

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ BİYOKİMYA  
ANABİLİM DALI

**ÜLSERATİF KOLİTLİ HASTALARDA  
GÖZLENEN İNFLAMASYONDA sRAGE'NİN  
OLASI ANTIİNFLAMATUVAR ROLÜNÜN  
AYDINLATILMASI**

**Dr. DENİZ KOÇER KALKANDELEN**

**UZMANLIK TEZİ**

**İZMİR-2013**

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ BİYOKİMYA  
ANABİLİM DALI

**ÜLSERATİF KOLİTLİ HASTALARDA  
GÖZLENEN İNFLAMASYONDA sRAGE'NİN  
OLASI ANTIİNFLAMATUVAR ROLÜNÜN  
AYDINLATILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. DENİZ KOÇER KALKANDELEN**

**DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ**

**Prof. Dr. Halil RESMİ**

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin  
2012.KB.SAG.043 sayılı desteği ile gerçekleştirilmiştir.

## İÇİNDEKİLER

Sayfa No

Tablo Listesi.....	i
Şekil Listesi.....	ii
Kısaltmalar.....	iii
Teşekkür.....	v
ÖZET.....	1
SUMMARY.....	2
<b><u>1. GİRİŞ VE AMAC</u></b> .....	3
<b><u>2.GENEL BİLGİLER</u></b> .....	5
<b>2.1. İNFLAMATUVAR BAĞIRSAK HASTALIKLARI</b> .....	5
2.1.1. Epidemiyoloji .....	5
2.1.2. Etyoloji ve Patogenez .....	5
2.1.2.1 Genetik Yatkınlık.....	6
2.1.2.2 İmmünolojik Faktörler .....	7
2.1.2.3 Mikrobiyal Faktörler.....	7
2.1.2.4 Çevresel Faktörler .....	7
2.1.3. Crohn Hastalığı.....	9
2.1.4. Ülseratif Kolit.....	11
2.1.4.1. Ülseratif Kolit Patolojisi.....	12
2.1.4.2. Ülseratif Kolit Klinik Bulguları.....	14
2.1.4.3. Ülseratif Kolit Laboratuvar Bulguları.....	15
<b>2.2. İLERİ GLİKASYON SON ÜRÜNLERİ, RESEPTÖR ve ÇÖZÜNÜR RESEPTÖRLERİ</b>	
2.2.1. İleri Glikasyon Son Ürünleri / Advanced Glycation Endproducts (AGE'ler).19	
2.2.2. İleri Glikasyon Son Ürünleri Reseptörleri / Receptor of Advanced Glycation Endproducts (RAGE).....	23
<b><u>3. GEREK VE YÖNTEMLER</u></b> .....	29
<b>3.1. ARAÇ VE GEREÇLER</b> .....	29
<b>3.2. OLGULARIN SEÇİMİ, ÖRNEKLERİN TOPLANMASI</b> .....	31
<b>3.3. DOKU HOMOJENİZASYONU</b> .....	32
<b>3.4. BİYOKİMYA ANALİZLERİ</b> .....	33

3.4.1. Total Protein Ölçümü.....	33
3.4.2. Western Blot Yöntemi.....	34
3.4.3. ELISA Yöntemi ile sRAGE Ölçümü.....	36
3.4.4. ELISA Yöntemi ile Kalprotektin Ölçümü.....	38
3.4.5. CRP Ölçüm Yöntemi.....	39
<b>3.5. İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER.....</b>	<b>39</b>
<b><u>4. BULGULAR.....</u></b>	<b>40</b>
<b>4.1. ÇALIŞMA GRUBUNU TANIMLAYICI BULGULAR.....</b>	<b>40</b>
<b>4.2. SERUM CRP, sRAGE, KALPROTEKTİN DÜZEYLERİ .....</b>	<b>40</b>
4.2.1. Ülseratif Kolit Alt Gruplarının Analiz Sonuçları.....	42
<b>4.3. DOKUDA sRAGE SONUÇLARI.....</b>	<b>44</b>
<b>4.4 KORELASYON ANALİZLERİ.....</b>	<b>45</b>
<b><u>5. TARTIŞMA VE SONUC .....</u></b>	<b>45</b>
<b><u>6. KAYNAKLAR VE EKLER.....</u></b>	<b>52</b>
<b>6.1. KAYNAKLAR.....</b>	<b>52</b>
<b>6.2. EKLER.....</b>	<b>60</b>

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa No

<b>Tablo 1:</b> Ülseratif Kolit ve CH karşılaştırması	11
<b>Tablo 2:</b> Montreal Sınıflandırması	14
<b>Tablo 3:</b> Çalışmada kullanılan cihazlar	29
<b>Tablo 4:</b> Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve sarf malzemeler	30
<b>Tablo 5:</b> Çalışmada kullanılan kitler	30
<b>Tablo 6:</b> Doku homojenizasyonunda kullanılan PBS çözeltisi	32
<b>Tablo 7:</b> SDS-PAGE ve Western blot analizinde kullanılan çözeltiler	35
<b>Tablo 8:</b> Ayırıcı jelin hazırlanması	35
<b>Tablo 9:</b> Paketleme jelinin hazırlanması	36
<b>Tablo 10:</b> Çalışma gruplarının yaş ve cinsiyet özellikleri	40
<b>Tablo 11:</b> Kontrol ve olgu gruplarına ait serumlarda ölçülen CRP, sRAGE ve kalprotektin için hesaplanan ortanca değerleri	41
<b>Tablo 12:</b> Endoskopi verileri bulunan ÜK'li hastaların serumları bir grup olarak ele alınarak kontrol grubu ve tüm ülseratif kolitli hasta serumları ile karşılaştırılması	43
<b>Tablo 13:</b> Hastalığın yaygınlığına göre ÜK alt grup karşılaştırması	43
<b>Tablo 14:</b> Kolonoskopi sırasında alınmış olan dokuların Western blot analiz sonuçları	45

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa No

<b>Şekil 1:</b> Kolonda CH	10
<b>Şekil 2:</b> ÜK Patofizyolojisi	12
<b>Şekil 3:</b> Kolonda ÜK	13
<b>Şekil 4:</b> İBH tanısında klinik değerlendirmeye katkı sağlayabilecek biyobelirteçlerin kullanımı	19
<b>Şekil 5:</b> Protein glikasyonu sonucunda AGE oluşumu	20
<b>Şekil 6:</b> Gliksalaz enzim sisteminin MG'nin detoksifiye edilmesindeki rolü	21
<b>Şekil 7:</b> RAGE'nin izoformları	24
<b>Şekil 8:</b> RAGE'nin yapısı	25
<b>Şekil 9:</b> AGE-RAGE etkileşiminden sonra aktive olan intrasellüler sinyal yolları	26
<b>Şekil 10:</b> sRAGE standart eğrisi	37
<b>Şekil 11:</b> Kalprotektin standart eğrisi	39
<b>Şekil 12:</b> (A) Kontrol, ÜK, polip grubunda CRP düzeylerinin karşılaştırılması. (B) Kontrol, ÜK, polip grubunda sRAGE düzeylerinin karşılaştırılması. (C) Kontrol, ÜK, polip grubunda kalprotektin düzeylerinin karşılaştırılması.	42
<b>Şekil 13:</b> Western blot analizi sonucunda gözlenen çeşitli dokulara ait sRAGE bantları	45

## KISALTMALAR

**ÜK:** Ülseratif Kolit

**CH:** Crohn Hastalığı

**İBH:** İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları

**RAGE:** İleri Glikasyon Son Ürünleri Reseptörü

**sRAGE:** İleri Glikasyon Son Ürünleri Çözünür Reseptörü

**ELISA:** Enzyme-linked immunosorbent assay

**GWAS:** Genome-wide association scans

**NOD2:** nucleotide binding oligomerization domain 2

**TNF- $\alpha$ :** Tumor Necrosis Factor-Alpha

**IL:** interlökin

**AIEC:** Adherent-invasive Escherichia coli

**CRP:** C-Reaktif Protein

**ANCA:** Anti-nötrofil sitoplazmik antikorlar

**ASCA:** anti-Saccharomyces cerevisiae antikorlar

**ALCA:** anti-laminaribiozid karbohidrat IgG

**ACCA:** anti-kitobiozid karbohidrat IgA

**ASMA/ AMCA:** anti-sentetik mannozid antikorlarıdır

**OmpC:** Escherichia coli dış membran porin C

**EN-RAGE:** İleri glikasyon son ürünleri için yeni tanımlanmış ekstrasellüler reseptör

**AGE:** İleri Glikasyon Son Ürünleri

**CML:** N<sup>ε</sup>-(karboksimetil) lizin

**MG:** Metilglioksal

**OST48:** oligosakkariltransferaz

**AGE RC:** AGE reseptör kompleksi

**HMGB-1:** high mobility group box-1

**fl-RAGE:** full-length isoform;

**DN-RAGE:** dominant negatif RAGE

**Adam 10 :** A disintegrin and metalloprotease 10

**esRAGE:** endogenous secretory RAGE

**cRAGE:** cleaved RAGE

**MHC:** Major histocompatibility complex

**NF- $\kappa$ B:** Nükleer faktör-  $\kappa$ B

**VCAM-1:** Vascular cell adhesion protein-1

**ICAM-1 :**Intercellular Adhesion Molecule-1

**KAH:** Koroner arter hastalığı

**KOAH:** Kronik obstrüktif akciğer hastalığı

**TEMED:** Tetra Metil Etilen Daimin

**PVDF:** Polivinidilin florid

**SDS-PAGE:** Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi



## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilimsel birikimlerini ve manevi desteklerini esirgemeyen, uzmanlık eğitimimde emeği geçen başta Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Canan ÇOKER, Prof. Dr. Banu ÖNVURAL ve Biyokimya Anabilim Dalı değerli öğretim üyelerine;

Tez çalışmamın en başından sonuna kadar her aşamasında bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, bilimsel birikimleriyle bana her konuda destek olan tez danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Halil Resmi'ye;

Uzmanlık eğitimim boyunca eşsiz deneyim ve bilgilerinden yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Sezer UYSAL, Doç. Dr. Ali Rıza ŞİŞMAN ve Yard. Doç. Dr. Tuncay KÜME 'ye;

Tez hastalarımın toplanması konusunda gösterdiği ilgi ve hassasiyetle bana destek olan, engin görüş ve önerilerinden yararlandığım Gastroenteroloji Ana Bilim Dalı öğretim üyesi değerli hocam Doç. Dr. Müjde Soytürk'e;

Araştırmanın planlanması ve istatistiksel verilerin analizinde desteğini eksik etmeyen Halk Sağlığı Ana Bilim Dalı öğretim üyesi değerli hocam Doç. Dr. Türkan Günay'a;

Laboratuvar çalışmaları sırasında bilgi ve deneyimini benimle paylaşan Dr. Ebru Tezel Taylan'a;

Uzmanlık eğitimim boyunca arkadaşlık ve dostluklarını esirgemeyen asistan arkadaşlarım, Dr. Banu DEVECİ, Dr. Emre DEMİRAY, Dr. Ali YILDIRIM, Dr. Yasin KENESARI, Dr. Ayşegül KESER, Dr. Burcu ÇİNKOOĞLU, Dr. Esra ZOR DOĞAN, Dr. Ferhat DEMİRCİ ve Dr. Barış SAĞLAM'a;

Uzmanlık eğitimimiz boyunca tüm işlerimizi kolaylaştıran anabilim dalı sekreterimiz Sayın Eda OLUM'a;

Beni bugünlere getiren sevgili annem ve babama;

Sevgili eşim Dr. Turan KALKANDELEN'e en içten dileklerle teşekkür ederim.

## ÖZET

Ülseratif Kolit (ÜK) ve Crohn Hastalığı (CH) gibi etyolojisi tam olarak açıklanamamış bir grup hastalıktan oluşan İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları (İBH) ayırıcı tanısının yapılabilmesi, tedavisinin düzenlenmesi ve prognozunun takibi için çoğu zaman endoskopi gibi girişimsel yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. Bu nedenle kolay saptanabilecek yeni biyolojik belirteçlere gereksinim vardır. İBH mekanizmasında, bir multiligand reseptör olan ‘leri glikasyon son ürünleri reseptörü’ (RAGE) ve onun çözünür formu ‘sRAGE’nin adı geçmektedir. sRAGE ve onun ligandlarından biri olan kalprotektin, intestinal mukozada eksprese edilerek hem bağırsak lümenine hem de dolaşıma salınmaktadır.

Bu proteinlerin serum ve mukozadaki değişimini aydınlatmak için ÜK’li hastalar çalışmaya alınmıştır. sRAGE, hem inflamatuvar hem de non-inflamatuvar mukozada Western blot tekniği kullanılarak; serum sRAGE ve kalprotektin de ‘Enzyme-linked immunosorbent assay’ (ELISA) yöntemiyle ölçülmüştür.

Kolonoskopi yapılan hastalar Montreal sınıflamasına göre alt gruplara ayrılmış, serum belirteçleri ve mukozal sRAGE düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Ayrıca ÜK’li hastaların inflame ve non-inflame mukozaları arasında da fark bulunmamıştır. ÜK’li hastaların kolonoskopi yardımıyla iyi tanımlanmış alt grubunda serum sRAGE ve kalprotektin anlamlı düşük bulunmuştur.

Bu çalışma, sınırlı sayıda hastayla yapılmıştır ve inflamatuvar belirteçler arasındaki ilişkiyi aydınlatmakta yetersiz kalmaktadır. Bu belirteçlerin düzeyleri arasındaki ilişkinin araştırılacağı daha ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.

**Anahtar sözcükler:** İnflamatuvar bağırsak hastalıkları, ülseratif kolit, sRAGE, kalprotektin, Western blot, ELISA

## SUMMARY

Ulcerative Colitis (UC) and Crohn Disease are classified as Inflammatory Bowel Diseases (IBD) and their etiology is not fully elucidated. Since the diagnosis and therapy of IBD require the use of invasive methods such as endoscopy, a new biological marker which can easily be determined is needed. A multiligand receptor called Receptor of Advanced Glycation End Products (RAGE) and its soluble form (sRAGE) are involved in the mechanism of IBD. sRAGE and one of its ligands, calprotectin, are expressed in intestinal mucosa and secreted both to the bowel lumen and the blood circulation.

Patients with UC were subjected to this study in order to clarify the alteration of those proteins in the bowel mucosa and the serum. sRAGE was measured with Western blotting both in the inflammatory and the non-inflammatory bowel mucosa samples, and the serum sRAGE and calprotectin levels were measured with Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

The UC patients that had colonoscopy were divided into subgroups according to the Montreal classification and no statistical difference was found between the serum and mucosal samples of subgroups. We also couldn't find any statistical difference between the inflamed and the non-inflamed bowel mucosa samples of the UC patients. However, both sRAGE and calprotectin serum levels were significantly lower at the subgroup of UC which was well defined by endoscopy.

This study was carried out with limited number of samples and is not sufficient enough to elucidate the interactions between the inflammatory markers and IBD. Further investigations with greater number of samples should be carried out.

**Key Words:** Inflammatory bowel diseases, ulcerative colitis, sRAGE, calprotectin, Western blotting, ELISA

## **1. GİRİŞ VE AMAC**

Kalın bağırsağın kronik inflamatuvar bir hastalığı olan Ülseratif kolit (ÜK), hastalarda yaşam kalitesini önemli düzeyde etkilemektedir. Otuz yıllık hastalık süresinden sonra % 20-30 oranlarında kolektomi gereksinimi ortaya çıkabilmekte; ayrıca kolorektal kanser gelişme riski de % 18'lere ulaşabilmektedir. ÜK'te görülen mukozal inflamasyonu baskılamaya yönelik ajanların kullanımının yaygınlaşması sayesinde, hastalığa bağlı ataklar azaldığı gibi, kolektomi gereksinimi ve kolorektal kanser gelişme riski de azalmaktadır (1). Günümüzde ÜK'in ayırıcı tanısının yapılabilmesi, tedavisinin düzenlenmesi ve prognozunun takibi için çoğu zaman endoskopi gibi girişimsel yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. Hastalığa bağlı bağırsak mukozası inflamasyonunu daha az girişimsel yöntemlerle saptamak ve takip edebilmek için, çok sayıda araştırma ile kan ve feçesteki biyobelirteçler incelenmektedir. Söz konusu belirteçler arasında, kronik inflamasyon sinyal yolağını tetiklediği bilinen bir hücre membran reseptörü olan, ileri glikasyon son ürünleri reseptörü (RAGE)'nin çözünür formu olan sRAGE ve onun ligandlarından biri olan S100 protein ailesi üyesi kalprotektin de yer almaktadır.

Genel görüş, sRAGE'nin, RAGE ligandlarını ekstrasellüler alanda yakalayan bir tuzak gibi davranarak, onların RAGE ile etkileşmesini ve böylece inflamatuvar cevabın ortaya çıkmasını engellediği yönündedir (2). ÜK'le ilgili yapılan çeşitli çalışmalarla da sRAGE ile kalprotektin arasındaki ilişki araştırılmıştır. Fekal ölçümü de yapılabilen kalprotektin, her molekülünde 'EF-hand' kalsiyum bağlayıcı motif bulunduran S100/kalgranulin ailesine üye, kalsiyum ve çinko bağlayıcı bir proteindir (3). Çocuk ve yetişkinlerde yapılan pek çok çalışmada İBH'nin tanısının konması, tedaviye yanıtının izlenmesi ve relapslarının saptanmasında fekal kalprotektin düzeylerinden yararlanılabileceği gösterilmiştir (4). Leach ve ark. (5) ELISA tekniğiyle çekal ve duodenal biyopsi örneklerinin süpernatantlarında sRAGE ve kalprotektin ölçümü yapmış; inflamatuvar bağırsak hastalarında hem mukozal hem de serum kalprotektini kontrolden anlamlı yüksek bulmuşlar, serum sRAGE açısından anlamlı fark bulamamışlar ve mukozal sRAGE'yi ise saptayamamışlardır. Malickova ve ark. (6) da serum sRAGE ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulamamışlar ve sRAGE'yi ELISA ile dışkı eluatlarında saptayamamışlardır.

Fekal kalprotektin ile ilgili pek çok çalışma yapılmış olmasına karşın kalprotektinin serum düzeyleriyle ilgili az sayıda çalışma bulunmakta, kalprotektin ile sRAGE'nin serum

düzeyleri arasındaki ilişki yeterince açıklığa kavuşturulamamış bulunmakta ve dokudaki sRAGE ekspresyonu ile ilgili veriler yetersiz kalmaktadır. Planladığımız çalışmanın hedefi, bu konuda yeni veriler sağlamaya yöneliktir. Çalışmada serum kalprotektin ve sRAGE arasındaki ilişkinin ve aynı zamanda özgünlüğü düşük olsa da rutinde sıkça kullanılan bir başka inflamasyon belirteci olan C reaktif protein (CRP) ile olan ilişkilerinin tartışılması amaçlanmıştır. Dokudaki sRAGE ekspresyonunu belirleyebilmek için Western blot tekniğinden yararlanılması uygun görülmüştür.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1 İNFLAMATUVAR BAĞIRSAK HASTALIKLARI**

Başlıca ÜK ve Crohn Hastalığı (CH)'ni içeren İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları (İBH) rektal kanama, ciddi diyare ve kilo kaybı ile karakterize, relaps ve remisyonlarla seyreden kronik inflamatuvar hastalıklardır (7). Genetik olarak yatkınlığı bulunan bireylerde normal bağırsak florasına karşı anormal immün yanıt oluşması sonucunda ortaya çıktıkları düşünülmektedir. CH çoğunlukla ileumu tutsa da özofagustan anüse kadar gastrointestinal kanalın herhangi bir bölümünü etkileyebilir ve olguların yaklaşık yarısında non-kazeöz granülomatöz inflamasyon mevcuttur. ÜK ise kolona sınırlı non-granülomatöz hastalıktır (8).

#### **2.1.1 Epidemiyoloji**

İBH geçmişte gelişmiş ülkelerde daha yaygın olarak görülse de gelişmekte olan ülkelerdeki prevalansı da giderek artmaktadır (7). İBH epidemiyolojisi dünya genelinde bölgeler arası önemli farklılıklar göstermektedir. CH insidansı 100.000'de 0.7-14.6, ÜK insidansı da 100.000'de 1.5-24.5 arasında değişmektedir (9).

Örneğin CH için, Batı Avrupa ve Kuzey Amerika ortalama insidans ve prevalansları sırasıyla 6/100.000 ve 150/100.000 iken; ÜK için, 20/100.000 ve 200/100.000'dir. Türkiye'de 2001-2003 yılları arasında 12 merkezde, en az üç aydır IBD tanısı ile takip edilmekte olan 877 hastada yapılmış olan çalışma verilerine göre, ülkemizde ÜK yıllık ortalama insidansı 4.4/100.000 iken CH yıllık ortalama insidansı 2.2/100.000'dir (10).

ÜK 30-40 yaş arası erkeklerde daha sık görülürken, CH 20-30 yaş kadınlarda daha fazla görülmektedir. Çocukluk çağı İBH, tüm olguların %7-20'sini oluştururken bunların içinde CH daha önde gözükmektedir. Ayrıca, bir hastanın tanısının ÜK'ten CH'a dönüşmesi ya da tam tersi, ÜK'te % 10 iken, CH için % 5'tir (11).

#### **2.1.2 Etyoloji ve Patogenez**

Normal bağırsaklarda konağın immün sistemini aktive eden lüminal mikroorganizmalar, diyetel antijenler ve endojen inflamatuvar uyaranlar gibi faktörlerle, konakta inflamasyonu baskılayan savunma sistemleri arasında dinamik bir denge mevcuttur ve bu denge mukozanın

bütünlüğünü sağlar. İBH patogenezi; genetik yatkınlık, bağışıklık sistemindeki bozukluklar ve mikrobiyal floranın çeşitli etkenlerle tetiklenmesini içermektedir. Hem ÜK hem de CH'ında bu dengenin bozulma nedenleri ve hastalık kaynakları tam olarak açıklanamadığı için 'İdiyopatik' İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları olarak da adlandırılmaktadırlar. Bu yatkınlığı açıklayan bazı kavramlar üzerinde aşağıda durulmuştur (8).

### 2.1.2.1 Genetik Yatkınlık

İBH için en önemli risk faktörü aile öyküsü varlığıdır. Hastaların yaklaşık %15'inde birinci derece akrabaları etkilenmiştir ve birinci derece akrabalarda hastalık insidansı toplumun geneline göre 30-100 kat artmıştır. Hastalalıktan etkilenmiş bireylerin birinci derece akrabalarında yaşam boyu İBH gelişme riski % 3-9 olarak tahmin edilmektedir (12).

İBH gelişimine genetik faktörlerin etkisi konusunda önemli gelişmeler yaşanmasına karşın, bu konuda bilinenler halen oldukça sınırlıdır. Belli başlı hastalıklarla tek nükleotid polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi araştırmak üzere yapılmakta olan 'Genome-wide association scans' (GWAS) çalışmaları sayesinde İBH için toplam 163 riskli lokus bulunduğu ve bunların 110'unun ÜK ve CH için ortak olduğu tanımlanmıştır. NOD2 (nucleotide binding oligomerization domain 2) varyant allelini taşıyanlarda ileal CH olasılığının dört kat artmış olduğu belirtilmiştir. NOD2, CH için en riskli olduğu belirtilen lokus olmakla birlikte ÜK patolojisi üzerine herhangi bir etkisinin olduğunu belirten yayın bulunmamaktadır. Ne yazık ki özellikle ÜK hastalığının şiddeti ile genotipik farklılıkları ortaya koyan çok az çalışma bulunmaktadır. HLA-DRB1 genotipi tek başına ÜK ya da CH ile ilişkili bulunmazken HLA-DRB1 (DR13) alleli, pankolit varlığı ile kuvvetli biçimde ilişkili bulunmuştur (13).

İBH gen çalışmaları ile Th17/IL23 (mikrobiyal infeksiyonlara karşı oluşan bağışıklık yanıtında görevli bir yolak) (14) gibi hem CH, hem de ÜK için ortak olan veya İBH ile diğer hastalıklar arasında paylaşılan ve belki de olabildiğince hastalığa özgün (ÜK için bariyer bütünlüğü ve CH için otofaji) yolaklar bulunduğu ortaya çıkarılmıştır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, hastalığı predispose eden gen varyantları ile immün, inflamatuvar ve homeostatik yolaklar arasındaki ilişkiyi hedef alan tedavi stratejileri geliştirme eğilimindedir. Örneğin CH'a özgün olarak otofaji yolağında bir bozukluk bulunan hastalarda, rapamisin gibi otofajiyi indükleyen ilaçların kullanılması gündeme gelebilir. NOD2/CARD15 pozitif hastalar, sargramostim gibi doğal bağışıklığı uyaran tedavilerden yarar görebilir. GWAS

verileri kullanılarak hangi hastalarda anti-TNF ajanlarının, hangilerinde de seçici adhezyon molekül antagonistlerinin kullanılacağına karar verilebilir (15).

#### **2.1.2.2 İmmünolojik Faktörler**

İBH'ında immün reaksiyonların intestinal epitelyumun kendi antijenlerine mi yoksa bakteriyel antijenlere karşı mı geliştiği hala bilinmemektedir. İBH'ında görülen immünolojik cevaplar konusunda şu yorumlar yapılabilir (16,17)

-Normalde bağırsak epitelinde kommensal mikroorganizmalara karşı immün toleransı sağlayan CD8 supresör T hücresi aktivasyonu mevcuttur; ancak, hem CH hem de ÜK'te, lamina propria ve periferik kanda proinflamatuvar sitokin salınımindan sorumlu tutulan CD4+ T hücresi aktivasyonu mevcuttur.

-CH başlıca; Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- $\alpha$ ), interlekin (IL)-12 ve interferon- $\gamma$  gibi Th1 hücre sitokinleri ile ilişkilendirilmiştir

- Fare modelleriyle yapılan son çalışmalarda doku inflamasyonunun bir CD4+ T hücre grubu olan TH17 hücrelerinin sekrete ettiği sitokin IL-17 nedeniyle meydana geldiği gösterilmiştir.

- İnflamatuvar sitokin TNF'nin İBH'nın patogenezindeki önemi, TNF antagonistlerinin bu hastalığın tedavisindeki etkinliğini açıklamaktadır.

#### **2.1.2.3 Mikrobiyal Faktörler**

İBH'ına mikroorganizmaların neden olduğuna dair herhangi bir kanıt bulunmamasına karşın bu mikrororganizmaların, bağışıklık sistemini antijenik olarak tetiklediği düşünülmektedir. Gram negatif bakteri duvarında bulunan kompleks lipopolisakkaritler, oldukça immünojenik olmalarına karşın sağlıklı bir intestinal bariyerden penetre olamamaktadırlar; ancak, bariyerde bir sorun olduğunda bağırsak lamina propriası lüminal içeriğe maruz kalacak olursa inflamatuvar süreç başlayabilmektedir (16).

#### **2.1.2.4 Çevresel Faktörler**

İBH için çevresel faktörler geniş bir dağılım göstermektedir. Bunlardan bazıları aşağıda ele alınmıştır.



### *Sigara İçimi*

Sigara içiminin İBH üzerinde hem olumlu hem de olumsuz etkileri çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. CH gelişme riskini artırırken ÜK üzerine böyle bir etkisi bulunmamaktadır. Sigaranın bırakılması ÜK alevlenmesi riskini artırırken, CH'nın şiddetinde azalmaya neden olabilmektedir (18).

### *Oral Kontraseptif ve Hormon Replasman Tedavisi*

Bir çok çalışmada oral kontraseptif kullanım süresi ile İBH arasında doğru orantılı bir ilişki gösterilmiştir. Hormon replasman tedavisi kullanımı ile ilgili yapılan bir çalışmada hormon replasman tedavisi alan kadınlarda CH riskinin artmış olduğu; ancak, ÜK için böyle bir durumun sözkonusu olmadığı bildirilmiştir (19).

### *Apendektomi*

Pek çok epidemiyolojik çalışma ile apendektomi ile İBH arasında negatif yönde bir ilişki olduğu gösterilmiştir (20). Yunanistan'da yapılan bir meta-analiz çalışması ile apendektominin, ÜK gelişme olasılığını % 69 azalttığı gösterilmiştir (OR 0.31, % 95 CI 0.25–0.38) (21).

### *Antibiyotik Kullanımı*

Antibiyotiklerin, kolonda bulunan yararlı mikroorganizmalarda *Lactobacillus*, *Lactobacillus*, *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* gibi türlerin sayısını azaltarak invazif *E coli* gibi patojen bakterilerin bağırsak epiteline tutunup invaze olmasını artırarak CH'nın insidansını artırdığı gösterilmiştir. Pediatrik gruplarda yapılan çeşitli çalışmalarla, bağırsak florasındaki kommensal mikroorganizmaların bağırsak lümenine yerleşerek ,bir denge içinde yaşamaya başladığı yaşamın ilk bir yılı içindeki antibiotik kullanımının, İBH insidansını olumsuz etkilediği gösterilmiştir (9).

İBH'da antibiotik kullanımı ile ilgili ikinci bir bakış açısı da AIEC (*Adherent-invasive Escherichia coli*), *Mycobacterium paratuberculosis*, mayalar (*Candida albicans*), *Listeria*, *Yersinia* ve *Chlamydia trachomatis* gibi bağırsak patojenlerine karşı etkili antibiotiklerin, hastalığın tedavisi üzerine etkili olup olmayacağı üzerinde yoğunlaşmaktadır. Yakın zamanda yapılan randomize plasebo-kontrollü çalışmaların meta-analiz sonuçlarına göre aktif, perianal ve sessiz CH ile aktif ÜK'te, antibiotiklerin plaseboya göre anlamlı derecede üstün

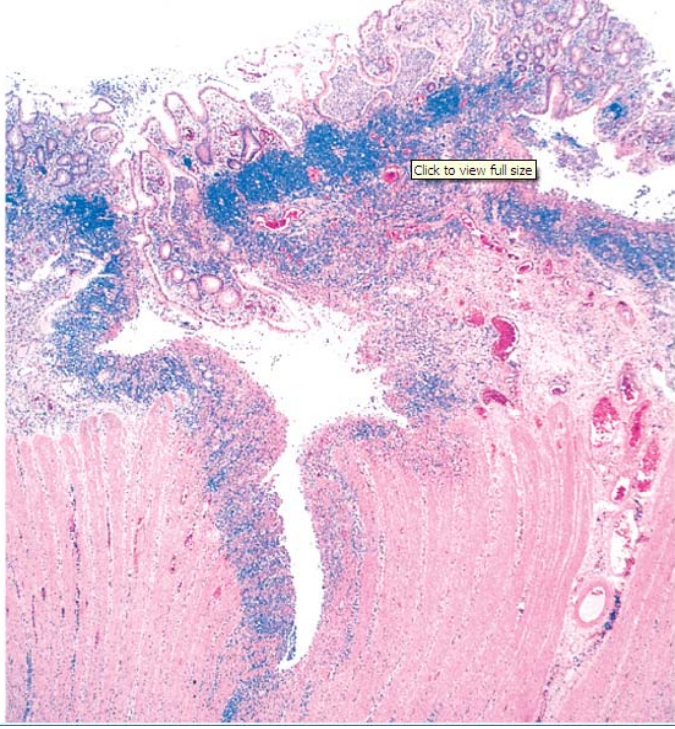
olduğu bulunmasına karşın diğer pek çok çalışma sonuçları bu durumla çelişkiler göstermektedir (22).

İnflamasyon İBH patogenezinde sonuç olarak gelişmektedir. Hem İBH'nın klinik özellikleri, hem de morfolojik değişiklikler; başta nötrofiller, daha sonra lenfositler olmak üzere inflamatuvar hücrelerin aktivasyonu sonucu ortaya çıkar. Bu inflamatuvar hücrelerin ürünleri nonspesifik doku hasarına yol açar. İnflamasyon 1) mukozal epitelyal bariyerin bütünlüğünün bozulmasına, 2) yüzey epitelyal hücrelerin absorbtif fonksiyonunun kaybına yol açar. Bu olayların hepsi birden, bu olayların karakteristiği olan aralıklı kanlı ishale neden olur. Tedavi girişimlerinin çoğu, tamamen ya da kısmen bağışıklık sisteminin baskılanarak kontrol altına alınmasına yöneliktir.

### **2.1.3. Crohn Hastalığı**

Crohn Hastalığı sindirim kanalının ağızdan anüse kadar herhangi bir bölgesini etkileyebilse de vakaların %30-40'ında sadece ince bağırsakta, %40-50'sinde ileoçekal bölgede, %20'sinde yalnız kolonda gözlenmektedir. Hastalık gelişimini tamamladığında bağırsakta mukozal hasar ile birlikte tipik transmural inflamatuvar süreç, %40-60 hastada nonkazeöz granülomlar ve fistül formasyonuna da yol açan fissürler ile karakterizedir. CH'nın tanısı radyolojik, endoskopik ve histolojik bulguların uygun klinik özelliklerle bir araya getirilmesi ile konulur. Tipik olarak rektum korunur ve tutulum rneği normal bölümlerin araya girmesiyle sıklıkla kesintilidir. Bu kesinti bulgusu veya 'skip' lezyonlar kolonoskopik veya baryumlu radyolojik görüntüleme çalışmalarında karakteristiktir. Kolon tutulumu olan hastalarda daha sık olmakla birlikte tüm hastaların 1/3'ünde anal kanalda kriptoglandler yapıları (morgani kripleri) tutar. Perianal hastalık tek başına bulunmaz. Üst gastrointestinal traktus (ağız, özefagus, mide ve duodenum) tutulumu nadirdir ve daima başka yerdeki hastalıkla birlikte dir.

İntestinal mukozada erken dönemde aftöz ülserlere benzeyen, fokal mukozal ülserler, dem ve normal mukozal yapının bozulduğu görülür. Hastalık ilerledikçe lezyonlar, bağırsağın uzun eksenine paralel uzanan lineer ülserler oluşturacak şekilde birleşir. Etkilenmiş kısımlar arasında kalan mukozal alanlar nispeten sağlam olduğundan kaldırım taşı görünümüne neden olurlar. Mukoza katlantıları arasında sıklıkla serozaya kadar tüm bağırsak duvarını kateden dar fissürler gelişir (şekil 1).



**Şekil 1:** Kolonda CH. Kas tabakasının içine doğru uzanan derin bir fissür, yüzeysel bir ülser (sağ üstte) ve aradaki mukozanın nispeten düzgün olduğu izlenmektedir. Yoğun lenfosit agregatları mevcut olup, bunlar mukozaya ve submukoza arasındaki bölgede mavi alanlar şeklinde gözlenmektedir.

CH çok çeşitli şekillerde kendini gösterebilir. Ön planda gözlenen özellikler tekrarlayan ishal atakları, kramp tarzında abdominal ağrı ve günler ya da haftalar süren ateştir. Hastalık çoğunlukla remisyon ve alevlenmeler şeklinde inişli çıkışlı seyreder.

CH'nin bazı önemli sonuçları şunlardır:

1-Diğer bağırsak segmentlerine, vajinaya ya da perianal deriye fistül oluşumu

2-Abdominal abseler ya da peritonit

3-Cerrahi müdahale gerektiren intestinal striktür ya da obstrüksiyon

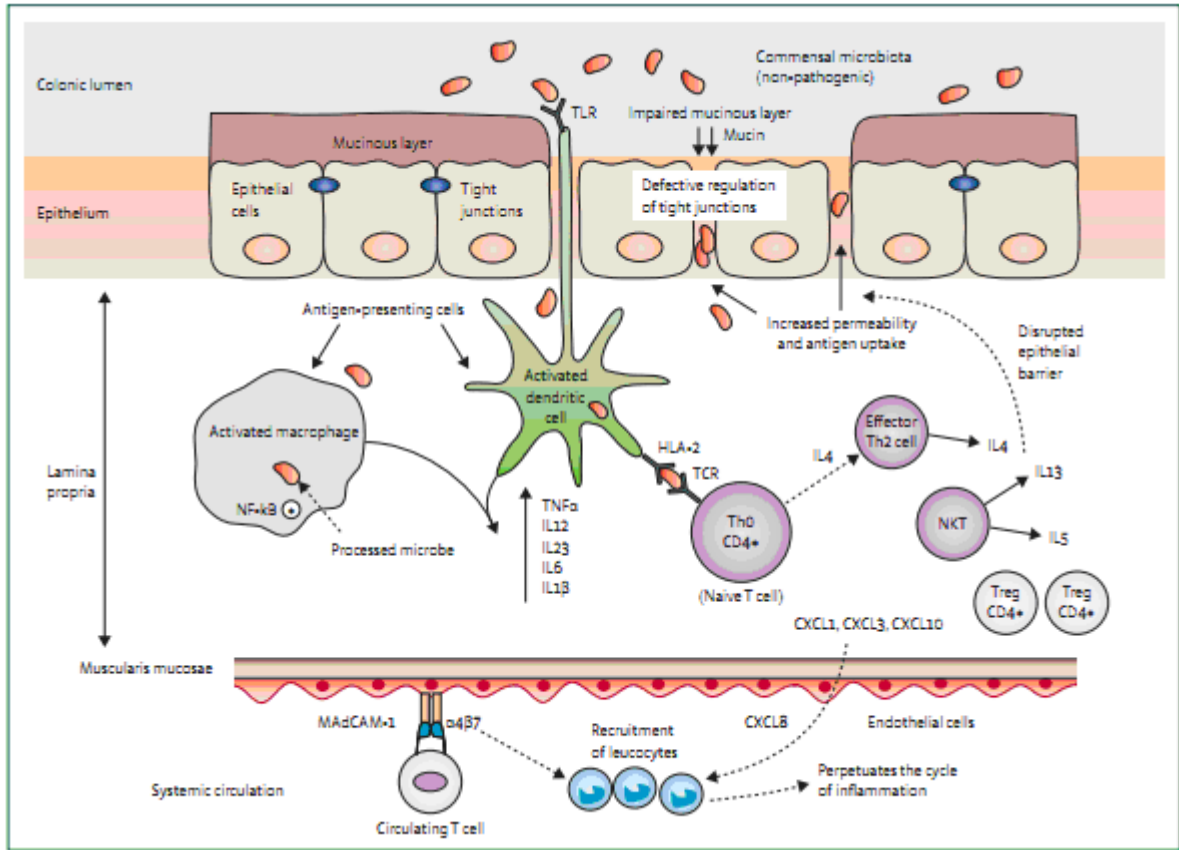
Ender olarak kolonun toksik dilatasyonu görülebilir. CH'ında kanser riski artışı belirgin olmasına rağmen ÜK'ten daha düşüktür (8,23).

**Tablo 1:** Ülseratif Kolit ve CH karşılaştırması (12)

ÖZELLİK	ÜLSERATİF KOLİT	CROHN HASTALIĞI
<b>PATOLOJİ</b>		
Rektal tutulum	Daima	Sık
Skip lezyonlar	Hiçbir zaman	Sık
Transmural tutulum	Ender	Sık
Granülomlar	Ara sıra	Sık
Perianal hastalık	Hiçbir zaman	Sık
Kaldırım taşı mukoza	Ender	Sık
<b>RADYOLOJİ</b>		
Yaka düğmesi ülser	Sık	Ara sıra
İnce bağırsak tutulumu	Hiçbir zaman	Sık
Atlamalı tutulum	Hiçbir zaman	Sık
Fistüller	Hiçbir zaman	Sık
Striktürler	Ara sıra	Sık
<b>ENDOSKOPI</b>		
Aftöz ülserler	Hiçbir zaman	Sık
Atlamalı tutulum	Hiçbir zaman	Sık
Rektal korunum	Hiçbir zaman	Sık
Lineer veya serpijinöz ülserler	Hiçbir zaman	Sık
Terminal ileumda ülser	Hiçbir zaman	Sık

#### 2.1.4. Ülseratif Kolit

ÜK'te inflamasyon karakteristik olarak mukozal yüzeye sınırlıdır. Rektumdan başlayıp proksimale doğru devam ederek bazen tüm kolonu etkileyebilir. Proktit ya da sol taraflı koliti olan hastalarda çekuma ait bir alanda da inflamasyon bulunabilir. Müsinöz tabaka ile kaplı epitelyal bariyer, lüminal mikroorganizmalarla konakçı bağışıklık hücrelerini fiziksel olarak birbirinden ayırarak ve antimikrobiyal peptidler sentezleyerek, mukozal immun sistemin ilk savunma hattını oluşturmaktadır. Epitelyal bariyerin hasarlanması muhtemelen 'tight junction'lardaki bozulmaya bağlı olarak permeabilite artışına neden olmaktadır. Bu bozukluğun kronik inflamasyondan kaynaklanıp kaynaklanmadığı ya da ülseratif kolite yol açıp açmadığı belirsiz olsa da bu bariyer kaybı, luminal antijen alımını artırmaktadır (Şekil 2).



**Şekil 2:** ÜK Patofizyolojisi (TLR-Toll-like receptor. HLA-human leucocyte antigen. IL-interleukin. TNF-tumour necrosis factor. NF-κB -nuclear factor-κB. Th-T hepler. NKT-natural killer T cell. CXCL-chemokine. Treg-regulatory T cell. MAdCAM1- mucosal vascular adressin-cell adhesion molecule 1) Epitel tabakayı kaplayan mukus film ve ‘tight junctions’teki bozulma, intestinal epitelyum permeabilitesini artırarak luminal antijenlerin alımını artırır. Molekül Paterni Tanıma Reseptörleri (TLR) aracılığıyla non-patojenik bakterileri tanıyan makrofaj ve dentritik hücreler, fonksiyonel durumlarını tolerojenik olandan aktif fenotipe doğru değiştirirler. NF-κB yolaklarının aktivasyonu proinflamatuvar genlerin transkripsiyonunu uyararak proinflamatuvar sitokin üretimini (TNF-α, interlökin12, 23 ,6, 1β) artırır. Makrofaj ve dentritik hücreler, işledikleri antijenleri naif CD4T-hücrelerine sunarak, interlökin-4 üretimiyle karakterize efektör Th2 hücrelerine farklılaşmalarını sağlarlar. Epitelyal bariyerin bozulmasıyla ilişkilendirilmiş interlökin-13’ün temel kaynağı da Naturel-killer T hücreleridir. Dolaşımdaki integrin-α4β7 taşıyan T hücreleri, inflame bağırsak dokusunda ekspresyonu artan ‘mucosal vascular adressin-cell adhesion molecule 1’ aracılığıyla kolonik kılcal damar endotel hücrelerine bağlanınca, bağırsağa özgü T hücrelerinin lamina propriaya geçişi artar. CXCL1, CXCL3, CXCL8 gibi inflamatuvar kemokinler upregüle olunca dolaşımdan lökosit göçü olur ve inflamasyon döngüsü devamlı hal alır (24).

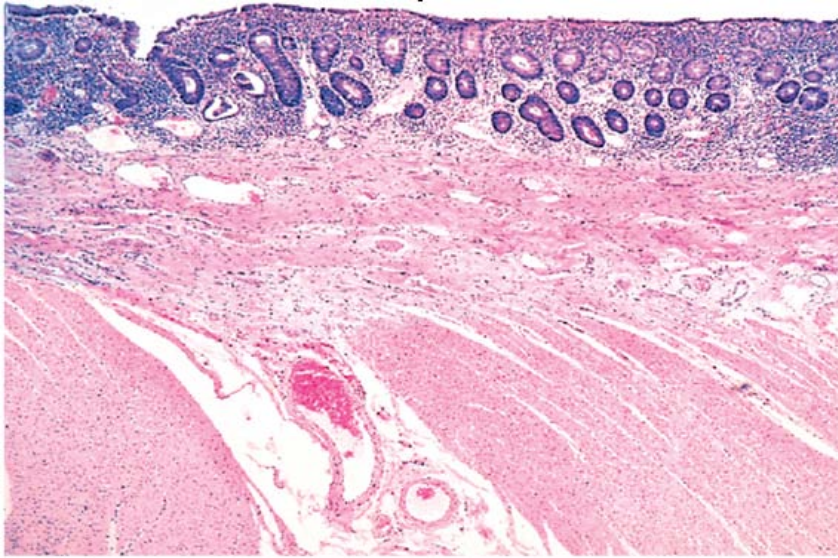
#### 2.1.4.1. Ülseratif Kolit Patolojisi

Hastaların yaklaşık yarısında tanı konduğu sırada sadece rektum ve rektosigmoid kolon etkilenmiştir. Hastalığın pankolit ile ortaya çıkması genellikle daha nadirdir. Aktif hastalık

durumunda mukozada makroskopik hiperemi, ödem, granüler görünüm ve kolay kanama şeklinde kendini gösteren inflamatuvar bir harabiyet mevcuttur. Şiddetli aktif hastalık durumunda kolonda yaygın olarak geniş tabanlı mukozal ülserasyonlar gözlenir. Rejenere olan mukozanın oluşturduğu izole adacıklar yüzeye çıkıntı yaparak 'psödopolipleri' oluştururlar.

ÜK'in tipik lezyonu kript abseleridir. Kript içinde, kript duvarında ve etrafındaki lamina propiada nötrofillerle varlığı ile karakterizedir. Kript abseleri ÜK'te karakteristik olmasına rağmen aynı zamanda akut, kendini sınırlayan infeksiyöz kolitte ve CH'nda da görülür. ÜK'te lamina propiada ilaveten mononükleer hücre artışı görülmesi, hastalığın kronik niteliğini destekler.

Mukozanın daha şiddetli harabiyeti, submukozaya kadar ilerleyen, bazen muskularis proprianın lumendeki materyale maruz kalmasına yol açan ülserasyona neden olur (Şekil 3). Az sayıdaki hastada muskularis propria o kadar zarar görür ki, perforasyon ve perikolonik abseler meydana gelir. Muskularis proprianın ve nöral pleksusların fekal materyale maruz kalması nöromusküler fonksiyonların tamamen durmasına yol açabilir. Bu şekilde kolonun progresif olarak genişleyip gangrenöz hale gelmesine 'toksik megakolon' denir (8).



**Şekil 3:** Kolonda ÜK. ÜK nedeniyle mukozada belirgin kronik inflamasyon, kolonik glandlarda atrofi, orta derecede submukozal fibrozis ve duvarın normal kas tabakası gözlenmektedir.

#### 2.1.4.2. Ülseratif Kolit Klinik Bulguları

ÜK insidansı insan yaşamında iki dönemde pik yapabilmektedir. Bunlardan birinci ve temel olanı 15-30 yaşları arasında görülürken, daha küçük ikinci pik de 50-70 yaşlar arasında görülmektedir (24).

ÜK tanısı klinik belirtilerin daha çok endoskopik ve histolojik bulgularla pekiştirilmesi ile konulur. Tanı için mutlaka infeksiyöz ve non-infeksiyöz diyare etkenlerinin dışlanması gerekmektedir.

Günümüzde, hastalığın sınıflandırması için Montreal (2005) ya da Paris (2011) konsensüsleri kullanılmaktadır. Bu konsensüsler hastalığın progresyonuna göre riskleri değerlendirmeyi ve doğru bireysel tedavi yönetimini kolaylaştırmaktadır.

Daha önce yalnızca CH için sınıflandırmalar yapılmışken, ÜK ilk kez Montreal konsensüsü ile sınıflandırmaya dahil edilmiş (Tablo 2); bu süreç pediatrik hastalardaki dinamik değişiklikleri içeren Paris konsensüsü ile de geliştirilmeye devam edilmiştir.

**Tablo 2:** Montreal Sınıflandırması \*

E1 (proktit)	Rektum ile sınırlı inflamasyon
E2 (sol taraflı; distal)	Splenik fleksura ile sınırlı inflamasyon
E3 (pankolit)	Splenik fleksuranın proksimalini de kapsayan inflamasyon
S0 (remisyon)	Semptom yok
S1(hafif)	Günde dört kez ya da daha az sayıda dışkılama (kanlı ya da kansız), sistemik belirtiler yok, inflamatuvar belirteçler normal
S2 (ılımlı/orta)	Günde dört kez dışkılama, sistemik belirtiler minimum
S3 (şiddetli):	Günde altı kez ya da daha fazla sayıda dışkılama, nabız sayısı dakikada $\geq 90$ , vücut sıcaklığı $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$ , hemoglobin konsantrasyonu $<10.5$ g/dL, eritrosit sedimentasyon hızı $\geq 30$ mm/h

\* Sınıflandırma, hastalığın organ tutulumundaki yaygınlığı (E; extent) ve klinik şiddetini (S; severity) gösteren iki ölçüt üzerinden yapılmaktadır.

ÜK sınıflandırmasının anatomik tutulum alanına göre belirlenmesinin tedavideki faydaları şöyledir: örneğin E1 olan bir hasta supposituvarlardan, E2'deki enemalardan fayda görebilir. Splenik fleksuranın üzerine uzanan bir inflamasyon varlığında ilk tercih oral tedavi olmalıdır. Yine hastalığın şiddetine göre yapılan sınıflandırma sonucunda ilacın oral mi yoksa intravenöz mü verileceği, kortikostreoid başlamaya gerek olup olmadığı da belirlenebilmektedir (25).

### **2.1.4.3. Ülseratif Kolit Laboratuvar Bulguları**

Ülseratif kolitin laboratuvar bulguları konusunda birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaların rutin olarak kullanılan veya henüz rutin olarak kullanılmayan ama üzerinde çalışılmakta olan bir kısmı aşağıda yer almaktadır.

#### *C-Reaktif Protein*

C-Reaktif Protein (CRP), çeşitli akut ve kronik durumlara cevaben karaciğerde üretilen bir proteindir. Aktif İBH ile ilişkili IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  gibi sitokinler, hepatositlerde CRP yapımını uyararak, 1 mg/L olan taban seviyesinin üstüne çıkmasına neden olur. Aktif İBH süresince CRP değeri, hastalığın şiddetine ve bireysel CRP üretme kapasitesine bağlı olarak 5-200 mg/L aralığında değişebilir. İBH'na spesifik olmasa da tanısal laboratuvarlarda kolay ve güvenilir bir şekilde ölçülebilmesi ve 19 saat gibi kısa yarı ömre sahip olması CRP'nin bir biyobelirteç olarak olumlu özellikleridir. Bireysel bağışıklık yanıtı ve CRP yüksekliğindeki farklılıklar ÜK'tense CH'nda daha sık görülmektedir. Bunun muhtemel nedenleri arasında ÜK'e göre CH'nda dokunun daha derin katmanlarında inflamasyon bulunması ve yüksek IL-6 seviyesi sayılmaktadır. Florin ve ark. (26) düşük CRP yanıtı olan hasta grubunda, izole ileal hastalık ve düşük vücut-kitle oranı ortak özelliklerini bulmuş olsa da başka bir hasta kohort analizi ile bu bulguların anlamlılığı doğrulanmamıştır. CRP seviyesindeki farklılıkların açıklanmaya çalışılmasında gen polimorfizmlerine değinen yayınlar da bulunmaktadır (27).

#### *Eritrosit Sedimentasyon Hızı (ESH/ESR)*

ESR ölçümü, akut faz yanıtının değerlendirilmesinde kaba ama hızlı bir değerlendirme olanağı sağlamaktadır. İnflamasyon mevcut olduğunda, fibrinojen gibi sedimentasyon öncülü faktörler, eritrositlerin birbirine yapışarak hızla çökmesine neden olurlar. Yaş, ırk, anemi, kan diskrazileri ve gebelik gibi çeşitli faktörler ESR'yi etkiler. CRP ile kıyaslandığında



inflamasyondaki değişikliklere cevaben ESR daha yavaş pik yapar ve düşer. Ayrıca hastalık aktivitesindeki değişikliklerle daha az uyumludur. Yine de daha önce olduğu gibi bugün de ESR yaygın olarak, İBH aktivitesi biyobelirteci olarak kullanılmaktadır (27) .

#### *Diğer Bazı Protein ve Hücresel Laboratuvar Belirteçleri*

Hemostatik fonksiyonlarından ayrı olarak trombositlerin inflamasyon sürecinde de rolü olduğu kabul edilmektedir. İBH patofizyolojisiyle olası ilişkisi halen aktif araştırma konusu olsa da, aktif İBH'ında, ortalama trombosit hacmi düşük iken trombosit sayısı yüksek bulunabilir. Bu durum, İBH'nı infeksiyöz diyarelerden ayırmakta yararlı olabilir. Normal seviye oldukça değişken olsa da pratikte trombosit sayısı rutin olarak bakılabilmektedir ve artmış olması klinisyeni devam eden bir inflamasyon konusunda uyarabilir (27).

İBH'ında serumda saptanabilecek diğer klasik akut faz proteinleri  $\alpha$ 1-asit glikoprotein (orosomukoid), fibrinojen, serum amiloid A,  $\beta$ 2-mikroglobulin,  $\alpha$ 2-globulin ve  $\alpha$ 1-antitripsindir.  $\alpha$ 1-asid glikoprotein seviyesinin İBH'da hastalık aktivitesi ile, ayrıca bağırsaklara doğru olan protein kaybıyla da korele olduğu gösterilmiştir; ancak, serum yarı ömrünün beş gün olması, hastalık aktivitesindeki artışı gösteren bir belirteç olarak yararlılığını sınırlamaktadır. Serumda bulunan diğer akut faz reaktantlarının bir kısmı bu amaçla araştırılmamış, araştırılanların da İBH tanı ve progresyonunu göstermede yararlı olmadığı veya CRP'ye üstünlüklerinin bulunmadığı belirtilmiştir.

Bu hastalıkta, beyaz küre sayısı glukokortikoid tedavisinden etkilenmekle ve non-spesifik olmakla birlikte artmış olabilir. Albumin de nutrisyonel durumdan etkilenmekle birlikte akut inflamasyonda düşebilir (27,28)

#### *Serolojik Belirteçler ve Antikorlar*

Önemle üzerinde durulan antikorlar arasında anti-nötrofil sitoplazmik antikorlar (ANCA) ve anti-Saccharomyces cerevisiae antikorlar (ASCA) yer almaktadır. ANCA'lar ilk olarak 1980'lerde İBH ve özellikle de ÜK ile ilişkilendirilmiştir. ANCA'lar nötrofil ve monositlerin sitoplazmasındaki antijenlere karşı oluşmuş, IgG alt sınıfından bir grup antikoru ifade etmektedir. İndirekt immünfloresan yöntemlerle belirlenmiş üç yapı bulunmaktadır: sitoplazmik (c), perinükleer (p) ve atipik (a) ANCA'lar (29). İntestinal mukozadaki B hücreleri muhtemelen kendisine ait bir epitopa ya da da bağırsak mukozasına yerleşmiş bir patojene karşı pANCA üretmektedir. 1996'da Vasiliauskas ve ark (30) pANCA negatif olan

hasta grubuna göre pANCA pozitif olan hastalarda sol taraflı kolit bulgularına daha sık rastlandığını belirtmişlerdir. Reese ve ark. (31) yaptıkları çalışmada ÜK tanısı için pANCA pozitifliğini % 55.3 duyarlılık ve % 88.5 özgüllük ile tanımlamışlardır.

ASCA'lar, mayaların -kısmen mannan gibi- hücre duvar bileşenlerine karşı yanıt olarak üretilmektedir. Main ve ark (32) bu antikorun varlığını, 1988'de küçük bir İBH grubunda tanımladılar. ÜK'li ve sağlıklı kontrol grubuna göre CH'nda, *Saccharomyces cerevisiae*'ye karşı daha büyük oranda IgG ve IgA antikorları eksprese edildiğini gösterdiler. Reese ve ark. (31) CH'nda, ANCA negatifliği ile kombine edildiğinde ASCA pozitifliğinin duyarlılığını % 54.6, özgüllüğünü de % 92.8 olarak bulmuşlardır (33).

Diğer bir antikor grubu, anti-karbohidrat antikorlar arasında yer alan anti-laminaribiozid karbohidrat IgG (ALCA), anti-kitobiozid karbohidrat IgA (ACCA) ve anti-sentetik mannozid antikorlarıdır (ASMA veya AMCA). ALCA, ACCA ve AMCA yeni tanımlanmış anti-glikan antikorlardır. ASMA gibi, mikroorganizmaların yüzeylerinde bulunan şekerlere karşı oluşurlar (27).

İBH'ndaki immün cevaptan çeşitli mikrobiyal antijenler de sorumlu tutulmuşlardır. *Escherichia coli* dış membran porin C (OmpC), *Pseudomonas floresan* CD-ilişkili protein (I2), ve anti-CBiR1 (anti-flagellin) gibi antijen ve antikorlar Crohn hastalarının %50'sinde bulunmakta iken, ÜK'lilerde genellikle bulunmamaktadır (28).

### *Fekal Belirteçler*

Fekal ölçümü de yapılabilen kalprotektin, her molekülünde 'EF-hand' kalsiyum bağlayıcı motif bulunduran S100/kalgranulin ailesine üye, kalsiyum ve çinko bağlayıcı bir proteindir (3). Kalprotektinin moleküler ağırlığı 24 kDa'dur. Her birinde iki kalsiyum bağlayıcı bölge bulunan heterodimerdir. Ağır zinciri oluşturan 14 kDa ağırlığındaki S100A9 ile hafif zinciri oluşturan 8 kDa ağırlığındaki S100A8 arasında kalsiyum bağımlı olarak oluşan non kovalent bir bağ vardır. Heterodimer yapısı en yaygın olarak bulunan yapıdır. Protein homodimerik, trimerik ve tetramerik kompleksler şeklinde bulunabileceği gibi her zincir ayrı ayrı olarak da bulunabilir. Kalprotektin başlıca nötrofillerde, daha az miktarda da monosit ve makrofajlarda bulunur. Antimikrobiyal, kemotaktik ve apoptozis indükleyici özellikleri ile endotelin inflamatuvar ve trombojenik cevabında, lökosit ve endotel hücre etkileşiminde ve hücre adezyonunda görev alır. İnflamasyonla seyreden hastalıklarda önemli bir rol oynamaktadır ve çoğunda serum ve/veya plazma kalprotektin düzeyleri hastalık

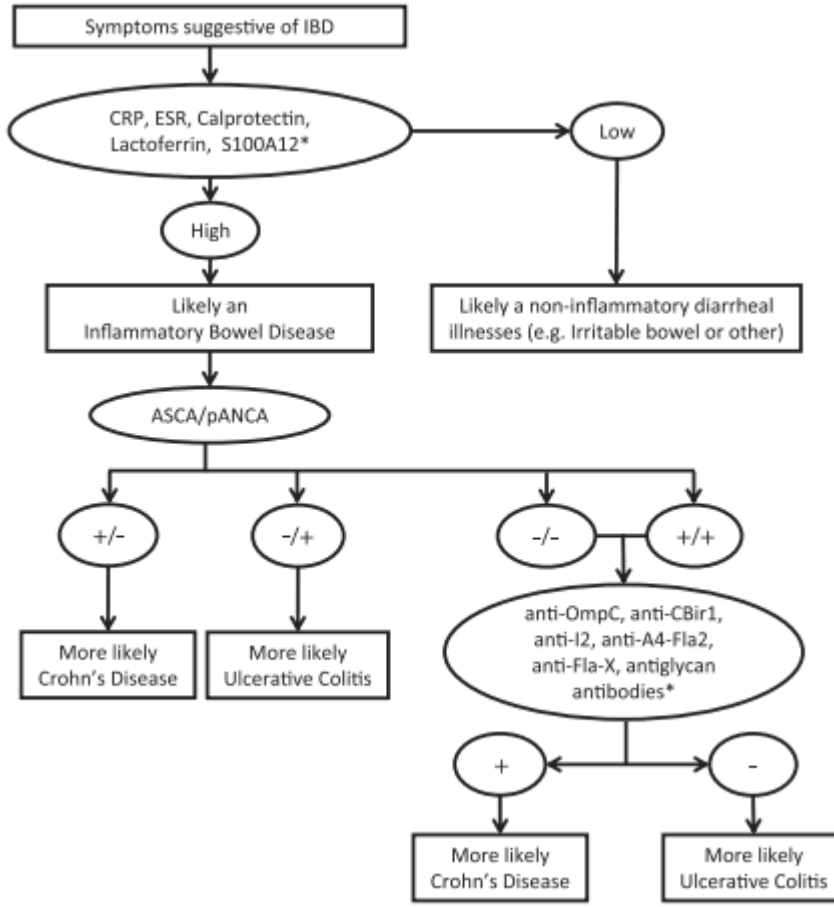
aktivitesi ile ilişkili bulunmuştur. Çocuk ve yetişkinlerde yapılan pek çok çalışmada İBH tanısının konması, tedavi yanıtının izlenmesi ve relapsların saptanmasında fekal kalprotektin düzeylerinden yararlanılabileceği gösterilmiştir (34). Fekal kalprotektinin kolon kaynaklı bakteriyel yıkıma karşı dirençli olduğu, dışkıda, oda sıcaklığında bir hafta süreyle stabil olduğu ve ticari ELISA kiti kullanılarak beş gramdan az miktardaki dışkıda bile ölçülebileceği belirtilmiştir (4).

Bir diğer fekal protein laktoferrindir. Fekal laktoferrin demir bağlayıcı bir proteindir ve fekal kalprotektine benzer şekilde nötrofillerden köken alan, antimikrobiyal özellikleri bulunan ve ticari ELISA kiti mevcut olan bir belirteçtir. Sekonder nötrofil granül içeriğinin başlıca bileşenidir. Nötrofil aktivasyonu ve degradasyonu ile salınır ve dışkıdaki proteolize karşı dirençlidir. İBH'nı foksiyonel bağırsak hastalıklarından ayırmak için yapılan pek çok çalışmada duyarlılığı ve özgüllüğü oldukça yüksek bulunmuştur (4).

Fekal S100A12 ise Kalgranulin C veya EN-RAGE (extra cellular newly identified receptor for advanced glycation end products/ ileri glikasyon son ürünleri için yeni tanımlanmış ekstrasellüler reseptör) olarak da adlandırılır. İnsan kalsiyum bağlayıcı S100 protein ailesi üyesidir. S100A8 ve S100A9 ile birlikte ekstrasellüler görevleri bulunan kalgranulin alt ailesini oluştururlar. Bu proteinler inflamasyon belirteci olarak davranmaktadır ve İBH ile ilişkilendirilmekle birlikte romatoid artrit, kistik fibrosis gibi hastalıklarda da yüksek seviyelerde saptandığı belirtilmektedir (35,36)

RAGE'ye bağlanması, TNF- $\alpha$ 'yı da içeren proinflamatuvar mediatörlerin üretimini artırarak monositlerde S100A12'yi indükleyerek, nötrofillerden de S100A12 salınımını artırabilir. TNF- $\alpha$ , İBH patogenezi ile ilgili başlıca sitokindir ve hastalık belirtileri anti-TNF- $\alpha$  antikoru tedavisini takiben gerileyebilmektedir (5).

Öncelikle İBH'nın non-İBH'dan ayırımında ve ardından da CH'nın da ÜK'ten ayırımında bu antikorların kullanımına ilişkin bir algoritma Şekil 4'te yer almaktadır.



**Şekil 4:** İBH tanısında klinik değerlendirmeye katkı sağlayabilecek biyobelirteçlerin kullanımı (27).

\* Yaygın kullanımı olmayan ya da yalnızca bazı özel laboratuarlarda çalışılabilen paneller içindeki testler.

## 2.2. İLERİ GLİKASYON SON ÜRÜNLERİ, RESEPTÖR ve ÇÖZÜNÜR RESEPTÖRLERİ

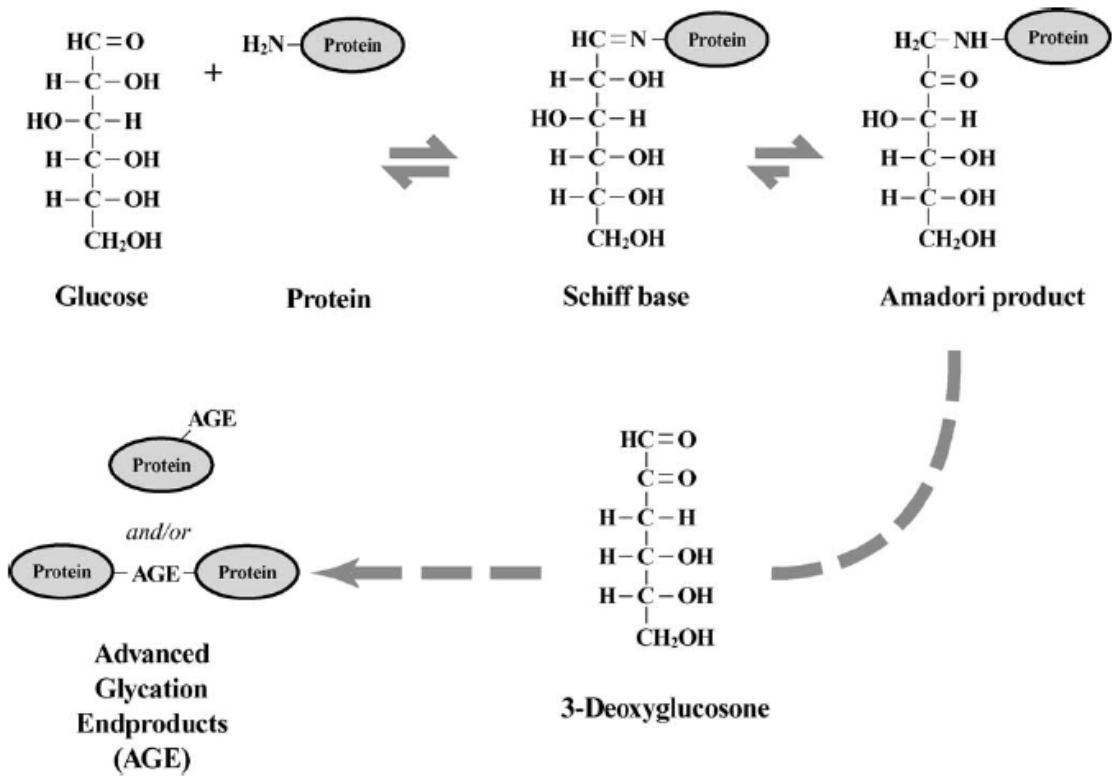
### 2.2.1. İleri Glikasyon Son Ürünleri (AGE'ler)

AGE'ler, proteinlerin arjinin ve lizin kalıntıları, lipidlerdeki veya guanin nükleik asitlerdeki serbest amino gruplarına şekerlerin non-enzimatik olarak eklenmesi ile oluşan heterojen bir molekül grubudur (37). AGE'ler in vivo hem oksidatif hem de non-oksidatif reaksiyonlarla oluşabilmektedir (38).

Non-enzimatik glikasyon süreci ilk önce L.C. Maillard tarafından 1900'lerin başında tanımlanmıştır ve o yıllarda bile diyabet gelişiminde önemli olabileceği hakkında tahminler yürütülmüştür. Daha sonra non-enzimatik glikasyon ve AGE'lerin yaşlanma, nörolojik

bozukluklar ve diyabetik komplikasyonlar gibi pek çok hastalık sürecinde önemli rolünün bulunduğu aşikar hale gelmiştir.

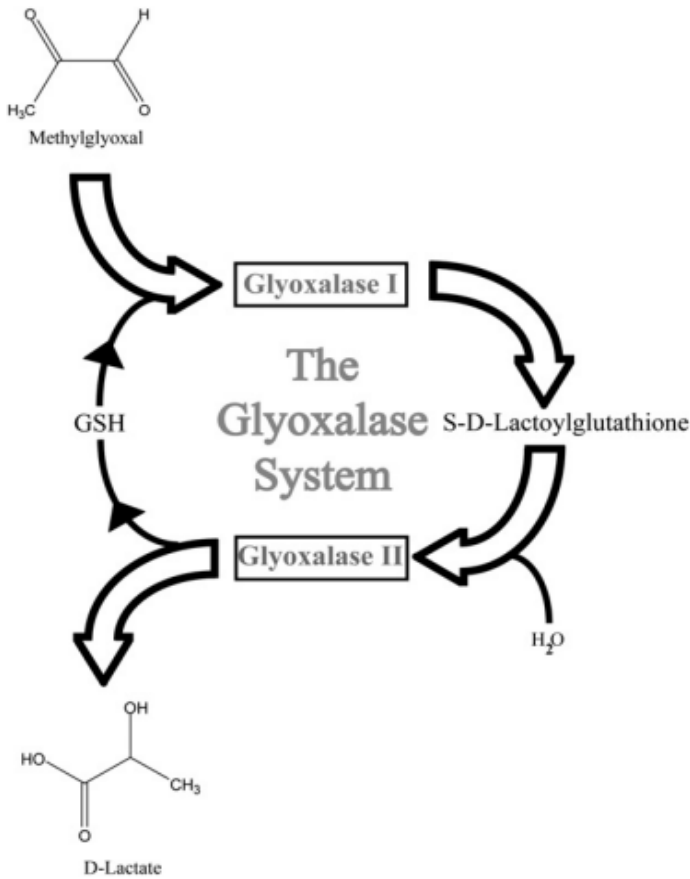
Klasik AGE yolağı (Şekil 5), proteinlerdeki amino grubuyla reaksiyona giren glukoz veya fruktoz, galaktoz, mannoz ve riboz gibi diğer indirgen şekerlerin ‘Schiff baz’ oluşturmak üzere yeniden düzenlenmesini içerir. Schiff baz oldukça kararsızdır ve Amadori ürünü veya fruktozamine indirgenir. Fruktozamin, glukoz konsantrasyonu ile miktarı değişmesine rağmen görece stabildir. En iyi bilinen Amadori ürünlerinden biri, hemoglobinin beta zincirindeki N-terminal valin amino grubunun doğal modifikasyonu ile oluşan HbA1c molekülüdür (37).



Şekil 5: Protein glikasyonu sonucunda AGE oluşumu (39)

Bu reaksiyonlar geri dönüşümlüdür ve Amadori ürünü miktarı glukoz seviyesiyle doğrudan ilişkilidir. Amadori ürünü bir kez oluşuktan sonra bu moleküllerin daha ileri oksidatif modifikasyonları gerçekleşerek, geri dönüşümsüz ileri glikozile son ürünleri (AGE’ler) oluşturabilir. Bu şekilde oksidatif yöntemle ortaya çıkan AGE’ler, N<sup>e</sup>- (karboksimetil) lizin (CML) ve pentozidin gibi glikoksidatif türevleri oluştururlar.

Glikolitik yoldaki ara ürünler, AGE'lerin hücre içindeki kaynağını oluştururlar. Bu hızlı Maillard tipi reaksiyonlarda gliokzal, metilglioksal (MG) ve 3-deoksiglukazon gibi güçlü glikasyon ajanları olan üç sınıf dikarbonil bileşik oluşabilir. Bunların arasında en güçlü glikasyon ajanı MG gibi gözükmetedir. MG, gliseraldehit 3-fosfat ve dihidroksiaseton fosfatın dönüşümünden oluşmaktadır ve genellikle 5-hidro 5-metilimidazon gibi AGE'leri ve arjpirimidin gibi floresan AGE'leri oluşturmak üzere arjininle reaksiyona girmektedir. MG düzeyleri iki enzim aktivitesi aracılığıyla düzenlenebilmektedir; glioksalaz I ve II enzimleri MG'yi D-laktata dönüştürerek detoksifiye edebilmektedir (Şekil 6). Glioksalaz aktivitesi bozulduğunda MG seviyesi yükselerek daha fazla AGE oluşumuna neden olur (40).



**Şekil 6:** Glioksalaz enzim sisteminin MG'nin detoksifiye edilmesindeki rolü (37).

AGE'ler sitoplazmik proteinler ve nükleik asitler üzerinde hızla oluşabilmektedir. Yüksek glukoz seviyelerinde (30 mM) hücre içi AGE oluşumunun 14 kat daha hızlı olduğu gösterilmiştir. Protein ve lipid oksidasyonunu içeren AGE oluşumu, moleküler

konformasyonu bozar, enzim aktivitesini değiştirir, indirgeyici kapasiteyi azaltır ve reseptörler tarafından tanınma ve temizlenmede anormalliklere neden olur (41).

Glukoz veya glikolitik ara ürünlerden köken almış AGE'lere ek olarak lipid peroksidasyonu da, proteinlerle etkileşime girebilen reaktif karbonil bileşiklerinin oluşumuna neden olarak ileri lipoksidasyon son ürünlerinin yapımına yol açabilmektedir. Bu arada CML de ileri lipoksidasyon son ürünlerinden biridir ve CML hem glikoksidasyon hem de lipid peroksidasyonu yolu ile oluşabilmektedir. Ayrıca MG, proteinlerin lizin kalıntıları ile reaksiyona girdiğinde N<sup>ε</sup>-(karboksimetil) lizin olarak bilinen bir CML-AGE homologu üretilmektedir. CML-AGE ayrıca inflamasyon mekanizmasındaki miyeloperoksidaz yolu ile de üretilmektedir. Diabetes Mellitus gibi diğer risk faktörleri olmasa bile doğal yaşlanma ve böbrek yetmezliği gibi durumlar, endojen AGE yapım ve birikimi ile ilişkilendirilmiştir. Ekzojen AGE kaynakları da in vivo AGE oluşumuna neden olabilmektedir. Fazla yağ içeren ya da yüksek ısıda pişmiş yiyecekler başta CML-AGE ya da AGE öncülü MG gibi AGE'ler içermektedir (40).

Sindirim yoluyla alınan AGE'lerin % 10'u absorbe edilirken, bunun da %30'u idrar yoluyla atılmaktadır. Sigara ve bazı çevresel kirleticilerin de AGE oluşumuna yol açabildiği gösterilmiştir. AGE'ler genellikle uzun ömürlü makro moleküller üzerinde birikirler. Dokusal moleküller ile AGE'ler arasındaki çapraz bağların kaldırılması çoğunlukla, AGE'leri özgül olarak tanıyan reseptörler veya özgül olmayan opü reseptörlere sahip doku makrofajlar tarafından gerçekleştirilmektedir. AGE'lerin ortadan kaldırılmasında, vasküler endotel veya mezengium gibi mezenkimal hücrelerin de önemli rol oynadığı giderek daha açık hale gelmektedir. Genellikle, AGE'ler ile değişikliğe uğratılmış moleküller hücre yüzey reseptör aracılı endositoz yoluyla tanınıp içeri alındıktan sonra hücre içinde degrade edilerek 'ikinci kuşak AGE'ler' diye bilinen düşük moleköl ağırlıklı AGE'ler olarak salıverilirler. Bu ikinci kuşak AGE'ler, yüksek çapraz bağ yapma veya oksidatif reaktiviteye sahip reaktif ara ürünler içerse de etkilerinin renal atılım yoluyla sınırlandırıldığı düşünölmektedir. Böylece AGE'leri ortadan kaldıran sistemin etkinliği renal klerense bağlı olmaktadır (41,42)

Sonuç olarak glioksalaz gibi detoksifikasyon mekanizmaları veya böbrek hastalığı gelişiminde olduğu gibi temizleme mekanizmaları baskılandığında AGE düzeyleri yükselir (40).

AGE'ler spontan floresan olup olmama özelliğine göre iki gruba ayrılırlar. AGE'ler yüksek performanslı kromatografi ve kütle spektrometri yöntemleri ile tanımlanabilirler.

CML ve pentosidin gibi antijenik bileşikler immünolojik yöntemlerle de saptanabilmektedir. AGE toksisitesini açıklamak üzere iki temel mekanizma tanımlanmıştır: doku/damar yapısında değişikliklere neden olan protein çapraz bağlanmaları ve RAGE , AGE-reseptör kompleksleri (AGE-R1, AGE-R2 ve AGE-R3), MSRII, CD36 ve LOX-1 gibi hücre yüzey reseptörleri ile etkileşim (2).

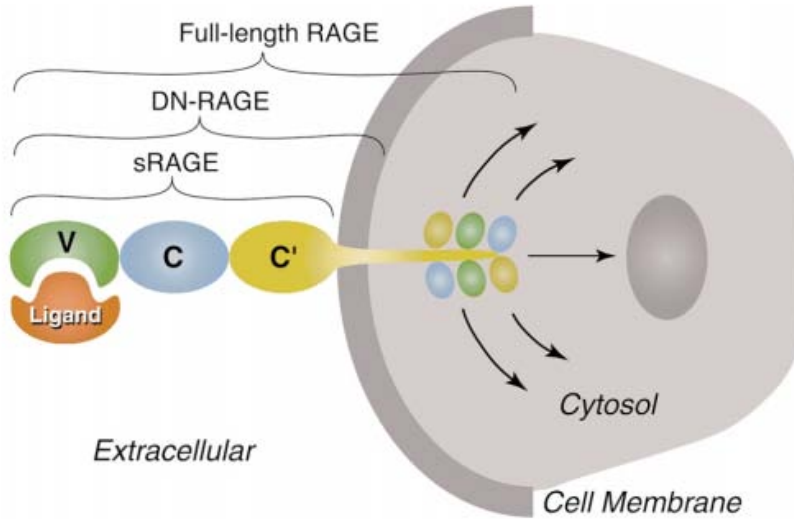
AGE araştırmalarının başlarında, in vivo AGE ürünlerinin dokulardan uzaklaştırılarak zararlı etkilerinin azaltılmasını sağlayan doğal bir reseptör sisteminin bulunduğu düşünölmekteydi. Sonraki çalışmalar ise AGE reseptörlerini AGE'lerle ilişkili biyolojik süreçlerde anahtar rolleri yanında, yaşlanma ve diyabet komplikasyonlarındaki patolojik rolleri ile tanımlamıştır. Çalışmalar, AGE'ler ile değişikliğe uğratılmış proteinleri tanıyan spesifik reseptörlerin, önceden çöpçü reseptör olarak tanımlanan sistemlerle ilişkili olmadığını göstermiştir. Son yıllarda AGE bağlayıcı birçok moleköl tanımlanmıştır. Önce, izole fare makrofajlarından ve sıçan karaciğer membranlarından moleköl ağırlıkları 60 kDa (p60) ve 90 kDa (p90) olan iki adet AGE bağlayıcı protein tanımlanmıştır. p60 günümüzde AGE-R1 olarak adlandırılmakta ve karakteristik membrana gömölü ve sinyal ileti bölgeleri ile oligosakkariltransferaz kompleksinin (OST48) 50 kDa'luk bileşeni ile homolog olduğu gösterilmiştir. p90 ise aynı zamanda AGE-R2 olarak adlandırılmıştır. 32 kDa'lık başka bir AGE bağlayıcı protein ise önce AGE reseptör kompleksi (AGE-RC) ardından da AGE-R3 olarak adlandırılmıştır. Bu protein aynı zamanda Galektin-3, Mac-2 veya karbohidrat bağlayıcı protein-35 olarak da adlandırılmakta ve AGE ligandları için yüksek affinite göstermektedir. Kanıtlar, AGE'lerin tanınma ve yüksek affinite ile bağlanmasından büyük ölçüde AGE-R1 ve AGE-R3'nin sorumlu olduğunu göstermektedir. AGE-R2'nin, AGE bağlanması ile fosforile olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle R2 komponenti, AGE reseptörü bağlanması ile ilişkili olarak, sinyal iletimi ve hücre aktivasyonunda görevli olabilir (41).

### **2.2.2. Receptor of Advanced Glycation Endproducts (RAGE)**

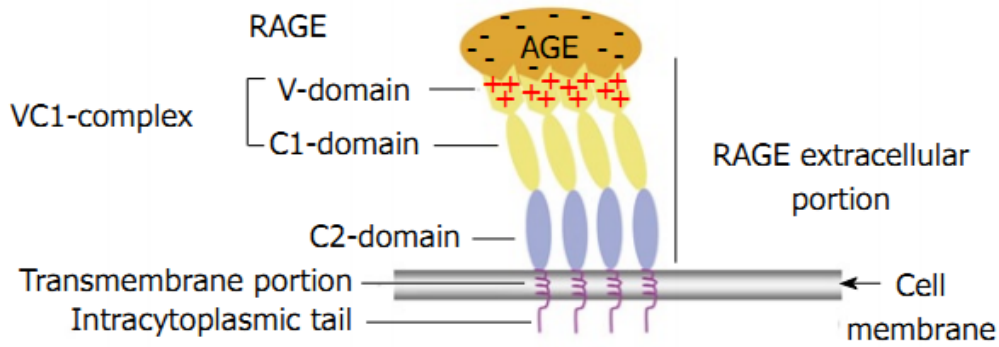
AGE'ler etkilerinin bir kısmını hücre yüzey reseptörü olan RAGE'ler aracılığıyla göstermektedir. RAGE immunglobulin süperailisi üyesidir ve AGE'lerden başka S100/kalgranulinler, HMGB1-proteinleri (high mobility group box-1 protein, amfoterin) amiloid- $\beta$  fibrilleri, Mac-1 ( $\alpha$ M $\beta$ 2, CD11b/CD18), DNA ve RNA'da bağlayabilmektedir (43,44).



Yaklaşık 47-55 kDa ağırlığında (43) bir hücre membran proteini olan RAGE'nin, çeşitli izoformları bulunmaktadır. RAGE'nin 332 aminoasitlik tam uzunlukta membrana bağlı izoformuna 'full-length isoform; fl-RAGE' denilmektedir. Eksrasellüler ve transmembran bölgeyi bulundurup sitozolik kuyruğu bulundurmeyen formuna dominant negatif RAGE (DN-RAGE), yalnız ekstrasellüler bölgeyi bulundurduğu için dolaşımda serbestçe bulunabilen formuna da solubl (sRAGE) denilmektedir (ŞEKİL 7). fl-RAGE'nin yapısı üç bölümde incelenebilir; 1) eksatrasellüler bölge (bir tane V-tipi ve 2 tane C-tipi (C1, C2) olmak üzere 3 tane immunglobulin benzeri kısımdan oluşmaktadır), 2) transmembraner bölge ve 3) oldukça yüklü, 43 aminoasitlik kısa C-terminal sitozolik kuyruk. Modern biyokimyasal teknikler bazı ligandlara bağlanmada V ve C1 bölgelerinin tek bir yapı gibi görev yaptığını düşündüren bulgular ortaya koyarken, C2 bölgesinin VC1 kompleksinden tamamen bağımsız şekilde ama ona esnek bir menteşe ile bağlı olarak görev yaptığı düşünülmektedir (Şekil 8). RAGE ligandlarının hücre içi sinyal yollarını aktive edebilmeleri için sitozolik kuyruk yaşamsal bir öneme sahiptir. Sitozolik kuyruğa sahip olmayan RAGE izoformları, AGE'leri bağlayabilir ancak bu bağlanmayla ortaya çıkması beklenen sinyal oluşumunu gerçekleştiremez (45,46)



Şekil 7: RAGE'nin izoformları (46)



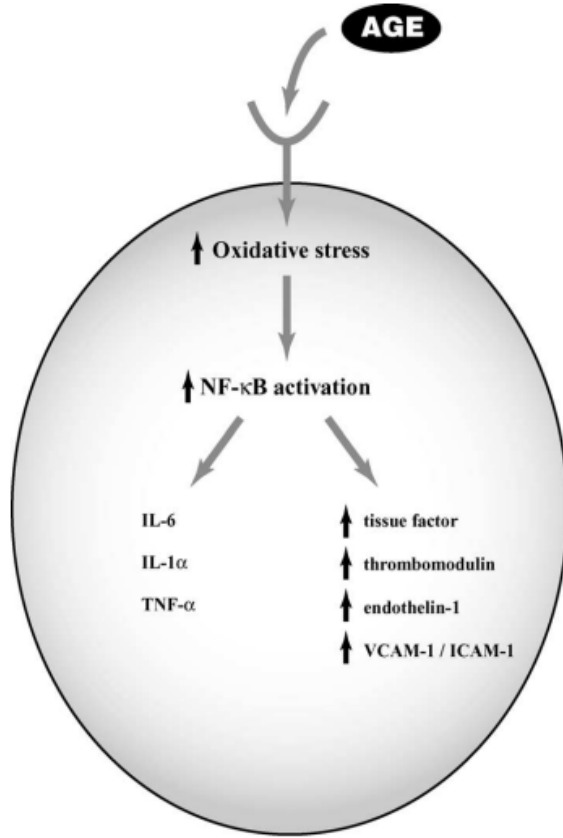
**Şekil 8:** RAGE'nin yapısı (45)

RAGE; akciğer, kalp, böbrek, beyin ve iskelet kası gibi değişik dokularda ve endotel hücresi, monosit/makrofaj, nötrofil ve lenfosit gibi çeşitli hücrelerde eksprese olmaktadır. RAGE'nin diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, artritler, kanserler ve nörolojik bozukluklar gibi değişik hastalıkların patogeneziyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Diyabette AGE'nin RAGE ile etkileşimi oksidatif stres ve inflamatuvar reaksiyonları tetikleyerek vasküler hasar ve ona bağlı komplikasyonlara neden olmaktadır. RAGE ayrıca oksidatif stres ve proinflamatuvar yanıt yoluyla aterosklerozun ilerlemesinde de önemli bir rol oynamaktadır. Artritli hastaların sinovyal doku, T hücre, B hücre ve makrofajlarındaki RAGE ekspresyonu, onun inflamatuvar eklem hastalıklarındaki önemine işaret etmektedir. Pankreas, mide, akciğer, meme kanseri ve lenfoma gibi çeşitli kanserlerde RAGE'nin fazla miktarda eksprese edildiği da belirtilmiştir. Kolorektal kanser hücreleri ile ilgili bir çalışmada, RAGE'nin inaktive edilmesinin anjiogenezi azalttığı gösterilmiştir (47).

Solubl formların oluşturulmasından genel olarak iki mekanizma sorumlu tutulmaktadır: 1) membran bağlı formdan proteolitik enzimlerce veya Adam 10 (a disintegrin and metalloprotease 10) 'un yardımıyla ayrılan ürünler olabilirler (cRAGE; cleaved RAGE), 2) mRNA'nın alternatif splicing'inden köken almış olabilirler (esRAGE; endogenous secretory RAGE/ RAGE-V1). Total sRAGE havuzu ile esRAGE'yi ayrı ayrı ölçen iki ELISA kiti bulunmaktadır ve yapılan karşılaştırmalar sonucunda esRAGE'nin, sRAGE havuzunun %20'sini oluşturduğu saptanmakla birlikte, henüz iki metodolojiyi karşılaştıran tam bir tanımlayıcı çalışma gerçekleştirilmediğinden bu oranlar kesin değildir (2).

İnsan RAGE geni, MHC’de (major histocompatibility complex) sınıf II ve sınıf III genler arasında, kromozom 6 üzerinde bulunur ve RAGE promoter bölgesinde nükleer faktör- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) alanları bulunmaktadır (48).

RAGE, kendi ligandları ile etkileştiğinde NADPH oksidaz, MAP kinaz ve NF- $\kappa$ B’yi de içeren sinyal yollarını etkinleştirerek reaktif oksijen türlerinin artmasına neden olmaktadır. Hücre sel cevap sonucunda inflamatuvar cevapta majör rol oynayan VCAM-1 (Vascular cell adhesion protein-1), ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) gibi adezyon molekülleri ile IL-6 gibi sitokinler over-eksprese olmaktadır (Şekil 9) (49,50)



**Şekil 9:** AGE-RAGE etkileşiminden sonra aktive olan intrasellüler sinyal yolları (39).

sRAGE ile ilgili genel görüş, sRAGE’nin bir tuzak gibi davranarak AGE gibi ligandları ekstrasellüler alanda yakalayıp onların RAGE ile etkileşmesini, yani inflamasyon cevabının ortaya çıkmasını engellediği yönündedir (2). Örneğin terapötikler açısından, farmakolojik antagonistler ve RAGE ‘null’ farelerle yapılan çalışmalar, RAGE blokajının, özellikle

diyabetik makro ve mikrovasküler hastalıklarda yararlı olduğunu savunmaktadır. Uzun süre (> altı ay) sRAGE ile tedavi edilen fareler tedaviyi iyi tolere etmiş ve diyabetin kronik komplikasyonlarına karşı korunmuştur (51).

Yaygın olarak inflamatuvar bir hastalık olduğu düşünülen koroner arter hastalığı (KAH) bulunan non-diyabetik erkeklerde yapılan çalışmada, sRAGE'nin yaşla eşleşmiş kontrol grubuna göre daha düşük olduğu belirtilmiştir (52). Ayrıca sRAGE'nin metabolik sendromda vücut kitle indeksi ve bel/kalça oranı ile ters korele olduğu belirtilmiştir (53).

Kronik inflamasyonla Kronik Obstruktif Akciğer Hastalığı (KOA) arasındaki ilişkiyi inceleyen çeşitli araştırmalar sonucunda RAGE'nin, bu hastaların solunum yolu epiteli ile düz kas hücrelerinde artmasına karşın, dolaşımdaki sRAGE'nin düşük bulunmasının, sRAGE'ye ithaf edilen bu tuzak işlevine bağlı olabileceği düşünülmektedir (54,55)

Kronik inflamasyonla seyreden bir diğer hastalık grubu olan İnflamatuvar Bağırsak Hastalıklarının (İBH) patogenezinde S100 ailesi proteinlerinin rolü olabileceği ve bu nedenle bu proteinlerin bağırsak inflamasyon markeri olma potansiyeli taşıdığı düşünülmektedir (5). S100A12 bir RAGE ligandır ve kendi ekspresyonunu da artıracak bir etki yapar. Etki TNF- $\alpha$  aracılıdır ancak diğer pro-inflamatuvar sitokinler de uyarılmaktadır (6,57). sRAGE ile S100A12 arasındaki dengenin İBH patogenezini etkileyebileceğinden yola çıkarak yapılan çalışmada (56) serum ve mukozal S100A12'nin İBH'ında yükseldiği ancak serum sRAGE'nin iki grup arasında anlamlı fark göstermediği, mukozal biopsi supernatanlarında ölçülen sRAGE'nin saptama sınırının altında olduğu belirtilmiştir. Fekal kalprotektin (S100A8 ve S100A9'un non-kovalent bileşiminden oluşan heterokompleks) ile serum sRAGE arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir başka çalışmada (5) sRAGE'nin İBH'lı ve sağlıklı gruplar arasında anlamlı fark göstermemesine karşın tedaviden önceki hasta grubunda fekal kalprotektin ile anlamlı negatif korele olduğu belirtilmiştir. Bu durum iki nedenden kaynaklanabilir. Birincisi, İBH'ında aşırı yükselmiş kalprotektin gibi ligandlar sRAGE tüketimini artırarak salgılanmış olan sRAGE'yi düşürmüş olabilirler. İkinci olarak sRAGE'nin salgılanan düzeyi düşük olduğundan inflamasyonla ilişkili ligandları hücre dışı ortamlarda yakalayıp etkisizleştirmede yetersiz kalmış olabilir. Bu durumda söz konusu ligandlar membran bağlı RAGE'ye bağlanarak inflamasyonu tetikleyebilir.

Çalışmamızda ÜK'li hastalarda, aktif kolitli ve sağlam görünümlü mukozadan alınmış biyopsi örneklerinde ve koliti bulunmayan sadece kolon polipi saptanmış hastalarda sağlıklı mukozadan alınmış biyopsi örneklerinde sRAGE bakılmıştır. Ayrıca serum CRP, sRAGE ve

kalprotektin düzeyleri ölçülerek ülseratif kolitteki değişiklikleri ve doku ile serumdaki düzeyler arasında korelasyon olup olmadığı irdelenmiştir. Çalışmanın amacı; sRAGE'nin, kolon inflamasyonu ile seyreden bir hastalık olan ÜK'te dokudaki düzeyinin ne şekilde etkilendiğini göstermek ve hastalık patogenezindeki rolünü aydınlatmaktır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. ARAÇ VE GEREÇLER

**Tablo 3:** Çalışmada kullanılan cihazlar

CİHAZ ADI	MARKA	MODEL	ÜRETİCİ FİRMA
Otoanalizör	Architect	C16000	Abbott Diagnostic, USA
ELISA Plak Okuyucusu	Thermo Electron Corporation	Varioskan Flash	Thermo Fisher Scientific USA
ELISA Plak Yıkayıcısı	Thermo Electron Corporation	Wellwash 4 Mk 2	Thermo Fisher Scientific USA
Mikroplate Çalkalayıcısı ve İnkübatör	Stuart	Orbital Incubator	Bio Cote
Santrifüj	Hettich	Rottich 35	Hettich Inc.
Soğuk Santrifüj	Biofuge Stratos	Heraeus	Kendro Lab. Products
Vorteks	Stuart	Vortex-Mixer	Bio Cote
Derin Dondurucu(-40°C)	Thermo	VLT1740-5-V40	Thermo Fisher Scientific USA
Derin Dondurucu(-20°C)	Uğur	UFR 370 GD	Uğur Soğ. Mak. Tic. AŞ
Buzdolabı (+4 °C)	Uğur	USS 374 DTKLY	Uğur Soğ. Mak. Tic. AŞ
Saf Su Cihazı	Millipore	Milli QZLX55003Y	Hettich Corporation, Almanya
Otomatik Pipetler	Biohit	Proline	Alpha Laboratories
Elektronik Hassas Tartı	Presica	XB 220 A	Presica, İsveç
pH Metre	Orion	420	USA
Doku Homojenizatörü	Tissue Lyser II	Retsch	Qiagen
Elektroforez Güç Kaynağı	Thermo Scientific	EC 1000 XL	Thermo Scientific Owl
Blotter Sistemi	ATTO	HorizBlot AE-6688	Labtech Int. Ltd
Developer	AGFA	CP 1000	AGFA GEVAERT N.V.

**Tablo 4:** Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve sarf malzemeler

<b>KİMYASAL ve SARF MALZEME ADI</b>	<b>ÜRETİCİ FİRMA /KOD</b>	<b>KİMYASAL ve SARF MALZEME ADI</b>	<b>ÜRETİCİ FİRMA /KOD</b>
Tris-HCl	Sigma /T5941	Süt Tozu	Appli Chem/A0830
NaCl	Riedel de Haen /13423	Sodyum Dodesil Sülfat	Sigma/ L5750
KCl	Sigma /P4504	Glisin	Fluka/ 50050
NP 40	Amresco Nonidet NP-40	Metanol	Sigma/ 348875
EDTA	Fluka/ 03680	Amonium Persulfat	Sigma/ A-9164
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck/106346	Tris	Sigma /T6066
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck/Art5100	Tetra Metil Etilen Daimin (TEMED)	Sigma /T9281
Polivinidilin florid membran	Millipore 0.25µm Immobilon P	Electro Chemy Luminesan	Thermo /32106
Tween 20	Sigma/P5927	İnhibitör Kokteyl	Sigma Fast Protease Inh. Tablets /58820
Poliklonal RAGE Antikoru	Millipore, AB9714	Protein Marker	Fermentas SMO671
Horse Radish Peroxidase işaretli konjugat	sc.2004 goat anti rabbit, Santa-Cruz	X-Ray filmi	Kodak /811 6428
β-Aktin	Abcam/Ab8227		

**Tablo 5:** Çalışmada kullanılan kitler

<b>KİT ADI</b>	<b>YÖNTEM</b>	<b>KATALOG NO</b>	<b>FİRMA</b>
sRAGE	ELISA	RD191116200R	BioVendor
Kalprotektin	ELISA	HK325	Hycult biotech
CRP	İmmünotürbidimetrik	REF6K26-30	Abbott
Pierce BCA kit	Spektrofotometrik	23225	Thermo

### 3.2. OLGULARIN SEÇİMİ, ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

Çalışmaya DEÜTF Hastanesi Gastroenteroloji Kliniği tarafından ÜK tanısı ile izlenmekte olan ve hastalık aktivitesini değerlendirmek ya da kolon kanseri taraması amacıyla kolonoskopi yapıp bu sırada kolon biyopsisi alınan 17 hasta (9K, 8E) dahil edilmiştir. Kontrol grubuna ise değişik nedenlerle kolonoskopi yapılması planlanmış ve kolonoskopi işlemi sırasında polip saptanmış 14 hasta (6K, 8E) dahil edilmiştir. Kontrol grubundaki hastalardan polip dışındaki normal görünümlü kolon mukozasından biyopsi örnekleri alınmıştır. Ne çalışma grubundaki ne de kontrol grubundaki hastalara çalışma amacıyla kolonoskopi yapılmış olup, zaten değişik nedenlerle kolonoskopi planlanmış olan hastalar onam formu alındıktan sonra çalışmaya dahil edilmiştir. Kolonoskopi işlemleri, hastalar sedoanestezi altındayken, Fujinon Japan marka EC-450DL5 model kolonoskopi cihazı yardımıyla, iki ayrı endoskopist tarafından gerçekleştirilmiştir. Doku örnekleri ependorf tüpüne alınarak hemen dondurulmuş ve analiz edilinceye kadar -20 °C’de saklanmıştır. Bu olgulardan endoskopi işlemi öncesinde kan alınmıştır.

ÜK’li hastalarda biyopsiler aynı hastanın hem kolitli mukozasından hem de sağlıklı görünen mukozasından alınmış ve bu örnekler ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Pankoliti bulunan bir hastada normal görünümlü mukoza bulunmadığından, sadece inflame mukozadan alınan örnekler değerlendirmeye alınmıştır.

Kolonoskopi yapıp hem doku hem de kan örneği alınan 17 ÜK’li hastaya ek olarak DEÜTF Hastanesi Gastroenteroloji Polikliniği’nde takip edilmekte olan 21 ÜK hastasından daha kan alınmış ve toplam 38 hastanın kan örnekleri çalışmaya dahil edilmiştir. İkinci grupta yer alan hastaların kanları, rutin işlemler için kan verme işlemi sırasında alınmıştır. Ayrıca başka nedenlerle kan vermekte olan 39 sağlıklı gönüllüden, onamları alınarak bir tüp fazla kan örneği alınmış ve sağlıklı kontrol grubu oluşturulmuştur.

Çalışmaya 18 yaş üstü kadın ve erkek hastalar dahil edilmiştir. Çalışmadaki hastaların ÜK tanısı klinik, laboratuvar, görüntüleme yöntemleri ve histopatolojik inceleme sonuçlarına göre konulmuştur. Biri dışındaki tüm hastalar ÜK tedavisi almaktadır. Çeşitli yayınlarda sRAGE düzeylerini değiştirdiği raporlanmış hastalıklara (diyabet, romatid artrit, osteoartrit, alzheimer, böbrek yetmezliği, KAH, KOAH) sahip kişiler çalışmaya dahil edilmemiştir.



Kan örnekleri (8 mL), 5000 *rpm*'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra rutin olarak kullanılmayacak olan kısmı en az 4 parçaya ayrılarak, analiz edilinceye kadar -40 °C'de saklanmıştır. Serum örnekleri CRP, sRAGE ve kalprotektin analizleri için kullanılmıştır.

Kanı hemolizli olan bir ÜK hastası çalışmadan dışlanmış olup alınan serum örnekleri arasında ikterik ve lipemik örnek bulunmamaktadır.

### 3.3. DOKU HOMOJENİZASYONU

Western Blot analizinde kullanılmak üzere, dokulardan protein elde edebilmek için homojenizasyon işlemi yapıldı.

#### Uygulama Adımları

- 1- Öncelikle her bir dokunun tartımı yapıldı ve dokudaki çözünür proteinlerin ayrılması için deterjan içermeyen 100 µl homojenizasyon tamponu PBS (Tablo 6) bulunan ependorf tüplere alındı.
- 2- Ependorf tüpleri soğutulmuş kaset içinde cihaza yerleştirildi ve homojenize edildi (frekans=1/25 s, süre=40s).
- 3- Elde edilen homojenat +4°C ve 12000 *rpm*'de 20 dakika santrifüj edildi.
- 4- Süpernatantlar temiz ependorf tüplerine alınarak deney süresince buz üzerinde bekletildi.

**Tablo 6:** Doku homojenizasyonunda kullanılan PBS çözeltisi

ÇÖZELTİLER	ÖZELLİKLERİ
Homojenizasyon Tamponu (PBS)	137 mmol/L NaCl
	2.7 mmol/L KCl
	10 mmol/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 2 H <sub>2</sub> O
	2 mmol/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	pH 7,4

## 3.4. BİYOKİMYA ANALİZLERİ

### 3.4.1. Total Protein Ölçümü

Bölüm 3.3.'te elde edilen süpernatantta bulunan protein konsantrasyonu, ticari bisinkonik asit (BCA) kiti kullanılarak üretici firma yönergesi doğrultusunda hesaplandı. Ölçülen protein, jel elektroforezinde kuyucuklara yüklenecek miktarın belirlenmesi amacıyla kullanıldı. Yöntemin temeli, alkali koşullarda protein tarafından  $Cu^{2+}$  iyonunun  $Cu^{1+}$  iyonuna indirgenmesi ve ardından, bir  $Cu^{1+}$  iyonuna iki BCA molekülü olmak üzere gerçekleşen şelasyon reaksiyonuna dayanmaktadır. Suda çözünür olan şelasyon ürünü 562 nm'de şiddetli ışık absorpsiyonu yapar.

#### Uygulama Adımları

- 1- Standart protein olarak sığır serum albumin (BSA), kör olarak distile su kullanıldı.
- 2- Öncelikle farklı konsantrasyonlarda (25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000  $\mu\text{g/ml}$ ) BSA standardı hazırlandı.
- 3- İçerisinde bisinkonik asit bulunan BCA A Reaktifi ve % 4 bakır sülfat içeren BCA B Reaktifi 50:1 oranında karıştırılarak çalışma reaktifi hazırlandı.
- 4- Standart ve örneklerden 25'er  $\mu\text{L}$ , 96 kuyucuklu plakta duplike olarak kuyucuklara konuldu.
- 5- Her kuyucuğa 200  $\mu\text{L}$  çalışma reaktifi eklendi.
- 6- Plaklar 37°C'de, 30 dakika inkübe edildi.
- 7- Örnek ve standartların absorbans değerleri, ELISA okuyucu kullanılarak 562 nm'de okundu.
- 8- Standart konsantrasyonuna karşı absorbans değerleri ile standart grafiği çizildi ve bu standart grafiğinden yararlanılarak örneklerin total protein konsantrasyonu hesaplandı.

### 3.4.2. Western Blot Yöntemi

Kolon doku örneklerinde sRAGE ekspresyonunun değerlendirilmesi için standart sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve ardından da Western blot analizi uygulandı. Doku örneklerinden elde edilen homojenatlar kullanıldı. İşlemlerde yükleme kontrolü olarak aktin kullanıldı. sRAGE ve aktin bantlarının optik dansiteleri 'ImageJ setup Wizard' programıyla elde edilip oranlanarak, düzeltilmiş sRAGE ekspresyon değerleri elde edildi.

#### Uygulama Adımları:

- 1- % 10 'luk ayırıcı ve % 4'lük stacking bölümler içeren poliakrilamid jel hazırlandı.
- 2- Örnekler, protein miktarları (5-20 µg, 10-20 µL) olacak biçimde jellere yüklendi.
- 3- Jeller elektroforez sistemine yerleştirilip yeterli miktarda yürütücü tampon konulduktan sonra elektrotlar bağlanıp sistem çalıştırıldı.
- 4- Örnekler paketlenen jeli geçinceye kadar 75 volt, ayırıcı jelde 120 volt gerilim uygulandı.
- 5- Proteinlere 90 mA akım uygulanarak jelden polivinidilen florid (PVDF) membrana yarı kuru olarak transfer edildi.
- 6- PVDF membran oda sıcaklığında, % 5 (w/v) süt tozu içeren TBS-T içinde 1 saat inkübe edilerek bloklandı.
- 7- Ardından, primer antikor (1/1000 dilüsyonda) ve % 3 süt tozu içeren TBS-T içinde bir gece 4 °C' de bekletildi.
- 8- PVDF membran yıkama işlemlerinin ardından, HRP işaretli sekonder antikorla (1/5000 dilüsyonla) ve % 3 süt tozu içeren TBS-T çözeltisinde 1 saat oda sıcaklığında bekletildi.
- 9- Membran kemiluminesans substrat içeren tamponda 1 dakika bekletildi.
- 10- Membran ve X-ray filmi kaset içinde yüz yüze getirilerek protein bantları filme aktarıldı.

**Tablo 7:** SDS-PAGE ve Western blot analizinde kullanılan çözeltiler

<b>Akrilamid Çözeltisi (%30)</b>	29.2 g akrilamid
	0.8 g bisakrilamid
<b>Paketleme jel tamponu</b> (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8)	12.8 g Tris, saf su ile 1 L'ye tamamlandı.
<b>Ayırıcı jel tamponu</b> (1.5 M Tris-HCl , pH 8.8)	36.3 g ; saf su ile 200 mL'ye tamamlandı.
<b>SDS (%10)</b>	2.5 g; saf su ile 25 mL'ye tamamlandı.
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (%10)</b>	0.05 g amonyum persülfat; 0.5 mL saf suda çözüldü.
<b>Örnek tamponu</b>	3.6 mL %10 SDS, 1 ml merkaptolanol, 2 mL gliserol, 0.0004 g brom fenol mavisi ve 2.5 mL paketleme jel tamponu saf suda çözülerek hacim bidistile suyla 10 mL'ye tamamlandı.
<b>Yürütücü Tampon</b> (PH 8.3)	15 g Tris Baz
	72 g Glisin
	5 g SDS; 1 L distile suya tamamlandı
<b>Transfer Çözeltisi (Towbin)</b>	3.25 g Tris
	14.4 g Glisin
	200 mL Metanol
	2 mL % 10 SDS
<b>Bloklama Çözeltisi</b>	% 5 süt tozu içeren TBS-T

**Tablo 8:** Ayırıcı jelin hazırlanması

Akrilamid stok çözeltisi	5.33 mL
Ayırıcı jel tamponu	4.0 mL
Saf su	6.38 mL
% 10 SDS	0.16 mL
TEMED	0.008 mL
% 10 amonyum persülfat	0.12 mL

Karışım cam tabakalar arasına döküldükten sonra yüzeyi izopropanol ile kapatılarak havayla teması kesildi. Yaklaşık 45 dakika sonra polimerizasyon tamamlandı.

**Tablo 9:** Paketleme jelinin hazırlanması

Akrilamid stok çözeltisi	1.005 mL
Paketleme jel tamponu	1.875 mL
Saf su	4.5 mL
% 10 SDS	0.075 mL
TEMED	0.0075mL
% 10 amonyum persülfat	0.0375 mL

### 3.4.3. ELISA Yöntemi ile sRAGE Ölçümü

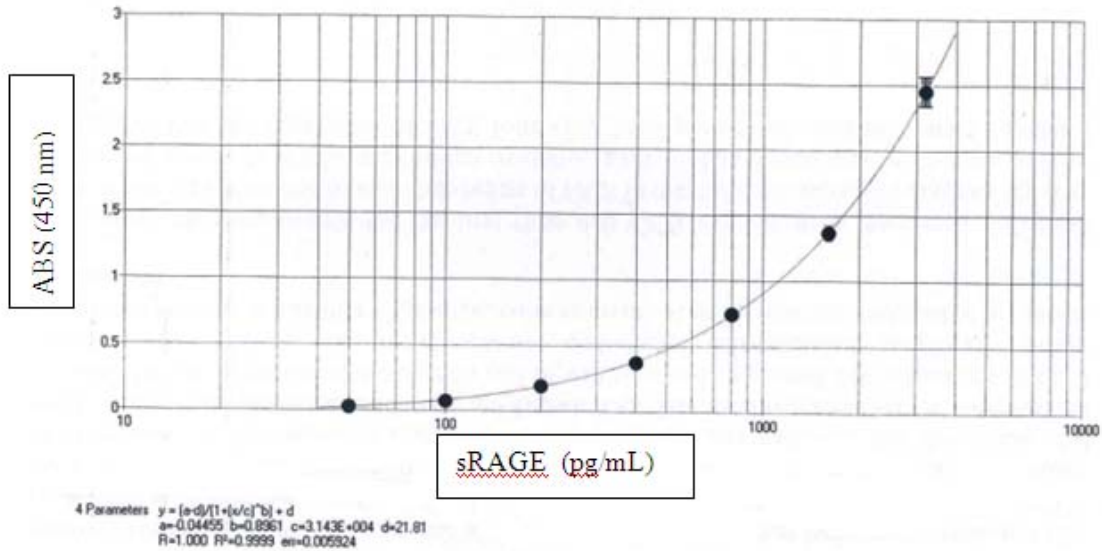
Serumda sRAGE ölçümü ticari ELISA kiti (BioVendor, Katolog No: RD191116200R) ile gerçekleştirildi.

**Test prensibi:** sRAGE'yi kantitatif olarak tespit eden enzim bağlı immünosorbent ölçüm yöntemine dayanmaktadır. Bu teknikte standartlar, kalite kontrol materyalleri ve örnekler, poliklonal anti-human sRAGE antikoru ile kaplı kuyucuklarda inkübe edilmektedir. 120 dakikalık inkübasyon ve yıkamadan sonra biotin işaretli poliklonal anti-human sRAGE antikoru eklenerek, yakalanmış sRAGE ile birlikte 60 dakika inkübasyon yapılır. Tekrar yıkama yapıldıktan sonra streptavidin-HRP konjugatı eklenir. 30 dakikalık inkübasyon ve son yıkama basamağından sonra kalan konjugatın TMB substrat çözeltisi ile reaksiyona girmesi sağlanır. Asidik çözeltinin eklenmesi ile reaksiyon durdurularak oluşan sarı renkli ürünün absorbansı ölçülür. Absorbans, sRAGE miktarı ile orantılıdır. Standartların sRAGE konsantrasyonuna karşı ölçülen absorbans değerleri ile standart eğrisi hazırlanarak, örneklerin konsantrasyonu saptanır.

#### Uygulama adımları

- 1- 100 µL hacimdeki standartlar (50, 100, 200, 400, 800, 1600, 3200 pg/mL), kontroller, kör ve 1/3 oranında seyreltilmiş örnekler çift olarak uygun kuyucuklara pipetlendi.
- 2- Plak orbital çalkalayıcıya yerleştirilerek, 300 rpm'de, oda sıcaklığında iki saat inkübe edildi.
- 3- Kuyucuklar yıkama çözeltisi ile (kuyucuk başına 0,35 mL) beş kez yıkandıktan sonra kağıt havlu üzerine ters çevrilek kurulandı.

- 4- Her kuyucuğa 100 µL biotin işaretli sekonder antikor çözeltisi eklendi.
- 5- Plak orbital çalkalayıcıya yerleştirilerek, 300 rpm'de, oda sıcaklığında bir saat inkübe edildi.
- 6- Kuyucuklar yıkama çözeltisi ile (kuyucuk başına 0.35 mL) beş kez yıkandıktan sonra kağıt havlu üzerine ters çevrilek kurulandı.
- 7- Her kuyucuğa 100 µL streptavidin-HRP konjugat eklendi.
- 8- Plak orbital çalkalayıcıya yerleştirilerek, 300 rpm'de, oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
- 9- Kuyucuklar yıkama çözeltisi ile (kuyucuk başına 0.35 mL) beş kez yıkandıktan sonra kağıt havlu üzerine ters çevrilek kurulandı.
- 10- Her kuyucuğa 100 µL substrat çözeltisi eklendi ve plak ışıktan korunmak için alüminyum folyo ile kaplandı.
- 11- Plak oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.
- 12- Kuyucuklara 100 µL asit çözeltisi ile renk oluşumu durduruldu.
- 13- Mikroplak okuyucu ile 450 nm'de okuma yapıldı, örneklerin dilüsyon oranlarına göre sonuçlar hesaplandı.



Şekil 10: sRAGE standart eğrisi

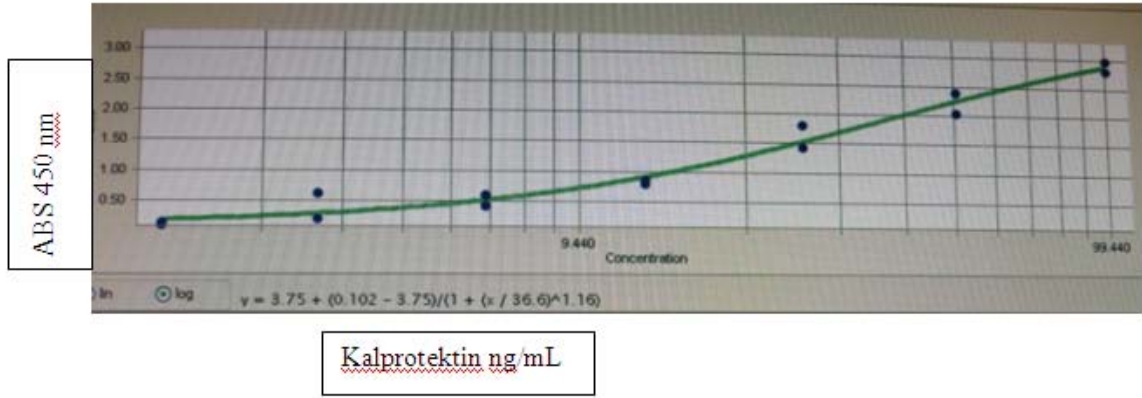
### 3.4.4. ELISA Yöntemi ile Kalprotektin Ölçümü

Serumda kalprotektin ölçümü ticari ELISA kiti (Hycult Biotech, Katolog No: HK325) kullanılarak, üretici firma yönergesine göre gerçekleştirildi.

**Test prensibi:** İnsan Kalprotektin ELISA, sandviç prensibine dayalı, kullanıma hazır katı (solid) faz enzim immunosorbent testtir. Bu teknikte standartlar ve örnekler, insan kalprotektinini tanıyan antikörlerle kaplı kuyucuklarda inkübe edilmektedir. Biotin eklenmiş işaretleyici antikör, yakalanmış insan kalprotektinine bağlanır. Streptavidin-peroksidaz konjugatı, biyotin ile işaretlenmiş antikora bağlanır. Streptavidin-peroksidaz konjugatı 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) substrat çözeltisi ile reaksiyona girer. Oksalik asitin eklenmesi ile reaksiyon durdurularak oluşan renkli ürünün absorbansı 450 nm'de ölçülür. Absorbans, insan kalprotektin miktarı ile orantılıdır. Standartların kalprotektin konsantrasyonuna karşı ölçülen absorbans değerleri ile standart eğrisi hazırlanarak, örneklerin konsantrasyonu saptanır.

#### Uygulama adımları

- 1-100 µL hacimdeki standartlar (100, 50, 25, 12.5, 6.3, 3.1, 1.6, 0 ng/mL), kör ve 1/60 oranında seyreltilmiş örnekler çift olarak uygun kuyucuklara pipetlendi.
- 2- Plak oda sıcaklığında bir saat inkübe edildi.
- 3- Kuyucuklar yıkama çözeltisi ile dört kez yıkandı.
- 4- Her kuyucuğa 100 µL seyreltilmiş biyotinle işaretli antikör çözeltisi eklendi.
- 5- Plak oda sıcaklığında bir saat inkübe edildi.
- 6- Kuyucuklar yıkama çözeltisi ile dört kez yıkandı.
- 7- Her kuyucuğa 100 µL seyreltilmiş streptavidin-peroksidaz eklendi.
- 8- Plak oda sıcaklığında bir saat inkübe edildi.
- 9- Kuyucuklar yıkama çözeltisi ile dört kez yıkandı.
- 10- Her kuyucuğa 100 µL substrat çözeltisi eklenerek plak ışıktan korunmak için alüminyum folyo ile kaplandı.
- 11- Plak oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
- 12- 100 µL asit çözeltisi ile renk reaksiyonu durduruldu.
- 13- Mikroplak okuyucu ile 450 nm'de okuma yapılarak sonuçlar hesaplandı.



Şekil 11: Kalprotektin standart eğrisi

### 3.4.5. CRP Ölçüm Yöntemi

CRP ölçümü, Architect C16000 (Abbott Diag. USA) otoanalizöründe, immunotürbidimetrik yöntemle gerçekleştirildi.

**Test prensibi:** Örnekteki CRP ve lateks partiküllerine tutunan poliklonal anti-CRP antikorları arasında antijen-antikor reaksiyonu gerçekleşmesi sonucu aglütinasyon meydana gelir. Bu aglütinasyon, absorbans değişimi olarak saptanır (550-580 nm). Absorbans artışı, CRP konsantrasyonuyla orantılıdır.

## 3.5. İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

İstatistiksel değerlendirmelerde, “SPSS for Windows 15.0” programı kullanıldı. Cinsiyete göre grupların karşılaştırmasında ki-kare testi kullanıldı. Ölçümle belirlenen bağımsız değişkenlerin karşılaştırılması için önce Kruskal Wallis testi kullanıldı. Gruplar arasında anlamlı bir farklılık varsa, farklılığın hangi iki grup arasında olduğunu belirlemek için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Bağımlı iki değişkenin karşılaştırıldığı bir durumda ise Wilcoxon testi kullanıldı. Korelasyon analizleri için non parametrik Spearman korelasyon analizi kullanıldı. Tüm testlerde anlamlılık düzeyi  $p < 0,05$  olarak ifade edildi.



## 4. BULGULAR

### 4.1. ÇALIŞMA GRUBUNU TANIMLAYICI BULGULAR

Çalışmaya alınan tüm olgularda serum CRP, sRAGE ve kalprotektin düzeyleri ölçülmek üzere ‘kontrol’, ‘ülseratif kolit’ ve ‘polip’ grupları tanımlandı. Bu gruplardaki hasta ve sağlıklıların yaş ve cinsiyet özellikleri Tablo 10’da verilmiştir. Yaş değişkeni, verilerin normal dağılım göstermemesi nedeniyle “ortanca” olarak ifade edilmiştir.

**Tablo 10:** Çalışma gruplarının yaş ve cinsiyet özellikleri

Değişkenler	Kontrol	Ülseratif Kolit	Polip	p
Yaş	46	46	62	0.004
Cinsiyet	39 (18 K, 21E)	38 (18 K, 20 E)	14 (8 K, 6 E)	0.970

Yaş değişkeninde Kruskal Wallis testi ile saptanan anlamlı farklılıktan sonra, anlamlı farklılığın hangi gruplar arasında bulunduğunu saptamak için Mann-Whitney testi uygulandı. Kontrol ve kolit grupları arasında anlamlı fark bulunmadığı ( $p=0.766$ ), kontrol ve polipli hasta ( $p=0.002$ ) ile kolit ve polip ( $p=0.001$ ) grupları arasında ise anlamlı fark bulunduğu saptanmıştır. Polipli hasta grubu daha yaşlı bireylerden oluşmaktadır.

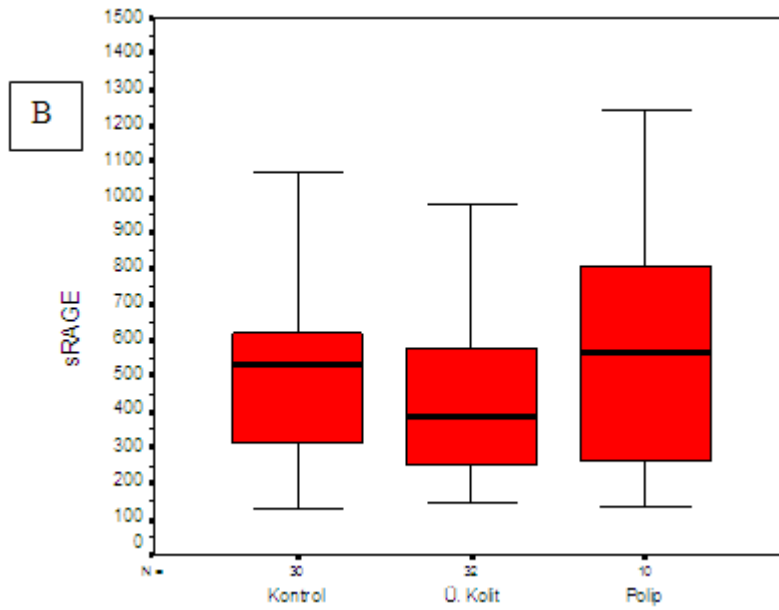
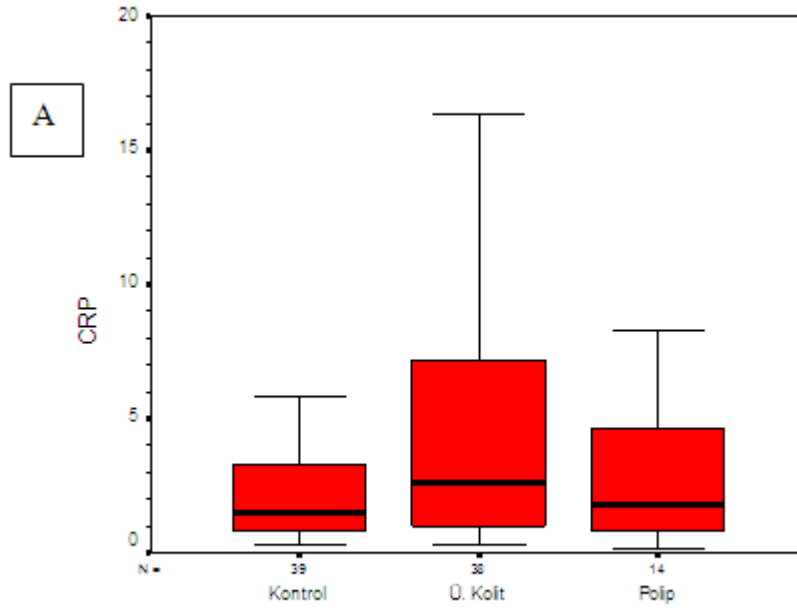
Grupların tümü cinsiyet dağılımı bakımından eşleşmiştir, dolayısıyla bir farklılık içermemektedir.

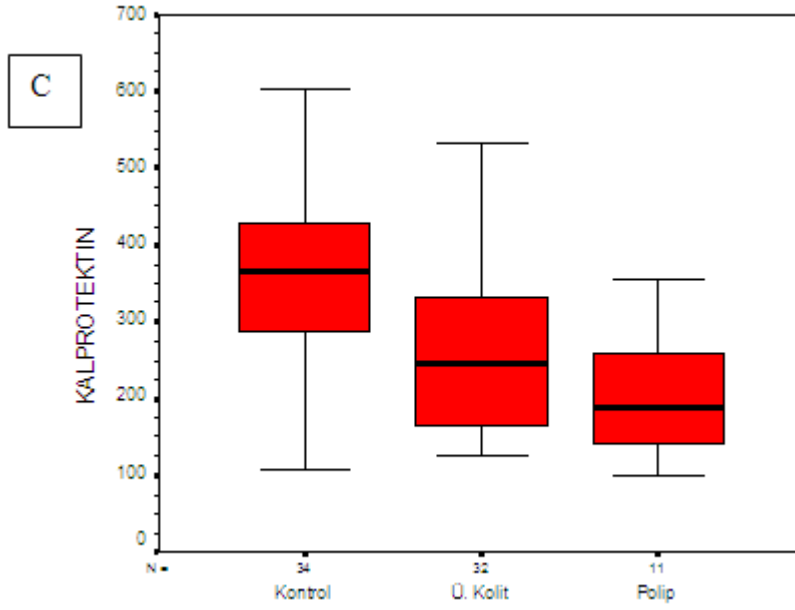
### 4.2. SERUM CRP, sRAGE, KALPROTEKTİN DÜZEYLERİ

Kontrol ve olgu gruplarına ait serumlarda ölçülen CRP, sRAGE ve kalprotektin için hesaplanan ortanca değerleri (Şekil 12) ve istatistiksel anlamlılığı gösteren p değerleri ‘Tablo 11’de yer almaktadır. Her üç ölçümün sonuçları da, verilerin normal dağılım göstermemesi nedeniyle “ortanca” olarak ifade edilmiştir.

**Tablo 11:** Kontrol ve olgu gruplarına ait serumlarda ölçülen CRP, sRAGE ve kalprotektin için hesaplanan ortanca değerleri

Değişkenler	Kontrol (n=39)	Ü. Kolit (n=38)	Polip (n=14)	p
CRP (mg/L)	1.5	2.62	1.8	0.546
sRAGE (pg/mL)	530	383	565	0.235
CAL (ng/mL)	366	246	188	<0.0001





**Şekil 12:** (A) Kontrol, ÜK, polip grubunda CRP düzeylerinin karşılaştırılması. (B) Kontrol, ÜK, polip grubunda sRAGE düzeylerinin karşılaştırılması. (C) Kontrol, ÜK, polip grubunda kalprotektin düzeylerinin karşılaştırılması.

Not: ELISA plağında yer yetersizliği ve dilüsyonlu çalışıldığı için saptama sınırının altında kalan örneklerin değerlendirme dışında bırakılması nedeniyle bazı örnekler o testler için değerlendirilememiştir. Her test için çalışılan örnek sayısı (n) grafik altında belirtilmiş olup, istatistiksel karşılaştırmalar eşlenik örnekler arasında yapılmıştır.

Deney gruplarından elde edilen CRP ve sRAGE değerleri arasında uygulanan Kruskal Wallis testi anlamlı değişiklik göstermediğinden daha ileri analiz yapılmamıştır. Kalprotektinde saptanan değişikliğin hangi deney grupları arasındaki farklılıktan kaynaklandığını saptamak içinse Mann-Whitney testi uygulandı. Buna göre; kontrol grubundaki kalprotektin ölçüm sonucu hem ÜK ( $p < 0.0001$ ) hem de polip ( $p = 0.001$ ) gruplarından anlamlı olarak daha yüksektir. ÜK ve polip grupları arasında ise anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p = 0.144$ ).

#### 4.2.1. Ülseratif Kolit Alt Gruplarının Analiz Sonuçları

Dokusu, dolayısıyla endoskopi verileri bulunan ÜK'li hastaların ( $n = 17$ ) serumları bir grup olarak ele alınarak üç belirtecin ortanca değerleri, sağlıklı gönüllülerden oluşan kontrol grubuyla ve tüm ülseratif kolitli grupla karşılaştırılmıştır (Tablo 12).

**Tablo 12:** Endoskopi verileri bulunan ÜK’li hastaların serumları bir grup olarak ele alınarak kontrol grubu ve tüm ülseratif kolitli hasta serumları ile karşılaştırılması

Değişkenler	Kontrol (n=39)	Ü. Kolit (Kolonoskopi ile dokusu alınanlar) (n=17)	Ü. Kolit (Tüm Grup) (n=38)
CRP (mg/L)	1.5	2.85*	2.62
sRAGE (pg/mL)	530	132**	383
CAL (ng/mL)	366	161***	246
*kontrol grubuyla (p=0.340) ve kolit grubuyla (p=0.820) anlamlı fark yok, **p<0.0001, kontrol ve tüm kolit grubundan anlamlı düşük, ***kontrol grubundan (p<0.0001) ve tüm kolit grubundan (p=0.003) anlamlı düşük.			

Endoskopi verileri bulunan ülseratif kolit hastaları Montreal sınıflamasına göre alt gruplara ayrıldı ve bu grupların serum örnekleri ile istatistiksel analiz yapıldı. Yalnızca kanı bulunan ÜK hastaları, eş zamanlı endoskopi bulguları bulunmaması nedeniyle bu sınıflamaya dahil edilmedi.

Hastalar, hastalığın yaygınlığına göre gruplandırıldıkları zaman dokuz hastanın ‘distal kolit (rektit/proktit)’, yedisinin ‘sol kolit’, yalnızca birinin de ‘pankolit’ şeklinde tutulumu olduğu gözlemlendi. Pankolit hastasının değerleri sol kolitli gruba dahil edilerek ‘distal’ ve ‘sol’ olmak üzere iki kolit grubu arasında istatistiksel çalışma yapıldı. Bu grupların ortanca değerleri ve Kruskal Wallis testi ile analiz sonuçları Tablo 13’te özetlenmiştir.

**Tablo 13:** Hastalığın yaygınlığına göre ÜK alt grup karşılaştırması

Değişkenler	Kontrol (n=39)	Ü. Kolit (n=38)	Distal Kolit (n=9)	Sol Kolit (n=8)	p
Yaş	46	46	55	43	0.004
SRAGE pg/mL	530	246	133	121	<0.0001
CAL ng/mL	366	246	134	163	<0.0001

Tüm gruplarda anlamlı farklılık saptandığından, anlamlılığın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek için Mann Whitney U testi yapıldı. Buna göre; her iki alt grup ile kontrol grubu arasında yaşça anlamlı bir farklılık yoktur (p=0.221 ve p=0.444). Aynı şekilde

tüm kolit grubundan da yaşça anlamlı farklılık göstermemektedirler ( $p=0.104$  ve  $p=0.502$ ). Ancak iki alt grubun yaşça birbirinden farklı olduğu saptanmıştır ( $p=0.032$ ).

Hem kalprotektin hem de sRAGE değerleri ele alındığında, hem distal hem de sol kolitli gruplar, kontrole göre anlamlı düşük değerlere sahiptirler (tümünde  $p < 0.0001$ ). Distal ve sol-kolit gruplarının kalprotektin değerleri, tüm ÜK grubundan anlamlı düşüktür ( $p=0.012$  ve  $p=0.032$ ). Aynı durum sRAGE ölçümleri için de geçerlidir (Distal için  $p < 0.0001$ , Sol için  $p < 0.0001$ ).

Tanımlanan gruplar arasındaki karşılaştırmalar CRP ile de gerçekleştirildi. Ancak hiçbir grup arasında anlamlı farklılık saptanmadı.

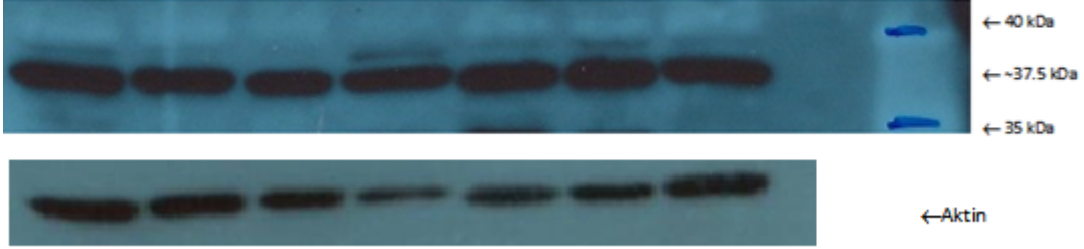
Her iki alt grup birbiri ile karşılaştırıldığında, kalprotektin, sRAGE ve CRP değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (kalprotektin için  $p=0.366$ , sRAGE için  $p=0.728$ , CRP için  $p=0.293$ ).

Yine dokusu bulunan ülseratif kolitli hastalar endoskopik bulguları sonucunda hastalığın şiddetine göre alt gruplara ayrıldığında, “hafif” ( $n=9$ ) ve “orta- şiddetli” ( $n=7$ ) gruplar arasında gerek CRP, gerekse sRAGE ve kalprotektin değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmadığı saptanmıştır (CRP için  $p=0.698$ , sRAGE için  $p=0.089$  ve kalprotektin için  $p=0.497$ ).

### **4.3 DOKUDA sRAGE SONUÇLARI**

Bağırsak mukozasındaki sRAGE protein ekspresyon düzeylerinin saptanması için ülseratif kolitli hastaların endoskopi sırasında, hem inflame hem de non-inflame görünümlü dokularından ayrı ayrı örnek alınarak Western blot doku analizi yapıldı. Gruplar bağımlı grup olarak değerlendirildiğinden bulgular Wilcoxon testi ile değerlendirildi. Kontrol grubu olarak da polipli hastaların sağlıklı bağırsak mukozalarından alınan dokular kullanıldı ve bu dokular, bağımsız gruplar olarak değerlendirildiğinden, ÜK’li hastaların inflame ve non-inflame dokularına ait verilerle Mann-Whitney U testi kullanılarak karşılaştırıldı. ‘Şekil 12’de dokuların Western blot analizine ilişkin temsili bir görüntü, ‘Tablo 14’te de analiz sonuçları görülmektedir. Analiz sonuçları hiçbir grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadığını göstermektedir.

İnf.	Ninf.	İnf.	Ninf.	Pol.	Pol	İnf.
------	-------	------	-------	------	-----	------



**Şekil 13:** Western blot analizi sonucunda gözlenen çeşitli dokulara ait sRAGE bantları

**Tablo 14:** Kolonoskopi sırasında alınmış olan dokuların Western blot analiz sonuçları

Değişkenler	Kolon polibi bulunan hasta dokusu (n=14)	Kolit-İnflame Doku (n=17)	Kolit-Noninflame Doku (n=17)
sRAGE	0.9	1.03	0.9
İnflame kolit- Noninflame kolit; p=0.575 İnflame kolit-Polipli hasta; p=0,890 Noninflame kolit-Polipli hasta; p=0,643			

#### 4.4. KORELASYON ANALİZLERİ

Tüm ÜK'li olgularda çalışmada düzeyleri saptanan üç belirtecin de aralarında bir korelasyon bulunmadığı saptandı. Ayrıca dokusu ve endoskopi verileri bulunan ÜK'li grupta (n=17) sRAGE ve kalprotektin değerlerinin, kontrole ve tüm ülseratifli gruba göre anlamlı düşük olduğu belirlendikten sonra belirteçler arasında korelasyon analizi yapıldı. Bu grupta da korelasyon bulunmadığı saptandı.

## **5. TARTIŞMA VE SONUC**

Farklı ligandların bağlanabildiği bir membran reseptörü olan RAGE, hücre içi sinyal yollarını aktive ederek inflamasyon yanıtının ortaya çıkmasında önemli bir role sahiptir. Bu özelliği dolayısıyla kronik inflamasyonla seyrettiği bilinen bir çok hastalıkta, RAGE'nin çeşitli izoformlarının vücudtaki dağılımı bir çok araştırmanın konusu olmuştur. ÜK ve CH gibi etyolojisi tam olarak açıklanamamış bir grup hastalıktan oluşan İBH, İrritabl Bağırsak Sendromu gibi organik bir nedene bağlı olmayan çeşitli hastalıklarla benzer klinik özelliklere sahip olabilmektedir (58). İBH'nın ayırıcı tanısının yapılabilmesi, tedavisinin düzenlenmesi ve prognozunun takibi için çoğu zaman endoskopi gibi girişimsel yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. Bu nedenle İBH'ndaki inflamasyonun diğer bağırsak hastalıklarından ayırt edici belirteçleri, gelecekte bu girişimsel yöntemlerin gerekliliğini azaltmaya aday olabilir. Bu belirteçler arasında adı geçmekte olan RAGE'nin çözünür formuyla (sRAGE), RAGE ligandlarından biri olan kalprotektin bizim çalışmamızın da temel noktasını oluşturmaktadır.

Kalsiyum bağlayıcı S100 protein ailesi üyesi inflamasyon-ilişkili 'kalgranülinler' S100A8 (MRP-8) ve S100A9 (MRP-14), kronik inflamasyonla seyreden pek çok durumda yüksek miktarda eksprese edilmektedir. Bunlar arasında dev hücreli arterit, kistik fibrosis, romatoid artrit, dermatozlar, bazı malignite ve otoimmün hastalıklar bulunmaktadır (59). Gastrointestinal sistemin inflamasyonla ilişkili bozukluklarından Barrett özefagusu, gastrit veya duodenitler gibi hastalıklarda ve infeksiyöz diyare, nekrotizan enterokolit, İBH gibi intestinal sistemin daha alt bölümlerini tutan hastalıklarda artmış fekal kalprotektin seviyeleri gözlenmektedir (60). S100A8 ve S100A9'un non-kovalent bağlanmasıyla oluşan kalprotektinden İBH ile ilgili pek çok çalışmada söz edilmektedir. Turovskaya ve ark. (61) kurdukları fare modellerinde, İBH'nda, kronik inflamasyon zemininde ortaya çıkabilen kolitle ilişkili karsinomda, karboksillenmiş N-glikan aracılı kalprotektin-sRAGE bağlanması önemli olabileceğine dikkat çekmişlerdir. Bunn ve ark. (62) fekal kalprotektin düzeylerinin, <sup>99</sup>Tc-işaretle beyaz küre 'scan'leri ve endoskopik ve histolojik invaziv inflamasyon skorları ile korele olduğunu göstermişlerdir. Fekal kalprotektin miktarlarının ölçülebildiği hasta başı testler -rutin kullanıma girmemiş olmakla birlikte- mevcuttur. Lobaton ve ark. (63) hasta başı fekal kalprotektin testinin hastalık aktivitesi ile anlamlı korele olduğunu belirtmişlerdir.

Biz de çalışmamızda ÜK'li hastalarda sRAGE'nin dokuda eksprese edilen miktarıyla serum düzeyleri arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçladık. Ayrıca bir RAGE ligandı olan

kalprotektinin serum düzeyiyle sRAGE arasındaki ilişkiyi değerlendirdik. Bu sırada iki belirtecin de, hastalığa özgünlüğü düşük olsa da rutinde yaygın olarak kullanılan bir inflamasyon belirteci olan CRP ile olan ilişkisini ele aldık.

Araştırmamız temel olarak iki çerçevede şekillendi. Bunlardan ilki olan doku çalışmalarımız sırasında, 17 ÜK hastasının kolonoskopik olarak inflame görünümlü mukozal sRAGE düzeylerini Western blotlama yöntemiyle yarı-kantitatif olarak ölçüp, kendi sağlıklı görünen mukozal sRAGE düzeyleriyle kıyasladık ve aralarında anlamlı fark olmadığını saptadık. Ayrıca kontrol grubu olarak belirlediğimiz 14 polipli hastanın sağlıklı bağırsak dokularında aynı yöntemle ölçülen sRAGE düzeylerinin de ÜK'li hastaların dokularındakinden anlamlı farklı olmadığını saptadık. Araştırmamızın ikinci bölümünde, bu gruplara ait serum örneklerinde sRAGE, kalprotektin ve CRP düzeylerini ölçtük. ÜK'li olgu sayısını artırmak için DEÜTF Gastroenteroloji ABD polikliniğine rutin kontrol amacıyla başvuran 21 ÜK hastasının serum örneğini de dahil ettiğimiz bir tüm ÜK'liler grubu oluşturduk. Serum belirteçleri için kontrol grubu olarak ÜK'li grupla yaş ve cinsiyet açısından eşleşen 39 sağlıklı gönüllü seçtik. Elde edilen veriler kolit grubu için farklı düzeylerde analiz edildi. Tüm kolitli grup içinde, kolonoskopisi yapılmış ve yaygınlık ve şiddete göre sınıflandırılabilen bir grup veri, tüm gruptan ayrı olarak da analiz edilmiştir. Bu alt grubun serum kalprotektin ve sRAGE düzeylerinin kontrol grubundan anlamlı düşük olduğunu, CRP değerlerininse farklı olmadığını gözledik. Kalprotektin tüm ÜK'li grupta da kontrolden anlamlı düşükken, dokusu bulunan ÜK'lilerde daha da düşük bulundu; ancak, beklenmedik şekilde dokusu bulunan ÜK'lilerin sRAGE'si anlamlı düşük bulunduğu halde, tüm ÜK'li grupla kontroller arasında sRAGE düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmadı. Kolonoskopi verileri bulunan ÜK hastalarını hastalığın yaygınlığına ve şiddetine göre yeniden alt gruplara ayırdığımızda, hiçbir alt grupla diğeri arasında serum belirteçleri ve mukozal sRAGE düzeyleri açısından anlamlı fark olmadığını gözledik. Leach ve ark. (5) da hastalık lokalizasyonu ve yayılımının S100 seviyelerini etkilemesi açısından lokalizasyon gruplarını karşılaştırdıkları çalışmalarında, serum veya mukozal S100A12 ve kalprotektin açısından fark bulamadıklarını belirtmişlerdir. Yılmaz ve ark. (64) da sRAGE düzeyleriyle Montreal sınıflamasına göre ayrılan alt gruplar arasında ilişki bulamamışlardır.

Leach ve ark. (5) çalışmalarında, çekal ve duodenal biyopsi örneklerinden organ kültürü yaparak kültür süpernatantlarında ELISA tekniğiyle sRAGE, kalprotektin ve S100A12 ölçümü yapmış; tedavi almamış İBH'na sahip hastalarda, hem mukozal hem de serum



kalprotektin ve S100A12'yi kontrolden anlamlı yüksek bulmuşlar, serum sRAGE açısından anlamlı fark bulamamışlar ve mukozal sRAGE'yi ise saptayamamışlardır. Malickova ve ark. (6) da İBH'lı hastaların dışkı eluatlarında yine ELISA ile sRAGE'yi saptayamamışlardır. İBH ile sRAGE ilişkisinin incelendiği az sayıda makale olması ve sRAGE'nin doku düzeylerinin hem mukozal hem de serumdaki diğer belirteçlerle ilişkisinin yeterince aydınlığa kavuşturulamamış olması nedeniyle, biz de çalışmamızda doku düzeylerini göstermek üzere Western blotlama yöntemini kullanmaya karar verdik. Aynı hastaya ait inflame ve sağlam görünümlü mukozalar arasında herhangi bir fark bulamamış olmamız, belki de hastanın sağlam görünümlü mukozasında da -endoskopi ile belirlenebilir olmasa da- inflamasyon bulunduğu şeklinde yorumlanabilir; ancak, polipli hastaların polipsiz alanlarından alınan bağırsak mukozalarında da sRAGE'nin benzer miktarlarda saptanmış olması bu olasılığı zayıflatmaktadır. Bununla birlikte benzer bir çalışma tekrar planlanacak olursa, bağırsak mukozası yerine tam kat bağırsak dokusunun alınması daha faydalı olabilir.

Luley ve ark. (60) bağırsak dokusu homojenizatlarında ELISA yöntemiyle kalprotektin ölçmüşler, karsinom ve polipli dokularda, kendi sağlıklı komşu dokularından ve sağlıklı kontrollerden anlamlı yüksek olduğunu saptamışlar; ancak, serum düzeyleri arasında herhangi bir anlamlı fark bulamamışlardır. sRAGE için polipli dokuda benzer bir çalışmaya rastlanmamıştır. Summerton ve ark. (65) kolonik polipozisli hastalarda fekal kalprotektini normal aralıkta saptarken, Kronborg ve ark. (66) polip sayısından bağımsız olarak, anlamlı yüksek bulmuşlar, Pezzilli ve ark. (67) kolonik polipozisli hastalarda fekal kalprotektinin sağlıklı kontrollerden ( $p=0.003$ ) ve divertikülozisli hastalardan ( $p=0.026$ ) anlamlı yüksek olduğunu göstermişlerdir. Jiao ve ark. (68) adenomatöz polip ile serum sRAGE düzeyleri arasında ters korelasyon olduğunu belirtmişlerdir. Polipli hastalarla ilgili bu kadar farklı sonuç belirtilmişken, biz de çalışmamızda polipli hastaların serum değerlerini sağlıklı kontrollerden ayrı bir grup olarak değerlendirmeyi uygun gördük. Sonuçta polipli hastaların serumlarında sRAGE ve CRP düzeyleri ne ÜK'li hastalar, ne de kontrol grubundan anlamlı farklı çıkmıştır; ancak, kalprotektin düzeyi kontrol grubundan anlamlı düşük bulunmuştur. Bu durum, kolonik polipli hastalarda özellikle serum kalprotektin çalışmalarının devam etmesi gerektiğine vurgu yapmaktadır.

Çalışmamızda kontrol grubu olarak belirlediğimiz ve sağlam dokularından yararlandığımız polipli hastaların yaşlarının olgu grubundan yüksek olması çalışmanın zayıf yönlerinden birini oluşturmaktadır. ÜK'in temel pik yaşı 15-30 (24) iken polipin yaşla artış

göstermesi (8), yaşlı popülasyonda daha sık rastlanmasına neden olmaktadır. Bizim kısıtlı zaman diliminde oluşturduğumuz çalışma grubumuz da bu durumdan etkilenmiştir. Metabolik sendrom ve esRAGE ilişkisini araştırdıkları çalışmalarında Koyama ve ark (69) diyabetik olmayan kişilerde, esRAGE'nin yaşla ters korele olduğunu göstermişlerdir. Geroldi ve ark. (70) 100 yaşın üstünde majör bir rahatsızlığı bulunmayan 80 ileri yaşlı olguda artmış sRAGE düzeylerinin aşırı uzamış ömürle ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Buradan çıkarımla sağlıklı bireylerde sRAGE'nin yaşla düşme eğiliminde olduğunu, ama kanlarında yüksek düzeyde sRAGE saptanan kişilerin uzun ömre ve sağlıklı yaşlanmaya aday oldukları söylenebilir. Bizim çalışmamızda yaş grupları eşlenik olmayan polipli hastalarla diğer gruplar arasında sRAGE açısından zaten anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

Fekal kalprotektinin mukozal inflamasyonu serumda ölçülen kalprotektinden daha doğru yansıttığı düşünüldüğünden çalışmalarda daha çok fekal kalprotektin ölçümleri yapılmış, serum kalprotektin düzeyleri çok daha az çalışmada ele alınmıştır. Bunun yanı sıra, geliştirilen hasta başı testlerinin, klasik fekal kalprotektin ELISA yöntemleri iyi korelasyon gösterdiği de belirtilmektedir (63). Bizim çalışmamızda da sağlıklı kontrollerde, poliplilerden ve tüm ÜK'li hastaların bulunduğu gruptan anlamlı yüksekken, yalnızca endoskopi bulguları bulunan daha az sayıdaki ÜK'lilerde kalprotektin ortanca değeri 246 ng/mL'den 161 ng/mL'ye düşmüştür (her iki karşılaştırmada da  $p < 0.0001$ ). Serum kalprotektinin ÜK'li grupta sağlıklı kontrollerden düşük çıkması daha önceki çalışmalardan farklılık göstermektedir (6,35). Kalprotektin ile sRAGE arasındaki ilişki, sRAGE'nin RAGE ligandlarını bir tuzak gibi davranıp bağlayabilme ve böylece sistemik eliminasyonunu sağlayabilme özelliği nedeniyle tartışmaya açıktır. Ayrıca sRAGE'nin endoskopi bulguları bulunan ÜK'lilerde kontrolden anlamlı düşük çıkmış olması bu olasılığı destekliyor olabilir. Yine de yalnız serum örneği alınan ÜK'lilerin hastalık aktivitelerinin değerlendirmeye alınmamış olması çalışmamızın kısıtlayıcı bir yönüdür.

Olgularda sRAGE, kalprotektin ve CRP düzeylerini etkileyebilecek önemli parametrelerden birisi de ilaç tedavisidir. Özellikle inflamasyonu suprese etmeye yönelik 'antiinflamatuvar' ilaç kullanımının bu belirteçlerin vücuttaki kompozisyonunda değişikliğe neden olması kaçınılmaz gözükmektedir. Biz de örnek toplama sürecimizi, hasta grubumuzu daha önce tedavi almamış, yeni tanı alan hastalardan oluşturabilecek kadar uzun planlayamamış olmamızdan dolayı, serum parametrelerinin ilaç kullanmayan hasta gruplarıyla yapılan çalışmalardan farklı çıkabileceğini öngörmekle birlikte; bağırsak

mukozasının inflame gözüken alanlarından doğrudan örnek alacak olmamızın, sağlıklı gözüken ÜK ve polipli hasta dokularından anlamlı farklı sonuç yaratıp yaratmayacağını araştırmak istedik. Malickova ve ark. (6) yedisi ÜK'li 29 inflamatuvar bağırsak hastasında, prospektif bir çalışma yapmış, anti TNF ajan-infliksımab ile tedaviye başlanmadan önce ve başlandıktan 10 hafta sonra serumda sRAGE, kalprotektin, CRP ve IL-6 ile feçeste kalprotektin ölçmüşlerdir. Tedaviden önceki örneklerde fekal kalprotektin ile serum kalprotektin, CRP ve IL-6 İBH'ında sağlıklı kontrollerden anlamlı yüksek bulunmuş, serum sRAGE ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunamamış ve dışkı eluatlarında sRAGE'yi saptayamamışlardır. Yirmi dört hasta infliksımab tedavisine yanıt vermiş, bunlarda hem fekal hem de serum kalprotektinde ve yine serum CRP ve IL-6'da anlamlı düşme saptanmış; ancak, sRAGE düzeylerinde değişiklik saptayamamışlardır. Tibble ve ark. (71) antiinflamatuvar ilaçlarla tedavinin bir başka etkisine dikkat çektikleri araştırmalarında, nonsteroid antiinflamatuvar ilaç kullanan hastaların % 44'ünde eritemden ülsere kadar değişebilen enteropati geliştiğini vurgulamışlar, bunların % 20 kadarında aktif inflamatuvar bağırsak hastalarınıninkine yakın kalprotektin düzeyleri saptamışlardır. Bu farklı etkilerinden dolayı antiinflamatuvar tedavi ajanlarının bizim çalışma grubumuza da değişik etkileri olmuş olabilir. Yılmaz ve ark.nın (64) yaptığı İBH'yla ilgili bir başka çalışmada da hastaların (n=113) büyük kısmının ilaç kullanmakta olduğu, yalnızca üç Crohn, dört ÜK hastasının hiçbir tedavi almıyor olduğu belirtilmektedir. Bu çalışma ile bizim çalışmamız arasındaki önemli bir fark, bu araştırmacıların, ÜK'li hastalarda sRAGE'yi kontrollerden anlamlı yüksek bulmuş olmalarıdır. Ancak dikkati çeken diğer bir nokta, ÜK'li hastalardaki sRAGE düzeylerinin CH'ndan anlamlı yüksek olması, CH ile sağlıklı kontroller arasında ise anlamlı fark olmamasıdır. Oysa Malickova ve ark. (6) çalışmalarında, ÜK ve CH'ndaki sRAGE düzeyleri arasında anlamlı fark saptamamışlardır. Yılmaz ve ark. (64) bizim çalışmamıza benzer şekilde serum sRAGE düzeylerinin CRP ile ve ayrıca albumin ve ESR ile de ilişkili olmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca infliksımab ve adalimumab tedavisi alan CH'nda bu tedaviyi almayanlara göre sRAGE düşük bulunurken, ÜK'lilerde sRAGE düzeyleri tedavi ile ilişkisiz bulunmuştur. sRAGE düzeylerinin hem Malickova hem de Yılmaz ve ark.nın yaptığı çalışmalarda ilaçlardan etkilenmemiş olması bizim çalışmamızdaki sRAGE sonuçları açısından olumlu olsa da Yılmaz ve ark.nın çalışmasında sRAGE'nin İBH'ında yüksek çıkması, bizimkinde ise tüm ÜK'lı grupta anlamlı farklı olmayıp, endoskopik verileri olan ÜK'lilerin serumunda anlamlı düşük çıkması birbiriyle çelişmektedir. Diğer inflamasyonla

seyreden hastalıklardaki sRAGE düzeyleri de böyle çelişkili durumlar sergilemekle birlikte, çoğunun ortak özelliği sRAGE'nin inflamatuvar hastalığı bulunan gruplarda düşük bulunmuş olmasıdır (52–55)

Son olarak;

- Çalışmamız, ülkede ÜK'te kalprotektin ve sRAGE konusunda gerçekleştirilen ender çalışmalardan birisidir.
- Çalışmanın en önemli bulguları, kolonoskopik olarak iyi tanımlanmış olguların serumlarında hem kalprotektin hem de sRAGE düzeylerinin düşük olmasıdır.
- Bu durum, sRAGE'nin kalprotektin ile bağlanarak, düzeylerinin düşebileceğine işaret eden genel yaklaşım ile uyumludur.
- Bir diğer önemli bulgu, ÜK'li hastaların kolonoskopik olarak inflame ve noninflame olarak tanımlanan alanlarında sRAGE düzeylerinin farklı olmamasıdır.
- Çalışmanın sınırlılıklarından birisi, kolonoskopik olarak tanımlanmış ve yeni kolonoskopisi olmayan hastaların farklı sRAGE düzeylerine sahip olmalarıdır.
- Dokuda sRAGE yanında kalprotektin ekspresyonlarının da gelecek çalışmalarda değerlendirilebilmesi, iki protein arasında odak dokudaki ilişkinin değerlendirilmesi açısından dikkate alınmalıdır.

## **6. KAYNAKLAR VE EKLER**

### **6.1. KAYNAKLAR**

1. Seidelin JB, Coskun M, Nielsen OH. Mucosal healing in ulcerative colitis: pathophysiology and pharmacology. *Advances in clinical chemistry*. 2013;59:101–23.
2. Maillard-Lefebvre H, Boulanger E, Daroux M, et al. Soluble receptor for advanced glycation end products: a new biomarker in diagnosis and prognosis of chronic inflammatory diseases. *Rheumatology*. 2009;48(10):1190–6.
3. Ui SY, Akatani YN, Ikami MM. Calprotectin ( S100A8 / S100A9 ), an Inflammatory Protein Complex from Neutrophils with a Broad Apoptosis-Inducing Activity. *Pharmaceutical Society of Japan*. 2003;26(June):753–760.
4. Abraham BP, Kane S. Fecal markers: calprotectin and lactoferrin. *Gastroenterology clinics of North America*. 2012;41(2):483–95.
5. Leach ST, Yang Z, Messina I, et al. Serum and mucosal S100 proteins, calprotectin (S100A8/S100A9) and S100A12, are elevated at diagnosis in children with inflammatory bowel disease. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2007;42(11):1321–31.
6. Malícková K, Kalousová M, Fucíková T, et al. Anti-inflammatory effect of biological treatment in patients with inflammatory bowel diseases: calprotectin and IL-6 changes do not correspond to sRAGE changes. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2010;70(4):294–9.
7. Zhu H, Li YR. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*. 2012;237(5):474–80.
8. Kumar V, Abbas K.A, Fausto M. *Robbinson's Basic Pathology 8. Edition*. 2007: 612-616 .

9. Neuman MG, Nanau RM. Inflammatory bowel disease: role of diet, microbiota, life style. *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine*. 2012;160(1):29–44.
10. Tozun N, Atug O. Clinical Characteristics of Inflammatory Bowel Disease in Turkey. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2009;43(1):10–13.
11. Burri E, Beglinger C. Faecal calprotectin -- a useful tool in the management of inflammatory bowel disease. *Swiss medical weekly*. 2012;142(April):w13557.
12. Goldman L, Ausiello D A. Cecil Medicine 23rd edition. 2007: 1220-1228
13. Ananthakrishnan AN, Xavier RJ. How Does Genotype Influence Disease Phenotype in Inflammatory Bowel Disease? *Inflammatory Bowel Disease*. 2013;0(0):1–10.
14. Abraham C, Cho J. Interleukin-23/Th17 Pathways and Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Disease*. 2009;15(7):1090–1100.
15. Vermeire S. Towards a Novel Molecular Classification of IBD. *Digestive Diseases*. 2012;425–427.
16. Macfarlane S, Steed H, Macfarlane GT. Intestinal bacteria and inflammatory bowel disease. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2009;46(1):25–54.
17. Rovedatti L, Kudo T, Biancheri P, et al. Differential regulation of interleukin 17 and interferon gamma production in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2009;58(12):1629–36.
18. Rosenfeld G, Bressler B. Editorial: the truth about cigarette smoking and the risk of inflammatory bowel disease. *The American journal of gastroenterology*. 2012;107(9):1407–8.
19. García Rodríguez L a, González-Pérez a, Johansson S, Wallander M. Risk factors for inflammatory bowel disease in the general population. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2005;22(4):309–15.

20. Derby LE, Jick H. Appendectomy protects against ulcerative colitis. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*. 1998;9(2):205–7.
21. Koutroubakis IE, Vlachonikolis IG. Appendectomy and the development of ulcerative colitis: results of a metaanalysis of published case-control studies. *The American journal of gastroenterology*. 2000;95(1):171–6.
22. Pineton de Chambrun GP, Torres J, Darfeuille-Michaud A, Colombel J-F. The Role of Anti(myco)bacterial Interventions in the Management of IBD: Is There Evidence at All?. *Digestive diseases (Basel, Switzerland)*. 2012;30(4):358–67.
23. Fauci A.S, Dennis L.K, Longo D, Braunwald E. Harrison's Principles of Internal Medicine 17th Edition. 2008:931-940
24. Ordás I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. Ulcerative colitis. *Lancet*. 2012;6736(12):1–15.
25. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Classification of inflammatory bowel disease: the old and the new. *Current opinion in gastroenterology*. 2012;28(4):321–6.
26. Florin THJ, Paterson EWJ, Fowler E V, Radford-smith GL. Clinically active Crohn ' s disease in the presence of a low C-reactive protein. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2006;(April 2005):306–311.
27. Iskandar HN, Ciorba M a. Biomarkers in inflammatory bowel disease: current practices and recent advances. *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine*. 2012;159(4):313–25.
28. Vilela EG, Torres HODG, Martins FP, et al. Evaluation of inflammatory activity in Crohn's disease and ulcerative colitis. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2012;18(9):872–81.

29. Zak-Gołąb A, Hrycek A, Holecki M, Chudek J. [Diagnostic value of antineutrophil cytoplasmic antibodies]. *Wiadomości lekarskie (Warsaw, Poland: 1960)*. 2011;64(1):37–42.
30. Vasiliauskas EA, Plevy SE, Landers CJ, et al. Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with Crohn's disease define a clinical subgroup. *Gastroenterology*. 1996;110(6):1810–9.
31. Reese GE, Constantinides VA, Simillis C, et al. Diagnostic precision of anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies and perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease. *The American journal of gastroenterology*. 2006;101(10):2410–22.
32. Main J, McKenzie H, Yeaman GR, et al. Antibody to *Saccharomyces cerevisiae* (bakers' yeast) in Crohn's disease. *British Medical Journal (Clinical research ed.)*. 1988;297(6656):1105–6.
33. Sellin JH, Shah RR. The promise and pitfalls of serologic testing in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology clinics of North America*. 2012;41(2):463–82.
34. Kostakis ID, Cholidou KG, Vaiopoulos AG, et al. Fecal Calprotectin in Pediatric Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review. *Digestive diseases and sciences*. 2012;
35. Sidler M a, Leach ST, Day AS. Fecal S100A12 and fecal calprotectin as noninvasive markers for inflammatory bowel disease in children. *Inflammatory bowel diseases*. 2008;14(3):359–66.
36. Judd T a, Day AS, Lemberg D a, Turner D, Leach ST. Update of fecal markers of inflammation in inflammatory bowel disease. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2011;26(10):1493–9.
37. Jack M, Wright D. Role of advanced glycation endproducts and glyoxalase I in diabetic peripheral sensory neuropathy. *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine*. 2012;159(5):355–65.



38. Hyogo H, Yamagishi S. Advanced glycation end products (AGEs) and their involvement in liver disease. *Current pharmaceutical design*. 2008;14(10):969–72.
39. Ahmed N. Advanced glycation endproducts — role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Research of Clinical Practise*. 2005;67:3–21.
40. Song F, Schmidt AM. Novel Mechanisms and Unique Targets? *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2012;1760–1765.
41. Vlassara H, Palace MR. Diabetes and advanced glycation endproducts. *Journal of internal medicine*. 2002;251(2):87–101.
42. Vlassara H, Cai W, Chen X, et al. Managing chronic inflammation in the aging diabetic patient with CKD by diet or sevelamer carbonate: a modern paradigm shift. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2012;67(12):1410–6.
43. Sorci G, Riuzzi F, Giambanco I, Donato R. Biochimica et Biophysica Acta RAGE in tissue homeostasis , repair and regeneration. *BBA - Molecular Cell Research*. 2013;1833(1):101–109.
44. Herold K, Moser B, Chen Y, et al. Receptor for advanced glycation end products ( RAGE ) in a dash to the rescue: inflammatory signals gone awry in the primal response to stress. *Journal of leukocyte biology*. 2007; 223(2):83–101
45. Hegab Z, Gibbons S, Neyses L, Mamas MA. Role of advanced glycation end products in cardiovascular disease. *World Journal of Cardiology*. 2012;4(4):90–102.
46. Schmidt AM, Yan S Du, Yan SF, Stern DM. Multiligand receptors The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *The jornal of clinical investigation*. 2001;108(7):949–955.
47. Soman S, Raju R, Sandhya VK. A multicellular signal transduction network of AGE / RAGE signaling. *Journal of cell communication and signaling*. 2013;19–23.

48. Lakshmi V, Sasidhar B, Eda R. Advanced glycation end products: role in pathology of diabetic cardiomyopathy. *Heart failure reviews*. 2013; 1032–1037
49. Physiol AJ, Metab E, Wautier M, et al. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *American journal of physiology*. 2013; 19(2):129–134.
50. Biologie L De, National I, Transfusion D, Chirurgie S De. AGEs bind to mesothelial cells via RAGE and stimulate VCAM-1 expression. *Kidney international*. 2002;61:148–156.
51. Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. Receptor for AGE ( RAGE ): signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications. *Annals of the New York Academy of science*. 2011;1243(Cml):88–102.
52. Falcone C, Emanuele E, Angelo AD, et al. Plasma Levels of Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products. *Arteriosclerosis, Trombosis and Vascular Biology*. 2005;1032–1037.
53. Danilo G, Garlaschelli K, Grigore L, et al. Circulating soluble receptor for advanced glycation end products is inversely associated with body mass index and waist / hip ratio in the general population. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2009;19(2):129–134.
54. Gopal P, Rutten EPA, Dentener MA, Wouters EFM, Reynaert NL. Decreased plasma sRAGE levels in COPD: influence of oxygen therapy. *European Journal of Clinical Investigation*. 2012;42:807–814.
55. Kozhich A, Thibaudeau O, Grandsaigne M, et al. Expression of High-Mobility Group Box 1 and of Receptor for Advanced Glycation End Products in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. (5): 2010; 917-27

56. Yang Z, Tao T, Raftery MJ, et al. Proinflammatory properties of the human S100 protein chemoattractants . Here we extend earlier evidence. *Journal of leukocyte biology*. 2001;6–14.
57. Hofmann M a, Drury S, Fu C, et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*. 1999;97(7):889–901.
58. Kok L, Elias SG, Witteman BJM, et al. Diagnostic Accuracy of Point-of-Care Fecal Calprotectin and Immunochemical Occult Blood Tests for Diagnosis of Organic Bowel Disease in Primary Care: The Cost-Effectiveness of a Decision Rule for Abdominal Complaints in Primary Care ( CEDAR ) Study. *Clinical Chemistry*. 2012;998:989–998.
59. McCormick MM, Rahimi F, Bobryshev V, et al. S100A8 and S100A9 in Human Arterial Wall. *The Journal of biological chemistry*. 2005; 41521-9
60. Luley K, Noack F, Lehnert H. Local calprotectin production in colorectal cancer and polyps — active neutrophil recruitment in carcinogenesis. *International journal of colorectal disease*. 2011;603–607.
61. Turovskaya O, Foell D, Sinha P, et al. RAGE , carboxylated glycans and S100A8 / A9 play essential roles in colitis-associated carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2008;29(10):2035–2043.
62. Bunn SK, Bisset WM, Main MJC, et al. Fecal Calprotectin: Validation as a Noninvasive Measure of Bowel Inflammation in Childhood Inflammatory Bowel Disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2001;(July):14–22.
63. Lobatón T, Rodríguez-moranta F, Lopez A, et al. ORIGINAL ARTICLE A New Rapid Quantitative Test for Fecal Calprotectin Predicts Endoscopic Activity in Ulcerative Colitis. *Inflammatory bowel diseases*. 2013;19(5):1034–1042.
64. Yilmaz Y, Yonal O, Eren F, Atug O, Hamzaoglu HO. Serum levels of soluble receptor for advanced glycation endproducts (sRAGE) are higher in ulcerative

- colitis and correlate with disease activity. *Journal of Crohn's & colitis*. 2011;5(5):402–6.
65. Summerton CB, Longlands MG, Wiener K, Shreeve DR. Faecal calprotectin: a marker of inflammation throughout the intestinal tract. *European journal of gastroenterology and hepatology*. 2002;841–845.
  66. Kronborg O, Ugstad M, Fuglerud P, et al. Faecal calprotectin levels in a high risk population for colorectal neoplasia. *Gut*. 2000;795–800.
  67. Pezzili R, Barassi A, Morselli Labate AM, Corinaldesi R. Fecal Calprotectin Levels in Patients with Colonic Polyposis. *Digestive diseases and science*. 2008;47–51.
  68. Jiao L, Chen L, Alsarraj A, et al. Plasma soluble receptor for advanced glycation end-products and risk of colorectal adenoma. *International Journal of molecular epidemiology and genetics*. 2012;3(4):294–304.
  69. Koyama H, Shoji T, Yokoyama H, et al. Plasma level of endogenous secretory RAGE is associated with components of the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25(12):2587–93.
  70. Geroldi D, Falcone C, Minoretti P, et al. High levels of soluble receptor for advanced glycation end products may be a marker of extreme longevity in humans. *Journal of American Geriatric Society*. 2006;54:1149–50.
  71. Tibble J a, Sigthorsson G, Foster R, et al. High prevalence of NSAID enteropathy as shown by a simple faecal test. *Gut*. 1999;45(3):362–6.

## 6.2. EKLER

EK-1

### BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı olarak bilinen hastalıklarının ortaya çıkması, şiddeti ve alevlenmelerle seyredip seyretmeyeceğini ortaya koymaya yarayacak çeşitli belirteçleri araştırmayı planlıyoruz. Bu amaçla, muayene bulguları bu tür hastalıklarla uyumlu olan 60 hastadan tanı için alınan kanda ve endoskopi sırasında alınacak bağırsak materyalinde bu belirteçlerle ilgili testler yapacağız. Bu nedenle rahatsızlığınız yüzünden zaten sizin bağırsaklarınızdan alınarak incelenmek üzere patolojiye gönderilen doku örneğinizin bir kısmını tanı ve tedavinizin düzenlenmesinde yapılacak standart tüm incelemelerin yanısıra, bu hastalığın tedavisine ve izlenmesine katkı sağlayabileceğini düşündüğümüz diğer incelemelerin yapılması ve girişim öncesi rutin kan testleriniz için alınacak kanın bir bölümünü (1 tüp; 8 ml) bu araştırmaya yardımcı olmak üzere kullanabilmemiz için müsaadenizi istiyoruz.

Araştırmamızın ileride bu hastalığın nedenlerinin aydınlatılmasına, tanı ve tedavisine katkı sağlayacağını düşünüyoruz. Yapılacak olan araştırmalar tanı ve tedavinizi hiçbir şekilde etkilemeyecektir. Bu çalışma için kan ve doku örneği bir kez alınacaktır. Kan alınırken oluşabilecek hemotoma (cilt altı kanamaya bağlı şişlik) karşı alkollü pamukla bası yapılacaktır. Biyopsi sonrası oluşabilecek kesi veya enfeksiyon kontrol edilerek tedavisi verilecektir. Muhtemel zarar durumunda Dr. Deniz Koçer'i 0 505 5827085, 0 232 4122559 no'lu telefonlardan arayıp yardım alabilirsiniz. Alınan örnekler bu çalışma dışında kullanılmayacak, çalışma sonrasında imha edilecektir.

Bu çalışma sırasında uygulanacak testlerin ve araştırma ile ilgili gerçekleştirilecek diğer işlemlerin masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir. Gönüllü bu çalışmaya katılmayı reddetme ya da araştırma başladıktan sonra devam etmeme hakkına sahiptir. Bu çalışmaya katılmanız veya başladıktan sonra herhangi bir safhasında ayrılmanız daha sonraki tıbbi bakımınızı etkilemeyecektir. Araştırmacı da gönüllünün kendi rızasına bakmadan, olguyu araştırma dışı bırakabilir. Bu çalışmada yer aldığınız süre içerisinde kayıtlarınızın yanı sıra ilişkili sağlık kayıtlarınız kesinlikle gizli kalacaktır. Bununla birlikte kayıtlarınız kurumun yerel etik kurul komitesine ve Sağlık Bakanlığına açık olacaktır. Hassas olabileceğiniz kişisel bilgileriniz yalnızca

araştırma amacıyla toplanacak ve işlenecektir. Çalışma verileri herhangi bir yayın ve raporda kullanılırken bu yayında isminiz kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılamayacaktır. Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve szli açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Hastanın;

Adı:

Soyadı:

Tarih:

Tel:

Adres :

İmza:

**Olur Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş Görevlisinin;**

Adı:

Soyadı:

Tarih:

Görevi :

İmza:

**Araştırma Yapan Araştırmacının**

Adı:Deniz

Soyadı:Koçer

Tarih:

Tel: 0 505 493 37 58 , 0 232 412 25 59 İmza:

## BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (Sağlıklı Gönüllü)

İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı olarak bilinen hastalıklarının ortaya çıkması, şiddeti ve alevlenmelerle seyredip seyretmeyeceğini ortaya koymaya yarayacak çeşitli belirteçleri araştırmayı planlıyoruz. Bu amaçla, muayene bulguları bu tür hastalıklarla uyumlu olan 30 hastadan tanı için alınan kanda ve endoskopi sırasında alınacak bağırsak materyalinde bu belirteçlerle ilgili testler yapacağız. Araştırmamızın ileride bu hastalığın nedenlerinin aydınlatılmasına, tanı ve tedavisine katkı sağlayacağını düşünüyoruz.

Kontrol grubu olarak da, hasta grubuna benzer yaş ve cinsite olan 30 kişi çalışmaya alınacaktır. Bu araştırma kapsamında kan alımı dışında başka bir girişim yapılmayacaktır. Bu araştırmaya yardımcı olmak üzere, rutin kan testleriniz için alınacak kanın bir bölümünü (1 tüp; 8 ml) bu araştırmaya yardımcı olmak üzere kullanabilmemiz için müsaadenizi istiyoruz.

Yapılacak olan araştırmalar tanı ve tedavinizi hiçbir şekilde etkilemeyecektir. Bu çalışma için kan örneği bir kez alınacaktır. Kan alınırken oluşabilecek hemotoma (cilt altı kanamaya bağlı şişlik) karşı alkollü pamukla bası yapılacaktır. Muhtemel zarar durumunda Dr. Deniz Koçer'i 0 505 5827085, 0 232 4122559 no'lu telefonlardan arayıp yardım alabilirsiniz. Alınan örnekler bu çalışma dışında kullanılmayacak, çalışma sonrasında imha edilecektir.

Bu çalışma sırasında uygulanacak testlerin ve araştırma ile ilgili gerçekleştirilecek diğer işlemlerin masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir. Gönüllü bu çalışmaya katılmayı reddetme ya da araştırma başladıktan sonra devam etmeme hakkına sahiptir. Bu çalışmaya katılmanız veya başladıktan sonra herhangi bir safhasında ayrılmanız daha sonraki tıbbi bakımınızı etkilemeyecektir. Araştırmacı da gönüllünün kendi rızasına bakmadan, olguyu araştırma dışı bırakabilir. Bu çalışmada yer aldığınız süre içerisinde kayıtlarınızın yanı sıra ilişkili sağlık kayıtlarınız kesinlikle gizli kalacaktır. Bununla birlikte kayıtlarınız kurumun yerel etik kurul komitesine ve Sağlık Bakanlığına açık olacaktır. Hassas olabileceğiniz kişisel bilgileriniz yalnızca araştırma amacıyla toplanacak ve işlenecektir. Çalışma verileri herhangi bir yayın ve raporda kullanılırken bu yayında isminiz kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılamayacaktır.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Hastanın:

Adı:

Soyadı:

Tarih:

Tel:

Adres :

İmza:

**Olur Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş Görevlisinin;**

Adı:

Soyadı:

Tarih:

Görevi :

İmza:

**Araştırma Yapan Araştırmacının**

Adı:Deniz

Soyadı:Koçer

Tarih:

Tel: 0 505 493 37 58 , 0 232 412 25 59 İmza: