

Enflamatuvar bağırsak hastalığı olan Türk çocuklarında interlökin-10 almaç gen mutasyon sıklığının ve klinik özelliklerinin belirlenmesi

Ömer Faruk Beşer^{1,*}, Kaan Boztuğ², Tufan Kutlu³, Fügen Çullu Çokuğraş³, Ethem Erginöz⁴, Tülay Erkan³

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi ¹Pediyatrik Gastroenteroloji, Hepatoloji ve Beslenme Uzmanı, ³Pediyatri Profesörü, ⁴Halk Sağlığı Profesörü; Medical University of Vienna and Research Center for Molecular Medicine of the Austrian Academy of Sciences (CeMM) ²Pediyatri Profesörü

*İletişim: ofbeser@gmail.com

SUMMARY: Beşer ÖF, Boztuğ K, Kutlu T, Çullu Çokuğraş F, Erginöz E, Erkan T. (Department of Pediatrics, İstanbul University Cerrahpaşa Faculty of Medicine, İstanbul, Turkey). The determination of frequency of interleukin-10 receptor gene mutations and clinical characteristics in Turkish children with inflammatory bowel disease. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2014; 57: 163-172.

In our study, we aimed to determine the presence of interleukin-10 (IL-10) receptor resistance gene mutations as a cause of inflammatory bowel disease (IBD) in children aged 0-18 years with a diagnosis of IBD by genetic analysis and to compare patients with versus without IL-10 receptor mutation in terms of demographic, clinical and laboratory findings and treatment response based on the follow-up findings. In our study, genotype analysis was performed to determine the presence of IL-10 and/or IL-10 receptor mutations in 53 patients with a diagnosis of IBD. When a mutation was found in the family, other family members were also compared regarding those gene locations. Based on previous genetic studies, the potential gene regions in which mutations were found were separated and selected. Mutation screening of the IL-10, IL-10RA and IL-10RB genes was done in these selected regions. Gene-specific and protein-specific tests were done to determine the functional effects of the mutations defined on the IL-10 signal pathway. Consanguinity between parents, early age of onset and a course of Crohn's disease were statistically significantly different in the patients who were found to have a mutation on the IL-10 pathway compared to those with no mutation ($p=0.014$, $p=0.005$, $p<0.001$, respectively). While perianal fistula was found in 100% of the patients who had mutation, it was found in only 14.9% of those with no mutation ($p<0.001$). It was found that weight- and height-for-age Z scores were statistically significantly lower in the IL-10 mutation-positive group ($p<0.001$, $p<0.001$, respectively). It was determined that azathioprine and anti-tumor necrosis factor (TNF) antibody treatments were used more frequently in the patients with mutation compared to those with no mutation, and remission times were statistically significantly longer in the IL-10 mutation-positive group compared to the IL-10 mutation-negative group ($p<0.001$). We believe that genetic mutations, mainly including IL-10, may have a greater impact on disease occurrence in early-onset IBD in the childhood age group. When a mutation is determined on the IL-10 signal pathway, the disease onset is at an earlier age, the prognosis is severe and response to treatment is poor.

Key words: inflammatory bowel disease, IL-10, IL-10RA, IL-10RB.

ÖZET: Çalışmamızda enflamatuvar bağırsak hastalığı (EBH) tanılı 0-18 yaş arasındaki çocuklarda hastalığın nedeni olarak interlökin-10 (IL-10) almaç direnci gen mutasyonlarının varlığını genetik analizle tespit etmeyi ve IL-10 almaç mutasyonu saptanacak olguların demografik, klinik, laboratuvar, tedaviye yanıt özellikleri açısından izlemlerini mutasyon saptanmayanlarla karşılaştırmayı amaçladık. Çalışmamızda 53 EBH tanılı olguda, IL-10 ve/

veya IL-10 almaç mutasyonlarının varlığının tespiti için genotip analizi yapılmıştır. Ailede mutasyon saptanması halinde diğer aile fertlerinin de o gen yerleşmeleri ile kıyaslanması yapılmıştır. Daha önce yapılmış genetik çalışmalar temel alınarak mutasyonların bulunduğu olası gen bölgeleri ayrıştırılıp seçilmiştir ve bu seçilen bölgelerde IL-10, IL-10RA ve IL-10RB genlerinde mutasyon taraması yapılmıştır. İnterlökin-10 sinyal yolağı üzerinde tanımlanan mutasyonların işlevsel etkilerini belirlemek için gene özel ve proteine özel testler yapılmıştır. İnterlökin-10 yolağında mutasyon saptanan olgularda anne-babalarında akrabalık, hastalığın erken yaşta başlaması ve Crohn hastalığı gidişinde olması, mutasyon saptanmayanlardan daha yüksek oranlarda gözlenmiştir (sırasıyla $p=0.014$, $p=0.005$, $p < 0.001$). Mutasyonu olanların %100'ünde perianal fistül varken, olmayanların ancak %14.9'unda vardı ($p < 0.001$). Yaşa göre ağırlık ve boy Z skorlarının mutasyonu saptanan grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede geri olduğu görülmüştür (sırasıyla $p < 0.001$, $p < 0.001$). İnterlökin-10 yolağında mutasyon saptananların tedavisinde azatiyoprin ve anti-TNF antikor tedavilerinin mutasyon saptanmayanlara göre daha fazla kullanıldığı, remisyona girme sürelerinin de mutasyonu olmayan gruptan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde uzun olduğu gözlemlenmiştir ($p < 0.001$). Çocuk yaş grubunda erken başlangıçlı EBH'de IL-10 başta olmak üzere genetik mutasyonların hastalığın oluşmasında daha fazla etkiye sahip olabileceğini düşünmekteyiz. İnterlökin-10 sinyal yolağı üzerinde mutasyon olması durumunda hastalık erken yaşta başlarken hem çok şiddetli gidip hem de tedavi yanıtı iyi olmamaktadır.

Anahtar kelimeler: enflamatuvar bağırsak hastalığı, IL-10, IL-10RA, IL-10RB.

Enflamatuvar bağırsak hastalıkları (EBH) çoğunlukla sindirim sisteminde, bazen sindirim sistemi dışında enflamasyona yol açan, remisyon ve tekrarlarla gidebilen bir grup hastalıktır.¹ Erişkinlerde EBH çocuklara göre daha sık gözlenmektedir. Ancak son yıllarda çocukluk yaş grubunda hastalığın başlama oranı arttığı için hastalık oluşumunda genetik mutasyonların rolü öne çıkmaktadır.² Erişkinlerde EBH'de genetik etkinin varlığı yönünde daha kesin kanıtlar bulunsa da özellikle çocuk yaş grubunda erken başlangıçlı EBH'de genetik mutasyonların hastalığın oluşmasında daha fazla etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir.³ Çocukların erişkin başlangıçlı EBH'nin oluşmasında daha etkili olan çevresel etmenlerden (diyet, sigara ve ilaçlar gibi) daha az etkilendiği kabul edilmektedir. Ayrıca erişkin hastalığıyla kıyaslandığında çocuklardaki EBH'de bağırsak mukozasında savunma sistemi yanıtının daha yüksek düzeyde aktif olduğu bilinmektedir.⁴

Günümüzde hâlâ EBH'nin genetik nedenlerinin ancak bir kısmı anlaşılabilmiştir. Özellikle son dönemde yapılan gen geçişli fare örnekli çalışmalar ve 'Genome-Wide Association Studies' (GWAS); bağırsakta enflamasyona

neden olan genetik nedenleri daha iyi anlamamızı sağlamıştır.⁵ Bu yaklaşımlar kullanılarak EBH patojenezinde birçok genin rol oynadığı ortaya çıkmıştır. Bu genler doğal ve kazanılmış bağışıklık sisteminin kontrolünü, otofaji sürecini, epitelin engel işlevini ve endoplazmik retikulum aktivasyonunu kontrol eden genlerdir.⁶ İnterlökin-10 (IL-10) aşırı bağışıklık yanıtlarını kısıtlayan bir interlökindir.⁷ Başlangıçta 'T helper 2' ile ilişkili olarak tanımlanmıştı ve IL-2 ve 'interferon- γ ' gibi 'T helper 1' tarafından salınan sitokinlerin salınımını baskıladığı sanılmaktaydı.⁸ Artık IL-10'un birçok hücre tarafından salındığı anlaşılmış ve özellikle T, B ve miyeloid hücreler üzerine çeşitli etkileri olduğu saptanmıştır.⁷ İnterlökin-10'un özellikle 'Tumor Necrosis Factor- α ' (TNF- α) ve IL-12 gibi enflamatuvar öncüsü olan sitokinlerin salınımını baskıladığı bilinmektedir.^{9,10}

İnterlökin-10 almaç iki alfa molekülü (IL-10R1), iki de beta molekülünden (IL-10R2) oluşmaktadır.¹¹ Almacın IL-10R1 alt birimi sadece IL-10'a özgül olmakla birlikte IL-10R2 alt birimi IL-22, IL-12 gibi birçok sitokine almaçlık yapmaktadır.¹² İnterlökin-10

almacında mutasyona bağlı 'Janus tirozin kinaz 1' ve 'tyrosine kinase-2' aktive olup bu 'signal transducer and activator of transcription 3'ü (STAT-3) fosforiller ve STAT-3'e bağlı genler aktive edilir.¹³ İnterlökin-10 almaç direnci olan farelerde enterokolit oluştuğu saptanmıştır ve IL-10'un sindirim sistemi mukozası üzerinde koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.¹⁴ İnterlökin-10'da veya almaçlarında bozukluk saptanan insanlarda enflamasyonu baskılayan bu sinyal yolu çalışmayıp enflamasyon kontrol altına alınamayacağından şiddetli enterokolit gelişebildiği bilinmektedir.⁶

Çalışmamızda EBH tanılı 0-18 yaş arasındaki çocuklarda hastalığın nedeni olarak IL-10 almaç direnci gen mutasyonlarının varlığını genetik analizle tespit etmeyi ve IL-10 almaç mutasyonu saptanacak olguların demografik, klinik, laboratuvar, tedaviye yanıt özellikleri açısından izlemlerini mutasyon saptanmayan gruba karşılaştırmayı amaçladık.

Materyal ve Metot

Hastalar

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Gastroenteroloji, Hepatoloji ve Beslenme Bilim Dalı'nda Ocak 2012 ve Ocak 2013 tarihleri arasında yapıldı. Çalışmaya 0-18 yaş aralığında EBH tanısı ile izlenmekte olan 53 olgu ailelerinin de onamı ile alındı.

Hasta grubu; klinik, serolojik, endoskopik, histopatolojik ölçütlere göre EBH tanısı konularak izlem altında olan ve tedavileri devam etmekte olan hastaları içermektedir. Çalışmaya alınan hastaların dosyaları incelenerek hastaların doğum tarihleri, ösefagogastroduodenoskopi/kolonoskopi bulguları, ilk tanı anındaki ve izlem sırasındaki laboratuvar incelemeleri, yakınmaları ve süresi, daha önce almış olduğu ve şu an almakta olduğu tedaviler, eşlik eden hastalık varlığı değerlendirildi. Tanı anındaki ve daha sonraki izlemleri sırasındaki boy ve vücut ağırlığı, boy Z skoru, vücut ağırlığı Z skoru, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2006 yılında yayınlamış olduğu büyüme eğrileri temel alınarak beş yaş altı için WHO Anthro v3.2.2 (Cenevre, İsviçre) ve beş yaş üzeri için WHO Anthro Plus v1.0.4 (Cenevre, İsviçre) programları kullanılarak hesaplandı.

Laboratuvar ve görüntüleme yöntemleri

Tanı anında ve izlem sırasında çalışılan eritrosit

sedimentasyon hızı (ESH), C-reaktif protein (CRP), tam kan sayımı, serum immünoglobülin düzeyleri, total protein ve albümin düzeyi, 'perinuclear anti neutrophil cytoplasmic antibodies' (pANCA's), 'anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies' (ASCA's) sonuçları dışkı inceleme sonuçları (parazit, amip, kültür, dışkı kalprotektin), kaydedildi.

Çalışmaya alınan tüm olguların ince bağırsakları ya kontrast madde kullanılarak nazoduodenal entübasyonla yapılan enteroklizis ile ya da ağızdan ve damardan kontrast madde verilerek uygulanan bilgisayarlı tomografi enteroklizis yöntemi ile görüntülenmişti. Bağırsak duvar kalınlığı tespit edilen olgularda duvar kalınlığının izlemi karın ultrasonografisiyle yapıldı. Tüm olgulara EBH tanısı için sedasyon altında kolonoskopi uygulandı. İşlem sırasında histopatolojik incelemeler için çoklu biyopsi örnekleri alınarak, biyopsilerin patoloj tarafından incelenmesinin ardından EBH tanısı konulan olgular çalışmaya alınmıştı. Ayrıca EBH tanısı koyulan tüm olgulara ösefagogastroduodenoskopi işlemi de uygulanıp bulguları kaydedildi.

Genetik inceleme

Genetik inceleme çalışmasının yapılabilmesi için hastadan, anne, baba, kardeşlerinden ve EBH tanılı akrabasından 10 ml kan alınıp +4 ile +12 °C arasında uygun ortam sağlanarak kapalı, ısı koruyucu bir ortamla kargo şirketi ile 'Research Center for Molecular Medicine of the Austrian Academy of Sciences'e (Ce-M-M-) en geç iki gün içerisinde ulaştırıldı.

IL-10, IL-10RA ve IL-10RB genlerinin egzonik bölgeleri standart kılcal dizileme yöntemlere göre genomik DNA'dan elde edilerek sekanslandı. İncelenen birincil sekansları, Tablo I'de gösterilmiştir. Daha sonra Tablo I'de vurgulanan öncül sekanslar Glocker ve arkadaşları⁶ çalışmalarındaki gibi düzenlendi. Sekanslama işlemi tüm olgularda bir yıllık süre içerisinde yapıldığından öncül sekanslarda küçük değişiklikler oluşabilmiştir.

İstatistiksel inceleme

Verilerin analiz edilmesi için SPSS 16.0 programı kullanıldı. Bağımlı olmayan istatistiksel değişkenler Mann-Whitney U, bağımlı istatistiksel değişkenler ise Wilcoxon testi ile hesaplandı. Normal dağılımlı değişkenler ortalama ± ortalama standart sapma olarak,

dağılımı normal olmayan değişkenler ise ortanca; en düşük-en yüksek olarak ifade edildi. Hasta grubunun demografik ve antropometrik ölçümleri ANOVA, ki-kare ve normal dağılıma uymayan veriler söz konusu olduğunda Kruskal-Wallis testi, laboratuvar değişkenleri ANOVA ve Kruskal-Wallis testleri ile incelendi. Verilerin karşılaştırılması gereken durumlarda ki-kare testi kullanıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Hasta onamı ve etik kurul onayı

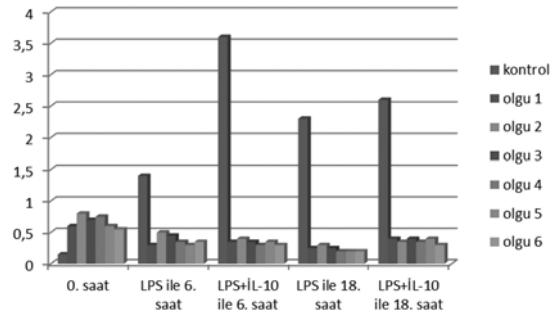
Çalışmaya alınan tüm olguların ebeveynlerinden hem kendileri için hem de çocukları için sözlü veya yazılı onam alındı. Çalışma sonuçlandıktan sonra her olgunun çalışma sonucu kendi velisine bildirildi. Çalışma için etik kurul onayı İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 14.04.2012 tarih ve 13418 numaralı yazısıyla alındı.

Bulgular

Enflamatuvar bağırsak hastalığı tanısı alan hastaların ilk tanı anındaki demografik ve genel özellikleri Tablo II'de sunulmuştur. Çalışmamızdaki 53 EBH tanılı olgudan birinde IL-10RAex4 c.T192G p.Y64X'de, birinde IL-10 c.G43A/G p.Gly15Arg'de, ikisinde IL-10RBex4 c.G477A p.W159X'de ve birinde IL-10RAex3 c.G133T p.W45G'de homozigot, birinde de IL-10ex3'de homozigot olmak üzere altı olgunun (%11.3) IL-10 yolağında mutasyonlar saptanmıştır.

İnterlökin-10 yolağında mutasyon saptanan altı olguda bu mutasyonların işlevsel olarak bir anlam ifade edip etmediğini ve mutasyon sonucu sinyal yolunda bir bozukluk olup olmadığını anlamak için her olguda 'Suppressor of Cytokine Signaling 3' (SOCS3) düzeyi de çalışılmıştır. Bu proteinin, hücreler lipopolisakkarit ve IL-10 tarafından uyarıldığında ekspresyonu başlatma görevi bulunmaktadır. Mutasyon saptanan altı olguda SOCS3 düzeyleri PCR tekniği ile ölçülmüş, normal bir kontrol olgusuyla karşılaştırılmış ve hepsinde düşüklük saptanmıştır (Şekil 1).

İnterlökin-10 yolağında mutasyon saptanan altı olguyu, hastalığın tutulum yeri, klinik gidiş ve tedaviye yanıt açısından değerlendirdiğimizde tümünde Crohn hastalığına (CH) daha yakın bir gidiş söz konusuydu. Başlangıç yaşı, anne-baba akrabalığı, ailede EBH öyküsü, fistül bulundurma, ağırlık ve boy Z skorlarında



LPS: lipopolisakkarit; SOCS: Suppressor of cytokine signaling 3

Şekil 1. SOCS düzeylerinin PCR ile işlevsel analizi.

gerilik özellikleri açısından bu altı olgunun değerlendirilmesi Tablo III'de sunulmuştur.

İnterlökin-10 mutasyonu olan olgularda hastalığın CH gidişinde olup erken yaşta başlaması ve anne-babalar arasında akrabalık oluşu mutasyonu saptanmayanlardan daha fazla gözlemlendi (sırasıyla $p < 0.001$, $p = 0.005$, $p = 0.014$). Anne-baba arasında akrabalık saptanan 20 olgunun yakınma başlama yaş ortalaması 66.3 ay iken akrabalık olmayanlarda bu ortalama 77.2 idi ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p = 0.025$).

Her iki grubun cinsiyet dağılımı ve ailede EBH olması karşılaştırıldığında arada anlamlı fark gözlenmedi (sırasıyla $p = 0.512$, $p = 0.336$). Ailesinde EBH saptadığımız bu 10 olgunun yakınma başlama yaş ortalaması 65.7 ay iken ailede EBH olmayanlarda bu 73.2 ay idi. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p = 0.025$). Diğer yandan IL-10 yolağında mutasyonu bulunan olgularımız hastalık başlangıç yaş ortalaması 10.3 ay iken, mutasyon saptanmayanlarda 75.2 ay idi. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p = 0.005$).

İnterlökin-10 mutasyonu olan olguların kilo alamama yakınmasının mutasyonu olmayan gruptan daha fazla olduğu görüldü ($p < 0.001$) (Tablo IV).

Bu olguların başvuru fizik muayene bulguları karşılaştırıldığında perianal hiperemi, fissür, fistül, apse, yaşa göre ağırlık ve boy Z skorları açısından IL-10 (+) grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede fark saptandı (sırasıyla $p = 0.011$, $p = 0.001$, $p < 0.001$, $p = 0.001$, $p = 0.001$, $p = 0.001$).

İnterlökin-10 yolağında mutasyon saptanan olguların tedavi sonrası yaşa göre ağırlık ve boy

Tablo I. Öncül sekanslar.

gene; exon	orientation	sequence (5'-3')
IL-10 exon 1	F	GCCGGGAAACCTTGATTG
	R	GGAATAGGTGTTGGGGATGG
IL-10 exon 2	F	TCCCATCACTGTTGAATCCTC
	R	GACTGAGCCCTTTGTAAACCC
IL-10 exon 3	F	ATCGCTAGAACCAAGCTGTCC
	R	GTGTCTTTGCTGTGTCTGTGG
IL-10 exon 4	F	ACCAGCTTGTCCCCTAAGTG
	R	GAATGGGGCCTATTGAGTCC
IL-10 exon 5.1	F	CATGAGCATGAGGGAGGG
	R	TCCGAGACACTGGAAGGTG
IL-10 exon 5.2	F	ATCTTGTCTCTGGGCTTGGG
	R	TGCAGAATTCATTCACCCAC
IL-10 exon 5.3	F	CCTAAATTTGGTTCTAGGCCG
	R	GGCTTCCTTTCTCTGAAATGC
IL-10 exon 5.4	F	TGGATCACTTGAGGTCAGGA
	R	CCTGGGGGTAGGGGTTAG
IL-10RA exon 1	F	GACAGTGGTTCCTCCGTC
	R	CACTGGATGGAGAACTTTAATGG
IL-10RA exon 2	F	GAACCTCCCTTTCTTCTTTGG
	R	AGGCAGGTATCTTCCCATGC
IL-10RA exon 3	F	GGCCTCTTGCCTCTCCC
	R	GCAGACATGGTGAGCTATGG
IL-10RA exon 4	F	ATTCTGGAGGCAAAGTCTCG
	R	AGTCCCAATGGCACACAAG
IL-10RA exon 5	F	CTAAAGGCCACCAGCTCTC
	R	ACGCGTTTTGGATTGCAC
IL-10RA exon 6	F	AATGGATTCATGGGACCAG
	R	ACTGGCTGGGAGGAAAAGAG
IL-10RA exon 7.1	F	CGAGCTCTCCTCCTGGG
	R	CCTCAGGTAACCCTGGAATG
IL-10RA exon 7.2	F	TGACAGTGGCATTGACTTAGTTC
	R	GTCCAGGCAGAGGAGCAG
IL-10RA exon 7.3	F	CCTGGGCAGCTTTAACTCAG
	R	AGGTTCCTCATGTGACCATC
IL-10RA exon 7.4	F	GCTGAAGTCAGCTCAGACCC
	R	CAGTGCCCAGTGGCTTATC
IL-10RA exon 7.5	F	TGGTCATAACTCAGCCCTTTG
	R	GTCATGGCTGGATTCCCTG
IL-10RA exon 7.6	F	AACAAAGGCAGTTCAGTCCAC
	R	AACCGAGTCCCTCCATGAGC
IL10RB exon 1	F	AGGGTAAAGAAGACCCTCAAA
	R	CCTAGTTGCGTCTCAGCAG
IL10RB exon 2	F	AGCCATAGAGGAGAACCAAGT
	R	ACCTAGAGATGACAGCAGTGG
IL10RB exon 3	F	TAAACACAGTTTCCACTCCCG
	R	AAGGCCATCCATTTGTGG
IL10RB exon 4	F	TCCGTGGACTAATTGTTCTGC
	R	AGTCCATAAGGTGCTGCCAC

IL10RB exon 5	F	CCCTGAACTGAGAGGAGCAC
	R	TGAATGAGCTGCCTCAGAAG
IL10RB exon 6	F	GGATTGTGATGGTTAAATGC
	R	CCCTTTACAAATAGCCTTCC
IL10RB exon 7.1	F	ATAGATTTTCCAGCCAGGAGT
	R	GCCCTGTTTCTCACAATTA
IL10RB exon 7.2	F	CACATCTAGAACTCCCAGACCC
	R	TCACTTTGTCACCCAGGC
IL10RB exon 7.3	F	GATGGCGCATGCCTATAATC
	R	TGGACATCAAGATGGCAAAC

Tablo II. İlk EBH tanısı sırasında olguların demografik özellikleri.

Özellikler	Değerler
Yaş	105.1±52.2 ay
Şikayet başlama yaşı	67.9±33.7 ay
Cinsiyet (K/E)	19/34
Ailede EBH olma oranı	%18.9
Akrabalık	%37.8
Crohn hastalığı / ülseratif kolit	18/35

K, kız; E, erkek; EBH, enflamatuvar bağırsak hastalığı.

Tablo III. IL-10 yolağında mutasyon saptanan hastaların özellikleri.

Olgu/Hastalık	Cinsiyet	Başlangıç yaşı/ay	Akrabalık	Ailede EBH	Fistül	Ağırlık Z skoru	Boy Z skoru
1/CH	E	6	2°	Var	Var	-3.1	-2.9
2/CH	E	26	3°	Yok	Var	-2.4	-2.6
3/CH	K	2	2°	Yok	Var	-1.9	-2.1
4/CH	K	2	3°	Yok	Var	-2.1	-2.4
5/CH	E	2	2°	Var	Var	-2.4	-1.8
6/CH	E	24	Yok	Yok	Var	-2.8	-3.5

K, kız; E, erkek; CH, Crohn hastalığı

Tablo IV. IL-10 mutasyonu olan ve olmayan hastaların yakınmalarının karşılaştırılması.

	Mutasyon var n=6	Mutasyon yok n=47	p
İshal (%)	89.4	100	0.401
Kanlı dışkılama (%)	100	70.2	0.119
Karın ağrısı (%)	66.7	63.8	0.891
Kilo alamama (%)	100	23.4	< 0.001

Tablo V. IL-10 mutasyonu olan ve olmayan hastaların Z skorlarının karşılaştırılması

Mutasyon var			Mutasyon yok		
Ağırlık Z-1	Ağırlık Z-2	p	Ağırlık Z-1	Ağırlık Z-2	p
-2.450	-1.583	0.528	-0.287	0.032	<0.001
Boy Z-1	Boy Z-2	p	Boy Z-1	Boy Z-2	p
-2.550	-1.500	0.249	-0.187	-0.019	0.008

Ağırlık Z-1; tanı anında yaşa göre ağırlık Z skoru, Ağırlık Z-2; tedavi sonrası yaşa göre ağırlık Z skoru, Boy Z-1; tanı anında yaşa göre boy Z skoru, Boy Z-2; tedavi sonrası yaşa göre boy Z skoru

Tablo VI. IL-10 mutasyonu olan ve olmayan hastaların laboratuvar bulgularının karşılaştırılması.

Mutasyon var			Mutasyon yok		
BK-1	BK-2	<i>p</i>	BK-1	BK-2	<i>p</i>
12391.67	9350.00	0.60	11446.38	8212.13	<0.001
HB-1	HB-2	<i>p</i>	HB-1	HB-2	<i>p</i>
9.933	9.750	0.917	10.638	11.551	<0.001
EÇH-1	EÇH-2	<i>p</i>	EÇH-1	EÇH-2	<i>p</i>
43.00	28.33	0.249	42.15	14.72	<0.001
CRP-1	CRP-2	<i>p</i>	CRP-1	CRP-2	<i>p</i>
5.017	1.882	0.345	2.254	0.199	<0.001

BK-1; tanı anında beyaz küre sayısı (sayı/mm³), BK-2; tedavi sonrası beyaz küre sayısı (sayı/mm³), HB-1; tanı anında hemoglobin düzeyi (g/dl), HB-2; tedavi sonrası hemoglobin düzeyi (g/dl), EÇH-1; tanı anında eritrosit çökme hızı (mm/saat), EÇH-2; tedavi sonrası eritrosit çökme hızı (mm/sa), CRP-1; tanı anında C-reaktif protein düzeyi [mg/dl (<0.5)], CRP-2; tedavi sonrası C-reaktif protein düzeyi [mg/dl (<0.5)]

Tablo VII. IL-10 mutasyonu olan ve olmayan hastaların pANCA ve ASCA karşılaştırması.

	Mutasyon var n=6	Mutasyon yok n=47	<i>p</i>
pANCA (+) (%)	33.3	46.8	0.532
ASCA (+) (%)	33.3	25.5	0.683

Tablo VIII. IL-10 mutasyonu olan ve olmayan hastaların tedavilerinin karşılaştırılması.

	Mutasyon var n=6	Mutasyon yok n=47	<i>p</i>
Steroid kullanımı (%)	100	89.4	0.01
Azatiyoprin kullanımı (%)	100	23.4	< 0.001
Anti-TNF antikor kullanımı (%)	50	6.4	0.001
Remisyona girme süresi (hafta)	15.67	4.11	< 0.001

Tablo IX. IL-10 mutasyonu olan ve olmayan hastaların izlem bulguları.

	Mutasyon var n=6	Mutasyon yok n=47
Ortalama izlem süresi (ay)	20.7±12.4	44.4±31.3
Remisyona girme süresi (hafta)	15.67	4.11
Kolektomili olgu sayısı (n)	2	3
Ölen hasta sayısı (n)	1	0

Z skorlarında düzelme gözlenmedi (sırasıyla $p=0.528$, $p=0.249$). İnterlökin-10 yolağında mutasyon saptanmayanlarda ise tedaviyle ağırlık ve boy Z skorlarında düzelme saptanmıştır (sırasıyla $p<0.001$, $p=0.008$) (Tablo V).

İnterlökin-10 yolağında mutasyon saptanan

olguların tedavi sonrasında beyaz küre, hemoglobin, ESH ve CRP değerlerinde düzelme olmadığı saptandı (sırasıyla $p=0.600$, $p=0.917$, $p=0.249$, $p=0.345$). Diğer yandan IL-10 yolağında mutasyon saptanmayanlarda tedaviyle bu değerlerde düzelme olduğu görüldü

(tümünde $p < 0.001$) (Tablo VI).

İnterlökin-10 mutasyonu olan ve olmayan olguların pANCA ve ASCA pozitiflikleri karşılaştırıldığında arada anlamlı bir fark bulunamadı (Tablo VII).

İnterlökin-10 yolağında mutasyon saptadığımız altı olgumuzun tamamında ince bağırsak tutulumu varken IL-10 mutasyonu olmayan olguların sadece %19'unda tutulum saptanmıştı ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.001$).

İnterlökin-10 yolağında mutasyon saptanan olguların tedavisinde azatiyoprin ve anti-TNF antikor tedavilerinin saptanmayanlara göre daha fazla kullanıldığı gözlemlendi (Tablo VIII). Hem azatiyoprin, hem anti-TNF antikoru daha yüksek oranlarda kullanılmasına rağmen IL-10 mutasyonu olan grupta remisyona girme süresi ortalaması 15.7 hafta idi. Ancak IL-10 mutasyonu olmayanlarda bu ortalama 4.1 hafta olarak saptanmıştır ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.001$).

İnterlökin-10 mutasyonu saptadığımız olguların ortalama izlem süresi 20.7 ± 12.4 ay iken, IL-10 mutasyonu saptamadığımız olgularda bu süre 44.4 ± 31.3 ay idi. Tüm olguların izlem bulguları Tablo IX'da sunulmuştur.

Tartışma

Enflamatuvar bağırsak hastalığı olanların birinci dereceden akrabalarında CH gelişme riski %5, ülseratif kolit gelişme riski ise %1.6 oranında artmaktadır.¹⁵ Anne ve babanın her ikisinin de EBH olması durumunda çocukta EBH gelişme riski %30'dan fazladır.¹⁶ Çalışmamızdaki olguların %18.9'unun birinci, ikinci veya üçüncü derece akrabalarında EBH olduğunu gözleyerek ailede EBH olması durumunda çocukta da bu riskin arttığını saptadık.

Erken yaşta başlayan EBH etiyolojisinde genetik bozukluklar çevresel etmenlerden daha çok yer tutmaktadır. Enflamatuvar bağırsak hastalığına neden olan genetik bozuklukların birçoğunun otozomal çekinik olarak kalıtıldığı düşünülmektedir.⁶ Çalışmamızda da tüm olguların %37.8'inin anne babaları arasında birinci, ikinci veya üçüncü dereceden akrabalık olduğunu tespit ettik ve bunun otozomal çekinik kalıtımla uyumlu olabileceğini düşündük.

Çalışmamızdaki 53 EBH tanılı olgudan altısının (%11.3) IL-10 yolunda mutasyon saptadık.

Glocker ve arkadaşlarının⁶ çalışmasında dokuz EBH'li olgudan erken başlangıçlı olan üçünde IL-10RA ve IL10RB genlerinde mutasyon saptanmıştır. Aynı çalışmada 32 çocukluk ve 90 erişkin yaşta başlayan EBH'li olgunun, genetik incelemesi GWAS çalışması ile yapılmıştır ve hiçbirisinde IL-10 ve/veya IL-10 almaç genlerinde mutasyon saptanmamıştır. Diğer bir çalışmada tümü erken başlangıçlı olan 66 olgunun genetik incelemesi yapılmış ve 16'sında IL-10 yolağında mutasyon saptanmıştır.¹⁷ Çalışmamızda olduğu gibi EBH tanılı olguların hastalık başlangıç yaşlarına göre gruplandırması yapılmadan tümünde genetik inceleme yapıldığında saptanan bu oran (%11.3) oldukça yüksek olarak gözükmektedir. Bunun nedeninin, ülkemizde akraba evliliği fazla olduğundan otozomal çekinik kalıtmı hastalıkların çok gözükmesi olduğunu düşünmekteyiz.

Yapılan birçok çalışma EBH'nin nedeni olarak IL-10 yolağında mutasyon saptanması durumunda hastalığın genelde erken başladığını göstermektedir ve bu da çalışmamızda saptadığımız bulguyla uyumludur.^{6,17}

Hastalarımız hem klinik gidiş, hem anatomik ve histopatolojik tutulum, hem de tedaviye yanıt açısından CH'ye yakındı. Engelhardt ve arkadaşları¹⁸ çalışmasında da bu duruma özellikle dikkat çekilmiş ve aynı çalışmada IL-10 mutasyonu saptanan yedi olgunun tamamında ince bağırsak tutulumunun olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızdaki IL-10 mutasyonu olan altı olguda da ince bağırsak tutulumu mevcut olup, bu bulguyla uyumluydu.

İnterlökin-10 mutasyonu saptanan olgularda hastalığın daha erken yaşta başladığı ve daha ağır gittiği göz önünde tutulursa, çalışmamızda da saptadığımız gibi bu olgularda büyüme geriliğinin daha fazla oluşu anlamlı görülmektedir.

Hastalarımızın başvurudaki fizik muayene bulgularında perianal hastalık (fissür, fistül ve apse), yaşa göre ağırlık ve boy Z skorlarının geriliği mutasyon saptanan olgularda daha sık gözlenmekteydi. Çalışmamızda saptadığımız bu bulgu diğer birçok çalışmada saptananlarla uyumludur.^{6,17,18}

İnterlökin-10 mutasyonu olan olgularda hem remisyona sağlamanın zorluğu hem de resmisyonda olma sürelerinin kısalığı nedeniyle tedaviye rağmen ağırlık ve boy

değerlerinde yeterli düzelme sağlanamazken, IL-10 mutasyonu olmayanlarda tedaviyle düzelmenin sağlanabilmesi daha olasıdır.¹⁹ Biz de çalışmamızda IL-10 (+) ve IL-10 (-) olgularımızda tedavi sonrası bu farkı tespit ettik.

Tilg ve arkadaşları²⁰ çalışmasında IL-10 yolağı bozuk çocuklarda hemoglobin üretiminin azaldığı gösterilip bunun da tedaviyle düzeltilmediği saptanmıştır. Çalışmamızda mutasyonu olan olgularda aneminin varlığı ve tedaviyle düzelmemesi bu çalışmayı desteklemektedir.

Enflamatuvar bağırsak hastalığının aktif döneminde ESH ve CRP düzeylerinin arttığı hemoglobin ve albümin düzeylerinin de düştüğü saptanabilmektedir. Ancak bazı EBH'li hastalarda ESH, CRP ve hemoglobin düzeyleri normal bulunabilmektedir.²¹ Çalışmamızda IL-10 mutasyonu olmayanlarda tedaviyle ESH ve CRP değerlerinde gerileme saptanmışken IL-10 mutasyonu olanlarda hem ESH'de hem de CRP'de düzelme saptamadık.

İnterlökin-10 mutasyonu saptanan olgularda hastalığın gidişinin daha şiddetli olduğu göz önünde tutulursa, çalışmamızda saptadığımız bu grupta azatiyoprin ve anti-TNF antikor kullanma oranlarının yüksekliğini ve remisyona girme sürelerinin uzunluğunu daha iyi anlamlandırabilmekteyiz.

Steroidler IL-1, IL-6 gibi enflamasyon öncüsü sitokinlerin ve prostaglandinlerin sentezini azaltarak enflamasyon baskılayıcı etkilerini göstermektedirler.²² Bu nedenle IL-10 yolağında bozukluk olduğunda steroidlerin hastalığın tedavisindeki etkinliği azalmaktadır. Çalışmamızdaki altı olguya da başlangıçta remisyonu sağlamak için sadece steroid uygulandığında başarısız olduğu görülmektedir. Bu bağlamda bu altı hastada ek olarak azatiyoprin de kullanılmıştır. Azatiyoprin bir imidazol türevidir. In vivo ortamda hızla 6-merkaptopürin (6-MP) ve metilnitroimidazole parçalanır. 6-merkaptopürin, hücre zarlarını geçip hücre içinde aktif nükleotit olan tiyoinozinik asit içeren pürin analoglarına dönüşür. Doğrudan doğruya verildiğinde ya da in vivo azatiyoprinden türediğinde 6-MP, esas olarak, inaktif oksitlenmiş metabolit tiyöürik asit olarak uzaklaştırılmaktadır. Bu oksidasyon, allopurinol tarafından engellenen bir enzim olan ksantin oksidaz tarafından sağlanır. Etki mekanizmaları henüz tam olarak açıklığa kavuşturulmamış

olmakla birlikte, önerilen bazı mekanizmalar, pürin antimetaboliti işlevini gören 6-MP'nin açığa çıkarılması; nükleik asit biyosentezinde pek çok yolun inhibe edilmesi ve böylece, immün yanıtın verilmesi ve şiddetlenmesi ile ilgili hücrelerin çoğalmasının önlenmesi; pürin tiyoanalogların dahil edilmesi ile DNA'nın zarar görmesidir. Tüm bu mekanizmalar göz önünde tutulduğunda zaten mutasyon sonucu genetik yolda işlevselliğin bozulduğu IL-10 mutasyonlu olgularda azatiyoprinin de tedavide çok etkili olması beklenmemektedir.²³ Bizim de steroid tedavisine yanıt alamadığımız IL-10 mutasyonlu altı olguda tedaviye azatiyoprin eklenmesine rağmen yeterli yanıt sağlanamamıştır. Bunun üzerine bu olgulardan üçüne anti-TNF antikor tedavisi başlanmıştır. İnterlökin-10, özellikle TNF- α ve IL-12 gibi enflamasyon öncülerinin salgılanmasını baskılamaktadır.¹¹ Bu nedenle IL-10 mutasyonu saptanan olgularda anti-TNF antikor tedavisi ile TNF- α 'yı engellemek mantıklı gibi görünmektedir. Çalışmamızda anti-TNF antikor tedavisi uygulanan üç olgudan ikisinde tedaviyle büyüme geriliğinde, yakınmalarda, klinik bulgularda ve laboratuvar tetkiklerinde öncesine göre bir miktar düzelme sağlanabilmiştir. Bir olguda ise anti-TNF tedavi başlanmasının ardından ilk dokuz ayda klinik olarak düzelme başlamıştı, ancak hastada daha sonra makrofaj aktivasyonu sendromu gelişti ve ardından hasta kaybedildi. İnterlökin-10 mutasyonu olan diğer üç olguda ise aile onamı olmadığı için anti-TNF antikor tedavisi başlanamamıştır.

Azatiyoprin ve anti-TNF antikorun birlikte kullanıldığı tedavi modelleri, konvansiyonel tedavilere yanıt vermeyen EBH formları için bir seçenek gibi gözükmektedir. Diğer yandan uzamış immünsüpresif ve/veya biyolojik ajanlarla tedavi lenfatik ve kolon dışı kanserlerin oluşum riskini arttırmaktadır.²⁴ Bu nedenle tedaviye dirençli EBH'li olguların yönetiminde oldukça dikkatli olunması gerekmektedir. Biz IL-10 mutasyonu olan olguların %50'sinde (üç olgu), mutasyonu olmayanların ise %6.4'ünde (üç olgu) hem anti-TNF hem de azatiyoprini tedavisini aynı anda kullanmak zorunda kalmıştık. Bu altı olgunun her iki ilacı kullanırkenki ortalama izlem süresi 10.8 ay idi. Bu süre içerisinde hiç bir olgumuzda kanser oluşumu gözlenmedi. Bu anlamda ileriye dönük izlemleri hâlâ sürmektedir.

Sonuç olarak; ülkemizde akraba evliliği sık olduğundan özellikle IL-10 yolağındaki mutasyonların da kalıtıldığı gibi otozomal çekinik geçişli hastalıklar daha sık gözlenebilmektedir. Çalışmamızın toplumumuzda ilk kez yapılması nedeniyle bu sıklığın belirlenmesine ışık tutabileceğini düşünmekteyiz. İnterlökin-10 mutasyonu saptanan olgularda hastalığın gidişinin ve başvuru yakınmalarının şiddetli olacağını, büyüme geriliğinin daha fazla saptanacağını, tedaviye rağmen düzelme gözlenemeyebileceğini belirlemek bu olguların yönetiminde doktora oldukça fazla fayda sağlayabilmektedir. Özellikle anne-baba arasında akrabalık olduğunda, erken başlangıçlı hastalıkta, perianal hastalığın eşlik ettiği durumlarda IL-10 mutasyonu olasılığının akıldan çıkartılmaması gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Ehlin AG, Montgomery SM, Ekblom A, Pounder RE, Wakefield AJ. Prevalence of gastrointestinal disease in two British national birth cohorts. *Gut* 2003; 52: 1117-1121.
- Baldassano RN, Piccoli DA. Inflammatory bowel disease in pediatric and adolescent patients. *Gastroenterol Clin North Am* 1999; 28: 445-458.
- Imielinski M, Baldassano RN, Griffiths A, et al. Common variants at five new loci associated with early-onset inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 2009; 41: 1335-1340.
- Lakatos PL. Environmental factors affecting inflammatory bowel disease: have we made progress? *Dig Dis* 2009; 27: 215-225.
- Mizoguchi A, Mizoguchi E. Inflammatory bowel disease, past, present and future: lessons from animal models. *J Gastroenterol* 2008; 43: 1-17.
- Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, et al. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med* 2009; 361: 2033-2045.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 683-765.
- Vernier-Massouille G, Balde M, Salleron J, et al. Natural history of pediatric Crohn's disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 2008; 135: 1106-1113.
- Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989; 170: 2081-2095.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, et al. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 1991; 146: 3444-3451.
- Pestka S, Krause CD, Sarkar D, et al. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 929-979.
- Commins S, Steinke JW, Borish L. The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 1108-1111.
- Finbloom DS, Winestock KD. IL-10 induces tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. *J Immunol* 1995; 155: 1079-1090.
- Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993; 75: 263-274.
- IBD Working Group of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. Inflammatory bowel disease in children and adolescents: recommendations for diagnosis--the Porto criteria. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 41: 1-7.
- Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, et al. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3668-3672.
- Kotlarz D, Beier R, Murugan D, et al. Loss of interleukin-10 signaling and infantile inflammatory bowel disease: implications for diagnosis and therapy. *Gastroenterology* 2012; 143: 347-355.
- Engelhardt KR, Shah N, Faizura-Yeop I, et al. Clinical outcome in IL-10- and IL-10 receptor-deficient patients with or without hematopoietic stem cell transplantation. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131: 825-830.
- Glocker EO, Kotlarz D, Klein C, Shah N, Grimbacher B. IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1246: 102-107.
- Tilg H, Ulmer H, Kaser A, Weiss G. Role of IL-10 for induction of anemia during inflammation. *J Immunol* 2002; 169: 2204-2209.
- Cabrera-Abreu JC, Davies P, Matek Z, Murphy MS. Performance of blood tests in diagnosis of inflammatory bowel disease in a specialist clinic. *Arch Dis Child* 2004; 89: 69-71.
- Ford AC, Bernstein CN, Khan KJ, et al. Glucocorticosteroid therapy in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 590-599.
- Timmer A, McDonald JW, Tsoulis DJ, Macdonald JK. Azathioprine and 6-mercaptopurine for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 9: CD000478.
- Toader E, Ciortescu I. Is there a risk for lymphoma or extracolonic cancer in patients with inflammatory bowel disease? *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2013; 117: 368-374.