T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

CROHN HASTALARINDA MİKROBİYATA KARAKTERİZASYONU VE İNFLAMAZOM BİLEŞENLERİNİN ROLÜ

DUYGU KIRKIK

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. SEVGİ KALKANLI TAŞ

TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ
ŞUBAT/2022

İTHAF

“Sevgili aileme ithaf ediyorum”

TEŞEKKÜR

Doktora sürecim boyunca her türlü deneyim ve bilgilerini benimle paylaşan, mesleki gelişimime; bilimsel desteği ve yol açıcı fikirleriyle katkı sunan bilgime bilgi katan, her daim öğretici, yol gösterici ve adaletli olan, değerli akademisyen, bilim insanı ve saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Sevgi Kalkanlı TAŞ'a,

Doktora eğitimim süresinde akademik ilerlememde katkısı ve desteği olan bölüm başkanımız değerli akademisyen ve bilim insanı Prof. Dr. Ülkan KILIÇ'a,

Doktora tezim süresince hasta ve sağlıklı örneklerimin toplanmasında, klinik değerlendirilmesinde katkı sağlayan Ümraniye Eğitim Araştırma Hastanesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı doktoru Doç. Dr. Resul KAHRAMAN ve İBH hemşiresi Derya YILDIZ'a, akademik sürecim boyunca bana yardımcı olan Doç. Dr. Alpaslan TANOĞLU'na,

Çalışmalar boyunca deneysel yardımını esirgemeyen başta arkadaşım Derya ALTUNKANAT, Cihan ERDOĞAN, Aylin UZUNOĞLU, Merve UZUNOĞLU, Fatih HACIMUSTAFAOĞLU, Dr. Aydın EROĞLU ve Tıbbi Biyoloji Anabilimdalı'nda lisansüstü öğrenimine devam eden arkadaşlarıma,

Büyük emek ve özveriyle beni bugünlere getiren, her anımda yanımda olan emeklerini asla ödeyemeyeceğim annem Tülay KIRKIK, babam Doğan KIRKIK ve kardeşim Zeki KIRKIK'a

Tez yazım aşaması süresince her türlü moral ve desteğini veren kuzenim Gizem MAMARAŞLI ve arkadaşım Gökhan CİVELEK'e

Bu Proje Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Biriminin (BAP) "2020/083" sayılı projesiyle ve "YÖK 100/2000 Doktora Bursu" ile desteklenmiştir.

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Duygu KIRKIK

İÇİNDEKİLER

İTHAF iv
TEŞEKKÜR v
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR LİSTESİ viii
ŞEKİLLER LİSTESİ ix
SİMGELER VE KISALTMALAR xi
ÖZET xiv
ABSTRACT xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. İNFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALIĞI 4
2.2. İNFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALIĞININ EPİDEMİYOLOJİSİ 5
2.3. İNFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALIKLARI RİSK FAKTÖRLERİ 6
2.3.1. Çevresel Faktörler 7
2.3.2. Genetik Faktörler 8
2.4. İNFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALIĞININ PATOFİZYOLOJİSİ 9
2.5. CROHN HASTALIĞI 10
2.6. CROHN HASTALIĞININ PATOGENEZİ 10
2.7. CROHN HASTALIĞI VE NOD2 İLİŞKİSİ 11
2.8. NLRP3 İNFLAMAZOMU 13
2.8.1. NLRP3 İnflamazomunun Mekanizmaları 14
2.8.1.1. İyon akışları 14
2.9. NLRP3 İNFLAMAZOMUNUN CROHN HASTALIĞINDAKİ ROLÜ 16
2.10. KAN MİKROBİYATASI 17
2.11. KAN MİKROBİYATASININ CROHN HASTALIĞI İLE İLİŞKİSİ 19
2.12. CROHN HASTALIĞINDA TEDAVİ YÖNTEMLERİ 20
3. GEREÇ VE YÖNTEM 25
3.1. ETİK İZİN 25
3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN ÖRNEKLER 25
3.3. ÇALIŞMADA KULLANILAN CİHAZ VE KİMYASALLAR 25
3.3.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar 25
3.3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Kitler 27

3.3.3. Çalışmada Kullanılan Tampon Çözeltilerin Hazırlanışı 28
3.3.3.1. Mikrobiyal DNA izolasyonu için hazırlanan çözeltiler: 28
3.3.3.2. QUBIT flurometre ile DNA konsantrasyonu ölçümü için hazırlanan çözeltiler:..... 28
3.3.3.3. SDS-PAGE jel elektroforezi için hazırlanan tampon ve çözeltiler:..... 29
3.3.3.4. Western blot için hazırlanan tampon ve çözeltiler:..... 29
3.3.3.5. ELISA için hazırlanan tampon ve çözeltiler: 30
3.4. YÖNTEM.....31
3.4.1. Mikrobiyal DNA İzolasyonu 31
3.4.2. DNA Konsantrasyonlarının Ölçümü..... 32
3.5. MİKROBİYATA ANALİZİ (METAGENOM ANALİZİ) 32
3.5.1. Kütüphane Hazırlama..... 32
3.5.2. Dizileme 33
3.5.3. Biyoinformatik Analiz..... 34
3.6. PROTEİN SEVİYESİNİN WESTERN BLOT YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ35
3.6.1. SDS-PAGE Jel Elektroforezi..... 35
3.6.2. Semi-Dry Western Blot Yöntemi ile NLRP3'ün Belirlenmesi 35
3.7. İSTATİKSEL ANALİZ 37
4. BULGULAR..... 39
4.1. 16S rRNA DİZİLEME ÖNCESİ PCR ÇALIŞMASI 39
4.2. 16S rRNA DİZİLEME ÖNCESİ ÖRNEKLERİN RT-PCR İLE KONTROLÜ 39
4.3. CROHN HASTALARININ KAN ÖRNEKLERİNDE BAKTERİLERİN SINIFLANDIRILMASI 40
4.4. YEME ALIŞKANLIKLARI VE KLİNİK BULGULARIN KARŞILAŞTIRILMASI 46
4.5. NLRP3 PROTEİNİNİN SDS-PAGE İLE GÖSTERİLMESİ 48
4.6. NLRP3 PROTEİNİNİN WESTERN BLOT İLE GÖSTERİLMESİ 52
4.7. IL-1β SEVİYESİNİN TÜM ÖRNEKLERDE TESPİTİ.....56
4.8. IL-18 SEVİYESİNİN TÜM ÖRNEKLERDE TESPİTİ.....58
5. TARTIŞMA 61
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER..... 67
KAYNAKLAR 68
EK..... 80

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: NOD2'nin immünite üzerindeki işleyiş ve fonksiyonları gösterilmiştir 13

Tablo 2.2: Aminosalisilatlar ve aminosalisilatların etkinliği ve yan etkileri..... 21

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan cihazlar 26

Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler 27

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Crohn hastalığının oluşum mekanizması 7

Şekil 2.2: Crohn hastalığının mekanizması 12

Şekil 2.3: NLRP3 inflamazomu aktivasyonunda iyon akışlarının rolleri 15

Şekil 4.1: Yeni tanılı Crohn hastaları, anti-TNF alan Crohn hastaları ve sağlıklı bireylerde V3-V4 bölgelerinin PCR ile gösterilmesi 39

Şekil 4.2: Örneklerin V3-V4 kontrol RT-PCR sonuçları 40

Şekil 4.3: Crohn hastalarının kanında bulunan 5 farklı filumun tespiti 41

Şekil 4.4: Tüm örneklerde bakteri türü ve miktarının analizi 41

Şekil 4.5: Crohn hastalarının kanında bakteri genuslarının tespiti 42

Şekil 4.6: Crohn hastalarının kanında bakteri türlerinin tayini 43

Şekil 4.7: Crohn hastalarının filumuna ait bar plot grafiği I 44

Şekil 4.8: Crohn hastalarının filumuna ait bar plot grafiği II 45

Şekil 4.9: Bir haftada tüketilen süt ve süt ürünleri ortalamalarının karşılaştırılması 46

Şekil 4.10: Bir haftada tüketilen haşlanmış sebze miktarının karşılaştırılması 46

Şekil 4.11: Bir haftada tüketilen et ve et ürünlerinin karşılaştırılması 47

Şekil 4.12: Anti-TNF ilaç alan Crohn hastaları ile kontrol grubunun klinik bilgilerinin karşılaştırılması 47

Şekil 4.13: Yeni tanılı Crohn hastaları ile kontrol grubunun klinik bilgilerinin karşılaştırılması 48

Şekil 4.14: Yeni tanılı Crohn hastaları, anti-TNF ilaç alan Crohn hastaları ve kontrolün plazma örneklerindeki proteinlerinin SDS elektroforezi ile karşılaştırılması 49

Şekil 4.15: Yeni tanılı Crohn hastaları, anti-TNF ilaç alan Crohn hastaları ve kontrollerin plazma örneklerindeki proteinlerinin SDS elektroforezi ile karşılaştırılması 50

Şekil 4.16: Yeni tanılı Crohn hastaları, anti-TNF ilaç alan Crohn hastaları ve kontrollerin plazma örneklerindeki proteinlerinin SDS elektroforezi ile karşılaştırılması 50

Şekil 4.17: Anti-TNF ilaç alan Crohn hastalarının plazma örneklerindeki proteinlerinin SDS elektroforezi ile gösterilmesi 50

Şekil 4.18: Sağlıklı bireylerin plazma örneklerindeki proteinlerin SDS elektroforezi ile karşılaştırılması 51

Şekil 4.19: Sağlıklı bireylerin plazma örneklerindeki proteinlerin SDS elektroforezi ile karşılaştırılması 51

Şekil 4.20: Yeni tanılı Crohn hastaları, anti-TNF ilaç alan Crohn hastaları ve kontrol grubunda NLRP3 proteininin Western Blot yöntemi ile gösterilmesi 53

Şekil 4.21: Yeni tanılı Crohn hastaları, anti-TNF ilaç alan Crohn hastaları ve sağlıklı bireylerde NLRP3 ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması 54

Şekil 4.22: Anti-TNF ilaç alan Crohn hastaları ve sağlıklı bireylerde NLRP3 ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması 54

Şekil 4.23: Yeni tanılı Crohn hastaları ve sağlıklı bireylerde NLRP3 ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması 55

Şekil 4.24: Yeni tanılı Crohn hastaları, anti-TNF ilaç alan Crohn hastalarında NLRP3 ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması 55

Şekil 4.25: Tespit edilen NLRP3 proteininin band yoğunluğunun hesaplanması 56

Şekil 4.26: Tüm hasta ve kontrollerde IL-1β seviyesinin 450 nm'de ölçümü 57

Şekil 4.27: IL-1β seviyesinin yeni tanı almış Crohn hastaları, anti-TNF ilaç alan Crohn hastaları ve sağlıklı bireylerde karşılaştırılması 57

Şekil 4.28: IL-1β seviyesinin ölçüm spesifite ve hassaslık grafik analizi 58

Şekil 4.29: Tüm hasta ve kontrollerde IL-18 seviyesinin 450 nm'de ölçümü 59

Şekil 4.30: IL-18 seviyesinin yeni tanı alan Crohn hastaları, anti-TNF ilaç alan Crohn hastaları ve sağlıklı bireylerde karşılaştırılması 59

Şekil 4.31: IL-18 seviyesinin ölçüm spesifite ve hassaslık grafik analizi 60

SİMGELER VE KISALTMALAR

AIM2 : Absent In Melanoma 2

AMP : Anti Mikrobiyal Peptit

APC : Antijen Sunan Hücreler

AZA : Azatiopin

CARD : Caspase Activation and Recruitment Domain

CH : Crohn Hastalığı

CLIC : Clathrin-Independent Carrier

DAMP : Damage-Associated-Molecular Pattern

DNA : Deoksiribonükleik Asit

ER : Endoplazmik Retikulum

HLA : Human Leukocyte Antigen

İBH : İnflamatuar Bağırsak Hastalığı

İBH-PI : Inflamatuar Bağırsak Hastalığı-Post Enfeksiyöz

IFNγ : İnterferon gamma

IL-12 : Interlökin 12

IL-12B : İnterlökin 12B

IL1R1 : İnterlökin 1 Reseptör Tip 1

IL1RL2 : Toll Like Receptor

IL-1β : İnterlökin 1 beta

IL-23 : İnterlökin 23

IL23R : Interlökin 23 Reseptör

LRR : Leucine-Rich Repeat

M-CSF : Monosit Colony-Stimulating Factors

MDP : Muramil Di-Peptit

MtROS : Mitokondriyal Reaktif Oksijen Türleri

MTX : Metotreksat

NACHT : Nükleotid Bağlayıcı Domain

NF-Kb : Nükleer Faktör κB

NK : Doğal Öldürücü Hücreler

NLR : NOD Like Receptor

NLRC4 : NLR Family CARD Domain Containing 4

NLRP1 : NLR Family Pyrin Domain Containing 1

NLRP3 : NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3

NOD : Nucleotide Oligomerization Domain

NOD2 : Nucleotide-binding and Oligomerization Domain 2

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern

PRR : Pattern Recognition Receptor

RNA : Ribonükleik Asit

ROS : Reactive Oxygen Species

T_H0 : T yardımcı hücreler

T_H1 : T yardımcı hücre 1

Th17 : T yardımcı hücre 17

T_H2 : T yardımcı hücre 2

TLR : Toll Like Receptor

TLR2 : Toll Like Receptor 2

TLR4 : Toll Like Reseptor 4

TNF : Tümör Nekroz Faktör

TNFSF15 : Tumor Nekrosis Factor Super Family 15

TNFα : Tümör Nekröz Faktör alfa

ÜK : Ülseratif Kolit

CROHN HASTALARINDA MİKROBİYATA KARAKTERİZASYONU VE İNFLAMAZOM BİLEŞENLERİNİN ROLÜ

ÖZET

Amaç: Doğal ve edinsel immünitenin birlikte rol aldığı bir immün reaksiyon olan inflamasyon, patojenlere karşı konakçı savunmasında hayati önem taşımaktadır. Genetik, çevre ve immünolojik ortamdan etkilenen Crohn Hastalığı, idiyopatik inflamatuar bir hastalık olduğu için çalışmamızda Crohn hastaları ve sağlıklı bireylerin kan mikrobiyatasındaki farklılıkları, inflamazom bileşenlerinin yanıtlarıyla değerlendirmeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamıza; 10 yeni tanı almış Crohn hastası, 10 anti-TNF ilaç alan Crohn hastası ve 20 kontrol olmak üzere 40 gönüllü dahil edildi. Kan örneklerinin tamamından 16S rRNA yöntemiyle V3-V4 bölgeleri dizilendi. Sonrasında ise NLRP3 proteini Western Blot yöntemi ile, IL-1β ve IL-18 serum profilleri ise ELISA yöntemiyle değerlendirildi.

Bulgular: Çalışmamızda hastaların kanında 5 farklı filum bulundu. Yeni tanı almış Crohn hastaları ve anti-TNF ilaç alan Crohn hastalarında NLRP3 proteininin çok yüksek miktarda bulunduğu, kontrol grubunda ise hiç bulunmadığı tespit edildi. Inflamazom bileşenleri olan IL-1β serum seviyesinin hasta grubunda daha az, kontrol grubunda ise daha yüksek olduğu (p=0,0041) ve IL-18 serum seviyesinin ise hastalarda yüksek miktarda (p=0,8209) sağlıklı bireylerde ise az miktarda olduğu tespit edildi.

Sonuç: Çalışmamız; Crohn hastaları ve kontrollerin kan mikrobiyal profillerinde olan önemli değişiklikleri ve klinik olarak önemli bir patojen olan Staphyloccus sciuri'nin varlığını ortaya koymaktadır. Sonuçlarımıza göre doğal ve edinsel immün yanıtta önemli bir rolü olan NLRP3 proteininin Crohn hastalarında aşırı ekspresyonunun gözlemlenmesi, hastalığın teşhisinde kullanılabilecek bir biyobelirteç olabileceğini göstermektedir. Bu çalışma ayrıca IL-1β ve IL-18 hakkında keşfedilecek daha çok biyolojik ve fizyolojik mekanizmaların olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Crohn Hastalığı, IL-18, IL-1β, İnflamazom, Mikrobiyom, NLRP3

THE CHARACTERIZATION OF THE MICROBIOATA AND THE ROLE OF INFLAMMASOME COMPONENTS IN CROHN PATIENTS

ABSTRACT

Aim: Inflammation is an immune reaction in which innate and acquired immunity are involved. It is vital in the host's defense against pathogens. Crohn's disease is an idiopathic inflammatory disease that is affected by genetic, environmental, and immunological factors. Thus, we aimed to investigate differences between the blood microbiome of Crohn's patients and healthy individuals regarding inflammasome component responses.

Materials and Methods: 40 volunteers were included in our study (10; newly diagnosed Crohn's disease patients, 10; patients taking anti-TNF drugs, and 20 control). V3-V4 regions were sequenced from blood samples of the study group by 16S rRNA method. Then, NLRP3 protein expression was analyzed by Western Blot using serum samples, and IL-1β and IL-18 serum profiles were analyzed by ELISA.

Results: In our study, 5 phyla were found in the patients' blood. NLRP3 protein expression was found quite high in newly diagnosed patients and patients taking anti-TNF drugs, while it was absent in the controls. Serum level of IL-1β was lower in the patient group than in the controls (p=0,0041), and IL-18 serum level was found relatively higher amounts in patients (p= 0,8209).

Conclusion: Our study reveals significant changes in the blood microbiome of Crohn's patients and the presence of clinically important pathogen of Staphylococcus sciuri. Our results show overexpression of NLRP3 protein in Crohn's patients suggests that it may be a biomarker that can be used for diagnosis. The investigation of IL-1 and IL-18-related immunological pathways has revealed novel and critical areas in Crohn's disease, according to this study.

Key Words: Crohn's Disease, IL-18, IL-1β, Inflammasome, Microbiome, NLRP3

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnflamatuar bağırsak hastalığı (İBH) sindirim sisteminde, iltihapla sonuçlanan ve bazen de bağırsakların yapısında hasara neden olan kronik bir hastalıktır. İBH'nın küresel prevalansı 2000 yılından beri artmaktadır ve İBH şu anda Batı ülkelerinde 200 kişiden 1'ini etkilemektedir (1). İBH; gastrointestinal sistemin etkilenen kısımları, semptomlar, komplikasyonlar, hastalık seyri ve yönetimi açısından farklılık gösteren Crohn Hastalığı (CH) ve Ülseratif Kolit (ÜK) olmak üzere iki farklı bozukluğu kapsar. CH'nin nedeni hala belirsizdir, ancak genetik, immünolojik ve çevresel faktörler, hastalığın başlangıcı ve ilerlemesine katkıda bulunmaktadır (2). CH, gastrointestinal sistemin herhangi bir yerini tutan bağırsak lezyonları ile karakterizedir ve kronik karın ağrısı, diyare, obstrüksiyon ve/veya perianal lezyonlara yol açabilen kronik, tekrarlayan transmural inflamasyonu içerir (2,3). Ülkemizde İBH'nin insidansı, Kuzey ülkelerine göre düşük, Asya ve Afrika ülkelerine göre ise daha yüksek orandadır. CH'ye ait en yüksek insidans ve prevalans oranları Kuzey Amerika, Birleşik Krallık, Kuzey Avrupa ve Avustralya'dır (4). Literatürde, Crohn hastalığının fizyolojisini, patolojisini ve etiyolojisini anlamak için birçok çalışma yapılmıştır. Son yıllarda yapılan araştırmalar; tütün kullanımı, beslenme alışkanlıkları, anti-inflamatuar ilaç kullanımı, genetik faktörler ve immünolojik ajanların Crohn hastalığının oluşum mekanizmasında rol oynadığını göstermiştir. Literatürde, inflamatuar hastalıkların patogenezinde mikrobiyata ve mikrobiyom çalışmaları önemli yer teşkil etmektedir.

İnsan mikrobiyomu, bakteri, arke, viral ve mantar mikrobiyal taksonlarının geniş bir korpusunu içerir. Bu mikroorganizmaların çoğu kommensal olmakla birlikte, bazıları mutualizm bazıları ise patojeniktir. Yararlı, önemsiz veya zararlı olup olmadığına bakılmaksızın, bedenlerimizi ve yaşamlarımızı paylaştığımız mikroplarla vücudumuz ayrılmaz bir şekilde bağlantılıdır (5). Yüzyıllar boyunca kan, immünolojik olarak ayrıcalıklı ve steril bir ortam olarak kabul edilmiştir. Ancak bu algı, kan mikrobiyotasının ve dolaşımdaki mikrobiyal metabolitlerin varlığını bildiren çalışmalarla son on yılda büyük ölçüde değişmiştir (6). Kandaki bazı patojen ya da zararlı mikropların varlığı, konakçı immün sürveyansına etkileri ve inflamatuar hastalıklardaki rollerine ışık tutmuştur (7-12). Yapılan çalışmalarda

beklenmedik mikroorganizmaların kökenleri, kimlikleri ve işlevleri henüz aydınlatılamamış olsada, kan yoluyla bulaşan mikrobiyal filogeni hakkındaki bilgiler giderek artmaktadır. İnsan kan mikrobiyomunun bileşimi ve kökenine odaklanmak hastalıkların patogenezinin aydınlatılmasına katkıda bulunacaktır. Bu amaçla, 16S rRNA gen dizilemesi ile bakteri türleri, bakteri türlerinin miktarının tayini ve genomik benzerlikleri Crohn hastalarında NOD, LRR- and pyrin domain-containing 3 protein (NLRP3) inflamazom bileşenleri ile değerlendirmektir. Doğal ve edinsel immünitenin birlikte rol aldığı bir immün reaksiyon olan inflamasyon, patojenlere karşı konakçı savunmasında hayati önem taşır. İnvazif patojene yanıt olarak nötrofil ve makrofaj gibi inflamatuvar hücrelerin birikimi, patojenin fagositozu sonrası; çeşitli sitokin ve kemokinlerin salgılanması ve bu moleküllerin lenfositleri aktive ederek edinsel immün yanıtı başlatması ile enfeksiyona yol açan patojenin ortadan kaldırılmasıyla ya da patojenin ortadan kaldırılamadığı yerleşen enfeksiyon durumlarında, kronik inflamatuar yanıtların başlatılmasıyla sonlanır. En iyi karakterize edilmiş inflamatuar sensör molekülü olan NLRP3; NOD Like Reseptör (NLR) ailesine ait bir proteindir ve bir amino terminal PYRIN (PYD) bölgesi, bir nükleotit bağlayıcı (NACHT) ve bir karboksi terminal lösin bakımından zengin tekrar (LRR) bölgeleri içerir (13). Çeşitli uyaranlara yanıt veren NLRP3'ün en çok rastlanan inflamazom tipi olduğu görülmektedir ve NLRP3 inflamazom ekspresyonu, Toll-like reseptör (TLR) ve NLR sinyalini aktive eden lipopolisakkarit gibi patojenle ilişkili moleküler kalıplar (PAMP) tarafından tetiklenmektedir (14). Nucleotide-binding and oligomerization domain 1 (NOD1) ve nucleotide-binding and oligomerization domain 2 (NOD2) reseptörleri gram negatif ve gram pozitif bakterilerden kaynaklanan peptidoglikan ürünlerini tanırlar (15). IL-1β dönüştürücü enzim (ICE) proteaz aktive edici faktör (IPAF) bir başka NLR'dir ve TLR5 ile eşleşerek flajelli bakteriler ile gelişen enfeksiyonları tanımaktadır (15). TLR5 ekstraselüler flajelini tanırken IPAF intraselüler flajelini tespit etmektedir (15). NLR'ler mikrobiyal parçacıkları tespit etmelerinin yanı sıra enfeksiyon ve steril enflamasyon ile ilişkili metabolik stresi de tespit etmektedir (15). Bu özellik en fazla NLRP3'de gelişmiştir ve NLRP3 inflamazomu yaygın metabolik tehlike sinyalleri ile aktive olmaktadır (15). İnflamazomun aktive olması pro-kaspaz 1'in parçalanması ve aktif proteaz aktivasyonu ile sonuçlanır (16,17). Aktive olan kaspaz-1, pro-IL-1β ve pro-IL-18'i parçalayarak biyolojik aktif formlara

dönüştürmektedir (16-18). Bağırsak mikrobiyomu, NLRP3 inflamazom yanıtını düzenleyerek hastalıkları ve inflamasyon sonuçlarını etkileyebileyeceğini raporlayan çalışmalar vardır (19,20). Günümüzde insan mikrobiyota projesi kapsamındaki araştırmalar sonucunda, vücudumuzda doğumdan itibaren var olan, vücut homeostazisinde aktif rol oynayan mikroorganizmaların rolleri daha iyi anlaşılmaya başlanması, heyecan verici gelişmelere yol açmıştır (21-24). İnsan mikrobiyotası gastrointestinal sistem başta olmak üzere deri, genitoüriner sistem ve solunum sistemine kolonizedir. Gastrointestinal sistem geniş yüzey alanı ve besin öğeleri bakımından zengin olması nedeni ile vücudumuzdaki mikroorganizma topluluğunun önemli bir kısmını barındırmaktadır (25). Bu nedenle mikrobiyomlarla ilgili çalışmaların büyük çoğunluğunu gastrointestinal mikrobiyomları kapsamaktadır. İnsan genomundan 150 kat fazla gen içeren (26-28) mikrobiyom, hastalık durumunda değişikliğe uğramakta ve bu durum disbiyoz olarak adlandırılmaktadır. Crohn hastalarının kan mikrobiyatasıyla ilgili bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Çalışmamız, yeni tanı konmuş Crohn hastalarını, anti-tümör nekroz faktörü (anti-TNF) alan Crohn hastalarını ve sağlıklı olan bireylerin kan mikrobiyatasındaki farklılıkları inflamazom bileşenlerinin yanıtlarıyla değerlendirecek olan ilk çalışma olacaktır. İnsan genomundaki genetik varyasyonların; mikrobiyomdaki taksonların varlığı, yokluğu veya rölatif bolluğu ile ilişkili olduğu yakın zamanda gösterilmiştir. Bu durum ilerleyen süreçte genetik varyasyon ve çevresel etkileşimin olduğu bazı hastalıklarda, mikrobiyomun doğal immün mekanizmalarla değerlendirilmesinde önemli bir değere sahip olacağını düşündürmektedir. Çalışmamıza anti-TNF ilaç kullanan Crohn hastaları da eklenmiştir. Crohn hastalarının ilaç öncesi ve sonrası kan mikrobiyatasındaki değişiklikler izleneceğinden, çalışmamıza katkıda bulunacak bireyler beslenme şekilleriyle ilgili anket dolduracaktır. Bu üç grup, günlük olarak aldıkları öğün/besin miktarları, yeme alışkanlıkları, 16s rRNA dizilimi sonuçları, NLRP3 inflamazom yanıtları bakımından değerlendirilecektir. Bu sebeple; NLRP3 inflamazomu ve kan mikrobiyatası arasındaki ilişkiyi tanımlayacak olmamız, hastalığın patogenezini anlamamız açısından da önem taşımaktadır. Kandaki mikrobiyom varlığının, NLRP3 inflamatuar yanıtlarının düzenlenmesi yoluyla inflamasyonu ve hastalık seyrini ve hastalık şiddetini etkileyebileceğini düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İNFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALIĞI

İBH; konak-mikrobiyal etkileşimlerden kaynaklanan kronik bir bağırsak iltihabı olarak tanımlanır (1). İBH'nin küresel prevalansı 2000 yılından beri artmaktadır ve günümüzde İBH; batı ülkelerinde yaşayan her 200 kişiden 1'ini etkilemektedir (2). İBH, gastrointestinal sistemin etkilenen kısımları, semptomlar, komplikasyonlar, hastalık seyri ve yönetimi açısından farklılık gösteren CH ve ÜK olmak üzere iki farklı klinik seyir izler. CH'nin nedeni halen belirsizdir fakat; genetik, immünolojik ve çevresel faktörler, hastalığın başlangıcı ve ilerlemesine katkıda bulunur (3). CH, gastrointestinal sistemin herhangi bir yerinde tutulum yapan bağırsak ile karakterizedir ve kronik karın ağrısı, diyare, obstrüksiyon ve/veya perianal lezyonlara yol açabilen kronik, tekrarlayan transmural inflamasyonu içerir. ÜK ise sadece kolonu etkiler, lezyonlar süreklidir, iltihaplanma yüzeyseldir ve kanlı ishale yol açar. CH ilerleyici ve yıkıcıdır. Aynı zamanda hastaların %21-47'sinin yaşam kalitesini düşürerek; hastaneye yatış, komplikasyonlar ve cerrahi riskler gibi hastaları birçok yönden etkileyen, sistemik, ekstraintestinal belirtiler göstermektedir (3). Ayrıca CH, hastaların yarısında, tanıdan sonraki 10 yıl içinde striktür veya fistül gibi bağırsak komplikasyonları gelişimine katkıda bulunur. Popülasyona dayalı kohort çalışmaları, CH'ye sahip bireylerin yaklaşık %30'nun tanı anında bağırsak hasarına sahip olduğunu ve bu hastaların yarısının tanıyı takip eden 20 yıl içinde ameliyat olması gerektiğini gösterir (4,5). Yapılan araştırmalara göre literatürde; şehirleşmiş bölgeler ve kuzeyde yaşayan Aşkenaz Yahudilerinin, CH bakımından yüksek insidansa sahip oldukları raporlanmıştır. Asya popülasyonlarına özgü yapılan çalışmalarda ise erkeklerde CH insidansının kadınlarda CH insidansına göre daha yüksek bulunduğu raporlanmıştır (6,11).

İBH'ye sahip olan hastalarda mukozal olarak bozulan yapıların iyileştirilmesi en çok tercih edilen tedavi şekillerinden biridir ve ameliyat riskinin azalması, nüks oranlarının düşmesi ve yaşam kalitesinin artmasına yardımcı olur (12). Son yirmi yılda, anti-TNF tedavisi (örneğin; infliximab, adalimumab ve sertolizumab), CH'nin seyrini değiştirmiştir. Bu ilaçlar hastalık seyri ilerlemeden kullanılmaktadır ve özellikle hastalık ilerlemesi riski yüksek olan hastalar için en çok tercih edilen tedavi olarak kabul

edilmektedir. Bu hedefe yönelik biyolojik tedaviler, CH tedavisinde kayda değer bir ilerleme göstermesine rağmen, parenteral uygulama ve ilacın immünojenisi dezavantaj oluşturmaktadır. CH için diğer biyolojik tedaviler, monoklonal anti-integrin antikoru olan vedolizumab ve orta-şiddetli Crohn hastalığında ise indüksiyon ve remisyonun sürdürülmesi için IL-12 ve IL-23 antagonisti olan ustekinumab tercih edilmektedir (3).

Hastalığın kronik, öngörülemeyen doğası; CH'ye sahip bireylerin yaşam kalitesini arttırmak ve bağırsak hasarını erken tedavi etmek için önemlidir.

2.2. İNFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALIĞININ EPİDEMİYOLOJİSİ

İBH insidansı bölgelere göre farklılık göstermektedir ve her yıl oran 100.000: 0,1-58 vaka arasında değişmektedir. Çalışmalar en yüksek insidansa sahip olan bölgelerin Kuzey Amerika, Kuzey ve Batı Avrupa ve Okyanus Kıtasının olduğunu göstermektedir (2). Kuzey Amerika'da her yıl 100.000: 0-20,2 vaka ve Avrupa'da ise 100.000: 0,3-12,7 vaka olduğu raporlanmıştır. Bildirilen en yüksek CH prevalansı Avrupa'da (Almanya'da 100.000:322 vaka) ve Kuzey Amerika'da (Kanada'da) 100.000: 319 vakadır (2).

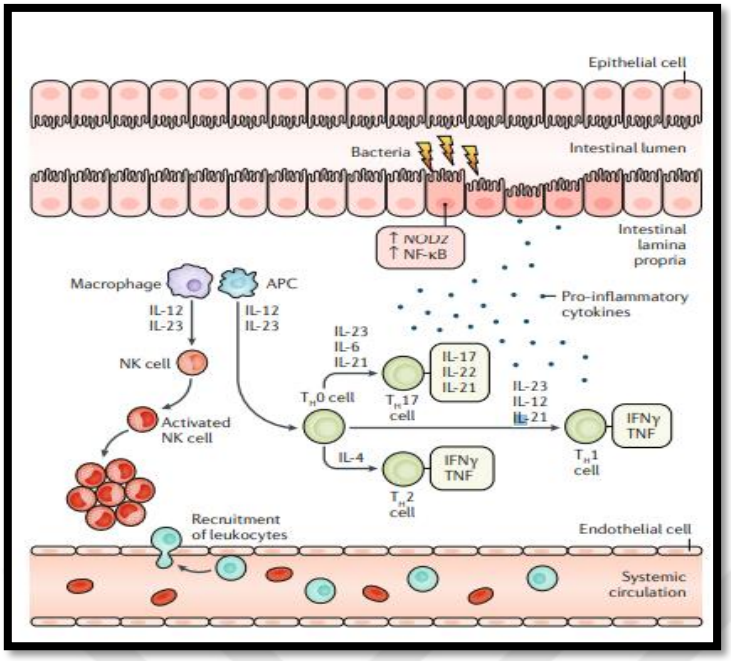
Yirmi birinci yüzyılın başından günümüze kadar, İBH insidansı; Asya, Afrika ve Güney Amerika gibi yeni sanayileşmiş ülkelerde hızla artan insidans ile birlikte küresel olarak bir artış göstermiştir. Çin'de ise İBH insidansı, nadir görülen bir durum olmaktan çıkıp, yaygın olan ve hastane yataklarının önemli ölçüde kullanımını gerektiren bir duruma dönüşmüştür (13). Kore'deki çalışmalar 2005 yılında 100.000: 1,68 vaka olduğunu bildirmiştir (9,10). Asya popülasyonunda CH prevalansı artmıştır. Örneğin, Tayvan'da CH prevalansı 2001 yılında 100.000: 0,6 vakadan 2015 yılında 100.000: 3,9 vakaya yükselmiştir ve 2014 yılında Hong Kong'da CH prevalansı 100.000:18,6 vaka olarak bildirilmiştir (14,15).

Yeni sanayileşmiş ülkelerde (Asya gibi), artan CH insidansı; batı yaşam tarzının, özellikle diyet, kentleşme ve sanayileşmenin risk üzerindeki etkisini yansıtmaktadır (16). Ayrıca, göçmenler üzerinde yapılan araştırmalar, CH insidansının düşük olduğu bölgelerden CH insidansının yüksek olduğu bölgelere göç eden bireylerde CH oluşum riskinin yüksek olduğunu ve bu riskin göçmen çocuklarında daha da belirgin olduğunu göstermiştir (2).

Gelişmekte olan ülkelerde CH prevalansı ve hastalık seyri için; çevresel ve genetik risk faktörlerini gelişmiş ülkelerle karşılaştıran popülasyona dayalı prospektif çalışmaların eksikliği nedeniyle, insidanstaki bu artışın gelişmekte olan ülkelerde CH' nin fenotipik özelliklerini nasıl etkileyeceğini tahmin etmek zordur.

2.3. İNFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALIKLARI RİSK FAKTÖRLERİ

Bağırsak homeostazı; lamina propriyadaki lümen içeriği ve mukozal bağışıklık arasındaki denge ile sağlanmaktadır. Bağırsak epiteli, mekanik işlevi (fiziksel bir bariyer olarak) ve aynı zamanda immün işlevleri nedeniyle bu dengeyi düzenlemektedir. Özelleşmiş bağırsak epitel hücreleri, bağırsak immünitesinde önemli rol oynar. Örneğin, Paneth hücreleri; Lieberkühn kriptlerinin tabanında bulunan ve yapısal olarak antimikrobiyal peptitler üreten özelleşmiş bağırsak hücreleridir. Microfold hücreleri ise bağırsakla ilişkili lenfoid dokuda luminal antijenleri yakalayan ve edinsel bağışıklık sisteminin hücrelerine sunan özelleşmiş bağırsak epitel hücreleridir. Bir antijenle etkileşimden sonra, dendritik hücreler gibi Antijen Sunan Hücreler (APC'ler), kontrollü bir inflamatuar yanıt başlatmak için antijeni T hücrelerine ve B hücrelerine sunmaktadır. CH gibi enflamatuar oluşturan durumlarda, epitelyal bariyer disfonksiyonu (örneğin, NOD2 ve nükleer faktör-κB (NF-κB) polimorfizmleri), lümen içeriğinin lamina propriyaya girmesiyle sonuçlanır ve dentritik hücreler interferon gama (IFNγ) ve TNF gibi proinflamatuar sitokinler üreten T_h0 hücreleri, T_h1 hücreleri, T_h17 hücreleri ve T_h2 hücrelerinin aktivasyonuna neden olur. Ayrıca, lümen içeriğine yanıt olarak, makrofajlar; proinflamatuar sitokinler olan IL-12 ve IL-23'ü üretir ve doğal öldürücü (NK) hücreleri aktive eder. Tüm bu sitokinlerin üretimi bağırsak enflamasyonunun devam etmesine neden olur (Şekil 2.1) (17).



Şekil 2.1. Crohn hastalığının oluşum mekanizması (17)

2.3.1. Çevresel Faktörler

Batı ülkelerinde, sigara içmek CH için değiştirilebilir risk faktörüdür ve erken hastalık başlangıcı, immünosupresyon ihtiyacı, artan cerrahi müdahale ihtiyacı ve daha yüksek post-operatif hastalık nüksü oranları ile ilişkilidir (3). Birkaç meta-analiz çalışması, farklı etnik kökenler arasında sigara içmenin CH riski üzerindeki etkisinde bir farklılık tanımlamıştır (18). Ayrıca bazı çalışmalar pasif sigara içiciliğinin CH gelişimine katkıda bulunduğunu göstermiştir (18-21).

Diğer risk faktörü olan diyet; bağırsak mikrobiyatasını etkileyen, çevresel faktörlerden biri olarak gösterilmiştir. Özellikle, konakçı-bağırsak mikrobiyota ilişkisi, gıda bileşimindeki değişiklikler ve yüksek lifli gıdalar, az yağlı gıdalar, gıda katkı maddeleri içeren işlenmiş gıdalar bağırsak disbiyosuzu ile sonuçlanmaktadır. (22).

Az miktarda lif tüketimi, yüksek lifli ve düşük lifli gıda tüketimi arasındaki sık diyet dalgalanmaları, bağırsak mikrobiyota çeşitliliğinin azalmasına yol açar ve CH gelişimine katkıda bulunur (2,3). Diyet; mikrobiyal kompozisyon üzerinde geçici bir etkiye sahip olduğundan, CH'deki değişen mikrobiyal çeşitlilikte diyet değişikliklerinin katılımı hala tartışma konusudur. İsveçte yapılan iki prospektif çalışma, Akdeniz

diyetinin, CH oluşum riskini önemli ölçüde azalttığını gösterilmiştir (23). Yapılan araştırmalarda bağırsak mikrobiyotasının, diyet bileşenleri ile değişebildiği gösterilmiştir (22). Buna ek olarak, bir çalışmada diyet bileşenlerinin epigenetik modifikasyonlar üzerinde etkilerinin olabileceğini ve uzun süreli fenotipik değişiklikler oluşturabileceği göstermiştir (22). Ayrıca son zamanlarda yapılan çalışmalarda çocukluk çağında uzun süreli antibiyotik kullanımı (18), kullanılan oral kontraseptifler, aspirin ve steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçların da (18,24-27) CH oluşum riskini artırdığı bildirmiştir.

Sigara kullanımını durdurmak, antibiyotiklerin doğru kullanımı, çocukluk çağında anne sütü tüketimi ve uygun diyet; CH gelişimini azaltmak ve uzun vadede hastalığın doğurduğu sonuçları iyileştirmek için güvenilir bir yaklaşım olabilir (6).

2.3.2. Genetik Faktörler

Genetik faktörler, çevresel faktörlere kıyasla hastalık riskini belirleyen genomik varyasyonların tanımlanmasına daha fazla katkı sağlamıştır. CH'nin (~%50) ÜK'ye (~%15) göre daha yüksek insidansı vardır ve monozigotik ikizler arasındaki uyum oranları ile CH ailesel kalıtım olarak kabul edilmiştir (3,28). Diğer birçok hastalıkta olduğu gibi, çoğu CH hastalık oluşum riskini arttıran varyantlar (tipik olasılık oranları 1,1-1,2'dir) çoğunlukla genomun düzenleyici bölgelerinde bulunmaktadır (29). CH için çoğu minör risk değişikleri, geniş bir immün aracılı hastalık yelpazesiyle paylaşılmaktadır (30). Literatürde; kalıtsal riskin önemli bir kısmı, NOD2 ve otofaji geni (ATG16L1) (her ikisi de CH için spesifik) ve IL-23 reseptör geni (IL23R) (CH ve ÜK riskini artıran) dahil olmak üzere birkaç lokustaki varyant ile açıklanmaktadır (29-31). Bazı varyantların keşfi, yeni hastalık mekanizmalarını tanımlamıştır; örneğin, CH patogenezinde NOD2 c.3019–3020insC bozulmuş bakteriyal tanıma ve ATG16L1p.Thr300Ala otofajiye neden olmuştur (31). Yapılan genom çalışmaları göstermiştir ki; NOD2, ileal CD38 riski ile ilişkili en önemli genetik faktörlerden biridir ve NOD2 eksikliği olan farelerde bağırsak epitel hücreleri, bakteri üzerindeki toksisite yeteneğini kaybetmiştir (32).

Çalışmalarda; NOD2, ATG16L1 ve IL23R'deki non-synonymous (eş anlamlı olmayan mutasyonlar) risk varyantlarının beyaz popülasyonlarda baskın, Asya kohortlarında monomorfik olduğu gösterilmiştir (3,33). Başka bir çalışmada

Asyalılarda, TNFSF15'in, CD17 ile ilişkilendirilen dominant bir risk varyantının olduğu göstermiştir (34). Doğu Asya popülasyonunda İBH ile ilişkili genetik lokuslar değerlendirilmiş ve B hücre fonksiyonunu etkileyen yeni varyantlar tanımlamıştır (35).

2.4. İNFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALIĞININ PATOFİZYOLOJİSİ

Crohn hastalığında gastrointestinal bölgenin enflamasyonu, bozulmuş epitel bariyer fonksiyonu, doğal ve edinsel bağışıklık tepkilerinin ve bağırsak mikrobiyotasının düzensizliğini içermektedir. Temel olarak post infeksiyöz bağırsak hastalığı (İBH-PI) mekanizmalarını araştıran çalışmalarda gösterilen İBH etiyolojisinde immün aktivasyonun rolüne ilişkin artan kanıtlar vardır (36). İBH'ye sahip olan on bireyden biri, İBH'nin enterik enfeksiyonla başladığına inanılmaktadır. Prospektif çalışmalar, enterik enfeksiyonların %3-36'sının kalıcı İBH semptomlarına yol açtığını göstermiştir. Viral gastroenterit sadece kısa süreli etkilere sahip gibi görünürken, bakteriyel enterit, protozoan ve helmint enfeksiyonlarını uzun süreli İBH-PI takip etmektedir (37). İBH-PI gelişiminde risk faktörleri, önem sırasına göre, hastalık süresinin uzaması, enfeksiyona neden olan bakteri suşunun toksisitesi, sigara, mukozal inflamasyon belirteçleri, cinsiyet, depresyon, hipokondriyazis ve önceki 3 aydaki olumsuz yaşam olaylarını içermektedir (37). İBH-PI'ya neden olan mekanizmalar bilinmemektedir ancak mukozal immünositlerde, enterokromafin ve mast hücrelerinde, enterik sinirlerde ve gastrointestinal mikrobiyotada enflamasyon veya kalıcı değişiklikleri içerdiği tespit edilmiştir (38). Bağırsak enfeksiyonuna maruz kalma, İBH'ye sahip bireylerin dolaşımındaki hücrelerin değişmiş bir popülasyonu, bağışıklık hücrelerinin mukozal infiltrasyonu ve çeşitli sitokinlerin artan üretimi ile karakterize edilen kalıcı sistemik ve mukozal inflamasyonu indüklemektedir (37). TLR ekspresyon ve aktivasyonunu değerlendiren son çalışmalar, bu hastalarda doğal bağışıklık tepkisinin arttığını da göstermiştir (39). Bu bulgular, immün aktivasyonun İBH patogenezinde çok önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca psikolojik stresin de immün aktivasyonu indükleyen faktörlerden biri olduğu bildirilmiştir (37). Bununla birlikte, inflamatuar bağırsak hastalarında immün aktivasyonun büyük ölçüde infeksiyöz gastroenterite ve/veya psikolojik strese bağlı olup olmadığı bilinmemektedir (40). İBH'de psikososyal faktörler önemli görünmektedir, ancak bu faktörlerin gastrointestinal fonksiyonu doğrudan değiştirip değiştirmediği de belirsizliğini korumaktadır. Gastrointestinal disfonksiyonun merkezi süreçleri de modüle etmesi de

mümkündür. Örneğin, anksiyete ve depresyon da İBH'da yaygındır (41,42). Çalışmalar, ince bağırsakta aşırı bakteri üremesinin İBH'de yaygın olduğunu göstermektedir, ancak; ince bağırsakta aşırı bakteri üremesinin İBH'ye neden olup olmadığı belirsizliğini korumaktadır (43), bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

2.5. CROHN HASTALIĞI

CH ilk olarak 1932 yılında Dr. Burrill B. Crohn ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (44). CH; ÜK ile, kronik idiyopatik İBH spektrumuna girmektedir (45). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, ABD nüfusunun %1,3'ünün (3 milyon kişi) İBH tanısı aldığını göstermektedir (46). Crohn hastalığı 100.000'de 3 ile 20 vaka arasında değişen yıllık insidansı olan kronik hastalıktır (47). Hastalığın ortalama yaş başlangıcı 30 yaştır ve hastalık 20 ile 30 yaş arası daha sıktır. Crohn hastalığı, gastrointestinal sistemde; ağızdan anüse kadar vücudun herhangi bir bölümünü etkileyen epitel lezyonları ile karakterizedir. Enflamasyon klasik olarak transmuraldır ve patolojide biyopsilerde granülomlar mevcut olabilir (48). Ortaya çıkan semptomlar değişkendir, ancak daha çok diyare, karın ağrısı, kilo kaybı, bulantı, kusma ve bazen ateş veya titreme görülmektedir (49). Hastalığın doğal öyküsü remisyon ve alevlenme dönemleriyle sürer. Enflamatuar, striktür ve penetran dahil olmak üzere birçok farklı hastalık fenotipi vardır. Ne yazık ki, CH'yi ortadan kaldırıcı kesin bir tedavi biçimi yoktur ve çoğu hasta için en az bir cerrahi operasyon gerekmektedir (48). Medikal tedavinin amacı, komplikasyonları ve cerrahiyi önleme umuduyla, steroid içermeyen klinik remisyon sağlamaktır. Yakın zamana kadar, ilaç seçenekleri tiyopurinler, metotreksat (MTX), natalizumab ve anti-TNF ajanları ile sınırlıydı. Son zamanlarda, bağırsak seçici anti-integrin (a4b7) inhibitörü ve IL-12/IL-23'e bir monoklonal antikor dahil olmak üzere yeni etki mekanizmalarına sahip ilaçlar onaylanmıştır.

2.6. CROHN HASTALIĞININ PATOGENEZİ

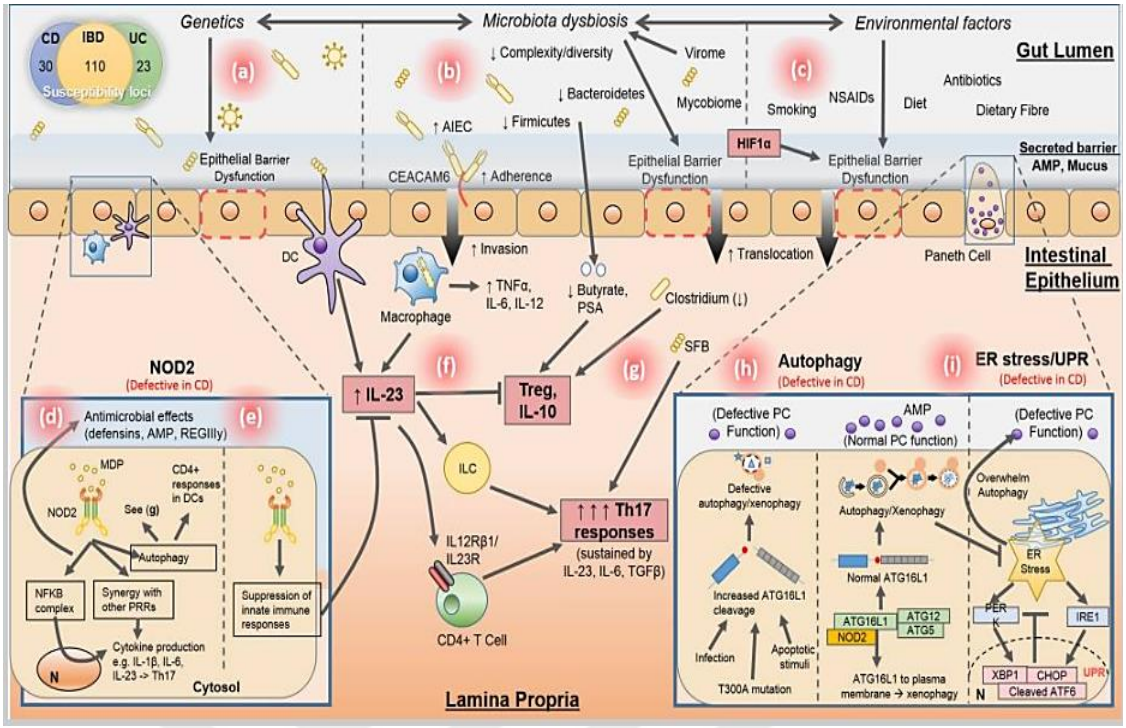
Genom çalışmaları CH'nin oluşum ve gelişim mekanizmalarını araştırmak için bilim dünyasına yeni katkılar sağlamıştır. Literatürde 30 lokus CH ile karakterizedir (Şekil 2A). Bu lokuslar, doğal bağışıklığı (CARD15/NOD2, IRGM, IL23R, LRRK2 ve ATG16L1) ve düzensiz doğal bağışıklık tepkilerinde görevli olan IL-23 ve T_h17 yolunda bulunan (IL23R, IL12B (IL-12p40'ı kodlar), STAT3, JAK2 ve TYK2'yi kapsamaktadır (50). Dendritik hücreler, ardından $CD4^+$ T hücreleri, doğal öldürücü

(NKT) hücreleri, bir immün hücre alt panelinde test edildiğinde genetik yatkınlığın yüksek oranda görülebileceğini göstermiştir ve bu hücrelerin CH patogenezinde önemli bir rol oynadığını gösterilmiştir (31). Genom çalışmalarından elde edilen verilere dayanarak, şimdiye kadar rapor edilen lokusların, toplam hastalık varyansının yalnızca %14'üne katkıda bulunduğunu göstermiştir (31). Entegre multi-omik analizi (transkriptomik, metabolomik ve epigenomik gibi profil oluşturma panelleri ile) içeren daha karmaşık çalışmaların devam etmekte olduğu ve patogenezinin çözülmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Epigenetik; metilasyon ilişkilendirme çalışmaları, TNF, MIR21, HLA ve NOD2 ve Th17 yolakları (51,52) dahil olmak üzere genetik yatkınlığı gösteren genlerin diferansiyel metilasyonunun tanımlandığı bir alanıdır (53).

2.7. CROHN HASTALIĞI VE NOD2 İLİŞKİSİ

NOD2, hücre içi bakterilere karşı bağışıklığı kontrol eden bir sitozolik patern tanıma reseptörüdür (PRR), genetik yatkınlık açısından önemli bir gen olduğunu vurgulamıştır. (54,55). Hastaların %40'ından NOD2 genindeki üç polimorfizm Arg702Trp, Gly908arg ve Fs1007ınsc sorumlu tutulmuştur (56) ve bu polimorfizmler bakteriyel hücre duvarının bir bileşeni olan muramil dipeptidin (MDP) tanınmasından sorumlu, NOD2'nin lösin bakımından zengin tekrar bölgesinde bulunmaktadır (57).

NOD2, bağırsak epitel hücreleri (esas olarak Paneth hücreleri) ve lamina propriyada bulunan monosit türevli bağışıklık hücreleri içeren çeşitli hücrelerde eksprese edilir (58,59). Hem insan hem de murin çalışmalarında; NOD2 fonksiyonundaki bozukluklar, mikrobiyal duyarlılığı (60), Paneth hücre fonksiyonunu ve anti-mikrobiyal peptit (AMP) üretimini (61), antijen sunumunu (62), hücre içi bakteri öldürmeyi (63) ve doğal immüniteden gelen sinyalizasyonu örneğin; TLR'nin fonksiyonunu (64) ve bunun IL-23 Th17 yanıtlarındaki düzenleyici rolünü (65) etkileyebildiğini göstermiştir. Genel olarak, NOD2 varyantlarının; CH hastalığına katkıda bulunduğu mekanizmalar esrarengiz bir alan olarak kalsa da, birbirini dışlamayan iki ana teori ortaya çıkmıştır: (66) NOD2, kritik konak anti-bakteriyel savunma ve proinflamatuar yanıtlar oluşturmaktadır (Şekil 2D), ve (67) NOD2, doğal bağışıklık tepkilerini düzenleme görevi görmektedir (Şekil 2E) (68). MDP'nin tanınmasından sonra NOD2 aktivasyonu, NF-κB'ye bağımlı sinyalleşmeyi tetiklemektedir (55).



Şekil 2.2: Crohn hastalığının mekanizması (54)

NOD2, farklılaşan gen düzenlemesinde diğer PRR'ler ile sinerji oluşturabilir ve bu sinerji, NOD2 varyantını eksprese eden hücrelerde yok olmaktadır (69,70). NOD2, bu bağlamda belirli proinflamatuar sitokinlerin, özellikle IL-1β, IL-6 ve IL-23'ün DC'lerden ve makrofajlardan salınımının güçlendirilmesinde anahtar bir rol oynar (58,71). Buna karşılık, NOD2'deki eksiklik, doğal TLR sinyalinin artmasına neden olmaktadır. Farelerde, makrofajlarda TLR aracılı IL-12 üretimi artmaktadır (72,73). Makrofajların MDP ile uyarılması, normal bireylerde NOD2, IL-1β ve TLR2 ve TLR4'e karşı proinflamatuar yanıtların oluştuğunu göstermekle birlikte, frameshift polimofizmine sahip olan bireylerde TLR2 ve TLR4 kaynaklı yanıtların inhibe olduğu görülmüştür (73,74).

NOD2'nin bağırsak mikrobiyotasını dolaylı olarak modüle ettiğini gösteren birkaç çalışmaya ek olarak Paneth hücrelerinin kusurlu AMP üretimiyle bu doğal immüniteye katkıda bulunduğu gösterilmektedir (61,75-78). Farelerde, NOD2 eksikliği kolit ile değil, *Listeria monocytogenes* gibi hücre içi bakterilerin kusurlu işlenmesiyle sonuçlandığı gösterilmiştir (58). İnsanlarla yapılan bir kohort çalışmasında, NOD2 polimorfizmleri ile artan *Enterobacteriaceae* arasında anlamlı bir ilişki olduğu

bulunmuştur (39). Farelerde NOD2 eksikliğinin ileal disbiyoz ile de ilişkili olduğu bulunmuştur (79-82). NOD2 ve NOD2'nin etkileşimleri (Tablo 2.1), potansiyel yeni terapötik hedefler oldukları için CH'de kritik öneme sahiptir (68,53,83-85).

Tablo 2.1: NOD2'nin immünite üzerindeki işleyiş ve fonksiyonları gösterilmiştir

NOD2 ve NOD2'nin etkileşimleri	
Aktivasyon	• Muramil dipeptid hücrelere giriş (bakteriyel sekresyon sistemleri ve sitozol içine doğrudan ulaşım) • Ligand-NOD2 interaction • Hücresel lokalizasyon
Sinyalleşme	• RIPK2 etkileşimi ve NF-κB sinyali
Regülasyon	• Hücre iskeleti düzenlemesi • Epistatik etkileşimler • Otoinhibisyon ve degradasyon
Etkileri	• Doğal immün yanıtlar • Edinsel immün yanıtlar • Antimikrobiyal fonksiyonlar • Otofaji ve ksenofajiyi kolaylaştırmak • Gut homeostaz (Bariyer fonksiyonu, Mikrobiyota)

2.8. NLRP3 İNFLAMAZOMU

İnflamazom; 2002 yılında Martinon tarafından tanımlanan inflamazom doğal immünitede önemli bir rol oynar (86). Bugüne kadar, NLRP3, NLRP1, AIM2 ve NLRC4 dahil olmak üzere birçok inflamazom tanımlanmıştır (87). NLRP3 inflamazomu; bir sensör (NLRP3), bir adaptör (ASC olarak da bilinir) ve bir inaktif enzimden (pro-kaspaz 1) oluşur. NLRP3, bir amino-terminal pirin alanı (PYD), bir merkezi NACHT alanı (NAIP, CIITA, HET-E ve TP1'de bulunan alan) ve bir karboksi-terminal lösin bakımından zengin tekrar alanı içeren üçlü bir proteindir (87,88).

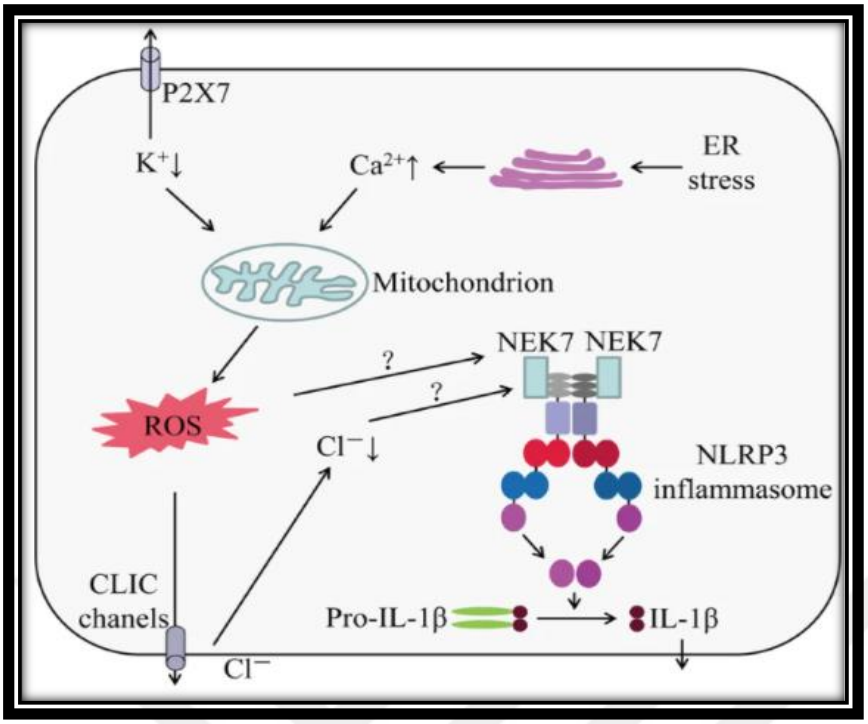
Aktivasyonla, NLRP3 proteini, PYD vasıtasıyla ASC ile etkileşime girer ve ASC'nin CARD alanı, NLRP3-ASC-pro-kaspaz-1 kompleksi oluşturmak için pro-kaspaz-1'in CARD alanını aktive eder, bu olay NLRP3 inflamazom olarak (89) olarak da adlandırılmaktadır.

NLRP3 inflamazomunun makrofajlarda aktivasyonu iki adım gerektirir, bunlar tanıma ve aktivasyondur (87). Tanıma adımı (sinyal 1), NF-κB aracılı NLRP3 ve pro-IL-1β ekspresyonunu indükleyen TLR4 agonistleri gibi inflamatuar uyaranlar tarafından sağlanır ve aktivasyon adımı (sinyal 2) ise inflamazom düzeneği; NLPR3, adaptör protein ve pro-kazpaz-1 aracılı IL-1β ve IL-18 salınımı ve piroptozu, NLPR3'ü destekleyen PAMP'ler ve DAMP'ler tarafından tetiklenir (90,91). Tanıma aşamasının NLRP3 ve pro-IL-1β'nın NF-κB'ye bağlı transkripsiyonel up-regülasyonu ile sınırlı olmadığı bildirilmiştir (87,92-95). Bir çalışmada NLRP3 inflamazomunun sinyal bir ve sinyal iki uyaranları ile aynı anda işleme girdiğinde, 10 dakika kadar erken aktive edilebileceğinden bahsedilmiştir (94).

2.8.1. NLRP3 İnflamazomunun Mekanizmaları

2.8.1.1. İyon akışları

K^+ akışı, Ca^{+2} akışı, Na^+ akışı ve CI^- akışı dahil olmak üzere dört farklı iyon, NLRP3 inflamazomu aktivasyonunda rol oynamaktadır (96-99). NLRP3 inflamazom aktivatörlerinin çeşitliliği nedeniyle, NLRP3'ün uyaranlarla doğrudan etkileşime girmesi olası değildir. Hücre içi K^+ konsantrasyonundaki bir azalma NLRP3 inflamazomu aktivasyonunun tetikleyicisi olarak tanımlanmıştır ve çok sayıda NLRP3 inflamatuar aktivatörünün K^+ akışını (ATP, partikül moleküller ve kristal dahil) indüklediği bilinmektedir ve hücre içi K^+ akışının azalması, NLRP3 inflamazomu aktivasyonunu gerçekleştirir (96,97).



Şekil 2.3: NLRP3 inflamazomu aktivasyonunda iyon akışlarının rolleri (87)

Şekil 2.3'de; NLRP3 inflamazomuna doğrudan bağlanabilen NEK7'nin (NIMA ile ilgili kinaz 7) K^+ akışına ihtiyacı olduğu gösterilmiştir (100-102). Bununla birlikte, K^+ akışı, NLRP3 inflamazomu aktivasyonuna özgü değildir. Son çalışmalar, imiquimod ve CL097 dahil olmak üzere birkaç küçük molekülün, ROS üretimini indükleyebileceğini ve K^+ akışından bağımsız olarak NLRP3 inflamazomu aktivasyonunu destekleyebileceğini göstermiştir (22,23). Çalışmalar NLRP3 inflamazomu aktivasyonu için Ca^{+2} sinyalinin de gerekli olduğunu raporlamıştır. Ca^{+2} mobilizasyonunun inhibisyonunu, NLRP3 inflamazom aktivasyonunu azalttığı gösterilmesine rağmen; NLRC4 ve AIM2 inflamazom aktivasyonu üzerinde etkisi olmadığı gösterilmiştir (97,103,104).

Hücrede K^+ akışı, mitokondriyal hasara ve mtROS üretimine yol açtığı ve Cl^- akışını desteklemek için plazma zarındaki CLIC' larını aktifleştirdiği gösterilmiştir (Şekil 2.3) (87). CLIC aracılı Cl^- akışı, NEK7–NLRP3 etkileşimini ve devamında NLRP3 inflamazom aktivasyonunu destekler. ER'den salınan aşırı Ca^{+2}, mitokondriyal hasara neden olarak, NLRP3 inflamazom aktivasyonunu tetikleyen mtROS üretimine yol açar. NLRP3 proteinine doğrudan bağlanabilen NEK7, NLRP3 inflamazomunun

yeni tanımlanan bileşenidir ve NLRP3 inflamazom düzeneği için K^+ akışı, ROS üretimi ve Cl^- akışı gerekir (87).

2.9. NLRP3 İNFLAMAZOMUNUN CROHN HASTALIĞINDAKİ ROLÜ

Gastrointestinal sistem, insan vücuduna enerji sağlayan ve atık maddelerin ortadan kaldırılmasına yardımcı olan bir bölümdür. Buna ek olarak, çevre toksinlerini ve potansiyel patojenleri hedef alan gastrointestinal yolun mukozada çok sayıda bağışıklık hücresi sağlayarak enfeksiyonları önler (105). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, özellikle bağırsak epitel hücrelerinin homeostazının önemli bir aracısı olduğunu göstermektedir (56). NLRP3 inflamazomu yalnızca konak savunmasının önemli bir aracı olarak değil, bağırsaktaki mikrobiyotaya tepkileri ve aynı zamanda bağırsak epitelinin bütünlüğünü kontrol eden ve bağışıklık sistemini modüle eden bağırsak homeostazının önemli bir düzenleyicisidir (105).

Yakın zamanda NLRP3 çalışmalarında ortaya çıkan polimorfizmler, NLRP3 ün bahsedilen fonksiyonlarını göstermesini engellemiştir (105). Villain ve arkadaşları NLRP3 gen bölgesindeki SNP'lerden rs10733113'ün CH oluşumuna güçlü bir şekilde katkıda bulunduğunu rapor etmişlerdir (106). Daha sonra, Schoultz ve ark. (107), hem CARD8'de C10X alleli, hem NALP3'te Q705K alelli hem de NOD2'nin wild tip alellerini taşıyan erkeklerin CH'ye yatkınlık oluşturabileceğini göstermiştir. Ayrıca, son zamanda yapılan çalışmalar, fonksiyonunu kaybetmiş bir CARD8 mutasyonunun da NLRP3 inflamazomunu aktive ettiği ve CH gelişimine katkıda bulunduğunu göstermiştir (107,108).

Bir diğer çalışmada ise; NLRP3 aktivasyonuyla oluşan IL-18'deki polimorfizmlerinin (rs1946518 A>C, rs360718 A>C ve rs187238 G>C) CH ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (109). Bununla birlikte, Çin'de yapılan bir çalışmada ise hem rs10925019 hem de rs10754558'in ÜK'ye katkıda bulunabileceğini, ancak CH'ye katkıda bulunmadığını göstermiştir (109). Bir meta-analiz çalışmasında, IL18R1, IL1R1, IL1RL1, IL1RL2 ve IL1R2 gibi NLRP3'ün downstream reseptörlerini etkileyen SNP'lerin İBH ile ilişkili olduğunu göstermiştir (31). Son zamanlarda yapılan başka bir vaka-kontrol çalışmasında ise, NLRP3'de bulunan (rs10754558) SNP'lerin ÜK ile de ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Çünkü çalışmada rs10754558'in "GG" genotipi ÜK'ye

sahip kişiler arasında 2,48 kat daha yaygın iken (P = 0,04) sağlıklı kişilerde "CG" genotipinin daha sık görüldüğü tespit edilmiştir (110).

NLRP3 gen polimorfizmlerinin, NLRP3 inflamazomunun oluşmasında bir azalmaya yol açabileceğini ve İBH'ye genetik olarak yatkınlığını tetikleyebileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, IL-18 düzeyinin, CH'ye sahip bireylerde yükseldiği ve patojenik Th1 yanıtlarını desteklediği bulunmuştur (111). Ayrıca son klinik çalışmalarda, İBH'ye sahip bireylerin kolonik dokularından ve makrofajlarından salgılanan proinflamatuar sitokinlerden IL-1β'nın ekspresyonunun arttığını ve artan IL-1β seviyesinin İBH'nin hastalık şiddeti ile ilişkili olduğunu göstermiştir (112,113).

Ayrıca, başka bir çalışmada, NLRP3 inflamazomunun aktivasyonunda, CH ve ÜK arasında çok önemli bir farklılık olduğu gösterilmiştir. Çalışmada; periferik kan mononükleer hücrelerin stimülasyonundan sonra, kontrollerle kıyasla CH'ye sahip bireylerin %60'ında NLRP3 inflamazomunun aktive olduğu gösterilmiştir ve NLRP3 aktivasyonu uzun süredir devam eden hastalıkla (>1,5 yıl) ilişkilendirilmiştir, çalışmadan elde edilen verilere göre hastalığın progresyon aşamasında ÜK immünolojik profilinde bir farklılaşma görüldüğü saptanmıştır (114). Son zamanda yapılan çalışmalar, bağırsak mikrobiyotasının bileşimini şekillendirmede NLRP3 inflamazomunun önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir.

2.10. KAN MİKROBİYATASI

İnsan mikrobiyomu, bakteri, arke, viral ve mantar mikrobiyal taksonlarının geniş bir korpusunu içermektedir. Mikroorganizmalar, insan hücrelerinden 1000 kat daha küçük olmalarına rağmen, bakteriler yetişkin insan vücut kütlesinin (1,5 kg) ~%2'sini oluşturmaktadır. İnsan vücudunda bulunan mikroorganizmaların çoğu kommensal, bazıları mutalist ve bazıları da patojeniktir. Yaşamımız; bedenlerimizi paylaştığımız mikroorganizmalarla ayrılmaz bir bütündür (115).

Mikroorganizmalar olan kapsamlı ortak evrim tarih göz önüne alındığında, genomumuzda kendi gen sayımız ~22.000 bin olmasına karşın, vücudumuzda bulunan benzersiz bakteri gen sayısının ~3.300.000 olduğu tahmin edilmektedir (116,117).

Yaşayan mikroorganizmaların tüm DNA içeriğinin incelenmesi olarak tanımlanan insan mikrobiyomu araştırması, son on yılda hızla gelişmiştir (118-122). Mikrobik benliğimizin keşfi, yeni nesil dizileme tekniklerinin gelişmesi ve metagenom

analizinin ortaya çıkmasıyla büyük ölçüde kolaylaşmıştır (123). Bazı popülasyon temelli çalışmalarda; insan bağırsak mikrobiyobumunun metagenomlarının yanı sıra cilt, vajina ve ağız dahil olmak üzere diğer vücut bölgeleri de araştırılmıştır. Bu araştırmalar kapsamında "İnsan Bağırsak Yolunun Metagenomları" projesi (117, 124,125) ve "İnsan Mikrobiyom Projesi" (126) kapsamında dünyanın dört bir yanından 2.000'den fazla bilim insanı, 2006'dan beri sağlıklı bireylerin mikrobiyom yapısının çalışmasına katkıda bulunmuştur (122). Çoğu insan temelli mikrobiyota çalışmasında, araştırılan konular bağırsak mikrobiyomuna odaklansada, ağız, göz, cilt, akciğerler, plasenta ve ürogenital yollarda bulunan mikrobiyal topluluklar da tanımlanmıştır (122, 126,127).

Son zamanlarda sağlıklı bir insan kanında bulunan mikrobiyom varlığı bilim camiasında büyük ilgi uyandırmıştır (128-130). Yapılan araştırmalara göre insan kanı, sağlık durumuna bağlı olarak ~%54,3 plazma, ~%45 kırmızı kan hücreleri (eritrositler), ~%0,7 beyaz kan hücreleri (lenfositler) ve değişken sayıda trombosit içermektedir (131). 1674'te Antonie van Leeuwenhoek tarafından raporlanan ilk eritrosit gözleminin ardından (132) (Şekil 3), kanın yaşamın en temel unsurlarını taşıyan ve sürdüren sıvı ortam olduğu bilinmektedir. Eritrositler oksijenin taşınmasından sorumluyken, lenfositlerin en önemli görevi hastalık etkenini tanıyıp, yok etmektedir (133). Trombositlerin birinci görevi ise pıhtılaşmanın erken döneminde damar duvarına yapışması ve daha sonrasında kümeleşerek tıkaç oluşturmasıdır (134). Bir kan bakteriyel mikrobiyomunun varlığı, çeşitli bulaşıcı ve bulaşıcı olmayan hastalık durumlarıyla ilişkilendirilmiştir (135-140). Örneğin, *Helicobacter pylori*'nin sadece mide mukozasında değil, aynı zamanda bakteriyemiye neden olabileceği periferik kanda da bulunabileceği bilinmektedir (135). Daha önceki çalışmalarda; *Helicobacter pylori*'nin anemi gelişiminde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (139,141). Örneğin; *Staphylococcus aureus*'un nötrofilleri enfeksiyonu yaymak için 'Truva atı' gibi kullanabileceğinden bahsedilmektedir (137,138). Ayrıca yapılan mikrobiyata çalışmalarında; *Listeria monocytogenes* (142), *Salmonella typhimurium* (143,144) ve *Yersinia pestis* (145)'in hücre içinde kalıcı olduğuna dair kanıtlar gösterilmiştir (146). Anormal bir kan mikrobiyotasının varlığı; tip II diyabet ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (145,147). Periodontal hastalık ve diş eti iltihabının kardiyovasküler hastalıklarla yakından ilişkili olduğunu gösteren bulgular da vardır (148,149).

2.11. KAN MİKROBİYATASININ CROHN HASTALIĞI İLE İLİŞKİSİ

Yüzyıllar boyunca kan, immünolojik olarak ayrıcalıklı ve steril bir ortam olarak kabul edilmiştir. Son on yılda bu algı, kan mikrobiyotasının ve dolaşımdaki mikrobiyal metabolitlerin varlığını bildiren çalışmalarla değişmiştir (150). Kandaki bazı patojen ya da zararlı mikropların varlığının kanıtı, konak immün sürveyansının üzerindeki etkilere ve inflamatuar hastalıklardaki rollerine ışık tutmuştur (151-155). Bu nedenle, kan mikrobiyotasının bazı hastalıkların gelişimi ve ilerlemesinde önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir. Mikrobiyom; tüm omurgalıların içinde ve üzerinde yaşayan, simbiyotik ve patojenik tüm mikroorganizmaların genomunu tanımlayan bir terimdir (156). Mikrobiyomun metabolik aktiviteleri, konağın hayati fizyolojik süreçlerinin sürdürülmesinde örneğin; enerji elde etme (157), patojenlere karşı koruma (158) ve konak immünitenin modülasyonu (159) gibi olaylarda merkezi bir rol oynamaktadır. Metabolit profillerindeki değişikliklerin mikrobiyomdaki fonksiyonel değişikliklerle ilişkili olduğu ve İBH'nin (160) gelişimini etkilediği gösterilmiştir. Geçmiş yıllarda yapılan mikrobiyom çalışmalarında, metabolit profillere dayalı olarak İBH'a sahip olan bireyler ve sağlıklı bireyler arasında önemli farklılıklar tespit edilmiş, hastalık durumu ile ilişkili olan spesifik bileşikler tanımlanmıştır (161,162). Buna ek olarak, birçok çalışma klinik verilerin entegrasyonunun, hastaları mikrobiyom taksonomisine ve fonksiyonel kapasiteye dayalı olarak tedaviye yanıtta farklı modeller oluşturmada yararlı olduğunu göstermiştir (163-165). İnsan vücudunun farklı bölgelerine özgü; karmaşık mikroorganizma toplulukları, insan sağlığı ve hastalıklarının önemli modülatörleri olarak ortaya çıkmaktadır (166). Dizileme yöntemleri ile, insan bağırsağında simbiyotik olarak çeşitli ve binlerce bakteri türünün yaşadığını ve kompleks karbonhidratların sindiriminde, kısa zincirli yağ asidi üretiminde, vitamin ve amino asit sentezinde ve bağışıklık sisteminin şekillenmesinde bu mikroorganizmaların yardımcı olduğunu göstermiştir (167,168). Bağırsakta bulunan mikroorganizma kümeleri, çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiş ve bağırsak disbiyozu olarak adlandırılmıştır (169). Bazı çalışmalarda, kronik böbrek hastalığının bağırsak disbiyosuzu ve inflamasyon ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (170,171). Kronik böbrek hastalığının bağırsak bariyer fonksiyonunda bozulmaya yol açan bağırsak disbiyozu, bağırsak kaynaklı toksinlerin, bakteriyel ürünlerin ve bakterilerin dolaşıma geçerek izin vererek inflamasyona neden olduğu gösterilmiştir (172,173). Kronik böbrek hastalığında dolaşıma katılan mikrobiyom, kanda ölçülen daha yüksek endotoksin

seviyesi, LPS seviyesi ve bağırsak üremik toksinleri ile ilişkilidir (130,174). Son zamanlarda, 16S ribozomal RNA (rRNA) ölçümü kullanılarak sağlıklı insan donörlerinde bile oldukça çeşitlendirilmiş bir kan mikrobiyomunun varlığı bulunmuştur (175). Günümüzde kandan mikrobiyata çalışması gastrit kanseri, diyabet, kardiyovasküler hastalık modelleriyle çalışılmıştır (176).

Kanda bakteriyel DNA'nın varlığı bilinmesine rağmen, literatürde çok fazla araştırma bulunmamaktadr. Louis Pasteur'ün monomorfik mikrop teorisinin aksine, kandaki bakteriler, Antoine Béchamp ve Günther Enderlein tarafından çevresel koşullara bağlı olarak patojenik veya apatojenik formlara dönüşen pleomorfik organizmalar olarak tanımlanmıştır (128,177). Bazı çalışmalar da sağlıklı kandaki bakteri pleomorfizmi hipotezini desteklemiştir (178). L-formlarının (hücre duvarı eksikliği olan, aseksüel olarak çoğalan, kültürlenemeyen bakteriyel formlar) (175,178) ve kandan bakteriyel DNA'yı saptamak için gelişmiş DNA dizileme tekniklerinin (175) keşfiyle, mikrobiyomun uykuda, yaşayabilir durumda var olabileceği veya cansız formlar ve çevresel koşullara yanıt olarak pleomorfizme uğradığı tespit edilmiştir (175).

İnsan mikrobiyotası, özellikle de bağırsak mikrobiyotası, sağlık ve hastalıkta kilit oyuncu olarak kabul edilmektedir, ancak şimdiye kadar olan çalışmalar, kan mikrobiyotası konusu üzerinde az durulduğunu göstermektedir. Çalışmamızda Crohn hastalığının patogenezine katkı sağlamak amacıyla 16S rRNA gen dizisi araştırılarak, kan mikrobiyata çalışması yapılacaktır. Bu sayede hastalıkla ilişkili, bakteri türleri, bakteri türlerinin miktarlarının tayini ve genomik benzerlikler belirlenecektir. Çalışmamız Crohn hastalarından alınan kan örnekleriyle çalışılan, literatürde yapılacak olan ilk kan mikrobiyata çalışması olacaktır.

2.12. CROHN HASTALIĞINDA TEDAVİ YÖNTEMLERİ

CH idiyopatik inflamatuar bir hastalıktır. Genetik, çevre ve immünolojik ortamdan etkilenir. Bu hastalığın görülme sıklığı günden güne artmakta ve tedavi seçenekleri gelişmektedir. Tedavi seçenekleri arasında; ilaçlar, besin takviyeleri, cerrahi veya bunların bir kombinasyonu bulunmaktadır (179). Tedavinin hedefi; inflamasyonu kontrol etmek, beslenme eksikliklerini düzeltmek, karın ağrısı, ishal ve rektal kanama gibi semptomları hafifletmektir. CH'nin tedavisi, hastalığın yeri ve ciddiyetine,

komplikasyonlara bağlıdır (180). Bununla birlikte, hastalık genellikle bir kişinin yaşamı boyunca çeşitli zamanlarda tekrarlamaktadır.

CH'nin farmakolojik tedavisi çok çeşitli ajanları içermektedir. Bu ajanların çeşitli endikasyonları ve etki mekanizmaları vardır. Aminosalisilatlar, kortikosteroidler, immünosupresif ajanlar, antikor ajanları ve antibiyotikler olmak üzere beş gruba ayrılmaktadırlar (181).

Aminosalisilatlar, aktif bileşen olan mesalamini hedef dokulara ileten bir ilaç sınıfıdır. Aminosalisilatlar, bağırsak üzerinde bir anti-inflamatuar etki ile CH tedavisinde kullanılmaktadır (Tablo 2.2). Bu sınıftaki ilaçlar arasında sülfasalazin, olsalazin ve mesalamin bulunur. 5-aminosalisilik asit (5-ASA) ve mesalazin, sülfasalazin (182,183) içindeki terapötik olarak aktif bileşiklerdir.

Tablo 2.2: Aminosalisilatlar ve aminosalisilatların etkinliği ve yan etkileri

Aminosalisilatlar	Etkinliği	Yan Etkileri
Sülfasalazin	Hem hafif hem de orta dereceli CH'de hem aktif hastalık hem de tedavi için kullanılmaktadr	Baş ağrısı, Steven-Johnson Sendromu (SJS), oligospermi, hepatotoksisite ve hemolitik anemi
Mezalamin	Hem hafif hem de orta dereceli CD'de hem aktif hastalık hem de tedavi için kullanılmaktadır	Ishal ve interstisyel nefrit
Olsalazin	Hafif veya orta dereceli CD'yi tedavi etmek için kullanılmaktadır	Baş ağrısı, bulantı, kusma, hepatotoksisite ve anoreksi

Diğer bir tedavi şekli olarak kullanılan kortikosteroidler; kortizon, prednizon, prednizolon, hidrokortizon, metilprednizolon, beklometazon ve budesoniddir. Kortikosteroidler inflamasyonu azaltmakta ve aktif CH'nin remisyonunu indüklemektedir. Bu ajanlar, interlökin transkripsiyonunu ve araşidonik asit

metabolizmasını baskılayarak ve bağırsaktaki lenfositlerin apoptozunu uyararak çalışmaktadır (184). Yan etki profili tüm bu ajanlar gibi benzerdir ve bu tür ilaçlar aniden kesildiğinde akut adrenal yetmezliğe yol açabilen Cushing özellikleri, akne, kilo alımı ve dispepsi içermektedir. Diğer yan etkileri ise hipertansiyon, diyabet ve osteoporozdur (185).

İmmünolojik etkiye bağlı olarak, CH'de immünomodülatör ajanların önemli bir rolü vardır ve bu ajanların farklı etkinlik ve endikasyonları bulunmaktadır. Yaygın olarak kullanılan immünosupresanlar 6-Merkaptopurin, azatioprin (AZA), metotreksat ve takrolimustur (186).

AZA, 6-MP'lik bir ön ilaçtır. AZA/6-MP ile tedavinin amacı alevlenmeleri önlemek, kortikosteroid ihtiyacını azaltmak, diyare, gastrointestinal kanama ve ağrıyı kontrol ederek yaşam kalitesini iyileştirmektir. Bu ajanlar sıklıkla CH için kullanılmaktadır. Bu ilaçlar, ayrıca kortikosteroidin neden olduğu remisyonun sürdürülmesinde etkilidir (187). AZA/6-MP gibi ilaçların klinik yanıtı 3 ay kadar sürebileceğinden dolayı, CH tedavisinde remisyon indüklemede plaseboya göre herhangi bir ek avantaj sağlamamaktadır. Pankreatit, hepatotoksisite ve kemik iliği baskılanması, AZA/6-MP kullanan hastalarda bildirilen yan etkilerdir (188).

Metotreksat (MTX), folik asit metabolizmasında yer alan dihidrofolat redüktaz enzimini, ardından deoksiribonükleik asit (DNA), ribonükleik asit (RNA) ve protein sentezinin inhibisyonu ve folat enzimine bağlı immünomodülasyonun inhibisyonuna sebep olmaktadır (189). MTX, diğer immünosupresif ilaçlarda başarısız olan CH'li hastalar için etkili bir alternatiftir. Klinik yanıtın elde edilmesi 12 hafta kadar sürdüğü için hastalığın geçici tedaviside kullanılmaktadır. Hepatotoksisite, lökopeni ve pnömoni gibi yaygın olmayan ancak ciddi yan etkiler nedeniyle kullanımı sınırlıdır (190).

Siklosporin, sitokinlerin üretimini inhibe ederek çalışan ve böylece T hücre aktivasyonunu düzenleyen bir immünomodülatördür (191). İntravenöz siklosporin, CH'deki perianal, rektovajinal ve enterokutan fistüller için etkili bir tedavidir. Siklosporinin oral formu, intravenöz formun aksine uzun vadeli ve faydalı etkilerin korunması için kullanışlı değildir. Siklosporinin yan etkileri nefrotoksisite, hipertansiyon, hipomagnezemi, tremor, gingivitis ve hirsutizmdir (189,192)

Düzensiz kullanılan TNF-α, bağırsak inflamasyonuna neden olabilmektedir (15). Anti-TNF ajanları (infliximab, adalimumab, certolizumab pegol), kortikosteroidlere, AZA/6-MP'ye veya metotreksata dirençli veya dirençli CH'yi tedavi etmek için kullanılmalıdır. Remisyon indüksiyonu için infliximab ve adalimumab tercih edilirken, üç anti-TNF ajanın tümü remisyonu sürdürmek için kullanılmaktadır (193). İnfliksimabın immünosupresanlarla kombinasyon tedavisi, bu ajanları daha önce kullanmamış hastalarda tek başına immünosupresanlarla veya tek başına infliksimab ile tedaviden daha etkilidir. Infliximab, yetişkinlerde orta şiddetli aktif CH ve aktif fistülize CH'yi tedavi etmek için kullanılan intravenöz olarak uygulanan bir ajandır. Diğer tedavilere iyi yanıt vermeyen orta derecede aktif ve şiddetli CH'ye sahip olan bireylerin belirti ve semptomlarını azaltmak için kullanılmaktadır. Bu ilaç remisyona neden olabilmektedir (194). İnfliksimabın yaygın yan etkileri solunum yolu enfeksiyonları, baş ağrısı, öksürük ve gastrittir. Ateş, titreme, nefes darlığı, göğüs ağrısı, kızarıklıklar ve kan basıncında dalgalanmaları içeren uygulamadan iki saat sonra infüzyon reaksiyonları ortaya çıkabilmektedir (195). Adalimumab, orta şiddetli CH tedavisinde, tedaviye yanıtı kaybetmiş veya infliksimaba karşı toleransı olmayan erişkinlerde klinik remisyon sağlamak ve sürdürmek için kullanılmaktadır (196). Adalimumabın yan etkileri, tüberküloz (TB), bakteriyel sepsis, histoplazmoz gibi mantar enfeksiyonlarını içermektedir. Adalimumab uygulanmadan önce hastalar latent TB için test edilmelidir ve bu hastalar, ilk latent TB testi sonuçlarından bağımsız olarak, tedavi sırasında aktif TB açısından da izlenmelidir (197). Certolizumab; polietilen glikole konjuge edilmiş bir monoklonal antikorun hümanize antijen bağlayıcı fragmanı (Fab), sertolizumabın yarı ömrünü artırarak ilaç uygulama dozajını ve sıklığını azaltmaktadır (198). İnfliksimab veya adalimumab'a yanıt veren ve daha sonra yanıtı kaybeden veya intoleransı olan CH'li hastalarda ikinci veya üçüncü sıra anti-TNF ajanları için ayrılmıştır. Yan etki profili, TB gibi enfeksiyon riskinin artması ve diğer fırsatçı enfeksiyonlar gibi diğer antikor türevli ajanlara benzerdir (199).

Eylül 2016'da Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi, CH tedavisi için ustekinumab kullanımını onaylamıştır, IL-12 ve IL-23 antagonistidir. Kortikosteroidler veya immünosupresanlar ile tedavisi başarısız olan orta şiddetli CH'ye sahip bireylerde kullanılır (200). Ustekinumab kullanımının yan etkileri anafilaktik reaksiyonlar, diyare, üst solunum yolu enfeksiyonları ve enjeksiyon yeri reaksiyonlarıdır (196,201).

CH'li hastalarda remisyon indüklemek ve sürdürmek için anti-integrin ajanları kullanılmaktadır. Kortikosteroidlerle remisyonu indüklenen hastalarda remisyonun sürdürülmesi için kullanılır; ayrıca anti-TNF ajanlarına dirençli hastalarda da kullanılmaktadırlar. Natalizumab ve vedolizumab, CH tedavisi için onaylanmış iki anti-integrin ajandır (202).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ETİK İZİN

Araştırmanın etik onayı 30.05.2020 tarihinde Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Klinik Araştırmalar Etik Kulunun "20/44" no'lu kararıyla alınmıştır. Bu Proje Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Biriminin (BAP) "2020/083" sayılı projesiyle desteklenmiştir.

3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN ÖRNEKLER

Araştırma kapsamında; Sultan Abdülhamid Han Eğitim ve Araştırma Hastanesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı ve Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesi Gastroentroloji Anabilim Dalı'ndan Uluslararası Crohn hastalığı Çalışma Grubu kriterlerine göre; cinsiyet farkı gözetmeden 10 Crohn hastalığı tanısı almış, ilaç tedavisi başlanmamış gönüllü, 10 Anti-TNF ajana başlamış CH'ye sahip gönüllü ve 20 sağlıklı (kontrol) gönüllü çalışmaya katılmıştır. CH dışında viral enfeksiyon geçiren, akut veya kronik sağlık problemleri olan bireyler çalışma kapsamı dışında bırakılmıştır.

Çalışmamız için gönüllülerden EDTA'lı iki tüp kan örneği alındı. Toplanan tüplerden biri plazması ayrılmış üzere ELISA ve Western Blot aşaması için -80^{o}C'ye kaldırıldı. Diğeri ise mikrobiyal DNA izolasyonu için kullanıldı. Sekanslama yapıldı.

3.3. ÇALIŞMADA KULLANILAN CİHAZ VE KİMYASALLAR

3.3.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan mevcut cihazlar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, İmmünoloji Anabilim Dalı ve Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı tarafından bölüm izni alınarak kullanılmıştır. Kullanılan cihazlar Tablo 3.1'de gösterilmiştir. Projede kullanılan sekanslama cihazları hizmet alımı olarak Teknogen A.Ş tarafından desteklenmiştir.

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Kullanım Amacı	Bulunduğu Anabilim Dalı
Derin Dondurucu (-80ºC) (DAIHAN/Duo Freez U500)	Örneklerin muhafazası	Tıbbi Biyoloji A.B.D.
Derin Dondurucu (-20ºC) (BOSCH/GSN36AI31)	Örneklerin muhafazası	İmmünoloji A.B.D.
Buzdolabı (+4 C) Arçelik	Örneklerin muhafazası	İmmünoloji A.B.D.
Otomatik pipet seti (Eppendorf)	Moleküler çalışmalar	İmmünoloji A.B.D.
Thermo Scienfic OWL P81- SDS jel makinesi	SDS Jel yapımı	İmmünoloji A.B.D.
Thermo Scientific Semi-Dry HEP-1 Western Blot Cihazı	Western Blot Cihazı	İmmünoloji A.B.D.
Spektrofotometre ve Florometre (DE-NOVIX/DS-11FX)	Örneklerin konsantrasyonlarının ölçümü	Tıbbi Biyoloji A.B.D.
Vorteks 4S (DAIHAN- Wisd/ VM-10)	Genel kullanım	İmmünoloji A.B.D.
Biyolojik Güvenlik Kabini (Biobase Class 2)	Mikrobiyal DNA izolasyonu, periferik mononükleer eldesi	Tıbbi Biyoloji A.B.D.
Distile su cihazı	Genel kullanım	Tıbbi Biyoloji A.B.D.
Masaüstü soğutmalı ultrasantrifüj	Genel kullanım	Tıbbi Biyoloji A.B.D.
Mini Santrifuj (Daihan)	Genel kullanım	Tıbbi Biyoloji A.B.D.
ELISA Okuyucu (Thermo Scientific Multiscan Sky)	Okuyucu	İmmünoloji A.B.D.
Spin Santrifuj (ONİLAB D1008)	Genel kullanım	Tıbbi Biyoloji A.B.D.
Colibri Titertek Berthold	DNA konsantrasyonu ölçümü	Teknogen A.Ş.
QUBİT FLOROMETER 2.0 (Thermo Scientific)	DNA konsantrasyonu ölçümü	Teknogen A.Ş.

3.3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Çalışmada kullanılan kimyasallar İmmünoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Sevgi Kalkanlı Taş Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan kimyasal ve sarf malzemelerin kullanım amaçları ve markaları Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler

Malzemeler	**Kullanım Amacı**	**Marka-Katolog Numarası**
Tris-Glisin Tamponu 10x	Western Blot	Thermo Scientific™, #28363
Pvdf Transfer Membranı, 0,45 um, 10 Cmx10xcm	Western Blot	Thermo Scientific™, #88585
Pierce Ecl Plus Western Blotlama Solüsyonu	Western Blot	Thermo Scientific™, 32106
Pierce Protein-Free (TBS) Bloklama Tamponu	Western Blot	Thermo Scientific™, #37570
Western Blot Filtre Kağıdı 10cm x10 cm	Western Blot	Thermo Scientific™,886600
Pierce BCA Protein Assay Kit	Protein miktarı belirleme	Thermo Scientific™ , #23225
Pageruler Protein Stain	Marker	Thermo Scientific™, #26619
Buph Tris-Hepes-SDS Yürütme Tamponu	SDS Elektroforezi	Thermo Scientific™, #28398
LDS Örnek Tamponu Non-Reducing (4X)	SDS Elektroforezi	Invitrogen™, #NP0007
Tris	SDS Elektroforezi	Sigma Aldrich, # 93362
TEMED	SDS Elektroforezi	Sigma Aldrich, #T9281
Sodium Dodecyl Sülfat	SDS Elektroforezi	Sigma Aldrich, #L3771

Tablo 3.3 (devam)

Bisacrilamid	SDS Elektroforezi	Sigma Aldrich, #146072
Amonyum Per Sülfat	SDS Elektroforezi	Sigma Aldrich, #
NLRP3/NALP3 Mouse Monoclonal Antikor	SDS Elektroforezi	Origene, #TA336883
Peroxidase Conjugated Goat Anti-Mouse IgG	SDS Elektroforezi	Origene, #TA130004
Pipet Uçları	Genel Kullanım	Eppendorf
Ethanol	Genel Kullanım	İsolab, #64175
İzopropil	Genel Kullanım	Isolab, 961.028
IL-1β ELISA Kit	ELISA	Thermo Scientific, #M420BB
IL-18 ELISA Kit	ELISA	Thermo Scientific, #BMS267-2
QIAamp Pathogen DNA mini kit	DNA izolasyonu	Qiagen, #50214

3.3.3. Çalışmada Kullanılan Tampon Çözeltilerin Hazırlanışı

3.3.3.1. Mikrobiyal DNA izolasyonu için hazırlanan çözeltiler:

- **Yıkama tamponunun hazırlanışı:** Kit ile birlikte gelen yıkama tamponlarından APW1'in içerisine 24 ml, APW2'nin içerisine 35 ml %99,9 ethanol eklendi ve yıkama tampon 15-25^{o}C'de muhafaza edildi.

3.3.3.2. QUBIT flurometre ile DNA konsantrasyonu ölçümü için hazırlanan çözeltiler:

- **Standart Çözeltinin Hazırlanışı:** Standart A ve Standart B'den 10 µl alınıp ayrı ayrı 0,5ml'lik mikrosantrifüj tüplere eklendi. Daha sonra üzerlerine çalışma solüsyonundan 190 µl eklendi. Kısa süreli vorteks yapıldı.

- **Örnek Çalışmanın Hazırlanışı:** Bir 0,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 198 µl çalışma solüsyonundan alınıp, içerisine 2 µl DNA eklendi. Kısa vorteks yapılarak cihazda okutuldu.

3.3.3.3. SDS-PAGE jel elektroforezi için hazırlanan tampon ve çözeltiler:

- **1.5 M Tris- CI:** SDS-PAGE jel elekroforezinde ayırma jeli için gerekli olan Tris-CI çözeltisi 50 mL distile su içerisine 9,09 gr Tris eklenerek hazırlandı ve HCI yardımıyla pH 8,8 olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi.
- **1.0 M Tris-CI:** SDS-PAGE jel elekroforezinde yığma jeli için gerekli olan Tris-CI çözeltisi 50 mL distile su içerisine 6,06 gr Tris eklenerek hazırlandı ve HCI yardımıyla pH 6,8 olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi.
- **%10 SDS:** SDS-PAGE jel elekroforezinde hem yığma hem de ayırma jeli için gerekli olan %10'luk SDS 10 mL distile su içerisinde 0,1 gr SDS çözülerek hazırlandı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi.
- **%10 APS:** SDS-PAGE jel elekroforezinde hem yığma hem de ayırma jeli için gerekli olan %10'luk APS 10 mL distile su içerisinde 0,1 gr APS çözülerek hazırlandı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi.
- **SDS yürütme tamponunun hazırlanışı:** SDS-PAGE jel elektroforezinde proteinlerin yürütülebilmesi için gerekli olan tampon çözelti 1 L distile su içinde 3 g TrisBaz, 14,4 g Glisin, 1 g SDS kimyasallarının çözünmesiyle hazırlandı. Hazırlanan tampon çözelti manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılıp, homojen hale getirildi. Homojen hale gelen tamponun pH'ı 8,3'e ayarlandı.

3.3.3.4. Western blot için hazırlanan tampon ve çözeltiler:

- **Jel boyama solüsyonunun hazırlanışı:** SDS-PAGE jel elektroforezinde jelin boyanıp, proteinlerin gözlemlenmesi için 500 ml distile su içerisine 0,5 gr %0,1 Comassive Blue Brillant, 200 ml %40 Metanol, 10 ml %2 Asetik asit kimyasalları eklendi. Manyetik karıştırıcıda karıştırılıp, homojen hale getirildi. Hazırlanan tampon oda sıcaklığında muhafaza edildi.
- **Jel boyasını silme tamponunun hazırlanışı:** SDS-PAGE jel elektroforezinde, boyanan jelin, boyasının sökülmesi için %40 methanol 1 L distile su içerisinde eklenip

ve 1 saat inkübe edildi. Ardından %2'lik glacial acid inkübe olan çözeltinin içerisine eklenip, karıştırıldı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında inkübe edildi.

- **Transfer solüsyonunun hazırlanışı:** SDS-PAGE jel elektroforezinde, jelin membrana geçirilmesi için gerekli olan transfer solüsyonu; 1 L distile su içerisine 25 mM Tris pH:8,3, 192 mM glisin, %20 ethanol, %0,05 SDS kimyasalları eklenerek yapıldı. Hazırlanan çözelti +4C°'de muhafaza edildi.
- **Yıkama tamponunun hazırlanışı:** Western Blot aşamasında, transfer sonrası membranı, methanolden ve bloklama sonrası bloklama solüsyonundan sonra uzaklaştırmak için 1 L distile suyun içinde 100 ml 10X PBS çözeltisi eklendi. Daha sonra içerisine %0,1 Tween 20 eklenerek, oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.3.3.5. ELISA için hazırlanan tampon ve çözeltiler:

- **1X yıkama tamponunun hazırlanışı:** Plakanın yıkama aşaması için hazırlanan 1X'lik yıkama tamponu 1000 ml distile su içerisinde kit ile birlikte gelen 50 ml 20X yıkama solüsyonu ile hazırlandı. Çözeltide köpürmeyi önlemek için hafifçe karıştırıldı ve hazırlanan tampon çözelti 4°C'de muhafaza edildi.
- **Assay tamponunun hazırlanışı:** ELISA'da kullanılan assay tampon çözeltisi için 100 ml distile su içerisine, kit ile birlikte gelen 5 ml 20X'lik assay tampon çözeltisi eklendi. Çözeltide köpürmeyi önlemek için hafifçe karıştırıldı ve hazırlanan tampon çözelti 4°C'de muhafaza edildi.
- **Biotin conjugatın hazırlanışı:** Çalışmadan 30 dakika önce 1X'lik assay tampon içerisinde 1 ml biotin conjugat eklenerek hazırlandı.
- **Streptavidin-HRP'nin hazırlanışı:** Çalışmadan 30 dakika önce 200 ml'lik distile su içerisine, 1 ml Streptavidin-HRP eklenerek hazırlandı.
- **Standartların hazırlanışı:** IL-1β standartı ve IL-18 standartı protokolde belirtildiği gibi 350 µL distile su ile konsantrasyonu 500 pg/mL olacak şekilde sulandırıldı. Sulandırılmış standart 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra plakalara yerleştirilecek şekilde ve standartların konsantrasyonları sırasıyla seri 5000 pg/ml, 2500 pg/ml, 1250 pg/ml, 625 pg/ml, 313 pg/ml, 156 pg/ml, 78 pg/ml dilüsyon yapıldı.
- **Kontrollerin hazırlanışı:** ELISA'da kullanılan kontrollerin hazırlanışı kit protokolüne uygun olarak dizayn edildi. Kit ile birlikte gelen kontroller 450 µL distile su ile sulandırıldı.

3.4. YÖNTEM

Örneklem büyüklüğü çalışmaya dahil edilecek hasta gruplarının özellikleri ve tüm değişkenler dikkate alınarak hesaplanmıştır. Güç analizi sonucunda, çalışma için 40 örneğe ihtiyaç olduğu hesaplanmıştır ve 10 yeni tanı almış Crohn hastalığına sahip birey, 10 anti-TNF ilaç başlamış Crohn hastası, 20 sağlıklı birey olmak üzere çalışmamıza toplamda 40 birey katılım sağlamıştır.

3.4.1. Mikrobiyal DNA İzolasyonu

Hastalardan rutin muayeneleri sırasında alınan kanın 400 µL'si DNA izolasyonu için ayrıldı. DNA izolasyonu için QIAamp UCP Pathogen Mini Kit kullanıldı (Cat no:50214, Qiagen). DNA izolasyonu için aşağıdaki aşamalar uygulandı.

1- 1,5 ml ependorf tüpe hastalardan alınan 400 µL kan örneği konuldu ve üzerine 100 µL ATL tampon çözeltisi eklendi. Daha sonra örneklerin her biri, 10 saniye boyunca vorteks yardımıyla karıştırıldı ve 8000g'de 5 saniye boyunca santrifujlendi.

2- Örneklerin üzerine 40 µL proteinaz K eklendi ve ardından 10 saniye boyunca vortekslendi. Vorteks sonrası örneklerin üzerine 200 µL APL2 tampon çözeltisi eklendi ve örnekler 30 saniye boyunca vortekslendi. Vortekslenen örnekler 70^0C'de inkübe edildi.

3- İnkübe edilen örnekler spin santrifuj yardımıyla çöktürüldü, lizat yapılması amacı ile üzerine; 300 µL ethanol eklendi ve 15 saniye boyunca vortekslendi.

4- Örneklerin her biri için QIAamp UCP Mini Spin filteli kolon kullanıldı. Ethanol sonrası 1 dakika inkübe olan örneklerden 600 µL alındı ve filtreli kolona eklendi. Daha sonra örnekler 8000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifujlendi. Bu aşama her bir örnek için iki kez tekrarlandı.

5- Supernatantı atılan örneklerin üzerine, ilk olarak 600 µL APW1 tampon çözeltisi eklendi ve 8000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifujlendi.

6- Santrifujlenen örnekleri supernatantı atıldı ve üzerine son yıkama aşaması için 750 µL APW2 tampon çözeltisi eklendi. 14000 rpm'de 3 dakika boyunca tüm örnekler santrifujlendi.

7- Son olarak filtreden DNA izolasyonu gerçekleştirmek için örnekler 56^oC'de 3 dakika boyunca kurutuldu.

8- Daha sonra filtrenin altına temiz ependorf tüp geçirildi ve 50 µL elüsyon tampon çözeltisi yardımıyla DNA eldesi tamamlandı.

9- DNA eldesi tamamlanan örneklerin hepsinin konsantrasyon ölçümü yapıldı ve -80^{o}C'de sekanslama aşamasına geçene kadar muhafaza edildi.

3.4.2. DNA Konsantrasyonlarının Ölçümü

DNA ölçümü 3 farklı cihazla yapıldı. İlk olarak; elde edilen DNA örneklerinin konsantrasyonu "DENOVIX/DS-11FX" cihazıyla ölçüldü. Daha sonra Colibri Titertek Berthold cihazı kullanılarak, örneklerin DNA ölçümleri ikinci kez yapıldı ve konsanstrasyonları karşılaştırıldı. DNA konsanstrasyonları dizilemede çok önemli bir faktör olduğundan, örneklerin konsantrasyonlarının ölçümü 3. kez Qubit 2.0 Fluorometre cihazı ile yapıldı. Cihazda öncelikle ölçüm için DNA seçeneği seçildi ve cihaz kalibrasyonu için standart A ve standart B kısa vorteks yapıldıktan sonra örnekler sırası ile okutuldu. Doğru orantı grafiği elde edildi. Daha sonra numunelere 5 saniye vorteks yapıldıktan sonra, örnekler cihaza tek tek yüklenerek okutma işlemi yapıldı.

Qubit 2.0 Fluorometre, ng/ml cinsinden Qubit™ dsDNA HS testine değer vermektedir. Bu değer, numunenin test tüpünde seyreltildikten sonra konsantrasyonuna karşılık gelmektedir.

Spekrofotometrik ölçüm neticesinde sekanslamaya uygun olan örneklere Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yapılmıştır.

3.5. MİKROBİYATA ANALİZİ (METAGENOM ANALİZİ)

3.5.1. Kütüphane Hazırlama

İzolasyon sonrasında her bir örnekteki 16S rRNA V3-V4 bölgelerinin zenginleştirilmesi için 16S Forward ve 16S Reverse kodlu 16S Universal Eubacteriyal primerler kullanılmıştır. İlgili primerler literatürdeki kapsamlı çalışmalardan, en yüksek etkinlik sunan primer seti olarak seçilmiş ve çalışmamızda kullanılmıştır.

- 16S-Forward

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

- 16S-Reverse

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC

Projede, kütüphane hazırlığı sırasında 2 basamaklı PCR işlemi gerçekleştirildi. Bu işlemlerde, KAPA HiFi HotStart ReadyMix (#Roche) kullanılarak her bir örnek için ayrı ayrı 25 döngülü PCR çalışıldı. Birinci PCR aşamasında, 95°C'de 3 dk. ardından 25 döngü boyunca 95°C 30sn, 55°C 30sn, 72°C 30sn; ve son olarak tek döngü 72°C'de 5dk. koşulları uygulandı. İkinci PCR uygulamasında, illumina index ve adaptör dizilerinin eklenmesi için Nextera XT Index Primer I ve Nextera XT Index Primer II setleri (#illumina, CA, USA) kullanıldı. PCR aşamasında, 95°C'de 3 dk. ardından 8 döngü boyunca 95°C 30sn, 55°C 30sn, 72°C 30sn; ve son olarak tek döngü 72°C'de 5dk koşulları uygulandı.

Her iki PCR işlemi sonrasında Agencourt AMPure XP (#Beckman Coulter) kiti ile saflaştırma ve pürifikasyon gerçekleştirildi. PCR sonrasında, tüm örneklere ait PCR ürünleri %2'lik agaroz jel üzerinde, bant varlığı ve göreceli bant yoğunlukları kontrol edildi ve hazırlanan kütüphanenin Qubit florometresi ile ölçümü yapıldı. Dizileme işlemine devam edildi.

3.5.2. Dizileme

Ekstrakte edilen bakteri DNA'larında bulunan 16S rRNA V3-V4 bölgesi PCR ile amplifike edildikten sonra Nova Seq 6000 platformunda (Illimuna) yaklaşık olarak bölgenin tamamının örtüştüğü 2x250 bp pair-end (çift uçlu) protokolü takip edilerek dizileme gerçekleştirildi. Amplifikasyon sırasında kullanılan bu primerler hem HiSeq sekanslama için hem adaptörleri hem de PCR ürünlerinin direk dizilenmesi ve çip üzerinde havuz sistemi oluşturmak için single-end (tek uçta) barkodları içermekteydi (203). 16S rRNA gen içeriğinden elde edilen veri filogenetik ve hizalama (alignment) tabanlı yaklaşımlar ile data çözümlemesinden en yüksek seviyede verim alınmasını

sağlamaktadır. Çalışmamızda; özgün moleküler barkodlar ile okuma çiftleri ayrıştırıldı ve pair-end (çift uçlu) okumaları FLASH (V1.2.7, http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/) (204) kullanılarak birleştirildi. FLASH yazılımı DNA fragmentinin karşılıklı kesişen sonlarından oluşturulan okumaya bazı okumaların örtüşmesiyle dahi pair-end'leri birleştirebilmesi için tasarlandı (205). QIIME (V1.7.0, http://qiime.org/scripts/split_libraries_fastq.html kalite kontrol prosesine göre raw taq'lardaki yüksek kalite filtresi ile temiz taq'lar elde etmek için spesifik filtreleme koşulları altında gerçekleştirildi (206). Bu taq'lar UCHIME (http://www.drive5.com/usearch/manual/uchime_algo.html) algoritması kullanılarak KİMERA sekasları tespiti için referans database (Gold database, http://drive5.com/uchime/uchime_download.html) ile karşılaştırıldı ve KİMERA (http://www.drive5.com/usearch/manual/chimera_formation.html) sekansları çıkarıldı. Sonunda efektif taq'lar elde edildi (207). Ek olarak, birleştirilen okuma sonuçlarına kalite filtresi uygulandı ve beklenen hata oranı (P-value) 0,05 üzerinde olanlar elendi.

16S rRNA gen dizileri UPRASE (Uparse v7.0.1001 http://drive5.com/uparse/) algoritması kullanılarak %97 benzerlik kesim oranı (cut-off) ile OTU kümelerine ayrıldı. Taksonomik sınıflara karar vermek için sadece 16S V3-V4 bölgesini içeren SILVA (http://www.arb-silva.de/) veri tabanının (208,209) optimize edilmiş versiyonu ile OTU'lar haritalandı. Ayrılmış (demultiplexed) okumaların UPARSE OTU'ler kullanılarak haritalanması ile yoğunluklar elde edildi. Tüm OTU'lerin temsili dizilerinin filogenetik ilişkisini elde etmek için, çok sayıda diziyi karşılaştırabilir olan MUSCLE (Sürüm 3.8.31 http://www.drive5.com/ muscle/) kullanıldı (210). Önceki iki basamakta oluşturulan OTU tabloları ile Alpha-diversity, beta- diversity (211) analizleri yapıldı.

3.5.3. Biyoinformatik Analiz

Dizileme uygulaması sonrasında kalite kontrol basamaklarında FastQC3 programı kullanıldı ve kalite kontrol sonuçlarına göre, her bir örneğin veri miktarı, okuma kalitesi, GC dağılımı, kimer dağılımı, olası adaptör kontaminasyonu incelendi. Ayrıca, okuma uçlarındaki düşük kaliteli baz okumaları, olası adaptör kontaminantları ile kimerik diziler, Genomes OnLine Database (GOLD) temel alınarak ve Trimmomatic 4 aracı ile kırpılacak ve taksonomik profillendirme için okumalar, Wang Q. et al. tarafından geliştirilmiş Ribosomal Database Project (RDP) Classifier kullanılarak Greengenes veritabanları temel alınarak hedef organizmalara hizalandı. Hizalama

sonrasında verilerin raporlanması, istatistik analizleri ve veri görselleştirme çalışmaları yapıldı (212).

3.6. PROTEİN SEVİYESİNİN WESTERN BLOT YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

3.6.1. SDS-PAGE Jel Elektroforezi

10 yeni tanı konmuş Crohn hastası, 10 anti-TNF alan Crohn hastası ve 20 sağlıklı bireyden alınan plazma örneklerinden izole edilen proteinlerin seviyeleri Western Blot yöntemi ile belirlendi. Çalışmamızda Western Blot'un ilk aşaması olan SDS-PAGE için Thermo Scientific OWL-P81 cihazı kullanıldı. %10'luk hazırlanan jelimizin ayırma kısmı için 2 mL distile su, 1,7 mL 1,5 M Tris-CI (pH:8,8), 1,3 mL Bis-acrilamid, 50 µL %30 SDS, µL %10 APS, 10 µL TEMED kullanıldı. Jelin düzleşmesini sağlamak için, üzerine 2 ml izopropil alkol eklendi ve 30 dakika inkübe edildi. 30 dakika inkübasyonun ardından, izopropil alkol, distile su yardımıyla uzaklaştırıldı ve toplayıcı jel hazırlandı. Toplayıcı jelin hazırlanışında 1,4 ml distile su, 330 µL 1,0 M Tris-CI (pH: 6.8), 250 mL Bis-acrilamid, 20 µL %30 SDS, 20 mL % APS, 20 µL TEMED kullanıldı. Jel; 30 dakika kurumaya bırakıldı. Kuyucuklara marker ve sırasıyla hastalardan elde edilen plazmalardan 10 µL ve 4 µL LDS buffer eklendi. Jel 100 V'da 40-45 dakika yürütüldü.

3.6.2. Semi-Dry Western Blot Yöntemi ile NLRP3'ün Belirlenmesi

SDS-PAGE jel elektroforezi sonrası Western Blot yöntemine semi-dry ile transfer işlemi yapılarak devam edildi. Görüntülenecek jel büyüklüğüne göre, PVDF membran kesildi ve iki adet filtre kullanıldı. İlk olarak, aktifleşmesi için 15 dakika PVDF membran ve filtreler methanolde 10 dakika inkübe edildi. Ardından jel 10 dakika, 10 mL transfer solüsyonda çalkalayıcı yardımıyla inkübe edildi. Sırasıyla filtre, jel, membrane ve filtre blotlama için "sandwich" methoduna göre hazırlandı ve blotlama yapmak üzere Thermo Scientific OWL HEP-1 markalı semi-dry cihazına aktarıldı ve 15V- 200 mA'de 30 dakika boyunca transfer edildi. Blotlama yöntemiyle protein membrana geçirildi ve membrane blotlama sonrası 3-5 saniye PBS-T yardımıyla yıkandı, transfer solüsyonu membrandan uzaklaştırıldı. Ardından membran 1 saat

boyunca bloklama solüsyonunda inkübe edildi. Daha sonra spesifik antikor olan Mouse Monoclonal NLRP3/NALP3 antikoru ve Peroxidase Conjugated Goat Anti-Mouse IgG sekonder antikor kullanıcı talimatlarına uygun şekilde 15 ml bloklama solüsyonun içerisinde hazırlandı. Membrana geçirilen marker ve proteinler, membrandaki proteine spesifik antikorun bağlanması için; membran; 15ml'lik primer antikorun bulunduğu solüsyona yerleştirildi ve 1 gece 60 rpm'de orbital çalkalayıcıda inkübe edildi. İnkübe sonrası, membrane 1 kez 10 dakika PBS-T ile yıkandı. Daha sonra membrane; 1 saat sekonder antikorla oda sıcaklığında 60 rpm'de orbital çalkalayıcı da inkübe edildi. İnkübasyon sonrası; 3 kez 10'ar dakika PBS-T ve 1 kez 5 dakika PBS solüsyonuyla orbital çalkalayıcıda 80 rpm'de yıkandı. Yıkanan membran kaba yerleştirildi ve 1000 µL ECL maddesi ile karanlık odada 5 dakika inkübe edildi. Protein görüntülemesi için Vilber Lourmat, Solo Fusion S cihazı kullanıldı ve görüntü alındı.

3.6.3. Proinflamatuar Sitokin Düzeylerinin ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi

3.6.3.1. IL-1β düzeyi: 10 yeni tanı konmuş Crohn hastası, 10 anti-TNF alan Crohn hastası ve 20 sağlıklı bireyden alınan plazma örneklerinden IL-1β seviyesini test etmek için uygun sayıda kuyu belirlendi. Çalışmada her kuyucuktaki örnek, standart, blank ve kontrol iki tekrar olacak test edildi. ELISA testi kullanıcı protokolüne uygun şekilde yapıldı. İlk olarak kuyucuklar, 400 µL yıkama tamponu ile iki kez yıkandı ve yıkama sonrası 15 saniye inkübe edildi. Son yıkamadan sonra, kuyular boşaltıldı ve 10 dakika boyunca ıslak emici bir kağıt üzerine baş aşağı olacak şekilde inkübe edildi. Çalışma için yedi adet standart hazırlandı ve standartlar A ve B kuyularına dikey olacak şekilde konsantrasyonları sırasıyla; 5000 pg/ml, 2500 pg/ml, 1250 pg/ml, 625 pg/ml, 313 pg/ml, 156 pg/ml, 78 pg/ml olacak şekilde yerleştirildi. Daha sonra tüm standartlar, kontroller ve blankler kuyucuklara iki tekrar olacak şekilde yerleştirildi. Ardından her kuyuya 100 µL sample diluent eklendi. Daha sonra örnek kuyularına, her serum örneğinden iki tekrar olacak şekilde 50 µL serum örneği eklendi ve üzerine 50 µL "biotin-conjugate" eklendi. Daha sonra 96 kuyucuklu plaka yapışkan bir filmle örtülüp, ELISA okuyucu (Thermo Scientific, Multiskan Sky) yardımıyla oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası; yapışkan film çıkarılıp, kuyucuklar boşaltıldı ve 3 kez yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkandı. Yıkama sonrası tüm kuyucuklara kuyucuklara 100 µL seyreltilmiş Streptavidin-HRP eklendi ve tekrar yapışkan film ile örtülüp oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüm kuyucuklara, 100

µL “TMB Substrate Solüsyonu” eklendi ve 96 kuyucuklu plaka karanlık ortamda 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası plakadaki renk değişimi izlendi ve en yüksek konsantrasyona sahip olan standartta koyu mavi renk değişimi gözlemlendiğinde, 100 µL durdurma solüsyonu eklendi. Plakadaki örneklerin absorbansı 450nm ve 620 nm’de değerlendirildi.

3.6.3.2. IL-18 düzeyi: 10 yeni tanı konmuş Crohn hastası, 10 anti-TNF alan Crohn hastası ve 20 sağlıklı bireyden alınan plazma örneklerinden IL-18 seviyesini test etmek için uygun sayıda kuyu belirlendi. Çalışmada her kuyucuktaki örnek, standart, blank ve kontrol iki tekrar olacak test edildi. ELISA testi kullanıcı protokolüne uygun şekilde yapıldı. İlk olarak kuyucuklar, 400 µL yıkama tamponu ile 6 kez yıkandı ve yıkama sonrası 15 saniye inkübe edildi. Son yıkamadan sonra, kuyular boşaltıldı ve 15 dakika boyunca ıslak emici bir kağıt üzerine baş aşağı olacak şekilde inkübe edildi. Çalışma için yedi adet standart hazırlandı ve standartlar A ve B kuyularına konsantrasyonları sırasıyla; 5000 pg/ml, 2500 pg/ml, 1250 pg/ml, 625 pg/ml, 313 pg/ml, 156 pg/ml, 78 pg/ml olacak şekilde yerleştirildi. Daha sonra tüm standartlar, kontroller ve blankler kuyucuklara iki tekrar olacak şekilde yerleştirildi. Ardından her kuyuya 100 µL sample diluent eklendi. Daha sonra örnek kuyularına, her serum örneğinden iki tekrar olacak şekilde 50 µL serum örneği eklendi ve üzerine 50 µL “biotin-conjugate” eklendi. Daha sonra 96 kuyucuklu plaka yapışkan bir filmle örtülüp, ELISA okuyucu (Thermo Scientific, Multiskan Sky) yardımıyla oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası; yapışkan film çıkarılıp, kuyucuklar boşaltıldı ve 6 kez yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkandı. Yıkama sonrası tüm kuyucuklara kuyucuklara 100 µL seyreltilmiş Streptavidin-HRP eklendi ve tekrar yapışkan film ile örtülüp oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüm kuyucuklara, 100 µL “TMB Substrate Solüsyonu” eklendi ve 96 kuyucuklu plaka karanlık ortamda 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası plakadaki renk değişimi izlendi ve en yüksek konsantrasyona sahip olan standartta koyu mavi renk değişimi gözlemlendiğinde, 100 µL durdurma solüsyonu eklendi. Plakadaki örneklerin absorbansı 450 nm ve 620 nm’de değerlendirildi.

3.7. İSTATİKSEL ANALİZ

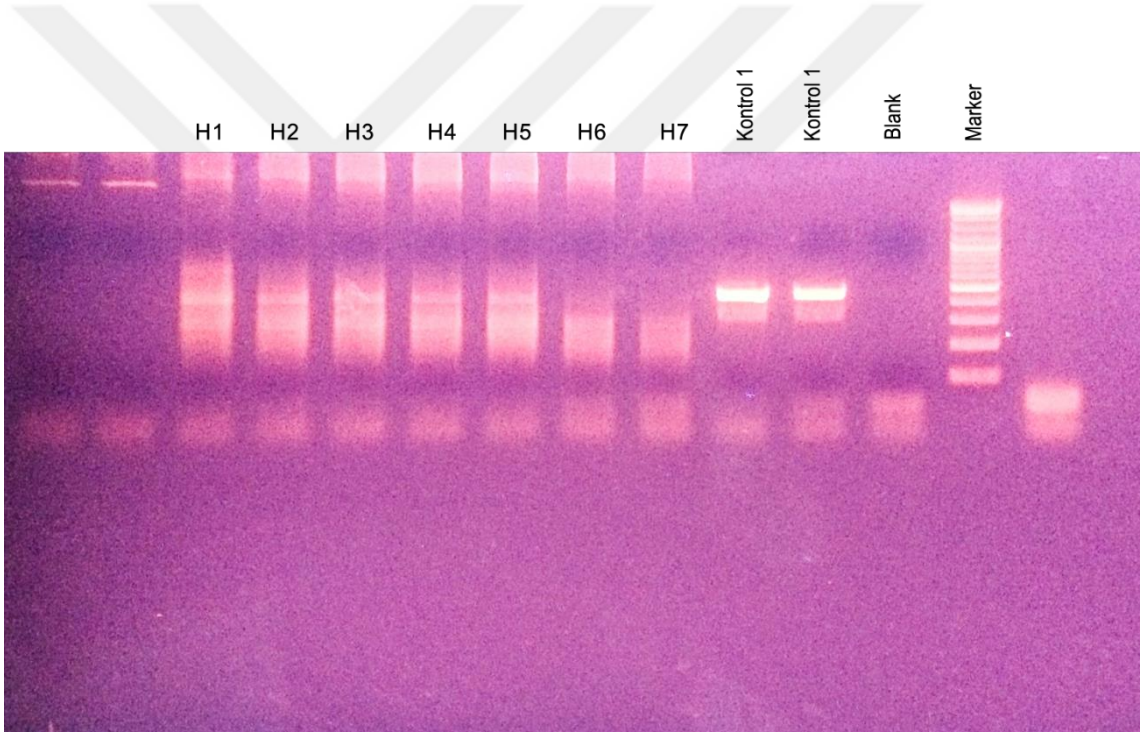
Tüm değerlendirmeler Statistical Package for the Social Sciences Statistical Software for Windows (sürüm 19.0, SPSS, Inc., Chicago, IL, ABD) ile yapıldı. Crohn

hastaları ve kontroller arasındaki farklılıklar, normallik varsayımlarına ve varyansların homojenliğine göre tek yönlü varyans analizi veya parametrik olmayan Kruskal-Wallis testleri ile değerlendirildi. Tüm gruplar arasındaki varyasyonlar Mann-Whitney U testleri veya Student's t testleri ile incelendi. Çalışma parametreleri arasındaki ilişkiler Spearman korelasyon testi ile incelendi. Her test için $< 0,05$ P değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. 16S rRNA DİZİLEME ÖNCESİ PCR ÇALIŞMASI

Şekil 4.1'de Crohn hastaları ve kontrollerden elde edilen mikrobiyal DNA örnekleriyle 16S Forward ve 16S Reverse kodlu 16S Universal Eubacteriyal primerler kullanılarak V3-V4 bölgesi çalışıldı. Görselde agaroz jelde yürütülmesi sonrası elde edilen görüntü gösterilmiştir. Görselde "H" harfi hastayı temsil etmektedir.

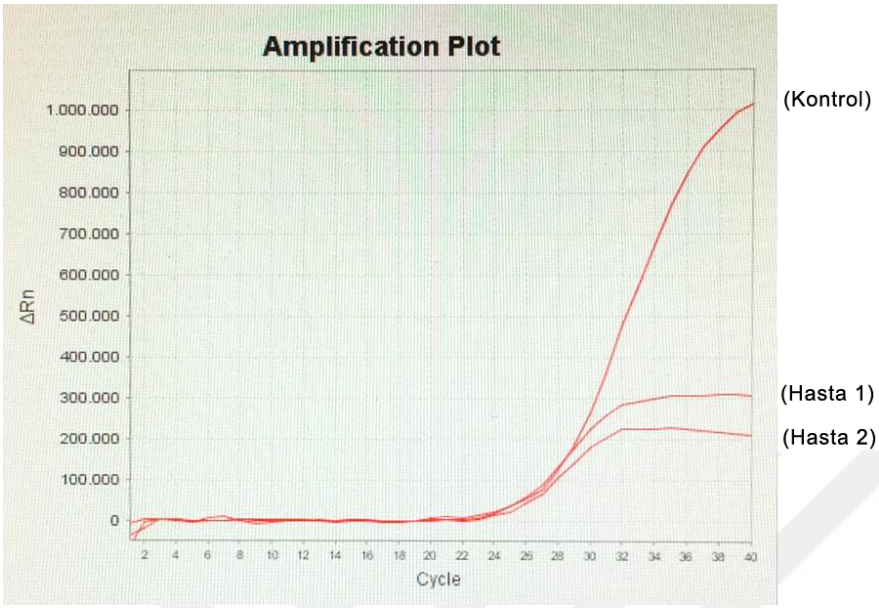


Şekil 4.1: Yeni tanılı Crohn hastaları, anti-TNF ilaç alan Crohn hastaları ve sağlıklı bireylerde V3-V4 bölgelerinin PCR ile gösterilmesi

4.2. 16S rRNA DİZİLEME ÖNCESİ ÖRNEKLERİN RT-PCR İLE KONTROLÜ

Şekil 4.2'de PCR ile çalışılan yeni tanılı Crohn hastası (Hasta 1), anti-TNF ilaç alan Crohn hastası (Hasta 2) ve sağlıklı (Kontrol) bireylerde V3-V4 bölgelerinin RT-

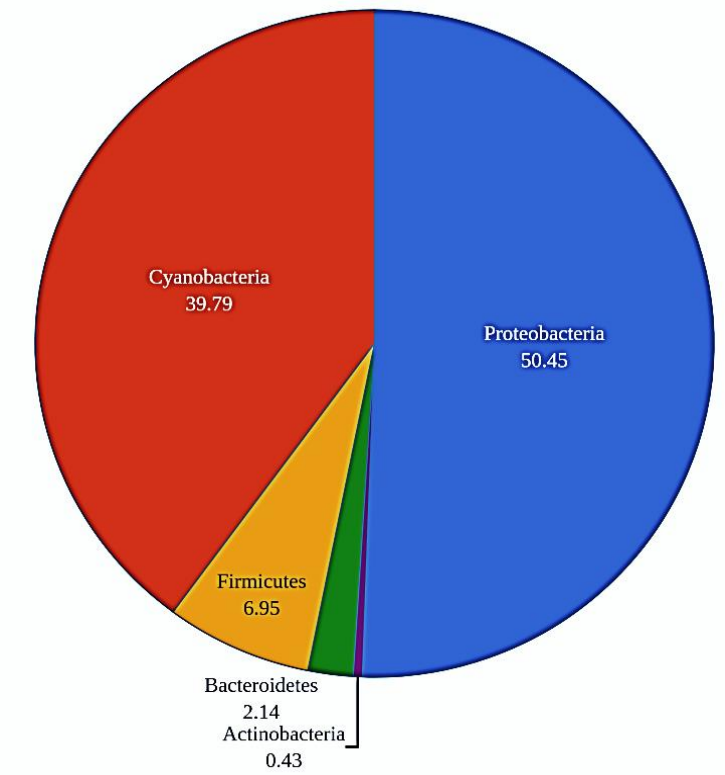
PCR ile dizileme öncesi kontrolü gösterilmiştir. Görselde ΔRn ışıma miktarını temsil etmektedir.



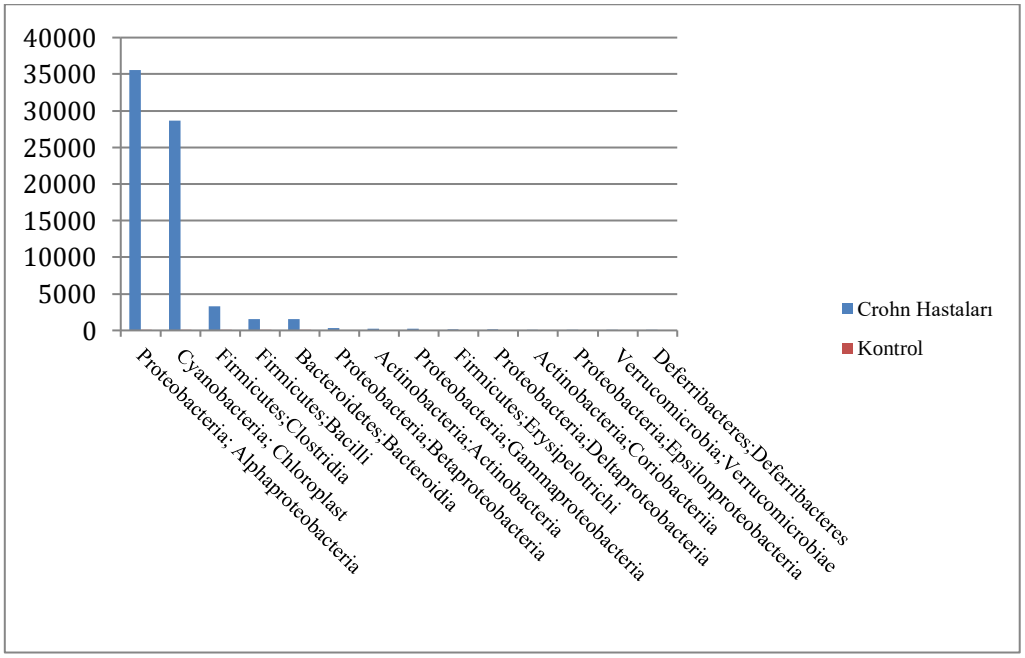
Şekil 4.2: Örneklerin V3-V4 kontrol RT-PCR sonuçları

4.3. CROHN HASTALARININ KAN ÖRNEKLERİNDE BAKTERİLERİN SINIFLANDIRILMASI

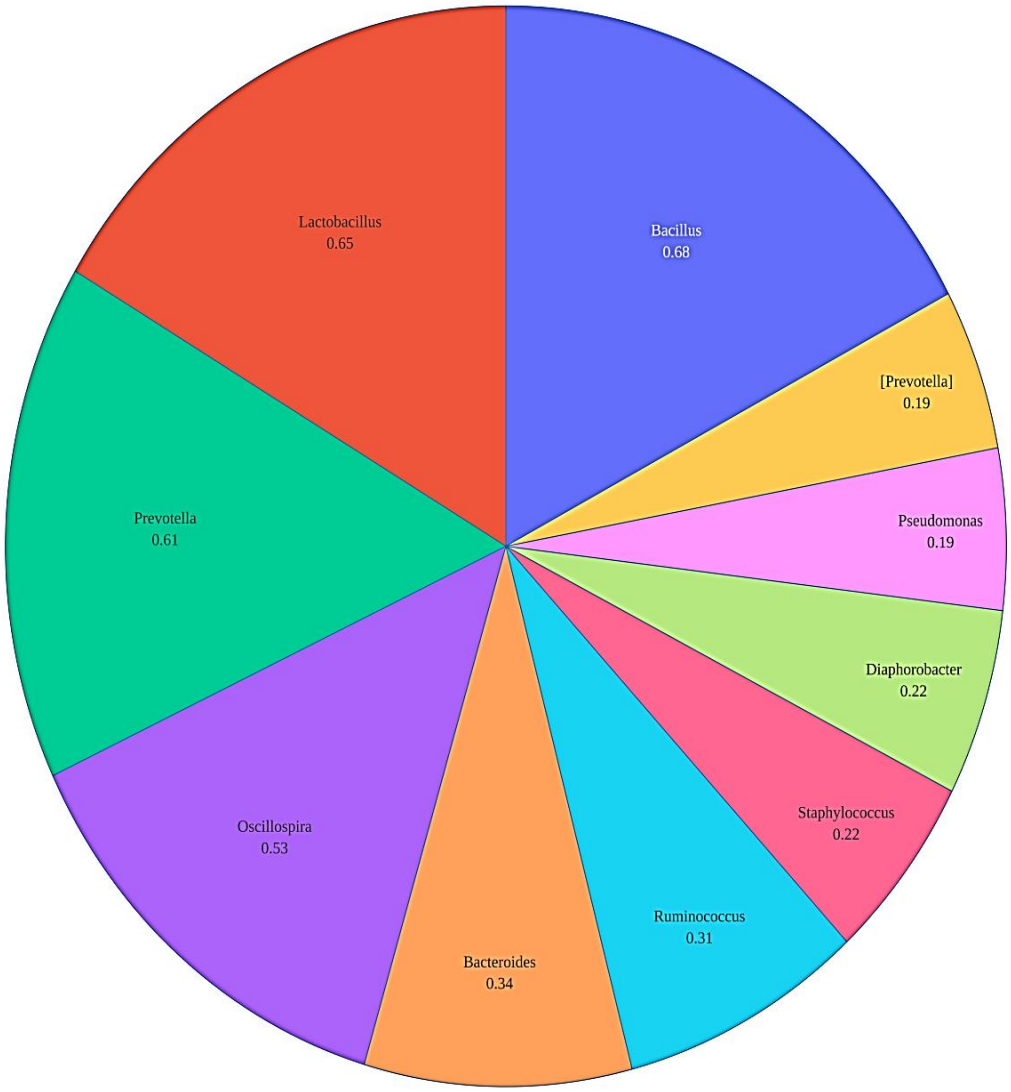
Tüm örnekler 16S rRNA dizileme ile çalışılmıştır ve 116.100 okuma verisi elde edilmiştir. Kalite skoru 30'dur. Crohn hastaların kanında %39,79 *Cynobacteria*, %50,45 Proteobacteria, %6,95 Firmicutes, %2,14 Bacterioidetes ve %0,43 Actinobacteria olmak üzere 5 filum bulundu (Şekil 4.3) ve %67 *Bacillus muralis*, %21 *Staphylococcus sciuri*, %16 *Faecalibacterium prausnitzi*, %16 *Ruminococcus bromii*, %11 *Bacteroides uniformis*, %8 *Corynebacterium stationis*, %6 *Lactobacillus helveticus*, %5 *Lactococcus garvieae*, %5 *Bifidobacterium psedolongum*, %0,61 *Prevotella copri* olmak üzere on tür bakteri tespit edildi (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5). Hastaların kanındaki bakteri türü ve tayini Şekil 4.6'da, Crohn hastalarının filumuna ait bar plot grafiği ise Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



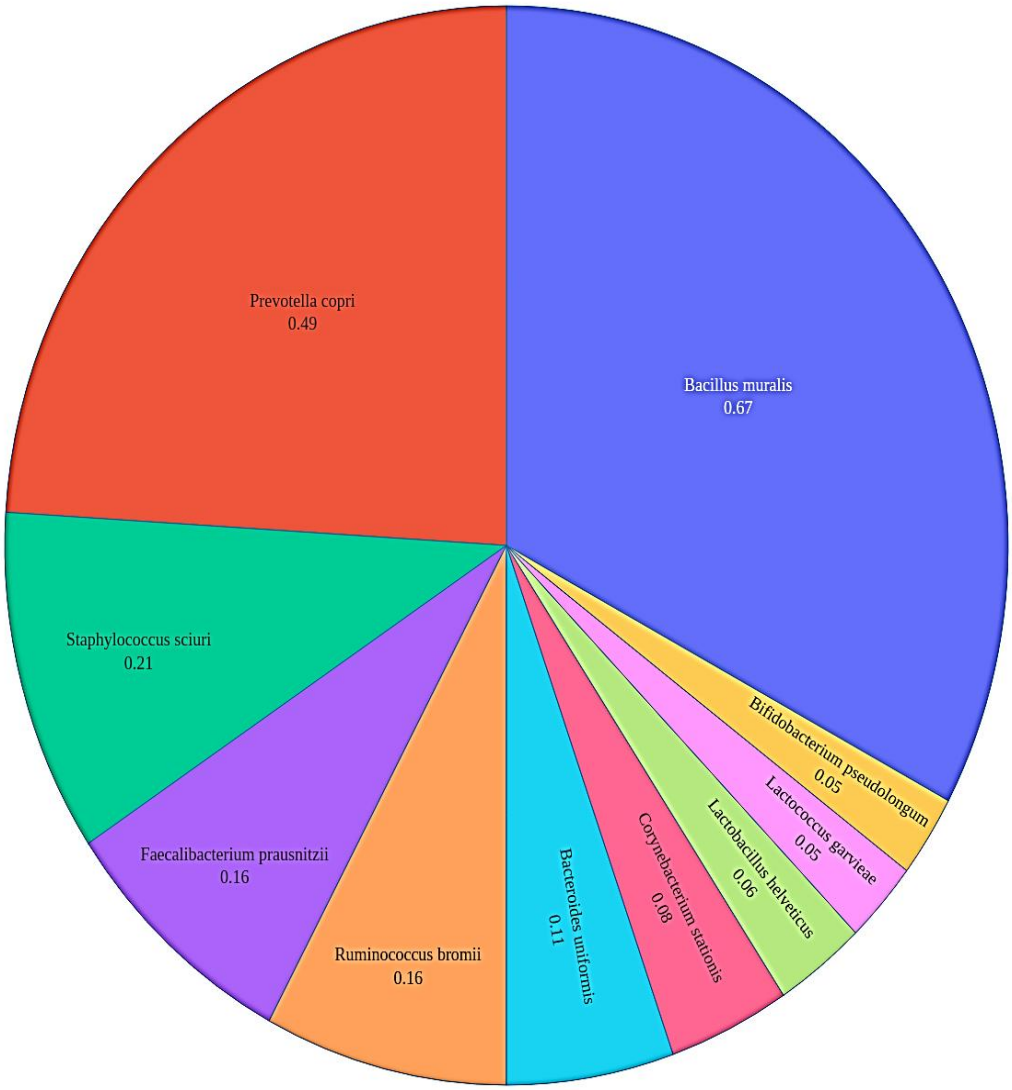
Şekil 4.3: Crohn hastalarının kanında bulunan 5 farklı filumun tespiti



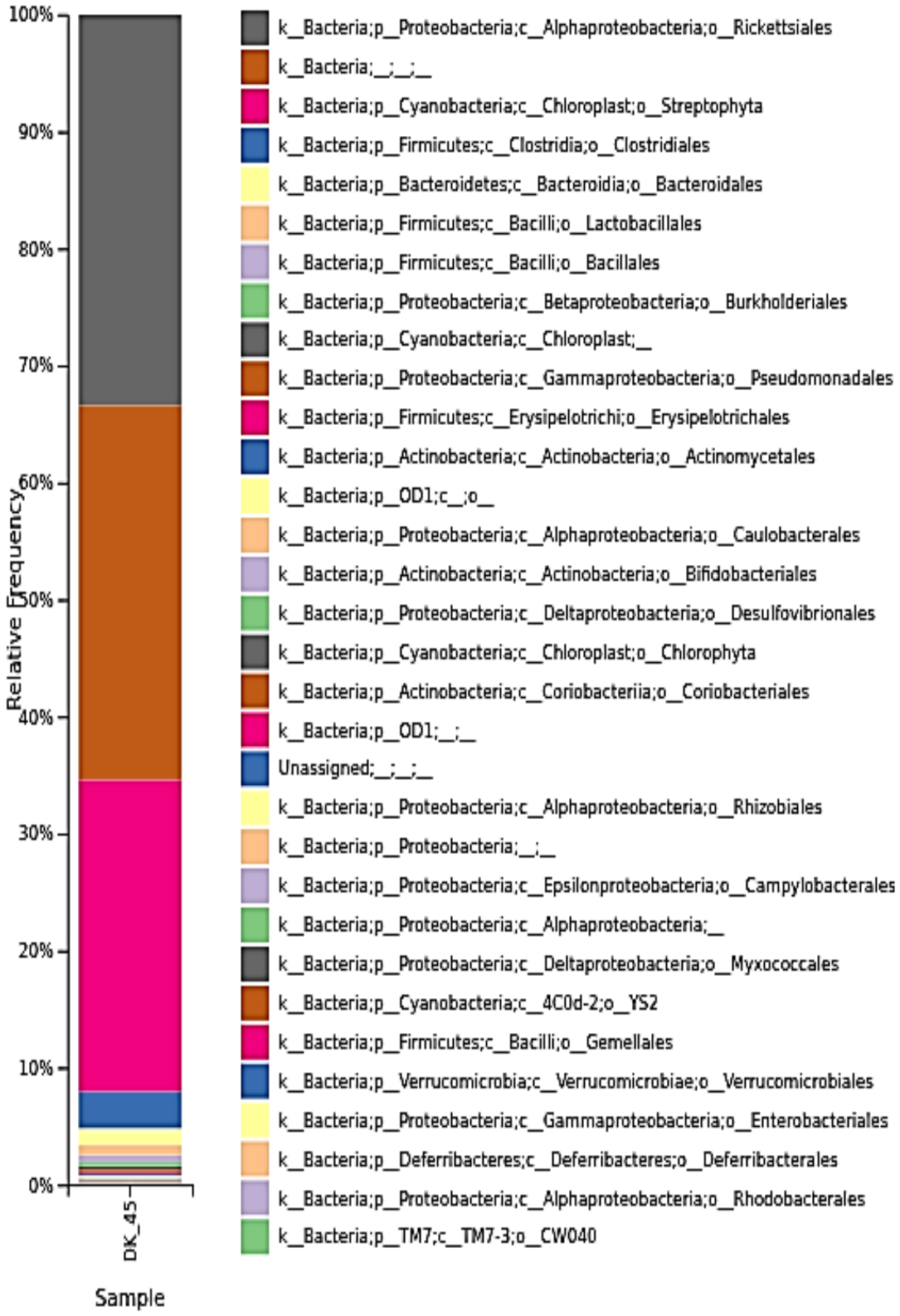
Şekil 4.4: Tüm örneklerde bakteri türü ve miktarının analizi



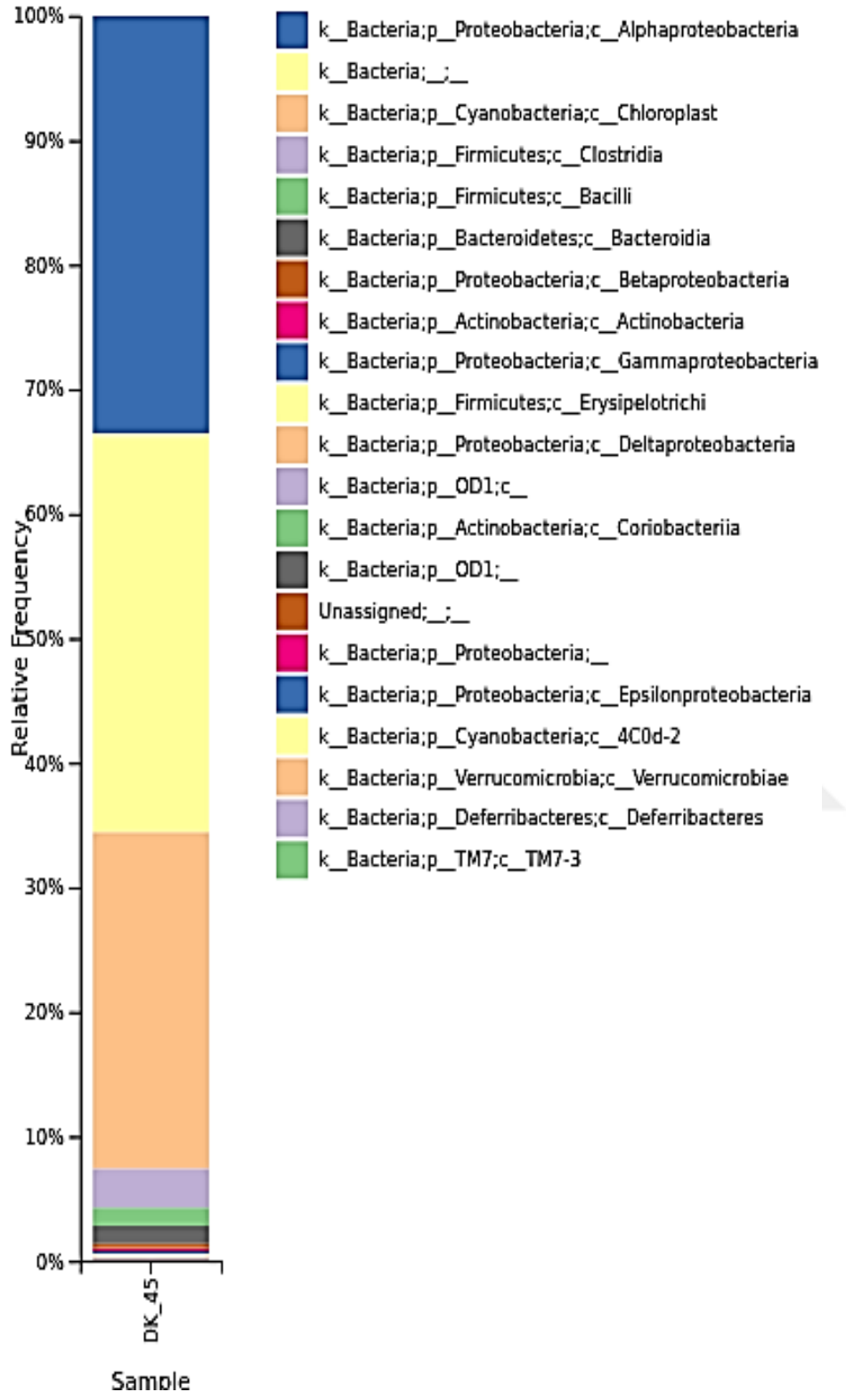
Şekil 4.5: Crohn hastalarının kanında bakteri genuslarının tespiti



Şekil 4.6: Crohn hastalarının kanında bakteri türlerinin tayini



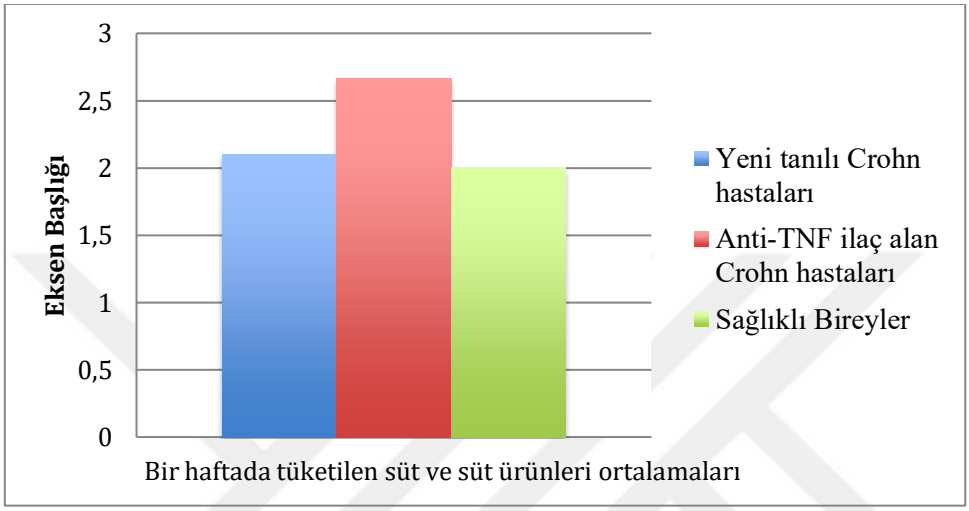
Şekil 4.7: Crohn hastalarının filumuna ait bar plot grafiği I



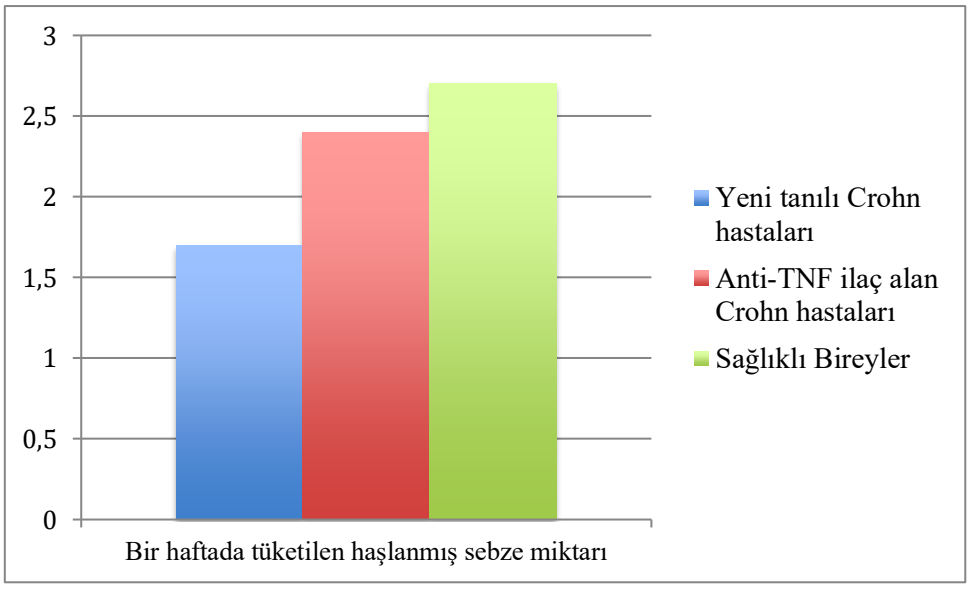
Şekil 4.8: Crohn hastalarının filumuna ait bar plot grafiği II

4.4. YEME ALIŞKANLIKLARI VE KLİNİK BULGULARIN KARŞILAŞTIRILMASI

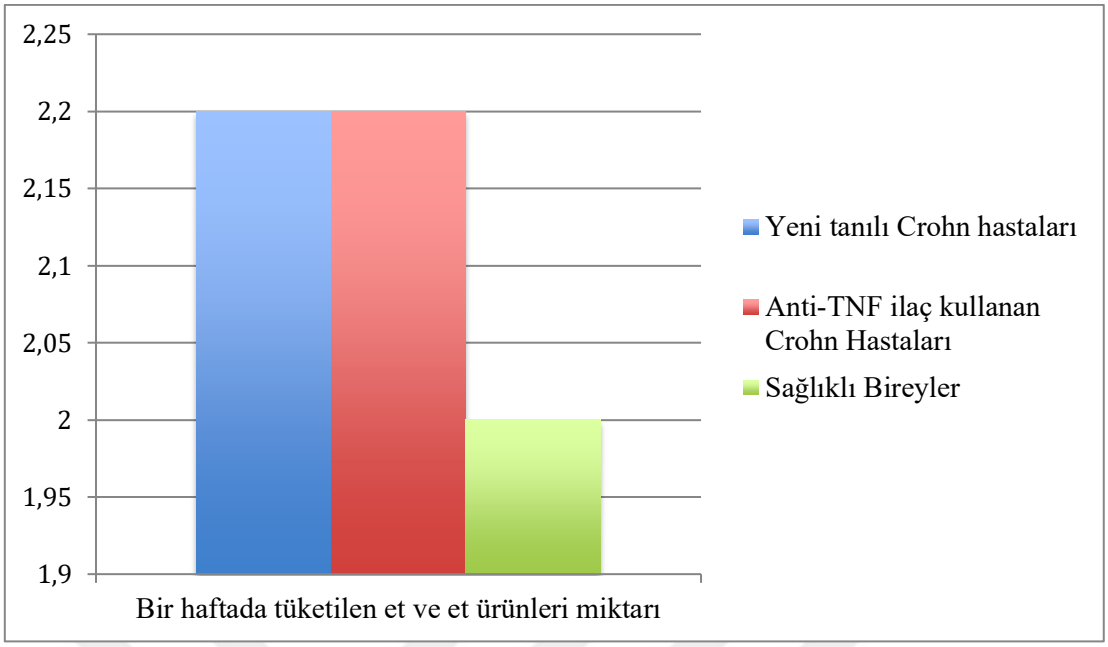
Çalışmaya katılan tüm katılımcıların yeme alışkanlıkları Şekil 4.9, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11 ve klinik bulguları ise Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'de gösterildi.



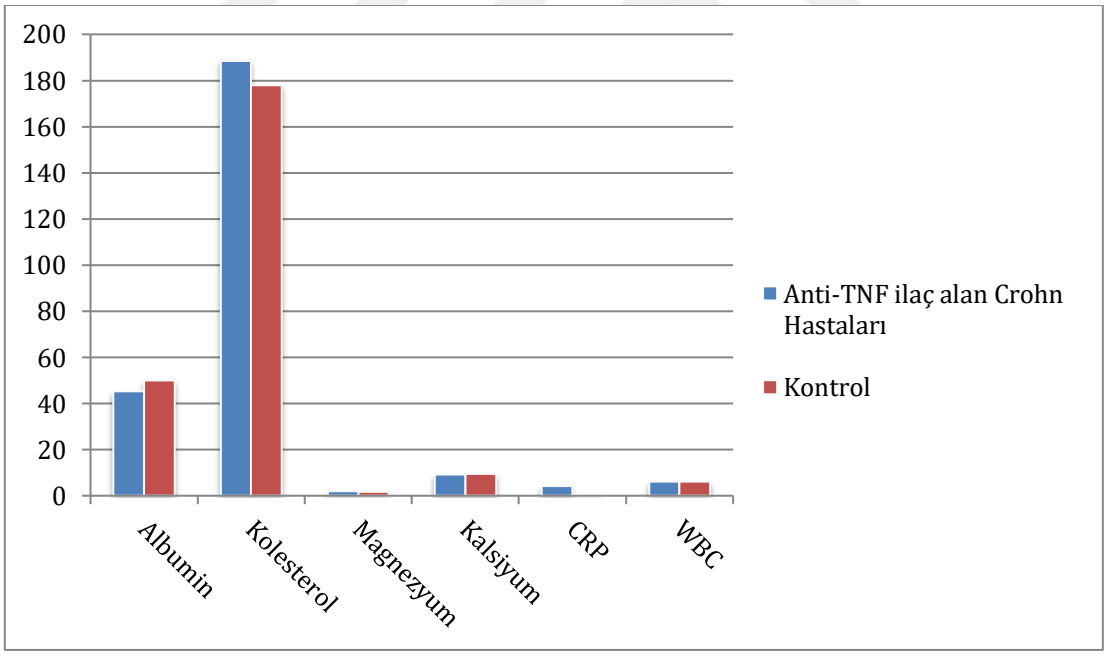
Şekil 4.9: Bir haftada tüketilen süt ve süt ürünleri ortalamalarının karşılaştırılması



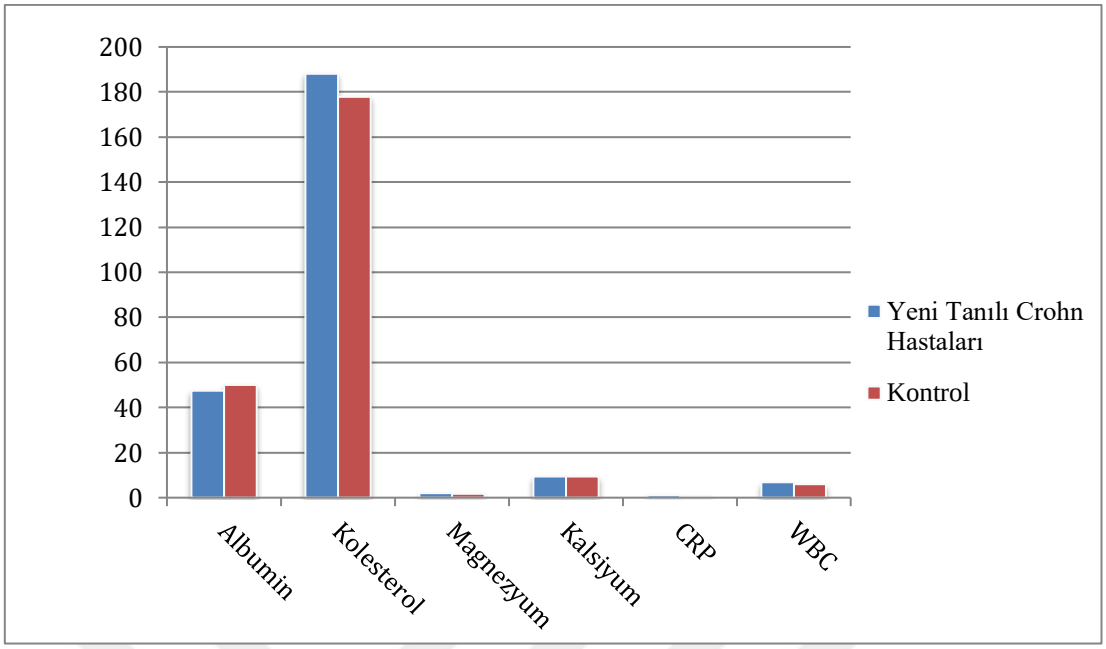
Şekil 4.10: Bir haftada tüketilen haşlanmış sebze miktarının karşılaştırılması



Şekil 4.11: Bir haftada tüketilen et ve et ürünlerinin karşılaştırılması



Şekil 4.12: Anti-TNF ilaç alan Crohn hastaları ile kontrol grubunun klinik bilgilerinin karşılaştırılması

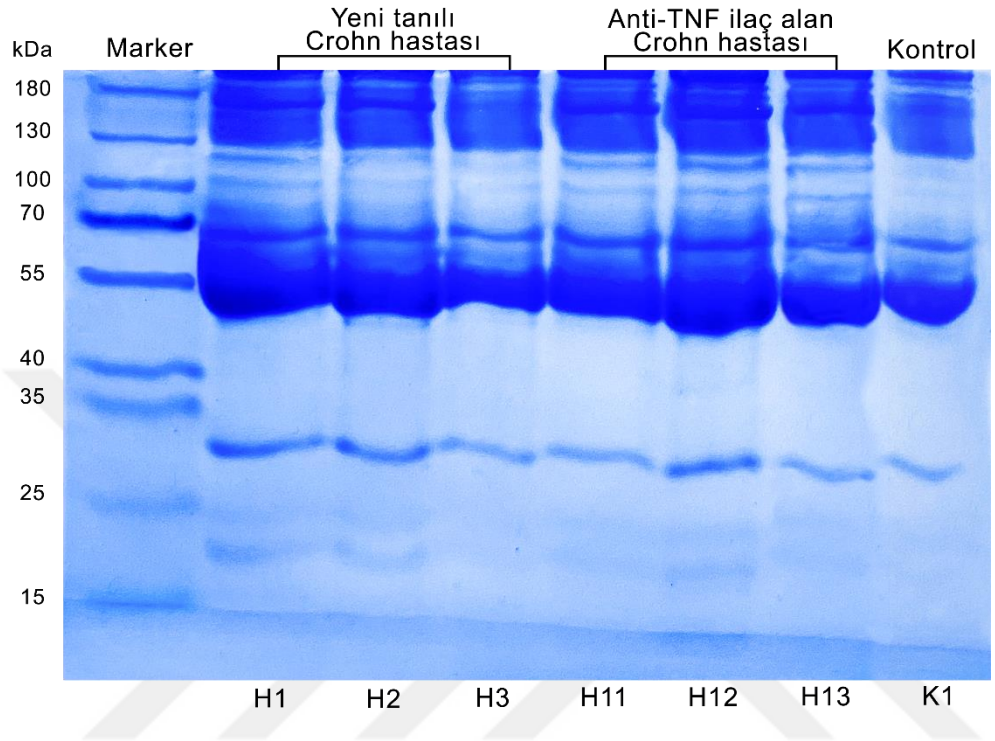


Şekil 4.13: Yeni tanılı Crohn hastaları ile kontrol grubunun klinik bilgilerinin karşılaştırılması

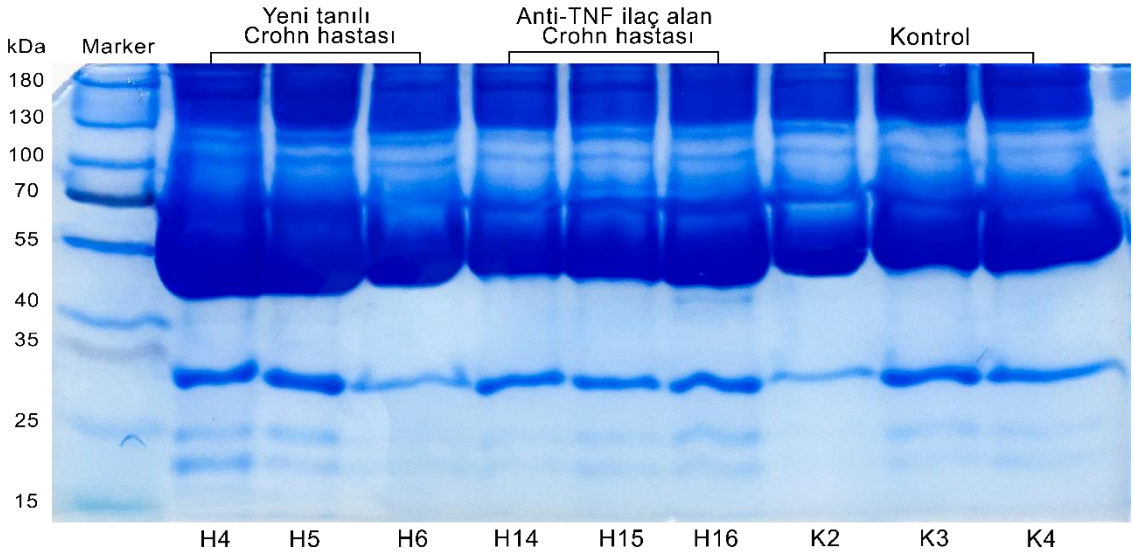
4.5. NLRP3 PROTEİNİNİN SDS-PAGE İLE GÖSTERİLMESİ

Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da yeni tanılı Crohn hastaları, anti-TNF ilaç alan Crohn hastaları ve kontrol grubunun; 4.17'de anti-TNF alan Crohn hastalarının; Şekil 4.18 ve şekil 4.19'da ise kontrol grubunun Western Blot öncesi SDS elektroforezi gösterildi. Görselde "H" harfi hastayı, "K" harfi sağlıklı bireyi temsil etmektedir. Şekil 4.14'de ilk kuyucuk marker sırasıyla; üç yeni tanılı Crohn hastası (H1, H2, H3), üç anti-TNF ilaç alan Crohn hastası (H11, H12, H13) ve bir kontrol (K1) olarak gösterilmiştir. Şekil 4.15'de ilk kuyucuk marker, sırasıyla üç yeni tanılı Crohn hastası (H4, H5, H6), üç anti-TNF alan Crohn hastası (H14, H15, H16) ve üç kontrol (K2, K3, K4) olarak gösterilmiştir. Şekil 4.16'da ilk kuyucuk marker, sırasıyla üç yeni tanılı Crohn hastası (H7, H8, H9, H10), üç anti-TNF alan Crohn hastası (H17, H18, H19, H20) ve bir kontrol (K5) olarak, Şekil 4.17'de ilk kuyucuk marker ve sonraki kuyucuklar sırasıyla anti-TNF ilaç alan Crohn hastaları (H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17, H18, H19) olarak gösterilmiştir. Şekil 4.18'de ilk kuyucuk marker ve kontroller sırasıyla (K6,K7, K8, K9, K10, K11, K12, K13 olarak gösterilmiştir. Şekil 4.19'da ilk kuyucuk marker ve kontroller sırasıyla (K14, K15, K16, K17, K18, K19, K20) olarak gösterilmiştir.

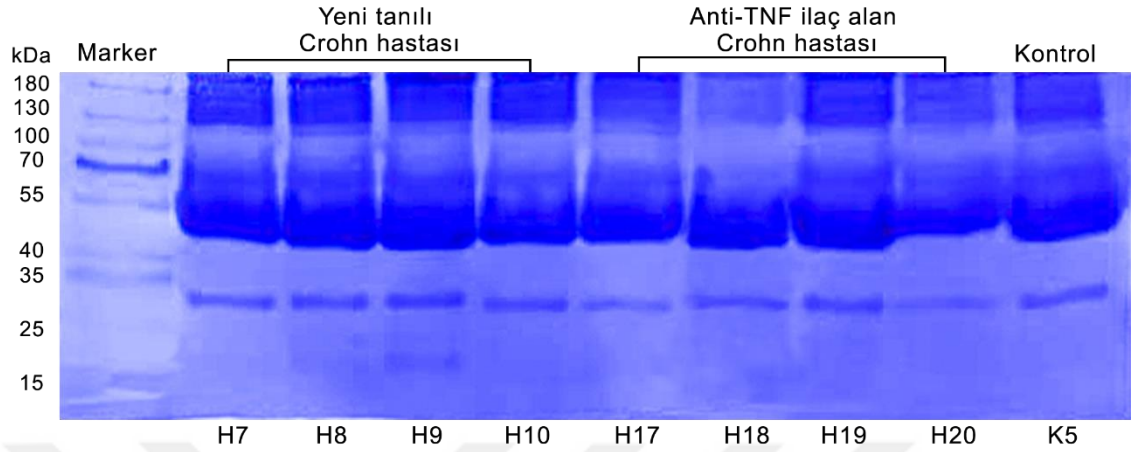
Böylelikle toplamda 20 kontrol, 10 anti-TNF ilaç alan Crohn hastası, 10 yeni tanılı Crohn hastası olmak üzere toplamda 40 örnek çalışıldı.



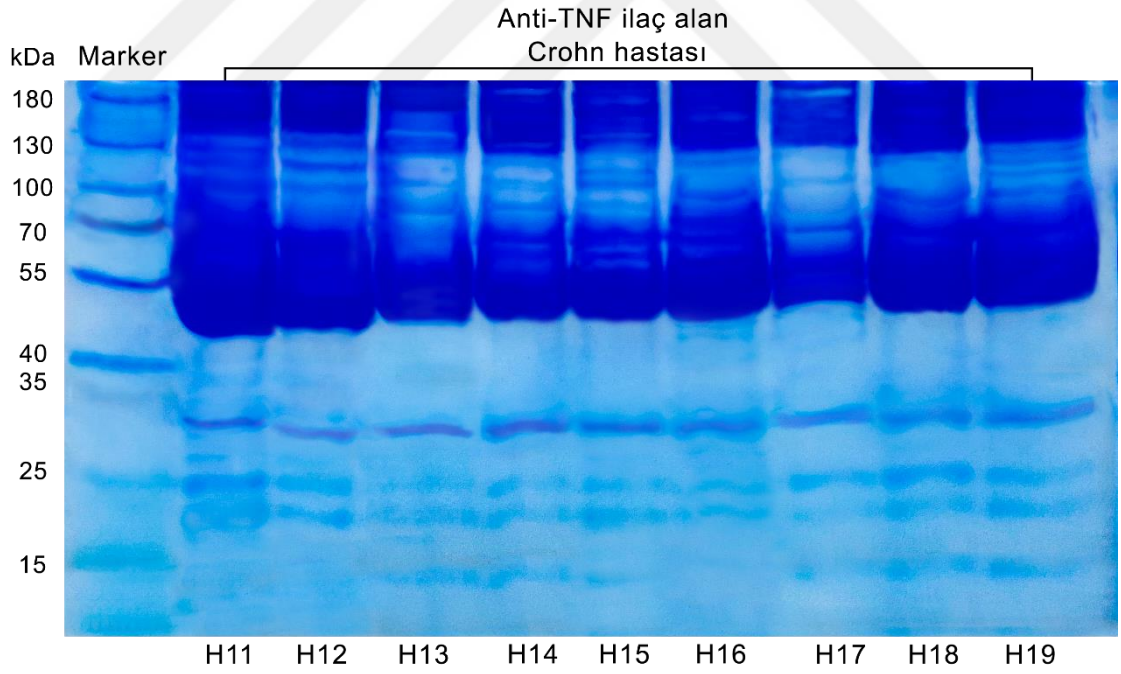
Şekil 4.14: Yeni tanılı Crohn hastaları, anti-TNF alan Crohn hastaları ve kontrolün plazma örneklerindeki proteinlerinin SDS elektroforezi ile karşılaştırılması



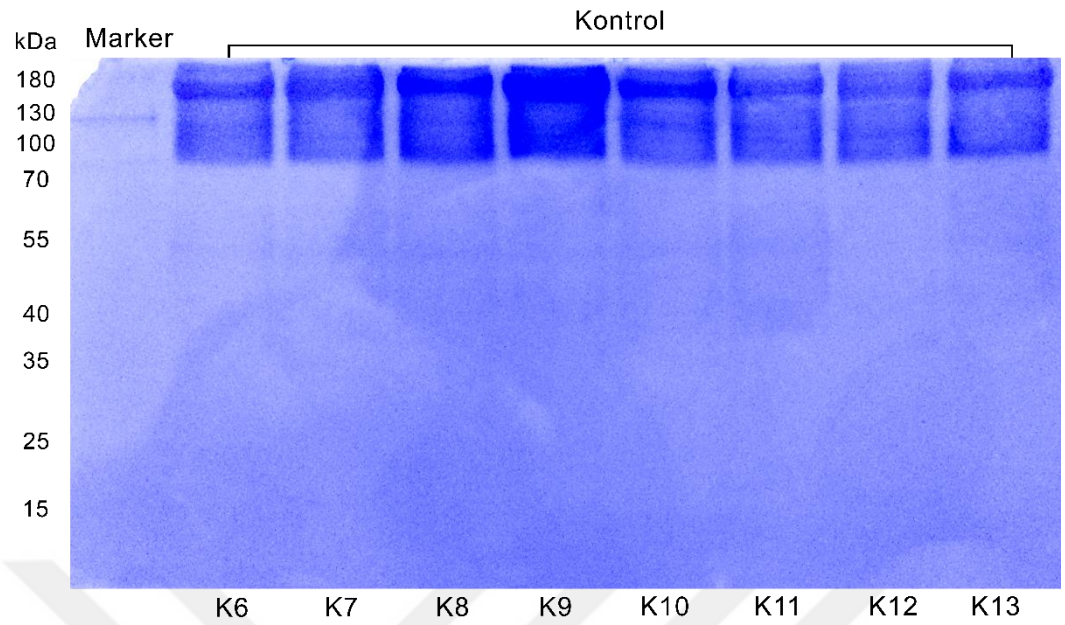
Şekil 4.15: Yeni tanılı Crohn hastaları, anti-TNF alan Crohn hastaları ve kontrollerin plazma örneklerindeki proteinlerinin SDS elektroforezi ile karşılaştırılması



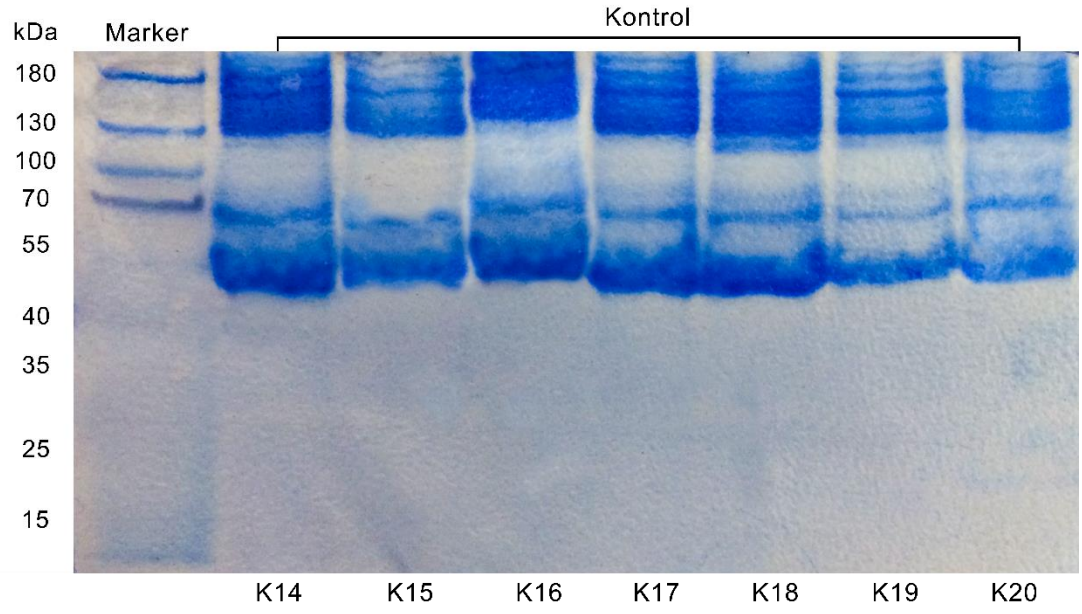
Şekil 4.16: Yeni tanılı Crohn hastaları, anti-TNF alan Crohn hastaları ve kontrollerin plazma örneklerindeki proteinlerinin SDS elektroforezi ile karşılaştırılması



Şekil 4.17: Anti-TNF alan Crohn hastalarının plazma örneklerindeki proteinlerinin SDS elektroforezi ile gösterilmesi



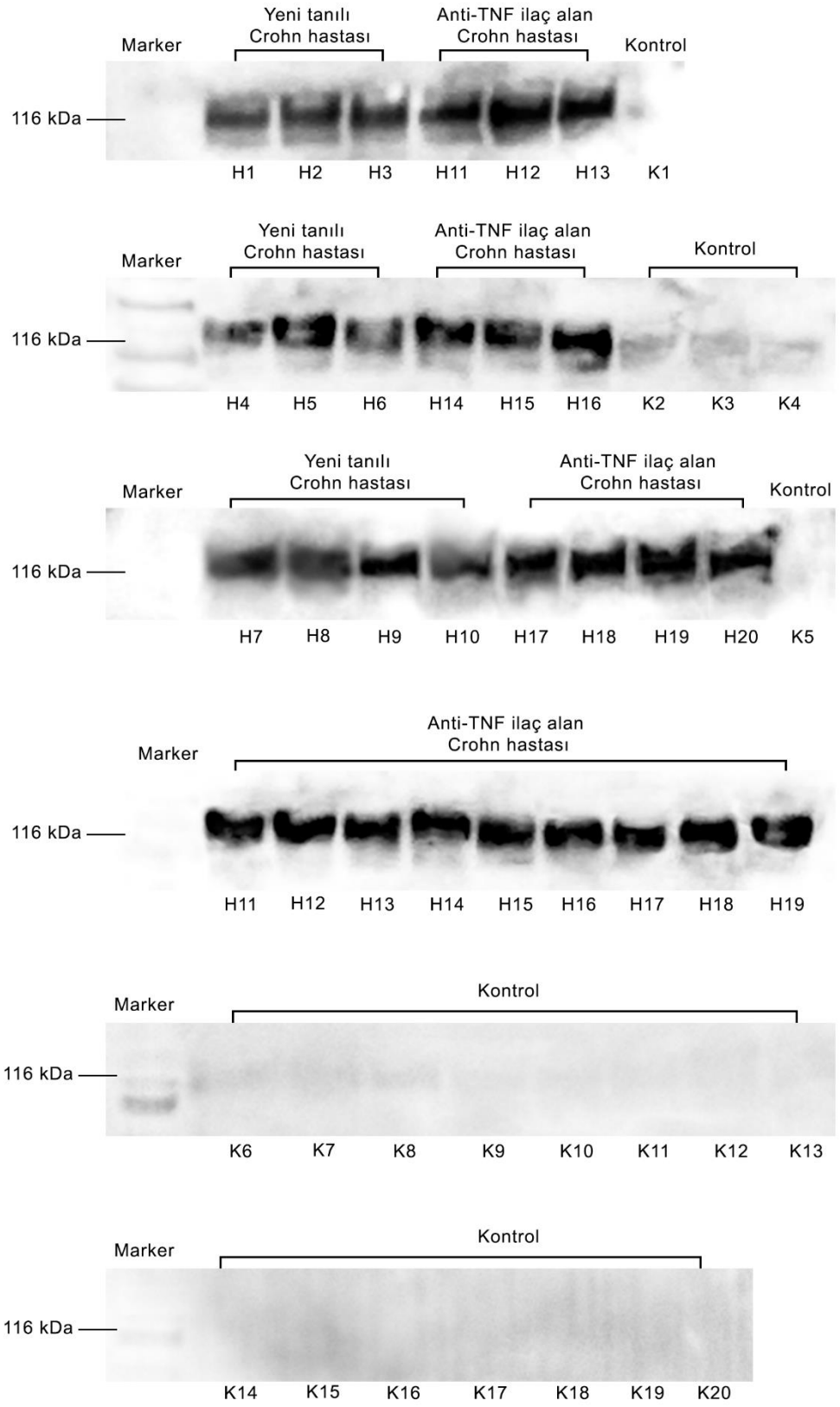
Şekil 4.18: Sağlıklı bireylerin plazma örneklerindeki proteinlerinin SDS elektroforezi ile karşılaştırılması



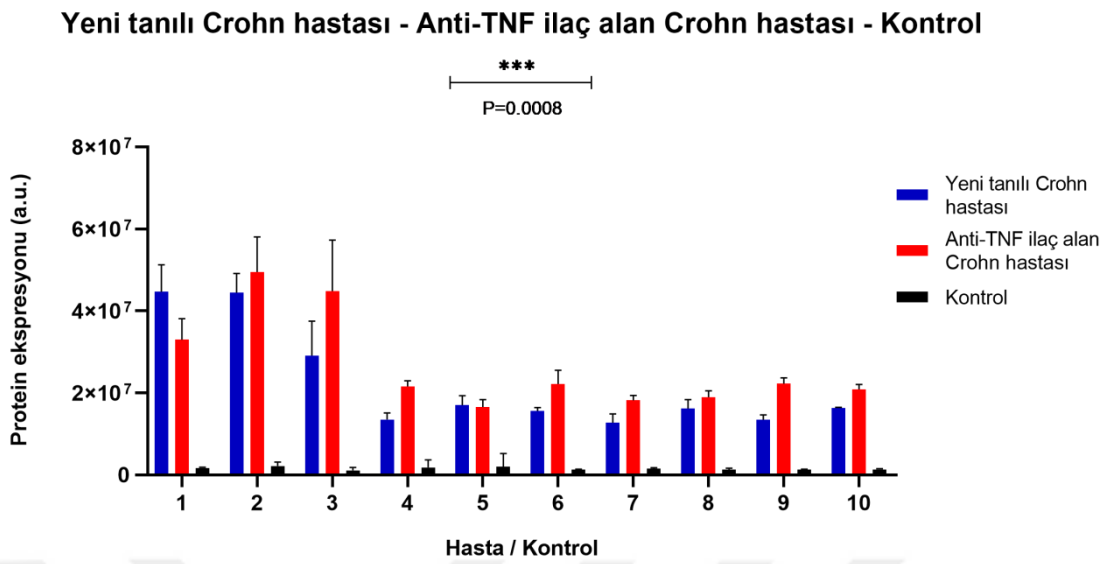
Şekil 4.19: Sağlıklı bireylerin plazma örneklerindeki proteinlerin SDS elektroforezi ile karşılaştırılması

4.6. NLRP3 PROTEİNİNİN WESTERN BLOT İLE GÖSTERİLMESİ

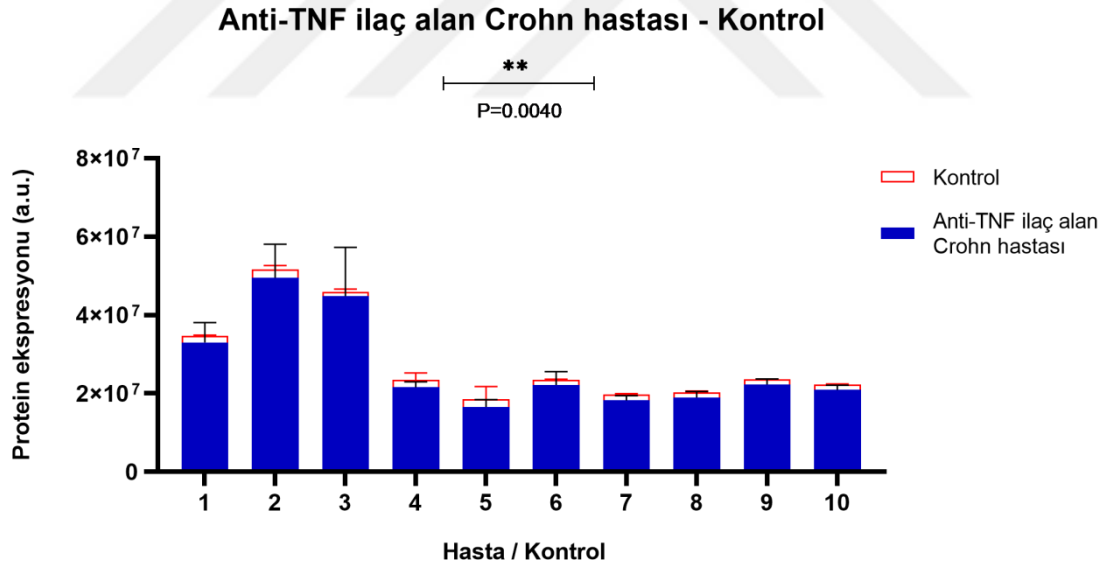
Şekil 4.20'de yeni tanılı Crohn hastaları , anti-TNF ilaç alan Crohn hastaları ve kontrol grubunda NLRP3 proteininin Western Blot görüntüsü; Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23 ve Şekil 4.24'de ise gruplar arasında NLRP3 proteininin anlamlılık oranı grafikle gösterildi. Şekil 4.25'de NLRP3 band yoğunluğu istatiği hesaplandı. Çalışmamızda istatiski olarak veriler değerlendirildiğinde, yeni tanılı Crohn hastalar ve anti-TNF ilaç alan hastalar karşılaştırıldığında p=0,0366 (Şekil 4.24), yeni tanılı Crohn hastalar ve kontrol grubu karşılaştırıldığında p=0,0035 (Şekil 4.23), anti-TNF ilaç alan Crohn hastaları ve anti-TNF ilaç alan grup karşılaştırıldığında p=0,040 (Şekil 4.22) olarak anlamlı bulundu.



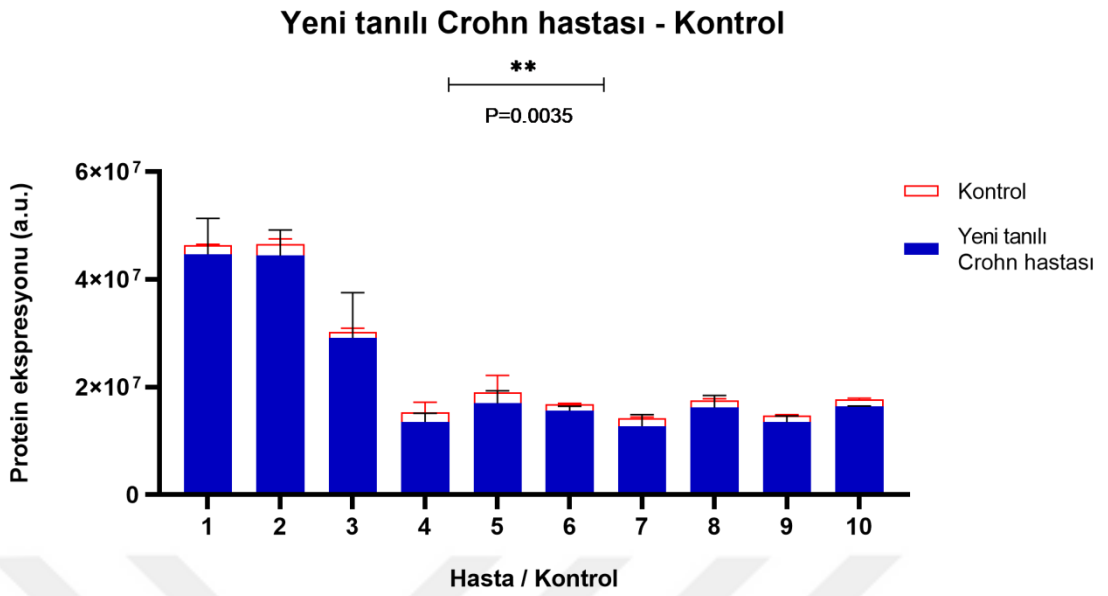
Şekil 4.20: Yeni tanılı Crohn hastaları, anti-TNF ilaç alan Crohn hastaları ve kontrol grubunda NLRP3 proteininin Western Blot yöntemi ile gösterilmesi



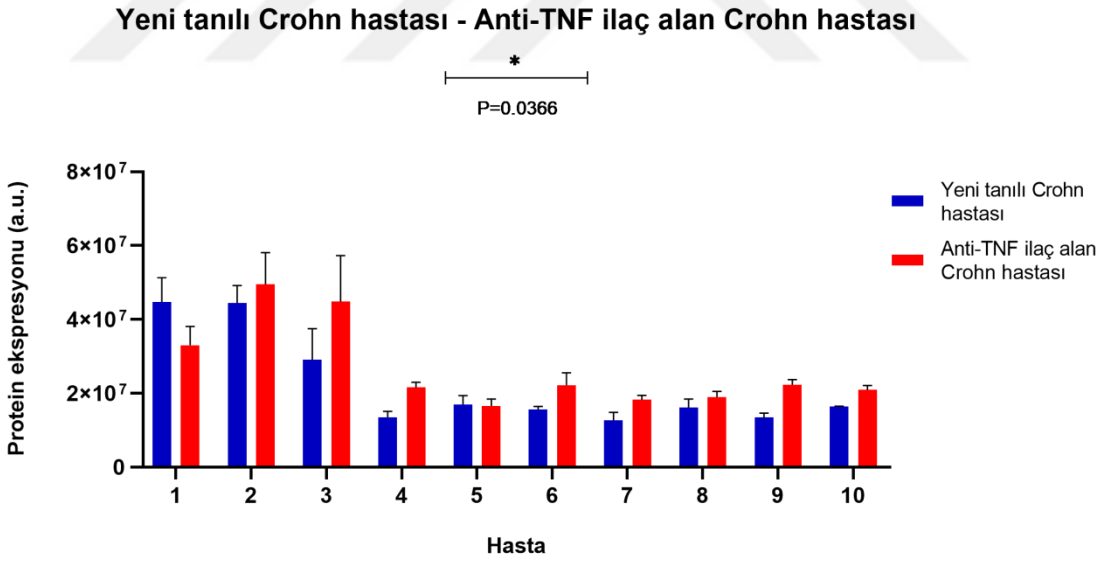
Şekil 4.21: Yeni tanılı Crohn hastaları, anti-TNF ilaç alan Crohn hastaları ve sağlıklı bireylerde NLRP3 ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması



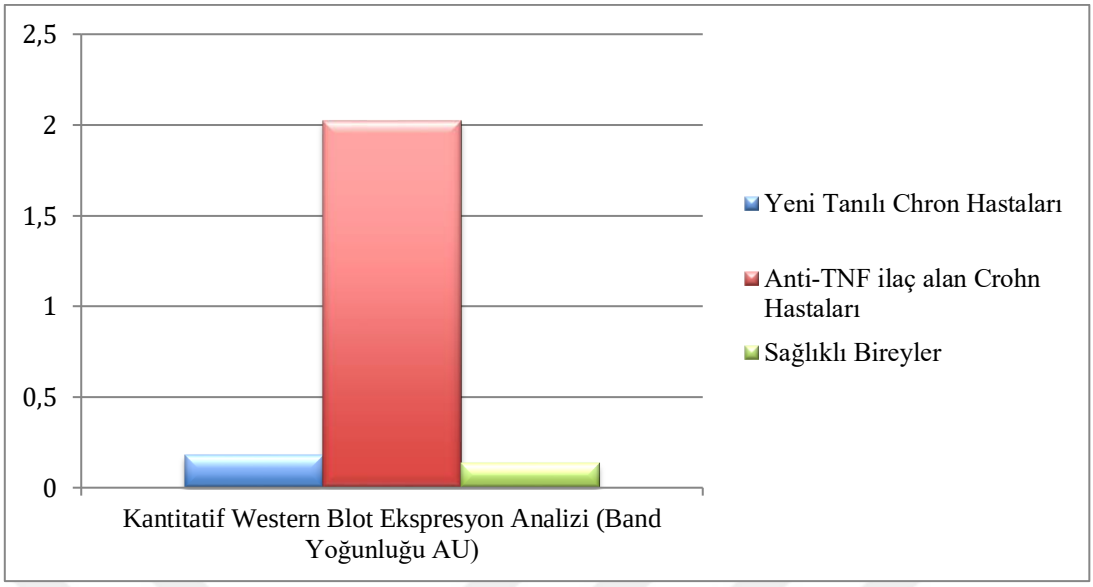
Şekil 4.22: Anti-TNF ilaç alan Crohn hastaları ve sağlıklı bireylerde NLRP3 ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması



Şekil 4.23: Yeni tanılı Crohn hastaları ve sağlıklı bireylerde NLRP3 ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması



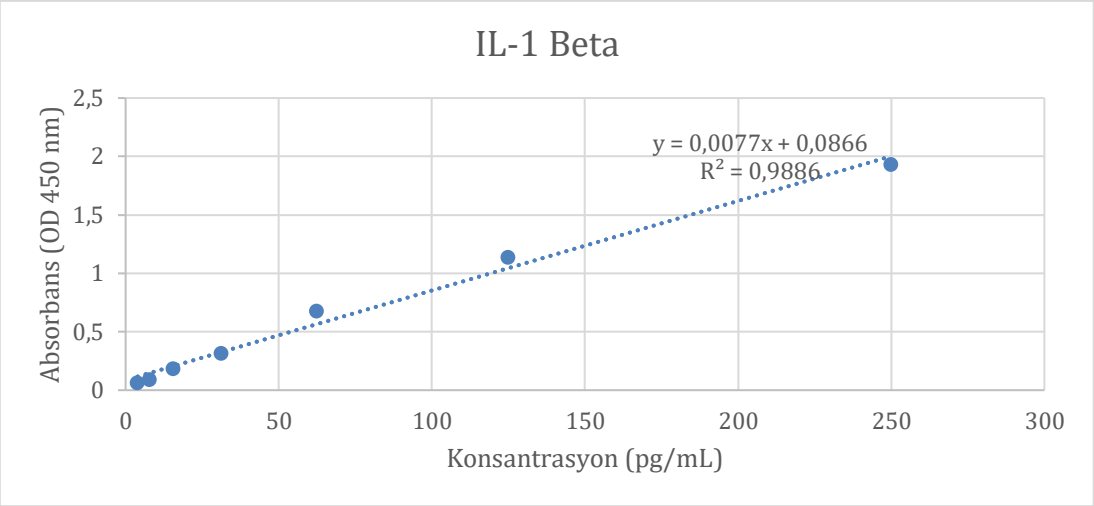
Şekil 4.24: Yeni tanılı Crohn hastaları, anti-TNF ilaç alan Crohn hastalarında NLRP3 ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması



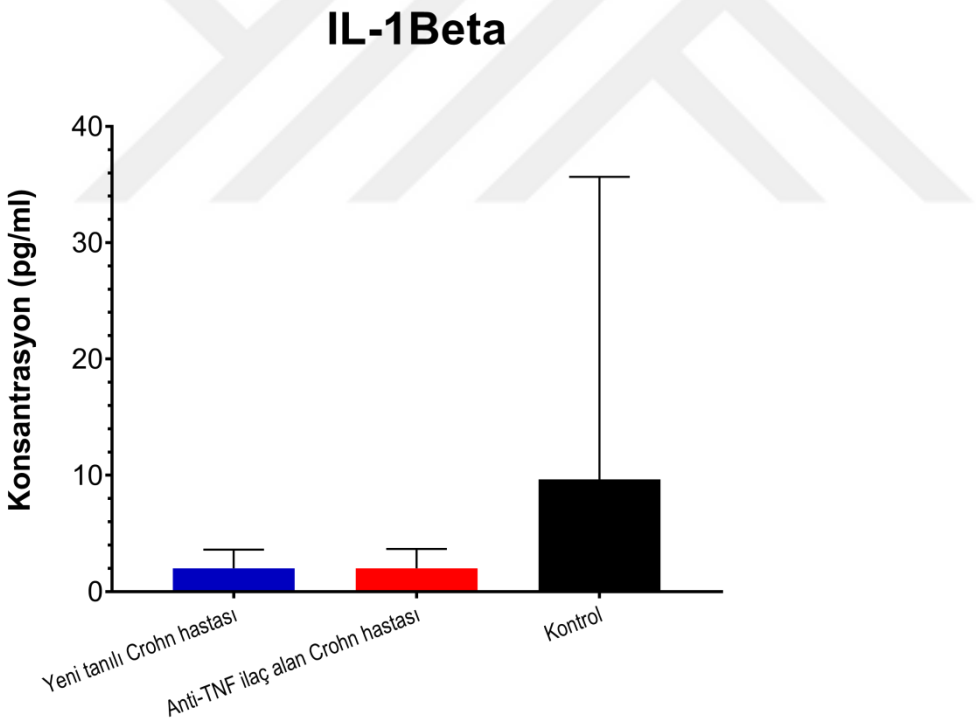
Şekil 4.25: Tespit edilen NLRP3 proteininin band yoğunluğunun hesaplanması

4.7. IL-1β SEVİYESİNİN TÜM ÖRNEKLERDE TESPİTİ

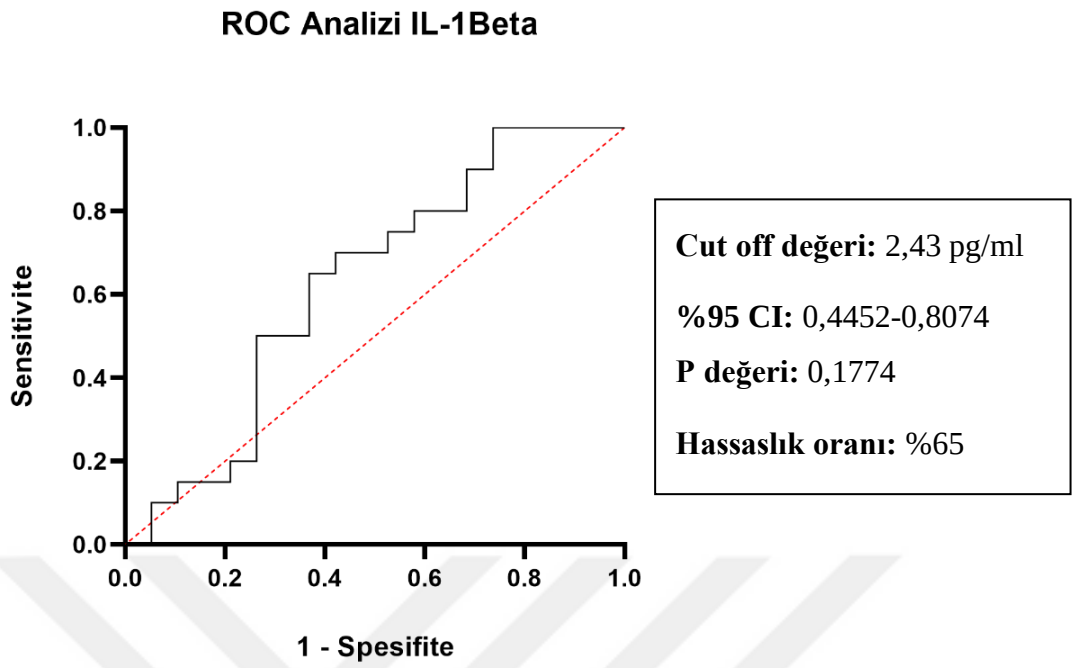
Tüm örneklerde IL-1β serum seviyesi ELISA yöntemi ile iki kez ölçüldü. Şekil 4.26'da IL-1β seviyesinin 450 nm'de ölçümü gösterildi ve IL-1β seviyesinin yeni tanı almış Crohn hastaları, anti-TNF ilaç alan Crohn hastaları ve sağlıklı bireylerde karşılaştırılması yapıldı ve grafik analizi ve anlamlılık oranı Şekil 4.27'de gösterildi. Şekil 4.28'de IL-1β seviyesinin ölçüm spesifite ve hassaslık grafik analizi olan ROC seviyesi gösterildi. Çalışmamızda yeni tanılı Crohn hastaları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, IL-1β seviyesi hastalarda daha düşük tespit edildi (p=0,0031). Anti-TNF ilaç alan Crohn hastaları ve kontrol grubu karşılaştırıldığında IL-1β seviyesi hastalarda daha düşük tespit edildi (p=0,0041). Yeni tanılı Crohn hastaları ile anti-TNF alan hastalar karşılaştırıldığında ise anti-TNF ilaç alan hastalarda IL-1β seviyesi daha yüksek gözlemlendi (p=0,6396).



Şekil 4.26: Tüm hasta ve kontrollerde IL-1β seviyesinin 450 nm'de ölçümü



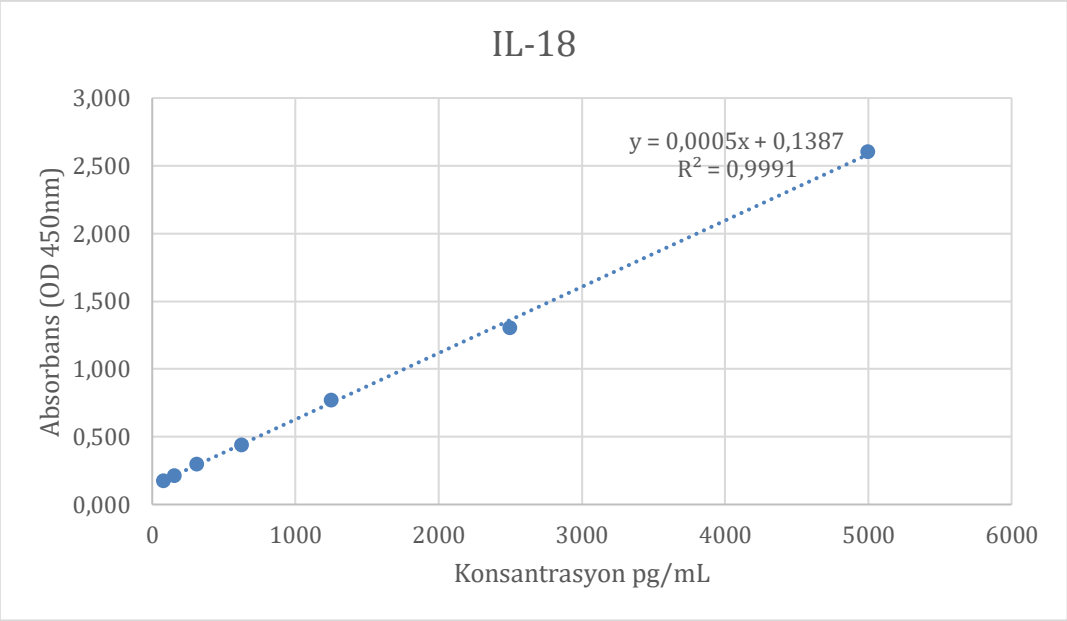
Şekil 4.27: IL-1β seviyesinin yeni tanı almış Crohn hastaları, anti-TNF alan Crohn hastaları ve sağlıklı bireylerde karşılaştırılması



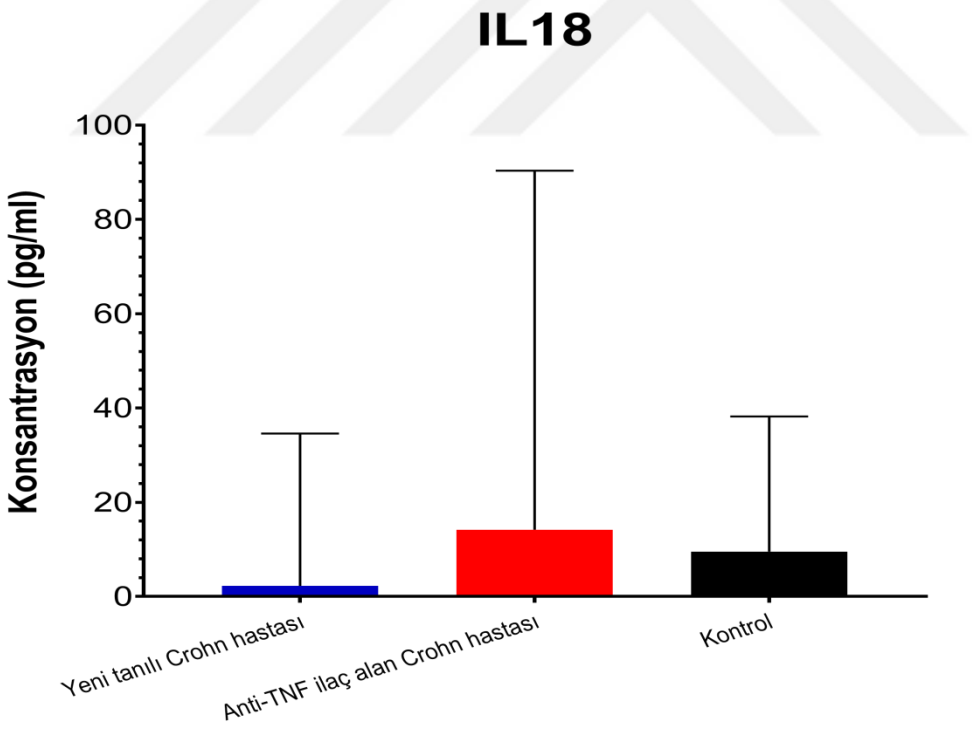
Şekil 4.28: IL-1β seviyesinin ölçüm spesifite ve hassaslık grafik analizi

4.8. IL-18 SEVİYESİNİN TÜM ÖRNEKLERDE TESPİTİ

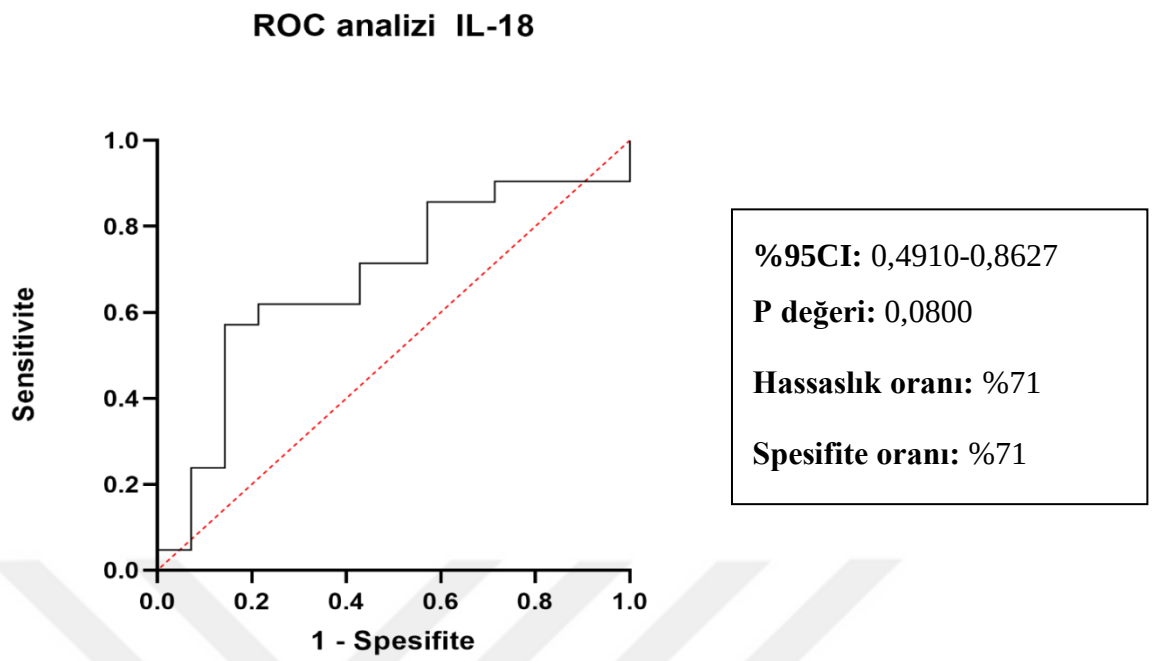
Tüm örneklerde IL-18 serum seviyesi ELISA yöntemi ile iki kez ölçüldü. Şekil 4.29'da IL-18 seviyesinin 450 nm'de ölçümü gösterildi ve IL-18 seviyesinin yeni tanı almış Crohn hastaları, anti-TNF alan Crohn hastaları ve sağlıklı bireylerde karşılaştırılması yapıldı ve grafik analizi ve anlamlılık oranı Şekil 4.30'da gösterildi. Şekil 4.31'de ise IL-18 seviyesinin ölçüm spesifite ve hassaslık grafik analizi olan ROC seviyesi gösterildi. Çalışmamızda yeni tanılı Crohn hastaları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, IL-18 seviyesi hastalarda p=0,8209 olarak hesaplandı. Anti-TNF alan Crohn hastaları ve kontrol grubu karşılaştırıldığında ise IL-18 seviyesi hastalarda daha yüksek (p=0,5699) olarak hesaplandı. Yeni tanılı Crohn hastaları ile anti-TNF ilaç alan hastalar karşılaştırıldığında ise anti-TNF ilaç alan hastalarda IL-18 seviyesi daha yüksek gözlemlendi (p=0,9902) olarak hesaplandı.



Şekil 4.29: Tüm hasta ve kontrollerde IL-18 seviyesinin 450 nm'de ölçümü



Şekil 4.30: IL-18 seviyesinin yeni tanı almış Crohn hastaları, anti-TNF alan Crohn hastaları ve sağlıklı bireylerde karşılaştırılması



Şekil 4.31: IL-18 seviyesinin ölçüm spesifite ve hassaslık grafik analizi

5. TARTIŞMA

İBH'nin küresel prevalansı 2000 yılından beri artış göstermiştir (1). İBH; Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 2 milyon, Avrupa'da 3 milyondan fazla kişiyi etkilemektedir (1). CH'nin nedeni hala belirsizdir, ancak genetik, immünolojik ve çevresel faktörlerin, hastalığın başlama ve ilerlemesine riskine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (2). CH'nin genetik yatkınlığının arka planınında, bağırsak mikrobiyomuna karşı düzensiz bir bağışıklık tepkisinin olduğu düşünülmektedir. Son 40 yılda değişen beslenme ve yaşam tarzı İBH insidansını arttırmıştır (3). Daha önce bulaşıcı olmadığı düşünülen *H. pylori* gibi çeşitli hastalıkların mikrobiyal bir bileşene sahip olduğu bulunmuştur (213,214,215). Son zamanda yapılan çalışmalar; mikroorganizmaların kolayca kültürlenemeyen formlarda da bulunabileceğine dair varsayımlar ortaya atmıştır ve yayımlanan birçok makale bu olasılıkları odak noktası haline getirmiştir. CH'nin oluşum mekanizmasını anlamak için literatürde birçok çalışma yapılmıştır (214). Bu tez çalışmasında, CH'nin oluşum mekanizmasına katkı sağlamak amacıyla CH'de kan karakterizasyonu ve inflamazom bileşenlerinin rolünü inceledik. Çalışmamıza yeni tanı almış Crohn hastalığına sahip bireyler, anti-TNF ilaç alan Crohn hastalığına sahip bireyler ve sağlıklı bireyler olmak üzere 40 gönüllü katıldı. Tüm bireylerin kan örneklerinden mikrobiyal DNA izolasyonu yapıldı. Daha sonra tüm DNA'lar V3-V4 bölgesine spesifik primerler kullanılarak PCR yöntemiyle çalışıldı (Şekil 4.1) ve tüm örnekler RT-PCR ile teyit edildi (Şekil 4.2). Daha sonra 16S rRNA yöntemiyle tüm örnekler dizilendi. 16S rRNA genlerinin yüksek oranda değişkenlik gösteren bölgeleri farklı derecelerde dizileme çeşitliliği gösterirken sadece bir bölgenin analizi bütün bakterileri ayırt edebilmek için yeterli olmadığı anlaşıldı. Genellikle V2, V3 ve V6 bölgeleri cins düzeyinde ayrım için yeterli olmakla birlikte; bazı durumlarda tür düzeyinde ayrımda da kullanılmaktadır. Bu sahalar yüksek oranda değişkenlik gösteren bölgeler oldukları için biyolojik çeşitliliğin sınıflandırılmasında ciddi bir potansiyeli barındırmaktadır (216). Çalışmamızda V3-V4 bölgesine ait Universal Eubacteriyal primerler kullanılarak dizileme yapıldı ve 116100 okuma verisi elde edildi. Bu verilerin %98'i çalışmada kullanıldı. %2'lik okuma kötü veri olduğu için elendi ve kalite skoru %37 olarak bulundu. Bu sayede hastalıkla ilişkili, bakteri türleri, bakteri türlerinin miktarlarının tayini ve genomik benzerlikler belirlendi. Hastaların kanında %39,79 Cynobacteria, %50,45 Proteobacteria, %6,95 Firmicutes, %2,14 Bacterioidetes

ve %0,43 Actinobacteria olmak üzere 5 filum bulundu (Şekil 4.3) ve %67 Bacillus muralis, %21 Staphylococcus sciuri, %16 Faecalibacterium prausnitzi, %16 Ruminococcus bromii, %11 Bacteroides uniformis, %8 Corynebacterium stationis, %6 Lactobacillus helveticus, %5 Lactococcus garvieae, %5 Bifidobacterium psedolongum, %0,61 Prevotella copri olmak üzere on tür bakteri tespit edildi (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5). Geçmişte yapılan genomik dizileme çalışmaları; oral ilişkili bakterilerin İBH ile ilişkili olabileceğini göstermiştir (217). Ağız hastalıklarının, özellikle periodontitisin düzensiz konakçı mikrobiyota etkileşimleri ile ilişkili olduğu bilinmektedir (218) ve periodontitli hastalarda oral bakterilerin sistemik hastalıklara katkıda bulunduğu ve birçok mekanizma ile etkileşebileceği gösterilmiştir (219). Çalışmamızda en büyük ve en çeşitli bakteri filumunu oluşturan proteobakterilerin, Crohn hastalığına sahip bireylerin kanında çok yüksek miktarda bulunduğunu tespit ettik. Proteobakterilerin; ekolojik ve patojenik öneme sahip olduğu bilinmektedir. Tüm proteobakteriler, lipopolisakkarit içeren bir dış zar ile gram negatiftir. Bu filumdaki bakteriler morfoloji, motilite ve metabolizmada önemli farklılıklar gösterdiğinden benzersizdir (220). Hasta grubunda tespit ettiğimiz proteobakterilerin %49,39'unun alphaproteobakteri sınıfına ait olduğu anlaşıldı (Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8). Proteobakteri filumunun çeşitli üyelerinin insan gastrointestinal hastalıklarındaki önemi çalışmalarda gösterilmiştir (121,220). Geçmiş çalışmalar; proteobakterilerin, metabolik sendrom, kardiyovasküler hastalıklar ve kronik akciğer hastalıkları dahil olmak üzere birçok kronik inflamatuar hastalıkta; hem bağırsakta hem de kanda daha yüksek oranda bulunduğu gösterilmiştir (221). Çalışmamızda Staphylococcus sciuri patojeninin yeni tanı almış Crohn hastaları ve anti-TNF ilaç alan Crohn hastalarında tespit edilmesi önemli bir bulgudur. Staphylococcus sciuri, koagülaz negatif, novobiyosine dirençli, oksidaz pozitif stafilokok türüdür ve esas olarak bir bakteri türü olarak kabul edilir. Staphylococcus sciuri genellikle birçok evcil hayvanın, çiftlik hayvanlarının ve vahşi hayvanların (222-225) deri ve mukozal yüzeylerinde ve hayvansal kaynaklı gıdalarda (226,227) bulunur. Staphyloccus sciuri'nin invaziv hastalığa neden olabilen fakültatif patojen olduğu gösterilmiş olmasına rağmen, bu bakterilerin olası virülans faktörleri literatürde çok fazla çalışılmamıştır (228-230). Buna ek olarak; bakteriyel endokardit (231), peritonit (232), idrar yolu enfeksiyonu (229), pelvik inflamatatuar hastalık (228), yara enfeksiyonları, septik şok (233) gibi çeşitli enfeksiyonlarla ilişkilendirildiğinden, insanlarda Staphyloccus sciuri' nin klinik önemi artmaktadır (234,235). Literatürde; kan örneğinde

bakteriyel mikrobiyomunun varlığı çeşitli bulaşıcı ve bulaşıcı olmayan hastalık durumları ile ilişkilendirilmiştir (215). CH mekanizması tam olarak anlaşılmamış bir inflamatuar bağırsak hastalığıdır ve CH hakkında öğrenilen her yeni bilgi hastalığın oluşum mekanizmasının bilinmesine katkıda bulunacaktır. Çalışmamıza katılan gönüllülerin bir günde tükettiği öğün sayısı, süt ve süt ürünleri tüketim sıklığı, et ürünleri tüketim sıklığı ve haşlanmış sebze tüketim sıklığı değerlendirildi. Yeni tanılı Crohn hastalarının, anti-TNF ilaç alan hastalara göre daha fazla süt ve süt ürünleri tükettiği ve en az süt ve süt ürünleri tüketen grubun kontrol grubu olduğu gözlemlendi (Şekil 4.9). Çalışmamızda en az haşlanmış sebze tüketen grubun yeni tanılı Crohn hastalarının olduğu (Şekil 4.10), en az et ürünleri tüketen grubun kontrol grubu (Şekil 4.11) olduğu gözlemlendi. Hastalarımız klinik bilgilerine göre değerlendirildiğinde kolesterol, WBC seviyesinin anti-TNF ilaç alan Crohn hastaları ve yeni tanılı Crohn hastalarında; kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 4.12 ve Şekil 4.13). Çalışmamızdaki yeni tanılı Crohn hastaları ve anti-TNF ilaç alan Crohn hastaları sigara kullanmayan, kontrol grubuna göre daha az öğün ile beslenen et ve süt ürünlerini kontrol grubuna göre fazla tüketen bireylerden oluşmaktaydı. Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler; *Staphyloccus sciuri*'nin et ve süt ürünleriyle ilişkisi olabileceğini düşündürdü. Literatürde; tüketime hazır etlerden izole edilen *Staphyloccus sciuri*'nin toksijenik potansiyel oluşturabileceğinden bahsedilmektedir (230) ve günümüzde yapılan çalışmalar kanın mikroplar için uygun bir büyüme ortamı sağlayabileceğini ve herhangi bir bakteriyeminin potansiyel olarak yaşamı tehdit edebileceğini göstermektedir (6). Sonuçlarımız değerlendirildiğinde, bakteri ve beslenme şeklinin CH'nin patogenezine katkıda bulunduğunu görmekteyiz.

NLRP3 inflamazomu, mikrobiyal enfeksiyon ve hücresel hasara yanıt olarak pro-kaspaz-1 aktivasyonuna ve proinflamatuar sitokinler olan IL-1β ve IL-18'in salgılanmasına aracılık eden doğal bağışıklık sisteminin kritik bir bileşenidir (86,90). NLRP3 inflamazomu, bakteri, mantar ve viral enfeksiyonlara karşı konak bağışıklık savunması için kritik öneme sahiptir (236). Kriyopirin ile ilişkili periyodik sendromlar, Alzheimer hastalığı, diyabet, gut, otoinflamatuar hastalıklar ve ateroskleroz dahil olmak üzere birçok inflamatuar bozukluğun patogenezi ile bağlantılıdır (236,237). NLRP3 inflamazomu, yaygın metabolik tehlike sinyalleri ile aktive olur, bunların arasında potasyumun dışa pompalanması ve artmış ekstrasellüler ATP yer alır. NLRP3 ayrıca ürik asit, asbest, silika ve aluminyum ile de aktive olur (236-239). Bu yüzden, NLRP3

inflamazomu son on yılda en çok araştırılan inflamazom olmuştur. NLRP3 uyaranlarının, çoklu sinyal ve hücresel olayları indüklediği ve NLRP3 inflamazomu aktivasyonunu tetiklediği gösterilmiştir (236,239). Önceki çalışmalar, NLRP3 inflamazomunun, romatoid artrit, ateroskleroz, gut ve ÜK gibi kronik inflamatuar hastalıklarda aşırı aktivasyonu gösterilmiştir (90). NLRP3 inflamazomu merkezi sinir sisteminin otoimmün inflamatuar demiyelinizan bir hastalığı olan multipl skleroz gelişiminde büyük önem taşımaktadır (90,240). Çalışmamızda Western Blot'tan elde ettiğimiz sonuçlara gore NLRP3 proteininin; tedavi alan Crohn hastaları ve yeni tanılı Crohn hastalarının ortak bir özelliği olarak plazmada artışı gözlendi. Sağlıklı bireylerde NLRP3 proteininin ekspresyonu hiç gözlemlenmedi (Şekil 4.20). Çalışmamızda; istatiski olarak veriler değerlendirildiğinde, yeni tanılı Crohn hastaları ve anti-TNF ilaç alan hastalar karşılaştırıldığında p=0,0366 (Şekil 4.21), yeni tanılı Crohn hastaları ve kontrol grubu karşılaştırıldığında p=0,0035 (Şekil 4.22), anti-TNF ilaç alan Crohn hastaları ve anti-TNF ilaç alan grup karşılaştırıldığında p=0,040 (Şekil 4.23) olarak anlamlı bulundu. Elde ettiğimiz sonuçlara gore; NLRP3 inflamazomunun, CH'yi teşhis etmeye ve hastalığın şiddetini değerlendirmeye yardımcı olan potansiyel bir biyobelirteç olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda yeni tanılı Crohn hastaları, anti-TNF alan Crohn hastaları ve sağlıklı bireylerde IL-1β ve IL-18 plazma seviyelerini değerlendirdik. Yeni tanılı Crohn hastaları ve anti-TNF ilaç alan Crohn hastalarında sağlıklı bireylere göre IL-1β seviyesi düşük, IL-18 seviyesi yüksek gözlemlendi. Çeşitli fizyolojik fonksiyonlara ve patolojik öneme sahip olduğu proinflamatuar bir sitokin olan IL-1β sağlık ve hastalıkta önemli bir rol oynar (241). IL-1β, ateş, ağrı eşiği, vazodilatasyon ve hipotansiyonu kontrol eden genlerin ekspresyonunu indükler (236). İnflamatuar duruma bağlı olarak, doğal bağışıklık hücreleri arasındaki Fas sinyallemesi, IL-1β ailesinin proinflamatuar sitokinlerinin ve aynı zamanda kemokinlerin üretilmesine ve aktifleştirilmesine aracılık edebilir (242,243). Fas sinyallemesinin doğal immün hücreler üzerindeki proinflamatuar etkisi, özellikle mikrobiyal olarak enfekte olmuş hücrelerde veya TLR ligandları (244) gibi sensörler tarafından indüklenmiş hücrelerde belirgindir. Proinflamatuar IL-1β sitokin ailesi transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel seviyelerde kontrol edilir, biyolojik olarak inaktif prekürsörler olarak üretilmektedirler ve proteolitik işlem sonrası aktif sitokindir. IL-1β sitokinleri, fonksiyon gösterebilmesi için çeşitli proteazlara ihtiyaç duyar (244). Bunlar arasında IL-1β sitokinlerini aktive ettiği bilinen en iyi

çalışılmış proteaz kaspaz-1'dir. Kaspaz-1 aktivitesi, inflamazomlar tarafından kontrol edilmektedir. Mikrobiyal yapılar veya endojen tehlike sinyallerini (245) tespit eden çoklu protein sinyalleme kompleksleri olan bu yapılar, inflamazomlar tarafından kontrol edilir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar Fas aracılı IL-1β aktivasyonundan bahsetmektedir. Fas aracılı IL-1β aktivasyonu kaspaz-1 bağımsızdır ve Fas'ın IL-1β aktivasyonunu nasıl indüklediği bilinmemektedir (246). Çalışmamızda yeni tanılı Crohn hastaları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, IL-1β seviyesi hastalarda daha düşük bulundu (p=0,0031). Anti-TNF ilaç alan Crohn hastaları ve kontrol grubu karşılaştırıldığında IL-1β seviyesi hastalarda daha düşük bulundu (p=0,0041). Yeni tanılı Crohn hastaları ile anti-TNF alan hastalar karşılaştırıldığında anti-TNF ilaç alan hastalarda IL-1β seviyesi daha yüksek gözlemlendi (p=0,6396) (Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.28). Elde ettiğimiz sonuç; IL-1β seviyesinin yeni tanılı Crohn hastalarında ve anti-TNF ilaç alan Crohn hastalarında bir sebepten baskılandığını ve başka mekanizmaların ya da aracıların IL-1β seviyesini etkileyebileceğini düşündürmektedir. Hücre tipi, türü, kaynağı, PAMP'ların ve DAMP'ların konsantrasyonu varyasyonu ortaya çıkaran faktörlerdir ve belki de bir salınma mekanizmasının diğerine baskınlığının sebebi olabilmektedir (247). Sıcaklık ve pH (247), redoks dengesi (248,249) ozmolaritenin (249) IL-1β sentezini etkilediği düşünülmektedir (250). IL-1β sentez mekanizmalarını etkileyen faktörlere bağlı olarak, bir hücre; hücre ölümüne teslim olmadan, düşük seviyede IL-1β salınımını indükleyebilir. Böylelikle daha fazla mekanizma devreye girer ve kullanılmak zorunda kalır (251). Son on yıldır yapılan çalışmalar; IL-1β hakkında keşfedilecek daha çok biyolojik ve fizyolojik mekanizmanın olduğunu ve IL-1β sentez mekanizmalarının daha ayrıntılı olarak çalışılması gerektiğini göstermektedir. Crohn hastalarında IL-1β sentezinin baskılanmasında başka mekanizmaların olduğu anlaşılmaktadır.

Yine proinflamatuar sitokinlerden olan IL-18 seviyesi, Crohn hastalarında kontrol grubu ile karşılaltırıldığında daha düşük (p=0,8209) ve anti-TNF alan Crohn hastaları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise daha yüksek (p=0,5699) gözlemlendi. Yeni tanılı Crohn hastaları ile anti-TNF ilaç alan hastaları karşılaştırıldığında ise anti-TNF ilaç alan hastalarda IL-18 seviyesi daha yüksek gözlemlendi (p=0,9902) (Şekil 4.28, Şekil 4.29 ve Şekil 4.30). IL-18; adezyon moleküllerindeki artışlar, nitrik oksit sentezi ve kemokin üretimi gibi diğer proinflamatuar sitokinlerin özelliklerini sergilemektedir (252). IL-18'in, makrofaj aktivasyon sendromunda gerçekleşen hepatik

hasarı hesaba katabilecek FASL'in indüksiyonudur. Crohn hastalığı gibi enflamatuar bağırsak hastalığı, karmaşık bir otoimmün hastalıktır (253,254). Crohn hastalığında tedavi başlangıçta immünosüpresif ilaçlarla yapılmaktadır. TNFα (255) veya IL-12/23'e gibi monoklonal antikorlar birçok hasta için etkili bir tedavi sağlamaktadır (256,257). IFNγ'nın Crohn hastalığında azalması, bu ajanların (257) klinik yanıtlarıyla bağlantılıdır. IL-18 seviyesi; Crohn hastalarının etkilenen bağırsak dokusunda yüksektir (258). Çalışmamızdan elde ettiğimiz verilere göre IL-18'in CH'nin aktivitesinde rol oynayabileceğini düşünmekteyiz. IL-18, pleiotropik ve immünöregülatör etkileriyle IL-1 süper ailesinin bir üyesi olarak kabul edilen bir proinflamatuar sitokindir. Sjögren Sendromu, Psoriatik Artrit ve tip II diyabet (259) gibi farklı enflamatuar hastalıklarda önemli bir rol oynamaktadır. 1989 yılında ilk kez IFN-γ üretiminin bir indükleyicisi olarak tanımlanmıştır. IL-12 ve IL-15 ile sinerji içinde, IL-1, IL-8, M-CSF, TNFα, IL-8, M-CSF, TNF-α ve IFN-γ olarak diğer sitokinlerin üretimini indüklemektedir (259,260). Edinsel immün tepkilerin düzenlenmesindeki rolünün yanı sıra, doğal immünitede rolü bulunmaktadır (259). IL-18 dendritik hücrelerden salgılanarak, doğal öldürücü hücrelerin aktivasyonunu sağlar ve IFN-γ üretimini indükler. Buna karşılık, doğal öldürücü hücreler, üretmiş oldukları IFN-γ ile dentritik hücrelerin olgunlaşmasını sağlamaktadır. Böylece, IL-18, adaptif ve doğal immün yanıtlar arasında kritik bir bağlantı sağlamaktadır (259,261). Ayrıca, IL-18, anjiyogenezi tetikleyebilmektedir (261,262) ve kemokinlerin üretimi, CD40 ve CD40L gibi moleküllerin ekspresyonunu da düzenleyebilmektedir (261).

İBH sebebiyle her yıl çok sayıda hasta polikliniğe başvurmaktadır ve polikliniğe başvuran hastalara gereğinden fazla tıbbi tetkik uygulanmaktadır. Tetkik sonucu verilen ilaçlar çoğu kez hastaya yeterli olmamaktır. Literatürdeki çalışmalarda Crohn hastalarının önemli bir kısmında klinik remisyon başarısına ulaşmak mümkün olmadığı için yaşam kalitesini olumsuz olarak etkilediği söyleyebilir. Projemizin literatüre katkısı; daha güçlü immünosupresif ve anti-inflamatuar ilaçların geliştirilmesine katkı sunmak, potansiyel ve sektörel uygulama alanlarına geçişe olanak sağlamaktır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler hastaların yaşam kalitesine katkıda bulunarak, dünya düzeyinde önemli bir sağlık sorununa getirilecek çözümlere destek olacaktır. Son yıllarda bilim ve teknolojideki ilerlemelerle birlikte tedavi seçenekleri de artmıştır. Çalışmamız; etkin Crohn hastalığının tedavisinde yeniliklere katkı sağlamanın yanı sıra hastaların yaşam kalitesini de yükseltmenin önemli bir tedavi amacı olduğunu belirtmiştir. NLRP3'ün hastalığın teşhisi için biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

KAYNAKLAR

1. Fakhoury, M., Negrulj, R., Mooranian, A., Al-Salami, H. (2014). Inflammatory bowel disease:clinical aspects and treatments. *J Inflamm Res*, 23;7:113-20. doi:10.2147/JIR.S65979.
2. Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J.-F., Peyrin-Biroulet, L. (2017). Crohn's disease. *Lancet*, 389, 1741–1755
3. Ng, S.C., Shi, H.Y., Hamidi, N., Underwood, F.E., Tang, W., Benchimol, E.I.,ve ark. (2017). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet*, 390;10114:2769-2778
4. Thia, K.T., Sandborn, W.J., Harmsen, W.S., Zinsmeister, A.R., Loftus, E.V. (2010). Risk factors associated with progression to intestinal complications of Crohn's disease in a population-based cohort. *Gastroenterology*, 139, 1147–1155.
5. Fiorino, G., Bonifacio, C., Peyrin-Biroulet, L., Danese, S. (2016). Preventing collateral damage in Crohn's disease: the Lémann index. *J. Crohns Colitis*, 10, 495–500.
6. Zeng, Z., Zhu, Z., Yang, Y., Ruan, W., Peng, X., Su, Y., ve ark. (2013). Incidence and clinical characteristics of inflammatory bowel disease in a developed region of Guangdong Province, China: a prospective population-based study. *J Gastroenterol Hepatol*, 28(7):1148-53. doi: 10.1111/jgh.12164.
7. Zhao, J., Ng, S.C., Lei, Y., Yi, F., Li, J., Yu, L., ve ark. (2013). First prospective, population-based inflammatory bowel disease incidence study in mainland of China: the emergence of "western" disease. *Inflamm Bowel Dis*, 19(9):1839-45. doi: 10.1097/MIB.0b013e31828a6551.
8. Ng, S.C., Tang, W., Ching, J.Y., Wong, M., Chow, C.M., Hui, A.J., ve ark.; Asia–Pacific Crohn's and Colitis Epidemiologic Study (ACCESS) Study Group. (2013). Incidence and phenotype of inflammatory bowel disease based on results from the Asia-pacific Crohn's and colitis epidemiology study. *Gastroenterolog*, 145(1):158-165.e2. doi: 10.1053/j.gastro.2013.04.007.
9. Kim, H.J., Hann, H.J., Hong, S.N., Kim, K.H., Ahn, I.M., Song, J.Y., ve ark. (2015). Incidence and natural course of inflammatory bowel disease in Korea, 2006-2012: a nationwide population-based study. *Inflamm Bowel Dis*, 21(3):623-30. doi: 10.1097/MIB.0000000000000313.
10. Park, S.H., Kim, Y.J., Rhee, K.H., Kim, Y.H., Hong, S.N., Kim, K.H., ve ark.; Songpa-Kangdong Inflammatory Bowel Disease [SK-IBD] Study Group. (2019). A 30-year Trend Analysis in the Epidemiology of Inflammatory Bowel Disease in the Songpa-Kangdong District of Seoul, Korea in 1986-2015. *J Crohns Colitis*, 28;13(11):1410-1417. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjz081.
11. Ananthakrishnan, A.N., Bernstein, C.N., Iliopoulos, D., Macpherson, A., Neurath, M.F., Ali, R.A.R., ve ark. (2018). Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 15(1):39-49. doi: 10.1038/nrgastro.2017.136.
12. Bernstein, C.N., Hitchon, C.A., Walld, R., Bolton, J.M., Sareen, J., Walker, J.R., ve ark.; CIHR Team in Defining the Burden and Managing the Effects of Psychiatric Comorbidity in Chronic Immunoinflammatory Disease. (2019). Increased Burden of Psychiatric Disorders in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*, 25(2):360-368. doi: 10.1093/ibd/izy235.
13. Kaplan, G.G., Ng, S.C. (2016). Globalisation of inflammatory bowel disease: perspectives from the evolution of inflammatory bowel disease in the UK and China. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 1(4):307-316. doi: 10.1016/S2468-1253(16)30077-2.
14. Ng, S.C., Bernstein, C.N., Vatn, M.H., Lakatos, P.L., Loftus, E.V. Jr, Tysk, C., ve ark.; Epidemiology and Natural History Task Force of the International Organization of Inflammatory Bowel Disease (IOIBD). (2013). Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease. *Gut*, 62(4):630-49. doi: 10.1136/gutjnl-2012-303661.
15. Yen, H.H., Weng, M.T., Tung, C.C., Wang, Y.T., Chang, Y.T., Chang, C.H., ve ark. (2019). Epidemiological trend in inflammatory bowel disease in Taiwan from 2001 to 2015: a nationwide populationbased study. *Intest Res*, 17(1):54-62. doi: 10.5217/ir.2018.00096.
16. Linares de la Cal, J. A., Cantón, C., Hermida, C., Pérez-Miranda, M., Maté-Jiménez, J. (1999). Estimated incidence of inflammatory bowel disease in Argentina and Panama (1987–1993). *Rev Esp Enferm Dig*, 91, 277–286
17. Roda, G., Chien Ng, S., Kotze, P.G., Argollo, M., Panaccione, R., Spinelli A., ve ark. (2020). Crohn's disease. *Nat Rev Dis Primers*, 6, 22. doi:10.1038/s41572-020-0156-2
18. Piovani, D., Danese, S., Peyrin-Biroulet, L., Nikolopoulos, G.K., Lytras, T., Bonovas, S. (2019). Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: An Umbrella Review of Meta-analyses. *Gastroenterology*, 157(3):647-659.e4. doi: 10.1053/j.gastro.2019.04.016.

19. Lakatos, P.L., Vegh, Z., Lovasz, B.D., David, G., Pandur, T., Erdelyi, Z., ve ark. (2013). Is current smoking still an important environmental factor in inflammatory bowel diseases? Results from a population-based incident cohort. *Inflamm Bowel Dis,* 19(5):1010-7. doi: 10.1097/MIB.0b013e3182802b3e.
20. Kondo, K., Ohfuji, S., Watanabe, K., Yamagami, H., Fukushima, W., Ito, K., ve ark.; Japanese Case-Control Study Group for Crohn's disease. (2019). The association between environmental factors and the development of Crohn's disease with focusing on passive smoking: A multicenter case-control study in Japan. *PLoS One,* 14(6):e0216429. doi: 10.1371/journal.pone.0216429.
21. Ng, S.C., Tang, W., Leong, R.W., Chen, M., Ko, Y., Studd, C., ve ark.; Asia-Pacific Crohn's and Colitis Epidemiology Study ACCESS Group. (2015). Environmental risk factors in inflammatory bowel disease: a population-based case-control study in Asia-Pacific. *Gut,* 64(7):1063-71. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307410.
22. Levine, A., Sigall Boneh, R., Wine, E. (2018). Evolving role of diet in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Gut,* 67, 1726–1738.
23. Khalili, H., Håkansson, N., Chan, S.S., Chen, Y., Lochhead, P., Ludvigsson, J.F. ve ark. (2020). Adherence to a Mediterranean diet is associated with a lower risk of later-onset Crohn's disease: results from two large prospective cohort studies. *Gut,* 69(9):1637-1644. doi: 10.1136/gutjnl-2019-319505.
24. Ortizo, R., Lee, S.Y., Nguyen, E.T., Jamal, M.M., Bechtold, M.M., Nguyen, D.L. (2017). Exposure to oral contraceptives increases the risk for development of inflammatory bowel disease: a meta-analysis of case-controlled and cohort studies. *Eur J Gastroenterol Hepatol,* 29(9):1064-1070. doi: 10.1097/MEG.0000000000000915.
25. Ananthakrishnan, A.N., Higuchi, L.M., Huang, E.S., Khalili, H., Richter, J.M., Fuchs, C.S., Chan, A.T. (2012). Aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drug use, and risk for Crohn disease and ulcerative colitis: a cohort study. *Ann Intern Med,* 156(5):350-9. doi: 10.7326/0003-4819-156-5-201203060-00007.
26. Moninuola, O. O., Milligan, W., Lochhead, P., Khalili, H. (2018). Systematic review with meta-analysis: association between acetaminophen and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and risk of Crohn's disease and ulcerative colitis exacerbation. *Aliment Pharmacol Ther,* 47, 1428–1439
27. Ungaro, R., Chang, H.L., Côté-Daigneault, J., Mehandru, S., Atreja, A., Colombel, J.F. (2016). Statins Associated With Decreased Risk of New Onset Inflammatory Bowel Disease. *Am J Gastroenterol*, 111(10):1416-1423. doi: 10.1038/ajg.2016.233.Erratum in: Am J Gastroenterol. 2016 Sep;111(9):1370.
28. Halfvarson, J., Bodin, L., Tysk, C., Lindberg, E., Järnerot, G. (2003). Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology,* 124, 1767–1773.
29. Huang, H., Fang, M., Jostins, L., Umićević Mirkov, M., Boucher, G., Anderson, C.A., ve ark. (2017). Fine-mapping inflammatory bowel disease loci to single-variant resolution. *Nature,* 547(7662):173-178. doi: 10.1038/nature22969.
30. Ellinghaus, D., Jostins, L., Spain, S.L., Cortes, A., Bethune, J., Han, B., ve ark.; International IBD Genetics Consortium (IIBDGC); International Genetics of Ankylosing Spondylitis Consortium (IGAS); International PSC Study Group (IPSCSG); Genetic Analysis of Psoriasis Consortium (GAPC); Psoriasis Association Genetics Extension (PAGE), Schreiber, S., Mrowietz, U., Juran, B.D., Lazaridis, K.N., Brunak, S., Dale, A.M., ve ark. (2016). Analysis of five chronic inflammatory diseases identifies 27 new associations and highlights disease-specific patterns at shared loci. *Nat Genet,* 48(5):510-8. doi: 10.1038/ng.3528.
31. Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R.K., Duerr, R.H., McGovern, D.P., Hui, K.Y., ve ark. (2012). Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature,* 491(7422):119-24. doi: 10.1038/nature11582.
32. Sidiq, T., Yoshihama, S., Downs, I., Kobayashi, K. S. (2016). Nod2: a critical regulator of ileal microbiota and Crohn's disease. *Front Immuno,* 7, 367
33. Hampe, J., Franke, A., Rosenstiel, P., Till, A., Teuber, M., Huse, K., ve ark. (2007). A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet,* 39(2):207-11. doi: 10.1038/ng1954.
34. Liu, J.Z., van Sommeren, S., Huang, H., Ng, S.C., Alberts, R., Takahashi, A., ve ark.; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium; International IBD Genetics Consortium, Barrett, J.C., Alizadeh, B.Z., Parkes, M., Bk, T., Daly, M.J., Kubo, M., ve ark. (2015). Association analyses identify

38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat Genet*, 47(9):979-986. doi: 10.1038/ng.3359.
35. Hong, M.,, Ye. B.D., Yang, S.K., Jung, S., Lee, H.S., Kim, B.M., ve ark. (2018). Immunochip Meta-Analysis of Inflammatory Bowel Disease Identifies Three Novel Loci and Four Novel Associations in Previously Reported Loci. *J Crohns Colitis*, 12(6):730-741. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjy002.
36. Matricon, J., Meleine, M., Gelot, A., Piche, T., Dapoigny, M., Muller, E., Ardid, D. (2012). Review article: Associations between immune activation, intestinal permeability and the irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther*, 36(11-12):1009-31. doi: 10.1111/apt.12080.
37. Saha, L. (2014). Irritable bowel syndrome: pathogenesis, diagnosis, treatment, and evidence-based medicine. *World journal of gastroenterology*, vol.20,22;6759-73. doi:10.3748/wjg.v20.i22.6759.
38. Spiller, R., Garsed, K. (2009). Postinfectious irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 136:1979–1988.
39. Belmonte, L., Beutheu Youmba, S., Bertiaux-Vandaële, N., Antonietti, M., Lecleire, S., Zalar, A., ve ark. (2012). Role of toll like receptors in irritable bowel syndrome: differential mucosal immune activation according to the disease subtype. *PLoS One*, 7:e42777.
40. Ishihara, S., Tada, Y., Fukuba, N., Oka, A., Kusunoki, R., Mishima, Y., ve ark. (2013). Pathogenesis of irritable bowel syndrome--review regarding associated infection and immune activation. *Digestion*, 87:204–211.
41. Drossman, D.A., Camilleri, M., Mayer, E.A., Whitehead, W.E. (2002). AGA technical review on irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 123:2108–2131.
42. Talley, N.J., Spiller, R. (2002). Irritable bowel syndrome: a little understood organic bowel disease? *Lancet*, 360:555–564.
43. Spiegel, B.M. (2011). Questioning the bacterial overgrowth hypothesis of irritable bowel syndrome: an epidemiologic and evolutionary perspective. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 9:461–49; quiz e59.
44. Wilks, S. (1859). Morbid appearances in the intestine of Miss Bankes. *London Med Times Gazette*, 2:264.
45. Loftus, E.V. Jr, Silverstein, M.D., Sandborn, W.J., Tremaine, W.J., Harmsen, W.S., Zinsmeister, A.R. (1998). Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence, and survival. *Gastroenterology*, 114(6):1161- 1168.
46. Dahlhamer, J.M., Zammitti, E.P., Ward, B.W., Wheaton, A.G, Croft, J.B. (2016). Prevalence of inflammatory bowel disease among adults aged 18 yearsdUnited States, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 65(42):1166-1169.
47. Molodecky, N.A., Soon, I.S., Rabi, D.M., Ghali, W.A., Ferris, M., Chernoff, G., ve ark. (2012). Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*, 142(1):46-54.e42; quiz e30. doi: 10.1053/j.gastro.2011.10.001.
48. Cheifetz, A.S. (2013). Management of active Crohn disease. *JAMA*, 309(20):2150-2158.
49. Danese, S., Fiocchi, C. (2011). Ulcerative colitis. *N Engl J Med*, 365(18):1713-1725.
50. Franke, A., McGovern Dermot, P.B., Barrett, J.C., Wang, K., Radford-Smith, G.L,, ve ark. (2010). Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet*, 42:1118–25.
51. Adams, A.T., Kennedy, N.A., Hansen, R., Ventham, N.T., O'Leary, K.R., Drummond, H.E., ve ark. (2014). Two-stage genome-wide methylation profiling in childhood-onset Crohn's Disease implicates epigenetic alterations at the VMP1/MIR21 and HLA loci. *Inflamm Bowel Dis*, 20:1784–93.
52. Nimmo, E.R., Stevens, C., Phillips, A.M., Smith, A., Drummond, H.E., Noble, C.L., ve ark. (2011). TLE1 modifies the effects of NOD2 in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gastroenterology*, 141:972–981.
53. Ventham, N.T., Kennedy, N.A., Nimmo, E.R., Satsangi, J. (2013). Beyond gene discovery in inflammatory bowel disease: the emerging role of epigenetics. *Gastroenterology*, 145:293–308.
54. Boyapati, R., Satsangi, J., & Ho, G. T. (2015). Pathogenesis of Crohn's disease. F1000prime reports, 7, 44. https://doi.org/10.12703/P7-44
55. Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., ve ark. (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411:603–6.
56. Cuthbert, A.P., Fisher, S.A., Mirza, M.M., King, K., Hampe, J., Croucher Peter, J.P., ve ark. (2002). The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 122:867–74.
57. Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., ve ark. (2003). Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem*, 278:5509–12.

58. Kobayashi, K.S., Chamaillard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nuñez, G., Flavell, R.A. (2005). Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science*, 307:731–4.
59. Ogura, Y., Lala, S., Xin, W., Smith, E., Dowds, T.A., Chen, F.F., ve ark. (2003). Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut*, 52:1591–7.
60. Jiang, W., Wang, X., Zeng, B., Liu, L., Tardivel, A., Wei, H., ve ark. (2013). Recognition of gut microbiota by NOD2 is essential for the homeostasis of intestinal intraepithelial lymphocytes. *J Exp Med*, 210:2465–76.
61. Bevins, C.L., Stange, E.F., Wehkamp, J. (2009). Decreased Paneth cell defensin expression in ileal Crohn's disease is independent of inflammation, but linked to the NOD2 1007fs genotype. *Gut*, 58:882–3. discussion 883-4
62. Cooney, R., Baker, J., Brain, O., Danis, B., Pichulik, T., Allan, P., ve ark. (2010). NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med*, 16:90–7. doi: 10.1038/nm.2069.
63. Lapaquette, P., Bringer, M., Darfeuille-Michaud, A., ve ark. (2012). Defects in autophagy favour adherent-invasive Escherichia coli persistence within macrophages leading to increased pro-inflammatory response. *Cell Microbiol*, 14:791–807.
64. van Heel, D.A., Ghosh, S., Hunt, K.A., Mathew, C.G., Forbes, A., Jewell, D.P., Playford, R.J. (2005). Synergy between TLR9 and NOD2 innate immune responses is lost in genetic Crohn's disease. *Gut*, 54:1553–7.
65. Brain, O., Owens Benjamin, M.J., Pichulik, T., Allan, P., Khatamzas, E., ve ark.(2013). The intracellular sensor NOD2 induces microRNA-29 expression in human dendritic cells to limit IL-23 release. *Immunity*, 39:521–36.
66. Molodecky, N.A., Soon, I.S., Rabi, D.M., Ghali, W.A., Ferris, M, Chernoff, G., ve ark. (2012). Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*, 142:46–54.
67. Abraham, C., Cho, J.H. (2009). Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*, 361:2066–78. doi: 10.1056/NEJMra0804647.
68. Strober, W., Asano, N., Fuss, I., Kitani, A., Watanabe, T. (2014). Cellular and molecular mechanisms underlying NOD2 risk-associated polymorphisms in Crohn's disease. *Immunol Rev*, 260:249–60.
69. Uehara, A., Yang, S., Fujimoto, Y., Fukase, K., Kusumoto, S., Shibata, K., ve ark. (2005). Muramyldipeptide and diaminopimelic acid-containing desmuramylpeptides in combination with chemically synthesized Toll-like receptor agonists synergistically induced production of interleukin-8 in a NOD2- and NOD1-dependent manner, respectively, in human monocytic cells in culture. *Cell Microbiol*, 7:53–61.
70. van Heel David, A., Ghosh, S., Butler, M., Hunt, K.A., Lundberg Anna, M.C., Ahmad, T., ve ark. (2005). Muramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity in NOD2-associated Crohn's disease. *Lancet*, 365:1794–6.
71. van Beelen Astrid, J., Zelinkova, Z., Taanman-Kueter, E.W., Muller, F.J., Hommes, D.W., Zaat Sebastian, A.J., ve ark. (2007). Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity*, 27:660–9.
72. Watanabe, T., Kitani, A., Murray, P.J., Wakatsuki, Y., Fuss, I.J., Strober, W. (2006). Nucleotide binding oligomerization domain 2 deficiency leads to dysregulated TLR2 signaling and induction of antigen-specific colitis. *Immunity*, 25:473–85.
73. Hedl, M., Li, J., Cho, J.H., Abraham, C. (2007). Chronic stimulation of Nod2 mediates tolerance to bacterial products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104:19440–5.
74. Hedl, M., Abraham, C. (2011). Secretory mediators regulate Nod2-induced tolerance in human macrophages. *Gastroenterology*, 140:231–41.
75. Wehkamp, J., Salzman, N.H., Porter, E., Nuding, S., Weichenthal, M., Petras, R.E.,ve ark. (2005). Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102:18129–34
76. VanDussen, K.L., Liu, T., Li, D., Towfic, F., Modiano, N., Winter R, Haritunians T, Taylor KD, Dhall D, Targan SR, Xavier RJ, McGovern Dermot, P.B., ve ark. (2014). Genetic variants synthesize to produce paneth cell phenotypes that define subtypes of Crohn's disease. *Gastroenterology*, 146:200–9.
77. Simms, L.A., Doecke, J.D., Walsh, M.D., Huang, N., Fowler, E.V., Radford-Smith, G.L. (2008). Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut*, 57:903–10.
78. Lala, S., Ogura, Y., Osborne, C., Hor, S.Y., Bromfield, A., Davies, S., ve ark. (2003). Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology*, 125:47–57.

79. Knights, D., Silverberg, M.S., Weersma, R.K., Gevers, D., Dijkstra, G., Huang, H., ve ark. (2014). Complex host genetics influence the microbiome in inflammatory bowel disease. *Genome Med*, 6:107.
80. Petnicki-Ocwieja, T., Hrncir, T., Liu, Y., Biswas, A., Hudcovic, T., Tlaskalova-Hogenova, H., ve ark. (2009). Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106:15813–8.
81. Rehman, A., Sina, C., Gavrilova, O., Häsler, R., Ott, S., Baines, J.F., ve ark. (2011). Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities. *Gut,* 60:1354–62.
82. Ramanan, D., Tang, M.S., Bowcutt, R., Loke, P., Cadwell, K. (2014). Bacterial sensor Nod2 prevents inflammation of the small intestine by restricting the expansion of the commensal Bacteroides vulgatus. *Immunity,* 41:311–24.
83. Caruso, R., Warner, N., Inohara, N., Núñez, G. (2014). NOD1 and NOD2: signaling, host defense, and inflammatory disease. *Immunity.* 41:898–908. doi: 10.1016/j.immuni.2014.12.010.
84. Boyle, J.P., Parkhouse, R., Monie, T.P. (2014). Insights into the molecular basis of the NOD2 signalling pathway. *Biol Open,* 4 doi: 10.1098/rsob.140178.
85. Salem, M., Seidelin, J.B., Rogler, G., Nielsen, O.H. (2013). Muramyl dipeptide responsive pathways in Crohn's disease: from NOD2 and beyond. *Cell Mol Life Sci,* 70:3391–404.
86. Martinon, F., Burns, K., Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-1β. *Mol Cell,* 10, 417–426.
87. Yang, Y., Wang, H., Kouadir, M., Song, H., Shi, F. (2019). Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. *Cell Death Dis,* 10(2):128. doi: 10.1038/s41419-019-1413-8.
88. Duncan, J. A., Canna, S. W. (2018). The NLRC4 inflammasome. *Immunol Rev.* 281, 115–123.
89. Schroder, K., Zhou, R. ve Tschopp, J. (2010). The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? *Science,* 327, 296–300.
90. Bauernfeind, F.G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E.S., MacDonald, K., Speert, D., ve ark. (2009). Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol,* 183(2):787-91. doi: 10.4049/jimmunol.0901363.
91. Netea, M.G., Nold-Petry, C.A., Nold, M.F., Joosten, L.A., Opitz, B., van der Meer, J.H., ve ark. (2009). Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood,* 113(10):2324-35. doi: 10.1182/blood-2008-03-146720.
92. Gong, Y.N., Wang, X., Wang, J., Yang, Z., Li, S., Yang, J., Liu, L., ve ark. (2010). Chemical probing reveals insights into the signaling mechanism of inflammasome activation. *Cell Res,* 20(12):1289-305. doi: 10.1038/cr.2010.135.
93. Lin, K.M., Hu, W., Troutman, T.D., Jennings, M., Brewer, T., Li, X., ve ark. (2014). IRAK-1 bypasses priming and directly links TLRs to rapid NLRP3 inflammasome activation. *Proc Natl Acad Sci USA,* 111(2):775-80. doi: 10.1073/pnas.1320294111. Epub 2013 Dec 30. Erratum in: Proc Natl Acad Sci USA. 2014 Feb 25;111(8):3195.
94. Juliana, C., Fernandes-Alnemri, T., Kang, S., Farias, A., Qin, F., Alnemri, E.S. (2012). Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *J Biol Chem,* 287(43):36617-22. doi: 10.1074/jbc.M112.407130.
95. Fernandes-Alnemri, T., Kang, S., Anderson, C., Sagara, J., Fitzgerald, K.A., Alnemri, E.S. (2013). Cutting edge: TLR signaling licenses IRAK1 for rapid activation of the NLRP3 inflammasome. *J Immunol,* 191(8):3995-9. doi: 10.4049/jimmunol.1301681.
96. Muñoz-Planillo, R., Kuffa, P., Martínez-Colón, G., Smith, B.L., Rajendiran, T.M., Núñez, G. (2013). K^+ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity,* 38(6):1142-53. doi: 10.1016/j.immuni.2013.05.016.
97. Murakami, T., Ockinger, J., Yu, J., Byles, V., McColl, A., Hofer, A.M., Horng, T. (2012). Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci USA,* 109(28):11282-7. doi: 10.1073/pnas.1117765109
98. Katsnelson, M., Dubyak, G. (2013). Cytosolic K+and extracellular Na + as regulators of NLRP3 inflammasome activation and the IL-1β secretion response of macrophages to crystalline stimuli. *FASEB J.* 27, 138.8–8.
99. Green, J.P., Yu, S., Martín-Sánchez, F., Pelegrin, P., Lopez-Castejon, G., Lawrence, C.B., Brough, D. (2018). Chloride regulates dynamic NLRP3-dependent ASC oligomerization and inflammasome priming. *Proc Natl Acad Sci USA,* 115(40):E9371-E9380. doi: 10.1073/pnas.1812744115.

100. Shi, H., Wang, Y., Li, X., Zhan, X., Tang, M., Fina, M., ve ark. (2016). NLRP3 activation and mitosis are mutually exclusive events coordinated by NEK7, a new inflammasome component. *Nat Immunol*, 17(3):250-8. doi: 10.1038/ni.3333.
101. He, Y., Zeng, M., Yang, D., Motro, B., Núñez, G. (2016). NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature*, 530, 354.
102. Groß, C.J., Mishra, R., Schneider, K.S., Médard, G., Wettmarshausen, J., Dittlein, D.C., ve ark. (2016). K+ Efflux-Independent NLRP3 Inflammasome Activation by Small Molecules Targeting Mitochondria. *Immunity*, 45(4):761-773. doi: 10.1016/j.immuni.2016.08.010.
103. Sanman, L.E., Qian, Y., Eisele, N.A., Ng, T.M., van der Linden, W.A., Monack, D.M., ve ark. (2016). Disruption of glycolytic flux is a signal for inflammasome signaling and pyroptotic cell death. *Elife*, 5:e13663. Erişim: 20.10.2021 doi: 10.7554/eLife.13663.
104. Lee, G.S., Subramanian, N., Kim, A.I., Aksentijevich, I., Goldbach-Mansky, R., Sacks, D.B., ve ark. (2012). The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca2+ and cAMP. *Nature*, 492(7427):123-7. doi: 10.1038/nature11588.
105. Zhen, Y., Zhang, H. (2019). NLRP3 Inflammasome and Inflammatory Bowel Disease. *Frontiers in immunology*, 10 276. doi:10.3389/fimmu.2019.00276
106. Lewis, G.J., Massey, D.C., Zhang, H., Bredin, F., Tremelling, M., Lee, J.C., ve ark. (2011). Genetic association between NLRP3 variants and Crohn's disease does not replicate in a large UK panel. *Inflamm Bowel Dis*, 17:1387–91.
107. Mao, L., Kitani, A., Similuk, M., Oler, A.J., Albenberg, L., Kelsen, J., ve ark. (2018). Loss-of-function CARD8 mutation causes NLRP3 inflammasome activation and Crohn's disease. *J Clin Invest*, 128:1793–806.
108. Yang, S.K., Kim, H., Hong, M., Lim, J., Choi, E., Ye, B.D., ve ark. (2011). Association of CARD8 with inflammatory bowel disease in Koreans. *J Hum Genet*, 56:217–23.
109. Zhang, H.X., Wang, Z.T., Lu, X.X., Wang, Y.G., Zhong, J., Liu, J. (2014).NLRP3 gene is associated with ulcerative colitis (UC), but not Crohn's disease (CD), in Chinese Han population. *Inflamm Res*, 63:979–85.
110. Hanaei, S., Sadr, M., Rezaei, A., Shahkarami, S., Ebrahimi, D.N., Bidoki, A.Z., ve ar. (2018). Association of NLRP3 single nucleotide polymorphisms with ulcerative colitis: a case-control study. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 42:269–75.
111. Kanai, T., Watanabe, M., Okazawa, A., Nakamaru, K., Okamoto, M., Naganuma, M., ve ark. (2000). Interleukin 18 is a potent proliferative factor for intestinal mucosal lymphocytes in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 119:1514–23.
112. McAlindon, M.E., Hawkey, C.J., Mahida, Y.R. (1998). Expression of interleukin 1 beta and interleukin 1 beta converting enzyme by intestinal macrophages in health and inflammatory bowel disease. *Gut*, 42:214–9.
113. Coccia, M., Harrison, O.J., Schiering, C., Asquith, M.J., Becher, B. Powrie, F., ve ark. (2012). IL-1beta mediates chronic intestinal inflammation by promoting the accumulation of IL-17A secreting innate lymphoid cells and CD4(+) Th17 cells. *J Exp Med*, 209:1595–609.
114. Lazaridis, L.D., Pistiki, A., Giamarellos-Bourboulis, E.J., Georgitsi, M., Damoraki, G., Polymeros, D., ve ark. (2017). Activation of NLRP3 inflammasome in inflammatory bowel disease: differences between crohn's disease and ulcerative colitis. *Dig Dis Sci*, 62:2348–56.
115. Molina, D. K., and DiMaio, V. J. (2012). Normal organ weights in men: part I-the heart. *Am J Forensic Med Pathol.* 33, 362–367.
116. Moeller, A. H., Caro-Quintero, A., Mjungu, D., Georgiev, A. V., Lonsdorf, E. V., Muller, M. N., et al. (2016). Cospeciation of gut microbiota with hominids. *Science*, 353, 380–382.
117. Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., ve ark. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464:59.
118. Cho, I.,Blaser, M. J. (2012). The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet*, 13:260.
119. Morgan, X. C., Tickle, T. L., Sokol, H., Gevers, D., Devaney, K. L., Ward, D. V., ve ark. (2012). Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol*, 13:R79.
120. Kim, B.-S., Jeon, Y.-S., and Chun, J. (2013). Current status and future promise of the human microbiome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 16, 71–79.
121. Khanna, S., and Tosh, P. K. (2014). A clinician's primer on the role of the microbiome in human health and disease. *Mayo Clin Proc*, 89, 107–114.
122. Lloyd-Price, J., Abu-Ali, G., and Huttenhower, C. (2016). The healthy human microbiome. *Genome Med*, 8:51.

123. Segata, N., Boernigen, D., Tickle, T. L., Morgan, X. C., Garrett, W. S., and Huttenhower, C. (2013). Computational meta'omics for microbial community studies. *Mol Syst Biol*, 9:666. doi: 10.1038/msb.2013.22
124. Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., ve ark. (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, 500, 541–546.
125. Li, J., Jia, H., Cai, X., Zhong, H., Feng, Q., Sunagawa, S., ve ark. (2014). An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol*, 32, 834–841.
126. Aagaard, K., Petrosino, J., Keitel, W., Watson, M., Katancik, J., Garcia, N., ve ark. (2013). The Human Microbiome Project strategy for comprehensive sampling of the human microbiome and why it matters. *FASEB J.* 27, 1012–1022.
127. Blekhman, R., Goodrich, J. K., Huang, K., Sun, Q., Bukowski, R., Bell, J. T., ve ark. (2015). Host genetic variation impacts microbiome composition across human body sites. *Genome Biol*, 16:191.
128. McLaughlin, R. W., Vali, H., Lau, P. C., Palfree, R. G., De Ciccio, A., Sirois, M., ve ark. (2002). Are there naturally occurring pleomorphic bacteria in the blood of healthy humans? *J Clin Microbiol*, 40, 4771–4775.
129. Bahrani-Mougeot, F. K., Paster, B. J., Coleman, S., Ashar, J., Barbuto, S., and Lockhart, P. B. (2008). Diverse and novel oral bacterial species in blood following dental procedures. *J Clin Microbiol*, 46, 2129–2132.
130. Païssé, S., Valle, C., Servant, F., Courtney, M., Burcelin, R., Amar, J., ve ark. (2016). Comprehensive description of blood microbiome from healthy donors assessed by 16S targeted metagenomic sequencing. *Transfusion*, 56, 1138–1147.
131. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. (4nd ed). New York, NY: Garland Science.
132. Bessis, M., and Delpech, G. (1981). Discovery of the red blood cell with notes on priorities and credits of discoveries, past, present and future. *Blood Cells*, 7, 447–480.
133. Jerne, N. K. (1973). The immune system. *Sci Am*, 229, 52–63.
134. Blache, D. (1992). Structure and function of blood platelets. *Arch Int Physiol Biochim Biophys*, 100:A17–24.
135. Huang, Y., Fan, X.G., Tang, Z.S., Liu, L., Tian, X.F, Li, N. (2006). Detection of Helicobacter pylori DNA in peripheral blood from patients with peptic ulcer or gastritis. *APMIS*. 2006: 114:851: 6
136. Thwaites, G.E., Gant, V. (2011). Are bloodstream leukocytes Trojan Horses for the metastasis of Staphylococcus aureus? *Nat Rev Microbiol*, 9(3):215-22. doi: 10.1038/nrmicro2508.
137. Nielsen, H.H., Qiu, J., Friis, S., Wermuth, L., Ritz, B. (2012). Treatment for Helicobacter pylori infection and risk of Parkinson's disease in Denmark. *Eur J Neurol*, 19(6):864-9. doi: 10.1111/j.1468-1331.2011.03643.x.
138. Prajsnar, T.K., Hamilton, R., Garcia-Lara, J., McVicker, G., Williams, A., Boots, M., ve ark. (2012). A privileged intraphagocyte niche is responsible for disseminated infection of *Staphylococcus aureus* in a zebrafish model. *Cell Microbiol*, 14(10):1600-19. doi: 10.1111/j.1462-5822.2012.01826.x.
139. Kibru, D., Gelaw, B., Alemu, A., Addis, Z. (2014). Helicobacter pylori infection and its association with anemia among adult dyspeptic patients attending Butajira Hospital, *Ethiopia. BMC Infect Dis*, 14:656. doi: 10.1186/s12879-014-0656-3.
140. Sato, J., Kanazawa, A., Ikeda, F., Yoshihara, T., Goto, H., Abe, H., ve ark. (2014). Gut dysbiosis and detection of "live gut bacteria" in blood of Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 37(8):2343-50. doi: 10.2337/dc13-2817.
141. Wang, Z., Zhang, L., Guo, Z., Liu, L., Ji, J., Zhang, J., ve ark. (2012). A unique feature of iron loss via close adhesion of Helicobacter pylori to host erythrocytes. *PLoS One*, 7(11):e50314. doi: 10.1371/journal.pone.0050314.
142. Xayarath, B., Freitag, N.E. (2012). Optimizing the balance between host and environmental survival skills: lessons learned from Listeria monocytogenes. *Future Microbiol*, 7: 83952
143. Eisenreich, W., Dandekar, T., Heesemann, J., Goebel, W. (2010). Carbon metabolism of intracellular bacterial pathogens and possible links to virulence. *Nat Rev Microbiol*, 8(6):401-12. doi: 10.1038/nrmicro2351.
144. Claudi, B., Spröte, P., Chirkova, A., Personnic, N., Zankl, J., Schürmann, N., ve ark. (2014). Phenotypic variation of Salmonella in host tissues delays eradication by antimicrobial chemotherapy. *Cell*, 158(4):722-733. doi: 10.1016/j.cell.2014.06.045.
145. Isberg, R.R. (1991). Discrimination between intracellular uptake and surface adhesion of bacterial pathogens. *Science*, 252: 9348
146. Gest, H. (2008). The Modern Myth of 'Unculturable' Bacteria: Scotoma of Contemporary Microbiology 2008. *Faculty Research (Bloomington)*, Erişim: 26 Ekim 2020, http://hdl.handle.net/2022/3149

147. Amar, J., Serino, M., Lange, C., Chabo, C., Iacovoni, J., Mondot, S., ve ark.; D.E.S.I.R. Study Group. (2011). Involvement of tissue bacteria in the onset of diabetes in humans: evidence for a concept. *Diabetologia,* 54(12):3055-61. doi: 10.1007/s00125-011-2329-8.
148. Yang, J., Feng, L., Ren, J., Wu, G., Chen, S., Zhou, Q. ve ark. (2013). Correlation between the severity of periodontitis and coronary artery stenosis in a Chinese population. *Aust Dent J,* 58(3):333-8. doi: 10.1111/adj.12087.
149. Ramírez, J.H., Parra, B., Gutierrez, S., Arce, R.M., Jaramillo, A., Ariza, Y., Contreras, A. (2014). Biomarkers of cardiovascular disease are increased in untreated chronic periodontitis: a case control study. *Aust Dent J,* 59(1):29-36. doi: 10.1111/adj.12139.
150. Velmuragan, G., Dinekaran, V., Rajendhran, J., Swaminathan, K. (2020). Blood Microbiota and Circulating Microbial Metabolites in Diabetes and Cardiovascular Disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism,* 31:11: 835-847.
151. Clarke, G. (2014). Gut microbiota: the neglected endocrine organ. *Mol Endocrinol,* 28: 1221–1238.
152. Tang, W.H.W. (2017). Gut microbiota in cardiovascular health and disease. *Circ Res,*120: 1183–1196.
153. Leshem, A. (2019). Fecal microbial transplantation and its potential application in cardiometabolic syndrome. *Front Immunol,* 10: 1341
154. Forkosh, E., Ilan, Y. (2019). The heart-gut axis: new target for atherosclerosis and congestive heart failure therapy. *Open Heart,* 6:e000993. Erişim: 10.10.2021doi: 10.1136/openhrt-2018-000993
155. Pietiainen, M. (2018). Mediators between oral dysbiosis and cardiovascular diseases. *Eur J Oral Sci,* 26–36
156. Metwaly, A., Dunkel, A., Waldschmitt, N., Raj, A., Lagkouvardos, I., Corraliza, A. M., ve ark. (2020). Integrated microbiota and metabolite profiles link Crohn's disease to sulfur metabolism. *Nature communications,* 11(1), 4322. doi: 10.1038/s41467-020-17956-1
157. Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., Gordon, J.I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature,* 444(7122):1027-31. doi: 10.1038/nature05414.
158. Ferreyra, J.A., Wu, K.J., Hryckowian, A.J., Bouley, D.M., Weimer, B.C., Sonnenburg, J.L. (2014). Gut microbiota-produced succinate promotes C. difficile infection after antibiotic treatment or motility disturbance. *Cell Host Microbe,* 16(6):770-7. doi: 10.1016/j.chom.2014.11.003.
159. Smith, P.M., Howitt, M.R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C.A., Bohlooly-Y, M., Glickman, J.N., Garrett, W.S. (2013). The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science,* 341(6145):569-73. doi: 10.1126/science.1241165.
160. Lloyd-Price, J., Arze, C., Ananthakrishnan, A.N., Schirmer, M., Avila-Pacheco, J., Poon, T.W., ve ark. (2019). Multi-omics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases. *Nature,* 569, 655–662 (2019). https://doi.org/10.1038/s41586-019-1237-9
161. Jacobs, J.P., Goudarzi, M., Singh, N., Tong, M., McHardy, I.H., Ruegger, P., ve ark. (2016). A Disease-Associated Microbial and Metabolomics State in Relatives of Pediatric Inflammatory Bowel Disease Patients. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol,* 2(6):750-766. doi: 10.1016/j.jcmgh.2016.06.004.
162. Franzosa, E.A., Sirota-Madi, A., Avila-Pacheco, J., Fornelos, N., Haiser, H.J., Reinker, S., ve ark. (2019). Gut microbiome structure and metabolic activity in inflammatory bowel disease. *Nat Microbiol,* 4, 293–305.
163. Gevers, D., Kugathasan, S., Denson, L.A., VÃ¡zquez-Baeza, Y., Van Treuren, W., Ren, B.,ve ark. (2014). The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe,* 15, 382–392.
164. Ananthakrishnan, A.N., Luo, C., Yajnik, V., Khalili, H., Garber, J.J., Stevens, B.W., ve ark. (2017). Gut microbiome function predicts response to anti-integrin biologic therapy in inflammatory bowel diseases. *Cell Host Microbe,* 21, 603–610.e3.
165. Douglas, G.M., Hansen, R., Jones, C.M.A., Dunn, K.A., Comeau, A.M., Bielawski, J.P., ve ark. (2018). Multi-omics differentially classify disease state and treatment outcome in pediatric Crohn's disease. *Microbiome,* 6(1):13. https://doi.org/10.1186/s40168-018-0398-3.
166. Human Microbiome Project Consortium. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature,* 486: 207–214
167. Hooper, L.V., Gordon, J.I. (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science,* 292: 1115–1118.
168. Hooper, L.V., Bry, L., Falk, P.G., Gordon, J.I. (1998). Host-microbial symbiosis in the mammalian intestine: Exploring an internal ecosystem. *BioEssays,* 20: 336–343
169. Wang, B., Yao, M., Lv, L., Ling, Z., Li, L. (2017).The human microbiota in health and disease. *Engineering,* 3: 71–82.

170. Evenepoel, P., Poesen, R., Meijers, B. (2017). The gut-kidney axis. *Pediatr Nephrol*, 32: 2005–2014
171. Brenchley, J.M., Douek, D.C. (2012). Microbial translocation across the GI tract. *Annu Rev Immunol*, 30: 149–173.
172. Vaziri, N.D., Wong, J., Pahl, M., Piceno, Y.M., Yuan, J., DeSantis, T.Z., Ni, Z., Nguyen, T.H., Andersen, G.L. (2013). Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora. *Kidney Int*, 83: 308–315.
173. Aronov, P.A., Luo, F.J., Plummer, N.S., Quan, Z., Holmes, S., Hostetter, T.H., Meyer, T.W. (2011). Colonic contribution to uremic solutes. *J Am Soc Nephrol*, 22: 1769–1776.
174. Andersen, K., Kesper, M.S., Marschner, J.A., Konrad, L., Ryu, M., Kumar, Vr. S., ve ark. (2017).Intestinal dysbiosis, barrier dysfunction, and bacterial translocation account for CKD-related systemic inflammation. *J Am Soc Nephrol*, 28: 76–83.
175. Shah, N.B., Allegretti, A.S., Nigwekar, S.U., Kalim, S., Zhao, S., Lelouvier, B., Servant F. (2019). Blood Microbiome Profile in CKD : A Pilot Study. *Clin J Am Soc Nephrol*, 14(5):692-701. doi: 10.2215/CJN.12161018.
176. Manchester K.L. (2011). Antoine Béchamp: Pere de la biologie. Oui ou non? *Endeavour*, 25: 68–73
177. Kritschewski, I.L., Ponomarewa, I.W. (1934). On the pleomorphism of bacteria: I. On the pleomorphism of B. Paratyphi B. *J Bacteriol*, 28: 111–126.
178. Errington, J., Mickiewicz, K., Kawai, Y., Wu, L.J. (2016). L-form bacteria, chronic diseases and the origins of life. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*, 371.
179. Lichtenstein, G.R., Loftus, E.V., Isaacs, K.L., Regueiro, M.D., Gerson, L.B., Sands, B.E. (2018). ACG clinical guideline: management of Crohn's disease in adults. *Am J Gastroenterol*, 113:481–517.
180. Seyedian, S.S., Nokhostin, F., Malamir, M.D. (2019). A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease. *J Med Life*, 2019;12:113–122.
181. Triantafillidis, J.K., Merikas, E., Georgopoulos, F. (2011).Current and emerging drugs for the treatment of inflammatory bowel disease. *Drug Des Devel Ther*, 2011:185–210.
182. Lim, W.C., Wang, Y., MacDonald, J.K., Hanauer, S. (2016). Aminosalicylates for induction of remission or response in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016:0.
183. Aminosalicylates. Crohn's and colitis foundation. Erişim: 10.10.2021, https://www.crohnscolitisfoundation.org/sites/default/files/legacy/assets/pdfs/aminosalicylates.pdf
184. Dubois-Camacho, K., Ottum, P.A., Franco-Muñoz, D., De la Fuente, M., Torres-Riquelme, A., DÃ¬az-JimÃ©nez, D. (2017).Glucocorticosteroid therapy in inflammatory bowel diseases: from clinical practice to molecular biology. *World J Gastroenterol*, 23:6628–6638.
185. Benchimol, E.I., Seow, C.H., Steinhart, A.H., Griffiths, A.M. (2008).Traditional corticosteroids for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008;2008:0.
186. Ardizzone, S., Cassinotti, A., Manes, G., Porro, G.B. (2010).Immunomodulators for all patients with inflammatory bowel disease? *Therap Adv Gastroenterol*, 3:31–42.
187. Carter, M.J., Lobo, A.J., Travis, S.P.L. (2004). Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*, 53:1–16.
188. Feldman, P.A., Wolfson, D., Barkin, J.S. (2007). Medical management of Crohn's disease. *Clin Colon Rectal Surg*, 20:269–281.
189. Rampton, D.S. (2001). Methotrexate in Crohn's disease. *Gut*, 48:790–791.
190. Zenlea, T., Peppercorn, M.A. (2014).Immunosuppressive therapies for inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 20:3146–3152.
191. Russell, G., Graveley, R., Seid, J., al-Humidan, A., Skjodt, H.(1992). Mechanisms of action of cyclosporine and effects on connective tissues. *Semin Arthritis Rheum*, 21:16–22.
192. Present, D.H., Lichtiger, S. (1994). Efficacy of cyclosporine in the treatment of fistula of Crohn's disease. *Dig Dis Sci*, 39:374–380.
193. Ruder, B., Atreya, R., Becker, C. (2019). Tumour necrosis factor alpha in intestinal homeostasis and gut related diseases. *Int J Mol Sci*, 20:1887.
194. Clark M, Colombel JF, Feagan BC, Fedorak RN, Hanauer SB, Kamm MA, Mayer L. (2007). American gastroenterological association consensus development conference on the use of biologics in the treatment of inflammatory bowel disease, June 21-23, 2006. *Gastroenterology*, 133(1):312-39. doi: 10.1053/j.gastro.2007.05.006.
195. Poggioli, G., Laureti, S., Campieri, M., Pierangeli, F., Gionchetti, P., Ugolini, F. (2007). Infliximab in the treatment of Crohn's disease. *Therapeutics and clinical risk management*, 3(2), 301–308. doi:10.2147/tcrm.2007.3.2.301
196. Remicade. Erişim: 10.10.2021, https://www.rxlist.com/remicade-side-effects-drug-center.htm 2019
197. Cassinotti, A., Ardizzone, S., Porro, G.B. (2008). Adalimumab for the treatment of Crohn's disease. *Biol Targets Ther*, 2008:763–777.

198. Ali, T., Kaitha, S., Mahmood, S., Ftesi, A., Stone, J., Bronze, M.S. Clinical use of anti-TNF therapy and increased risk of infections. *Drug Healthc Patient Saf,* 2013:79–99.
199. Goel, N., Stephens, S. (2010). Certolizumab pegol. *mAbs,* 2:137–147. doi: 10.4161/mabs.2.2.11271
200. Adegbola, S.O., Sahnan, K., Warusavitarne, J., Hart, A., Tozer, P. (2018). Anti-TNF therapy in Crohn's disease. *Int J Mol Sci*, 19:2244.
201. Aggeletopoulou, I., Assimakopoulos, S.F., Konstantakis, C., Triantos, T. (2018). Interleukin 12/interleukin 23 pathway: biological basis and therapeutic effect in patients with Crohn's disease. *World J Gastroenterol,* 24:4093–4103.
202. McLean, L.P., Cross, R.K. (2016). Integrin antagonists as potential therapeutic options for the treatment of Crohn's disease. *Expert Opin Investig Drugs,* 25(3):263-73. doi: 10.1517/13543784.2016.1148137.
203. Edgar, R.C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics,* 2010; 26(19): 2460-1.
204. Magoč, T., Salzberg, S. L. (2011). FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* (Oxford, England), 27(21), 2957–2963. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507
205. Bokulich, N.A., Subramanian, S., Faith, J.J., Gevers, D., Gordon, J.I., Knight, R., Mills, D.A., Caporaso, J.G. (2013). Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat Methods,* 10(1):57-9. doi: 10.1038/nmeth.2276.
206. Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K.(2010).QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods,* 7(5):335-6. doi: 10.1038/nmeth.f.303.
207. Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics,* 27(16):2194-200. doi: 10.1093/bioinformatics/btr381.
208. Edgar, R.C. (2013). UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods,* 10 (10):996-8.
209. Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., ve ark. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res,* 41(Database issue):D590-6. doi: 10.1093/nar/gks1219.
210. Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res,* 32(5):1792-7. doi: 10.1093/nar/gkh340.
211. Lozupone, C., Knight, R. (2005). UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol,* 71(12): 8228-8235.
212. Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., ve ark. (2014). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic acids research,* 42(Database issue), D633–D642.
213. Cover, T. L., Blaser, M. J. (2009). Helicobacter pylori in health and disease. *Gastroenterology,* 136(6), 1863–1873.
214. Wilburn, J., Twiss, J., Kemp, K., & McKenna, S. P. (2017). A qualitative study of the impact of Crohn's disease from a patient's perspective. *Frontline gastroenterology,* 8(1), 68–73.
215. Noto, J.M., Peek, R.M., Jr. (2017). The gastric microbiome, its interaction with Helicobacter pylori, and its potential role in the progression to stomach cancer. *PLoS Pathog,* 13:e1006573. 10.1371/journal.ppat.1006573
216. Fadeev E, Cardozo-Mino MG, Rapp JZ, Bienhold C, Salter I, Salman-Carvalho V, Molari M, Tegetmeyer HE, Buttigieg PL, Boetius A. (2021). Comparison of Two 16S rRNA Primers (V3-V4 and V4-V5) for Studies of Arctic Microbial Communities. *Front Microbiol,* 12:637526.
217. Lankarani, K. B., Sivandzadeh, G. R., & Hassanpour, S. (2013). Oral manifestation in inflammatory bowel disease: a review. *World journal of gastroenterology,* 19(46), 8571–8579. https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i46.8571
218. Willis, J. R., & Gabaldón, T. (2020). The Human Oral Microbiome in Health and Disease: From Sequences to Ecosystems. *Microorganisms,* 8 (2), 308. https://doi.org/10.3390/microorganisms8020308
219. D'Aiuto, F., Parkar, M., Andreou, G., Suvan, J., Brett, P.M., Ready, D., Tonetti, M.S. (2004). Periodontitis and systemic inflammation: control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers. *J Dent Res,* 83(2):156-60.
220. Rizzatti, G., Lopetuso, L. R., Gibiino, G., Binda, C., Gasbarrini, A. (2017). Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases. *BioMed research international,* 9351507. https://doi.org/10.1155/2017/9351507

221. Zhang, Y., Xu, J., Wang, X., ve ark. (2019). Changes of intestinal bacterial microbiota in coronary heart disease complicated with nonalcoholic fatty liver disease. *BMC Genomics*, 20, 862. https://doi.org/10.1186/s12864-019-6251-7
222. Hauschild, T., and S. Schwarz. (2003). Differentiation of Staphylococcus sciuri strains isolated from free-living rodents and insectivores. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, 50:241-246.
223. Kloos, W. E. (1980). Natural populations of the genus Staphylococcus. *Annu Rev Microbiol*, 34:559-592
224. Kloos, W. E., Ballard, D.N., Webster, J.A., Hubner, R.J., Tomasz, A., Couto, I., ve ark. (1997). Ribotype delineation and description of Staphylococcus sciuri subspecies and their potential as reservoirs of methicillin resistance and staphylolytic enzyme genes. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 47:313-323
225. Kolawole, D. O., Shittu, A.O. (1997). Unusual recovery of animal staphylococci from septic wounds of hospital patients in Ile-Ife, Nigeria. *Lett Appl Microbiol*, 24:87-90.
226. Garcia, M. C., Rodriguez, M. J., Bernardo A., Tornadijo, M.E., Carballo, J. (2002). Study of enterococci and micrococci isolated throughout manufacture and ripening of San Simon cheese. *Food Microbiol*, 19:23-33.
227. Papamanoli, E., Kotzekidou, P., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki E. (2002). Characterization of Micrococcaceae isolated from dry fermented sausage. *Food Microbiol*, 19:441-449.
228. Couto, I., Sanches, I.S., Sa-Leao, R., de Lencastre, H. (2000). Molecular characterization of Staphylococcus sciuri strains isolated from humans. *J Clin Microbiol*, 38:1136-1143.
229. Nemeghaire, S., Argudin, M.A., Febler, A. T., Hauschild, T., Scwarz, S., Butaye, P. (2014). The ecological importane of the *Staphylococcus sciuri* species group as reservoir for resistance and virulence genes. *Veterinary Microbiology*, 171 (3-4), 342-356.
230. Stepanovic, S., P. Jezek, I. Dakic, D. Vukovic, and L. Seifert. Staphylococcus sciuri: an unusual cause of pelvic inflammatory disease. *Int. J. STD AIDS*, in press.
231. Hedin, G., Widerstrom, M. (1998). Endocarditis due to Staphylococcus sciuri. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 17:673-675.
232. Wallet, F., Stuit, L., Boulanger, E., Roussel-Delvallez, M., Dequiedt, P., Courcol, R.J. (2000). Peritonitis due to Staphylococcus sciuri in a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Scand J Infect Dis*, 32:697-698.
233. Horii, T., Suzuki, Y., Kimura, T., Kanno, T., Maekawa, M. (2001). Intravenous catheter-related septic shock caused by Staphylococcus sciuri and Escherichia vulneris. *Scand J Infect Dis*, 33:930-932.
234. Stepanovic, S., Dakic, I., Djukic, S., Lozuk, B., Svabic-Vlahovic, M. (2002). Surgical wound infection associated with Staphylococcus sciuri. *Scand J Infect Dis* 34:685-686.
235. Shittu, A., Lin, J., Morrison, D., Kolawole, D. (2004). Isolation and molecular characterization of multiresistant Staphylococcus sciuri and Staphylococcus haemolyticus associated with skin and soft-tissue infections. *J Med Microbiol*, 53:51-55.
236. Kelley, N., Jeltema, D., Duan, Y., He, Y. (2019). The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *International journal of molecular sciences*, 20(13), 3328.
237. Menu P., Vince J.E. (2011). The NLRP3 inflammasome in health and disease: The good, the bad and the ugly. *Clin. Exp. Immunol*, 166:1–15.
238. Guo H., Callaway J.B., Ting J.P.-Y. (2015). Inflammasomes: Mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat. Med*, 21:677–687.
239. Vajjhala P.R., Mirams R.E., Hill, J.M. (2012). Multiple binding sites on the pyrin domain of ASC protein allow self-association and interaction with NLRP3 protein. *J Biol Chem*, 287:41732–41743. doi: 10.1074/jbc.M112.381228
240. Fusco, R., Siracusa, R., Genovese, T., Cuzzocrea, S., Di Paola, R. (2020). Focus on the Role of NLRP3 Inflammasome in Diseases. *International journal of molecular sciences*, 21(12), 4223. https://doi.org/10.3390/ijms21124223
241. Goverman, J. (2009). Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol*, 9:393–407. doi: 10.1038/nri2550.
242. Di Iorio, A. (2003). Serum IL-1β levels in health and disease: a population-based study. The InCHIANTI study. *Cytokine*, 22(6), 198–205. doi:10.1016/s1043-4666(03)00152-2
243. Miwa, K., Asano, M., Horai, R., Iwakura, Y., Nagata, S., Suda, T. (1998). Caspase 1-independent IL-1beta release and inflammation induced by the apoptosis inducer Fas ligand. *Nat Med*, 4:1287–1292.
244. Hohlbaum, A.M., Gregory, M.S., Ju, S.T., Marshak-Rothstein, A. (2001). Fas ligand engagement of resident peritoneal macrophages in vivo induces apoptosis and the production of neutrophil chemotactic factors. J *Immunol*, 167:6217–6224.

245. Maedler, K., Schumann, D. M., Sauter, N., Ellingsgaard, H., Bosco, D., Baertschiger, R., ve ark. (2006). Low Concentration of Interleukin-1 Induces FLICE-Inhibitory Protein-Mediated -Cell Proliferation in Human Pancreatic Islets. *Diabetes*, 55(10), 2713–2722.
246. Broz, P., Monack, D. M. (2011). Molecular mechanisms of inflammasome activation during microbial infections. *Immunological reviews*, 243(1), 174–190. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01041.x
247. Bossaller, L., Chiang, P. I., Schmidt-Lauber, C., Ganesan, S., Kaiser, W. J., Rathinam, V. A., ve ark. (2012). Cutting edge: FAS (CD95) mediates noncanonical IL-1β and IL-18 maturation via caspase-8 in an RIP3-independent manner. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 189(12), 5508–5512.
248. Rubartelli, A., Bajetto, A., Allavena, G., Cozzolino, F., Sitia, R. (1993). Post-translational regulation of interleukin 1 beta secretion. *Cytokine*, 5(2):117-24. doi: 10.1016/1043-4666(93)90050-f.
249. Tassi S., Carta S., Delfino L., Caorsi R., Martini A., Gattorno, M. (2010). Altered redox state of monocytes from cryopyrin-associated periodic syndromes causes accelerated IL-1beta secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(21):9789–9794.
250. Carta, S., Tassi, S., Pettinati, I., Delfino, L., Dinarello, C.A., Rubartelli, A. (2011). The rate of interleukin-1{beta} secretion in different myeloid cells varies with the extent of redox response to toll-like receptor triggering. *J Biol Chem*, 286(31):27069–27080.
251. Perregaux, D.G., Laliberte, R.E., Gabel, C.A. (1996). Human monocyte interleukin-1beta posttranslational processing. Evidence of a volume-regulated response. *J Biol Chem*, 271(47):29830–29838.
252. Lopez-Castejon, G., Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1β secretion. *Cytokine & growth factor reviews*, 22(4), 189–195.
253. Tsutsui, H., Matsui, K., Okamura, H., Nakanishi, K. (2000). Pathophysiological roles of interleukin-18 in inflammatory liver diseases. *Immunol Rev*, 174:192–209. doi:10.1034/j.1600-0528.2002.017418.x
254. Mazodier, K., Marin, V., Novick, D., Farnarier, C., Robitail, S., Schleinitz, N., ve ark. (2005).Severe imbalance of IL-18/IL-18BP in patients with secondary hemophagocytic syndrome. *Blood*, 106(10):3483–9. doi:10.1182/blood-2005-05-1980
255. ten Hove, T., van Montfrans, C., Peppelenbosch, M.P., van Deventer, S.J. (2002). Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut*, 50(2):206–11. doi:10.1136/gut.50.2.206
256. Sandborn, W.J., Feagan, B.G., Fedorak, R.N., Scherl, E., Fleisher, M.R., Katz, S., ve ark. (2008). A randomized trial of Ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease. *Gastroenterology*, 135(4):1130–41. doi:10.1053/j.gastro.2008.07.014
257. Mannon, P.J., Fuss, I.J., Mayer, L., Elson, C.O., Sandborn, W.J., Present, D., ve ark. (2004). Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med*, 351(20):2069–79. doi:10.1056/NEJMoa033402
258. Pizarro, T.T., Michie, M.H., Bentz, M., Woraratanadharm, J., Smith, M.F. Jr, Foley, E., ve ark. (1999). IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *J Immunol*, 162(11):6829–35.
259. Colafrancesco, S., Priori, R., Alessandri, C., Perricone, C., Pendolino, M., Picarelli, G., Valesini, G. (2012). IL-18 Serum Level in Adult Onset Still's Disease: A Marker of Disease Activity. *International Journal of Inflammation*, 1–6.
260. Reddy, P. (2004). Interleukin-18: recent advances. *Current Opinion in Hematology*, 11(6):405-10.
261. Bombardieri, M., McInnes, I. B., Pitzalis, C. (2007). Interleukin-18 as a potential Terapeutic target in chronic autoimmune/inflammatory conditions. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 7(1):31-40
262. Dai, S. M., Nishioka, K., Yudoh, K. (2004). Interleukin (IL) 18 stimulates osteoclast formation through synovial T cells in rheumatoid arthritis: comparison with IL1β and tumour necrosis factor α. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 63(11):1379-86.

EK

Etik Kurul İzni

Evrak Tarih ve Sayısı: 13/08/2020-26877 *BEKV3P64T*

T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Toplantı Tarihi : 30/05/2020
Toplantı Sayısı : 16
Karar Sayısı :2

Konu : Araştırma Projesi Değerlendirme Raporu (20/44)

Sayın Doç Dr. Sevgi Kalkanlı TAŞ

Kurulumuza değerlendirilmek üzere sunduğunuz 20-44 kayıt numaralı "Crohn Hastalarında Mikrobiyata Karakterizasyonu ve Inflamazom Bileşenlerinin Rolü" başlıklı proje önerisi kurulumuzun 30.05.2020 tarihli toplantısında görüşülmüş olup, karar örneği ekte sunulmuştur.

Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK Başkan

Ek: Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu (20-44)

Aslı Gibidir

e-imzalıdır.

Prof.Dr.Mustafa ÖZTÜRK
Başkan

Doç.Dr Ayşe BATIREL
Başkan Yardımcısı

Doç.Dr. Serhat KÖSEOĞLU
Etik Kurul Üyesi

Doç.Dr. Nursel ARICI
Etik Kurul Üyesi

Doç.Dr. Alev KURAL
Etik Kurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Hilal ÖZKAYA
EtikKurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Evren OKUR
Etik Kurul Üyesi

Prof. Dr. Berna LAÇİN
Etik Kurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Merve KABASAKAL
Etik Kurul Üyesi

Prof. Dr. Eyüp Turgut IŞITMANGİL
Etik Kurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Süleyman ERSOY
Etik Kurul Üyesi

Doç.Dr. Ayşin ERSOY
Etik Kurul Üyesi

Av. Hilal Umay ÖZBEKBALCI
Etik Kurul Üyesi

Prof. Dr. Mahmut GÜMÜŞ
Etik Kurul Üyesi

Mehmet SARI
Sivil Üye

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.