T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

CROHN HASTALIĞININ TLR4 RESEPTÖRÜ İLE İLİŞKİSİ

DERYA ALTUNKANAT

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. SEVGİ KALKANLI TAŞ

TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ
EYLÜL/2023

İTHAF

“Sevgili aileme ithaf ediyorum. ”

TEŞEKKÜR

Doktora dönemim boyunca bilgisi ve desteğini esirgemeyen, tüm öğrencileri ve meslektaşları tarafından saygı ve sevgiyle anılan, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Sevgi KALKANLI TAŞ'a,

Maddi ve manevi her türlü desteklerini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ülkan KILIÇ'a ve tüm Tıbbi Biyoloji hocalarıma,

Gönüllülere ait örneklerin ve klinik verilerin toplanmasında ve değerlendirilmesinde katkı sağlayan Sayın Doç Dr. Resul KAHRAMAN ve Sayın Prof. Dr. Alpaslan TANOĞLU'na ayrıca örneklerin özveri ile toplanmasına her konuda bize yardımcı olan Gastroenteroloji Hemşiresi Sayın Derya YILDIZ'a,

Projemde eksik bulunan malzemelerim için desteklerinden dolayı Sayın Cihan Süleyman ERDOĞAN ve Sayın Asuman DEVECİ ÖZKAN'na

Tez projemin deneyleri boyunca her konuda bilgi ve desteği sağlayan İmmünoloji ABD ve Tıbbi Biyoloji ABD lisansüstü öğrencilerine,

Doktora tez süreci boyunca her zaman yanımda olan ve desteklerini hiç esirgemeyen değerli eşim Engin ALTUNKANAT'na,

Sevgi ve teşekkürlerimi iletiyorum…

Doktora Tez sürecim boyunca, büyük emeği olan değerli ÖZTÜRK ve ALTUNKANAT ailesi fertlerine ithaf ediyorum…

Bu çalışma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Biriminin "**2020/041"** sayılı projesiyle ve 'YÖK 100/2000 Doktora Bursu' ile desteklenmiştir.

Derya ALTUNKANAT

İÇİNDEKİLER

İTHAF iv

TEŞEKKÜR v

İÇİNDEKİLER vi

TABLOLAR LİSTESİ ix

ŞEKİLLER LİSTESİ x

SİMGELER VE KISALTMALAR xi

ÖZET xii

ABSTRACT xiii

1. GİRİŞ VE AMAÇ 1

2. GENEL BİLGİLER 4

2.1. CROHN HASTALIĞI 4

2.2. CROHN HASTALIĞININ ETİYOLOJİSİ 5

2.3. CROHN HASTALIĞININ EPİDEMİYOLOJİSİ 5

2.4. CROHN HASTALIĞI TANISI 6

2.5. CROHN HASTALIĞI TEDAVİSİ 7

2.6. TOLL-LIKE RESEPTÖRLERİ 7

2.6.1. TLR'lerin yapısı ve karakterizasyonu 9

2.6.2. TLR ailesinin üyeleri 9

2.6.3. TLR'lerin ligandları 11

2.6.4. TLR'lerin sinyal yolları 12

2.6.5. TLR4 13

2.6.5.1. TLR4 sinyal yolağı 13

2.6.5.2. TLR4 ligandları 14

3. GEREÇ VE YÖNTEM 16

3.1. ETİK İZİN 16

3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN ÖRNEKLER 16

3.3. ÇALIŞMADA KULLANILAN CİHAZ VE KİMYASALLAR 16

3.3.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar 16
3.3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar 17
3.3.2.1. Hücre kültürü 17
3.3.2.2. Western blot 17
3.3.3. Çalışmada Kullanılan Kitler 18
3.3.3.1. Protein izolasyonu 18
3.3.3.2. Protein konsantrasyon ölçümü 18
3.3.3.3. RNA izolasyonu 18
3.3.3.4. Real-Time PCR 18
3.3.3.5. ELİSA 18
3.3.4. Çalışmada Kullanılan Tampon Çözeltilerin Hazırlanışı 18
3.3.3.1. SDS-PAGE jel elektroforezi için hazırlanan tampon ve çözeltiler 18
3.3.3.2. Western blot için hazırlanan tampon ve çözeltiler 19
3.4. YÖNTEM 20
3.4.1. Periferal Mononükleer Hücre İzolasyonu 20
3.4.2. Hücre Sayımı 21
3.4.3. LPS ile Periferal Mononükleer Hücre İndükleme 21
3.4.4. RNA İzolasyonu 21
3.4.5. RNA Konsantrasyon Ölçümü 23
3.4.6. cDNA Eldesi ve Kontrol PCR 23
3.4.7. Protein İzolasyonu 25
3.4.8. Protein Ölçümü 25
3.4.9. Protein Seviyesinin Western Blot Yöntemi ile Belirlenmesi 25
3.4.9.1. SDS-Page jel elektroforezi 25
3.4.9.2. Semi-Dry Western Blot yöntemi ile TLR4'ün belirlenmesi. 26
3.4.10. ELİSA 27
3.4.10.1. IL-1β ELİSA kiti 27
3.4.10.2. IL-18 ELİSA kiti 29
3.4.11. İstatiksel Analiz 30
4. BULGULAR 31
4.1. TLR4 VE NF-κB EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN TESPİTİ 31
4.2. PROTEİNİNİN SDS-PAGE İLE GÖSTERİLMESİ 31

4.3. TLR4 PROTEİNİNİN WESTERN BLOT İLE GÖSTERİLMESİ 32
4.3. SÜPERNATANTLARDA IL-1B SEVİYESİNİN TESPİTİ 33
4.4. SÜPERNATANTLARDA IL-18 SEVİYESİNİN TESPİTİ 35
5. TARTIŞMA 38
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 42
KAYNAKLAR 43
EK 52

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1: cDNA sentez reaksiyonu 23

Tablo 3.2: cDNA sentezi reaksiyonu şartları 24

Tablo 3.3: Real-Time PCR Reaksiyonu 24

Tablo 3.4: cDNA Real-Time PCR Koşulları 24

Tablo 3.5: %10'luk ayırma jeli hazırlanması 26

Tablo 3.6: Toplayıcı jelin hazırlanması 26

Tablo 4.1: TLR4 ve NF-κB genlerinin kat değişimi 31

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Crohn hastalığının etkilediği bölgeler 4

Şekil 2.2: TLR'lerin aile üyeleri ve lokasyonları 11

Şekil 2.3. Hücresel sinyal yollarına aracılık eden TLR'ler ve adaptör proteinler 12

Şekil 3.1: Santrifüjden önce (solda) ve sonra (sağda) kan ayırma tüpü 21

Şekil 4.1: Proteinlerin konsantrasyon ölçüm plate görüntüsü 31

Şekil 4.2: Aktif yeni tanılı Crohn hastalarından ve kontrol örneklerinden elde edilen PBMC'lerin örneklerin protein jel elektroforez görüntüsü 32

Şekil 4.3: Yeni tanılı Crohn hastaları grubunda TLR4 proteininin Western Blot yöntemi ile gösterilmesi 32

Şekil 4.4: Yeni tanılı Crohn hastaları grubunda B-Actin proteininin Western Blot yöntemi ile gösterilmesi 33

Şekil 4.5: Tüm hasta ve kontrollerde IL-1β seviyesinin 450 nm'de ölçümü 34

Şekil 4.6: IL-1β seviyesinin yeni tanı almış Crohn hastaları ve sağlıklı bireylerde karşılaştırılması 34

Şekil 4.7: IL-1β seviyesinin ölçüm spesifite ve hassaslık grafik analizi 35

Şekil 4.8: Tüm hasta ve kontrollerde IL-18 seviyesinin 450 nm'de ölçümü 36

Şekil 4.9: IL-18 seviyesinin yeni tanı almış Crohn hastaları ve sağlıklı bireylerde karşılaştırılması 36

Şekil 4.10: IL-18 seviyesinin ölçüm spesifite ve hassaslık grafik analizi 37

SİMGELER VE KISALTMALAR

AIEC : Adheran-İnvaziv Escherichia Coli'nin

ATG16L1 : Otofaji ile İlgili 16-Benzeri Gen

CD : Crohn Disease (Crohn Hastalığı)

CTD : C Terminal Alanı

DAMP : Hasarla Ilişkili Moleküler Yapılar

GI : Gastrointestinal

İBH : İnflamatuar Bağırsak Hastalığı

KCNN4 : Ara İletkenlik Kalsiyumla Aktive Olan Potasyum Kanal Proteini 4

LPMC : Lamina Propria Mononükleer Hücreleri

LPS : Lipopolisakkarit

LRP6 : Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptörü Ile Ilgili Protein 6

LRRK2 : Lösin Bakımından Zengin Tekrar Kinaz 2

MRE : Manyetik Rezonans Enterografisi

NF-κB : Nüklear faktör-κB

NOD2 : Nucleotide binding Oligomerization Domain 2

NTC : N Terminal Alanı

PAMP : Patojenle Ilişkili Moleküler Kalıpları

PBMC : Periferal Mononükleer Hücre

PRR : Patern Tanıma Reseptörleri

SNP : Tek Nükleotid Polimorfizmleri

TCF4 : Transkripsiyon Faktörü 4

TLR : Toll-like Reseptör

UK : Ulcerative Colitis (Ülseratif Kolit)

CROHN HASTALIĞININ TLR4 RESEPTÖRÜ İLE İLİŞKİSİ

ÖZET

Amaç: Bu çalışmadaki amaç NF-κB ve TLR4 ekspresyonları araştırılarak inflamasyondaki rolünü belirlemek ayrıca TLR4'ün aktivitesinin Crohn hastalığında prognostik biyobelirteç ve terapötik hedef olarak kullanılıp kullanılamayacağının belirlenmesidir.

Gereç ve Yöntem: 20 aktif dönem Crohn hastasından ve 20 sağlıklı gönüllülerden alınan periferik kandan periferik kan mononüklear hücreler izole edildi. Ardından hücreler LPS ile 1 gün uyarıldı. TLR4 ve NF-κB'nin mRNA ifadeleri qPCR yapılmıştır. TLR4 protein düzeyi Western blot yöntemiyle incelenmiştir. Pro-inflamatuar sitokin olan IL-1B ve IL-18 düzeyleri ELISA yöntemi çalışılmıştır.

Bulgular: Çalışmamızda LPS ile uyarım öncesi ve sonrası TLR4 (önce 13,69 kat, sonra 6,38 kat) (sırasıyla p=0,0013, p=0,015) ve NF-κB'nin (önce 11,21 kat, sonra 2,22 kat) (sırasıyla p=0,022, p=0,027) mRNA ifadelerinin düştüğü gözlemlenmiştir. IL-1B ve IL-18 düzeyleri uyarım öncesi (sırasıyla p=0,022, p=0,0125) ve sonrası (sırasıyla p=<0,0001, p=0,0357) kontrol grubuyla karşılaştırıldığında düşük çıkmıştır. Western Blot'ta sonuç alınamamıştır.

Sonuç: TLR4 ve NF-κB, bağırsak epitelyumun farklı bölgelerinde tercihen lokalize olurken, periferik kan mononüklear hücrelerde mRNA ekspresyonu gözlendi. Fakat uyarım sonrası ekspresyonda düşüş gözlendi. TLR4'ün koruyucu etkisi, hücresel yerleşimi ve ligand yanıtı veya miRNA gibi aracılar tarafından olabileceğini düşündürmektedir. IL-1β ve IL-18 seviyelerinin hastalarda düşük olduğu gözlemlenmiştir. IL-1β'nin aktivasyonu, kaspaz-1 bağımlı ve bağımsız mekanizmalarla gerçekleşirken, IL-18, IL-1β'nin proteazlar tarafından kesilmesiyle aktif hale gelir. Crohn hastalığında IL-1β ve IL-18 sentezinin inhibe edilmesinde farklı mekanizmalar rol oynayabilir.

Anahtar Kelimeler: Crohn Hastalığı, İnflamasyon, NF-kB, TLR4

THE RELATIONSHIP OF CROHN DISEASE WITH TLR4 RECEPTOR

ABSTRACT

Aim: The aim of this study was to investigate the expressions of NF-κB and TLR4 to determine their role in inflammation, as well as to determine whether the activity of TLR4 can be used as a prognostic biomarker and therapeutic target in Crohn's disease.

Materials and Methods: PBMC were isolated from 20 active Crohn's disease patients and 20 healthy volunteers. Subsequently, the cells were stimulated with LPS for 1 day. The mRNA expressions of TLR4 and NF-κB were analyzed using qPCR. The TLR4 protein level was examined using the Western Blot. The levels of IL-1B and IL-18 were studied using the ELISA method.

Results: In our study, it was observed that the mRNA expressions of TLR4 (before 13.69-fold, after 6.38-fold) ($p=0.0013$, $p=0.015$, respectively) and NF-κB (before 11.21-fold, after 2.22-fold) ($p=0.022$, $p=0.027$, respectively) decreased after stimulation with LPS. The levels of IL-1B and IL-18 were found to be lower compared to the control group both before ($p=0.022$, $p=0.0125$, respectively) and after ($p=<0.0001$, $p=0.0357$, respectively) stimulation. Western Blot yielded no results.

Conclusion: TLR4 and NF-κB are preferably localized in different regions of the intestinal epithelium, while mRNA expression was observed in peripheral blood mononuclear cells. However, a decrease in expression was observed after stimulation. It suggests that the protective effect of TLR4 may be mediated through mechanisms such as its cellular localization and ligand response, or through intermediaries like miRNA. It was observed that IL-1β and IL-18 levels were low in patients. While the activation of IL-1β occurs through both caspase-1 dependent and independent mechanisms, IL-18 becomes active through the proteolytic cleavage of IL-1β. Different mechanisms may play a role in inhibiting the synthesis of IL-1β and IL-18 in Crohn's disease.

Key Words: Crohn Disease, Inflammation, NF-kB, TLR4

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnflamatuar bağırsak hastalıkların (İBH) nedeni ve patogenezi tam olarak anlaşılamamış, remisyon ve alevlenmeler ile giden gastrointestinal ve ekstraintestinal komplikasyonlara yol açan kronik bir hastalık grubudur. Bu hastalık grubu içerisinde Crohn hastalığı (CD), Ülseratif kolit (UC) ve tam olarak sınıflandırılamamış klinik ve laboratuvar özelliklere sahip olan indetermine kolit bulunmaktadır (1). CD ağızdan anüse kadar gastrointestinal traktüsün herhangi bir parçasını tutabilir. Hastaların yaklaşık yarısında terminal ileum ve kolon tutulumu, %30'unda sadece ince bağırsak etkilenmesi ve %20'sinde yalnızca izole kolon tutulumu gözlenir. (2). Bu hastalıkta, inflamasyon bazen atlayarak ilerleyebilir ve etkilenen dokuda yaygın (transmural) bir şekilde bulunabilir. İnflamasyona bağlı olarak tutulan bağırsak kısmı daralmakta, kalınlaşmakta ve eşlik eden ülser ve fissürler sonucu kaldırım taşı görünümüne neden olmaktadır. Kronik inflamasyon sonucu abse, fistül ve darlık gibi lokal komplikasyonlar gelişebilmekte, tekrarlayan cerrahi müdahale gereksinimi doğabilmektedir (3).

Crohn hastalığının görülme sıklığı coğrafi bölgelere göre değişiklik gösterir. Sanayileşmiş toplumlarda, örneğin Kuzey Amerika, İngiltere ve Batı Avrupa ülkelerinde, insidans en yüksek seviyededir. Bu hastalık genellikle 20'li ve 30'lu yaşlarda ortaya çıksa da, 60 ila 80 yaş arasındaki yaş gruplarında da sıkça görülür. (4). Kadınlarda biraz daha fazla görülme eğilimi vardır (5). Türkiye'de 2007 verilerine göre İBH insidansı 4/100,000 olarak bildirilmiştir. Kırsal alanlarda yaşayanlarda şehirde yaşayanlara kıyasla daha az görülür. Crohn hastalığı ülkemizde kadınlarda erkeklerden biraz daha sık görülür (6).

Literatürde CD'nın nedenlerini anlamak için birçok çalışma yapılmıştır. Son yıllarda yapılan araştırmalar; sigara tüketimi, beslenme alışkanlıkları, ilaç kullanımı, genetik faktörler ve immünolojik ajanların CD'nın oluşum mekanizmasında rol oynadığını göstermiştir. Örneğin: Anne sütü ile beslenmenin, çocukluk döneminde hayvanlarla temas ve çiftlik yaşamının Crohn hastalığına karşı koruyucu etkisi olduğu tespit edilmiştir (7). CD'nin etiyolojisinde en iyi belirlenmiş çevresel risk faktörü sigara içimidir; bu, hastalık riskini 2 kat artırır (8). CD riski, aktif sigara içen hastalarda ve sigarayı bırakan hastalarda da yükselir (9). Sigara kullanımı hastalığın seyrini olumsuz etkiler, fistül ve striktür oluşumunu, alevlenmeleri ve cerrahi sonrası hastalığın tekrar

etmesini artırır. Son araştırmalar pasif sigara içmenin de Crohn hastalığı için bir risk faktörü olabileceğini göstermiştir (10). Çocukluk döneminde antibiyotik kullanımı, CD riskini artırabilir (11). Oral kontraseptifler, aspirin ve steroid olmayan anti-enflamatuar ilaçlar CD riskini yükseltirken, özellikle yaşlı hastalarda statin kullanımı bu riski azaltabilir (12–14). Apendektomi, Crohn hastalığında bağırsak striktür riskini artırabilir (15). Crohn hastalığındaki diyetin rolü tam olarak anlaşılamamıştır; ancak, şekerli gıdaların, çoklu doymamış yağ asitlerinin ve etin Crohn hastalığı riskini artırdığını, meyve ve lif açısından zengin gıdaların ise riski azalttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (16–18).

CD genellikle enfeksiyöz gastroenteritlerin ardından ortaya çıkar (19), bu durum bağırsak florasında değişikliklere (disbiyoz) neden olabilir (20). Bacteroides ve Firmicutes bakterilerinin azalması, gammaproteobacter ve acinetobacterin artışı Crohn hastalığındaki disbiyozu tanımlamak için kullanılmıştır (21). Crohn hastalarında adheran-invaziv Escherichia Coli'nin (AIEC) prevalansının arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (22).

Mikrobiyotanın güçlü immünomodülatör molekülü lipopolisakkarittir (LPS). Farklı mikrobiyotik türler, çeşitli LPS tipleri üretir ve bu çeşitlilik insanlardaki otoimmünite riskine ve yardımcı T hücre yanıtlarındaki farklılıklara katkıda bulunabilir (23). Hücre yüzeyinde bulunan TLR'lerin, mikrobiyal membran bileşenleri arasında lipidler, lipoproteinler ve proteinler gibi unsurları tanıma özellikleri vardır. Öte yandan hücre içinde yer alan TLR'ler, bakteriyel ve viral nükleik asitleri tespit etme kapasitesine sahiptir. Bu mekanizmalar aynı zamanda vücudun kendi nükleik asitlerini tanıma ve otoimmün hastalıklara yol açma potansiyeline de sahiptir (24).

CD'nin temel özelliği spesifik olmayan kolon enflamasyonudur; Kolonda çok sayıda anormal şekilde aktive edilmiş immünosit toplanırken, çeşitli enflamatuar faktörler aşırı ifade edilir. Nüklear faktör κB (NF-κB) transdüksiyonunda rol oynayan anahtar proteinlerden biri olan Toll benzeri reseptör 4 (TLR4), CD'nın kolon mukozasında yüksek oranda eksprese edilir (25-27). Hem MyD88 hem de TRIF bağımlı bir şekilde plazma membranında ve endozomlarda çalışan tek TLR, TLR4'tür. Bu gözlem, CD14, LBP, MD2, MAL ve / veya TRAM'ı hedefleyenler gibi modülatörlerin tasarımı için çeşitli seçenekler sağlar. Tüm TLR'lerden yalnızca TLR4, kendi dış alanı tarafından oluşturulan bir paket yerine muramyl dipeptide (MD2) ile sağlanan ligand bağlama cebi içerir; bu bulgu, terapötik bir hedef olarak TLR4'ün önemini

vurgulamaktadır (28). Bu çalışmadaki amaç NF-κB ve TLR4 ekspresyonları araştırılarak inflamasyondaki rolünü belirlemek ayrıca TLR4'ün aktivitesinin CH'da prognostik biyobelirteç ve terapötik hedef olarak kullanılıp kullanılamayacağının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda, 20 aktif dönem Crohn hastasından ve 20 sağlıklı gönüllülerden alınan periferik kan mononüklear hücrelerinde (PBMC) TLR4 ve NF-kB'nin mRNA ifadeleri qPCR, protein ifadesi ve TLR4'ün aktivite düzeyleri Western Blot yöntemleri kullanılarak belirlenecektir. PBMC'lerin salgılamış olduğu pro-inflamatuar sitokinlerin düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçülecektir. Primer kültürleri yapılan PBMC'ler LPS ile uyarıldıktan sonra, TLR4 proteininin aktivite düzeyinde ve pro-inflamatuar sitokinlerin miktarında bir değişiklik olup olmadığı belirlenecektir.

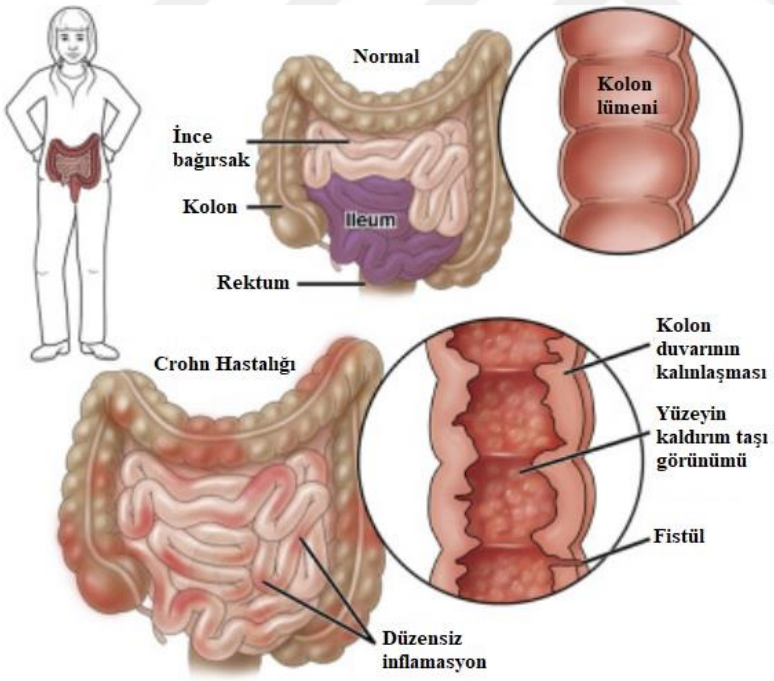
Konunun özgün değeri;

- TLR4, CD patogenezindeki potansiyel rollerinin ve pro-inflamatuar sinyal yolaklarındaki moleküler mekanizmalarının açığa çıkartılmasının, CD patogenezinin anlaşılmasına olanak sağlayabilecek olması ve TLR4'ün expresyon ve aktivite düzeylerinin potansiyel prognastik biyobelirteç olarak kullanılabilecek olması, çalışmamızı özgün kılmaktadır.
- Ayrıca, CD patogenezi ve progresyonunda TLR4'ün fonksiyonel ve biyolojik önemini anlamak, terapötik amaçlar için inflamatuar yanıtta TLR4'ü hedef alan ümit verici immünosupresif ve anti-inflamatuar ilaçların geliştirilmesine neden olabileceğinden ve klinik hekimlere tedaviyi yönlendirici (örneğin belirli TLR4 inhibitörünün kullanımının tavsiye edilebilmesi) katkı sağlayabilecek olmasından dolayı bu değeri ile de özgün bir çalışma olacaktır.
- Önerilen proje konusunda literatürde bir yayına rastlanmamasından dolayı bu çalışma dünyada ve Türkiye' de ilk defa yapılacaktır ve elde edilecek veriler ile literatürdeki bu konudaki boşluk dolduracaktır. Potansiyel anti-inflamatuar TLR4 inhibitörünün inflamatuar yanıtın önlenmesinde kullanılabilecek olması, CD'larının yaşam kalitesinin artmasına olumlu katkılar sağlayabilecek ve tedaviye yeni bir yaklaşım getirecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. CROHN HASTALIĞI

CD, gastrointestinal sistemi etkileyen ve sıklıkla ekstraintestinal komplikasyonlara neden olan kronik inflamatuar bir durumdur. Ağızdan anüse kadar herhangi bir noktada iltihaplanma olabilir (29,30) (Şekil 2.1). CD geleneksel olarak Batı dünyasında daha yaygın bir hastalık olarak bilinir; bununla birlikte, 21. yüzyıldan itibaren kentleşme derecesinin artmasıyla birlikte Asya'da CD insidansı artmaktadır (31). CD'li hastaların çoğunda, nüksetme ve remisyonun giderek artan ve azalan bir klinik seyri gözlemlenmektedir ve zamanla bağırsakta kümülatif yapısal hasar geliştirir (32). Bununla birlikte, hastalık fenotipindeki ve şiddetindeki değişiklikler sıklıkla heterojendir ve her hasta için önceden tahmin edilemez (33).



Şekil 2.1: Crohn hastalığının etkilediği bölgeler (34)

2.2. CROHN HASTALIĞININ ETİYOLOJİSİ

Etiyolojisi tam olarak anlaşılmamakla birlikte birçok mekanizma tanımlanmıştır. Genetik yatkınlık ve bağırsak homeostazının bozulması, en çok çalışılan etiyolojik faktörlerden ikisidir (35).

CD ağırlıklı olarak kadınları etkiler ve insidansı yaşamın ikinci ve üçüncü dekatlarında zirve yapar (36, 37).

Önceki çalışmalar, CD'nin Aşkenazi Yahudilerinde daha yaygın olduğunu ve güçlü bir şekilde ilişkili ilk duyarlılık geni olan Nucleotide binding Oligomerization Domain 2 (NOD2) gibi çoklu genetik varyantlarla ilişkili olduğunu açıklamıştır. Bu gen, bağırsak epitelinde, özellikle de enterik patojenlere karşı savunmadan sorumlu olan Paneth hücrelerinde eksprese edilir. CARD15 / NOD2 genindeki üç genetik varyant (A702W, G908R ve L1007fsinsC), CD'li Kafkasyalı hastaların %30'a kadarında mevcuttur. Homozigotlar ve bileşik heterozigotlar için, CD geliştirme riski, mutasyonu olmayan bireylere göre 10 ila 42 kat daha fazladır. Ayrıca, bahsedilen varyantlar artmış ileal hastalık, stenoz ve daha erken başlangıç sıklığı ile ilişkilidir (38).

Sigara içmek tipik olarak CD için bir risk faktörü, ancak UC'de koruyucu bir faktör olarak düşünülmüştür. Bazı çalışmalarda sigara içimi alevlenmelerle ilişkilendirilmiştir ve tartışmalı olmasına rağmen IBD'ye sahip olmak için bir risk faktörü olduğuna inanılmaktadır (39).

Apendektomi IBD üzerinde farklı bir etki göstermektedir. 2008'de yayınlanan bir meta-analizde, apendektominin CD gelişme riskini artırdığını bulmuşlardır (40). Ancak, hastalar 10 yaşından önce opere edildiğinde CD riski azalmıştır. Andersson ve arkadaşları (2003) perfore apandisit nedeniyle apendektominin sonraki bağırsak rezeksiyonu riskini artırabileceğini, diğer nedenlere bağlı apendektominin CD riskini azalttığını buldu (41). Apendektomi ve CD arasındaki ilişki hala kesin değildir.

2.3. CROHN HASTALIĞININ EPİDEMİYOLOJİSİ

CD prevalansı 100.000'de 3 ila 20 vaka insidansına sahiptir (42). CD, Asya ve Güney Amerika'da insidansı artsa da, sanayileşmiş dünyada, özellikle Kuzey Amerika ve Batı Avrupa'da daha yaygındır (43, 44). Kadınlarda CD'nin baskınlığı biraz daha yüksektir ve Aşkenaz Yahudisi kökenli bireylerde Yahudi olmayanlara göre daha yaygındır. CD'nin kesin patogenezi bilinmemektedir, ancak hastalık riskini arttırdığı ve

hastalığın anormal bağırsak immün yanıtına yol açtığı gösterilen bir dizi genetik ve çevresel faktör vardır (43).

2.4. CROHN HASTALIĞI TANISI

CD tanısı klinik bir teşhistir ve ortaya çıkan semptomların sinsi ve nonspesifik olabileceği düşünüldüğünde oldukça zor olabilir (45). Daha fazla değerlendirme gerektiren kırmızı bayrak semptomları arasında kilo kaybı, kanlı ishal, demir eksikliği ve gece uyanmaları yer alır. Benzer şekilde, ailede önemli IBD öyküsü, c-reaktif protein seviyesindeki açıklanamayan yükselmeler, sedimantasyon hızları veya diğer akut faz reaktanları (örneğin, ferritin ve trombositler) veya düşük B12, olası CD için daha fazla araştırma yapılmasını gerektirmelidir (46).

CD tanısı semptomlara ve endoskopik ve radyolojik bulgulara göre konur (45, 46). Patoloji doğrulayıcı olabilir. Kolonik veya ileal CD vakalarında, endoskopik bulgular klasik olarak normal görünen mukoza alanlarının yanında değişen derecelerde inflamasyon (eritem, kırılganlık, erozyonlar ve ülserler dahil) olan atlama lezyonları ile karakterize edilir. Endoskopi sırasında lümen darlıkları ve daha az sıklıkla fistüller görülebilir. Patolojide CD'nin klasik bulgusu kazeifiye olmayan granülomdur. Ancak bunlar nadirdir, vakaların %25'inden azında meydana gelir ve benzersiz veya CD'ye patognomonik değildir (47,48). Daha yaygın patolojik bulgular arasında lenfositler, plazma hücreleri, granülositler, bazal lenfoplazmasitoz, kript mimarisinin bozulması ve kriptlerin kısalması ve düzensizliği, kript atrofisi, kript apseleri ve kript dallanmasından değişen derecelerde infiltratlar yer alır. Kronikliğin patolojik bulgusu, paneth hücre metaplazisinin varlığı ile de desteklenir (45). İzole jejunal hastalık gibi bazı durumlarda, etkilenen bölge kolay endoskopik değerlendirmeye uygun olmayabilir. Bu durumlarda, ince bağırsak mukozasını değerlendirmek için balon enteroskopi veya kapsül endoskopi yapılabilir (49). Kapsül endoskopi anormal mukozayı bulmak için çok hassas bir test olmasına rağmen, CD teşhisi için düşük özgüllüğe sahiptir (50,51). CD şüphesi olan vakalarda kapsül retansiyonu riski %1,6 ile oldukça düşüktür, ancak bilinen CD vakalarında bu risk %13'e yükselir (48). Bu riski azaltmak için ince bağırsak görüntülemesi ve açıklığı Kapsül endoskopi yapılmadan önce kapsül yerleştirilmelidir. Açıklık kapsülü, 48 ila 72 saat içinde parçalanmak üzere özel olarak tasarlanmıştır. İnce bağırsaktan geçip geçmediğini belirlemek için açıklık kapsülü üzerindeki radyoopak belirteçleri belirlemek için yerleştirmeden 24 saat sonra görüntüleme elde edilir. Bu

geçerse, normal kapsül endoskopisi büyük olasılıkla önemli bir alıkonma riski olmadan gerçekleştirilebilir (52).

Görüntüleme, CD'yi teşhis etmek için de kullanılabilir. Hem bilgisayarlı tomografi enterografisi (CTE) hem de manyetik rezonans enterografisi (MRE), bağırsak duvarı, mukoza ve ekstraluminal komplikasyonların görüntülenmesine izin verir. CTE ve MRE, CD'nin teşhisi ve değerlendirilmesi için kriter standardı olarak ince bağırsak baryum çalışmalarının yerini almıştır (53). CTE ile karşılaştırıldığında, MRE daha pahalıdır ancak daha da önemlisi, radyasyona maruz kalmayı önler ve iyotlu kontrast kullanmaz. CD tanısında serolojik belirteçlerin kullanımını değerlendiren çok sayıda çalışma olmasına rağmen (54,55) hiçbir belirteç veya belirteç paneli CD tanısını koyacak veya ekarte edecek kadar duyarlı veya özgül değildir.

2.5. CROHN HASTALIĞI TEDAVİSİ

Bir kişinin hangi tedaviye ihtiyacı olduğu, hastalığın şiddetine ve semptomlarına bağlıdır. Her insan CD'nı farklı şekilde deneyimler, bu nedenle sağlık hizmeti sağlayıcıları, kişinin semptomlarını iyileştirmek veya remisyonu azaltma tedavileri sağlar. Günümüzde CD'nı şu yöntemlerle tedavi edilir:

- İlaçlar
- Bağırsak istirahati
- Ameliyat (56)

2.6. TOLL-LIKE RESEPTÖRLERİ

Toll benzeri reseptörler (TLR'ler), immün yanıtlarda, özellikle de hücre dışı matris tarafından patojen tanınmasında hayati bir rol oynayan, patern tanıma reseptörleri (PRR'ler) ailesine ait, evrimsel olarak korunmuş reseptörlerdir (57-60). TLR'ler, enflamatuar reaksiyonların düzenlenmesinde ve enfeksiyöz patojenlerin ve kanser kalıntılarının ortadan kaldırılması için doğal veya adaptif immün yanıtların aktivasyonunda doğrudan yer alır (58,61-63).

TLR'ler, korunmuş patojenle ilişkili moleküler kalıpları (PAMP'ler), patojenlerin korunmuş yapılarını veya konakçı içindeki patojenlerin neden olduğu hasarı tanıma yetenekleri nedeniyle patojenlere karşı ilk savunma hattında kilit bir konuma sahiptir (64-67).

PRR'ler, başlangıçta enfeksiyona maruz kalmayı algılama ve patojenin ve bunun enfekte olmuş hücresinin nihai olarak ortadan kaldırılması için bir hücre içi sinyal zincirini ortaya çıkarma yetenekleri nedeniyle doğuştan gelen bağışıklığın önemli bir bileşenini oluşturur (57). Tüm PRR'ler, patojenlerde yaygın olarak bulunan ancak konakçı moleküllerden farklı olan ve bu nedenle yaygın olarak PAMP'ler olarak adlandırılan çok çeşitli yabancı molekülleri (örn. PRR'lerin aktivasyonu), aşağı akış transkripsiyonel aktivasyonuna ve çok sayıda enflamatuar aracının ekspresyonuna neden olur (37,64,65,67). Ek olarak, PRR sinyali ayrıca otofaji, hücre ölümü, sitokin işleme ve fagositozda yer alan çeşitli işlemlerin tetiklenmesine de yol açar (68,69).

Şu anda, bileşimlerine ve yapılarına göre, PRR'ler birincil işlevlerine, konumlarına, ligandlara özgüllüklerine ve evrimsel ilişkilerine bağlı olarak aşağıdaki gibi beş sınıfa ayrılır:

- Toll-like benzeri reseptörler (TLR'ler)
- AIM2 benzeri reseptörler (ALR'ler)
- C tipi lektin reseptörleri (CLR'ler)
- Retinoik asitle indüklenebilir gen- (RIG-) I benzeri reseptörler (RLR'ler)
- NOD benzeri reseptörler (NLR'ler) (57,64)

TLR'ler ve CLR'ler, zara bağlı reseptörler olarak işlev görür ve transmembran proteinler olarak bulunurken, diğerleri sitozolik proteinler olarak ortaya çıkar (57,64,70).

PRR'lerin yalnızca makrofajlar, nötrofiller, dendritik hücreler (DH'ler), doğal öldürücü (NK) hücreler, mast hücreleri, bazofiller ve eozinofiller gibi özelleşmiş bağışıklık tepkisi hücrelerinde değil aynı zamanda diğer hücrelerde de ifade edildiği bulunmuştur (61,64).

PRR'lerin yabancı olarak tanıyabildiği ve doğuştan gelen bir bağışıklık tepkisi ortaya çıkarabildiği çok sayıda moleküler model arasından dördü bugüne kadar şu şekilde karakterize edilmiştir: patojenle ilişkili moleküler modeller (PAMP'ler),

hasar/tehlike ile ilişkili moleküler modeller (DAMP'ler), mikropla ilişkili moleküler modeller (MAMP'ler) ve ksenobiyotikle ilişkili moleküler modeller (XAMP'ler). PRR'lerin çoğu, patojenlerden gelen moleküler modeller tarafından aktive edildikten sonra, inflamatuar yanıt geninin, özellikle proinflamatuar sitokinlerin ve tip I interferonların upregülasyonuna neden olur (57,64,70). TLR'ler ve CLR'ler, yüzey ifadeleri nedeniyle hücre dışında bulunan moleküler modellere duyarlıyken, diğerleri hücre içi olarak patojen kaynaklı modellere yanıt verir.

2.6.1. TLR'lerin yapısı ve karakterizasyonu

TLR reseptörlerinin keşfi, Drosophila'daki toll geninin ve proteininin tanımlanması ve fonksiyonel karakterizasyonuna dayanmaktadır (71). TLR'ler, embriyonik gelişim ve dorsoventral polarizasyondaki rolleri ile birlikte mantar ve gram-pozitif bakteriyel enfeksiyonlara (72) karşı bağışıklığın sağlanmasında rol oynayan hücre yüzeyi reseptörleri (73) olarak görev yapma konusunda ücretli (toll) proteine benzerlikleri nedeniyle adını aldılar (64,74-77).

TLR'ler, genellikle üç alandan oluşan bir tür tip I integral transmembran proteini olarak sınıflandırılır: zarın dışında bulunan bir N-terminal alanı (NTD), zarı kateden bir orta tek sarmal transmembran alanı ve sitoplazmaya doğru yerleştirilmiş bir C-terminal alanı (CTD) (78). N-terminal alanı, çeşitli PAMP'ler için ligand tanıma alanı olarak hizmet edecek bir dış alan oluştururken, CTD, toll-IL-1 reseptörü homolog alanı aracılığıyla akış aşağı sinyalleşmenin başlatılması için çeşitli sinyal transdüksiyon adaptörleri ile etkileşimlerde yer alır (57,64,70,76,78). Dış alan, PAMP'ler/DAMP'ler için TLR'lere çok ihtiyaç duyulan özgüllüğü ve tanınabilirliği sağlayan yaklaşık 19-25 yüksek oranda korunmuş kısa tandem lösin açısından zengin tekrar (LRR) motiflerinden oluşan katlanmış bir solenoid yapıya (at nalı benzeri) sahiptir (65,79). TLR'lerin her bir LRR tekrar dizisi, xLxxLxLxx dizi modelinde 24-29 amino asit içerir (64,80). Ek olarak NTD, çeşitli patojen türevli ligandlar için gerçek bağlanma bölgeleri olarak hizmet eden glikan parçaları içerir (81,82).

2.6.2. TLR ailesinin üyeleri

TLR'ler ayrıca hücre dışı LRR motifi içinde bulunan sistein kümelerinin sayısına bağlı olarak aşağıdaki gibi iki gruba ayrılır: omurgalı tipi (V-Tipi) ve protostom tipi (P-Tipi). V-Tipi TLR'ler, CTD'lerinde (LRRCT) tek bir sistein kümesine veya CF motifine

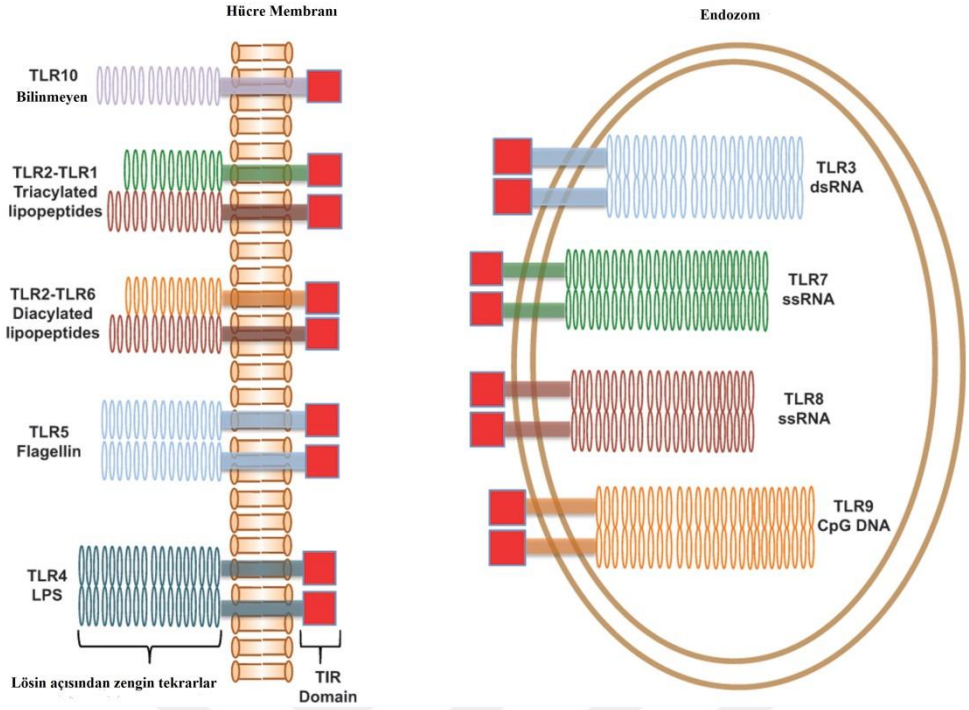
sahiptir ve bu nedenle Tek Sistein Kümesi TLR'leri (sccTLR'ler) olarak da adlandırılır. P-Tipi TLR'ler birden fazla (iki veya daha fazla) sistein kümesine veya CF motifine sahiptir ya LRRCT'lerinde ya da N-terminal (LRRNT) alanında (83,84).

TLR ailesi, ister böcek ister insan olsun, bireyin bağışıklık sisteminde kritik bir rol oynar. Kendilik ve kendilik dışı antijenleri tanıma, çeşitli patojenleri tespit etme, doğal ve kazanılmış bağışıklık arasında köprü kurma, sitokin üretimini düzenleme ve konakçı hücrenin çoğalmasını ve hayatta kalmasını düzenleme işlevi gören en iyi karakterize edilmiş PRR ailelerinden biridir (57,64,85,86).

Bugüne kadar, omurgasızlarda 222 TLR ve omurgalılarda 28 TLR tanımlanmıştır; bir bireyde en yüksek TLR sayısı, 21 TLR molekülüne sahip teleost omurgalı balıklarında bulunur. Memelilerde toplam 13 TLR (TLR1-13) bulunmuştur - bununla birlikte, insanlar bunlardan yalnızca 10'una (TLR1-10) sahipken, fare TLR10'un işlevsiz olmasıyla birlikte hepsine sahiptir (64,85,87,88). TLR1-9 ve 11'in ligandlarının ve sinyal yollarının çoğu bilinirken, TLR10, 12 ve 13'ün biyolojik rolü hala net değil. İnsanlarda TLR4, TLR ailesinin ilk keşfedilen ve enflamatuar yanıtları düzenlediği bildirilen (89), TLR3 ise TLR7-9 gibi viral TLR'lere ait en eski ailedir (64,82).

TLR'ler, işlevselliklerine ve konakçı hücredeki konumlarına bağlı olarak, aşağıdaki gibi iki türe (64,84-86,90) ayrılır:

- Hücre yüzeyinde aktif formlarında ifade edilen hücre zarı TLR'leri, yabancı ligandları algılamak ve bunlarla bağlanmak için NDT dış bölgesi dışarıya bakar. TLR1, 2, 4, 5, 6 ve 10'u içerirler. Aktif sinyal ileten formlarında, dimerler olarak bulunurlar—TLR1-TLR2, TLR2-TLR6 ve TLR2-TLR4/5/10 (91)
- Endoplazmik retikulum (ER), endozomlar ve lizozomlar gibi organel biyomembranları üzerindeki konakçı hücrelerde ifade edilen hücre içi TLR'ler. TLR3, 7, 8 ve 9'u içerir (80,92).



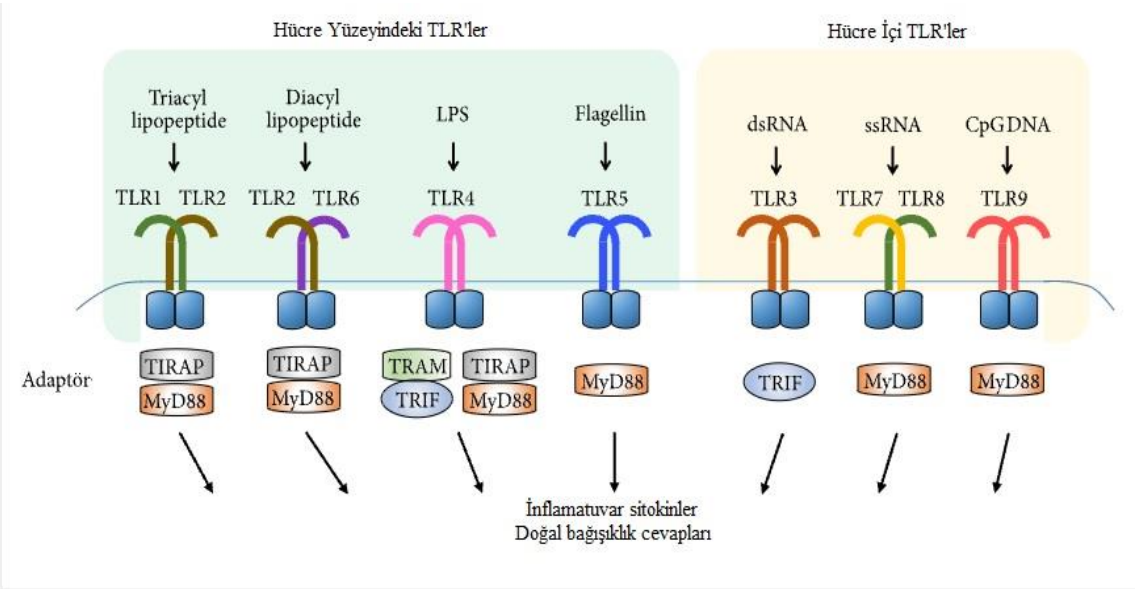
Şekil 2.2: TLR'lerin aile üyeleri ve lokasyonları (93)

2.6.3. TLR'lerin ligandları

TLR'ler ağırlıklı olarak, patojenik enfeksiyonu tanımada ve kaderine karar vermede çok önemli roller oynayan konakçı antijen işleyen hücrelerde (APC'ler) eksprese edilir (94,55). TLR'ler, bakteriler, protozoalar, mantarlar ve virüsler dahil olmak üzere bir dizi mikroorganizmadan gelen çeşitli PAMP'leri tanıyacak şekilde gelişmiştir (80,82,94-96). Bir protein, karbonhidrat, lipid veya bir nükleik asit gibi patojenlerden (PAMP'ler) eksojen olarak türetilen hemen hemen her tür büyük biyomolekül için, konakçı hücrede bağlanması ve yabancı bir varlık olarak tanınması için bir veya daha fazla TLR vardır (Şekil 2.3) (80,95,96). Benzer şekilde, TLR'ler ayrıca plazma zarı bileşenleri, ısı şoku proteinleri (HSP'ler) ve mitokondriyal DNA (mt DNA) gibi organel nükleik asitler gibi çeşitli endojen ligandlara (konakçıdan türetilen DAMP'ler) bağlanır (97).

Bununla birlikte, TLR2 ve TLR4, çok çeşitli ligandları tanıyabilme ve sonuç olarak aktive olabilme konusunda PRR'lerin en verimli olanlarıdır (95,96). TLR'lerin bazıları, lipoproteinler için TLR2, lipotekoik asit (LTA), peptidoglikanlar (PG), zimosan ve porin (98,99), virüslerden türetilen dsRNA için TLR3, gram negatif bakteri kaynaklı lipopolisakkaritler (LPS) ve bitki kaynaklı taksol için TLR4 (99,100), gram

negatif bakteriyel flagellin proteini için TLR5 (101) ve antiviral sentetik bileşikler—imidazokinolinler ve loksoribin (102,103) için TLR7 gibi bazı belirli ligandları tanıma ve bunlara bağlanma konusunda oldukça spesifiktir.



Şekil 2.3: Hücresel sinyal yollarına aracılık eden TLR'ler ve adaptör proteinler (104)

2.6.4. TLR'lerin sinyal yolları

Ligandın TLR'nin LRR alanına bağlanmasıyla aktivasyon üzerine, sinyalin hücrenin iç ortamına aktarılması gerekir. TLR'ler için, sinyalin hücrenin aşağı akışına geçmesi için aktive edilmiş ve/veya dimerize edilmiş reseptörün CTD alanına alınan çeşitli adaptör moleküller tanımlanmıştır (60,105,106). TLR sinyalinin işleyişi için kritik olan önemli bağdaştırıcılar, yapılarında toll-IL-1 reseptörü (TIR) alanlarına sahip olmalarıyla tanımlanır ve aşağıdaki şekilde kategorize edilir:

- Miyeloid farklılaşma birincil yanıt proteini 88 (MyDD88)
- TIR alanı içeren adaptör proteini (TIRAP veya Mal)
- IFN-β'yi indükleyen TIR alanı içeren adaptör (TRIF, TICAM1)
- TRIF ile ilgili adaptör molekülü (TRAM, TICAM2)
- Fosfoinositid (BCAP) için B hücresi adaptörü
- Steril α- ve armadillo motifi içeren protein (SARM)

TLR'ler sınıf I transmembran reseptör ailesine ait olduğundan, ligandın bağlanması bir dimerizasyonu indükler ve bu da onları aktive eder (60,64,80,95,96).

Gerçek sinyalleme kaskadı, ligand tipine, etkileşimli TLR'ye ve sinyalleme yolu için bağlanan akış aşağı adaptör molekülüne bağlıdır. Bununla birlikte, TLR sinyali, aşağı akış sinyal kaskadları için MyD88 veya TRIF'in işe alınmasına dayalı olarak genellikle iki farklı yola ayrılır (57,60,64).

MyD88'e bağlı yol: Sonunda proinflamatuar sitokin genlerinin gelişmiş ekspresyonuna yol açan tüm TLR'ler (TLR3 hariç) tarafından kullanılır. TLR'lerin aktifleştirilmiş CTD alanına MyD88 alımı, iki önemli adaptör molekülü olan Mal ve TIRAP tarafından kolaylaştırılır. Mal adaptör proteini, MyD88'i almak için her türlü TLR reseptörü tarafından kullanılırken, TLR1, 2, 4 ve 6, MyD88 ile teması kolaylaştırmak için TIRAP molekülü ile ek birleşme gerektirir (80).

TRIF'e bağlı yol: TLR3 ve TLR4 tarafından interferon tip-1 genlerinin gelişmiş ifadesini tetiklemek için kullanılır. TLR3, TRIF'i doğrudan alarak viral dsRNA'nın bağlanmasına yanıt olarak bunu kullanırken, TLR4, TRIF'in aktivasyonu için başka bir adaptör protein olan TRAM'a ihtiyaç duyar (57).

2.6.5. TLR4

TLR4 için açıklanan ilk işlev, patojenlerden (patojenle ilişkili moleküler model moleküller (PAMP'ler)) eksojen moleküllerin, özellikle gram negatif bakterilerden (örn., LPS) moleküllerin tanınmasıydı (107). Son zamanlarda, TLR4'ün yaralı dokular ve nekrotik hücreler tarafından salınan endojen moleküllerin tanınmasında da rol oynadığı geniş çapta gösterilmiştir. Hasarla ilişkili moleküler model molekülleri (DAMP'ler) olarak adlandırılan bu moleküller, TLR4 ile etkileşime girerek güçlü bir proinflamatuar yanıtın aktivasyonunu indükler (108). Genel olarak inflamasyonun koruyucu bir rolü vardır. Doku bütünlüğünü ve işlevini geri kazandıran rezolüsyon yollarının indüksiyonu ile takip edilen karmaşık ve koordineli bir süreçtir.

2.6.5.1. TLR4 sinyal yolağı: TLR4, endotelyal hücreler (109), kardiyak miyositler (110) ve merkezi sinir sistemi (CNS) hücreleri (111) dahil olmak üzere hem hematopoietik hem de hematopoietik olmayan hücrelerde hücre yüzeyinde eksprese edilir. TLR4, 608 kalıntılı bir hücre dışı alandan ve hücre içi sinyal kaskadı ile ilgili olan 187 kalıntılı bir hücre içi alandan oluşur (112). TLR4'ün transfeksiyonunun tek başına LPS tanınması için yeterli olmadığı ve ligand kaynaklı aktivasyon için TLR4'ün hücre yüzeyindeki miyeloid farklılaşma 2 (MD2) ile fiziksel ilişkisinin gerekli olduğu

gösterilmiştir (113-115). MD2, transmembran ve hücre içi alanlardan yoksundur ve TLR4/MD2 reseptör kompleksini oluşturan LPS ile etkileşim yoluyla TLR4'ün hücre dışı alanı ile kovalent olmayan bir şekilde birleşir (116). LPS algılamayı artıran diğer yardımcı moleküller, LPS monomerlerinin MD2 ve TLR4'e transferini destekleyen LPS bağlayıcı protein (LBP) ve CD14'tür (117). LPS bağlanmasından sonra, iki TLR4/MD2 kompleksinin bir dimerizasyonu meydana gelir ve bu, TLR4 homodimerinde, Toll/interlökin-1 reseptör benzeri (TIR) alanları içeren adaptör proteinlerin alınmasını indükleyen konformasyonel değişikliklerle sonuçlanır. Bu bağdaştırıcılar, TLR4'ün sitoplazmik kuyruğundaki TIR alanları ile bağdaştırıcılarda bulunanlar arasındaki homofilik etkileşimler yoluyla TLR4 kümesiyle birleşir. İki farklı hücre içi sinyal yolunda yer alan dört adaptör proteini tanımlanmıştır:

- Miyeloid farklılaşma birincil yanıt proteini 88 (MyD88),
- TIR alanı içeren adaptör proteini (TIRAP) olarak da bilinen MyD88 adaptör benzeri (MAL) proteini,
- TIR alanı içeren adaptör molekülü-1 (TICAM-1) olarak da bilinen IFN-β'yı (TRIF) indükleyen TIR alanı içeren adaptör,
- TRIF ile ilgili adaptör molekülü (TRAM) (118).

MyD88 aracılı sinyalleme, esas olarak plazma zarında meydana gelir ve MyD88 ve MAL proteinlerinin hızlı bir şekilde alınmasını içerir.

2.6.5.2. TLR4 ligandları: TLR4'ün bir bakteriyel LPS sensörü olarak rolünün Poltorak ve ark. (100) ve Qureshi ve ark. (119) tarafından keşfedilmesinden bu yana, hem konakçı dokulardan hem de hücrelerden eksojen kaynaklardan birkaç başka ligand tanımlanmıştır.

Ekzojen ligandlar (PAMP'ler), bakterilerden, virüslerden, mantarlardan, bitkilerden ve siyanobakterilerden izole edilen moleküllerdir. Çoğu, TLR4/MD2 kompleksinin agonistleridir (100,119-127). Bununla birlikte, bakteri ve siyanobakterilerden (Rhodobacter ve Oscillatoria türleri, sırasıyla), TLR4 antagonistleri de elde edilmiştir ve bunların etki mekanizmaları iyi karakterize edilmiştir. Bu antagonistler, hastalıkların hayvan modellerinde hem in vitro hem de in vivo olarak kullanıldı ve TLR4 sinyal modülasyonunun etkilerinin araştırılmasına olanak sağladı (128,129).

Endojen ligandlar (DAMP'ler) iki ana gruba aittir: (a) hücre dışı matristen kaynaklanan moleküller ve (130-134) (b) hücreler tarafından pasif olarak salınan veya aktif olarak salgılanan hücre içi aracılar (135-148). Bazı DAMP'ler için TLR4 aracılı sinyali aktive etme yeteneği sorgulanmış (149) ve TLR4/MD2 ile etkileşim mekanizmaları henüz araştırılmamış olsa da (kristalografik veriler mevcut değildir), bazı endojen moleküllerin proinflamatuar yanıtı indüklemek için TLR4 kullanabileceğine şüphe yoktur. TLR4 aracılı enflamasyonu indükleyebilen hücre dışı matrisin prototipik bir molekülü, glikozaminoglikan hiyalüronandır. Hiyalüronan normal koşullarda dokularda yüksek moleküler formda (106 Da'ya kadar) bulunur. Doku zedelenmesinden sonra, hem in vitro hem de in vivo TLR4 yoluyla makrofajları aktive ettiği gösterilen küçük parçalara ayrılır (130,150). TLR4'ün endojen hücre içi tetikleyicileri, DNA bağlayıcı protein yüksek hareketli grup kutusu 1'i (HMGB1) ve hücresel ısı şok proteinlerini (HSP'ler) içerir. Hücre hasarı ve nekrozdan sonra, bu moleküller hücre dışı ortama salınır ve böylece TLR4'ün aracılık ettiği güçlü bir proinflamatuar yanıtı indükler (135,139,151). Steril inflamasyondaki rolünün ötesinde, HMGB1 ayrıca patojenik bakteri ürünlerine maruz kaldıktan sonra immün yetmezlikli hücreler tarafından aktif olarak salınır, böylece enfeksiyöz ve enfeksiyöz olmayan enflamatuvar yanıtın kesişme noktasında ortak bir aracıyı temsil eder (135). Endojen TLR4 ligandları arasında yalnızca HMGB1 için, HMGB1'in TLR4'e spesifik bağlanmasını doğrulamak için yüzey plazmon rezonansı kullanan daha ayrıntılı çalışmalar yapılmıştır (152).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ETİK İZİN

Projenin etik onayı 16.10.2020 tarihinde Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Klinik Araştırmalar Etik Kulunun "20/108" kayıt no'lu kararıyla alınmıştır. Bu Proje Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Biriminin (BAP) "2021/041" sayılı projesiyle desteklenmiştir.

3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN ÖRNEKLER

Araştırma kapsamında; Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı ve Sancaktepe Şehit Prof. İlhan Varank Eğitim ve Araştırma Hastanesi Gastroentroloji Anabilim Dalı'ndan Uluslararası Crohn hastalığı Çalışma Grubu kriterlerine göre çalışmaya; cinsiyet farkı gözetmeden aktik dönem 10 Crohn hastası ve 20 sağlıklı (kontrol) gönüllü katılmıştır. 18 yaş ve altı bireyler, CD dışında viral enfeksiyon geçiren, başka otoimmün hastalığı olan, akut veya kronik sağlık problemleri olan bireyler çalışma kapsamı dışında bırakılmıştır.

Gönüllülerden alınan kan örneklerinden periferik mononükleer hücreler elde edilmiştir. Elde edilen periferik mononükleer hücreler için ise hücre sayımı yapılmıştır. Yeterli hücre sayısına ulaştığımız örnekler LPS ile uyarılarak deneyler gerçekleştirilmiştir.

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 cihazların listesi aşağıdaki gibidir.

- Real-Time PCR (LightCycler 480)
- Western Blot (Thermo)
- Görüntüleme Cihazı (Vilber)
- Soğutmalı Santrifüj (Daihan)

- Kabin
- Etüv
- Çeker Ocak
- ELİSA Cihazı (MultiScan Go)

3.3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

3.3.2.1. Hücre kültürü:

- Lenfosit ayırma solüsyonu (Capricorn) (LSM-A)
- Fetal Bovine Serum (Capricorn) (FBS-11A)
- L-glutamine (Capricorn) (GLN-B)
- Penicilin/Streptomycin 100x (Capricorn) (PS-B)
- RPMI (Capricorn)(RPMI-A)
- Trypan Blue
- LPS 25 mg (Sigma)
- PBS (Capricorn)(PBS-10XA)

3.3.2.2. Western blot:

- İzopropil alkol
- Etil alkol
- APS
- SDS
- Bisacrilamid
- Commassive Blue
- Blocking Buffer
- Tris-Glisin Tamponu 10x (Thermo Scientific™, #28363)
- Buph Trıs-Hepes-Sds Yürütme Tamponu (Thermo Scientific™, #28398)
- Pıerce Proteın-Free (Tbs) Bloklama Tamponu (Thermo Scientific™, #37570)
- Lds Örnek Tamponu Non-Reducıng (4X) (Invitrogen™, #NP0007)
- Pvdf Transfer Membranı, 0.45 um, 10 cm x 10 cm (Thermo Scientific™, #88585)
- Pıerce ECL Plus Western Blotlama Solüsyonu
- Western Blot Filtre Kağıdı 10 cm x10 cm

- Tris
- Temed
- TLR4 Antikoru (Santa Cruz/sc-293072)
- Rabbit Polyclonal Anti-Beta Actin Antibody (Abcam ab119716, 1:500)

3.3.3. Çalışmada Kullanılan Kitler

3.3.3.1. Protein izolasyonu:

- M-Per™ Mammalian Protein Extraction (Thermo Scientific™ , #78501)

3.3.3.2. Protein konsantrasyon ölçümü:

- SMART BCA Protein Assay Kit (21071)

3.3.3.3. RNA izolasyonu:

- RNA izolasyon Kiti (GeneAll) (305-101)

3.3.3.4. Real-Time PCR:

- cDNA Sentez Kiti (A.B.T.) (C03-01-05)
- 2X qPCR SYBR Green Master Mix (A.B.T.) (Q03-01-05)
- Primer

3.3.3.5. ELİSA:

- IL-1β Elisa Kit (Thermo Scientific™, #M420BB)
- IL-18 Elisa Kit (Thermo Scientific™, #BMS267-2)

3.3.4. Çalışmada Kullanılan Tampon Çözeltilerin Hazırlanışı

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

- **1.5 M Tris- CI:** 50 mL distile su içerisine 9,09 gr Tris eklenerek SDS-PAGE jel elekroforezinde ayırma jeli için gerekli olan Tris-CI çözeltisi hazırlandı. HCI yardımıyla pH 8,8 olacak şekilde ayarlandı. Çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi.

- **1.0 M Tris-CI:** 50 mL distile su içerisine 6,06 gr Tris eklenerek SDS-PAGE jel elekroforezinde yığma jeli için gerekli olan Tris-CI çözeltisi hazırlandı. HCI

yardımıyla pH 6,8 olacak şekilde ayarlandı. Çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi.

- **%10 Sodyum Dedosil Sülfat (SDS):** 10 mL distile su içerisinde 0,1 gr SDS çözülerek hazırlandı. SDS-PAGE jel elekroforezinde hem yığma hem de ayırma jeli için hazırlandı. Çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi.

- **%10 Amonyum Per Sülfat (APS):** 10 mL distile su içerisinde 0,1 gr APS çözülerek hazırlandı. SDS-PAGE jel elekroforezinde hem yığma hem de ayırma jeli için hazırlandı. 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. Hazırlanan tamponun pH'ı 8,3'e ayarlandı.

3.3.3.2. Western blot için hazırlanan tampon ve çözeltiler:

- **Jel boyama solüsyonunun hazırlanışı:** SDS-PAGE jel elektroforezinde jelin boyanıp, proteinlerin gözlemlenmesi için 0,5 gr %0,1 Comassive Blue Brillant, 200 ml %40 Metanol, 10 ml %2 Asetik asit kimyasalları eklendikten sonra distile su ile 500 ml'ye tamamlanır. Manyetik karıştırıcıda karıştırılarak, homojen hale getirildi. Tampon oda sıcaklığında muhafaza edildi.

- **Jel boyasını çözme tamponunun hazırlanışı:** SDS-PAGE jel elektroforezinde, boyanan jelin, boyasının sökülmesi için 200 ml %40 methanol ve 10 ml %2 glacial asetik asit üzerine distile su eklenerek 500 ml'ye tamamlanır. Çözelti oda sıcaklığında inkübe edildi.

- **Transfer solüsyonunun hazırlanışı:** SDS-PAGE jel elektroforezinde, jelin PVDV 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 +4Co 'de muhafaza edildi.

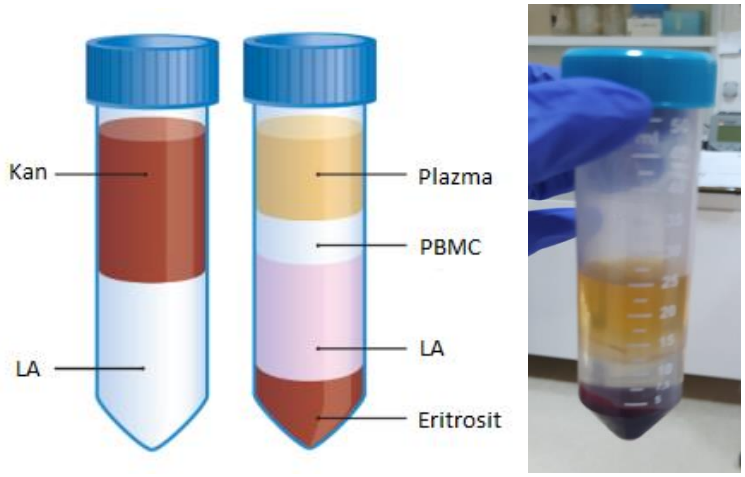
- **Yıkama tamponunun hazırlanışı:** Western Blot aşamasında, transfer sonrası membranı, methanolden ve bloklama sonrası bloklama solüsyonundan sonra uzaklaştırmak için 1 L distile suyun içinde 100 ml 10X PBS çözeltisi eklendi. Daha sonra içerisine %0,1 Tween 20 eklenerek, oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.4. YÖNTEM

3.4.1. Periferal Mononükleer Hücre İzolasyonu

Hastalardan rutin muaneleri sırasında alınan EDTA'lı tüpte 15 mL tam kandan aynı gün içersinde Periferal mononükleer hücre (PBMC) izolasyonu yapılmıştır. PBMC izolasyon aşağıdaki aşamalar uygulandı.

- Onbeş mililitre periferal kan üzerine 15 ml PBS eklendi ve ters-düz edilerek karıştırıldı.
- Elli mililitrelik falcona oda sıcaklığında 15 ml lenfosit ayırıcı (LA) solüsyon eklendi.
- Dilue edilen kan, LA solüsyon üzerine pipet yardımıyla sızdırarak eklendi. Bu aşamada kan ve lenfosit ayırıcı solüsyonun birbirine karıştırılmamalıdır.
- Daha sonra 500 rcf'de 25 dk 19^{o}C'de santrifüj edildi. Ayrılmış katmanları korumak için fren kapatıldı.
- Lenfositler ve diğer mononükleer hücreler (%70 ila %100 zenginleştirme), plazma ve ayırma çözeltisi arasındaki beyaz bulutlu tabaka konsantre olur (Şekil 3.1).
- Beyaz tabaka pipet ile 15 ml'lik yeni bir steril tüpe aktarılır.
- PBS ile doldurun ve 15 dakika boyunca 300 g'de bir veya iki kez yıkanır.
- Daha fazla uygulama için hücre peletini uygun ortamda yeniden süspanse edilir.



Şekil 3.1: Santrifüjden önce (solda) ve sonra (sağda) kan ayırma tüpü

3.4.2. Hücre Sayımı

Hücre sayımı için 0,5 µl'lik ependorfa 80 µl RPMI, 10 µl Trypan blue, 10 µl hücre eklenerek karıştırılır. Daha sonra thoma lamına lamelin kenarından sızdırarak 10 µl eklenir. Mikroskopta 10'luk objektifte canlı hücreler sayılır.
Hesaplaması; karelerde sayılan canlı hücre sayısı ortalaması x dilüsyon faktörü x 10^4

3.4.3. LPS ile Periferal Mononükleer Hücre İndükleme

Real-Time PCR için $5x10^6$, Western Blot için $5x10^6$ PBMC petri kablarına ve ELISA için $1x10^5$ PBMC 96 kuyucuklu plakalara yerleştirildikten bir gün sonra (24 saat), PBMC'ler 1 µg/ml olacak şekilde LPS ile uyarılacaktır. LPS ile stimüle edilen PBMC'ler 24 saat inkübe edilecektir. İnkübasyon sürelerinden sonra, hücreler liziz edilir ve daha sonra protein ve RNA izole edildi. ELISA analizleri icin, LPS ile stimüle edilen PBMC'ler 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sürelerinden sonra, süpernatantlar toplanacak ve inflamatuar sitokinlerin düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçüldü.

3.4.4. RNA İzolasyonu

1. Santrifüj ile hücreler toplanır, ardından tekrarlayan pipetleme veya vorteksleme yoluyla ~1 x 10^7 PBMC başına 1 ml RiboExTM içinde parçalanır.
   Not: mRNA bozulmasına katkıda bulunabileceğinden, hücreleri RiboExTM ile parçalamadan önce yıkamayın.

2. Homojenatı oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edin. Bu adım, nükleoprotein komplekslerinin tamamen ayrışmasına izin verilir. Homojenize numuneler -70°C'de en az bir ay saklanabilir.
3. Bu adım opsiyoneldir: 4°C'de 10 dakika 12.000 x g'de santrifüjleyin ve süpernatantı yeni bir tüpe aktarılır. Bu isteğe bağlı adım, yalnızca yüksek miktarda protein, yağ, polisakkarit veya kaslar, yağ, doku ve bitkilerin yumrulu kısımları gibi hücre dışı materyaller içeren homojenat için gereklidir. Elde edilen pelet hücre dışı membranlar, polisakkaritler ve yüksek moleküler ağırlıklı DNA içerirken, süpernatant RNA içerir. Yağ dokusu örnekleri sulu fazın üzerinde bir tabaka oluşturacaktır, bu nedenle bu tabakayı çıkarılır ve atılır.
4. Bir ml RiboExTM başına 0,2 ml kloroform ekleyin. Onbeş saniye kuvvetlice çalkalayın ve 2 dakika oda sıcaklığında saklanır. Alternatif olarak, kloroform yerine 0.1 ml BCP (1-bromo-3-kloropropan) kullanılabilir.
5. 4°C'de 15 dakika boyunca 12.000 x g'de santrifüjlenir ve sulu fazı yeni bir tüpe aktarılır. Karışım üç faza ayrılacaktır; bir alt tabaka, bir ara faz ve bir renksiz üst sulu tabaka. Üst sulu katman, homojenizasyon için kullanılan RiboExTM hacminin yaklaşık %50'sidir. >8°C sıcaklıklarda santrifüjleme, bazı DNA'ların sulu fazda bölünmesine neden olabilir.
6. Numuneye 1 hacim tampon RB1 ekleyin ve ters çevirerek iyice karıştırılır. Santrifüj etmeyin.
7. Karışımın 700 ul'ye kadarını mini spin kolonuna aktarılır.
8. Oda sıcaklığında ≥ 10.000 x g'de 30 saniye santrifüjleyin. Geçişi atın ve mini döndürme kolonunu tekrar aynı tüpe takılır.
9. Numunenin geri kalanını kullanarak adım 7 ve 8. adımı tekrarlanır.
10. Mini spin kolonuna 500 ul tampon SW1 ekleyin. Oda sıcaklığında ≥ 10.000 x g'de 30 saniye santrifüjlenir.
11. Mini spin kolonuna 500 ul tampon RNW ekleynir.
12. Oda sıcaklığında ≥ 10.000 x g'de 30 saniye santrifüjlenir.
13. Geçişi atın ve mini döndürme kolonunu tekrar aynı tüpe takılır.
14. Kalan yıkama tamponunu çıkarmak için oda sıcaklığında 1 dakika daha ≥ 10.000 x g'de santrifüjlenir. Mini spin kolonunu yeni bir 1.5 ml tüpe aktarılır.
15. Mini spin kolonundaki filtrenin merkezine 50 ~ 100 ul RNaz içermeyen su eklenir. 1 dakika bekletilir.

16. Oda sıcaklığında 1 dakika boyunca ≥ 10.000 x g'de santrifüjlenir.
17. Saflaştırılmış RNA, anında analiz için 4°C'de saklanır ve uzun süreli saklama için -80°C'de saklanabilir.

3.4.5. RNA Konsantrasyon Ölçümü

RNA konsantrasyonunun ve saflığının tespit edilmesi için MultiScanGo spektrofotometre cihazı kullanılarak 230 ve 260 nm dalga boyunda ışığı soğurma (OD) ölçümü yapıldı. RNA'nın saflık derecesi 260 nm'deki OD/230 nm'deki OD oranı hesaplanarak bulundu. RNA'nın saflık oranı 260/230 değerinin 2.0-2.0 aralığında olması beklenir.

3.4.6. cDNA Eldesi ve Kontrol PCR

RNA konsantrasyon ölçümü yapıldıktan sonra cDNA'lar oluşturuldu. Total RNA örnekleri eşit konsantrasyona getirilerek cDNA sentezi yapıldı ve aşağıdaki reaksiyon karışım hazırlandı (Tablo 3.1). Sonrasında örnekler PCR cihazına yerleştirildi ve reaksiyon şartları girilerek reaksiyon başlatıldı (Tablo 3.2).

Tablo 3.1: cDNA sentez reaksiyonu

Reaktifler	Miktarı
10X Reaction Buffer	2 µl
dNTP mix (2.5 mM each)	1 µl
Random hexamer (50 µM)	2 µl
Reverse Transcriptase (200 U/µl)	1 µl
RNase Inhibitor	0,5 µl
RNase free Water	3,5 µl (değişebilir)
RNA Template (1000 ng)	10 µl (değişebilir)
Toplam	20 µl

Tablo 3.2: cDNA sentezi reaksiyonu şartları

PCR Adımları	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
Adım 1	25	10 dakika	1
Adım 2	37	120 dakika	1
Adım 3	85	5 dakika	1
Adım 4	4	∞	1

ß-aktin geni kontrol geni olarak kullanılarak PCR yapıldı ve cDNA'lar kontrol edildi (Tablo 3.2) (Tablo 3.3) (Tablo 3.4). Bu protokoller TLR4 ve NF-κB genlerine de uygulandı.

Tablo 3.3: Real-Time PCR Reaksiyonu

	Miktar
Su	5 µl
Sybrgreen	10 µl
Primer (F)	0,5 µl
Primer (R)	0,5 µl
cDNA	4 µl
Toplam	20 µl

Tablo 3.4: cDNA Real-Time PCR Koşulları

Aşama	Sıcaklık	Süre/Döngü
Ön Denatürasyon	95	5 dk, 1 döngü
Denatürasyon	95	15 sn } 40 döngü
Primerin Bağlanması	60	1 dk }
Melting Curve	95	1 dk
	65	30 sn
	95	5 sn

3.4.7. Protein İzolasyonu

- Hücreler 2500 rcf'de 10 dk santrifüj edilir. Süpernatant atılır.
- Hücreleri yıkamak amacıyla PBS eklenir, 2500 rcf'de 10 dk santrifüj edilir.
- Yüz µl hücreye (100 mg) 1 ml M-Per solüsyonu eklenir.
- On dakika yavaşça karıştırın. 14000 rcf'de 15 dk santrifüj ediniz.
- Süpernatantı ayrı bir ependorfa alınız. Ölçüm için analiz edilir.

3.4.8. Protein Ölçümü

PBMC örneklerinden izole edilen protein konsantrasyonunun ölçümü SMART BCA Protein Assay Kit ile yapıldı. Çalışmadan önce standartlarla birlikte tüm örnekler dilue edildi sonra 25 µL örnekler ve standartlar 96'lık plate'lere eklendi. Çalışma solüsyonu 50:1 dilue edildikten sonra 200 µL örneklerin üzerine eklenerek 1,5 saat 37^{o}C'de inkübe edildi ve alüminyum folyo ile sarıldı. OD ölçümleri 562 nm'de yapıldı.Tüm örneklerin konsantrasyonu çıkan eğriye göre hesaplandı.

3.4.9. Protein Seviyesinin Western Blot Yöntemi ile Belirlenmesi

Protein blotlama, proteinlerin hareketsizleştirici bir zara transferini içerir. En yaygın olarak kullanılan blotlama yöntemi, çözülmüş proteinlerin bir poliakrilamid jelden bir nitroselüloz veya poliviniliden diflorür (PVDF) tabakasına elektroforetik transferidir ve genellikle "Western blot" olarak adlandırılır. Elektroforetik transfer, proteinleri jellerden ayrıştırmak ve onları bir matris üzerinde hareketsiz hale getirmek için bir elektrik alanının itici gücünü kullanır. Bu yöntem hızlı, verimli ve protein yapısını yüksek çözünürlüğünü korur. Şu anda elektroblotlama aparatının iki ana konfigürasyonu vardır: (1) dikey olarak yerleştirilmiş telle veya plaka elektrotlara sahip tampon tankları ve (2) düz plaka elektrotlarla yarı kuru transfer.

3.4.9.1. SDS-Page jel elektroforezi: 20 yeni tanı konmuş Crohn hastası ve 20 sağlıklı bireyden alınan kan örneklerinden izole edilen PBMC'lerde ilgili proteinlerin seviyeleri Western Blot yöntemi ile belirlenmiştir. Bu amaçla, $5x10^{6}$ PBMC'nin LPS stimulasyonundan önce ve sonra TLR4 düzeyleri belirlenmiştir. Çalışmamızda Western Blot'un ilk aşaması olan SDS-Page için Thermo Scientific OWL-P81 cihazı kullanılmıştır.

Tablo 3.5: %10'luk ayırma jeli hazırlanması

Malzemeler	Miktarlar
distile su	2 mL
1.5 M Tris-CI (PH:8.8)	1,7 mL
Bis-acrilamid	1,3 mL
%30 SDS	50 µL
%10 APS	50 µL
Temed	10 µL

Ayırma jeli Tablo 3.5'e göre hazırlandıktan sonra tanka dökülür. Jelin düzleşmesini sağlamak amacı ile üzerine 2ml izopropil alkol eklenmiştir. 30 dakika inkübasyonun ardından izopropil alkol, distile su yardımıyla uzaklaştırıldı.

Tablo 3.6: Toplayıcı jelin hazırlanması

Malzemeler	Miktarlar
Distile su	1,4 mL
1.0 M Tris-CI (pH:6.8)	330 µL
Bis-acrilamid	250 mL
%30 SDS	20 µL
%10 APS	20 µL
Temed	20 µL

Toplayıcı jelin Tablo 3.6'ya göre hazırlandı ve Jel 30 dakika kurumaya bırakıldı. Kuyucuklara marker ve sırasıyla hastalardan elde edilen PBMC'lerin proteinleri 70°C'de 10 dk bekletildikten sonra 10 µL ve 4 µL LDS buffer eklendi. Jel 100 V'da 40-45 dakika yürütüldü.

3.4.9.2. Semi-Dry Western Blot yöntemi ile TLR4'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.

- PVDF membran ve filtrelerin aktifleşmesi için 15 dakika methanolde 10 dakika bekletildi.
- Jel 10 mL transfer solüsyonda 10 dakika boyunca çalkalayıcı yardımıyla inkübe edildi.
- Sırasıyla filtre, jel, membrane ve filtre üst üste konularak blotlama için "sandwich" methoduna göre hazırlandı ve blotlama yapmak üzere Thermo Scientific OWL HEP-1 markalı semi-dry cihazına aktarıldı.
- 15V- 200 mA'de 30 dakika boyunca transfer edildi.
- Blotlama yöntemiyle protein membrana geçirildi.
- Membrane blotlama sonrası 3-5 saniye PBS-T yardımıyla yıkandı, transfer solüsyonu membrandan uzaklaştırıldı.
- Membran 1,5 saat boyunca bloklama solüsyonunda inkübe edildi.
- Daha sonra spesifik antikor olan TLR4 antikoru 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.

3.4.10. ELİSA

3.4.10.1. IL-1β ELİSA kiti:

1. Stripleri ilk aşamada kuyu başına yaklaşık 400 µL Yıkama Tamponu ile iki kez yıkanır. Aspirasyondan önce Yıkama Tamponunun kuyularda yaklaşık 10 – 15 saniye bekletildi.

2. Son yıkamadan sonra, kuyuları boşaltıp kalan Yıkama Tamponunu çıkarmak için kağıt havlu üzerinde stripleri şeritleri dokundurarak kurutuldu. Stripleri 15 dakikadan uzun olmamak üzere ıslak emici bir kağıt üzerine baş aşağı yerleştirilebilir. Kuyuların tamamen kuruması gerekir.
3. Standartlar seri dilüsyon tüplerde hazırlandı.
4. Tüm standart kuyucuklara iki kopya halinde 100 µL Sample Diluent eklendi.
5. Blank kuyucuklara iki kopya halinde 100 µL Sample Diluent eklendi.
6. Numune kuyularına 50 µL Sample Diluent eklendi.
7. Numune kuyularına kopya halinde her numuneden 50 µL eklendi.
8. Kit protokolüne göre Biotin-Conjugate hazırlandı.
9. Tüm striplere 50 µL Biotin-Conjugate eklendi.
10. Striplerin üzeri yapışkan bir filmle örtülür ve çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında (18 ila 25°C) 2 saat inkübe edildi.
11. Kit protokolüne göre Streptavidin-HRP'yi hazırlandı.
12. Yapışkan filmi çıkarılır ve kuyular boşaltılır. Striplerini test protokolünün 2. maddesine göre 3 kez yıkandı.
13. Tüm kuyucuklara 100 µL seyreltilmiş Streptavidin-HRP eklendi.
14. Yapışkan bir filmle örtülür ve çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında (18° ila 25°C) 1 saat inkübe edildi.
15. Yapışkan filmi çıkarılır ve kuyuları boşaltılır. Mikrokuyu striplerini test protokolünün 2. maddesine göre 3 kez yıkandı.
16. Tüm kuyucuklara 100 µL TMB Substrate Solution pipetlendi.
17. Stripler oda sıcaklığında (18°-25°C) yaklaşık 10 dakika inkübe edildi. Yoğun ışığa doğrudan maruz kalmaktan kaçının. Plakadaki renk gelişimi izlendi. En yüksek konsantrasyondaki standart koyu mavi bir renk oluşturduğunda durdurma solüsyonunun eklendi. Ayrıca renk gelişimi, ELISA cihazıyla 620 nm'de izlenebilir. Standart 1, 0.9 – 0.95'lik bir OD'ye ulaşır ulaşmaz substrat reaksiyon durduruldu.
18. Tüm striplere 100 µL Durdurma Solüsyonunu hızlı bir şekilde pipetleyerek enzim reaksiyonunu durduruldu. Durdurma Solüsyonunun enzimi tamamen inaktive etmek için mikro kuyucuklar boyunca hızlı ve eşit bir şekilde yayılması önemlidir. Sonuçlar, Durdurma Solüsyonu eklendikten hemen sonra veya mikro kuyucuk şeritleri bir saat içinde okutuldu.

19. Birincil dalga uzunluğu olarak 450 nm (isteğe bağlı olarak referans dalga uzunluğu olarak 620 nm; 610 nm ila 650 nm kabul edilebilir) kullanarak bir spektro-fotometrede her mikro kuyunun absorbansı okutuldu. Boş kuyuları kullanarak üreticinin talimatlarına göre plaka okuyucuyu boşaltıldı. Hem numunelerin hem de standartların absorbansını belirlendi.

3.4.10.2. IL-18 ELİSA kiti:

1. Stripleri ilk aşamada kuyu başına yaklaşık 400 µL Yıkama Tamponu ile 6 kez yıkandı. Aspirasyondan önce Yıkama Tamponunun kuyularda yaklaşık 10 – 15 saniye bekletildi.
2. Son yıkamadan sonra, kuyuları boşaltıp kalan Yıkama Tamponunu çıkarmak için kağıt havlu üzerinde stripleri şeritleri dokundurarak kurutuldu. Stripleri 15 dakikadan uzun olmamak üzere ıslak emici bir kağıt üzerine baş aşağı yerleştirildi. Kuyuların tamamen kuruması gerekir.
3. Standartlar seri dilüsyon (5000 pg/ml, 2500 pg/ml, 1250 pg/ml, 625 pg/ml, 313 pg/ml, 156 pg/ml, 78 pg/ml) tüplerde hazırlandı.
4. Tüm standart kuyucuklara iki kopya halinde 100 µL Sample Diluent eklendi.
5. Blank kuyucuklara iki kopya halinde 100 µL Sample Diluent eklendi.
6. Numune kuyularına 50 µL Sample Diluent eklendi.
7. Numune kuyularına her numuneden 50 µL eklendi.
8. Kit protokolüne göre Biotin-Conjugate hazırlandı.
9. Tüm striplere 50 µL Biotin-Conjugate eklendi.
10. Striplerin üzeri yapışkan bir filmle örtüldü ve çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında (18 ila 25°C) 2 saat inkübe edildi.
11. Kit protokolüne göre Streptavidin-HRP'yi hazırlandı.
12. Yapışkan filmi çıkarıldı ve kuyular boşaltıldı. Striplerini test protokolünün 1. maddesine göre 6 kez yıkandı.
13. Tüm kuyucuklara 100 µL seyreltilmiş Streptavidin-HRP eklendi.
14. Yapışkan bir filmle örtülür ve çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında (18° ila 25°C) 1 saat inkübe edildi.
15. Yapışkan filmi çıkarıldı ve kuyuları boşaltıldı.
16. Tüm kuyucuklara 100 µL TMB Substrate Solution pipetlendi.

17. Stripler oda sıcaklığında (18°-25°C) yaklaşık 10 dakika inkübe edildi. Yoğun ışığa doğrudan maruz kalmaktan kaçınıldı. Plakadaki renk gelişimi izlendi. En yüksek konsantrasyondaki standart koyu mavi bir renk oluşturduğunda durdurma solüsyonunun eklendi. Ayrıca renk gelişimi, ELISA cihazıyla 620 nm'de izlendi. Standart 1, 0.9 – 0.95'lik bir OD'ye ulaşır ulaşmaz substrat reaksiyonu durduruldu.
18. Tüm striplere 100 µL Durdurma Solüsyonunu hızlı bir şekilde pipetleyerek enzim reaksiyonunu durduruldu. Durdurma Solüsyonunun enzimi tamamen inaktive etmek için mikro kuyucuklar boyunca hızlı ve eşit bir şekilde yayılması önemlidir. Sonuçlar, Durdurma Solüsyonu eklendikten hemen sonra veya mikro kuyucuk şeritleri bir saat içinde okutuldu.
19. Birincil dalga uzunluğu olarak 450 nm (isteğe bağlı olarak referans dalga uzunluğu olarak 620 nm) kullanarak bir spektro-fotometrede her mikro kuyunun absorbansını okutuldu. Boş kuyuları kullanarak üreticinin talimatlarına göre plaka okuyucuyu boşaltıldı. Hem numunelerin hem de standartların absorbansını belirlendi.

3.4.11. İstatiksel Analiz

Çoklu grupları karşılaştırmak için one-way ANOVA ve Unpaired t testi kullanıldı. Tüm gruplar arasındaki varyasyonlar Student's t testleri ile incelendi. Her test için $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. TLR4 VE NF-κB EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN TESPİTİ

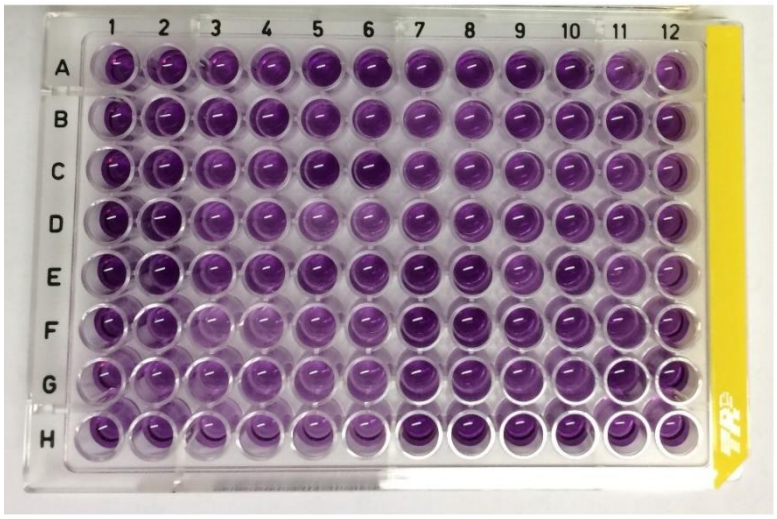
LPS ile uyarım öncesi TLR4 ekspresyonu 13,69, uyarım sonrası ekspresyonu 6.38 kat olarak tespit edilmiştir. LPS ile uyarım öncesi NF-κB ekspresyonu 11,21 kat, uyarım sonrası ekspresyonu 2,22 kat olarak tespit edilmiştir. TLR4 ve NF-κB ekspresyonu uyarıma rağmen ekspresyonları giderek azalmıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: TLR4 ve NF-κB genlerinin kat değişimi

	Uyarma öncesi		Uyarma sonrası	
	Kat değişimi	p değeri	Kat değişimi	p değeri
TLR4	13,69	**0,001309**	6,38	**0,015136**
NF-κB	11,21	**0,022293**	2,22	**0,027667**

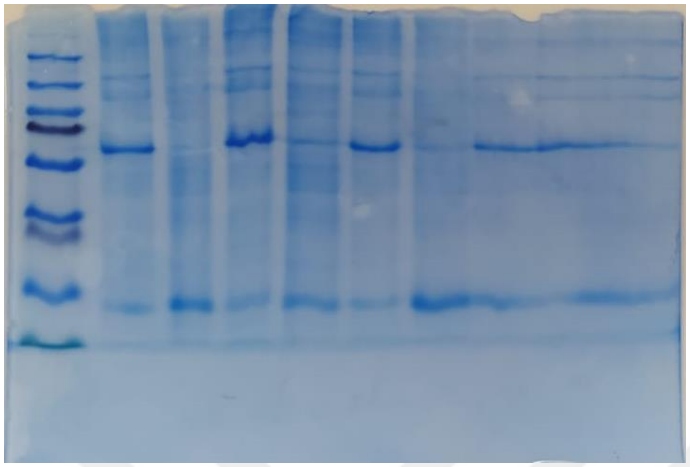
4.2. PROTEİNİNİN SDS-PAGE İLE GÖSTERİLMESİ

Proteinleri jele yüklemeden önce protein konsantrasyonları BCA kit ile OD ölçümü yapılarak belirlendi (Şekil 4.1). SDS-PAGE deneyinde her bir kuyucuğa 20 µg örnek yüklendi.



Şekil 4.1: Proteinlerin konsantrasyon ölçüm plate görüntüsü

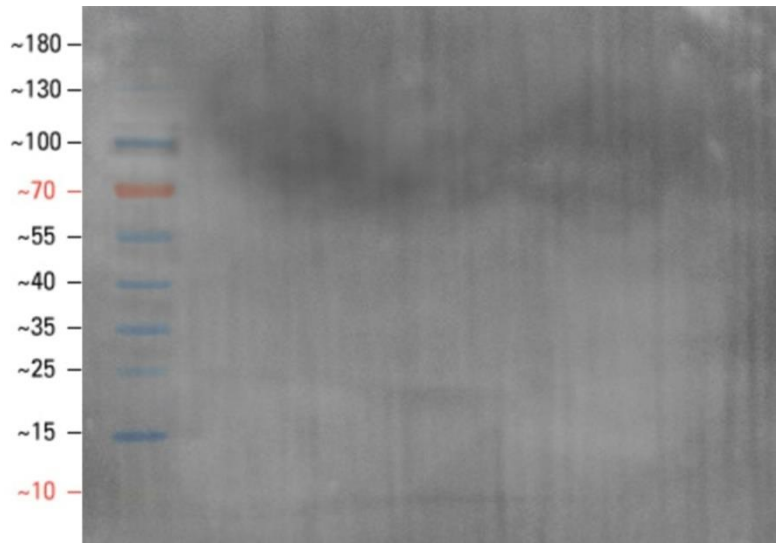
Şekil 4.2'de yeni tanılı Crohn hastaları ve kontrol grubunun Western Blot öncesi SDS-PAGE elektroforezi gösterildi.



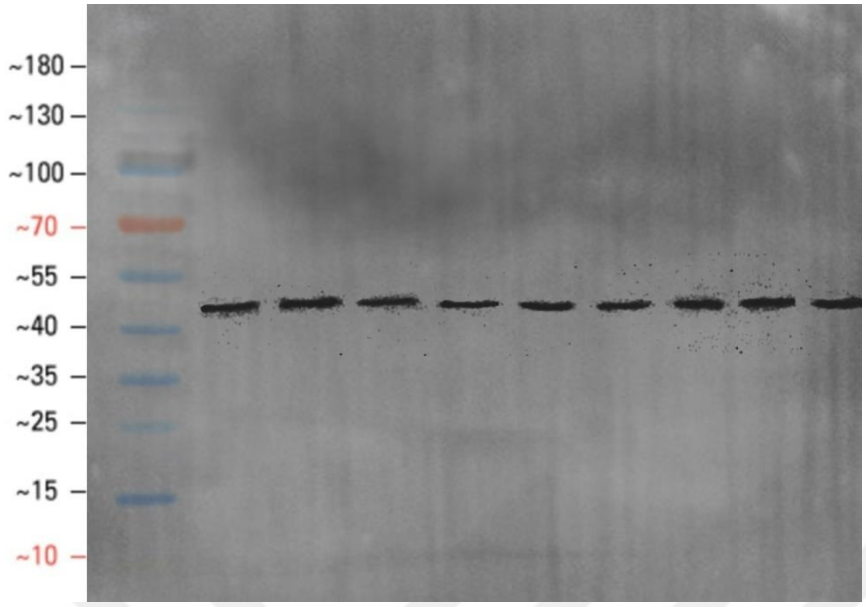
Şekil 4.2: Aktif yeni tanılı Crohn hastalarından ve kontrol örneklerinden elde edilen PBMC'lerin örneklerin protein jel elektroforez görüntüsü

4.3. TLR4 PROTEİNİNİN WESTERN BLOT İLE GÖSTERİLMESİ

Yeni tanılı Crohn hastaları grubunda TLR4 proteininin Western Blot görüntüsü Şekil 4.3'deki gibidir. TLR4 proteini (90 kD) saptanamamıştır. Yeni tanılı Crohn hastaları grubunda B-Actin proteininin (42 kD) Western Blot görüntüsü Şekil 4.4'deki gibidir.



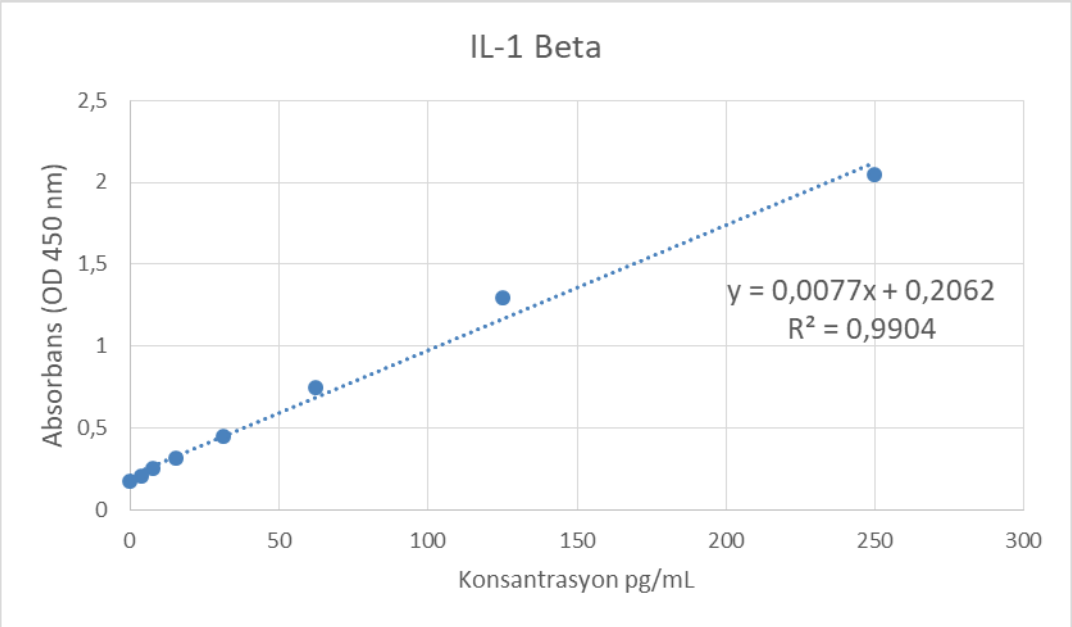
Şekil 4.3: Yeni tanılı Crohn hastaları grubunda TLR4 proteininin Western Blot yöntemi ile gösterilmesi



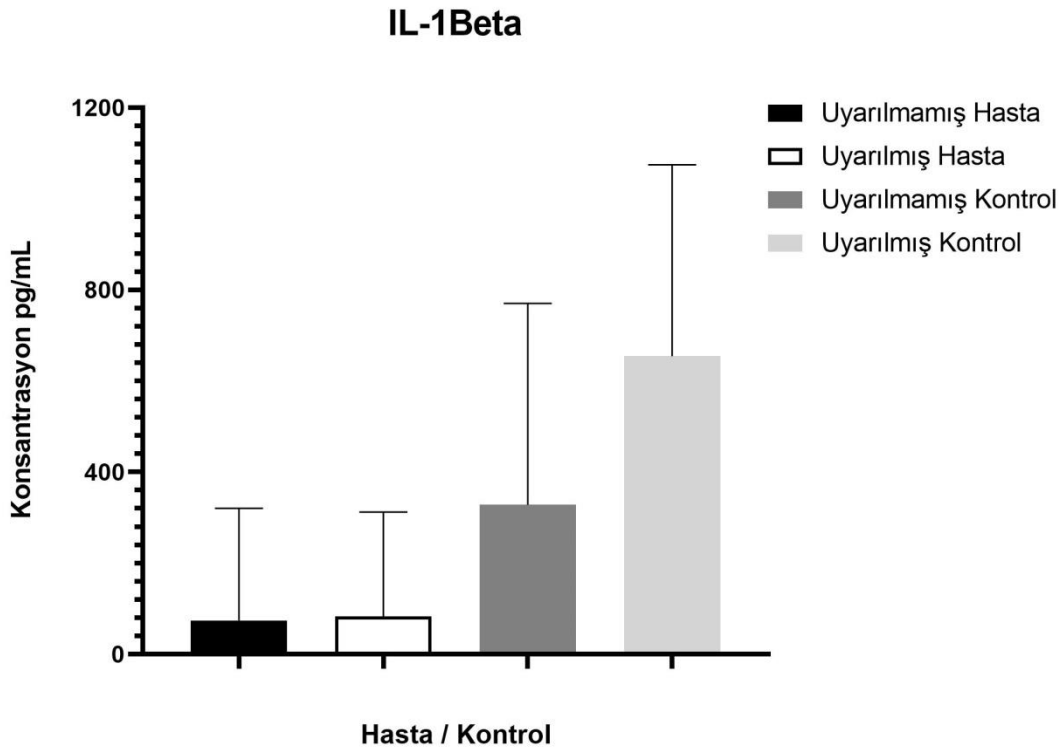
Şekil 4.4: Yeni tanılı Crohn hastaları grubunda B-Actin proteininin Western Blot yöntemi ile gösterilmesi

4.3. SÜPERNATANTLARDA IL-1β SEVİYESİNİN TESPİTİ

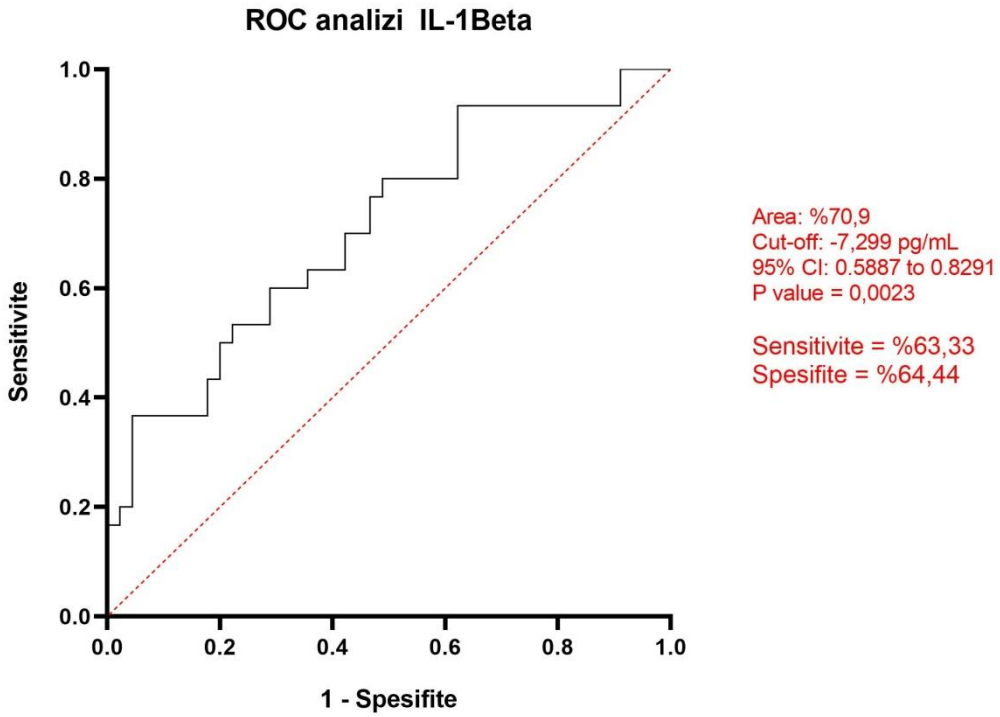
Tüm örneklerde IL-1β seviyesi ELISA yöntemi ile iki kez ölçüldü. Şekil 4.5'de IL-1β seviyesinin 450 nm'de ölçümü gösterildi ve IL-1β seviyesinin yeni tanı almış Crohn hastaları ve sağlıklı bireylerde karşılaştırılması yapıldı ve grafik analizi ve anlamlılık oranı Şekil 4.6'de gösterildi. Şekil 4.7'de IL-1β seviyesinin ölçüm spesifite ve hassaslık grafik analizi olan ROC seviyesi gösterildi. Çalışmamızda LPS ile uyarım öncesi ve sonrası yeni tanılı Crohn hastaları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, IL-1β seviyesi hastalarda daha düşük tespit edildi (uyarım öncesi p=0,0228, uyarım sonrası p=0,0001).



Şekil 4.5: Tüm hasta ve kontrollerde IL-1β seviyesinin 450 nm'de ölçümü



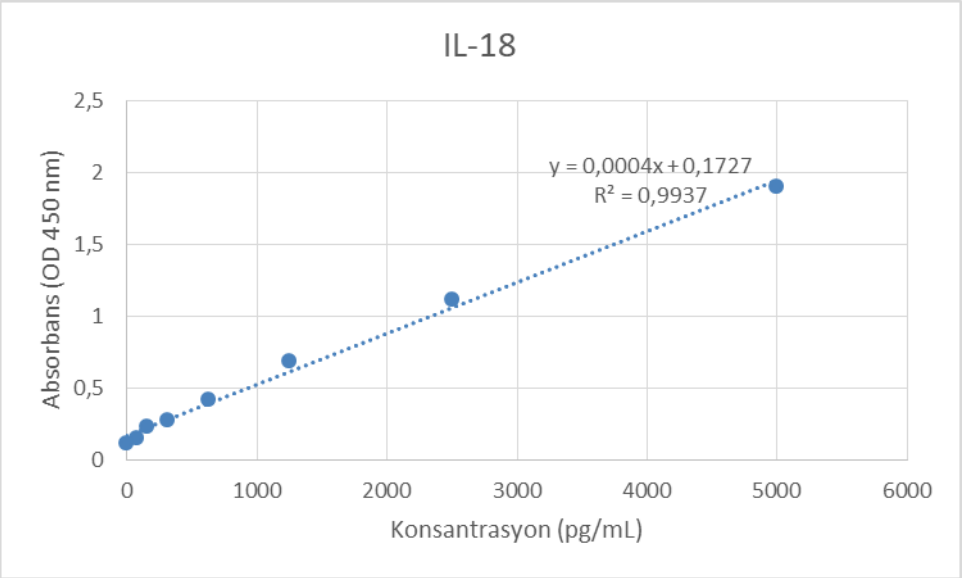
Şekil 4.6: IL-1β seviyesinin yeni tanı almış Crohn hastaları ve sağlıklı bireylerde karşılaştırılması



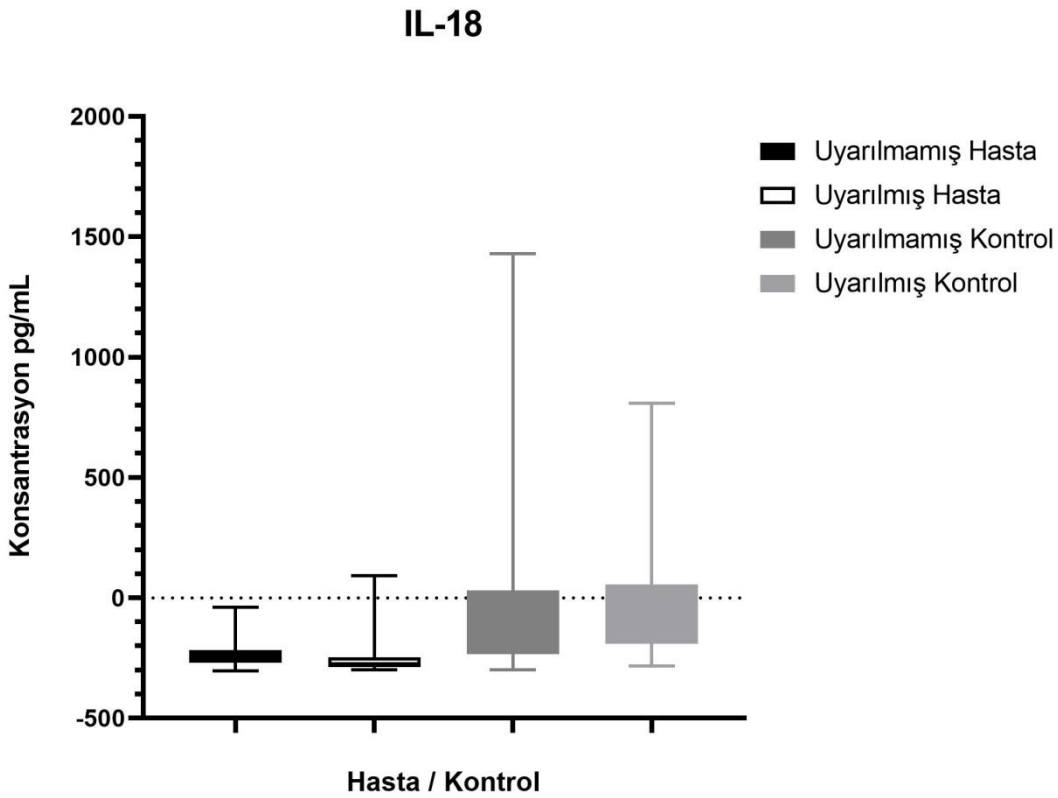
Şekil 4.7: IL-1β seviyesinin ölçüm spesifite ve hassaslık grafik analizi

4.4. SÜPERNATANTLARDA IL-18 SEVİYESİNİN TESPİTİ

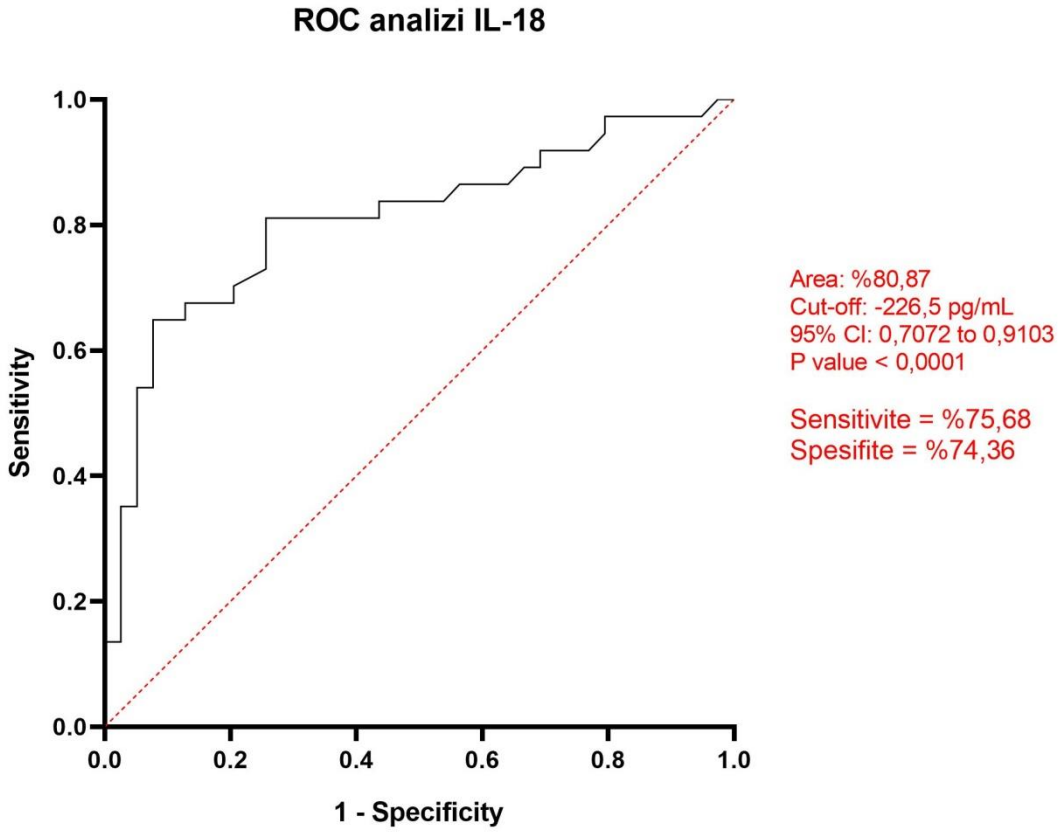
Tüm örneklerde IL-18 seviyesi ELISA yöntemi ile iki kez ölçüldü. Şekil 4.8'de IL-18 seviyesinin 450 nm'de ölçümü gösterildi ve IL-18 seviyesinin yeni tanı almış Crohn hastaları ve sağlıklı bireylerde karşılaştırılması yapıldı ve grafik analizi ve anlamlılık oranı Şekil 4.9'de gösterildi. Şekil 4.10'de IL-18 seviyesinin ölçüm spesifite ve hassaslık grafik analizi olan ROC seviyesi gösterildi. Çalışmamızda LPS ile uyarım öncesi ve sonrası yeni tanılı Crohn hastaları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, IL-18 seviyesi hastalarda daha düşük tespit edildi (uyarım öncesi p=0,0125, uyarım sonrası p=0,0357).



Şekil 4.8: Tüm hasta ve kontrollerde IL-18 seviyesinin 450 nm'de ölçümü



Şekil 4.9: IL-18 seviyesinin yeni tanı almış Crohn hastaları ve sağlıklı bireylerde karşılaştırılması



Şekil 4.10: IL-18 seviyesinin ölçüm spesifite ve hassaslık grafik analizi

5. TARTIŞMA

Bağırsak epitelinin farklı hücre tipleri, bağırsaklardaki bağışıklık sistemi aktivasyonunu yönlendiren Toll-benzeri reseptörlerin (TLR'ler) farklı kombinasyonlarını ifade edebilir. Örneğin, absorptif enterositler, Paneth hücreleri, goblet hücreleri, enteroendokrin hücreler gibi bağırsak hücreleri ile çeşitli profesyonel immün hücre alt kümeleri arasında TLR ifade çeşitliliği gözlemlenir. Bu TLR ifadesi, gastrointestinal sistemin farklı bölgelerinde farklılık gösterebilir (153). Örneğin, olgunlaşmamış dendritik hücreler (DH'ler) patojenik tehditlere hızla tepki vermek için TLR4'ü yüksek seviyelerde ifade ederken, bağırsak lumeninde yaygın olarak bulunan lipopolisakkarit (LPS) gibi maddelere karşı aşırı tepkisel bir TLR4 ifadesi göstermezler (154,155,156). Belirgin TLR ifade paternleri, bu nedenle, farklı stratejik konumlarda TLR ligand tanımanın farklı fonksiyonel gerekliliklerini yansıtabilir.

TLR'lerin ligand tanıma ve bağlanma özelliklerine bağlı olarak, stratejik olarak hücre yüzeyinde (örneğin TLR1/2/4/5/6) veya hücre içi bölmelerde (örneğin TLR3/7/8/9) yer alır. Bağırsak epitelyal TLR lokalizasyonu ve ligand yanıtı, hücresel aktivasyon (157,158), polarite (159) ve farklılaşma durumu tarafından kritik olarak değiştirilebilir (160). Örneğin, TLR2 ve TLR4, in vitro olarak farklılaşmış bağırsak hücrelerinde hücre yüzeyinin apikal bölgesinde tercihen bulunurlar (160). Diğer yandan, TLR5, in vitro olarak bağırsak epitelinin bazolateral bölgesinde istikrarlı bir şekilde ifade edilir. TLR4'ün hücre yüzey lokalizasyonunda kalmasını sağlayan MD-2 molekülü bulunsa da, TLR4 ayrıca hücre içi taşıma mekanizmaları aracılığıyla Golgi aygıtı, plazma zarı ve endozomal yapılar arasında taşınabilir. TLR'lerin hücresel yerleşimi ve ligand yanıtı, bağırsak hücrelerinin işlevsel durumu ve polaritesi gibi faktörlerden etkilenir. Bu durum, bağırsak epitelinin bağışıklık tepkilerini düzenlemesinde önemli bir rol oynar (160-163).

Ek olarak, farklı TLR'ler, Unc93B aracılığıyla TLR3/7/9 (164), PRAT4A aracılığıyla TLR1/4 (165), veya ısı şoku proteini 96 (166) aracılığıyla TLR4/9 gibi yardımcı moleküller yoluyla endoplazmatik retikulum (ER) ile etkileşime girebilir.

Bu tez çalışmasında, CD'nin oluşum mekanizmasına katkı sağlamak amacıyla CD'de TLR4'ün rolünü inceledik. Çalışmamıza yeni tanı almış aktif Crohn hastalığına sahip bireyler ve sağlıklı bireyler olmak üzere 40 gönüllü katıldı. Tüm bireylerden

PBMC örnekleri izole edildi. Hücre kültürü ortamında hücreler LPS ile uyarılarak TLR4 ve NF-κB ekspresyonları incelenmiştir. Uyarılma öncesi ve sonrası TLR4 ve NF-κB ekspresyonlarının azaldığı görülmüştür. Gibson ve arkadaşları kolitli fareler üzerinde yaptıkları çalışmada kolit sırasında TLR4'ün rolü uyarıcıya bağlı olarak hem koruyucu hem de zararlı olabilir, bu durum uyarıcıya bağlı olabilceğini bildirmişlerdir (167). Cari ve arkadaşları 2023'te yaptıkları çalışmada CD bağırsak dokularında TLR4 ekspresyonunu anlamlı bulmamışlardır (168). Cario ve Podolsky yaptıkları çalışmada (2000) CD bağırsak epitellerinde TLR4'ün aşırı eksprese olduğunu bildirmişlerdir (169). Çalışmamız literatür ile uyumludur.

LPS ile TLR4 etkileşimi, proinflamatuar mediatörlerin transkripsiyonel seviyesindeki indüksiyonunun ötesinde, proinflamatuar yanıtın kapanmasını posttranskripsiyonel olarak düzenleyen ve daha fazla LPS stimülasyonuna karşı geçici bir refrakterlik durumu indükleyen mikroRNA'lar (miRNA'lar) gibi aracıların indüksiyonunu da düzenler. Bu nedenle, aşırı inflamasyonu önlemek ve enfeksiyon veya yaralanmayı takiben doku onarımını başlatmak için doku homeostazında TLR4 sinyalinin sıkı bir şekilde düzenlenmesi önemlidir (170,171).

miRNA'lar, doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinin hem gelişiminde hem de işlevinde yer almıştır. Enflamatuar ligandla uyarılan monositler, miR-146 da dahil olmak üzere birçok miRNA'nın yukarı regülasyonunu gösterir. Birçok çalışma, miR-146a ifadesini NF-kB sinyaliyle ilişkilendirirken, miR-146b ile daha az nettir. Araştırmalar, miR-146a'nın insan monositlerinin aktivasyonu üzerine hızla indüklendiğini ve LPS ile indüklenen miR146a'nın IRAK1 ve TRAF6'yı hedef aldığını göstermektedir. Bu bulgu, miR146a'nın, bir negatif geri besleme düzenleme döngüsü aracılığıyla sitokin ve TLR sinyalini kontrol etmedeki rolünü ortaya koymaktadır (172).

Çalışmamız, yeni tanı almış Crohn hastaları ile sağlıklı bireylerden elde edilen periferik kan mononükleer hücrelerin (PBMC'ler) LPS ile uyarılarak IL-1β ve IL-18 sitokin seviyeleri incelemiştir. Yeni tanılı Crohn hastalarında, sağlıklı bireylere göre IL-1β ve IL-18 seviyelerinin düşük olduğu gözlemlenmiştir; IL-18 seviyesi, IL-1β seviyesinden daha düşük bulunmuştur. IL-1, lokal ve sistemik yanıtları uyararak proinflamatuar sitokinlerin bir örneği olarak kabul edilmektedir. Ancak, bu etkiler bazen zararlı olabilir, özellikle kronik inflamatuar hastalıklar ve septik şok gibi durumlarda. Bununla birlikte, bu yanıtlar enfeksiyonların kontrolü ve çözülmesinde de kritik öneme sahiptir (173). IL-1'in sistemik etkileri arasında hipotansiyon, ateş, nötrofil

artışı, trombositoz ve akut faz proteinlerinin üretimi bulunur. Bazı durumlarda, bu etkiler aşağı akıştaki sitokinlerin ve diğer enflamatuar mediatörlerin indüksiyonu yoluyla dolaylı olarak gerçekleşir (174). IL-1β'nin primer makrofajlardan salınımı için iki sinyal gereklidir: İlk olarak, Toll benzeri reseptörlerin (TLR'ler) aktivasyonuyla pro-IL-1β'nin transkripsiyon ve çevirisi gerçekleşir; ikinci olarak ise NLR tarafından uyarılan IL-1β işleme ve ekstraselüler ATP tarafından P2X purinoceptor 7'nin aktive edilmesiyle kaspaz-1 bağımlı bir mekanizma yoluyla IL-1β salınır (175). Buna ek olarak, taze izole edilmiş primer insan monositleri, TLR4 veya TLR2 ligandlarıyla tek bir uyarım sonrasında mIL-1β salınımı yapar (176). Bu durum, IL-1β'nin monositlerde ve makrofajlarda farklı şekillerde düzenlendiğini düşündürmektedir (177). Pro-IL-1β ayrıca ekstraselüler ortamda farklı enflamatuar proteazlar tarafından kesilebilir ve aktif IL-1β'ye dönüşebilir (178). Şaşırtıcı bir şekilde, NF-κB aktivasyonu makrofajlar ve nötrofiller tarafından IL-1β salınımı üzerinde inhibisyon etkisi yapar. Makrofajlarda, NF-κB kaspaz-1 bağımlı IL-1β işleme sürecini anti-apoptotik genlerin ekspresyonunu artırarak inhibe ederken, nötrofillerde IL-1β salınımı kaspaz-1 bağımlı değildir ve NFκB tarafından indüklenen gen ürünlerinin inhibe ettiği serin proteazlara bağlıdır (179). Ayrıca, adaptif bağışıklık sistemi, etkici ve hafıza CD4+ T hücrelerinin hücre yüzeyinde ifade edilen CD40 ligand gibi tümör nekroz faktörü (TNF) ailesi üyeleri aracılığıyla makrofajlar tarafından NALP3 inflamasom fonksiyonunu ve IL-1β salınımını aşağı regüle edebilir (180). Ayrıca Fas aracılı IL-1β aktivasyonu son çalışmalarda ortaya çıkmış olup, bu aktivasyon kaspaz-1 bağımsızdır ve Fas'ın IL-1β'nin nasıl aktive edildiği henüz bilinmemektedir (181).

Çalışmamızda yeni tanılı Crohn hastaları ile kontrol grubu LPS ile uyarım öncesi ve sonrası karşılaştırıldığında, IL-1β seviyesi hastalarda daha düşük bulundu (sırasıyla p=0,0228, p=0,0001) (Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7). Elde ettiğimiz sonuç, LPS uyarım öncesi NF-κB ekspresyonunu 11,21 kat artmıştır fakat LPS uyarım sonrası NF-κB ekspresyonunu 2,22 kat artış göstermiştir. Yine de IL-1β aktivasyonu çok az değişmiştir. Bu bulgular bize IL-1β seviyesinin yeni tanılı Crohn hastalarında bir sebepten inhibe edildiği ve başka mekanizmaların ya da aracıların IL-1β seviyesini etkileyebileceğini düşündürmektedir. En son yapılan çalışmalar, IL-1β ile ilgili daha fazla biyolojik ve fizyolojik mekanizmanın keşfedilmesi gerektiğini ve IL-1β sentez mekanizmalarının daha ayrıntılı olarak araştırılması gerektiğini göstermektedir. Ayrıca,

Crohn hastalarında IL-1β sentezinin inhibisyonunda farklı mekanizmaların varlığı anlaşılmaktadır.

Proinflamatuar sitokinlerden olan IL-18 seviyesi, Crohn hastaları kontrol grubuyla LPS uyarım öncesi ve sonrası karşılaştırıldığında daha düşük (sırasıyla p=0,0125, p=0,0357) gözlemlendi (Şekil 4.8, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10). IL-18, IL-1 ailesine ait bir proinflamatuar sitokin olup, sağlıklı insanların ve farelerin monosit/makrofajlar, antijen sunan hücreler ve epitelyal hücrelerinde inaktif bir öncü olarak sürekli olarak bulunur (182,183). Biyolojik olarak aktif IL-18, IL-1β öncüsünün hücre içi bir sistein proteaz olan kaspaz-1 tarafından kesilmesi sonucunda oluşur. IL-18, öncelikle endotoksemi modelinde farelerde IFN-γ üretimi indükleme yeteneğiyle keşfedilse de, IL-18 sadece bir IFN-γ indüktörü değildir. IL-18, IL-12 ile sinerji oluşturarak Th-1 immün yanıtını sürdürür, kemokinlerin ve hücre adezyon moleküllerinin indüksiyonuna yol açar, IL-1 ve TNF-α gibi inflamatuar sitokin salgılanmasını uyarır ve Fas ligandı ve perforin yollarının upregülasyonu aracılığıyla NK hücre sitotoksisitesini artırır (182-185). IL-18 ayrıca, Th-1 bağışıklık hastalıkları, grefte karşı konak hastalığı, romatoid artrit, Crohn hastalığı ve multipl sklerozun patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir (186-189). Bizim çalışmamızda LPS ile uyarımda IL-18 düzeyleri düşük çıkmıştır. Çalışmamız LPS ile uyarım ile IL-18 arasında bir ilişki olmadığını göstermektedir. Monteleone ve arkadaşları (1999) yaptıkları çalışmada hem CD hem de UC ve kontrol grubundaki mukozal ve lamina propria mononükleer hücre (LPMC) örneklerinde CD'den daha fazla IL-18 mRNA birikimi saptamışlardır. CD'de IL-18 transkriptleri, ilgili alanlardan alınan mukozal örneklerde daha fazla olduğunu göstermişlerdir (190).

Bu çalışma, yeni tanılı Crohn hastalarında IL-1β ve IL-18 seviyelerinin düşük olmasının ardında çeşitli mekanizmaların bulunduğunu ve bu mekanizmaların daha ayrıntılı olarak araştırılması gerektiğini göstermektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

TLR'ler, gastrointestinal sistemde çeşitli hücre tipleri tarafından farklı kombinasyonlarda ifade edilir ve bağırsak epitelyal hücrelerin yanı sıra immün hücrelerde bulunur. Bu hücrelerde TLR lokalizasyonu ve ligand yanıtı, hücresel aktivasyon, polarite ve farklılaşma durumuna bağlı olarak değişebilir. TLR4, bağırsak epitelyumun farklı bölgelerinde tercihen lokalize olurken, PBMC hücrelerinde mRNA ekspresyonu az gözlendi. TLR4'ün sinyal düzenlemesinde mikroRNA'lar gibi aracı moleküller rol oynayabilir. IL-1β ve IL-18, proinflamatuar sitokinlerdir ve Crohn hastalarında düşük seviyelerde bulunabilir. IL-1β'nin aktivasyonu, kaspaz-1 bağımlı ve bağımsız mekanizmalarla gerçekleşirken, IL-18, IL-1β'nin proteazlar tarafından kesilmesiyle aktif hale gelir. Crohn hastalığında IL-1β ve IL-18 sentezinin inhibe edilmesinde farklı mekanizmalar rol oynayabilir.

KAYNAKLAR

1. Özden, A. (2013). Türkiye'de İltihabi Bağırsak Hastalığı Tarihine Kısa Bakış. *Güncel gastroenteroloji dergisi*, 17(4), 294–301.
2. Cheifetz, A.S. (2013). Management of active Crohn disease. *JAMA*, 309(20):2150–8.
3. Cosnes, J., Cattan, S., Blain, A., Beaugerie, L., Carbonnel, F., Parc, R., et al. (2002). Long-term evolution of disease behavior of Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*, 8(4), 244-50.
4. Loftus, E.V. (2004). Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*, 126(6):1504–17.
5. Molodecky, N. A., Soon, I.S., Rabi, D.M., Ghali, W.A., Ferris, M., Chernoff, G., et al. (2012). Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*, 142(1), 46-54
6. Tozun, N., Atug, O., Imeryuz, N., Hamzaoglu, H.O., Tiftikci, A., Parlak, E., et al. (2009). Members of the Turkish IBD Study Group. Clinical characteristics of inflammatory bowel disease in Turkey: a multicenter epidemiologic survey. *Journal of Clinical Gastroenterol*, 43(1), 51-7
7. Ananthakrishnan, A.N. (2015). Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 12(4):205–17.
8. Mahid, S.S., Minor, K.S., Soto, R.E., Hornung, C.A., Galandiuk, S. (2006). Smoking and inflammatory bowel disease: A meta-analysis. *Mayo Clinical Proceedings*, 81(11):1462–71.
9. Higuchi, L.M., Khalili, H., Chan, A.T., Richter, J.M., Bousvaros, A., Fuchs, C.S. (2012). A prospective study of cigarette smoking and the risk of inflammatory bowel disease in women. *American Journal of Gastroenterol*, 107(9):1399–406.
10. Van Der Heide, F., Wassenaar, M., Van Der Linde, K., Spoelstra, P., Kleibeuker, J.H., Dijkstra, G. (2011). Effects of active and passive smoking on Crohn's disease and ulcerative colitis in a cohort from a regional hospital. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 23(3):255–61.
11. Ungaro, R., Bernstein, C.N., Gearry, R., Hviid, A., Kolho, K.L., Kronman, M.P., et al. (2014). Antibiotics associated with increased risk of New-Onset Crohn's disease but not ulcerative colitis: A metaanalysis. *American Journal of Gastroenterology*, 109(11):1728–38.
12. Cornish, J.A., Tan E., Simillis, C., Clark, S.K., Teare, J., Tekkis, P.P. (2008). The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: A meta-analysis. *American Journal of Gastroenterology*, 103(9):2394–400.
13. Ashwin, N., Ananthakrishnan, M., Higuchi, L., Huang, E., Khalili, H., Richter, J., et al. (2012). Aspirin, Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Use, and Risk for Crohn. *Annals Internal Medicine*,156:350–159.
14. Ungaro, R., Chang, H.L., Cote-Daigneaut, J., Mehandru, S., Atreja, A., Colombel, J.F. (2016). Statins Associated with Decreased Risk of New Onset Inflammatory Bowel Disease. *American Journal of Gastroenterol*, 111(10):1416–23.
15. Lakatos, P.L. (2009). Environmental factors affecting inflammatory bowel disease: Have we made progress? *Digestive Diseases and Sciences*, 27(3):215–25.
16. Amre, D.K., D'Souza, S., Morgan, K., Seidman, G., Lambrette, P., Grimard, G., et al. (2007). Imbalances in dietary consumption of fatty acids, vegetables, and fruits are associated with risk for crohn's disease in children. *American Journal of Gastroenterol*, 102(9):2016–25.
17. Sakamoto, N., Kono, S., Wakai, K., Fukuda, Y., Satomi, M., Shimoyama, T., et al. (2005). Dietary risk factors for inflammatory bowel disease: A multicenter case-control study in Japan. *Inflammatory Bowel Diseases*, 11(2):154–63.
18. Hou, J.K., Abraham, B., El-Serag, H. (2011). Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: A systematic review of the literature. *American Journal of Gastroenterol*, 106(4):563– 73.
19. Rodríguez, L.A.G., Ruigómez, A., Panés, J. (2006). Acute Gastroenteritis Is Followed by an Increased Risk of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*, 130(6):1588–94.
20. Joossens, M., Huys, G., Cnockaert, M., De Preter, V., Verbeke, K., Rutgeerts, P., et al. (2011). Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut*, 60(5):631–7.
21. Kostic, A.D., Xavier, R.J., Gevers, D. (2014). The microbiome in inflammatory bowel disease: Current status and the future ahead. *Gastroenterology*, 146(6):1489–99.
22. Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.L., Barnich, N., et al. (2004). High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 127(2):412–21.

23. Çelik, M., Yalçın, S.S. (2019). Aşılar ve Mikrobiyota. *Turkish Journal of Pediatric Disease*, 4:310-323
24. Özbek, M., Hitit, M., Ergün, E., Beyaz, F., Ergün, L. (2017). Toll Benzeri Reseptörler. *Mehmeet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 5(2): 180-192.
25. Fukata, M., Arditi, M. (2013). The role of pattern recognition receptors in intestinal inflammation. *Mucosal Immunology*, 3: 451-463.
26. Leal, R.F., Milanski, M., Ayrizono Mde, L., Coope, A., Rodrigues, V.S., Portovedo, M., et al. (2013). Toll-like receptor 4, F4/80 and pro-inflammatory cytokines in intestinal and mesenteric fat tissue of Crohn's disease. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2: 98-104.
27. Zhang, D., Ma, X., Wu, H., Hong, J., Zhang, C., Wu, L., et al. (2018). Efficacy of herb-partitioned moxibustion at Qihai (CV 6) and bilateral Tianshu (ST 25) on colonic damage and the TLR4/NF-κB signaling pathway in rats with Crohn's disease. *Journal Traditional Chinese Medicine*, 38(2): 218-226).
28. Javaid, N., Yasmeen, F., Choi, S. (2019). Toll-Like Receptors and Relevant Emerging Therapeutics with Reference to Delivery Methods. *Pharmaceutics*, 11(9):441.
29. Wilkins, T., Jarvis, K., Patel, J. (2011). Diagnosis and management of Crohn's disease. *American Family Physician*, 84(12):1365–1375.
30. 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 [published correction appears in Am J Gastroenterol. 2018;113(7):1101]. *American Journal of Gastroenterology*, 113(4):481–517.
31. Ng, S.C., Tang, W., Ching, J.Y., Wong, M., Chow, C.M., Hui, A.J, et al. (2013). Incidence and phenotype of inflammatory bowel disease based on results from the AsiaPacific Crohn's and Colitis Epidemiology Study. *Gastroenterology*, 145:158-165.
32. Pariente, B., Cosnes, J., Danese, S., Sandborn, W.J., Lewin, M., Fletcher, J.G., et al. (2011). Development of the Crohn's disease digestive damage score, the Lémann score. *Inflammatory Bowel Diseases*, 17:1415-1422.
33. Targan, S.R., Hanauer, S.B., van Deventer, S.J., Mayer, L., Present, D.H., Braakman, T, et al. (1997). A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *The New England Journal of Medicine*, 337:1029-1035
34. AGA Patient Education Section. (2020). Crohn's Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 18:xviii. https://www.cghjournal.org/action/showPdf?pii=S1542-3565%2820%2930763-1
35. MacDonald, T., Monteleone, I., Fantini, M. (2011). Regulation of Homeostasis and Inflammation in the Intestine. *Gastroenterology*, 140(6): 1768-75
36. Cosnes, J., Gower-Rousseau, C., Seksik, P. (2011). Epidemiology and Natural History of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*, 140(6): 1785-94.
37. Loftus, E., Schoenfeld, P., Sandborn, W. (2002). The epidemiology and natural history of Crohn's disease in population-based patient cohorts from North America: a systematic review. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 16(1): 51-60.
38. Strober, W., Asano, N., Fuss, I. (2014). Cellular and molecular mechanisms underlying NOD2 risk-associated polymorphisms in Crohn's disease. *Immunological Reviews*, 260(1): 249-60.
39. Van der Heide, F., Dijkstra, A., Weersma, R.K. (2009). Effects of active and passive smoking on disease course of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*,15(8): 1199-207.
40. Kaplan, G., Jackson, T., Sands, B. (2008). The Risk of developing Crohn's disease after an appendectomy: A meta-analysis. *American Journal of Gastroenterology*, 103(11): 2925-31.
41. Andersson, R., Olaison, G., Tysk, C. (2003). Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. *Gastroenterology*, 124(1): 40-6.
42. Molodecky, N.A., Soon, I.S., Rabi, D.M., Ghali, W.A., Ferris, M., Chernoff, G., et al. (2012). Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*, 142 (e42; quiz e30): 46-54
43. Ng, S.C., Bernstein, C.N., Vatn, M.H., Lakatos, P.L., Loftus, E.V., Jr Tysk, C., et al. (2013). Epidemiology and Natural History Task Force of the International Organization of Inflammatory Bowel Disease (IOIBD) Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease. *Gut*, 62: 630-649
44. Loftus Jr., E.V. (2004). Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*, 126: 1504-1517
45. Cheifetz, A.S. (2013). Management of active Crohn disease. *Journal of the American Medical Association*, 309: 2150-2158
46. Baumgart, D.C., and Sandborn, W.J. (2012). Crohn's disease. *Lancet*, 380: 1590-1605
47. Chambers, T., and Morson, B. (1979). The granuloma in Crohn's disease. *Gut*, 20: 269-274

48. Heresbach, D., Alexandre, J.L., Branger, B., Bretagne, J.F., Cruchant, E., Dabadie, A., et al. (2005). ABERMAD (Association Bretonne d'Etude et de Recherche sur les Maladies de l'Appareil Digestif). Frequency and significance of granulomas in a cohort of incident cases of Crohn's disease. *Gut,* 54: 215-222
49. Tukey, M., Pleskow, D., Legnani, P., Cheifetz, A.S., Moss, A.C. (2009). The utility of capsule endoscopy in patients with suspected Crohn's disease. *American Journal of Gastroenterology*, 104: 2734-2739
50. Fireman, Z., Mahajna, E., Broide, E., Shapiro, M., Fich, L., Sternberg, A., et al. (2003). Diagnosing small bowel Crohn's disease with wireless capsule endoscopy. *Gut,* 52: 390-392
51. Cheifetz, A.S., Kornbluth, A.A., Legnani, P., Schmelkin, I., Brown, A., Lichtiger, S., et al. (2006). The risk of retention of the capsule endoscope in patients with known or suspected Crohn's disease. *American Journal of Gastroenterology*, 101: 2218-2222
52. Signorelli, C., Rondonotti, E., Villa, F., Abbiati, C., Beccari, G., Avesani, E.C., et al. (2006). Use of the Given® Patency System for the screening of patients at high risk for capsule retention. *Digestive Liver Disease*, 38: 326-330
53. Dambha, F., Tanner, J., Carroll, N. (2014). Diagnostic imaging in Crohn's disease: what is the new gold standard?. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 28: 421-436
54. Peeters, M., Joossens, S., Vermeire, S., Vlietinck, R., Bossuyt, X., Rutgeerts, P. (2001). Diagnostic value of anti-Saccharomyces cerevisiae and antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease. *American Journal of Gastroenterology*, 96: 730-734
55. Zholudev, A., Zurakowski, D., Young, W., Leichtner, A., Bousvaros, A. (2004). Serologic testing with ANCA, ASCA, and anti-OmpC in children and young adults with Crohn's disease and ulcerative colitis: diagnostic value and correlation with disease phenotype. *American Journal of Gastroenterology*, 99: 2235-2241
56. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. NIH Publication No. 14–3410 September 2014. http://www.ibdclinic.ca/media/uploads/crohns_508.pdf
57. Takeuchi, O., Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6):805–820.
58. Akira, S., Takeda, K., Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology*, 2(8):675–680.
59. Ospelt, C., Gay, S. (2010). TLRs and chronic inflammation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(4):495–505.
60. Takeda, K., Akira, S. (2015). Toll-like receptors. *Current Protocols in Immunology*, 109(1).
61. Delneste, Y., Beauvillain, C., Jeannin, P. (2007). Innate immunity: structure and function of TLRs. *Medical Science (Paris)*, 23(1):67–73.
62. Wang, J. P., Bowen G. N., Padden C., Cerny, A., Finberg, R.W., Newburger, P.E., et al. (2008). Toll-like receptor-mediated activation of neutrophils by influenza A virus. *Blood*, 112(5):2028–2034.
63. Jing, J.J., Li, M., Yuan, Y. (2012). Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms in cancer: a meta-analysis. *Gene*, 499(2):237–242.
64. Behzadi, P., García-Perdomo, H.A., Karpiński, T.M. (2021). Toll-Like Receptors: General Molecular and Structural Biology. *Journal of Immunology Research*, 2021
65. Botos, I., Segal, D.M., Davies, D.R. (2011). The structural biology of toll-like receptors. *Structure*, 19(4):447–459.
66. Jeong, E., Lee J. Y. (2011). Intrinsic and extrinsic regulation of innate immune receptors. *Yonsei Medical Journal*, 52(3):379–392.
67. Kang, J. Y., Lee J. O. (2011). Structural biology of the toll-like receptor family. *Annual Review of Biochemistry*, 80:917–941.
68. Brubaker, S. W., Bonham, K. S., Zanoni, I., Kagan, J. C. (2015). Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annual Review of Immunology*, 33(1):257–290.
69. Deretic, V., Saitoh, T., Akira, S. (2013). Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13(10):722–737.
70. Kawai, T., Akira S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11(5):373–384.
71. Anderson, K.V., Bokla, L., Nüsslein-Volhard, C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the drosophila embryo: The induction of polarity by the Toll gene product. *Cell*, 42(3):791–798.
72. Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J. M., Hoffmann J. A. (1996). The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette sp atzle/Toll/cactus Controls the Potent Antifungal Response in Drosophila Adults. *Cell*, 86(6):973–983.
73. Schneider, D. S., Hudson K. L., Lin T. Y., Anderson K. V. (1991). Dominant and recessive mutations define functional domains of toll, a transmembrane protein required for dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo. *Genes and Development*, 5(5):797–807.

74. El-Zayat S. R., Sibaii H., Mannaa F. A. (2019). Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1):187.
75. Lim, K. H., Staudt, L. M. (2013). Toll-like receptor signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(1):p. a011247.
76. Nie L., Cai S. Y., Shao J. Z., Chen J. (2018). Toll-like receptors, associated biological roles, and signaling networks in non-mammals. *Frontiers in Immunology*, 9:1523.
77. Noreen, M., Arshad, M. (2015). Association of TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, and TIRAP polymorphisms with disease susceptibility. *Immunologic Research*, 62(2):234–252.
78. Bell, J. K., Mullen G. E., Leifer C. A., Mazzoni A., Davies D. R., Segal D. M. (2003). Leucine-rich repeats and pathogen recognition in toll-like receptors. *Trends in Immunology*, 24(10):528–533.
79. Gao, W., Xiong Y., Li Q., Yang H. (2017). Inhibition of toll-like receptor signaling as a promising therapy for inflammatory diseases: a journey from molecular to nano therapeutics. *Frontiers in Physiology*, 8:p. 508
80. Chang, Z.L. (2010). Important aspects of toll-like receptors, ligands and their signaling pathways. *Inflammation Research*, 59(10):791–808.
81. Akira, S., Takeda, K., Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology*, 2(8):675–680. doi: 10.1038/90609.
82. Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4):783–801.
83. Brennan, J.J., Gilmore, T.D. (2018). Evolutionary origins of toll-like receptor signaling. *Molecular Biology and Evolution*, 35(7):1576–1587.
84. Leulier, F., Lemaitre, B. (2008). Toll-like receptors--taking an evolutionary approach. *Nature Reviews Genetics*, 9(3):165–178.
85. Nie, L., Cai, S.Y., Shao, J.Z., Chen, J. (2018). Toll-like receptors, associated biological roles, and signaling networks in non-mammals. *Frontiers in Immunology*, 9:1523.
86. Reuven, E.M., Fink, A., Shai, Y. (2014). Regulation of innate immune responses by transmembrane interactions: lessons from the TLR family. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1838(6):1586–1593.
87. Kawai, T., Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11(5):373–384.
88. Fitzgerald, K.A., Kagan, J.C. (2020). Toll-like receptors and the control of immunity. *Cell*, 180(6):1044–1066.
89. Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C. A., Jr. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6640):394–397.
90. Kang, J.Y., Lee, J.O. (2011). Structural biology of the toll-like receptor family. *Annual Review of Biochemistry*, 80:917–941.
91. Gay, N.J., Symmons, M.F., Gangloff, M., Bryant, C.E. (2014). Assembly and localization of toll-like receptor signalling complexes. *Nature Reviews Immunology*, 14(8):546–558.
92. Sellge, G., Kufer, T.A. (2015). PRR-signaling pathways: learning from microbial tactics. *Seminars in Immunology*, 27(2):75–84.
93. Godfroy, J.I., Roostan, M., Moroz, Y.S., Korendovych, I.V., Yin, H. (2012). Isolated Toll-like Receptor Transmembrane Domains Are Capable of Oligomerization. *PLoS ONE*, 7(11): e48875.
94. Gao, D., Li, W. (2017). Structures and recognition modes of toll-like receptors. *Proteins*, 85(1):3–9.
95. Gay, N.J., Gangloff, M. (2007). Structure and function of toll receptors and their ligands. Annual *Review of Biochemistry*, 76:141–165.
96. West, A.P., Koblansky, A.A., Ghosh, S. (2006). Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22:409–437.
97. Murad S. (2014). Toll-like receptor 4 in inflammation and angiogenesis: a double-edged sword. *Frontiers in Immunology*, 5:313.
98. Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M., Kirschning, C.J. (1999). Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(25):17406–17409.
99. Underhill, D.M., Ozinsky, A., Smith, K.D., Aderem, A. (1999). Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(25):14459–14463.
100. Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., et al. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 282(5396):2085–2088.
101. Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., et al. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by toll-like receptor 5. *Nature*, 410(6832):1099–1103.

102. Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., et al. (2002). Small antiviral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nature Immunology*, 3(2):196–200.
103. Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., al. (2000). A toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408(6813):740–745. Erratum in: Nature 2001; 409(6820):646.
104. Noh, J.Y., Yoon, S.R., Kim, T.D., Choi, I., Jung, H. (2020). Toll-Like Receptors in Natural Killer Cells and Their Application for Immunotherapy. *J Immunol Res*, 2020:2045860
105. Akira, S., Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. Nature Reviews. *Immunology*, 4(7):499–511.
106. Leifer, C.A., Medvedev, A.E. (2016). Molecular mechanisms of regulation of toll-like receptor signaling. *Journal of Leukocyte Biology*, 100(5):927–941.
107. Akira, S., Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signaling. *Nature Reviews Immunology*, 4(7):1–16.
108. Yu, L., Wang, L., Chen, S. (2010). Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(11):2592–2603.
109. Taylor, K.R., Trowbridge, J.M., Rudisill, J.A., Termeer, C.C., Simon, J.C., Gallo, R.L. (2004). Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(17):17079–17084.
110. Frantz, S., Kobzik, L., Kim, Y.D., Fukazawa, R., Medzhitov, R., Lee, R.T., et al. (1999). Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *The Journal of Clinical Investigation*, 104(3):271–280.
111. Kielian, T. (2006). Toll-like receptors in CNS glial inflammation and homeostasis. *Journal of Neuroscience Research*, 83(5):711–730.
112. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C.A., Jr. (1997). A human homologue of the Drosophila toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6640):394–397.
113. Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Iwakura, Y., Akira, S., et al. (2002). Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nature Immunology*, 3(7):667–672.
114. Schromm, A.B., Lien, E., Henneke, P., Chow, J.C., Yoshimura, A., Heine, H., et al. (2001). Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. *The Journal of Experimental Medicine*, 194(1):79–88.
115. Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., et al. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on toll-like receptor 4. *Journal of Experimental Medicine*, 189(11):1777–1782.
116. Viriyakosol, S., Tobias, P.S., Kitchens, R.L., Kirkland, T.N. (2001). MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(41):38044–38051.
117. Zanoni, I., Ostuni, R., Marek, L.R., Barresi, S., Barbalat, R., Barton, G.M., et al. (2011). CD14 controls the LPS-induced endocytosis of toll-like receptor 4. *Cell*, 147(4):868–880.
118. Barton, G.M., Medzhitov, R. (2003). Toll-like receptor signaling pathways. *Science*, 300(5625):1524–1525.
119. Qureshi, S.T., Larivière, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, K.J., Gros, P., et al. (1999). Endotoxin-tolerant mice have mutations in toll-like receptor 4 (Tlr4). *Journal of Experimental Medicine*, 189(4):615–625.
120. Kurt-Jones, E. A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L.M., Jones, L.P., Tripp, R.A., et al. (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nature Immunology*, 1(5):398–401.
121. Flo, T.H., Ryan, L., Latz, E., Takeuchi, O., Monks, B.G., Lien, E., et al. (2002). Involvement of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in cell activation by mannuronic acid polymers. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(38):35489–35495.
122. Yang, S., Sugawara, S., Monodane, T., Nishijima, M., Adachi, Y., Akashi, S., et al. (2001). Micrococcus luteus teichuronic acids activate human and murine monocytic cells in a CD14- and toll-like receptor 4-dependent manner. *Infection and Immunity*, 69(4):2025–2030.
123. Rallabhandi, P., Bell, J., Boukhvalova, M.S., Medvedev, A., Lorenz, E., Arditi, M., et al. (2006). Analysis of TLR4 polymorphic variants: new insights into TLR4/MD-2/CD14 stoichiometry, structure, and signaling. *The Journal of Immunology*, 177(1):322–332.
124. Gomi, K., Kawasaki, K., Kawai, Y., Shiozaki, M., Nishijima, M. (2002). Toll-like receptor 4-MD-2 complex mediates the signal transduction induced by flavolipin, an amino acid-containing lipid unique to Flavobacterium meningosepticum. *The Journal of Immunology*, 168(6):2939–2943.
125. Romani, L. (2011). Immunity to fungal infections. *Nature Reviews Immunology*, 11(4):275–288.

126. Modhiran, N., Watterson, D., Muller, D.A., Panetta, A.K., Sester, D.P., Liu, L., et al. (2015). Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. *Science Translational Medicine*, 7(304)
127. Kawasaki, K., Akashi, S., Shimazu, R., Yoshida, T., Miyake, K., Nishijima, M. (2000). Mouse toll-like receptor 4·MD-2 complex mediates lipopolysaccharide—mimetic signal transduction by Taxol. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(4):2251–2254.
128. Kutuzova, G.D., Albrecht, R.M., Erickson, C.M., Qureshi, N. (2001). Diphosphoryl lipid A from Rhodobacter sphaeroides blocks the binding and internalization of lipopolysaccharide in RAW 264.7 cells. *The Journal of Immunology*, 167(1):482–489.
129. Macagno, A., Molteni, M., Rinaldi, A., Bertoni, F., Lanzavecchia, A., Rossetti, C., et al. (2006). A cyanobacterial LPS antagonist prevents endotoxin shock and blocks sustained TLR4 stimulation required for cytokine expression. *Journal of Experimental Medicine*, 203(6):1481–1492.
130. Termeer, C., Benedix, F., Sleeman, J., Fieber, C., Voith, U., Ahrens, T., et al. (2002). Oligosaccharides of hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *The Journal of Experimental Medicine*, 195(1):99–111.
131. Schaefer, L., Babelova, A., Kiss, E., Hausser, H.J., Baliova, M., Krzyzankova, M., et al. (2005). The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(8):2223–2233.
132. Gondokaryono, S.P., Ushio, H., Niyonsaba, F., Hara, M., Takenaka, H., Jayawardana, S.T., et al. (2007). The extra domain A of fibronectin stimulates murine mast cells via toll-like receptor 4. *Journal of Leukocyte Biology*, 82(3):657–665.
133. Johnson, G.B., Brunn, G.J., Kodaira, Y., Platt, J.L. (2002). Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by toll-like receptor 4. *Journal of Immunology*, 168(10):5233–5239.
134. Midwood, K., Sacre, S., Piccinini, A. M., Inglis, J., Trebaul, A., Chan, E., et al. (2009). Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease. *Nature Medicine*, 15(7):774–780.
135. Lotze, M.T., Tracey, K.J. (2005). High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nature Reviews Immunology*, 5(4):331–342.
136. Roelofs, M.F., Boelens, W.C., Joosten, L.A.B., Abdollahi-Roodsaz, S., Geurts, J., Wunderink, L.U., et al. (2006). Identification of small heat shock protein B8 (HSP22) as a novel TLR4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Journal of Immunology*, 176(11):7021–7027.
137. Ohashi, K., Burkart, V., Flohé, S., Kolb, H. (2000). Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *The Journal of Immunology*, 164(2):558–561.
138. Asea, A., Rehli, M., Kabingu, E., Boch, J.A., Bare, O, Auron, P.E., et al. (2002). Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *Journal of Biological Chemistry*, 277(17):15028–15034.
139. Chase, M.A., Wheeler, D.S., Lierl, K.M., Hughes, V.S., Wong, H.R., Page, K. (2007). Hsp72 induces inflammation and regulates cytokine production in airway epithelium through a TLR4- and NF-κB-dependent mechanism. *The Journal of Immunology*, 179(9):6318–6324.
140. Fang, H., Wu, Y., Huang, X., Wang, W., Ang, B., Cao, X., et al. (2011). Toll-like receptor 4 (TLR4) is essential for Hsp70-like protein 1 (HSP70L1) to activate dendritic cells and induce Th1 response. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(35):30393–30400.
141. Vabulas, R.M., Braedel, S., Hilf, N., Singh-Jasuja, H., Herter, S., Ahmad-Nejad, P., et al. (2002). The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the toll-like receptor 2/4 pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 277(23):20847–20853.
142. Wu, W., Chen, Q., Geng, F., Tong, L., Yang, R., Yang, J., et al. (2015). Calcineurin B stimulates cytokine production through a CD14-independent Toll-like receptor 4 pathway. *Immunology and Cell Biology*, 94(3):285–292.
143. Biragyn, A., Ruffini, P.A., Leifer, C.A., Klyushnenkova, E., Shakhov, A., Chertov, O., et al. (2002). Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by β-defensin 2. *Science*, 298(5595):1025–1029.
144. Vogl, T., Tenbrock, K., Ludwig, S., Leukert, N., Ehrhardt, C., van Zoelen, M.A., et al. (2007). Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nature Medicine*, 13(9):1042–1049.
145. Guillot, L., Balloy, V., McCormack, F.X., Golenbock, D.T., Chignard, M., Si-Tahar, M. (2002). Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4. *The Journal of Immunology*, 168(12):5989–5992.

146. Tarkowski, A., Bjersing, J., Shestakov, A., Bokarewa, M.I. (2010). Resistin competes with lipopolysaccharide for binding to toll-like receptor 4. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(6):1419–1431.
147. Smiley, S.T., King, J.A., Hancock, W.W. (2001). Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *Journal of Immunology*, 167(5):2887–2894.
148. Stewart, C.R., Stuart, L.M., Wilkinson, K., van Gils, J.M., Deng, J., Halle, A., et al. (2010). CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nature Immunology*, 11(2):155–161.
149. Erridge, C. (2010). Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? *Journal of Leukocyte Biology*, 87(6):989–999.
150. Jiang, D., Liang, J., Fan, J., Yu, S., Chen, S, Luo, Y., et al. (2005). Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nature Medicine*, 11(11):1173–1179.
151. Lehnardt, S., Schott, E., Trimbuch, T., Laubisch, D., Krueger, C., Wulczyn, G., et al. (2008). A vicious cycle involving release of heat shock protein 60 from injured cells and activation of toll-like receptor 4 mediates neurodegeneration in the CNS. *The Journal of Neuroscience*, 28(10):2320–2331.
152. Yang, H., Hreggvidsdottir, H. S., Palmblad, K., Wang, H., Ochani, M., Li, J., et al. (2010). A critical cysteine is required for HMGB1 binding to toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(26):11942–11947.
153. Visintin, A., Mazzoni, A., Spitzer, J.H., Wyllie, D.H., Dower, S.K., Segal, D.M. (2001). Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *Journal of Immunology*, 166:249–255.
154. Yanagawa, Y., Onoe, K. (2007). Enhanced IL-10 production by TLR4- and TLR2-primed dendritic cells upon TLR restimulation. *Journal of Immunology*, 178:6173–6180.
155. Uematsu, S., Jang, M.H., Chevrier, N., Guo, Z., Kumagai., Y., Yamamoto., M., et al. (2006). Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells. *Nature Immunology*, 7:868–874.
156. Cerovic, V., Jenkins, C.D., Barnes, A.G., Milling, S.W., MacPherson, G.G., Klavinskis, L.S. (2009). Hyporesponsiveness of intestinal dendritic cells to TLR stimulation is limited to TLR4. *Journal of Immunology*, 182:2405–2415.
157. Cario, E., Rosenberg, I.M., Brandwein, S.L., Beck, P.L., Reinecker, H.C., Podolsky, D.K. (2000). Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *Journal of Immunology*, 164:966–972.
158. Abreu, M.T., Arnold, E.T., Thomas, L.S., Gonsky, R., Zhou, Y., Hu, B., et al. (2002). TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells. *Journal Biological Chemistry*, 277:20431–20437.
159. Lee, J, Mo, J.H., Katakura, K., Alkalay, I., Rucker, A.N., Liu, Y.T., et al. (2006). Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nature Cell Biology*, 8:1327–1336.
160. Cario, E, Brown, D, McKee, M., Lynch-Devaney, K, Gerken, G, Podolsky, D.K. (2002). Commensal-associated molecular patterns induce selective toll-like receptor-trafficking from apical membrane to cytoplasmic compartments in polarized intestinal epithelium. *American Journal of Pathology*, 160:165–173.
161. Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Iwakura, Y., Akira, S., et al. (2002). Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nature Immunology*, 3:667–672.
162. Hornef, M.W., Frisan, T., Vandewalle, A., Normark, S., Richter-Dahlfors, A. (2002). Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells. *Journal of Experimental Medicine*, 195:559–570.
163. Latz, E., Visintin, A., Lien, E., Fitzgerald, K.A., Monks, B.G., Kurt-Jones, E.A., et al. (2002). Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. *Journal of Biology Chemistry*, 277:47834–47843.
164. Brinkmann, M.M., Spooner, E., Hoebe, K., Beutler, B., Ploegh, H.L., Kim, Y.M. (2007). The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *Journal of Cell Biology*, 177:265–275.
165. Takahashi, K., Shibata, T., Akashi-Takamura, S., Kiyokawa, T., Wakabayashi, Y., Tanimura, N., et al. (2007). A protein associated with Toll-like receptor (TLR) 4 (PRAT4A) is required for TLR-dependent immune responses. *Journal of Experimental Medicine*, 204:2963–2976.

166. Yang, Y., Liu, B., Dai, J., Srivastava, P.K., Zammit, D.J., Lefrançois, L., et al. (2007). Heat shock protein gp96 is a master chaperone for toll-like receptors and is important in the innate function of macrophages. *Immunity*, 26:215–226.
167. Gibson, D.L., Montero, M., Ropeleski, M.J., Bergstrom, K.S., Ma, C., Ghosh, S., et al. (2010). Interleukin-11 reduces TLR4-induced colitis in TLR2-deficient mice and restores intestinal STAT3 signaling. *Gastroenterology*, 139(4):1277-88.
168. Cari, L., Rosati, L., Leoncini, G., Lusenti, E., Gentili, M., Nocentini, G., et al. (2023). Association of GILZ with MUC2, TLR2, and TLR4 in Inflammatory Bowel Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 23;24(3):2235.
169. Cario, E., Podolsky, D.K. (2000). Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infection and Immunity*, 68(12):7010-7.
170. Nahid, M.A., Pauley, K.M., Satoh, M., Chan, E.K.L. (2009). miR-146a is critical for endotoxin-induced tolerance: implication in innate immunity. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(50):34590–34599.
171. O'Neill, L.A., Sheedy, F.J., McCoy C.E. (2011). MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 11(3):163–175.
172. Nahid, M.A., Satoh, M., & Chan, E.K. (2011). MicroRNA in TLR signaling and endotoxin tolerance. *Cellular & Molecular Immunology*, 8(5), 388–403.
173. Miller, L.S. O'Connell, R.M., Gutierrez, M.A., Pietras, E.M., Shahangian, A., Gross, C.E., et al. (2006). MyD88 mediates neutrophil recruitment initiated by IL-1R but not TLR2 activation in immunity against Staphylococcus aureus. *Immunity*, 24, 79–91.
174. Dinarello, C.A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 87, 2095–2147.
175. Arend, W.P., Palmer, G., Gabay, C. (2008). IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunological Review*s, 223, 20–38.
176. Netea, M.G., Nold-Petry, C.A., Nold, M.F., Joosten, L.A., Opitz, B., van der Meer, J.H., et al. (2009). Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1β in monocytes and macrophages. *Blood*, 113, 2324–2335.
177. Keller, M., Ruegg, A., Werner, S., Beer, H.D. (2008). Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell*, 132, 818–831.
178. Fantuzzi, G., and Dinarello, C.A. (1999). Interleukin-18 and interleukin-1β: two cytokine substrates for ICe (caspase-1). *Journal of Clinical Immunology*, 19, 1–11.
179. Greten, F.R., Arkan, M.C., Bollrath, J., Hsu, L.C., Goode, J., Miething, C., et al. (2007). NF-κB is a negative regulator of IL-1β secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKKβ. *Cell*, 130, 918–931.
180. Guarda, G., Dostert, C., Staehli, F., Cabalzar, K., Castillo, R., Tardivel, A., Schneider, P., et al. (2009). T cells dampen innate immune responses through inhibition of NLRP1 and NLRP3 inflammasomes. *Nature*, 460, 269–273.
181. Broz, P., Monack, D.M. (2011). Molecular mechanisms of inflammasome activation during microbial infections. *Immunological reviews*, 243(1), 174–190.
182. Dinarello, C.A. (1999). IL-18: a TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 103: 11-24.
183. Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H., Okamura, H. (2001). Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annual Review of Immunology*, 19: 423-474.
184. Puren, A.J., Fantuzzi, G., Gu, Y., Su, M.S., Dinarello, C.A. (1998). Interleukin-18 (IFNgamma-inducing factor) induces IL-8 and IL-1beta via TNFalpha production from non-CD14+ human blood mononuclear cells. *Journal of Clinical Investigation*, 101: 711-721.
185. Hyodo, Y., Matsui, K., Hayashi, N., Tsutsui, H., Kashiwamura, S., Yamauchi, H., et al. (1999). IL-18 up-regulates perforin-mediated NK activity without increasing perforin messenger RNA expression by binding to constitutively expressed IL-18 receptor. *Journal of Immunology*, 162: 1662-1668.
186. Reddy, P., Teshima, T., Kukuruga, M., Ordemann, R., Liu, C., Lowler, K., et al. (2001). Interleukin-18 regulates acute graft-versus-host disease by enhancing Fas-mediated donor T cell apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, 194: 1433-1440.
187. Gracie, J.A., Forsey, R.J., Chan, W.L., Gilmour, A., Leung, B.P., Greer, M.R., et al. (1999). A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Investigation*, 104: 1393-1401.
188. Pizarro, T.T., Michie, M.H., Bentz, M., Woraratanadharm, J., Smith, M.F. Jr., Foley, E., et al. (1999). IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *Journal of Immunology*, 162: 6829-6835.

189. Wildbaum, G., Youssef, S., Grabie, N., Karin, N. (1998). Neutralizing antibodies to IFN-gamma-inducing factor prevent experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology*, 161: 6368-6374.
190. Monteleone, G., Trapasso, F., Parrello, T., Biancone, L., Stella, A., Iuliano, R., et al. (1999). Bioactive IL-18 Expression Is Up-Regulated in Crohn's Disease. *Journal of Immunology*, 163 (1): 143–147.

EK

EK-1 ETİK KURUL İZNİ

Evrak Tarih ve Sayısı: 25/11/2020-E.41338 "BEKV3P64T"

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

Toplantı Tarihi : 16/10/2020
Toplantı Sayısı : 24
Karar Sayısı : 7

Konu : Araştırma Projesi Değerlendirme Raporu (20/1008)

Sayın Doç. Dr. Sevgi KALKANLI TAŞ

Kurulumuza değerlendirilmek üzere sunduğunuz 20-108 kayıt numaralı "*Crohn Hatalığının TLR4 Reseptörü İleİlişkisininAraştırılması*" başlıklı proje önerisi kurulumuzun 16.10.2020 tarihli toplantısında görüşülmüş olup, karar örneği ekte sunulmuştur.

Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK Başkan

Ek: Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu (20-108)

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. AlevKURAL
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 Kanununa göre Güvenli Elektronik İmza ile imzalanmıştır.
Evrak sorgulaması http://ebys.sbu.edu.tr/enVision/Validate_Doc.aspx?V=BEAM4LK4F adresinden yapılabilir.