

İNFLAMATUAR BARSAK HASTALIK GELİŞİMİ ÜZERİNDE ÇEVRESEL FAKTÖRLERİN ETKİLEŞİM MEKANİZMALARININ İNCELENMESİ

*INVESTIGATION OF INTERACTION MECHANISM OF ENVIROMENTAL FACTORS ON
INFLAMMATORY BOWEL DISEASE DEVELOPMENT*

**Aydın Çevik, Özlem Timirci-Kahraman, Faruk Çelik, Burcu Çelikel, Nur Gökçe
Çetiner, H.Arzu Ergen, Bedia Çakmakoğlu, Ş.Ümit Zeybek**

Istanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Bu çalışma İ.Ü. BAP Birimi tarafından desteklenmiştir.
(Proje no: 33000)

Sorumlu Yazar : Şakir Ümit Zeybek

Yazışma adresi : İstanbul Üniversitesi

Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü,
Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Vakıf Gureba Cad.
34080, Şehremini/İSTANBUL

Tel : 0532 405 87 40

E-mail adres : umz67@yahoo.com

ÖZET

Barsak Hastalığı (IBH), çevresel, enfeksiyöz, genetik, otoimmün etkenlerden oluştuğu bildirilen bir hastalıktır. IBH' da luminal değişimlere karşı intestinal mukozanın kendini koruma yetersizliği söz konusudur ve kronik inflamasyon bu hastalığın ayırt edici özelliklerindedir. En fazla görülme yaşı, 15-25 veya 55-65 arasındadır. Adipoz doku ve elemanları birçok proteinin (adipositokin) salgılanmasını ve böylece metabolizma ve inflamasyon gibi çeşitli biyolojik fonksiyonların düzenlenmesini sağlar. Leptin öncelikli olarak spesifik hipotalamik yollardan enerji düzeylerine ve nöroendokrin fonksiyonlara etki etmektedir. Ancak leptin direnci moleküler düzeyde yeteri kadar anlaşılammıştır. Ghrelin, ghrelin hormonu endojen reseptörünün ligandı olarak bilinmekte ve kendine özgü reseptöre bağlanarak hücre içi kalsiyum konsantrasyonlarını arttırmakta, büyüme hormonu salgılanmasına neden olmakta ve birçok fizyolojik etkisini bu yolla göstermektedir. Resistin periferik sinyal molekülü olarak tanınmakta ve inflamatuvar barsak hastalığı açısından risk durumu son yıllarda araştırılmaktadır. Potansiyel letal inflamasyonda rol oynadığı bilinen sitokinlerden tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α)'nın etkisi insanlarda araştırılmakta ve özellikle inflamatuvar barsak hastalığı patogeneğinde kritik bir rol oynadığı bildirilmektedir. Epidermal growth factor (EGF), epiteliyal gelişimi, gastrik asid salınımını ve anjiyogenezi teşvik eden multipotent bir peptittir. Bazı çalışmalarda EGF'in inflamatuvar barsak hastalığında mukozanın hasara veya doku tamirine yatkınlığını etkileyen belirteçlerden biri olduğu belirtilmiştir. Araştırmamız ile panel olarak ve ilk defa bir arada çalışılacak olan leptin, ghrelin, resistin, EGF ve TNF- α belirteçlerine ait verilerin, literatürlerle uygun olarak sonuç alınmıştır.

Anahtar kelimeler: inflamatuvar barsak hastalığı, leptin, ghrelin, rezistin, EGF, TNF- α , ELISA

ABSTRACT

Inflammatory Bowel Disease (IBD) is a disease reported that occurs from environmental, infectious, genetic and autoimmune factors. In IBD, there is a lack of self-protection of intestinal mucosa against luminal changes. Chronic inflammation is a hallmark of this disease. The most common age ranges are between 15-25 and 55-65. Adipose tissue and the elements of it, provides the secretion of many proteins (adipocytokines) and thus, regulation of the biologic functions like metabolism and inflammation. Leptin affects energy levels and neuroendocrine functions of specific hypothalamic pathways primarily. But molecular means of leptin resistance is not understood enough yet. Ghrelin is known as ligand of ghrelin hormone's endogenous receptor. It increases calcium concentrations by binding specific receptors. It leads to secretion of growth hormone and thus has many physiological effects.

Recently discovered resistin, is a hormone secreted by fat cells. It is recognized as a peripheric signal molecule and the status of risk about IBD is being investigated in recent years. The effect of Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), known as a cytokine which is playing a role in potential lethal inflammation, is under investigation in human and it is reported that TNF- α especially plays a critical role in IBD pathogenesis. Epidermal growth factor (EGF) is a multipotent peptide that promotes epithelial growth, gastric acid secretion and angiogenesis. In some studies, EGF is indicated that it is one of the markers affecting mucosa's susceptibility to damage and tissue repair in IBD.

The data belongs to our research are corelated with the literatures. Studying of leptin, ghelin, resistin, EGF and TNF- α markers will be studied together for the first time and as a panel.

Key Words: Inflammatory Bowel Disease, leptin, ghrelin, resistin, EGF, TNF- α , ELISA

GİRİŞ

İnflamatuvar Barsak Hastalığı (IBH), bağıışıklık, enfeksiyöz, kalıtsal, otoimmün nedenler ve çevresel faktörler ile oluştuğu bildirilen; Crohn Hastalığı, ülseratif kolit ve bunun gibi hastalıkları içerir. Bununla birlikte, mezenterik beyaz adipoz doku (WAT) hipertrofisi, vücut kompozisyonu değişikliği, anoreksiya gibi özellikler gözlenmektedir.

En fazla görülme yaşı, 15-25 veya 55-65 arasındadır. Ancak diğer yaş gruplarında da ortaya çıkabilir. Kadınlarda ise erkeklere oranla % 30 daha fazla gözlenir. Ortalama olarak toplumda binde bir oranında görülür. Hastalık bulaşıcı değildir ancak en önemli risk faktörü aile öyküsüdür. Söz konusu bu faktörler arasındaki etkileşim önemli olabilir. Adı geçen etkenlerden obeziteyle de ilişkili olduğu bilinen adipoz doku ve elemanları birçok proteinin salgılanmasını ve böylece çeşitli biyolojik fonksiyonların düzenlenmesini sağlar. Adipositokinler olarak bilinen bu proteinler içinde, araştırmamızda tayin edeceğimiz leptin, ghrelin ve resistin gibi belirteçler de yer almaktadır. Adipositokinler metabolizma ve inflamasyonda önemli rol oynarlar.

Leptin öncelikli olarak spesifik hipotalamik yollardan enerji düzeylerine ve nöroendokrin fonksiyonlara etki etmektedir. Ancak leptin direnci moleküler düzeyde yeteri kadar anlaşılammıştır. Leptinin kilo kaybı ile ilgili etkilere karşı olan direnci insan ve kemirgen obezitesinde benzerlik göstermektedir.

Son yıllarda keşfedilen Resistin, yağ hücresinden salgılanan bir hormondur. Obezite ve Tip-2 diyabet ile de bağlantılı olan resistin; periferik sinyal molekülü olarak tanınmakta, negatif geribesleme ile periferik etki ederek beden yağ kitlesini düzenleyebilmekte ve inflamatuvar barsak hastalığı açısından risk durumu son yıllarda araştırılmaktadır.

Ghrelin, ghrelin hormonu endojen reseptörünün ligandı olarak bilinmekte ve kendine özgü reseptöre (GHSR1a)

bağlanarak hücre içi kalsiyum konsantrasyonlarını arttırmakta, büyüme hormonu salgılanmasına neden olmakta ve birçok fizyolojik etkisini bu yolla göstermektedir.

Anormal adipokin üretiminin bazı proinflamatuvar sinyal yollarının aktive olması ile inflamasyonun biyolojik belirteçlerinin indüklenmesi sonucunda ortaya çıkan kronik inflamasyon yanıtıyla, ilişkili olduğu öne sürülmektedir.

Potansiyel letal inflamasyonda rol oynadığı bilinen sitokinlerden bazıları olan, tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α), interlökin 1 β (IL-1 β), interlökin-2 (IL-2), interlökin-4 (IL-4), interlökin-5 (IL-5), interlökin-6 (IL-6), interlökin-10 (IL-10), interlökin-12 (IL-12) ve interferon- γ (IFN- γ)'nın etkisi insanlarda araştırılmakta ve özellikle inflamatuvar barsak hastalığı patogeneğinde kritik bir rol oynadığı bildirilmektedir.

Barsak hastalığında (IBD-IBH) insan metabolizması önemli değişikliklere uğrar ve kronik inflamasyon bu hastalığın ayırt edici özelliklerindedir.

Epidermal growth factor (EGF), epiteliyal gelişimi, gastrik asid salınımını ve anjiyogenezi teşvik eden multipotent bir peptittir. Bazı çalışmalarda EGF'in inflamatuvar barsak hastalığında mukozanın hasara veya doku tamirine yatkınlığını etkileyen belirteçlerden biri olduğu belirtilmiştir. Bunun yanında, EGF düzeyleri ile ülseratif kolit ve Chron's Hastalığı arasında ilişki bulunmuştur.

İnflamatuvar Barsak Hastalığı'nın (IBH), serum leptin seviyelerinin azaldığı, adiponektin ve resistin düzeylerinin arttığı bildirilmiştir.

Diğer taraftan TNF- α bloke edici ajanlar IBH'li vakalarda inflamatuvar süreçte biyolojik ajan olarak değerlendirildiği belirtilmiştir.

1. YÖNTEM

Çalışmada kullanılan örnekler gönüllülerden alınan kan örneklerinden 3000 rpm 5 dakika santrifüj sonrasında

alınan serumlarda bakılmıştır. Kit prosedürlerine uygun bir şekilde örneklerin sulandırılması, standartların hazırlanması yapılmıştır. Standartlar, örnekler aktarılması gereken kuyucuklara kit prosedürüne göre değişik miktarlarda aktarımı yapılmıştır. Her kuyuya kit'te belirtilen miktar kadar antibody, biyotin ile işaretlenmiş peptid eklenip belli süre boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası yıkama ve yıkama sonrası her kuyuya SA-HRP eklenmiştir. Oda sıcaklığı inkübasyonu sonrası tekrar yıkama yapılarak her kuyuya TMB eklenmiştir. Karanlık ortamda belirli süre inkübasyon sonrası HCL eklenerek reaksiyonun durdurulması sağlanmış ve ELISA cihazında 450 nm dalga boyunda absorbansı okunmuştur.

2. BULGULAR

Yapılan ELISA çalışmaları sonucu elde edilen verilen SPSS-8 paket programı ile istatistiksel olarak belirlenmiştir. EGF için denek sayısı<50 olduğu için gruplarda Shapiro-Wilk testi sonuçlarına bakıldı. $P < 0.05$ olduğundan veriler normal dağılım göstermiyor. Bu yüzden Mann-Whitney U testi ile sonuçlar değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda $p=0.0001$ olarak belirlenmiştir. Gherelin için sonuçlar kontrol grubunda veriler normal dağılım göstermiş ($p:0.544$) ama hasta grubunda normal dağılım göstermediği için nonparametrik test olan Mann-Whitney U testi kullanıldı ve $p=0.022$ olarak ortaya konulmuştur. Leptin serum düzeyleri verileri için Shapiro-Wilk testi sonuçlarına bakıldı. $P < 0.05$ olduğundan veriler normal dağılım göstermediğinden Mann-Whitney U testinde $p=0.003$ olarak anlamlı sonuçlar kaydedilmiştir. Rezistinde serum düzeyleri de benzer sebeplerden Mann-Whitney U testinde $p=0.003$ olarak belirlenmiştir. TNF Alfa için; $p= 0.0001$ gibi yüksek skorda ilişki saptanmıştır.

3. TARTIŞMA VE SONUÇ

Adipositokinler olarak bilinen leptin, ghrelin ve resistin metabolizma ve inflamasyonda önemli rol oynadıklarına dair bir çok güçlü kanıt bulunmaktadır. Buna karşın literatürde İBH açısından etkisi pek fazla

incelenmemektedir. Gherelin için sonuçlar kontrol grubunda veriler normal dağılım göstermiş ($p:0.544$) ama hasta grubunda normal dağılım göstermediği için nonparametrik test olan Mann-Whitney U testi kullanıldı ve $p=0.022$ olarak ortaya konulmuştur. Leptin serum düzeyleri verileri için Shapiro-Wilk testi sonuçlarına bakıldı. $P < 0.05$ olduğundan veriler normal dağılım göstermediğinden Mann-Whitney U testinde $p=0.003$ olarak anlamlı sonuçlar kaydedilmiştir. Rezistinde serum düzeyleri de benzer sebeplerden Mann-Whitney U testinde $p=0.003$ olarak belirlenmiştir. Böylece adipositokinlerin İBH vakalarında serum düzeyindeki etkileri beklediğimiz yönde olmuştur.

Potansiyel letal inflamasyonda rol oynadığı bilinen sitokinlerden bazıları olan, tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α), interlökin 1 β (IL-1 β), interlökin-2 (IL-2), interlökin-4 (IL-4), interlökin-5 (IL-5), interlökin-6 (IL-6), interlökin-10 (IL-10), interlökin-12 (IL-12) ve interferon- γ (IFN- γ)'nın etkisi insanlarda araştırılmakta ve özellikle inflamatuvar barsak hastalığı patogeneziinde kritik bir rol oynadığına dair çalışmalar literatür çalışmalarımızda bulunmaktadır. Yaptığımız çalışmamızda serum düzeylerinde incelediğimiz TNF Alfa için; $p= 0.0001$ gibi yüksek skorda ilişki saptanmıştır. Literatürdeki kanıyı destekleyici yönden bulgular alınmıştır.

Epidermal growth factor (EGF), epiteliyal gelişimi, gastrik asid salınımını ve anjiyogenezi teşvik eden multipotent bir peptittir. Bazı çalışmalarda EGF'in inflamatuvar barsak hastalığında mukozanın hasara veya doku tamirine yatkınlığını etkileyen belirteçlerden biri olduğu belirtilmiştir. Bunun yanında, EGF düzeyleri ile ülseratif kolit ve Chron's Hastalığı arasında çelişkili veriler yer almaktadır. Bizim çalışmamızda EGF için denek sayısı<50 olduğu için gruplarda Shapiro-Wilk testi sonuçlarına bakıldı. $P < 0.05$ olduğundan veriler normal dağılım göstermiyor. Bu yüzden Mann-Whitney U testi ile sonuçlar değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda $p=0.0001$ olarak

belirlenmiştir. Bulgular literatürü destekleyici yönde olmuştur.

KAYNAKLAR:

- 1) Jahanshahi G, Motavasel V, Rezaie A, Hashtroudi AA, Daryani NE, Abdollahi M. Alterations in antioxidant power and levels of epidermal growth factor and nitric oxide in saliva of patients with inflammatory bowel diseases. *Dig Dis Sci.* 2004 Nov-Dec;49(11-12):1752-7.
- 2) Oikonomou KA, Kapsoritakis AN, Kapsoritaki AI, Manolakis AC, Tsiopoulos FD, Germeis AE, Potamianos SP. Downregulation of serum epidermal growth factor in patients with inflammatory bowel disease. Is there a link with mucosal damage? *Growth Factors.* 2010 Dec;28(6):461-6.
- 3) Karmiris K, Koutroubakis IE, Xidakis C, Polychronaki M, Voudouri T, Kouroumalis EA. Circulating levels of leptin, adiponectin, resistin, and ghrelin in inflammatory bowel disease. *Swiss Med Wkly.* 2009 May 16;139(19-20):278-87.
- 4) Pache I, Rogler G, Felley C. TNF-alpha blockers in inflammatory bowel diseases: practical consensus recommendations and a user's guide. *Clin Chem.* 2001;47(7):1297-301.
- 5) Komatsu M, Kobayashi D, Saito K, Furuya D, Yagihashi A, Araake H, Tsuji N, Sakamaki S, Niitsu Y, Watanabe N. Tumor necrosis factor-alpha in serum of patients with inflammatory bowel disease as measured by a highly sensitive immuno-PCR. *Clin Chem.* 2001;47(7):1297-301.
- 6) Konstantinos Karmiris, Ioannis E. Koutroubakis, Elias A. Kouroumalis, Leptin, adiponectin, resistin, and ghrelin – Implications for inflammatory bowel disease. *Mol Nutr Food Res.* 2008 Aug;52(8):855-66.
- 7) G. Andrisani, L. Guidi, A. Papa, A. Armuzzi, Anti-TNF alpha therapy in the management of extraintestinal manifestation of inflammatory bowel disease *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2012; 16: 890-901. A. Ballinger, Paul Kelly, Elizabeth Hallyburton, Rachel Besser, Michael Farthing, Plasma leptin in chronic inflammatory bowel disease and HIV: implications for the pathogenesis of anorexia and weight loss *Clinical Science* (1998) 94, 479-483.