin, otofagozom oluşumunu bozduğu ve uzun yarı – ömrü olan proteinlerin yıkımının ciddi şekilde sekteye uğradığı gösterilmiştir. Bunun sonucunda Salmonella, Listeria gibi organizmaların Xenofajisini bozduğu bulunmuştur. Ayrıca, ATG16L1’i olmayan makrofaj ve paneth hücrelerinin, lipopolisakkaritle uyarıldığında, yüksek miktarda IL1 β ve IL18 salgıladıkları gösterilmiştir (40). Bu aberan hücrelerin mikroorganizmaları elimine etme kabiliyetleri azalmaktadır.

ATG16L1’de görülen mutasyonlar, intestinal mikroorganizmaların eliminasyonu dışında, vücudun kendi dokularına karşı olan “self – tolerance”ını da bozmaktadır. Majör Doku Uyumluluk Kompleksi, sınıf II moleküllerinin aracılık ettiği otoantijen sunumundaki immün – toleransın bozulmasına neden olarak immün aracılıklı inflamasyona neden olmaktadır (41).

Öne sürülen diğer olası mekanizma, otofajide görülen defektin neden olduğu çarpaz etkileşimlerle epitel hücre apoptozisini hızlandırırken, inflamatuvar hücre apoptozisini azaltmasıdır. Bu konuda da giderek artan kanıtlar bulunmaktadır (42).



Şekil 2.2. Otofajinin basamakları: vezikül nükleasyonu (fagofor oluşumu), vezikül elongasyonu ve tamamlanması, çift membranlı otofagozomun lizozomla birleşerek otolizozom halini alması, otofagozomun iç zarının lizisi ve içeriğın sindirilmesi. Yolakların inhibitörleri kırmızı, aktivatörleri yeşil renktedir. ATG proteinleri, belirli basamaklarda kompleksler oluşturarak görev yapmaktadır (Levine ve Kroemer, Cell 2008) (36).

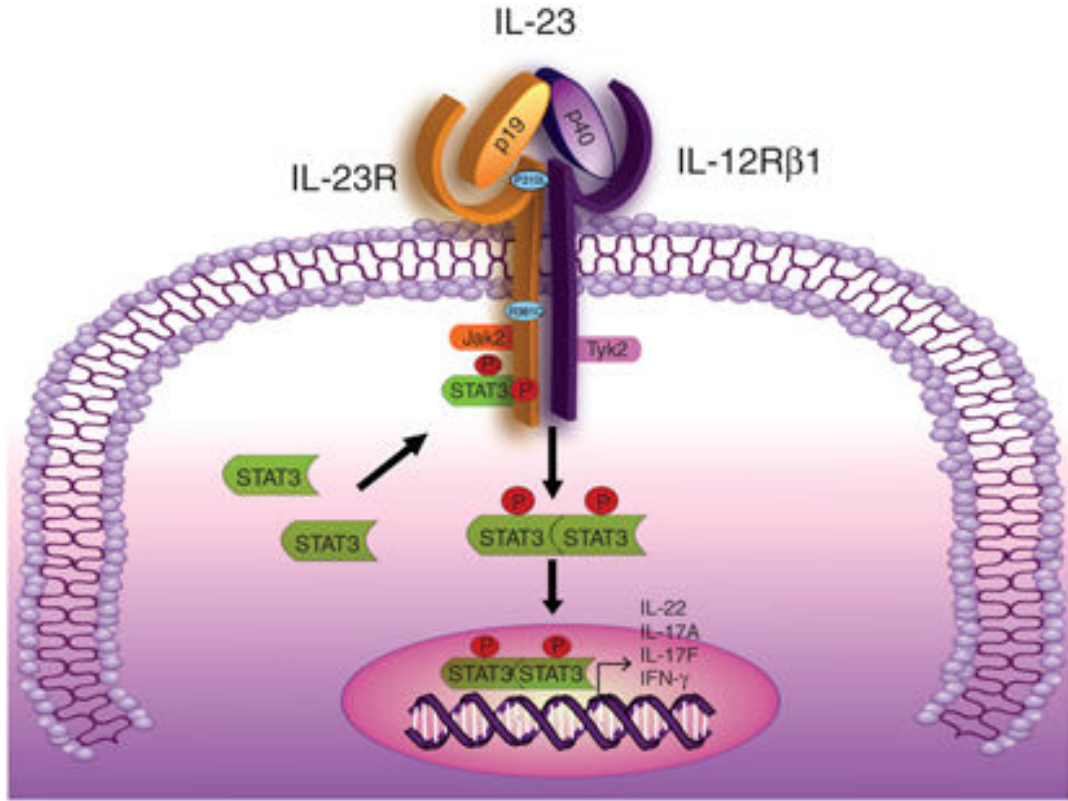
2.2. Gen Polimorfizmleri

Son yıllarda, İBH başta olmak üzere bir çok hastalığın patogeneğinde çığır açan “Genome Wide Association” yani, genom boyunca rastgele, herhangi bir hipoteze dayanmadan, binlerce mutasyonun tespitine yönelik çalışmalar yapılmıştır.

2.2.1. Interlökin 23 Reseptör Gen Polimorfizmi

Duerr ve arkadaşları, 2006 yılında Avrupa’lı 567 ileal CH ve 571 kontrol hastasında, 300,000’den fazla “Single Nucleotide Polymorphism (SNP)”yi taramıştır (19). CH ile anlamlı ilişki bulunan SNP, kromozom 1p31’de yer alan IL23 reseptör (IL23R) genindeki rs11209026 polimorfizmidir. Buna göre gerçekleşen R381Q amino asit değişimi, CH gelişiminden koruyucu bulunmuştur (Odds Ratio = 0.26, % 95 Güvenlik Aralığı(GA)(0.15 – 0.43). Bu koruyucu ilişki daha sonra birçok toplumda yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır (43 - 45). IL23R polimorfizminin, K ile ilişkisi de başka çalışmalarda gösterilmiştir (46).

IL23’n otoimmün ve kronik hastalıklarda rol alan bir pro – inflamatuvar medyatör olduğu ve Th17 aksında yer aldığı bilinmektedir. IL23R, IL23 reseptörünün iki subnitinden birisidir ve T hafıza hücrelerinin çoğalmasında ve Th17 başta olmak üzere T hücrelerinden sitokin üretimini artırmaktadır (şekil 2.2). Bu çalışmalardan sonra, IL23 ve yakın ilişkide olduğu IL12 inhibitörlerinin CH tedavisinde kullanılmasıyla ilgili çalışmalar yapılmaya başlanmıştır (47).



Şekil 3.2. İnterlökin 23 reseptör kompleksi ve intraselüler etkileri (48).

2.2.2. ATG16L1 Gen Polimorfizmi

İBH ile ilgili yapılan diğer tüm genomda ilişki araştırmasında, 735 CH ve 368 kontrol karşılaştırılmış, kromozom 2q37.1’de kodlanan “*Autophagy – Related 16 – Like Gene(ATG16L1)*”de görülen rs2241880 SNP’sinin, CH riskinde anlamlı artışa neden olduğu bulunmuştur. Bu SNP’de 300. Amino asitteki threonin, alanine dönüşmektedir (T300A). CH riskinde artışın yanı sıra, erken yaşta hastalık başlaması, ileal tutulumun daha sık olması gibi fenotipik değişimlere ve tedavi yanıtında farklılığa neden olduğu bildirilmiştir. Bu SNP’nin, ÜK ile ilişkisi olmadığını bildiren çalışmaların yanı sıra, zayıf da olsa artırıcı olduğunu bildiren yayınlar da vardır (20, 49 – 51). Söz konusu SNP’yi taşıyan bireylerde, Paneth hücrelerinde anormallikler görüldüğü, Xenofajinin bozulduğu, apoptozis ve “*self – tolerance*”ın bozulduğu saptanmıştır.

2.2.3. Ülkemizdeki durum:

Genetik faktörlerle ilgili çalışmalar, değişik toplumlarda farklı sonuçlar verebilmektedir. Bu polimorfizmlerin ÜK ve CH gelişmesi ve fenotipiyle ilişkisiyle ilgili bir çok ülkeden geniş katılımlı çalışmalar yapılmıştır, ancak ülkemizde yapılmış bir çalışma yoktur. İBH insidansının giderek arttığı da düşünülecek olursa böyle bir çalışmayı ülkemizde yapmanın önemi ortaya çıkmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, ülkemizde İBH hastalarında IL23R ve ATG16L1 gen polimorfizmi sıklığında normal popülasyona göre fark olup olmadığını tespit etmek ve bu polimorfizmlerin birbiriyle ilişkisinin yanı sıra hastalık seyri, şiddeti, tutulumu, tedavi yanıtı gibi klinik parametreler üzerine olan etkisini değerlendirmektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Verilerin Toplanması

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bilim Dalı'nda iki aşamalı olarak planlanmış ve yürütülmüştür. İlk olarak çalışmaya katılmayı kabul eden ÜK veya CH tanısıyla takip edilen 18 yaş ve üzeri tüm hastaların, klinik, endoskopik ve histopatolojik verileri prospektif olarak bir anket formuna kaydedilmiş ve hastalardan DNA izolasyonu için kan alınmıştır. Bu aşamada toplam 140 (71 ÜK, 69 CH) hastanın bilgileri kaydedilmiştir. Bu gruptaki hastalardan elde edilecek verilerle genotip – fenotip korelasyonlarının analiz edilmesi amaçlanmıştır. İkinci aşamada, daha önce kliniğimiz DNA bankasında izole edilerek DNA'ları saklanan 104 İBH hastasının (63 ÜK, 41 CH) genotipleri çalışılmış ve ilk grupla birlikte hastalık gelişimi riski açısından kontrollerle karşılaştırılması planlanmıştır. Bu grubun tanı haricindeki klinik verileri sağlıklı olmadığından, genotip – fenotip etkileşimi açısından yapılan değerlendirmeye katılmamıştır. Kontrol grubu olarak, daha önce hiçbir barsak hastalığı geçirmediğini ifade eden 156 sağlıklı birey çalışmaya alınmıştır.

Çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden alınan etik kurul izniyle gerçekleştirilmiştir. Tüm hasta ve kontroller aydınlatılmış gönüllü olur formları imzalatılarak çalışmaya alınmıştır. Hasta ve kontrol grubunu oluşturan kişilerden DNA izolasyonları yapılmak üzere EDTA'lı tüplere kan alınmış ve bekletilmeden DNA izolasyonları yapılmıştır.

Hastaların yaşı, cinsiyeti, tıbbi özgeçmişleri, hastalıkla ilgili klinik aktivite, tutulum yeri (ÜK için Montreal sınıflamasına göre; pankolit ve sol tip kolit; CH için ileit, kolit, ileokolit), hastalık süresi, tanı yaşı, tutulum şekli (CH için; lüminal, stenotik, fistülizan), ekstraintestinal tutulum varsa tipi (PSK; Primer Sklerozan Kolanjit, AS; Ankilozan Spondilit; EN: Eritema Nodosum, PG; Pyoderma Gangrenozum, Üveit), tedavi ve tedaviye yanıt öyküsü, cerrahi geçirip geçirmediği ve geçirdiyse tipi (total kolektomi, barsak rezeksiyonu, vb), apse gelişimi, fistül hikayesi ve tipi, güncel hematolojik ve karaciğer test sonuçları ile sedimentasyon hızı ve C reaktif protein

gibi hastalıkla ilişkili faktörler dosya kayıtlarından ve hastanın kendisinden öğrenilmiştir. Ayrıca, soygeçmişinde ailede İBH hastası olup olmadığı, varsa tipi öğrenilmiş, sigara anamnezi sorgulanmıştır. Son kolonoskopi tarihi ve bulguları dosyadan kaydedilmiştir.

3.2. DNA Eldesi ve Gen Polimorfizmlerinin Tespiti

3.2.1. Primerler

Yapılan polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılan primerlerin tümü TIB MOLBIOL (TIB MOLBIOL Syntheselabor, Almanya) tarafından sentezlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan primer dizileri Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan primer dizileri.

SNP	Primer Dizisi (5'→3' yönünde)	Kaynak
IL 23R (rs11209026)	5'-CTTTGATTGGGATATTTAACAGATCATT-3' 5'-GGCATGGGTAAGTACTTATTTAAA-3'	Ann Rheum Dis 2009 68: 1340-1344 (Ref. 52)
ATG16L1 (rs2241880)	5'-CTCTGTCACCATATCAAGCGTGG-3' 5'-CATCTGTTGATAGCCTGTCCTTCTAGA-3'	World J Gastroenterol 2010; 16(2): 176-183 (Ref 53)

3.2.2. Kimyasallar

Agaroz	Quantum Biotechnologies
Amonyum Asetat	Sigma, Almanya
Borik Asit	Merck, Frankfurt, Almanya
Bromofenol Mavisi	Sigma, Almanya
EDTA	Sigma, Almanya
Etidyum Bromid	Sigma, Almanya
Fikol	Biochrom, Almanya
Mutlak Etanol	Kimetsan, Türkiye
NaCl	Sigma, Almanya
Na ₂ EDTA	Sigma, Almanya
Proteinaz K	Sigma, Almanya
SDS	Sigma, Almanya
Tris HCl	Sigma, Almanya
Ksilen Siyanol	Sigma, Almanya
ΦX174 DNA/Hinfl	MBI Fermentas, Litvanya

3.2.3. Restriksiyon Endonükleazlar

RFLP (Restriksiyon parçacığı uzunluk polimorfizmi) reaksiyonlarında kullanılan enzimler, enzimin tanıma ve kesim bölgeleri, tavsiye edilen tampon çözeltileri, önerilen sıcaklıklar ve enzimleri sağlayan firmalar Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan restriksiyon endonükleazlar.

Restriksiyon Endonükleaz	Kesim Bölgesi	Uygun Sıcaklık °C	Üretici Firma
α TaqI (rs11209026)	5'..T↓CGA..3' 3'..AGC↓T..5'	65	Fermentas, Litvanya
LweI (rs2241880)	5'..GCATCNNNNN↓NNNNN..3' 3'..CGTAGNNNNNNNNN↓N..5'	37	Fermentas, Litvanya

3.2.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Malzemeleri

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) için; 5U/ μ l *Thermus aquaticus* DNA polimeraz enzimi, 10X PZR tamponu (750 mM Tris-HCl (25°C'de pH 8,8), 200 mM (NH₄)₂SO₄, %0,1 (Tween 20), 25 mM MgCl₂) içeren Taq DNA polimeraz (MBI Fermentas, Litvanya) seti kullanıldı. Set ayrıca, her biri 100 mM olan dATP, dTTP, dGTP, dCTP (QBiogeen, Almanya) içermektedir. PZR reaksiyonları, 0,2 ml'lik tüpler (Greiner Bioone, Avusturya) içerisinde "Eppendorf Mastercycler Personal" kullanılarak yapıldı.

3.2.5. Standart Çözeltiler ve Tamponlar

Çalışmada kullanılan standart çözeltiler ve tamponlar ile bunların içerikleri Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.3 Çalışmada kullanılan çözeltilerin ve tamponların içerikleri.

Standart Çözelti ve Tampon:	İçerik:
Tris-borik asit- EDTA tamponu (TBE) (10X) (11)	108 g Tris HCl (0,9 M), 55 g borik asit (0,9 M), 20 ml 0,5 M EDTA, ddH ₂ O ile 1000 ml'ye tamamlandı.
Nükleoliz tamponu	10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 2 mM Na ₂ EDTA
Doymuş amonyum asetat çözeltisi	148 g (9,6 M) amonyum asetat, su ile 200 ml'ye tamamlandı.
SDS (sodyum dodesil sülfat) (%10)	10 g SDS (AppliChem GmbH, Darmstadt), 100 ml'ye ddH ₂ O ile tamamlandı.
Agaroz jel yükleme tamponu (6X)	% 15 fikol, % 0,05 bromofenol mavisi, % 0,05 ksilen siyanol

3.2.6. DNA İzolasyonu

EDTA'lı tüpler içerisindeki 15 ml'lik kan örneği, +4°C sıcaklığındaki 35 ml distile su ile 5 dakika hızlıca çalkalandı. Daha sonra 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve geriye kalan pelet üzerine +4°C sıcaklığındaki distile sudan 25 ml eklenerek kuvvetlice çalkalandı ve 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve geriye kalan pelet 3 ml nükleoliz tamponu, 200 µl SDS ve 150 µl proteinaz K içinde vorteks yardımı ile çözüldü. Bir gece 37°C'de bekletildi. Daha sonra bu çözeltinin üzerine 2 ml amonyum asetat eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra, 3000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatant

başka bir tüpe alınarak üzerine hacminin 2 katı kadar mutlak etanol eklendi. Kısa bir süre bekletildikten sonra, tüp yavaşça çevrilerek genomik DNA'nın toplanması sağlandı. Genomik DNA, daha önce içine 1 ml distile su konulmuş olan steril tüpe bir pipet ucu yardımıyla aktarıldı ve su içinde çözünmesi sağlandı. Elde edilen DNA'ların konsantrasyonu ve saflığı RNA/DNA metre (Pharmacia Biotech, GeneQuant, İngiltere) kullanılarak ölçüldü.

3.2.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Kandan elde edilen genomik DNA'nın çoğaltılması için PZR tekniği kullanıldı. PZR, hacmi 0,2 ml olan steril reaksiyon tüplerinde (Greiner Bioone, Avusturya) gerçekleştirildi. Her reaksiyon için hazırlanan PZR karışımının son hacmi, ddH₂O ile 50 µl'ye tamamlandı. Çoğaltılan tüm hedef gen bölgesi için hazırlanan PZR karışımında, 100 ng genomik DNA, 1,25 ünite (U) Taq polimeraz enzimi, karışık dNTP'den 0,16 mM (her birinden 0,5 mM), her biri 0,25 mM olmak üzere "forward ve reverse" primerler kullanıldı. Çoğaltılan hedef bölgelere özgül olarak eklenen MgCl₂ miktarı, primerler, PZR bağlanma ve uzama sıcaklıkları ile döngü sayıları Tablo 3.4'te verilmiştir. Tüm PZR için, 5 dakika 95°C başlangıç denatürasyon sıcaklığı ve 7 dakika 72°C son uzama sıcaklığı kullanılmıştır.

Tablo 3.4. Uygulanan PZR içeriği ve koşulları.

Hedef Bölge	Primerler	MgCl ₂ Konsantrasyonu	Reaksiyon Koşulları	Döngü Sayısı
IL 23R (rs11209026)	P1 P2	0,5 mM	95°C 60 sn 55°C 60 sn 72°C 60 sn	30
ATG16L1 (rs2241880)	P3 P4	0,5 mM	95°C 60 sn 60°C 60 sn 72°C 60 sn	30

3.2.8. Restriksiyon Endonükleaz Analizi

Restriksiyon endonükleaz (RE) analizleri her reaksiyon için üretici firmanın önerilerine uygun olarak kullanıldı. Her bir reaksiyon toplam 20 µl'lik hacimde gerçekleştirildi. IL23R için αTaqI enzimi, ATG16L1 için ise LweI enzimleri kullanıldı. Enzim kesimi reaksiyonları üretici firmalar tarafından önerilen sıcaklıklarda 1 gece bekletilerek gerçekleştirildi.

3.2.9. Agaroz Jel Elektroforezi

PZR ve restriksiyon endonükleaz analizleri sonrasında reaksiyon ürünlerini incelemek için agaroz jel elektroforezi kullanıldı. Tüm PZR ürünleri için %1 konsantrasyonda agaroz jel (0,25 g agaroz, 25 ml 0,5X TBE) kullanılırken, RE analizlerinde; her iki bölge için de % 2-3 konsantrasyonlarda agaroz jel kullanıldı.

3.2.10. Genotipler

Çalışılan iki gen bölgesinin nativ genotipleri ile heterozigot ve homozigot mutasyon sonucundaki genotip değişimleri tablo 3.5'de görülmektedir.

Tablo 3.5. Her iki gen için belirlenen genotipler (G: Guanin, A: Adenin).

Gen	Anestral Alel	Sık Homozigot (nativ genotip)	Heterozigot	Nadir Homozigot
IL 23R (rs11209026)	G	GG	GA	AA
ATG16L1 (rs2241880)	A	AA	GA	GG

3.3. İstatistiksel Değerlendirme

Kategorik değişkenlerin değerlendirilmesinde dağılımın homojen olup olmamasına göre Kİ-Kare, “*Yate’s continuity correction*”, “*Linear by linear association*”, “*Fisher exact*” ve “*Mann Whitney U*” testleri kullanıldı. Korelasyon değerlendirmesi için Odd’s Oranı’nın yanı sıra genotip dağılımının asimetrik olması dikkate alınarak Spearman korelasyon testi kullanıldı. ÜK ve CH grubu arasındaki farklılıkların değerlendirilmesi için “*Student’s T Testi*” kullanıldı. Genotiplerin Hardy Weinberg Dengesi (HWD) açısından test edilmesi için, internet üzerinden ulaşılabilen bir hesap makinesi kullanıldı, p değeri 0.05’in üzerindeki değerler HWD’ye uyumlu kabul edildi (54). Anlamli ilişki saptanan genotiplerin birbirleriyle etkileşim (epistasis) olasılığını dışlamak için Lojistik regresyon analizi yapıldı. Fenotip – Genotip ilişkisi saptanan parametrelerin konfirme edilmesi için yerine göre varyans analizi yapıldı. İstatistik analizler, SPSS 18®, Illinois, ABD paket programı kullanılarak yapıldı. İstatistiksel anlamlılık (p) değeri 0.05 ve altı olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

Çalışmanın prospektif safhasında kayıtları alınan 140 (71 ÜK, 69 CH) hastanın, 10 tanesinin (4 ÜK, 6 CH) DNA ekstraksiyonu yapılamadığı için çalışma dışı bırakıldı (Analize alınan toplam sayılar; ÜK: 67, CH: 63). İkinci aşamada, retrospektif olarak genotip analizleri yapılan 104 hastanın (63 ÜK, 41 CH) 12 tanesinin genotipleri elde edilemediği için dışlandı (Analize alınan toplam sayılar; ÜK: 55, CH: 37). Prospektif ve retrospektif analizleri yapılan toplam hasta sayısı 222 (ÜK: 130, CH: 104) idi. Kontrol grubu olarak, alınan 156 sağlıklı bireyden 22'sinin DNA ve genotiplemesi yapılamadığı için toplam 134 kontrol hastası çalışmaya alındı.

Katılımcıların demografik özellikleri ve hastalık karakteristikleri tablo 4.1'de görülmektedir.

Hastaların yaş, cinsiyet, hastalık süresi dağılımları arasında anlamlı fark yoktu. Hastalık şiddeti açısından değerlendirildiğinde CH'de orta – şiddetli vakalar, ÜK'ye göre anlamlı olarak fazla idi ($p=0.000$). Klinik ve kolonoskopik olarak aktif hastaların oranı iki grupta benzerdi. Ekstraintestinal tutulum açısından değerlendirildiğinde, PSK'nın, ÜK'de; AS'nin ise CH'de baskın olduğu görüldü, ancak istatistik olarak anlamlılığa ulaşmadı ($p>0.05$). Hiçbir hastada üveit ve pyoderma gangrenozum saptanmadı. Apse ve fistül gelişimi beklendiği gibi, CH'de daha fazla saptandı ($p<0.05$). Sigara kullanımı CH'de belirgin olarak artmış saptandı ($p=0.001$).

Hastaların akut faz reaktanları, hematolojik ve biyokimyasal değerleri arasında anlamlı fark saptanmadı (Tablo 4.2).

Hastaların kullandıkları tedaviler tablo 4.3'de görülmektedir. Kortikosteroidler, Azathioprin ve 6 – Merkaptoprin gibi immünmodülatuar ilaçlar ve infliksimab, adalimumab gibi anti – TNF ajanlar CH'li hasta grubunda anlamlı olarak daha fazla kullanılmaktaydı. Diğer ajanlar ve cerrahi geçiren hastalar arasında anlamlı fark saptanmadı. Takrolimus ve Sirolimus, karaciğer nakli (2 hasta PSK, 2 hasta Hepatit

B'ye bağılı siroz, 1 hasta Wilson hastalığı nedeniyle nakil olmuştu) olan hastalarda kullanılmaktaydı.

Tablo 4.2. Katılımcıların demografik özellikleri ve klinik karakteristikleri (PSK: Primer Sklerozan Kolanjit, AS: Ankilozan Spondilit, EN: Eritema Nodosum)

Özellik	ÜK (N=67)	CH (N=63)	Tüm İBH (N=130)	Kontrol (N=134)
Yaş(±SS)	45.9±14.7	41.6±15.3	43.8±15.0	32.2±10.1
Cinsiyet (K/E)	27/40	36/27	63/67	92/42
Hastalık süresi	5.1±5.1	4.8±5.2	4.9±5.1	
CH Tutulum				
İleit		24 (% 38.1)		
Kolit		9 (% 14.3)		
İleokolit		30 (% 47.6)		
CH Tip				
Lüminal		42 (% 66.7)		
Stenotik		6 (% 9.5)		
Fistülizan		14 (% 22.2)		
ÜK Tutulum				
Sol Tip	38 (% 56.7)			
Pankolit	29 (% 43.3)			
Hastalık Şiddeti (hafif/orta – ağır)	35/32	6/56	41/88	
Klinik Aktivite	29 (% 43.3)	32 (% 50.8)	61 (% 46.9)	
Kolonoskopik aktivite	44 (% 65.7)	47 (% 74.6)	91 (% 70.0)	
Ekstra intestinal tutulum	14 (% 20.9)	18 (% 28.6)	32 (% 24)	
PSK	5 (% 7.5)	0 (% 0)		
AS	9 (% 13.4)	18 (% 28.6)		
EN	0 (% 0)	3 (% 4.8)		
Sigara	4 (% 6.0)	21 (% 33.3)	25 (% 19.2)	35(% 23.3)
Apse	1 (% 1.5)	7 (% 11.1)	8 (% 6.2)	
Fistül	1 (% 1.5)	14 (% 22.2)	15 (% 11.5)	

Tablo 4.2. Hastaların akut faz reaktanları, hematolojik ve biyokimyasal değerleri

Parametre	ÜK (N=67)	CH (N=63)
Hb (g/dl)	13.2±2.1	12.6±2.1
PLT (x10 ⁶ /L)	283.5±98.3	313.4±99.9
BK (x10 ³ /L)	7.8±2.7	8.1±2.7
ESH (mm/sa)	35.4±31.3	38.4±28.3
CRP (mg/dl)	17.9±35.8	20.0±33.4
ALT (IU/L)	20.9±11.2	20.3±15.0
AST (IU/L)	22.5±8.9	20.8±9.5
ALP (IU/L)	81.3±64.6	63.9±18.5
GGT (IU/L)	26.4±28.8	23.4±26.5

Hb: Hemoglobin, PLT: Trombosit, BK: Beyak küre, ESR: Eritrosit Sedimentasyon Hızı, CRP: C – Reaktif Protein, ALT: Alanin – amino transferaz, AST: Aspartat – amino transferaz, ALP: Alkalen Fosfataz, GGT: Gama – Glutamil transpeptidaz

Tablo 4.3. Hastaların kullandıkları tedaviler

Tedavi	ÜK (N=67)	CH (N=63)
5 - ASA	61 (% 91.0)	55 (% 87.3)
CS	20 (%29.9)	34 (% 54.0)
AZA/6MP	15 (%22.4)	31 (% 49.2)
Anti – TNF	7 (% 10.4)	20 (% 31.7)
CSA	1 (% 1.5)	0 (% 0)
MTX	0 (% 0)	2 (% 3.2)
Sirolimus	1 (% 1.5)	0 (% 0)
Tacrolimus	4 (% 6.0)	0 (% 0)
Antibiyotik	4 (% 6.0)	2 (% 3.2)
Cerrahi	8 (% 11.9)	15 (% 23.8)

5 – ASA: 5 – Aminosalisilat, CS: Corticosteroid, AZA/6MP: Azathioprin/6 – Merkaptoprin, Anti – TNF: Anti – Tümör Nekrozis Faktör, CSA: Siklosporin A, MTX: Metotreksat.

Prospektif ve retrospektif hasta gruplarının tümünün, iki gen polimorfizmi açısından kontrollerle karşılaştırılması sonucunda elde edilen ilişki sonuçları tablo 4.4’de görülmektedir.

Tablo 4.4. Grupların genotip ve alel frekansları ve hastalık ilişkisi

SNP	Grup	Genotip Frekansı			Alel Frekansı		HWD p değeri	Odd’s Oram (%95 Güv. Ara.)	Hastalık Riski için p değeri
		GG	GA	AA	G	A			
IL23R R381Q (Ancestral Alel: G)	ÜK (n=114)	0.947(108)	0.053(6)	0(0)	0.97	0.03	0.77	0.32	0.027
	CH (n=97)	0.959(93)	0.041(4)	0(0)	0.98	0.02	0.83	0.25	0.013
	Kontrol (n=129)	0.853(110)	0.147(19)	0(0)	0.93	0.07	0.36	(0.12-0.84)	(0.08-0.76)
ATG16L1 T300A (Ancestral Alel: A)	ÜK (n=115)	0.278(32)	0.522(60)	0.200(23)	0.54	0.46	0.59	1.35	0.27
	CH (n=95)	0.232(22)	0.484(46)	0.284(27)	0.47	0.53	0.77	1.73	0.09*
	Kontrol (n=134)	0.343(46)	0.478(64)	0.179(24)	0.58	0.42	0.83	(0.79-2.33)	(0.95-3.14)

*ATG16L1’in CH’ye etkisi açısından genotipler; sık homozigot vs heterozigot vs nadir homozigot şeklinde analiz edildiğinde artırıcı yönde ilişki ortaya çıkıyordu (p=0.024, Spearman R=0.149).

Tüm genotipler, HWD’ye uymaktaydı. Yapılan genotip – hastalık ilişkisi analizi sonuçlarına göre, IL23R polimorfizmi, hem ÜK, hem de CH için koruyucu etki oluşturmaktaydı [Sırasıyla OR = 0.32 (% 95 Güven Aralığı: 0.12 - 0.84), p=0.027 ve OR = 0.25 (% 95 Güven Aralığı: 0.08 – 0.76), p=0.013]. Hastalık gelişme riski için

iki polimorfizmin olası etkileşimini dışlamak için yapılan çok değişkenli analizde, ATG16L1 polimorfizmi varlığının, IL23R polimorfizminin koruyucu etkisini değiştirmedeği saptandı [ÜK için: Lojistik regresyon OR=0.349 (% 95 Güvenlik Aralığı: 0.134 – 0.910), p = 0.031; CH için: Lojistik regresyon OR=0.282 (% 95 Güvenlik Aralığı: 0.092 – 0.865), p = 0.027]. ATG16L1 genotiplerindeki polimorfizm oranlarının çok fazla olması nedeniyle rastgele seçilen bazı vakalara sekans analizi yapıldı. Sekans analizi yapılan tüm vakalarda polimorfizmin doğruluğu kanıtlandı. ATG16L1 polimorfizmi ise ÜK gelişmesine etki etmez iken, CH gelişme riskini kontrol grubuna göre artırıyordu (p=0.024, Spearman R=0.149). Bu zayıf ilişki, lojistik regresyon analizinde saptanmadı.

Genotip – Fenotip etkileşimleri açısından yapılan değerlendirme sonuçlarında istatistiksel açıdan anlamlı bulunan sonuçlar tablo 4.5’de görülmektedir.

Tablo 4.5. İBH’da IL23R ve ATG16L1 Genotip – Fenotip etkileşimleri

Hastalık	SNP	Etkileşim	Spearman R	p değeri
Ülseratif Kolit	ATG16L1	Kadın cinsiyet	0.246	0.048
		AST	0.274	0.027
	IL23R	Hastalık süresi	0.268	0.031
		AS	0.266	0.035
Crohn Hastalığı	ATG16L1	Rezeksiyon	0.488	0.000
		ALP	0.288	0.042
	IL23R	EN	0.261	0.044
		Klinik aktivite	0.256	0.043
		EN	0.247	0.051

AST: Aspartat Transaminaz, AS: Ankilozan Spondilit, ALP: Alkalen Fosfataz, EN: Eritema Nodosum

ÜK’li kadın hastalarda ATG16L1 gen polimorfizmi sıklığı daha fazla saptandı (R=0.246, p=0.048). Kontrol grubunda bakıldığında, iki polimorfizm için de herhangi bir cinsiyet kümelenmesi saptanmadı (ATG16L1 için p=0.03; IL23R için p=1.0). Hastalık süresinin nativ genotipte 3.2±4.1 yıl iken, mutasyon taşıyan hastalarda 5.6±5.3 yıla çıktığı saptandı, bu sonuç hastalığa daha erken yakalandığını düşündürmekteydi (p=0.05). AST değerinin de mutasyon taşıyanlarda daha fazla olduğu saptandı (R=0.0274, p=0.027), ancak bu ilişki varyans analizi ile konfirme

edilemedi ($p=0.2$). ÜK'li hastalarda IL23R mutasyonu taşıyanlarda, AS gelişiminin daha sık olduğu saptansa da, bu sonuca mutasyon taşıyan 4 hastanın 2'sinde AS gelişmesi nedeniyle ulaşıldığı dikkati çekti. Benzer şekilde rezeksiyon sıklığında saptanan artış, 4 hastalık bu gruptaki tek hastanın rezeksiyona gitmesi nedeniyle gerçekleşmişti.

CH'de hem ATG16L1, hem de IL23R mutasyonu taşıyıcılarında daha fazla EN olduğu saptandı. ATG16L1 için homozigot mutant olan 23 hastanın 3 (% 13.0)'ünde EN gelişmiş, diğer genotiplerde gelişmemişti ($p=0.044$). IL23R mutasyonu için heterozigot olan 4 hastanın 1 (% 25)'inde EN gelişmişti, bu oran nativ genotipte % 3.4 idi ($p=0.051$). Klinik aktivite, IL23R polimorfizmini taşıyan 4 hastanın da aktif olması nedeniyle bu grupta daha fazla görünmekteydi ($p=0.04$).

Bu sayılanların dışında başka anlamlı genotip - fenotip etkileşimi saptanmadı. Bunların arasında, CH için tutulum yerinin ileal vs kolonik olması, lüminal/stenotik vs fistülizan olması, yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, klinik aktivite, operasyon, apse, kullanılan anti - TNF'ler dahil olmak üzere tedavilere yanıt, hastalık şiddeti, kolonoskopik aktivite, hematolojik ve biyokimyasal parametreler, akut faz reaktanları, diğer ekstraintestinal manifestasyonlar, hastalık süresi ve tanı yaşıyla genotipik değişimler arasında anlamlı ilişki saptanmadı.

ÜK için de sayılanlara ek olarak tutulumun sol tip veya ekstensif/pankolit olması, tedavi yanıtları ve diğer klinik - laboratuvar değerlendirmeler açısından genotipik etkileşim bulunmadı.

İki genetik değişimin birbiriyle etkileşimi saptanmadı ($R = -0.083$, $p=0.5$).

Aile öyküsünün ÜK hastası olan bir vakada pozitif olması nedeniyle anlamlı ilişki saptanmadı.

5. TARTIŞMA

Bu çalışma, Türkiye'deki İBH hastalarında IL23R ve ATG16L1 gen polimorfizm sıklığı ve etkilerini irdeleyen ilk araştırmadır. Yapılan genotip – hastalık ilişkisi analizi sonuçlarına göre, IL23R polimorfizminin, hem ÜK, hem de CH için koruyucu etki oluşturduğu saptanmıştır [Sırasıyla OR = 0.32 (% 95 Güven Aralığı: 0.12 - 0.84), p=0.027 ve OR = 0.25 (% 95 Güven Aralığı: 0.08 – 0.76, p=0.013)]. IL23R polimorfizmi sonucunda oluşan bu koruyucu etki ile ATG16L1 polimorfizmi arasında epistatik etkileşim saptanmamıştır, daha önce yapılan çalışmalarda da böyle bir ilişkinin olmadığı bildirilmiştir (55). ATG16L1 ise ÜK gelişmesine etki etmez iken, CH gelişme riskini kontrol grubuna göre artırıyor bulunmuştur (p=0.024, Spearman R=0.149).

Bu çalışmada İBH'lı hastalarda saptanan IL23R genotip ve alel sıklıkları, daha önce beyaz ırkta bildirilen sonuçlarla uyumludur (19, 43, 50). Nadir görülen 381Gln aleli, İBH'li hastaların % 3'ünde görülürken, kontrol gruplarında % 6 - 7'lerde görülmektedir, bizim çalışmamızda ÜK'de % 3, CH'de % 2 çıkarken, kontrol grubunda % 7 bulunmuştur, üç grupta da hiç homozigot mutasyon saptanmamıştır.

ATG16L1 ise oldukça polimorfik bir genidir. Kontrol grubunda mutant alel sıklığı % 42 tespit edilmiştir ki, literatürde beyaz ırkta % 50'lerde bildirilen değerler vardır (51, 56).

Literatürde, IL23R polimorfizminin İBH'ye etkileriyle ilgili yapılmış bir çok yayın mevcuttur. Birçoğunda koruyucu yönde etkileşim gösterdiği bildirilirken (19, 45, 56 – 60), bazı çalışmalarda CH'yi artırdığı, hastalık başlangıcının daha erken olmasına neden olduğu bildirilmiştir (53, 61). Diğer çalışmaların aksi bulgular rapor eden bu çalışmalardan birisi pediatrik yaş grubunu içeren bir çalışma, diğeri ise IL23R'nin farklı bir gen bölgesinde oluşan mutasyon sonucunu bildirmiştir. Bu nedenle genel kanı, IL23R polimorfizminin başlıca CH riskini azalttığı, nispeten daha az oranda da ÜK riskini azalttığı yönündedir.

ATG16L1 polimorfizmleri normal popülasyonda da sık görülse de, özellikle CH gelişme riskini artırdığıyla ilgili bir çok toplumda yapılan geniş ölçekli çalışmalar

mevcuttur (20, 49 – 51, 53, 56, 59, 62). Hastalık sıklığını artırmanın yanında pediatrik yaşta CH gelişme riskini de artırmaktadır (63). ÜK üzerine etkisiyle ilgili veriler yeterli değilse de, birçok çalışmada etkisiz çıkmıştır (56). Bu çalışmada ÜK hastalık süresini artırdığı saptanmış, bu bulgunun anlamının pediatrik yaşlar gibi erken dönemde hastalığa yakalanmaya neden olabileceği düşünülmüştür.

Yapılan çalışmalarda üzerinde önemle durulan bir diğer nokta, bu çalışmanın da ikincil amaçlarından olan genotip – fenotip etkileşimleridir. Şimdiye kadar farklı hasta gruplarında farklı etkileşimler tanımlanmıştır. Bir Alman çalışmasında, ATG16L1 rs1004819 varyantı, ileal tutulum (OR= 4.24, p=0.004) ve stenozan hastalıkla (OR=1.99, p=0.045) ilişkili bulunmuştur. Aynı çalışmada diğer taraftan, bizim çalışmamıza benzer şekilde R381Q varyantı, hastalığın başlangıç yaşı, lokalizasyonu, ekstra – intestinal tutulum, peri – anal hastalık veya immunosupresif tedavi ihtiyacı ile ilişkisiz bulunmuştur (51). Diğer bir çalışmada da, ATG16L1 polimorfizmi olan bireylerde ileal tutulum riskinin 3 kat kadar arttığı gösterilmiştir (64). Öte yandan, Tremelling ve arkadaşlarının çalışmasında, nadir görülen IL23R varyantının CH (OR=0.38) ve ÜK (OR= 0.73) için koruyucu etkisi gözler önüne serilmiş, 1902 CH’li hastanın değerlendirilmesi sonucunda, başlangıç yaşı, cinsiyet, hastalık bölgesi, davranışı, cerrahi ihtiyacı, perianal hastalık ve sigara içme gibi fenotipik parametrelerle genotipin ilişkisiz olduğu bildirilmiştir (45). Başka çalışmalarda da fenotipik etkinin olmadığı yönünde bulgulara ulaşılmıştır (56, 65).

Bu çalışmada saptanan fenotipik etkileşimler; ÜK için ATG16L1 polimorfizminde görülen kadın cinsiyet ve yüksek AST düzeyi yapılan ileri analizlerde konfirme edilememiş, muhtemelen hasta sayısındaki azlığa bağlı tesadüfi olabileceği düşünülmüştür. ÜK için koruyucu olduğu saptanan IL23R’nin, rezeksiyon riskiyle orantılı olması da aynı nedene bağlı olabilir. CH’de ise eritema nodozum sıklığında hem ATG16L1, hem de IL23R polimorfizmi sonucu görülen artış da hasta sayısının azlığı nedeniyle dikkatle değerlendirilmelidir. Bunun dışında CH’de ileal vs kolonik tutulum olması, lüminal, stenotik veya fistülizan hastalık, hastalık şiddeti, yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, klinik aktivite, apse, hastalık şiddeti, kolonoskopik aktivite, hematolojik ve biyokimyasal parametreler, akut faz reaktanları, diğer ekstraintestinal manifestasyonlar, hastalık süresi ve tanı yaşıyla genotipik değişimler arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. ÜK için de sayılanlara ek olarak tutulumun

sol tip veya ekstensif/pankolit olması ve diğer klinik – laboratuvar değerlendirmeler açısından genotipik etkileşim bulunmamıştır.

Teorik olarak, bu iki gende görülen polimorfizmler inflamatuvar yanıtı etkilemek suretiyle, anti – inflamatuvar tedavi yanıtı ve cerrahi ihtiyacını etkileyebilir. Ancak bu çalışmada ne IL23R, ne de ATG16L1 gen polimorfizmleri, steroid, anti – TNF ve cerrahi tedavi yanıtlarına etki etmemiştir.

IL23R'nin, İBH patogenezindeki rolüyle ilgili altta yatan mekanizmalar yavaş yavaş aydınlanmaktadır. Mutasyona uğrayan R381, IL23 reseptörünün sitoplazmik domaininde, transmembran domaininin içinde yer alan 5. amino asittir ve türler arasında büyük oranda yapısı korunmuştur. Daha önceki hayvan çalışmalarında, IL23R'nin kolit gelişimi için önemli olduğu gösterilmiştir (66). IL23R, CD4+ T hücreleri farklı bir T hücre alttipi olan Th17'ye farklılaşmak üzere uyarmaktadır. Daha sonra bunlardan fazla miktarda salınan TGF – β 1 ve IL6 ile birlikte proinflamatuvar IL – 17'nin etkisiyle inflamasyon uyarılmaktadır (67). Dahası, Th17 T hücre altgrubunun, hayvan modellerinde kronik otoimmün inflamatuvar durumlara aracılık ettiği ve intestinal hastalık için IL23'ün merkezi rol üstlendiği gösterilmiştir (68). Bu bulgular ve genetik çalışmaların ışığında, IL23/Th17 İBH patogenezinde merkezi bir role sahip gibi görünmektedir (69 – 71). IL23R polimorfizminin ÜK ve CH'den koruyucu olmasındaki etken muhtemelen bu yolağın bozulması olabilir.

Son yıllarda, Alman ve İngiliz yazarlar yaptıkları bir tüm genomda ilişki çalışmasında 19,779 SNP arasında, kromozom 2q37.1'de yer alan ATG16L1 geninde kodlayıcı bir varyantla CH arasında bir ilişki kurmuşlardır (20). Böylece doğal immün yanıtın bir bileşeni olan otofajinin, patogeneizde önemi anlaşılmıştır. ATG gen ekspresyonunda proinflamatuvar sitokinlerin etkisinin olmaması, polimorfizmin primer etken olduğunu düşündürmektedir (65). ATG16L1'in kalıtım şekli ko – dominanttır ve Kafkas ırkında sık görülür. Asya ırkında ilişki bulunmaması, genin çevresel faktörlerden etkilendiğini düşündürmektedir (72). Otofaji, patojen kaynaklı proteinlerin oto – fagositozunda çok önemli bir mekanizmadır. T300A polimorfizminin buradaki etkisi net olarak bilinmese de muhtemelen bu mekanizmayı bozan protein etkileşimlerine neden olmaktadır. Bunun sonucunda, hem doğal, hem de kazanılmış immün yanıt bozulmakta, mukozayı invaze eden

mikroorganizmalara karşı hücre sel yanıt yetersiz kalmaktadır. Böylece bozulmuş bariyer fonksiyonunun neden olduğu persistan bir bakteriyel enfeksiyon meydana gelmektedir (51). ATG'de görülen gen varyasyonlarının hastalık gelişimi üzerine olan net etkisinin, lüminal havuzdaki mikroorganizma yüküyle, otofajik süreçlerin savunma kapasitesi arasındaki dengeyle ilişkili olduğu öne sürülmüştür (73).

Bu çalışmanın en önemli kısıtlılığı, tüm İBH hasta grubunun ayrıntılı klinik ve laboratuvar özelliklerine ulaşamaması nedeniyle, bu hastaların tüm analizlere alınamamasıdır.

Sonuçta Türk popülasyonunda IL23R polimorfizmi varlığı ÜK ve CH'den koruyucu olarak bulunmuştur. ATG16L1 polimorfizmi ise Crohn hastalığı için risk faktörüdür. Bu genotiplerin hastalık seyri, klinik, laboratuvar bulguları ve tedavi yanıtlarına kayda değer etkisi saptanmamıştır. Bu açılardan daha geniş serilerde çalışmalar yapılmasına ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR

1. IL23R polimorfizminin, hem ÜK, hem de CH için koruyucu etki oluşturduğu saptandı [Sırasıyla OR = 0.32 (% 95 Güven Aralığı: 0.12 - 0.84), p=0.027 ve OR = 0.25 (% 95 Güven Aralığı: 0.08 – 0.76, p=0.013)]. Buna göre IL23R polimorfizmi olanlarda olmayanlara göre ÜK görülme sıklığı 1/3, CH riski ise ¼ oranındaydı.
2. ATG16L1 polimorfizmi, ÜK gelişmesine etki etmez iken, CH gelişme riskini kontrol grubuna göre artırıyor (p=0.024, Spearman R=0.149).
3. ATG16L1 polimorfizmi olan bireylerde ÜK hastalık süresi anlamlı şekilde uzuyor, hastalık başlangıcı daha erken yaşlarda oluyordu.
4. ÜK’de ATG16L1’in kadınlarda daha sık olması ve AST yüksekliği ihtimalini artırması, IL23R’nin ise eşlik eden AS riski ve rezeksiyon ihtimalini artırması bulguları vaka sayısının azlığı nedeniyle dikkatle değerlendirilmelidir.
5. CH’de ATG16L1 ile yüksek ALP, ve artmış EN ko – insidansı, IL23R ile yine artmış EN ko – insidansı ve daha aktif hastalık görülmesi bulguları da vaka sayısının azlığı nedeniyle dikkatle değerlendirilmelidir.
6. Her iki mutasyon için de, İBH ile ilişkili kayda değer başka genotip - fenotip etkileşimi saptanmamıştır.
7. Steroid, Anti – TNF ve cerrahi tedavilere yanıtla polimorfizmler arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır.
8. Türk popülasyonunda genotip – fenotip etkileşimleri açısından sağlıklı bilgi edinebilmek için daha geniş serilerde çalışma yapılmalıdır.

ÖZET

İltihabi Barsak Hastalıkları (İBH) etyolojisinde genetik zeminde çevresel faktörlerin etkisi üzerinde durulmaktadır. İnterlökin 23 reseptör (IL23R) genindeki R381Q polimorfizmi, Crohn hastalığı ve ülseratif kolitle ilişkili bulunmuştur. Autophagy 16 – like 1(ATG16L1) genindeki T300A polimorfizminin ise Crohn hastalığı riskini arttırdığı gösterilmiştir. Bu alanda ülkemizde yapılmış bir çalışma yoktur.

Bu çalışmanın amacı, İBH’da IL23R ve ATG16L1 gen polimorfizmi sıklığında normal popülasyona göre değişme olup olmadığını tespit etmek ve bu polimorfizmlerin klinik parametreler üzerine olan etkisini değerlendirmektir.

Gastroenteroloji Bilim Dalı polikliniğine başvuran 222 İBH hastası ve 134 kişilik sağlıklı kontrol grubunda SNP’ler tespit edilmiştir. Ayrıca 130 hastanın dosyalarından hastalık tutulum bölgeleri, aktivitesi, tedavi yanıtları çıkartılarak, SNP varlığı ile ilişki aranmıştır.

IL23R polimorfizminin, hem ÜK, hem de CH için koruyucu etki oluşturduğu saptanmıştır [Sırasıyla OR = 0.32 (% 95 Güven Aralığı: 0.12 - 0.84), p=0.027 ve OR = 0.25 (% 95 Güven Aralığı: 0.08 – 0.76, p=0.013)]. ATG16L1 polimorfizmi, ÜK gelişmesine etki etmez iken, CH gelişme riskini kontrol grubuna göre artırıyor bulunmuştur (p=0.024, Spearman R=0.149). ÜK’de ATG16L1’in kadınlarda daha sık olması ve AST yüksekliği ihtimalini artırması, IL23R’nin ise eşlik eden AS riski ve rezeksiyon ihtimalini artırması ile CH’de ATG16L1 ile yüksek ALP, ve artmış EN ko – insidansı, IL23R ile yine artmış EN ko – insidansı ve daha aktif hastalık görülmesi bulguları da vaka sayısının azlığı nedeniyle dikkatle değerlendirilmelidir.

Her iki mutasyon için de, İBH ile ilişkili başka kayda değer genotip - fenotip etkileşimi saptanmamıştır. Steroid, Anti – TNF ve cerrahi tedavilere yanıtla polimorfizmler arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır.

Sonuçta, Türk popülasyonunda IL23R polimorfizminin, hem ÜK, hem de CH için koruyucu etki oluşturduğu saptanmıştır. ATG16L1 polimorfizmi ise Crohn hastalığı için risk faktörü olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: İltihabi Barsak Hastalıkları, Ülseratif Kolit, Crohn Hastalığı, İnterlökin 23 Reseptör Polimorfizmi, ATG16L1 Polimorfizmi, Tek Nükleotid Polimorfizmi

SUMMARY

Etiology of Inflammatory Bowel Diseases (IBD), is thought to be environmental insults under the proper genetic background. R381Q polymorphism of Interleukin 23 Receptor (IL23R) gene is found to be associated with Crohn's disease(CD), and Ulcerative Colitis(UC). T300A polymorphism of Autophagy 16 – Like1 (ATG16L1) gene is shown to increase the Crohn's disease risk. There is no previous study on this subject from our country. The purpose of this study is to demonstrate whether, there is any increase in the rate of IL23R and ATG16L1 gene polymorphism in the inflammatory bowel disease, compared with normal population, and to determine if there is any effect of them over clinical parameters.

Study was conducted among 222 inflammatory bowel disease cases admitted to the Gastroenterology Department, and 134 healthy control cases. The Single Nucleotide Polymorphisms were detected, besides, involvement sites, activity, treatment responses were recorded from the patient files, and correlation to the SNP's were evaluated.

IL23R polymorphism was protective against both UC, and CD development [OR = 0.32 (% 95 Confidence Interval: 0.12 - 0.84), $p=0.027$ ve OR = 0.25 (% 95 Confidence Interval: 0.08 – 0.76, $p=0.013$), respectively]. There was no effect of ATG16L1 polymorphism on UC development, but it significantly increased development of CD ($p=0.024$, Spearman $R=0.149$). There was female predominance, and higher AST levels in cases with UC, carrying ATG16L1, and increased likelihood of AS, and resection in IL23R carriers; on the other hand, higher levels of ALP, increased EN risk in CD patients with ATG16L1, and again increased EN coincidence, and higher disease activity, but these findings should be evaluated cautiously due to low number of cases. There was no other significant phenotype association between UC and CD with SNP's. There is no correlation between corticosteroid, anti – TNF treatment response, need for surgery and polymorphisms. As a result, it was found that, IL23R polymorphism is protective against development of both UC, and CD. ATG16L1 polymorphism is a risk factor for development of CD.

Key Words: Inflammatory Bowel Diseases, Ulcerative Colitis, Crohn's Disease, Interleukin 23 Receptor Polymorphism, ATG16L1 Polymorphism, Single Nucleotide Polymorphism

KAYNAKLAR

1. Stonnington CM, Phillips SF, Meltion LJ III, Zinsmeister AR. Chronic ulcerative colitis: Incidence and prevalence in a community. *Gut* 1987; 28:402 – 9.
2. Kildebo S, Nordgaard K, Aronsen O, Breckan R, Burhol PG, Jorde R. The incidence of ulcerative colitis in Northern Norway from 1983 to 1986. The Northern Norwegian Gastroenterology Society. *Scand J Gastroenterol* 1990; 25:890 – 6.
3. Tozun N, Atug O, Imeryuz N, Hamzaoglu HO, Tiftikci A, Parlak E, Dagli U, Ulker A, Hulagu S, Akpinar H, Tuncer C, Suleymanlar I, Ovunc O, Hilmioglu F, Aslan S, Turkdogan K, Bahcecioglu HI, Yurdaydin C; Members of the Turkish IBD Study Group. Clinical characteristics of inflammatory bowel disease in Turkey: a multicenter epidemiologic survey. *J Clin Gastroenterol*. 2009 Jan;43(1):51-7.
4. Tezel A, Dökmeci G, Eskiocak M, Umit H, Soylu AR. Epidemiological features of ulcerative colitis in Trakya, Turkey. *J Int Med Res*. 2003 Mar-Apr;31(2):141-8.
5. Kappelman MD, Rifas-Shiman SL, Kleinman K, Ollendorf D, Bousvaros A, Grand RJ, Finkelstein JA. The prevalence and geographic distribution of Crohn's disease and ulcerative colitis in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5:1424 - 9.
6. Sonnenberg A, Richardson PA, Abraham NS. Hospitalizations for inflammatory bowel disease among US military veterans 1975-2006. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 1740-1745.
7. Loftus CG, Loftus EV Jr, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Tremaine WJ, Melton LJ 3rd, Sandborn WJ. Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 254-261.
8. Sachar DB. Studying inflammatory bowel disease in the global laboratory. *J Gastrointestin Liver Dis*. 2009 Dec;18(4):407-9.
9. Niv Y, Abukasis G. Prevalence of ulcerative colitis in the Israeli kibbutz population. *J Clin Gastroenterol* 1991; 13:98 – 101.

10. Mayberry J, Mann R. Inflammatory bowel disease in rural sub-Saharan Africa: rarity of diagnosis in patients attending mission hospitals. *Digestion* 1989; 44:172 – 6.
11. Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden. *Gastroenterology* 1991; 100:350 – 8.
12. Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sørensen TI, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1991; 324:84 – 8.
13. Bayless TM, Tokayer AZ, Polito JM 2nd, Quaskey SA, Mellits ED, Harris ML. Crohn's disease: concordance for site and clinical type in affected family members--potential hereditary influences. *Gastroenterology* 1996; 111:573 – 9.
14. Tysk C, Lindberg E, Järnerot G, Flodérus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1988; 29:990 – 6.
15. Toyoda H, Wang SJ, Yang HY, Redford A, Magalong D, Tyan D, McElree CK, Pressman SR, Shanahan F, Targan SR, et al. Distinct associations of HLA class II genes with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1993; 104:741 – 8.
16. Kugathasan S, Collins N, Maresco K, Hoffmann RG, Stephens M, Werlin SL, Rudolph C, Broeckel U. CARD15 gene mutations and risk for early surgery in pediatric-onset Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2:1003 – 9.
17. Celik Y, Dagli U, Kiliç MY, Törüner M, Ozen SC, Ozkan M, Soykan I, Cetinkaya H, Ulker A, Ozden A, Bozdayi AM. Cytokine gene polymorphisms in Turkish patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2006 May;41(5):559-65.
18. Ozen SC, Dagli U, Kiliç MY, Törüner M, Celik Y, Ozkan M, Soykan I, Cetinkaya H, Ulker A, Ozden A, Bozdayi AM. NOD2/CARD15, NOD1/CARD4, and ICAM-1 gene polymorphisms in Turkish patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*. 2006 Apr;41(4):304-10.
19. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A, Dassopoulos T, Bitton A, Yang H, Targan S, Datta LW, Kistner EO, Schumm LP, Lee AT, Gregersen PK, Barmada MM, Rotter JI, Nicolae DL, Cho JH. A genome-wide association study identifies

- IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*. 2006 Dec 1;314(5804):1461-3. Epub 2006 Oct 26. PubMed PMID: 17068223.
20. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, Albrecht M, Mayr G, De La Vega FM, Briggs J, Günther S, Prescott NJ, Onnie CM, Häsler R, Sipos B, Fölsch UR, Lengauer T, Platzer M, Mathew CG, Krawczak M, Schreiber S. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* 2007; 39:207 – 11.
 21. Price WH. A high incidence of chronic inflammatory bowel disease in patients with Turner's syndrome. *J Med Genet* 1979; 16:263 – 6.
 22. Schinella RA, Greco MA, Cobert BL, Denmark LW, Cox RP. Hermansky-Pudlak syndrome with granulomatous colitis. *Ann Intern Med* 1980; 92:20 – 3.
 23. Visser G, Rake JP, Fernandes J, Labrune P, Leonard JV, Moses S, Ullrich K, Smit GP. Neutropenia, neutrophil dysfunction, and inflammatory bowel disease in glycogen storage disease type Ib: results of the European Study on Glycogen Storage Disease type I. *J Pediatr* 2000; 137:187 – 91.
 24. Porter CK, Tribble DR, Aliaga PA, Halvorson HA, Riddle MS. Infectious gastroenteritis and risk of developing inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2008; 135:781.
 25. Boyko EJ, Koepsell TD, Perera DR, Inui TS. Risk of ulcerative colitis among former and current cigarette smokers. *N Engl J Med* 1987; 316:707 – 10.
 26. Silverstein MD, Lashner BA, Hanauer SB, Evans AA, Kirsner JB. Cigarette smoking in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 1989; 84:31 – 3.
 27. Persson PG, Ahlbom A, Hellers G. Diet and inflammatory bowel disease: a case-control study. *Epidemiology* 1992; 3:47 – 52.
 28. Sakamoto N, Kono S, Wakai K, Fukuda Y, Satomi M, Shimoyama T, Inaba Y, Miyake Y, Sasaki S, Okamoto K, Kobashi G, Washio M, Yokoyama T, Date C, Tanaka H; Epidemiology Group of the Research Committee on Inflammatory Bowel Disease in Japan. Dietary risk factors for inflammatory bowel disease: a multicenter case-control study in Japan. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11:154 – 63.
 29. Cosnes J, Carbonnel F, Carrat F, Beaugerie L, Gendre JP. Oral contraceptive use and the clinical course of Crohn's disease: a prospective cohort study. *Gut* 1999; 45:218 – 22.

30. Tanner AR, Raghunath AS. Colonic inflammation and nonsteroidal anti-inflammatory drug administration. An assessment of the frequency of the problem. *Digestion* 1988; 41:116 – 20.
31. Levenstein S, Prantera C, Varvo V, Scribano ML, Berto E, Andreoli A, Luzi C. Psychological stress and disease activity in ulcerative colitis: a multidimensional cross-sectional study. *Am J Gastroenterol* 1994; 89:1219 – 25.
32. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekblom A. Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2001; 344:808 - 14.
33. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, Brant SR, Silverberg MS, Taylor KD, Barmada MM, Bitton A, Dassopoulos T, Datta LW, Green T, Griffiths AM, Kistner EO, Murtha MT, Regueiro MD, Rotter JI, Schumm LP, Steinhardt AH, Targan SR, Xavier RJ; NIDDK IBD Genetics Consortium, Libioulle C, Sandor C, Lathrop M, Belaiche J, Dewit O, Gut I, Heath S, Laukens D, Mni M, Rutgeerts P, Van Gossum A, Zelenika D, Franchimont D, Hugot JP, de Vos M, Vermeire S, Louis E; Belgian-French IBD Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium, Cardon LR, Anderson CA, Drummond H, Nimmo E, Ahmad T, Prescott NJ, Onnie CM, Fisher SA, Marchini J, Ghori J, Bumpstead S, Gwilliam R, Tremelling M, Deloukas P, Mansfield J, Jewell D, Satsangi J, Mathew CG, Parkes M, Georges M, Daly MJ. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet* 2008 Aug;40(8):955–62.
34. Caroline Diveu, Mandy J McGeachy, Daniel J Cua. Cytokines that regulate autoimmunity. *Current Opinion in Immunology* 2008, 20:663–668.
35. Mizushima N, Klionsky DJ. Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu Rev Nutr* 2007;27:19–40.
36. Beth Levine, Guido Kroemer. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell*, 2008 January 11; 132(1): 27–42.
37. Xavier RJ, Huett A, Rioux JD. Autophagy as an important process in gut homeostasis and crohn's disease pathogenesis. *Gut*. 2008 June ; 57(6): 717–720.
38. Sanjuan MA, Dillon CP, Tait SW, Moshiah S, Dorsey F, Connell S, Komatsu M, Tanaka K, Cleveland JL, Withoff S, Green DR. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature* 2007;450:1253–7.

39. Koslowski MJ, Beisner J, Stange EF, Wehkamp J. Innate antimicrobial host defense in small intestinal Crohn's disease *International Journal of Medical Microbiology*, 2010; 300: 34–40.
40. Takeshi Noda and Tamotsu Yoshimori. Molecular basis of canonical and bactericidal autophagy. *International Immunology*, 2009; 21 (11): 1199–1204.
41. Münz C. Enhancing immunity through autophagy. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 423-449.
42. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 741-752
43. Cooney R, Jewell D. The Genetic Basis of Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis* 2009;27:428–442.
44. Baptista ML, Amarante H, Picheth G, Sdepanian VL, Peterson N, Babasukumar U, Lima HC, Kugathasan S. CARD15 and IL23R Influences Crohn's Disease Susceptibility but not Disease Phenotype in a Brazilian Population. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:674–679.
45. Tremelling M, Cummings F, Fisher SA, Mansfield J, Gwilliam R, Keniry A, Nimmo ER, Drummond H, Onnie CM, Prescott NJ, Sanderson J, Bredin F, Berzuini C, Forbes A, Lewis CM, Cardon L, Deloukas P, Jewell D, Mathew CG, Parkes M, Satsangi J. IL23R Variation Determines Susceptibility But Not Disease Phenotype in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2007 May; 132(5): 1657–1664.
46. Fisher SA, Tremelling M, Anderson CA, Gwilliam R, Bumpstead S, Prescott NJ, Nimmo ER, Massey D, Berzuini C, Johnson C, Barrett JC, Cummings FR, Drummond H, Lees CW, Onnie CM, Hanson CE, Blaszczyk K, Inouye M, Ewels P, Ravindrarajah R, Keniry A, Hunt S, Carter M, Watkins N, Ouwehand W, Lewis CM, Cardon L, the Wellcome Trust Case Control Consortium, Lobo A, Forbes A, Sanderson J, Jewel DP, Mansfield JC, Deloukas P, Mathew CG, Parkes M, Satsangi J. Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. *Nat Genet*. 2008 June ; 40(6): 710–712.
47. Burakoff R, Barish CF, Riff D, Pruitt R, Chey WY, Farraye FA, Shafran I, Katz S, Krone CL, Vander Vliet M, Stevens C, Sherman ML, Jacobson E, Bleday R. A Phase 1/2A Trial of STA 5326, an Oral Interleukin-12/23 Inhibitor, in Patients

- with Active Moderate to Severe Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12: 558–565.
48. Di Cesare A, Di Meglio P, Nestle FO. The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2009 Jun;129(6):1339-50. Epub 2009 Mar 26. Review. PubMed PMID: 19322214.
 49. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, Green T, Kuballa P, Barmada MM, Datta LW, Shugart YY, Griffiths AM, Targan SR, Ippoliti AF, Bernard EJ, Mei L, Nicolae DL, Regueiro M, Schumm LP, Steinhart AH, Rotter JI, Duerr RH, Cho JH, Daly MJ, Brant SR. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet* 2007 May;39(5):596–604.
 50. The Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007 Jun 7;447(7145):661–78.
 51. Prescott NJ, Fisher SA, Franke A, Hampe J, Onnie CM, Soars D, Bagnall R, Mirza MM, Sanderson J, Forbes A, Mansfield JC, Lewis CM, Schreiber S, Mathew CG. A nonsynonymous SNP in ATG16L1 predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5. *Gastroenterology* 2007;132:1665–71.
 52. Hollis-Moffatt J E, Merriman M E, Rodger R A, Rowley K A, Chapman P T, Dalbeth N, Gow P J, Harrison A A, Highton J, Jones P B B, O'Donnell J L, Stamp L K, Merriman T R. Evidence for association of an interleukin 23 receptor variant independent of the R381Q variant with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009 68: 1340-1344.
 53. Csöngéi V, Járomi L, Sáfrány E, Sipeky C, Magyari L, Faragó B, Bene J, Polgár N, Lakner L, Sarlós P, Varga M, Melegh B. Interaction of the major inflammatory bowel disease susceptibility alleles in Crohn's disease patients. *World J Gastroenterol* 2010 January 14; 16(2): 176-183.
 54. Rodriguez S, Gaunt TR, Day IN. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *Am J Epidemiol.* 2009 Feb 15;169(4):505-14. Epub 2009 Jan 6. PubMed PMID: 19126586.
 55. Newman WG, Zhang Q, Liu X, Amos CI, Siminovitch KA. Genetic variants in IL-23R and ATG16L1 independently predispose to increased susceptibility to

- Crohn's disease in a Canadian population. *J Clin Gastroenterol*. 2009 May-Jun;43(5):444-7. PubMed PMID: 19276991.
56. Roberts RL, Gearry RB, Hollis-Moffatt JE, Miller AL, Reid J, Abkevich V, Timms KM, Gutin A, Lanchbury JS, Merriman TR, Barclay ML, Kennedy MA. IL23R R381Q and ATG16L1 T300A are strongly associated with Crohn's disease in a Study of New Zealand Caucasians with inflammatory Bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2007;102:2754–61.
57. Baptista ML, Amarante H, Picheth G, Sdepanian VL, Peterson N, Babasukumar U, Lima HC, Kugathasan S. CARD15 and IL23R influences Crohn's disease susceptibility but not disease phenotype in a Brazilian population. *Inflamm Bowel Dis*. 2008 May;14(5):674-9. PubMed PMID: 18200510.
58. Dubinsky MC, Wang D, Picornell Y, Wrobel I, Katzir L, Quiros A, Dutridge D, Wahbeh G, Silber G, Bahar R, Mengesha E, Targan SR, Taylor KD, Rotter JJ; Western Regional Research Alliance for Pediatric IBD. IL-23 receptor (IL-23R) gene protects against pediatric Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2007 May;13(5):511-5. PubMed PMID: 17309073; PubMed Central PMCID: PMC2169293.
59. Lakatos PL, Szamosi T, Szilvasi A, Molnar E, Lakatos L, Kovacs A, Molnar T, Altorjay I, Papp M, Tulassay Z, Miheller P, Papp J, Tordai A, Andrikovics H; Hungarian IBD Study Group. ATG16L1 and IL23 receptor (IL23R) genes are associated with disease susceptibility in Hungarian CD patients. *Dig Liver Dis*. 2008 Nov;40(11):867-73. Epub 2008 May 22. PubMed PMID: 18499543.
60. Leshinsky-Silver E, Karban A, Dalal I, Eliakim R, Shirin H, Tzofi T, Boaz M, Levine A. Evaluation of the interleukin-23 receptor gene coding variant R381Q in pediatric and adult Crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007 Oct;45(4):405-8. PubMed PMID: 18030204.
61. Amre DK, Mack D, Israel D, Morgan K, Lambrette P, Law L, Grimard G, Deslandres C, Krupoves A, Bucionis V, Costea I, Bissonauth V, Feguery H, D'Souza S, Levy E, Seidman EG. Association between genetic variants in the IL-23R gene and early-onset Crohn's disease: results from a case-control and family-based study among Canadian children. *Am J Gastroenterol*. 2008 Mar;103(3):615-20. Epub 2007 Nov 28. PubMed PMID: 18047539.
62. Cheng JF, Ning YJ, Zhang W, Lu ZH, Lin L. T300A polymorphism of ATG16L1 and susceptibility to inflammatory bowel diseases: a meta-analysis.

- World J Gastroenterol. 2010 Mar 14;16(10):1258-66. PubMed PMID: 20222171; PubMed Central PMCID: PMC2839180.
63. Baldassano RN, Bradfield JP, Monos DS, Kim CE, Glessner JT, Casalunovo T, Frackelton EC, Otieno FG, Kanterakis S, Shaner JL, Smith RM, Eckert AW, Robinson LJ, Onyiah CC, Abrams DJ, Chiavacci RM, Skraban R, Devoto M, Grant SF, Hakonarson H. Association of the T300A non-synonymous variant of the ATG16L1 gene with susceptibility to paediatric Crohn's disease. *Gut*. 2007 Aug;56(8):1171-3. PubMed PMID: 17625155; PubMed Central PMCID: PMC1955510.
64. Fowler EV, Doecke J, Simms LA, Zhao ZZ, Webb PM, Hayward NK, Whiteman DC, Florin TH, Montgomery GW, Cavanaugh JA, Radford-Smith GL. ATG16L1 T300A shows strong associations with disease subgroups in a large Australian IBD population: further support for significant disease heterogeneity. *Am J Gastroenterol*. 2008 Oct;103(10):2519-26. Epub 2008 Jul 30. PubMed PMID: 18671817.
65. Glas J, Seiderer J, Wetzke M, Konrad A, Török HP, Schmechel S, Tonenchi L, Grassl C, Dambacher J, Pfennig S, Maier K, Griga T, Klein W, Eppelen JT, Schiemann U, Folwaczny C, Lohse P, Göke B, Ochsenkühn T, Müller-Myhsok B, Folwaczny M, Mussack T, Brand S. rs1004819 is the main disease-associated IL23R Variant in German Crohn's disease Patients: combined analysis of IL23R, CARD15, and OCTN1/2 variants. *PLoS ONE* 2007;2:e819.
66. Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, Kleinschek MA, Owyang A, Mattson J, Blumenschein W, Murphy E, Sathe M, Cua DJ, Kastelein RA, Rennick D. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* 2006;116:1310–6.
67. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 2003;278:1910–4.
68. Hue S, Ahern P, Buonocore S, Kullberg MC, Cua DJ, McKenzie BS, Powrie F, Maloy KJ. Interleukin-23 drives innate and T-cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med* 2006;203:2473–83.
69. Neurath MF. IL-23: a master regulator in Crohn disease. *Nat Med* 2007;13:26–8.
70. Cummings JR, Cooney R, Pathan S, Anderson CA, Barrett JC, Beckly J, Geremia A, Hancock L, Guo C, Ahmad T, Cardon LR, Jewell DP. Confirmation

of the role of ATG16L1 as a Crohn's disease susceptibility gene. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:941–6.

71. Weersma RK, Zhernakova A, Nolte IM, Lefebvre C, Rioux JD, Mulder F, van Dullemen HM, Kleibeuker JH, Wijmenga C, Dijkstra G. ATG16L1 and IL23R are associated with inflammatory Bowel diseases but not with celiac disease in The Netherlands. *Am J Gastroenterol* 2007 [online].
72. Zhang HF, Qiu LX, Chen Y, Zhu WL, Mao C, Zhu LG, Zheng MH, Wang Y, Lei L, Shi J. ATG16L1 T300A polymorphism and Crohn's disease susceptibility: evidence from 13,022 cases and 17,532 controls. *Hum Genet.* 2009 Jun;125(5-6):627-31. Epub 2009 Apr 1. PubMed PMID: 19337756.
73. Kuballa P, Huett A, Rioux JD, Daly MJ, Xavier RJ. Impaired autophagy of an intracellular pathogen induced by a Crohn's disease associated ATG16L1 variant. *PLoS One.* 2008;3(10):e3391. Epub 2008 Oct 13. PubMed PMID: 18852889; PubMed Central PMCID: PMC2566595.