



**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI
PEDIATRİK GASTROENTEROLOJİ BİLİM DALI**

**GLUTENSİZ DİYETE UYAN ÇÖLYAKLI GEBELERDE
GLİADİNE KARŞI PLASENTAL İMMÜN YANITIN SAĞLIKLI
GEBELERLE KARŞILAŞTIRILMASI**

**Uzm. Dr. BURCU VOLKAN
YAN DAL UZMANLIK TEZİ**

İSTANBUL, 2014



**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI
PEDIATRİK GASTROENTEROLOJİ BİLİM DALI**

**GLUTENSİZ DİYETE UYAN ÇÖLYAKLI GEBELERDE
GLİADİNE KARŞI PLASENTAL İMMÜN YANITIN SAĞLIKLI
GEBELERLE KARŞILAŞTIRILMASI**

Uzm. Dr. BURCU VOLKAN

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. DENİZ ERTEM

Bu tez Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından SAG-C-TUP-100413-0114 nolu proje olarak desteklenmiştir.

İSTANBUL, 2014

ÖNSÖZ

Pediyatrik Gastroenteroloji, Hepatoloji ve Beslenme yan dal ihtisasım süresince derin bilgi ve deneyimleri ile eğitimime sonsuz katkı sağlayan, tezimin yapım ve yazım aşamasında değerli fikirlerini ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım ve hocam Prof. Dr. Deniz Ertem'e,

Her geçen gün tıp dünyasında yeni bir şeylerin keşfedildiğini ve güncel kalmanın önemini öğreten, görüşleri ve değerli önerileriyle bana yol gösteren hocam Prof. Dr. Ender Pehlivanoglu'na

Pediyatri uzmanlık ihtisasım ve Pediyatrik Gastroenteroloji, Hepatoloji ve Beslenme yan dal ihtisasım süresince yanımda olan, her zaman desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimleri ile eğitimime katkı sağlayan hocam Yard. Doç. Dr. Engin Tutar'a,

Eğitimim süresince bilimsel desteklerini her zaman yanımda hissettiğim başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Işıl Barlan olmak üzere tüm değerli hocalarıma,

Tezimin her aşamasında çok büyük destek ve özverili katkılarını gördüğüm İmmünoloji Bilim Dalı öğretim üyelerinden Yard. Doç. Dr. Aysin Tulunay'a ve Patoloji Bilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Çiğdem Ataizi Çelikel'e,

Birlikte zevkle ve uyum içinde çalıştığım, iyi ve kötü günde yanımda olan değerli yan dal arkadaşlarım Uzm. Dr. Günsel Kutluk, Uzm. Dr. Aykut Bayrak, Uzm. Dr. Esra Polat ve Uzm. Dr. Birol Öztürk ile anabilim dalımızdaki tüm uzman ve asistan arkadaşlarıma,

Gastroenterolojinin temeli olan endoskopi eğitimime destek veren başta Prof. Dr. Osman Özdoğan olmak üzere tüm Dahiliye Gastroenteroloji Bilim Dalı öğretim üyelerine ve uzmanlarına; endoskopi ünitemizin özverili, candan hemşire ve personeline,

Her zaman büyük özveriyle yanımda duran sevgilerini ve desteklerini esirgemeyen başta annem Vildan Pişgin olmak üzere tüm aile büyüklerime, eşim Ömür Volkan ve canım oğlum Deniz Onur Volkan'a,

En içten duygularımla teşekkür ederim.

Ocak, 2014

Dr. Burcu VOLKAN

ÖZET

Giriş ve amaç: Çölyak hastalığında diet tedavisine uyulmadığı durumlarda geçikmiş menarş, amenore, erken menapoz, tekrarlayan düşükler, infertilite ve hamilelikle ilgili problemler gibi reproduktif sistemle ilgili olumsuz etkiler görülmektedir. Son bilgilerin ışığında reproduktif sistemle ilgili problemlerin mekanizması net değildir. Besin ve vitamin eksikliğine bağlı malabsorbsiyonun katkısının yanında gliadinin indüklediği inflamasyon ve plasental hücrelerin apoptozu da fetal büyümeyi etkileyebilir. Çalışmanın amacı, glutensiz diyet tedavisine uyumlu çölyak hastalarından elde edilen desidual mononükleer hücrelerin, gliadin antijenine immün yanıtının değerlendirilmesidir.

Yöntem: Diyetine uyumlu çölyak hasta plasentalarının desidual lökosit popülasyonu ($CD3^+$ T lenfosit, $CD4^+$ T lenfosit, $CD8^+$ T lenfosit, $CD3^+CD16^+CD56^+$ NK-T hücre, $CD16^+CD56^+$ NK hücre) akım sitometrisi ile sayıldı. İmmünohistokimyasal boyama ile desiduada bulunan $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD16^+$ ve $CD56^+$ lenfositler değerlendirildi. Ekstravillöz trofoblastlarda, fetüsün implantasyonu için önemli olan HLA-G molekülünün ekspresyonu immünohistokimyasal boyama ile değerlendirildi. Desidual mononükleer hücreler pt-gliadin (enzimatik olarak parçalanmış gliadin), fitohemagglütinin (PHA) yada pt-gliadin+PHA ile uyarılarak 72 saat kültüre alındı ve lenfositlerin aktivasyonunu gösteren $CD69$ molekülü ekspresyonu akım sitometrisi ile ölçüldü. Kültür süpernetanlarında salgılanan Th1 ($IFN-\gamma$ IL-15, IL-17), Th2 (IL-4, IL-10) sitokinleri ve sHLA-G ELISA yöntemi ile ölçüldü. Kontrol grubuna alınan plasentalar, yaş ve gebelik haftası ile uyumlu sağlıklı hamilelerden elde edildi.

Bulgular: Onaltı gebe (8 çölyak hastası, 8 sağlıklı kontrol) çalışmaya dahil edildi. Doğum yapılan gestasyon haftası ve doğan bebeklerin tartısı açısından hasta ve kontrol grubu arasında fark saptanmadı. Akım sitometrisi ile değerlendirildiğinde $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ T lenfosit, NK-T hücre ve NK hücre yüzdeleri açısından iki grup arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Desidual lökositlerin immünohistokimyasal boyama sonucunda $CD16^+$ NK hücre sayısı hasta grubunda anlamlı derecede yüksek saptandı ($p=0.007$), $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ T lenfosit ve $CD56^+$ NK hücre sayıları

açısından ise fark saptanmadı. Kontrol grubunda CD3⁺ T hücrelerinin pt-gliadin + PHA uyarımı sonrasında, CD69 ekspresyonu hasta grubuna göre anlamlı derecede arttığı izlendi (p=0.038), NK ve NK-T hücrelerinin uyarımı sonrasında ise iki grup arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Hasta grubunda pt-gliadin ile uyarım sonrasında NK hücrelerin CD69 ekspresyonu, NK-T hücrelerine göre anlamlı derecede fazla olduğu görüldü (p=0.03). Desidual mononükleer hücrelerden pt-gliadin ile uyarımı sonrası salgılanan IL-10, IFN- γ , IL-15 seviyeleri çölyak hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptandı (p=0.028, p=0.01 ve p=0.01). IL-4, IL-17 ve sHLA-G salgılanması açısından iki grup arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Ektravillöz trofoblastların HLA-G ekspresyonunun immünohistokimyasal değerlendirilmesi sonucunda iki grup arasında fark saptanmadı.

Sonuç: Çölyak hasta plasentasından izole edilen desidual lökosit kompozisyonunun sağlıklı kontrollerden farklı olduğunu ve hasta grubunda CD16⁺ NK hücrelerinin anlamlı olarak arttığı saptandı. Desidual lökositler gliadinle uyarıldığında kontrol grubunda CD3⁺ T lenfositler, NK ve NK-T hücreleri aktive olurken, çölyak plasentasında ise sadece NK hücreleri aktive oldu. İzole edilen desidual lökositlerin gliadinle uyarılması sonucunda çölyaklı hastalara ait plasentada IFN- γ , IL-15 ve IL-10'nun daha fazla salgılandığı, gebeliğin devamı için zararlı ortam oluşturan CD16⁺ NK hücrelerin sayısının ve aktivitesinin artmış olduğu görüldü. IFN- γ ve IL-15 gibi inflamatuvar sitokinlerin fazla salgılandığı çölyak plasentasında artan Th1 yanıtın kaynağının NK hücreleri olduğu düşünüldü.

Anahtar kelimeler : Çölyak hastalığı, gebelik, plasenta, gliadin, immün yanıt

Abstract

Objectives and study: Celiac disease is associated with reproductive disorders such as delayed menarche, amenorrhea, early menopause, recurrent abortions, infertility and adverse pregnancy outcome in patients who are not compliant to gluten free diet (GFD). The current knowledge regarding the pathogenesis of reproductive problems is still obscure. Nutrient and vitamin deficiency secondary to malabsorption may impair fetal growth as well as gliadin induced inflammation and apoptosis of the placenta. The aim this study was to evaluate immune response of the decidual mononuclear cells, isolated from GFD compliant celiac patients to gliadin.

Methods: Decidual leucocyte population ($CD3^+$ T lymphocytes, $CD4^+$ lymphocytes, $CD8^+$ lymphocytes, $CD3^+CD16^+$ $CD56^+$ NK-T cells, $CD56^+CD16^+$ NK cells) isolated from placenta of GFD compliant celiac patients, was assessed by flow cytometry. Decidual mononuclear cells ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD16^+$, $CD56^+$) were assessed by immunohistochemistry staining. Expression of HLA-G (which is important for the implantation of the fetus was determined) on the extravillous cytotrophoblasts was determined by immunohistochemistry. Decidual mononuclear cells were cultured with pt-gliadin (digested gliadin), phytohemagglutinine (PHA) or pt-gliadin+PHA for 72 hours, and expression of CD69, which shows the activation of lymphocyte, was assessed by flow cytometry. Subsequently, secretion of Th1 (IFN- γ IL-15, IL-17), Th2 (IL-4, IL-10) cytokines and, sHLA-G were measured by ELISA. Control placentas were obtained from healthy pregnant women who were matched for age and parity.

Results: Sixteen pregnant women (8 celiac patients, 8 healthy controls) have participated in this study. There was no difference between the patients and controls regarding gestational age and birth weight of the newborns. Flow cytometric analysis of $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ lymphocytes, NK-T and NK cells did not vary significantly between celiac patients and controls. Immunohistochemical analysis of decidual leucocyte population, the number of $CD16^+$ NK cells were significantly higher in celiac placentas than control ($p=0.007$) but $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ T lymphocytes and

CD56⁺ NK cells did not vary significantly between two groups. In control placenta, the percentage of CD3⁺ T cells expressing CD69 activation molecule was significantly increased after exposure to pt-gliadin+PHA (p=0.03), however expression of CD69 activation molecule on NK and NK-T cells did not vary between two groups. In celiac placenta, NK cells were activated more than NK-T cells after exposure to pt-gliadin (p=0.03). Pt-gliadin stimulated IL-10, IFN- γ and IL-15 secretion from cultured decidual mononuclear cells of celiac women were significantly higher than control group (p=0.028, p=0.01, p=0.01 respectively). Secretion of IL-4, IL-17 and sHLA-G did not vary significantly between celiac patients and controls. There was no difference in pattern of HLA-G expression on extravillous trophoblast with immunohistochemistry analysis between two groups.

Conclusion: Decidual leucocyte composition, isolated from celiac placenta was different from control placenta and CD16⁺ NK cells were significantly higher in celiac placenta than control. The CD3⁺ T lymphocytes, NK cells and NK-T cells, isolated from the decidua were activated after antigenic stimulation in both patients and controls, however decidual NK cells were activated more than NK-T and CD3⁺ cells after gliadin stimulation in celiac patients. In celiac placentas, pt-gliadin stimulated IL-10, IFN- γ and IL-15 secretion from cultured decidual mononuclear cells were significantly higher than controls. It is thought that NK cells are responsible for the increased Th1 response in celiac placenta in which inflammatory cytokines like IFN- and IL-5 are secreted in high amounts.

Key words: Celiac disease, pregnancy, placenta, gliadin, immune response

SİMGELER VE KISALTMALAR

ÇH	: Çölyak hastalığı
HLA	: Human lökosit antijen
ESPGHAN	: European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition
TTG	: Tissue transglutaminaz
TH	: T helper 1
MHC	: Major histokompatibilite kompleksi
RÇH	: Refrakter çölyak hastalığı
IL	: İnterlökin
CTLA4	: Sitotoksik T lenfosit antijen 4
RGS1	: Regülatör G-protein sinyal 1
CCR	: C kemokin reseptör
PEP	: Prolil endopeptidaz
CD	: Cluster differentiation
NK	: Natural killer
TG2	: Transglutaminaz 2
TGFβ	: Transforming growth factor-β
TNFα	: Tümör nekroz faktör-α
APC	: Antigen presenting cell (antijen sunan hücre)
IFNγ	: İnterferon gamma
DC	: Dendritik hücre
Treg	: T regülatör
İEL	: İntraepiteyal lenfosit
TCR	: T hücre reseptörü
MIC	: MHC sınıf 1 polipeptid ile ilgili molekül
NKG2C	: Natural killer grup 2 member C reseptörü
NKG2D	: Natural killer grup 2 member D reseptörü
GİS	: Gastrointestinal sistem
AGA	: Anti-gliadin
EMA	: Endomisyum antikoru
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
RIA	: Radio-immunoassay

DGP	: Deamine gliadin peptidi
HE	: Hematoksilen eozin
Ppm	: Parts per million
ZOT	: Zonula Occludens Toxin
IUGR	: İntauterin büyüme geriliği
G-CSF	: Granülosit koloni stimule edici faktör
GM-CSF	: Granülosit-makrofaj koloni stimuli edici faktör
M-CSF	: Makrofaj koloni stimuli edici faktör
LIF	: Lösemi inhibitor faktör
VEGF	: Vasküler endothelial büyüme faktörü
PIGF	: Plasental büyüme faktörü
IP-10	: İnterferon indükleyici protein-10
SF	: Serum fizyolojik
Rpm	: Revolutions per minute
PBS	: Fosfat tampon çözeltisi
PHA	: Fitohemaglütinin
FCS	: Fetal calf serum
DMSO	: Dimetil sülfoksit
pt-gliadin	: Pepsin tripsin digest gliadin
mM	: Milimol
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
BD	: Becton-Dickinson Immunocytometry systems
PERCP	: Peridinin-chlorophyll proteins
PE	: Phycoerithin
APC	: Allophycocyanin
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
ABC	: Avidin-Biotin-Peroxidase Complex
nm	: Nanometre
pg	: Pikogram
ng	: Nanogram
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
DAB	: 3,3'-diaminobenzidin
SPSS	: Statistical Package for Social Sciences

TABLÖLAR DİZİNİ

		<u>Sayfa</u>
Tablo 1	Çölyak hastalığında tahılların toksisitesi	7
Tablo 2	Çölyak hastalığı klinik sınıflama	13
Tablo 3	Çölyak hastalığı ile birliktelik gösteren hastalıklar	16
Tablo 4	Çölyak hastalığında serolojik testlerin spesifitesi ve sensitivitesi	20
Tablo 5	Çölyak hastalığı histopatolojik değerlendirilmesinde kullanılan Marsh sınıflaması	23
Tablo 6	Çölyak hastalığı histopatolojik değerlendirilmesinde kullanılan modifiye Marsh Sınıflaması	23
Tablo 7	Çölyak hastalığında reproduktif dönem değişiklikleri	30
Tablo 8	Hücre yüzey molekülü ekspresyonunda kullanılan monoklonal antikorlar	41
Tablo 9	Trofoblastlarda HLA-G ile boyanma sınıflaması	45
Tablo 10	Desidual lökositlerin immünohistokimyasal boyanması	48
Tablo 11	Desidua ve koryon villuslarda trofoblastların HLA-G ekspresyonu	49
Tablo 12	Plasentadan izole edilen lenfosit alt gruplarının hasta ve kontrol gruplarına göre dağılımı	49
Tablo 13	CD3 ⁺ T lenfositlerin uyarım sonrası CD69 ekspresyonu	50
Tablo 14	NK hücrelerin uyarım sonrası CD69 ekspresyonu	51
Tablo 15	NK-T hücrelerin uyarım sonrası CD69 ekspresyonu	51
Tablo16	Kültür süpernetanlarında salgılanan sitokin seviyeleri	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

		<u>Sayfa</u>
Şekil 1	Gliadin ile tetiklenen intestinal hasarın immünolojik mekanizması	11
Şekil 2	Çölyak hastalığı buzdağı	12
Şekil 3	Duedonal foldlarda deniz tarağı görünümü	21
Şekil 4	Duedonal foldlarda silinme	21
Şekil 5	Çölyak hastalığında Marsh sınıflamasına göre histopatolojik değişiklikler	22
Şekil 6	Materno-fetal arayüz	33
Şekil 7	Desidual lökositlerin immünhistokimyasal boyama sonuçları	48
Şekil 8	T lenfositlerin uyarım sonrasında CD69 ekspresyonu	51
Şekil 9	Hasta grubunda CD3 ⁺ , NK ve NK-T hücrelerin CD69 Ekspresyonu	52
Şekil 10	Kontrol grubunda CD3 ⁺ , NK ve NK-T hücrelerin CD69 ekspresyonu	52
Şekil 11	Hasta ve kontrol grubunda uyarım sonrası salınan IL-10, IL-15 ve IFN- γ düzeyleri	54

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Önsöz	i
Özet	ii
İngilizce özet (Abstract)	iv
Simgeler ve kısaltmalar	vi
Tablolar dizini	viii
Şekiller dizini	ix
İçindekiler	x
1.Giriş ve Amaç	1
2.Genel Bilgiler	3
2.1.Çölyak Hastalığı	3
2.1.1.Tanım	3
2.1.2.Tarihçe	3
2.1.3.Epidemiyoloji	4
2.1.4.Patofizyoloji	5
2.1.4.1.Çevresel Faktörler	5
2.1.4.2.Genetik Faktörler	6
2.1.4.3.Gluten	7
2.1.4.4.Glutene Bağlı Gastrointestinal Hasarın Mekanizması	8
2.1.4.4.1.Bağırsak geçirgenliğinde artış	8
2.1.4.4.2.Transglutaminaz 2 ve CD4 T Hücre Aktivasyonu	8
2.1.4.4.3.İntestinal Dendritik Hücreler	9
2.1.4.4.4.Enterosirler ve İntraepitelyal Lenfositler	10
2.1.5.Klinik Bulgular	12
2.1.5.1.Gastrointestinal Sistem Dışı Bulgular	13
2.1.5.2.Çölyak Hastalığı ile İlişkili Olan Hastalıklar	16
2.1.5.2.1.Tip 1 Diyabet	16
2.1.5.2.2.Otoimmün Tiroid Hastalıkları	17
2.1.5.2.3.Genetik Bozukluklar	17
2.1.5.2.4.Selektif IgA Eksikliği	17
2.1.6.Tanı	18
2.1.6.1.Serolojik Testler	18
2.1.6.1.1.Anti-gliadin Antikorları	18
2.1.6.1.2.Anti Endomizyum Antikorları	19
2.1.6.1.3.Anti Doku Transglutamina Antikorları	19
2.1.6.1.4.Deamine Gliadin Peptidlerine Karşı Antikorlar	20
2.1.6.2.Üst Gastrointestinal Sistem Endoskopisi	20
2.1.6.3.Histopatoloji	21
2.1.6.4.Doku Grupları (HLA-DQ2 ve HLA-DQ8)	24
2.1.7.Tedavi	24
2.1.7.1.Glutensiz Diyet, Vitamin ve Mineral Replasmanı	24
2.1.7.2.Yeni Tedavi Yaklaşımları	25
2.1.7.2.1.Enzim Replasman Tedavisi	26
2.1.7.2.2.Genetik Çalışmalar	27
2.1.7.2.3.İnce Bağırsak Geçirgenliğinin azaltılması	27
2.1.7.2.4.Transglutaminaz İnhibitörleri	28

2.1.7.2.5.HLA-DQ2 İnhibitörleri	28
2.1.7.2.6.Diğer Tedaviler	28
2.1.8.Çölyak Hastalığının Komplikasyonları	28
2.1.8.1.Kanser	28
2.1.8.2.Refrakter Çölyak Hastalığı	29
2.2.Çölyak Hastalığının Reprodüktif Sistem Üzerine Etkileri	30
2.3.Gebelik İmmünolojisi	32
2.3.1.Desidual İmmün Hücreler	34
2.3.1.1.Uterusun Natural killer Hücreleri	34
2.3.1.2.Lenfositler	35
2.3.1.3.Regülatör T Hücreleri (Treg)	36
2.3.1.4.Monosit ve Makrofajlar	36
2.3.2.Trofoblastların Maternal İmmün Yanıttan Korunması	36
2.3.2.1.HLA-G	37
2.3.2.2.HLA-E	37
3.Gereç ve Yöntem	38
3.1.Olgu seçimi	38
3.2.İmmünolojik Değerlendirme	38
3.2.1.Plasentadan Mononükleer Hücre İzolasyonu ve Kültürü	38
3.2.2.Pt-gliadin Hazırlanması ve Hücre Kültürlerini Uyaracak Doz Tayini	39
3.2.3.Plasental Hücre Kültürü	40
3.2.4.Plasental Mononükleer Hücrelerde Eksprese Edilen Yüzey Moleküllerinin Analizi	40
3.2.5.Hücre Kültüründe Sitokin Analizi	41
3.2.5.1.IL-4 Sitokin Analizi	41
3.2.5.2.IL-10 Sitokin Analizi	42
3.2.5.3.IL-15 Sitokin Analizi	42
3.2.5.4.IL-17 Sitokin Analizi	43
3.2.5.5.IFN- γ Sitokin Analizi	43
3.2.5.6.sHLA-G Analizi	44
3.3.Plasental Dokunun İmmünohistokimyasal Değerlendirilmesi	44
3.4.İstatistiksel Analiz	46
4.Bulgular	47
4.1.Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri	47
4.2.Plasentanın immünohistokimyasal boyama sonuçlar	48
4.3.Plasentadan izole edilen lenfositlerin subgrup analizi	49
4.4.Plasentadan izole edilen mononükleer hücrelerin antijenik uyarıya cevabı (CD69 yüzey aktivasyon belirteci)	50
4.5.Plasentadan izole edilen mononükleer hücre kültüründe salgılanan sitokin düzeyleri	53
5.Tartışma	55
6.Sonuçlar	64
7.Kaynaklar	65
8.Ekler	77
8.1.Ek-1: Hasta onam formu	77
8.2.Ek- 2: Etik kurul onayı	80

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Çölyak hastalığı, genetik olarak yatkın kişilerde gluten içeren buğday, arpa, çavdar ve yulaflı gıdaların tüketilmesi ile tetiklenen bir otoimmün enteropatidir. Beyaz ırkta, özellikle çocukluk çağında, görülme sıklığı 1/80-1/300 arasında değişmektedir (1). Ülkemizde 2010 yılında Dalgıç ve ark.nın bildirdiği, çok merkezli Türkiye çalışmasında, çocuk popülasyonundaki sıklığı 1/212 olarak saptanmıştır (2). Çölyak hastalığı multigenik bir hastalıktır ve major histokompatibilite kompleksindeki (MHC) insan lökosit antijeni (HLA) sınıf 2 D genleri ile arasında kuvvetli ilişki gösterilmiştir (3).

Gluten, buğday ve diğer tahıllarda bulunan bir protein olup glutenin ve gliadin polipeptidlerinden meydana gelir ve alkolde çözülebilen prolamin kısmıyla hastalığa yol açar. Gluten ve/veya peptidleri intestinal bariyeri aşarak orada bulunan antijen sunan hücreler, T hücreleri, NK hücreler, B lenfositleri ve plazma hücreleri ile karşılaşır ve meydana gelen immünolojik reaksiyonlar sonucunda intestinal hücre hasarı oluşur (4).

Çölyak hastalığı tipik olarak, çocuklarda erken çocukluk dönemi olan 2 yaş civarında ve erişkin dönemde 40 yaş civarında en sık görülür. Çölyak hastalığı kronik ishal, kilo kaybı, büyüme geriliği ve malabsorbsiyon gibi klasik semptomlarla ortaya çıktığı gibi dirençli demir eksikliği anemisi, izole boy kısalığı, osteoporoz, hepatit ve jinekolojik problemler gibi ekstraintestinal bulgularla da karşımıza çıkabilir (5).

Çölyak hastalığının reproduktif dönem üzerindeki etkilerini araştıran çalışmalarda glutensiz diyetle uyumsuz hastalarda diyetle uyumlu olanlara ve sağlıklı kontrollere göre, gecikmiş menarş, erken menapoz, sekonder amenore, menstrual siklus bozuklukları ve sebebi bilinmeyen infertilitenin daha sık, gebelik dönemlerinde abortus oranının ve doğan bebeklerde intrauterin büyüme geriliği olma sıklığının daha yüksek oranda olduğu saptanmıştır (6,7). Saptanan bu problemlerin gelişmesinde besinlerin malabsorbsiyonu sonucu oluşan vitamin ve elementlerin eksikliğinin yanında, gliadinin gastrointestinal sistemde oluşturduğu immünolojik hasarın da katkısı olduğu düşünülmektedir.

Diyete uyumsuz çölyaklı hastalarda gebelikte görülen problemlerin mekanizmasına yönelik araştırmalar 2000’li yılların ortalarından bu yana yapılmakta olup, daha çok immünhistokimyasal çalışmalardır ve desiduada bulunan immün sistem hücrelerinin fonksiyonu, gliadine verdikleri immün cevap ile ilgili yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Literatürde tekrarlayan düşükleri veya preeklampsisi olan gebelerin plasentalarında yapılmış olan immünolojik çalışmaların ışığı altında Çölyak hastalarında gebelikle ilgili problemlerin mekanizmasını araştırmak için farklı bir bakış açısı uygulayacak şekilde çalışmamızı planladık.

Bu çalışmanın amacı;

- Glutensiz diyet tedavisi alan çölyaklı gebelerin plasental hücre kompozisyonunun sağılıklı gebelerle karşılaştırılması.
- Diyet tedavisine uyan çölyaklı gebelerin plasentasından izole edilen mononükleer hücrelerin, nonspesifik ve spesifik gliadin antijeni ile uyarımı sonrasında meydana gelen immünolojik yanıtın, sağılıklı gebelerle karşılaştırılması.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ÇÖLYAK HASTALIĞI

2.1.1.Tanım

Çölyak hastalığı (ÇH), genetik olarak yatkınlığı olan kişilerde gluten içeren buğday, arpa, çavdar ve yulaflı gıdaların tüketilmesi ile tetiklenen, hücrel ve humoral immün sistemin aktivasyonu ile karakterize otoimmün enteropatidir. Batı toplumlarında en sık görülen malabsorbsiyon nedenlerinden birisidir. Günümüzde ÇH olan bireylerin doğuştan genetik olarak hastalığa yatkınlığı olduğu ve bunun uygun çevresel koşullar altında hastalığa dönüştüğü kabul edilmektedir (8).

2.1.2.Tarihçe

Bir İngiliz pediatrist olan Samuel Gee (9) ÇH'yi ilk kez 1887 yılında, gayta sıklık ve kıvamında değişiklikler, karın şişliği ve kas güçsüzlüğü gibi semptomların oluşturduğu kronik bir hastalık olarak tanımlamış ve bir gıdanın semptomlara neden olabileceğini öne sürmüştür. Uzun yıllar çeşitli diyet tedavileri denenilen ÇH'de, hastalık ile gluten arasındaki ilişki ilk defa, 2. Dünya Savaşı sırasında yokluk nedeniyle ekmek ve tahılın daha az tüketilmesi sonucunda hastaların ataklarının azaldığını gözlemleyen Dr.Willem-Karel Dicke tarafından tanımlandı. Dr. Dicke'nin Van de Kamer ve Weijers (10) ile yaptığı araştırmalar sonucunda 1950 yılında, glutenin ÇH'de inflamasyonu tetiklediği kanıtlanmış, 1954 yılında da Paulley (11) tarafından ÇH'nin karakteristik intestinal bulguları bildirilmiştir.

İlk zamanlarda ÇH'nin primer olarak çocukluk çağı hastalığı olduğu ve tanısının bazen erişkin yaşa kadar gecikebileceği düşünülmekteydi. Yıllar içinde genetik, immünolojik ve moleküler alandaki ilerlemeler sayesinde ÇH'nin patogenezi aydınlatarak gelişmeler kaydedildi ve hastalığın sadece çocukları değil, genetik yatkınlığı olan bireyleri yeterince gluten içeren gıdaya maruz kalmaları durumunda herhangi bir yaşta etkileyebileceği anlaşıldı (8). Howell ve ark. (12) tarafından 1986 yılında hastalığın spesifik HLA (Human lökosit antijen) sınıf 2 DQ haplotipleri ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir.

2.1.3.Epidemiyoloji

Beyaz ırkta, özellikle çocukluk çağında, görülme sıklığı 1/80-1/300 arasında değişmektedir (1). Avrupa ve Amerika'da son zamanlarda tahmin edilen prevelansı %1 (%0.5-%1.26) civarındadır (13). Ülkemizde 2010 yılında Devlet Planlama Teşkilatı'ndan alınan destekle tamamlanan çok merkezli Türkiye çalışmasında ÇH prevelansı 6-17 yaş arası popülasyonda 1/212 (%0.47) olarak saptanmıştır (2).

Çölyak hastalığı tamamen asemptomatik olabileceği gibi, tedaviye dirençli demir eksikliği anemisi, boy kısalığı ve hatta ölüme kadar varabilen ciddi bir tablo ile ortaya çıkabilir. Geniş klinik spektrumu göz önüne alındığında hastalığın prevelansının tahmin edildiğinden daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Amerika'da yapılmış bir epidemiyolojik çalışmada semptom ve risk faktörü olmayan çocuklarda ÇH prevelansı %0.31 iken, semptom ve risk faktörü olanlarda %4.1'e kadar yükseldiği gözlenmiştir (14). Toplumda her tanı alan hastaya karşılık 5 ile 7 arasında tanı almamış çölyak hastasının bulunduğu tahmin edilmektedir (15).

Çölyak hastalığı patogenezinde genetik, çevresel ve immünolojik faktörler rol oynamaktadır. Hastaların birinci derecede akrabalarında %10-12 oranında ÇH saptandığı ve konkordansının dizigotik ikizlerde %17-20, monozigot ikizlerde ise %83-86 olduğu bildirilmektedir (8,16). Genetik faktörlerin çeşitliliği, diyet alışkanlıklarının da dahil olduğu çevresel faktörler, dünyanın değişik bölgelerinde ÇH sıklığındaki farklılığın nedenini açıklamaktadır. Cezayir'de yaşayan Arap-Berberi kökenli Sahara popülasyonunda ÇH prevelansı diğer toplumlara göre en yüksek seviyededir (%5.6) (3). Bu toplumda akraba evliliği ve HLA-DQ2 sıklığının fazla olması ve glutenin temel gıda olarak tüketilmesi, hastalığın yüksek oranda görülmesine neden olarak düşünülmektedir. Bu verileri destekler nitelikte, HLA-DQ2 taşıma oranı düşük olan ve temel gıda olarak glutenin az tüketildiği Japonya ve Çin'de ÇH daha nadir görülmektedir (17). Orta Doğu ülkelerinde (İran, Türkiye, İsrail ve Suriye) ÇH prevelansı Batı ülkeleri ile benzer sıklıktadır (18).

2.1.4.Patofizyoloji

2.1.4.1.Çevresel Faktörler

Çölyak hastalığı gelişmesinde anne sütü ile beslenme, glutenli gıdalarla beslenmeye başlama yaşı, geçirilmiş gastrointestinal sistem enfeksiyonları ve sosyoekonomik düzey gibi çevresel faktörlerin önemli rol oynadığı bilinmektedir (19). Toplumda HLA DQ2 ya da DQ8 genlerini taşıyan bireylerin bir kısmında ÇH gelişirken, kalanında ise gelişmemesinin nedeninin bu faktörler olduğu düşünülmektedir (8).

Anne sütünü daha uzun süre alan çocuklarda ÇH gelişme riski azalmakta ve anne sütüne devam ederken gluten içeren ek gıdalara başlanmasının yine ÇH riskini %52 oranında azalttığı bildirilmektedir (20). European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) tarafından, 4-7. aylar arasında anne sütü ile beslenmenin yanı sıra, bebeğin az miktarda glutenli gıdalar ile tanıştırılmasının, ÇH ortaya çıkışını geciktirebileceği bildirilmiştir (21). Gluten içeren ek besinler üç aylıktan önce başlanan bebeklerde ÇH gelişme riski, daha geç başlanana göre 5 kat artmaktadır (22). ÇH patogeneğinde anne sütünün koruyucu rolünün mekanizması net değildir. Anne sütünün immün-modülatör ve gastrointestinal enfeksiyonlara karşı koruyucu etkilerinin yanı sıra gluteni dilue ederek etki ettiği de düşünülmektedir (23).

Çocukluk çağında viral gastroenteritlerin (rotavirüs, adenovirüs, enterovirüs) yanı sıra Campylobacter jejuni, Giardia lamblia gibi etkenlere bağlı gastroenteritler sık görülmektedir (24). Gastrointestinal sistem enfeksiyonları intestinal mukozanın permeabilitesini artırıp sitokin dengesini değiştirerek, besinlere ait bazı antijenlerle beraber gluten peptidlerinin de penetrasyonunu artırır. Ayrıca enfeksiyonlar sonucunda tTG (tissue transglutaminaz) ekspresyonu artar ve gliadin peptidlerini deamine ederek ÇH patogeneğinde önemli rol oynayan TH1 (T helper 1) immün yanıt tetiklenir (3,24). Böylece genetik yatkınlığı olan bireylerde ÇH için bir risk faktörü oluşturur.

Buna karşılık bozuk hijyenik koşullar, bağırsak flora değişiklikleri, enfeksiyonlar ve diyet farklılıkları immün fonksiyonun modülasyonu etkisinin matürasyonuna katkıda bulunarak ÇH gelişmesinde koruyucu etkisinin olabileceği ileri sürülmüştür (25).

2.1.4.3.Genetik Faktörler,

Çölyak hastalığı multigenik bir hastalıktır ve major histokompatibilite kompleksindeki (MHC) HLA sınıf 2D genleri ile arasında kuvvetli ilişki gösterilmiştir (3). Kromozom 6p21.3'de lokalize olan, ÇH ile ilişkili en önemli HLA-DQ molekülüleri DQ2 ve DQ8'dir. HLA-DQ2 çölyak hastalarının %90-95'inde saptanır. HLA-DQ2'nin HLA-DQ2.5 subtipi (HLA-DQA1* 0501 ve HLA-DQB1* 0201 allellerinde kodlanır) ve HLA-DQ2.2 subtipi (HLA-DQA1* 0201 ve HLA-DQB1* 0202 allellerinde kodlanır) bulunmaktadır ve HLA-DQ2.5 subtipi ÇH'de daha sık görülür. HLA-DQ2.5 homozigot olan hastaların heterozigot olanlara göre ÇH gelişmesi açısından 5 kat riskli olduğu saptanmıştır (26). Aynı şekilde homozigot olanların refrakter çölyak hastalığı (RÇH) ve bununla ilişkili intestinal lenfoma gelişmesi açısından da risk taşıdığı belirtilmiştir (27). Toplumda HLA-DQ2'yi kodlayan alleller %25 oranında saptanmasına rağmen bunların %4'ünde ÇH gelişmektedir (28). Çölyak hastalarının %5-10'unda HLA DQ8 saptanır (HLA-DQA1* 0301 ve HLA-DQB1* 0302 allellerinde kodlanır). Çölyak hastalığı gelişmesinde rol oynayan genetik risk faktörlerinin %40'undan bu genler sorumludur ancak hastaların az bir kısmında (%1) iki genin de negatif olabileceği unutulmamalıdır (8,16).

HLA ile ilişkili olmayan immün fonksiyona sahip proteinleri kodlayan, otoimmün hastalıkların patogeneğinde rol oynayan birçok gen de ÇH için risk oluşturmaktadır. Bu genlerin hastalığın genetiğine katkısı %3-4 olarak tahmin edilmektedir (29). CTLA4 (Sitotoksik T lenfosit antijen 4) geni (T hücre aktivitesini baskılayan bir reseptörü kodlar), IL 2 geni (T hücre için büyüme faktörünü kodlar), IL21 geni (B, T ve NK hücre fonksiyonları için gerekli sitokinleri kodlar), RGS1 geni (Regülatör G-protein sinyal 1-hücreler arası iletişimde görev alan, intraepitelyal lenfositlerde ifade edilen proteinleri kodlar), IL1R1, IL18R1, IL18RAP genleri (ÇH'larında intestinal mukozada interferon- γ yapımını indükleyen IL18 reseptörünü kodlar), CCR1, CCR3, CCR2, CCR5 genleri (kemokin reseptörlerini kodlar), IL12A geni (TH1 hücre farklılaşmasını sağlayan IL12 sitokinini kodlar) çölyak hastalığına duyarlılığa neden olan genlerin bazılarıdır (30-32).

2.1.4.3. Gluten

Gluten; buğday, arpa ve çavdarda bulunan bir protein olup, glutenin ve gliadin polipeptidlerinden meydana gelir. Gliadin monomerik yapıdadır ve α , γ , ω gliadine (250-300 aminoasit sıralı) bölünür. Glutenin büyük polimerik yapıdadır, büyük molekül ağırlıklı (650-800 aminoasit sıralı) ve düşük molekül ağırlıklı glutenin (270-330 aminoasit sıralı) polipeptidlerine ayrılır. Glutene karşı spesifik T hücre cevabının oluşumu ile ilgili birçok mekanizma ileri sürülmektedir. Gluten ile patojen veya besin antijenleri arasındaki moleküler benzerliğin immün cevabı tetikleyerek, ÇH'ye neden olabileceği tahmin edilmektedir. Adenovirus tip 12 E1B proteini, Candida albicans hücre duvarı proteini gliadin peptidleri ile benzer aminoasit dizileri içermektedir. Fakat bu patojenlerin ÇH için tetikleyici faktör olup olmadığı kanıtlanamamıştır (33).

Gluten alkolde çözülebilen prolamin kısmıyla hastalığa yol açar. Buğday gluteninde, arpa hordeininde ve çavdar sekalinde bulunan glutamin ve prolinde zengin peptid sekansları gluten toksisitesinden sorumludur. Yulafta bulunan avenin, az miktarda prolin içermesi nedeni ile ÇH'ye neden olan peptid dizisinden fakirdir. Çölyak hastalığına neden olan tahılların toksisitesi tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Çölyak hastalığında tahılların toksisitesi .

Tahıl	Prolamin	İçerik	Toksisite
Buğday	Gliadin	%36 G; %17-33 P	+++
Arpa	Hordein	%36 G; %17-33 P	++
Çavdar	Sekalin	%36 G; %17-33 P	+++
Yulaf	Avenin	Yüksek G; düşük P	
Mısır	Zein	Düşük G	
Pirinç	?	Düşük G	

G: glutamin, P: prolin

Gastrointestinal sistemde pankreatik, gastrik ve ince barsak fırçamsı kenar enzimlerinde prolin endopeptidaz (PEP) aktivitesi olmaması nedeni ile prolin içeriği yüksek olan gluten, bu enzimlerce tamamen sindirilemez ve 10-50 aminoasitlik

peptid parçaları intestinal lümende kalır. Glutamin içeriği yüksek olan bu peptid parçaları, doku transglutaminaz enzimi için iyi bir substrat oluşturur (34).

2.1.4.4.Glutene Bağlı Gastrointestinal Hasarın Mekanizması

Gluten bağırsak geçirgenliğini arttırarak antijenik özelliği olan gluten proteinleri bağırsak duvarında immünolojik reaksiyonları başlatır. Transglutaminaz 2, gluten proteinlerini deamine ederek bu peptidlerin CD4⁺ T lenfositlerine sunulmasını sağlar ve CD4⁺ T lenfositlerini aktive eder. Ayrıca gluten, intestinal epitel içinde bulunan lenfositleri aktive ederek enterosit hasarına neden olur.

2.1.4.4.1.Bağırsak Geçirgenliğinde Artış

Fizyolojik koşullarda bağırsak epiteli makromoleküllere geçirgen değildir. Sıvıların, makromoleküllerin, lökositlerin kan dolaşımı ve intestinal lümen arasındaki karşılıklı hareketinden, *tight junction*ların düzenlenmesinde rol oynayan zonulin isimli bir proteinin sorumlu olduğu düşünülmektedir (23). Gliadinin CXCR3 kemokin reseptörlerine bağlanması sonucunda intestinal hücrelerden zonulin salınarak protein kinaz C aktivasyonu gerçekleşir ve hücre içi aktin filamentlerinin polimerizasyonu artar. Bu etkileşimler *tigh junction* fonksiyon bozukluğuna neden olarak, bağırsak epitel geçirgenliğini arttırır (35). Bu geçirgenlik artışını takiben, genetik yatkınlığı olan insanlarda antijenik özellik taşıyan gluten ve/veya peptidler intestinal bariyeri aşarak, bağırsak duvarında bulunan antijen sunan hücrelerin yanı sıra T hücreleri, NK hücreleri, B lenfositler ve plazma hücreleri ile karşılaşarak immünolojik reaksiyonların oluşmasına zemin hazırlar.

2.1.4.4.2.Transglutaminaz 2 ve CD4⁺ T Hücre Aktivasyonu

Transglutaminaz 2 (TG2) hücre sitoplazmasında ve hücre dışında bulunan çok fonksiyonlu bir proteindir. Sitoplazmada inaktif formda olan enzim mekanik veya inflamatuvar etki ile hücre dışına salınarak aktif hale geçer. Proteinlerin birbirlerine bağlanmasını katalize ederek doku tamirinde, granülasyon dokusunun oluşumunda, angiogeneze ve tümör büyümesinde rol oynar (4,36). Transforming growth factor- β (TGF β), tümör nekrozis faktör- α (TNF α), IL-6, retinoidler ve kortikosteroidler TG2 ekspresyonunu arttırır (4). Transglutaminaz 2, kalsiyuma bağımlı olarak

transaminasyon ve deaminasyon reaksiyonlarında görev alır ve spesifik glutamin rezidülerini (Gln-X-Pro dizisi) içeren gluten proteinlerini deamine ederek ÇH patogenezinde önemli bir rol oynar (37). Deaminasyon işlemi sonrasında nötral glutamin, negatif yüklü glutamik aside dönüşür ve negatif yüklü bölgeleri olan HLA-DQ2 ve HLA-DQ8 ile bağlanabilir hale gelir. Antijen sunan hücre (APC)'lerin yüzeyinde ifade edilen HLA-DQ2 ve HLA-DQ8'e bağlanan gluten peptidleri CD4⁺ T hücrelere sunulur. Glutenin deaminasyonu, gluten spesifik T hücre yanıtı ve ÇH'nin gelişimi için en kritik reaksiyondur.

Gluten spesifik CD4⁺ T hücreleri, intraepitelyal sitotoksik T hücrelerinin doku hasarı oluşturabilmesi için, pro-inflamatuar sitokin olan interferon- γ (IFN γ) ve IL-21'i salgılayarak uygun inflammatuar ortamı hazırlar (37). Salınan IFN γ , HLA DQ molekülünün ekspresyonunu arttırarak daha fazla gluten peptidinin APC'ye sunulmasını sağlar. CD4⁺ T hücreler, B hücrelerini uyararak gluten ve TG2'ye özgü spesifik IgA ve IgG antikorları üreten plazma hücrelerine dönüşmesine yardımcı olur (38). Bu antikorlar glutenin bağırsak lümeninden lamina propriaya taşınmasını sağlamanın yanı sıra gluten spesifik CD4⁺ T hücre cevabını daha da uyararak bağırsak hasarının artmasına neden olur. Bağırsak hasarı arttıkça, hücre içinde bulunan TG2 hücre dışına salınarak daha fazla gliadin deaminasyonu gerçekleşir ve bu reaksiyon zinciri kısır döngü halinde intestinal hasara sebep olur. Gluten, MHC molekülünden bağımsız olarak lamina propiadaki CD8 T hücre cevabını uyararak ve direkt sitotoksik etki ile bağırsak epitel hücrelerinde hasara neden olur (39).

2.1.4.4.3. İntestinal Dendritik Hücreler

İmmün yanıtın düzenlemesinde önemli görevi olan dentritik hücreler (DC) deri, burun mukozası, solunum ve gastrointestinal sistem gibi vücudun dışa açılan bölgelerinde bulunur. Antijenleri tanımada, bunların işlenip T hücrelerine sunulmasında ve T hücrelerinin aktivasyonunda, immün toleransın gelişmesinde ve devamında, B lenfositlerin uyarılmasında görev alırlar (40). Gastrointestinal sistemde dendritik hücreler, epitelial *tigh junction*'ların arasından gönderdiği uzantılar yardımı ile intestinal lümende bulunan antijenleri yakalar ve intraepitelial lenfosit infiltrasyonunu sağlayarak doğal immün yanıtı; gluten spesifik CD4⁺ T hücre cevabını indükleyerek edinsel immün yanıtı destekler (41). İmmatür DC'de MHC

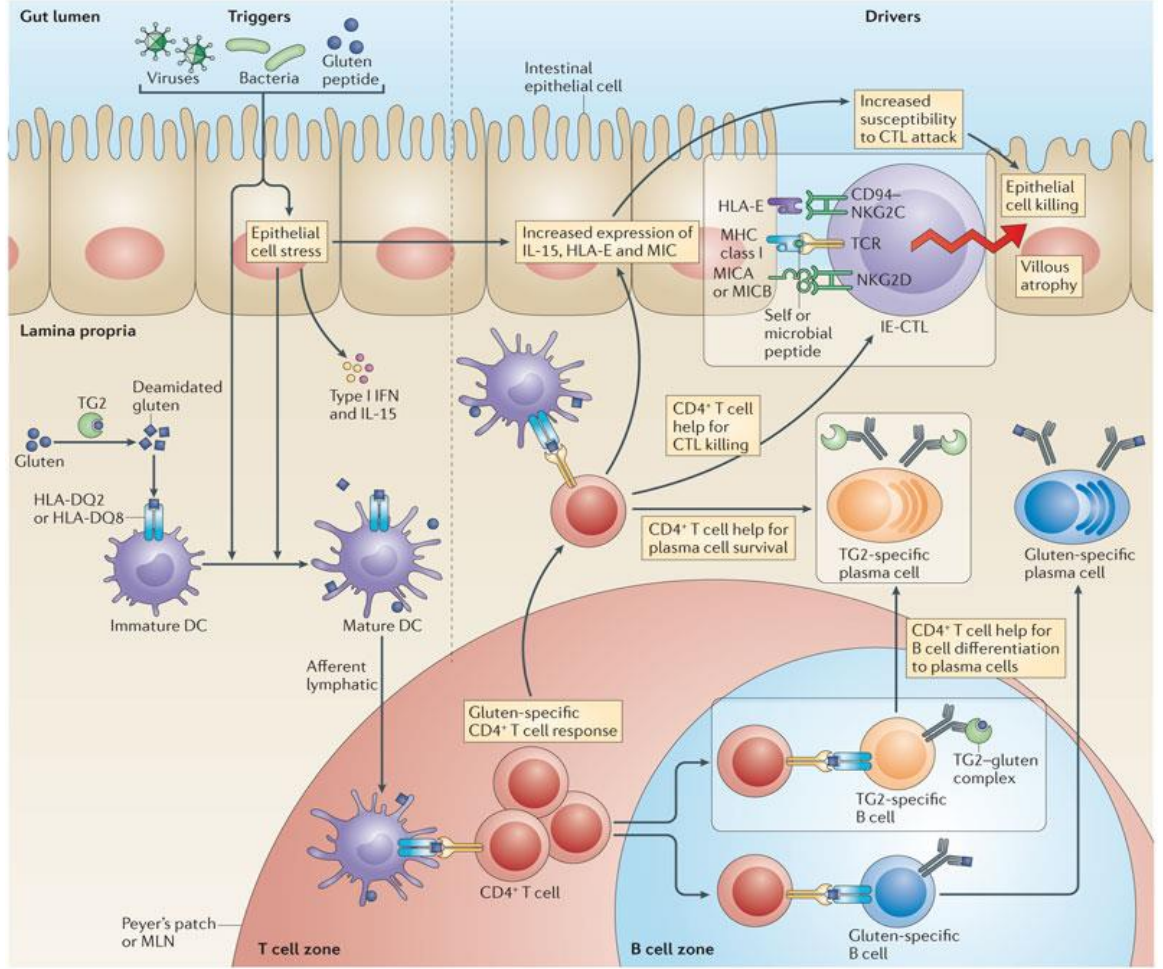
sınıf 2 ekspresyonu ve stimulator moleküller düşük seviyede bulunur. T regulator (Treg) hücrelerden salınan IL10 DC'lerin fonksiyonunu değiştirir ve farklılaşmasını engelleyerek immün toleransa neden olur (42). Dentritik hücrelerden kaynaklanan sinyallerin bu şekilde baskılanması gluten spesifik T hücre cevabının da oluşmasına engeldir.

2.1.4.4.4. Enterositler ve İntra-epitelyal Lenfositler

Gliadin peptidleri enterositlerden, DC'lerden ve diğer APC'lerden IL-15 salınımını indükler. Enterositleri en fazla uyaran gluten peptidi α -gliadin 31-43'dür. Gliadin peptid, APC'lerden IL15 salınımını artırır, İEL'leri aktive eder, stresle uyarılan MHC sınıf I polipeptidi ile ilişkili molekülün (MIC) ekspresyonunu artar, epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) ekspresyonunu ve aktivasyonunu artırır (37). Alfa-gliadin 31-43 peptidi dışında da doğal immün sistemi indükleyerek intestinal hasara neden olan çeşitli peptidler bulunmaktadır (43).

İntestinal epitel içinde bulunan lenfositlerin (İEL) büyük kısmını natural killer (NK) hücreleri ve ÇH için spesifik olan TCR $\alpha\beta$ (CD4⁺, CD8⁺) T hücreleri, TCR $\gamma\delta$ (CD4⁻, CD8⁻) T hücreleri oluşturur. İEL'ler dolaşımda bulunan T hücrelerinden farklı NK hücre reseptörleri eksprese eder ve bu reseptörler stresli durumlarda T hücre aktivasyon eşiğini düşürerek, T hücre stimülasyonuna neden olur. Sağlıklı insanlardan elde edilen İEL'ler daha çok inhibitör etkisi olan CD94/NKG2A reseptörünü eksprese ederken, çölyak hastalarında ise aktivasyon sağlayan CD94/NKG2C ve NKG2D eksprese edilir. Çölyak hastalarında, gluten peptidlerinin etkisiyle enterosit yüzeyinde CD94/NKG2C ve NKG2D için ligand olan MIC ve HLA-E ekspresyonu artar. Bu reseptörler ile ligandların etkileşimi sonucunda artan IFN γ üretimi enterosit hasarına ve villöz atrofiye neden olur (4,36). İntraepitelyal lenfositlerde aktive edici NK hücre reseptörlerinin ekspresyonunu arttıran önemli faktörlerden biri de enterositlerden ve makrofajlardan gliadin indüksiyonu ile salınan IL15'tir. T hücre aktivasyonu için anahtar bir sitokin olan IL15, enterosit yüzeyinde MIC aktivasyonu ve İEL'de NKG2D reseptörlerinin ekspresyonunu arttırmanın yanı sıra enterositlerde apoptoz molekülü olan FAS ekspresyonunu arttırarak kript proliferasyonunu uyarır (4,33,44).

Gluten spesifik CD4⁺ T hücreleri lamina propiada inflamatuvar yanıtta sorumlu iken, İEL'ler T hücre reseptör sinyali gerekmeden İEL'ler aktive NK hücre reseptörleri sayesinde doku hasarına neden olurlar. ÇH'de bağırsak mukozasında gliadine bağlı meydana gelen immünolojik aktivasyon ve intestinal hasar şekil 1'de özetlenmiştir.



Nature Reviews | Immunology

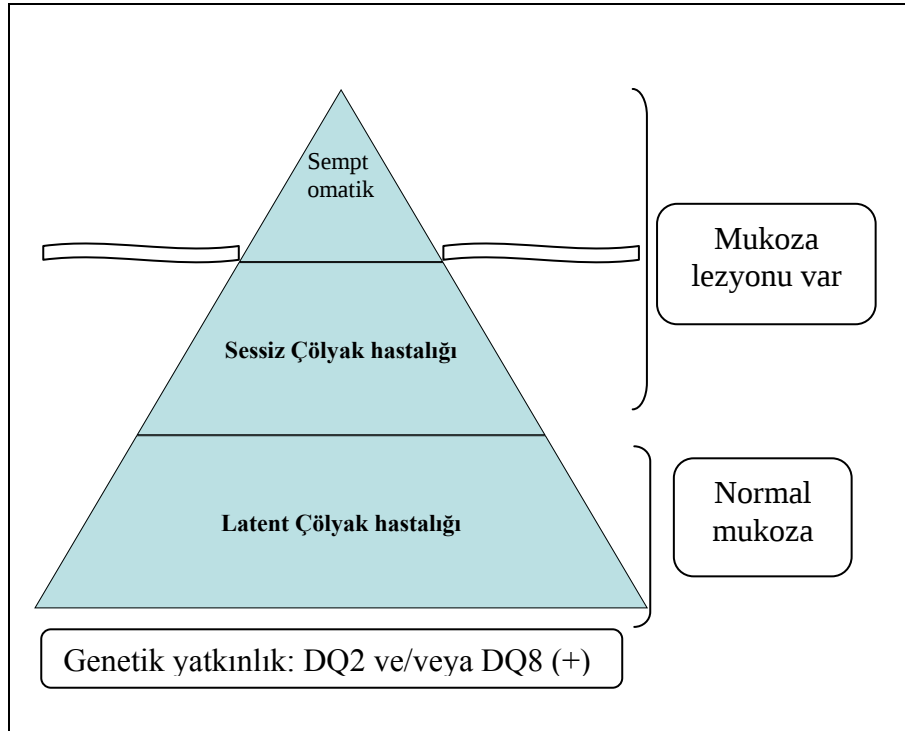
Şekil 1: Gliadin ile tetiklenen intestinal hasarın immünolojik mekanizması (45)

CD94: cluster differentiation 94, NKG2C: natural killer grup 2 member C reseptörü, NKG2D: natural killer grup 2 member D reseptörü, TCR: T hücre reseptörü, HLA-E: human lökosit antijen-E, MHC: major histocompatibility complex, MICA: MHC sınıf 1 polipeptid ile ilgili molekül A, MICB: MHC sınıf 1 polipeptid ile ilgili molekül B, IE-CTL: intraepitelyal sitotoksik T lenfosit, IL-15: interlökin 15, TG-2: transglutaminaz 2, HLA-DQ2: human lökosit antijen DQ2, HLA-DQ8: human lökosit antijen DQ8, DC: dendritik hücre, IFN: interferon, MLN: mezenterik lenf nodu

2.1.5.Klinik Bulgular

Çölyak hastalığı tipik olarak, çocuklarda erken çocukluk dönemi olan 2 yaş civarında ve erişkin dönemde 40 yaş civarında tepe yapar. Tipik klinik tablo, 6-24 ay arası çocuklarda iştahsızlık, kronik ishal, kusma, karın ağrısı, abdominal distansiyon, büyüme geriliği gibi gastrointestinal sistem semptomlarıyla ortaya çıkar. Semptomlar glutenli gıdaları almaya başladıktan sonra değişik zaman dilimlerinde ortaya çıkabilir. Erken çocukluk döneminde şiddetli sulu ishal, karın şişliği, dehidratasyon, hipotansiyon, letarji ve hipokaleminin belirgin olduğu elektrolit değişiklikleri ile karakterize “çölyak krizi” gelişebilir. Bu klinik tabloya günümüzde daha az rastlanmaktadır.

Çölyak hastalığına ait semptomların çoğu besinlerin ve vitaminlerin malabsorbsiyonu sonucu gelişir. Semptomların şiddeti mukozal lezyonların ağırlığı ile orantılı değildir. Total villöz atrofi olan hasta asemptomatik olabileceği gibi, demir eksikliği anemisi, kas krampları gibi spesifik olmayan semptomlarla da gelebilir. Hastaların büyük bir kısmının asemptomatik (sessiz çölyak) olması veya atipik bulgular göstermesi nedeni ile tanı konulamadığı için Buzdağı Model Teorisi (şekil 2) geliştirilmiştir (46).



Şekil 2. Çölyak hastalığı buzdağı.

Çölyak hastalığı semptomatik (aktif), sessiz ve latent olmak üzere 3 klinik tipe ayrılır (Tablo 2). Semptomatik olan hastalar gastrointestinal sistem (GİS) bulgularının görüldüğü klasik bir tablo veya GİS dışı bulguların ön planda olduğu atipik bir tablo ile karşımıza gelebilir.

Tablo 2. Çölyak hastalığında klinik sınıflama

Semptomatik, aktif form

Klinik bulgular (+), seroloji (+), biyopsi tanısal

- Tipik (klasik) GİS bulguları
- GİS dışı atipik bulgular

Sessiz (silent) form

Seroloji (+), biyopsi tanısal

- Klinik bulgular yok

Latent form

- Klinik bulgular yok, seroloji (+)
 - Mukoza normal (ilerisi için riskli)
-

2.1.5.1. Gastrointestinal Sistem Dışı Bulgular:

Yeni tanı alan çocukluk çağındaki ÇH'lerin %50'si, erişkin hastaların 2/3'ü tipik gastrointestinal semptomlarla belirti vermemektedir (5). Gastrointestinal sistem bulguları ile başvuran çocukların çoğu tekrarlayan karın ağrısı, ishal veya kabızlık gibi hafif semptomlarla başvurmaktadır (8). Kanada'da yapılan bir çalışmada 1995 yılından önce ÇH tanısı alan hastaların yaş ortalaması 5.3 yıl iken, 1995 sonrası 8.7 yıla çıktığı ve son yıllarda tanı alan çocukların çoğunun GİS dışı bulgularla başvurduğu saptanmıştır (47). Çölyak hastalığı olan çocuklarda başvuru semptomlarının zaman içinde değişmesinin, hastalığın klinik bulgularının değişmesinden mi yoksa GİS dışı bulguların klinisyenler tarafından daha iyi tanınmasından mı kaynaklandığı tartışmalıdır (8).

Çölyak hastalığında görülen GİS dışı bulgular aşağıdaki gibi özetlenebilir:

Demir eksikliği anemisi: Oral demir tedavisine dirençli demir eksikliği anemisi en sık karşılaşılan GİS dışı semptomudur ve sıklıkla başlangıç semptomu olarak karşımıza çıkar. Erişkinlerde nedeni bilinmeyen demir eksikliği anemisi olan hastalarda ÇH prevalansı %4.7-14.6 (48), tedaviye dirençli demir eksikliği anemisi

olanlarda ise %13.7-20 arasında saptanmıştır (49). Demir eksikliği anemisi olan çocuklarda ÇH prevelansını araştıran çalışmaların sayısı çok azdır. Ülkemizde yapılmış bir çalışmada demir eksikliği anemisi olan çocuklarda ÇH sıklığı %4.4 olarak bulunmuştur ve literatürde %15'e kadar varan oranlar bildirilmiştir (50).

Boy kısalığı: Çölyak hastalığında tek klinik bulgu boy kısalığı olabilir. İdiyopatik boy kısalığı tanısı ile tetkik edilen çocukların %2-8'inde ÇH ile ilişkili serolojik testler pozitif saptanmıştır. Boy kısalığı olan hastalarda, konstitüsyonel boy kısalığı ve endokrinolojik sebepler dışlandıktan sonra ÇH sıklığı 2-4 kat artmaktadır (51). Çölyak hastalığında boy uzama ve tartı alım hızında azalma, büyüme eğrisinde duraklama veya gerileme saptanır. Ülkemizde literatürle uyumlu olarak çocuklarda boy kısalığı etyolojisine yönelik yapılmış çalışmalarda erkeklerde yapısal, kızlarda ise ailevi boy kısalıklarının ön planda olduğu saptanmıştır. Demirel ve ark.nın (52) 2005 yılında yaptığı çalışmada ülkemizde patolojik boy kısalığının %30'a yakın oranda olduğu saptanmış ve bunun %10'nunun büyüme hormonu eksikliği, %6.5'unun çölyak hastalığına bağlı olduğu tespit edilmiştir.

Sebebi açıklanamayan transaminaz yüksekliği veya kronik hepatit: Sebebi bilinmeyen karaciğer enzim yüksekliği bulunan hastaların yaklaşık %10'unda sessiz ÇH olduğu gösterilmiş (53), yeni tanı alan çölyak hastalarının %15-55'inde ise serum aminotransferazlarında yükseklik saptanmıştır (54). Bunların çoğunda non-spesifik reaktif hepatit (çölyak hepatit) saptanmaktadır ve glutensiz diyet tedavisi sonrasında hasar geriye dönmektedir. Vakaların çok az bir kısmında ciddi karaciğer hasarı ve siroz gelişip transplantasyon gerekebilir. Literatürde transplantasyon gerektirecek ciddi karaciğer hasarı olan, ÇH tanısı konulduktan sonra glutensiz diyet tedavisi ile karaciğer fonksiyonları düzelen vakalar bildirilmektedir (55). Çölyak hastalığı ile birlikte primer sklerozan kolanjit (%2-3), primer biliyer siroz (%3-7), otoimmün hepatit (%3-6) gibi otoimmün kronik karaciğer hastalıkları da görülebilmektedir (54,55). Nedeni bilinmeyen hepatik transaminaz yüksekliği olan veya nedeni bilinmeyen kronik karaciğer hastalığı olan vakaların ayırıcı tanısında çölyak hastalığı unutulmamalı ve serolojik testler ile tarama yapılmalıdır (56).

Osteopeni, osteoartrit: Yeni tanı alan ÇH'lerin çoğunda kemik mineral kaybı görülmektedir ve bu durum osteopeni, osteoporoz ve spontan/tekrarlayan kemik kırıkları için risk oluşturmaktadır (56). Ülkemizde yapılmış bir çalışmada yeni tanı

alan çölyak hastalarında kemik mineral yoğunluğu ölçüldüğünde tedavi alanlara ve kontrol grubuna göre tedavisiz ÇH’de kemik mineral yoğunluğunun düşük olduğu saptanmıştır. Bir yıllık glutensiz diyet tedavisi sonrasında kemik mineral yoğunluğunun normal sınırlara geldiği görülmüştür (57). Büyümenin hızlı olduğu çocukluk çağında özellikle adolosan dönemde kemik dokusunda mineral döngüsü çok hızlıdır ve bu dönemde kemik yoğunluğu zirve yapar. Bu nedenle çocukluk çağında ÇH’nin erken tanısı ve tedavisi hastaların osteopeniden korunması açısından önem taşır.

Dermatitis herpetiformis: Ekstremitelerin fleksör yüzünde, kafa derisi, kalça, dirsek, ense ve dizlerde görülen simetrik, kaşıntılı, papüloveziküler, eritematöz deri lezyonlarıdır. Deri biyopsisinde derma-epidermal bileşkede epidermal TG2’yi gösteren, granüler IgA depolanması saptanır. Glutensiz diyet sonrası genellikle 1-3 ay içinde lezyonlar geriler fakat bazı vakalarda 1-2 yıla kadar uzayabilir. Kaşıntının ve kızarıklığın çabuk gerilemesi için tedaviye antimikrobiyal etkisi olan dapson da eklenebilir (8,56,58).

Artrit, artralji: Akut, erozif olmayan ve glutensiz diyet ile düzelen artrit görülebilir (59).

Nörolojik sorunlar: Erişkinler ÇH’de idiyopatik serebellar ataksi, tedaviye dirençli epilepsi, oksipital kalsifikasyonlar, fokal beyaz madde lezyonları, kas hipotonisi, felç, ciddi ataksi, periferik nöropati gibi klinik bulgular görülebilir (3). Çocuklarda ise ÇH bu gibi ciddi nörolojik bulgular saptanmamakla beraber baş ağrısı, gelişimsel gerilik, hipotoni gibi daha hafif nörolojik bulgularla birliktelik bildirilmektedir (8). Çölyak hastalığı tanısı alan çocuklarda kronik baş ağrısının sağlıklı çocuklara göre 3.2 kat daha sık olduğu saptanmış ve baş ağrısı olan çölyak hastalarında diyet tedavisi sonrasında, olguların %77.3’ünde semptomların gerilediği görülmüştür (60).

Psikiatrik bozukluklar: Erişkinlerde çölyak hastalarında yapılan çalışmalarda sağlıklı gruba oranla otizm, hiperaktivite, depresyon, anksiyete gibi GİS dışı semptomların daha sık görüldüğü ve diyet tedavisi sonrasında bulguların gerilediği bildirilmektedir (8,59). Çocuk ÇH’de ise psikiatrik tanımlanmış vakalar bulunmamaktadır ve otizm ile ÇH arasında ilişki saptanmamıştır (61,62).

Jinekolojik sorunlar: Gecikmiş menarş, erken menapoz, amenore, infertilite, tekrarlayan düşükler, intrauterin büyüme geriliği, prematürite gibi fertilite ve hamilelikle ilgili sorunlara neden olabilir (44).

Diğer: Vitamin K eksikliği, trombositoz, foliküler keratoz, alopesi, dental enamel defektler, tekrarlayan aftöz stomatit.

2.1.5.2.Çölyak Hastalığı ile İlişkisi Olan Hastalıklar

Bazı otoimmün hastalıklar ve genetik sendromlar, normal popülasyona göre daha sık oranda ÇH ile birliktelik göstermektedir (3). Çölyak hastalığının daha yüksek sıklıkta görüldüğü bu hastalıkların bilinmesi, ÇH tanısının daha erken konulmasında yardımcı olabilir. Çölyak hastalığı ile birlikte görülen hastalıklar tablo 3’de özetlenmiştir.

Tablo 3: Çölyak hastalığı ile birliktelik gösteren hastalıklar.

Birlikteliği kesin olanlar	Birlikteliği muhtemel olanlar
Dermatitis Herpetiformis	Konjenital kalp hastalıkları
Ig A eksikliği	Tekrarlayan perikardit
Tip I diyabet	Sarkoidoz
Otoimmün tiroid hastalıkları	Kistik fibroz
Sjögren sendromu	Pulmoner hemosiderozis
Mikroskobik kolit	İBH, SLE
Romatoid artrit	Otoimmün hepatit
Down sendromu	Primer biliyer siroz
Ig A nefropatisi	Addison hastalığı

2.1.5.2.1.Tip 1 Diyabet

Çölyak hastalığı ile beraberlik gösteren hastalıklar arasında en çok araştırılanlardan birisi Tip 1 diyabettir. Tip 1 diyabet tanılı hastaların %5-10’unda tTG (Tissue transglutaminaz) antikorları pozitifdir ve bunların %75’inin ince bağırsak

biyopsilerinde patoloji saptanmıştır (63). Çölyak hastalığı için risk faktörü olan HLA-DQ2 ve HLA-DQ8 genotipleri Tip 1 diyabet için de risk faktörü oluşturmaktadır (59). İki hastalığın da oluşmasında genetik ve çevresel faktörler rol oynar. Amerikan Diyabet Derneği, diyabet hastalarına tanı anında ve ÇH ile ilgili semptom görüldüğünde, çölyak serolojisinin bakılmasını önermektedir (64). ÇH tanısı konulan Tip 1 diyabeti olan hastalarda, glutensiz diyet tedavisi sonrasında GİS semptomlarında, antropometrik ölçümlerde, diyabetin kontrolünde iyileşme, hipoglisemi ataklarında azalma görülmüştür (65,66)

2.1.5.2.2.Otoimmün Tiroid Hastalıkları

Çölyak hastalığında görülen genetik risk faktörleri, otoimmün tiroid hastalıklarında da görülür. Otoimmün tiroid hastalığı olan çocukların %7.7'sinde çölyak otoantikörleri pozitif saptanmış olup, başka bir çalışmada ise %2.3'ünde duodenum biyopsisinde villöz atrofi görülmüştür (67). Otoimmün tiroid hastaları pubertal gelişim ve büyüme yönünden takip edilerek herhangi bir duraklama/gerileme saptandığında veya ÇH düşündürecek klinik bulgular tabloya eklendiğinde çölyak serolojisine bakılması önerilmektedir (68). Fakat tedavi alan çölyak hastalarına semptom olmadığı sürece otoimmün tiroid hastalıkları açısından rutin tarama önerilmemektedir (8).

2.1.5.2.3.Genetik Bozukluklar

Bazı sendromlar ile ÇH arasında birliktelik bulunmaktadır. Çalışmalarda Turner sendromlu hastalarda ÇH prevelansı %4.5-8.1 arasında değiştiği bildirilmektedir (69). Bu hastaların izleminde 4 yaşından sonra 2-5 yıl aralar ile çölyak serolojisine bakılması önerilmektedir (70). Down sendrom olan hastalarda ÇH prevelansının %4-18 gibi sık bir değer bildirildiğinden bu hastaların izleminde 2-3 yıl ara ile çölyak serolojisine bakılması önerilmektedir (71).

2.1.5.2.4.Selektif IgA Eksikliği

Selektif IgA eksikliği toplumda 1/300-1/600 sıklıkta görülmektedir (72). Çölyak hastalarında ise 1/39 oranında görülmektedir ve bu oran genel popülasyona göre 7-15 kat daha fazladır (73). ÇH tanısında kullanılan IgA sınıfı otoantikörler nedeniyle bu

sıklık dikkate alınmalı ve yalnız negatif sonuçlar almamak için tarama yapılan hastaların IgA düzeyine de bakılmalıdır.

2.1.6.Tanı

2.1.6.1.Serolojik Testler

Çölyak hastalığının tanısında en önemli adım, farklı klinik bulgulara neden olabilen çölyak hastalığından şüphelenilerek tarama testlerinin yapılmasıdır. Histopatolojik inceleme tanı için altın standart olmakla birlikte, serolojik testler asemptomatik olup, ÇH açısından yüksek risk taşıyan bireylerin (birinci derecede akrabalarında çölyak hastalığı olanlar, otoimmün hastalık öyküsü olanlar, Tip 1 diyabet tanılı hastalar) saptanmasına yönelik önemli tarama araçlarıdır (8,74). Çölyak otoantikörlerinin taranması gereken durumlar şunlardır:

- 1- Çölyak hastalığını düşündüren bulgu ve semptomları olanlarda (malabsorbsiyon, büyüme geriliği, kronik diyare, tedaviye dirençli demir eksikliği anemisi, vitamin-mineral eksikliklerine ait klinik bulgular, osteoporoz-osteopeni, gecikmiş puberte, infertilite gibi)
- 2- Çölyak hastalığı için yüksek risk taşıyan hastalık gruplarında (Tip 1 diyabet, birinci derece akrabada çölyak hastalığı olanlar, otoimmün tiroidit, Down sendromu, Turner sendromu, selektif IgA eksikliği)
- 3- Glutensiz diyet tedavisi alanlarda diyete uyumun değerlendirmesi amacıyla.

2.1.6.1.1.Anti-gliadin Antikorları:

Anti-gliadin antikorları ilk kez 1958 yılında tanımlandı (75). Antigliadin (AGA) IgA ve IgG antikorları düşük özgüllük (spesifisite) ve duyarlılığa (sensitivite) sahip olduklarından günümüzde tarama testi olarak kullanımları azalmaktadır. AGA IgA ve IgG'nin duyarlılığı %80-90 arasında değişmektedir (74). AGA IgA'nın özgüllüğü %92-97 arasındayken, AGA IgG'nin özgüllüğü %50 civarında olup oldukça düşük bir değerdedir (76). Ancak iki yaş altı hastalarda yapılan bir çalışmada ÇH tanısında AGA IgA'nın duyarlılığının %97 olduğu, tTG IgA ve EMA IgA'ya (%83) göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (77). Günümüzde de ESPGHAN 2 yaş altı çocuklarda ÇH taraması için AGA antikorlarına bakılmasını, bu antikorlar negatif olsa da ÇH

riski yüksek ise endoskopi yapılmasını önermektedir (21). Ancak AGA IgA ve IgG, GIS'te permeabilitenin arttığı özellikle özofajit, gıda alerjisi, inek sütü intoleransı, ishal, gastrointestinal enfeksiyonlar, gastrit, kistik fibrozis, inflamatuvar bağırsak hastalığı, irritabl bağırsak sendromu gibi durumlarda yalancı pozitif sonuç verebilir (1).

2.1.6.1.2.Anti Endomizyum Antikorları

Endomizyum antikoru (EMA) ilk defa 1983 yılında tanımlandı. Lamina propriada CD4⁺ T lenfosit aktivasyonu ve 'mukozal remodeling' sonucu ortaya çıkan EMA'nın doğruluk oranı mukozal hasarın hafif olduğu durumlarda azalmaktadır (28). Özgüllüğü %100, duyarlılığı %90'ın üzerinde olan EMA, indirekt immünflorosan yöntemiyle bakılır (77). EMA diğer testlere göre daha spesifiktir fakat incelemeyi yapan kişiden kaynaklanan hata riskinin bulunması, zahmetli ve pahalı bir yöntem olması dezavantajlarıdır (78).

2.1.6.1.3.Anti Doku Transglutaminaz Antikorları

Anti doku transglutaminaz (anti-tTG) IgA antikoru, erişkin ve çocuklarda benzer oranlarda yüksek duyarlılık (%92-100) ve özgüllük (%91-100) taşıdığından, günümüzde en güvenilir serolojik testtir. Bu antikorların düzeyi ile duodenumdaki mukozal hasar arasında doğru orantı bulunmaktadır. Serum doku transglutaminazı belirlenen limit değerın üst sınırda olması durumunda, ÇH için pozitif tahmin değeri %75 iken, normalin 10 katı ve üstündeki değerlerde ise pozitif tahmin değeri %96'lara yükseldiği saptanmıştır (79). Yine tTG titresı ile histopatolojik bulguların arasındaki ilişkiyi araştıran başka bir çalışmada anti-tTG IgA'nın total villöz atrofi olan hastalarda duyarlılığı %90 iken, parsiyel villöz atrofi olanlarda ise %42 olduğu bulunmuştur (56,77). Serum tTG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) veya radio-immunoassay (RIA) yöntemiyle bakılan bir test olduğundan maaliyeti daha düşük olup, laboratuvar kaynaklı hata payı da çok daha düşüktür (1,28). Otoimmün hastalıklar, lenfoma, kalp hastalıkları, siroz, enfeksiyon gibi durumlarda da anti-tTG yüksek saptanabilir (8).

Tanı için özgüllüğü ve duyarlılığı en yüksek olan serolojik testler anti-tTG ve EMA aynı zamanda bakılmalıdır (3). Son yıllarda yapılan çalışmalar, EMA veya anti-tTG'den herhangi biri ile değerlendirme yapıldığında, olguların %20'sinde

tanının atlanabileceğini göstermiştir (76). Bu nedenle günümüzde EMA ve anti-tTG'nin birlikte kullanımı önerilmektedir (28).

2.1.6.1.4. Deamine Gliadin Peptidlerine (DPG) Karşı Gelişmiş Antikorlar

Çölyak hastalığının tanısında, son yıllarda doku transglutaminaz enzimi tarafından deamine edilen gliadin peptidlerine bağlanan antikorlar (DGP) bulunmuş ve bunların tespitine dayanan yeni serolojik testler geliştirilmiştir (80). DGP IgG ve IgA, tTG IgA'ya göre daha düşük duyarlılık göstermesine rağmen, DGP IgG çölyak hastalığı için yüksek özgüllük (tTG'den daha yüksek, EMA ile aynı) taşımaktadır. Bu antikorlar IgA eksikliği olan ÇH'lerin tanısında ve özellikle 2 yaşın altındaki hastalarda yüksek duyarlılığa sahiptir (81). Çölyak hastalığı tanısında kullanılan serolojik testlerin güvenilirliği tablo 4'te gösterilmektedir.

Tablo 4: Çölyak hastalığında serolojik testlerin spesifitesi ve sensitivitesi (81)

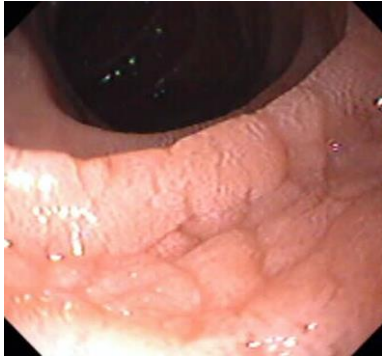
Serolojik testler	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	Tanı değeri
tTG IgA	97	91	98
EMA IgA	94	100	97
AGA IgA	73	87	80
AGA IgG	73	77	75
DGP-AGA IgA	84	90	87
DPG-AGA IgG	84	99	92

Tanı için en duyarlı antikor testleri IgA sınıfı testlerdir. Çölyak hastalarında selektif IgA eksikliği %3 oranındadır. Bu nedenle ÇH şüphesi olan hastalarda, serolojik testler IgA ve IgG beraber istenmeli veya hastada serum IgA düzeyi bakılarak sonuçlar değerlendirilmelidir (82). IgA tipi testler kullanılıyorsa, yanlış negatif sonuçlardan kaçınmak için çölyak hastalığı şüphesi olan tüm hastalarda serum total IgA düzeyi belirlendikten sonra serolojik testler değerlendirilmelidir.

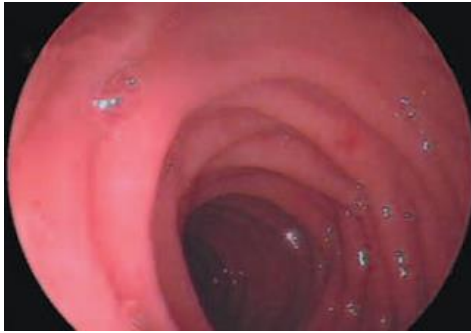
2.1.6.2. Üst Gastrointestinal Sistem Endoskopisi

Çölyak hastalığı şüphesi olan veya serolojik olarak antikor pozitifliği saptanan her hastaya üst GİS endoskopisi yapıp distal duodenum biopsisi alınarak tanı

kesinleştirilebilir veya dışlanabilir. Histopatoloji tanıda altın standarttır. Hastada serolojik testler negatif bile olsa, klinik olarak ÇH şüphesi yüksek ise üst GİS endoskopisi yapılmalıdır (56). Endoskopik olarak duedonal foldlarda silinme, duodenum mukozasında fissür, saban izi veya deniz tarağı görünümü, duodenumda mikronodüler kabarıklıklar olabileceği gibi mukoza tamamen normal de olabilir (şekil 3,4) (83).



Şekil 3: Duodonal foldlarda deniz tarağı görünümü

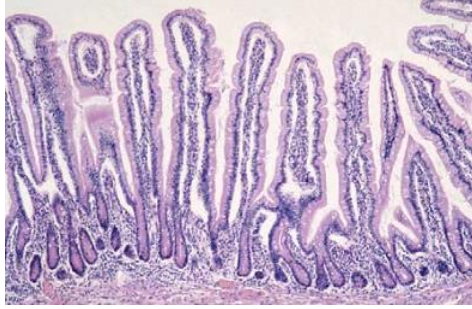


Şekil 4: Duodonal foldlarda silinme

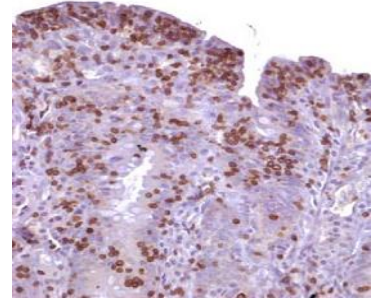
2.1.6.3.Histopatoloji

Çölyak hastalarında histopatolojik değişiklikler diffüz yayılım göstermediği için endoskopi sırasında bulbus ve duodenumun farklı kısımlarından ve olabildiğince distalden çok sayıda biyopsi (4-6 adet) alınmalıdır. Çölyak hastalığında ince bağırsak mukozasının histopatolojik değerlendirilmesi Marsh sınıflamasına göre yapılır (3). Marsh sınıflamasında evre 1 olan erken dönemde villöz yapı normal izlenirken İEL sayısında artma saptanır (>30/100 enterosit). İntraepitelyal lenfosit sayısının artması ÇH için spesifik bir bulgu değildir çünkü akut enfeksiyöz enteropatilerde,

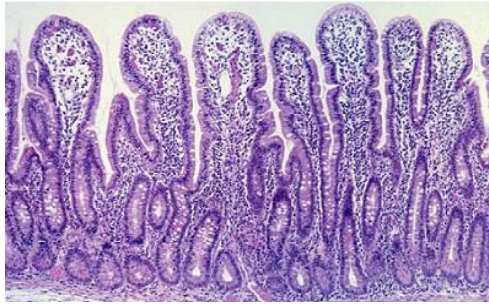
giardiazisde, tropikal spruda, otoimmün hastalıklarda, Crohn hastalığında ve non-steroid antiinflatuar ilaç kullanımına bağlı olarak da İEL artışı saptanabilir (84). Marsh evre 2’de İEL artışının yanında kript hipertrofisi, evre 3’de villöz atrofi, evre 4’de ise total intestinal mukozal hipoplazi/atrofi saptanır (83,85). Tablo 5’te Marsh sınıflaması, şekil 5’te ise evrelere göre histopatolojik değişiklikler gösterilmiştir.



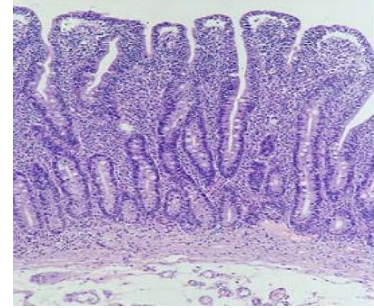
Marsh 1: Lenfositik enterit



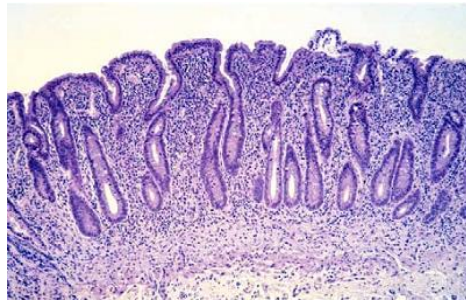
İEL artışı (HE-CD3 boya)



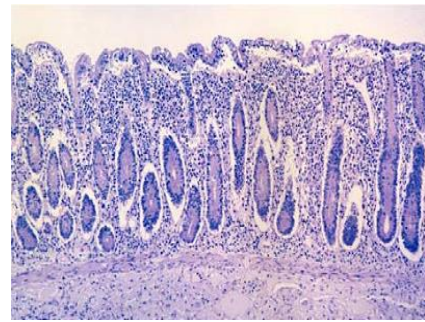
Marsh 2: İEL artışı ve kript hiperplazisi



Marsh 3a: Parsiyel villöz atrofi



Marsh 3b: Subtotal villöz atrofi



Marsh 3c: Total villöz atrofi

Şekil 5. Çölyak hastalığında Marsh sınıflamasına göre histopatolojik değişiklikler (83).

Tablo-5: Çölyak hastalığı histopatolojik değerlendirmesinde kullanılan Marsh sınıflaması (83)

Marsh sınıflaması	Histolojik görünüm
0	Normal
1	İEL artışı (>30/100 enterosit)
2	Kript proliferasyonu ve hipertrofisi
3a	Parsiyel villöz atrofi
3b	Subtotal villöz atrofi
3c	Total villöz atrofi
4	İnce barsak mukozal yapısında hipoplazi

Oberhuber ve ark. (86) 4 evreden oluşan Marsh sınıflamasını 3 evre olarak modifiye etmiştir (modifiye Marsh sınıflaması) ve son yıllarda daha çok bu sınıflama tercih edilmektedir (Tablo 6).

Tablo 6. Çölyak hastalığı histopatolojik değerlendirmesinde kullanılan modifiye Marsh sınıflaması (86).

Histolojik tip	İEL	Kript yapısı	Villus yapısı
0	Normal (<30/100 enterosit)	Normal	Normal
1	Artmış	Normal	Normal
2	Artmış	Hiperplastik	Normal
3a	Artmış	Hiperplastik	Hafif atrofi
3b	Artmış	Hiperplastik	Belirgin atrofi
3c	Artmış	Hiperplastik	Total atrofi

Histopatolojik incelemede, değerlendiren kişinin tecrübesi, hastalığın yama tarzı tutulum göstermesi, düşük dereceli lezyon (Marsh 1 veya 2) ve teknik yetersizlik nedeni ile yanlış pozitif veya negatif sonuçlar alınabilir. Çölyak hastalığını düşündüren semptomları olup, seronegatif olan hastalarda histopatolojik olarak Marsh 1 veya 2 lezyon saptanması durumunda klinik olarak hastada kuvvetle ÇH

düşünülyorsa ya HLA doku tip incelemesi veya bir süre sonra endoskopi ve biyopsi tekrarı gerekir.

İnek sütü protein intoleransı, gastroenterit (bakteriyel, viral), Crohn hastalığı, gıda alerjisi (inek sütü, soya), eosinofilik gastroenterit, immün yetersizlik, giardiazis, bakteriyel aşırı çoğalma, radyoterapi gibi durumlarda ince bağırsakta parsiyel villöz atrofi gelişebileceğinden, bu hastalarda da ÇH'nin mutlaka ayırıcı tanıya dahil edilmesi gerekir.

2.1.6.4.Doku Grupları (HLA-DQ2 ve HLA-DQ8)

HLA-DQ2 çölyak hastalarının %90-95'inde, geri kalan grupta ise HLA-DQ8 pozitifdir (3,23). Toplum genelinin %30-40'ında HLA-DQ2 ve HLA-DQ8 doku tipleri bulunduğ dikkate alındığında, doku tiplerinin negatifliği tanıyı dışlamada önemli iken, pozitif bulunması tanıyı kesinleştirmemektedir. Doku tiplemesi henüz yaygın olarak kullanılmamakla beraber, seroloji ve histopatolojik yöntemlerle kesin tanı konulamayan hastalarda tercih edilebilir.

2.1.7.Tedavi

2.1.7.1.Glutensiz Diyet, Vitamin ve Mineral Replasmanı

Çölyak hastalığının tek tedavisi gluten içeren tahılların (buğday, arpa ve çavdar) ömür boyu diyetten çıkarılmasıdır. Yulafın prolamin içeriği düşük olup, klinik çalışmalarda birçok çölyak hastasının yulaflı tolere ettiğini, glutensiz diyeti daha kabul edilebilir hale getirdiği ve böylece yaşam kalitesini yükselttiği gösterilmiştir (87,88). Bazı ülkelerde ticari olarak elde edilen yulaf unu gluten içeren diğer tahıllarla kontamine olma riski nedeniyle diyetten çıkarılmaktadır. Ülkemizde de çölyak hastalarının tedavisinde kontaminasyon endişesiyle yulaflı ürünler diyetten çıkarılmaktadır. Bazı araştırmacılar ise gluteni tamamen yasaklamak yerine ELISA ile tespit edilemeyecek miktarda (20 ppm=2 mg gluten/kg) gluten alımının zararlı olmadığını ileri sürmektedirler (1,89). Glutensiz unların B vitamini yönünden fakir olması nedeni ile uzun süre glutensiz diyet uygulanan hastalarda vitamin eksiklikleri görülebileceğinden vitamin B replasmanı önerilir.

Küçük çocuklar ve ciddi hastalık bulguları gösterenlerde, ağır mukoza hasarına bağlı olarak ince barsaklardaki villöz atrofiye sekonder laktaz enzim eksikliği klinik

semptomlara neden olabilir. Glutensiz diyet tedavisi altında villus atrofsi düzelene kadar, hasta laktozlu gıdaları tolere edemeyebilir. Bu nedenle glutensiz diyet tedavisinin ilk 2 haftasında laktozsuz beslenme gaz ve şişkinlik yakınmalarının azalmasına yardımcı olacaktır. Diyet tedavisinin ilk aylarında hızlı büyüme sonucu açığa çıkacak demir, kalsiyum, çinko, folat, vitamin eksikliğini önleyecek şekilde vitamin ve mineral desteğinin verilmesi gereklidir.

Hastaların glutensiz diyet başlandıktan 2 hafta sonra yaklaşık %70'inde klinik düzelmeler görülürken, serolojik olarak tTG'nin normale dönmesi ve histolojik düzelme 6 ay sürebilir. Hastaların %95'inde 2 yıl içinde histolojik olarak tam düzelme saptanır (8,90). Diyet sonrasında ilk yıl içinde hastalarda hızlı bir tartı artışı ve boy uzaması görülür. Diyete rağmen yakınmaların geçmemesi durumunda tanıda şüphe yoksa öncelikle diyete uyumsuzluk akla getirilmeli ve hastadan bu yönde bilgi alınmalıdır. Bunun dışında ayırıcı tanıda laktoz intoleransı, diğer gıda proteinlerine alerji, immün yetersizlik, lenfoma, irritabl bağırsak sendromu gibi hastalıklar da akla getirilmelidir.

Glutensiz diyet alan hastaların tedavi yanıtının değerlendirilmesinde altın standart tekrar üst GİS endoskopi yaparak histolojik düzelmenin görülmesi olmakla beraber, günümüzde tekrar endoskopi yapılması önerilmemektedir. Daha çok semptomlarda düzelme, tartı alımı ve boy uzamasının hızlaması ve serum çölyak antikör düzeylerinin saptanamaması (negatifleşmesi) tedavi yanıtının değerlendirilmesinde kullanılan parametrelerdir. Bu amaçla özellikle serum tTG2 antikörlerinin glutensiz diyet başladıktan 4-6. aydan sonra belirli aralıklarla izlenmesi önerilmektedir (91).

Erken çocukluk döneminde daha sık rastlanılan çölyak krizinde hastalara hızlı sıvı replasmanı yapılarak sıvı ve elektrolit dengesizlikleri düzeltilmelidir. Kaşektik ve malabsorbsiyonu belirgin olan, glutensiz diyet hızlı yanıt vermeyen hastalara kısa süre için steroid tedavisinin de yararlı olduğu bildirilmektedir (3).

2.1.7.2.Yeni Tedavi Yaklaşımları

Çölyak hastalığının tedavisinde en etkin ve güvenilir yöntem sıkı bir glutensiz diyet tedavisidir. Glutensiz ürünlerin üretimi sırasında gluten ile kontaminasyonu, glutensiz ürün çeşitliliğinin yetersiz olması, glutensiz ürünlerin mali yükü nedeniyle

satın alınamaması gibi nedenler glutensiz diyet tedavisinde uyumsuzluğa neden olabilir (91). Zararsız olmasına rağmen yaşam standartlarını düşüren bu tedavi yerine, daha kolay ve konforlu ancak glutensiz diyet kadar güvenli, etkili alternatif ve yardımcı tedavi yöntemleri arayışına girilmiştir.

2.1.7.2.1.Enzim Replasman Tedavisi

Gastrointestinal sistemde pankreatik, gastrik ve ince bağırsak fırçamsı kenar hücrelerinde PEP enzim aktivitesi bulunmadığından, prolin içeriği yüksek olan gluten tamamen sindirilemez ve antijenik özelliği olan peptid parçaları intestinal lümende kalır. Bu peptid parçaları epiteli geçerek lamina propiaya ulaşır ve CD4⁺ T hücrelerin aktivasyonuna neden olur. PEP enzimi in vitro koşullarda *Flavobacterium meningosepticum* ve *Aspergillus niger*'den elde edilir. Pepsin ve tripsin tarafından parçalanmaması nedeniyle ağızdan alındığında aktivitesini kaybetmeyen bu enzimin, yemeklerle kullanılması glutenin detoksifikasyonunun sağlanabileceği ve zararlı peptidlerin oluşumunun engellenebileceği fikrinden yola çıkılarak yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (91). Pyle ve ark. (92) gluten içeren besinler tükettiğinde karbonhidrat ve yağ malabsorbsiyonu görülen hastalarda günlük 5 gr gluten ve beraberinde PEP enzim tedavisi uygulandığında, hastaların çoğunda malabsorbsiyonun engellediğini saptamışlardır. Mitea ve ark.'nın (93) çalışmasında, insan GIS'ini taklit eden bir dinamik sistemde, enzimin midede glutenin parçalanmasını hızlandırdığı ve gliadin peptidlerinin midede inaktive edilemesiyle duodenal T hücre aktivasyonunun da gerçekleşmediğini göstermişlerdir. PEP tedavisi için en önemli kısıtlayıcı faktör gliadinin yeterli derecede parçalanması ve zararlı olan peptidlerin oluşmaması için yüksek miktarlarda verilmesi ve uzun süre gluten ile muamele edilmesinin gerekliliğidir.

Endopeptidaz B'nin öncül enzim formu olan EP-B2, arpadan elde edilir ve asit pH'de pepsin enzimi tarafından aktif hale getirilir. Ağızdan 1 gr gluten ile birlikte alındığında doza ve süreye bağımlı olarak gluteni iyi sindirdiği görülmüştür (94). PEP ve EP-B2 birlikte verildiğinde buğday gluteni sindirilerek detoksifiye edildiği saptanmıştır (91).

Yapılan çalışmalar sonucunda, günümüzde enzim tedavisinin glutensiz diyetin yerine geçemeyeceği anlaşılmıştır ancak bu konuda çalışmalar hala devam

etmektedir. Yine de enzimin kullanılması ile beslenmede farkedilemeyecek kadar az miktarda alınan glutenin detoksifiye edilmesinin sosyal ortamlarda ve yolculuk sırasında az miktarda gluten alınmasına izin vererek yaşam standartını yükseltebileceği düşünülmektedir (23,91).

2.1.7.2.2.Genetik Çalışmalar

Genetik modifikasyonla glutenden ÇH için toksik olan bölümler çıkarılarak daha az immünojenik özelliği olan gluten üretilir. Bu yöntemle üretim sırasında biyolojik olarak aktif peptid parçalarının çıkarılması hedeflenmektedir ancak bu parçaların sürekli olarak tekrarlaması işlemi zorlaştırmaktadır.

2.1.7.2.3.İnce Bağırsak Geçirgenliğinin Azaltılması

Vibrio cholerae bağırsak epitel *tight junction*larını açan ZOT (Zonula Occludens Toxin) isimli bir toksin salgılar. ÇH’de de hasara uğramış bağırsak epitelinden salınan, ZOT’a benzer, zonulin adı verilen parakrin bir protein salınır (95). Çölyak hastalarında bağırsak geçirgenliğinin artması tüm immünolojik reaksiyonların tetiğini çeken ilk olaydır ve hastalarda serum zonulin düzeyinin arttığı saptanmıştır (23). Bu bilgiden yola çıkılarak alternatif tedavi arayışlarına gidilmiştir. AT1001, gliadinin neden olduğu bağırsak epitel hücre iskeletinin yapısal değişikliklerini inhibe ederek, *tight junction*ların bütünlüğünü koruyan, hücreler arası geçirgenliği azaltan bir oktapeptiddir. Çölyak hastalarına plasebo ve AT1001 verildikten sonra akut olarak glutene maruz bırakıldıklarında, plasebo alan grupta barsak permeabilitesi %70 oranında artarken, AT1001 alan grupta barsak permeabilitesinin değişmediği gözlenmiştir (96). 2007 yılında yapılan bir çalışmada akut gluten maruziyeti sonrasında plasebo verilen grupta bağırsak geçirgenliğinin %70 arttığı, AT1001 verilen grupta ise artış olmadığı saptanmıştır (96). Zonulin antagonisti olan FZI/0’ın, zonulin salınımını inhibe ederek bağırsak geçirgenliğini azalttığı gösterilmiştir (97). Enzim tedavisinde olduğu gibi bu tedavinin de tek başına etkinliği yetersizdir. İlerisi için kombine tedaviler veya yeni geliştirilecek ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır.

2.1.7.2.4. Transglutaminaz İnhibitörleri

Transglutaminaz, proteinlerin deaminasyon ve transaminasyon reaksiyonlarında görev alan bir enzimdir. Bilinen 7 adet transglutaminaz enzimi bulunmaktadır ve bunların yapıları birbirine benzerdir (98). Doku transglutaminaz (TG2), apoptoz, hücre adhezyonu, sinyal iletimi, doku tamiri, granülasyon dokusu oluşumu, angiogenez ve tümör büyümesi gibi birçok biyolojik olayda önemli fonksiyonları olan Ca'a bağımlı bir enzimdir (98,99). Transglutaminaz inhibitörleri gliadin peptidlerinin deaminasyonuna engel olurlar ancak bağırsakta bulunan TG2'ye spesifik olmadıklarından farklı transglutaminazların inhibisyonu istenen bir durum değildir. Bu nedenle enterositten geçebilecek fakat sistemik dolaşıma geçmeyecek ve bağırsak TG2'ye spesifik inhibitörlerin geliştirilmesi ile ilgili çalışmalara devam edilmektedir (23,91).

2.1.7.2.5. HLA-DQ2 İnhibitörleri

ÇH'nin patogeneğinde HLA-DQ2 aracılı TH1 immün yanıt önemli rol oynar. HLA DQ2'ye yüksek afinite gösteren gluten peptidleri üretilmiştir fakat bu peptidlerin çoğu agonist etki göstererek antijenik özelliği olan gluten peptidlerinin bağlanmasını yeterli derecede bloke edememiştir (100).

2.1.7.2.6. Diğer tedaviler

ÇH'nin tedavisinde gluten peptidlerinin intraluminal bağlanması, nötralizan gluten antikoru, IL-15 antagonistleri, kemik iliği nakli ve mezenkimal kök hücre tedavisi gibi birçok yöntem düşünülmüş ancak çalışmaların sonuçları henüz klinik uygulamaya geçecek düzeye ulaşmamıştır (101,102).

2.1.8. Çölyak Hastalığının Komplikasyonları

2.1.8.1. Kanser

Çölyak hastalığında, ince bağırsak adenokarsinomu, T veya B hücreli non-Hodgkin lenfoma, orofarengeal veya özofageal adenokarsinom, bağırsakla ilişkili T hücreli lenfoma gelişme riskinin normal popülasyona göre artmış olduğu gösterilmiştir (3). Bunun bağırsak geçirgenliğinde artışa sekonder çevresel karsinojenlere maruziyetin

artması, kronik inflamasyon, kronik antijen uyarımı ve salınan inflamatuvar sitokinlere bağlı olabileceği düşünülmektedir (19,56). Remisyonda olan çölyak hastalarında malabsorbsiyon bulgularının yanı sıra karın ağrısı, ateş, kilo kaybı ve gece terlemesi gibi semptomların görülmesi bağırsakla ilişkili T hücreli lenfomayı akla getirmelidir. Bu tip lenfomanın prognozu kötü olup, 5 yıllık sağ kalım oranı %8-20 olarak bildirilmektedir (103). Son yıllarda ÇH'de lenfoma riskinin, 1980'li yıllara oranla düştüğü fakat yine de normal popülasyona göre 1.3 kat daha yüksek olduğu bildirilmektedir (104). Bu düşüşün son 20 yıl içinde çölyak hastalarının daha erken tanı alarak tedaviye başlanmasına bağlı olduğu tahmin edilmektedir (3,23).

2.1.8.2.Refrakter Çölyak Hastalığı

Refrakter çölyak hastalığı, kesin tanı almış hastalarda 6-12 ay süresince sıkı glutensiz diyetle rağmen tedaviye cevap alınmaması veya remisyonda iken semptomların tekrarlamasıdır. Sıklıkla erişkin yaşlarda, özellikle 50 yaş üzerinde tanı alan ÇH'de görülür. İki tip RÇH tanımlanmıştır, tip 1'de bağırsak mukozasında intraepitelyal alanda fenotipik olarak normal lenfositler artarken, tip 2'de CD3, CD4, CD8 gibi T hücre reseptörü taşımayan sitoplazmik CD3 reseptörü taşıyan lenfositler artar (105,106). Tip 1'in prognozu tip 2'ye göre daha iyi olup, tip 2'de 5 yıl içinde bağırsakla ilişkili T hücreli lenfoma gelişme riski %60-80'lere kadar çıkmaktadır (102). Bu hastalarda sıkı glutensiz diyetin yanında besin, vitamin ve mineral replasmanı yapılmalıdır. Tip 1 RÇH'de prednizon, budenozid veya steroidler azatioprin ile kombine edilerek kullanılırken, tip 2'de ise prednizon, azatioprin, siklosporin, infliksimab, cladribine, alemtuzumab, anti-CD52 ve IL-10 gibi daha güçlü immünsupresif ilaçlar ve biyolojik ajanların kullanılması gerekebilir (102,106). Tip 2 RÇH'de IL-15'i bloke eden antikörler ve otolog kök hücre transplantasyonu gibi yeni tedavi yöntemleri denenmektedir (3). Ciddi ishali, kilo kaybı ve malnütrisyonu olan hastalarda parenteral beslenme gerekebilir. Yararı kanıtlanmamış olmasına rağmen sıkı glutensiz diyetle devam edilmesi önerilmektedir. (77).

2.2.ÇÖLYAK HASTALIĞININ REPRODÜKTİF SİSTEM ÜZERİNE ETKİLERİ

Çölyak hastalığı malabsorbsiyon ve buna bağlı klinik bulguların yanı sıra dirençli demir eksikliği anemisi, izole boy kısalığı, osteoporoz, hepatit ve jinekolojik problemler gibi ekstraintestinal bulgularla da ortaya çıkabilir. Son yıllarda çölyaklı erkek ve kadınlarda yapılan çalışmalar, diyetle uyumsuz olan hastalarda doğurganlık oranlarında azalma, menarşta gecikme, amenore, erken menapoz, tekrarlayan düşükler, düşük doğum ağırlıklı ve prematüre bebek doğumu gibi problemlerin daha sık görüldüğüne işaret etmektedir (Tablo 7). Reprodüktif dönemde görülen bu problemler ÇH'nin ilk klinik bulgusu olabilmektedir (6,7,107).

Tablo 7. Çölyak hastalığında reprodüktif dönem değişiklikleri (6)

Kadın fertilitesi	Geç menarş, erken menapoz, amenore, tekrarlayan düşükler
Erkek fertilitesi	Gonadal disfonksiyon, sperm morfolojisinde ve motilitesinde değişiklikler, cinsel aktivitede azalma
Hamilelik	Prematüre doğum, düşük ağırlıklı bebek doğumu, intrauterine büyüme geriliği, plasentanın anormal yerleşimi
Postpartum	Hormonal veya immün değişiklikler

Literatürde çölyak hastalığının reprodüktif dönem üzerindeki etkilerini araştıran bir çok çalışma bulunmaktadır. Çölyak hastalarında sağlıklılara göre erken menapoz, gecikmiş menarş, menstrual siklus bozuklukları ve amenorenin sıklığını araştıran çalışmalar, tedaviye uyumsuzluğun riski arttıran bir faktör olduğunu göstermektedir (108-110). Tekrarlayan abortus ve/veya nedeni bilinmeyen infertilitesi olan olgularda ÇH sıklığını araştıran çalışmalar, çölyak hastalığının normal popülasyona göre bu grup hastalarda daha sık görüldüğünü göstermektedir (111-116).

Çölyak hastalarında infertilite ve abortus oranlarındaki yüksekliğin yanı sıra, hamilelik sırasında komplikasyon gelişme riski, prematüre ve düşük ağırlıklı bebek doğum oranının, IUGR riskinin de sağlıklı kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu bildirilmektedir (117). Çölyak hastalarında reprodüktif sistemle ilgili problemlerin diyet tedavisine uyumsuz hastalarda diyet tedavisine uyanlara ve sağlıklı kontrollere

göre daha yüksek oranda görüldüğünü gösteren çok sayıda çalışmanın yanı sıra literatürde bunun aksini savunan az sayıda çalışma da bulunmaktadır (118-125).

Çölyak hastalığında glutensiz diyetle uyumsuzluğa bağlı olarak gebelikte, gebelik sonrası dönemde ve yenidoğanda karşılaşılan problemlerin nedeniyle ilgili çeşitli mekanizmalar ileri sürülmektedir (6,7,126). Çinko ve selenyum eksikliğinin FSH, LH sentez ve salınımını etkilediği, folik asit eksikliğinin ise embriyo ve seminifer tübül gibi hızlı çoğalan dokular üzerine olumsuz etkisi olduğu ileri sürülmektedir (126). Bunun malnütrisyondan dolayı immünolojik nedenlere de bağlı olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Hadziselimovic ve ark. (127), diyetle uyumsuz çölyaklı gebelerin plasentasında yoğun gliadin birikimi olduğunu, ekstrasitotrofoblastlarda apoptozun ve apoptoz göstergesi olan Fas-L ekspresyonunun arttığını bildirmişlerdir. Transglutaminaz 2, bir çok doku ve hücre yüzeyinde eksprese edilen bir enzim olup, plasentada trofoblastlarda, fibroblastlarda ve sinsityotrofoblast mikrovillus membranında da bulunmaktadır (128). Çölyak hastalarının serumundaki anti-tTG antikorları, plasentanın maternal tarafında bulunan (sinsityotrofoblast mikrovillus membranındaki) transglutaminaz 2 enzimine bağlanarak enzimin fonksiyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (129). Başka bir çalışmada ise term plasentadan izole edilen trofoblastlar anti-tTG IgG otoantikorları ile inkübe edildiğinde, trofoblastlarda apoptoz ve bir apoptoz belirteci olan Annexin-5 ekspresyonunun arttığı, aynı zamanda trofoblastların uterus duvarına invazyonunun azaldığı görülmüştür (130). Ayrıca anti-TG2 antikorlarının, endometrium epitel hücrelerine bağlanarak yeni damar oluşumunu ve damar gelişimini bozduğu gösterilmiştir (131).

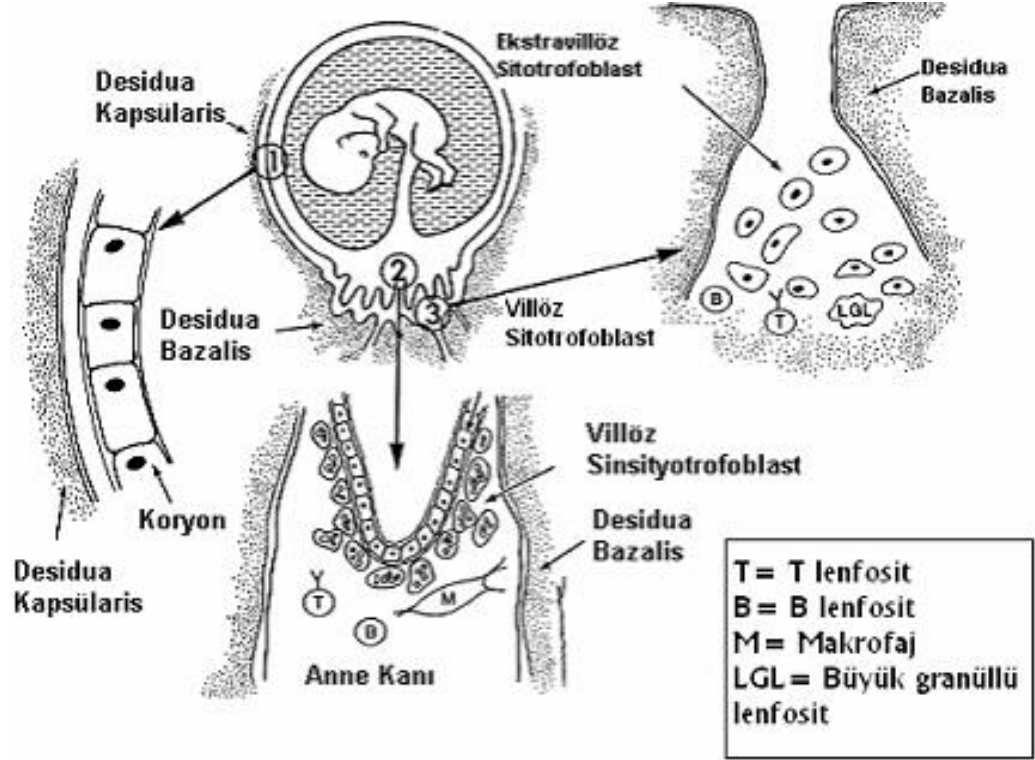
Maternal çölyak hastalığında diyetle uyulmadığında görülen reproduktif sistem sorunları yıllardır araştırılmaktadır. Son yıllarda ise bunun mekanizması ilgi çekmeye başlamıştır (128-131). İki binli yılların ortasından sonra yapılan yayınlarda maternal serumdaki anti-tTG antikorların, plasenta ve fetüsün gelişimi için önemli olan trofoblastlara bağlanarak, trofoblastların fonksiyonunu bozduğunu ve apoptozuna neden olduğunun gösterilmesiyle çölyak hastalığının indüklediği infertilite, abortus ve IUGR'nin mekanizması konusunda yeni bilgiler sağlanmıştır. Gebeliğin oluşması ve devamını sağlayan kompleks immünolojik olaylar göz önüne alındığında, maternal çölyak hastalarında diyet tedavisine uyulmadığında gözlenen

olumsuz etkilerin altında başka mekanizmalar da olabileceği fikri doğmuştur. Normal gebeliğin devamlılığı için Th2 immün yanıtın baskın olduğu bir ortam gerekli iken, çölyak hastası gebelerin plasentasından alınan decidua hücrelerinin gliadin ile inkübasyonu sonrasında, Th1 hakimiyetinde immün yanıt geliştiği gözlenmiştir (132). Gerek anti-tTG antikorlarının plasental hücrelere bağlanarak fonksiyonlarını inhibe etmesiyle, gerekse de desidua immün hücrelerin gliadin peptidleri ile karşılaştıktan sonra fonksiyonlarının değişmesiyle diyete uyumsuz çölyak hastalarında gebelikte veya doğacak çocukla ilgili problemler görülmektedir.

2.3.GEBELİK İMMÜNOLOJİSİ

Gebelik süresince önce embriyo sonra fetüs hem annenin hem de babanın antijenlerini taşıdığı için bir semi-allograft olarak kabul edilir. İlk kez 1953 yılında semi-allograft olan fetüsün, anne ve fetüs arasındaki immünolojik reaksiyonların baskılanmasıyla, annenin fetüsa immünolojik tolerans geliştirdiği ve bu şekilde fetüsün yaşamını sürdürebildiği bildirmiştir (133). Prematüre doğum, intrauterine büyüme geriliği, spontan düşüklükler, fetal ölüm, plasental yetersizlik gibi problemlerin de patogeneğinde immünolojik mekanizmaların olduğunu savunulmaktadır (133-135).

Fetüsün annenin immün sistemi ile ilişkisini sağlayan fetal doku plasentadır. Trofoblastlar annenin hücreleri ile temas eden en önemli fetal hücrelerdir ve temas ettikleri bölgelere göre üç tipe ayrılırlar. Placenta villus, sinsityotrofoblastik hücreler ve bunların altında uzanan villöz trofoblastlar ile mezokimal çekirdekten oluşur. Annenin immün sistemi ile direk temas halinde olan hücreler sinsityotrofoblastlardır. Villöz trofoblastların oluşturduğu fetomaternal bariyer, maternal hücreler ile fetal hücreler arasındaki direk teması önlemektedir Ekstravillöz trofoblastlar ise maternal tarafta myometrium ve placenta desiduasına göç eden, proliferen olan hücrelerdir. (Şekil 6) (133,134). Desidua ise annenin ve fetal hücrelerin temas halinde olduğu plasentanın maternal bölümüdür.



Şekil 6. Materno-fetal arayüz (134)

Semi-allograft olan fetüs henüz blastokist implantasyonu sırasında, annenin endometriyumuna invaze olurken akut, aseptik inflamatuvar bir yanıt oluşturur. İmplantе olan embriyo ise bu yanıtı baskılayarak yaşamını sürdürür. MHC sınıf I ve II, patojenleri T lenfositlere sunarak immün sistemi patojenlere karşı uyarıcı bütönlеyici membran glukoproteinleridir. Klasik sınıf I proteinleri $CD8^+$ T lenfositleri tarafından tanınır ve etkileşimleri sonucunda sitolitik etki görülür. Klasik Sınıf II molekülleri ise $CD4^+$ T lenfositleri tarafından tanınması sonucunda sitolitik etkinin yanı sıra $CD4^+$ T lenfositlerinin yardımcı T hücrelerine dönmesini sağlayarak TH1 veya TH2 immün yanıtın oluşmasına neden olur (136). Fetomaternal immüntoleransın en önemli faktörlerinden bir tanesinin trofoblastların klasik sınıf I moleküllelerinden HLA-A ve HLA-B'yi ve klasik sınıf II moleküllelerini taşıması olduğu düşünülmektedir. Böylece trofoblastların annenin immün hücreleri tarafından yok edilmesi engellenir. Trofoblastlar klasik sınıf I moleküllelerinden HLA-C ve klasik olmayan sınıf Ib MHC moleküllelerinden HLA-E, HLA-F ve HLA-G'yi eksprese ederler (136,137).

Fetomaternal immüntoleransın gelişmesinde, trofoblastlar üzerinde bulunan Fas/Fas ligand (FasL), petformin ve B7 proteinleri olarak adlandırılan hücre yüzey proteinlerinin de katkısı vardır. B7 proteinleri, trofoblastlarda bulunan ve fetomaternal ilişkiyi düzenleyen transmembran proteinlerdir. Fas proteini, aktif T ve B lenfositleri, NK hücreleri, monositler ve makrofajlar gibi immün hücrelerde eksprese edilir. FasL ise, aktif T lenfositleri, sitotrofoblastlar ve sinsitiotrofoblastların yanı sıra kornea epiteli, göz endotelinde de eksprese edilir. Fas-FasL etkileşimi, Fas taşıyan hücrelerin apoptozuna neden olur. Son yıllarda yapılan çalışmalar trofoblastların yüzeyinde FasL'nin yanında Fas eksprese edildiği saptanmış ve bu sayede myometriuma invazyon yapan trofoblastların annenin aktif lenfositleri tarafından öldürülmesinin engellendiği düşünülmektedir. TH1 sitokinler Fas ekspresyonunu ve sensitivitesini artırırken, TH2 sitokinler Fas'ın neden olduğu apoptozu indükler. Perforin, uterusda bulunan NK hücrelerinin hemen hemen %95'inde eksprese edilen ve bu hücrelerin fonksiyonlarını düzenleyen bir proteindir (137).

2.3.1.Desidual İmmün Hücreler:

Desidua, annenin ve fetal hücrelerin temas halinde olduğu plasantanın maternal bölümüdür. Stroma hücreleri, uterusun natural killer hücreleri (uNK), lenfosit, monosit ve epitel hücrelerden oluşan desidual hücreler, fetusun toleransında ve trofoblast invazyonunun kontrolünde önemli rol oynar. İmmünohistokimyasal çalışmalarda gebeliğin erken evrelerinde desiduada bulunan hücrelerin %30-40'ının lökosit olduğu, bunların %70'inin CD56^{parlak}CD16⁻ NK hücreleri, %30'unun ise CD14⁺ makrofaj ve CD3⁺ T lenfositlerinden oluştuğu saptanmıştır (138,139). Birinci trimesterden sonra desidual lökositlerin dağılımı hakkında daha az bilgi bulunmasına rağmen, genellikle 3. trimesterde uNK hücrelerinin oranının azaldığı, CD3⁺ T lenfositlerinin ise arttığı kabul edilmektedir (140,141).

2.3.1.1.Uterusun Natural Killer Hücreleri

Natural killer hücrelerinin tümör immünitesinde, hücre içi patojenlere karşı konak savunmasında, transplante kemik iliği reddinde, spesifik sitokinlere karşı kazanılmış immünite gelişmesinde önemli fonksiyonları bulunmaktadır (139). NK hücreleri

CD16 ve CD56 yüzey antijenleri eksprese eder. CD16, NK hücreleri ile ilişkili antikora bağımlı hücre ölümünden sorumlu iken, CD56 ise daha çok sitokin salgılayan hücrelerde eksprese edilir. Periferik NK hücrelerinin %90'ı yüzeyinde CD16 molekülü eksprese ederken CD56 molekülü eksprese etmez (CD56^{sönük}CD16⁺), kalan %10'u ise CD56^{parlak}CD16⁻ 'tir. Sitotoksik etkili periferik NK hücrelerine göre plasental NK hücrelerinin sitotoksik etkisi zayıf, sitokin salgılama fonksiyonu yüksektir ve ilk trimesterde %70'e yakını CD56^{parlak}CD16⁻ NK hücrelerinden oluşur (134,135).

Plasental NK hücreleri salgıladığı sitokinler ile gebeliğin oluşmasına ve devamına yardımcı olur. Granülosit koloni stimule edici faktör (G-CSF), granülosit-makrofaj koloni stimuli edici faktör (GM-CSF), makrofaj koloni stimuli edici faktör (M-CSF) ve lösemi inhibitör faktör (LIF) salgılayarak trofoblastların büyümesi, çoğalması, farklılaşmasına ve implantasyonuna yardımcı olurlar (133,139,142). Plasental NK hücreleri bunun yanında vasküler endothelial büyüme faktörü (VEGF), anjiopoetin-2 ve plasental büyüme faktörü (PlGF) salgılayarak plasentada damar gelişimine yardımcı olur (139). IL-8, interferon indükleyici protein-10 (IP-10) ile de trofoblastın uterusu invazyonunu kontrol ederler. (135,137,139).

Plasental NK hücreleri inhibitör reseptörler taşıdıklarından desiduada bulunan semi-allojenik non-villöz sitotrofoblastlara karşı reaksiyon geliştirmezler. Bu reseptörler trofoblast üzerindeki MHC Ia ve Ib (HLA-C, HLA-E, HLA-G) antijenlerine bağlanarak plasental NK hücrelerin hücre duvarına zarar vermesi inhibe edilir (133). Trofoblastlar üzerinde MHC II ve klasik MHC Ia (HLA-A ve HLA-B) molekülleri bulunmadığından maternal T lenfositleri, APC'leri ve periferik NK hücreleri trofoblastlara karşı reaksiyon geliştirmez (133).

2.3.1.2.Lenfositler

Plasentalın desidual tabakasında bulunan T lenfositler, trofoblastlara (antijen olarak tanımlanmayı sağlayan MHC II ve MHC Ia grup yüzey belirteçleri taşımadığından) karşı reaksiyon geliştirmez. Desidual lenfositler TH1 tip veya TH2 tip sitokinleri salgılayabilir. TH1 sitokinler (IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-12, IL-15) gebeliğin idamesi için tehdit oluşturup, trofoblast invazyonunu engelleyerek düşüğe neden olurlar. Ayrıca IFN- γ ve TNF- α trofoblast apoptozuna neden olarak plasental yetmezliğe yol

açar ve fetüsün gelişimini etkilenir. TH2 baskın immün yanıt sonucu salınan sitokinler (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13) trofoblastların proliferasyonunu ve invazyonunu artırır (133). Gebelikte fetüsün sağlıklı gelişimi için uygun olan tolerans ortamı baskın TH2 immün yanıtla karşılık azalmış TH1 immün yanıtın sağladığı ortamdır. Preeklampsi veya tekrarlayan düşük öyküsü olan hastaların plasentalarında yapılan incelemeler TH1 immün yanıtın daha baskın olduğu göstermiştir (143,144).

2.3.1.3.Regülatör T Hücreleri (Treg)

Desidua yoğun olarak bulunan regülatör T hücreleri ($CD4^+/CD25^+$), T hücre cevabını düzenleyerek fetomaternal immüntoleransın devamını sağlar. Çalışmalar Treg hücrelerinde eksikliğin erken dönemlerde spontan abortuslara, tekrarlayan düşüklere neden olduğunu göstermektedir (137,145). Treg hücreler, IL2 üretimini, $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücre çoğalmasını, antijen sunan hücrelerin fonksiyonunu inhibe ederek immünsupresif fonksiyon gösterirler.

2.3.1.4.Monosit ve Makrofajlar

Desidua bulunan makrofajlar, çeşitli sitokin ve immünsupresif prostaglandinler salgılayarak gebeliğin devamına yardımcı olur. Makrofajlar ayrıca trofoblast invazyonunun neden olduğu hafif dereceli inflamasyon sonucunda oluşan hücre kalıntılarını da fagositize ederek temizlerler (133).

2.3.2.Trofoblastların Maternal İmmün Yanıttan Korunması

MHC sınıfı antijenler üç grupta sınıflandırılır: MHC sınıf Ia (HLA-A, HLA-B ve HLA-C), MHC sınıf Ib (HLA-E, HLA-F ve HLA-G), MHC sınıf II (HLA-DP, HLA-DQ ve HLA DR). Sınıf Ia moleküller çekirdekli hücrelerde bulunur ve antijenlerin T lenfositlerine sunulmasında, NK hücrelerinin aktivasyonunda rol alır. Sınıf II moleküller, B lenfositler, antijen sunan hücreler ve bazı epitel hücrelerinin yüzeyinde bulunur ve çeşitli antijenlerin immün olarak tanınmasında rol alır. Sınıf Ib moleküllerin gerçek fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir, bazı trofoblastik hücrelerin yüzeylerinde HLA-G ve HLA-E taşımaları fetüsün yabancı olarak algılanmadan tolere edilmesini sağladığı düşünülmektedir (133).

2.3.2.1.HLA-G

Non-villöz trofoblast hücrelerin yüzeyinde bulunan HLA-G'nin fonksiyonu konusunda çeşitli varsayımlar ileri sürülmektedir. Maternal NK hücreler üzerindeki inhibitör reseptörlere bağlanarak trofoblast lizisini ve maternal NK hücrelerin plasentaya göçünü engellediği düşünülmektedir. HLA-G, T lenfositlerin çoğalmasını baskılayıp, T lenfositlerin ve maternal NK hücrelerin sekresyonunu etkileyerek gebelik süresince immün yanıtın TH1'den TH 2'ye kaymasını böylece de gebeliğin devamlılığını sağladığı düşünülmektedir (135,139,142). Non-villöz trofoblast hücrelerin yüzeyinde bulunan HLA-G dışında çözünür (soluble) sHLA-G formu da bulunmaktadır. Maternal kan hücrelerinde ve amniyotik sıvıda bulunan sHLA-G, (supresör) CD8 T lenfositlerin apoptozunu ve (yardımcı) CD4 T lenfositlerin proliferasyonunu engelleyerek immünsupresif etki yapar, böylece embriyonun implantasyonu ve gebeliğin devamlılığı sağlanmış olur. Erken dönemde düşükleri olan gebelerde plazma sHLA-G seviyesi normal gebelerle karşılaştırıldığında düşük seviyede saptanması HLA-G'nin gebeliğin devamlılığında rol oynadığını desteklemektedir (133,134,137,146,147).

2.3.2.2.HLA-E

Non-villöz trofoblastlarda eksprese edilen HLA-E'nin, gerçek fonksiyonu tam olarak anlaşılmamıştır. HLA-G gibi maternal NK hücrelerini inhibe ettiği düşünülmektedir (139).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Olgu Seçimi

Çalışmaya toplam 16 gebe alındı, 8 gebe çölyak hastalığı tanılı olup, glutensiz diyet tedavisi alan gebelerdi, kontrol grubuna ise 8 sağlıklı gebe dahil edildi. Çölyak hastalığı olan gebeler klinik bulgu ve pozitif serolojinin yanı sıra endoskopik biyopsi örneği alınarak tanı konulmuş olgulardan seçildi. Kontrol grubuna alınan vakalar ise gebeliği sırasında komplikasyon gelişmemiş olan sağlıklı gebelerdi. Hasta ve kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilen gebelerden hipertansiyon, karaciğer, böbrek veya kalp yetmezliği gibi sistemik hastalığı bulunanlar, kronik ilaç alım öyküsü ve gebelik sırasında erken doğum, prematüre ve/veya IUGR bebek doğum öyküsü olanlar çalışma dışı bırakıldı.

Çölyak hastalığı olan gebeler, gebeliğin son ayında diyetle uyum açısından sorgulandı. Hem çölyak hastalığı olan gebelerden hem de sağlıklı kontrollerden kan alınarak, serum IgA ve tTG IgA düzeyleri bakıldı böylece hasta grubunun diyetle uyumu değerlendirildi. Sezeryan ve vajinal yol ile yapılmış doğumlarda elde edilen plasental desidual hücrelerin immünolojik yanıtlarının farklı olabileceğine dair veriler bulunduğundan grubumuzu doğum şekli açısından homojenize etmek amacıyla tek tip doğum şekli tercih edildi ve sezeryan yolu ile doğum yapmış gebeler çalışmaya alındı.

Araştırmaya katılan çölyak hastası ve sağlıklı gebelere çalışma hakkında bilgi verilerek, plasentalarının incelenmesi için yazılı aydınlatılmış onam formu dolduruldu ve her doğumda plasenta primer araştırmacı tarafından doğuma girilerek elde edildi. Çalışma için Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırma Kurulu'ndan 28.03.2013 tarihinde onay alındı (Ek-1).

3.2. İmmünolojik Değerlendirme

3.2.1. Plasentadan Mononükleer Hücre İzolasyonu ve Kültürü

Term gebeliği (38-40. gestasyon haftasını) komplikasyonsuz olarak tamamlamış gebelerin plasentaları sezeryan doğum sırasında steril şartlarda alınarak, steril serum fizyolojik (SF) içine konuldu. Plasentanın anne kanından ve pıhtılardan temizlenmesi

için steril SF içinde 1 saat bekletildi ve daha sonra SF ile yıkandı. Plazenta dokularının maternal yüzeyindeki kotilendondan steril koşullarda alınan doku örnekleri SF içinde ezilerek parçalandı. Desiduadan izole edilecek hücrelerin apoptozunu ve hücre yüzey proteinlerinin kaybını önlemek için enzimatik parçalama yerine mekanik olarak ezme yöntemi kullanıldı. SF içinde ezilen dokular steril şartlarda Ficoll (d: 1077, Sigma-Aldrich Inc.) üzerine yayılarak oda ısısında 2000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında hücreler gradiyent farkına göre, en üstte plazma, orta tabakada mononükleer hücreler, en altta ise eritrositler olacak şekilde ayrıldı. Orta tabakada bulunan mononükleer hücreler toplanarak PBS eklendi ve oda ısısında 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üstte kalan PBS dökülerek tüpün dibine çökmüş olan hücre kısmına 1 ml %70 RPMI 1640 medyum (pH=7.3, Sigma-Aldrich Co.), %20 fetal dana serumu (Fetal Calf Serum: FCS, Sigma-Aldrich Co.), %10 DMSO (dimethyl sulfoxid, Sigma-Aldrich Co.) içeren solüsyon eklendi. Hücreler kültür yapılana dek sıvı azot (-180°C) tankında muhafaza edildi.

3.2.2. Gliadinin Pepsin ve Tripsin ile Sindirilerek pt-gliadin Hazırlanması ve Hücre Kültürlerini Uyaracak Doz Tayini

Gliadin (10 mg), 1.6 ml 50 mM Na-acetat buffer içinde eritildi. Karışıma pepsin (0.5mg, P6887; Sigma-Aldrich) eklenerek ve 37°C'de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında karışıma 11.8 mg Na₂PO₄ eklendi, sonra da solüsyonun PH'sını 7'ye getirmek için karışıma NaOH eklendi. Daha sonra tripsin (0.5 mg, T-4799; Sigma-Aldrich) eklenerek 37°C'de 2 saat daha inkübe edildi. Karışım >95°C'nin üzerinde 10 dakika beklenerek reaksiyon tamamlandı. Enzimatik olarak parçalanmış gliadin (pt-gliadin) -20°C'de saklandı. Enzimatik olarak parçalanmış gliadin kültürlerine 1x10⁶ hücre/ml'ye 250 µg konsantrasyonunda eklendi (148).

Pt-gliadinin in vitro koşullarda hücre uyarım için gereken uygun konsantrasyonunun belirlenmesi için, beş sağlıklı gönüllünün heparinize venöz kanından izole edilen lenfositler kullanıldı. İzole edilen 1x10⁶ mononükleer hücrenin üzerine 1 ml %10 FCS içeren tam RPMI eklendi. Her ml'de 10⁶ mononükleer hücre bulunan ortama 0.25 mg, 0.5 mg ve 1 mg pt-gliadin eklendi. Spesifik antijenle uyarımı kontrol etmek için, nonspesifik bir uyarıcı olan fitohemaglutinin (PHA,

Sigma-Aldrich Co.) 10 µg/ml dozunda tek başına ve pt-gliadin ile birlikte hücre kültürlerine eklendi . Akım sitometrisi ile T lenfosit ve NK hücrelerinin yüzeyinde CD69 ekspresyonu antijenik uyarıya yanıtı değerlendirmek için kullanıldı. Bu amaçla hücre kültürlerinde uyarı öncesi ve uyarı sonrası 24., 48. ve 72. saatlerde CD69 ekspresyonu akım sitometri ile analiz edildi.

3.2.3. Plasental Hücre Kültürü

Hücre kültürü yapılana dek sıvı azot (-180 °C) tankında muhafaza edilen hücreler, sıvı azot tankından çıkarılarak çözünmeden %10 FCS içeren RPMI solüsyonuna katıldı ve iki kez 1500 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üstte kalan %10 FCS-RPMI kısmı döküldü ve tüpün dibine çökmüş olan hücre kısmın 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde %10 FCS içeren RPMI, 2 mM L-glutamine, antibiyotik (100 U/ml Penisilin, 10 µg/ml streptomisin) içeren karışımda süspansiyone edildi. İzole edilen hücreler 250 µg pt-gliadin, 10 µg/ml nonspesifik uyaran olan fitohemagglutinin (PHA, Sigma-Aldrich Co.) ve 250 µg pt-gliadin ile beraber PHA ile ayrı ayrı uyarılarak 37 °C, %5 CO₂’li ortamda 72 saat süresince kültüre alındı. NK hücre, CD4⁺ ve CD8⁺ T hücre populasyonlarında eksprese edilen yüzey moleküllerinin incelenmesi amacı ile, kültürün 72. saatinde hücreler toplanarak monoklonal antikorlar ile işaretleme yapıldı.

3.2.4. Plasental Mononükleer Hücrelerde Eksprese Edilen Yüzey Moleküllerinin Analizi

NK, CD4⁺ ve CD8⁺ T hücre populasyonun fenotipik dağılımlarının ve aktivasyonlarının belirlenmesi için plasentadan izole edilen mononükleer hücreler kültürün 72. saatinde floresan işaretli 6 farklı renkte monoklonal antikorla boyandı (tablo 8). Bu amaçla 200 µL 1×10^6 hücre/ml hücre süspansiyonu üzerine araştırılacak antikorlar uygun dilüsyonda eklenerek karanlıkta, oda ısısında, kit içerisinde belirtilen sürede inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücrelere PBS eklenerek oda ısısında 1500 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Daha sonra akım sitometri cihazı (FACSCanto, Diva yazılımı, Becton & Dickinson Corp.) kullanılarak yüzey molekül ekspresyonları yüzde olarak saptandı.

Tablo 8. Hücre yüzey molekülü ekspresyonunda kullanılan monoklonal antikorlar

Antikor	Özgünlüğü	Fluorokrom	Kaynak
anti CD3	T hücre	PerCP	Biolegend
anti CD4	Yardımcı T hücre	PE-Cy7	BD
anti CD8	Sitotoksik T hücre	APC-Cy7	BD
anti CD16	NK hücre	APC	Biolegend
anti CD56	NK hücre	PE	Biolegend
anti CD69	Aktivasyon	FITC	Biolegend

BD: Becton-Dickinson Immunocytometry systems, PerCP: peridinin-chlorophyll proteins, PE: phycoerithin, APC: allophycocyanin, FITC: fluorescein isothiocyanate

3.2.5. Hücre Kültüründe Sitokin Analizi

Plasentadan izole edilen mononükleer hücrelerin salgıladıkları IL-4, IL-10, IL-15, IL-17, IFN- γ sitokin ve sHLA-G seviyelerinin belirlenmesi için pt-gliadin, PHA ve pt-gliadin ile birlikte PHA uyarımı sonrasında alınan hücre süpernetanları daha sonra analiz etmek üzere -80 °C’de saklandı.

3.2.5.1. IL-4 sitokin Analizi

Çalışmada IL-4 sitokin seviyesi insan IL-4 ELİSA kiti (Boster, Inc. EK0404) kullanılarak ölçüldü. Antijenle uyarıldıktan sonra -80 °C’de saklanan kültür süpernetanları oda sıcaklığında çözülerek insan IL-4 antikorlu ile kaplı plağa eklendi ve 37 °C’de 90 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında plaklarda kalan süpernetanlar uzaklaştırılarak biyotinlenmiş anti-insan IL-4 antikorlu kuyulara eklendi. Yine 37 °C’de 1 saat inkübasyon sonrasında bağlanmayan antikorlar PBS ile yıkanıp uzaklaştırılarak, 30 dakika 37 °C’de Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) çalışma solüsyonuyla inkübe edildi. Daha sonra kuyular PBS ile yıkanarak substrat solüsyonu (TMB) eklendi ve 37 °C’de, karanlıkta 30 dakika bekletildi. Reaksiyon 2M sülfürik asit içeren stop solüsyonu ile sonlandırıldı. ELISA okuyucusunda 450 nm dalga boyunda renk değişimleri ölçüldü. Standart eğri çizilerek örneklerin içerdikleri IL-4 sitokin seviyesi pg/ml cinsinden tayin edildi. Üretici firma tarafından bu kit için belirtilen en alt ölçüm düzeyi 1.5 pg/ml idi.

3.2.5.2. IL-10 Sitokin Analizi

Çalışmada IL-10 sitokin seviyesi insan IL-10 ELISA kiti (Boster, Inc. EK0416) kullanılarak ölçüldü. Antijenle uyarıldıktan sonra -80°C’de saklanan kültür süpernetanları oda sıcaklığında çözülerek insan IL-10 antikoru ile kaplı plağa eklendi ve 37°C’de 90 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında plaklarda kalan süpernetanlar uzaklaştırılarak biyotinlenmiş anti-insan IL-10 antikoru kuyulara eklendi. Yine 37°C’de 1 saat inkübasyon sonrasında bağlanmayan antikorlar PBS ile yıkanıp uzaklaştırılarak, 30 dakika 37°C’de Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) çalışma solüsyonuyla inkübe edildi. Daha sonra kuyular PBS ile yıkanarak substrat solüsyonu (TMB) eklendi ve 37°C’de, karanlıkta 30 dakika bekletildi. Reaksiyon 2M sülfürik asit içeren stop solüsyonu ile sonlandırıldı. ELISA okuyucusunda 450 nm dalga boyunda renk değişimleri ölçüldü. Standart eğri çizilerek örneklerin içerdikleri IL-10 sitokin seviyesi pg/ml cinsinden tayin edildi. Üretici firma tarafından bu kit için belirtilen en alt ölçüm düzeyi 0.5 pg/ml idi.

3.2.5.3. IL-15 Sitokin Analizi

Çalışmada IL-15 sitokin seviyesi insan IL-15 ELISA kiti (Biolegend, Inc. Cat.no.435104) kullanılarak ölçüldü. Düz tabanlı ve 96 kuyulu plaklar kaplama tampon çözeltisi içerisine uygun oranda IL-15 kaplama antikoru eklenerek 16 saat +4°C’de bekletildi. Bu işlem sonrasında kuyulara IL-15 blok tamponu eklenerek oda ısısında, karıştırıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kuyular yıkama solüsyonu (PBS+%0.05 Tween-20, PH7.4) ile yıkanarak hazırlandı.

Antijenle uyarıldıktan sonra -80°C’de saklanan kültür süpernetanları kuyulara eklenerek oda ısısında, karıştırıcı üzerinde 2 saat inkübe edildi. Yıkama işleminden sonra anti-IL-15 poliklonal antikoru eklenerek 1 saat oda ısısında karıştırılarak inkübe edilip tekrar yıkama yapıldı. Avidin HRP solüsyonu kuyulara eklendi ve oda ısısında 30 dakika karıştırılarak inkübe edildi. Kuyular yıkanarak, TMB substrat solüsyonu eklendi. Oda ısısında 15 dakika karanlıkta karıştırılarak inkübasyon sonrasında reaksiyon 1 N HCl ile sonlandırıldı. ELISA okuyucusunda 450nm dalga boyunda optik yoğunlukları ölçüldü. Standart eğri çizilerek örneklerin içerdikleri IL-15 sitokin seviyesi pg/ml cinsinden bulundu. Üretici firma tarafından bu kit için belirtilen en alt ölçüm düzeyi 4 pg/ml idi.

3.2.5.4. IL-17 Sitokin Analizi

Çalışmada IL-17 sitokin seviyesi insan IL-17 ELİSA kiti (Boster, Inc. EK0430) kullanılarak ölçüldü. Antijenle uyarıldıktan sonra -80°C’de saklanan kültür süpernetanları oda sıcaklığında çözülerek insan IL-17 antikoru ile kaplı plağa eklendi ve 37°C’de 90 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında plaklarda kalan süpernetanlar uzaklaştırılarak biyotinlenmiş anti-insan IL-17 antikoru kuyulara eklendi. Yine 37°C’de 1 saat inkübasyon sonrasında bağlanmayan antikorlar PBS ile yıkanıp uzaklaştırılarak, 30 dakika 37°C’de Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) çalışma solüsyonuyla inkübe edildi. Daha sonra kuyular PBS ile yıkanarak substrat solüsyonu (TMB) eklendi ve 37°C’de, karanlıkta 30 dakika bekletildi. Reaksiyon 2M sülfürik asit içeren stop solüsyonu ile sonlandırıldı. ELISA okuyucusunda 450 nm dalga boyunda renk değişimleri ölçüldü. Standart eğri çizilerek örneklerin içerdikleri IL-17 sitokin seviyesi pg/ml cinsinden tayin edildi. Üretici firma tarafından bu kit için belirtilen en alt ölçüm düzeyi 1 pg/ml idi.

3.2.5.5. IFN- γ Sitokin Analizi

Çalışmada IFN- γ sitokin seviyesi insan IFN- γ ELİSA kiti (Boster, Inc. EK0373) kullanılarak ölçüldü. Antijenle uyarıldıktan sonra -80°C’de saklanan kültür süpernetanları oda sıcaklığında çözülerek insan IFN- γ antikoru ile kaplı plağa eklendi ve 37°C’de 90 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında plaklarda kalan süpernetanlar uzaklaştırılarak biyotinlenmiş anti-insan IFN- γ antikoru kuyulara eklendi. Yine 37°C’de 1 saat inkübasyon sonrasında bağlanmayan antikorlar PBS ile yıkanıp uzaklaştırılarak, 30 dakika 37°C’de Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) çalışma solüsyonuyla inkübe edildi. Daha sonra kuyular PBS ile yıkanarak substrat solüsyonu (TMB) eklendi ve 37°C’de, karanlıkta 30 dakika bekletildi. Reaksiyon 2M sülfürik asit içeren stop solüsyonu ile sonlandırıldı. ELISA okuyucusunda 450 nm dalga boyunda renk değişimleri ölçüldü. Standart eğri çizilerek örneklerin içerdikleri IL-4 sitokin seviyesi pg/ml cinsinden tayin edildi. Üretici firma tarafından bu kit için belirtilen en alt ölçüm düzeyi 2 pg/ml idi.

3.2.5.6. sHLA-G Analizi

Çalışmada sHLA-G seviyeleri insan HLA-G ELISA kiti (Cusabio, Inc. CSB-E09401h) kullanılarak ölçüldü. Antijenle uyarıldıktan sonra -80 °C’de saklanan kültür süpernetanları oda sıcaklığında çözülerek insan HLA-G antikoru ile kaplı plağa eklendi ve 37 °C’de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında plaklarda kalan süpernetanlar uzaklaştırılarak biyotinlenmiş anti-insan HLA-G antikoru kuyulara eklendi. Bir saat 37 °C’de inkübasyon sonrasında bağlanmayan antikorlar yıkama solüsyonu ile yıkanıp uzaklaştırılarak 1 saat 37 °C’de HRP-Avidin solüsyonu ile inkübe edildi. Daha sonra kuyular yıkanarak TMB substrat solüsyonu eklendi ve 37 °C’de, karanlıkta 30 dakika bekletildi. Reaksiyon 2M sülfürik asit içeren stop solüsyonu ile sonlandırıldı. ELISA okuyucusunda 450 nm dalga boyunda renk değişimleri ölçüldü. Standart eğri çizilerek örneklerin içerdikleri HLA-G seviyesi ng/ml cinsinden tayin edildi. Üretici firma tarafından bu kit için belirtilen en alt ölçüm düzeyi 0.31 ng/ml idi.

3.3. Plasental Dokunun İmmünohistokimyasal Değerlendirilmesi

Formalin ile fiske edilmiş dokularda, mononükleer hücreler üzerindeki CD4, CD8, CD16, CD56 ve trofoblastların yüzeyinde HLA-G immünoekspresyonunu göstermek amacıyla streptavidin biotin peroksidaz immünohistokimya boyama yöntemi uygulandı.

Bu yöntemde, parafine gömülü dokulardan, pozitif şarjlı lamlara 3 µm kalınlığında kesitler alındı ve 37 °C’de bir gece deparafinize edildi, ardından üç ayrı ksilende beşer dakika bekletilerek deparafinizasyon tamamlandı. Kesitler iki ayrı %96’lık etanolden 10’ar dakikalık sürelerle geçirildi ve dokudaki endojen peroksidaz aktivitesi %3’lük hidrojen peroksit (metanolde çözünen) ile 20 dakika boyunca baskılandı. Distile su ile yıkamanın ardından, maskelenen antijenleri açığa çıkarmak amacıyla mikrodalga fırında 400 W güçte; CD8, CD16, CD56 ve HLA-G boyanacak kesitlere pH 6 Sitrat tampon çözeltisi, CD4 boyanacak kesitlere ise pH 8 EDTA çözeltisi uygulandı. Oda ısısında 20 dakika soğutulan lamalar iki ayrı fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile 5’er dakika yıkandı ve nonspesifik boyanmayı engellemek için dokulara 10 dakikalık protein blokajı (SensiTek HRP Anti-Polyvalent Lab Pack, ScyTek Laboratories, US) yapıldı. Blokajın ardından 1:50 dilüsyon oranında CD16

(clone 2H7; NCL-CD16, Novocastra, Leica), 1:100 dilüsyon oranında HLA-G (4H84, sc-21799, Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA) ve kullanıma hazır CD4 (RTU-CD4-1F6, Novocastra, Leica), CD8 (RTU-CD8-295, Novocastra, Leica), CD56 (NCAM) (RTU-CD56-1B6, Novocastra, Leica) antikorları damlatılarak oda ısısında 60 dakika inkübe edildi. Süre sonunda kesitler iki ayrı PBS ile 5'er dakika yıkandı ve biotinlenmiş sekonder antikorda (SensiTek HRP Anti-Polyvalent Lab Pack, ScyTek Laboratories, US) 10 dakika bekletildi. Yine PBS ile yıkamanın ardından streptavidin peroksidaz (SensiTek HRP Anti-Polyvalent Lab Pack, ScyTek Laboratories, US) damlatılarak tekrar 10 dakika inkübe edildi. Beşer dakikalık iki ayrı PBS ile yıkanan kesitlere 3,3'-diaminobenzidin (DAB) kromojeni damlatıldı ve 5 dakikalık inkübasyon sonunda boyanma kontrol edildi. Distile su ile yıkanan kesitlere Mayer Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı ve etanolden geçirilerek dehidrate edildi. Uygun kapama maddesi ile kapatılan kesitler ışık mikroskobunda değerlendirildi.

Işık mikroskobu altında CD4, CD8, CD16 ve CD56 antikorları ile boyanan hücrelerin değerlendirilmesi için, birbirini takip eden 10 adet büyük büyütme alanındaki boyanan hücreler sayıldı ve bir büyük büyütme alanına düşen hücre sayısı belirlendi. Trofoblastların HLA-G antikoruna boyanmasının değerlendirilmesi için, ışık mikroskobu altında tüm alanlar tarandı ve HLA-G antikoruna boyanan trofoblastların sayısı ve boyanma yoğunluğuna göre 4 sınıfa ayrıldı (149) (tablo 9).

Tablo 9: Trofoblastlarda HLA-G ile boyanma sınıflaması

Boyanma derecesi	Boyanma yoğunluğu
0	Boyanma yok
+	Trofoblastların <%5'inde boyanma
++	Trofoblastların <%50'sinde boyanma
+++	Trofoblastların >%50'sinde boyanma
++++	Trofoblastların >%95'inde boyanma

3.4. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 14.0 programı kullanılarak yapıldı. Frekans, yüzde, ortalama ve standart sapma gibi tanımlayıcı istatistiksel metodların yanı sıra nicel verilerin grup ortalama karşılaştırmasında hasta ve kontrol grubu karşılaştırılırken Mann-Whitney U testi, hastalar ve kontrol grubu kendi içinde karşılaştırılırken Wilcoxon testi kullanıldı. Sonuçlar %95'lik güven aralığında, anlamlılık $p<0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

4.BULGULAR

4.1.Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri

Çölyak hastalığı tanısıyla diyet tedavisi almakta olan 8 gebe, hasta grubunu oluşturmak üzere çalışmaya alındı. Gebeliğini komplikasyonsuz olarak tamamlamış, kronik hastalık öyküsü olmayan 8 gebe ise kontrol grubunu oluşturmak üzere çalışmaya alındı. Hasta grubunda çölyak hastası olan gebelerin hepsi glutensiz diyetle uyum gösteren hastalardı. Sadece bir gebenin 1. ve 2. trimesterinde diyetine tam olarak uymadığı öğrenildi. Çölyak gebe grubundaki 2 olgunun 2 kez, kontrol grubundaki 2 olgunun ise 1 kez düşük öyküsü mevcuttu.

Olguların hepsinin doğum sırasında serum anti-tTG IgA antikorlarına ve total IgA düzeyine bakıldı. Hasta grubunda bulunan olgulardan birinin anti-tTG antikorları normalin üst seviyesinin 2 katı yüksek olduğu saptandı ve bu hastanın gebeliğinin ilk dönemlerinde glutensiz diyetle uymadığı, son trimesterde ise tam diyet yaptığı öğrenildi. Hasta grubunda bulunan diğer olgularda ve sağlıklı kontrollerde anti-tTG IgA antikorları negatif saptandı.

Hasta grubundaki olguların yaş ortalaması 33 ± 5.5 yaş (25-42 yaş), kontrol grubunda bulunan olguların yaş ortalaması 29.7 ± 2.3 yaş (28-34 yaş) idi. İki grup arasında yaş ortalamaları açısından anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0.1$). Çalışmaya alınan çölyak hastalığı olan gebeler 38.5 ± 0.7 gestasyonel haftada, kontrol grubundakiler ise benzer şekilde 38.3 ± 0.5 gestasyonel haftada sezeryan yoluyla doğum yaptılar ($p=0.73$). Hasta grubunda doğan bebeklerin doğum tartılarının ortalaması 3218.1 ± 374.8 gram (2685-3800 gr), kontrol grubunda ise 3317 ± 561.6 gram (2700-4395 gr) idi ve iki grup arasında doğum tartı ortalaması açısından anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0.75$).

4.2. Plasentanın İmmünohistokimyasal Boyama Sonuçları

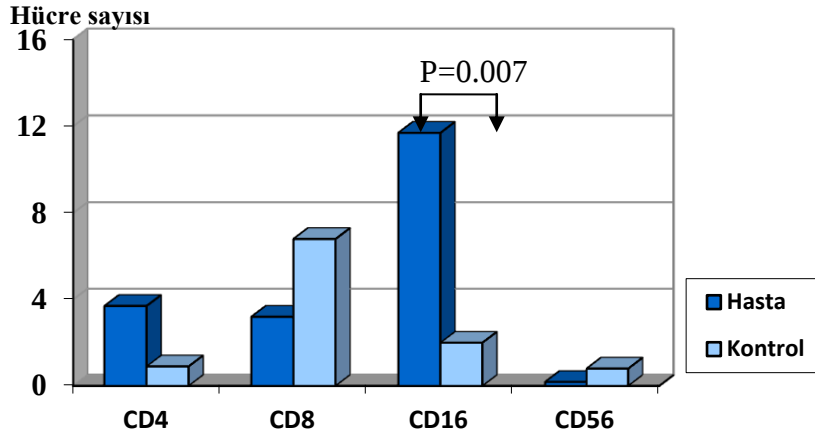
Plasentadan alınan doku kesitleri CD4, CD8, CD16, CD56 ve HLA-G antikorları ile boyandı. Desidual lökositler CD4, CD8, CD16 ve CD56 antikorları ile boyanarak değerlendirildi. Hasta ve kontrol grubunda desidual lökositlerin immünohistokimyasal boyama sonuçları Tablo 10'da sunulmuştur. Çölyak hastalarının desiduasında CD16+ boyanan hücre sayısı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptandı ($p=0.007$). Desidual lökositler içerisinde $CD4^+$, $CD8^+$, $CD56^+$ boyanan hücreler arasında ise iki grup arasında fark saptanmadı ($p>0.05$) (şekil 7).

Tablo 10: Desidual lökositlerin immünohistokimyasal boyanması

Desidual lökositler (BBA *)	Hasta Grubu (n=8)	Kontrol Grubu (n=8)	Fx^2
CD4	3.7±4.4	0.9±0.4	0.38
CD8	3.2±4.3	6.8±2.8	0.13
CD16	11.7±7.5	2±0.6	0.007
CD56	0.1±0.4	0.8±1.4	0.16

* Büyük büyütme alanındaki hücre sayısı

Fx^2 : Mann Whitney U test



Şekil 7: Desidual lökositlerin immünohistokimyasal boyama sonuçları

Desiduada ve koryon villuslarda bulunan trofoblastların HLA-G ekspresyonunun değerlendirilmesi için plasenta kesitleri HLA-G antikoruna boyandı. Desidua ve koryon villus trofoblastlarında HLA-G ekspresyonu açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (tablo 11) ($p>0.05$).

Tablo 11: Desidua ve koryon villuslarda trofoblastların HLA-G ekspresyonu

HLA-G ekspresyonu*	Hasta Grubu (n=8)	Kontrol Grubu (n=8)	Fx^2
Desidua trofoblastları	2.6±0.5	2.2±0.7	0.32
Koryon villus trofoblastları	2.1±0.3	1.5±0.5	0.06

* HLA-G ekspresyonu yoğunluk derecesi
 Fx^2 : Mann Whitney U test

4.3.Plasentadan izole edilen lenfositlerin subgrup analizi

Hasta ve sağlıklı kontrol grubundan izole edilen mononükleer hücrelerin, yüzeyinde eksprese edilen CD3, CD4, CD8, CD16 ve CD56 belirteçleri akım sitometri cihazı ile bakılarak T, NK ve NK-T hücre subgrupları yüzde olarak belirlendi. İki grup arasında T hücreleri alt grupları, NK ve NK-T hücre yüzdeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$) (Tablo 12).

Tablo 12: Plasentadan izole edilen lenfosit alt gruplarının hasta ve kontrol gruplarına göre dağılımı

Lenfosit subgrubu (%)	Hasta grubu (n=8)	Kontrol grubu (n=8)	Fx^2
CD3 T lenfosit	28.8±17.2	39.1±22.2	p=0.32
CD4 T lenfosit	14.5±8.7	13.2±10.2	P=0.72
CD8 T lenfosit	7.4±4.2	10.5±7.8	P=0.50
NK hücre	31.1±7.3	25.1±12.9	P=0.23
NK-T hücre	13.2±8.4	17.8±11.1	P=0.50

Fx^2 :Mann Whitney U

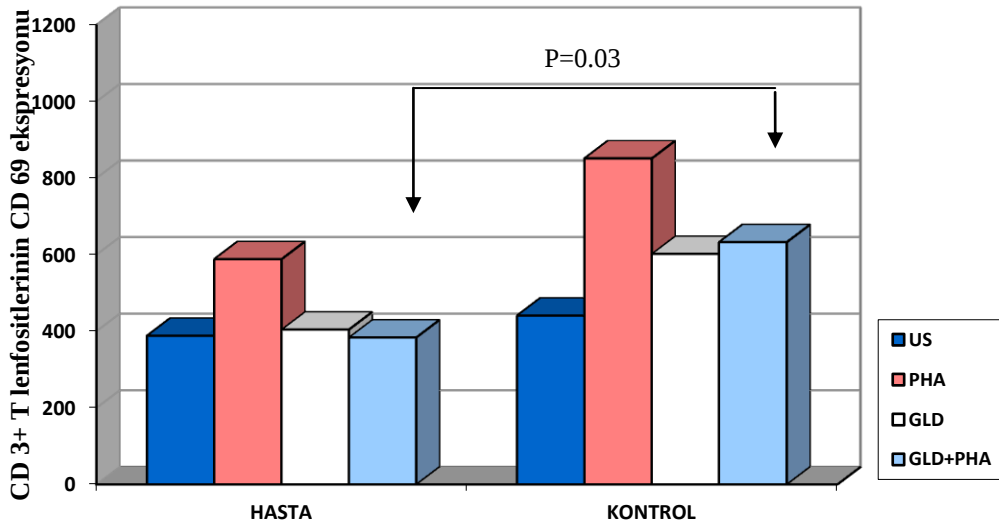
4.4. Plasentadan izole edilen mononükleer hücrelerin antijenik uyarıya cevabı (CD69 yüzey aktivasyon belirteci)

Hasta ve sağlıklı kontrol olgularından izole edilen mononükleer hücreler 250 µg pt-gliadin, 10 µg/ml PHA, pt-gliadin + PHA ile uyarıldı ve 72 saat sonunda CD3⁺ T hücre, NK hücre ve NK-T hücre popülasyonlarında aktivasyon molekülü olarak eksprese edilen CD69 yüzey belirteci akım sitometri cihazı ile ölçüldü. Kontrol grubunda CD3⁺ T hücrelerin CD69 aktivasyon belirteci, pt-gliadin + PHA uyarımı sonrasında hasta grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı arttığı izlendi (p=0.038) (şekil 8) ancak CD3⁺ T hücrelerin gliadin veya PHA uyarımı sonrasında CD69 yüzey belirteci ekspresyonu açısından iki grup arasında istatistiksel bir fark saptanmadı (Tablo 13).

Tablo 13: CD3⁺ Tlenfositlerin uyarım sonrası CD69 ekspresyonu

CD 3+ Tlenfosit uyarımı	Hasta grubu (MFI)	Kontrol grubu (MFI)	Fx ²
US (uyarımsız)	387.8±93.6	440.7±177.3	0.64
PHA	588±434.7	851±568.6	0.32
Gliadin	404±120.3	601.6±245.9	0.13
Gliadin+PHA	383.3±38.6	632.3±250.2	0.03

Fx2: Man Whitney U test



Şekil 8: T lenfositlerin uyarım sonrasında CD69 ekspresyonu

NK (tablo 14) ve NK-T (tablo 15) hücrelerinin uyarımı sonrasında hasta ve kontrol grupları arasında CD69 yüzey molekülü ekspresyonu açısından anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).

Tablo 14: NK hücrelerin uyarım sonrası CD69 ekspresyonu

NK hücrelerin uyarımı	Hasta grubu (MFI)	Kontrol grubu (MFI)	Fx^2
US (uyarımsız)	318.8±78.3	281.6±157.8	0.38
PHA	312.1±108.7	325.8±182.9	1
Gliadin	497±184.8	583.3±230.9	0.27
Gliadin+PHA	434.2±71.5	519.6±195.9	0.19

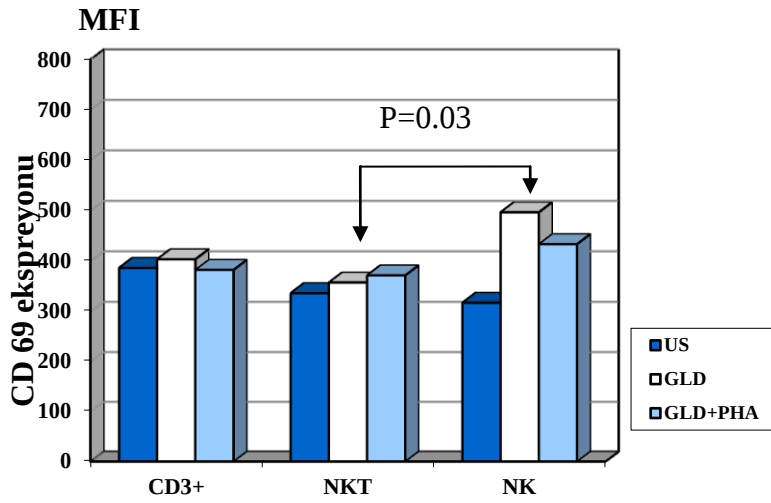
Fx^2 : Man Whitney U test

Tablo 15: NK-T hücrelerin uyarım sonrası CD69 ekspresyonu

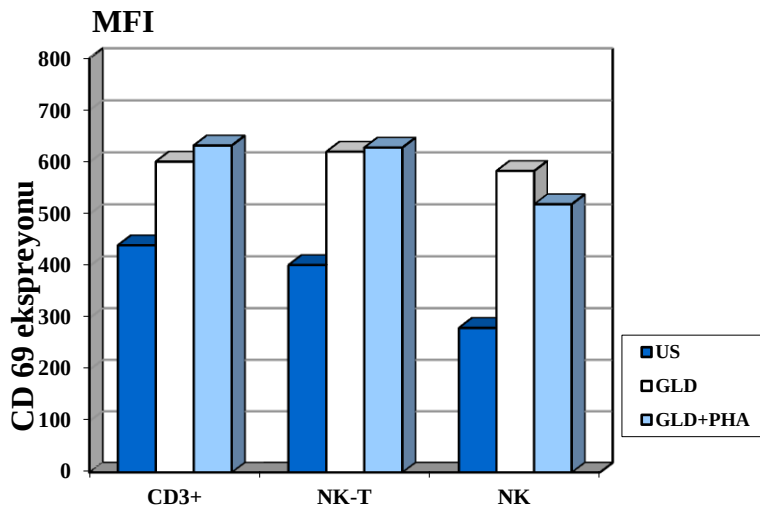
NK-T hücrelerin uyarımı	Hasta grubu (MFI)	Kontrol grubu (MFI)	Fx^2
US (uyarımsız)	337.1±103.7	402.7±159.6	0.44
PHA	526.7±394.3	725.7±413.9	0.08
Gliadin	358.1±41.4	620.7±267.6	0.06
Gliadin+PHA	372.8±33.4	628.6±242.5	0.06

Fx^2 : Man Whitney U test

Hasta grubunda uyarım sonrasında $CD3^+$ T lenfositleri ve NK-T hücrelerinin CD69 ekspresyonunda anlamlı bir artış saptanmadı ($p>0.05$). NK hücrelerinin uyarımı sonrasında ise CD69 ekspresyonunda anlamlı bir artış izlendi ($p<0.05$). pt-gliadin ile uyarım sonrasında NK hücrelerin CD69 ekspresyonu, NK-T hücrelerine göre anlamlı derecede arttığı görülmektedir ($p=0.03$) (şekil 9). Kontrol grubunda plasental $CD3^+$ T hücre, NK ve NK-T hücrelerin pt-gliadin, pt-gliadin+PHA uyarımı sonrasında üç hücre grubunda da CD69 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış izlenmiştir (şekil 10).



Şekil 9: Hasta grubunda $CD3^+$, NK ve NK-T hücrelerin CD69 ekspresyonu



Şekil 10: Kontrol grubunda $CD3^+$, NK ve NK-T hücrelerin CD69 ekspresyonu

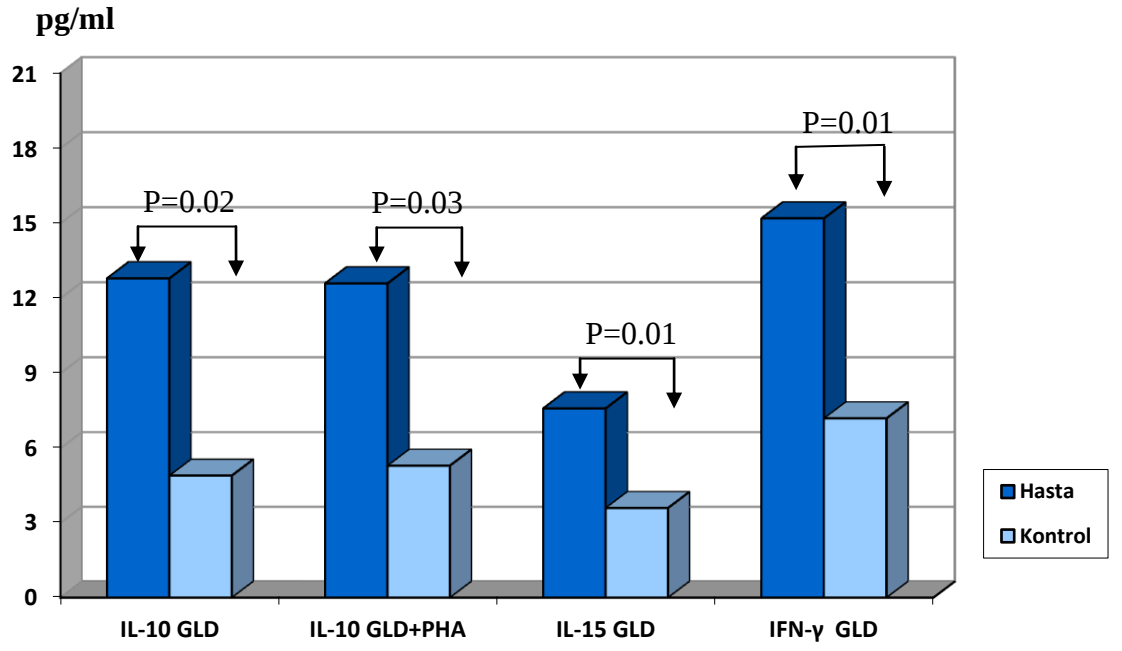
4.5. Placentadan izole edilen mononükleer hücre kültüründe salgılanan sitokin düzeyleri

Placentadan izole edilen mononükleer hücreler pt-gliadin, PHA, pt-gliadin+PHA ile uyarıldıktan sonra salgıladıkları IL-4, IL-10, IL-15, IL-17, IFN- γ sitokin ve sHLA-G seviyeleri kültür süpernetanlarından ELISA yöntemi ile ölçüldü. Kültür süpernetanlarından salınan sitokin seviyeleri tablo 16'da sunulmuştur. Hasta ve kontrol grubu arasında IL-4, IL-17 ve sHLA-G salınımı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$). Hasta grubunda pt-gliadin ve pt-gliadin+PHA ile uyarıldıktan sonra salınan IL-10 seviyesinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış saptandı ($p=0.02$ ve $p=0.03$). Yine hasta grubunda gliadin ile uyarımı sonrasında salınan IL-15 ve IFN- γ seviyelerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı ($p=0.01$ ve $p=0.01$) (şekil 11).

Tablo 16: Kültür süpernetanlarında salgılanan sitokin seviyeleri

Sitokin (pg/ml) *(ng/ml)	Gliadin uyarımı			Gliadin+PHA uyarımı		
	Hasta	Kontrol	Fx^2	Hasta	Kontrol	Fx^2
IL-4	6.4±12.1	0.0	0.44	9.2±19.4	0.0	0.44
IL-10	12.8±11.1	4.9±5.8	0.02	12.6±12.4	5.3±7.2	0.03
IL-15	7.6±5.7	3.6±2.7	0.01	7.4±6.7	4.5±5.1	0.23
IL-17	42.1±36.2	19.5±18.5	0.13	41.7±50.5	24.9±31	0.19
IFN- γ	15.2±11.4	7.2±5.5	0.01	14.8±13.5	9±10.2	0.23
sHLA-G*	0.0	0.0	1	0.0	0.0	1

Fx^2 : Man Whitney U test



Şekil 11: Hasta ve kontrol grubunda uyarım sonrası salınan IL-10, IL-15 ve IFN- γ düzeyleri

5. TARTIŞMA

Çölyak hastalığı toplumun %1'ini etkileyen kronik otoimmün bir hastalıktır (13). Hastalık glutenli gıdaları almaya başladıktan sonra, erken çocukluk

döneminden erişkin yaşa kadar değişik zaman dilimlerinde ortaya çıkabilmektedir. Çölyak hastalığı semptomatik (aktif), sessiz ve latent olmak üzere 3 klinik tipe ayrılır. Son yıllarda semptomatik çölyak hastalarına göre daha yüksek oranda, sessiz ve latent çölyak hastalığı olarak sınıflandırılan asemptomatik hastaların olduğu ve asemptomatik hastaların semptomatik olanlara göre 7 kat fazla olduğu bildirilmektedir (15). Semptomatik olan hastalar gastrointestinal sistem bulgularının görüldüğü klasik bir tablo veya gastrointestinal sistem dışı bulguların ön planda olduğu atipik bir tablo ile karşımıza gelebilir.

Gastrointestinal sistemde gliadine karşı gelişen immünolojik reaksiyonlar sonucunda iştahsızlık, kronik ishal, kusma, karın ağrısı, abdominal distansiyon, büyüme geriliği gibi klasik klinik bulgular ortaya çıkmaktadır. Yeni tanı alan çocukluk çağındaki çölyak hastalarının %50'si, erişkin hastaların 2/3'ü tedaviye dirençli demir eksikliği anemisi, izole boy kısalığı, sebebi açıklamayan transaminaz yüksekliği, kronik hepatit, osteopeni, spontan kemik kırıkları, jinekolojik sorunlar, nörolojik ve psikiatrik bozukluklar gibi gastrointestinal sistem dışı bulgularla belirti vermektedir (5). Son yıllarda çölyak hastalığının gastrointestinal sistem dışı bulguları ve bunların mekanizmasına yönelik çalışmalar literatürde yer almaya başlamıştır (127,129-132). Gastrointestinal sistem dışı bulgulardan biri olan reproduktif sistem üzerine etkilere yönelik 1970'li yıllardan bu yana yapılan epidemiyolojik ve klinik çalışmalarda, diyetine uymayan hastalarda gecikmiş menarş, amenore, erken menapoz, infertilite, tekrarlayan düşükler, hamilelikle ilgili problemlerin görüldüğü bildirilmiştir (6,7,107).

Reproduktif dönemde görülen problemlerin mekanizmasına yönelik çalışmalar ise daha çok 2000'li yılların ortasından itibaren yayınlanmaya başlamıştır. Diyetine uymayan çölyak hastası gebelerin plasentalarında yoğun gliadin birikimi olduğu, yine bu gebelerde diyetine uyan çölyak hastası ve sağlıklı gebelere göre trofoblastlarda bir apoptoz göstergesi olan Fas-L ekspresyonunun yüksek, bu gebelerden doğan bebeklerin ağırlıklarının ise düşük olduğu saptanmıştır (127). Fetusun gelişimi için gerekli olan hormonları ve protein yapısındaki molekülleri sentezleyen plasantanın uterus duvarına tutunmasını sağlayan trofoblastların, gliadinin oluşturduğu inflamatuvar ortamda apoptoza uğraması sağlıklı bir gebeliğin

devamlılığına engel olabileceği gibi prematüre, IUGR veya düşük ağırlıklı bebek doğumu gibi problemler de yol açabilir.

Tedaviye uyumsuz çölyak hastalarının serumlarından elde edilen anti-tTG antikorları sağlıklı gebe plasentaları ile inkübe edildiğinde, bu antikorların plasentanın maternal yüzeyinde bulunan (sinsitiotrofoblast mikrovillus membranındaki) transglutaminaz 2 enzimine bağlanarak fonksiyonunu inhibe ettiği, trofoblastlarda bir apoptoz belirteci olan annexin-5 ekspresyonunun arttığı ve trofoblastların uterus duvarına invazyonunun azaldığı gösterilmiştir (129,130). Yine anti-tTG antikorlarının endometrium epitel hücrelerine bağlanarak yeni damar oluşumunu ve damar gelişimini bozduğu gösterilmiştir (131). Transglutaminaz-2 birçok doku ve hücre yüzeyinde eksprese edilen bir enzim olup, plasentada trofoblastlarda, fibroblastlarda ve sinsityotrofoblast mikrovillüs membranında da bulunmaktadır (128). Proteinlerin birbirlerine bağlanmasını katalize ederek hücre farklılaşması ve büyümesi, doku tamiri, granülasyon dokusu oluşumu, angiogenez gibi birçok önemli reaksiyonda işlevi olan bu enzimin inhibisyonu ile hücre çoğalması, adhezyonu, göç ve invazyonu etkilenerek plasentanın tam olarak fonksiyonunu yerine getirememesine neden olur (129). Plasentanın gelişebilmesi ve fonksiyonu için ekstravillöz trofoblastların maternal desidua tabakasına invazyonu ve damarsal yapılarının gelişmesi gereklidir. Çölyak hastalarının serumlarında bulunan anti-tTG antikorlarının transglutaminaz-2 enzimini inhibe edip, trofoblastik aktiviteyi bozarak veya trofoblast apoptozuna neden olarak gebeliğin erken dönemlerinde fetal kayıba, ilerleyen dönemlerinde ise prematüre, IUGR veya düşük ağırlıklı bebek doğumu gibi problemlere yol açtığı düşünülmektedir (129,130). Tüm bu veriler, diyet tedavisine uyumsuz çölyak hastalarında hamilelik ve yenidoğanla ilgili olup sadece malnütrisyon ile açıklanamayacak problemlerin, plasentada gliadine bağlı olarak oluşan immünolojik hasara bağlı olarak geliştiğini göstermektedir.

Desidua, maternal ve fetal hücrelerin temas halinde olduğu plasentanın maternal bölümüdür. Fetal toleransta ve trofoblastik invazyonunun kontrolünde stromal hücreler, uterusun natural killer hücreleri (uNK), lenfosit, monosit ve epitel hücrelerden oluşan desidua hücreleri önemli rol oynarlar. Desiduada bulunan T lenfositleri ve NK hücreleri antijenik uyarı sonrasında Th1 veya Th2 sitokinleri salgılar. Gebeliğin oluşması ve devamı için fetusun semiallograft olarak kabul

edilmesini sağlayacak Th2 immün yanıtın baskın olduğu bir ortama ihtiyaç vardır. Silano ve ark. (132), diyet tedavisine uyumlu gebe çölyak hastalarının plasentasından elde ettikleri decidua hücrelerini gliadin ile inkübe ettiklerinde Th1 baskın bir immün yanıt geliştiğini gözlemişlerdir. Çölyak hastalarında gliadinin gebelik için zararlı Th1 immün yanıtı uyarması, diyet tedavisine uymayan gebe çölyak hastalarında görülen problemlerin immünolojik temelini destekler niteliktedir.

Çalışmamızda çölyak hastası gebeler glutensiz diyet tedavisine uyan ve serolojik olarak da diyet uyumları teyid edilmiş hastalardı ve tümü 38-40. gestasyonel haftada komplikasyonsuz olarak doğum yaptılar. Bebeklerin doğum tartısı kontrol grubundaki bebeklerden farklı değildi. Doğum şeklinin desidual lökosit dağılımında özellikle NK hücre ve T hücre alt gruplarında değişikliğe neden olduğu gösterilmiştir (150). Çalışmamızda desidual hücre dağılımında doğum yönteminden kaynaklanacak farklılıkların olmaması için çalışma grubundaki hasta ve sağlıklı gebelerin aynı yöntemle doğum yapmış olmasına dikkat edildi.

Sağlıklı bir gebelikte, implantasyondan itibaren ikinci trimestera değin desidual lökositlerin %70'ini $CD56^{bright}CD16^{-}$ NK hücreleri, kalanını ise $CD14^{+}$ makrofajlar ve $CD3^{+}$ T lenfositleri oluşturur (138). Bu hücre dağılımı son trimesterde değişikliğe uğrar ve $CD56^{+}$ NK hücrelerin sayısı azalırken, $CD3^{+}$ T lenfositlerin sayısı artarak desidual immün hücrelerin çoğunluğunu oluşturur (151). Gebeliği sırasında preeklampsi ve hipertansiyon gibi problemleri olup, fetal büyüme geriliği olan bebek doğuran annelerin plasentalarında yapılan çalışmalar, desiduada $CD3^{+}$ T lenfositleri, $CD19^{+}$ B lenfositleri, $CD14^{+}$ makrofajlar ve $CD56^{+}$ NK hücre sayılarının azaldığını, $CD16^{+}$ NK hücrelerinin ise arttığını göstermektedir (143,152,153). Bunun plasentaya lökosit infiltrasyonun azalması veya desiduada lökosit kompozisyonun bozulmasından kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (152). Desiduada bulunan lökosit dağılımındaki bu farklılıkların lokal sitokin ve vazoaaktif mediatörlerin salınımını değiştirerek, plasental vasküler yapıyı bozduğu, vazokonstrüksiyona yol açtığı düşünülmektedir (152). Tüm bu süreç sonuçta erken doğum, düşük ağırlıklı veya fetal büyüme geriliği olan bebek doğumu gibi problemlere zemin hazırlamaktadır.

Çalışmamızda çölyak ve kontrol gebe plasentalarında, desiduada T lenfositler ve NK hücreleri akım sitometrisi ile değerlendirildiğinde, hücre dağılımı

açısından hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel bir fark saptanmadı. Ancak $CD16^+CD56^+$ NK hücreleri hasta grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek oranda, $CD3^+T$, $CD8^+T$ lenfositleri ve $CD3^+CD16^+CD56^+$ NK-T hücreleri ise daha düşük oranda saptandı. Çalışmamızda çölyak hastalarındaki desidual lenfosit dağılımı açısından saptanan (istatistiğe yansımayan) bu farklılıklar, diğer sorunlu gebeliklerde örneğin preeklampsi veya fetal büyüme geriliği olan gebelerin plasentasında gösterildiği gibi desidual lökosit kompozisyonunun bozulmasına sekonder olarak geliştiği düşünüldü. Bu değişikliğin istatistiğe yansımama nedeni ise çalışmaya alınan çölyaklı gebelerin tümünün en az 5 yıldır sıkı bir glutensiz diyet tedavisi uygulayan hastalardan oluşması ve bu nedenle hastaların glutene maruz kalmamalarıyla açıklanabilir. Grubumuzda diyetine uymayan çölyaklı gebe bulunmadığından yoğun gluten maruziyetinin plasental hücre dağılımı üzerine etkisi konusunda ise yorum yapmak mümkün değildir.

İlk trimesterde desidual lökositlerin %70'ini $CD56^{bright}CD16^-$ NK hücreleri oluşturur. Bu hücrelerin sitotoksik etkisi düşüktür ve salgıladıkları sitokinler ile gebeliğin oluşmasına ve devamına yardımcı olurlar. Daha sitotoksik etkisi olan $CD56^{dim}CD16^+$ NK hücreler ilk trimesterde çok düşük orandayken, son trimesterde bunların oranı artar (152). Desidual NK hücrelerinin, feto-maternal alanda $Th1/Th2$ immün yanıt dengesinin korunmasında önemli fonksiyonları bulunmaktadır (139). Sitotoksik etkili NK hücreleri, plasentada enfekte hücreleri yok ederek, plasentayı aşırı lökosit cevabından korur. Diğer taraftan plasentadaki $CD16^+$ NK hücre sayısı ve aktivitesinin artmasıyla immünolojik denge bozularak sağlıklı gebelik ve fetal gelişim için olumsuz bir ortam oluşur. Tekrarlayan düşükleri olan hastalarda ve preeklampsi gebelerin, gerek periferik kanında gerekse 3. trimester desidua örneklerinde yapılan incelemeler, klasik sitotoksik NK hücre ($CD16^+$) sayısının arttığını göstermektedir (153-155). Desiduada $CD56^{bright}CD16^-$ NK hücreleri ile sitotoksik $CD16^+$ NK hücreleri arasındaki dengenin bozulması sonucunda değişen sitokin profili, damar gelişimi ve trofoblast invazyonunun yanı sıra normal gebelikte hakim olan $Th2$ immün yanıtı da olumsuz yönde etkileyerek, sağlıklı gebelik için gereken ortam bozulur. Çalışmamızda desidual lökositleri immünohistokimyasal boyama ile değerlendirdiğimizde, sitotoksik $CD16^+$ NK hücrelerinin çölyak hasta plasentasında kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı saptanmıştır. $CD4^+$,

CD8⁺ lenfosit ve CD56⁺ NK hücreleri açısından iki grup arasında bir fark saptanmadı. Hipertansiyon veya preeklampsi gibi gebeliği tehdit eden patolojik durumlarda artan CD16⁺ NK hücreleri, çalışmamızda literatürde daha önce hiç çalışmamış olan çölyaklı gebelerde araştırıldı. Literatürde ilk kez çölyaklı gebelerde sıkı glutensiz diyet tedavisine rağmen, plasental hücre kompozisyonunun sağlıklı gebelerden farklı olduğu gösterildi ve gebelik için zararlı etkileri olabilen CD16⁺ NK hücre oranının çölyaklı gebe plasentasında sağlıklı gebelere göre daha yüksek oranda bulunduğu yine çalışmamızda ilk kez ortaya konuldu.

Çalışmamızda plasental hücre kompozisyonunu değerlendirmede akım sitometresi ve immünohistokimyasal boyama yöntemi bir arada kullanıldı. İki yöntemin uygulama farklılıkları ve teknik avantajları ya da dezavantajları olmakla beraber, bu şekilde plasental hücre kompozisyonu hakkında daha sağlıklı veri elde edilebileceği düşünüldü. Akım sitometresi ile yapılan değerlendirmede, plasentanın desidual tabakasından izole edilen hücreler gebenin periferik kanı veya kordon kanı ile kontamine olma ihtimali olabileceğinden, çalışmamızda kontaminasyonu en aza indirebilmek için, hücre izolasyonundan önce plaseenta dikkatli bir yıkama işleminden geçirildi. İmmünohistokimyasal inceleme ise dokuda bulunan hücre kompozisyonunu boyama özelliklerine dayanarak gösteren bir yöntemdir. Çalışmamızda, immünohistokimyasal değerlendirmede CD16⁺ NK hücre sayıları, çölyak hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptandı ve bu sonuç akım sitometresiyle yapılan incelemede de CD16⁺ NK hücrelerinin hasta plasentasında daha yüksek oranda bulunduğunu gösterdi.

Hücre kültürleri nonspesifik ve spesifik antijenle uyarılarak, lenfosit aktivasyonunu gösteren CD69 yüzey belirtecinin ekspresyonu akım sitometresi ile değerlendirildiğinde, pt-gliadin-PHA ile uyarı karşısında kontrol grubuna ait CD3⁺ T lenfositlerin yüzeyinde CD69 ekspresyonundaki artışın çölyak hastalarına göre anlamlı oranda yüksek olduğu saptandı. Çölyaklı hastalardan izole edilen CD3⁺ T lenfositler nonspesifik antijen ile uyarıldığında cevap alınırken, gliadin ile uyarıya cevap alınamadı. Aynı hücre kültürleri gliadin ve nonspesifik antijen kombinasyonu ile uyarıldığında cevap alınamaması, çölyaklı hasta plasentasından izole edilen CD3⁺ T lenfositlerde gliadine spesifik bir duyarsızlık olduğunu düşündürdü. Bu kronik enfeksiyonlarda görülen T hücre tükenmişliği ile açıklanabilir. Kronik

enfeksiyonlarda olduğu gibi bazı spesifik antijenlere uzun süre maruz kalan T hücreleri fonksiyonlarını progresif olarak kaybettiği bildirilmektedir (156,157). T lenfositlerin tükenmişliği olarak adlandırılan bu durumda, T hücreleri kronik olarak maruz kaldığı spesifik antijene yeterli immün cevap veremediğinde enfeksiyon veya inflamasyon kontrol altına alınamayabilir (156,158).

Çölyak hastalarında plasentadan izole edilen hücreler uyarıldığında $CD3^+$ T lenfositleri ve NK-T hücreleri aktive olmazken, NK hücreleri hem sayısal olarak anlamlı bir artış gösterdi hem de $CD3^+$ T ve NK-T hücrelerine göre NK hücreleri daha çok aktive oldular. Çölyak hastalığında gliadine karşı bağırsak epitelinde gelişen immünolojik reaksiyonlarda, $CD4^+$ ve sitotoksik T lenfositlerin önemli rolü vardır. Buna karşılık gebeliğin oluşması ve devamı için önemli olan NK hücrelerinin, plasentada gliadine karşı gelişen immünolojik reaksiyonda da, T lenfositlere göre daha etkin rolü olduğunu göstermektedir (4,37,133,134).

Gebelikte fetusun sağlıklı gelişimi için uygun olan tolerans ortamı baskın Th2 ve azalmış Th1 immün yanıt ile sağlanabilir. Th1 immün yanıt sonucu salınan sitokinler trofoblast apoptozuna neden olarak plasental yetmezliğe, trofoblast invazyonunu engelleyerek düşüğe neden olabileceği gibi dolaylı olarak da sağlıklı fetal gelişim için uygun olmayan bir ortam oluşturur. Th2 sitokinler ise trofoblastların proliferasyonunu ve invazyonunu arttırarak maternal endokrin fonksiyonları düzenler (143,144,159). Preeklampsisi olan gebe plasentalarında yapılan çalışmalar, gebelik ve fetus için risk oluşturan IFN- γ 'nın (Th1 sitokini) daha fazla, IL-6 ve IL-10 gibi Th2 sitokinlerin ise sağlıklı kontrollere göre daha az salgılandığını göstermektedir. (143,153). Çalışmamızda gliadinle uyarım sonrasında desidual lökosit kültürlerinde IFN- γ , IL-15 ve IL-10 sitokinleri çölyak hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak fazla salgılandığı saptandı. Gebeliğin devamı ve fetal gelişim için zararlı Th1 sitokini olan IFN- γ , aktive T lenfositlerden ve desidual NK hücrelerinden salınır. Hem NK hücrelerin hem de T lenfositlerin maturasyonu ve stimülasyonunu sağlayan IL-15, plasenta dahil bir çok doku ve immün hücre tarafından salgılanan bir sitokindir (160). Çalışmamızda desidüadan izole edilen lökositlerin gliadin ile stimülasyonu sonucu, IFN- γ ve IL-15'in kontrol grubuna göre çölyaklı gebelerde artması literatürle uyumlu olarak çölyaklı gebe plasentasında artmış Th1 immün yanıtı göstermektedir.

T, B lenfositleri, NK hücreleri, fagositik ve dendritik hücrelerden salınan IL-10, hem Th1 hem de Th2 fonksiyonu gösteren bir sitokindir. IL-10'nun NK hücreleri, T lenfositleri, dendritik ve fagositik hücrelerin fonksiyonunu baskılama, antijen sunan hücrelerin antijen sunumunu engelleme gibi immünsupresif etkilerinin yanında, sitotoksik T lenfositlerinin olgunlaşması, B hücre aktivasyonu, fagositik ve dendritik hücrelerde T lenfosit reseptörlerinin aktivasyonu gibi immünstimülan etkileri de bulunmaktadır (161). Romatoid artriti ve geçmiş tipte inek sütü alerjisi olan hastaların duodenumundan izole edilen lenfositlerden, IL-10 salınımının arttığı ve bunun mukozal inflamasyonun bir göstergesi olduğu bildirilmiştir (162,163). Çölyak plasentasından izole edilen hücreler gliadinle uyarıldığında Th1 sitokinlerinin (IFN- γ ve IL-15) artmasının yanı sıra IL-10 salınımındaki artış, çölyaklı gebe plasentasında gliadinin Th1 immün yanıtı baskın hale getirdiğini destekler yöndedir.

Th2 sitokini olan IL-4, NK hücre aktivitesini kontrol ederek, NK hücrelerinin trofoblast hasarını engeller (159). Preeklampsisi, hipertansiyonu olan gebe plasenta çalışmalarında, IL-4 salınımı açısından sağlıklı kontrol plasentaları ile arada fark olmadığı bildirilmiştir (153). Çalışmamızda literatürle uyumlu şekilde, IL-4 salınımı açısından çölyak ve sağlıklı gebe plasentaları arasında fark saptanmadı.

T lenfositleri, monosit, nötrofil ve mast hücrelerinden salgılanan IL-17'nin, trofoblast invazyonu ve plasental sitokin salgısı üzerinden gebelik için düzenleyici rolünün yanı sıra proinflamatuvar zararlı etkileri de vardır (164). Preeklampsi ve erken doğum eylemi olan gebelerin, periferik kan ve plasentalarında IL-17'nin sağlıklı kontrollere göre daha fazla salgılandığı ve bunun plasentada inflamasyonun bir göstergesi olduğu bildirilmiştir (165,166). Çalışmamızda IL-17 salınımı açısından gruplar arasında fark saptanmadı. Bunun nedeni, çalışma grubundaki çölyaklı gebelerin diyet tedavisine uymaları nedeniyle, yeterli gluten maruziyetinin olmaması sonucu T lenfositlerin Th17 lenfositlere dönüşmesini sağlayacak inflamatuvar ortamın olmamasıyla açıklanabilir. Çalışmamızda diyetine uymayan veya diyet tedavisi yapmayan çölyaklı gebe bulunmadığından bu konuda yorum yapmak mümkün değildir.

Gebelik süresince Th2 immün yanıtın idamesini sağlayan, CD56⁺ NK hücreleri ve trofoblastlarda HLA-G ekspresyonu gibi faktörler bulunmaktadır. Non-villöz trofoblast hücrelerin yüzeyinde bulunan HLA-G, T lenfositler ve maternal NK

hücrelerden sitokin salınımını etkileyerek, gebelikte baskın Th2 immün yanıtın korunmasına yardımcı olur. Non-villöz trofoblast hücre yüzeyinde HLA-G ekspresyonu, T lenfosit proliferasyonunu baskılayıp, trofoblast lizisini, NK hücrelerin plasentaya migrasyonunu engellediği düşünülmektedir (135,139,142). Non-villöz trofoblast hücrelerin yüzeyinde bulunan HLA-G'nin yanı sıra, maternal kan hücrelerinde ve amniyon sıvısında çözünür (soluble) sHLA-G formu da bulunmaktadır (134). sHLA-G, CD8⁺ T lenfosit apoptozunu ve CD4⁺ T lenfosit proliferasyonunu engelleyerek embriyonun rejeksiyonunu önleyecek immünsupresif bir ortam sağladığı ve böylece gebeliğin sağlıklı bir şekilde devam etmesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (133,134,137). Tekrarlayan düşük veya preeklampsili gebe plasentasında, trofoblastlarda HLA-G ekspresyonunu sağlıklı kontrollerle karşılaştıran çalışmalarda sonuçlar tartışmalıdır (167-169). Çalışmamızda immünohistokimyasal olarak trofoblastik HLA-G ekspresyonu ve ELISA yöntemiyle mononükleer hücre kültür süpernetanlarında sHLA-G sekresyonu değerlendirildiğinde, çölyak ve kontrol grupları arasında fark saptanmadı. Gebelik kompleks immün reaksiyonların gerçekleştiği ve fetusun semi-allograft olarak algılandığı bir süreçtir. Fetusun reddini engelleyen mekanizmalardan biri olan, ekstrasvillöz trofoblastlarda HLA-G ekspresyonu tekrarlayan düşük ve preeklampsili gebe plasentalarında araştırıldığında, çalışmamızda olduğu gibi hasta ve kontrol plasentaları arasında fark olmadığını bildiren yayınlar bulunmaktadır (167-169). Çalışmamızda hasta ve kontrol plasentalarında immünohistokimyasal boyama ile trofoblastik HLA-G ekspresyonun benzer bulunmasının nedeni, çalışma grubumuzdaki çölyaklı gebelerin diyet tedavisine uyumlu olmaları nedeniyle gliadin maruziyetinin olmamasıyla açıklanabilir.

Bu çalışmada edinilen bulgular çölyak hasta plasentasından izole edilen desidual lökosit kompozisyonunun sağlıklı kontrollerden farklı olduğunu ve hasta grubunda CD16⁺ NK hücrelerinin anlamlı olarak arttığını göstermektedir. Sitotoksik CD16⁺ NK hücre sayı ve aktivitesinin artması ve plasentada immünolojik dengenin bozulmasıyla sağlıklı gebelik ve fetal gelişim için olumsuz bir ortam oluşmaktadır. Desidual lökositlerin gliadinle uyarılması sonucu, sağlıklı kontrollerde CD3⁺ T lenfositler, NK ve NK-T hücrelerinin hepsi aktive olurken, çölyak plasentasında ise sadece NK hücreleri aktive edildi. Çölyaklı gebe plasentasından izole edilen CD3⁺ T

lenfositlerin nonspesifik antijenle uyarılabilmesine karşılık gliadine spesifik cevapsızlığı, kronik enfeksiyonlarda görülen ‘T lenfosit tükenmişliği’ ile açıklanabilir. Aktivasyon sonrası, çölyaklı hastalarda IFN- γ , IL-15 ve IL-10 gibi Th1 sitokinlerinde artışın yanı sıra, sağlıklı gebelik için olumsuz ortam oluşturan CD16⁺ NK hücrelerinin sayı ve aktivitesinde artış saptandı. Çölyaklı hastalarda gliadinle uyarı sonrası artan IFN- γ , IL-15 inflamatuvar sitokinler Th1 immün yanıtın kaynağının plasental NK hücreleri olduğu düşündürmüştür. Bu konuda daha ayrıntılı bilgi diyet tedavisi almayan veya diyetine uymayan çölyaklı gebe plasentasındaki immün yanıtın çalışmasıyla elde edilebilir.

6. SONUÇLAR

1. Glutensiz diyet tedavisine uyan 8 çölyak hastası gebe ve kontrol grubunu oluşturmak üzere 8 sağlıklı gebe toplam 16 gebe çalışmaya alındı.

2. Gebelerin tümü 38-40. gestasyonel haftada komplikasyonsuz olarak doğum yaptılar ve bebeklerin doğum tartısı açısından iki grup arasında fark saptanmadı.
3. Çölyak hasta plasentasından izole edilen desidual lökosit kompozisyonunun sağlıklı kontrollerden farklı olduğunu ve hasta grubunda CD16⁺ NK hücrelerinin anlamlı olarak arttığı saptandı.
4. Desidual lökositler gliadinle uyarıldığında kontrol grubunda CD3⁺ T lenfositler, NK ve NK-T hücreleri aktive olurken, çölyak plasentasında ise sadece NK hücreleri aktive olduğu görüldü.
5. İzole edilen desidual lökositlerin gliadinle uyarılması sonucunda salgılanan sitokin profiline bakıldığında, çölyaklı hastalara ait plasentada IFN- γ , IL-15 ve IL-10 sitokinlerinde artışın yanı sıra gebeliğin devamı için zararlı ortam oluşturan CD16⁺ NK hücrelerinin sayı ve aktivitesinde artış saptandı.

7.KAYNAKLAR

- 1- Hill ID, Dirks MH, Liptak GS, et al. Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2005; 40:1-19.

- 2- Dalgıç B, Sari S, Basturk B, Ensari A, Egritas O, Bukulmez A, Baris Z; Turkish Celiac Study Group. Prevalence of celiac disease in healthy Turkish school children. *Am J Gastroenterol* 2011; 106:1512-7.
- 3- Tack GJ, Verbeek WH, Schreurs MW, Mulder CJ. The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7:204-13.
- 4- Koning F, Schuppan D, Cerf-Bensussan N, Sollid LM. Pathomechanisms in celiac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005; 19:373-87.
- 5- Rampertab SD, Pooran N, Brar P, Singh P, Green PH. Trends in the presentation of celiac disease. *Am J Med* 2006; 119:355.
- 6- Bast A, O'Bryan T, Bast E . Celiac Disease and Reproductive Health. *Prac Gastroent* 2009 :10-21.
- 7- Freeman HJ. Reproductive changes associated with celiac disease. *World J Gastroenterol* 2010;16:5810-14.
- 8- Newton KP, Singer SA. Celiac disease in children and adolescents: special considerations. *Semin Immunopathol* 2012; 34:479-96.
- 9- Losowsky MS. A history of coeliac disease. *Dig Dis* 2008; 26:112-20.
- 10- 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 Pediatr* 1953; 42: 34-42.
- 11- Paulley JW. Observations on the aethiology of idiopathic steatorrhea; jejunal and lymph-nod biopsies. *Br Med J* 1954; 2:1318-21.
- 12- Howell MD, Aurtin RK, Kelleher D, Nepom GT, Kagnoff MF. An HLA-D region restriction fragment length polymorphism associated with celiac disease. *J Exp Med* 1986; 164:333-8.
- 13- Dubé C, Rostom A, Sy R, et al. The prevalence of celiac disease in average-risk and at-risk western European populations: a systematic review. *Gastroenterology* 2005; 128: 57–67.
- 14- Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, et al. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch Intern Med* 2003; 163:286–92.
- 15- Hill ID. Celiac disease – a never ending story. *J Pediatr* 2003;143:289-91.
- 16- Book L, Zane J, Neuhausen SL. Prevalance of celiac disease among relatives of sib pairs with celiac disease in U.S. families. *Am J Gastroenterol* 2003; 98:377-81.

- 17- Cummins AG, Roberts-Thomson IC. Prevalence of celiac disease in the Asia-Pacific region. *J. Gastroenterol Hepatol* 2009; 24:1347–51.
- 18- Malekzadeh R, Sachdev A, Fahid Ali A. Coeliac disease in developing countries: Middle East, India and North Africa. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005; 19:351-8.
- 19- Green PH, Cellier C. Celiac disease. *N Engl J Med* 2007; 357:1731-43.
- 20- Akobeng AK, Ramanan AV, Buchan I, Heller RF. Effect of breast feeding on risk of coeliac disease: a systematic review and meta-analysis of studies. *Arch Dis Child* 2006; 91:39–43.
- 21- Agostoni C, Decsi T, Fewtrell M, Goulet O, et al. Complementary feeding: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008; 6: 99-110.
- 22- Norris JM, Barriga K, Hoffenberg EJ et al. Risk of celiac disease autoimmunity and timing of gluten introduction in the diet of infants at increased risk of disease. *JAMA* 2005; 293:2343-51.
- 23- Scanlon SA, Murray JA. Update on celiac disease—etiology, differential diagnosis, drug targets, and management advances. *Clin Exp Gastroenterol* 2011; 4:297–311.
- 24- Stene LC, Honeyman MC, Hoffenberg EJ et al. Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study. *Am. J. Gastroenterol* 2006; 101:2333–40.
- 25- Kondrashova A, Mustalahti K, Kaukinen K, et al. Lower economic status and inferior hygienic environment may protect against celiac disease. *Ann Med* 2008; 40:223–31.
- 26- Mearin ML, Biemond I, Pena AS et al. (1983) HLA-DR phenotypes in Spanish coeliac children: their contribution to the understanding of the genetics of the disease. *Gut* 1983; 24:532–7.
- 27- Tjon JM, van Bergen J, Koning F. Celiac disease: how complicated can it get? *Immunogenetics* 2010; 62:641-51.
- 28- Green PH, Jabri B. Coeliac disease. *Lancet* 2003; 362:383-91.
- 29- Zhernakova A, van Diemen CC, Wijmenga C. Detecting shared pathogenesis from the shared genetics of immune related diseases. *Nat Rev Genet* 2009; 10:43-55.
- 30- Leonard WJ, Spolski R. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nature Rev Immunol* 2005; 5:688-98.
- 31- Salvati VM, MacDonald TT, Bajaj-Elliott M et al. Interleukin 18 and associated markers of T helper cell type 1 activity in coeliac disease. *Gut* 2002; 50:186-90.

- 32- Nilsen EM, Jahnsen FL, Lundin KE et al. Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. *Gastroenterology* 1998; 115:551-63.
- 33- Stepniak D, Koning F. Celiac disease--sandwiched between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol* 2006; 67: 460-8.
- 34- Kagnoff MF. Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *J Clin Invest* 2007; 117:41-9.
- 35- Fasano A, Not T, Wang W, et al. Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet* 2000; 355:1518-9.
- 36- Lorand L, Graham RM. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4:140-56.
- 37- Jabri B, Sollid LM. Tissue-mediated control of immunopathology in coeliac disease. *Nat Rev Immunol* 2009; 9:858-70.
- 38- Sollid LM, Molberg O, McAdam S, Lundin KE. Autoantibodies in coeliac disease: tissue transglutaminase guilt by association? *Gut* 1997; 41:851-2.
- 39- Matysiak-Budnik T, Moura IC, Arcos-Fajardo M et al. Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *J Exp Med* 2008; 205:143-54.
- 40- Wright-Browne V, McClain KL, Talpaz M, Ordonez N, Estrov Z. Physiology and pathophysiology of dendritic cells. *Hum Pathol* 1997; 28:563-79.
- 41- Fasano A, Shea-Donohue T. Mechanisms of disease: the role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases. *Nat Clin Prac Gastroenterol Hepatol* 2005; 2:416-22.
- 42- Torres MI, López Casado L, Rios A. New aspects in celiac disease. *World J Gastroenterol* 2007;13:1156-61.
- 43- Barone MV, Gimigliano A, Castoria G, Paoletta G et al. Growth factor-like activity of gliadin, an alimentary protein: implications for coeliac disease. *Gut* 2007; 56:480-88.
- 44- Van Heel DA, West J. Recent advances in coeliac disease. *Gut* 2006; 55:1037-46.
- 45- Sollid LM, Jabri B. Triggers and drivers of autoimmunity: lessons from coeliac disease. *Nat Rev Immunol* 2013; 13:294-302.
- 46- Goddard CJ, Gillett HR. Complications of coeliac disease: are all patients at risk? *Postgrad Med J* 2006; 82:705-12.
- 47- Rashid M, Cranney A, Zarkadas M et al. Celiac disease: evaluation of the diagnosis and dietary compliance in Canadian children. *Pediatrics* 2005; 116:754-9.

- 48- Zamani F, Mohamadnejad M, Shakeri R et al. Gluten sensitive enteropathy in patients with iron deficiency anemia of unknown origin. *World J Gastroenterol* 2008; 14:7381-5.
- 49- Uçardağ D, Güliter S, Ceneli O et al. Celiac disease prevalence in patients with iron deficiency anemia of obscure origin. *Türk J Gastroenterol* 2009; 20:266-70.
- 50- Kalaycı AG, Kanber Y, Birinci A, Yildiz L, Albayrak D. The prevalence of coeliac disease as detected by screening in children with iron deficiency anaemia. *Acta Paediatr* 2005; 94:678-81.
- 51- Van Rijn JC, Grote FK, Oostdijk W, Wit JM. Short stature and the probability of celiac disease, in the absence of gastrointestinal symptoms. *Arch Dis Child* 2004; 89:882–3.
- 52- Demirel F, Bideci A, Çamurdan MO, Arga M, Cinaz P. Çocuklarda boy kısalığında etiolojik etmenler. *Türk Pediatri Arşivi* 2005; 40:39- 43.
- 53- Lo Iacono O, Petta S, Venezia G et al. Anti-tissue transglutaminase antibodies in patients with abnormal liver tests: is it always coeliac disease? *Am J Gastroenterol* 2005; 100:2472–7.
- 54- Drastich P, Honsová E, Lodererová A, et al. Celiac disease markers in patients with liver diseases: a single center large scale screening study. *World J Gastroenterol* 2012; 18:6255-62.
- 55- Kaukinen K, Halme L, Collin P, et al. Celiac disease in patients with severe liver disease: gluten-free diet may reverse hepatic failure. *Gastroenterology* 2002; 122:881–8.
- 56- Rodrigo L. Celiac disease. *World J Gastroenterol*, 2006; 12:6585-93.
- 57- Kavak US, Yüce A, Koçak N, et al. Bone mineral density in children with untreated and treated celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 37:434-6.
- 58- Kondrashova A, Mustalahti K, Kaukinen K et al. Lower economic status and inferior hygienic environment may protect against celiac disease. *Ann Med* 2008; 40:223–31.
- 59- Barker JM, Liu E. Celiac Disease: pathophysiology, clinical manifestations and associated autoimmune conditions. *Adv Pediatr* 2008; 55:349-65.
- 60- Lionetti E, Francavilla R, Pavone P, 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.
- 61- Black C, Kaye JA, Jick H. Relation of childhood gastro-intestinal disorders to autism: nested case-control study using data from the UK General Practice Research Database. *BMJ* 2002; 325:419–21.
- 62- Batista IC, Gandolfi L, Nobrega YK et al. Autism spectrum disorder and celiac disease: no evidence for a link. *Arq Neuropsiquiatr* 2012; 70:28–33.

- 63- Barker JM, Yu J, Yu L et al. Autoantibody "sub-specificity" in type 1 diabetes: risk for organ specific autoimmunity clusters in distinct groups. *Diabetes Care* 2005; 28:850–5.
- 64- Expert Committee on the Diagnosis and Clasification of Diabetes Mellitus. American Diabetes Association: clinical practice recommendations 2002. *Diabetes Care* 2002; Suppl 1, 25:S1–147.
- 65- Sanchez-Albisua I, Wolf J, Neu A, Geiger H, Wascher I, Stern M. Coeliac disease in children with type 1 diabetes mellitus: the effect of the gluten-free diet. *Diabet Med* 2005; 22:1079–1082.
- 66- Mohn A, Cerruto M, Iafusco D et al. Celiac disease in children and adolescents with type I diabetes: importance of hypoglycemia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 32:37–40.
- 67- Larizza D, Calcaterra V, De Giacomo C et al. Celiac disease in children with autoimmune thyroid disease. *J Pediatr* 2001; 139:738–740.
- 68- Diamanti A, Ferretti F, Guglielmi R, et al. Thyroid autoimmunity in children with coeliac disease: a prospective survey. *Arch Dis Child* 2011; 96:1038-41.
- 69- Bonamico M, Pasquino AM, Mariani P et al. Prevalence and clinical picture of celiac disease in Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:5495–8.
- 70- Bondy CA; Turner Syndrome Study Group. Care of girls and women with Turner syndrome: a guideline of the Turner Syndrome Study Group. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:10–25.
- 71- Van Cleve SN, Cohen WI. Part I: clinical practice guidelines for children with Down syndrome from birth to 12 years. *J Pediatr Health Care* 2006; 20:47-54.
- 72- Pan-Hammarström Q, Hammarström L. Antibody deficiency diseases. *Eur J Immunol* 2008; 38:327–33.
- 73- Wang N, Shen N, Vyse TJ et al. Selective IgA deficiency in autoimmune diseases. *Mol Med* 2011; 17:1383-96.
- 74- Holtmeier W, Caspary WF. Celiac Disease. *Orphanet J Rare Dis* 2006; 1:3.
- 75- Bürgin-Wolff A, Gaze H, Hadziselimovic F et al. Antigliadin and antiendomysium antibody determination for coeliac disease. *Arch Dis Child* 1991; 66:941-7.
- 76- Giersiepen K, Lelgemann M, Stuhldreher N, 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.
- 77- Freeman HJ, Chopra A, Clandinin MT, Thomson AB. Recent advances in celiac disease. *World J Gastroenterol*, 2011; 17:2259-72.
- 78- Leffler DA, Schuppan D. Update on serologic testing in celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2010; 105:2520–24.

- 79- Liu E, Bao F, Barriga K, et al. Fluctuating transglutaminase autoantibodies are related to histologic features of celiac disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2003; 1:356–62.
- 80- Rashtak S, Ettore MW, Homburger HA, Murray JA. Comparative usefulness of deamidated gliadin antibodies in the diagnosis of celiac disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6:426-32.
- 81- Volta U, Villanacci V. Celiac disease: diagnostic criteria in progress. *Cell Mol Immunol* 2011; 8:96-102.
- 82- Lenhardt A, Plebani A, Marchetti F, et al. Role of human tissue transglutaminase IgG and anti-gliadin IgG antibodies in the diagnosis of coeliac disease in the patients with selective immunoglobulin A deficiency. *Dig Liver Dis* 2004; 36:730-4.
- 83- Green PH, Rostami K, March MN. Diagnosis of coeliac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005; 19:389-400.
- 84- Villanacci V, Ceppa P, Tavani E et al. Coeliac disease: the histology report. *Dig Liver Dis* 2011; 43:385-95.
- 85- Kalhan S, Joseph P, Sharma S, et al. Comparative study of histopathological Marsh grading with clinical and serological parameters in celiac iceberg of north India. *Indian J Pathol Microbiol* 2011; 54:279-83.
- 86- Bardella MT, Velio P, Cesana BM, et al. Coeliac disease: a histological follow-up study. *Histopathology* 2007; 50:465-71.
- 87- Hoffenberg EJ, Haas J, Drescher A et al. A trial of oats in children with newly diagnosed celiac disease. *J Pediatr* 2000; 137:361–6.
- 88- Högborg L, Laurin P, Falth-Magnusson K et al. Oats to children with newly diagnosed coeliac disease: a randomised double blind study. *Gut* 2004; 53:649–54.
- 89- Catassi C, Fabiani E, Iacono G 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.
- 90- Wahab PJ, Meijer JW, Mulder CJ. Histologic follow-up of people with celiac disease on a gluten-free diet: slow and incomplete recovery. *Am J Clin Pathol* 2001; 118:459–63.
- 91- Selimoğlu MA, Karabiber H. Celiac Disease prevention and treatment. *J Clin Gastroenterol* 2010; 44:4-8.
- 92- Pyle GG, Paaso B, Anderson BE, et al. Effect of pretreatment of food gluten with prolyl endopeptidase on gluten-induced malabsorption in celiac sprue. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3:687-94.

- 93- Mitea C, Havenaar R, Drijfhout JW, et al. Efficient degradation of gluten by a prolyl endoprotease in a gastrointestinal model: implications for coeliac disease. *Gut* 2008; 57:25-32.
- 94- Gass J, Vora H, Bethune MT et al. Effect of barley endo-protease EP-B2 on gluten digestion in the intact rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318:1178–86.
- 95- Fasano A, Not T, Wang W et al. Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet* 2000; 355:1518–9.
- 96- Paterson BM, Lammers KM, Arrieta MC, et al. The safety, tolerance, pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of single doses of AT-1001 in coeliac disease subjects: a proof of concept study. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26:757-66.
- 97- Drago S, El Asmar R, Di Pierro M 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.
- 98- Fesus L, Piacentini M. Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. *Trends Biochem Sci* 2002; 27:534-9.
- 99- Sollid LM. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:647-55.
- 100- Xia J, Siegel M, Bergseng E et al. Inhibition of HLA-DQ2-mediated antigen presentation by analogues of a high affinity 33-residue peptide from alpha2-gliadin. *J Am Chem Soc* 2006; 128:1859-67.
- 101- Mention JJ, Ben Ahmed M, Begue B et al. Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology* 2003; 125:730–45.
- 102- Al-toma A, Visser OJ, van Roessel HM et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in refractory celiac disease with aberrant T cells. *Blood* 2007; 109:2243-9.
- 103- Al-Toma A, Verbeek WH, Hadithi M et al. Survival in refractory coeliac disease and enteropathy-associated T-cell lymphoma: retrospective evaluation of single-centre experience. *Gut* 2007; 56:1373-8.
- 104- Card TR, West J, Holmes. Risk of malignancy in diagnosed coeliac disease: a 24-year prospective, population-based, cohort study. *Gut* 2004; 53:769-75.
- 105- Verbeek WH, Goerres MS, von Blomberg BM et al. Flow cytometric determination of aberrant intra-epithelial lymphocytes predicts T-cell lymphoma development more

- accurately than T-cell clonality analysis in Refractory Celiac Disease. *Clin Immunol* 2008; 126:48-56.
- 106- Rubio-Tapia A, Murray JA. Classification and management of refractory coeliac disease. *Gut* 2010; 59:547-57.
 - 107- Suciu N, Pop L, Panaitescu E et al. Fetal and neonatal outcome in celiac disease. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2013 Sep 3. [Epub ahead of print]
 - 108- Ferguson R, Holmes GK, Cooke WT. Coeliac disease, fertility and pregnancy. *Scand J Gastroenterol* 1982 Jan;17:65-8.
 - 109- Molteni N, Bardella MT, Bianchi PA. Obstetric and gynecological problems in women with untreated celiac sprue. *J Clin Gastroenterol* 1990; 12:37-9.
 - 110- Kotze LM. Gynecologic and obstetric findings related to nutritional status and adherence to a gluten-free diet in Brazilian patients with celiac disease. *J Clin Gastroenterol* 2004 Aug;38:567-74.
 - 111- Collin P, Vilska S, Heinonen PK et al. Infertility and coeliac disease. *Gut*. 1996; 39:382-4.
 - 112- Kolho KL, Tiitinen A, Tulppala M et al. Screening for coeliac disease in women with a history of recurrent miscarriage or infertility. *Br J Obstet Gynaecol* 1999;106:171-3.
 - 113- Martinelli P, Troncone R, Paparo F et al. Coeliac disease and unfavourable outcome of pregnancy. *Gut*. 2000; 46:332-5.
 - 114- Sheiner E, Peleg R, Levy A. Pregnancy outcome of patients with known celiac disease. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006; 129:41-5.
 - 115- Zugna D, Richiardi L, Akre O et al. A nationwide population-based study to determine whether coeliac disease is associated with infertility. *Gut* 2010; 59:1471-5.
 - 116- Choi JM, Lebwohl B, Wang J et al. Increased prevalence of celiac disease in patients with unexplained infertility in the United States. *J Reprod Med* 2011; 56:199-203.
 - 117- Martinelli D, Fortunato F, Tafuri S et al. Reproductive life disorders in Italian celiac women. A case-control study. *BMC Gastroenterol* 2010;10:89.
 - 118- Ogborn AD. Pregnancy in patients with coeliac disease. *Br J Obstet Gynaecol* 1975; 82:293-6.
 - 119- Ciacci C, Cirillo M, Auriemma G et al. Celiac disease and pregnancy outcome. *Am J Gastroenterol* 1996; 91:718-22.
 - 120- Salvatore S, Finazzi S, Radaelli G et al. Prevalence of undiagnosed celiac disease in the parents of preterm and/or small for gestational age infants. *Am J Gastroenterol* 2007; 102:168-73.

- 121- Khashan AS, Henriksen TB, Mortensen PB et al. The impact of maternal celiac disease on birthweight and preterm birth: a Danish population-based cohort study. *Hum Reprod* 2010; 25:528-34.
- 122- Kiefte-de Jong JC, Jaddoe VW, Uitterlinden AG et al. Levels of antibodies against tissue transglutaminase during pregnancy are associated with reduced fetal weight and birth weight. *Gastroenterology* 2013; 144:726-735.
- 123- Greco L, Veneziano A, Di Donato L et al. Undiagnosed coeliac disease does not appear to be associated with unfavourable outcome of pregnancy. *Gut* 2004; 53:149-151.
- 124- Solís Sánchez G, Blanco Cristóbal C, Suárez González A et al. Maternal non-diagnosed celiac disease and risk of low birth weight. *Rev Esp Enferm Dig* 2008; 100:332-6.
- 125- Ozgör B, Selimoğlu MA, Temel I et al. Prevalence of celiac disease in parents of preterm or low birthweight newborns. *J Obstet Gynaecol Res* 2011; 37:1615-19.
- 126- Ozgör B, Selimoğlu MA. Coeliac disease and reproductive disorders. *Scand J Gastroenterol* 2010; 45:395-402.
- 127- Hadziselimovic F, Geneto R, Buser M. Celiac disease, pregnancy, small for gestational age: role of extravillous trophoblast. *Fetal Pediatr Pathol* 2007; 26:125-134.
- 128- Robinson NJ, Glazier JD, Greenwood SL et al. Tissue transglutaminase expression and activity in placenta. *Placenta* 2006; 27:148-57.
- 129- Anjum N, Baker PN, Robinson NJ, Aplin JD. Maternal celiac disease autoantibodies bind directly to syncytiotrophoblast and inhibit placental tissue transglutaminase activity. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 19:7-16.
- 130- Di Simone N, Silano M, Castellani R et al. Gasbarrini. Anti-tissue transglutaminase antibodies from celiac patients are responsible for trophoblast damage via apoptosis in vitro. *Am J Gastroenterol* 2010; 105:2254-61.
- 131- Di Simone N, De Spirito M, Di Nicuolo F et al. Potential new mechanisms of placental damage in celiac disease: anti-transglutaminase antibodies impair human endometrial angiogenesis. *Biol Reprod* 2013; 89:88.
- 132- Silano M, Di Simone N, Castellani R, Tersigni C. Gliadin Directly Elicits a TH1 Immune Response in Decidua From Celiac Pregnant Women. *European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Annual Meeting June 9–12, 2010 Istanbul, Turkey*
- 133- Veenstra van Nieuwenhoven AL, Heineman MJ, Faas MM. The immunology of successful pregnancy. *Hum Reprod Update* 2003; 9:347-57.

- 134- Aagaard-Tillery KM, Silver R, Dalton J. Immunology of normal pregnancy. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006; 11:279-95.
- 135- Riley JK, Yokoyama WM. NK cell tolerance and the maternal-fetal interface. *Am J Reprod Immunol* 2008; 59:371-87.
- 136- Cresswell P. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:259-93.
- 137- Makrigiannakis A, Karamouti M, Drakakis P et al. Fetomaternal Immunotolerance. *Am J Rep Immunol* 2008; 60:482-96.
- 138- Bulmer JN, Morrison L, Longfellow M et al. Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Hum Reprod* 1991; 6:791-8.
- 139- Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:656-63.
- 140- Bulmer JN, Lash GE. Human uterine natural killer cells: a reappraisal. *Mol Immunol* 2005; 42:511-21.
- 141- Williams PJ, Searle RF, Robson SC et al. Decidual leucocyte populations in early to late gestation normal human pregnancy. *J Reprod Immunol* 2009; 82:24-31.
- 142- Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med* 2006; 12:1065-74.
- 143- Wilczyński JR, Tchórzewski H, Głowacka E et al. Cytokine secretion by decidual lymphocytes in transient hypertension of pregnancy and pre-eclampsia. *Mediators Inflamm* 2002;11:105-11.
- 144- Zhou JJ, Hu YL, Hao S, Hou YY. Immunophenotypic characteristics of uterine natural killer cells and helper T cell 1/helper T cell 2 immunity in the third trimester decidua of preeclampsia patients. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2007; 42:244-8.
- 145- Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S et al. Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol Hum Reprod* 2004; 10:347–53.
- 146- Carosella ED, LeMaoult J. HLA-G: a look back, a look forward. *Cell. Mol Life Sci* 2011; 68:337-40.
- 147- Poehlmann TG, Schaumann A, Busch S et al. Inhibition of term decidual NK cell cytotoxicity by soluble HLA-G1. *Am J Reprod Immunol* 2006; 56:275-85.

- 148- Lindfors K, Blomqvist T, Juuti-Uusitalo K et al. Live probiotic *Bifidobacterium lactis* bacteria inhibit the toxic effects induced by wheat gliadin in epithelial cell culture. *Clin Exp Immunol* 2008; 152:552-8.
- 149- Bhalla A, Stone PR, Liddell HS et al. Comparison of the expression of human leukocyte antigen (HLA)-G and HLA-E in women with normal pregnancy and those with recurrent miscarriage. *Reproduction* 2006; 131:583-9.
- 150- Sindram-Trujillo AP, Scherjon SA, van Hulst-van Miert PP et al. Comparison of decidual leukocytes following spontaneous vaginal delivery and elective cesarean section in uncomplicated human term pregnancy. *J Reprod Immunol* 2004; 62:125-37.
- 151- Williams PJ, Searle RF, Robson SC et al. Decidual leucocyte populations in early to late gestation normal human pregnancy. *J Reprod Immunol* 2009; 82:24-31.
- 152- Williams PJ, Bulmer JN, Searle RF et al. Altered decidual leucocyte populations in the placental bed in pre-eclampsia and foetal growth restriction: a comparison with late normal pregnancy. *Soc Reprod Fertility* 2009; 138:177-84.
- 153- Wilczyński JR, Tchórzewski H, Banasik M et al. Lymphocyte subset distribution and cytokine secretion in third trimester decidua in normal pregnancy and preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 109:8-15.
- 154- Stallmach T, Hebisch G, Orban P, Lü X. Aberrant positioning of trophoblast and lymphocytes in the feto-maternal interface with pre-eclampsia. *Virchows Arch* 1999; 434:207-11.
- 155- Coulam CB, Goodman C, Roussev RG et al. Systemic CD56+ cells can predict pregnancy outcome. *Am J Reprod Immunol* 1995; 33:40-6.
- 156- Jin HT, Jeong YH, Park HJ, Ha SJ. Mechanism of T cell exhaustion in a chronic environment. *BMB Rep* 2011; 44:217-31.
- 157- den Boer AT, van Mierlo GJ, Franssen MF et al. The tumoricidal activity of memory CD8+ T cells is hampered by persistent systemic antigen, but full functional capacity is regained in an antigen-free environment. *J Immunol* 2004; 172:6074-9.
- 158- Blackburn SD, Wherry EJ. IL-10, T cell exhaustion and viral persistence. *Trends Microbiol* 2007; 15:143-6.
- 159- Saito S. Cytokine network at the feto-maternal interface. *J Reprod Immunol* 2000; 47:87-103.
- 160- Fehniger TA, Caligiuri MA. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 2001; 97:14-32.
- 161- Trinchieri G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J Exp Med* 2007; 204:239-43.

- 162- Nissinen R, Leirisalo-Repo M, Nieminen AM et al. Immune activation in the small intestine in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004; 63:1327-30.
- 163- Paajanen L, Vaarala O, Karttunen R et al. Increased IFN-gamma secretion from duodenal biopsy samples in delayed-type cow's milk allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 2005; 16:439-44.
- 164- Pongcharoen S, Somran J, Sritippayawan S et al. Interleukin-17 expression in the human placenta. *Placenta* 2007; 28:59-63.
- 165- Ito M, Nakashima A, Hidaka T et al. A role for IL-17 in induction of an inflammation at the fetomaternal interface in preterm labour. *J Reprod Immunol* 2010; 84:75-85.
- 166- Toldi G, Rigó J Jr, Stenczer B et al. Increased prevalence of IL-17-producing peripheral blood lymphocytes in preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2011; 66:223-9.
- 167- Bhalla A, Stone PR, Liddell HS et al. Comparison of the expression of human leukocyte antigen (HLA)-G and HLA-E in women with normal pregnancy and those with recurrent miscarriage. *Reproduction* 2006; 131:583-9.
- 168- Goldman-Wohl DS, Ariel I, Greenfield C et al. Lack of human leukocyte antigen-G expression in extravillous trophoblasts is associated with pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 2000;6:88-95.
- 169- Emmer PM, Steegers EA, Kerstens HM et al. Altered phenotype of HLA-G expressing trophoblast and decidual natural killer cells in pathological pregnancies. *Hum Reprod* 2002; 17:1072-80.

8.EKLER

8.1. Ek-1: Hasta onam formu

AYDINLATILMIŞ (BİLGİLENDİRİLMİŞ) ONAM FORMU

Çölyak, genetik olarak yatkın kişilerde gluten içeren buğday, arpa, çavdar ve yulaflı gıdaların tüketilmesi ile tetiklenen otoimmün bir barsak hastalığıdır. Ülkemizde 2010 yılında yapılan çalışmada sıklığı 1/212 olarak saptanmıştır. Olgular klinik bir bulgu veremeyeceği gibi, tanı gecikmesinden ölüme kadar varabilen geniş bir klinik yelpaze ile karşımıza gelebilmektedir.

Çölyak hastalığı klinik olarak ishal, kilo alamama, karın şişliği, karın ağrısı, büyüme geriliği gibi semptomlarla ortaya çıkabilir. Yeni tanı konulan çocukluk çağındaki çölyak hastalarının %50'si, erişkin hastaların 3'te 2'si tipik gastrointestinal semptomlarla karşımıza gelmemektedir.

Çölyak hastalığında görülen atipik klinik bulgular; Dermatitis Herpetiformis, demir eksikliği anemisi, boy kısalığı, kronik hepatit/ transaminaz yüksekliği, eklem iltihabı ve ağrısı, kemik erimesi, nörolojik problemler, psikiatrik bozukluklar ve jinekolojik problemler (adet gecikmesi, erken menapoz, infertilite, tekrarlayan düşükler, düşük ağırlıklı bebek doğumu, prematürite)

Çölyak hastalığı tanıları kadınların hamilelik döneminde görülen bozuklukların ve doğan bebeklerde görülen problemlerin nedenlerini bulmak üzere yeni bir araştırma yapmaktayız. Araştırmanın ismi 'Çölyak hastalığı tanıları kadınların hamilelik döneminde plasentasında olan immünolojik değişiklikler' dir.

Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz Uzm.Dr.Burcu Volkan tarafından takip edileceksiniz. Bu çalışmayı yapabilmek için doğumunuz sırasında kadın doğum doktorunuzun yardımı ile normalde bebek doğduktan sonra çıkarılıp atılan ve plasenta denilen doku özel bir kaba alınacaktır. Doğan bebeğinizin doğum ağırlığı, boyu kaydedilerek eğer isterseniz belirli periyotlarla hastaneye çağrılarak muayenesi yapılacaktır

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.

Yapılacak araştırmanın getireceği olası yararlar: Böyle bir analiz çölyak hastalığının plasenta dokusunda yaptığı değişikliklerin öğrenilmesinde yararlı olacaktır. Şu anda bu çalışmanın hemen hastalığınıza fayda olarak dönüp dönmeyeceğini bilmiyoruz. Ancak çölyak hastalığın temelinde yatan nedenlerin öğrenilmesi tedavide yeni yaklaşımlara ve ileride çölyak hastalığından etkilenmiş bireylere fayda sağlayacaktır.

Hastanın Beyanı

Sayın Uzm.Dr. Burcu Volkan tarafından Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim Araştırma Hastanesi Çocuk Gastroenteroloji, Hepatoloji ve Beslenme Bilim Dalı'nda tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, hangi araştırmacıyı, hangi telefon ve adresten arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.

İmza

Görüşme tanığı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.

İmza:

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel.

İmza:

8.1. EK-1: Etik kurul onayı



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakültesi Dekanlığı
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMA
KURULU

Sayı : 70737436-050.01.04-1300046438
Konu : Onay Hk.

28.03.2013

Sayın : Prof.Dr. Deniz ERTEM

09.2013.0075 protokol nolu " Çölyak hastalığı nedeniyle glutensiz diyet tedavisinde olan gebelerde gliadin antijenine plasental immün yanıtın değerlendirilmesi" isimli projeniz Fakültemiz Araştırma Etik Kurulu tarafından incelenerek onaylanmıştır.

Prof. Dr. Haner DİRESKENELİ
Araştırma Etik Kurul Başkanı



(0 216) 337 14 53 (Faks)
(0 216) 414 05 45 (Santral)

aylin.yasar@mamara.edu.tr

Ayrıntılı bilgi için : Aylin YAŞAR