



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ÇOCUK GASTROENTEROLOJİ, HEPATOLOJİ VE
BESLENME BİLİM DALI

**ÇOCUKLARDA ÇÖLYAK HASTALIĞININ TANISI
VE İZLEMİNDE İSKEMİ MODİFİYE ALBÜMİN,
TOTAL OKSİDAN DURUM VE TOTAL ANTİOKSİDAN
KAPASİTENİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Uz. Dr. Ersin SAYAR

Antalya, 2013



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ÇOCUK GASTROENTEROLOJİ, HEPATOLOJİ VE
BESLENME BİLİM DALI

ÇOCUKLARDA ÇÖLYAK HASTALIĞININ TANISI VE İZLEMİNDE İSKEMİ MODİFİYE ALBÜMİN, TOTAL OKSİDAN DURUM VE TOTAL ANTİOKSİDAN KAPASİTENİN DEĞERLENDİRİLMESİ

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Uz. Dr. Ersin SAYAR

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Reha ARTAN

“Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

Antalya, 2013

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi birikimi, yakın ilgi ve önerileri ile beni yönlendiren tez danışmanım Prof.Dr. Reha ARTAN'a, çalışmanın yürütülmesinde değerli katkılarından dolayı Prof.Dr. Sebahat ÖZDEM ve Dr. Gülbahar UZUN'a, eğitim sürem boyunca emeği geçen başta Prof.Dr. Reha ARTAN, Doç.Dr. Aygen YILMAZ ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Gayaz AKÇURİN olmak üzere tüm öğretim üyelerine ve bütün süreçlerde desteğini aldığım anneme, babama, kayınpederime ve eşime teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Kısaltmalar Dizini	iv
Tablolar Dizini	v
Şekiller Dizini	vi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
1.1. Giriş	1
1.2. Amaç	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Çölyak Hastalığı	2
2.1.1. Tarihçe	2
2.1.2. Epidemiyoloji	3
2.1.3. Patojenez	6
2.1.4. Klinik bulgular	13
2.1.5. Tanı	18
2.1.6. Tedavi	21
2.2. Oksidatif Stres ve İskemi Modifiye Albumin	23
3. HASTALAR VE YÖNTEM	25
3.1. Hastalar ve Hasta Gruplarının Oluşturulması	25
3.2. Çalışmaya Dahil Edilmeme Kriterleri	25
3.3. Serum Örneklerinin Çalışılması	26
3.4. İstatistiksel Değerlendirme	27
4. BULGULAR	28
4.1. Demografik Özellikler	28
4.2. Klinik, Endoskopik, Histopatolojik Özellikler	28
4.3. Oksidan Ve Antioksidan Durum Belirteçleri	30
5. TARTIŞMA	32
5.1. Çölyak Hastalığı Tanısında Oksidan Ve Antioksidan Belirteçler	32
5.2. İMA'nın Histopatolojik Evre İle İlişkisi	33
5.3. Glutensiz Diyetin Oksidan Ve Antioksidan Belirteçlere Etkisi	34
6. SONUÇLAR	35
7. ÖZET	36
8. ABSTRACT	37
9. KAYNAKLAR	38

KISALTMALAR DİZİNİ

AOPP	Advanced Oxidative Protein Products
ÇH	Çölyak Hastalığı
dTG	Doku Transglutaminaz
GSH	Glutatyon
IgA	Immünglobulin-A
İMA	İskemi Modifiye Albümin
İEL	İntraepitelyal Lenfositöz
NOS	Nitrik Oksit Sentetaz
SH	Sülfidril
TAK	Total Antioksidan Kapasite
TOD	Total Oksidan Durum

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Çölyak hastalarının intestinal biyopsiler, kan ve idrar örneklerinde oksidatif stres belirteçleri ve antioksidan enzim düzeylerindeki değişiklikler	11
2.2. Çölyak hastalığının klinik bulguları	14
2.3. Çölyak hastalığının tanısında skorelama sistemi	19
2.4. Çölyak hastalığı tanısında kullanılan serolojik testler	20
2.5. Marsh-Oberhuber (modifiye Marsh) evreleme sistemi	21
2.6. Çölyak hastalığında olası yeni tedaviler	23
4.1. Çölyak hastalığı olan ve olmayan grupların cinsiyete göre dağılımı	28
4.2. Grupların yaş ortalamalarına göre değerlendirilmesi	28
4.3. Çölyak hastalığı bulunan çocukların klinik belirti ve bulguları	29
4.4. Çölyak hastalığı bulunan çocuklarda duodenum mukozasının endoskopik görünümü	30
4.5. Çölyak hastalığı bulunan çocuklarda duodenum biyopsilerinin histopatolojik evrelemesi	30
4.6. Çölyak hastalığı olanlar ile kontrol grubunun oksidan ve antioksidan belirteçler açısından karşılaştırılması	31
4.7. Glutensiz diyet öncesi ve sonrasında oksidan ve antioksidan belirteçlerin karşılaştırılması	32

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. İntestinal epitelyal hasarda toksik ve immünojenik peptitlerin rolü	7
2.2. Glutenin oksidatif stres ve gen ekspresyonu üzerine etkileri	10
2.3. Çölyak buzdağı modeli	13

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Giriş

Çölyak hastalığı genetik ve çevresel faktörlerin kompleks etkileşimi ile karakterize, devamlı gluten intoleransı sonucu ince barsağın kronik otoimmün inflamatuvar hastalığıdır. Genetik olarak yatkın bireylerde gluten, intestinal epitelyal hasara neden olan çevresel etkindir (1). Çocuklarda tanı, karın ağrısı, ishal gibi intestinal veya büyüme-gelişme geriliği, demir eksikliği anemisi gibi ekstraintestinal belirti ve bulguları olan ve anti-doku transglutaminaz, anti-endomisyum antikorları pozitif saptanan hastalarda endoskopi ve alınan biyopsilerin değerlendirilmesi ile konulur. Duodenum biyopsisinde intraepitelyal lenfositoz, kript hiperplazisi ve villöz atrofinin görülmesi tanı için gereklidir. Tedavide ömür boyu glutensiz beslenme düzeni gerekmektedir (2).

Çölyak hastalığında, intestinal epitelyal hasar başlıca iki mekanizmayla gerçekleşir: ‘toksik’ ve ‘immünojenik’. Besinlerle alınan gluten preteolizis ile toksik ve immünojenik peptitlere dönüşür. Enterositlere alınan toksik peptitler burada oksidatif strese ve buna bağlı olarak apoptosis artışı, hücre farklılaşmasında bozukluk ve ‘tight junction’ bağlantılarında bozulmaya neden olurlar. Bu değişiklikler, epitelyal bariyerde bozulma ve permeabilite artışına neden olarak peptitlerin enterositi doğrudan geçmesine ve doğal ve adaptif immün yanıtı uyarmalarına neden olur. Bunun sonucunda hücre hasarı ve villöz atrofi gelişir (3).

1.2. Amaç

Çölyak hastalığı patojenezinde önemli bir basamak olan oksidatif stresin bir göstergesi olan iskemi modifiye albümin (İMA) ve total oksidan durum (TOD) ile total antioksidan kapasite (TAK) düzeylerini çölyak hastalığı tanısı sırasında ve glutensiz beslenme düzeni sonrasında araştırmayı amaçladık. Bu göstergeleri çölyak hastalığında araştıran herhangi bir çalışmaya literatürde rastlamadık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Çölyak Hastalığı

2.1.1. Tarihçe

Tarihte çölyak hastalığına ait ilk tanım milattan sonra birinci yüzyılda Kapadokya’da yaşadığı sanılan hekim Arateus’un notlarında bulunmuştur (4). Bu notlarda çölyak hastalığı (ÇH), kadınlarda erkeklerden daha sık görülen, çocuklarda ve erişkinlerde ortaya çıkabilen, ishal ve malabsorbsiyon ile ilişkili bağırsak hastalığı olarak tanımlanmıştır (5). Hastalığın besin alımına bağlı olduğu düşüncesi 1888’de Gee tarafından öne sürülmüştür (6). Bu düşünce, buğday ve arpa tüketiminin ÇH’ye neden olduğunu ve bu tahılların diyetten çıkarılmasının hastalıkta düzelmeye yol açtığını saptayan Dicke ve arkadaşları tarafından 1953’te kanıtlanmıştır (7). Hastalığın klinik bulgularının ince barsağın duvar bütünlüğünde bozulma ile ilişkili olduğunu ilk olarak 1954’te Paulley bildirmiştir (8). Uzun yıllar sonra Marsh, intraepitelyal lenfositozla birlikte hiperplazik kriptlerden total villöz atrofiye uzanan histolojik bir sınıflandırma oluşturmuştur (9).

Hastalığın klinik ve histolojik tanımları konusunda önemli bir ilerleme kaydedildiği dönemde epidemiyolojik çalışmalar da, ÇH’nin ikizlerde ve birinci derece akrabalarda sıklığının arttığını göstererek genetik geçiş varlığını ortaya koymuşlardır (10). Majör histokompatibilite kompleks sınıf II genlerinin klonlamasıyla HLA-DQ2 ve HLA-DQ8 genlerinin ÇH için sorumlu genler olduğu saptandı (11). ÇH ve HLA genleri arasındaki ilişki kanıtlanmış iken, Ferguson ve ark. ÇH’nin, ince barsak mukozasında glutene karşı lenfosit aracılı immünite ile ilişkisini ve T hücre aracılı immünitenin kript hiperplazisi ve villöz atrofiye neden olduğunu bildirdiler (12). Ardından intestinal biyopsilerde uygulanan immünolojik çalışmalarda, patojenezde önemli rol oynayan inflamatuvar gluten-reaktif T hücrelerinin, yalnızca HLA-DQ2 ve HLA-DQ8 varlığında gluteni seçici olarak tanıdığı ve sadece ÇH olan bireylerin ince bağırsak mukozasında bulundukları ortaya konmuştur (13,14). Glutenin doku transglutaminaz 2 (dTG2) için mükemmel bir substrat olduğunun bulunmasından sonra, genellikle negatif yüklü peptitlerle bağlanmaya meyilli olan HLA-DQ2 ve HLA-DQ8’in, glutaminden zengin ve asidik kalıntılardan fakir olan gluten ile bağlanması anlaşıldı. Glutenin glutamin kalıntıları dTG2 tarafından

deaminasyon ile negatif yüklü glutamat kalıntılarına dönüştürülüyordu (15). Ardından Schuppan ve ark. besin antijeni ile indüklenmekle birlikte hastaların dTG2 enzimine karşı antikor geliştirdiklerini ve ÇH'nin otoimmün komponentini gösterdi (16). Ayrıca otoimmünite ile ÇH ilişkisi, tip 1 diabet ve otoimmün tiroidit gibi diğer otoimmün hastalıklar ve ÇH arasında muhtemel bir bağlantı gösterilerek desteklendi (17).

Patojenezdeki rolü kanıtlanmakla birlikte, CD4⁺ T hücre aracılı adaptif bağışıklığın villöz atrofi ve intestinal hasarı tetiklemede gerekli ancak yeterli olmadığı ve olası non-HLA genlerinin rolü Ferguson ve ark. tarafından öne sürüldü (18). Nitekim CD8⁺ intraepitelyal lenfositlerin NK hücre reseptör ekspresyonunu uyarak, stres ve inflamasyonla indüklenen MHC sınıf I molekül eksprese eden epitel hücrelerini öldürdükleri saptandı (19). Günümüze kadar çoğu inflamatuvar ve immün yanıtla ilişkili olmak üzere hastalığa yatkınlık oluşturan 39 non-HLA gen tanımlanmıştır (20).

Patojenezi aydınlatma konusunda çok sayıda gelişme gözlenmekle birlikte, çok sayıda etmenin rol oynadığı bu kompleks hastalığın mekanizması hakkında birçok soru halen cevaplanmayı beklemektedir.

2.1.2. Epidemiyoloji

Geçmişte ÇH, genellikle Avrupa kökenlileri etkileyen ve çoğunlukla yaşamın ilk yıllarında başlangıç gösteren nadir bir hastalık olarak düşünülmekteydi. Bu dönemde tanı tipik gastrointestinal semptomların varlığına ve ince bağırsak biyopsisine dayanyordu. İlk önce anti-gliadin ardından anti-endomisyum ve anti-transglutaminaz antikorları olmak üzere yüksek özgün ve duyarlı serolojik belirteçlerin kullanımı ile birlikte, klinik olarak atipik ve hatta sessiz formlar da dahil ÇH'nin prevalansını tam olarak belirlemek mümkün olmuştur (21). Genel toplumun serolojik testlerle taramasına dayanan epidemiyolojik çalışmalar ilk olarak yaklaşık 20 yıl kadar önce İtalya'da başlamıştır. Sağlıklı 17.201 İtalyan öğrencide yapılan bir serolojik taramada daha önce tanımlanmış vakalarla birlikte toplam prevalans 1000'de 5.44 veya 184 bireyde 1 olarak saptanmıştır. Ayrıca daha önce tanımlanmış vakaların tanımlanmamışlara oranı 1:7 olarak bulunmuştur (22).

Yakın dönemde yayınlanan ve dört Avrupa ülkesinde geniş çaplı çok merkezli yapılan bir çalışmada, ÇH'nin toplam prevalansı %1 olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada prevalansın ülkeler arasında geniş farklılıklar gösterdiği görülmüş

(Finlandiya’da %2, İtalya’da %1.2, Kuzey İrlanda’da %0.9, Almanya’da %0.3) ve çoğu çölyak hastasının serolojik tarama yapılmadan saptanamayacağı sonucuna varılmıştır (23).

Amerika Birleşik Devletleri (1:133) ve çoğunlukla Avrupa orjinli bireylerin oluşturduğu Avustralya ve Yeni Zellanda gibi gelişmiş ülkelerden de benzer sonuçlar bildirilmiştir (24-26). Çölyak hastalığının sıklığı, yine çoğunluğunu Avrupa orjinli bireylerin oluşturduğu Güney Amerika ülkelerinde de araştırılmıştır. Brezilya’da kan donörlerinde ÇH prevalansının 1:214 ila 1:681 arasında olduğu saptanmıştır (27,28). Arjantin’de 2000 erişkinin katıldığı bir çalışmada ise bu oran 1:167 olarak bildirilmiştir (29).

Yakın dönemdeki epidemiyolojik çalışmalar, ÇH prevalansının Kuzey Afrika ve Asya ülkelerinde de Avrupa ortalamasına yakın seyrettiğini göstermektedir. Çölyak hastalığının prevalansı Mısır’da %0.53, Libya’da %0.79, Tunus’ta %0.6, İran’da %0.88 ve Hindistan’da %0.7 olarak bulunmuştur (30-34). Ülkemizde yapılan çalışmada ise Dalgıç ve ark. sağlıklı okul çocuklarında hastalık prevalansını en az 1:212 (%0.47) olarak bildirmişlerdir (35).

Hastalığın sıklığının ülkeler arasında farklılık göstermesi, asıl olarak sorumlu etmenler olan genotip (HLA-DQ2, HLA-DQ8) ve gluten tüketiminin dünya çapında farklılık göstermesinden kaynaklanmaktadır (36). Dünyada ÇH prevalansının en yüksek (%5.6) görüldüğü bölge olan Cezayir’in güneyinde akraba evliliğinin sık görülmesi, HLA-DQ2’nin yüksek frekansı ve glutenin yoğun tüketilmesi hastalık sıklığını açıklamaktadır (37). Bununla birlikte HLA ilişkili genlerin düşük sıklıkla görüldüğü ve gluten içeren tahıl tüketiminin düşük olduğu Sahra altı Afrika ve Uzak Doğu ülkelerinde ÇH’nın prevalansı da oldukça düşüktür (21).

Çölyak hastalığının epidemiyolojisi ortaya atılan ‘iceberg’ modeli ile özdeşleşmiştir (38). Bu modele göre, sadece genotip ile değil, aynı zamanda gluten tüketimi ile de ilişkili olan toplumdaki ÇH vakalarının sayısı, buz dağının boyutunu gösterir. Tipik vakalar hastalığı düşündürecek şikayetlere neden olduğundan genellikle tanı alırlar. Bu grup buz dağının görünen kısmını oluşturur ve hastağın insidansını gösterir. Gelişmiş ülkelerde her bir tanımlanan olguya karşın beş olgu, şikayetlerin olmaması veya atipik ya da hafif olmasına bağlı olarak tanı alamaz. Bu vakalar da buz dağının görünmeyen büyük kısmını oluşturur. Tedavi altında olmayan

bu bireyler infertilite, osteoporoz ve kanser gibi ÇH'nın uzun dönem komplikasyonları açısından risk altındadır (21).

Günümüzde, tanı oranını arttırmada en etkili yöntem risk gruplarına odaklı vaka taramasıdır. Etik olarak uygun bu yaklaşım ile aynı zamanda da giderler asgari düzeyde tutulabilir. Çölyak hastalığının değişik klinik tipleri konusunda farkındalık ve serolojik testlerin daha yaygın kullanımı, bu durumun görünmeyen kısmının önemli bir bölümünü ortaya çıkarabilir.

Gelişmiş ülkelerde ÇH prevalansının artış eğiliminde olası bir diğer ilginç noktadır. Finlandiya'da ÇH prevalansı 20 yıl içerisinde yaklaşık iki kat (1978-80'de %1.05, 2000-01'de %1.99) artmıştır (39). Bu belirgin artışın, sadece hastalığı tarama yöntemlerinin gelişmesi ile açıklanabilmesi mümkün değildir. Amerika Birleşik Devletleri'nde ÇH'nın doğal seyrini değerlendiren bir başka çalışmada, erişkin yaş grubunda son 30 yıl içerisinde hastalık prevalansının beş kat arttığı bildirilmiştir. Bu çalışma, glutene tolerans kaybının bilinmeyen etkenlerden dolayı hayatın herhangi bir döneminde ortaya çıkabileceğine dikkat çekmektedir (40). Bu gözlemin özellikle erişkin popülasyon açısından, ÇH tanı ve tedavisi üzerine geniş kapsamlı etkileri olabilir.

Gelişmiş ülkelerde son bir kaç dekatta allerjik hastalıklar gibi otoimmün hastalıkların insidansında da sürekli bir artış olduğu gözlenmektedir. ‘‘Hijyen hipotezi’’ne göre, Batı ülkelerindeki nispeten daha temiz çevre şartları, erken çocukluk dönemindeki infeksiyonların sıklığını azaltır ve bağırsaktaki mikroorganizma spektrumunu değiştirir. Bu değişiklikler immün yanıtı düzenleyerek değişik otoimmün hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilir (41). Bununla birlikte A.B.D.'nde erişkin başlangıçlı ÇH prevalansında artışın, çocukluk dönemindeki hijyenik değişiklikler ile açıklanması zordur.

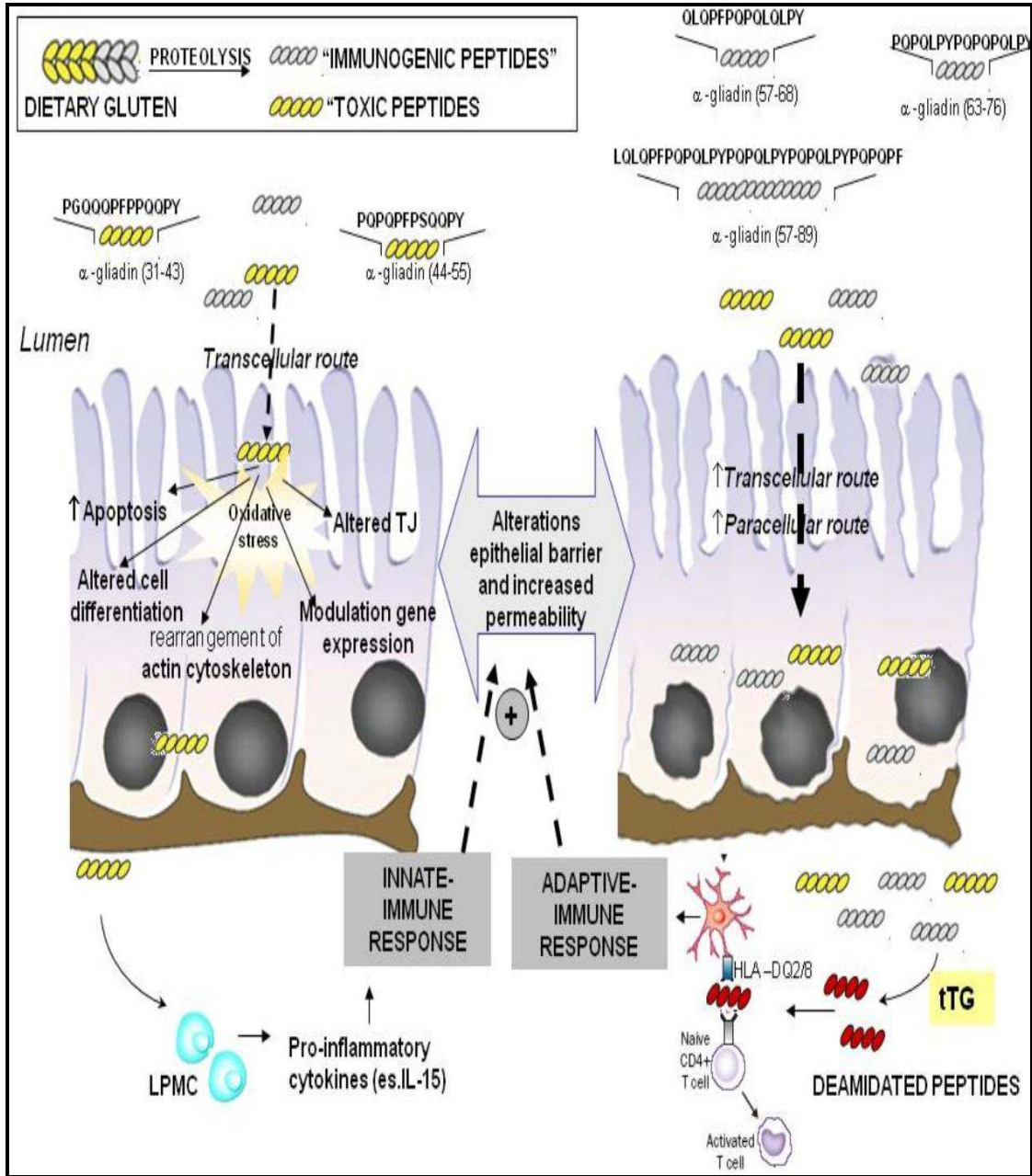
Alınan glutenin miktar ve kalitesi, buğday hamur fermentasyonunun tipi ve süresi, bağırsaktaki mikroorganizmaların spektrumu ve zamanla nasıl değiştikleri, intestinal infeksiyonlar ve genel stres faktörleri tolerans-immün yanıt ayarının düzenleyicileri gibi görünmektedir (42-44). Bu faktörlerin glutene tolerans kaybına neden olup olmadıkları ve oluyorlar ise olası mekanizmaların aydınlatılması konusunda geniş kapsamlı çalışmalar ihtiyaç vardır. Bu çalışmaların sonuçları sadece ÇH'dan değil diğer otoimmün hastalıklardan da korunma konusunda bizlere yardımcı olabilir.

2.1.3. Patojenez

Fizyolojik şartlarda, bağırsak epiteli gliadin gibi makromoleküllere karşı geçirgen değildir. ‘Tight junction’ (TJ) düzenlemesinde rol alan bir intestinal peptit olan zonulin düzeyinin yükselmesi, geçirgenliğin artışında asıl sorumlu olarak görülmektedir (45). Normal sıçan intestinal hücresinin gliadin ile stimülasyonu sonrası zonulin, intrasellüler aktin filamanlarının protein kinaz C aracılı polimerizasyonunu indükler, bu filamanlar polimerizasyon sonrası TJ proteinleri ile bağlanarak epitelyal geçirgenliği düzenlerler (46). Ayrıca, tümör nekrozis faktör- α ve interferon- γ gibi inflamatuvar mediatörlerin endotelyal ve epitelyal geçirgenliği arttırdığının gösterilmesi ile asıl olarak zonulin tarafından oluşturulan intestinal bariyer fonksiyonunun gliadinin submukozaya girişi sonrası gelişen inflamatuvar yanıt ile hasarlanabileceği ortaya konmuştur (47). Bu bulgular ışığında, ÇH, genetik ve çevresel faktörler arasındaki kompleks etkileşimle niteli, gluten veya gliadine karşı kalıcı intoleransa bağlı olarak gelişen ince bağırsakların kronik inflamatuvar bir hastalığı olarak tanımlanabilir (3,21).

Hastalığa neden olan çevresel faktör, glutendir. Gluten içinde yer alan gliadin peptitlerinin asıl olarak immünomodülatör etki ile, diğer bazı peptitlerin ise asıl olarak oksidatif stres ve pro-inflamatuvar sitokinlerin salınımı aracılığı ile sitotoksositeye neden oldukları gösterilmiştir (48,49). Nitekim glutensiz diyet ile hastalarda klinik düzelme görülür. Besin proteinleri epitelden taşınmadan önce peptidazlar vasıtasıyla küçük peptitlere ve aminoasitlere indirgenirler. Buğday ve ilişkili tahıllardaki gliadin ve diğer proteinlerin yüksek prolin ve glutamin içeriği, insan bağırsağında bu proteinleri tam proteolitik yıkıma dirençli hale getirir. Böylece yüksek prolin ve glutamin konsantrasyonuna sahip oligopeptitler, ince bağırsakta birikir ve genetik olarak yatkın bireylerde toksik etki oluşturabilirler (50).

Şekil 2.1’de ÇH’da intestinal epitelyal hasara neden olan toksik ve immünojenik peptitlerin rolü görünmektedir. İntestinal hücrelerdeki toksik peptitler, TJ fonksiyonlarında bozulmayı ve apoptozis, hücre farklılaşmasında değişim gibi bazı sitotoksik etkileri tetiklerler. Bu etkilerin çoğu, enterositlerde gluten peptitleri ile indüklenen artmış oksidatif strese bağlı olarak gelişir. Bu değişiklikler, epitelyal bariyerde bozulmaya ve geçirgenliğin artmasına neden olur. Sonuç olarak toksik ve immünojenik peptitler enterositler boyunca ilerleyerek ÇH’da hücre hasarı ve villöz atrofiye neden olan doğal ve adaptif immün yanıtı aktive ederler (3).



Şekil 2.1. İntestinal epitelyal hasarda toksik ve immünojenik peptitlerin rolü (3,48).

Çölyak hastalığı seyrinde değişik gluten peptitleri yer alır. Bilgisayar model çalışmaları α-gliadin'den köken alan biyolojik olarak aktif iki farklı peptit grubunu ortaya koymuştur. Serin içeren peptit grupları asıl olarak sitotoksik etkiye sahip iken, tirozin içeren gruplar immünojenik reaksiyonları tetikleme kapasitesine sahiptirler. Eğer bu aktif peptitlerin sindiriminde yetersizlik mevcutsa ÇH'da her iki tip aktivite görülmesi mümkündür. Serin içeren peptitlerin aktivitesi PSQQ ve QQQP dizileri ile

ilişkili iken tirozin içerenlerde immünolojik aktiviteden QQPY ve QPYP dizileri sorumlu tutulmaktadır. Yaygın olarak araştırılmış olan α -gliadin peptitlerinden bazıları P31-43, P31-49, P44-55, P57-68, P57-89 ve P63-76'dır (48,49,51).

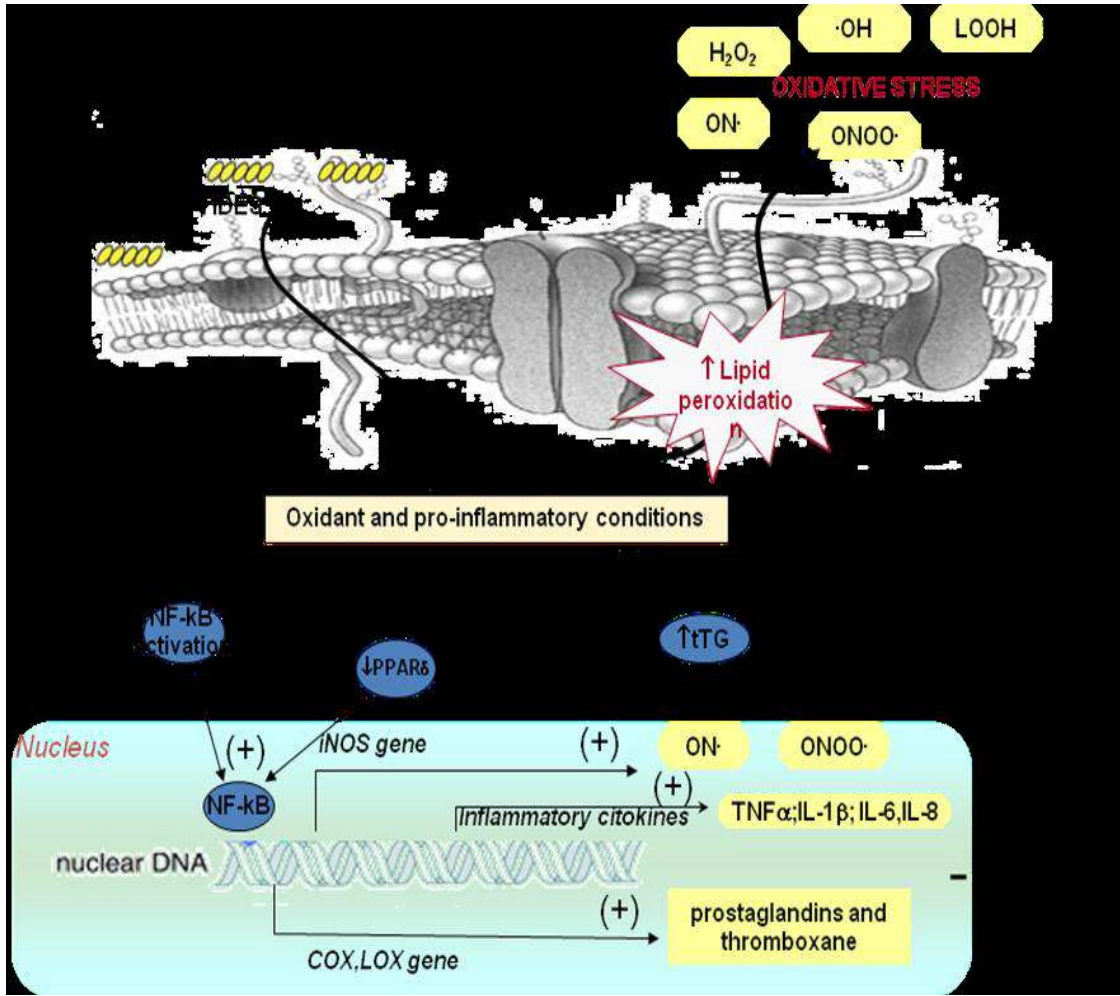
P-57-68, P57-89 ve P63-76 gibi immünojenik peptitler, antijen prezente eden hücrelerdeki HLA-DQ2 veya DQ8 ile bağlanıp sonucunda T-hücre stimülasyonuna, dolayısıyla adaptif immün yanıtı neden olurlar (52-53). Bu kalıntıların sürekli mevcudiyeti ise onları doku transglutaminaz (dTG) enzimi için tercih edilebilir bir substrat haline getirir. Asıl fonksiyonu glutamin verici proteinlerdeki kovalen ve geri dönüşümsüz bağlanan glutamin kalıntısını, glutamin alan proteinlerdeki lizin kalıntısı ile katalizlemek olan dTG, bu reaksiyon sonucunda DQ-'gluten' peptit komplekslerini oluşturur (54). Bununla birlikte dTG, düşük pH'ta veya ortamda alıcı protein bulunmasa bile peptit yapısındaki glutamini glutamik aside hidrolize ederek gluten peptitlerinin immünojenitesini arttırabilir (55). Oluşan DQ-'gluten' peptit kompleksleri DQ2 veya DQ8 mevcudiyetinde, özellikle interferon-gamma gibi Th1 tipi sitokinler üreten T-helper hücrelerini aktive ederler. Th1 sitokin sekresyonu, villöz yapının kaybı ve dolayısı ile intestinal mukoza hasarına neden olan matrix metalloproteinazları gibi enzimlerin salınımına yol açar (56). Th1 sitokinlerin artışı intestinal permeabilite artışına neden olur ve bu da, intestinal lümende gluten peptitleri varoldukça, gluten peptitlerin pasajını ve antijen prezente eden hücrelerdeki DQ2 ve DQ8 ile bağlanmasını arttırarak inflamatuvar sürecin 'kronik feedback' ile devamına yol açar. Toksik gluten peptitleri ile epitelyal hücreler, makrofajlar ve dendritik hücreler gibi lamina propriadaki spesifik hücrelerin arasındaki etkileşimler, interlökin-15 gibi medyatörlerin ekspresyonunda ve intraepitelyal lenfosit sayısında artışa neden olarak doğal immün yanıtı uyarırlar (57). Bu değişiklikler de mukozal matriks hasarında rol alırlar. Doğal immün yanıtın ana medyatörü olan interlökin-15, kript hiperplazisine neden olan kript enterositlerinin proliferasyonunda rol oynar (58).

İmmünojenik etkilerinin yanı sıra gliadin peptitleri, intestinal biyopsilerde veya in vitro hücre kültürlerinde gösterildiği gibi doğrudan intestinal hücre yapı ve fonksiyonlarını etkileyebilirler. Bu etkiler, daha önce araştırılmış olan P31-43, P31-49, P44-55 gibi 'toksik peptitler' tarafından ve iki farklı ana moleküler mekanizma (oksidatif stres ve gen ekspresyonu) ile oluşturulur (59,60).

2.1.3.1. Glutenin oksidatif stres üzerine olan etkisi

Özellikle P31-43 gibi bazı α -gliadin peptitleri hücrelere penetre olma yeteneğine sahiptirler. Bunlar ‘endositik uptake’ ile hücre içine girerler (61). Lizozomlarda peptit P31-43 depolanması, bazı sinyal iletim yollarını aktive ederek reaktif oksijen ve reaktif nitrojen radikalleri gibi serbest radikallerin miktarını artırır (Şekil 2.2) (62). Bu yüzden oksidatif stresin gliadin toksisitesinde rol alan mekanizmalardan biri olduğu varsayılmaktadır. Farklı hücre modellerinde yapılan çalışmalarda, gliadine maruziyetin artmış lipid peroksidasyon ürünleri, artmış GSSG/GSH glutasyon oranı ve azalmış protein bağlı sülfidril grupları ile karakterize intrasellüler oksidatif düzensizliğe neden olduğu bildirilmiştir (63). Ayrıca hücre membranında da belirgin yapısal bozukluklar da tespit edilmiştir. Oksidatif etkide artış; hücre morfolojisi, proliferasyonu, apoptozis ve hücrenin yaşam döngüsünde değişikliklere neden olarak belirgin hasar oluşturabilir (59, 64-66).

Glutenin oksidatif stres ve gen ekspresyonu üzerine etkileri Şekil 2.2’de özetlenmektedir. Enterositlerdeki gliadin peptitleri tarafından tetiklenen oksidatif dengedeki değişiklik transkripsiyon faktörü ‘nuclear factor kappa light-chain-enhancer of activated B cells’ (NF- κ B) aktivasyonuna neden olur. NF- κ B aktivasyonu, proinflatuvar sitokinlerin ve siklooksijenaz 2 (COX2), indüklenebilir nitrik oksit sentetaz (iNOS) gibi enzimlerin transkripsiyonunu dolayısıyla prostaglandin ve nitrik oksit (NO) metabolitlerinin üretimini arttırarak oksidatif strese katkıda bulunur. Ayrıca dTG aracılı ‘peroxisome proliferator-activated receptors gamma’ (PPAR γ) down-regülasyonu oksidatif streste artışa neden olur. PPAR γ downregülasyonu NF- κ B aktivasyonunu uyarır (59,63-66).



Şekil 2.2. Glutenin oksidatif stres ve gen ekspresyonu üzerine etkileri (59,62).

Oksidatif hasar ile ÇH arasındaki ilişki intestinal hücrelerde, kan ve idrarda yapılan çeşitli çalışmalarla desteklenmiştir. Çölyak hastalarının intestinal biyopsiler, kan ve idrar örneklerinde oksidatif stres belirteçleri ve antioksidan enzim düzeylerindeki değişiklikler Tablo 2.1’de verilmiştir. Aktif çölyak hastalarının ince bağırsak biyopsi örneklerinde prostaglandin E2 (PGE2) düzeylerinde artış gösterilirken, diğer taraftan antioksidan enzimler glutasyon peroksidaz ve redüktaz düzeylerinde dolayısıyla glutasyon (GSH) düzeyinde düşüş saptanmıştır (67-70). Bazı araştırmalarda saptanan NO düzeylerinde artış sonucu reaktif nitrojen türlerinin ÇH patojenezinde rol oynadığı düşünülmektedir. Çölyak hastalarının duodenum biyopsilerinde iNOS aktivitesinin arttığı ve bu aktivitenin glutensiz diyet uygulanması sonrasında normale döndüğü gösterilmiştir (71,72). Ayrıca ÇH mevcut olan

çocuklarda serum ve idrarda yüksek düzeylerde NO varlığı ve bunun ince bağırsakta artmış iNOS ekspresyonu ile korele olduğu gösterilmiştir (73,74).

Tablo 2.1. Çölyak hastalarının intestinal biyopsiler, kan ve idrar örneklerinde oksidatif stres belirteçleri ve antioksidan enzim düzeylerindeki değişiklikler (3).

İntestinal biyopsiler	Lipit hidroksiperoksit (LOOH) düzeylerinde artma Glutasyon (GSH) düzeylerinde azalma Glutasyon peroksidaz (GPx) aktivitesinde azalma Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesinde azalma Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinde artma Paraoksonaz-1 (PON1) ve paraoksonaz-3 (PON3) ekspresyonunda azalma İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonunda artma
Plazma ve kan hücreleri	Plazmada lipit hidroksiperoksit (LOOH) düzeylerinde artma Plazma ve lipoproteinlerde tiobarbitürik asit reaktif ürünlerinde artma Plazmada karbonil gruplarının düzeylerinde artma Lökositlerdeki DNA'da 8-hidroksiguanozin (8-oxodG) düzeylerinde artma Plazmada NO metabolitlerinin düzeylerinde artma Plazmada nitrotirozin düzeylerinde artma Plazmada glutasyon (GSH) düzeylerinde azalma Kanda glutasyon peroksidaz (GPx) aktivitesinde azalma Kanda glutasyon redüktaz (GR) aktivitesinde azalma Kanda süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinde artma Plazma ve eritrositlerde alfa-tokoferol düzeylerinde artma Plazma askorbik asit düzeylerinde azalma Plazma retinol düzeylerinde azalma
İdrar	DNA'da 8-hidroksiguanozin (8-oxodG) düzeylerinde artma

2.1.3.2. Glutenin gen ekspresyonu üzerine etkileri ve bunun oksidatif stres ve inflamasyonla ilişkisi

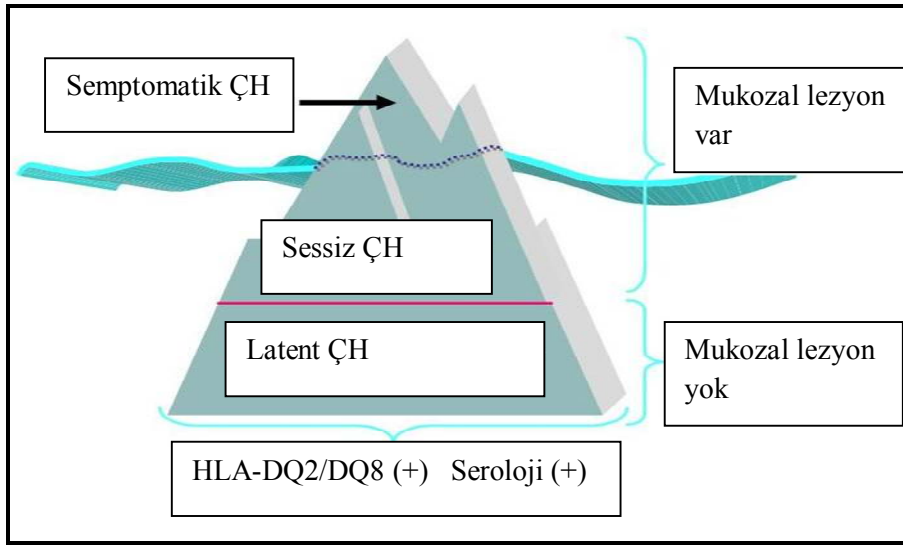
Çeşitli hücre modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda, gliadin peptitlerinin gen ekspresyonunu ayarlama yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (75,76). Reaktif oksijen radikallerinin (ROS) artmış düzeyleri, ubikuitin-proteazom sistemi yoluyla dTG'nin azalmış yıkımına ve böylece çölyak mukozasında uygun hedefler için artmış dTG düzeylerine neden olur. P31-43 tarafından indüklenen ROS-dTG aksının kontrolsüz aktivasyonu, 'PPAR γ down-regülasyonu' ile inflamasyon kontrolünde bozulmaya yol açar (77,78). Çölyak hastalarında 'PPAR γ down-regülasyonu' duodenum biyopsi örneklerinde proteomik analiz ile gösterilmiştir (79). Bununla birlikte epitelial hücreler dahil çeşitli hücre tipleri tarafından PPAR γ reseptör üretimi artırılıp inflamatuvar genlerin ekspresyonu azaltılarak, inflamatuvar yanıtın baskılanması ve oksidatif stresin düzenlenmesi sağlanabilir (62,77).

Ortaya atılan bir diğer hipotez ise 'PPAR γ down-regülasyonu'nun NF- κ B aktivasyonunda yer aldığıdır (Şekil 2.2). Çölyak hastalığının patojenezinde yer alan birçok pro-inflamatuvar sitokin, adezyon molekülleri ve enzimlerin gen ekspresyonunun NF- κ B tarafından düzenlendiği saptanmıştır (75,80). NF- κ B ve diğer transkripsiyon faktörlerinin sentezi intrasellüler redoks durumuna bağlıdır ve sinerjistik olarak pro-inflamatuvar genlerin transkripsiyonel aktivitesi ile uyarılabilir (81,82). Gerçekten de, gliadin peptitleri varlığında inkübe edilen hücrelerde, siklooksijenaz-2 (COX-2) ekspresyonu, sitozolik fosfolipaz A2 (cPLA 2) aktivitesi ve IL-8 salınımında artış saptanmıştır (76,83). Ayrıca interferon- γ tarafından stimüle edilen RAW 264.7 makrofajlarında, gliadin, NF- κ B ve diğer transkripsiyon faktörleri (IRF1 ve STAT-1 α) aracılığıyla iNOS gen ekspresyonunu artırır (75,84).

Gluten ile oksidatif stres, gen ekspresyonu ve inflamasyon arasındaki ilişki yakın zamanda yapılan bir çalışma ile desteklenmiştir. Bu çalışmada tedavi edilmemiş çölyak hastalarının ince bağırsak biyopsi örneklerinde 'cDNA microarray' kullanılarak gen ekspresyonu analizi uygulanmış ve hücre sinyali ve farklılaşmasında görevli 30 genden dokuzunun ekspresyonunda kontrol örneklerle göre farklılık saptanmıştır (85). Farklı bir hücre modeli kullanılan bir diğer çalışmada ise, glutenle temasın ardından 30 genden 29 genin ekspresyonunda farklılık saptanmıştır. Glutenin kesilmesinden sonra ince bağırsak biyopsi örneklerinde 29 genin ekspresyonunu ilk haline geri dönmüştür (86).

2.1.4. Klinik bulgular

Çölyak hastalığı, epidemiyoloji kısmında daha önce bahsedilen ‘buzdağı modeli’ ile adeta özdeşleşmiştir (Şekil 2.3). Bu modele göre buzdağının suyun üstünde kalan kısmı klinik bulgu veren hastalardan oluşurken, suyun altında kalan kısım ise ‘latent’ ve ‘silent’ çölyak hastalarından oluşur. Klinik bulgu henüz gelişmemiş olan ‘latent’ ve ‘silent’ çölyak hastalarının arasındaki fark, ‘silent’ grupta mukoza değişiklikleri mevcut iken ‘latent’ grupta mukoza değişikliklerinin başlamamış olmasıdır (21,38).



Şekil 2.3. Çölyak buzdağı modeli (38).

Çocuklarda ÇH değişik klinik bulgularla ortaya çıkabilir. Bulguların ortaya çıkma yaşı ve hastalığın süresi gibi faktörler bu geniş spektrumdan sorumludur (87). Hastalığın klinik bulguları ile eşlik edebilen otoimmün ve genetik hastalıklar Tablo 2.2’de verilmiştir (21).

2.1.4.1. Tipik ÇH

Hastalığın bu formu villöz atrofi ve bağırsak malabsorbsiyonunun tipik bulguları ile karakterizedir. Genellikle 6 ve 24. aylar arasında büyüme geriliği, anormal dışkı, karın şişliği, kaslarda erime ve hipotoni, iştahsızlık ve mutsuz görünüm, apati gibi belirti ve bulgularla ortaya çıkar. Gelişmekte olan ülkelerde kronik ishal, karın şişliği ve anemi sık görülen bulgulardır (38).

2.1.4.2. Atipik ÇH

Atipik ÇH genellikle daha büyük çocuklar ve erişkinlerde görülürken belirgin malabsorbsiyon bulguları gözlenmez. İntestinal bulgular olmayabilir veya tekrarlayan karın ağrısı, bulantı, kusma, şişkinlik, dış minesı bozuklukları, tekrarlayan aftöz stomatit gibi alışılmadık şikayetler mevcuttur (21,88). İlerleyici olmayan ve hafif karaciğer inflamasyonuna bağılı izole serum aminotransferaz yüksekliğı çocukluk çağında yaygın görülen bir bulgudur (89). Herhangi bir organ veya sistemi etkileyebilen hastalığın çeşitli ekstraintestinal bulguları tanımlanmıştır.

Tablo 2.2. Çölyak hastalığının klinik bulguları (21).

Tipik ÇH	Atipik ÇH	Eşlik eden otoimmün hastalıklar	Eşlik eden genetik hastalıklar
Kronik ishal	Kısa boy	Tip 1 diabet	Down sendromu
Büyüme geriliğı	Osteopeni/osteoporoz	Otoimmün tiroidit	Turner sendromu
Karın şişliğı	Hipertransaminazemi	Otoimmün hepatit	Williams sendromu
Kaslarda erime	Dermatitis herpetiformis	Myastenia gravis	IgA eksikliğı
Anoreksi	Dental enamel hipoplazi	Primer bilyer siroz	
Davranış değışiklikleri	Tekrarlayan aftöz stomatit	Primer sklerozan kolanjit	
	Tekrarlayan karın ağrısı	Psöriasis	
	Kusma	Sjögren hastalığı	
	Anemi (demir, B12, folat eksikliğı)	İdiopatik trombositopenik purpura	
	Kabızlık		
	Baş ağrısı		
	Polinöropati		
	Beyaz cevher lezyonları		
	Serebellar ataksi		
	Epilepsi		
	Puberta gecikmesi		
	Tekrarlayan düşükler		
	İnfertilite		

Anemi, ÇH'da yaygındır ve başvuru bulgusu olarak görülebilir. Anemi prevalansının çeşitli yayınlara göre belirgin olarak değişiklik gösterdiği ve yeni tanı konan olgularda %12-69 aralığında olduğu bildirilmiştir (90). Demir eksikliği anemisi en sık görülen formudur ve erişkinlerde çocuklara göre daha sık görülmek üzere subklinik vakaların %46'sında bildirilmiştir. Proksimal ince bağırsaktan emilen demirin emilimi, sağlam mukozal yüzey gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Demir eksikliği, tipik olarak oral demir tedavisine dirençlidir ve özellikle çocuklarda ÇH'nın tek belirtisi olabilir (90). Hematoloji kliniklerine demir eksikliği anemisi nedeniyle başvuran hastaların %2-6'sında ÇH saptanmıştır (91). ÇH ile birlikte olan demir eksikliği anemisinin tedavisi, glutensiz diyet ile birlikte demir depoları dolana kadar demir desteğidir. Ayrıca küçük bir kısmı tüm ince bağırsak boyunca emilen B12 vitamini ile jejunumdan emilen folik asit eksiklikleri de ÇH'da anemiye neden olabilir (90).

Dermatitis herpetiformis günümüzde ÇH'nın değişik bir formu, deri ÇH olarak düşünülmektedir. Tipik olarak dermoepidermal bileşkede granüler, dermal papillada ise benek şeklinde IgA depolanması ile karakterize bir deri hastalığıdır. Esas lezyon eritematöz papül veya vezikülleri içerir ki bu veziküllerin bazen bir araya gelmesi ile herpetiform şekillenme görülebilir. Bu deri döküntüleri, özellikle diz, dirsek, omuz, sakrum, kalça ve ensede olmak üzere ekstansör yüzeylerde simetrik olarak dağılım gösterir. Bazı vakalarda lezyonlar baş, yüz ve kasıklarda yer alabilir. İkincil bir bakteriyel infeksiyon eklenmezse genellikle lezyonlar skar bırakmadan iyileşir. Bununla birlikte postinflamatuvar pigment değişiklikleri de gözlenebilir. Baskılayıcı tedavi ile glutensiz diyetin birbirlerini tamamlayıcı olduğu düşünülmektedir. Glutensiz diyet, altta yatan gluten duyarlılığını uzun dönemde kontrol altına alırken, aralıklı dapson tedavisi diyet kaçığına bağlı nadir atakları baskılar (92).

Sağlıklı görünen çocuklarda ÇH'nın ilk bulgusu boy kısalığı olabilir. Gastrointestinal bulgusu olmayan boy kısalığı ile başvuran çocukların %2-8'inde, en sık görülen organik neden olarak ÇH saptanmıştır ki, bu sıklık büyüme hormonu eksikliği sıklığından belirgin olarak yüksektir (93). Endokrinolojik tetkikler genellikle, kemik yaşında geriliği, uyarı testlerine normal veya azalmış büyüme hormonu cevabını ve 'insulin-like growth factor-1' (IGF-1) düzeylerinde düşüklüğü gösterir. Çölyak hastalığı ile birlikte olan boy kısalığının patojenezi hala belirsizliğini korumaktadır. Karakteristik olarak diğer besinsel eksikliklerle birlikte ÇH'nda görülen

Çinko eksikliği, IGF-1 üretimini bozan asıl besinsel eksikliktir ve kemik metabolizması ile büyüme üzerine zararlı etkileri mevcuttur (94). Ayrıca santral sinir sisteminde anti-hipofizer antikorların mevcudiyeti veya anormal beyin monoamin metabolizmasına bağlı olabilecek büyüme hormonunun bozulmuş salınımı malntrsyonla ilişkili olabilir (94,95). Glutensiz diyet ile tedavi, genellikle büyümenin iki-üç yıl içinde tamamen yakalanması ile sonuçlanır. Eğer glutensiz diyet başlangıcından itibaren 12. ayda büyüme yakalaması gerçekleşmiyorsa, eşlik eden veya geçici büyüme hormonu eksiklikęinin araştırılması gereklidir (96).

Çölyak hastalığı aynı zamanda düşük mineral dansitesi ve osteoporoza neden olur. Biyopsi ile doğrulanmış 86 lyak hastasının %40'ında osteopeni, %26'sında osteoporoz saptanmıştır (97). Bir araştırmaya göre osteoporotik bireylerde H prevalansı %3.4 olarak bildirilmiştir (98). Geçmişte kemik değişikliklerinin sadece intestinal malabsorbsiyona bağlı kalsiyum ve D vitamini eksikliği sonucu geliştiği düşünülmekteydi. Günümüzde, kemik formasyon ve reabsorbsiyonunu etkileyen sitokinler ve lokal/sistemik faktörler arasındaki ilişki gibi kemik metabolizma bozukluklarının diğer nedenleri gösterilmiştir. Kemik metabolizmasının yenilenmesi ve normale dönmesinde etkili olan tek yol ömür boyu glutensiz diyet uygulanmasıdır. Çocukluk yaş grubunda glutensiz diyetin zamanında uygulanması ile kemik kitlesinde iyileşme mümkün olur. Diğer taraftan H'na sekonder osteoporoz gelişen erişkinlerde spontan iyileşme gözlenmemiş ayrıca kırık riskini azaltmada standart osteoporoz tedavisinin etkinliği konusunda kesin bir sonuca varılamamıştır. Bu bulgu H komplikasyonlarından korunmada asıl etkili yöntemin erken tanı olduğunu ortaya koymaktadır (99).

Çölyak hastalığı ile ilişkili çeşitli nörolojik durumlarla ilgili çalışmaların sayısı günden güne artmaktadır, öyle ki, erişkinlerde tahmini prevalans için %26'ya kadar yükselen sıklık bildirilmiştir (100). Bununla birlikte bu konudaki yayınların değişik eleme kriterleri ve hasta özellikleri içermelerinden dolayı sonuçlar tartışmaya açıktır. Bir metaanalize, hastaların çocukluk ağı boyunca bazı nörolojik komplikasyonların (başağrısı, periferik nöropati, beyaz cevher hastalığı) gelişimi açısından risk altında olduklarını ortaya koymuştur (101). Çocukluk ağında nörolojik tutulum prevalansı erişkinlere oranla daha düşüktür. Ayrıca H ile pediatrik yaş grubundaki epilepsi, otizm veya serebellar ataksi arasında nedensel bir ilişkiyi destekleyen herhangi bir kanıt yoktur (101).

Çölyak hastalığı olan kadınlarda daha sık oranda tekrarlayan spontan düşükler, erken menapoz ve amenore gözlenir. Fertilite problemleri aynı zamanda erkeklerde de gözlenebilir. Çölyak hastalığının bu değişikliklere nasıl yol açtığı tam olarak aydınlatılamamakla birlikte, malnütrisyon ve demir, folat, çinko eksikliklerinin rolü olduğu düşünülmektedir (102).

2.1.4.3. Sessiz ÇH

Serolojik testlerin uygulanması ile taramalar sayesinde sessiz ÇH tanınabilirliği de artmıştır. Bu taramalar genellikle ailede ÇH olan bir olgunun varlığı ya da eşlik eden genetik (Down, Turner, Williams sendromu) veya otoimmün (tip 1 diabet) bir hastalık varlığında uygulanır. Aslında, hikaye ve tetkikler varolan düşük derecedeki hastalığı ortaya çıkarabilir. Yaygın özellikler; irritabilite ve okul performansında bozulma gibi davranış bozuklukları, fiziksel kapasitede azalma ve kronik yorgunluk, demir eksikliği ve azalmış kemik mineral dansitesidir. Sessiz çölyak hastalarında glutensiz diyet ile tedavi sonrası genellikle psikolojik ve fiziksel iyilik hali bildirilmiştir (38).

2.1.4.4. Latent ÇH

Latent veya potansiyel ÇH normal intestinal mukoza veya intraepitelyal lenfositöz gibi hafif histolojik anormalliklerle karakterizedir. Bu hastalar dTG ve/veya anti-endomisyum antikorları açısından pozitif bulunur, aynı zamanda biyopsilerde subepitelyal anti-dTG IgA depozitleri bulunabilir. Hastaların ya genel durumları iyidir veya glutensiz diyetle yanıt veren intestinal semptomları mevcuttur. Zamanla hastalarda mukozada düzleşme görülebilir, bununla birlikte mukozalarda düzleşme görülene kadar glutensiz diyet uygulanmasına yönelik herhangi bir kanıt bulunmamaktadır (102).

2.1.4.5. Eşlik eden hastalıklar

Çölyak hastalığının prevalansı bazı otoimmün hastalıklar, IgA eksikliği ve bazı genetik (Down, Turner, Williams sendromu) hastalıkların varlığında artmıştır. Tip 1 diabetes mellitusu olan çocuklarda ÇH'nın ortalama prevalansı %4.5'tir (103). Otoimmün tiroid hastalığı olan bireylerde ÇH sıklığının altı ila yedi kat arttığı bildirilmiştir (104). Down sendromlu çocuklarda ise ÇH'nın bildirilen prevalansı %3.2 ve %10.3 arasında değişmektedir (105).

Hastalığın klinik spektrumunun oldukça geniş olmasından dolayı, çocuklarda ÇH'nın tanısında yüksek farkındalık ve klinik şüphe, esastır. Eğer hastalık olasılığı görülüyorsa tanı için testler yapılmalıdır. Tanımlanmamış vakalarda en yüksek 'cost-effectivity' gösterdiğinden, vaka bulma odaklı yaklaşım günümüzde önerilen yaklaşım şeklidir (21).

2.1.5. Tanı

Çölyak hastalığının tanısı klinik bulgulara pozitif serolojik testler ve biyopsi bulgularının eşlik etmesiyle konur. Bununla birlikte klinik bulgular, serolojik testler ve biyopsi bulgularının her biri, her hasta için yüksek oranda ÇH'na özgü olmayabilir. Bu durumda bu parametrelerin hepsini bir arada değerlendirmek gerekmektedir. Yakın dönemde 'European Society for Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition' (ESPGHAN) hastalığın tanısı için klinik bulgular, serolojik testler (IgA tipinde özgül antikorlar ve HLA doku grupları) ve biyopsi bulgularını içeren skrolama yöntemini önermiştir. Bu skrolama sistemine göre tanı için 4 puan gereklidir (Tablo 2.3) (2).

Serolojik testler tabloda görüldüğü gibi tanı için önemlidir. Çölyak hastalığını düşündüren klinik bulgusu olan ve ÇH'na eşlik edebilen yukarıda bahsedilmiş genetik veya otoimmün hastalığı olan bireylerin serolojik testlerle taranması önerilmektedir. Aynı zamanda ÇH tanısı almış bireylerin birinci derece akrabaları için de serolojik tarama önerilmektedir (2,106). Tablo 2.4'te dTG, endomisyum antikorları (EMA) ile deamine gliadin peptit (DGP) antikorları ve HLA-DQ2, -DQ8 gibi serum testlerinin özgüllük, duyarlılık ve uygun kullanım alanları verilmiştir (2,106,107).

Eşlik eden IgA eksikliği olmayan bireylerde dTG IgA antikor ölçümü, yüksek duyarlılık ve özgüllüğü ile, ayrıca iyi standardize edilmesinden dolayı başlangıç testi olarak önerilmektedir (108). IgA eksikliği olan kişilerde dTG IgG antikorlarının ölçümü kullanılabilir. Tam kanın bir damlasının kurutma kağıdına damlatılması ile dTG antikorların belirlenmesine dayanan hızlı kart testi olası yanlış negatif sonuçlar nedeniyle tanıda önerilmemektedir (31). Çölyak hastalığı tanısında EMA IgA antikorlarının özgüllüğü %100'e yakındır. Bununla birlikte uygulanması pahalı ve kişi bağımlı olduğundan, dTG antikorlarının sınırda pozitif olduğu durumlarda veya yanlış pozitif sonuç olasılığı olan tip 1 diabet de dahil, otoimmün hastalık varlığında doğrulayıcı test olarak kullanılması önerilmektedir (107). Alternatif bir test olarak DGP IgG antikorları, IgA eksikliği olan ve küçük yaştaki bireylerin taramalarında

dTG IgG antikorlarından daha duyarlı ve özgül olarak saptanmıştır (109). Risk altındaki bireylerde (örn. ailede ÇH olan birey varlığı) HLA-DQ2 ve HLA-DQ8 testleri kullanışlıdır. Yüksek negatif prediktif değeri dolayısıyla, HLA-DQ2 ve HLA-DQ8 negatif bireylerde ÇH'nın ortaya çıkması beklenmez (110).

Tablo 2.3. Çölyak hastalığının tanısında skorelama sistemi (2).

	Puan
Klinik bulgular	
Malabsorbsiyon sendromu	2
Diğer ÇH ile ilişkili bulgular veya tip-1 diabet varlığı veya birinci derece akrabalarında hastalık varlığı	1
Asemptomatik	0
Serum antikorları	
EMA pozitifliği veya anti-dTG'nin yüksek pozitifliği (üst limitin 10 katından fazla)	2
Anti-dTG'nin düşük pozitifliği veya deamine gliadin peptit antikorları(anti-DGP) pozitifliği	1
Serum antikorlarının bakılmamış olması	0
Çölyak özgül antikorların negatif olması	-1
HLA	
Tam HLA-DQ2 varlığı veya HLA-DQ8 heterodimerlerinin varlığı	1
HLA testlerinin bakılmamış olması veya yarı DQ2 (sadece HLA-DQB1*0202) varlığı	0
HLA-DQ2 ve -DQ8 yokluğu	-1
Histoloji	
Marsh 3b veya 3c (subtotal villöz atrofi veya düzleşmiş yüzey)	2
Marsh 2 veya 3a (hafif derecede azalmış villus uzunluğu/kript derinliği oranı) veya Marsh 0-1 ile birlikte intestinal dTG antikorlarının varlığı	1
Marsh 0-1 veya biyopsinin uygulanmamış olması	0

Uygun klinik bulgular ve serolojik testler varlığında tanı için üst gastrointestinal endoskopi ile biyopsi alınması önerilmektedir (111). Çölyak hastalığında endoskopik görünüm, normal bulgular ile mukozal katlantılarda atrofi, mukozada ödem arasında çok farklı şekillerde olabilir. Görülebilen fissürler veya mukozanın alacalı görünümü, nodülarite gözlenebilir (111,112). Ancak bu bulgular tropical sprue veya lenfomada da görülebilir. Yüksek rezolüsyonlu endoskopi ve kromoendoskopiden yararlanılması ile

biyopsi için villöz atrofi alanlarının belirlenmesi mümkün olabilir (113-115). Aynı zamanda tanı için video kapsül endoskopinin kullanışlı olduğu bildirilmektedir (116).

Tablo 2.4. Çölyak hastalığı tanısında kullanılan serolojik testler (2,106,107).

Test	Duyarlılık (aralık)(%)	Özgüllük (aralık)(%)	Yorumlar
Anti dTG IgA	>95 (73-100)	>95(77-100)	İlk düzey tarama testi
Anti dTG IgG	Değişken (12-99)	Değişken (86-100)	IgA eksikliği olan hastalarda kullanışlı
Anti EMA IgA	>90 (82-100)	98 (94-100)	Tanı belirsizliğinde kullanışlı
Anti DGP IgG	>90 (80-98)	>90 (86-96)	IgA eksikliği ve küçük çocuklarda kullanışlı
HLA-DQ2 veya HLA-DQ8	91 (82-97)	54 (12-68)	Yüksek negatif öngörüye sahip

Üst gastrointestinal endoskopi sonrası alınan duodenum biyopsi materyallerinin histolojik incelenmesi, tanı için çok değerlidir. Buna rağmen, tanı için, tek başına ve bir arada bulunabilen çeşitli histolojik bulguların, klinik bulgular ve serolojik testlerle birlikte yorumlanması gereklidir (111). Çölyak hastalığında görülen değişik lezyonların sınıflandırılması için Marsh bir evreleme sistemi önermiştir (117,118). Daha sonra tanısal kolaylık için gözden geçirilen bu sistem günümüzde Marsh-Oberhuber ya da modifiye Marsh evreleme sistemi olarak bilinmektedir (119). Tablo 2.5’de gösterilen bu sisteme göre histolojik değişiklikler; ‘preinfiltratif’ (evre 0), ‘infiltratif’ (evre 1), ‘infiltratif-hiperplastik’ (evre 2), ‘düz destrüktif’ (evre 3) ve ‘atrofik-hipoplastik’ (evre 4) olarak sınıflandırılmaktadır.

Marsh evre 0’da, normal histolojik mukoza veya az miktarda (100 enterosit başına 40’ın altında) intrapitelyal lenfositler mevcuttur. Bu evrede vakalar ayrıca asemptomatik olduğundan sadece serolojik testlerle ortaya çıkarılabilir. Evre 1’de 100 enterosit başına 40’ın üzerinde intrapitelyal lenfositler diğer bir ifadeyle intraepitelyal lenfositoz (İEL) mevcuttur. Bu ÇH için duyarlı bir bulgu olmakla birlikte ilaca bağımlı hasar, peptik hasar ve immün hastalıklarda da görülebileceğinde ÇH’na özgül değildir. Evre 2’de İEL bulgusuna kript hiperplazisi de eşlik eder ve villöz yapı doğaldır. Bu evrenin de ÇH için evre 1 gibi nonspesifik olduğu klinik ve serolojik tetkikler ile birlikte değerlendirilmesi gerektiği belirtilmektedir. Evre 3’de yukarıda sayılan bulgulara ek olarak değişik derecelerde villöz atrofi (evre 3a’da hafif, 3b’de

orta, 3c’de tam) eklenmiştir. Bu evre, evre 1 ve 2’ye ÇH’na daha spesifik olmakla birlikte zaman zaman bakteriyel aşırı çoğalma, peptik hasar, ilaca bağlı hasar ve immün hastalıkların bu değişikliklere yol açabileceğinin akılda tutulması gerekmektedir. Evre 4’te ise tam villöz atrofi olmasına rağmen, İEL ve kript hiperplazisi bulunmaz. Bu değişikliklerin malnütrisyon ve İEL’in anormal homeostazına bağlı olarak geri dönüşümsüz hasarı yansıttığı düşünülmektedir. Bununla birlikte bazı yazarlar evre 4’ün sınıflandırma sisteminden çıkarılması gerektiğini ifade etmişlerdir (111,120).

Tablo 2.5. Marsh-Oberhuber (modifiye Marsh) evreleme sistemi (111)

	IEL (her 100 jejunal enterositte)	IEL (her 100 duodenal enterositte)	Kript hiperplazisi	Villöz atrofi
Marsh 0	<40	<30	-	-
Marsh 1	>40	>30	-	-
Marsh 2	>40	>30	+	-
Marsh 3a	>40	>30	+	Hafif
Marsh 3b	>40	>30	+	Belirgin
Marsh 3c	>40	>30	+	Tam
Marsh 4	<40	<30	(Hipoplazi)	Tam

2.1.6. Tedavi

Günümüzde ÇH için mümkün olan tek tedavi seçeneği gluten içeren tahılların (buğday, çavdar, arpa, tritikale-buğday çavdar melezi, bulgur, kuskus, kıvılc buğday, kamut-Horasan buğdayı) diyetten çıkarılmasıdır (21,38). Pirinç, mısır ve karabuğday (arap darısı) gluten içermez ve tüketilebilir. Patates, kestane ve dünyanın çeşitli ülkelerinde tüketilen tapyoka nişastası, süpürge darısı, kinoa unu, horozibiği çiçeği gibi farklı nişasta ürünleri de güvenle tüketilebilir. Avrupa, Amerika, Asya, Avustralya ve Kuzey Afrika dahil dünyanın bir çok bölgesi için diyetle, gluten içeren ekmek ve kek/pasta ürünleri önemli bir yer tutmaktadır.

Geçmişte yulafın, ÇH olan bireyler için toksik olduğu düşünülmekte idi. Yakın dönemdeki çalışmalarda, yulaf alımının hem güvenli olduğu hem de hastaların diyet kalitesini de arttırdığı gösterilmiştir (121). Hastalara uygulanacak olan glutensiz diyet;

sebzeler, salatalar, bakliyatlar, meyvalar, kuruyemişler, et, balık, kümes hayvan eti, peynir, yumurta ve süt gibi doğal besinleri içerebilir.

Gluten içeren besinler günlük enerji alımına katkıda bulunur, aynı zamanda yemeklere tat katar. Bununla birlikte, günümüzde özel firmalar tarafından çölyak hastaları için üretilen ve gluten içermeyiğı garanti edilen çekici ve lezzetli ürünler, uluslar arası tanınan ‘çapraz buğday’ amblemi ile etiketlenerek raflarda yer almaktadır. Glutensiz diyet uygulanan hastalara ayrıca demir, kalsiyum ve vitamin eksiklikleri durumunda beslenme desteğı önerilmektedir (122).

Uzun dönemde (bir-iki yıl içinde) glutensiz diyet ile klinik, serolojik ve histolojik düzelme gözlenir ve komplikasyon riski geriler (38). Buna rağmen, besinlerde gluten kontaminasyonu sık görüldüğünden, ‘sıfır gluten’ içeren bir diyet hemen hemen imkansızdır. Sucuk, sosis, çorba, soya sosları ve dondurma gibi bazı ticari ürünlerde, protein filtresi olarak kullanılan gizli gluten bulunabilir. Hatta ÇH’nda diyet tedavisinde kullanılan ürünler bile, öğütme, depolama veya işleme aşamaları sırasında çapraz kontaminasyon yolu ile düşük miktarlarda gluten içerebilmektedir (123). Çift kör, plasebo kontrollü, çok merkezli yapılan bir çalışma, düşük miktarlarda glutene uzamış maruziyet durumunda güvenli sınırın günlük 50 mg olduğunu ortaya koymuştur (123). Daha önce yukarıda bahsedildiğı gibi, in vivo uyarı testleri ve in vitro immünolojik testler yulafın, daha önce düşünölenin aksine güvenle tüketilebileceğini ortaya koymaktadır, fakat kontrolsüz öğütme ve işleme aşamaları sırasında gelişebilecek glutenle çapraz kontaminasyon büyük endişe kaynağıdır (38).

Gluten içermeyen besin ürünlerinin; üretim aşamasında küçük derecede de olsa gluten ile kontaminasyonu, yüksek maliyeti, düşük erişilebilirlik ile lezzeti ve birtakım kültürel alışkanlıklar nedeniyle glutensiz diyeti sürdürmek genellikle zordur. Ayrıca hastaların küçük bir kısmında ÇH dirençli seyreder ve glutensiz diyetle cevap vermez. Bu yüzden birçok araştırmacı, hastalarda devamlı glutensiz diyet uygulamasına alternatif tedavi seçenekleri ile ilgilenmiştir (124).

Son dönemde ÇH’nın patojenezinin daha iyi anlaşılması, yeni geliştirilen tedavi yöntemlerinin temelini oluşturmaktadır (Tablo 2.6). Bu tedaviler; glutensiz tahıl üretimine, endopeptidazlara dirençli gliadin peptitlerinin yıkımına, epitelyal zonulin reseptör blokajı ile intestinal permeabilitenin azaltılmasına, intestinal dTG aktivitesinin inhibisyonuna, HLA-DQ2 antagonistleri ile gluten peptit sunumunun

engellenmesine, proinflatuar sitokinlerin inhibisyonu veya düzenlenmesine ve glutene oral toleransı sağlamaya odaklanmaktadır.

Tablo 2.6. Çölyak hastalığında olası yeni tedaviler (21).

Amaç	Terapötik ajan
Glutenle temasın azaltılması	İmmünojenitesi azaltılmış buğday çeşitleri Gliadinin transamidasyonu Tedavi öncesi probiotik kullanımı Prolil endopeptidaz + arpa endoproteazı Polimerik gliadin bağlayıcıları
İntestinal permeabilite inhibitörleri	Zonulin reseptör antagonisti
İmmün cevap modülatörleri	dTG inhibitörleri HLA-DQ2/DQ8 bağlayıcıları Gluten aşılamaşı Anti-interlökin 15 Anti-tümör nekrozis faktör- α Anti-CD52 İnterlökin 10

Bu tedavi seçeneklerinin bazıları faz 1 veya faz 2 klinik çalışma aşamasındadır. Günümüzde ise hastalara, tek etkili ve güvenli tedavi seçeneği olan sıkı glutensiz diyet önerilmektedir (21).

2.2. Oksidatif Stres Ve İskemi Modifiye Albumin

Bütün canlılar için gerekli olan oksijen, vücutta bir takım biyokimyasal reaksiyonlar sonrası reaktif oksijen türlerine dönüşür. Bu reaktif oksijen türleri yine antioksidan mekanizmalarla hücre ve dokulardan uzaklaştırılır. Bu metabolitlerin hücre ve dokularda fazla miktarda üretildiği veya antioksidan sistemlerle uzaklaştırılamadığı durumlarda, reaktif oksijen türleri birikimi olur ve oksidatif stres durumundan sözedilir ki bu durum birçok hastalığın patojenezinde rol oynar (125,126).

Hücresinin oksidatif stres durumunu değerlendirmek için kullanılan birçok belirteç vardır. Total oksidan durum (TOD) ve oksijen radikallerinin hücredeki proteinlerle reaksiyonu ile oluşan ilerlemiş protein oksidasyon ürünleri ‘advanced oxidative protein products’ (AOPP) bu belirteçlerden ikisidir. Diğer taraftan antioksidan sistemlerin değerlendirilmesi için de çok sayıda belirteç bulunmaktadır.

Total antioksidan kapasite (TAK) ve oksijen radikallerinin elektrofilik grupları ile etkileşime geçerek antioksidan savunma sisteminin ana elemanı olarak görev yapan sülfidril (SH) grupları bu belirteçler arasındadır (125-128).

Serum albuminin yapısındaki son amino terminali, kobalt, bakır ve ayrıca nikel gibi metallerin bağlandığı bölgedir. İskemi, hipoksi, asidoz, oksidatif stres ve membran bozulması gibi nedenler bu metallerin albuminin N-terminaline bağlanmalarını azaltır. Yapısında değişiklik meydana gelmiş olan bu albumine 'iskemi modifiye albumin' (İMA) adı verilir (129,130). Ön planda miyokardiyal iskemi ve akut koroner sendromun erken belirteci olarak kullanılan İMA, albumin-kobalt bağlanma testi ile ölçülür (131). Bununla birlikte son dönemdeki çalışmalar İMA'nın, iskemik kalp hastalığı dışında, diabetes mellitus, hiperlipidemi, kronik böbrek yetersizliği, obezite, talasemi gibi hastalıklarda oksidatif stresin bir göstergesi olarak arttığını bildirmiştir (132-136).

3. HASTALAR VE YÖNTEM

3.1. Hastalar Ve Hasta Gruplarının Oluşturulması

İleriye dönük planlanan çalışmaya Mart 2011 – Mart 2013 tarihleri arasında prospektif olarak planlandı. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Gastroenteroloji Polikliniği'ne tipik veya atipik ÇH belirti ve bulguları ile başvuran ayrıca ÇH'na eşlik edebilen hastalıkları olan olgular alındı. Serolojik tarama (dTG IgA, dTG IgG ve total IgA) testlerinde dTG antikoru pozitif saptanan bireylere üst gastrointestinal endoskopi işlemi uygulanarak en az üç adet duodenum biyopsisi alındı. Çölyak hastalığı tanısı klinik bulgular, serolojik testler ve histopatolojik bulguların bir arada değerlendirilmesi sonucunda kondu (2). Tanı konan hastalardan, glutensiz diyet başlamadan önce 2 mL serum örneği ayrıldı ve -80°C'de muhafaza edildi. Kontrol grubunu minör cerrahi girişimler (sünnet, fitık) için getirilen kronik hastalığı olmayan sağlıklı 30 çocuk oluşturdu. Bu hastalardan operasyon öncesi yapılan rutin biyokimya testlerinden artan serum örnekleri -80°C'de saklandı. Glutensiz diyet başlanan hastalardan glutensiz diyetin 3. ayında yapılan rutin hemogram, biyokimya kontrolü sırasında alınan kan örneğinin serumu – 80°C'de saklandı. Çölyak hastalığı saptanan olguların glutensiz diyet öncesi ve sonrasında alınan serum örnekleri ile kontrol grubundan alınan serum örneklerinde İMA, TAK, TOD, AOPP, SH ölçümü yapıldı. Tüm bu işlemler için hasta ve ailesinden sözlü ve yazılı onam alındı (Ek-1).

3.2. Çalışmaya Dahil Edilmeme Kriterleri

Oksidatif stresin patojenezde yer aldığı bilinen ve İMA düzeylerini değiştirebileceği bilinen herhangi bir kronik hastalığı olan (kronik kardiyovasküler hastalıklar, kronik böbrek yetersizliği, diyabetes mellitus, obezite, talasemi major) bireyler çalışma dışı bırakıldı.

3.3. Serum Örneklerinin Çalışılması

Serum İMA düzeyi, albumin-kobalt bağlanma testi ile jelli düz biyokimya tüplerine alınan venöz kan örneklerinde ölçüldü. Serum İMA ölçümü için 95 µL hasta serumu, 5 µL kobaltklorid ile karıştırılıp 5 dakika süreyle inkübe edildi (137). İnkübasyon sırasında kobaltklorid konsantrasyonu 0.58 mmol/L olacak şekilde ayarlandı. İskemik durumlar ve oksidatif stres mevcudiyetinde kobaltın çok az bir kısmının albumine bağlandığı bilinmektedir (137). Albumine bağlanmayan kobaltı belirlemek için inkübasyondan sonra ölçüm kuvvetine 25 µL ditiyotreitol (son konsantrasyonu 1.67 mmol/L) eklenerek karıştırıldı ve bu şekilde ditiyotreitolün, albumine bağlanmamış kobalt ile renkli kompleks oluşturması sağlandı. Oluşan renkli kompleks 500 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Beş noktalı kalibrasyon eğrisi çizildikten sonra absorbans değerleri, kalibrasyon eğrisinde 5-180 U/mL aralığında değerlendirildi (137,138).

Erel tarafından geliştirilen bir yöntem ile güçlü serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan kapasitesi ölçüldü (139). Bu yöntemin çalışma prensibine göre, Fe-o-dianisidin kompleksi hidrojen peroksid ile Fenton tipi reaksiyon oluşturarak OH radikalini oluşturur. Bu güçlü reaktif oksijen türü indirgenip, düşük pH'da renksiz o-dianisidin molekülüyle reaksiyona girerek sarı-kahverengi dianisidil radikallerini oluşturur. Dianisidil radikalleri ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılıp renk oluşumunu artırır. Ancak örneklerdeki antioksidanlar, bu oksidasyon reaksiyonlarını bastırarak renk oluşumunu durdururlar. Bu reaksiyon otomatik analizörde spektrofotometrik olarak ölçülerek TAK düzeyleri tespit edilir.

Erel tarafından geliştirilen başka bir yöntem ile de, TOD otomatik kalorimetrik olarak ölçüldü (140). Bu yöntemde numunede bulunan oksidanlar, ferroz iyon-o-dianisidin kompleksini ferik iyon-a oksidlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırır. Ferrik iyonlar asidik ortamda 'xylenolorange' ile renkli bir kompleks oluşturur. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülür.

Total sülfidril grupları (SH), Ellman reaktifi, 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoik asit, kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü (141).

İlerlemiş protein oksidasyon ürünlerinin (AOPP) düzeyleri ise Witko-Sarsat yöntemiyle spektrofotometrik olarak ölçüldü (142).

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analiz, SPSS Software 16.0'da yapıldı. Çölyak hastalığı tanısı konulan olgular ile kontrol grubunu oluşturan olguların cinsiyet ve yaş gibi demografik özellikleri kaydedildi. Çölyak hastalığı tanılı olguların başvuru şikayeti, dTG değeri ve biyopsi materyallerinin histopatolojik evrelemesi (111) SPSS 16.0 istatistik programına aktarıldı. Ayrıca kontrol grubu ile ÇH tanısı konan olguların glutensiz diyet öncesi ve sonrasında ölçülen İMA, TOD, TAK, AOPP, SH değerleri de kaydedildi. Tanımlayıcı istatistikler; frekans, yüzde, ortalama, standart sapma, medyan, minimum, maksimum değerleri ile sunuldu. Kategorik veriler arasındaki ilişkilerin tespitinde Pearson ki-kare testi, gözlerde beklenen değerler 5'in altında ise Fisher'in kesin ki-kare testi kullanıldı. Grup ortalamalarının karşılaştırılmasında Mann-Whitney U veya student t testi, iki ölçüm arasındaki ilişkinin belirlenmesinde Pearson veya Spearman korelasyon testleri kullanıldı. $p < 0.05$ bulunması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Yukarıda belirtilen dönem aralığında, 37 hastaya ÇH tanısı konuldu ve bu hastaların tamamı çalışmaya dahil edildi. Kontrol grubunu ise 29 adet sağlıklı çocuk oluşturdu.

4.1. Demografik Özellikler

Çölyak hastalığı olan ve olmayan grupların cinsiyet dağılımı Tablo 4.1’de verilmiştir. Buna göre kızlar, ÇH grubunun %56.8’ini oluştururken, kontrol grubunun %55.2’sini oluşturuyordu. Buna göre cinsiyet açısından gruplar arasında istatistiksel açıdan bir fark yoktu ($p=0.898$). Tablo 4.2’de gösterildiği gibi, olguların yaş ortalamasına bakıldığında da, her iki grup arasında bir fark olmadığı gözlemlendi ($p=0.791$).

Tablo 4.1. Çölyak hastalığı olan ve olmayan grupların cinsiyete göre dağılımı.

			Cinsiyet		Toplam	p
			Kız	Erkek		
Çölyak	yok	n	16	13	29	0.898
		%	55.2%	44.8%	100.0%	
	var	n	21	16	37	
		%	56.8%	43.2%	100.0%	
Toplam		n	37	29	66	
		%	56.1%	43.9%	100.0%	

Tablo 4.2. Grupların yaş ortalamalarına göre değerlendirmesi.

	ÇH (+)	ÇH (-)	p
Yaş ortalaması	7.49 ±4.54	7.29 ±4.83	0.791

4.2. Klinik, Endoskopik, Histopatolojik Özellikler

Çölyak hastalığı saptanan çocukların klinik belirti ve bulgularını değerlendirdiğimizde; olguların 20’si (%54.1) büyüme geriliği, 6’sı (%16.2) kronik ishal, 4’ü (%10.8) demir eksikliği anemisi, 3’ü (%8.1) karın ağrısı ve dispeptik şikayetler ile başvurmuştu. Ayrıca 1 (%2.7) olguda kronik ishal ve demir eksikliği

anemisi birlikteliği, yine 1 (%2.7) olguda büyüme geriliği ve demir eksikliği anemisi birlikteliği mevcuttu. Eşlik eden genetik hastalığı (Down sendromu) bulunan ise 2 (%5.4) olgu mevcuttu (Tablo 4.3). Buna göre hastaların 26'sı (%70.3) tipik ÇH, 9'u (%24.3) atipik ÇH kliniği ile başvururken, 2 (%5.4) hastanın ise eşlik eden genetik hastalık ile başvurmuş olduğu gözlemlendi.

Tablo 4.3. ÇH bulunan çocukların klinik belirti ve bulguları.

	n (%)
Büyüme geriliği	20 (54.1)
Kronik ishal	6 (16.2)
Demir eksikliği anemisi	4 (10.8)
Karın ağrısı-dispeptik şikayetler	3 (8.1)
Büyüme geriliği + Demir eksikliği anemisi	1 (2.7)
Kronik ishal + Demir eksikliği anemisi	1 (2.7)
Down sendromu	2 (5.4)

Hastaların üst gastrointestinal endoskopik incelemede duodenum görünümelerini değerlendirdiğimizde; olguların 16'sında (%43.2) mukozal katlantılarda silinme, 6'sında (%16.2) nodüler görünüm, 1'inde (%2.7) mukozada ödem, 3'ünde (%8.1) ise mukozal katlantılarda silinme ve nodüler görünüm birlikteliği mevcuttu. Ayrıca 11 (%29.7) olguda duodenumun endoskopik görüntüsü normal olarak değerlendirildi (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. ÇH bulunan çocuklarda duodenum mukozasının endoskopik görünümü.

	n (%)
Mukozal katlantılarda silinme	16 (43.2)
Nodüler görünüm	6 (16.2)
Mukozada ödem	1 (2.7)
Mukozal katlantılarda silinme + Nodüler görünüm	3 (8.1)
Normal bulgular	11 (29.7)

Hastaların duodenum biyopsileri histopatolojik olarak Marsh-Oberhuber evreleme sistemine göre değerlendirildiğinde; olguların 3'ü (%8.1) evre 2, 4'ü (%10.8) evre 3a, 11'i (%29.7) evre 3b, 19'u (%51.4) evre 3c bulguları gösteriyordu (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. ÇH bulunan çocuklarda duodenum biyopsilerinin histopatolojik evrelemesi.

	n (%)
Evre 2	3 (8.1)
Evre 3a	4 (10.8)
Evre 3b	11 (29.7)
Evre 3c	19 (51.4)

4.3. Oksidan Ve Antioksidan Durum Belirteçleri

Çölyak hastalığı olanlarda glutensiz diyet öncesi alınan serum örnekleri ile kontrol grubuna ait örnekler, oksidan belirteçler olan İMA, TOD, AOPP ve antioksidan belirteçler olan TAK, SH düzeyleri açısından karşılaştırıldı. Tablo 4.6'da görüldüğü gibi ÇH olan çocuklarda İMA, TOD, AOPP düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek iken TAK ve SH düzeyleri ise kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düşüktü.

Tablo 4.6. ÇH olanlar ile kontrol grubunun oksidan ve antioksidan belirteçler açısından karşılaştırılması.

	ÇH (+)	ÇH (-)	P
İMA	92.90 ±12.12	72.66 ±13.46	0.001
TOD	120.40 ±39.12	39.72 ±45.83	0.001
TAK	2.88 ±0.05	2.92 ±0.04	0.001
AOPP	31.92 ±23.33	17.59 ±19.60	0.001
SH	157.12 ±59.89	229.50 ±53.65	0.001

Çölyak hastalarında dTG IgA düzeyleri ile İMA, TOD, AOPP, TAK ve SH düzeylerinin korelasyonu değerlendirildiğinde; dTG IgA'nın İMA düzeyleri ile orta düzeyde pozitif korele olduğu ($r=0.653$, $p=0.001$) saptanırken, diğer belirteçler ile bir korelasyonu görülmedi. Aynı şekilde Marsh-Oberhuber histopatolojik evresi ile dTG

IgA ve diğer belirteçlerin olası bir korelasyonu değerlendirildiğinde; histopatolojik evre ile dTG IgA'nın yüksek düzeyde ($r=0.761$, $p=0.001$) ve İMA'nın orta düzeyde ($r=0.647$, $p=0.001$) pozitif korelasyon gösterdiği saptandı. Histopatolojik evre ile diğer belirteçler arasında pozitif veya negatif yönde bir korelasyon yoktu.

Çölyak hastalığı olanlarda glutensiz diyet öncesi ile glutensiz diyet sonrası alınan örnekler, oksidan belirteçler olan İMA, TOD, AOPP ve antioksidan belirteçler olan TAK, SH düzeyleri açısından karşılaştırıldı. Tablo 4.7'de görüldüğü gibi glutensiz diyet sonrası çocuklarda İMA, TOD, AOPP düzeyleri diyet öncesi düzeylerine göre anlamlı derecede düşük iken TAK ve SH düzeyleri ise diyet öncesi düzeylere kıyasla anlamlı derecede yüksekti.

Tablo 4.7. Glutensiz diyet öncesi ve sonrasında oksidan ve antioksidan belirteçlerin karşılaştırılması.

	Diyet öncesi	Diyet sonrası	p
İMA	92.90 $\pm$ 12.12	77.94 $\pm$ 8.37	0.001
TOD	120.40 $\pm$ 39.12	23.47 $\pm$ 22.51	0.001
TAK	2.88 $\pm$ 0.05	2.93 $\pm$ 0.02	0.001
AOPP	31.92 $\pm$ 23.33	11.18 $\pm$ 9.31	0.001
SH	157.12 $\pm$ 59.89	241.50 $\pm$ 31.76	0.001

5. TARTIŞMA

Çölyak hastalığının prevalansındaki artış ve glutensiz diyetin sürdürülmesinde zorluklar nedeniyle birçok araştırmacı, olası yeni tedaviler açısından hastalığın etyopatogenezi ile daha fazla ilgilenmeye başlamıştır (21, 124). Glutenin yapısında yer alan P31-43 gibi bazı α -gliadin peptitleri, ‘endositik uptake’ ile hücre içine girerek lizozomlarda depolanır ve bazı sinyal iletim yollarını aktive ederek reaktif oksijen ve reaktif nitrojen radikalleri gibi serbest radikallerin miktarını artırırlar (61,62). Bu yüzden oksidatif stresin gliadin toksisitesinde rol alan mekanizmalardan biri olduğu varsayılmaktadır.

5.1. Çölyak Hastalığı Tanısında Oksidan Ve Antioksidan Belirteçler

Çalışmamızda ÇH olan çocuklarda oksidan (İMA, TOD, AOPP) ve antioksidan (TAK, SH) belirteçlerin diyet öncesi düzeylerini kontrol grubu ile karşılaştırdık. Literatürde bu belirteçlerin ÇH’da incelendiği bir araştırma raporuna rastlamadık. Çalışmamızda ÇH olan çocuklarda İMA, TOD, AOPP düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek, TAK ve SH düzeyleri ise kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük olarak saptandı. Bu bulgular, oksidatif stres ile ÇH’ndaki rolünü doğrular nitelikte idi.

Oksidatif hasar ile ÇH arasındaki ilişki intestinal hücrelerde, kan ve idrarda yapılan bazı çalışmalarla desteklenmiştir (67-74,143,144). Aktif çölyak hastalarının ince bağırsak biyopsi örneklerinde prostaglandin E2 (PGE2) düzeylerinde artış göstermesine karşın antioksidan enzim (glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktaz) düzeylerinde, dolayısıyla glutasyon (GSH) düzeyinde düşüş saptanmıştır (67-70). Lavö ve ark. ÇH olan yedi erişkinin jejunal sekresyonunu incelemiş ve bu sıvıda PGE2 konsantrasyonunun sağlam kontrollere oranla daha yüksek olduğunu saptamıştır (69). Stojiljkovic ve ark. ise 39 ÇH olan çocuğun intestinal biyopsi örneklerinde glutasyon, lipid hidroperoksitleri ve antioksidan enzim aktivitesini sağlam kontrol grubu ile karşılaştırmıştır. Buna göre ÇH’da süperoksit dismutaz aktivitesi artmış iken GSH, glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktaz aktivitesinde azalma görülmüştür (70). Benzer şekilde Stahlberg ve ark.’nın yapmış oldukları çalışmada, 41 ÇH olan çocuğun ince bağırsak biyopsilerinde glutasyon peroksidaz ve

epoksit hidrolaz aktivitelerinde sağlam kontrollere göre belirgin azalma saptanmıştır (143).

Ayrıca lyak hastalarının duodenum biyopsilerinde iNOS aktivitesinin arttığı iki ayrı çalışmada gösterilmiştir (71,72). Bunlardan Daniels ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada 22 lyak hastasının duodenum biyopsilerinden elde edilen enterositlerde, nitrik oksit sentetazın mRNA ekspresyonunun sağlam bireylere oranla artmış olduğu saptanmıştır (71). Beckett ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada ise 11 tedavi edilmemiş ve 10 tedavi edilmiş H olan erişkin bireyin ince bağırsak biyopsi örnekleri 9 kontrol hastası ile karşılaştırılmıştır. Buna göre tedavi edilmemiş bireylerin biyopsi örneklerinde tedavi edilmiş ve sağlam bireylerinkine kıyasla iNOS aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (72). Ter Steege ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada ise duodenum biyopsilerinde NOS aktivitesi nitrotirozin boyama düzeyleri ile değerlendirilmiş ve 11 lyak hastasında nitrotirozin boyaması kontrol grubuna göre artmış olarak saptanmıştır (144). Murray ve ark. ile Högberg ve ark.'nın yaptığı çalışmalarda H olan çocuklarda serum ve idrarda yüksek düzeylerde NO varlığı ve bunun ince bağırsakta artmış iNOS ekspresyonu ile korele olduğu gösterilmiştir (73,74).

5.2. İMA'nın Histopatolojik Evre İle İlişkisi

Çalışmamızda lyak olgularının Marsh-Oberhuber histopatolojik evresi ile dTG IgA ve diğer belirteçlerin olası bir korelasyonu değerlendirdiğimizde; histopatolojik evre ile dTG IgA'nın yüksek düzeyde ($r=0.761$) ve İMA'nın orta düzeyde ($r=0.647$) pozitif korelasyon gösterdiğini saptadık. Histopatolojik evre ile diğer belirteçler arasında pozitif veya negatif yönde bir korelasyon yoktu. Son dönemde yayınlanan ve lyak hastalarının duodenum biyopsilerinin histopatolojik bulguları ile dTG IgA düzeylerinin ilişkisini araştıran iki yayında da, çalışmamızın sonuçlarına benzer şekilde, antikorlar ile histopatolojik evre arasında yüksek düzeyde korelasyon saptanmıştır. Allesio ve ark.'nın, 10 ay ile 72 yaş arasındaki 412 lyak hastasında ve yine Zanini ve ark.'nın 945 erişkin lyaklı hastada yapmış olduğu çalışmalarda histopatolojik evre ile dTG IgA'nın yüksek düzeyde korele olduğu saptanmıştır (145,146).

Ayrıca İMA düzeyinin histopatolojik evre ile, dTG IgA kadar yüksek olmasa da, orta derecede bir ilişkisinin saptanması İMA'nın, dTG IgA gibi ÇH tanısında kullanımını düşündürebilir. Ancak bunun için geniş katılımlı çalışmalara gereksinim vardır. Ertekin ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada 41 ÇH bulunan çocukta serum nitrik oksit düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla yüksek saptandığı ve bu düzeylerin histopatolojik bulgular ile korele olduğu belirtilmiştir (147). Literatürde ÇH ve oksidatif stresin diğer belirteçleri ile ilgili çalışmalar var olmakla birlikte histopatolojik evre ile herhangi bir oksidan belirtecin korelasyonunu değerlendiren bundan başka bir çalışmaya rastlamadık.

5.3. Glutensiz Diyetin Oksidan Ve Antioksidan Belirteçlere Etkisi

Çalışmamızda ayrıca oksidatif stres ile ÇH arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarda sık rastlamadığımız, tedavi ile oksidatif stresin durumunu değerlendirdik. Bunun için diyet öncesi düzeyler ile diyet sonrası düzeyleri karşılaştırdık. Glutensiz diyet sonrası çocuklarda İMA, TOD, AOPP düzeyleri, diyet öncesi düzeylerine göre anlamlı derecede düşük iken, TAK ve SH düzeyleri ise diyet öncesi düzeylere kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğunu saptadık. Bu bulgular, oksidatif stresin çölyak hastalarında glutensiz diyet sonrası gerilediğini göstermekte idi. Ertekin ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada 41 ÇH bulunan çocukta serum nitrik oksit düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla yüksek saptandığı ve bu düzeylerin glutensiz diyet sonrası gerilediği belirtilmiştir (147). Szaflarska-Poplawska ve ark.'nın yapmış olduğu bir çalışmada ise, ÇH olan çocuklarda bir oksidatif stres belirteci olan 8-oxodG'nin kandaki lökositlerde kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı ancak bu değerlerin glutensiz diyet ile gerilemediği saptanmıştır (148).

Sonuç olarak, çalışmamızda oksidatif stresin ÇH patojenezinde rol aldığını, oksidatif stres belirteçleri ile bunun değerlendirilebileceğini ve glutensiz diyet sonrası oksidatif stresin gerileyeceğini saptadık. Ayrıca İMA'nın histopatolojik evre ile orta düzeyde pozitif korelasyon gösteren bir belirteç olduğunu ve tanıda kullanılabileceğini saptadık.

6. SONUÇLAR

Çölyak hastalığı patojenezinde önemli bir basamak olan oksidatif stresin belirteçlerini ÇH tanısı sırasında ve glutensiz diyet sonrasında araştırmayı planladığımız çalışmanın sonucunda;

1. Çölyak hastalığı olan çocuklarda İMA, TOD, AOPP düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek iken TAK ve SH düzeyleri ise kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük olarak saptadık.
2. Marsh-Oberhuber histopatolojik evresi ile dTG IgA'nın yüksek ve İMA'nın orta düzeyde pozitif korelasyon gösterdiğini saptadık.
3. Glutensiz diyet sonrası çocuklarda İMA, TOD, AOPP düzeyleri diyet öncesi düzeylerine göre anlamlı derecede düşük, TAK ve SH düzeyleri ise diyet öncesi düzeylere kıyasla anlamlı derecede yüksek olarak saptadık.

7. ÖZET

ÇOCUKLARDA ÇÖLYAK HASTALIĞI TANISI VE İZLEMİNDE İSKEMİ MODİFİYE ALBÜMİN, TOTAL OKSİDAN DURUM VE TOTAL ANTIOKSİDAN KAPASİTENİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Çalışmamızda çölyak hastalığı (ÇH) patojenezinde önemli bir basamak olan oksidatif stress göstergelerini araştırmayı amaçladık. Bunun için ÇH’nda daha önce değerlendirilmemiş olan oksidan ve antioksidan belirteçler olan iskemi modifiye albümin (İMA), total oksidan durum (TOD), total antioksidan kapasite (TAK), sülfidril (SH) ve ilerlemiş protein oksidasyon ürünlerinin (AOPP) düzeylerini tanı sırasında ve glutensiz diyet sonrasında değerlendirdik.

İleriye dönük olarak planlanan çalışmamıza Mart 2011 – Mart 2013 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Gastroenteroloji Polikliniği’nde ÇH tanısı konulan 37 olgu ile kontrol grubunu oluşturan 29 sağlıklı çocuk dahil edildi.

Çölyak hastalığı olan çocuklarda oksidan belirteçler olan İMA, TOD, AOPP düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek iken antioksidan belirteçlerden TAK ve SH düzeyleri ise kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük olarak saptadık. Ayrıca Marsh-Oberhuber histopatolojik evresi ile dTG IgA’nın yüksek ($r=0.761$, $p=0.001$) ve İMA’nın orta düzeyde pozitif korelasyon ($r=0.647$, $p=0.001$) gösterdiğini saptadık. Glutensiz diyet sonrasında İMA, TOD, AOPP düzeylerinin diyet öncesi düzeylerine göre anlamlı derecede düşük, TAK ve SH düzeylerinin ise diyet öncesi düzeylere kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğunu saptadık.

Sonuç olarak, çalışmamızda oksidatif stresin ÇH patojenezinde rol aldığını, oksidatif stres belirteçleri ile bunun değerlendirilebileceğini ve glutensiz diyet sonrası oksidatif stresin gerileyeceğini saptadık. Ayrıca İMA’nın histopatolojik evre ile orta düzeyde pozitif korelasyon gösteren bir belirteç olduğunu saptadık.

Anahtar kelimeler: Çocukluk çağı, çölyak hastalığı, oksidatif stres, iskemi modifiye albumin.

8. ABSTRACT

ASSESSMENT OF ISCHEMIA MODIFIED ALBUMIN, TOTAL ANTIOXIDANT STATUS AND TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY IN DIAGNOSIS AND FOLLOW UP OF CELIAC DISEASE IN CHILDREN

In our study, we aimed to investigate oxidative stress markers which is an important factor in pathogenesis of celiac disease (CD) in children. For this purpose, we evaluated ischemia modified albumin (IMA), total oxidant status (TOS), total antioxidant capacity (TAC), sulphhydryl (SH) and advanced oxidation protein products (AOPP) which are oxidant and antioxidant markers that had not been evaluated in CD before in the course of diagnosis and following gluten-free diet.

A total of 37 patients who were diagnosed with CD at Pediatric Gastroenterology Clinic of Akdeniz University, School of Medicine between March 2011 and March 2013 and 29 healthy children were enrolled in this prospective study.

While oxidant markers, IMA, TOS, AOPP levels were significantly higher in patient group compared to control group, antioxidant markers, TAC and SH levels were found significantly lower in patient group compared to control group. We also detected that dTG IgA showed a highly positive correlation ($r=0.761$, $p=0.001$) and IMA showed moderately positive correlation ($r=0.647$, $p=0.001$) with Marsh-Oberhuber histopathologic stage. We found that IMA, TOS, AOPP levels were significantly lower and TAC and SH levels were significantly higher after gluten free diet compared to pre-diet period.

In conclusion, we detected that oxidative stress plays a role in pathogenesis of CD, this can be evaluated with oxidative stress markers and oxidative stress resolves after gluten-free diet. We also detected that IMA is a marker which shows a moderately positive correlation with histopathologic stage.

Key words: childhood, celiac disease, oxidative stress, ischemia modified albumin

9. KAYNAKLAR

1. Fasano A, Catassi C. Celiac disease. *N Engl J Med* 2012; 367: 2419-26.
2. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabo IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition guidelines for the diagnosis of celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012; 54(1): 136-60.
3. Ferretti G, Bachetti T, Masciangelo S, Saturni L. Celiac disease, inflammation and oxidative damage. *Nutrients* 2012; 4: 243-57.
4. Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB, Jabri B. Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Annu Rev Immunol* 2011; 29: 493-525.
5. Adams F. The extant works of Arateus, the Cappodacian. London: Sydenham Soc 1956.
6. Gee S. On the coeliac affection. *St. Bartholomew's Hosp Rep* 1888; 24: 17-20.
7. Dicke WK, Weijers HA, Van de Kamer 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.
8. Paulley JW. Observation on the aetiology of idiopathic steatorrhoea: jejunal and lymph-node biopsies. *Br Med J* 1954; 2: 1318-21.
9. Marsh MN. Mucosal pathology in gluten sensitivity. In *Coeliac Disease*, ed. Marsh M, Oxford, UK: Blackwell Sci 1992; 136-91.
10. Risch N. Assessing the role of HLA-linked and -unlinked determinants of disease. *Am J Hum Genet* 1987; 40: 1-4.
11. Sollid LM, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F, Thorsby E. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ α/β heterodimer. *J Exp Med* 1989; 169: 345-50.
12. Ferguson A, MacDonald TT, McClure JP, Holden RJ. Cell-mediated immunity to gliadin within the small-intestinal mucosa in coeliac disease. *Lancet* 1975; 1: 895-97.
13. Lundin KE, Scott H, Fausa O, Thorsby E, Sollid LM. T cells from the small intestinal mucosa of a DR4, DQ7/DR4, DQ8 celiac disease patient preferentially recognize gliadin when presented by DQ8. *Hum Immunol* 1994; 41: 285-91.
14. Molberg O, Kett K, Scott H, Thorsby E, Sollid LM, Lundin KE. Gliadin specific, HLA DQ2-restricted T cells are commonly found in small intestinal biopsies from coeliac disease patients, but not from controls. *Scand J Immunol* 1997; 46: 103-9.

15. Molberg O, McAdam SN, Korner R, Quarsten H, Kristiansen C, Madsen L, et al. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognised by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med* 1998; 4: 713-7.
16. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner T, Volta U, Riecken EO, et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 1997; 3: 797-801.
17. Ventura A, Magazzu G, Greco L. Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. SIGEP Study Group for Autoimmune Disorders in Celiac Disease. *Gastroenterology* 1999; 117: 297-303.
18. Ferguson A, Arranz E, O'Mahony S. Clinical and pathological spectrum of coeliac disease-active, silent, latent, potential. *Gut* 1993; 34: 150-1.
19. Meresse B, Curran SA, Ciszewski C, Orbelyan G, Setty M, Bhagat G, et al. Reprogramming CTLs into natural killer-like cells in celiac disease. *J Exp Med* 2006; 203: 1343-55.
20. Trynka G, Hunt KA, Bockett NA, Romanos J, Mistry V, Szperl A, et al. Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nat Genet* 2011; 43: 1193-201.
21. Lionetti E, Catassi C. New clues in celiac disease epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, and treatment. *Int Rev Immunol* 2011; 30: 219-31.
22. Catassi C, Fabiani E, Ratsch IM, Coppa GV, Giorgi PL, Pierdomenico R, et al. The coeliac iceberg in Italy. A multicentre antigliadin antibodies screening for celiac disease in school-age subjects. *Acta Paediatr Suppl* 1996; 412: 29-35.
23. Mustalahti K, Catassi C, Reunanen A, Fabiani E, Heier M, McMillan S, et al. The prevalence of CD in Europe: results of centralized, international mass screening Project. *Ann Med* 2010; 42: 587-95.
24. Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti RB, Drago S, et al. Prevalence of CD in at-risk and non at-risk groups: a large, multicentre study. *Arch Intern Med*. 2003; 163: 286-92.
25. Hovell CJ, Collett JA, Vautier G, Cheng AJ, Sutanto E, Mallon DF, et al. High prevalence of coeliac disease in a population-based study from western Australia: a case for screening? *Med J Aust* 2001; 175: 247-50.
26. Cook HB, Burt MJ, Collett JA, Whitehead MR, Frampton CM, Chapman BA. Adult coeliac disease: prevalence and clinical significance. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 1032-6.
27. Gandolfi L, Pratesi R, Cordoba JC, Taub PL, Gasparin M, Catassi C. Prevalence of CD among blood donors in Brazil. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 689-92.

28. Oliveira RP, Sdepanian VL, Barreto JA, Cortez AJ, Carvalho FO, Bordin JO, et al. High prevalence of CD in Brazilian blood donor volunteers based on screening by IgA antitissue transglutaminase antibody. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007; 19: 43-9.
29. Gomez JC, Selvaggio GS, Viola M, Pizarro B, la Motta G, de Barrio S. Prevalence of CD in Argentina: screening of an adult population in the La Plata area. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2700-4.
30. Abu-Zekry M, Kryszak D, Daib M, Catassi C, Fasano A. Prevalence of CD in Egyptian children disputes the east-west agriculture-dependent spread of the disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008; 47: 136-40.
31. Alarida K, Harown J, Ahmaida A, Marinelli L, Venturini C, Kodermaç G, et al. Coeliac disease in Libyan children: a screening study based on the rapid determination of anti-transglutaminase antibodies. *Dig Liver Dis* 2011.
32. Ben Hariz M, Kallel-Sellami M, Kallel L, Lahmer A, Halioui S, Bouraoui S, et al. Prevalence of CD in Tunisia: mass screening study in schoolchildren. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007; 19: 687-94.
33. Imanzadeh F, Seyyari AA, Yaghoobi M, Akbari MR, Shafagh H, Farsar AR. CD in children with diarrhea is more frequent than previously suspected. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 40: 3009-11.
34. Sood A, Midha V, Sood N, Avasthi G, Sehgal A. Prevalence of CD among school children in Punjab, India. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1622-5.
35. Dalgic B, Sarı S, Baştürk B, Ensari A, Egritas O, Bukulmez A, et al. Prevalence of coeliac disease in healthy Turkish school children. *Am J Gastroenterol* 2011; 106(8): 1512-7.
36. Catassi C, Cobellis G. Coeliac disease epidemiology is alive and kicking, especially in the developing world. *Dig Liver Dis* 2007; 39: 908-10.
37. Catassi C, Ratsch IM, Gandolfi L, Pratesi R, Fabiani E, El Asmar R, et al. Why is coeliac disease endemic in the people of Sahara? *Lancet* 1999; 354: 647-8.
38. Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology* 2001; 120: 636-51.
39. Lohi S, Mustalahti K, Kaukinen K, Laurila K, Collin P, Rissanen H, et al. Increasing prevalence of coeliac disease over time. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26: 1217-25.
40. Catassi C, Kryszak D, Bhatti B, Sturgeon C, Helzlsouer K, Clipp SL, et al. Natural history of celiac disease autoimmunity in a USA cohort followed since 1974. *Ann Med* 2010; 42: 530-8.
41. Bach JC. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002; 347: 911-20.

42. Ivarsson A, Persson LA, Nyström L, Ascher H, Cavell B, Danielsson L, et al. Epidemic of coeliac disease in Swedish children. *Acta Paediatr* 2000; 89: 165-71.
43. Gobetti M, Rizzello GM, Di Cagno R, De Angelis M. Sourdough lactobacilli and celiac disease. *Food Microbiol* 2007; 24: 187-96.
44. Zannoni G, Navone R, Lunardi C, Tridente G, Bason C, Sivori S, et al. In celiac disease, a subset of autoantibodies against transglutaminase binds toll-like receptor 4 and induces activation of monocytes. *PLoS Med* 2006; 3: e358.
45. Fasano A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiol Rev* 2011; 91: 151-75.
46. Clemente MG, De Virgiliis S, Kang JS, Macatagney R, Musu MP, Di Pierro MR, et al. Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut* 2003; 52: 218-23.
47. Drago S, El Asmar R, Di Pierro M, Grazia Clemente M, Tripathi A, Sapone A, et al. Gliadin, zonulin and gut permeability: effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 408-19.
48. Ciccocioppo, di Sabatino A, Corazza GR. The immun recognition of gluten in coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 2005; 140: 408-16.
49. Shan L, Molberg O, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, et al. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* 2002; 297: 2275-9.
50. Trynka G, Wijmenga C, van Heel DA. A genetic perspective on coeliac disease. *Trends Mol Med* 2010; 16: 537-50.
51. Cornell HJ, Wills-Johnson G. Structure-activity relationships in coeliac-toxic gliadin peptides. *Amino Acid* 2001; 21: 243-53.
52. Auricchio S, Barone MV, Troncone R. Dietary proteins and mechanism of gastrointestinal diseases: Gliadin as a model. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 39: 738-9.
53. Hausch F, Shan L, Santiago NA, Gray GM, Khosla C. Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: 996-1003.
54. Folk JE. Mechanism and basis for specificity of transglutaminase-catalyzed-(γ -glutamyl) lysine bond formation. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1983; 54: 1-56.
55. Jabri B, Kasarda DD, Green PHR. Innate and adaptive immunity: The Yin and Yang of celiac disease. *Immunol Rev* 2005; 206: 219-31.
56. Kagnoff MF. Overview and pathogenesis of celiac disease. *Gastroenterology* 2005; 128: 10-8.

57. Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S, et al. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in celiac disease. *Lancet* 2003; 362: 30-7.
58. Pender SLF, Lionetti P, Murch SH, Wathan N, MacDonald TT. Proteolytic degradation of intestinal mucosa extracellular matrix after lamina propria T cell activation. *Gut* 1996; 39: 284-90.
59. Elli L, Dolfini E, Bardella MT. Gliadin cytotoxicity and in vitro cell cultures. *Toxicol Lett* 2003; 46: 1-8.
60. Maiuri L, Troncone R, Mayer M, Coletta S, Picarelli A, de Vincenzi M, et al. In vitro activities of A-gliadin related synthetic peptides: Damaging affect on the atrophic coeliac mucosa and activation of mucosal immune response in the treated coeliac mucosa. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31: 247-53.
61. Heyman M, Menard S. Pathways of gliadin transport in celiac disease. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1165: 274-8.
62. Zimmer KP, Fischer I, Mothes T, Weissen-Plenz G, Schmitz M, Wieser H, et al. Endocytotic segregation of gliadin peptide 31-49 in enterocytes. *Gut* 2010; 59: 300-10.
63. Luciani A, Vilella VR, Vasaturo A, Giardino I, Pettoello-Mantovani M, Guido S, et al. Lysosomal accumulation of gliadin p31-43 peptide induces oxidative stres and tissue transglutaminase –mediated PPARgamma downregulation in intestinal epithelial cells and coeliac mucosa. *Gut* 2010; 59: 311-9.
64. Di Sabatino A, Ciccocioppo R, D'Alo S, Parroni R, Millimaggi M, Cifone MG, et al. Intraepithelial and lamina propria lymphocytes show distinct patterns of apoptosis whereas both populations are active in Fas based cytotoxicity in coeliac disease. *Gut* 2001; 49: 380-6.
65. Giovannini C, Sanchez M, Straface E, Scazzocchio B, Silano M, de Vincenzi M. Induction of apoptosis CaCo-2 cells by wheat gliadin peptides. *Toxicology* 2000; 145: 63-71.
66. Giovannini C, Mancini E, de Vincenzi M. Inhibition of the cellular metabolism of CaCo-2 cells by prolamin peptides from cereals toxic for coeliacs. *Toxicol In Vitro* 1996; 10: 533-8.
67. Giovannini C, Maiuri L, de Vincenzi M. Cytotoxic effect of prolamin-derived peptides on in vitro cultures of cell line CaCo-2: Implications for coeliac disease. *Toxicol In Vitro* 1994; 9: 251-5.
68. Dolfini E, Elli L, Dasdia T, Bufardecì B, Colleoni MP, Costa B, et al. In vitro cytotoxic effect of bread with gliadin on the LoVo human adenocarcinoma cell line. *Toxicol In Vitro* 2002; 16: 331-7.

69. Lavö B, Knutson L, Lööf L, Hallgren R. Gliadin challenge-induced jejunal prostaglandin E2 secretion in celiac disease. *Gastroenterology* 1990; 99: 703-7.
70. Stojiljkovic V, Todorovic A, Pejic S, Kasapovic J, Saicic ZS, Radlovic N, et al. Antioxidant status and lipid peroxidation in small intestinal mucosa of children with celiac disease. *Clin Biochem* 2009; 42: 1431-7.
71. Daniels I, Cavill D, Murray IA, Long RG. Elevated expression of iNOS mRNA and protein in coeliac disease. *Clin Chim Acta* 2005; 356: 134-42.
72. Beckett CG, Dell'Olio D, Ellis HJ, Rosen-Bronson S, Ciclitira PJ. The detection and localization of inducible nitric oxide synthase production in the small intestine of patients with coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998; 10: 641-7.
73. Murray IA, Daniels I, Coupland K, Smith JA, Long RG. Increased activity and expression of iNOS in human duodenal enterocytes from patients with celiac disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: 319-26.
74. Högberg L, Webb C, Falth-Magnusson K, Forslund T, Magnusson KE, Danielsson L, et al. Children with screening-detected coeliac disease show increased levels of nitric oxide products in urine. *Acta Paediatr* 2011; 100: 1023-7.
75. Maiuri MC, de Stefano D, Mele G, Iovine B, Bevilacqua MA, Greco L, et al. Gliadin increases iNOS gene expression in interferon-stimulated RAW 264.7 cells through a mechanism involving NF- κ B. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2003; 368: 63-71.
76. De Stefano D, Maiuri MC, Iovine B, Ialenti A, Bevilacqua MA, Carnuccio R. The role of NF- κ B, IRF-1, and STAT-1 α transcription factors in the iNOS gene induction by gliadin and IFN- γ in RAW 264.7 macrophages. *J Mol Med* 2006; 84: 65-74.
77. Thomas KE, Sapone A, Fasano A, Vogel SN. Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: Role of the innate immune response in celiac disease. *J Immunol* 2006; 176: 2512-21.
78. Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Rispo A, et al. Unexpected role of surface transglutaminase type II in celiac disease. *Gastroenterology* 2005; 129: 1400-13.
79. Luciani A, Vilella VR, Vasatura A, Giardino I, Pettoello-Mantovani M, Guido S, et al. Lysosomal accumulation of gliadin p31e43 peptide induces oxidative stress and tissue transglutaminase-mediated PPAR γ downregulation in intestinal epithelial cells and coeliac mucosa. *Gut* 2010; 59: 311-9.
80. De Re V, Simula MP, Notarpietro A, Canzonieri V, Cannizzaro R, Toffoli G, et al. Do gliadin and tissue transglutaminase mediate PPAR downregulation in intestinal cells of patients with coeliac disease? *Gut* 2010; 59: 1730-1.

81. Simula MP, Cannizzaro R, Canzonieri V, Pavan A, Maiero S, Toffoli G, et al. PPAR signaling pathway and cancer-related proteins are involved in celiac disease-associated tissue damage. *Mol Med* 2010; 16: 199-209.
82. Maiuri MC, de Stefano D, Mele G, Fecarotta S, Greco L, Troncone R, et al. Nuclear factor kappa B is activated in small intestinal mucosa of celiac patients. *J Mol Med* 2003; 81: 373-9.
83. Flohe L, Brigelius-Flohe R, Saliou C, Traber MG, Packer L. Redox regulation of NF- κ B activation. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 1115-26.
84. Ohmori Y, Hamilton TA. Cooperative interaction between interferon (IFN) stimulus response element and kappa B sequence motifs controls IFN gamma- and lipopolysaccharide-stimulated transcription from the murine IP 10 promoter. *J Biol Chem* 1993; 268: 6677-88.
85. Juuti-Uusitalo K, Maki M, Kaukinen K, Collin P, Visakorpi T, Vihinen M, et al. cDNA microarray analysis of gene expression in coeliac disease jejunal biopsy samples. *J Autoimm* 2004; 22: 249-65.
86. Juuti-Uusitalo K, Maki M, Kainulainen H, Isola J, Kaukinen K. Gluten affects apithelial differentiation-associated genes in small intestinal mucosa of coeliac patients. *Clin Exp Immunol* 2007; 150: 294-305.
87. Reilly NR, Green PHR. Epidemiology and clinical presentations of celiac disease. *Semin Immunopathol* 2012; 34: 473-8.
88. Bucci P, Carile F, Sanglanantoni A, D'Angio F, Santarelli A, Lo Muzio L. Oral aphthous ulcers and dental enamel defects in children with coeliac disease. *Acta Paediatr* 2006; 95: 203-7.
89. Rubio-Tapia A, Murray JA. The liver in celiac disease. *Hepatology* 2007; 46: 1650-8.
90. Halfdanarson TR, Litzow MR, Murray JA. Hematologic manifestations of celiac disease. *Blood* 2007; 109: 412-21.
91. Hershko C, Patz J. Ironing out the mechanism of anemia in celiac disease. *Haematologica* 2008; 93: 1761-5.
92. Nicolas ME, Krause PK, Gibson LE, Murray JE. Dermatitis herpetiformis. *Int J Dermatol* 2003; 42: 588-600.
93. Van Rijn JC, Grote FK, Oostdijk W, Wit JM. Short stature and the probability of coeliac disease, in the absence of gastrointestinal symptoms. *Arch Dis Child* 2004; 89: 882-3.
94. Fasano A, Counts D. Commentary on 'anti-pituitary antibodies in children with newly diagnosed celiac disease: a novel finding contributing to linear-growth'. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 697-8.

95. Delvecchio M, De Bellis A, Francavilla R, Rutigliano V, Predieri B, Indrio F, et al. Anti-pituitary antibodies in children with newly diagnosed celiac disease: a novel finding contributing to linear-growth impairment. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 691-6.
96. Gadewar S, Fasano A. Celiac disease: is the atypical really typical? Summary of the recent National Institutes of Health Consensus Conference and latest advances. *Curr Gastroenterol Rep* 2005; 7: 455-61.
97. Mora S. Celiac disease in children: impact on bone health. *Rev Endocr Metab Disord* 2008; 9: 123-30.
98. Stenson WF, Newberry R, Lorenz R, Baldus C, Civitelli R. Increased prevalence of celiac disease and need for routine screening among patients with osteoporosis. *Arch Intern Med* 2005; 165: 393-9.
99. Fasano A, Catassi C. Coeliac disease in children. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005; 19: 467-8.
100. Bushara KO. Neurologic presentation of CD. *Gastroenterology* 2005; 128: 92-7.
101. Lionetti E, Francavilla R, Pavone P, Pavone L, Francavilla T, Pulvirenti A, et al. The neurology of coeliac disease in childhood: what is the evidence? A systematic review and meta-analysis. *Dev Med Child Neurol* 2010; 52: 700-7.
102. Di Sabatino A, Corazza GR. Coeliac disease. *Lancet* 2009; 373: 1480-93.
103. Holmes GKT. Screening for coeliac disease in type 1 diabetes. *Arch Dis Child* 2002; 87: 495-9.
104. Larizza D, Calcaterra V, De Giacomo C, De Silvestri A, Asti M, Badulli C, et al. Coeliac disease in children with autoimmune thyroid disease. *J Pediatr* 2001; 139: 738-40.
105. Book L, Hart A, Black J, Feolo M, Zone JJ, Neuhausen SL. Prevalence and clinical characteristics of CD in Down's syndrome in a U.S. study. *Am J Med Gen* 2001; 98: 70-4.
106. Fasano A, Catassi C. Celiac disease. *N Engl J Med* 2012; 367: 2419-26.
107. Giersiepen K, Leigemann M, Stuhldreher N, Ronfani L, Husby S, Koletzko S, et al. Accuracy of diagnostic antibody tests for coeliac disease in children: summary of an evidence report. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012; 54: 229-41.
108. Zintzaras E, Germeris AE. Performance of antibodies against tissue trans-glutaminase for the diagnosis of celiac disease: meta-analysis. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 187-92.
109. Tonutti E, Visentini D, Picierno A, Bizzaro N, Villalta D, Tozzoli R, et al. Diagnostic efficiency of the ELISA test for the detection of deamidated anti-gliadin peptide antibodies in the diagnosis and monitoring of celiac disease. *J Clin Lab Anal* 2009; 23: 165-71.

110. Karell K, Louka AS, Moodie SJ, Ascher H, Clot F, Greco L, et al. 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: 469-77.
111. Harris LA, Park JY, Votaggio L, Lam-Himlin D. Celiac disease: clinical, endoscopic, and histopathologic review. *Gastrointest Endosc* 2012; 76(3): 625-40.
112. Shah VH, Rotterdam H, Kotler DP, Fasano A, Green PH. All that scallops is not celiac disease. *Gastrointest Endosc* 2000; 51: 717-20.
113. Cammarota G, Martino A, Pirozzi GA, Cianci R, Cremonini F, Zuccala G, et al. Direct visualization of intestinal villi by high-resolution magnifying upper endoscopy: a validation study. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 732-8.
114. Lo A, Guelrud M, Essenfled H, Bonis P. Classification of villous atrophy with enhanced magnification endoscopy in patients with celiac disease and tropical sprue. *Gastrointest Endosc* 2007; 66: 377-82.
115. Hurlstone DP, Sanders DS. High-magnification immersion chromoscopic duodenoscopy permits visualization of patchy atrophy in celiac disease: an opportunity to target biopsies of abnormal mucosa. *Gastrointest Endosc* 2003; 58: 815-6.
116. Collin P, Rondonotti E, Lundin KE, Spada C, Keuchel M, Kaukinen K, et al. Video capsule endoscopy in celiac disease: current clinical practice. *J Dig Dis* 2012; 13: 94-9.
117. Marsh MN. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology* 2012; 102: 330-54.
118. Marsh MN, Crowe PT. Morphology of the mucosal lesion in gluten sensitivity. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1995; 9: 273-93.
119. Oberhuber G. Histopathology of celiac disease. *Biomed Pharmacother* 2000; 54: 368-72.
120. Corazza GR, Villanacci V. Coeliac disease. *J Clin Pathol* 2005; 58: 573-4.
121. Haboubi NY, Taylor S, Jones S. Coeliac disease and oats: a systematic review. *Postgrad Med J* 2006; 82: 672-8.
122. Hopman EG, Le Cessi S, von Blomberg BM, Mearin ML. Nutritional management of the gluten-free diet in young people with CD in the Netherlands. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 43: 102-8.
123. Catassi C, Fabiani E, Iacono G, D'Agate G, Francavilla R, Biagi F, et al. A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *Am J Clin Nutr* 2007; 85: 160-6.
124. Tack GJ, Verbeek WH, Schreurs MW, Mulder CJ. The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 203-13.

125. Cros CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, et al. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987; 107: 526-45.
126. McCord JM. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem* 1993; 26: 351-7.
127. Slmeci L. Advanced oxidation protein products (AOPP): novel uremic toxins, or components of the non-enzymatic antioxidant system of the plasma proteome? *Free Radic Res* 2011; 45(10): 1115-23.
128. Kalinina EV, Chernov NN, Saprin AN. Involvement of thio-, peroxi-, and glutaredoxins in cellular redox-dependent processes. *Biochemistry* 2008; 73(13): 1493-510.
129. McCord. Oxygen-derived free radicals in post ischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312: 159-63.
130. Berenshtein E, Mayer B, Goldberg C, Kitrossky N, Chevion M. Patterns of mobilization of copper and iron following myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 3025-34.
131. Sbarouni E, Georgiadou P, Voudris V. Ischemia modified albumin changes-review and clinical implications. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49: 177-84.
132. Kaefer M, Piva SJ, De Carvalho JA, Da Silva DB, Becker AM, Coelho AC, et al. Association between ischemia-modified albumin, inflammation and hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus. *Clin Biochem* 2010; 43: 450-4.
133. Duarte MM, Rocha JB, Moresco RN, Duarte T, Da Cruz IB, Loro VL, et al. Association between ischemia modified albumin, lipids and inflammation biomarkers in patients with hypercholesterolemia. *Clin Biochem* 2009; 42: 666-71.
134. Cichota LC, Moresco RN, Duarte MM, da Silva JE. Evaluation of ischemia-modified albumin in anemia associated to chronic kidney disease. *J Clin Lab Anal* 2008; 22: 1-5.
135. Piva SJ, Duarte MM, Da Cruz IB, Coelho AC, Moreira AP, Tonello R, et al. Ischemia-modified albumin as an oxidative stress biomarker in obesity. *Clin Biochem* 2011; 44: 345-7.
136. Awadallah SM, Atoum MF, Nimer NA, Saleh SA. Ischemia modified albumin: an oxidative stress marker in β -thalassemia major. *Clin Chim Acta* 2012; 413: 907-10.
137. Bar-Or D, Lau E, Winkler JV. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia-a preliminary report. *J Emerg Med* 2000; 19: 311-5.
138. Bar-Or D, Lau E, Rao N. Reduction in the cobalt binding capacity of human albumin with myocardial ischemia. *Ann Emerg Med* 1999; 34: 56.
139. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem* 2004; 37(2): 112-9.

140. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005; 38(12): 1103-11.
141. Koster JF, Biemon P, Swaak AJ. Intracellular and extracellular sulfhydryl levels in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1986; 45(1): 44-6.
142. Witko-Sarsat V, Frielander M, Capeille're-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996; 49: 1304-13.
143. Stahlberg MR, Hietanen E, Maki M. Mucosal biotransformation rates in the small intestine of children. *Gut* 1988; 29: 1058-63.
144. Ter Steege J, Buurman W, Arends JW, Forget P. Presence of inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, CD68, and CD14 in the small intestine in celiac disease. *Lab Invest* 1997; 77: 29-36.
145. Alessio MG, Tonutti E, Brusca I, Radice A, Licini L, Sonzogni A, et al. Correlation between IgA tissue transglutaminase antibody ratio and histological finding in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012; 55(1): 44-9.
146. Zanini B, Magni A, Caselani F, Lanzarotto F, Carabellese N, Villanacci V, et al. High tissue-transglutaminase antibody level predicts small intestinal villous atrophy in adult patients at high risk of celiac disease. *Dig Liver Dis* 2012; 44(4): 280-5.
147. Ertekin V, Selimoğlu MA, Türkan Y, Akçay F. Serum nitric oxide levels in children with celiac disease. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: 782-5.
148. Szaflarska-Poplawska A, Siomek A, Czerwionka-Szaflarska M, Gackowski D, Rozalski R, Guz J, et al. Oxidatively damaged DNA/oxidative stress in children with celiac disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19(8): 1960-5.