



T.C.

GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

ÇÖLYAK HASTALARINDA

GSH-Px (GLUTATYON PEROKSİDAZ) VE SOD (SUPEROKSİD

DİSMUTAZ) ENZİM POLİMORFİZMİ

Dr. Muzaffer KATAR

UZMANLIK TEZİ

TOKAT

2009

T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ÇÖLYAK HASTALARINDA GSH-PX (GLUTATYON
PEROXİDAZ) VE SOD (SÜPEROXİD DİSMUTAZ) ENZİM
POLİMORFİZMİ**

Dr. Muzaffer KATAR

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. A. Fikret ÖZUĞURLU

TOKAT

2009

TEŞEKKÜR

Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında dört yıllık ihtisas eğitimim süresince hem bilimsel hem de tez çalışmalarım esnasında bilgi, tecrübe ve her türlü desteğini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. A. Fikret ÖZUĞURLU'ya bilgi ve tecrübeleriyle yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalımızın değerli öğretim üyeleri, Sayın Doç. Dr. Hüseyin ÖZYURT ve Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Şemsettin ŞAHİN'e,

Tez çalışmamın İstatistik değerlendirmesini yapan Halk Sağlığı Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Mücahit EĞRİ' ye, projemize klinik yorumlarıyla katkılarından dolayı Dahilye Anabilim Dalı Öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Faruk KUTLUTÜRK'e ve Çocuk Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyeleri Sayın Yrd. Doç. Resul YILMAZ ve Yrd. Doç. Mustafa ÖZÇETİN'e,

Tez hazırlığının laboratuvar çalışmaları aşamasındaki katkılarından Biyolog İsmail BENLİ'ye, Kimyager Leyla AYDOĞAN'a,

Onam formlarının toplanmasındaki katkılarından dolayı bölüm sekreterimiz Meral KIRMIZI' ya ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm Biyokimya Anabilim Dalı çalışanlarına,

Tez çalışmam süresince desteğini esirgemeyen eşime, oğluma ve tüm aileme,

Teşekkür Ederim.

ÖZET

ÇÖLYAK HASTALARINDA GLUTATYON PEROKSİDAZ (GSH-Px) VE SÜPEROKSİD DİSMUTAZ (SOD) ENZİM POLİMORFİZMİ

Çölyak hastalığı (ÇH) (Gluten Sensitif Enteropati); arpa, buğday, yulaf ve çavdar gibi hububat ürünlerinde bulunan gluten'in gliadin fraksiyonuna karşı oluşan, mukozal inflamatuvar hasar tarafından tetiklenen, malabsorbsiyon ile karakterize multifaktoriyel inflamatuvar bir ince barsak hastalığıdır. Hem genetik hem de çevresel faktörlerin etkilediği çölyak hastalığında ishal, kusma, karın ağrısı, kilo kaybı, genel güçsüzlük, kas erimesi, iştah azalması, kötü kokulu, gri renkli ve yağlı dışkı, büyüme ve gelişme geriliği, anemi ve vitamin eksiklikleri sıklıkla görülen klinik semptomlardır. Çölyak hastalığının patogenezi araştırılmaya yönelik çalışmalarda oksidatif stresin önemli olduğu gözlenmiştir. Bu sebeple ÇH patofizyolojisini aydınlatmak amacı ile moleküler düzeyde SOD ve GSH-Px enzimlerinin gen polimorfizmlerinin incelenmesinin yararlı olacağı düşünülerek bu çalışmamız planlanmıştır.

Çalışmamızda çölyak mutasyonu (DQA1*0501, DQB1*0201 ve DRB1*04) olan 117 hastanın 96'sında (%83,75) SOD enzim polimorfizmi saptanırken 68'inde (%58,12) GSH-Px enzim polimorfizmi tesbit edildi. Çölyak mutasyonu bulunmayan 148 kişilik kontrol grubundakilerin 116'sında (%78,38) SOD enzim polimorfizmi ve 89'unda (% 60,14) GSH-Px enzim polimorfizmi tesbit edildi.

Bu çalışmamız, ÇH'nda SOD ve GSH-Px enzim polimorfizminin istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde olmasa dahi var olduğunu, farklı düzeylerde etkilendiklerini, yine enzim aktivitelerindekine benzer şekilde SOD enzim polimorfizminin GSH-Px enzim polimorfizminden daha sık görüldüğünü desteklemektedir.

Anahtar kelimeler: Çölyak Hastalığı , SOD, GSH-Px, polimorfizm, RT-qPCR

Bu proje 2009/2 no ile Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

EVALUATION OF GLUTATHIONE PEROXIDASE (GSH-Px) AND SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD) ENZYMES POLYMORPHISM IN CD (CELIAC DISEASE) PATIENTS (*)

Celiac disease (CD) (Gluten sensitive enteropathy) is a multifactorial inflammatory small bowel disease characterized by malabsorption triggered by mucosal inflammatory damage formed against gliadin fraction of gluten found in cereals like wheat, barley, rye, and oat. In the CD which is affected by both genetic and environmental factors; diarrhoea, vomiting, abdominal pain, weight loss, general weakness, muscle wasting, loss of appetite, bad smelling and gray in color stool, growth and development retardation, anemia, and vitamin deficiencies are frequently seen symptoms. In the studies aimed to investigate the pathogenesis of the CD, it has been seen that oxidative stress is important. In order to illuminate the pathophysiology of CD; our study has been planned by thinking that studying gene polymorphisms of SOD and GSH-Px enzymes at molecular levels might be helpful.

In our study; out of 117 patients who have CD mutations (DQA1*0501, DQB1*0201 ve DRB1*04); in 96 (83,75%) we have detected SOD enzyme polymorphism and in 68 (58,12%) have detected GSH-Px polymorphism. Out of 148 patients who have not CD mutations; in 116 patients (78,38%) we have detected SOD enzyme polymorphism and in 89 (60,14%) we have detected GSH-Px enzyme polymorphism.

Our study supports that in CD; even though SOD and GSH-Px polymorphisms are not present statistically at meaningful levels in fact they are present. Our study supports that similar to enzyme activities of SOD and GSH-Px, SOD enzyme polymorphism is more frequently seen than that of GSH-Px.

Key words: CD, SOD, GSH-Px, polymorphisms, RT-qPCR

(*) This Project has been supported by Gaziosmanpasa University, Scientific Research Projects Committee.(2009/2)

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİLLER.....	xi
TABLolar.....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Çölyak hastalığının Tanımı.....	3
2.2. Tarihçesi.....	3
2.3. Epidemiyolojisi.....	3
2.4. Genetik.....	5
2.4.1. HLA moleküllerinin yapısı ve fonksiyonu.....	8
2.4.2. HLA polimorfizmi.....	10
2.4.3. HLA ve ÇH.....	10
2.4.4. Yeni ÇH genleri.....	12
2.5.Etiyopatogenez.....	13
2.6.Klinik Bulgular.....	16
2.7. Tanı ve Tedavi.....	19
2.7.1. Tanıda seroloji.....	19
2.7.2. İnce Barsak Biyopsisi.....	20
2.7.3. Tedavi.....	22
2.8. Genetik çeşitlilik ve fenotip analizi.....	25

2.9. Serbest Radikaller.....	26
2.9.1.Serbest Radikallerin Tanım ve Tarihçesi.....	26
2.9.2.Serbest Radikallerin Üretilmesi.....	26
2.9.3. Moleküler Toksikolojiye Karşı Antioksidanlar.....	28
2.9.4. Serbest oksijen radikallerinin kaynakları.....	33
2.9.5. Serbest Radikallerin Etkileri.....	35
2.10. Antioksidan enzimler.....	38
2.10.1. İnsan Antioksidan Genleri, Özellikleri ve Polimorfizmler.....	38
2.11. Çölyak hastalığı ve Antioksidan Sistem.....	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	41
3.1.DNA İzolasyonu.....	41
3.2. GSH-Px Enzimine Ait primer ve Prob Tasarımı.....	42
3.3. SOD Enzimine Ait Primer ve Prob Tasarımı.....	42
3.4 Araştırma Verilerinin Analizi.....	45
4. BULGULAR.....	45
5. TARTIŞMA.....	58
6. SONUÇ.....	67
7. KAYNAKLAR.....	68

KISALTMALAR

ÇH	: Çölyak Hastalığı
CD	: Celiac Disease
HLA	: Human Leukocyte Antigen
MHC	: Major Histocompatibility Complex
TBARS	: Thiobarbituric Acid-Reactive Substance
TG 2	: Transglutaminaz 2
GTPaz	: Guanin Tri Phosphatase
SPINK	: Kazal Tip Serin Proteaz İnhibitörü
IMGT	: ImMunoGeneTics
CCR 3	: CC Chemokine Receptor 3
TH 1	: T Helper 1
NK	: Naturel Killer
kb	: Kilobase
RGS 1	: Regulator of G-protein Signalling 1
TAGAP	: T-cell Activation Rho GTPase Activating Protein
LPP	: Lipoma Preferred Partner
IL12A	: Interleukin 12 Alpha
IL18RAP	: Interleukin 18 Receptor Accessory Protein
tTG	: tissue Trans Glutaminase
Gt	: toxic Gliadin
IFN	: İnterferon
TNF- α	: Tümör nekrozis faktör- α
IL	: Interlökin
TGF	: Transforming büyüme faktörü
APC	:Antigen Presenting Cell
Sec	:Selenosistein
MYO9B	: Myosin 9 B
SLE	: Sistemik Lupus Eritematoz
DH	: Dermatitis Herpetiformis
GI	: Gastro-İntestinal
Ig A	: Immun globulin A

SNP	: Single Nucleotide Polymorphisms
SOR	: Süper oksid radikali
ROS	: Reaktif oksijen türleri
O ₂ •	: Süperoksit radikali
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HO•	: Hidroksil radikali
LOO•	: Peroksil radikali
LOOH	: Lipid hidroperoksitin
MDA	: Malondialdehit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
mRNA	: Messenger Ribo Nükleik Asid
GSH	: Glutasyon
SOD	: Süperoksit dismutaz
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSSG-R	: Glutasyon redüktaz
CAT	: Katalaz
NOS	: Nitrik oksid sintaz
HO-1	: Hem oksijenaz 1
EPO	: Eozinofil peroksidaz
BHA	: Butyl Hidroksianizol
BHT	: Butyl Hidroksitoluen
t-BHQ	: t-Butyl Hidrokinon
MDA	: Malondialdehyde
FALS	: Familial Amiyotrofik Lateral Skleroz
¹ O ₂	: Singlet oksijen
GTT	: Valin
GCT	: Alanin
MTS	: Mitokondri Hedef Sekansı
EDTA	: Etilendiamin tetraasetikasit
NO	: Nitrik oksit
PCR	: Polymerase Chain Reaction
RT	: Reverse Transcription

μL	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
RT-PCR	: Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SPSS	: Statistical Packages for the Social Sciences
mg/dl	: Miligram/desilitre
sn	: Saniye

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
1. ÇH'nın tahmini prevalansı	5
2. HLA'lar insan MHC bölgesinde ki genlerin ürünüdür	7
3. HLA heterodimerlerinin yapısı	9
4. ÇH patogeneğinde antikorların yer alması	14
5. Dermatit Herpetiform	18
6. ÇH'na sahip olan ve olmayan hastaların endoskopik ve muayene bulguları	21
7. ÇH olma ihtimali olan hastalara yaklaşım algolaritması	25
8. Çölyak hastaları ile kontrol grubunda SOD polimorfizminin dağılımının grafiği	47
9. SOD polimorfizminin sık görülen çölyak mutasyonlarına göre dağılımı grafiği	49
10. SOD için erime eğrileri	50
11. SOD için erime pikleri	51
12. Çölyak hastaları ile kontrol grubunda GSH-Px polimorfizminin dağılımının grafiği	53
13. GSH-Px polimorfizminin sık görülen çölyak mutasyonlarına göre dağılımı grafiği	55
14. GSH-Px için erime eğrileri	56
15. GSH-Px için erime pikleri	57

TABLÖLAR

Tablo	Sayfa
1. Çölyak hasta grubu ile kontrol grubunda SOD polimorfizminin dağılımı	46
2. SOD polimorfizminin ÇH mutasyonlarına göre dağılımı	48
3. Çölyak hasta grubu ile kontrol grubunda GSH-Px polimorfizminin Dağılımı	52
4. GSH-Px polimorfizminin ÇH mutasyonlarına göre dağılımı	54

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Çölyak hastalığı (ÇH) (Gluten Sensitif Enteropati); arpa, buğday, yulaf ve çavdar gibi hububat ürünlerinde bulunan gluten'in gliadin fraksiyonuna karşı oluşan mukozal inflamatuvar hasar tarafından tetiklenen malabsorbsiyon ile karakterize multifaktoriyel inflamatuvar bir ince barsak hastalığıdır (1, 2). Hem genetik hem de çevresel faktörlerin etkilediği çölyak hastalığında ishal, kusma, karın ağrısı, kilo kaybı, genel güçsüzlük, kas erimesi, iştah azalması, kötü kokulu, gri renkli ve yağlı dışkı, büyüme ve gelişme geriliği, anemi ve vitamin eksiklikleri sıklıkla görülen klinik semptomlardır (2).

Hastalığın etyolojisini incelemeye yönelik çalışmalarda, vakaların çoğunda MHC (Major Histocompatibility Complex) bölgesinin 6p21,3 kromozomunda yerleşmiş olan HLA (Human Leukocyte Antigen) genlerinin varyantları olan HLA-DQA1*0501 ve DQB1*0201 allellerini taşıyanlarda çölyak hastalığı riskinin artmış olduğu gözlenmiştir. Daha az sayıda hastada ise DQA1*03-DQB1*0302 heterodimeri ya da tek başına DQA*05 veya DQB1*02 varlığı saptanmıştır (3).

Serbest radikaller; bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküller olup bu ortaklanmamış elektronları nedeniyle oldukça reaktif yapılar olup süperoksit anyonu (O_2^{\bullet}), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikallerinden (OH^{\bullet}) oluşmaktadırlar (4, 5). Serbest radikallerin aşırı miktarlarda üretimine neden olan durumlar, hücrede oksidan/antioksidan dengesinin bozulmasına, detoksifiye edilemeyen radikallerin hücrede değişik yapıları oksidasyona uğratmasına ve birçok hastalığın oluşumuna neden olmaktadır (6). Oksidatif hasara neden olan serbest radikallerin artışına bağlı olarak, gelişen hasarı önlemeye yönelik birçok savunma sistemleri devreye girer. Kısaca antioksidanlar olarak da adlandırılan bu savunma sisteminde süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) önemli antioksidan enzimler arasında ilk sıralarda yer almaktadırlar (7).

Çölyak hastalığının patogenezi araştırmaya yönelik çalışmalarda oksidatif stresin çok önemli olduğu rapor edilmiştir (8, 9). Oksidatif stres belirteçlerinden TBARS (thiobarbituric asid-reactive substance) ile karbonil grupları araştırılmış ve çölyak hastalarında redoks dengesinin bozulduğu, bunun da protein ve lipidlerde ciddi hasarlara neden olduğu saptanmıştır (9). Yine bu çalışmalarda, çölyak

hastalığında bir antioksidan enzim olan SOD aktivitesinde önemli derecede artış gözlenirken, bir diğer bir antioksidan enzim olan GSH-Px aktivitesinde ise çok anlamlı düzeylerde azalmalar olduğu tespit edilmiştir (10).

İnsan genom çalışmalarında kaydedilen ilerlemeler sayesinde oksidatif stresin pek çok genetik hastalığın gelişiminde önemli bir etken olduğu bilinmektedir. Yaptığımız literatür araştırmalarında; antioksidan enzimlerle, çölyak hastalığı arasındaki ilişkiyi açıklamaya yönelik pek çok yayın olmasına rağmen, genetik yatkınlığa dayanan bu hastalığın etyolojisini tanımlamak adına çölyak hastalığında GSH-Px ve SOD polimorfizmini incelemeye yönelik herhangi bir yayına rastlanmamıştır.

Bu verilerden yola çıkılarak çölyak hastalığında gözlenen artmış oksidatif strese cevap olarak değişen GSH-Px ve SOD aktivitesinin bir gen polimorfizminden kaynaklanıp kaynaklanmadığının incelenmesinin bu hastalığın etyolojisinin tam olarak belirlenmesine ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yardımcı olacağını düşünmekteyiz.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Tanım

Çölyak hastalığı (ÇH) (Gluten Sensitif Enteropati); arpa, buğday, yulaf ve çavdar gibi hububat ürünlerinde bulunan gluten'in gliadin fraksiyonuna karşı oluşan mukozal inflamatuvar hasar tarafından tetiklenen malabsorbsiyon ile karakterize multifaktoriyel inflamatuvar bir ince barsak hastalığıdır (1, 2).

2.2 Tarihçe

Çölyak hastalığı ile uyumlu semptomların bilinen en erken tarifi Yunanlı Doktor Aretaeus (11) tarafından ikinci yüzyılda yapılmıştır. 19.yüzyılda (1887) Samuel Gee ve diğer doktorlar (11,12) hastalığın semptomlarını ve karakteristik özelliklerini tanımlamış ve tedavi hakkında çeşitli fikirler önermişlerdir. Çölyak hastalığı ayrıca 'gluten intoleransı', 'gluten sensitif enteropati', 'nontropical sprue', 'çölyak sprue' isimleri ile de bilinmektedir. "Sprue", Hollandaca bir kelimedir ve güçten düşme, zayıflama anlamındadır (13). 1953'de hastalığın etkeni olan buğday, arpa, çavdar gibi tahılların diyetten çıkarılmasının önemli olduğunu ilk fark eden Hollandalı bir çocuk doktoru olan William Karel Dicke olmuştur. 1954'de John W.Paulley (11,12) ise barsaktaki hastalıkla ilişkili histo-patolojik değişiklikleri, geniş düz villuslar ve ince barsak mukozasında yoğun, kronik lenfoepitelyal hücre infiltrasyonu olarak tanımlamıştır. Mukozal hasarın derecelendirilmesi ilk kez Marsh tarafından yapılmıştır. Marsh (11,12), çölyak hastalığının patolojik spektrumunu gösterip, barsak mukozasında glutene bir cevap olarak gelişen anormalliklerin derecelendirilmesini yapmıştır. Hastalığın belirli HLA işaretleri ve glutene özel T hücreleri ile ilişkisinin keşfi ve yine transglutaminaz 2 (TG2)'nin anti-endomisyal antikorların hedef otoantijeni olduğunun fark edilmesi 1980-1990 yılları arasında gerçekleşmiştir (11).

2.3 Epidemiyoloji

Çölyak hastalığının gerçek prevalansı, bu hastalığa yatkınlığı olan toplumlarda önceden tahmin edildiğinden çok daha yüksektir. Bunun sebebi, geniş serolojik taramalar yapılamadığı sürece birçok vakaya tanı konulamamasıdır (14). Çölyak hastalığının prevalansı hakkında bilgilerin çoğuna, hastalığın dünyanın diğer

bölgelerine göre daha fazla görüldüğü düşünülen Avrupa ülkelerinden ulaşılmaktadır. Son zamanlarda bazı yazarlar Asya, Orta Doğu, Kuzey Afrika ve Güney Amerika üzerine yeni bilgiler yayınlamaya başlamışlardır (12). Önceleri Birleşik Devletlerde Çölyak hastalığının prevalansı 2000 veya 3000'de bir olarak tahmin edilmekteydi. Ancak hastalığın ortaya çıkış semptomlarının çeşitliliğinin anlaşılması ve doğru serolojik testlerin tanıya yardımcı olabileceğinin farkına varılması, hastalık prevalansının tahmin edilebilirliğini 10 kattan daha fazla arttırmıştır (13). Briani ve ark. (11) hastalığın herhangi bir yaşta görülebileceğini, diğer otoimmün hastalıklarla birlikte olabileceğini ve kadınlarda erkeklerden yaklaşık 3 kat daha sıklıkla bulunabileceğini rapor etmiştir. Son zamanlarda yapılan bir büyük epidemiyolojik çalışmada; asemptomatik kişilerin 133, gastrointestinal semptomları olanların 56, ikinci-derece yakınlarında hastalık olanların 39 ve yine birinci derece yakınlarında hastalık olanların 22'de birinde çölyak hastalığının görüldüğü saptanmıştır (13). Bu hastalık bir zamanlar pediatrik popülasyonun nadir görülen bir hastalığı olarak düşünülürken, günümüzde Birleşik Devletler'de ve dünyanın diğer birçok bölgesinde yaklaşık her 100 kişiden birinde hastalığın bulunduğu ifade edilmektedir (11). Monozigot ikizler arasında %70-75 ve birinci derece akrabalar arasında %5-22 uyum oranı gösterilmiştir (15). Epidemiyolojik çalışmalarda hastalığın, nüfusunu çoğunlukla Avrupa kökenli göçmen toplulukların oluşturduğu Güney Amerika ülkelerinde görüldüğü çok önceden gösterilmiştir(16, 17). Her ne kadar Afrika'nın pek çok bölgesinde ÇH'nin sıklığı bilinmese de, hastalığın dünyadaki en yüksek prevalansı (%5.6), Arap-Berberi kökenli olup, batı Sahara'da yaşayan Saharawilerde tanımlanmıştır (18). Bunun sebebi Saharawi toplumunda kan bağı akrabalığı olanlar arasında evliliklerin çok yaygın oluşu ve yine HLA-DQ2 ve DQ8'in çok sık görülmesi olabilir. Gluten tüketimi de bu toplulukta oldukça yüksek seviyededir(19).

ÇH Mısır'lı çocuklarda da sık görülen ve genellikle tanı konamayan bir bozukluktur (20). ÇH için son zamanlarda Tunus'ta 6284 çocukta yapılan büyük bir taramada, hastalığın prevalansı 1/157 olarak bulunmuştur (21). ÇH ayrıca Ortadoğu'da da sık görülen bir bozukluktur (22). İran, Irak, Suudi Arabistan ve Kuveyt'de yapılan çalışmalarda saptanan kronik ishal vakalarının, yetişkinlerde %20 ve çocuklarda da %18.5'inden ÇH'nin sorumlu olduğu bulunmuştur. Ürdün'den bir

çalışmaya göre de ÇH'nın yüksek sıklıkla görülme oranının, toplumun çok miktarda buğday tüketmesiyle yakın ilişkili olduğu ifade edilmiştir (135kg/kişi/yıl) (23). Hindistan'da ÇH'nın ortalama prevalansı tam olarak bilinmemesine rağmen, buğdayın ana besin kaynağı olduğu bu ülkenin kuzey bölgesinde hastalık sayısının yüksek olması muhtemeldir (24). Uzak Doğu ülkelerinde ÇH hakkında bilgiler oldukça kısıtlıdır. HLA-DQ2/DQ8 genlerinin prevalansının düşük olması ve düşük glutenli gıda tüketimi, bu populasyonlarda hastalığın prevalansının da düşük olmasının ana nedeni olabilir. (25).

Genel popülasyonda	1/133
Semptomatik çocuklarda	1/322
Semptomatik yetişkinlerde	1/105
ÇH'na sahip kişilerin birinci derece akrabalarında	1/22
ÇH'na sahip kişilerin ikinci derece akrabalarında	1/39
ÇH'na sahip kişilerin ikinci derece akrabalarında	1/60
Afrikalı-,Hispanik- ve Asyalı Amerikalılarda	1/236
Dünya genelinde prevalans	1/266

Şekil 1: ÇH'nın tahmini prevalansı (12)

2.4 Genetik

ÇH genetik temele dayalı hastalıklardan en sık görülenlerden birisidir. ÇH, multigenik bir hastalık olup sınıf II HLA genetik yatkınlığın %40'ını oluşturur. Primer HLA birleşmesi DQ2(DQA1*05/DQB1*02) ve DQ8(DQA1*0301/DQB1*0302) ileler. Antijen oluşturan hücrelerin hücre yüzey proteinleri, ÇH'na yatkınlığa neden olur. HLA proteinlerinin varlığı hastalığın gelişimi için gereklidir ancak yeterli değildir. HLA olmayan çeşitli genler de ÇH için genetik riske ilave katkıda bulunurlar (11). ÇH'ı bulunan kişilerin yaklaşık %97'si kromozom 6p21'de sınıf II HLA, özellikle HLA-DQ2 ve HLADQ-8 olarak

adlandırılan genetik bulguya sahiptir. Bunların varlıkları ÇH'nın gelişimi için gereklidir. Bu alellerin yokluğu nerdeyse tanıdan tamamen uzaklaştırır. HLA-DQ2 Çölyak hastalarının %90'dan fazlasında bulunur. Geri kalanların çoğunda da HLA-DQ8 bulunur (12).

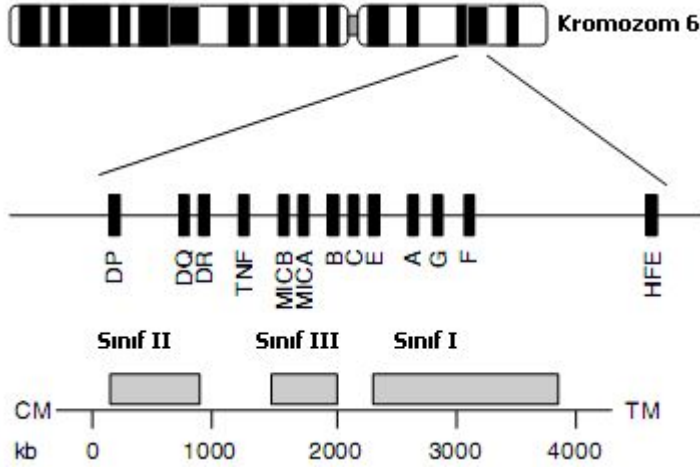
ÇH, HLA-DQ2 ve/veya HLA-DQ8 genlerini taşıyan kişilerde gelişir, fakat glutene maruz kalan ve genetik olarak yatkınlığı olan kişilerin tamamında gelişmez. Bilinmeyen çevresel faktörler, stres (enfeksiyon, ameliyat veya hamilelik) ve henüz belirlenememiş genler de hastalığın gelişimi için önemlidir (13).

HLA olmayan faktörler: Rho-GTP'az proteinler, örnek olarak MYO9B tarafından kodlanan miyosin IXB epitelyal sitoskeletal organizasyonda rol alır. Yine hastalıkla ilişkili olduğu düşünülen genetik durumlardan biri olan SPINK (Kazal tip serin proteaz inhibitörleri) genleri, doku korunmasında kontrolden çıkmış proteoliz ve bakteriyel büyümenin önlenmesinde rol alır. (12).

HLA kompleksi yüksek derecede polimorfik kromozom 6p21'in 4Mb bölgesinde 200'den fazla gen ve 3000'den fazla bilinen aleli mevcuttur (26). HLA sınıf II molekülleri, ekzojen peptid antijenlerinin T hücrelerine sunulmasında görev alırlar. ÇH ile ilişkisini araştırmaya yönelik ilk çalışmalarda B8 ve daha sonra DR3 moleküllerini belirlemek için serolojik metodlar kullanılmıştır (27, 28). Yapılan çalışmalar DQ2'yi ve özellikle HLA-DQ2(A1*0501,B1*0201) heterodimerini kodlayan HLA-DQA1*0501 ve DQB1*0201'nin kombinasyonunu ÇH'nın sebebi olarak öne çıkarmıştır (29). Bu heterodimer cis (bir altünite maternal, biri de paternal haplotiplerden gelir) veya trans (aleller aynı haplotip üzerindedir) olarak kodlanabilir (30). Çeşitli araştırmalar cis haplotipi homozigotluğuna veya ikinci bir DQB1*02 alleleline sahip olmanın hastalığa yatkınlığı artırdığını göstermiştir.(30, 31). İkinci B1*02 aleli DQB1*0202 ve DQA1*0201'yi taşıyan DR7-DQ2 haplotipi üzerinde kalıtılır fakat bu haplotipe tek başına sahip olmak ÇH'na yatkınlığa sebep olmaz (32).

HLA gen-doza etkisini açıklamak için Vader ve ark. tarafından yapılan in vitro çalışmada; proliferasyon düzeyi ve gluten-reaktif T hücre klonlarının sitokin cevaplarının, DQ tipine ve gen dozuna bağlı olduğu görülmüştür (33). Bu araştırma, T hücre cevabının DQ2-5 homozigotları için en yüksek, DQ2-5/2-2 için orta derecede, DQ2-5/x heterozigotlar için düşük ve DQ2-2 için en düşük olduğunu

göstermiştir. HLA-DQ2-5 molekülü cis veya trans formunda kodlanır. Kuzey Avrupa kökenli hastaların yaklaşık %90'ında bulunur. Kalanın büyük kısmı HLA-DQ8 (genetik olarak DQA1*03,DQB1*0302) taşır (34, 35). HLADQ2 ve HLA-DQ8 ÇH gelişimi için gerekli fakat yeterli değildir. Sağlıklı Kafkas toplumunun %30'unda DQ2 mevcuttur (36). Genel olarak ÇH'nda aday gen çalışmalarında, HLA-DQ dışında genetik yakınlık lokusu kesin olarak belirlenememiştir (37).



Şekil 2: HLA'lar insan MHC bölgesinde ki genlerin ürünüdür. MHC genleri kromozom 6 üzerinde yerleşmişlerdir (37)

İnsan MHC bölgesinde kodlanan üç sınıf (I, II ve III) HLA molekülü belirlenmiştir. Yapı ve fonksiyon açısından Sınıf I antijenler; HLA-A, B, C genlerinin ve daha az önemli HLA-E, F, G ve sınıf I psödogenler HLA-H, J, K, L ve P ana ürünlerini belirlerler. Diğer taraftan Sınıf II antijenler; HLA-DQ, DR ve DP genlerin ve daha az önemli HLA-DM ve DO ana ürünlerini belirlerler (38). Bunun aksine, sınıf I ve II arasında yerleşmiş olan sınıf III bölgesi, 20 genin toplamını içerir ve kompleman, hormonlar ve intraselüler peptid işlemini kodlar (39). Çeşitli HLA lokuslarının her biri için toplumda çeşitli aleller mevcuttur. Bu aleller tek bir kişide, bir tek lokusta kodominant ekspresyon gösterirler. Bunun anlamı; her bir kişi, her bir lokus için en fazla iki alel'e sahip olacaktır. Bunun biri anneden gelirken, diğeri babadan gelecektir. Bu alellerin ikisi birlikte ifade edilir. Memelilerde, sınıf I antijenler olan HLA-A, B ve C, çoğu çekirdekli hücrelerin yüzeyinde ve trombositlerde bulunur. Eser miktardaki sınıf I antijenler ise, olgun eritrositlerin üzerinde bulunur ve belirli allotipler diğerlerinden daha iyi eksprese edilirler (37).

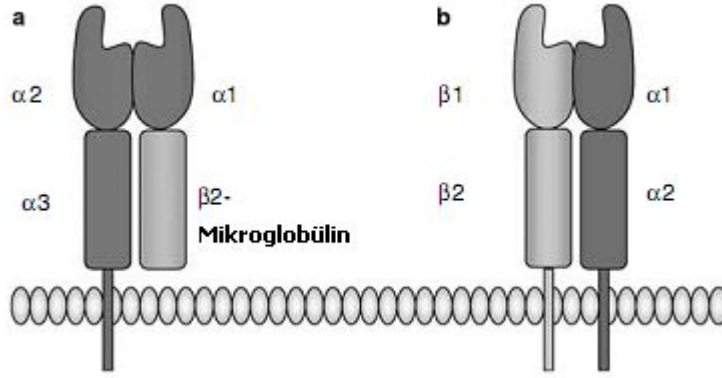
Trombositler, HLA-A ve B antijenlerini daha fazla, HLA-C antijenlerini daha zayıf şekilde eksprese eder. Sınıf II antijenlerini ise hiç eksprese edemezler (37). Diğer taraftan, atipik sınıf I genler (E, F, G) düşük derecede eksprese edilir ve HLA-A, B, C genlerinin yoğun polimorfizmini göstermezler ve immün sistemde sınırlı fonksiyona sahiptirler. HLA-E doğal öldürücü hücrelerin aktivitesinin düzenlenmesinde görev alırlar. HLA-G temel olarak trofoblastlarda eksprese edilir ve fetüsün maternal immünotoleransını etkileyebilir. (40).

Sınıf II antijenler; B lenfositlerinin, monositlerin, makrofajların, dendritik hücrelerin endotelial hücrelerin, intestinal epitelyal hücrelerin, erken hematopoetik hücrelerin ve aktive olmuş T lenfositlerin üzerinde eksprese edilir. Sınıf I ve II, HLA antijenlerinin ekspresyonu sitokinler tarafından düzenlenir ve bunlarda interferon-gama özel olarak önemlidir. (37).

2.4.1. HLA moleküllerinin yapısı ve fonksiyonu

Sınıf I ve II moleküllerin ana rolü, kendinden olan, olmayan yabancı peptidlere bağlanarak hücre membranına taşımak ve T-hücre antijen reseptörleri tarafından tanınmasını sağlamaktır (41).

Sınıf I moleküller, temel olarak endojen olarak üretilmiş peptidleri (viral veya tümör peptidleri gibi) CD8⁺ sitotoksik T hücrelere sunarlar. Sınıf II moleküller, çoğunlukla ekzojen antijenleri (bakteriyel peptidler gibi) CD4⁺ T-yardımcı hücrelere sunarlar. Peptid sunumunun bu fonksiyonel bölünmesi tüm zararlı antijenlerin uygun muamele görmesini sağlar. CD8⁺ ve CD4⁺ T hücrelerinin bu iki yolla aktivasyonu hücre bölünmesini ve farklılaşmasını uyarır. Sonuçta hücreler ve antikor aracılı immün yanıtları uyarır. Sınıf I ve II moleküller değişken ekstraselüler ve görece olarak sabit transmembran ve intrasitoplazmik bölgelere sahip bir heterodimerlerdir (42).



Şekil 3: HLA heterodimerlerinin yapısı; a) Sınıf I molekülü; b) Sınıf II molekülü (37)

Sınıf I moleküller; HLA-A, B veya C lokus tarafından kodlanan bir transmembran alfa-zincir ve kovalent olmayan bağla bağlandığı, 15q21-q22 kromozomu üzerinde yerleşmiş genler tarafından kodlanan, sınıf I moleküllerin hücre yüzeyinde transportu için önemli olan, Beta-2 mikroglobulinden oluşurlar. Alfa-1 ve alfa-2 bölgeler bir yarık oluştururlar ve bu yarık sitoplazmik viral ve kendi peptidlerinin proteazomlar tarafından parçalanmasıyla elde edilen 8-10 amino asidlere bağlanmak için dizayn edilmiştir. (Yukardaki şeklin a kısmı) (37).

Sınıf II genler; sınıf II moleküllerin alfa ve beta zincirlerini kodlarlar. HLA sınıf II'nin klasik üç tipinin her biri, kovalent olmayan bağlarla birleşmiş alfa/beta heterodimerleri tarafından oluşturulur. Beta zincirler DRB1, DQB1 ve DPB1 genleri tarafından kodlanır ve tamamı oldukça polimorfiktir (yukarıdaki şeklin b kısmı). Alfa zincirler DPA ve DQA için oldukça polimorfiktir, fakat DRA geni sabittir. Ayrıca gen duplikasyonları belli haplotiplerde oluşmuş ve DRB3-9 genlerini üretmiştir. İçlerinden sadece DRB-3, DRB4 ve DRB5 fonksiyoneldir. Bunların varlığında düşük seviyede DRA zinciriyle birlikte eksprese edilirler. B3 olduğunda DR52, B4 olduğunda DR53 ve B5 olduğunda DR51 oluşur (39). Sınıf II moleküller genellikle ekzojen ve endojen proteinlerin parçalanmasından oluşan 12-25 amino asitlik peptitlere bağlanır ve bakteriler ile kimyasal toksinlere karşı immün cevabın oluşmasında önemli rol oynarlar (37).

2.4.2. HLA polimorfizmi

HLA genleri yüksek derecede polimorfiktir demek, her bir lokusta (A, B, C, DP, DQ, DR, vs.) çeşitli aleller bulunurken, DNA diziliminde sadece birkaç nükleotidde farklılık bulunduğu anlamındadır. Ocak 2008'deki son IMGT/HLA veritabanı raporunda toplam 2991 HLA alleli kayıtlıdır. Her yıl 500 yeni kayıt olmaktadır. Bu çeşitliliğe rağmen herhangi bir kişi her bir spesifik HLA lokusunda sadece iki otozomal ve kodominant alele sahiptir. Her bir 6. kromozom'un HLA genlerinin kombinasyonu tamamen her bir ebeveynden kalıtılmış ve fenotip olarak ifade edilmiş bir HLA haplotipi gösterir (43). 100 milyondan fazla farklı fenotipin, HLA sistemindeki alellerin tüm kombinasyonlarından oluştuğu tahmin edilmektedir. Bir kişinin haplotipleri neredeyse kişiye özeldir ve HLA'yı genetik çalışmalar için ideal bir hedef haline getirir (44).

2.4.3. HLA ve ÇH

HLA genlerinin hastalığa yatkınlıkta önemi açıkça kanıtlanmış olup, HLA tiplemesinin hastalığın belirli klinik durumlarda belirlenmesi için faydalı bir test olduğu kabul edilmektedir. ÇH, ilk olarak sınıf I HLA molekülüyle ilişkili bulunmuş ve daha sonra DR3, DR5, DR7 (45) ve sınıf II HLA kompleksindeki DQ2/DQ8 alelleriyle ilişkili olduğu tespit edilmiştir (46, 47). Şimdi resmi olarak dört haplotip çölyak heterodimeri olarak kabul edilmektedir (37).

- I. DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501(**DR3-DQ2**),
- II. DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201(**DR7-DQ2**),
- III. DRB1*11/12-DQB1*0301-DQA1*0501(**DR5-DQ7**),
- IV. DRB1*04-DQB1*0302-DQA1*0301 (**DR4-DQ8**).

Sadece birinci ve dördüncünün varlığının ÇH için bir risk olarak kabul edilmesinde yeterli olduğu düşünülmektedir. HLA-DQ lokusu, HLA-DQB1 ve HLA-DQA1 alelini içerir ve her ikisinde polimorfiktir (48, 49)

Çölyak hastalarının yaklaşık %95'i serolojik olarak belirlenmiş DQ2 heterodimerini taşır. Bu çölyak heterodimeri ayrıca DQ2-5 olarak adlandırılır. DR3 için homozigot kişilerde tüm DQ molekülleri DQ2'dir. Heterozigot olanlarda DQ moleküllerinin %50'si DQ2'dir. Her ne kadar bunlar ÇH ile eşit olarak ilişkiliseler

de toplumun sadece %2'si DR3 için homozigottur ve bu grup tüm çölyak hastalarının %25'ini oluşturur (50).

DQA1*0201 ve DQB1*0202 tarafından oluşturulan HLA-DQ2 molekülü HLA-DQ2-2 olarak ifade edilir ve peptid bağlama özelliği vardır ve HLA-DQ2-5'in özellikleriyle nerdeyse aynı özelliklere sahiptir (51). HLA-DQ2-2, HLA-DQ2-5 ile birlikte eksprese edilmezse ÇH'na yatkınlık oluşturmaz (36). Az sayıda kişide DQ2 ve DQ8 heterodimerleri yerine, tek başına DQB1*02 veya DQA1*05 bulunur. Çölyak hastalarının % 0.5'inde ise DQ2 ve DQ8'in her ikisi de yoktur (52).

Gen dozu ÇH'na yatkınlığı etkiler. Örnek olarak HLA-DQ2 için homozigotluk varlığında, heterozigotluktan en az beş kat daha yüksek riskle hastalık gelişir. Homozigotlardan DQB1*02 ve DQA1*05'i her iki kromozomda cis formunda bulunduran veya ikinci bir DQB1*02 alel'i diğer haplotipte taşıyanlar hastalık için daha büyük risk taşırlar (53, 54). Hastalığa yatkınlığın yanında belirli HLA alellerinin varlığı, hastalığın klinik fenotipini de belirler. Mesela HLA-DQB1*0201 homozigotluğu ciddi intestinal hasara neden olur (55, 56). DQ2 homozigotluğu da bir kişide ÇH'nın erken yaşta gelişmesinin sebebidir (46, 47).

HLA-DQ2 homozigotluğu ile inatçı ÇH ve tip II enteropati ilişkili T-hücre lenfoma gelişimi arasında yakın ilişki vardır. HLA-DQ2, homozigotluğunun erken yaşta belirlenmesi, bu tip ciddi komplikasyonların gelişmesini önler (57). Tüm bu bilgilere rağmen, HLA risk faktörleri hastalığa genetik yatkınlıktan tamamen sorumlu değildir. Sadece iki molekülü (DQ2 ve DQ8) içeren yatkınlık modeli tüm gözlemleri açıklayamaz ve daha karmaşık bir model önerir. HLA açısından birbirinin aynısı kardeşlerde hastalık uyumu sadece %30'dur ve bu da monozigotik ikizlerde görülenden çok daha azdır. HLA genleri bu yüzden önemlidir ancak ÇH'na yatkınlığa neden olma açısından yeterli değildir. Genel popülasyonda HLA-DQ2'nin görece olarak yüksek prevalansı yaklaşık %30 oranındadır ve genotip ve klinik ifade arasındaki ilişki de hala boşluklar vardır ve bu durum ÇH gelişmesinde ek HLA ve HLA-olmayan genlerin etkili olabileceğini göstermektedir (58, 59).

ÇH'nda HLA tiplmesi, DQ2 ve DQ8 için yüksek derecede sensitif, fakat zayıf spesifiteye sahiptir ve bu yüzden pozitiflik durumu daha az önem taşımaktadır. Her ne kadar DQ2 alelleri nerdeyse tüm çölyak hastaları tarafından eksprese edilirse de genel popülasyonun DQ2 haplotipi için % 30'u ve DQ8 için de

%20'si pozitifdir. HLA tiplendirmesi ÇH için riski belirlemede iyi bir yoldur fakat hastalığın gerçek/gelecek derecesini belirlemede yeterli değildir (37).

Genetik çalışmalarda IL2 ve IL21 genleri hastalığa yatkınlığı saptamada yeni faktörler olarak belirlendi (60). İlave genetik çalışmalar son zamanlarda yedi bilinmeyen risk bölgesini belirlemiştir. Tip I diyabet ve ÇH bu bölgelerin birkaçını paylaşıyorlar. Bunlar LA-DQ, IL2-IL21, CCR3 ve SH2B3'dür (61). HLA-DQ2 homozigotluğu ÇH'nın ciddi komplikasyonlarıyla ilişkilidir. HLA-DQB1*0201 aleli yönünden homozigot olanlarda klinik tanı konduğunda hastada, ağır villöz atrofi, genç yaş, ciddi diyare, düşük kan hemoglobin değerinin görüldüğü ve glutensiz diyetle villöz atrofide düzelmeyen yavaş olduğu rapor edilmiştir (56). DQB1*02 homozigot hastaların belirlenmesi, hastalığın ağır komplikasyonlarının belirlenmesine yardım eder (62).

2.4.4. Yeni ÇH genleri;

IL2-IL21: Kromozom 4q 27 üzerinde belirlenmiştir. HLA'nın dışında en güçlü ÇH işaretidir. (61). IL-2 ve IL-21 sitokin ailesinin reseptörlerinde aynı gama-zincirini paylaşan üyelerdir. (63) IL2'nin T hücre aktivasyonu ve çoğalmasını uyarıcı bir fonksiyonu vardır. Ayrıca doğal öldürücü (NK) hücrelerin çoğalmasını ve B hücrelerinde immünglobulin üretimini uyarabilir. IL-21 ise ÇH'nda T Helper-1 aktivitesinin devamlılığında önemlidir (64, 65)

RGS1 bölgesi: HLA dışında ÇH ile ilişkili en kuvvetli gen bölgelerden birisidir ve IL2-IL-21; RGS1'in 5' ucuna 8kb uzaklıkta bir tek nükleotid polimorfizmidir (SNP) (66). G protein sinyal aktivitesini düzenler ve farelerde kemokin reseptör sinyal iletimi ve B hücrelerin lenf nodlarına akışıyla ilişkilendirilmiştir(67).

3p21: Diğer kuvvetli ilişki, 3p21 üzerindeki kemokin reseptör gen topluluğunu (CCR1, CCR2, CCRL2, CCR3, CCR5, XCR1) kapsamaktadır. Kemokin reseptör sinyal iletimi ile etkili immün hücrelerin enflamasyon bölgesine çağrılmasının ÇH'ndaki önemini vurgular. (37).

IL12A ve IL18RAP: IL12, antijen sunan hücreler tarafından eksprese edilir ve geniş biyolojik aktiviteye sahiptir. (37). IFN-gama salgılayan Th1 hücrelerini uyarır. IL18 transkriptleri insan ince barsağında güçlü bir şekilde eksprese edilir.

(68). Bu bağlamda başka bir aday gen (IL18RAP), IL-18 reseptörünün beta zincirini kodlar. ÇH ile ilişkili SNP'ler periferik kandaki IL18RAPgen ekspresyonuyla uyumludur (37).

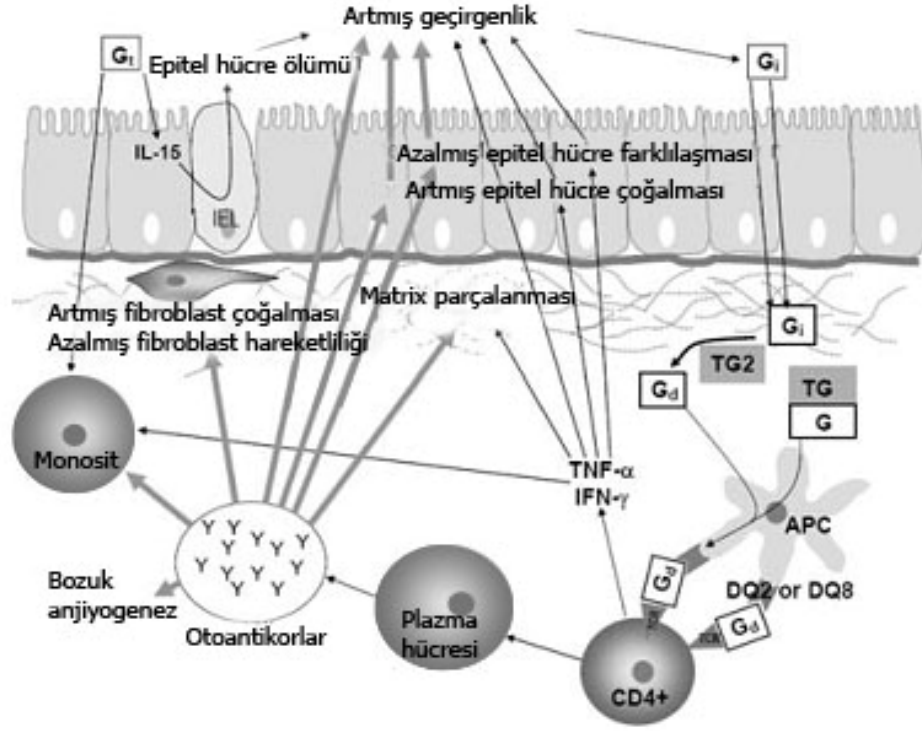
SH2B3: İmmün hücrelerde eksprese edilir. ÇH'larının mukozasında artar ve T-hücre reseptörü, büyüme faktörü ve sitokin reseptör aracılı sinyal iletiminin düzenlenmesinde görev alır (69).

TAGAP ve LPP: T hücre aktivasyonunda GTPaz aktive edici protein (TAGAP), aktif-T hücrelerinde eksprese edilen bir gendir. İmmün hücrelerdeki fonksiyonu tam belirlenememiştir fakat sitoskeletal değişiklikleri düzenleyebilir(70). LPP de ince barsakta kuvvetli bir şekilde eksprese edilir fakat ÇH ile ilişkisi tam olarak bilinmemektedir (37).

2.5 Etiyopatogenez

Normal fizyolojik şartlar altında intestinal epitel, hücrelerarası sıkı bağlantılarıyla gluten proteinleri gibi makromoleküllerin geçişinin önündeki temel bariyerdir. Glutenin alkolde çözünen kısmı olan proaminler, prolin ve glutaminden zengindir ve ince barsakta kısmi fakat tam olmayan bir sindirime uğrarlar. (71, 72) Belirli gluten peptidleri doğal bir immün yanıt oluştururken, diğerleri kazanılmış immüniteye sebep olurlar. Doğal immün yanıtta, antijen veren hücreler tarafından işlenip sunulan ve özel immünojenik gluten peptidlerini tanıyan lamina propriyada yerleşmiş CD4⁺ T hücreleri bulunmaktadır (73). Gluten antijenleri, doku transglutaminazı (tTG) tarafından enzimatik olarak değiştirilir. (74) Bu intraselüler enzim hücrelerde bulunan ve çölyak hastalığında (ÇH) önemli olan çeşitli işlemlerde yer alır. tTG endomisyal otoantikorların hedefidir ve enflamasyonda olduğu gibi asidik pH'da gliadindeki glutamin kalıntılarını deamidasyona uğratarak onları negatif yüklü glutamik asit kalıntılarına çevirir. Bu deamide peptidler doğal gluten peptidlerinden daha antijeniktir ve daha yüksek bir afinite ile HLA-DQ2 ve HLA-DQ8'in bağlanma kısımlarına yapışırlar (75). HLA-DQ peptid kompleksleri enflamatuvar T hücrelerini tetikler ve sonuçta anti-tTG ve antiendomisyal antikor formundaki otoantikorların üretimini uyarırlar (76). Bu antikorların varlığı ÇH'nın özel bir göstergesidir. Daha sonra CD4⁺ T lenfositleri lamina propriyayı işgal ederler ve T hücreleri proinflamatuvar sitokinleri üretirler. Sonuçta yüzey epitelyumu hasarı gerçekleşir. Mukozal değişim oluşur. (77). Lamina propriyanın CD4⁺ T lenfositler

tarafından ve intestinal epitelin CD8⁺ T lenfositlerince istila etmesi, aktif ÇH'nın önemli bir karakteristik özelliğidir (77). Genetik yatkınlıkla birlikte çevresel faktörler de ÇH'nın gelişmesinde rol alırlar. İnfant dönemde glutenin alınmaya başlanma zamanı önemli bir faktördür (78). Son zamanlarda yapılan bir çalışma, ÇH ile ilişkili antikorların gelişmesi açısından, gluten-içeren yiyeceklerin ilk 3 ay veya 7 aydan sonra verilmesinin 4-6 ay arasında verildiği durumda gözlenenenden daha yüksek bir riske sahip olduğu saptanmıştır(79). Gluten içeren yiyeceklerin hala anne sütü alan infantlara kademe kademe arttırılarak verilmesi ÇH riskini erken çocukluk döneminde azaltır (80).



Şekil 4: ÇH patogenezinde antikorların yer alması (81)

Büyük doku enflamasyonunun başlangıcında, aktiflenmiş T hücrelerinin çölyak hastalığına özel otoantikorları, B hücrelerine sentezlettirdikleri düşünülür (82). ÇH'na özel TG2'ye karşı otoantikorlar ince barsak mukozasında lokal olarak üretilir ve muhtemelen barsaktan sirkülasyona dökülürler. Bu otoantikorlar dolaşımında bulunmalarına ilaveten, üretildikleri yer olan ince barsak mukozasında

ekstrasellüler TG2 üzerinde yerleşmiş olarak, epitelyal tabakanın altında ve kan damarlarının etrafında bulunurlar (83).

Toksik gliadin peptidler (Gt), sonuçta hücre ölümü ve artmış epitelyal gerginliğe yol açan IL15 sekresyonu yoluyla doğal immün cevap oluştururlar. Bu da immünojenik gliadin peptidlerine lamina propriyaya girme imkanı sağlarlar. Gliadin peptidlerinin burada transglutaminaz 2 (TG2) tarafından deamide edildikleri düşünülmektedir. Deamidasyona uğramış peptidler endositoza uğrar veya tek başına yada TG2 ile kompleks yapmış antijen sunan hücreler (APC) tarafından işlenirler. APC'ler DQ2 veya DQ8'in oluğundaki peptidleri T hücrelerine sunarlar. T hücre reseptörleri (TCR), yardımcı (helper) T hücrelerinin yüzeyindedirler ve DQ2 veya DQ8'e bağlı deamide gliadini tanırlar. Bu olay güçlü T hücre cevabına ve tümör nekroz faktör α (TNF α) ve γ interferon (IFN γ) gibi çeşitli enflamatuvar sitokinlerin salınmasına neden olur. Bu sitokinler, epitelyal hücrelerin çoğalmasını arttırarak, farklılaşmasını azaltarak ve eptielin geçirgenliğini arttırarak mukozal hasara neden olurlar. Sitokinlerin matriks bozulmasında ve monosit aktivasyonunda etkili oldukları düşünülmektedir. Enflamatuvar sitokinlerin salgılanmasına ek olarak, T hücrelerinin mukozal B hücrelerini uyararak, anti-TG2'yi hedeflemiş otoantikorların salgılanmasını uyardıkları düşünülür. Bu otoantikorlar fibroblastların, çoğalmalarını arttırıp hareketlerini engelleyerek fonksiyonunu düzenlerler. Bunun ötesinde anti-TG2-hedeflemiş otoantikorlar ince barsak mukoza tekrar düzenlemesine katkıda bulunan anjiyogenezi engeller (81).

ÇH'nın gelişmesinde aşağıdaki bazı faktörler önemlidir

1. HLA faktörleri: Jores ve arkadaşları (56) HLA-DQBI*0201 aleli için homozigot olanlar ile barsak hasarının derecesi arasında kesin bir ilişki belirlemişlerdir.
2. HLA olmayan faktörler: Rho-GTPaz proteinleri, örnek olarak myosin IXB (MYO9B tarafından kodlanır) epitelyal sitoskeletal organizasyonda görev alır. Farklı Avrupalı gruplar tarafından bildirilen analizlerde MYO9B polimorfiziminin ÇH'nda yatkınlık yaratan bir faktör olarak bildirilmiştir (84).

Son zamanlarda ÇH ile genetik yatkınlık arasındaki ilişkileri açıklamaya yönelik çalışmalarda SPINK genleri tanımlanmıştır. Bu genler kontrolsüz proteoliz ve aşırı bakteriyel çoğalmayla doku korumasında rol alır. Büyük, çok merkezli bir

çalışmada ÇH için kromozom 4'te IL-2/IL-21 bölgesinde risk varyantları belirlenmiştir (85).

2.a. Sitokinler: Anormal T hücre toplulukları ÇH ve cevapsız ÇH/enteropati ilişkili vakalarda rol oynarlar. Refrakter ÇH olan hastalıkların duodenal biyopsi örneklerinde IgM, apolipoprotein C-III ve Charcot-Leyden kristal proteinlerinin çok yüksek seviyelerde oldukları görülmüştür (86).

2.b. IL-10 ve IL-2: ÇH'nda IL-10 ve IL-2'nin üretiminde bir dengesizlik vardır. ÇH klonlarından yüksek toksisiteye sahip olanlar IL-2 üretirken birçok sitotoksik ÇH ile ilgili olmayan intraepitelyal lenfositler IL-10 üretir. Fonksiyonel olarak farklı intraepitelyal lenfosit toplulukları arasındaki dengesizlik ÇH'nın patogenezinde rol oynar. Bu da öncelikli olarak IL-10 üreten intraepitelyal lenfositlerin azalması yoluyla olur (87).

Doğal ve kazanılmış immünite arasında çeşitli fonksiyonlara sahip olan IL-15'in ÇH patogenezinde artan bir önemi vardır (88). Aktif ÇH hastalarının mukozalarında IL-15 önemli derecede fazla eksprese edilir (89). Transforming büyüme faktörü $-\beta$ (TGF- β)'nin mukozal T hücrelerinde sinyal iletimi bozulur. Bu da sürekli barsak enflamasyonu ve hasarına neden olan IL-15'in artmış ekspresyonuyla olur (90). Monosit, makrofaj ve eozinofiller gibi çeşitli hücreler tarafından eksprese edilen makrofaj göçünü inhibe edici faktör ilgi çeken başka bir sitokindir (91).

2.c. İnterselüler adezyen molekül-1 geni: ÇH'na yatkınlık için iyi bir adaydır. 241. pozisyonda glisinine arjinine dönüşmesine neden olan bir tek nükleotid polimorfizmi erişkin dönemde ortaya çıkan ÇH'na neden olur (12).

2.6. Klinik Bulgular

Dr. Samuel Gee (92) 1887'de ÇH'nın klasik özelliklerini diyare, yorgunluk, halsizlik ve büyüme gelişme geriliği olarak tanımlayıp, beslenmenin düzenlenmesinin tedavinin ana parçası olduğunu ve hastalığın yaşa-özel olmadığını ifade etmiştir. 1953'de William Karel Dicke (93), kontrollü bir çalışmada buğday, arpa ve çavdarın ÇH'nı tetiklediğini ve diyetten bunların çıkarılmasıyla durumun tersine döndüğünü göstermiştir.

Çölyak lezyonunun ilk doğru tanımı 1954'de Paulley (94) tarafından ÇH'na sahip bir hastadan alınan ince barsak mukozasında biyopsi örnekleri incelenerek

yapılmış ve geniş düz villuslar ile yoğun kronik lenfoepitelyal enflamatuvar hücre işgali tarif edilmiştir.

İlk kez Marsh (95) tarafından mukozal hasar derecelendirmesini tarif etmiştir. Marsh ÇH'nın patolojik spektrumunu göstermiş ve glutene karşı barsak mukozasının yanıtı olarak ortaya çıkan anormallikleri tariflemiştir. Birbiriyle ilişkili beş lezyon belirlenmiştir. Bunlar intraepitelyal lenfositlerde artışın gözleendiği mukozanın küçük hasarından, total villöz atrofiye kadar değişir.

Klasik çölyak hasarı lenfositlerin epitel ve lamina propriyada birikmesi ve kript hiperplazisi ve villöz atrofi ile belirlenir (96).

ÇH'nın klinik bulguları çoğunlukla hastanın yaşına, hastalığın derecesi ve süresine ve barsak dışı bulguların varlığına bağlı olarak değişir (97). ÇH temel olarak proksimal ince barsağı etkiler. Fakat bazı kişilerde tüm ince barsağı da etkileyebilir. Bu proksimal ince barsak etkilenmesi vitamin ve minerallerin malabsorbsiyonuna neden olur. ÇH'ndaki diyare hastalığın distal ince barsağa kadar ilerlemesinden dolayı ortaya çıkmaktadır (98).

Çocuklukta ÇH ile ilişkili klasik semptomlar diyare, abdominal şişkinlik ve büyüme gelişme geriliğidir (99). Benzer olarak ergenler ve yetişkinlerde hastalık, diyare, kabızlık, kilo kaybı, güçsüzlük kısa boy yapısı, karın ağrısı ve kusmayla karakterizedir (100, 101). Şişmanlığın olması ÇH tanısını ekarte ettirmez (84). ÇH'nın atipik bulguları hiç gastrointestinal semptomlar bulunmamasına karşılık, bunun yerine demir eksikliği anemisi, azalmış kemik mineral yoğunluğu, kronik yorgunluk, irritable barsak, hazımsızlık, infertilite, düşük, hipertransaminemi, pıhtılaşma bozukluğu, kısa boy, gecikmiş puberte, artralji, aftöz stomatit, folat/çinko eksikliği, diş enamel hipoplazisi ve başka türlü açıklanamayan periferik nöropati ve ataksi gibi nörolojik bozukluklardır (101, 102) ÇH'nın subklinik formuna sahip kişiler bu durumun farkında değildirler. Çünkü görünürde fiziki semptomları yoktur. Fakat ÇH için pozitif serolojik teste sahiptirler ve barsak biyopsisinde villöz atrofi mevcuttur (56). Subklinik ÇH riskli grubun taranması sırasında veya dispepsi veya reflü gibi başka bir nedenle alınan biyopsiler sayesinde belirlenir (85). Risk grubu; ÇH hastalarının birinci derece yakınlarını (103), Down sendromlu kişileri (104) ve Tip 1 diyabet (105) ve Hashimoto tiroiditi (86) gibi otoimmün hastalıklara sahip kişilerdir. ÇH'nda otoimmün bozukluklar, normal popülasyonlara göre 3 ila 10 kat

daha fazla görülür (106, 107). Diğer otoimmün bozuklukların gelişme riski, glutene maruz kalma süresi ile doğru orantılı olarak artar (107). ÇH ile artmış prevalansa sahip durumlar; romatoid artrit (108), sistemik lupus eritematöz (SLE) (88), otoimmün karaciğer hastalığı (89), Turner sendromu (56), William sendromu, Addison hastalığı (90), alopesi erata, Sjögren sendromu, hepatit, periferik nöropati, psöriyazis ve kardiyomiyopati (89)'dir. Tedavi edilmemiş ÇH'nda ince barsak, malinitelerinin, adenokarsinomunun ve enteropati-ilişkili T hücre lenfomanın insidansı artmaktadır (100). ÇH'nın özel bir bulgusu dermatit herpetiformisdir. Bu sık görülmeyen ÇH'larının %10 ila %20'sini etkileyen bir deri lezyonudur (109). Yüksek derecede kaşıntılı, su kabarcıklı, kronik deri lezyonu klasik olarak simetrik papüloveziküler lezyonlarla karakterizedir. Bu lezyonlar dizleri, dirsekleri, kalçaları ve sırtı etkiler (110). Her ne kadar dermatit herpetiformis (DH) hastalarında GI semptomlar veya malabsorbsiyon özellikleri bulunmamasına rağmen, serolojik antikor özellikleri ÇH'na benzer, enflamatuvar ince barsak mukozal hasar ise ÇH'nda görülmele aynıdır (111). DH'in bulguları, glutensiz diyetle olumlu cevap verir ve deri lezyonlarını tedavi etmek için kullanılan Dapsone'un dozu glutensiz diyetle verilmek suretiyle azaltılabilir. Şuanda, ÇH; GI sistemle sınırlı bir hastalık olmaktan ziyade, bir multisistem immünolojik bozukluğa benzer (101).



Şekil 5: Dermatit Herpetiformis (15)

Günümüzde hastalık, çocuklara oranla yetişkinlerde daha sık görülmektedir (99). Ayrıca ÇH'ı kadınlar daha baskındır ve kadın erkek oranı 3 e 1 dir.

Yeni tanı konmuş ÇH'larının %25'i, 60 yaşından büyüklerde görülmektedir (100). Günümüzde subklinik ve atipik hastalar daha sık ortaya çıkmaktadır. (56, 111). Çok sayıda vaka geniş serolojik taramalar ve insanların hastalık hakkında bilgilerinin ve dolayısıyla farkındalığın artışı ile belirlenmektedir (12). Daha sıklıkla karşılaşılan, ÇH'na sahip çocuklarda daha az GI semptomlara ait bulgulara rastlanmasıdır. Mesela konsitipasyonlu çocuklarda ÇH'ı, GI sistem dışı semptomlarla (örnek olarak kısa boy) ortaya çıkar veya asemptomatik olabilirler. Fakat ÇH'na sahip ebeveynleri olabilirler. Bazı çocuklar sadece huysuzdur veya uyku bozukluğuna sahip olabilirler. Yetişkinlerde çeşitli nöropsikiyatrik durumlar, örnek olarak depresyon ve anksiyete bildirilmiştir. ÇH aile hikayesinin varlığı hastalığın gelişme riskini büyük oranda arttırır (13).

2.7. Tanı ve Tedavi

ÇH'nın tanısını tek başına koyduracak bir test yoktur (112). ÇH için belirleyici semptomlara sahip olan veya artmış riske sahip hastaların tanısında serolojik testler ve ince barsak biyopsisi ileri derecede sensitif ve spesifiktir (113). Tanı testi hasta gluten içeren yiyecekler alırken yapılmalıdır. Diyare, malabzorbsiyon, kilo kaybı, karın ağrısı, gaz ve şişkinlik gibi sürekli GI şikayetleri olan hastalar ÇH yönünden mutlaka incelenmelidir. Tanı testleri prematürite, osteopeni veya osteoporozisi, açıklanamayan demir eksikliği anormallikleri bulunan ve yüksek risk taşıyan hastalarda yine açıklanamayan GI semptomlarından şikayet eden vakalarda uygulanmalıdır. Asemptomatik hastalarda tarama önerilmez (15).

2.7.1. Tanıda Seroloji

ÇH için serolojik tanıda kullanılan faktörler, immunglobulin A (IgA), endomisyal antikorlar ve IgA doku transglutaminaz (tTG) antikorlardır (114). Gliadin antikorları, ÇH için düşük sensitivite ve spesifisiteye sahip olmasından dolayı artık kullanılmamaktadır. Pek çok çalışmada IgA ve tTG antikorlarının sensitivite ve spesifisiteyi %95'ten büyük olarak bulunmuş. Sensitivite mukozal hasarın derecesine bağlıdır. Ayrıca, tTG endomisyal antikorlar tarafından tanınan bir otoantijen olduğu için nadiren iki test uygulanır. tTG antikor testi enzim bağlı immünosorbent assay kullandığı için ucuzdur. ÇH taramasında öncelikli önerilen tek serolojik testtir (113). Hastalığın prevalansı düşük olduğunda dolayı doğru bir testle dahi yanlış-pozitif sonuç alınması riski yüksektir. Bu yüzden ince barsak biyopsisini de içeren doğrulayıcı testler önerilmektedir (15).

Bazı durumlarda HLA fenotipleri DQ2 ve DQ8 için test yapmak faydalı olabilir (115). Genel popülasyonun yaklaşık %40'ında HLADQ2 veya HLADQ8 veya herikisi birden görülürken, ÇH'na sahip kişilerin %99'dan fazlasında görülürler. Bu genetik işaretler yoksa muhtemelen ÇH'da yoktur. ÇH'na sahip kişilerin yaklaşık %3'ünde IgA eksikliği vardır. Bu da yanlış-negatif serolojik test sonuçlarına neden olur. Total IgA seviyesinin ölçümü sadece IgA eksikliğinden şüphelenildiğinde veya serum tTG negatif fakat ÇH'ndan hala şüpheleniliyorsa yapılmalıdır (116).

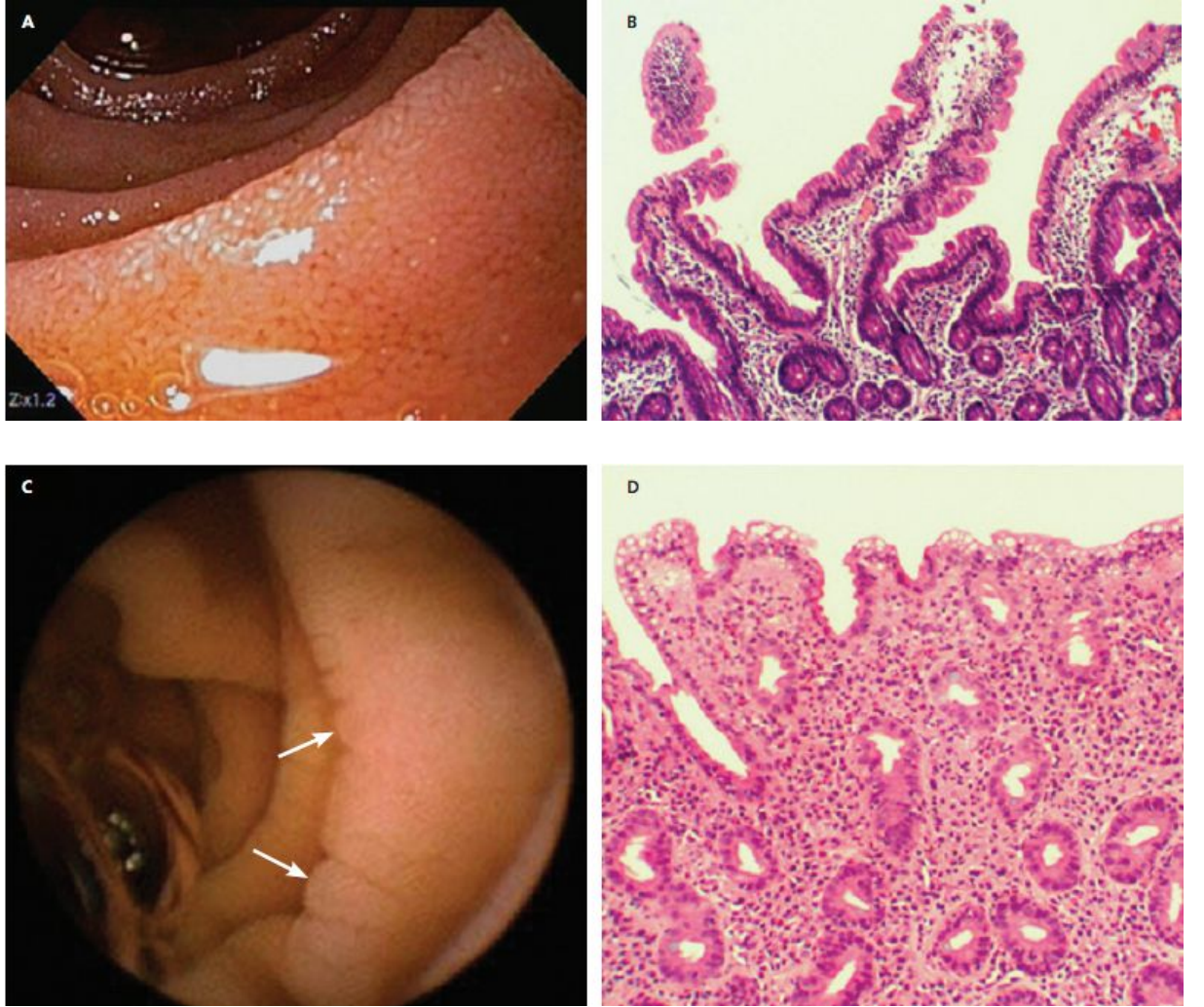
Serolojik işaretler yanlış-pozitif veya yanlış-negatif sonuçlara neden olabilir ve bu yüzden ÇH'nın tanısı için güvenilmezler. Pozitif serolojik işaretler yüksek riskli hastalarda ince barsak biyopsisiyle ileri düzeyde araştırmayı gerektirir. Bunun aksine negatif serolojik işaretler, düşük riskli ve IgA eksikliği olmayan hastalarda yüksek derecede negatif prediktif değere sahiptir ve ince barsak biyopsisine genellikle ihtiyaç duyulmaz. ÇH için şüpheler yüksekse, negatif işaretler ince barsak biyopsisini engellememelidir (15).

Tanıdaki gecikmelerin, hastanın medikal bakım aramasında geç kalmasından ziyade, doktorun tanı koymada gecikmesinden kaynaklandığı görülmüş (117, 118). Spesifik semptomlarının olmaması ve klinik bulgulardaki yüksek değişkenlik, doktorların ÇH'nı önemli bir etken olarak görmemesine ve hastalığın ender olduğunun düşünülmesine neden olmaktadır (117, 118).

2.7.2. İnce Barsak Biyopsisi

Klinik olarak doğru yapılan bir serolojik incelemeye rağmen, çoğu ÇH için tanıyı doğrulamada ince barsak biyopsisi gereklidir. Mukozal değişiklikler kısmiden total villöz atrofiye kadar değişebilir veya basit kript uzamasıyla veya artmış epitelyal lenfositler gözlenebilir. Alınan biyopsi sayısı da önemlidir. Çünkü aynı kişide villöz atrofinin histolojik derecesi değişkendir. (113). Bu yüzden duodenumun ikinci parçasından veya daha ilerden en az 4 veya 5 parça biyopsi alınmalıdır. Bu da testin sensitivitesini artırır (119). ÇH için araştırma safhasındaki tüm hastaların duodonal biyopsi yapılana kadar gluten içeren besin alması şarttır (120). Tüm tanılar duodonal biyopsi ile doğrulanmalıdır. Serolojik olarak negatif olan kişilerde villöz atrofinin diğer nedenleri de göz önüne alınmalıdır. İşlevsel anormallikleri saf dışı etmek için sıklıkla ikinci bir biyopsiye gerek vardır (120).

Kapsül endoskopi: Biyopsi ÇH için %100 sensitif veya spesifik değildir ve diğer klinik durumlar örnek olarak enfeksiyon (Giardiazis, insan immün yetmezlik, virüs enfeksiyonu) enterit, bakteriyel aşırı çoğalma, otoimmün enteropati veya lenfoma vakalarındaki benzer bir görünüme sahiptirler. Eğer tanı şüpheli ise standart endoskopun ulaşabildiği noktanın ilerisine ulaşarak lezyonun ileumda mı yoksa jejunumda mı olduğunu ayırmada kapsül endoskopisi faydalıdır (121).



Şekil 6: ÇH'na sahip olan ve olmayan hastaların endoskopik ve muayene bulguları:

- A) Normal ince barsağın yüksek çözünürlüklü endoskopik fotoğrafı. Villuslar açıkça görülmekte ve kıvrımlarında taraklaşma belirtisi bulunmamaktadır; B) İnce barsağın biyopsi örneği (hematoksilen-eozin, orijinal büyütme x 100); C) Bir çölyak hastasının ince barsağının kapsül

kamera görüntüsü. Mukozal katlantılarda taraklanma mevcuttur ve bu malabsorbsiyonun karakteristiğidir. Ayrıca normale karşılaştırıldığında villöz atrofi görülmektedir; D) Bir çölyak hastasının ince barsağının biyopsi örneği (Hematoksilen-eozin, orijinal büyütme x 100) Villöz yapı kaybolmuştur (120)

Bir diğer yardımcı test de HLA haplotipinin belirlenmesidir. ÇH hastalarının yaklaşık %95'i HLA-DQ2 alenini taşıırken geri kalanlar da genellikle HLA-DQ8 pozitifdirler (120).

2.7.3. Tedavi

Şu anda ÇH için bilimsel olarak kanıtlanmış tedavi, hayat boyu sıkı glutensiz diyettir. Glutenin küçük miktarları dahi zararlı olduğu için buğday, arpa ve çavdardan gelen gluteni içeren tüm yiyecekler ve ilaçlar kullanılmamalıdır. Glutenin yiyeceklerden tümüyle çıkartılması hastaların çoğunda semptomatik, serolojik ve histolojik düzelmelere neden olur (24). Glutensiz beslenmeyle çocuklarda büyüme ve gelişme normale döner. Yetişkinlerde de hastalığın birçok komplikasyonu önlenir. Green ve arkadaşları (122) hastaların %70'inde glutensiz diyetin başlangıcından itibaren 2 hafta içerisinde semptomlarda belirgin düzelmeye görüldüğünü bildirmişlerdir. Glutensiz diyetin başlangıçtan 6-12 ay sonra sıkı bir diyet kontrolü ile antikor seviyeleri normale döner ve tam bir histolojik düzelmeye ise iki yıllık bir süre içerisinde gerçekleşir (123). Hastaların küçük bir yüzdesinde ince barsakta ve semptomlarda düzelmeye tam olarak gerçekleşemez (124). Hastaların bir kısmında tedaviye yanıt alınmaz. ÇH'nin komplike bir formudur ve bu tip hastalar glutensiz diyetle tam olarak yanıt vermez (125).

Yeni tanı konmuş ÇH'na sahip kişilerin beslenme durumu; hastalığın ne kadar süredir var olduğuna, GI sistemdeki hasarın derecesine ve malabsorbsiyonun derecesine bağlıdır. Tanı konulduğunda bazı hastalar ciddi kilo kaybı, anemi ve vitamin-mineral eksikliklerinin açık belirtilerine sahiptirler. Demir, folat ve kalsiyum malabsorbsiyonları sık görülür. Çünkü bunlar proksimal ince barsakta emilirler. Hastalık ince barsak boyunca ilerlerken, karbonhidrat, yağ, yağda çözünen vitaminler, A, D, E, K ve diğer mikrobeyinlerin malabsorbsiyonu görülür (24).

Azalmış laktaz üretiminden dolayı sekonder laktoz intoleransı görülür. Çünkü villuslar hasarlanmıştır (126). Beslenme bozukluğuyla başvuran hastaların geçici bir dönem veya uzun süreli glutensiz fakat vitamin, mineraller ve proteinler içeren diyetlerle eksikliklerini düzelterip depolarını doldurmak gerekir (127).

Aneminin kaynağına göre demir, folat ve B-12 vitaminleri tedavi kullanılır. Proksimal ince barsak, enflamasyonun ve demir emiliminin gerçekleştiği bölge olduğu için, ÇH'nın tedaviye cevap vermeyen demir eksikliği anemisiyle ilişkili olduğu net bir şekilde ortaya konmuştur (128). Demir eksikliği anemisinin sıklığı ÇH'nda %12-69 arasında değişir. Kronikleşmiş ve tedavi almamış hastalarda daha sık görülür (129). B-12 vitamini eksikliğinin insidansı tedavi edilmemiş grupta %8 ile %41 arasındadır (130). B-12 emiliminin gerçekleştiği ileumda villuslar korunmaktadır. B-12 eksikliğine neden olan sebepler net değil ancak mukozal değişiklikler B-12 eksikliğinin en önemli sebebidir. Folik asit jejunumdan emilir, aktif ÇH'ında proksimal jejunum enflamasyona uğrar ve hasarlanır. Fonksiyonel olarak zarar görmüş villusların glutensiz diyetle tedavisi sürecinde günlük folik asit verilmesi de gerekir (127).

Klasik malabzorbsiyonu olan hastalarda yağda çözünen vitaminlerin (A, D, E ve K) eksikliği görülmektedir. Bu yağda çözünen vitaminlerin geri yerine konulması kişiye göre ayarlanır. Kalsiyum, fosfor ve vitamin-D eksiklikleri, laktoz alımını azaltmak için süt ve süt ürünlerinin tüketiminin azalmasından kaynaklanmaktadır. Çoğu vakada laktoz intoleransı glutensiz diyet verilmesi ile düzeltilmektedir (131). Kemik hastalığı ÇH'nda önemlidir. Bu yüzden tanıda, kemik yoğunluğu, serum kalsiyum, alkalen fosfataz ve paratiroid hormon seviyelerinin ölçülmesi ve tedavide yeterli seviyede kalsiyum ve Vitamin-D alımı önemlidir. Sıkı bir glutensiz diyet ile kemik mineralizasyonunun normale dönmesinin çocukta ve genç yetişkinde 1 yıl içerisinde gerçekleştiği görülmüştür. Yetişkin ÇH'larında kalsiyum ve D vitamini ile diyet tedavisi sayesinde yine kemik yıkım-yapım hızında azalma ve sıkı glutensiz diyet verilmesiyle kemik mineral yoğunluğunda artış meydana geldiği gösterilmiştir (132). ÇH'nın tedavi planı, semptomları düzeltmek, barsağı iyileştirmek, malabzorbsiyonun sonuçlarını geriye çevirmek ve hastaya sağlıklı ve glutensiz bir diyet sağlamaktır (128).

Tanı ve tedavi sırasında hastalar korku, sinirlilik, endişe ve üzüntüye sahiptirler. Sinirlilik doktor hasta ilişkisini de kötü yönde etkiler. Tedavi edilen yetişkinler arasında depresyon en sık görülen nöropsikiyatrik komplikasyon olarak ortaya çıkar ve hasta kompliyasını etkiler.

ÇH hastalarında bazı faktörler hayat kalitesinin azalmasında etkilidir. Bunlar arasında; glutensiz diyetin maliyeti, dışarıda yemek yemek, seyahat etmek, aile hayatı ve kariyer ve iş hayatında glutensiz bir yaşam tarzının sürdürülmesi de sayılabilir. Hasta eğitimi ve glutensiz diyetle bağlılığın devam ettirilmesi çok önemlidir. Glutensiz diyetle uymamanın nedenleri, yetersiz eğitim, yanlış bilgilendirme ve diyetin kısıtlayıcı doğasından kaynaklanmaktadır (122). İdeal olanı, yeni tanı konmuş hastanın eğitimini, doktor, diyetisyen ve lokal destek gruplarından oluşan bir takımın birlikte gerçekleştirmelidir (127). Kitaplar, periyodik yayınlar, web sitelerinde bulunan pek çok kaynak ÇH'larının faydalanması için mevcuttur. Amerikan ulusal sağlık enstitüsü ÇH nedeniyle etkilenen hastaların tedavisi ve idaresi için altı madde belirlemiştir (12). Bunlar;

C: (Consultation) Eğitimli bir diyetisyen tarafından konsültasyon

E: (Education) ÇH hakkında eğitim

L: (Lifelong adherence) Hayat boyu glutensiz diyetle bağlı kalma

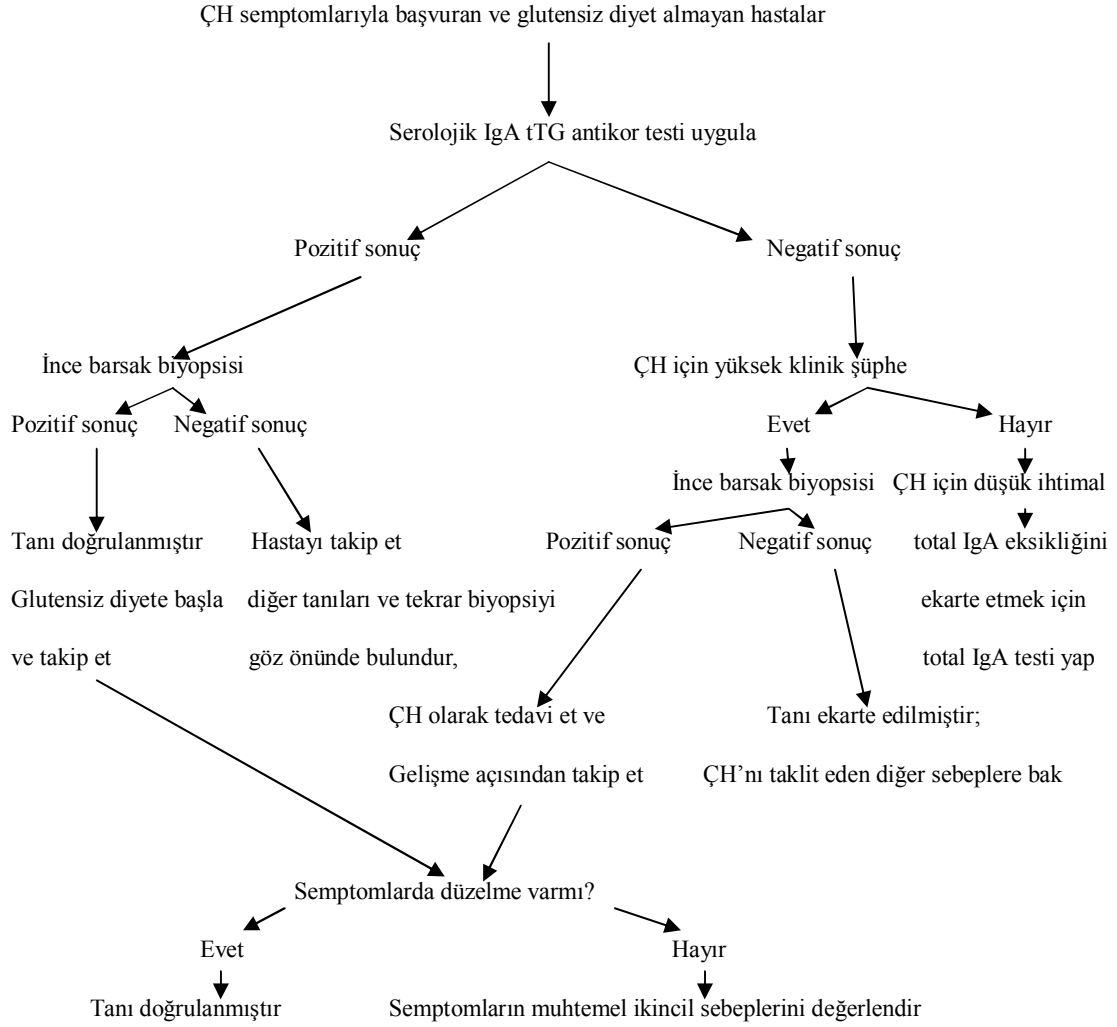
İ: (Identification and treatment) Besinsel eksikliklerin belirlenmesi ve tedavisi

A: (Advocacy group) Öneri gruplarına katılma

C: (Continuous follow-up) Sürekli, uzun dönemli takip

ÇH'na sahip kişilerde diyare, karın ağrısı, gaz ve kilo şikayetleri de mevcuttur. Hastalık, deri, karaciğer, sinir sistemi, kemikler, üreme sistemi ve endokrin sistemi dahil çeşitli organ sistemlerini etkileyebilir (133).

İnce barsağın sınırlı derecede hasar gördüğü vakalarda, barsak bunu telafi ettiğinden dolayı pek çok vakada (%38) hastalık asemptomatiktir (112). Bir raporda ÇH vakalarının bir çoğunda daha önceden irritable barsak sendromu tanısı konduğu bildirilmiştir (21). Önerilen tanı yaklaşım **Şekil 7 'de** özetlenmiştir.



Şekil 7: ÇH olma ihtimali olan hastalara yaklaşım algolaritması (120)

2.8. Genetik çeşitlilik ve fenotip analizi

İnsan genetik çeşitliliği çok sıktır ve SNPs (Single nucleotide polymorphisms) bu çeşitliliğin büyük kısmından sorumludur. SNP'lerin bir bölümü genlerdeki kodlayıcı ve düzenleyici bölgelerde bulunurlar. Pek çok gen önemli genetik varyasyonlar içerir (33). Çoğu varyantlar sessizdir ve gen ekspresyonu ve fenotip için sonuçsuz kalır.. Fakat diğerleri değişmiş fenotipe neden olur. Yeni genetik polimorfizmler genlerin kodlayan bölgelerinde silico'da bulunabilir. (134). Genotipler; promoter aktivite (düzenleyici bir bölge ise), protein fonksiyonu (eğer bir amino asit değişimi sonucu ise) mRNA da stabilite (ekzonlarda kodlamayan

nükleotid değişiklikleri) ve bağlantı varyasyonları (intronik sıralarda) temellerinde çalışılmalıdır (135).

İnsan protein seviyelerini ve aktivitesini ölçerek invitro çalışmalarında gösterilen yeni bir fenotipin doğrulanması önemlidir (135).

2.9. Serbest Radikaller

2.9.1. Tanım ve Tarihçe

Serbest radikaller; bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküller olup, bu ortaklanmamış elektronları nedeniyle oldukça reaktif yapılardır. Süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikallerinden (OH^{\bullet}) oluşmaktadırlar (4). Serbest radikallerin aşırı miktarlarda üretimine neden olan durumlar, hücrede oksidan/antioksidan dengesinin bozulmasına ve detoksifiye edilemeyen radikallerin hücrede değişik yapıları oksidasyona uğratmasına ve birçok hastalığın oluşumuna neden olmaktadır (6). Oksidatif hasara neden olan serbest radikallerin artışına bağlı olarak gelişen hasarı önlemeye yönelik birçok savunma sistemleri devreye girer.

2.9.2. Serbest Radikallerin Üretilmesi:

Birçok radikal reaksiyonunda ilk olay süperoksit radikalinin (O_2) (SOR) üretilmesidir. SOR, moleküler oksijenden tek bir elektron eklenmesiyle elde edilir. Süperoksit dismutaz (SOD), SOR üzerine etki eder ve hidrojen peroksit (H_2O_2) yapımına neden olur. H_2O_2 , SOR'un bir başka molekülüyle etkileşime girer ve yapı olarak daha güçlü olan hidroksil (OH^{\bullet}) radikalini oluşturur. SOR aracılı H_2O_2 dekompozisyonu ferik iyon ile katalizlenir. (Haber-weiss reaksiyonu). OH^{\bullet} radikali SOR'dan daha toksiktir. Diğer radikaller, SOR veya OH^{\bullet} radikalinin biyolojik moleküller üzerine etki etmesiyle üretilirler. Bu radikaller lipid radikalleri, lipid peroksi radikalleri, pirimidin radikalleri ve pürin radikallerinden oluşmaktadır. SOR'un sorumlu olduğu zanedilen zarar verici etkilerin birçoğu bu sekonder serbest radikaller vasıtasıyla oluşturulmaktadır (136).

Prokaryot ve ökaryotlarda solunum yapan hücreler SOR'un ana kaynağıdır (137). Solunum sırasında ökaryotlarda ne kadar SOR üretildiği bilinmemektedir.

Streptokok fekalis ekstraktlarında SOD üretimi spesifik antikorla engellenir ve tüketilen oksijenin %17'si SOR üretime gider (138). Etkili ATP üretilmesi, SOR yapımını gerektirir. SOR üretimi ve solunum ilişkisi mitokondrinin ökaryotlarda "moleküler saat" olduğunun ve türlerin maksimum ömürlerinin oksijen tüketimine bağlı olduğunun bir göstergesidir (139). Yine düşük oksijen konsantrasyonlarının in vitro ortamda kültürü yapılan insan diploid hücrelerinin ömrünü uzattığı gösterilmiştir (140). SOR kaynağı sadece hücre solunum değildir. SOR'un üretimi ksantin oksidaz, aldehid oksidaz, flavin dehidrojenaz, indolamin dioksijenaz, z-nitropropan dioksijenaz, diamin oksidaz ve ribuloz 1,5-difosfat karboksilaz gibi birçok enzimin aktivitesi için gerekli veya yakın ilişkilidir (137). SOR, hidrokinonlar, flavinler, katekolaminler, tetrahidropterinler, ferrodoksinler, hiyalurik asid ve hemoglobin gibi çeşitli moleküllerin otooksidasyonu sırasında üretilir (137). Serbest radikaller ayrıca şehirdeki hava kirliliğinde, organik maddelerin yanmasıyla oluşan dumanda (benzin, kağıt, tütün, vb.) ozonla kirlenmiş havada da mevcuttur (141). SOR ayrıca nötrofiller, monositler ve makrofajlardaki mikrobisidal aktivite için gereklidir ve bu hücrelerde solunum patlaması süresince üretilir. İnsan monositlerinde ve nötrofillerde son zamanlarda OH⁻ radikallerinin üretildiği de gösterilmiştir (142).

Serbest radikallerin biyolojik sistemlere etkilerinin bir sonucu lipid peroksidlerin üretimidir. Serbest radikaller, poliansatüre yağ asitlerine saldırırlar ve alil çift bağlarla lipid radikallerini oluştururlar. Lipid radikalleri bu çift bağlarla moleküler oksijene bağlanır ve lipid peroksi radikallerini üretir. Bu peroksi radikallerinden proton ve elektron çıkarılmasıyla lipid peroksidler oluşturulur. Bunlar aldehitlere kadar parçalanırlar ve aldehidler de proteinleri, lipidleri ve nükleik asitleri çapraz bağlarla birbirine bağlar. Serbest radikaller ilave reaksiyonlara da girerler ve yeni radikallerle birlikte kovalent bağlar oluştururlar (136).

SOR, OH⁻ radikalleri ve diğerleri (hidrojen radikali, hidrate elektron vb.) hızlıca pek çok biyolojik bileşiklere etkilerler ve aktiviteleri açısından hidroksil radikali diğer radikalleri geçmektedir (136).

Kesme reaksiyonları biyolojik öneme sahiptir ve özellikle iyonize radyasyon açısından önemlidir. Bu reaksiyonlar, ayrıca kimyasal oksidasyonlardan oluşan SOR'lar için de gösterilmiştir. Lown ve arkadaşları (143), kovalent olarak kapalı

yuvarlak DNA'nın invitro olarak adriyamisin, danarubusin ve indirgeyici ajanlarla ayrıldığını göstermişler ve serbest radikallerin bu reaksiyona SOD, kataloz ve sodyum benzoatla ayrılmasını engelleyerek aracılık ettiğini bulmuşlar. Morgan ve arkadaşları (144), kapalı yuvarlak DNA'nın SOR ile ayrılmasını, OH⁻ radikalinin aktif bir tür olduğunu ve bunun SOD ve katalazla engelleme çalışmalarıyla belirlendiğini ifade etmişlerdir.

Biyomoleküllerin lipid peroksidasyonundan kaynaklanan aldehitlerle çapraz bağlanması iyi bir şekilde ortaya konmuştur ve bu in vivo olarak baskın bir mekanizma olabilir. Lipid peroksitlerin etan, pentan ve değişik aldehitleri içeren çeşitli ürünlere ayrıştığı bilinmektedir. Oluşturulan en önemli aldehid, malondialdehittir. Bu da proteinler, fosfolipidler ve nükleik asitlerle schiff bazlar oluşturur. Makromoleküllerin lipid peroksidasyon ürünleriyle in vitro olarak çapraz bağlanması gösterilmiş olup, bu da lipid peroksidasyonunun in vivo olarak çapraz bağlanmadan sorumlu olduğunun bir belirtisidir. Bu çapraz bağlantıların, aminlerin peroksida lipidlerden oluşan aldehidlerle reaksiyonu sonucu oluştuğu gösterilmiştir (145). DNA'nın, invitro olarak X-irradiasyonu sırasında üretilen malondialdehid benzeri materyal tarafından çapraz bağlandığı tespit edilmiştir (146). Lipid peroksidasyonu ve çapraz bağlanmanın önemi hücre sel bütünlüğün zayıflamasına yol açmalarıdır (136).

2.9.3. Moleküler Toksikolojiye Karşı Antioksidanlar

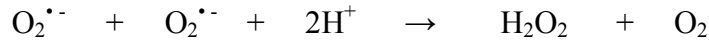
Antioksidanlar, hücreleri ksenobiyotiklerin, ilaçların, karsinojenlerin ve toksik reaksiyonların yan etkilerine karşı direkt veya indirekt olarak koruyan maddelerdir (147). Çeşitli biyolojik açıdan aktif bileşiklerin de antioksidan fonksiyonlara sahip olduğu bildirilmiştir. Bunlar Vitamin C (askorbik asit), Vitamin E (α -tokoferol), Vitamin A, β -karoten, metalloprotein, poliaminler, melatonin, NADPH, adenzin, koenzim Q-10, urat, ubiginol, polifenoller, flavonoidler, fitoestrogenler, sistein, homosistein, taurin, metiyonin, s-adenozil-L-metiyonin, resveratrol, nitrosidler, GSH, glutatyon peroksidaz (GPX), superoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT), tiyoredoksin redüktaz, nitrik oksid sintaz (NOS), hem oksijenaz-1 (HO-1) ve eozinofil peroksidaz (EPO)'ı içerir (148). 3-(2)-tert-butyl-4-hidroksianizol (BHA), 3,5-di-tert-butyl-4-hidroksitolwen (BHT), ve t-butil hidrokinon (t-BHQ)'i içeren fenolik bileşiklerin oksidatif stresi önlemede

antioksidan rolü iyi bir şekilde tanımlanmıştır (149). Çeşitli antioksidanlar superoksid ve serbest radikalleri temizleyebilir veya hücrelerdeki detoksifikasyon mekanizmalarını uyarabilir ve serbest radikal defoksifikasyonuna sebep olur. Böylece pek çok patofizyolojik işlemin önlenmesine neden olur (150).

Glutasyon, direkt olarak superoksidi temizler, BHA, BHT ve t-BHQ birbirleriyle uyumlu bir şekilde bir takım genlerin ekspresyonunu uyarır ve bu genlerin ürünleri oksidatif stres ve ilişkili sonuçlarına karşı koruyucudur (151). Diğer bileşikler, glutamin gibi, özellikle intestinal hücrelerde ısı şok proteini 72 (hsp72)'yi uyarır ve bu da oksidanlar gibi enflamasyon tarafından uyarılan strese karşı hücre korunmasına yardımcı olur (152).

SOD: SOD, serbest radikal süperoksidi perokside çevirerek parçalar. Daha sonra da katalaz veya GPX reaksiyonlarıyla parçalanır. Aerobik solunumla süperoksidin düşük bir seviyesi sürekli olarak üretilir. Mitokondrinin elektron transport zinciri, dört elektronu moleküler oksijene taşır ve suyu oluştururken arada sırada tek bir elektronu kaçıır. Süperoksit Fe(III)'ü Fe(II)'ye indirger ve bu arada demir ve hidroksil iyonları salınır. Böylece, H₂O₂ ile etkileşir ve hidroksil radikallerini üretir. SOD; süperoksidi, H₂O₂'e ve moleküler oksijene çevirir.

SOD



SOD'un diğer bir fonksiyonu dehidratazları (dihidroksi asit dehidrataz, akonitaz, 6-fosfoglukonat dehidrataz ve fumarazlar A ve B) serbest radikal süperoksidin inaktivasyonuna karşı korumaktır (153). SOD'un 4 sınıfı belirlenmiştir ve dinükleer Cu, Zn veya mononükleer Fe, Mn veya Ni kofaktörlerini içerir (154). Fe-SOD ve Mn-SOD'lar homoloji gösterir ve aktif bölgelerinde metal şelasyonu yapan aynı artıklara sahiptirler. İnsanlarda SOD'un üç formu vardır: Sitokozolik Cu, Zn-SOD, Mitokondriyal Mn-SOD ve ekstrasellüler-SOD (EC-SOD) (155). SOD dismutasyonu geçiş metal iyonunu ardı ardına oksidasyon, redüksiyonu ile katalizler ve bunu aktif bölgede yüksek reaksiyon hızıyla bir Ping Pong tip mekanizmayla gerçekleştirir (156). Manganaz-SOD: Bir heterotetramerdir. (96kDa) ve her bir subnite için bir manganaz atomu içerir ve subuniteler Mn(III)'den Mn(II)'ye ve tekrar Mn(III)'e dönüşü sağlar ve bu durum süperoksitin dismutasyonunun iki adımı

boyunca gerçekleştirir. Mitokondrideki solunum zinciri oksijen radikallerin önemli bir kaynağıdır (157).

Mn-SOD: Nükleer olarak kodlanmış bir primer antioksidan enzimdir ve bu süperoksit radikallerini çıkarmak için çalışır (158). Mn-SOD'un diğerlerine göre biyolojik önemi;

Mn-SOD genlerinin E.Coli'de inaktivasyonu aerobik durumlarda mutasyon sıklığını artırır. Saccharomyces cerevisiae'deki genin eliminasyonu oksijene hassasiyetini artırır. Tümör nekroz faktör (TNF) özellikle Mn-SOD'u uyarır. İnsan Mn-SOD genlerinin transgenik farelerde ekspresyonu, oksijen tarafından uyarılan pulmoner hasara ve adriamisin tarafından uyarılmış kardiyak toksisiteye karşı koruyucudur (159). Bu yüzden Mn-SOD'un ekspresyonu aerobik hayatın devamı ve oksijen radikali aracılı toksisiteye karşı hücrel direncin gelişmesi açısından çok önemlidir. Mn-SOD (SOD-2) bir tümör baskılayıcı gen olarak önerilmiştir (160).

Bakır, Çinko SOD: Cu,Zn-SOD (SOD-1)'ler: gelişim boyunca korunmuş diğer enzim sınıflarıdır. Yaklaşık 32kDa'lık iki birbirinin aynı subunitine sahiptir ve her bir subunit bir metal topluluğu içerir. Aktif bölge bir bakır ve onunla köprü yapmış bir çinko tarafından oluşturulmaktadır. Bu köprüleşmede etkili hedef bölge His61'dir (161). Bakır ve çinko içeren SOD'un H₂O₂ tarafından inaktivasyonu birbirini takip eden bir dizi reaksiyon sonucu gerçekleşir. Birincisi, H₂O₂ tarafından Cu(II)'nin Cu(I)'e indirgemesidir. Sonra Cu(I), ikinci bir H₂O₂ tarafından okside edilir ve böylece güçlü bir oksidan elde edilir ve bu Cu(I)O, Cu(II)OH veya Cu(III) olabilir. Son olarak histidin oksidasyonu gerçekleşir ve o da SOD aktivitesinin kaybına neden olur (157).

Her ne kadar Mn-SOD tüm tümörlerde bulunsa da, Cu,Zn-SOD ve Mn-SOD'un aktivitelerinin oranı normal dokudan farklı değildir ve tümörler metabolik olarak aktif dokulardan daha az Cu,Zn-SOD'a sahiptir (162).

Cu,Zn-SOD'un antioksidan savunmada ilk sırada ve çok önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır. Süperoksit anyon radikallerinin dismutasyonunu katalizler ve H₂O₂ ile moleküler oksijen oluşturur. Bu enzimden yoksun farelerde paraquat toksisitesine yatkınlık gözlenmiştir. Memelilerde oksijen serbest radikaller kadın üremesinde anormalliklere neden olurlar (163). Diğer son zamanlardaki araştırmalara göre Mn-SOD yaşam için önemlidir. Ancak Cu,Zn-SOD değildir.

SOD-1 uyarılması yaşlanmanın önlenmesi ve çevresel faktörlerden kaynaklanan zararlı etkiler ve oksidatif stres tarafından oluşturulan mutasyonların önlenmesi açısından önemlidir (157).

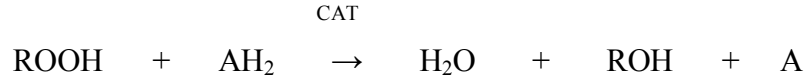
Ekstrasellüler SOD, (EC-SOD): tetrametrik, salgılayıcı, bakır ve çinko içeren bir glikoproteindir (heparin ve heparan sülfat gibi glikozaminoglikanlar için yüksek yatkınlığa sahiptir) ve interstisyel bölgelerde bulunur. Ayrıca ekstrasellüler sıvılarda bulunur ve EC-SOD plazma, lenf ve sinoviyal sıvının SOD aktivitesinin büyük kısmından sorumludur (164). Kan damarı duvarının interstisyumundaki temel antioksidan olup (165), süperoksid anyonunu temizlemek için dizayn edilmiş bilinen tek ekstrasellüler enzimdir (166). EC-SOD substratı veya diğer oksidanların (ksantin oksidaz ve hipoksantin, paraquat, pirogallol, α -naftoflavon, hidrokinon, katekol, Fe^{+2} iyonları, Cu^{2+} iyonları, bütiyonin, sulfokisimin, dietilmaleat, t-bütül hidroperoksid, kuman hidroperoksit, selenit, sitiolan ve yüksek oksijen parsiyel basıncı) memelilerde düzenlenmesi, hücrelerin oksidanlara cevabından ziyade sitokinlerle düzenlenirler (167).

EC-SOD, ekstrasellüler süperoksidin elde edilebilirliğini kontrol eder çünkü, nitrik oksitin inaktivasyonunu da içeren çeşitli fizyolojik yollar için önemlidir. EC-SOD, NO'in inaktivasyonunda birincil kontrol edici faktöre sahiptir. Nöro-davranışsal fonksiyonlar üzerindeki rolü ortaya konmuştur (168).

Nikel-SOD: Ni-SOD, streptomiçes türlerinden elde edilmiştir. Birbirinin aynı 13,4kDa'lık dört subuniteden oluşur ve 70°C'ye kadar stabildir. Siyanid ve H_2O_2 tarafından güçlü şekilde, azid tarafından ise az miktarda engellenir. Amino asit kompozisyonu demir, manganez ve çinko-bakır SOD'lerden farklıdır. Nikelden yoksun apoenzim süperoksidin, H_2O_2 'e dönüşümünde aracılık etme yeteneği yoktur ve Ni^{11} aktivitede güçlü bir role sahiptir (169).

Katalaz: Katalaz (EC,1,11,1,6) bir tetramerik hemenzimdir ve dört tane birbirinin aynı 60 kDa'luk tetrahedral subuniteden oluşur. Her bir molekül için dört ferriprotoporfirin grubu içerir. Moleküler kültesi yaklaşık 240kDa'dur. Katalaz bilinen en etkili enzimdir. Çok etkili olduğundan dolayı herhangi bir konsantrasyonda H_2O_2 tarafından doyurulamaz (170). Katalaz, H_2O_2 ile su ve moleküler oksijen oluşturmak için etkileşir ve H vericileriyle (metanol, etanol,

formik asit, fenol) 1 mol peroksit kullanarak bir çeşit peroksidaz aktivitesine benzer davranışta bulunur:



H₂O₂ enzimatik olarak aerobik organizmalarda katalaz ve çeşitli peroksidazlar tarafından parçalanır. Hayvanlarda H₂O₂'i, katalaz ve GPX defoksifiye eder. Katalaz, hücreleri içerisinde oluşan H₂O₂ 'den korur. Her ne kadar katalaz bazı hücre tipleri için normal koşullar altında çok önemli değilse de, hücrelerin oksidatif strese karşı toleransta, kazanılmış yanıtta önemli rol oynar (171). Transfeksiyona uğramış, zenginleştirilmiş katalaz hücrelerinin adriyamisin, bleomisin ve paraquat'a artmış hassasiyeti, ilaç aracılığıyla, katalaz tarafından oksijen tüketiminin engellenmesi yeteneğine bağlanabilir. Böylece H₂O₂'i hücreden kaçmadan önce yakalayarak oksijene çevirir. Bu yolla katalaz oksijen konsantrasyonunu sabit tutar. Bunu da kimyasal redüksiyonun tekrarlı turları ile veya toksinle direk etkileşerek gerçekleştirir (172).

Glutasyon peroksidaz (GPX): Selenyum içeren peroksidazlar GPX'in (EC 1,11,1,19) daha önemli örnekleridir ve GSH'ı kullanarak hidroperoksitlerin (ROOH ve H₂O₂) pek çok çeşidinin redüksiyonunu katalizlerler. Böylece memeli hücrelerini oksidatif hasara karşı korurlar.



Memelilerde en az beş GPX izoenzimi bulunmuştur. Hemen hemen her yerde eksprese edilseler de, her bir izoformun seviyesi doku tipine bağlı olarak değişebilir. Sitozolik ve mitokondriyal GPX (cGPX veya GPX1) glutasyon harcayarak yağlı asit hidroperoksitlerini ve H₂O₂'i indirger. GPX1 ve fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz GPX4 (veya PHGPX) pek çok dokuda bulunur. GPX4 hücrenin sitozol ve

membran kısmında yerleşmiştir. PHGPX direk olarak peroksida membranlarda ve okside lipoproteinlerde üretilen fosfolipid hidroperoksitlerini, yağlı asit hidroperoksitlerine ve kolesterol hidroperoksitlerine indirger (173). GPX1 çoğunlukla eritrositler, böbrekler ve karaciğerde bulunurken, GPX4 çoğunlukla renal epitelyal hücrelerde ve testiste bulunur. Sitozolik GPX2(veya GPX-G1) ve ekstrasellüler GPX3(veya GPX-P) çoğu dokuda nadiren görülürler. Fakat gastrointestinal sistem ve böbrek bunların dışındadır. Son zamanlarda yeni bulunan bir üye GPX5'dir. Özellikle fare epididiminde bulunur, selenyum'dan bağımsızdır (157).

GPX1 (80kDa) enzimatik aktivitesi için önemli olan 4 alt ünitenin her birinde bir selenosistein (Sec) içerir. Her ne kadar GPX substrat H_2O_2 'yi katalazla paylaşırsa da, tek başına başarılı bir şekilde lipid ve diğer organik hidroperoksitlerle reaksiyona girebilir. Glutasyon redoks çemberi düşük derecede oksidan strese karşı korumanın en önemli kaynağıdır. Katalaz ise ciddi oksidan strese karşı savunmada daha önemli ve etkilidir (174). Hayvan hücrelerinde ve özellikle insan eritrositlerinde H_2O_2 'in detoksifikasyonu için ana antioksidan enzimin GPX olduğu düşünülmüştür. Çünkü katalazın H_2O_2 'e yatkınlığı GPX'dan daha düşüktür (175). GPX'ı tüketmiş hücreler, paraquat ve adriamisin hasarına transfeksiyona uğramamış parental hücrelerden daha hassastır. Hafif derecede artmış paraquat ve adriamisin hassasiyeti GPX'in hücresel miktarının azalmasına bağlıdır. Bu tüm bilgilere göre; GPX, hücreleri paraquat ve adriamisinin toksisitesine karşı korur. Bu ajanlar H_2O_2 veya diğer hidroperoksitlere etkilidirler (176).

GPX, dihidrorodamin 123'in oksidasyonuna karşı GSH'ı indirgen olarak kullanan peroksinitrite karşı korur. Böylece GPX'ın bir fonksiyonu vardır ve diğer selenoproteinler, selenosistein ve selenometiyonin içerirler. Peroksinitrit aracılı oksidanlara karşı peroksinitrit gibi GSH bağımlı savunma hattının devam ettirilmesinde görev alırlar (177).

2.9.4. Serbest oksijen radikallerinin kaynakları

Normalde hücrelerde serbest radikallerin oluşması için bir çok mekanizma mevcuttur. Bunlar; mitokondriyal elektron transport zinciri, katekolaminler, ksantin oksidaz, oksidan enzimler, mikrozomal elektron transport zinciri, fagositler, Fe^{+2} hücresel otooksidasyonu ve araşidonik asit yolunu içerir (178).

Mitokondriyal Elektron transport zinciri; mitokondriyal sitokrom oksidaz aracılığıyla oksijenin suya indirgenmesi sırasında elektron akımının yaklaşık %1'i süperoksite dönüşür. SOD ve glutatyon bu süperoksit kaçacağını zararsız hale getirir (179).

Katekolaminler: Serbest oksijen radikallerinin önemli bir kaynağı da katekolaminlerin oto-oksidasyonu yolu ile H_2O_2 ve OH^- radikallerinin oluşmasıdır. (179).

Mikrozomal elektron transport zinciri: Bazı metabolizma fonksiyonları gerçekleştirilen endoplazmik retikulumda da serbest radikaller oluşturulmaktadır.

Oksidazlar: En önemli serbest radikal kaynağı oksidazlar; ksantin oksidaz, amino asit oksidaz, monoamin oksidaz ve sitokrom oksidazdır. Ksantinoksidaz potansiyel bir serbest radikal kaynağı olup, pürin katabolizmasında yer alır ve bazı durumlarda çok miktarda O_2^- üretimine neden olur (180).

Fagositler: Nötrofiller, iskemik peryodun sonunda endotelyuma bağlı olarak bulunur ve serbest oksijen radikalleri için bir mikro ortam oluşturup lokal hasarın yoğun bir şekilde ortaya çıkmasına neden olurlar (180).

Prostaglandin sentez yolu: Siklooksijenaz veya lipoksijenaz yoluyla prostaglandin sentezi sürecinde süperoksit radikalleri ve hidroksil radikalleri oluşur (178). Geçiş metallere özellikle demir ve bakır, hidroksil radikali gibi çok tehlikeli radikallerin oluşumuna neden olabilir (6).

İlaçlar, maruz kalınan çevresel kirlilik, sigara, egzoz dumanı, pestisitler gibi bazı ajanlar ve iyonize ışınlar da serbest oksijen radikallerinin üretimine neden olurlar.

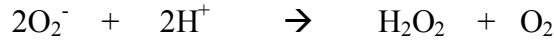
Süperoksit radikali (O_2^-):

Oksijene bir elektron eklenmesiyle oluşur (181). Süperoksit nerdeyse tüm hücrelerde oluşturulur. İç mitokondri zarındaki solunum zincirinde, ksantin oksidaz gibi flavoenzimlerce endojen olarak, iskemik reperfüzyonda lipoksijenaz ve siklooksijenaz tarafından oluşturulur (182). Sulu çözeltide zayıf bir oksitleyici ajandır ve askorbik asit, tiyol gibi molekülleri oksitleyebilir. Ayrıca güçlü bir indirgeyici ajandır ve sitokrom C, ferrik EDTA gibi demir komplekslerini indirger (183).

Süperoksitin önemli bir kaynağı da fagositik hücrelerin yabancı partiküllerle veya immün kompleksle karşılaştığında gerçekleştirdiği solunum patlamasıdır (184).

Hidrojen Peroksit (H₂O₂):

Süperoksite ikinci bir elektron eklenmesiyle peroksit iyonu, O₂²⁻ oluşur ve bununda eşlenmemiş elektronu olmadığından tam bir radikal değildir. Tüm peroksit iyonları fizyolojik pH da protonlanır ve H₂O₂ oluşur. Sıvı çözeltilerde süperoksit, dismutasyon reaksiyonuna uğrar ve H₂O₂ ile O₂ oluşturur.



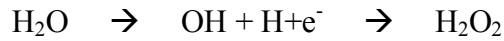
Asidik PH da dismutasyon daha da hızlıdır (184). H₂O₂ bir serbest radikal değildir. Ancak biyolojik zarlardan kolaylıkla geçer ve önemli radikallerin oluşmasında rol alır. Ayrıca hücre içi sinyal görevi yapar. Tüm bu sebeplerden dolayı çok önemlidir (185). Oksijene iki elektron transfer edilerek yine glukoz oksidaz, viral oksidaz ve aminoasit oksidaz tarafından direkt olarak oluşturulabilir (184). Katalaz, glutatyon peroksidaz ve diğer oksidazlar H₂O₂'in istenmeyen kısmını hücreden uzaklaştırırlar.

Hidroksil Radikali (OH⁻)

H₂O₂'deki O-O bağının homolitik ayrılması iki OH⁻ radikalinin üretimine neden olur. Bu olay homoliz, ısı veya iyonize radyasyonla gerçekleştirilir. H₂O₂ ve demir II tuzunun karışımı OH⁻ radikalini oluşturur ve bu ilk kez 1894'te Fenton (186) tarafından gözlemlenmiştir.



Fe⁺² ve Cu⁺² yardımıyla H₂O₂'den HO⁻ radikali oluşur. Suyun yüksek enerji ile iyonizasyonu sonucu OH⁻ radikali meydana gelir. HO⁻ radikalinin vücuttaki en önemli kaynağı bu reaksiyondur.



H₂O₂'in süperoksit (O₂⁻) ile reaksiyonu sonucu, H₂O₂ yıkılarak serbest oksijen radikallerinin en reaktif ve zarar verici türü olan hidroksil radikali oluşur.



2.9.5. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller hücrelerdeki lipit, protein, karbonhidrat, DNA ve nükleik asitler gibi komponentlerle etkileşerek hücrenin membran bütünlüğünü veya

enzimlerin aktivitesini bozabilir ya da DNA yapısında değişikliklere neden olabilirler (187).

DNA ve nükleik asitlere etki:

İyonize radyasyona maruz kalınması sonucu serbest radikaller ve aktif moleküller meydana gelirler. Bu radikallerin DNA'yı etkilemesi sonucu hücrede mutasyon meydana gelir veya hücrenin ölümüne neden olurlar. Kromozom değişiklikleri ve DNA'daki değişiklikler sitotoksitaya neden olur. H₂O₂ hücre zarından geçerek çekirdeğe ulaşır ve DNA'da hasar meydana getirir. Bu da hücre fonksiyon kaybına neden olabilir veya hücre ölümüyle sonuçlanabilir (188).

Proteinlere Etkileri:

Radikallerin etkilerine karşı en hassas olan lipitlerle karşılaştırıldığında proteinlerin hassasiyeti daha azdır. Radikallerin, monamin oksidaz ve transport proteinleri gibi membran bileşenlerine etkileri çok önemlidir. Radikallerin proteinler üzerine etkisi, amino asit dizilişleri, radikallerin oluşum yeri, hedef molekül ve antioksidanlar gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Moleküllerin serbest radikallerle etkileşimi açısından doymamış bağ ve sülfür içeren moleküller daha yüksek hassasiyete sahiptir. Histidin, metiyonin, sistein, fenilalanin, tirozin ve triptofan gibi aminoasitlerde oluşan proteinlerin serbest radikallere hassasiyetleri daha yüksektir. Disülfid bağı fazla olan albümin ve immünoglobülin G'nin üç boyutlu yapıları da etkilenir (6). Protein harabiyetinin derecesi proteinin hücre içerisindeki yerleşimine ve radikalın sitotoksik gücüne bağlıdır (189).

Karbonhidratlara Etkileri:

Radikaller bağ dokunun ana bileşenlerinden biri olan hiyaluronik asitin parçalanmasına neden olabilirler (181). Hidrojen peroksit, peroksit ve okzoaldehitler monosakkaritlerin otooksidasyonu ile oluşabilirler. Sonuçta oluşan okzoaldehitlerin proteinlere bağlanmasıyla antimitotik etki ortaya çıkar ve bu da kanser ve yaşlanmaya neden olur (189).

Lipitlere Etkileri:

Dokulardaki doymamış yağ asitlerine serbest radikallerin etkisi, lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Serbest radikallerle membran kolesterol ve yağ

asitlerinin doymamış bağları reaksiyona girerek peroksidasyon olayını gerçekleştirirler (190).

Lipit peroksidasyonu reaktif oksijen türlerinin doymamış yağ asitlerini, malondialdehit, alkol, peroksitler, pentan ve etana yıkma reaksiyonlarıdır. Bu peroksidasyon ürünleri membran akışkanlığını ve geçirgenliğini etkileyip hücre ve organelin geri dönüşümsüz hasarlanmasına neden olur (189).

Organizmada oluşan radikallerin etkisiyle yağ asitlerinin metilen grubundan bir hidrojen atomu uzaklaştırılması, lipit peroksidasyonunun başlangıç reaksiyonudur ve hidrojen atomunun uzaklaşmasıyla yağ asidi zinciri lipit radikali (L) dönüşür. Oluşan lipit radikali, lipit peroksi (LOO[•]) radikali oluşturmak için moleküler oksijenle reaksiyona girer. Diğer komşu yağ asitlerini etkileyip yeni lipit radikalleri oluşturan peroksil radikali, açığa çıkan hidrojen atomunu alıp lipit hidroperoksitlerini (LOOH) oluşturur. Peroksidasyon başladıktan sonra kendiliğinden yayılabilir. Çok sayıda yağ zinciri lipit hidroperoksitlerini oluşturabilir. Bu yüzden bu reaksiyon ilerleme reaksiyonu olarak adlandırılır (188). Lipit peroksidasyonunun ilk ürünü olan lipid hidroperoksitleri çok kararlıdır. Bir antioksidan olan E Vitamini lipit peroksidasyonunun sürekli devam etmesi durumunda bu zincirleme reaksiyonu durdurulabilir. Böylece lipit peroksidasyonunu sonlandırabilir (191).

Araşidonik asit metabolizması sonucu lipitlerden serbest radikal üretilmesine enzimatik lipit peroksidasyonu denir. İnsan enzimatik lipit peroksidasyonu ise diğer radikaller tarafından gerçekleştirilir (6).

Malondialdehid (MDA) ile tiobarbitürik asit, üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşur. Lipit peroksidasyonunun belirlenmesinde MDA ve tiobarbitürik asit ile reaksiyon veren maddelerin (TBARS) plazma ve eritrosit düzeyi ölçümü kullanılır (187).

Çölyak hastalığının patogenezi araştırmaya yönelik çalışmalarda oksidatif stresin oldukça önemli olduğu gözlenmiştir (192). Oksidatif stres belirteçlerinden TBARS (thiobarbituric asid-reactive substance) ve karbonil grupları araştırılmış olup, çölyak hastalarında redoks dengesinin bozulduğu, bunun da protein ve lipidlerde ciddi hasarlara neden olduğu saptanmıştır (192). Yine bu çalışmalarda, çölyak hastalığında bir antioksidan enzim olan SOD aktivitesinde önemli derecede

artış gözlenirken, bir diğer antioksidan enzim olan GSH-Px aktivitesinde ise çok anlamlı düzeylerde azalmalar meydana geldiği tespit edilmiştir (193).

2.10. Antioksidan Enzimler

2.10.1. İnsan Antioksidan Genleri, Özellikleri ve Polimorfizmler

SOD1: Bakır/Çinko-SOD (SOD1) homodimer olarak yaklaşık tüm hayvan hücrelerinin sitozolinde bulunurlar. Memelilerde Cu/Zn-SOD'un en yüksek seviyeleri, karaciğer, eritrositler, beyin ve nöronlarda bulunur. SOD1 geni beş ekzon bulundurur (194) ve kromozom 21q22,1 de yerleşmiştir (195). Bugüne kadar yapılan araştırmalarda ailesel amiyotrofik lateral skleroz (FALS) hastalarında Cu/Zn -SOD geninde 58 mutasyon belirlenmiştir.

SOD2: Manganez içeren SOD (SOD2), Cu/Zn SOD'a benzer bir rol oynar. Süperoksit radikallerin birincil hücrel kaynağı mitokondri sınırları içindedir. Memelilerde bu enzimin en yüksek seviyelerine kalp, beyin, karaciğer ve böbreklerde rastlanmaktadır (196).

MnSOD: Bir homotetramerdir ve her bir alt ünite 196 aminoasit içerir, beş ekzon içeren bir tek gen tarafından kodlanır ve kromozom 6q25 üzerinde yerleşmiştir. Cu/ZnSOD'un tersine bugüne kadar sadece birkaç mutasyon belirlenmiştir. En geniş kapsamlı çalışılan polimorfizm mitokondriyal hedef sırasında 16. pozisyonda yerleşmiştir. Valin yerine alanin geçmesiyle sonuçlanır (197). Bu polimorfizmin lider sinyalin yapısını değiştirdiği ve böylece MnSOD'un mitokondriye taşınmasını etkilediği belirtilmiştir (198). MnSOD'un alanin varyantı artmış meme kanseriyle (199), Parkinson hastalığıyla (198) ve motor nöron hastalığıyla (200) ilişkilidir. Valin ise homozigot genotipi, ailesel olmayan idiyopatik kardiyomyopati ile bağlantılı bulunmuştur (201).

SOD3: Ekstrasellüler-SOD (ECSOD/SOD3), sekretuar, bakır ve çinko içeren tetramerik bir glikoproteindir. ECSOD: SOD aktivitesinin çoğunluğundan sorumludur ve sinovyal sıvı, plazma ve lenf sıvısında bulunur. Fakat bu enzimin öncelikle endotelial hücre yüzeyindeki heparin proteoglikanlara bağlı olduğu tespit edilmiştir. SOD3 geni üç ekzon içerir ve kodlayan bölge 3. ekzonda yer alır (202) ve 4pter-q21'de haritalanmıştır (203).

GPX1: Selenyum içeren glutatyon peroksidaz1 (GPX1), dört alt ünitesinin her birinde selenosistein içerir. GPX1 geni kromozom 3p21.3'te yerleşmiş olup (10), iki ekzon içermektedir (204). Bu enzim özellikle eritrositlerde, böbrekte ve karaciğerde çok miktarda olmak üzere insanlarda her yerde bulunur (135). Moskow ve arkadaşları (205), GPX1 geninin ekzon1'inde bir polialanin alanında değişen sayılarda GCG (alanin) tekrarlarını buldular. Bir diğer çalışmada, üç allel, ALA*5, ALA*6 ve ALA*7 gözlemlendi ve bunların azalmış enzim aktivitesiyle ilişkili olmadığı saptandı (206). Ayrıca bu alleller, üç nükleotid değişimi gösterir. Bu değişimlerin; +2'de bir T-C değişimi, -592'de bir G-A değişimi ve 197. pozisyonda (Pro-Leu) bir amino asit değişimi olduğu gösterilmiştir (205). Pro-Leu değişimine neden olan bir SNP da belirlenmiştir (207). GPX1 (-/-) fare normal bir fenotip gösterir (208). Coksaike virüsünün avirulan bir türü ile infeksiyonu takiben myokardite neden olmaktadır (209).

GPX2: GPX2 geni iki ekzon içerir ve kromozom 14q24.1'de yerleşmiştir. Bu gende iki polimorfizm bildirilmiştir. Örneğin. bir A-T değişimi ve TC tekrarlarının bir mikro uydusu. Bunların her ikisi de introndadır (210). Sitolik selenyum-bağımlı GPX2, öncelikli olarak gastrointestinal peroksidlerin toksisitesine karşı koruyucudur (135).

GPX3: Ekstrasellüler GPX3 temel olarak plazmada bulunur. Ayrıca böbrek, akciğer, kalp ve plasentada saptanmıştır. Bu enzim GPX4'ten daha az olsada, fosfatidilkolin gibi daha kompleks lipidlerin hidroperoksidlerini indirgemektedir (211). GPX3 geni beş ekzon içerir ve kromozom 5q32-q33.1'de yerleşmiştir (212). Bugüne kadar bir polimorfizm bildirilmemiştir (135).

GPX4: Fosfolipid hidroperoksid GPX4 (PHGX4) varlığı birçok dokuda belirlenmiştir. Hem sitolde hem de membranla ilişkilidir. Diğer GPXler tetramerken, onların aksine bir monomer olarak bulunurlar. Küçük boyutludurlar ve hidrofobik yüzeyi, membranlarda peroksidize fosfolipidlerin ve kolesterolün indirgenmesine neden olur (213). Mitokondriyal PHGPX hücreleri oksidatif stresten korumada öncelikli olarak rol alırlar (214). Aktivitesi genellikle GPX1'den daha düşüktür ve testis hariç tüm dokularda bulunur (211). GPX4 spermin baş kısmındaki, proteinin %50'sini oluşturur. Yapısal protein olarak fonksiyon gören GPX4 geni yedi

ekzon içerir ve kromozom 19p13.3'de yerleşmiştir. Potansiyel bir alternatif olarak, dokuya özel birinci ekzon tarif edilmiştir (215).

KATALAZ: Katalaz geni 13 ekzon içerir ve kromozom 11p13'de yerleşmiştir. Katalaz geninde çeşitli mutasyonlar/polimorfizmler belirlenmiştir ve çoğu akatalazemia ile ilişkilidir. Otozomal resesif özelliğe sahiptir. Japonlarda, akatalazemia G/A nokta mutasyonu intron 4'tedir ve anormal bölünmeye ve bir mutasyon oluşmasına neden olur. Bir T silinmesine ek olarak ekzon 4'te bir çerçeve kayması meydana gelmektedir (216). Katalaz geninde diğer polimorfizm/mutasyonlar da, belirlenir. Bunlardan; T49C, T111C ve T/C intron 1'de, A/G intron 7'de; A/G poly(A)'dan aşağı tarafta ve promoterde, A/T pozisyon -21'de; C/A pozisyon -20'de, C/T pozisyon -18'de ve bir genel T/C polimorfizmi -262'de yerleşmiştir. Bir genel T/C değişimi nükleotid pozisyonu 1167'de bulunur (134).

2.11. ÇH ve Antioksidan Sistem

Bağımsız olarak var olan ve bir veya daha fazla ortaklanmamış elektrona sahip molekül veya atomlar serbest radikaller olarak adlandırılırlar (217). Bu özellikleri serbest radikallerin magnetik bir alana çekilmesine neden olur ve onları yüksek derecede reaktif hale getirir. Stabil hale gelebilmek için çevrelerindeki organik ve inorganik moleküllerle tepkimeye girerek serbest elektronlarını eşleştirirler. Bu tepkime esnasında reaksiyona girdiği diğer molekülünde eşleşmemiş elektrona sahip olmasına neden olur. Sonuç olarak tek bir radikal, elektron transfer reaksiyon zincirinin başlamasına neden olur (6).

1970'lere kadar, serbest radikaller çoğunlukla gıda teknolojileri polimer araştırmacıları ve radyasyon kimyagerleri tarafından araştırılıyordu. 1970'lerden sonra serbest radikallerin insan vücudunda sürekli üretildiği ve bunların antioksidan savunma mekanizmalarıyla ortadan kaldırılmaya çalışıldığı görülmüştür. Ancak serbest oksijen radikallerinin araştırılmasında en önemli gelişmeler, Mc Card ve Fridowich tarafından süperoksit dismutazın (SOD) keşfedilmesi sürecinde gerçekleşmiştir. Son zamanlarda serbest oksijen radikallerinin pek çok patolojik süreçte zararlı etkilerinin varlığı belirlenmiştir (218). En çok kullanılan ve bütün hücrelere rahatlıkla girebilen madde moleküler oksijendir (O_2). Elektron transferi aracılığıyla moleküler oksijen, suya kadar indirgenir. Bu yolda 4 elektron

kullanılarak, süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit ve hidroksil radikali (OH^-) gibi ara moleküller oluşur. Bunlar reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılırlar (185).

3.GEREÇ ve YÖNTEM

06.01.2009 tarihinde Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Tıbbi-Cerrahi-İlaç Araştırmaları Etik Kurulundan 08-GEKTIP-38 Proje numarası ile gerekli onay alındı. Çalışmamızda kontrol ve hasta grubunu oluşturacak bireyler, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Merkezi Dahiliye ve Pediatri polikliniğine gelen ve dahiliye ve pediatri uzmanı doktorlar tarafından değerlendirildikten sonra moleküler analiz uygulanan bireylerden seçildi. Çalışmamızdaki analizler için kullanılan örnek sayısı Çölyak hastaları için 117, kontrol grubu için 148 olarak belirlendi ve gerekli onam formları hasta ve kontrol gruplarından alındı. Hasta ve kontrol gruplarından tam kanlar antekübital venden, içinde disodyum etilendiamin tetraasetik asit (EDTA; 3 mg/L) olan bir tüpe alındı. EDTA'lı tam kan örneklerinden standart metodlarla DNA izolasyonu yapıldı.

3.1. DNA İzolasyonu:

Tam kandan DNA izolasyonu; Roche firmasının kiti (High Pure PCR Template Preparation Kit) kullanılarak yapılmıştır. Aşağıdaki deney protokolü uygulanmıştır.

- EDTA'lı tüpte bulunan kan oda sıcaklığına getirildikten sonra alt-üst edilerek homojenize edilir.
- EDTA'lı tüpte bulunan tam kandan 200 µL propilen tüpe alınır.
- Propilen tüpe alınan tam kanın üzerine 200 µL bağlayıcı solüsyon (Binding Buffer) ve 40 µL Proteinaz K konduktan sonra karıştırılır.
- Isı bloğunda 10 dakika boyunca 70 °C sıcaklığında inkübe edilir.
- 100 µL izopropanol üzerine eklendikten sonra karıştırılır.
- High Pure filtrelili tüpe konulan karışım 1 dk 8,000 x g'de santrifüj edilir.
- Dipte kalan sıvı uzaklaştırılır.

- Filtreli tüpe 500 µL inhibitör uzaklaştırıcı solüsyon (inhibitör removal buffer) eklenir.
- 1 dk 8,000 x g'de santrifüj edilir.
- Dipte kalan fazla sıvı uzaklaştırılır.
- 500 µL yıkama solüsyonu (Wash Buffer) filtreli tüpe eklenir.
- 8,000 x g'de 1 dk santrifüj edilir.
- Dipte kalan fazla sıvı uzaklaştırılır.
- 500 µL yıkama solüsyonu (Wash Buffer) tekrar filtreli tüpe eklenir.
- 8,000 x g' de 1 dk santrifüj edilir.
- Daha sonra filtreli tüp yeni bir propilen tüpe alınır.
- 10 saniye 13,000 x g'de santrifüj edilir.
- Daha sonra filtreli tüp tekrar yeni bir propilen tüpe alınır.
- Önceden 70 °C sıcaklıkta ısıtılmış 200 µL elüsyon solüsyonu (Elution Buffer) filtreli tüpe konulur.
- 8,000 x g'de 1 dk santrifüj edilir ve filtre uzaklaştırılır.
- Kalıp DNA propilen tüpte bulunmaktadır.

Çalışmalarda elde edilen bu materyal DNA olarak kullanıldı.

3.2. GSH-Px Enzimine Ait primer ve Prob Tasarımı

Forward 5'- ACTTTGAGAAGTTCCTGGTG

Reverse 5'- TTCCTCCCTCGTAGGTTTAG

PROBE1 5'- LC640-TGCTGTCTCAAGGGCCAG—PH

PROBE2 5'- CAGACCATTGACATCGAGCCTGACATCGAA—FL

3.3. SOD Enzimine Ait Primer ve Prob Tasarımı

Forward 5'- CAGCCTGCGTAGACGGTCCC

Reverse 5'- CGTGGTGCTTGCTGTGGTGC

SENSOR 5'- CTCCGGCTTTGGGGTATCTG—FL

ANCHOR 5'- LC640-GCTCCAGGCAGAAGCACAGCCTCC—PH

GSH-Px enzim polimorfizmi için uygulanan RT-qPCR deney protokolü:

Items (İçerik)	Volume (Hacim)	Initial concent (başlangıç konsantrasyonu)	Final concent (Son konsantrasyon)
Sterile ddH2O	3.4 µL		
MgCl ₂	1.6 µL	25 mM	2 mM
GPX-Prim _{forw}	2 µL	5 pmol/µL	0.5 µM
GSH-Px Prim _{rev}	2 µL	5 pmol/µL	0.5 µM
GSH-Px -Probe Fluo (1)	2 µL	1.5 pmol/µL	0.15 µM
GSH-Px Probe LC640 (2)	2 µL	1.5 pmol/µL	0.15 µM
LC FastStart Master Hyb	2 µL	10X	1X
DNA Template	5 µL		200-400 ng/50 µL
Total Volume (Toplam hacim)	20 µL		

Gsh px enzim polimorfizmi için uygulanan RT-qPCR protokolü

Program	Denaturation	Cycling			Melting			Cooling
Analysis Mode	None	Quantification			Melting Curves			None
Cycles	1	40			1			1
Segment	1	1	2	3	1	2	3	1
Target Temperature (C)	95	95	50	72	95	40	85	40
Hold (sn)	600	10	20	20	0	30	0	30
Ramp Rate (C/sn)	20	20	20	20	20	20	0,1	20
Acquisition Mode	None	None	Single	None	None	None	Cont.	None

Mn-SOD enzim polimorfizmi için uygulanan RT-qPCR deney protokolü:

Items (İçerik)	Volume (Hacim)	Initial concent (başlangıç konsantrasyonu)	Final concent (Son konsantrasyon)
Sterile ddH ₂ O	3.4 µL		
MgCl ₂	1.6 µL	25 mM	2 mM
GPX-Prim _{forw}	2 µL	5 pmol/µL	0.5 µM
GSH-Px-Prim _{rev}	2 µL	5 pmol/µL	0.5 µM
GSH-Px Probe Fluo (1)	2 µL	1.5 pmol/µL	0.15 µM
GSH-Px Probe LC640 (2)	2 µL	1.5 pmol/µL	0.15 µM
LC FastStart Master Hyb	2 µL	10X	1X
DNA Template	5 µL		200-400 ng/50 µL
Total Volume (Toplam hacim)	20 µL		

SOD enzim polimorfizmi için uygulanan RT-qPCR protokolü

Program	Denaturation	Cycling			Melting			Cooling
Analysis Mode	None	Quantification			Melting Curves			None
Cycles	1	40			1			1
Segment	1	1	2	3	1	2	3	1
Target Temperature (C)	95	95	60	72	95	40	85	40
Hold (sn)	600	10	20	20	0	30	0	30
Ramp Rate (C/sn)	20	20	20	20	20	20	0,1	20
Acquisition Mode	None	None	Single	None	None	None	Cont.	None

3.4. Araştırma Verilerinin Analizi:

Araştırmamızda elde ettiğimiz verilerin analizi Statistical Packages for the Social Sciences (SPSS) 15.0 paket programı ile yapılmıştır. Tek örnek Kolmogorov-Smirnov testi ile s¼rekli değişkenler incelenmiş, Student's t-testi normal dağılım özelliği gösteren s¼rekli verilerin iki gruba g¼re karşılaştırılmasında, ikiden fazla grupların karşılaştırılmasında tek y¼nl¼ varyans analizi, ilişkilerin g¼sterilmesinde Pearson korelasyon analizi uygulanmıştır. Man-Whitney U testi ile normal dağılım g¼stermeyen s¼rekli değişkenlerin ikili grup karşılaştırmaları yapılmıştır.

Ki-kare (X^2) testi kategorik veri analizinde kullanılmış, Lojistik regresyon analizi gruplararası anlamlı dağılım farkı g¼steren kategorik verilere uygulanmıştır.

4. BULGULAR

İncelemesi yapılan toplam 265 DNA ¼rneđinin 117 tanesi ¼¼lyak hastalığı i¼in DQA1*0501, DQB1*0201 ve DRB1*04 mutasyonu olan hasta grubu, 148 tanesi ise ¼¼lyak i¼in mutasyon g¼stermeyen kontrol grubudur. Yapılan laboratuvar araştırmaları sonrasında elde edilen veriler tablo ve şekiller halinde aşağıda sunulmuştur.

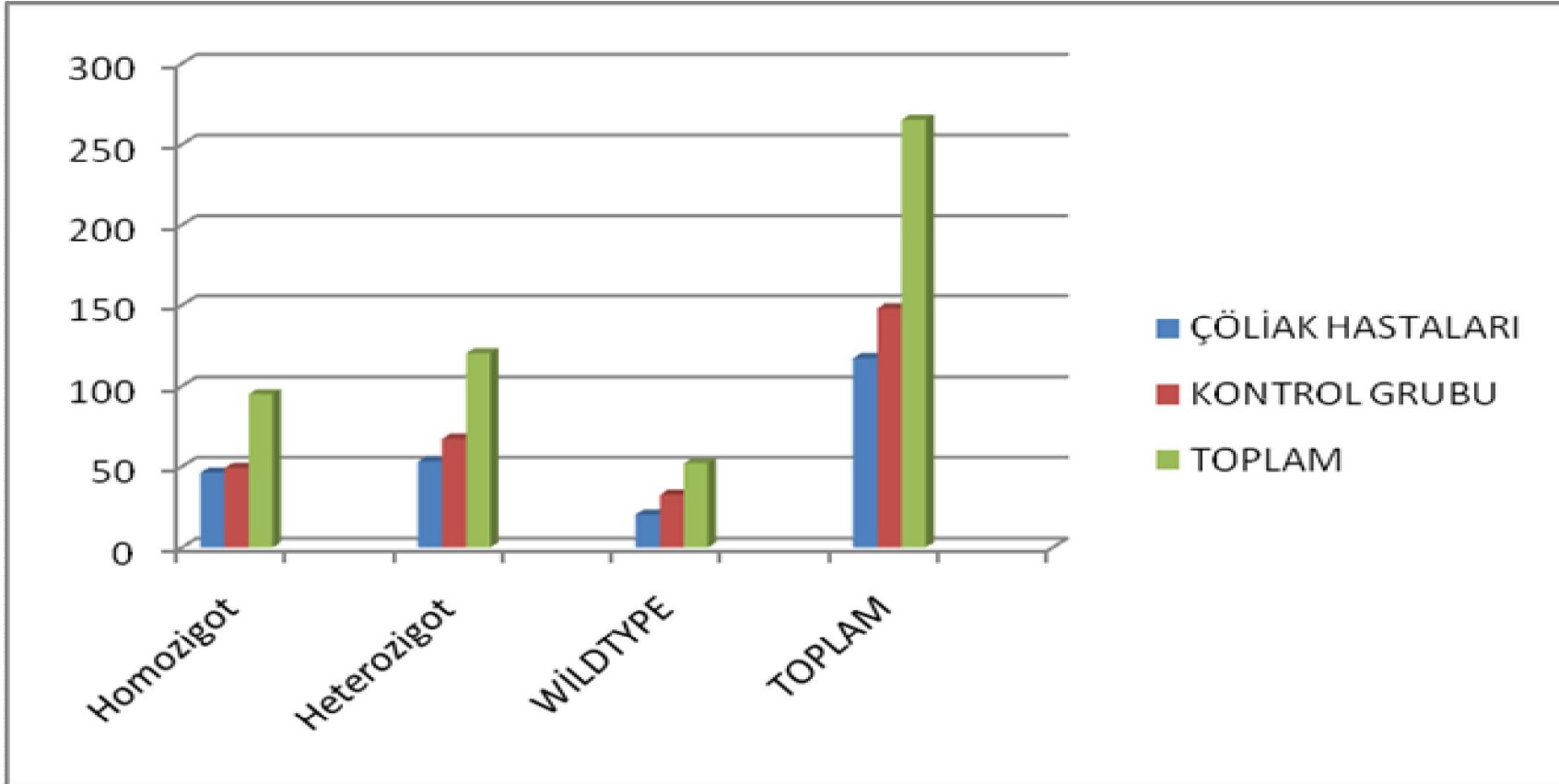
şekil 8'de ¼¼lyak hastaları ile kontrol grubunda SOD polimorfizminin dağılım grafiğinde de g¼r¼ld¼đ¼ gibi hem hasta grubunda hem kontrol grubunda heterozigotların oranı homozigotlardan y¼ksek olarak g¼r¼l¼rken wildtype'lar ise en az oranda g¼r¼lenlerdir.

şekil 12'de ise ¼¼lyak hastaları ile kontrol grubunda GSH-Px polimorfizminin dağılımının grafiği ile yine heterozigotların bu kez wildtype'lardan daha y¼ksek oranda g¼r¼ld¼đ¼ ve homozigotların en az oranda olduğu g¼r¼lmektedir.

Tablo 1: Çölyak hasta grubu ile kontrol grubunda SOD polimorfizminin dağılımı

SOD POLİMORFİZMİ	ÇÖLYAK HASTALARI		KONTROL GRUBU		TOPLAM	
	S	%	S	%	S	%
Homozigot	46	39.31	49	33.10	95	35.85
Heterozigot	52	44.44	67	45.27	119	44.91
WİLDTYPE	19	16.25	32	21.63	51	19.24
TOPLAM	117	100.0	148	100.0	265	100.0

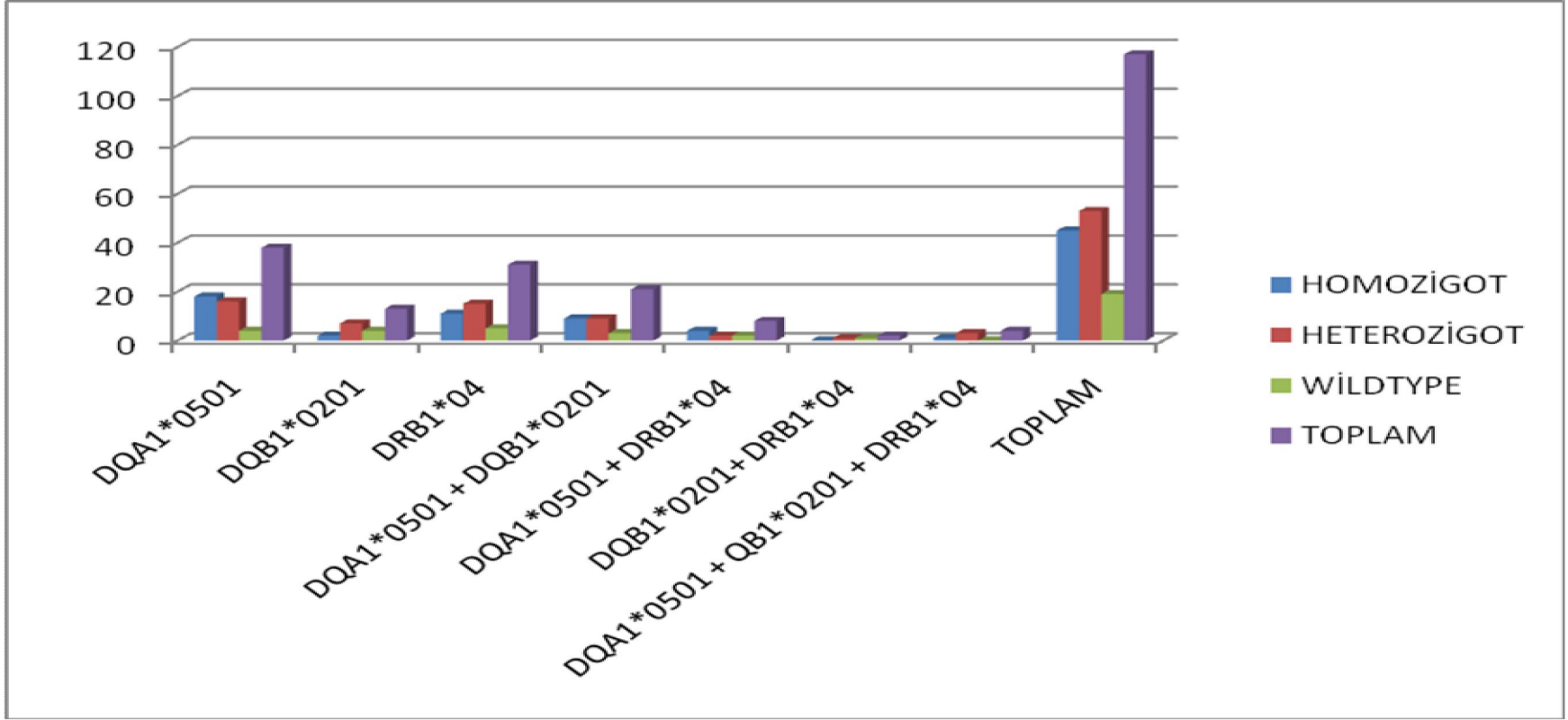
χ^2 : 1.36 p=0.505



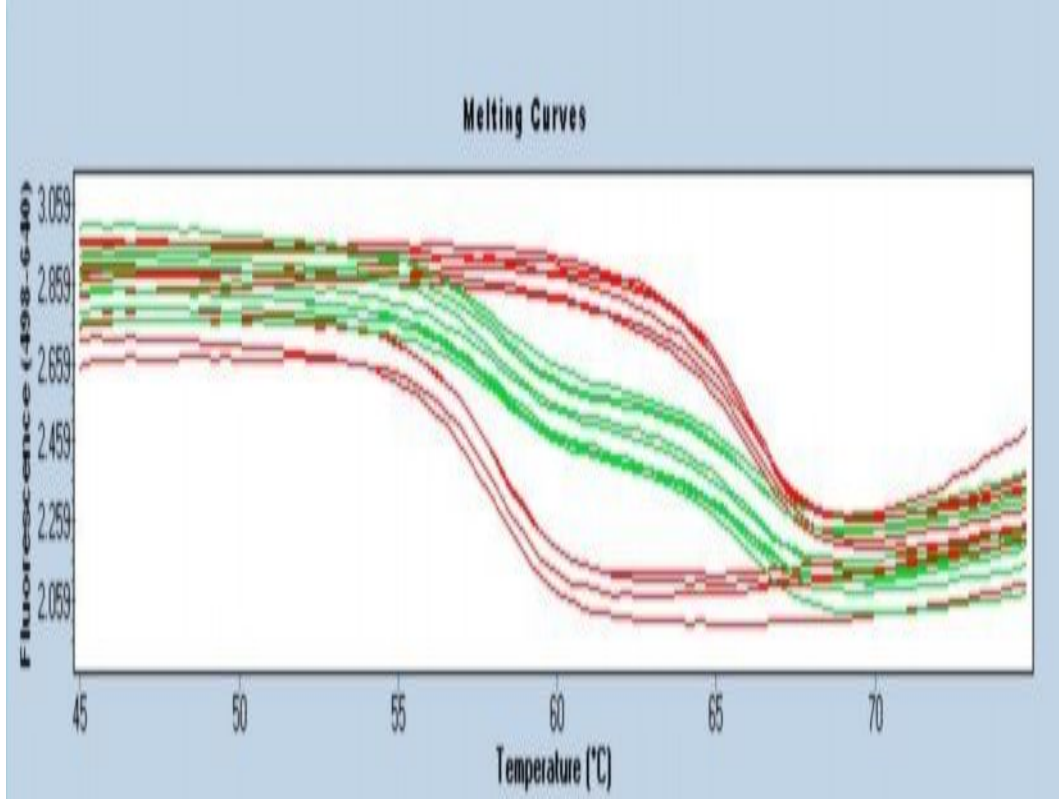
Şekil 8: Çölyak hastaları ile kontrol grubunda SOD polimorfizminin dağılım grafiği

Tablo 2: SOD polimorfizminin ÇH mutasyonlarına göre dağılımı

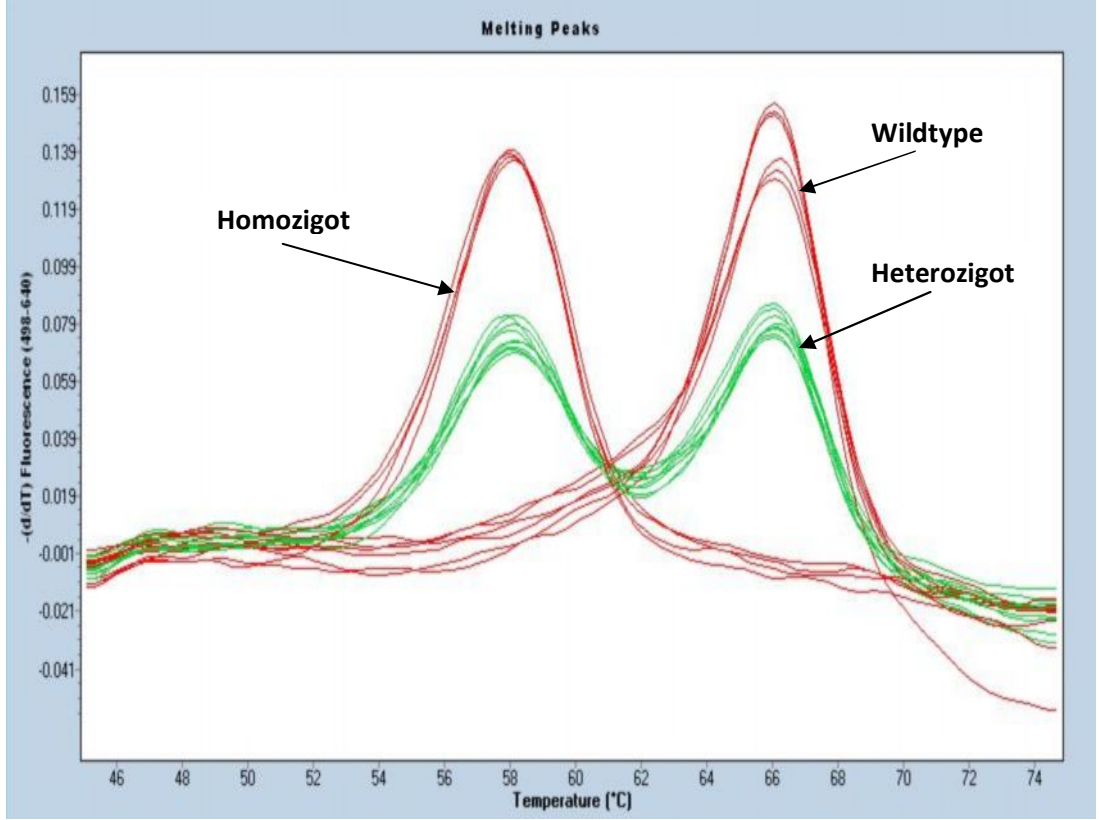
SOD POLİMORFİZMİ	ÇÖLİAK HASTA GRUBU														TOPLAM	
	DQA1*0501		DQB1*0201		DRB1*04		DQA1*0501 + DQB1*0201		DQA1*0501 + DRB1*04		DQB1*0201+ DRB1*04		DQA1*0501 + QB1*0201 + DRB1*04			
	S	%	S	%	S	%	S	%	S	%	S	%	S	%	S	%
HOMOZİGOT	18	47.36	2	15.36	11	35.48	9	42.88	5	62.50	--	--	1	25.0	46	%39.32
HETEROZİGOT	16	42.10	7	53.80	15	48.39	9	42.88	1	12.50	1	50.0	3	75.0	52	%44.44
WİLDTYPE	4	10.54	4	30.74	5	%16.13	3	14.24	2	25.00	1	50.0	--	--	19	%16.24
TOPLAM	38	100.0	13	100.0	31	100.0	21	100.0	8	100.0	2	100.0	4	100.0	117	100.0



Şekil 9: SOD polimorfizminin, sık görülen çölyak mutasyonlarına göre dağılımı grafiğinde; çalışmamıza dahil edilen 117 çölyak hastalık mutasyonu taşıyan hastalarda en fazla DQA1*0501 mutasyonu görülmüş olup, onu DRB1*04 ve diğer bir veya birden fazla mutasyonun birlikte bulunduğu kombine mutasyonların izlediği gözlenmiştir.



Şekil 10: SOD için erime eğrileri



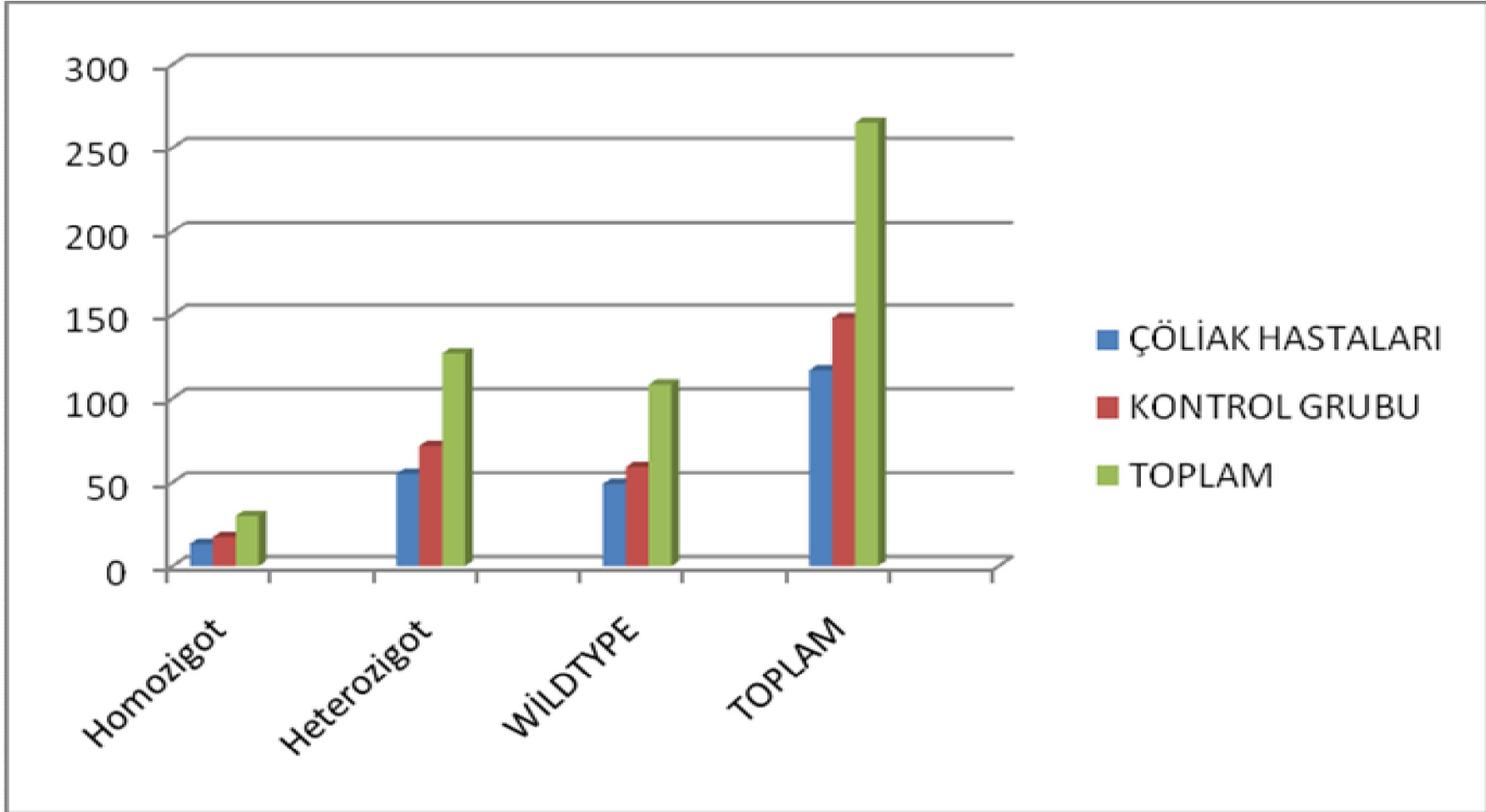
Şekil 11: SOD için erime pikleri

Tm 56 °C de gösterilen pikler SOD Enzimi için C (sitozin) gelmesi gerekirken T (timin) bazının yerleştiği mutant olan alleleri, Tm 65 °C civarında görülen pikler ise wildtype alleleri gösterirken, her iki Tm de de pik olanlar ise heterozigot alleleri göstermektedir.

Tablo 3: Çölyak hasta grubu ile kontrol grubunda GSH-Px polimorfizminin dağılımı

	ÇÖLİAK HASTALARI		KONTROL GRUBU		TOPLAM	
	S	%	S	%	S	%
GSH-Px POLİMORFİZMİ						
Homozigot	13	11.11	17	11.49	30	11.32
Heterozigot	55	47.01	72	48.65	127	47.92
WİLDTYPE	49	41.88	59	39.86	108	40.75
TOPLAM	117	100.0	148	100.0	265	100.0

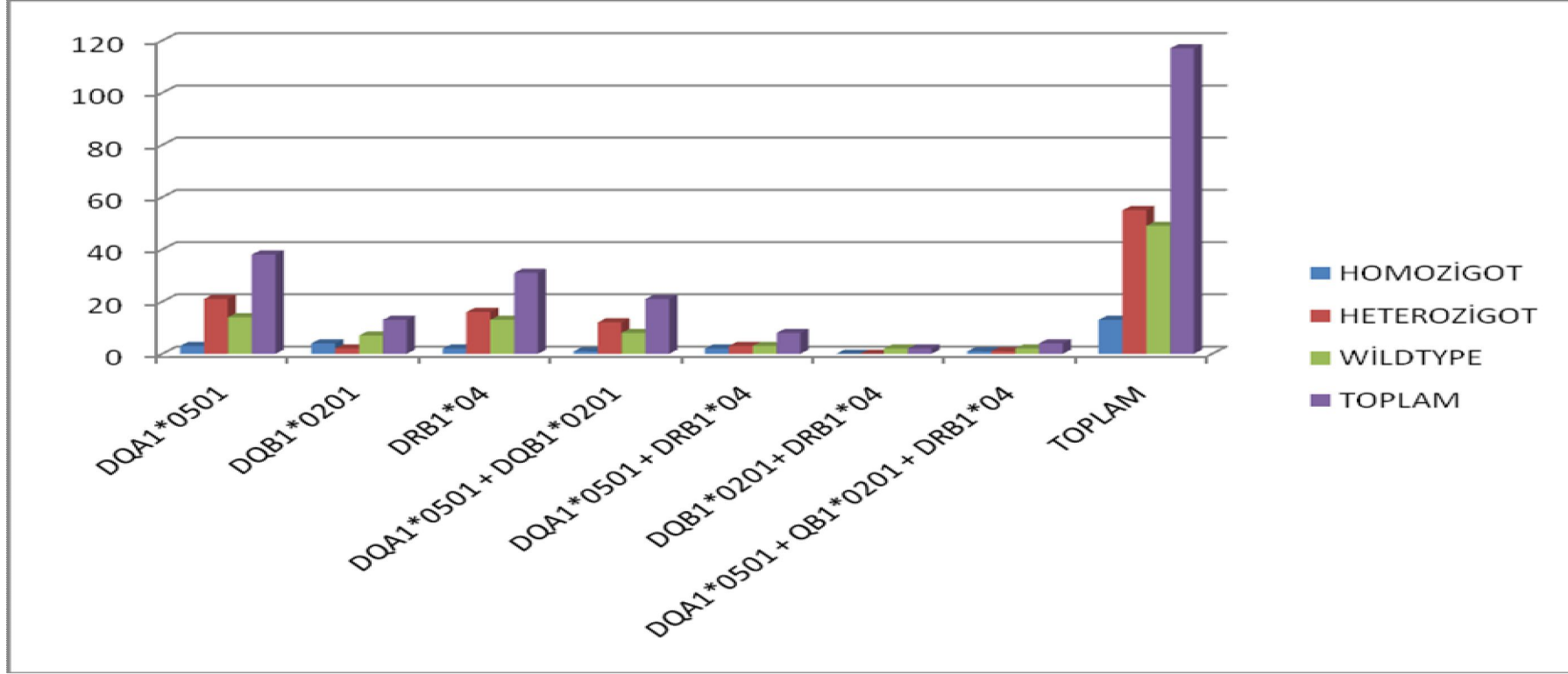
χ^2 : 0.11 p: 0.9



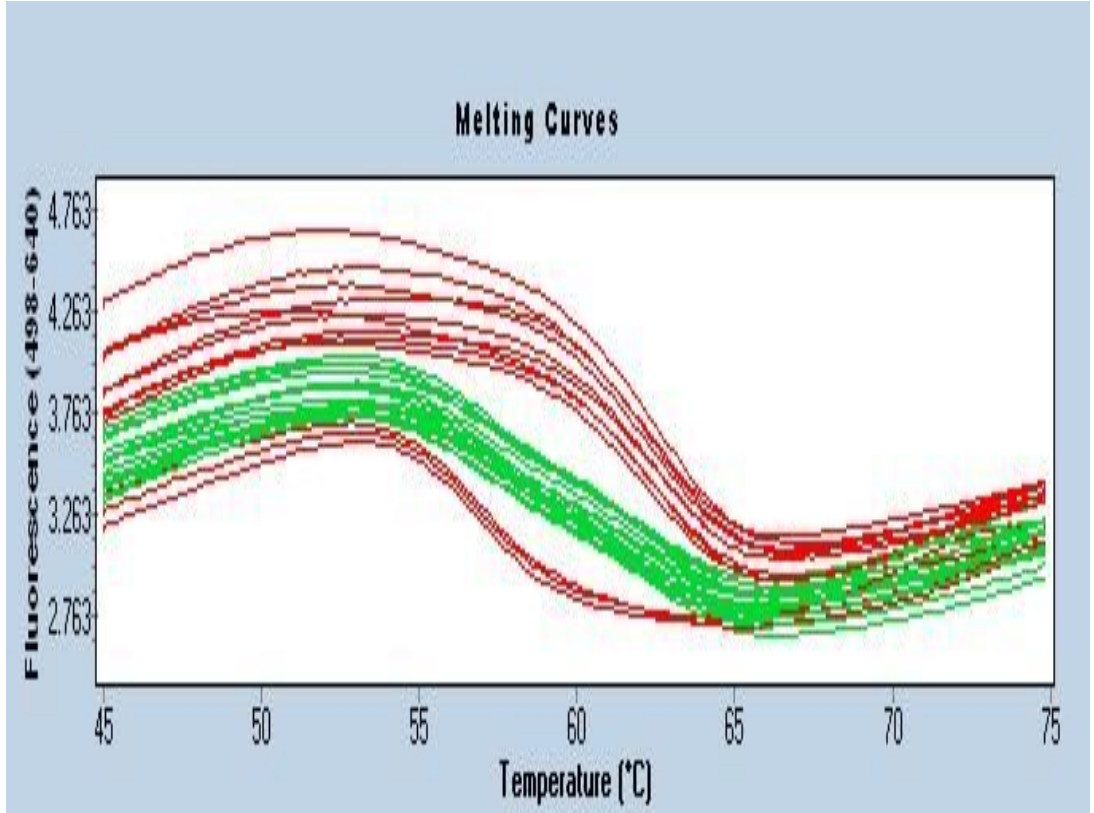
Şekil 12: Çölyak hastaları ile kontrol grubunda GSH-Px polimorfizminin dağılımının grafiği

Tablo 4: GSH-Px polimorfizminin ÇH mutasyonlarına göre dağılımı

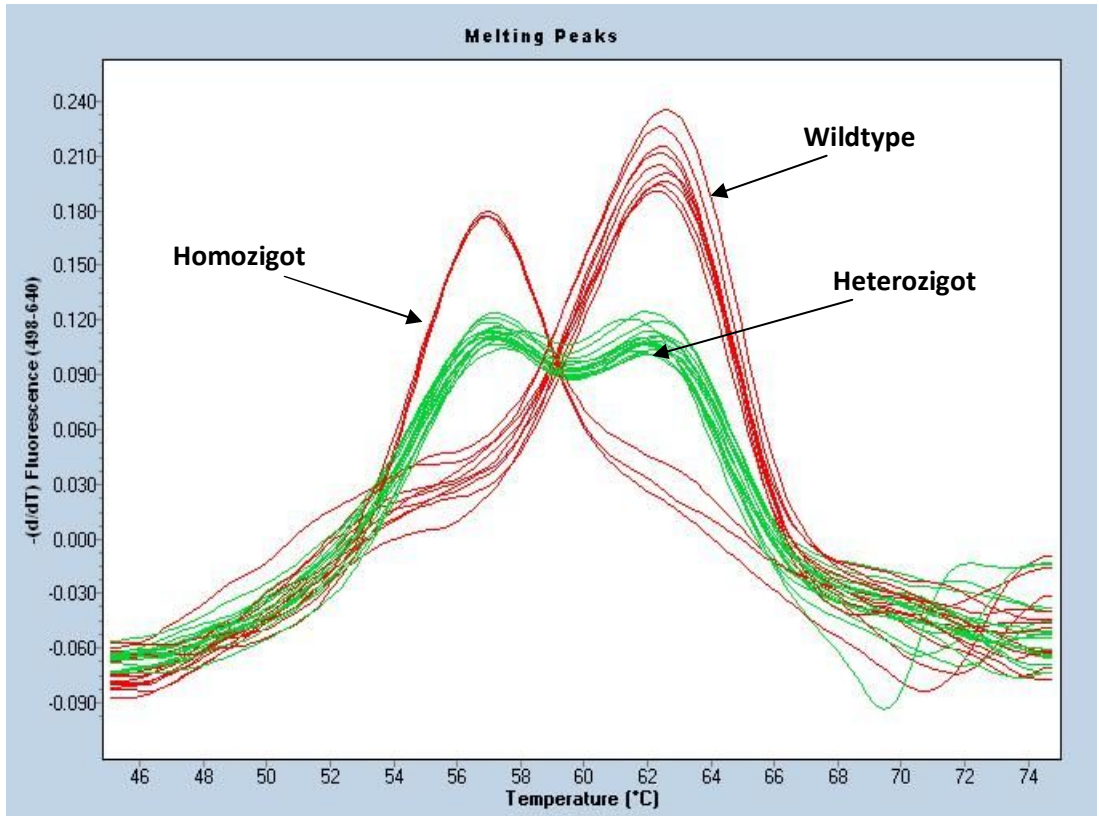
GSH-Px POLİMORFİZMİ	ÇÖLİAK HASTA GRUBU														TOPLAM	
	DQA1*0501		DQB1*0201		DRB1*04		DQA1*0501 + DQB1*0201		DQA1*0501 1 + DRB1*04		DQB1*0201 + DRB1*04		DQA1*0501 + QB1*0201 + DRB1*04			
	S	%	S	%	S	%	S	%	S	%	S	%	S	%	S	%
HOMOZİGOT	3	%7.9	4	%30.8	2	%6.5	1	%4.8	2	%25	--		1	%25	13	%11.1
HETEROZİGOT	21	%55.3	2	%15.4	16	%51.6	12	%57.1	3	%37.5	--		1	%25	55	%47.0
WİLDTYPE	14	%36.8	7	%53.8	13	%41.9	8	%38.1	3	%37.5	2	%100	2	%50	49	%41.9
TOPLAM	38	%100	13	%100	31	%100	21	%100	8	%100	2	%100	4	%100	117	%100



Şekil 13: GSH-Px polimorfizminin sık görülen çölyak mutasyonlarına göre dağılımı grafiği incelendiğinde; 117 çölyak hastalık mutasyonu taşıyan hastalarda yine SOD polimorfizminde gözlediğimiz gibi en fazla DQA1*0501 mutasyonu görülmüş olup, onu DRB1*04 ve diğer bir veya birden fazla mutasyonun birlikte bulunduğu kombine mutasyonların izlediği saptanmıştır.



Şekil 14: GSH-Px için erime eğrileri



Şekil 15: GSH-Px için erime pikleri

Tm 57 °C de GSH-Px enzimi için gösterilen pikler C (sitozin) gelmesi gerekirken T (timin) bazının yerleştiği mutant olan alleleri gösterirken, 66 °C civarında görülen pikler ise wildtype alleleri ve heriki Tm de de pike sahip olanlar ise heterozigot alleleri göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Serbest radikaller; bir veya daha fazla sayıda ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküller olarak tanımlanmaktadır. Yapılarında bulunan bu eşlenmemiş elektronların varlığı serbest radikallerin magnetik bir alana çekilmesine neden olur ve onları yüksek derecede reaktif hale getirir. Stabil hale gelebilmek için çevrelerindeki organik ve inorganik moleküllere tepkimeye girerek serbest elektronlarını eşleştirirler. Bu tepkime esnasında reaksiyona girdiği diğer moleküllerde de eşleşmemiş elektronların oluşmasına neden olurlar. Sonuç olarak tek bir radikal elektron transferi reaksiyon zincirinin başlamasına neden olabilir (6). 1970'lere kadar, serbest radikaller çoğunlukla gıda teknolojileri polimer araştırmacıları ve radyasyon kimyagerleri tarafından araştırılıyordu. 1970'lerden sonra serbest radikallerin insan vücudunda sürekli üretildiği ve bunların antioksidan savunma mekanizmalarıyla ortadan kaldırılmaya çalışıldığı görülmüş. Ancak serbest oksijen radikallerinin araştırılmasında çok önemli gelişmeler, Mc Card ve Fridowich tarafından süperoksit dismutazın (SOD) keşfedilmesiyle gerçekleşmiştir. Son zamanlarda serbest oksijen radikallerinin zararlı etkilerinin pek çok patolojik süreçte önemli bulguları belirlenmiştir (7). Vücudumuzda üretilen en önemli serbest radikaller süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil (OH^{\cdot}) radikalleridir. Moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi ile süperoksit anyonu oluşurken, moleküler oksijenin iki elektron ve iki proton alması ile hidrojen peroksit oluşur. Hidrojen peroksidin geçiş metalleri yardımıyla indirgenmesi sonucunda da hidroksil radikalleri oluşmaktadır. Bunlar reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılırlar (4). OH^{\cdot} radikali SOR'dan daha toksiktir. SOR veya OH^{\cdot} radikalın biyolojik moleküller üzerine etkimesiyle üretilen lipid radikalleri, lipid peroksi radikalleri, pürin ve pirimidin radikallerini SOR'un neden olduğu düşünülen zarar verici etkilerin birçoğundan sorumludurlar (136).

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücudumuzda bir çok savunma sistemi gelişmiştir. Bunlar antioksidan savunma sistemi veya kısaca antioksidanlar olarak bilinirler. Antioksidanlar enzim endojen ve eksojen kaynaklı olarak sınıflandırılabilirler. Endojen antioksidanlar da enzim olanlar ve olmayanlar şeklinde 2 ye ayrılabilirler. Enzim yapılı

antioksidanlara; süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz, hidroperoksidaz örnek verilebilirler. Enzim olmayanlar; lipid fazda bulunan (alfa tokoferol, beta karoten) ve sıvı fazda bulunanlar: seruloplazmin, melatonin, askorbik asit, sistein, urat, transferin, laktoferin, myoglobin, hemoglobin, ferritin, metionin, bilirubin, glutatyon olarak sayılabilir (7). Serbest oksijen radikalleri (SOR) bu antioksidan savunma sistemi tarafından fizyolojik olarak ya tamamen ortadan kaldırılırlar veya zararsız metabolitlere dönüştürülürler. Vücutta serbest oksijen radikali üretimi ile bu oksijen radikallerini temizleyen antioksidan savunma sistemi arasında bir denge durumu söz konusudur. Serbest radikallerin aşırı derecede artması veya antioksidanların yetersiz kaldığı hallerde, bu denge bozulur ve oksidatif stres durumu oluşur ve serbest radikaller lipid proksidlerin üretimine neden olurlar. Olayın gelişimi esnasında önce serbest radikaller poliansatüre yağ asitlerine saldırırlar ve allilik çift bağlarla lipid radikalleri oluştururlar. Bu lipid radikalleri allilik çift bağlarla moleküler oksijene bağlanır ve lipid peroksi radikallerini üretirler Peroksi radikallerinden proton ve elektron çıkarılmasıyla lipid peroksidler oluşurlar. Bu lipid peroksidler aldehitlere parçalanırlar ve aldehidler de proteinleri, lipidleri ve nükleik asitleri çapraz bağlarla birbirine bağlarlar. Oldukça toksik yapılarıdır. Artmış olan serbest radikaller hücre veya dokularda birçok yapıyı etkileyerek hücre ve doku hasarına yol açmaktadırlar. Serbest radikaller ilave reaksiyonlara girerler ve yeni radikallerle birlikte kovalent bağlar oluştururlar. SOR, OH⁻ radikalleri ve diğerleri (hidrojen radikali, hidrate elektron vb.) hızlı bir şekilde pek çok biyolojik bileşikleri olumsuz yönde etkilerler. Bunlardan en etkin olanları hidroksil radikalleridir (143). Serbest radikaller yine proteinler üzerine etki ederek, protein yapısında bulunan amino asitlerle (histidin arginin, sistein ve metiyonin gibi) reaksiyona girerler ve bu amino asitlerin oksidasyonuna sebep olurlar. Proteinler parçalanır, serbest radikallerin etkisiyle çapraz bağlar oluşur, proteinlerde agregasyon olayı meydana gelir. Sundelhulm ve ark. (145) çapraz bağlantıların, aminlerin, perokside lipidlerden oluşan aldehidlerle reaksiyonuna neden olduğunu göstermiştir. Lipid peroksidasyonu ve çapraz bağlanmanın önemi, hücresel bütünlüğün azalmasıdır. Serbest oksijen radikalleri hücre membranlarında yağ asitlerinin peroksidasyonuna neden olur. Bu da membran fosfolipitlerinin yapısının ve membran geçirgenliğinin bozulmasına, membrandaki enzimlerin yapılarının bozulmasına ve genel olarak tüm membran

yapısının bozulmasına neden olmaktadır. Sonuçta apoptozise ve ya hücre ölümüne yol açmaktadır. Hücre içinde artan serbest radikaller ve lipid peroksidasyon ürünü olan MDA, hücre çekiredeğindeki DNA ile reaksiyona girmektedir. DNA yapısında baz değişimlerine ve DNA'da zincir kırılmalarına, netice olarak kromozom anomalileri ve sitotoksositeye sebep olmaktadır.

Lipid peroksidasyonunun tüm aerobik organizmalarda önlenmesi zorunlu bir işlemdir. Çünkü lipid peroksidasyon ürünleri, DNA hasarına neden olur. Artmış lipid peroksidasyonu ve azalmış antioksidan koruma sıklıkla birarada görülür. Epoksidler, DNA, RNA ve proteinlere kovalent olarak bağlanır (219). Böyle bir reaksiyon, epoksidin özelliklerine bağlı olarak, sitotoksite, alerjiye, mutajeniteye ve/veya karsinojeniteye neden olur (220).

Yine Choi ve ark. (221), H₂O₂ 'in, protein fosforilasyonu, transkripsiyon ve apoptoz gibi hücrel işlemleri etkileyen intraselüler mesajcı olabileceği bildirilmişlerdir.

Serbest oksijen radikallerinin aşırı üretimi, Mİ, parkinson hastalığı, multipl skleroz hastalıkları, felç, retrolental fibroplazi , kistik fibrozis, oküler hemoraji, karaciğer yetmezliği, , Huntington koresi, Amiotrofik lateral skleroz, katarkt, akut tübüler nekroz, ARDS, Alzheimer hastalığı, anfizem gibi birçok organ ve sistemi ilgilendiren patolojilerin yanısıra araştırmamızda konu olan , diyare, kabızlık, kilo kaybı, karın ağrısı ve kusmayla karakterize çölyak ve benzeri gastrointestinal hastalıklara neden olmaktadır.

Çeşitli antioksidanlar bu superoksit ve serbest radikalleri temizleyebilir veya hücrelerdeki detoksifikasyon mekanizmalarını uyarabilir. Neticede serbest radikal oluşumu artmış defoksifikasyonuna sebep olur ve böylece pek çok patofizyolojik işlemin önlenmesine neden olur. Glutatyon ve SOD'un direkt olarak superoksidi temizlediği, BHA, BHT ve t-BHQ birbirleriyle uyumlu bir şekilde bir takım genlerin ekspresyonunu uyardığı ve bu genlerin ürünlerinin oksidatif stres ve bununla ilişkili sonuçlarına karşı koruyucu oldukları bildirilmiştir (151). Musch ve ark. (152) diğer bileşiklerden, glutaminin özellikle ısı şok proteini 72 (hps72)'yi intestinal hücrelerde uyardığını ve bununda oksidanlar gibi enflamasyon tarafından uyarılan strese karşı hücre korumasına aracılık ettiğini rapor etmişlerdir.

Odetti P ve ark. (192) Çölyak hastalığının patogenezi için araştırmaya yönelik çalışmalarda oksidatif stresin önemli olduğunu gözlemlemişler, oksidatif stres belirteçlerinden TBARS (thiobarbituric asid-reactive substance) ve karbonil gruplarını araştırmış ve çölyak hastalarında redox dengesinin bozulduğunu, bunun da protein ve lipidlerde ciddi hasarlara neden olduğu saptanmıştır.

Briani C ve ark'nın (11) yaptıkları özel bir çalışmada, ÇH'nin multigenik bir hastalık olup sınıf II HLA'nın genetik yatkınlığın %40'ını oluşturduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada primer HLA birleşmesinin DQ2 (DQA1*05/DQB1*02) ve DQ8 (DQA1*0301/DQB1*0302) ile birlikte olduğu, antijen sunan hücrelerin hücre yüzey proteinlerinin ÇH'na yatkınlığa neden olduğu, HLA proteinlerinin varlığının hastalığın gelişimi için gerekli olduğunu ancak tek başına yeterli olmadığı tespit edilmiştir. Çeşitli HLA olmayan genler de ayrıca ÇH için genetik riske katkıda bulunduğu ifade edilmiştir.

Mary M. ve ark. (12) ÇH'nin genetik temeli olan hastalıklardan en sık görülenlerden birisi olduğu, ÇH'na sahip kişilerin yaklaşık %97'sinin kromozom 6p21'de sınıf II HLA, özellikle HLA-DQ2 ve HLA-DQ8, olarak adlandırılan genetik işarete sahip olduklarını belirlemişlerdir. Ayrıca toplumun %40'ının da bu haplotipi taşıdığı, bunların varlığının ÇH'nin gelişimi için gerekli olduğu, bu alellerin yokluğunun nerdeyse tanıdan tamamen uzaklaştıracağını ifade etmişlerdir. ÇH'nin %90'dan fazlasında HLA-DQ2'nin ve geri kalanların çoğunda da HLA-DQ8 bulunduğunu rapor etmişlerdir.

Tully M A. (13) ise HLA-DQ2 ve/veya HLA-DQ8 genlerini taşıyan kişilerde ÇH'nin gelişebileceğini, fakat genetik olarak yatkınlığı olmasına rağmen glutene maruz kalan her kişide hastalığın gelişmediğini, bilinen bazı çevresel faktörler (stres enfeksiyon, ameliyat veya hamilelik gibi) ve henüz belirlenmemiş genlerin hastalığın gelişimi için çok önemli olduğunu belirtmişlerdir.

Tosi R ve ark (29) ise; DQ2'yi ve özellikle HLA-DQ2 (A1*0501,B1*0201) heterodimerini kodlayan HLA-DQA1*0501 ve DQB1*0201'nin kombinasyonunu ÇH'nin sebebi olarak ön plana çıkarmışlardır.

De Marchi M ve ark (45) HLA genlerinin hastalığa yatkınlıkta açıkça kanıtlandığını ve HLA tiplemesinin hastalığın bazı klinik durumlarda belirlenmesi için faydalı bir test olarak kabul edilebileceğini ifade etmiştir.

ÇH ilk olarak sınıf I HLA molekülüyle daha sonra da DR3, DR5, DR7 ve sınıf II HLAkompleksteki DQ2/DQ8 alelleriyle ilişkili bulunmuştur. (45, 46).

Bu günlerde ise, resmi olarak dört haplotip çölyak heterodimeri olarak kabul edilmektedir. (1) DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501(DR3-DQ2); (2) DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201(DR7-DQ2);(3)DRB1*11/12-DQB1*0301-DQA1*0501 (DR5-DQ7); (4) DRB1*04-DQB1*0302-DQA1*0301 (DR4-DQ8). Sadece birinci ve sonuncunun varlığının ÇH için bir risk olarak yeterli olacağı düşünülmektedir (48).

Sollid LM ve ark. (53) Çölyak hastalarının sadece % 0.5'inde DQ2 ve DQ8 heterodimerinin her ikisinin birlikte bulunmadığını, onun yerine bu kişilerde tek başına DQB1*02 veya DQA1*05 nin bulunduğunu ifade etmişlerdir. Sollid ve ark. göre, gen dozu da ÇH'na yatkınlığı etkiler. Örnek olarak HLA-DQ2 için homozigotluk, heterozigotluktan en az beş kat daha yüksek riskle hastalık gelişimine neden olur, homozigotlardan DQB1*02 ve DQA1*05'i her iki kromozomda cis formunda veya ikinci bir DQB1*02 aleli diğer haplotipte taşıyanlar hastalık için daha büyük risk taşır.

Polvi A ve ark. (222) ÇH'na yatkınlığın büyük oranda genetik faktörlerle belirlenebileceğini, .ÇH'larının yaklaşık %88'inin DQA1*05 veya DQB1*02 alelleri tarafından kodlanan HLA-DQ2 heterodimerini taşıdığını, geri kalanının HLA-DQA1*05 VEYA HLADQB1*02'den herhangi birine sahip olacağını veya DQA1*03 ve DQB1*0302 alelleri tarafından kodlanan HLA-DQ8'i eksprese edeceğini ifade etmiştir.

Jabri B ve ark. (223) hastalığın etiyopatogenezini; çevresel, genetik ve immünolojik faktörlerin kompleks bir karşılıklı etkileşimi şeklinde tanımlamışlardır. Bu araştırmacılara göre buğday gluteni ve ilişkili proteinler ince barsakta mukozal hasara neden olan doğal ve uyarlanmış(adaptive) immün cevaplar oluşturur. Sınıf II HLA-DQ2 ve HLA-DQ8'i kodlayan genler hastalıkla yakından ilişkilidir ve yaklaşık tüm çölyak hastalarında bulunur. HLA-olmayan genler de ayrıca hastalıkta rol oynarlar. Glutene immünolojik yanıt; gluten proteinlerine ve otoantijen TG2'ye antikor yanıtı, glutene CD4⁺ T hücre yanıtı, artmış sayıda intraepitelyal CD8⁺ T hücreleri ve bir miktar sitokin ve kemokinin artmış seviyeleridir.

Aynı çalışmada glutenin muhtemelen 100'den fazla farklı proteini içerdiği, gluten proteinlerinin çözünerek gliadinler ve gluteninler diye ayrıldıklarını ve

herikisinin de ÇH'nda etkili oldukları bulunmuştur. Arpa ve çavdar'ın, buğday glutenine benzer proteinler içerdiği ve hastalığı tetikleyebileceği de rapor edilmiştir (223).

Alaedini A (115), stres faktörlerinin intestinal geçirgenliği değiştirip bazı tam parçalanmamış buğday gluteni ve ilişkili gluten peptidlerinin lamina propriyaya geçişine neden olabildiğini tanımlamışlardır. Örnek olarak gastrointestinal enfeksiyonların ÇH'nı tetikleme riskini artırdığı bulunmuştur. Glutene doğal immün yanıtın intestinal geçirgenliği artıran mukozal değişikliklerin öncüsü olabileceğini ifade etmişlerdir. Nötral gluten peptidlerindeki glutamin kalıntılarının TG2 tarafından deamidasyon yoluyla negatif yüklü glutamik asitlere çevrileceği, HLA-DQ2 ve HLA-DQ8'i eksprese eden antijen sunan hücrelerin bu deamide peptidlere yüksek ilgileri olduğu, bu oluşturulmuş immünojenik peptidlerin HLA moleküllerine bağlanmasının konağın lamina propriyasındaki gluten spesifik CD4⁺ T hücrelerini aktive edebilen peptid komplekslerini oluşturduklarını belirtmişlerdir. Bu T hücrelerinin aktivasyonuna bir çok sitokinin üretilmesinin eşlik ettiği ve bu sitokinlerin, fibroblastlar ve inflamatuvar hücreler tarafından salınan metalloproteinazlar aracılığıyla enflamasyonu ve barsak hasarını devam ettirebildiklerini belirtmişlerdir.

Yapılan bir diğer çalışmada Mary M. ve ark (12) ÇH'na genetik yatkınlıktan dolayı bir kişinin glutene tahammülsüzlüğünün bir ömür boyunca süreceğini, alınan gluten miktarının, HLA-DQ2 ve HLA-DQ8 gen miktarının (homozigot kişiler ÇH için daha risklidir) ve tTG'm lokal üretilmesinin ÇH'da ortaya çıkan bulgularda ve hastalığın ciddiyetinin belirlenmesinde çok önemli olduğunu saptamışlardır

Bu etkenler nedeniyle ortaya çıkan ÇH'nın klinik bulguları çoğunlukla hastanın yaşına, hastalığın derecesi ve süresi ve barsak dışı bulguların varlığına bağlı olarak değişir (97). Green PH ve ark. (98) ÇH'nın temelde proksimal ince barsağı etkilediği, fakat bazı kişilerde tüm ince barsağın etkilenebileceğini, proksimal ince barsak etkilenmesinin vitamin ve minerallerin malabzorbisyonuna neden olacağını belirtmişlerdir. ÇH'ndaki diyarenin hastalığın distal ince barsağa ilerlemesinden dolayı gelişeceği de tanımlanmıştır (98). Çocuklukta ÇH ile ilişkili klasik semptomlar diyare, abdominal şişkinlik ve büyüme gelişme geriliği şeklinde ifade

edilmiştir (99). Benzer olarak hastalık semptomları yetişkinlerde, diyare, kabızlık, kilo kaybı, güçsüzlük kısa boy yapısı, karın ağrısı ve kusmayla karakterizedir. Yine hastalıkta görülebilecek atipik bulgular arasında; demir eksikliği anemisi, azalmış kemik mineral yoğunluğu, kronik yorgunluk, irritable barsak, hazımsızlık, infertilite, düşük, hipertransaminemi, pıhtılaşma bozukluğu, gecikmiş puberte, artralji, aftöz stomatit, folat/çinko eksikliği, diş enamel hipoplazisi ve başka türlü açıklanamayan periferik nöropati ve ataksi gibi nörolojik bozukluklar sayılabilir.

Yukarıda verilen örneklerden yola çıkılarak hastalığın gen polimorfizmiyle yakından ilgili olduğunu, bazı çevresel faktörler olmadan genetik yatkınlığın tek başına ÇH gelişimine neden olamasa da, hastalığın etiyopatogenezinde en önemli etken olduğunu söylersek hata etmemiş oluruz.

Yine hastalığın etyolojisine yönelik Kiss C ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada (193), çölyak hastalığında bir antioksidan enzim olan SOD aktivitesinde önemli derecede artış gözlenirken bir diğer antioksidan enzim olan GSH-Px aktivitesinde ise çok anlamlı düzeylerde azalmalar tespit edildiği rapor edilmiştir.

Bu verilerin ışığında, hastalığın gelişiminden sorumlu temel etken olan oksidan-antioksidan dengesinin bozulması ve serbest radikallerin artmasının bir nedeni olarak kabul edebileceğimiz SOD ve GSH-Px gibi enzimlerin aktivitelerinde gözlenen dengesizliklerde, bu enzimlerin gen polimorfizminin bir sebep olup olmadığının araştırılmasının önemli olduğunu düşünerek bu çalışmayı tasarladık.

Bu çalışmamızda; çölyak hastalığında gözlenen artmış oksidatif strese cevap olarak değişen GSH-Px ve SOD enzimlerinin aktivitelerini etkileyen ve bu enzimlerin yapılarında gözlenebilen polimorfizmlerin ne sıklıkta oluştuğunu incelemeyi ve çölyak hastalığında sıklıkla görüldüğü rapor edilen **DQA1*0501**, **DQB1*0201**, **DRB1*04** mutasyonları ile bir ilişkisinin olup olmadığını göstermeyi amaçladık.

Fakültemiz dahiliye ve çocuk polikliniklerimize müracaatte bulunan 265 hastanın moleküler analizinde; 117 denekte taradığımız bu 3 mutasyondan en az birinin varlığı saptanmıştır. (Tablo 2, Tablo 4). Klinik olarak çölyak benzeri şikayetlerle hastanemize başvuran hastalarda yapılan araştırmalar sonrasında, hiçbir mutasyon bulunmadığı tespit edilen diğer 148 denek de kontrol grubu olarak alınmıştır. Her iki grupta da SOD ve GSH-Px enzim polimorfizmi çalışılmıştır.

Yaptığımız literatür araştırmalarında; antioksidan enzimlerle, çölyak hastalığı arasındaki ilişkiyi açıklamaya yönelik pek çok yayın olmasına rağmen, genetik yatkınlığa dayanan bu hastalığın etyolojisini tanımlamak adına çölyak hastalığında GSH-Px ve SOD polimorfizmini incelemeye yönelik herhangi bir yayına rastlayamadığımızdan dolayı, araştırmamızın elde ettiğimiz verilerimizi kendi içersinde değerlendirme yolunu tercih ettik.

Çölyak hastalığı şüphesi ile gelen hastaların 117'sinde (%44,15) çölyak mutasyonu bulunmuştur.

Mutasyon bulunan bu 117 hastada hastada yapılan SOD polimorfizmi çalışmasında; hastaların 98'inde (% 83.75) enzim polimorfizminin varlığı saptandı. Tespit edilen SOD enzim polimorfizminin dağılımında: 46'sı (%39.31) homozigot, 52'si (% 44.44) heterozigot ve 19'u (% 16,25) wildtype olarak belirlendi.

Çölyak mutasyonu olmayan kontrol grubundaki 148 kişiden 116'sında (%78.38) SOD enzim polimorfizmi tespit edilirken, 32'sinin (%21.63) polimorfizmi açasından Wildtype olduğu bulundu (Tablo 1).

GSH-Px enzim polimorfizmi çalışmasında ise; hastaların 68'inde (%58,12) enzim polimorfizmi tespit edildi. Bu GSH-Px polimorfizminin dağılımı incelendiğinde; 13'ünün (%11,11) homozigot, 55'inin (%47,01) heterozigot, 49'unun da (%41,88) wildtype olduğu saptanmıştır (Tablo 3).

Çölyak hastalığı bulunmayan ve kontrol grubu olarak kullanılan 148 kişinin GSH-Px enzim polimorfizmi yönünden analizinde; bunların 89'unda (%60.14) enzim polimorfizmi saptandı. Yine bu gruptaki 59 kişinin (%39.86) wildtype olduğu tespit edildi (Tablo 3).

117 hastanın, 68'inde (%58,12) GSH-Px polimorfizmi, 98'inde (% 83.75) ise SOD polimorfizminin var olduğu göz önüne alındığında, çölyak hastalığında hem SOD hem de GSH-Px enziminin etkilendiğini ve büyük oranda polimorfizm meydana geldiğini söyleyebiliriz

SOD polimorfizmi yönünden Çölyak hasta grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında polimorfizm var olmasına rağmen istatistiki aćıdan anlamlı bir sonuç elde edilememiştir (**p=0.505**).

GSH-Px polimorfizmi yönünden hasta ve kontrol grubunun mukayesesinde yine polimorfizm görölmüştür. Fakat anlamlı bir sonuç bulunamamıştır (**p=0.902**).

Gerek SOD, gerekse GSH-Px polimorfizmini araştırmaya yönelik çalışmamızda hasta ve kontrol grupları arasında polimorfizmin varlığını tespit etmemize rağmen, verilerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gzlememizin nedeni; kontrol grubu olarak, tamamen sağlıklı bireylerden değil de, lyak semptomlarına benzer Şikayetleri nedeniyle hastanemize başvuran fakat lyak mutasyonu bulunamayan hastaları çalışmamıza dahil etmemiz olabilir. Bunun SOD ve GSH-Px polimorfizm oranını kısmen azaltmış olması muhtemeldir. SOD ve GSH-Px polimorfizm oranını azalmasında, lyak prevalansına oranla çalışılan numune sayısının kısmen az oluşu da bir neden olabilir.

Çölyak hastalarında SOD ve GSH-Px polimorfizmine yönelik alışmamızda, SOD polimorfizminin (%83.75), GSH-Px polimorfizmine oranla (%58,12) daha sık görüldüğü saptanmış olup, bu netice Kiss C ve ark.'nın (193) lyak hastalığında SOD aktivitesinde önemli derecede artış gözlenirken, GSH-Px aktivitesinde ise çok anlamlı düzeylerde azalmalar tespit edildiğine dair rapor ile bir paralellik göstermektedir. Ayrıca alışmamızda SOD ve GSH-Px enzim polimorfizminin homozigot, heterozigot ve wildtype gruplar arasında dağılımları açısından da birbirinden farklı olduklarını tespit ettik.

Sonuç olarak; bu çalışmamız, lyak hastalığında SOD ve GSH-Px enzim polimorfizminin istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde olmasa dahi var olduğunu, farklı düzeylerde etkilendikleri, yine enzim aktivitelerindekine benzer Şekilde SOD polimorfizminin GSH-Px enzim polimorfizminden daha sık görüldüğünü desteklemektedir.

6. SONUÇ

1. Çölyak mutasyonu olan 117 hastanın 98'inde (% 83.75) SOD enzim polimorfizmi tespit edildi.
2. Tespit edilen SOD enzim polimorfizminin dağılımı: 46'sı (%39.31) homozigot, 52'si (% 44.44) heterozigot ve 19'u (% 16,25) wildtype olarak belirlendi.
3. Çölyak mutasyonu olmayan kontrol grubundaki 148 kişiden 116'sında (%78.38) SOD enzim polimorfizmi tespit edilirken, 32'si (%21.63) polimorfizmi açısından Wildtype olarak tespit edildi.
4. Yine çölyak mutasyonu olan hastaların 68'inde (% 58,12) ise GSH-Px, enzim polimorfizmi tespit edildi.
5. GSH-Px enzim polimorfizminin dağılımı ise: 13'ü (% 11,11) homozigot, 55'i (%47,01) heterozigot, 49'u da (% 41,88) wildtype olarak belirlendi.
6. Çölyak mutasyonu bulunmayan 148 kişilik kontrol grubundakilerin 89'unda (%60.14) GSH-Px enzim polimorfizmi tespit edildi. Polimorfizmi açısından bu gruptaki 59 kişi (%39.86) wildtype olarak bulundu.
7. Çölyak hasta mutasyonlarına göre SOD ve GSH-PX polimorfizm dağılımı incelendiğinde; her ikisinde de,
En fazla **DQA1*0501** mutasyonu (38 kişide)görülürken, sıklık açısından bunu; **DRB1*04** (31 kişi), **DQA1*0501 + DQB1*0201** (21 kişi) ve **DQB1*0201** (13 kişi) izledi. Daha az görülse de **DQA1*0501 + DRB1*04** (8 kişi), **DQA1*0501 + QB1*0201 + DRB1*04** (4 kişi), **DQB1*0201+ DRB1*04** (2 kişi) pozitifliği saptandı. SOD ve GSH-Px gözlenen gen mutasyonlarının sayıları birbirinin aynı olmasına rağmen, bu mutasyonların homozigot, heterozigot ve wildtype'lar arasındaki dağılımlarının birbirinden oldukça farklı olduğu bulundu.

7. KAYNAKLAR

1. Bracken S, Byrne G, Kelly J ve ark. Altered gene expression in highly purified enterocytes from patients with active Celiac Disease. *BMC Genomics* 2008; 9: 377.
2. Lurz E, Scheidegger U, Spalinger J ve ark. Clinical presentation of Celiac Disease and the diagnostic accuracy of serologic markers of serologic markers in children. *Eur J Pediatr.* 2008; 0845-4 [Epub ahead of print]).
3. Hourigan C.S. The molecular basis of coeliac disease. *Clin Exp Med* 2006; 6: 53-59.
4. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49(3): 479-480.
5. Preedy VR, Reilly ME, Mantle D. Oxidative damage in liver disease. *JIFCC* 1998;10(1): 16-20.
6. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyolojik etkileri. Mimoza Basın yayın dağıtım. Konya 1995; 32-42.
7. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human. *Am J Med* 1991; 91: 314-22.
8. Stojilkovic V, Todorovic A, Radlovic N ve ark. Antioxidant enzymes, glutathion and lipid peroksidation in peripheral blood of children affected by coeliac disease. *Ann Clin Biochem* 2007; 44: 537-543.
9. Odetti P, Valentini S, Arango I ve ark. Oxidative stress in subjects affected by celiac disease. *Free Rad Res* 1997; 29: 17-24.
10. Kiss C, Li J, Szeles A ve ark. Assignment of the ARHA and GPX1 genes to human chromosome bands 3p21.3 by in situ hybridization and with somatic cell hybrids. *Cytogenet Cell Genet* 1997; 79: 228-30.
11. Briani C, Samaroo D, Alaedini A. Celiac disease: From gluten to autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 2008; 7: 644-650.
12. Mary M. Niewinski. Advances in Celiac Disease and Gluten-Free Diet. *J Am Diet Assoc* 2008;108:661-672.
13. Tully M A. Pediatric Celiac Disease 2008; 31(2): 132-140.
14. Polanco I. Celiac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008; 47: 3-6.

15. Presutti RJ, Cangemi JR, Cassidy HD ve ark. Celiac Disease. *Am Fam Physician* 2007; 76: 1795-1802.
16. Gomez JC, Selvaggio G, Viola M ve ark. Prevalence of celiac disease in Argentina: screening of an adult population in the La Plata area. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2700-2704.
17. Oliveira RP, Sdepanian VL, Barreto JA ve ark. High prevalence of celiac disease in Brazilian blood donor volunteers based on screening by IgA antitissue transglutaminase antibody. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007;19:43–49.
18. Catassi C, Raˆtsch M, Gandolfi L ve ark. Why is celiac disease endemic in the people of Sahara? *Lancet* 1999; 354: 647–648.
19. Catassi C, Doloretta Macis M, Raˆtsch IM ve ark. The distribution of DQ genes in the Saharawi population provides only a partial explanation for the high celiac disease prevalence. *Tissue Antigens* 2001; 58: 402-406.
20. Abu-Zekry M, Diab M, Kryszak D ve ark. Prevalence of celiac disease in Egyptian children disputes the East–West agriculture-dependent spreading of the disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008; 47: 136-140.
21. Ben Hariz M, Kallel-Sellami M, Kallel L ve ark. Prevalence of celiac disease in Tunisia: mass-screening study in schoolchildren. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007; 19: 687-694.
22. Shahbazkhani B, Forootan M, Merat S ve ark. Coeliac disease presenting with symptoms of irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 231-235.
23. Rawashdeh MO, Khalil B, Raweily E. Celiac disease in Arabs. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1996; 23: 415-418.
24. Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology* 2001; 120: 636-651.
25. Fasano A, Araya M, Bhatnagar S ve ark. Federation of internal societies of pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition consensus report on celiac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2008; 47: 214-219.

26. Robinson J, Waller MJ, Parham P ve ark. IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 311-314.
27. Falchuk ZM, Rogentine GN, Strober W. Predominance of histocompatibility antigen HL-A8 in patients with gluten-sensitive enteropathy. *J Clin Invest* 1972; 51: 1602-1605.
28. Keuning JJ, Pena AS, van Leeuwen A ve ark. HLA-DW3 associated with coeliac disease. *Lancet* 1976; 1: 506-508.
29. Tosi R, Vismara D, Tanigaki N ve ark. Evidence that celiac disease is primarily associated with a DC locus allelic specificity. *Clin Immunol Immunopathol* 1983; 28: 395-404.
30. Louka AS, Nilsson S, Olsson M ve ark. HLA in coeliac disease families: a novel test of risk modification by the 'other' haplotype when at least one DQA1*05-DQB1*02 haplotype is carried. *Tissue Antigens* 2002; 60: 147-154.
31. Van Belzen MJ, Koeleman BP, Crusius JB ve ark. Defining the contribution of the HLA region to cis DQ2-positive coeliac disease patients. *Genes Immun* 2004; 5: 215-220.
32. Dubois P C, van Heel D A. Translational Mini-Review series on the Immunogenetics of Gut Disease: Immunogenetics of coeliac disease. *The Journal of Translational Immunology* 2008; 153: 162-173.
33. Vader W, Stepniak D, Kooy Y ve ark. The HLA-DQ2 gene dose effect in celiac disease is directly related to the magnitude and breadth of gluten-specific T cell responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 12390-12395.
34. Spurkland A, Sollid LM, Polanco I ve ark. HLA-DR and -DQ genotypes of celiac disease patients serologically typed to be non DR3 or non-DR5/7. *Hum Immunol* 1992; 35: 188-192.
35. Karell K, Louka AS, Moodie SJ ve ark. HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Hum Immunol* 2003; 64: 469-477.

36. Sollid LM, Markussen G, Ek J, Gjerde H ve ark. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *J Exp Med* 1989; 169: 345-350.
37. Casinotti A, Birindelli S, Clerici M ve ark. HLA and autoimmun digestive disease: A clinically oriented review for gastroenterologists. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 195-217.
38. Ploegh HL, Orr HT, Strominger JL. Major histocompatibility antigens: the human (HLA-A, -B, -C) and murine (H-2K, H-2D) class I molecules. *Cell* 1981; 24: 287-299.
39. Sanfilippo F, Amos DB. An interpretation of the major histocompatibility complex. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL (eds). *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 3rd edn. ASM Press: Washington 1986.
40. Moscoso J, Serrano-Vela JI, Pacheco R ve ark. HLA-G, -E and -F: allelism, function and evolution. *Transpl Immunol* 2006; 17: 61-64.
41. Janeway CA, Travers P. Antigen recognition by T lymphocytes. *Immunobiology*, 3rd edn, Garland Publishing: New York and London, 1997, pp. 41–6.
42. McCluskey J, Peh CA. The human leukocyte antigens and clinical medicine: an overview. *Rev Immunogenet* 1999; 1: 3-20.
43. Sullivan KA, Amos DB. The HLA system and its detection. In: Rose NR, Friedmil OH, Fahey JL (eds). *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 3rd edn, ASM Press: Washington 1986.
44. Jin P, Wang E. Polymorphisms in clinical immunology. From HLA typig to immunogenetic profiling. *J Transl Med* 2003; 1: 1-11.
45. De Marchi M, Borelli I, Olivetti E ve ark. Two HLA-DR alleles are associated with celiac disease. *Tissue Antigens* 1979; 14: 309-316.
46. Zubillaga P, Vidales MC, Zubillaga I ve ark. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 genetic markers and clinical presentation in coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002; 34: 548-554.
47. Congia M, Cucca F, Frau F ve ark. A gene dosage effect of the DQA1*0501/DQB1*0201 allelic combination influences the clinical heterogeneity of coeliac disease. *Hum Immunol* 1994; 40: 138-142.

48. van Rood JJ, van Leeuwen A, Keuning JJ ve ark. Evidence for two series of B-cell antigens in man and their comparison with HLA-D. *Scand J Immunol* 1977; 6: 373-384.
49. Duquesnoy RJ, Marrari M, Annen K. Identification of an HLA-DR-associated system of B-cell alloantigens. *Transplant Proc* 1979; 11: 1757-1760.
50. Louka AS, Nilsson S, Olson JM ve ark. An autosomal screen for genes that predispose to celiac disease in the western counties of Ireland. *Nat Genet* 1996; 14: 329- 333.
51. van de Wal Y, Kooy YM, Drijfhout JW ve ark. Unique peptide binding characteristics of the disease-associated DQ(alpha1*0501, beta1*0201) vs the non-disease-associated DQ(alpha1*0201, beta1*0202) molecule. *Immunogenetics* 1997; 46: 484-492.
52. Karrel K, Louka AS, Mooedie S, ve ark. HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) heterodimer; results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Hum Immunol* 2003; 34: 548-554.
53. Sollid LM, Thorsby E. HLA susceptibility genes in coeliac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology* 1993; 105: 910-922.
54. Louka AS, Sollid LM. HLA in coeliac disease: unravelling the complex genetics of a complex disorder. *Tissue Antigens* 2003; 61: 105-117.
55. Karinen H, Karkkainen P, Pihlajamaki J ve ark. Gene dose effect of the DQB1*0201 allele contributes to severity of coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 191-199.
56. Jores RD, Frau F, Cucca F ve ark. HLA-DQB1*0201 homozygosity predisposes to severe intestinal damage in celiac disease. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 48-53.
57. Al-toma A, Goerres M, Meijer JWR ve ark. Human leukocyte antigen DQ2 homozygosity and the development of refractory coeliac disease and enteropathy-associated T-cell lymphoma . *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 315-319.

58. Greco L, Percopo S, Clot F ve ark. Lack of correlation between genotype and phenotype in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998; 26: 286-290.
59. Mustalahti K, Holopainen P, Karel K ve ark. Genetic dissection between silent and clinically diagnosed symptomatic forms of coeliac disease in multiplex families. *Dig Liv Dis* 2002; 34: 842-845.
60. van Heel DA, Franke L, Hunt KA, ve ark. A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. *Nat Genet* 2007; 39: 827-829.
61. Hunt KA, Zhernakova A, Turner G, ve ark. Newly identified genetic risk variants for celiac disease related to the immune response. *Nat Genet* 2008; 40: 395-402.
62. Haines M L, Anderson R P, Gibson P R. Systematic review: the evidence base for long-term management of coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 28: 1042-1066.
63. Waldmann TA. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev* 2006; 6: 595–601.
64. Lenardo MJ. Fas and the art of lymphocyte maintenance. *J Exp Med* 1996; 183: 721-724.
65. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA ve ark. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 2005; 6: 1142-1151.
66. Pennington DJ, Silva-Santos B, Shires J ve ark. The inter-relatedness and interdependence of mouse T cell receptor gammadelta+ and alphabeta+ cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 991-998.
67. Han SB, Moratz C, Huang NN ve ark. Rgs1 and Gnai2 regulate the entrance of B lymphocytes into lymph nodes and B cell motility within lymph node follicles. *Immunity* 2005; 22: 343-354.
68. Nilsen EM, Jahnsen FL, Lundin KE ve ark. Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. *Gastroenterology* 1998; 115: 551-563.
69. Li Y, He X, Schembri-King J ve ark. Hayashi J. Cloning and characterization of human Lnk, an adaptor protein with pleckstrin homology and Src

- homology 2 domains that can inhibit T cell activation. *J Immunol* 2000; 164: 5199–5206.
70. Mao M, Biery MC, Kobayashi SV ve ark. T lymphocyte activation gene identification by coregulated expression on DNA microarrays. *Genomics* 2004; 83: 989-999.
 71. van de Wal Y, Kooy YM, van Veelen P ve ark. Glutenin is involved in the gluten-driven mucosal T cell response. *Eur J Immunol* 1999; 10: 3133-3139.
 72. Dewar DH, Amato M, Ellis HJ, Pollack EL ve ark. The toxicity of high molecular weight glutenin subunits of wheat to patients with coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 483-491.
 73. Sollid LM. Molecular basis of celiac disease. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 53-81.
 74. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M ve ark. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 1997; 3: 797-801.
 75. Tollefsen S, Arentz-Hansen H, Fleckenstein B ve ark. HLA-DQ2 and -DQ8 signatures of gluten T-cell epitopes in celiac disease. *J Clin Invest* 2006; 116: 2226-2236.
 76. Molberg O, Mcadam SN, Korner R, ve ark. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med* 1998; 4: 713-717.
 77. Schuppan D, Esslinger B, Dieterich W. Innate immunity and celiac disease. *Lancet* 2003; 362(9377): 3-4.
 78. Norris JM, Barriga K, Hoffenberg EJ ve ark. Risk of celiac disease autoimmunity and timing of gluten introduction in the diet of infants at increased risk of disease. *JAMA* 2005; 293: 2343-2351.
 79. Fasano A. Celiac disease How to handle a clinical chameleon. *N Engl J Med* 2003; 348: 2568-2570.
 80. Ivarsson A, Hernell O, Stenlund H, Persson LA. Breast-feeding protects against celiac disease. *Am J Clin Nutr* 2002; 75: 914-921.

81. Lindfors K, Kaukinen K, Maki M ve ark. A role for anti-transglutaminase 2 autoantibodies in the pathogenesis of celiac disease? *Amino Acids* 2009; 36: 685-691.
82. Marzari R, Sblattero D, Florian F ve ark. Molecular dissection of the tissue transglutaminase autoantibody response in celiac disease. *J Immunol* 2001; 166: 4170-4176.
83. Korponay-Szabo IR, Halttunen T, Szalai Z ve ark. In vivo targeting of intestinal and extraintestinal transglutaminase 2 by coeliac autoantibodies. *Gut* 2004; 53: 641-648.
84. van Belzen MJ, Meijer JW, Sandkuijl LA, et al. A major non-HLA locus in celiac disease maps to chromosome 19. *Gastroenterology* 2003; 125: 1032-1041.
85. Hunt KA, Monsuur AJ, McArdle WL ve ark. Lack of association of MYO9B genetic variants with coeliac disease in a British cohort. *Gut* 2006; 55: 969-972.
86. De Re V, Simula MP, Caggiari L ve ark. Proteins specifically hyperexpressed in a coeliac disease patient with aberrant T cells. *Clin Exp Immunol* 2007; 148: 402-409.
87. Kolkowski EC, Fernandez MA, Pujol-Borrell R ve ark. Human intestinal alphabeta IEL clones in celiac disease show reduced IL-10 synthesis and enhanced IL-2 production. *Cell Immunol* 2006; 244: 1-9.
88. Mention JJ, Ben AM, Begue B ve ark. Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology* 2003; 125: 730-745.
89. Benahmed M, Meresse B, Arnulf B ve ark. Inhibition of TGF-beta signaling by IL-15: a new role for IL-15 in the loss of immune homeostasis in celiac disease. *Gastroenterology* 2007; 132: 994-1008.
90. Kagnoff MF. Mucosal inflammation in celiac disease: interleukin-15 meets transforming growth factor beta-1. *Gastroenterology* 2007; 132: 1174-1176.
91. Nunez C, Rueda B, Martinez A ve ark. Involvement of macrophage migration inhibitory factor gene in celiac disease susceptibility. *Genes Immun* 2007; 8: 168-170.

92. Gee S. On the celiac affection. *St Bartholomew Hospital Rep* 1888; 24: 17-20.
93. Dicke WK, Weijers HA, van der Kramer JH. Coeliac disease. II. The presence in wheat of a factor having a deleterious effect in cases of coeliac disease. *Acta Paediatr* 1953; 42: 34-42.
94. Paulley JW. Observation on the aetiology of idiopathic; jejunal and lymph node biopsies. *Br Med J* 1954; 4900: 1318-1321.
95. Marsh MN. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac disease'). *Gastroenterology* 1992; 102: 330-354.
96. Dewar DH, Ciclitira PL. Clinical features and diagnosis of celiac disease. *Gastroenterology* 2005; 128(1): 19-24.
97. Chand N, Mihas A. Celiac disease: Current concepts in diagnosis and treatment. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 3-14.
98. Green PH, Jabri B. Coeliac disease. *Lancet* 2003; 362: 383-391.
99. Goldberg D, Kryszak D, Fasano A ve ark. Screening for celiac disease in family members: is follow-up testing necessary? *Dig Dis Sci* 2007; 52: 1082-1086.
100. Reeves Gee, Squance ML, Duggan AE ve ark. Diagnostic accuracy of coeliac serological tests: a prospective study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 493-501.
101. Ciccocioppo R, Di SA, Bauer M ve ark. Matrix metalloproteinase pattern in celiac duodenal mucosa. *Lab Invest* 2005; 85: 397-407.
102. Daly A, Walsh C, Feighery C ve ark. Serum levels of soluble CD163 correlate with the inflammatory process in coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24: 553-559.
103. 103. Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T ve ark. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch Intern Med* 2003; 163: 286-292.
104. Wapenaar MC, Monsuur AJ, Poell J ve ark. The SPINK gene family and celiac disease susceptibility. *Immunogenetics* 2007; 59: 349-357.

105. Cirillo G, Di Domenico MR, Corsi I ve ark. Do MYO9B genetic variants predispose to coeliac disease? An association study in a cohort of South Italian children. *Dig Liver Dis* 2007; 39: 228-231.
106. Baxter AG, Kinder SJ, Hammond KJ ve ark. Association between alpha-beta TCR β CD4-CD8- T-cell deficiency and IDDM in NOD/Lt mice. *Diabetes* 1997; 46: 572-582.
107. Grose RH, Cummins AG, Thompson FM. Deficiency of invariant natural killer T cells in coeliac disease. *Gut* 2007; 56: 790-795.
108. Hermann C, Krikovszky D, Vasarhelyi B ve ark. Polymorphisms of the TNF-alpha gene and risk of celiac disease in T1DM children. *Pediatr Diabetes* 2007; 8: 138-141.
109. Catassi C, Fabiani E, Iacono G ve ark. A prospective, double-blind, placebo controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *Am J Clin Nutr* 2007; 85: 160-166.
110. Silano M, Leonardi F, Trecca A ve ark. Prevention by a decapeptide from durum wheat of in vitro gliadin peptide-induced apoptosis in small-bowel mucosa from coeliac patients. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 786-787.
111. Mitea C, Havenaar R, Drijfhout JW ve ark. Efficient degradation of gluten by a prolyl endoprotease in a gastrointestinal model: implications for celiac disease. *Gut* 2007; 57: 25-32.
112. National Institutes of Health. Statement. NIH Consensus Development Conference on Celiac Disease, June 28-30, 2004. *Gastroenterology* 2005; 128(1): 1-9.
113. Hill ID. What are the sensitivity and specificity of serologic tests for celiac disease? Do sensitivity and specificity vary in different populations? *Gastroenterology* 2005; 128(4 suppl 1): 25-32.
114. Treem WR. Emerging concepts in celiac disease. *Dig Liver Dis* 2004; 36(7): 492-498.
115. Alaedini A, Green PH. Narrative review: celiac disease: understanding a complex autoimmune disorder. *Ann Intern Med* 2005; 142(4): 289-298.

116. Rostom A, Murray JA, Kagnoff MF. American Gastroenterological Association (AGA) Institute technical review on the diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterology* 2006; 131(6): 1981-2002.
117. Cranney A, Zarkadas M, Graham ID ve ark. The Canadian celiac health survey. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 1087-1093.
118. Catassi C, Kryszak D, Louis-Jacques O ve ark. Detection of celiac disease in primary care: A multicenter case-finding study in North America. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1454-1460.
119. Cataldo F, Marino V, Ventura A ve ark. Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in coeliac disease: an Italian multicentre study. Italian Society of Paediatric Gastroenterology and Hepatology (SIGEP) and "Club del Tenue" Working Groups on Coeliac Disease. *Gut* 1998; 42(3): 362-365.
120. Leeds JS, Hopper AD, Hurlstone DP ve ark. Is exocrine pancreatic insufficiency in adult coeliac disease a cause of persisting symptoms? *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25: 265-271.
121. Culliford A, Daly J, Diamond B ve ark. The value of wireless capsule endoscopy in patients with complicated celiac disease. *Gastrointest Endosc* 2005; 62(1): 55-61.
122. Green PHR, Stavropoulos SN, Panagi SG ve ark. Characteristics of adult celiac disease in the USA: Results of a national survey. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 126-131.
123. Grefte JM, Bouman JG, Grond J ve ark. Slow and incomplete histological and functional recovery in adult gluten sensitive enteropathy. *J Clin Pathol.* 1988; 41: 886-891.
124. Bardella MT, Velio P, Cesana BM ve ark. Coeliac disease: A histological follow-up study. *Histopathology* 2007; 50: 465.
125. Krauss N, Schuppan D. Monitoring nonresponsive patients who have celiac disease. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2006; 16: 317-327.
126. Ojetti V, Nucera G, Migneco A ve ark. High prevalence of celiac disease in patients with lactose intolerance. *Digestion* 2005; 71: 106-110.

127. Raymond N, Heap J, Case S. The gluten-free diet: An update for health professionals. *Practical Gastroenterol* 2006; 30: 67-92.
128. See J, Murray JA. Gluten-free diet: The medical and nutrition management of celiac disease. *Nutr Clin Pract* 2006; 21: 1-15.
129. Tikkakoski S, Savilahti E, Kolho KL. Undiagnosed celiac disease and nutritional deficiencies in adults screened in primary health care. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 60-65.
130. Halfdanarson TR, Litzow MR, Murray JA. Hematological manifestations of celiac disease. *Blood* 2006; 109: 412-421.
131. Farrell RJ, Kelly CP. Celiac sprue. *N Engl J Med* 2002; 346: 180-188.
132. Mautalen C, Gonzalez D, Mazure R ve ark. Effect of treatment on bone mass, mineral metabolism, and body composition in untreated celiac disease patients. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 313-318.
133. Rewers M, Liu E, Simmons J ve ark. Celiac disease associated with type 1 diabetes mellitus. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2004; 33(1): 197-214.
134. Forsberg L, de Faire U, Morgenstern R. *Hum. Mutat* 1999; 13: 294-300.
135. Forsberg L, De Faire U, Morgenstern R. Oxidative stress ,human genetic variation ,and disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2001; 389: 84-93.
136. Leibovitz BE, Siegel BV. Aspects of free radical reactions in Biological systems: Aging. *Journal of Gerontology* 1980; 35 (1): 45-56.
137. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science* 1978; 20: 875-880.
138. Britton L, Malinowski DP, Fridovich I. Superoxide dismutase and oxygen metabolism in *Streptococcus faecalis* and comparisons with other organisms. Jour-brane damage as well as to increases in the rational of *Bacteriology* 1978; 134: 229-236.
139. Harman D. The Biologic clock: The mitochondria. *Journal of the American Geriatrics Society* 1972; 20: 145-147.
140. Packer L, Fuehr K. Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells. *Nature* 1977; 267: 423-425.
141. Boenig HV. Free radicals and health: Indicators for a unifying concept. *Journal of the American Geriatrics Society* 1966; 14: 1211-1220.

142. Tauber AI, Babior BM. Evidence for hydroxyl radical production by human neutrophils. *Journal of Clinical Investigation* 1977; 60: 374-379.
143. Lown JW, Sim SK, Majumdar KC ve ark. Strand scission of DNA by bound adriamycin and daunorubicin in the presence of reducing agents. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1977; 76: 705-710.
144. Morgan AR, Cone RL, Elgert TM. The mechanism of DNA strand breakage by vitamin C and superoxide and the protective roles of catalase and superoxide dismutase. *Nucleic Acids Research* 1976; 5: 1139-1149.
145. Sundholm F, Visapaa A. Cross-linking of collagen in the presence of oxidizing lipid. *Lipids* 1978; 13: 755-757.
146. Payes B. Enzymatic repair of x-ray-damaged DNA. I. Labeling of the precursor of a malondialdehyde-like material in x-irradiated DNA and the enzymatic excision of labeled lesions. *Biochemica et Biophysica Acta* 1974; 366: 251-260.
147. Halliwell B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochem. Pharm* 1995; 49: 1341-1348.
148. Krishna, MC, Russo A, Mitchell JB ve ark. Do nitroxide antioxidants act as scavengers of superoxide or as superoxide dismutase mimics? *J Biol Chem* 1996; 271: 26026–26031.
149. Kahl R. Synthetic antioxidants: biochemical actions and interference with radiation, toxic compounds, chemical mutagens and chemical carcinogens. *Toxicology* 1984; 33: 185-228.
150. Mate's JM, Pe'rez-Go'mez C, Nu'n~ez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999; 32: 595-603.
151. Radjendirane V, Joseph P, Jaiswal AK. Oxidative stress and signal transduction. Chapman and Hall New York pp 1997: 441-469.
152. Musch MW, Hayden D, Sugi K ve ark. Cell-specific induction of hsp72-mediated protection by glutamine against oxidant injury in IEC18 cells. *Proc Assoc Am Physicians* 1998; 110: 136–139.
153. Benov L, Fridovich I. Growth in iron-enriched medium partially compensates *E. coli* for the lack of Mn and Fe SOD. *J Biol Chem* 1998; 273: 10313-10316.

154. Whittaker M, Whittaker JW. A glutamate bridge is essential for dimer stability and metal selectivity in Mn-SOD. *J Biol Chem* 1998; 273: 22188-22193.
155. Majima H, Oberley TD, Furukawa K ve ark. Prevention of mitochondrial injury by Mn-SOD reveals a primary mechanism for alkaline-induced cell death. *J Biol Chem* 1998; 273: 8217-8224.
156. Hsieh Y, Guan Y, Tu C ve ark. Probing the active site of human Mn-SOD: the role of glutamine 143. *Biochemistry* 1998; 37: 4731-4739.
157. Mates JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 2000; 153: 83-104.
158. Guan Y, Hickey MJ, Borgstahl GE ve ark. Crystal structure of Y34F mutant human mitochondrial manganese superoxide dismutase and the functional role of tyrosine 34. *Biochemistry* 1998; 37: 4722-4730.
159. Mate's JM, Sa'nchez-Jime'nez F. Role of ROS in apoptosis. Possible implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32: 157-170.
160. Bravard A, Cherbonnel-Lasserre C, Reillaudou M ve ark. Modifications of the antioxidant enzymes in relation to chromosome imbalances in human melanoma cell lines. *Melanoma Res* 1998; 8: 329-335.
161. Banci L, Benedetto M, Bertini I ve ark. Solution structure of reduced monomeric Q133M2 copper, zinc superoxide dismutase (SOD). Why is SOD a dimeric enzyme? *Biochemistry* 1998; 37: 11780-11791.
162. Westman N, Marklund SL. Cu/Zn-SOD and Mn-SOD in human tissues and human malignant tumors. *Cancer Res* 1981; 41: 2962-2966.
163. Ho Y, Gargano M, Cao J ve ark. Reduced fertility in female mice lacking Cu/Zn-SOD. *J Biol Chem* 1998; 273: 7765-7769.
164. Adachi T, Wang XL. Association of EC-SOD phenotype with the endothelial constitutive NO synthase polymorphism. *FEBS Lett* 1998; 433: 166-168.
165. Sentman ML, Jonsson LM, Marklund SL. Enhanced alloxan-induced beta-cell damage and delayed recovery from hyperglycemia in mice lacking extracellular-superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 790-796.

166. Enghild JJ, Thogersen IB, Oury TD ve ark. The heparin-binding domain of Ec-SOD is proteolytically processed intracellularly during biosynthesis. *J Biol Chem* 1999; 274: 14818-14822.
167. Buschfort CM, Muller R, Seeber S ve ark. DNA excision repair profiles of normal and leukemic human lymphocytes: functional analysis at the single-cell level. *Cancer Res* 1997; 57: 651-658.
168. Levin ED, Brady TC, Hochrein EC ve ark. Molecular manipulations of extracellular superoxide dismutase: functional importance for learning. *Behav Genet* 1998; 28: 381-390.
169. Young H, Kim EJ, Roe JH ve ark. A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. *Biochem J* 1996; 318: 889-896.
170. Lledí'as F, Rangel P, Hansberg W. Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J Biol Chem* 1998; 273: 10630-10637.
171. Hunt C, Sim JE, Sullivan SJ ve ark. Genomic instability and catalase gene amplification induced by chronic exposure to oxidative stress. *Cancer Res* 1998; 58: 3986-3992.
172. Speranza M, Bagley AC, Lynch RE ve ark. Cells enriched for catalase are sensitized to the toxicities of bleomycin, adriamycin, and paraquat. *J Biol Chem* 1993; 268: 19039-19043.
173. Imai H, Narashima K, Arai M ve ark. Suppression of leukotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1998; 273: 1990-1997.
174. Yan H, Harding JJ. Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dis-mutase. *Biochem J* 1997; 328: 599-605.
175. Izawa S, Inoue Y, Kimura A. Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 1996; 320: 61-67.
176. Taylor S, Davenport LD, Speranza MJ ve ark. Glutathione peroxidase protects cultured mammalian cells from the toxicity of adriamycin and paraquat. *Arch Biochem Biophys* 1993; 305: 600-605.

177. Sies H, Sharov VS, Klotz LO ve ark. Glutathione peroxidase protects against peroxy-nitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxy-nitrite reductase. *J Biol Chem* 1997; 272: 27812-27817.
178. Chung HY, Kim HJ, Shim KH, Kim KW. Dietary modulation of prostanoid synthesis in the aging process: role of cyclooxygenase-2. *Mech Ageing Dev* 1999; 111(2-3): 97-106.
179. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen radicals and singlet oxygen. *Free Radicals in Biology and Medicine* 1984: 93-109.
180. Mahadik SP, Scheffer RE. Oxidative injury and potential use of antioxidants in schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1996; 55(1-2): 45-54.
181. Kurutaş Belge E, İnanç Güler F, Kılınç M. Serbest Radikaller. *Arşiv*, 2004; 13: 120-13.
182. Zimmerman BJ, Granger DN. Mechanisms of reperfusion injury. *Am J Med Sc* 1994; 307: 284-292.
183. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chemistry* 1995; 41: 1819-1828.
184. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984; 219: 1-14.
185. Nordberg J, Arner ESJ. Reactive Oxygen Species, Antioxidants and The Mammalian Thioredoxin System. *Free Radical Biology and Medicine* 2001; 31(11): 1287-1317.
186. Walling C. Oxidases and related redox systems. Pergamon Press. Oxford 1982: 85-97
187. Marks BD, Marks DA, Smith CM. Oxygen metabolism and oxygen toxicity. *Basic Med Biochemistry* 1996: 327-340.
188. Özkan A, Fışkın K. Serbest Oksijen Radikalleri, Karsinogenez ve Antioksidant Enzimler. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi* 2004; 14: 52-60.
189. Meram İ, Aktaran Ş. Serbest Radikallerin Biomoleküller Üzerine Etkileri. *Arşiv*. 2002; 11: 299.
190. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine*. 2th Ed. Oxford: Clarendon Pres, 1989; 125.

191. Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants: how do we know that they are working? *Critical Reviews in Food Sci. Nutrition* 2000; 32: 21-39.
192. Odetti P, Valentini S, Arango I ve ark. Oxidative stres in subjects affected by celiac disease. *Free Rad Res* 1997; 29: 17-24.
193. Kiss C, Li J, Szeles A ve ark. Assignment of the ARHA and GPX1 genes to human chromosome bands 3p21.3 by in situ hybridization and with somatic cell hybrids. *Cytogenet Cell Genet* 1997; 79: 228-230.
194. Orrell RW, Habgood JJ, Gradiner I ve ark. *J Neurology* 1997; 48: 746-751.
195. Huret JL, Delabar JM, Marlhens F ve ark. *Hum Genet* 1987; 75: 251-257.
196. Beyer W, Imlay J, Fridovich I. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1991; 40: 221-253.
197. Rosenblum JS, Gilula NB, Lerner RA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 4471-4473.
198. Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T ve ark. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 226: 561-565.
199. Ambrosone CB, Freudenheim JL, Thompson PA ve ark. *Cancer Res* 1999; 59: 602-606.
200. Van Landeghem GF, Tabatabaie P, Beckman G ve ark. *Eur J Neurol* 1999; 6: 639-644.
201. Hiroi S, Harada H, Nishi H ve ark. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 261: 332-339.
202. Folz RJ, Peno-Green L, Crapo JD. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 2251-2254.
203. Hendrickson DJ, Fisher JH, Jones C ve ark. *Genomics* 1990; 8: 736-738.
204. Ishida K, Morino T, Takagi K ve ark. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 10051.
205. Moscow JA, Morrow CS, He R ve ark. *J Biol Chem* 1992; 267: 5949-5958.
206. Shen Q, Townes PL, Padden C ve ark. *Genomics* 1994; 23: 292-294.
207. Emahazion T, Jobs M, Howell WM ve ark. *Gene* 1999; 238: 315-324.
208. Ho YS, Magnenat JL, Bronson RT ve ark. *J Biol Chem* 1997; 272: 16644-16651.
209. Beck MA, Esworthy RS, Ho YS ve ark. *FASEB J* 1998; 12: 1143-1149.
210. Chu FF, Rohan de Silva HA, Esworthy RS ve ark. *Genomics* 1996; 32: 272-276.

211. Brigelius-Flohe R. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 951-965.
212. Chu FF. *Cytogenet Cell Genet* 1994; 66: 96-98.
213. Thomas JP, Geiger PG, Maiorino M ve ark. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1045: 252-260.
214. Arai M, Imai H, Koumura T ve ark. *J Biol Chem* 1999; 274: 4924-4933.
215. Kelner MJ, Montoya MA. *Biochim Biophys Res Commun* 1998; 249: 53-55.
216. Hirono A, Sasaya-Hamada F, Kanno H ve ark. *Blood Cells Mol Dis* 1995; 21: 232-234.
217. Murray RK, Granner DK, Mayes PA ve ark. *Harper's Biochemistry*. 25 ed. Ebert MH, Loosen PT, Nurcombe B. *Current Psikiyatri*. Ankara: Güneş Kitabevi; New York: McGraw-Hill; 2000.
218. Hsu CY, Dimitrijevic MR. Commentary methylprednisolone in spinal cord injury: the possible mechanism of action. *J Neurotrauma* 1990; 7: 115-119.
219. Mate's JM, Sa'nchez-Jime'nez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosc* 1999; 4: 339-345.
220. Wagner B, Buettner GR, Oberley LW ve ark. Sensitivity of K562 and HL-60 cells to edelfosine, an ether lipid drug, correlates with production of reactive oxygen species. *Cancer Res* 1998; 58: 2809-2816
221. Choi HJ, Kang SW, Yang CH ve ark. Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution. *Nat Struct Biol* 1998; 5: 400-406.
222. Polvi A, Eland C, Koskimies S ve ark. HLA DQ and DP in Finnish families with celiac disease. *Eur J Immunogenet* 1996; 23: 221-234.
223. Jabri B, Kasarda DD, Green PH. Innate and adaptive immunity: the yin and yang of celiac disease. *Immunol Rev* 2005; 206: 219-231.