

ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

IRAKLI HASTA ÖRNEKLERİNDE ÇÖLYAK HASTALIĞINA YÖNELİK
MOLEKÜLER VE İMMÜNOLOJİK ÇALIŞMA

Sardar Khudhur Aswad HASAK

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2024

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Sardar Khudhur Aswad HASAK tarafından hazırlanan “**Iraklı Hasta Örneklerinde Çölyak Hastalığına Yönelik Moleküler ve İmmünolojik Çalışma**” adlı tez çalışması 12/03/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Özcan ÖZKAN

Eş Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Jaleel SAMANJE

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Özcan ÖZKAN
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Fatih BAKIR
Tıbbi Biyokimya
Lokman Hekim Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Ayşegül Taylan ÖZKAN
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
TOBB ETÜ Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Neslihan TEKİN KARACAER
Biyoloji Anabilim Dalı
Aksaray Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül OĞLAKÇI İLHAN
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hamit ALYAR

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum **“İraklı Hasta Örneklerinde Çölyak Hastalığına Yönelik Moleküler ve İmmünolojik Çalışma”** konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan “Bilimsel İntihal Tespit Programı”yla tarandığını, “intihal içermediğini” beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (01/03/2024).

Sardar Khudhur Aswad HASAK

ÖZET

Doktora Tezi

IRAKLI HASTA ÖRNEKLERİNDE ÇÖLYAK HASTALIĞINA YÖNELİK MOLEKÜLER VE İMMÜNOLOJİK ÇALIŞMA

Sardar Khudhur Aswad HASAK

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özcan ÖZKAN
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Jaleel SAMANJE

Bu çalışmanın amacı, belirli immünolojik belirteçlerin (IL15, IL21 ve TNF α) ekspresyon seviyelerini, serum otoantikorlarını incelemek ve ÇH'li hastalarda HLA tiplemesindeki haplotip değişikliklerini tespit etmenin yanı sıra MYO9B'nin SNP rs2305767'sini belirlemektir. Bu amaçla Kasım 2022 ile Şubat 2023 tarihleri arasında Bağdat Eğitim Hastanesi, Pediatri Eğitim Hastanesi ve Sindirim Hastanesi Danışma Kliniğinde bakım gören elli hasta ile toplam kırk kontrol çalışmaya dahil edilmiştir. Vaka çalışması grubundaki katılımcıların yaşları 1 ile 60 arasında değişmekte olup ortalama yaş $19,9 \pm 15,4$ 'tür. Karşılaştırma yapıldığında kontrol grubunun yaş ortalaması $21,8 \pm 16,1$ yıldır. ÇH hastalarında, IL-15, IL-21 ve TNF-a'nın serum seviyeleri kontrollerle karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksektir. Benzer şekilde, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında ÇH hastalarında serum tTG, EMA ve gliadin seviyeleri artmıştır. ÇH hastalarında hemoglobin ve WBC hematolojik özellikleri kontrol grubuna göre oldukça yüksektir. PLT, ÇH hastalarında daha yüksektir ancak anlamlı bir değeri yoktur. Genetik test, hastaların çoğunluğunun (%76,0) HLA-DQ2 homozigot ve HLADQ8 (%20,0) olduğunu, HLADQ2,8'in (%14,0) olduğunu ortaya çıkarmıştır. HLADQ2 için kodlanan alellerin çoğunluğu, kontrollerle karşılaştırıldığında ÇH hastalarında anlamlıdır. DQA1*03, DQB1*0302 ve DRB1*04 alellerini içeren HLA-haplotip DO8, aleller (DQA1*03 ve DRB1*04) anlamlı bir fark gösterirken ve DQB1*0302, sonuç anlamlı değildir. ÇH hastalarında serolojik testler ile interlökin düzeyleri arasında anlamlı bir korelasyon vardır. Anti-gliadin IgA ile HLADQ2 arasında anlamlı bir ilişki bulunmamakla birlikte, 0,096'lık p değerine güvenilmektedir. Sonuçlar, HLADQ2'nin anti-EMA ve tTG'nin her biri ile ilişkisini sunar; bu, p değerlerine göre parametreler arasında anlamlı bir ilişki olduğunu gösterir. Verilerin dağılımı, HLADQ2 değişkeni ile IL-15 ve TNF-a'nın pozitif ve negatif ortalama $\pm$ SE'sinde anlamlı bir fark olduğunu ortaya koymaktadır.

2024, 137 sayfa

ANAHTAR KELİMELEER: Çölyak hastalığı, IL-15, IL-21, TNF- α , İmmünolojik

ABSTRACT

PhD Thesis

MOLECULAR AND IMMUNOLOGICAL STUDY FOR CELIAC DISEASE IN SAMPLES OF IRAQI PATIENTS

Sardar Khudhur Aswad HASAK

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Prof. Dr. Özcan ÖZKAN
Co-Advisor: Asst. Prof. Dr. Jaleel SAMANJE

The aim of this study was to examine the expression levels of certain immunological markers (IL15, IL21 and TNF α), serum autoantibodies and to identify the SNP rs2305767 of MYO9B in addition to detecting haplotype changes in HLA typing in patients with CD. For this purpose, fifty patients who received care at Baghdad Teaching Hospital, Pediatric Teaching Hospital and Digestive Hospital Consultation Clinic between November 2022 and February 2023 and forty controls were included in the study. The age of the participants in the case study group ranged from 1 to 60 years with a mean age of 19.9 ± 15.4 years. In comparison, the mean age of the control group was 21.8 ± 16.1 years. Serum levels of IL-15, IL-21 and TNF- α were significantly higher in CD patients compared to controls. Similarly, serum levels of tTG, EMA and gliadin were increased in CD patients compared to healthy controls. Hemoglobin and WBC hematologic characteristics were significantly higher in CD patients compared to the control group. PLT is higher in CD patients but has no significant value. Genetic testing revealed that the majority of patients (76.0%) were HLA-DQ2 homozygous and HLADQ8 (20.0%), HLADQ2.8 (14.0%). The majority of alleles encoded for HLADQ2 are significant in CD patients compared to controls. In HLA-haplotype DO8, which includes alleles DQA1*03, DQB1*0302 and DRB1*04, the alleles (DQA1*03 and DRB1*04) show a significant difference and in DQB1*0302, the result is not significant. There is a significant correlation between serologic tests and interleukin levels in CD patients. There is no significant correlation between anti-gliadin IgA and HLADQ2, although the p value of 0.096 is reliable. The results present the association of HLADQ2 with each of anti-EMA and tTG, which indicates a significant association between the parameters according to the p-values. The distribution of the data reveals a significant difference in the positive and negative mean $\pm$ SE of IL-15 and TNF- α with the HLADQ2 variable.

2024, 137 pages

Keywords: Celiac disease, IL-15, IL-21, TNF- α , Immunological

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Danışman hocam Prof. Dr. Özcan Özkan'a bu çalışma boyunca verdiği destek, ilgi, heyecan ve rehberlik için en içten şükranlarımı, minnettarlığımı ve takdirlerimi sunmak isterim.

Ayrıca, tüm yollarımda beni koşulsuz destekleyen anneme ve babama, sevgi ve desteğini esirgemeyen kardeşlerime, eşim Enas'a, güzel kızlarım Aveen ve Berna'ya çok teşekkür ederim.

Sardar Khudhur Aswad HASAK

Çankırı, Mart 2024

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER DİZİNİ	vii
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1 Çölyak Hastalığı	4
2.1.1 Genel bilgiler	4
2.1.2 Tarihçe.....	5
2.1.3 Epidemiyoloji	6
2.1.4 Çölyak hastalığının etiyolojisi.....	8
2.1.5 Çölyak hastalığının klinik sunumu	14
2.1.6 Çölyak hastalığının türleri	15
2.1.7 Çölyak hastalığının teşhisi	16
2.1.8 Çölyak hastalığı komplikasyonları.....	22
2.1.9 Çölyak hastalığıyla ilişkili bozukluklar	22
2.1.10 Çölyak hastalığının tedavisi	23
2.2 Çölyak Hastalığında İnterlökin-15, İnterlökin-21 ve Tümoral Nekroz Faktörü- α'nın Rolü	24
2.3 HLA-DQ2 ve HLA-DQ8 Genetiği ve Hastalık Riski	27
2.4 HLA ve Hastalık İlişkisi	29
2.5 Miyozin IXB (MYO9B) Geni	29
3. MATERYAL VE METOT	31
3.1 Çalışma Tasarımı	31
3.1.1 Çalışma grubu seçimi	31
3.1.2 Etik konular	31

3.1.3 Çalışma grubunun tanımlayıcı değişkenleri	32
3.2 Örnek Toplama	33
3.3 Malzemeler.....	34
3.3.1 Ekipman ve aletler	34
3.3.2 Kitler ve diğer malzemeler	35
3.4 Laboratuvar Yöntemleri	36
3.4.1 Hematolojik araştırmalar	36
3.4.2 ELISA kullanılarak immünolojik analiz	36
3.5 Çölyak Strip Uygulaması Kullanılarak Çölyak Hastalığı ile İlişkili HLA Haplotiplerinin (HLADQ2 ve HLADQ8) Tespiti	50
3.5.1 Genomik DNA'nın ekstraksiyonu prosedürü	50
3.5.2 DNA amplifikasyonu	51
3.5.3 Hibridizasyon ve geliştirme için termo çalkalayıcı PSH-60HL.....	52
3.5.4 Şeritlerin okunması ve yorumlanması.....	53
3.6 SNP Analizi.....	54
3.6.1 MYO9B geninin tek nükleotid polimorfizmi (SNP)	54
3.7 İstatistiksel Analiz	58
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	63
4.1 Katılımcı Yaşı ve Cinsiyet Dağılımı.....	63
4.2 Çölyak Hastaları ve Kontrollerin Klinik ve Sosyo-Demografik Sunumu	65
4.3 Çalışma Gruplarının Hematolojik Özellikleri.....	68
4.4 Hastalar ve Kontrol Grubu Arasında Çölyak Hastalığına Bağlı HLA Haplotiplerinin (HLA DQ2, HLA DQ8 ve HLA DQ2&8) Tanımlanması.....	69
4.5 Pozitif HLA Haplotiplerinin (HLA DQ2, HLA DQ8& HLA DQ2&8) Çalışma Grupları Arasında Cinsiyete Göre Dağılımı	72
4.6 Hastalar ve Kontrol Grubu Arasında Çölyak Hastalığı ile İlişkili HLA Haplotiplerinin Tespiti	74
4.7 CD ve Kontrol Grubunda Anti-Gliadin IgG ve IgA Tespiti	77
4.8 CD ve Kontrol Grubunda Anti-Transglutaminaz IgG ve IgA Tespiti.....	78
4.9 Çölyak Hastalığı ve Kontrol Grubunda Anti- Endomysial IgG & IgA Tespiti	80
4.10 Hasta ve Sağlıklı Grupta Serum IL-15, TNF- α ve IL-21'in Saptanması.....	81
4.11 Serum Belirteçleri (anti gliadin IgG, IgA) ile Diğer Laboratuvar Bulguları (IL-15, TNF- α ve IL-21) Arasındaki Korelasyon.....	87

4.12 Çölyak Hastalıkları Grubunda Anti-Transglutaminaz IgG, IgA ve İnterlökinler (IL-15, TNF- α ve IL-21) Arasındaki Korelasyon Katsayısı.....	87
4.13 Çölyak Hastalıkları Grubunda Anti-Endomizyal IgG, IgA ve İnterlökinler (IL-15, TNF- α ve IL-21) Arasındaki Korelasyon Katsayısı.....	88
4.14 Çölyak Hastalığı Grubunda HLA DQ2'nin Serum Belirteçleri (Gliadin, Ttg ve Endomysial) ile İlişkisi.....	90
4.15 Hasta Gruplarında HLA DQ2 ile IL-15, TNF- α ve IL-21 Arasındaki İlişki...	91
4.16 Çölyak Hastalığı Grubunda HLA DQ8'in Serum Belirteçleri (Gliadin, tTG ve Endomizyal) ile İlişkisi	91
4.17 Çölyak Hastalıkları Grubunda HLA DQ8'in İnterlökinler (IL-15, TNF- α ve IL-21) ile İlişkisi.....	92
4.18 Çölyak Hastalığı Grubunda HLA DQ2&8'in Serum Belirteçleri (Gliadin, tTG ve Endomysial) ile İlişkisi.....	92
4.19 Çölyak Hastalığı Grubunda HLA DQ2&8 ile İnterlökinler (IL-15, TNF- α ve IL-21) Arasındaki İlişki.....	93
4.20 Çölyak Hastalarında her biri için IgG ve IgA Sınıflarının (Gliadin, Ttg, Endomizyal) ve İnterlökinlerin (IL-15, TNF- α ve IL-21) Eğri Altında Kalan Alanı Gösteren ROC Eğrisi Analizi	95
4.21 ROC ve Üretici için Optimal Kesim Değerlerine göre IL-15, TNF- α ve IL-21 Testlerinin Tanısal Performansı.....	96
4.22 MYO9B Geninin Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP)	97
4.22.1 Çalışma gruplarında rs2305767 SNP tespiti.....	97
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	101
KAYNAKLAR	103
ÖZGEÇMİŞ.....	137

SİMGELER DİZİNİ

°C	Derece santigrat
mg	Miligram
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
nm	Nanometre
%	Yüzde



KISALTMALAR DİZİNİ

ESPGHAN	Avrupa pediatrik gastroenteroloji derneği hepatoloji ve beslenme
WDEIA	Buğday bağımlı egzersizin neden olduğu anafilaksi
SYK	Dalak tirozin kinaz
WGO	Dünya gastroenteroloji organizasyonu
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EoE	Eozinofilik özofajit
FODMAPS	Fermente edilebilir oligo, di, monosakkaritler ve polioller
IEL	Epitelyal lenfositler
IELs	Epitelyal lenfositler
GRND	Glutenle ilişkili nörolojik bozukluklar
MARSH	Histolojiyi puanlamak için mukozal algoritma kuralları
FAS	İlk apoptoz sinyali
IGIF	İnterferon gama indükleyici faktör
BSG	İngiliz gastroenteroloji derneği
CFTR	Kistik fibroz transmembran iletkenlik düzenleyici
CXCR3	Kemokin reseptörü 3
LP	Lamina propria
MLNs	Mezenterik lenf düğümleri
NKGD2D	MHC olmayan sınıf I doğal öldürücü reseptör
MICA	MHC sınıf I zincirle ilişkili molekül
PAR2	Proteinaz aktive edici reseptör 2
STAT	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü
CTLA	Sitotoksik lenfositlerle ilişkili protein
FOXP3	Transkripsiyon faktörü P3
UNL	Üst normal sınır

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Çölyak hastalığının buzdağı modeli (Parzanese <i>et al.</i> 2017).....	8
Şekil 2.2	Çölyak hastalığının, doğuştan gelen ve edinsel bağışıklık ve çevresel tetikleyiciler arasındaki etkileşimi (Voisine and Abadie 2021)	9
Şekil 2.3	HLADQ2 ve DQ8 haplotipleri (Caio <i>et al.</i> 2009).....	10
Şekil 2.4	α -gliadin polipeptidinin haritalanması (Fasano 2011).....	11
Şekil 2.5	Çölyak hastalığında bağırsak dokusu tahribatı (Voisine and Abadie 2021) ..	14
Şekil 2.6	Çölyak hastalığının teşhis süreci diyagramı (Kelly <i>et al.</i> 2015).....	18
Şekil 2.7	Çölyak Hastalığındaki sitokin ağı (Abadie and Jabri 2014)	27
Şekil 3.1	Araştırma tasarımının şematik gösterimi.....	34
Şekil 4.1	CD hastalarında her bir Ttg, gliadin, endomizyal ve interlökinler (IL-15, TNF- α ve IL-21) için IgG ve IgA sınıflarının eğri altında kalan alanı gösteren ROC eğrisi analizi.....	96
Şekil 4.2	MYO9B'nin jel elektroforezi PCR ürünleri, 780 bp moleküler boyuttaki bantları.....	97
Şekil 4.3	MYO9B gen SNP'sinin (rs2305767 A/G) üç genotipi gösteren DNA dizisi kromatogramı.....	98

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1	Çalışmada kullanılan alet ve ekipmanlar	35
Çizelge 3.2	Çalışmada kullanılan kitler ve diğer materyaller	35
Çizelge 3.3	TNF-a kitinden sağlanan reaktifler	37
Çizelge 3.4	IL-15 kiti bileşeni.....	39
Çizelge 3.5	Plakadaki IL-15 standartlarının düzeni	40
Çizelge 3.6	Endomisiyal kitteki test bileşenleri.....	44
Çizelge 3.7	Anti-Ttg Ab kiti bileşeni.....	46
Çizelge 3.8	Anti-gliadin Ab kiti bileşenleri	48
Çizelge 3.9	HLADQ2 ve DQ8'i kodlayan H aplotipleri	50
Çizelge 3.10	DNA ekstraksiyon kiti	51
Çizelge 3.11	HLA DQ2\DQ8 gen amplifikasyonu için PCR Termo döngü koşulu	52
Çizelge 3.12	Çölyak hastalığı HLA aplotipleri kit içeriği	53
Çizelge 3.13	Tek nükleotid polimorfizmi genotiplemesinde kullanılan MYO9B geninin ileri ve geri primerleri	55
Çizelge 3.14	Primer hazırlığı	56
Çizelge 3.15	PCR bileşen hesaplaması	57
Çizelge 3.16	Tek numune için ana karışım bileşenleri	57
Çizelge 3.17	PCR protokolü	57
Çizelge 4.1	Hasta ve kontrol gruplarında yaş ve cinsiyet dağılımı.....	63
Çizelge 4.2	Çölyak hastaları ve kontrollerin klinik ve sosyo-demografik özellikleri ..	66
Çizelge 4.3	Çalışma gruplarının hematolojik özellikleri	68
Çizelge 4.4	Hastalar ve kontrol grubu arasında çölyak hastalığına bağlı HLA aplotipleri	70
Çizelge 4.5	Çalışma grupları arasında pozitif HLA aplotiplerinin (HLA DQ2, HLA DQ8& HLA DQ2&8) cinsiyete göre dağılımı	73
Çizelge 4.6	Hastalar ve kontrol grubu arasında ÇH ile ilişkili HLA aplotiplerinin tespiti.....	74
Çizelge 4.7	CD ve kontrol grubunda anti-gliadin IgG ve IgA'nın tespiti	77
Çizelge 4.8	CD ve kontrol grubunda anti-Transglutaminaz IgG ve IgA Tespiti	78
Çizelge 4.9	Çölyak hastalığı ve kontrol grubunda anti- endomysial IgG & IgA tespiti.....	80
Çizelge 4.10	Hasta ve sağlıklı grupta serum IL-15, TNF- α ve IL-21 tespiti	82
Çizelge 4.11	Serum belirteçleri (anti gliadin IgG, IgA) ile diğer laboratuvar bulguları (IL-15, TNF- α ve IL-21) arasındaki korelasyon	87
Çizelge 4.12	Çölyak hastalıkları grubunda anti-Transglutaminaz IgG, IgA ve interlökinler (IL-15, TNF- α ve IL-21) arasındaki korelasyon katsayısı	88
Çizelge 4.13	Çölyak hastalıkları grubunda anti-endomizyal IgG, IgA ve interlökinler (IL-15, TNF- α ve IL-21) arasındaki korelasyon katsayısı.....	88

Çizelge 4.14 Çölyak hastalığı grubunda HLA DQ2'nin serum belirteçleri (gliadin, Ttg ve endomysial) ile ilişkisi.....	91
Çizelge 4.15 Hasta gruplarında HLA DQ2 ile IL-15, TNF- α ve IL-21 arasındaki ilişki.....	91
Çizelge 4.16 Çölyak hastalığı grubunda HLA DQ8'in serum belirteçleri (gliadin, tTG ve endomizyal) ile ilişkisi	91
Çizelge 4.17 Çölyak hastalıkları grubunda HLA DQ8'in interlökinler (IL-15, TNF- α ve IL-21) ile ilişkisi.....	92
Çizelge 4.18 Çölyak hastalığı grubunda HLA DQ2&8'in serum belirteçleri (gliadin, tTG ve endomysial) ile ilişkisi.....	92
Çizelge 4.19 Çölyak hastalığı grubunda HLA DQ2&8 ile interlökinler (IL-15, TNF- α ve IL-21) arasındaki ilişki.....	93
Çizelge 4.20 CD hastalarında her bir Ttg, gliadin, endomizyal ve interlökinler (IL-15, TNF- α , IL-21) için IgG ve IgA sınıflarının eğri altında kalan alanı gösteren ROC eğrisi analizi	95
Çizelge 4.21 ROC ve IL-15, TNF- α ve IL-21 testlerinin tanısal performansı.....	96
Çizelge 4.22 ÇH hastalarında ve kontrollerde MYO9B geni (rs2305767SNP) genotiplerinin sayıları ve yüzde frekansları ve bunların hardy-weinberg dengesi (HWE)	98

1. GİRİŞ

Çölyak hastalığı, genetik yatkınlığı olan bireyleri etkileyen ve ince bağırsağın besinlerdeki besin maddelerini etkili bir şekilde emememesiyle sonuçlanan otoimmün bir durumdur (Rodrigo *et al.* 2018). Çölyak hastalığı olan bireylerin gluteni tüketmesi, ince bağırsaklarında immünolojik bir reaksiyona neden olur. Gluten, çoğunlukla buğday, çavdar ve arpanın yanı sıra bu tahıllardan yapılan ürünlerde bulunan bir protein topluluğudur. Çölyak hastalığı (ÇH), Güney Amerika, Afrika, Avrupa ve Asya'daki popülasyonların yaklaşık %1'ini etkileyen önemli bir küresel halk sağlığı sorunudur (Kelly *et al.* 2015, Ahadi *et al.* 2016). ÇH tanısı serolojik testlere, özellikle de endomisyal antikorların, deamide gliadin peptidlerinin ve tTG'nin saptanmasına dayanır. Bu belirteçler için testi pozitif çıkan hastalar, endoskopi ve ince bağırsak biyopsileri kullanılarak daha ileri incelemeye tabi tutulur. Çölyak hastalığının, T hücrelerinden etkilenen ve HLA-DQ2 ve HLA-DQ8'e bağlı gliadin türevi peptitleri değiştiren bir hastalık olduğu bilinmektedir (Kaswala *et al.* 2015). tTG'nin enzimatik fonksiyonları, daha sonra proinflamatuvar sitokinler üreten ve bağırsaklarda iltihaplanmaya neden olan, kendiliğinden tepkimeye giren T yardımcı hücrelerinin uyarılmasına yol açabilir (Masaebi *et al.* 2020).

Sitokinler, kemokinler, interferonlar (IFN'ler), monokinler, interlökinler (IL'ler), lenfokinler ve koloni uyarıcı faktörleri (CSF'ler) içeren düşük molekül ağırlıklı glikoproteinlerin heterojen bir koleksiyonudur. Sitokinler hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık tepkisi aşamaları boyunca üretilir. Aşırı sitokin üretimi inflamasyona, otoimmüniteye ve bunun sonucunda doku hasarına yol açabilir (Rider *et al.* 2016). Tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α), inflamasyonu teşvik eden ve bağışıklık sistemini düzenleyen çok etkili bir sitokindir. TNF- α , çok sayıda başka sitokinin üretimini indükler ve iltihaplanmaya yol açan sitokin reaksiyonlarının dizisini düzenler. TNF- α geni, HLA sınıf I ve sınıf II arasında güçlü bir genetik bağlantı sergiler (Khan *et al.* 2016). IL-15, monositler, makrofajlar, dendritik hücreler (DC), keratinositler, fibroblastlar, miyositler ve sinir hücreleri gibi çok sayıda hücre türü ve organ tarafından tutarlı bir şekilde üretilir (Grabstein *et al.* 1994). Pleiotropik bir sitokin olarak hem doğuştan hem de edinilmiş

başışıklıkta önemli bir işleve sahiptir (Abadie and Jabri 2014). IL-15, ÇH'nin gelişiminde çok önemli bir rol oynar ve çok sayıda çalışma, bunun hastalığın farklı evrelerinde doğrulanmış etkisini ve çok sayıda hücre tipi ve immünolojik tepkiler üzerindeki geniş etkisini göstermiştir (Voisine and Abadie 2021). IL-15, interlökin (IL 21) olan IL-21'in etkilerini artırabilir. Büyük ölçüde B lenfositleri, T lenfositleri ve doğal öldürücü T hücreleri tarafından sentezlenir (Borrelli *et al.* 2016). Ek olarak çölyak hastalığı olan hastaların epitel hücreleri ve lamina propriası da bunu üretir (Cielo *et al.* 2019). IL-21, hem adaptif hem de doğuştan gelen başışıklık tepkilerini kontrol edip yönlendirdiğinden, çeşitli ve çok işlevli rollere sahiptir. Antikor üretimiyle sonuçlanan T ve B hücresi yanıtlarının düzenlenmesinde önemli roller oynar (Iervasi *et al.* 2020). Sahip olduğu etki aralığı göz önüne alındığında, IL-21'in, otoimmün hastalıklar da dahil olmak üzere çeşitli immün aracılı bozukluklarda yer alan inflamatuvar yanıtların başlatılması, ayarlanması ve ilerlemesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olabileceği anlaşılabilir (Zhang *et al.* 2016, Kunisato *et al.* 2018). Ek olarak, CH ile HLA sınıf II geni, özellikle DQ2 ve DQ8 arasında önemli bir genetik korelasyon vardır. Bunun tersine, yeni yayınlanan bir genom çapında ilişkilendirme çalışması (GWAS), ÇH'ye karşı hassasiyete katkıda bulunan diğer HLA dışı genleri keşfetmiştir. Genom çapında ilişkilendirme çalışmalarının HLA bölgesi ile ilişkili olmayan ÇH ile ilişkili 100'den fazla gen keşfetmesi şaşırtıcı değildir (Lundin and Wijmenga 2015). Bu, ÇH'ye kalıtsal yatkınlığa katkıda bulunan HLA dışı ek genlerin bulunduğunu gösterir.

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmanın amacı, Çölyak hastalığı olan hastaların klinik ve sosyo-demografik sunum özelliklerini (klinik başvuru, ikamet yeri, glutensiz diyet ve aile öyküsü) değerlendirmek, Çölyak hastalarında bazı hematolojik parametrelerin değerlendirmek, ELISA teknikleri kullanılarak CH hastalarından ve kontrol katılımcılarından alınan serumdaki anti- tTG Ab, anti-gliadin Ab ve anti-EMA Ab seviyelerini ölçmek, ELISA teknikleri kullanılarak CH hastalarının insan serumlarında bazı immünolojik belirteçlerin (IL-15, IL-21 ve TNF α) rolünü ve bunların çölyak tarama testleriyle (AGA, EMA ve Ttg) korelasyonunu belirlemek, Irak'ta bulunan CH hastalarında HLA-DQ2 ve HLA-DQ8 haplotiplerini ve alellerini tespit etmek, CH hastalarında anti- tTG, anti-gliadin Ab ve anti-EMA konsantrasyonları ve ayrıca

interlökinler IL-15, IL-21 ve TNF ile ilişkili olarak HLA-DQ2 ve HLADQ8'i tespit etmek ve son olarak MYOB9 genindeki SNP'lerin (rs2305767) saptanmasıdır.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Çölyak Hastalığı

2.1.1 Genel bilgiler

Glutene duyarlı enteropati veya tropik olmayan sprue olarak da bilinen Çölyak hastalığı, genetik olarak yatkın bireyleri etkileyen sistemik bir otoimmün durumdur ve küresel popülasyonun yaklaşık %1'inde gluten tüketimiyle tetiklenir. Buğday, arpa ve çavdardaki glütenin α -gliadin kısmı ince bağırsakta immünolojik tepkiyi tetikleyerek mukozal hasara ve villöz yapının bozulmasına neden olur. Bağışıklık reaksiyonu ince bağırsağın ötesine uzanır ve vücutta başka bağırsak dışı semptomlara yol açabilir. Genetik yatkınlık, durumun gelişimi için çok önemlidir. Yaşam boyu gluten intoleransı HLA-DQ2 veya HLA-DQ8'in varlığını gerektirir. HLA-DQ2 veya HLA-DQ8 haplotiplerine sahip olmak ÇH geliştirmek için gereklidir (Voisine and Abadie 2021).

Çölyak hastalığı çok çeşitli klinik semptomlarla ortaya çıkar. Yaygın olmasına rağmen, malabsorbsiyonun tipik belirtileri yalnızca az sayıda hastada mevcut olduğundan çoğu hasta uzun bir süre tespit edilememektedir (Caio *et al.* 2019). Komorbiditeler arasında immün aracılı bozukluklar, bir deri semptomu olarak dermatitis herpetiformis, diş minesi hipoplazisi (DED) ve oral semptomlar olarak tekrarlayan oral aftöz lezyonlar (RAS) yer alır. Gluten ataksisi, Purkinje hücrelerinin kademeli dejenerasyonu ile karakterize, glutenin neden olduğu bir hastalıktır. Ortak genetik arka plan, ÇH ve diğer otoimmün bozuklukların eşzamanlı varlığına katkıda bulunur. Bu hastalıklar sıklıkla çocukluk döneminde tip I diyabeti ve olgunluk döneminde otoimmün tiroiditi içerir. İnflamatuvar bağırsak hastalığının yanı sıra Sjögren sendromu, sistemik lupus eritematozus (SLE), Addison hastalığı, romatoid artrit, otoimmün karaciğer bozuklukları ve miyastenia gravis daha az sıklıkla gelişir. Dirençli çölyak hastalığı, çölyak hastalığının nadir ve ciddi bir sonucudur. Çoğu hastada ülseratif jejunit gelişir ve bunu hemen hemen yalnızca çölyak hastalarında ortaya çıkan enteropati ile ilişkili T hücreli lenfoma (EATL) takip eder (Bajor 2020).

Modern yaşamın hızlı ilerlemesi ve ekonomik büyüme, özellikle geçen yüzyılın ikinci yarısında belirgindir. Bu, aynı zamanda beslenme alışkanlıklarını da etkileyen insan yaşam tarzındaki bir değişiklikle bağlantılıdır. İnsan beslenme düzenlerindeki değişiklik; obezite, hipertansiyon, otoimmün bozukluklar (AID), kardiyovasküler hastalıklar ve kanserler gibi birçok sağlık sorunundaki artışla ilişkilendirilmiştir (Goel *et al.* 2020).

2.1.2 Tarihçe

Çölyak hastalığı (ÇH), genetik olarak yatkın kişilerde gluten tüketimiyle aktive olan sistemik bir durumdur. Bu durum, kan dolaşımındaki belirli otoantikorlara ve spesifik bir insan lökosit antijen haplotipine (HLA-DQ2 veya HLA-DQ8) bağlı, bağırsakları etkileyen bir otoimmün bozukluk olarak ortaya çıkar (Ludvigsson *et al.* 2013). MS 250'de Kapadokyalı Aretaeus, "pepsis" veya sindirimin, "anadoz" veya emilimin kronik olarak bozulmasının "çölyak diyatezi" olarak bilinen genel bir zayıflığa yol açtığını yazmıştır (Dowd and Walker-Smith 1974, Gasbarrini *et al.* 2014). Karın anlamına gelen Yunanca "koiliakos" kelimesi, "çölyak" kelimesinin kökenidir (Freeman 2015). Ancak Samuel Gee tarafından, ÇH'nin kapsamlı modern klinik tanımı 1888'e kadar yayınlanmamıştır. Christian Herter 1908 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde (Herter 1908) büyüme gerilemesini vurgulayan benzer bir açıklama yayınlamıştır. ÇH bir dönem Gee-Herter hastalığı olarak anılmıştır (Yan D. & Holt PR, 2007). Ancak, Arateus'tan beri bu kavramda diyetin nedensel bir rol oynadığı fikri ortaya atılmıştır. Muz diyeti (Haas 1924) ve meyve ve sebze bazlı Fanconi diyeti de dahil olmak üzere birçok diyet 20. yüzyılda tanınmıştır. Hollandalı bir çocuk doktoru olan Willem-Karel Dicke, tahıl tüketimi (buğday, çavdar, arpa ve daha az ölçüde yulaf) arasındaki nedensel ilişkiyi ilk olarak 1940'larda tanımlamıştır. İkinci Dünya Savaşı sırasında gıda kıtlığının ÇH'li çocukları nasıl etkilediğinin gözlemlenmesi bu bağlantıya ilham kaynağı olmuştur. Dicke, CD'li çocukların ekmek ve tahıl yemeyi bıraktıklarında semptomlarının düzeldiğini; ancak savaş bittiğinde ve bu yiyecekler yeniden diyetlerinin bir parçası haline geldiğinde semptomlar daha da kötüleştiğini kaydetmiştir (Yan and Holt 2009). ÇH hastalarından alınan cerrahi numunelerdeki ince bağırsak histolojik anormallikleri (kronik inflamasyon ve atrofi), Paulley (1954) tarafından ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Berger *et al.* (1964) tarafından yapılan çalışmada, ÇH hastalarının serum anti-gliadin antikorlarına (AGA)

sahip olduğu tespit edilmiştir. Seroloji 20 yıla kadar bir tanı kriteri olarak kabul edilmemiştir (Kilander *et al.* 1983). Ancak daha sonra kesin ve hassas serolojik testler keşfedilmiştir. Falchuk *et al.* (1972), belirli bir HLA genotipi ile ÇH arasında bir korelasyon olduğunu ve ÇH'nin glutene karşı anormal bir bağışıklık tepki genine sahip olduğunu öne sürmüşlerdir. HLA-DQ2/8'in artık ÇH gelişimi için gerekli olduğu bilindiğinden, HLA tespiti ÇH tanısının üçüncü dayanağını oluşturmaktadır (Calado and Verdelho Machado 2022).

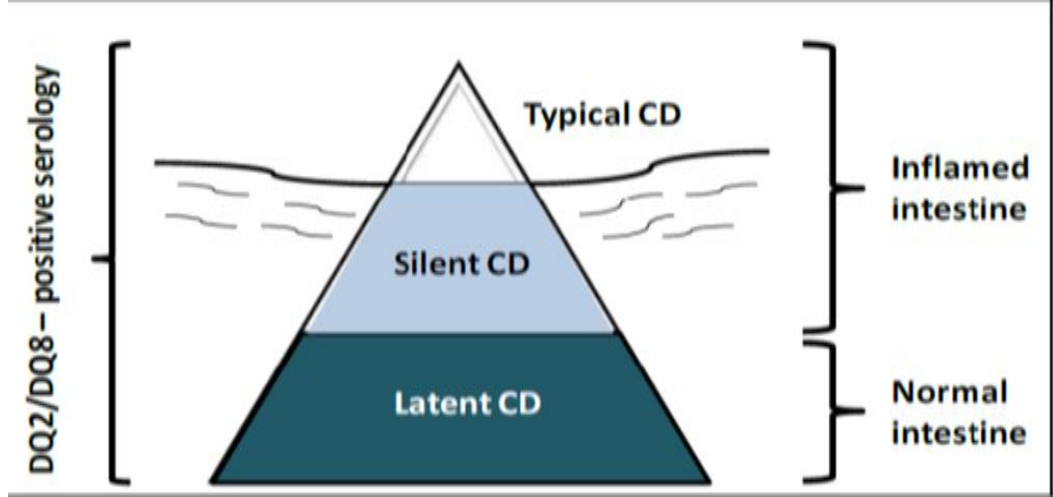
2.1.3 Epidemiyoloji

ÇH prevalansı yaşa, cinsiyete ve coğrafi bölgeye göre değişmektedir. Yakın zamanda yapılan bir meta-analiz, dünya çapında serolojik testler kullanılarak %1,4 ve bağırsak biyopsisi kullanılarak %0,7 sıklık tespit etmiştir (Singh *et al.* 2018, Stefanelli *et al.* 2020). Sıklık, sağlık sistemleri içindeki anlaşmazlıklardan ve yürütülen teşhis araştırmalarının miktarından etkilenen farklı ülkeler arasında değişmektedir (Fasano and Catassi 2012, Du *et al.* 2018). Coğrafi dağılımda önemli farklılıklar vardır. Çölyak hastalığı Batı ülkelerinde daha yaygındır ve genel nüfusun yaklaşık %1'ini etkilemektedir. Test duyarlılığının artması, beslenme uygulamalarındaki değişiklikler ve ilişkili gastrointestinal semptomların daha fazla ortaya çıkmasıyla ilişkilendirilebilecek vakalarda her yıl, özellikle çocuklar arasında gözle görülür bir artış olmuştur (Namatovu *et al.* 2014). Batı ülkeleri, gluten içeren temel gıdaların kullanımından kaynaklanan çölyak hastalığı vakalarının tarihsel merkez üsleri olarak kabul edilmektedir. Gluten yeme oranındaki benzerliğe ve genetik hassasiyete rağmen, Avrupa ülkeleri genelinde bu durumun sıklığında açıklanamayan bir heterojenlik vardır (Catassi *et al.* 2014). Amerika Birleşik Devletleri'nde genel popülasyonda çölyak hastalığının prevalansı %0,4 ile %1 arasında değişmektedir ve Avrupa ile karşılaştırıldığında tanı kriterlerinde farklılıklar bulunmaktadır (Badizadegan *et al.* 2020).

Küresel nüfusun %60'ına ev sahipliği yapan Asya, farklı Asya ülkeleri arasında farklılıklar göstererek ÇH prevalansında artış yaşamaktadır ve teşhis edilemeyen vakaların önemli bir kaynağı olarak kabul edilmektedir (Singh *et al.* 2016, Agarwal *et al.* 2020). Ortadoğu ülkelerinin başlangıçta çölyak hastalığı prevalansının düşük olduğu

düşünülmüyordu. Ancak anti- tTG Ab ve anti- endomysial Ab gibi serolojik testlerin kullanıma sunulmasıyla birlikte görülme sıklığı Batı ülkeleriyle karşılaştırılabilir düzeye yükselmiştir (Parzanese *et al.* 2017). Suudi Arabistan'da biyopsi ile kanıtlanmış vakaların prevalansı yaklaşık %1'dir, ancak dünya çapında diğer bölgelerde görüldüğü gibi vakaların hafife alınması nedeniyle gerçek sayı daha fazla olabilir (Al Hatlani 2015, Al-Ajlan 2016).

Irak'ta yapılan sınırlı çalışmalar, tip 1 diyabetli çocuklarda çölyak hastalığı prevalansının %10 ile %11,2 arasında olduğunu göstermiştir (Mansour and Najeeb 2011). Başka bir çalışma, irritabl bağırsak sendromlu Iraklı hastaların %12,1'inde CH kayıtlarının mevcut olduğunu göstermiştir (İbrahim 2020). Şekil 2.1'de gösterildiği gibi, ÇH vakaları sıklıkla bir buzdağına benzetilir; tanı konulan hastaların su hattının üzerindeki görünür kısmıdır ve tanı konulamayan çoğunluğun ise yüzeyin altında saklandığı düşünülmektedir (Nenna *et al.* 2013). ÇH her yaşta ortaya çıkabilir, ancak en sık iki yaşından sonra çocukluk döneminde (King *et al.* 2020) veya yaşamın üçüncü on yılında (yetişkinlik) (Pastore *et al.* 2019) teşhis edilir. Serolojik ve biyopsi tanı yöntemlerindeki ilerleme, özellikle hafif semptomları olan hastaların tespit edilmesinde artışa yol açmıştır. Bu gerçek aynı zamanda yetişkin ve yaşlı bireylerde tespit edilen vakaların oranını da değiştirmiştir. Yaşlılarda vakaların artması, bu vakaların gecikmiş tanıdan mı kaynaklandığı yoksa gerçekten bu yaş grubunda mı geliştiği sorusunu gündeme getirmektedir. Bu tür vakaların tespiti, gecikmiş tanıya veya gastrointestinal semptomları çok az olan veya hiç olmayan bireylere bağlı olabilir (Ludvigsson *et al.* 2014, Domic *et al.* 2019). Araştırmalar, genetik duyarlılığı olan ve az miktarda gluten içeren gıdaları tüketen bebeklerin, yaşamlarının ilerleyen dönemlerinde semptomatik çölyak hastalığına yakalanma riskinin yüksek olduğunu göstermektedir. ÇH Irak'taki çocuklarda daha yaygındır (Hameed *et al.* 2016). Çölyak vakalarında, kadınlarda erkeklere kıyasla bu durumun görülme sıklığı daha yüksektir ve kadın/erkek oranı 3:1'dir (Caio *et al.* 2019, Hameed *et al.* 2016).



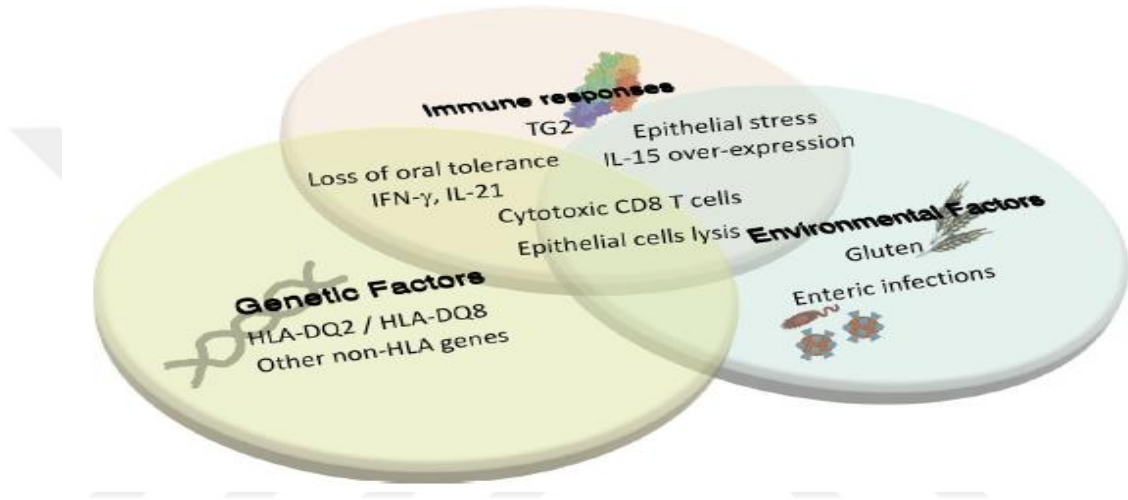
Şekil 2.1 Çölyak hastalığının buzdağı modeli (Parzanese *et al.* 2017)

2.1.4 Çölyak hastalığının etiyolojisi

2.1.4.1 Çevresel ve yaşam tarzı faktörleri

Geçtiğimiz yüzyılın son yirmi yılında Batı ülkelerinde ÇH prevalansındaki artış yalnızca tanı yöntemlerindeki ilerlemelere bağlı değildir (Singh *et al.* 2018). Avrupa Gastroenteroloji, Hepatoloji ve Pediatrik Beslenme Derneği'nin (ESPGHAN) sütten kesme sürecine ilişkin mevcut kılavuzlarının güncellenmiş bir versiyonunda (Agostoni *et al.* 2008), glutenin "tolerans penceresi" içinde 4 ile 7 aylıkken verilmesi önerilmektedir. Probiyotiklerin pasif olarak verilmesi gibi emzirmenin yenidoğanlar için önemli faydalarına rağmen, özellikle yaşamın ilk altı ayında düşük glutenli diyet uygulayan bebeklerde emzirmenin çölyak hastalığına yakalanma riskini azaltıp azaltmadığı konusunda hala tartışmalar bulunmaktadır (Størdal *et al.* 2013, Lionetti and Catassi 2015). Erken bebeklik dönemindeki enfeksiyonlar, özellikle de gastrointestinal veya solunum yolu enfeksiyonları, ÇH'nin başlangıcı veya ilerlemesiyle yakından bağlantılı olabilir. Bu durum, yüksek interferon-1 seviyelerine, bağırsak epitel bariyerinin bozulmasına ve bağırsak mukozasında gen ifadesinde değişikliklere neden olan mikrobiyal ve gluten peptidleri arasındaki benzerliğe bağlanabilir (Canova *et al.* 2014, Beyerlein *et al.* 2017). Bağırsak mikrobiyota bileşimi, doğum yöntemi, metabolik profil, aşılama tasarımı ve antibiyotik veya diğer ilaçların kullanımı gibi çeşitli çevresel faktörlerin, bağışıklık tepkisi ile glutene tolerans arasındaki dengeyi gerçekten etkileyip

etkilemediğini belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Hamilelik ve doğum sırasında maruz kalmanın etkisi henüz tam olarak araştırılmamıştır. Gluten antijenitesinin azaltılması ve toksik peptitlerin glutenden uzaklaştırılması etkili bir birincil önleme stratejisi olabilir. Bu, belirli tahıl çeşitlerinin seçilmesi, gluten peptit dizilerinin genetik olarak değiştirilmesi veya toksik dizileri silinmiş veya susturulmuş genetiği değiştirilmiş organizmaların oluşturulması gibi çeşitli yöntemlerle yapılabilir (Pagliari *et al.* 2015, Fredinah Namatovu 2015) (Şekil 2.2).

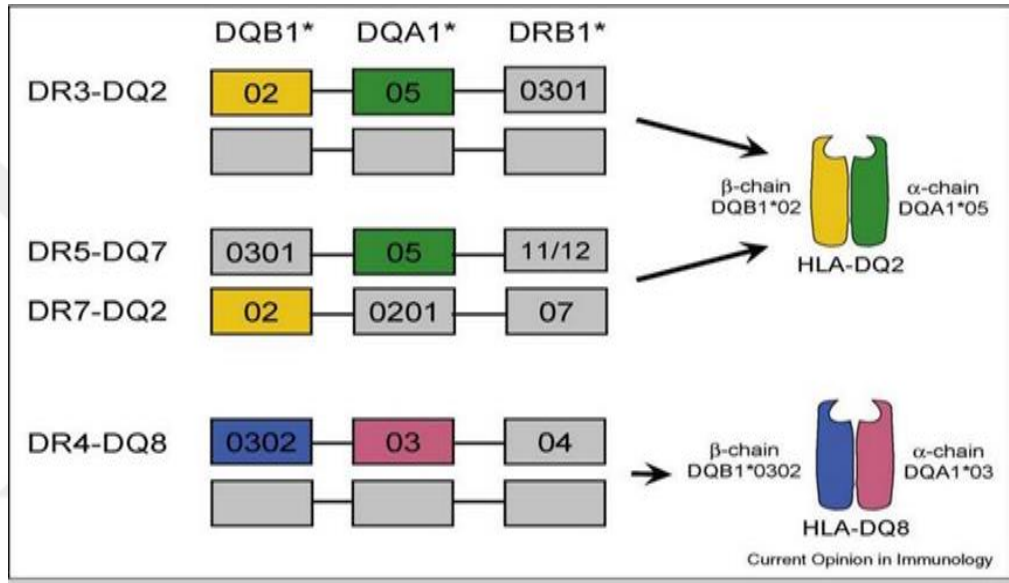


Şekil 2.2 Çölyak hastalığının, doğuştan gelen ve edinsel bağışıklık ve çevresel tetikleyiciler arasındaki etkileşimi (Voisine and Abadie 2021)

2.1.4.2 Genetik duyarlılık

ÇH, çevresel faktörlere bağlı olarak genetik olarak yatkın bireylerde ortaya çıkan tanınmış bir otoimmün hastalıktır. Çölyak hastalığının genetik bir bileşeni vardır ve birinci derece akrabalarda bu durumu geliştirme olasılığı %7,5'tir (Singh *et al.* 2015). Diğer otoimmün hastalıklarda olduğu gibi, çölyak hastalığının da önemli bir genetik bileşeni vardır ve bu durum, çölyak hastalığında sık görülmesiyle kanıtlanmıştır. Aileler (yaklaşık %10-15) ve tek yumurta ikizlerinde bu durumun görülme ihtimalinin yüksek olması (%75-80) muhtemeldir (Lundin and Wijmenga 2015). HLA sınıf II heterodimerleri, özellikle DQ2 ve DQ8, diğer otoimmün hastalıklara benzer şekilde çölyak hastalığının kalıtsallığında önemli bir rol oynar. HLA-DQ2 geninin iki kopyasına sahip olmak, yakın akrabası çölyak hastalığından etkilenen bebeklerin bu duruma erken

yaşıta yakalanma olasılığını önemli ölçüde (%25-30) artırır (Lionetti *et al.* 2014). HLA-DQ2/HLA-DQ8 genel popülasyonun %25-35'inde yaygındır ve bu bireylerin yalnızca %3'ünde ÇH gelişebilir (Mazzilli *et al.* 1992). Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları, 100'den fazla HLA ile ilişkili olmayan genin CD ile bağlantılı olduğunu göstermiştir (Lundin and Wijmenga 2015). ÇH için kalıtsal riske katkıda bulunan bu ekstra genlerin önemi sınırlıdır, ancak belki de hastalığın gelişiminde rol oynayan önemli mekanizmaların ortaya çıkarılmasına yardımcı olabilirler (Caio *et al.* 2019) (Şekil 2.3).

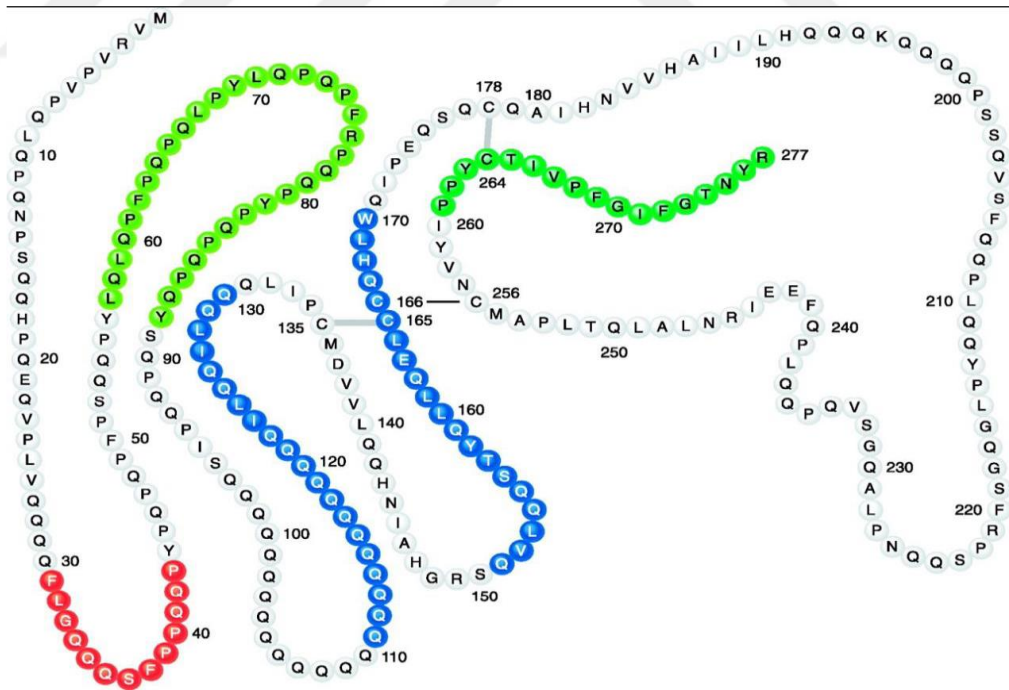


Şekil 2.3 HLA-DQ2 ve DQ8 haplotipleri (Caio *et al.* 2009)

2.1.4.3 Belirli tahılların tüketimi

ÇH, ince bağırsağa zarar veren ve malabsorbsiyonun yanı sıra otoimmün semptomlara neden olan glutene karşı ciddi bir bağışıklık reaksiyonundan kaynaklanır (Guandalini and Assiri 2014). *Triticiae* kabilesinin *Gramineae* familyasından bir protein sınıfı, özellikle buğday, glutinli arpa ve çavdarı oluşturur. Yulaf filogenetik olarak daha uzaktan akraba olmasına rağmen, bazı hastaların semptomları deneyimlemesine yetecek kadar benzerlik vardır. Darı, sorgum, pirinç ve mısır ÇH'ye neden olamayacak kadar uzaktadır (Kagnoff 2007). Gluten, adını viskoelastik ve yapışkan özelliklerinden dolayı Latince "yapıştırıcı" anlamına gelen bir kelimedir (Lebwohl *et al.* 2018). Şekil 2.4 buğdayın temel yapısını göstermektedir. Gliadinler 250-650 amino asitten oluşur ve molekül ağırlığı 30,000 ile

75,000 arasında değişir. Gliadin'in dört elektroforetik alt tipi vardır: α , β , γ ve ω . Bu alt tipler karşılaştırılabilir epitopikleri farklılaşmamış antikorların oluşumuyla sonuçlanan özelliklerdir (Ozuna *et al.* 2015). Tohumun protein içeriği un ağırlığının yaklaşık %8-15'ini oluşturur ve çözünürlüklerine göre albuminler, globulinler, gliadinler ve gluteninler gibi çeşitli formlardan oluşur (Sharma *et al.* 2020). Glutenin, disülfid bağlarıyla bir arada tutulan bir polimer oluşturarak hamurun uzayabilirliğine katkıda bulunur ve iki alt tipten oluşur: HMW ve LMW glutenin. Buğday proteinleri, yüksek prolamin ve glutamik asit, amino asit seviyeleri nedeniyle prolaminler olarak anılır (García-Molina and Barro 2017). Gluten tipik olarak tüm tahıl proteinlerini (prolaminler) içerir ve buğday alerjisi, çölyak hastalığı, dermatitis herpetiformis, gluten ataksisi ve çölyak dışı gluten duyarlılığı (NCGS) gibi glutenle ilişkili bozuklukları olan bireylerde bağışıklık reaksiyonlarına neden olabilir (Sollid *et al.* 2012). Glutenin immünojenitesini azaltmak için ekmekteki CH epitopunun azaltılması (Zhang *et al.* 2018) veya moleküler biyoloji manipülasyonu, probiyotik kullanımı veya nanoteknoloji (Yoosuf and Makharia 2019) gibi farklı yöntemler önerilmiştir.



Şekil 2.4 α -gliadin polipeptidinin haritalanması (Fasano 2011)

2.1.4.4 Bağışıklık tepkisi

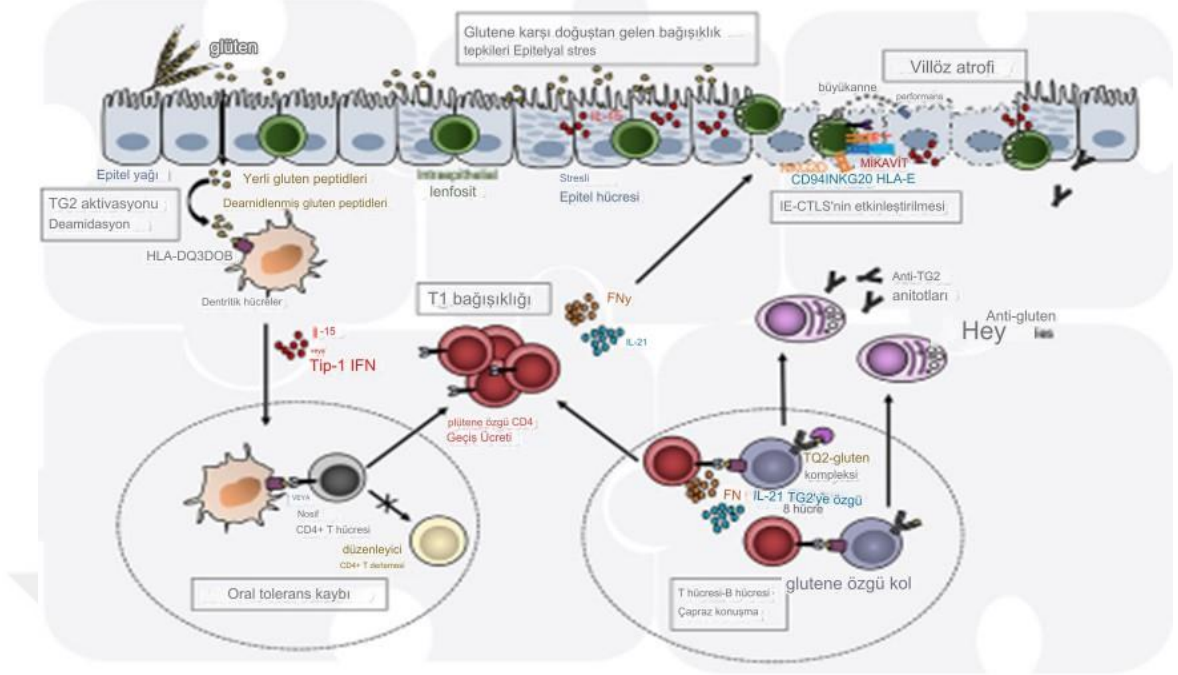
Doğuştan bağışıklık tepkisi;

Doğuştan bağışıklık ÇH'ye başlamak için çok önemlidir. İnterlökin (IL15) ve interferon a gibi sitokinler, dendritik hücrelerin ve intraepitelyal lenfositlerin fonksiyonunu etkileyerek doğuştan gelen bağışıklık tepkisini aktive edebilir (Matysiak-Budnik *et al.* 2008). Son bulgular, belirli gliadin peptitlerinin epitelyal büyüme faktörü ve IL-15 üretimini tetikleyebildiğini, bunun da enterosit gelişiminde, yapısal bütünlükte, veziküler taşınmada, sinyal yollarında, proliferasyonda ve stres ve doğuştan gelen bağışıklık tepkilerinin aktivasyonunda değişikliklere yol açtığını göstermektedir (Kim *et al.* 2015). Buğdayda haşere direnci sağlayan alfa-amilaz/tripsin inhibitörlerinin, Toll benzeri reseptör 4-MD2-CD14 kompleksi ile etkileşime girerek çölyak hastalığının doğuştan gelen bağışıklık tepkisinde de rol oynadığı görülmektedir. Bu etkileşim, çölyak hastalığı olan hastaların hücrelerinde olgunlaşma belirteçlerinin ekspresyonunun artmasına ve proinflamatuvar sitokinlerin salınmasına yol açar (Junker *et al.* 2012). Bu mukozal olaylar, gliadin aracılı zonulin salınımına ikincil olarak epitelyal bariyer fonksiyonunun fonksiyonel ihlali (Caio *et al.* 2019), lamina propriada toksik peptitlerin müteakip erişimi ve gliadin kaynaklı yüksek seviyelerde zonulin üretimi ile birlikte nötrofil aktive edici ve kemoattraktan kemokin (IL-8) (Barone *et al.* 2014), 'mükemmel fırtınanın' ÇH enteropatisini başlatmasına neden olur. Araştırmalar gliadinin, fMet -Leu- Phe reseptörü 1 ile etkileşime girerek nötrofilleri doğrudan çektiğini gösterdi (Lammers *et al.* 2015).

Adaptif bağışıklık tepkisi;

Çölyak hastalığının gelişimine temel olarak belirli gluten peptitleri ile majör doku uyumluluk kompleksi sınıf II HLADQ2/8 Ag tarafından kısıtlanan T lenfositleri arasındaki benzersiz etkileşim neden olur ve bu da hatalı bir adaptif bağışıklık tepkisine yol açar (Stamnaes and Sollid 2015). Gluten peptidleri ve TG2 arasındaki etkileşim, translasyon sonrası deamidasyon sürecine dayanır. Bu etkileşim, CD4+T hücrelerinin adaptif immünolojik tepkisini artıran IL-15 aşırı ekspresyonu yoluyla doğuştan gelen bağışıklık sisteminin aktivasyonundan etkilenir (Caio *et al.* 2019). HLA sınıf II'yi

eksprese eden dendritik hücreler, makrofajlar, B hücreleri ve enterositler, gluteni CD4+T hücrelerine sunarak bunların lamina propriada yeniden dolaşımına yol açabilir. Lamina propriadaki CD4+ T hücreleri glutenle temas ettiğinde aktive olur ve çoğalır, bu da stromal hücreler tarafından proinflamatuvar sitokinlerin, metaloproteazların ve keratinosit büyüme faktörünün üretilmesine yol açar. Bu süreç, intraepitelyal lenfositlerin (IEL'ler) neden olduğu bağırsak epitel hücre ölümüne bağlı olarak kriptal hiperplaziye ve villöz küntleşmeye neden olur (Pagliari *et al.* 2015). Ek olarak, aktif CD'de enterositler üzerinde membrana bağlı IL-15'in aşırı ekspresyonu vardır ve doğal öldürücü (NK) reseptörlerinin (CD94) ve (NKG2D) CD3+ IEL'ler tarafından aşırı ekspresyonuna neden olur (Hüe *et al.* 2004). CD kript hiperplazisinin, mukozal inflamatuvar hakaretin neden olduğu devam eden doku hasarı ile kök hücrelerin hasarı onarma konusundaki yetersizliği arasındaki dengesizlikten kaynaklandığına inanılmaktadır. Araştırmamız, çölyak hiperplastik kriptasının olgunlaşmamış progenitör hücrelerde bir artış ve kirpi sinyallemede bir azalma sergilediğini göstermektedir (Senger *et al.* 2015). Bu çalışma, ÇH histopatolojisine katkıda bulunan moleküler yolları ortaya çıkarmakta ve ÇH için fare modellerinde neden enteropati gelişmediğini açıklamaktadır. İnsanlaştırılmış farelerde tutarlı CH benzeri enteropati mevcut değildir (Ju *et al.* 2015). CD4+T hücrelerinden gelen immün tepkiye bağlı olarak enterositlerin hızlı parçalanmasının ÇH gelişiminin tek nedeni olmadığını savunmaktadır. ÇH'ye yatkın bireylerin kök hücre popülasyonundaki temel bir kusurun, ÇH ile ilişkili bağırsak sorunlarının gelişiminde çok önemli bir rol oynadığını ileri sürmektedir (Schumann *et al.* 2017) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 Çölyak hastalığında bağırsak dokusu tahribatı (Voisine and Abadie 2021)

2.1.5 Çölyak hastalığının klinik sunumu

Kadın-erkek oranı kabaca 2,8:1 (Abadie *et al.* 2011, Hameed *et al.* 2016) olup, kadınlarda daha yüksek bir tercih söz konusudur ve iki tepe noktası vardır (Igbinedion *et al.* 2017); ilk dalga bebeklikten sonra ortaya çıkarken, ikinci dalga genellikle yaşamın ikinci ile üçüncü on yılında gerçekleşir (Kabbani *et al.* 2012). ÇH, genetik olarak yatkınlığı olan bireylerde gluten tüketimi ile tetiklenen otoimmün bir durumdur. Dünya genelinde görülme sıklığı yaklaşık %1'dir. ÇH'nin teşhisi son birkaç yılda gelişme göstermiş ve özellikle hastalığın subklinik tipindeki vakaların teşhisinde artış sağlamıştır. Klinik tablo önemli ölçüde değişkenlik gösterebilir ve çeşitli tablo stratejileri önerilmiştir. İntestinal, ekstraintestinal, prospektif ve refrakter (Caio *et al.* 2019). Bağırsak tipi ağırlıklı olarak 3 yaşın altındaki çocuklarda görülür ve ishal, iştah azalması, gelişememe ve karın şişkinliği gibi semptomlar gösterir (Meijer *et al.* 2021). Çölyak hastalığı olan yetişkinler karın şişliği, ishal, mide koliği veya kabızlık gibi sindirim semptomları yaşayabilir (Reilly *et al.* 2011). Bağırsak dışı belirtiler çeşitlidir ve hem pediatrik hem de yetişkin çölyak hastalığı vakalarında bulunabilir: Hematolojik bulgular, kemik yoğunluğu değişiklikleri,

büyüme geriliği ve boy kısalığı, oral bulgular, nörolojik bulgular, psikolojik bozukluklar, oküler bulgular, dermatolojik bulgular, yorgunluk, kas bulguları, kardiyopulmoner bulgular ve üreme sistemi bulguları (Lindfors *et al.* 2019).

2.1.6 Çölyak hastalığının türleri

2.1.6.1 Tipik (Gastrointestinal)

Bu tipik olarak ishal, steatore ve kilo kaybına yol açan malabsorbsiyon dahil olmak üzere sindirilmiş gıdanın düzensiz emiliminden kaynaklanan klinik semptomlarla karakterize edilir (Ludvigsson *et al.* 2013). Tipik olarak altı ile yirmi dört aylıkken gluten içeren sütte kesme gıdalarının verilmesinden sonra meydana gelir (Tully 2008). Villöz atrofi ve kript hiperplazisinin histolojik bulguları tanıyı destekler.

2.1.6.2 Atipik (Ekstratestinal)

Bu çeşitlilik, anormal emilimin tipik belirtileri olsun ya da olmasın, bağırsak dışı semptomların yaygınlığı ile karakterize edilir. Genellikle daha büyük çocuklarda ve yetişkinlerde bulunur (Ludvigsson *et al.* 2013). Çeşitli çalışmalar, çölyak hastalığı olan kişilerin %50'sinden fazlasının anemi, osteoporoz, hipoplastik diş minesini ve nörolojik sorunlar gibi çok sayıda semptom sergilediğini göstermiştir (Rampertab *et al.* 2006, Husby *et al.* 2012).

2.1.6.3 Asemptomatik

Bu form, klinik semptom belirtisi olmaksızın pozitif seroloji ve karakteristik bağırsak histolojisi gösteren birkaç kişiye işaret etmektedir. Özellikle otoimmün veya nadiren malign hastalıklar olmak üzere komplikasyon gelişme şansı yüksektir (Caio *et al.* 2019). Tip 1 diyabet, ailede çölyak hastalığı öyküsü ve Down, Turner veya Williams sendromu gibi genetik hastalıkları gibi otoimmün rahatsızlıkları olan hastalar, çölyak hastalığının gelişmesine daha duyarlıdır (Ludvigsson *et al.* 2013).

2.1.6.4 Gizli (Potansiyel)

Sınırlı sayıda asemptomatik kişi pozitif serum TG2 antikorlarına sahiptir ancak normal ince bağırsak histolojisine sahiptir (Volta *et al.* 2016). Önceki bir çalışma, bu hastalardaki yüksek endomisiyal antikor seviyelerinin hastalığın ilerlemesinin önemli bir göstergesi olabileceğini öne sürmüştür (Troncone *et al.* 1996). Bu gruptaki bazı hastalarda zamanla gözle görülür mukozal hasar meydana gelir. Olası çölyak hastalığında bağırsak biyopsi bölgesinde transglutaminaz 2 antikorları ve önemli sayıda intraepitelyal lenfosit (özellikle TCR $\gamma\delta$ + lenfositler) sıklıkla görülmektedir (Caio *et al.* 2019).

2.1.6.5 Refrakter (RCD)

RCD, tüm OACD vakalarının yaklaşık %10'unu ve tüm çölyak hastalığı vakalarının yaklaşık %1-1,5'ini oluşturur. Bu bozukluk, negatif çölyak hastalığı serolojisi ile doğrulanan, minimum bir yıl sıkı glutensiz diyet sonrasında sürekli villöz atrofiye bağlı malabsorbsiyon, kilo kaybı ve ishal semptomlarıyla tanımlanır (Ludvigsson *et al.* 2013). Refrakter çölyak hastalığı iki sınıfa ayrılır: birincil ve ikincil. Bu sınıflandırma, hastaların glutensiz diyetin başlangıcından itibaren semptomatik iyileşme yaşayıp yaşamadıklarına veya bir iyileşme döneminden sonra semptomların tekrar ortaya çıkıp çıkmadığına dayanmaktadır. RCD-tip 1'in iki alt tipi vardır: biri IEL popülasyonunda normal bir CD3⁺ CD8⁺ fenotipine sahiptir ve diğeri ise gama zincirinin monoklonal yeniden düzenlenmesi ile birleştirilmiş yüzey CD3⁺/ intrasitoplazmik CD3⁺ IEL'lerin klonal sunumuna sahiptir. T hücresi reseptöründe (Roshan *et al.* 2011), iki alt gruba yapılan bu sınıflandırma, tedavi planlaması ve prognozu tahmin etmek için çok önemlidir.

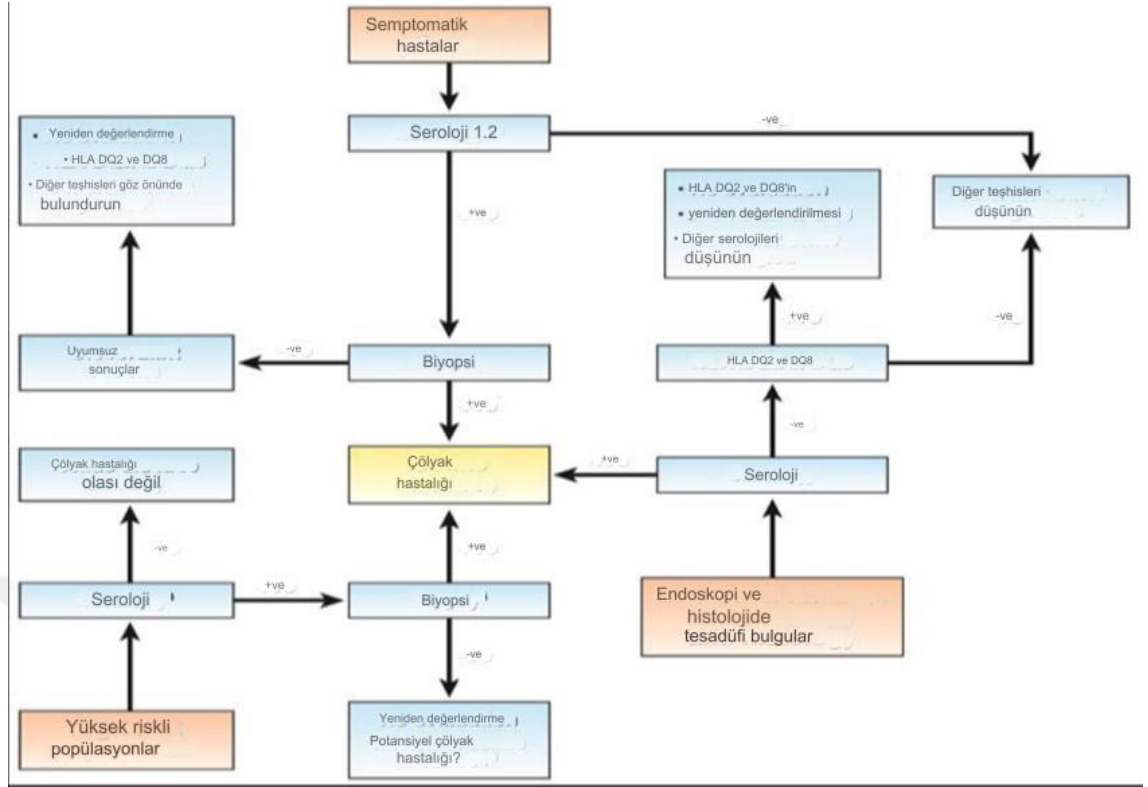
2.1.7 Çölyak hastalığının teşhisi

ÇH ile ilişkili semptomların çeşitliliği, tanımlanmasını zorlaştırmaktadır. Doğru bir teşhis tek bir teste dayanamaz ancak bileşenleri klinik, serolojik, genetik ve histolojik yönlerden oluşan bir yapbozun titizlikle bir araya getirilmesini gerektirir (Ludvigsson *et al.* 2014, Husby *et al.* 2020). NASPGHAN, ESPGHAN ve İngiliz Gastroenteroloji Derneği (BSG)

uluslararası kılavuzlarına göre ÇH tanısı, ÇH serolojik belirteçlerinin, HLA-DQ2 ve HLA-DQ8 genotiplemesinin analizine, ince bağırsaktan ilk biyopsiye ve klinik ve serolojik değerlendirmelere dayanmaktadır. Glutensiz diyet klinik, serolojik ve histolojik görünümü değiştirerek hastalığın ayırt edici özelliklerinin tanımlanmasını engeller. Tanıyı doğrulamak için, ÇH'deki histolojik değişikliklerin düzensiz doğası nedeniyle duodenumun ikinci veya daha distal bölgesinden alınan çoklu bağırsak biyopsilerinin histolojik incelemeye tabi tutulması gerekir. Teşhis net olmadığında, HLA-DQ2 ve HLA-DQ8 testi çölyak hastalığını dışlamak veya her iki belirteç de negatif çıkarsa olası olmayan bir tanıya işaret etmek için değerli bir araç olabilir. ÇH tanısı, tüm semptomların ortadan kalkması ve başlangıçta pozitif olan hem serolojik hem de histolojik testlerin sıkı bir glutensiz diyet tedavisi sonrasında negatif hale gelmesiyle doğrulanır (Hill *et al.* 2005, Husby *et al.* 2012).

2.1.7.1 Çölyak hastalığındaki serolojik testler

ÇH'nin teşhis sürecinde önemli bir rol, bağırsak biyopsisi yapılması gereken kişilerin belirlenmesine olanak sağlayan seroloji tarafından oynanır; en önemli testler ve bunların göreceli önemi aşağıda verilmiştir: (Villanacci *et al.* 2020) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Çölyak hastalığının teşhis süreci diyagramı (Kelly *et al.* 2015)

Anti-retikülin antikorı: Bu üretilen ve kısaca kullanılan ikinci serolojik testtir. Daha hassas analizlerin mevcut olması nedeniyle tarama amacıyla kullanılmamalıdır (Nandiwada and Tebo 2013, Mäki 1995).

Anti-gliadin antikorı (AGA'lar): ÇH'yi tespit etmek için çeşitli antikor testleri geliştirilmiştir. IgA-AGA yıllardır kullanılmaktadır ve makul derecede doğrudur. Araştırmalar, antikorların (IgA ve IgG) doğal gliadin'i hedef aldığını, AGA'ları çölyak hastalarında ince bağırsak biyopsisi ihtiyacına yönelik ilk serolojik göstergeler haline getirdiğini göstermiştir (Al-Toma *et al.* 2019, Leffler and Schuppan 2010). Ancak, 1990'larda daha kesin teşhislerin yaygın olarak bulunması nedeniyle önemi azalmıştır (Gasbarrini *et al.* 2010). Testin zayıf doğruluğu ve sınırlı duyarlılığı/özgüllüğü ile karşılaştırıldığında, küçük çocuklarda daha iyi performans göstermektedir (Rubio-Tapia *et al.* 2023).

Antiendomisyel antikor (EMA): EM antikor testi, hastalığın tespiti için kesin ve hassas bir teşhis aracıdır. Endomisyum antikorları, insan göbek kordonu veya maymun özofagus dokusu kullanılarak dolaylı immünofloresan teknikle tanımlanabilir ve sonuçlar titreler halinde sağlanır (Lebwohl and Rubio-Tapia 2021, Leffler and Schuppan 2010). EMA, yüksek özgüllüğü ve duyarlılığı nedeniyle çölyak hastalığı için önemli bir biyobelirteç olarak kabul edilmektedir (Salmi *et al.* 2006, Leffler and Schuppan 2010).

Anti-doku transglutaminaz antikoru (ATtg Ab): 1997 yılında endomisyel antikorların hedef aldığı antijenin doku transglutaminaz (tTG) enzimi olduğu bulunmuştur. Rekombinant teknolojisi sayesinde insan tTG'si ticari kullanım için üretilmiş ve bu da test maliyetlerinde önemli bir azalmaya yol açmıştır. Hastane laboratuvarları genellikle anti-EM Ab yerine tTG Ab'yi ölçer. Eş zamanlı IgA eksikliğine sahip olacağı tahmin edilmeyen kişiler için önerilen birincil test, yüksek duyarlılığı, özgüllüğü ve tutarlılığı nedeniyle serum tTG IgA testidir (Zintzaras and Germentis 2006, Lewis and Scott 2010). tTG IgG antikorları, IgA düzeyi düşük kişilerde serolojik bir teknik olarak kullanılır; testler genellikle ELISA kullanılarak yapılır, radyoimmünoassay ise daha az kullanılır (Rubio-Tapia *et al.* 2023).

Anti-deamide gliadin türevi peptitler (Anti-DGP): DGP için antikor testleri klinik kullanıma açıktır. Bağırsak dokusu transglutaminaz (tTG), glutendeki peptitleri deamide formlara dönüştürür ve deamide gliadin peptit (DGP) testinin temelini oluşturur. Bu antikorlar çölyak hastalığı için önceki AGA'lara göre daha spesifik ve duyarlı bir test sağlar (Kits 2006). Özellikle 2 yaşın altındaki bebekler için faydalıdır (Rashtak *et al.* 2008). Ayrıca, IgG-TG2 ile IgG-DGP, seçici IgA eksikliği olan hastalarda ÇH'yi tanımlamak için en iyi araç olarak kabul edilmektedir (Tonutti *et al.* 2009). Anti-DGP testleri, çocuklarda glutensiz diyetle bağlılığın izlenmesinin yanı sıra çölyak otoimmünesinin izlenmesinde de faydalı olmuştur (Basso *et al.* 2009, Monzani *et al.* 2011). Retrospektif bir araştırma, özellikle küçük çocuklarda IgG anti-DGP antikorlarının tTG (IgA) antikorlarından önce ortaya çıktığını göstermiştir. Bu keşif, çölyak hastalığının erken teşhisinin, hastalık için genetik risk taşıyan çocuklarda DGP testi kullanılarak düzenli izleme yoluyla mümkün olabileceğini düşündürmektedir (Lammi *et al.* 2015).

2.1.7.2 Bağırsak endoskopisi ve biyopsisi

Histopatolojik bulgular, malabsorbsiyonun nedenlerinin belirlenmesinde (ayırıcı tanı) hayati bir role sahiptir (Husby *et al.* 2020). Çölyak standartlarına göre tanıyı doğrulamak için ince bağırsağın histolojik incelemesi gereklidir. Yetişkin çölyak hastalığının teşhisi için endoskopi ve ince bağırsak biyopsilerinin alınması önemlidir (Mills and Murray 2016). İnce bağırsak histolojisinde ayrıntılı olarak analiz edilmesi gereken çeşitli yapılar şunlardır: inflamatuvar hücre infiltrasyonu, kısa enterositler, kript hiperplazisi ve körelmiş atrofik villuslar. Bağırsak histolojik lezyonları Marsh sınıflandırma puanlama yöntemi kullanılarak dört spesifik tanı derecesine ayrılmıştır (Villanacci *et al.* 2011). Oberhuber daha sonra derece III'ü A, B ve C puanlarına (modifiye Marsh-Oberhuber) ayırarak Marsh sınıflandırma sisteminde düzenlemeler önermiştir (Mills and Murray 2016), diğeri ise Corazza sınıflandırmasıdır (Ludvigsson *et al.* 2013).

2.1.7.3 Genetik test

HLADQ alel genotipleme çölyak hastalığının varlığını veya duyarlılığını dışlamada (Husby *et al.* 2012), HLA tiplmesi çölyak hastalığının teşhisinde önemli bir rol oynar (Hadithi *et al.* 2007, Rubio-Tapia *et al.* 2023). 2012 ESPGHAN kılavuzları çölyak hastalığında genetik testlerin önemini vurgulamaktadır. HLA-DQ2 ve HLA-DQ8 haplotipleri bulunmadığında hastalığın görülme olasılığı düşüktür. Bu nedenle HLA tiplmesi, çölyak hastalığı riski taşıyanlar için ilk tarama tekniği olarak kabul edilir (Husby *et al.* 2020). Kromozom 19 üzerindeki MYO9B geni de dahil olmak üzere HLA olmayan 39 lokusun, çölyak hastalığına potansiyel katkıda bulunanlar olduğu tespit edilmiştir (Dubois *et al.* 2010, Gagliardi *et al.* 2021).

Doğumda HLA genetik testinin yapılması, çölyak hastalığına kalıtsal yatkınlığı olan bireylerin semptomların ve ilişkili sağlık sorunlarının ortaya çıkmasından önce belirlenmesi için yaygın tarama yöntemi olarak önerilmektedir (Rubio-Tapia *et al.* 2023).

Bu nedenle aşağıdaki durumlarda genetik test dikkate alınmalı ve uygulanmalıdır:

- Çölyak hastalığına özgü kan testleri ile bağırsak dokusu muayenesi arasında tutarsız sonuç veren hastalarda
- Çölyak hastalığında glutensiz diyetle iyileşme sağlanamadığında,
- Glutensiz diyet uygulayan, diyetle başlamadan önce çölyak hastalığı için test yapılmamış ve test için ağızdan gluten tüketemeyen hastaların değerlendirilmesinde,
- Birinci derece akrabalar gibi yüksek risk altındaki kişilerin taranmasında, Çölyak hastalığının (ÇH) önemli bir genetik etkisi vardır ve kalıtsal, karmaşık bir hastalık olarak kabul edilir. ÇH hastasının birinci derece akrabalarında %5-15 oranında görülme sıklığına sahiptir ve dizigotik ikizlerle karşılaştırıldığında monozigotik ikizler arasında oldukça yüksek bir uyum oranı gösterir. ÇH'de önemli bir genetik etki vardır; monozigotik ikizlerde %80, dizigotik ikizlerde ise %11 uyum oranı vardır (Anderson *et al.* 2013, Vaquero *et al.* 2014).
- Down, Turner veya Williams sendromlarının yanı sıra otoimmün hastalıkları ve IgA eksikliği olan bireylerde, çölyak hastalığına genetik yatkınlığın değerlendirilmesinde,
- HLA-DQ allellerinin test edilmesini ve doğrulayıcı serolojiyi içeren serogenetik stratejinin kullanılmasında, gereksiz gastroskopilere olan ihtiyacın azalmasına yardımcı olur. Çölyak hastalığının teşhisine yönelik birçok test, test sürecinde hastaların gluten içeren bir diyet tüketmesini gerektirmektedir (Lewis *et al.* 2017).

2.1.7.4 Gluten testi

Gluten testi, daha önce semptomlarını glutenden kaçınarak kontrol altına alan hastalarda çölyak hastalığını teşhis etmek için kullanılan bir yöntemdir. Hastalığı doğrulamak için tıbbi gözetim altında glutenin diyetle yeniden dahil edilmesini içerir (Lähdeaho *et al.* 2011, Leffler *et al.* 2013). Daha önce bu test ÇH'yi tespit etmek için yaygın olarak kullanılıyordu, ancak serolojik analizler son derece doğru olduğundan artık daha az kullanılmaktadır.

Gluten kısıtlaması sırasında yapılan seroloji ve biyopsiden elde edilen normal sonuçlara rağmen, gluten testi pozitif HLA genotipleme olan kişilerde çölyak hastalığının teşhisinde en etkili test olmaya devam etmektedir. Bu testin standart protokolü, 1-2 ay boyunca günde minimum 10 g gluten içeren bir diyetin uygulanmasını içerirken, testin

tanısal doğruluğu, optimum süresi ve optimal gluten dozajı ile ilgili daha az veri mevcuttur (Ansaldi *et al.* 1988, Rujner *et al.* 2002). Yakın zamanda yapılan bir çalışma, çoğu hastanın, günde 3 gramdan fazla gluteni kaldıramasalar bile, gluteni tükettikten sonraki 2 hafta içinde tanısal değişiklikler yaşadığını göstermiştir (Leffler *et al.* 2013). Araştırmalar, günde 10 mg'dan az gluten tüketmenin normal histolojiyi koruduğunu, ancak günde 50 mg gluten tüketmenin villöz yükseklik-kript derinliği oranının değişmesine ve intraepitelyal lenfositlerde (IEL) artış ve villöz atrofi gibi önemli anormalliklere yol açtığını göstermektedir. Günde 100 ile 500 mg gluten alımı bu anormallikleri şiddetlendirmektedir (Akobeng and Thomas 2008). Ayrıca, gluten testinin başlatılması, profesyonellerin teşhis algoritmaları oluşturmaya ve klinik deneylerde klinik yanıtları takip etmesine olanak tanımıştır. Test, Glütensiz Diyete yardımcı tedavi olarak kullanıldığında, gelen tedavilerin etkinliğinin artırılmasında yararlı bir rol oynar (Castillo *et al.* 2015).

2.1.8 Çölyak hastalığı komplikasyonları

ÇH'nin 50 yaşından sonra geç teşhis edilmesinin ve sıkı bir glutensiz diyetle uyulmamasının, genel popülasyona kıyasla ölüm oranlarında artışa neden olduğu gösterilmiştir (Rubio-Tapia *et al.* 2016). Seyrek olarak ortaya çıkan (ÇH'li bireylerin yaklaşık %1'i) (Biagi *et al.* 2014) ÇH, hiposplenizme (Di Sabatino *et al.* 2013), RCD (Dewar *et al.* 2012), bağırsak lenfomasına (Caio *et al.* 2019), ülseratif jejunoileite, ince bağırsak adenokarsinomuna (Biagi *et al.* 2014) yol açabilir. Glutensiz diyet uygulayan bireylerde ishal, bağırsak alt tıkanıklığı, karın ağrısı, kilo kaybı, ateş ve aşırı halsizlik gibi semptomların açıklanamayan bir şekilde devam etmesi veya kötüleşmesi durumunda komplikasyonlardan şüphelenilmelidir. Bu sorunlar, ÇH tanısı konmuş yaşlı kişilerde ve DQ2 için homozigot olan ve glutensiz diyetle sıkı sıkıya bağlı kalmayan kişilerde daha sık görülmektedir (Caio *et al.* 2019).

2.1.9 Çölyak hastalığıyla ilişkili bozukluklar

Çölyak hastalığı farklı klinik bulgularla ortaya çıkabilmektedir. Orta dereceli varyantı olan hastalar kesinlikle hiçbir semptom göstermeyebilirken, en şiddetli formu olanlarda

yaşamı tehdit eden komplikasyon riski daha yüksektir. Çölyak hastalığı, otoimmün karaciğer de dahil olmak üzere çölyak hastalığı olan bireylerin ve onların birinci derece akrabalarının %15'ine kadar diğer bozukluklarla, özellikle diğer otoimmün hastalıklarla bağlantılı olma riski taşıyan bir otoimmün durumdur (Spijkerman *et al.* 2016). Otoimmün hepatit, primer biliyer siroz ve primer sklerozan kolanjit gibi bozukluklar, immün aracılı olmayan grup, alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı, Wilson hastalığı ve Budd-Chiari sendromu (Balaban *et al.* 2019), diyabet (DM) (Kylökäs *et al.* 2016), otoimmün tiroid hastalıklarını (Balaban *et al.* 2019) içerir. Hashimoto tiroiditi ve Graves hastalığı (Mehrdad *et al.* 2012), cilt hastalıkları (Abenavoli *et al.* 2019), Dermatit herpetiformis, romatoid artrit, sistemik lupus eritematosus (Ludvigsson *et al.* 2012), Sjogren sendromu (Parisis *et al.* 2020), sedef hastalığı, sarkoidoz ve pankreatit gibi. Çölyak hastalığı, kollajenöz sprue, ülseratif jejunoileit, refrakter çölyak hastalığı (RCD), enteropati ile ilişkili T hücreli lenfoma, ince bağırsak adenokarsinomu (SBA), hiposplenizm ve kavitasyonlu mezenterik lenf nodu sendromu (CMLNS) gibi nadir fakat ciddi komplikasyonlara yol açabilir. Bu makale çölyak hastalığının bu nadir fakat ciddi sonuçlarının klinikopatolojik özelliklerini özetlemektedir. Hematolojik bulgular idiyopatik trombositopenik purpura (ITP) ile bağlantıyı içerir. Kan pıhtılaşması eğiliminin artması gibi kanla ilgili ek semptomlar düşüklere, kan pıhtılarına ve farklı kalp rahatsızlıklarına yol açar (Balaban *et al.* 2019).

2.1.10 Çölyak hastalığının tedavisi

ÇH'nin tek başarılı tedavisi, bağırsak ve bağırsak dışı semptomların iyileşmesi, otoantikörlerin ortadan kaldırılması ve bağırsak villuslarının restorasyonu ile sonuçlanan, yaşam boyu sıkı bir glutensiz diyetdir (Kupper 2005, Plugis and Khosla 2015). Gluten varlığında vücudun bağırsağa saldırmasını önleyecek veya durduracak bir tedavi mevcut değildir. Diyete sıkı sıkıya bağlı kalmak bağırsak iyileşmesine yardımcı olur ve çoğu durumda semptomların azalmasına neden olur. Diyete hemen başlamak aynı zamanda bazı durumlarda artan osteoporoz, bağırsak kanseri ve kısırlık riskini de azaltabilir (Laurikka *et al.* 2018, Treem 2004). Hasta sıkı bir glutensiz diyete uymayı zor bulmaktadır, ancak araştırmalar bu diyeti sıkı bir şekilde takip etmenin ishalin, kilo alımının ve besin emilimi sorunlarının normalleşmesine yol açabileceğini göstermektedir.

Glutensiz bir diyetin ardından biyopsiler genellikle 6 ay ile 2 yıl arasında normale döner (Freeman 2017). Bununla birlikte, çok merkezli GIP araştırmalarında da gösterildiği gibi, düşük yaşam kalitesi, psikolojik sorunlar ve istemsiz glutene maruz kalmanın yarattığı kaygı gibi dezavantajlarla birlikte gelir (De Lourdes Moreno *et al.* 2017, Lebowohl *et al.* 2018). Olası vitamin ve mineral eksiklikleri, metabolik sendrom, artmış kardiyovasküler risk ve sıklıkla şiddetli kabızlık (Calado and Verdelho Machado 2022) sık görülen sorunlardır. ÇH ile ilgili sorunların çoğunu ele almak için, hastayı düzenlenmemiş glutensiz diyetin tehlikeleri konusunda eğitmek ve ÇH konusunda uzmanlaşmış bir diyetisyenden beslenme rehberliği sunmak faydalı olabilir. Psikolojik olarak, bir psikoloğun yardımı hastalıkla yüzleşmede oldukça faydalı olabilir (Roos *et al.* 2006). Çölyak hastalarının yaklaşık %40'ı, gluteni ortadan kaldırmanın getirdiği ciddi zorluklar nedeniyle beslenmelerinden memnun değil ve bu da yaşam kalitelerinin düşmesine neden olur. Bu hastalar alternatif tedavileri araştırmaya ilgi duymaktadır (Aziz *et al.* 2011). Bireyleri gluten içeren öğelerin belirlenmesi, güvenli gıda seçenekleri ve kısıtlamalar dahilinde dengeli bir beslenmenin sürdürülmesi konusunda eğitmek için diyetisyen katılımı sıklıkla aranır. Glutensiz ürünler birçok ülkede reçeteye veya sağlık sigortası kapsamında alınmaktadır. Glutensiz ürünler tipik olarak normal gluten içeren gıdalara kıyasla daha pahalıdır ve daha zor temin edilebilir (Lee *et al.* 2007). Araştırmalarda belirlenen ilaçlar, diğer seçeneklerin yanı sıra azaltılmış immünojeniteye sahip genetik olarak tasarlanmış buğday suşlarından, prolil endopeptidazlardan, gliadine güçlü bir şekilde bağlanan emilmeyen polimerlerden, bağırsak geçirgenliğini ve gluten deaminasyonunu hedefleyen ilaçlardan ve HLA inhibitörlerinden oluşur (Costes *et al.* 2015).

2.2 Çölyak Hastalığında İnterlökin-15, İnterlökin-21 ve Tümoral Nekroz Faktörü- α 'nın Rolü

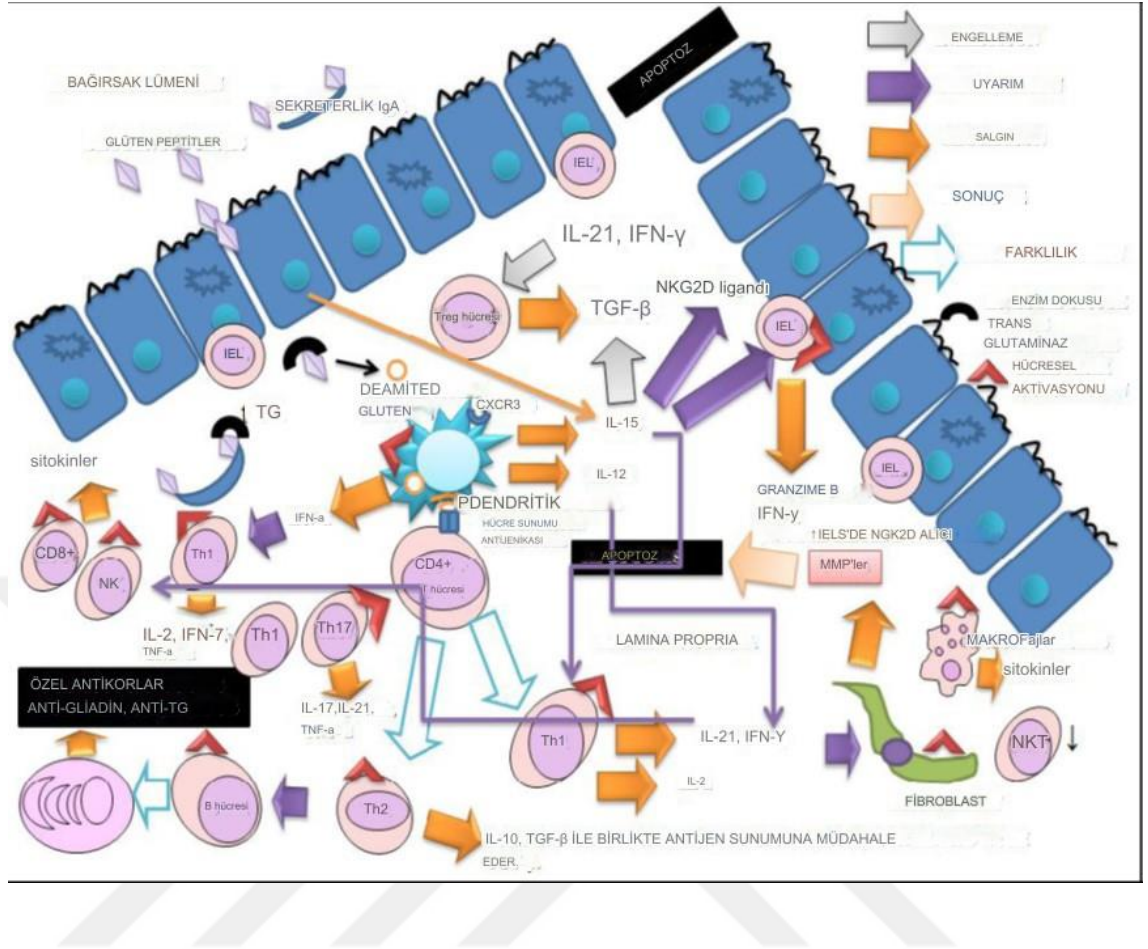
IL-15, mononükleer fagositler ve diğer çeşitli hücreler tarafından üretilen bir sitokindir. T ve NK hücrelerinde büyüme ve hayatta kalmanın desteklenmesinde ve ayrıca CTL'ye aktivasyon ve hayatta kalma sinyallerinin sağlanmasında önemli rollere sahiptir. APC'ye etki ederek CD4⁺ T hücresi yanıtlarını dolaylı olarak etkilediğine inanılmaktadır (Dubsky *et al.* 2007). Lamina propriadaki epitel hücreleri ve DC'ler tarafından IL-15 üretiminin

CD yukarı regülasyonu, CD8+ intraepitelyal lenfosit popülasyonunun sinyal özelliklerini etkiliyor gibi görünmektedir. Ek olarak, sitotoksik, TCR'den bağımsız NK benzeri hücreler tarafından tanınan Majör Histo-uyumluluk Kompleksi (MHC) sınıf I zincirle ilişkili protein (MIC) gibi bağırsak epitel hücrelerinde ligandların yüksek üretimini tetikler. Çölyak hastalığı mukozasındaki dendritik hücreler tarafından salgılanan IL-15, glutene karşı spesifik T hücresi reaksiyonunda önemli bir rol oynayabilir (Meresse *et al.* 2004, Maiuri *et al.* 2000). Farklı bir çalışma, tedavi edilmemiş ÇH hastalarının bağırsak epitelinde ve lamina propriasında, remisyonundaki ve sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında yüksek IL-15 seviyelerini gösterdiğini bulmuştur (Di Sabatino *et al.* 2006). Araştırmalar, IL-15'in, CD4+ T ve NK T hücrelerinin yanı sıra insan bağırsağı CD3+ Lamina Propria T Lenfositleri (LPL'ler) tarafından üretilen bir sitokin olan IL-21'in etkilerini artırabildiğini tespit etmiştir. IL-21, IFN- γ üretimini artırır ve CD8+ T hücrelerinin ve NK hücrelerinin sitolitik aktivitesini artırır (Ebert 2009). IL-15, NKG2D'yi eksprese eden IEL'ler yoluyla bağırsak epitel hücrelerinde hücre ölümüne neden olmada çok önemli bir işlev oynar. IL-15 ve IL-21, yerel immünolojik tolerans sistemlerini bozacak şekilde birlikte çalışabilir. Sitokinlerin, dendritik hücre gelişimi ve T hücresi programlı hücre ölümü gibi hem doğuştan hem de kazanılmış bağışıklığın çeşitli unsurlarını seçici olarak etkilediği görülmektedir. İnflamatuar sürecin belirli aşamaları sırasında, IL-15 ve IL-21, gluten tarafından tetiklenen bağışıklık tepkisi üzerinde zıt etkilere sahip olabilir (Spolski and Leonard 2008, McInnes and Gracie 2004).

IL-15, intraepitelyal lenfositler (IEL'ler) tarafından granzim B üretimini ve IEL'ler ve Th1 hücreleri tarafından IFN- γ üretimini artırır. Aynı zamanda IEL'ler üzerinde aktive edici NKG2D reseptörünün ekspresyonunu artırır ve epitelyal hücreler üzerinde NKG2D ligandının, MHC sınıf I zincirle ilişkili ligand A'nın (MICA) oluşturulmasını tetikler (De Nitto *et al.* 2009). IL-15, Crohn hastalığı olan kişilerin bağırsaklarında yüksek düzeyde eksprese edilir. Bu ifade, fonksiyonel Treg'lerin üretimini engellemez ancak insan T hücrelerini Treg baskılamasına karşı dirençli hale getirir (Hmida *et al.* 2012). IL-15 çölyak hastalığının gelişiminde rol oynar. Yapılan bir çalışmada, fareler diyet antijenine maruz bırakıldığında, IL-15'in CD4+ T hücreleriyle etkileşimi, CD8+ T hücrelerinin aktivasyonunu tetiklemede ve ince bağırsağa zarar vermede esas olarak belirlenmiştir (Korneychuk *et al.* 2014). IL-15 duyarlılığı, bu hastalığın ve potansiyel olarak diğer

otoimmün bozuklukların tedavisi veya önlenmesi için umut verici yeni hedefler sunabilir (Harris *et al.* 2010).

TNF- α , çeşitli inflamatuvar, kanserli ve otoimmün durumlarda çok önemli olan pro-inflamatuvar bir sitokindir (Sheikhpour *et al.* 2018). TNF- α geni 6p21.3 kromozomu üzerinde yer alır, 8 eksondan oluşur ve 382 amino asidi kodlar (Aslebahar *et al.* 2019). İnsan TNF- α geni, HLA sınıf I ve sınıf II ile yakın bağlantıya sahiptir (Aflatoonian *et al.* 2019). Th1, birkaç Th2 ve bazı CTL özellikleri tarafından oluşturulur. Nitrik oksit sentezini uyarır ve diğer biyolojik etkilerin yanı sıra mikrovasküler endotelyumun aktivasyonunu tetikler. Araştırmacılar, TNF- α ve IFN- γ 'nin birlikte çalışarak TG2'nin ifadesini önemli ölçüde arttırdığını ve IFN- γ 'nin en güçlü uyarıcı olduğunu keşfetmiştir. TG2, buğday ve benzeri tahıllardaki zararlı proteinlerde bulunan glutamin kalıntılarını deamidize ederek çölyak hastalığının gelişiminde çok önemli bir rol oynar. *Bifidobacterium breve* suşlarının probiyotik müdahale olarak uygulanmasının, glutensiz diyetle beslenen çölyak hastalığı olan çocuklarda proinflamatuvar sitokin TNF- α üretimini azalttığı bulunmuştur (Romero-Adrián *et al.* 2015) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 Çölyak Hatalığındaki sitokin ağı (Abadie and Jabri 2014)

2.3 HLA-DQ2 ve HLA-DQ8 Genetiği ve Hastalık Riski

HLA, insanlardaki ana doku uyumluluk kompleksinin (MHC) adıdır (Janeway *et al.* 1997). Genler kromozom 6 üzerinde bulunur ve üç sınıfa (I-III) ayrılır. HLA-DQ, 6p21.3 kromozomunda yer alan sınıf II bir moleküldür. Hücrelerin içinden peptitler sunan sınıf I moleküllerin ve tamamlayıcı proteinleri kodlayan sınıf III moleküllerin aksine, dış hücrelerden peptitlerin sunulmasında rol oynar. HLA-DQ, HLA-DQA1 ve HLA-DQB1 genleri tarafından üretilen bir $\alpha\beta$ heterodimerden oluşur. $\alpha\beta$ heterodimer, antijen sunan hücrelerde (APC'ler) bulunan bir hücre yüzeyi reseptörüdür. Hastalık riski DQA1 ve DQB1 alellerinin miktarı, türü ve düzenine göre belirlendiğinden çölyak hastalığının genetiği karmaşıktır (Marsh *et al.* 2010). DQA1 ve DQB1 genlerinin spesifik bir kombinasyonu tarafından kodlanan izoform, HLAx.y olarak ifade edilebilir; burada x,

DQB1'i ve y, DQA1'i ifade eder. Örneğin DQ2.5, cis (aynı kromozom üzerinde) veya trans (farklı kromozomlar üzerinde) yoluyla miras alınan DQB1*02 ve DQA1*05 tarafından kodlanan proteindir. Bu aleller aynı kromozom üzerinde (cis'te) olduğunda, genellikle başka bir sınıf II molekülü DRB1*03 (DR3) ile bir haplotipte birlikte kalıtılırlar. En yüksek risk altındaki grup, her iki kromozomda da homozigot olarak bilinen ve gen dozu etkisi olarak adlandırılan DQB1*02'ye sahip bireylerden oluşur (Van Belzen *et al.* 2004). İki DQB1*02 aleline sahip olmak anlamına gelen DQB1*02 homozigotluğu popülasyonun %2'sinde bulunur ancak bir DQB1*'e sahip olan heterozigotlarla karşılaştırıldığında çölyak hastalığı riskinin beş kat daha yüksek olması nedeniyle çölyak hastalarının %25'ini oluşturur (Megiorni *et al.* 2009). Araştırmalar, DQB1*02 için homozigot olan bireylerin, heterozigot bireylere kıyasla daha güçlü bir CD4+ yardımcı T hücresi tepkisi sergilediğini göstermektedir (Vader *et al.* 2003). Ayrıca DQB1*02 homozigotluğu, daha genç başlangıç yaşıyla (Zubillaga *et al.* 2002) ve dirençli spru dahil daha karmaşık klinik seyirle (Al-Toma *et al.* 2006) ilişkili olabilir. DQ2.5 (DQB1*02/DQA1*05) Heterozigotlar, çölyak hastalığı olan bireylerde gözlemlenen HLA türlerinin neredeyse %50'sini içeren baskın HLA konfigürasyonlarıdır (Megiorni *et al.* 2009). DQ2.2 (DQB1*02/DQA1*02), DQ2.5'e oldukça homolog olmasına rağmen, bağlı peptitlerin stabilitesinin azalması nedeniyle tek başına çok az çölyak hastalığı riski taşır (Fallang *et al.* 2009). Çölyak hastalığı olan bireylerin yalnızca küçük bir kısmı, yüksek riskli HLA-DQ2 heterodimerinin alellerinden birine sahiptir: HLA-DQA1*05 (05:01 veya 05:05) veya HLA-DQB1*02 (02:01 veya 02) buna "yarı heterodimer" denir. Genel popülasyonda HLA-DQ8 prevalansı büyük farklılıklar gösterir ve Orta Doğu ve Güney Amerika'daki kişilerde daha yüksek oranlar gözlemlenir. 16 HLA-DQ8, çölyak hastalığı olan hastaların %5-10'unda mevcuttur. DQ2'ye benzer şekilde HLA-DQ8'de hastalık riski bir süreklilik boyunca değişiklik gösterir. Hem DQ8 hem de DQ2'yi taşıyan kişiler en yüksek riske sahiptir, ancak her ikisini de taşımanın genel yaygınlığı %2,5 ile minimum düzeydedir. 9 HLA-DQ8 artı DQ2.2 veya DQ2.5'e sahip olanlar için tahmini risk 24'te 1'dir. Oysaki HLA-DQ8'e sahip olan ancak DQ2.2 veya DQ2.5'i olmayanlar için tahmini risk 89,9'da 1'dir. DQ8 için homozigotluk, DQ8 için heterozigotluktan daha yüksek bir risk oluşturur (Pietzak *et al.* 2009). HLA-DQ2 ve DQ8 negatif bireylerde çölyak hastalığının gelişmesi son derece nadirdir (Kupfer and Jabri 2012).

2.4 HLA ve Hastalık İlişkisi

Ana doku uyumluluk kompleksi bölgesindeki genlerin çoğu, işlevsellikleri açısından çok önemli olan önemli polimorfizm sergiler. HLA moleküllerinin birincil rolü immünolojik yanıtları başlatmak ve kontrol etmektir. Otoimmün, bulaşıcı, inflamatuvar ve malign durumlar gibi çeşitli insan hastalıkları, spesifik HLA alellerine sahip kişilerde daha yaygındır (Shoeib *et al.* 2019). Genomun HLA bölgesi en yüksek sayıda insan hastalıklarıyla bağlantılıdır (James and Georgopoulos 2018). Korelasyonun bazı bozukluklarda ılımlı, diğerlerinde ise özellikle otoimmün hastalıklarda önemli ölçüde güçlü olduğu belirlenmiştir (Trowsdale 2011). Pek çok otoimmün hastalık HLA sınıf II genleriyle bağlantılıyken, küçük bir kısmı da HLA sınıf I genleriyle bağlantılıdır. Şekil 1.5 belirli HLA genleri tarafından belirli hastalıklara karşı hassasiyetin arttığını göstermektedir. Tip 1 diyabet ve çölyak hastalığı, HLA-sınıf II alelleri DQB1 *02:01 ve DQB1 *03:02 ile bağlantılıdır (Viken *et al.* 2017). Bölgelerle bağlantılı diğer bozukluklar arasında tip 1 diyabet (Bratanic *et al.* 2010), romatoid artrit (Coenen *et al.* 2009), multipl skleroz (Lincoln *et al.* 2009), IgA eksikliği (Ferreira *et al.* 2012), kansere duyarlılık (Wu *et al.* 2007), idiyopatik nefrotik sendrom (Debiec and Ronco 2011) ve sjögren sendromu yer alır (Denham and Hill 2013).

2.5 Miyozin IXB (MYO9B) Geni

MYO9B geni 19p13.1'de bulunur ve (CD) için bir duyarlılık geni olarak tanımlanmıştır (Bähler *et al.* 1997, Post *et al.* 2002). Otoimmün ile ilişkili bozukluklar bazı ortak genetik duyarlılık faktörlerine sahip olabilir (Matter and Balda 2003). MYO9B, Ras homolog (Rho) ailesine ait bir GTPaz aktive edici proteini kodlar. Epitel hücrelerinin hücre iskeletinin düzenlenmesinde rol oynar ve sıkı bağlantıların yapımını etkiler (Post *et al.* 2002, Matter and Balda 2003).

İnsan MYO9B, insan bağırsak epitel hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli dokularda ve hücre tiplerinde ekspresye edilir (Liao *et al.* 2015), artan MYO9B gen ekspresyonu, in vivo artan bağırsak geçirgenliği ile ilişkilidir (Sapone *et al.* 2006). MYO9B, bağışıklık hücrelerinde, bağışıklık aktivitesine doğrudan dahil olduğunu gösteren önemli bir ifade

sergiler (Wirth *et al.* 1996). MYO9B geninde birkaç tek nükleotid polimorfizmi (SNP) keşfedilmiştir. Yaygın olarak incelenen dört polimorfizm şunlardır: rs1545620 (ekson 20), rs1457092 (intron 20), rs2305767 (intron 14) ve rs2305764 (intron 28) (Liao *et al.* 2015).



3. MATERYAL VE METOT

3.1 Çalışma Tasarımı

Bu çalışmanın amacı, belirli immünolojik belirteçlerin (IL15, IL21 ve TNF α) ekspresyon seviyelerini, serum otoantikorlarını incelemek ve ÇH'li hastalarda HLA tiplemesindeki haplotip değişikliklerini tespit etmenin yanı sıra MYO9B'nin SNP rs2305767'sini tespit etmek ve bunları Kasım 2022 ile Şubat 2023 tarihleri arasında Bağdat Eğitim Hastanesinden toplanan Çölyak olmayan katılımcılar sağlıklı kontroller ile karşılaştırmaktır.

3.1.1 Çalışma grubu seçimi

Hasta örnekleme; Çalışmaya katılanlar arasında Bağdat Eğitim Hastanesi, Pediatri Eğitim Hastanesi ve Sindirim Hastanesi Danışma Kliniğinde bakım gören elli hasta yer almıştır. Yaş grupları 1 ile 60 yaş arasında değişmektedir.

Kontrol örnekleme; Bağdat Eğitim Hastanesi'nde evlilik öncesi muayene birimini ziyaret ederken toplam kırk kontrol çalışmaya dahil edilmiştir. Buna karşılık, pediatrik kontroller, sağlık durumları iyi görünen bazı refakatçileri ve rutin pediatrik kontroller veya aşılar (görünüşe göre sağlıklı) için birinci basamak bakım ünitesini ziyaret edenleri içermektedir.

3.1.2 Etik konular

Etik olarak, veri toplama ve araştırma grubu seçimi Bağdat Sağlık Müdürlüğü'nden izin alındıktan sonra gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, Milli Eğitim Laboratuvarları Merkezi'nin izni ve onayı da alınmıştır. Kan örnekleriyle ilgili olarak, hastalardan veya katılımcı çocukların ebeveynlerinden, ya takip protokollerinin bir parçası olarak (eski vakalar) ya da bir değişim testinin ardından ÇH tanısını taramak veya doğrulamak için (pediatrik yeni vakalar) moleküler ve immünolojik testler için hastalardan alınan kanı aspire etmek veya

kullanmak için onay alınmıştır. Yetişkin kontrolleri için sadece önceden belirtilen ilgili birimde halihazırda mevcut olan kan örneklerini kullanmak için onay alınırken, çocuk kontrolleri için kan aspirasyonu için ebeveyn onayı alınmıştır. Hem hastalar hem de kontroller, bu testlerin yalnızca araştırma amaçlı olduğu ve teşhis amaçlı olmadığı konusunda bilgilendirilmiştir. Bulguların yayınlanması için kontrollerden ve hastalardan onay alınmıştır.

3.1.3 Çalışma grubunun tanımlayıcı değişkenleri

****Dahil edilme kriterleri;**

A) Hastalar:

- Yaygın olarak ÇH'ye işaret eden semptomlar
- Yüksek pozitif titrede serum TTG (IgA) sınıfı otoantikörler (mevcutsa)
- Duodenal biyopside çölyak histolojik tablosu olanlar (varsa)
- Klinik semptomları güçlü bir şekilde ÇH tanısını düşündürdüğünde uzmanlar tarafından ÇH tanısı konulan hastalar.

B) Kontroller

- Araştırmaya katılanlar çeşitli yaşlardaki (görünüşte sağlıklı) sağlıklı bireylerdir.

****Hariç tutma kriterleri;**

A) Hastalar: İki grup hariçtir;

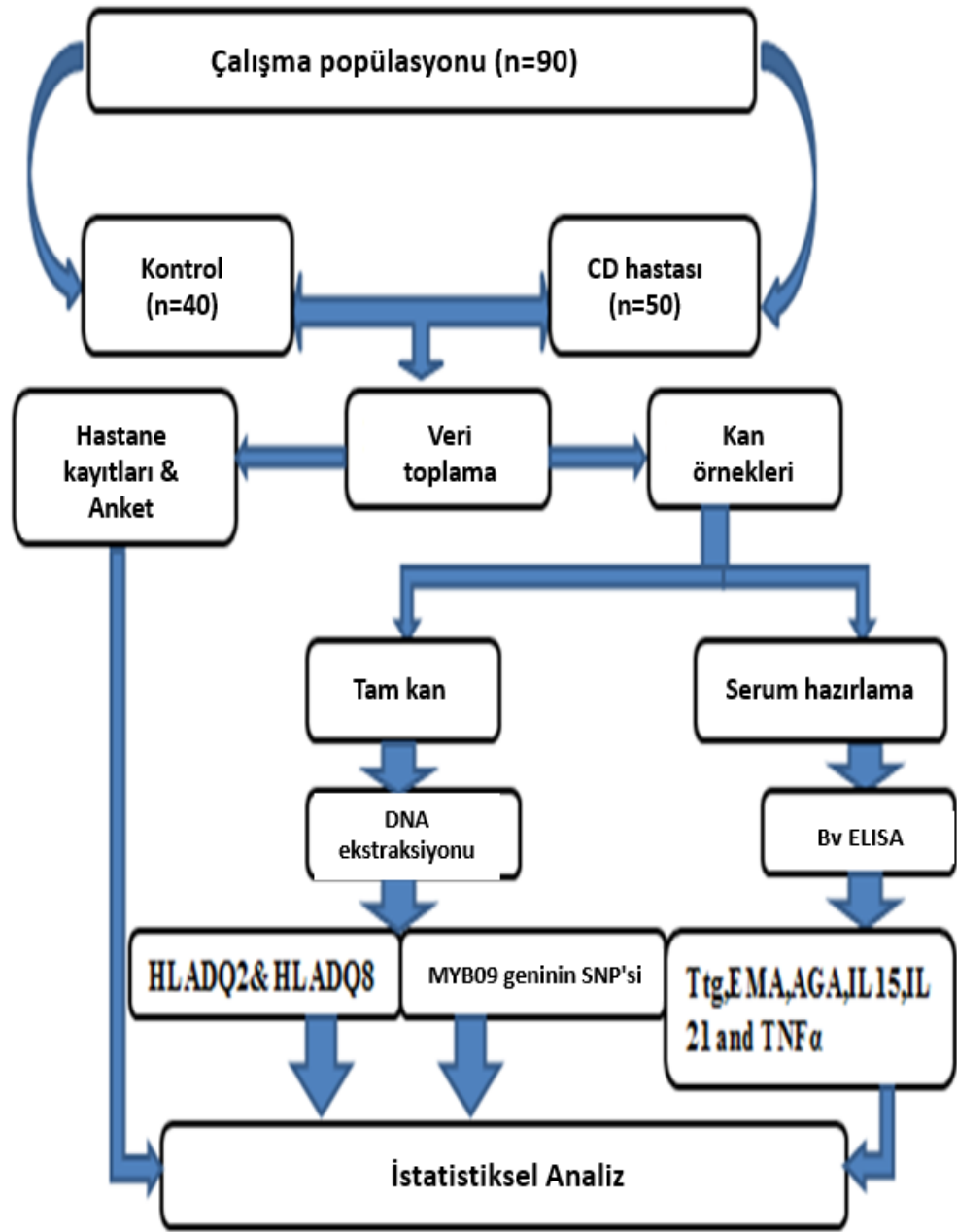
- Sınırdaki serolojik sonuçları ve negatif biyopsi sonuçları olan, ÇH'nin bağırsak semptomları olan kişiler
- İlişkili kronik karaciğer ve böbrek hastalıkları, bağırsak kanserleri ve Crohn hastalığı veya ülseratif kolit gibi inflamatuvar bağırsak bozuklukları olan kişiler

B) Kontroller; Araştırma sırasında aşağıdakilere sahip olanlar çalışmaya dahil edilmemiştir.

- Gıda alerjileri
- Akut veya kronik gastroenterit
- Bulaşıcı hastalık
- Kanser
- Bağırsak tümörleri, kronik böbrek ve karaciğer hastalıkları ve Crohn hastalığı veya ülseratif kolit gibi ilgili kronik inflamatuvar bağırsak bozuklukları
- Obezite
- Kalp hastalığının varlığı

3.2 Örnek Toplama

Bireylerin yaş, isim, cinsiyet, tıbbi geçmişi, aile öyküsü, endoskopik bulgular ve tedavi türü gibi biyodemografik özellikleri hakkında bilgi toplamak için anket görüşmeleri ve hasta tıbbi kayıtları kullanılmıştır. Antekubital fossanın %70 etanol dezenfeksiyonunu takiben venöz kan numuneleri elde etmek için venipunktür uygulanmıştır. EDTA içeren tüpler, moleküler belirteçler (çölyak hastalığının Haplotipleri HLA tiplemesi ve dizi gen değişiklikleri) için iki mililitre kan örneği ile doldurulurken, immünolojik belirteçleri (IL15, IL21 ve TNFa) ve serolojik belirteçleri tespit etmek üzere serum hazırlığı için jel tüpüne 3 mL dağıtılmıştır. Anti-transglutaminaz antikorları (TTG), anti-gliadin (AGA) ve anti- endomisyal (EMA) antikorları ELISA tekniği kullanılarak belirlenmiştir. Kan örneklerinden 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek serum oluşturulmuştur. Daha sonra süpernatant Eppendorf tüplerine aktarılmış ve ihtiyaç duyulana kadar -20°C'de saklanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Araştırma tasarımının şematik gösterimi

3.3 Malzemeler

3.3.1 Ekipman ve aletler

Çalışmada kullanılan tüm alet ve ekipmanlar Çizelge 3.1’de listelenmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan alet ve ekipmanlar

No	Alet ve ekipman	Şirket/Menşei
1	Mikro ELISA okuyucu ve otomatik yıkayıcı	Bio Teq/ABD
2	Analitik Jena qTower Gerçek Zamanlı PCR Termal Döngüleyici	Analytik Jena/ABD
3	CBC Otomatik analizörü	Ruby/ABD
4	Santrifüj, Mikrosantrifüj,	Hettich/Almanya
5	Jel tüpü, Ependrof tüpü	Çin
6	K2 - EDTA tüpleri (5 mL)	Afco-Dispo/Ürdün
7	Derin dondurucu	Japonya
8	TSC Termo-çalkalayıcı	Biometra/Almanya
9	UV PCR kabini	Analytik jena/ABD
10	Thermo- çalkalayıcı PST-60 HL	Biosan/Almanya
11	Jel Fotoğraf Sistemi	Major Science/Tayvan
12	Mikro spin Santrifüj	My Eugene, Çin
13	OWL Elektroforez Sistemi	Thermo/ABD
14	Kuantus Florometre	Promega/ABD
15	Termal ısıtıl döngüleyici	Thermo Fisher Scientific/ABD

3.3.2 Kitler ve diğer malzemeler

Mevcut çalışmada kullanılan kitler ve diğer materyaller Çizelge 3.2’de listelenmiştir.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan kitler ve diğer materyaller

	Kitler	Şirket	Menşei
ELISA Kitleri	Anti Gliadin Ab (IgG)	AESKU	Almanya
	Anti Gliadin Ab (IgA)		
	Anti Doku Transglutaminaz (tTG) IgG Ab	AESKU	Almanya
	Anti Doku Transglutaminaz (tTG) IgA Ab		
	Anti endomisiyal Ab (IgG)	GENERIC ASSAYS GmbH	Almanya
	Anti endomisiyal Ab (IgA)		
	İnterlökin 15	CUSABIO	ABD
	İnterlökin 21	CUSABIO	ABD
	TNF-alfa insan	Demeditec Diagnostics	Almanya
Moleküler Kitler	Ekstraksiyon DNA'sı	Promega	ABD
	HLA haplotipleri (HLA-DQ8 ve HLA-DQ2) Çölyak Şeridi.	Operon	İspanya
SNP Analizi	ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep Sistemi, Agaroz, Etidyum Bromür Çözeltisi (10 mg/mL), 100 bp DNA ladder, GoTag Green Master Mix, Nükleazsız Su, TAE 40X, Quantifluor dsDNA Sistemi	Promega	ABD
	Astar MYO9B gen SNP (rs2305767)	Macrogen	Kore

3.4 Laboratuvar Yöntemleri

3.4.1 Hematolojik araştırmalar

ÇH hastalığı ve hastalık aktivitesinin izlenmesi ile ilgili hematolojik testler aşağıdaki gibidir:

Tam kan sayımı (CBC): Tam kan sayımı, otomatik analiz cihazı (CELL-DYN Ruby) tarafından aşağıdakilerin her birinin hem diferansiyel hem de toplam beyaz kan hücresi (WBC) sayımının belirlenmesi için yapılır.

3.4.2 ELISA kullanılarak immünolojik analiz

3.4.2.1 TNF-alfa insan ELISA yöntemi

A. Yöntemin ilkeleri: ELISA, mikrotitre plakası üzerinde gerçekleştirilen, katı faz enzimiyle güçlendirilmiş duyarlılık immün testidir. Test, spesifik TNF-a epitoplarını hedef alan monoklonal antikorları (MAb'ler) kullanır. Mikrotitre kuyucuğı üzerine kaplanmış yakalama monoklonal antikor (MAb 1) ve yaban turpu peroksidazı (HRP) ile etiketlenmiş monoklonal antikor (MAb 2), kalibratörler ve örneklerle reaksiyona girer. Bir kuluçka dönemi boyunca: kaplanmış MAb1 – insan TNF-a – MAb 2 –HRP, mikrotitre plakası Ab etiketli bağlanmamış enzimi çıkarmak için yıkanır. Bağlı enzim etiketli Ab, bir kromojenik reaksiyon yoluyla ölçülür. Kromojenik çözelti (TMB) eklenir ve inkübe edilir. Durdurma çözeltisi eklendikten sonra reaksiyon durdurulur ve mikrotitre plakası uygun dalga boyunda okunur. TNF- α düzeyleriyle ilişkili olan kolorimetrik absorbans ölçümleri, substrat dönüşüm miktarını hesaplamak için kullanılır. Numunelerdeki TNF- α konsantrasyonu, görüntülenen bir kalibrasyon eğrisinden enterpolasyon yapılarak hesaplanır. ELISA okuyucusunun (3 OD birimine kadar doğrusallık) ve gelişmiş veri azaltma yönteminin (polikromatik veri azaltma) kullanımı, düşük aralıkta ve genişletilmiş kalibrasyon aralığında yüksek hassasiyetle sonuçlanır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 TNF-a kitinden sağlanan reaktifler

Malzemeler	Miktar
Mikrotitrasyon plakası 96 anti TNF- α (monoklonal antikorlar) kaplı kuyu içerir	96 kuyu
Konjugat HRP etiketli anti-TNF- α (monoklonal antikorlar) içerir.	1 şişe ve 0,75 mL
İnsan plazmasında sıfır kalibratör	2 şişe
Kalibratör N=1 ile 5	5 şişe
Konjugat tamponu ve İnkübasyon tamponu	1 şişe\6 mL
Yıkama Solüsyonu 200x	1 şişe\10 mL
Kontroller 1 ve 2	2 şişe
Kromojen TMB (Tetrametilbenzidin)	1 şişe\12 mL
Durdurma solüsyonu	1 şişe\12 mL

B. Reaktiflerin hazırlanması:

- Kalibratörler: Sıfır kalibratörleri QC veri sayfasında belirtilen hacme kadar DW ile ve diğer kalibratörleri 2 mL DW ile sulandırılmıştır.
- Kontroller: Kontroller 2 mL distile su ile sulandırılmıştır.
- Konjugat Çözeltisi: Konsantre konjugatı steril bir cam kapta seyreltmek için konjugat tamponu kullanılmıştır.

C. Prosedür:

- Tüm kuyucuklara elli μ L inkübasyon tamponu eklenmiştir.
- Her bir kalibratör, kontrol ve numuneden ikişer yüz μ L uygun kuyucuklara eklenmiştir.
- Mikrokuyucuk plakası 700 rpm $\pm$ 100 rpm hız ayarlı yatay bir çalkalayıcıya yerleştirilmiş ve üzeri yapışkan bir filmle kapatılarak (18 ile 25 °C) iki saat boyunca inkübe edilmiştir.
- Yapışkan film çıkarıldı ve kuyucuklar boşaltıldı. Yıkama mikrowell şeridi üç kez yıkanmıştır. Hemen bir sonraki adıma geçin. Yapışkan kaplama çıkarıldıktan sonra kuyucuklar bir kez daha boşaltılmıştır.
- Her bir kuyucuğa yüz μ L sıfır kalibratör yerleştirilmiştir.
- Her bir kuyucuğa elli μ L anti-TNF- α (HRP) konjugatı eklenmiştir.

- Oda sıcaklığında iki saat boyunca 700 ± 100 rpm'ye ayarlanmış yatay bir çalkalayıcıda inkübe edilmiştir.
- Yapışkan film çıkarıldı ve kuyucuklar boşaltıldı. Yıkama mikrokuyucuk şeridi üç kez (3X) yıkanmıştır.
- Her bir kuyucuğa yüz μL TMB (Kromojenik çözelti) pipetlenmiştir.
- Oda sıcaklığında 15 dakika boyunca 700 ± 100 rpm'ye ayarlanmış yatay bir çalkalayıcıda inkübe edildi. Yoğun ışığa doğrudan maruz kalmaktan kaçınılmalıdır.
- Her bir kuyucuğa yüz μL durdurma çözeltisi pipetlenmiştir.
- Her bir mikro kuyucuğun absorbansı 30 dakika içinde 450 nm ve 490 nm'de okunmuş ve sonuçlar hesaplanmıştır.

D. Sonuçların hesaplanması: Standart eğri, (4 parametrelili lojistik) üretme kabiliyetine sahip bilgisayar yazılımı kullanılarak verilerin azaltılmasıyla oluşturulmuştur. Standart bir eğri, x eksenindeki standartların her biri için ortalama absorbansın y eksenindeki konsantrasyona karşı çizilmesi ve grafik noktaları boyunca optimal bir uyum eğrisi çizilmesi yoluyla üretilebilir. Veriler, insan TNF- α konsantrasyon değerlerinin logunun OD'nin loguna karşı çizilmesi yoluyla doğrusallaştırılabilir ve regresyon analizinden optimum uyum çizgisi bulunabilir.

3.4.2.2 İnsan interlökin 15 (IL-15)

Serumdaki insan interlökin-15 içeriğinin CUSABIO ABD'den bir ELISA kiti kullanılarak niceliksel olarak belirlenmiştir.

A. Test prensibi: Bu deneyde kantitatif sandviç enzim immünoanaliz metodolojisi kullanılmaktadır. Önceden kaplanmış bir mikrolaka, IL-15'e özgü bir antikorla kaplanmıştır. Mevcut olan herhangi bir IL-15, standartlar ve numuneler kuyucuklara pipetlendikten sonra hareketsizleştirilmiş antikor tarafından bağlanır. IL-15'e spesifik bir biyotin-konjuge antikor, bağlanmamış materyaller çıkarıldıktan sonra kuyucuklara eklenir. Avidin ile birleştirilmiş yaban turpu peroksidazı (HRP) yıkamanın ardından kuyucuklara eklenir. Bağlanmamış avidin-enzim reaktifini uzaklaştırmak için yıkamadan

sonra kuyucuklara bir substrat çözeltisi eklenir ve ilk adımda bağlanan IL-15 miktarıyla orantılı olarak renk gelişir. Renk gelişimi durdurulur ve rengin yoğunluğu ölçülür (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 IL-15 kiti bileşeni

Kit bileşeni	Miktar
12x8 kaplamalı mikrokuyular	Bir (96 kuyu)
Standart (kurutulmuş)	İki
Biyotin-antikör (100xkons.)	120 µL bir şişe
HRP-avidin (100xkonsantre)	120 µL bir şişe
Biotin-Ab Seyreltici	15 mL bir şişe
(HRP)-avidin Seyreltici	15 mL bir şişe
Örnek seyreltici	50 mL bir şişe
Yıkama Tamponu (25X kons.)	20 mL bir şişe
(TMB) Substrat	10 mL bir şişe
Durdurma solüsyonu	10 mL bir şişe

B. IL-15 COSABIO kiti için reaktiflerin hazırlanması: Kullanım kılavuzundaki talimatlara göre;

- Biotin-anti-body (1x): flakon açılmadan önce santrifüjlenmiştir.
- Biyotin-anti-vücut 100 kat seyreltme gerektirmiştir. Önerilen 100 kat seyreltmeler (10 µL) biotin-anti-body+ (990 µL) biotin-anti-body Seyreltici olmuştur.
- HRP-avidin (1x): flakon açılmadan önce santrifüjlenmiştir. HRP-avidin 100 kat seyreltme gerektirir. Önerilen 100 kat seyreltme (10 µL) HRP-avidin+(990 µL) HRP-avidin seyreltici olmuştur.
- Yıkama tamponu (1x): oda sıcaklığına kadar ısıtılmış ve herhangi bir kristalin çözünmesi için, yıkama tamponu hafifçe karıştırılmıştır. 500 mL yıkama tamponu (1x) yapmak için 20 mL yıkama tamponu konsantresini (25x) 480 mL DW ile seyreltilmiştir.
- Standart: standart şişeyi 6000 rpm'de otuz saniye santrifüjlenmiştir. Standart seyreltici (SD) bir mL ile sulandırılır. Bu sulandırma (200 pg/mL) stok çözeltisi oluşturacaktır. Tam sulandırmayı sağlamak için standardı hafifçe çalkalanır ve standardın en az 15 dakika beklemesine izin verilir. Çalışma standartları, Çizelge 3.5'te belirtildiği gibi art arda etiketlenmiş yedi düzlem tüp (S6-S0) alınarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.5 Plakadaki IL-15 standartlarının düzeni

Tüp	S7 Stok SOL.	6	5	4	3	2	1	0
pg/mL								0

Örnek seyrelticinin iki yüz elli mikrolitresi S6 ile S0 etiketli tüplere pipetlenir. Stok solüsyonu S7 daha sonra S6'ya pipetlenir, ardından iki katlı bir seyreltme serisi oluşturmak için sıralı bir şekilde S5'ten S1'e pipetlenir. S0, sadece numune seyrelticisini (0 pg/mL) içeren standarttır.

C. Test prosedürü:

- Plastik mikrotitre plakası kapalı poşetten çıkarıldı ve madde ekleme işlemine başlamak için çalışma tezgahına yerleştirilmiştir.
- S0 ila S7 kuyucuklarına yüz mikrolitre standart uygulanırken diğer kuyucuklara 100 µL seyreltilmemiş numune eklenmiştir. Kuyucuklar daha sonra yapışkan bir şeritle kapatılmış ve 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Analiz edilen standartları ve numuneleri belgelemek için bir plaka çizelgesi verilmiştir.
- İnkübasyondan sonra, her bir kuyucuktaki sıvı durulanmadan çıkarılmıştır.
- Her bir kuyucuğa 100 µL hacminde Biyotin-antikör (1x) eklenmiştir. Kuyucuklar daha sonra yeni bir yapışkan şerit ile kaplanmış ve 37°C sıcaklıkta 1 saat boyunca inkübe edilmiştir.
- Sıvı aspire edilmiş ve üç kez yıkanmıştır; her bir kuyu her yıkama döngüsünde 200 µL yıkama tamponuyla doldurulmuştur. Kalan yıkama tamponunun tamamen ortadan kaldırılmasını garanti etmek için, son yıkamanın ardından plaka ters çevrilerek temiz kâğıt havlularla kurutulmuştur.
- Tüm kuyucuklara yüz µL HRP-avidin (1x) eklenmiş, yeni bir yapışkan şerit ile kaplanmış ve 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir.
- Sıvı aspirasyonu ve yıkama beş kez gerçekleştirilmiş, her bir kuyu her yıkama döngüsünde 200 µL yıkama tamponu ile doldurulmuştur. Kalan yıkama tamponunun tamamen ortadan kaldırılmasını garanti etmek için, son yıkamanın ardından plaka ters çevrilerek temiz kâğıt havlularla kurutulmuştur.

- Her bir kuyucuğa 90 µL Substrat eklenmesi, 37°C'de (15-30) dakika inkübe edilmesi ve ışıktan korunması sağlanmıştır.
- Tüm kuyucuklara 50 µL Durdurma Solüsyonu (1x) eklenmiştir.
- Her bir mikro kuyucuğun absorbansı 450 nm kullanılarak spektrofotometrede okunmuştur, dalga boyu düzeltilmesi mevcutsa 540 nm veya 570 nm'ye ayarlanmıştır.

D. IL-15 sonuçlarının hesaplanması: Her standart ve numune için ortalama değerleri hesaplayın ve sıfır standardın ortalama optik yoğunluğundan (OD) çıkartın. Her standardın ortalama absorbansını x ekseninde y eksenindeki konsantrasyona göre grafiklendirerek bir standart eğri oluşturuldu. Daha sonra grafikteki noktalara en iyi uyan bir eğri oluşturuldu.

3.4.2.3 İnsan interleokini 21 (IL-21)

Serum IL21 seviyesi ölçümü için CUSABIO\USA ELISA kiti kullanılmıştır.

A. Test prensibi: Bu tahlil kantitatif sandviç enzim immünolojik tahlil yaklaşımını kullanır. Spesifik olarak IL-21'i hedefleyen bir antikör önceden bir mikropalakaya uygulanmıştır. Standartlar ve numuneler bir pipet kullanılarak kuyucuklara aktarılır ve mevcut olan herhangi bir IL-21, sabit antikora bağlanır. Bağlanmayan bileşiklerin uzaklaştırılmasının ardından, kuyucuklara spesifik olarak IL-21'i hedefleyen biyotin-konjuge bir antikör eklenir. Yıkama işleminin ardından kuyucuklar avidin-konjuge yabancı turpu peroksidazı (HRP) ile muamele edilir. Bağlanmamış herhangi bir avidin-enzim reaktifini ortadan kaldırmak için bir yıkama gerçekleştirildikten sonra, kuyucuklara bir substrat içeren bir çözelti eklenir. Gelişen renk yoğunluğu, başlangıç aşamasında bağlanan IL-21 miktarıyla doğru orantılıdır. Renk geliştirme süreci durdurulur ve rengin büyüklüğü ölçülür.

B. Reaktiflerin hazırlanması:

- Biyotin-anti-vücut (1x): Açmadan önce flakon santrifüjlenmiştir.

- Biotin-anti-vücut 100 kat seyreltme gerektirmiştir. Önerilen 100 kat seyreltmeler (10 µL) Biotin-anti-body+ (990 µL) Biotin-anti-body Seyreltici olmuştur.
- HRP-avidin (1x): Açmadan önce flakon santrifüjlenmiştir. HRP-avidin 100 kat seyreltme gerektirir. Önerilen 100 kat seyreltme (10 µL) HRP-avidin+(990 µL) HRP-avidin Seyreltici olmuştur.
- Yıkama Tamponu (1x): 20 mL yıkama tamponu konsantresi (25x) distile veya deiyonize su ile seyreltilerek (500 mL) yıkama tamponu (1x) hazırlanmıştır.
- Standart: Standart flakonu otuz saniye boyunca altı yüz ile on bin rpm santrifüjlenir. Standart Seyreltici bir mL ile sulandırılır. Bu sulandırma (200 pg/mL) stok çözeltisini oluşturacaktır. Tam sulandırmayı sağlamak için standardı hafifçe çalkalanır ve standardın en az on beş dakika beklemesine izin verilmiştir.

Stok standart çözeltisi bir dizi seyreltme yapmak için kullanılmış, tüplerin her birine (S0-S6) 250 µL örnek seyreltici eklenmiştir. Tüplerin her biri bir sonraki transferden önce tamamen karıştırılmıştır. Seyreltilmemiş Standart yüksek standart (200 pg/mL) olarak kullanılacaktır. Örnek Seyreltici 0 standart (0 pg/mL) olarak kabul edilmiştir.

C. Test prosedürü:

- Kuyucukların her birine 100 µL standart ve numune eklendikten sonra yapışkanlı bir şeritle kaplanmıştır. 37°C'de 2 saat inkübe edilerek test edilen numunelerin ve standartların kaydedilmesi için plakanın bir düzeni sağlanmıştır.
- Sıvı, yıkama yapılmadan kuyucukların her birinden uzaklaştırılmıştır.
- Kuyucukların her birine 100 µL Biotin antikoru (1x) eklenerek yeni bir yapışkan şeritle kaplanmıştır. 37°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir.
- Yapışkan tabaka çıkarılarak kuyucuklar boşaltılmış ve mikro kuyu şeridi üç kez yıkanmıştır.
- kuyucukların her birine Yüz ul HRP- avidin reaktifi eklenerek 37°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir.

- Yapışkan tabaka çıkarılarak kuyucuklar boşaltılmış ve mikro kuyu şeridi beş kez yıkanmıştır. Daha sonra tüm kuyucuklara pipetlenerek 37°C'de 15-30 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Işıktan korunmuştur.
- Sonlandırma: Reaksiyonu sonlandırmak için kuyucukların her birine elli µL durdurma solüsyonu eklenmiştir. Kuyudaki renk maviden sarıya dönmüştür.
- Spektrofotometre, 450 nm'lik bir ana dalga boyuyla her bir mikro kuyucuğun absorbansını ölçmek için kullanılmıştır. Plaka okuyucu, boş kuyucuklar kullanılarak üreticinin talimatlarına uygun olarak kalibre edilmiştir. Absorbans ölçümü hem numuneler hem de standartlar için yapılmıştır.

D. IL-21 sonuçlarının hesaplanması: Her standart ve numune için çift okumaların ortalamasını alınarak ortalama sıfır standart optik yoğunluğu çıkarılmıştır. Standart eğri oluşturma işlemi, dört parametrelili lojistik (4-PL) eğri uyumu oluşturabilen bir bilgisayar yazılımı kullanılarak verilerin indirgenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Alternatif olarak, standart bir eğri oluşturmak için x eksenindeki her bir standardın ortalama absorbansı y eksenindeki konsantrasyona karşı çizilmiş ve grafikteki noktalar boyunca en uygun eğri çizilmiştir. Veriler, IL-21 konsantrasyonlarının logu O.D.'nin loguna karşı çizilerek doğrusallaştırılabilir ve en iyi uyum çizgisi regresyon analizi ile belirlenebilir. Bu prosedür verilerin yeterli ancak daha az kesin bir uyumunu sağlayacaktır.

3.4.2.4 İnsan serumunda IgA ve IgG sınıfının (EmA IgA& IgG) antiendomisial antikorları

A. Test prensibi: EmA insan, insan serumunda çölyak hastalığıyla ilişkili ana otoantijenlere karşı IgA veya IgG otoantikorlarının düzeylerini doğru bir şekilde ölçmek için bir enzim immün testi kullanan bir teşhis testidir. Seyreltilmiş hasta numunelerinde ve kalibratörlerde bulunan otoantikorlar, mikrotitre plakasının katı yüzeyinde hareketsizleştirilmiş insan otoantijenlerine bağlanır. CeliAK insanı, tipik olarak immünofloresan yoluyla tespit edilen otoantikorların endomisial antijenler üzerine hassas şekilde bağlanmasını sağlar. Oda sıcaklığında (18-25°C) 60 dakika inkübe edildikten sonra bağlanmayan serum bileşenleri bir yıkama işlemiyle elimine edilir. Otoantikorlar yalnızca yaban turpu peroksidazına (HRP) bağlı olan anti-insan IgA veya

IgG antikorlarına bağlanır. Bu bağlanma, oda sıcaklığında 30 dakikalık bir inkübasyon süresi içinde gerçekleşir. Fazla konjugat, başka bir yıkama prosedürü yoluyla katı fazlı bağışıklık komplekslerinden uzaklaştırılır. HRP, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) içeren renksiz substrat çözeltisinin mavi bir ürüne dönüşümünü katalize eder. Enzimatik reaksiyon, oda sıcaklığında 15 dakika sonra kuyucuklara asidik bir çözelti (H₂SO₄) eklenerek durdurulur ve çözeltinin renginin maviden sarıya dönmesi sağlanır. 450 nm'deki optik yoğunluk (OD), doğrudan bağ oluşturan belirli antikorların miktarıyla ilgilidir. Standart eğri, kalibratörlerin antikorlarının konsantrasyonlarının (x eksen) eşleşen OD değerlerine (y eksen) göre grafiğinin çizilmesiyle oluşturulur. Numunenin antikor konsantrasyonu, standart eğri okunarak anında belirlenir (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6 Endomisiyal kitteki test bileşenleri

Malzemeler	Miktar
Mikrotitre plakası	96 kuyu
Konsantre yıkama tamponu (1000 mL solüsyon için yeterli)	100 mL
Örnek seyreltici	100 mL
Konjugat (HRP)	15 mL
Substrat (hidrojen Peroksit)	15 mL
Durdurma çözeltisi (sülfürik asit)	15 mL
Kalibratörler	Her biri 1 mL
Pozitif ve negatif kontroller	1 mL

Test edilen serum numuneleri, numune tamponu ile seyreltilmiş (1+100), ardından konsantre yıkama tamponu çözeltisi 10X, uygun hacme kadar deiyonize distile su eklenerek 10 kata (1+9) kadar seyreltilmiştir. Şerit başına 72 mL damıtılmış su içeren konsantre uygulandıktan sonra üretici tarafından tavsiye edildiği şekilde aşağıdaki adımlar takip edilmiştir.

B. Genel protokol: Her iki serolojik testin tümü (IgA ve IgG sınıfına ait antiendomisiyal antikorlar), üretici firma tarafından açıklanan protokolle aynı olup, aşağıdaki gibidir:

- Bir alikot (100 µL) kalibratörler, kontroller ve seyreltilmiş hasta numuneleri kuyucuklara eklenmiş, ardından plaka yapışkan şeritlerle kapatıldıktan sonra 60 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

- Kuyu içerikleri atılmış ve plaka önceden hazırlanan 300 µL yıkama çözeltisi ile üç kez yıkanmıştır
- Enzim konjugatına ilişkin alikot (100 µL) kuyucukların her birine dağıtılmış, ardından plaka yapışkan şeritlerle kapatıldıktan sonra oda sıcaklığında 30 dakika süreyle inkübe edilmiş ve ardından adım ii tekrarlanmıştır.
- Kuyu içerikleri atılmış ve plaka 300 µL yıkama çözeltisi ile üç kez yıkanmıştır.
- TMB substrat çözeltisine ilişkin bir hacim (100 µL) kuyucukların her birine dağıtılmış, ardından plaka karanlık bir yerde oda sıcaklığında 15 dakika süreyle inkübe edilmiştir.
- Son olarak, kuyucukların her birine durdurma solüsyonuna ilişkin (100 µL) eklenmiş, 5 dakika sonra plaka, durdurma solüsyonu eklendikten sonraki 30 dakika içinde 620 veya 690 nm'ye karşı 450 nanometre dalga boyunda okunmuştur.

C. Veri işleme: Standart eğri, kalibratörlerin (0) 1-4 ortalama optik yoğunluk (OD) değerlerinin doğrusal bir ölçek kullanılarak y eksenini üzerinde ve bunların karşılık gelen konsantrasyonlarının logaritmik bir ölçek kullanılarak x eksenini üzerinde grafiklendirilmesiyle oluşturulmuştur. Bilinmeyen maddelerin EmA'daki konsantrasyonları, ilgili OD değerlerine dayalı olarak doğrudan U/mL cinsinden ölçülmüştür.

3.4.2.5 ELISA kullanılarak insan serumu Ab'sinde anti-doku transglutaminazının (IgG ve IgA) belirlenmesi

AESKULISA tTg yeni nesil, insan serumundaki doku transglutaminazının (tTG) neo-epitoplarına karşı antikorları doğru bir şekilde ölçmek ve tanımlamak için katı faz teknolojisini kullanan bir enzim immün testidir. Gliadine özgü peptidlerle çapraz bağlanan insan rekombinant transglutaminazını kullanan test, yeni tTg epitoplarını ortaya koymaktadır. Bu, testin duyarlılığında ve özgüllüğünde önemli bir iyileşmeye yol açmaktadır.

A. Anti-tTG Ab'nin prensibi: 1:101 oranında sulandırılan serum örnekleri uygun antijenle kaplanmış mikropalakalara yerleştirilerek inkübe edilir. Hastanın numunesinde antikorlar varsa bunlar antijene bağlanacaktır. Bağlanmamış kısım sonraki aşamada uzaklaştırılır. Daha sonra yaban turpu peroksidazına (konjugat) bağlanan anti-insan immünoglobulinler mikropalakalara yerleştirilir ve numunelerde bulunan antijen-antikor kompleksi ile etkileşime girmesine izin verilir. Bağlanmamış konjugat bir sonraki adım sırasında çıkarılır. Mavi renkle sonuçlanan enzimatik kolorimetrik işlem, TMB substratının eklenmesiyle başlatılır. Bu reaksiyon, seyreltilmiş asitin eklenmesiyle durdurulabilir ve rengin sarıya dönüşmesine neden olur. Kromojenden kaynaklanan renk gelişiminin derecesi, hasta numunesindeki karşılık gelen antikorların başlangıç konsantrasyonuyla doğrudan orantılı olan, antijen-antikor kompleksine bağlanan konjugat miktarıyla belirlenir (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7 Anti-Ttg Ab kiti bileşeni

Öge	İçindekiler
Örnek arabelleği (5X)	1x20 mL
Yıkama tamponu (50X)	1x20 mL
Negatif, Pozitif kontrol ve Kesme kalibratörü	1x1,5 mL
Kalibratörler	6x1,5 mL
Konjuge	1x15 mL
TMB substratı	1x15 mL
Durdurma solüsyonu	1x1,5 mL
Mikrotitre plakası	12x8 kuyu şeritleri

B. Hazırlıklar:

- Numune tamponu uygun hacme kadar deiyonize distile su ilave edilerek 1:5 oranında seyreltilmiştir.
- Test edilen serum numuneleri önceden hazırlanmış numune tamponu (1X) (örn. 1000 µL numune tamponu (1x)+10 µL serum) ile seyreltilmiştir (1:101).
- Konsantre yıkama tamponu çözeltisi 1:50, uygun hacme kadar (örn. 20 mL artı 980 mL) deiyonize distile su eklenerek 1X'e seyreltilmiş üretici tarafından tavsiye edildiği şekilde ve aşağıdaki adımlar takip edilmiştir.

C. Test adımları: Her iki serolojik testin tümü (Anti-Doku Transglutaminaz IgG & IgA) Üretici firma tarafından açıklananla aynı protokole sahiptir ve aşağıdaki gibidir:

- Kontrollerden, önceden seyreltilmiş numunelerden ve kalibratörden 100 mikrolitre (100 µL) hacim ilgili mikro kuyucuklara yerleştirilmiştir. Daha sonra plakalar kapatılmış, parafin ile hava geçirmez şekilde mühürlenmiş ve ortam sıcaklığında (20-32°C/68-89,6°F) 30 dakika süreyle inkübatöre yerleştirilmiştir.
- İnkübasyonun ardından kuyu içeriği atılmış ve kuyular 300 mL yıkama tamponu çözeltisi ile üç kez durulanmıştır.
- Sonrasında, 100 µL konjugat reaktifi eklenmiş ve plaka kapatılmış ve ortam sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon süresinin ardından mikro kuyucuklar yıkama tamponu ile üç kez durulanmıştır.
- Tüm kuyucuklara 100 µL hacminde substrat çözeltisi (TMB) hızlı bir şekilde uygulandı.
- Sonrasında, plakalar gizlendi ve 30 dakika süreyle ışısız bir ortamda bekletildi.
- Sonrasında, her bir kuyucuğa 100 µL durdurma çözeltisi herhangi bir kesinti olmaksızın sürekli ve tutarlı bir şekilde eklenmiştir. Plakalar daha sonra 30 dakikalık bir zaman dilimi içinde 450 nm (tercihen 450/620 nm) dalga boyunda absorbans için ölçülmüştür.

D. Nicel yorumlama: Kantitatif yorumlamayı gerçekleştirmek için standart eğri, her kalibratörün optik yoğunluğunun (OD) y ekseninde, x ekseninde U/mL cinsinden karşılık gelen konsantrasyon değerlerine karşı grafiğinin çizilmesiyle oluşturulmuştur. Her numunenin optik yoğunluğunu (OD) ve mililitre başına birim (U/mL) cinsinden temsil edilen ilgili antikor konsantrasyonlarının belirlenmesi ve en iyi sonuçları elde etmek için Log/Çizgi Koordinatlarını ve 4 Parametrelili Uyum'u kullanılması önerilmektedir.

3.4.2.6 İnsan serumundaki anti-gliadin Ab

A. Test prensibi: 1:101 oranında seyreltilen serum örnekleri uygun antijenle kaplanmış mikrolakalara yerleştirilerek inkübasyona bırakılır. Hastanın numunesinde antikorlar varsa bunlar antijene bağlanacaktır. Bağlanmamış kısım sonraki aşamada uzaklaştırılır. Daha sonra yaban turpu peroksidazı ile konjuge edilmiş anti-insan immünoglobulinleri inkübe edilir ve mikrolakaların içindeki numunelerdeki antijen-antikor kompleksi ile etkileşime girer. Bağlanmamış konjugat bir sonraki adım sırasında çıkarılır. Mavi renkle sonuçlanan enzimatik kolorimetrik işlem, TMB substratının eklenmesiyle başlatılır. Bu reaksiyon, seyreltilmiş asitin eklenmesiyle durdurulabilir ve rengin sarıya dönüşmesine neden olur. Kromojenden kaynaklanan renk gelişiminin derecesi, antijen-antikor kompleksine bağlanan konjugat miktarından doğrudan etkilenir ve bu da hasta numunesindeki karşılık gelen antikorların başlangıç konsantrasyonuyla doğrudan orantılıdır (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8 Anti-gliadin Ab kiti bileşenleri

Öge	İçindekiler
Örnek tamponu (5X)	1x20 mL
Yıkama tamponu (50X)	1x20 mL
Negatif, Pozitif kontrol ve Kesme kalibratörü	1x1,5 mL
Kalibratörler	6x1,5 mL
Konjuge	1x15 mL
TMB substratı	1x15 mL
Durdurma solüsyonu	1x1,5 mL
Mikrotitre plakası	12x8 kuyu şeritleri

B. Test prosedürü:

- Numune tamponu, uygun hacme kadar (örn. 20 mL artı 80 mL) deiyonize distile su eklenerek 1:5 oranında seyreltilmiştir.
- Test edilen serum numuneleri önceden hazırlanmış numune tamponu (1X) (örn. 1000 µL numune tamponu (1x) + 10 µL serum) ile seyreltilmiştir (1:101).

- Konsantre yıkama tamponu çözeltisi 1:50, uygun hacme kadar (örn. 20 mL artı 980 mL) deiyonize distile su eklenerek 1X'e seyreltilmiş ve üretici tarafından tavsiye edildiği şekilde aşağıdaki adımlar takip edilmiştir.

C. Test adımları: İki serolojik testin tümü (Anti-Gliadin IgG ve IgA), üretici firma tarafından açıklananla aynı protokole sahiptir ve aşağıdaki gibidir:

- Kuyu başına yüz μ L standart, kontrol ve numune (seyreltilmiş) eklenmiştir. Bir plaka kapatıcı ile sıkıca kapatılıp oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Test edilen standartları ve numuneleri kaydetmek için bir plaka düzeni sağlanmıştır.
- Her kuyu aspire edilip yıkanmış ve toplam üç yıkama için işlem tekrarlanmıştır. Yıkama, otomatik yıkayıcı kullanılarak her bir kuyucuğun yıkama tamponu (300 μ L) ile doldurulmasıyla gerçekleştirilmiştir. Son yıkamadan sonra yıkama tamponu aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Plaka ters çevrildi ve temiz kâğıt havlulara karşı kurutulmuştur.
- Tüm kuyucuklara yüz μ L konjugat eklenmiş ve plaka kapatıcı ile sıkıca kapatılmış ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir.
- Aspirasyon/yıkama işlemi adım 2'deki gibi tekrarlanmıştır.
- Her bir kuyucuğa yüz μ L substrat çözeltisi eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Yoğun ışıktan korunmuştur.
- Her bir kuyucuğa yüz μ L durdurma çözeltisi eklenmiştir.
- Her bir kuyucuğun optik yoğunluğu, 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropilaka okuyucu kullanılarak 30 dakika içinde belirlenmiştir (Önerilen 450/620 nm).

D. Nicel yorumlama: Kantitatif yorumlamayı gerçekleştirmek için standart eğri, her kalibratörün optik yoğunluğunun (OD) y ekseninde, x ekseninde U/mL cinsinden karşılık gelen konsantrasyon değerlerine karşı grafiğinin çizilmesiyle oluşturulmuştur. Logaritmik/doğrusal koordinatlar ve 4 Parametrelili Uyum kullanılarak en iyi sonuçlara ulaşılmıştır. Her numunenin optik yoğunluğunu (OD) gözlemleyin ve mililitre başına birim (U/mL) cinsinden temsil edilen ilgili antikör konsantrasyonlarını belirleyin.

3.5 Çölyak Strip Uygulaması Kullanılarak Çölyak Hastalığı ile İlişkili HLA Haplotiplerinin (HLADQ2 ve HLADQ8) Tespiti

Immuno & Molecular Diagnostics, İspanya'nın Çölyak Strip kiti, çölyak hastalığına bağlı birincil genetik belirteçler olan HLA-DQ2 ve HLA-DQ8 proteinlerini kodlayan haplotiplerin tanımlanmasını sağlar.

CeliacStrip kiti, Çizelge 3.9'da gösterildiği gibi tespit edilebilecek kesin haplotipleri sunar. Deney üç aşamada gerçekleştirilmiştir. Başlangıçta genomik DNA, tam kan örneğinde bulunan çekirdekli hücrelerden izole edilmiştir. Daha sonra ekstrakte edilen genomik DNA, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) teknikleri kullanılarak çoğaltılmıştır. Son olarak PCR ürünü, gen tanımlama ve değerlendirmeyi kolaylaştırmak için hibridizasyon ve geliştirme işlemlerine tabi tutulmuştur. İşlemler üreticinin talimatlarına sıkı sıkıya bağlı kalınarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.9 HLADQ2 ve DQ8'i kodlayan H aplotipleri

HLA bölgesi	Spesifik haplotip
HLA- DQ2 cis	DQA1*05- DQB1*02- DRB1*03
HLA- DQ2 trans	DQA1*05- DQB1*0301- DRB1*11/DRB1*12
	DQA1*02- DQB1*02- DRB1*07
HLA-DQ8	DQA1*03- DQB1*0302- DRB1*04

3.5.1 Genomik DNA'nın ekstraksiyonu prosedürü

Tam kan örnekleri, ReliaPrep TM Blood gDNA Miniprep System (Promega, ABD) protokolü izlenerek, genomik DNA'nın ekstraksiyonu için steril bir ortama yerleştirilerek işlenmiştir. Analizden önce kan numunesinin ortam oda sıcaklığına dengelenmesine izin verilmiştir. Sıvının düzgün bir şekilde dağılmasını sağlamak için tüp 10 dakika boyunca kuvvetli bir şekilde çalkalanmış ve 200 µL'lik bir hacim, kit içinde verilen 20 µL proteinaz K (PK) çözeltisini zaten içeren 1,5 mL'lik bir santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Karışım kısa bir süre çalkalanmış ve 200 µL Hücre Lizis Tamponu eklenmiştir. Daha sonra tüp

minimum 10 saniye süreyle vortekslemeye ve ardından 10 dakika süreyle (56°C) sıcaklıkta inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyondan sonra tüp çıkarılmış ve içeriği bir toplama tüpüne aktarılmıştır. Daha sonra toplama tüpüne 250 µL Bağlama Tamponu eklenmiş ve 14,000 rpm'de hızlı bir şekilde döndürülmüştür. Daha sonra, fiziksel temasın yol açabileceği herhangi bir kirlenmeyi önlemek amacıyla ReliaPrep™ Bağlama Kolonunu hassas bir şekilde çıkarmak için cımbız kullanılmıştır. Daha sonra kolon bir tüp rafına yerleştirilmiştir. Toplama tüpünün içeriği daha sonra kolona yerleştirilerek bir dakika süreyle dakikada 14,000 devir hızında santrifüje tabi tutulmuştur. Santrifüjlemenin ardından kolon, sıvının atılmasından önce tüm lizatin membrandan tamamen geçtiğinden emin olmak için incelenmiştir. Daha sonra sütun orijinal kabından çıkarılmış, yeni bir toplama tüpüne aktarılmış ve üç tur temizlemeye tabi tutulmuştur. Her temizleme turu, 500 µL Sütun Yıkama Solüsyonunun eklenmesini ve ardından bir dakika süreyle 14,000 rpm hızında santrifüjlemeyi içermektedir. Üç yıkamanın ardından kolona 100 mikrolitre Nükleaz İçermeyen Su eklenmiştir. Daha sonra kolon, 1,5 mL'lik steril bir santrifüj tüpüne yerleştirilmiş ve 1 dakika süreyle dakikada 14,000 devir hızında döndürülmüştür. Ekstrakte edilen genomik DNA (gDNA), kalite değerlendirmesi için 24 saat 4°C sıcaklıkta tutulmuştur. Daha sonra amplifikasyon işlemine kadar -26°C sıcaklıkta saklanmıştır (Çizelge 3.10).

Çizelge 3.10 DNA ekstraksiyon kiti

Hacim	DNA ekstraksiyon kiti
5 paket	ReliaPrep™ Bağlama Kolonları (50/paket)
5 paket	Toplama Tüpleri (200/paket)
55 mL	Hücre Lizis Tamponu (CLD)
5,5mL	Proteinaz K (PK) Çözümü
68,75mL	Bağlama Tamponu (BBA)
412,5mL	Sütun Yıkama Solüsyonu (CWD)
50 mL	Nükleaz İçermeyen Su

3.5.2 DNA amplifikasyonu

CeliacStrip test kılavuzunda sağlanan protokol izlenerek belirli alanların konsantrasyonunu arttırmak amacıyla PCR kullanılarak amplifiye edilmiştir. 5

mikrolitrelik DNA numunesi hacmi, 39 mikrolitre PCR ön karışımı, 5 mikrolitre primer ve 1 mikrolitre Taq ile bir PCR tüpünde birleştirilmiş ve PCR tüpü başına toplam 50 mikrolitrelik bir miktar elde edilmiştir. DNA numuneleri, Çizelge 3.11'de özetlenen protokol kullanılarak bir termosikleyicide (Analytic Jena GMBH, Almanya) amplifikasyona tabi tutulmuştur (Çizelge 3.11).

Çizelge 3.11 HLA DQ2\DQ8 gen amplifikasyonu için PCR Termo döngü koşulu

Adımlar	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	94°C	5 dk.	30 döngü
Denatürasyon	94°C	45 sn.	
Tavlama	57°C	1 dk.	
Eklenti	72°C	45 sn.	
Son Uzantı	72°C	5 dk.	
Tutma	4°C	∞	

3.5.3 Hibridizasyon ve geliştirme için termo çalkalayıcı PSH-60HL

Plaka termo çalkalayıcısını analiz için hazırlamaya yönelik ilk prosedürler, kesinlikle Opegen'de sağlanan talimatlara uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Analizden önce hibridizasyon tamponu, yıkama tamponu 1 ve yıkama tamponu 2, bir su banyosunda 42°C'ye ısıtıldı. Denatüre edici çözelti, konjugat ve substrat reaktiflerinin oda sıcaklığına ulaşması sağlanmıştır. Çökelti içeren reaktifler tamamen çözünene kadar hafifçe çalkalanmıştır. Hibridizasyon şeritleri, teması ve kontaminasyonu önlemek için cımbız kullanılarak alüminyum poşetten dikkatli bir şekilde çıkarılmıştır. Şeritler hibridizasyon tepsisine yerleştirildi, her şerit ayrı bir kanala tahsis edilmiş ve yukarı doğru yönlendirilmiştir. Denatürasyon tamponu (12,5 µL) dikkatlice tepsiye yerleştirilmiş ve ardından 12,5 µL PCR ürünü eklenmiştir. Daha sonra tepsi, termo çalkalayıcının plakası üzerine yerleştirilmiştir, güvenli bir şekilde kapatılmış ve 10 dakika süreyle inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyonun ardından, her kanala derhal 2 mL ısıtılmış hibridizasyon tamponu eklenmiş ve plaka dikey olarak salınarak hafifçe çalkalanmıştır. Termo çalkalayıcı daha sonra kapatılmış ve plaka, 30 dakikalık bir inkübasyon süresi boyunca 450 rpm'lik bir hızda 42°C'lik sabit bir sıcaklıkta çalkalanmıştır. Hibridizasyon işlemi boyunca aynı sıcaklık ve hız korunmuştur. Hibridizasyon tamponu daha sonra bir vakum pompası kullanılarak ortadan kaldırılmış ve ardından her kanala 2 mL ısıtılmış yıkama

tamponu 1 eklenerek 10 dakikalık iki yıkama döngüsüne tabi tutulmuştur. Yıkama adımını takiben her kanala 2 mL konjugat eklenerek 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra konjugat çıkarıldı ve 2 mL ısıtılmış yıkama tamponu 2 ile değiştirilmiştir. Daha sonra plaka, üç kez tekrarlanarak 5 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Yıkama tamponu 2, aspirasyon yoluyla çıkarılmış, ardından 1 mL substrat ilave edilerek 10 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra plakalar ekstrakte edilmiş ve 2 mL distile su ile üç kez durulanmıştır. Daha sonra şeritler ayrılarak ışısız ortamda kurumaya bırakılmıştır (Çizelge 3.12).

Çizelge 3.12 Çölyak hastalığı HLA haplotipleri kit içeriği

Çölyak Şerit	İçindekiler	Miktar
	Membranlar	16 test
	8 kanallı tepsi	2
PCR Reaktifi	PCR Karışımı	0,80 mL
	Primerler	0,110 mL
	Tak	0,030 mL
	Denatürasyon	1 mL
	1 tamponu yıkayın	100 mL
	Konjuge	60 mL
	Yıkama tamponu 2	130mL
	Yüzey	30 mL

3.5.4 Şeritlerin okunması ve yorumlanması

Hibridizasyon/geliştirme sonrasında şeritleri yorumlamak için şeritler bir kâğıt üzerine yerleştirilmiş ve selofanla kaplanmıştır. Yorumlama, kit içerisinde yer alan değerlendirme tablosu kullanılarak, şeritlerin siyah ve kırmızı çizgileri çizelgedeki çizgilerle hizalanarak, şeritler üzerindeki konumlarına göre bantlar tanımlanarak manuel olarak yapılmıştır.

3.6 SNP Analizi

3.6.1 MYO9B geninin tek nükleotid polimorfizmi (SNP)

Bu çalışmanın amacı, çölyak hastalarında (vakalarda) ve asemptomatik sağlıklı kontrollerde MYO9B gen polimorfizminin (rs2305767) sıklığını ve ilişkisini tahmin etmektir.

3.6.1.1 DNA ekstraksiyonu

Genomik DNA, Promega'nın ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System prosedürü kullanılarak aşağıdaki adımlar izlenerek bir kan numunesinden ekstrakte edilmiştir.

- Kan numunesi oda sıcaklığında bir rulo karıştırıcıda 15 dakika boyunca kuvvetli bir şekilde çalkalanmıştır.
- Her 1,5 mL'lik mikro santrifüj tüpüne 20 µL Proteinaz K (PK) Çözeltisi dağıtılmış ve ardından 200 µL kan eklenmiştir. İçerik daha sonra kısaca karıştırılmıştır.
- Hücre lizisini indüklemek için tüpe 200 µL Hücre Lizis Tamponu (CLD) eklenmiş ve 10 saniye süreyle vorteks kullanılarak çalkalanmıştır.
- Tüm karışımlar 30 dakika süreyle 56°C sıcaklıktaki bir su banyosunda inkübasyona tabi tutulmuştur.
- Kan numunesinin inkübasyonu sırasında, bir ReliaPrep™ Bağlama Kolonu herhangi bir içerik içermeyen bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
- İnkübasyon süresinden sonra tüp su banyosundan çıkarıldı ve 250 µL Bağlama Tamponu (BBA) eklendi. İçerik daha sonra 10 saniye boyunca vorteks kullanılarak kuvvetli bir şekilde karıştırılmıştır.
- Tüm tüp içeriği ReliaPrep™ Bağlama Kolonu üzerine yerleştirildikten sonra 12,000 rpm'de üç dakika santrifüj edilmiştir.
- İçinden geçen sıvıyı taşıyan toplama tüpü çıkarılarak atılmıştır.
- Bağlama kolonu yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.

- Kolonu yıkamak için 500 µL Kolon Yıkama Solüsyonu (CWD) eklendi ve kolon 3 dakika boyunca maksimum hızda santrifüj edildi. Kolondan geçen sıvı atıldı ve bu işlem üç kez tekrarlanmıştır.
- Yıkama aşamasının ardından kolon steril 1,5 mL'lik bir mikro santrifüj tüpüne aktarılmış ve kolona 100 µL Nükleazsız Su eklenmiştir.
- 5 dakikalık bir sürenin ardından, 1,5 mL'lik tüp 5 dakika boyunca 5000 rpm hızında bir kolonda santrifüj işlemine tabi tutulmuştur.
- Santrifüjün ardından ReliaPrep™ Bağlama Kolonu atılmış ve eluat muhafaza edilmiştir.

3.6.1.2 DNA miktarının ölçümü

Ekstrakte edilen DNA konsantrasyonunu ölçmek ve dolayısıyla sonraki uygulamalar için numunelerin kalitesini değerlendirmek için Quantus Florometre kullanılmıştır. 1 µL DNA'nın 200 µL seyreltilmiş kantiflor boya ile birleştirilmesiyle bir karışım hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında 5 dakikalık inkübasyonun ardından DNA konsantrasyonu okumaları tespit edilmiştir.

3.6.1.3 Başlangıçlar

Tek nükleotid polimorfizmi genotiplemesinde kullanılan MYO9B geninin ileri ve geri primerleri Çizelge 3.13'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.13 Tek nükleotid polimorfizmi genotiplemesinde kullanılan MYO9B geninin ileri ve geri primerleri

Primerler	Sıra 5'-3'	Tavlama Sıcaklığı (°C)	Ürün boyutu (bp)
rs2305767-F	TGTAACGACGGCCAGTTCTCTTG AGTAGCTGGGATTA	60	780
rs2305767-R	CAGGAAACAGCTATGACGTGTCGGG ATTGGGTAG		

Primerler Macrogen Company tarafından liyofilize formdan sağlanmıştır. Liyofilize primerler, stok çözelti olarak 100 pmol/μL'lik son konsantrasyonu verecek şekilde nükleaz içermeyen su içinde çözülmüştür. Bu primerlerin çalışma çözeltisi, 10 pmol/μL'lik bir çalışma primer çözeltisi elde etmek için 90 μL nükleaz içermeyen suya 10 μL primer stok çözeltisinin (dondurucu -20°C'de saklanan) eklenmesiyle hazırlanmıştır (Çizelge 3.14).

Çizelge 3.14 Primer hazırlığı

Primer	NFW miktarı (μL)	Konsantrasyon (pmol/μL)
rs2305767-F	300	100
rs2305767-R	300	100

Primer optimizasyonu: Primerin ideal bağlanma sıcaklığının belirlenmesi amacıyla, DNA şablonu, 55, 58, 60, 63 ve 65°C'lik bağlanma sıcaklıklarında aynı primer çiftleri (ileri ve geri) kullanılarak çoğaltılmıştır. PCR reaksiyonları için yirmi mikrolitre GoTaq Green Master Mix (2X), her primerden bir mikrolitre (10 pmol), altı mikrolitre nükleaz içermeyen su ve iki mikrolitre şablon DNA kullanılmıştır. Bir PCR Express (Thermal Cyclers, Veriti, ABD) kullanılarak sıcaklık programı; 94°C'de 4 dakika süreyle ilk denatürasyon; daha sonra 94°C'de 30 saniye süreyle 30 döngü denatürasyon, 55, 58, 60, 63 veya 65°C'de 30 saniye süreyle tavlama ve son olarak 72°C'de 30 saniye süreyle uzatma olacak şekilde ayarlanmıştır. Protokol, reaksiyonları durdurmak için 72°C sıcaklıkta 7 dakikalık son uzatılmış inkübasyon periyoduyla, ardından 4°C derece sıcaklıkta 10 dakikalık inkübasyonla sona ermiştir.

3.6.1.4 Reaksiyon kurulumu ve termal döngü protokolü

PCR bileşenleri, tek numune için ana karışım bileşenleri ve PCR protokolü Çizelge 3.15, Çizelge 3.16 ve Çizelge 3.17'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.15 PCR bileşen hesaplaması

PCR Bileşen Hesaplaması				
Reaksiyon sayısı		rxn	Primerlerin tavlama sıcaklığı	60
Reaksiyon hacmi/çalıştırma	25	µL	PCR ürününün uzunluğu (bp)	780

Çizelge 3.16 Tek numune için ana karışım bileşenleri

Ana karışım bileşenler	Stok	Birim	Final	Birim	Hacim
					1 Örnek
Ana Karışım	2	X	1	X	12,5
İleri primer	10	uM	0,5	uM	1
Ters primer	10	uM	0,5	uM	1
Nükleazsız Su (NFW)					8,5
DNA		ng/µL		ng/µL	2
Toplam hacim					25
rxn başına kısım	Tüp başına 23 µL ana karışım ve iki µL şablon eklenir				

Çizelge 3.17 PCR protokolü

Adımlar	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
İlk denatürasyon	(95)	5 dk	1
Denatürasyon	(95)	30 s	30
Tavlama	(60)	30 s	
Eklenti	(72)	30 s	
Son uzatma	(72)	7 dk	1
Tutma	(10)	10 dk	

3.6.1.5 Agaroj jel elektroforezi

PCR amplifikasyonundan sonra amplifikasyonun varlığını doğrulamak için agaroj jel elektroforezi kullanılmıştır. PCR'nin başarısı tamamen izole edilmiş DNA'nın spesifik gereksinimlerine dayanmaktadır.

Agaroj jelin hazırlanması;

- Bir balon 100 mL 1X TAE çözeltisi ile doldurulmuştur.
- Tampon içine 1,5 gram (%1,5'e eşdeğer) agaroj eklenmiştir.

- Çözelti, tüm jel partikülleri tamamen çözülene kadar bir mikrodalga kullanılarak kaynama noktasına kadar ısıtılmıştır.
- Mililitre başına 10 miligram konsantrasyona sahip 1 mikrolitre hacminde Etidyum Bromür çözeltisi agaroz eklenmiştir.
- Homojenliği sağlamak ve hava kabarcıklarının oluşmasını önlemek için agaroz çalkalanmıştır.
- Çözeltinin 50-60°C'lik daha düşük bir sıcaklığa ulaşmasına izin verilmiştir.

Yatay agaroz jelin hazırlanması; Jel tepsisinin her iki kenarı selofan bantlarla kapatıldıktan sonra agaroz solüsyonu jel tepsisine dökülmüştür. Agaroz daha sonra oda sıcaklığında 30 dakika süreyle sertleşmeye bırakılmıştır. Tarak hassas bir şekilde ekstrakte edilerek jel daha sonra jel elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Tank, tampon seviyesi jel yüzeyini 3-5 mm aşındırmaya kadar 1X TAE-elektroforez tamponu ile doldurulmuştur.

PCR ürünlerinin yüklenmesi; PCR ürünü için 5 µL doğrudan kuyucuğa yüklenmiştir. Elektrik gücü 100 volt/50mA'da 60 dakika boyunca açılmıştır. DNA Katottan artı Anot kutuplarına doğru hareket etmiştir. Ardından jeldeki Etidyum bromür lekeli bantlar Jel görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülenmiştir.

3.6.1.6 Standart sıralama

PCR ürünleri, otomatik bir DNA dizileme cihazı olan ABI3730XL kullanılarak sanger dizilemesi için MacroGen Corporation-Kore'ye gönderilmiştir. Sonuçlar e-posta ile alınmış ve daha sonra Geneious yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.7 İstatistiksel Analiz

Veri analizi, IBM SPSS-29 istatistiksel aracı (IBM Statistical Packages for Social Sciences-versiyon 29, Chicago, IL, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veriler frekans, yüzde, ortalama, standart sapma ve aralık (minimum-maksimum değerler) gibi

temel istatistiksel ölçümler kullanılmıştır. Çeşitli ortalamalar (niceliksel veriler) arasındaki eşitsizliğin istatistiksel önemi, iki bağımsız ortalamayı karşılaştırmak için Öğrenci t testi veya ikiden fazla bağımsız ortalamayı karşılaştırmak için ANOVA testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Farklı yüzdelerdeki (niteliksel veriler) varyasyonların istatistiksel önemi, uygun olduğunda Yate düzeltmesi veya Fisher Exact testinin dahil edildiği Pearson Ki-kare testi (χ^2 -testi) kullanılarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık, 0,05 veya daha düşük bir P değerine göre belirlenmiştir. Pearson korelasyon katsayısı, iki niceliksel değişken arasındaki korelasyonu değerlendirmek ve ilişkinin istatistiksel önemini belirlemek için ilişkili t-testi ile hesaplanmıştır. Korelasyon katsayısı (r) pozitif (doğrudan korelasyonu gösterir) veya negatif (ters korelasyonu gösterir) olabilir. 0,3'ten küçük bir sayı korelasyonun olmadığını gösterirken, 0,3 ile 0,5'in altındaki değerler zayıf korelasyonu gösterir. 0,5 ile 0,7'nin altındaki değerler orta düzeyde gücü, 0,7'den büyük değerler ise güçlü korelasyonu gösterir. Korelasyonun yanı sıra r^2 olarak da bilinen belirleme katsayısı da belirlenmiştir. Örneğin r'nin değeri 0,58 olduğunda karşılık gelen r^2 0,34'tür. Bu, y değerlerindeki varyansın %34'ünün x değerlerinin bilinmesiyle açıklanabileceğini veya tam tersini göstermektedir.

Olasılık Oranı (OR), maruz kalma ile belirli bir sonuç arasındaki ilişkiyi ölçen istatistiksel bir terimdir. Olasılık oranı (OR), belirli bir maruziyet söz konusu olduğunda bir sonucun meydana gelme olasılığını, bu maruziyet olmadan sonucun meydana gelme olasılığına göre ölçer. OR veya olasılık oranı, iki değişken arasında, özellikle de bir bileşenin istenen sonuç üzerindeki etkisi arasında bağlantı kurmak için oldukça etkili bir yöntemdir. Kanıtın gücü yeterliyse ve istatistiksel analiz titizse, potansiyel olarak nedensel bir ilişki kurulabilir. Olasılık oranı (OR), yayınlanmış araştırma yayınlarında sıklıkla istatistiksel bir ölçü olarak anılır. Esasen, olasılık oranı (OR), bir kişinin belirli bir duruma maruz kalması durumunda, bu duruma maruz kalmadığı zamana kıyasla bir olayın meydana gelme olasılığını temsil eder. OR'deki 1 değeri, ilgilenilen olayın meydana gelme ihtimalinin olmadığını gösterir. Basitçe söylemek gerekirse, 1'lik bir olasılık oranı, sonucun meydana gelme olasılığının artmadığını veya azalmadığını gösterir. 1'den büyük bir olasılık oranı (OR), sonucun oluşma olasılığının daha yüksek olduğunu gösterirken, 1'den küçük bir OR, sonucun gerçekleşme olasılığının daha düşük olduğunu gösterir. Olasılık oranı (OR) 1 ile 2 arasına düştüğünde, olayın meydana gelme olasılığı,

oranlardaki %XX'lik bir artışla gösterilir (%XX, OR- 1'e eşittir). Olasılık oranının (OR) 1,24 olması, sonucu yaşama olasılığının referans gruba göre %24 daha fazla olduğunu gösterir ($1,24-1=0,24$, yani %24). Olasılık oranının (OR) 2'yi aşması olasılığın XX kat artması olarak tanımlanabilir (XX, OR'ye eşittir). Olasılık oranının (OR) 2,5 olması, karşılaştırma grubuna göre sonucun yaşanma ihtimalinin 2,5 kat arttığı anlamına gelir. Olasılık oranı (OR) 1'den küçük olduğunda, sonucun yaşanma olasılığı %XX oranında azalır (%XX, 1 eksi OR'ye eşittir). Örneğin, olasılık oranının 0,70 olması, sonucun yaşanma olasılığının %30 azaldığını gösterir.

Olasılık oranı ayrıca değişken ile sonuç arasındaki korelasyonun büyüklüğünü de gösterir. Kısa ve öz bir şekilde ifade etmek gerekirse, 5'lik bir olasılık oranı (OR), 3'lük bir OR'ye kıyasla çok daha güçlü bir korelasyona işaret eder; bu da 1,5'lik bir OR'den daha güçlüdür. Son olarak olasılık oranı (OR), bileşen ile sonuç arasındaki ilişkinin spesifik yönünü gösterir. Örneğin, 1'den büyük bir olasılık oranı (OR), sonuç ile bağlantılı değişkenler arasında pozitif bir korelasyon olduğunu gösterir. Alternatif olarak, her ikisi de istatistiksel anlamlılık düzeyini gösteren bir p değeri ve %95 güven aralığı eşlik eder. OR'nin istatistiksel anlamlılığını analiz etmek için %95 güven aralığı (%95 GA), p değerinden daha büyük öneme sahiptir. Temelde, olasılık oranının (OR) araştırma popülasyonundaki bireylerin %95'i arasında ne ölçüde dağıldığını temsil eder. L, numunedeki OR'nin logaritmasını gösteriyorsa, popülasyondaki OR'nin logaritması için tahmini %95 güven aralığı $L \pm 1,96SE$ 'dir. Olasılık oranı (OR) için %95'lik bir güven aralığı oluşturmak amacıyla, bunu $\exp(L-1,96SE)$ ve $\exp(L+1,96SE)$ ile eşleyebiliriz. Nüfus olasılık oranının (OR) bire eşit olduğu hipotezini test etmek için iki taraflı p değeri, P'nin bir olasılığı temsil ettiği ve Z'nin temsil ettiği $2P(Z < -|L|/SE)$ formülü kullanılarak hesaplanabilir. Olasılık oranı hakkında sonuç çıkarmak için kullanılan farklı bir yöntem, X ve Y'nin marjinal frekanslarına dayalı olarak veri dağılımının incelenmesini içerir. Bu yöntemin bir yararı, olasılık oranının (OR) örnekleme dağılımının tam olarak temsil edilebilmesidir. Olasılık oranının (OR) 1 olması, bir olayın meydana gelme ihtimalinde herhangi bir değişiklik olmadığını gösteriyorsa, o zaman her iki tarafta da 1'in %95 güven aralığına (CI) sahip olması, sonucun meydana gelme ihtimalinin hem daha yüksek hem de daha düşük olduğu anlamına gelir; bu da şu şekildedir: çelişkili. Bu nedenle, 1 değerini içeren %95'lik bir güven aralığı hiçbir zaman istatistiksel olarak anlamlı kabul

edilmeyecektir, yani hiçbir zaman 0,05'in altındaki bir p değeriyle ilişkilendirilmeyecektir. Örneğin, belirli bir sonucun olasılığı %65 daha yüksektir (OR=1,65, %95 GA=1,36–1,96, P=0,02). Hastalık tespiti için çeşitli parametrelerin teşhis veya tarama potansiyelini değerlendirmek amacıyla Alıcı Çalışma Karakteristiği (ROC) eğrisi tekniği kullanıldı. Bu teknik aynı zamanda doğru hastalık teşhisi için duyarlılığı ve özgüllüğü dengeleyen optimal "kesme değerinin" belirlenmesine de yardımcı oldu. Genellikle "Eğri Altındaki Alan" (AUC) olarak bilinen ROCS alanının açıklaması şu şekildedir: Sayısal ölçek şu şekildedir: 0,9 "mükemmel" olarak kabul edilir, 0,8 "iyi" olarak kabul edilir, 0,7 "olarak kabul edilir" makul", 0,6 "zayıf" olarak kabul edilir ve 0,6'nın altındaki herhangi bir değer "başarısız" olarak kabul edilir.

Duyarlılık, özgüllük, yanlış negatif yüzde, yanlış pozitif yüzde, pozitif tahmin değeri, negatif tahmin değeri ve doğruluk oranı aşağıdaki Denklem (3.1), Denklem (3.2), Denklem (3.3), Denklem (3.4), Denklem (3.5), Denklem (3.6) ve Denklem (3.7) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Duyarlılık} = \text{Toplam hastalığı bölen gerçek pozitif} \times 100. \quad (3.1)$$

$$\text{Özgüllük} = (\text{Doğru negatifin toplam sağlıklıya bölünmesi} \times 100) \quad (3.2)$$

$$\% \text{Yanlış negatif} = \text{Toplam hastalığı bölen yanlış negatif} \times 100 \quad (3.3)$$

$$\% \text{Yanlış pozitif} = \text{Yanlış pozitifin toplam sağlıklıya bölünmesi} \times 100 \quad (3.4)$$

$$\text{Pozitif testin tahmini} = \text{Gerçek pozitifin toplam pozitiflere bölünmesi} \times 100 \quad (3.5)$$

$$\text{Negatif testin tahmini} = \text{Gerçek negatifin toplam negatiflere bölünmesi} \times 100 \quad (3.6)$$

$$\text{Doğruluk oranı} = [(\text{Doğru pozitif} + \text{gerçek negatif}) \text{ bölen } (\text{Toplam hastalık} + \text{toplam sağlıklı})] \times 100 \quad (3.7)$$

Örneklem büyüklüğü: Uygun olan her kadın katılımcı, onam formunu ve araştırma aracını yazılı olarak doldurmuştur. Örnek büyüklüğü aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir: Denklemdeki değişkenler şu şekilde tanımlanır: n örneklem büyüklüğünü temsil eder, α tip I hata için anlamlılık düzeyini temsil eder, Z standart normal dağılımdan 5'e karşılık gelen kritik değerdir. σ ölçülen değişkenin varyansdır ve d , niceliksel değişkenin tahmin edilmesi için istenen doğruluk düzeyini gösterir. Çalışmada, birinci tür hata olan z , σ ve d 'nin değerlerinin sırasıyla 0,05, 96,3, 7,38 ve 0,99 olduğu bulunmuştur. Yanıt vermeme oranı %10 olarak hesaplandıktan sonra örneklem büyüklüğü 238'e ayarlanmış ve 235 katılımcı veri analizine dahil edilmiştir. Ülkedeki her bölge için örneklem büyüklüğü XXX olarak belirlenmiştir. Bu hesaplamada 2'lik tasarım etkisi, 2 taraflı testle %80'lik istatistiksel güç ve 0,05'lik anlamlılık düzeyi (α) hesaba katılmıştır. Amaç, 1. zaman (anket) ile 2. zaman (anketin bir sonraki turu) arasında düzensiz yasal statüye sahip kişilerin yüzdesinde %10'luk bir azalma tespit etmektir. 1. zamanda kişilerin %30'unun düzensiz hukuki statüye sahip olduğu varsayılırken, 2. zamanda bu oranın %20'ye düşmesi beklenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Katılımcı Yaşı ve Cinsiyet Dağılımı

Yaş: Vaka çalışması grubundaki katılımcıların yaşları 1 ile 60 arasında değişmekte olup yaş ortalaması $19,9 \pm 15,4$ yıl (ortalama $\pm$ standart sapma), kontrol grubunun yaş ortalaması ise $21,8 \pm 16,1$ yıl olarak hesaplanmıştır. Hem hasta hem de kontrol grubunda 10 yaş altı bireylerin oranı sırasıyla %32 ve %30'dur. Çizelge 4.1'de hasta ve kontrol gruplarının yaş gruplarının istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermediği görülmektedir ($p=0,560$).

Cinsiyet: Hasta grubunun 18'i (%36,0) erkek, 32'si (%64,0) kadın, kontrol grubunun ise 15'i (%37,5) erkek, 25'i (%62,5) kadındır. İstatistikler, Çizelge 4.1'de gösterildiği gibi hasta ve kontrol grupları arasında cinsiyet açısından anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir ($p=0,883$).

Çizelge 4.1 Hasta ve kontrol gruplarında yaş ve cinsiyet dağılımı

		Hasta		Kontrol		P değeri
		Sayı	%	Sayı	%	
Yaş (yıl)	<10 yaş	16	32,0	12	30,0	0,988
	10---	14	28,0	10	25,0	
	20---	8	16,0	7	17,5	
	30---	5	10,0	5	12,5	
	=>40 yıl	7	14,0	6	15,0	
	Ortalama $\pm$ SS (Aralık)	$19,9 \pm 15,4$ (1-60)		$21,8 \pm 16,1$ (1-59)		0,560
Cinsiyet	Erkek	18	36,0	15	37,5	0,883
	Kadın	32	64,0	25	62,5	
*0,05 düzeyinde Pearson Ki-kare testi (χ^2 -testi) kullanılarak yüzdelerde anlamlı bir fark belirlenmiştir.						
#0,05 düzeyinde Students-t-testi kullanılarak iki bağımsız ortalama arasındaki anlamlı fark						

Bu araştırmanın sonuçları, Irak'ta ve dünya çapında birçok çalışmanın elde ettiği sonuçlarla örtüşmektedir. Iraklı hastalarda çölyak hastalığına ilişkin bir çalışma, Iraklı hastaların %37,5'inin 10 yaşın altında olduğunu göstermiştir (Hameed *et al.* 2016). Ayrıca bu bulgular, Irak-Bağdat'ta yapılan çölyak hastalarını inceleyen ve hastaların %56,7'sinin 8-12 yaş aralığında olduğunu ortaya koyan başka bir çalışmanın sonuçlarıyla da tutarlıdır

(Al-Assaf *et al.* 2021). Ayrıca Bağdat eğitim laboratuvarlarının immünoloji bölümünde 509 hastayı kapsayan bir çalışma, çölyak hastalığının büyük çoğunluğunun 1-10 yaş grubunda görüldüğünü ortaya çıkarmıştır (Kamil 2005).

Bu çalışmaya dahil edilen hastaların yaşlarının 1 ile 60 yıl arasında değişmiştir. Tüm hastalar ve cinsiyetler için ortalama ve en sık görülen yaş $19,9 \pm 15,4$ yıldır. Bu bulgular önceki araştırmaların sonuçlarıyla uyumludur (Hammo and Hayawi 2021, Alkemaw and Alsaltani 2021). Dünya çapında yaş ve en yüksek çölyak hastalığı oranı ile ilgili birçok çalışma, mevcut çalışmaya benzer sonuçlar ortaya koymuştur (Mashayekhi *et al.* 2018, Fernández-Mestre *et al.* 2023). Yaşa bağlılığın spesifik açıklaması bilinmemekle birlikte genel olarak çocuklarda çölyak hastalığı (ÇH) prevalansının diğer yaş gruplarına göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum, önemli miktarda glüten alımına veya emzirmeye devam edilmeden glütene maruz kalınmasına atfedilebilir; bu da çocuklarda ÇH gelişme olasılığını artırabilir. Alternatif olarak, erken bebekliği veya yetişkinlikte ÇH'nin gecikmiş başlangıcını etkileyen çevresel faktörler de rol oynayabilir (Hameed *et al.* 2016) veya enfeksiyonlar veya genetik gibi diğer faktörlerden kaynaklanabilir (Alkemaw and Alsaltani 2021).

Vakaların cinsiyete göre dağılımına bakıldığında, hasta alımında rastgele seçim tekniği kullanılmasına rağmen çalışma grubunun %64'ü kadın, %36'sı erkek olup, kadın/erkek oranının 1,9 olması kadınlarda ÇH'nin belgelenmiş yaygınlığını göstergesidir (Çizelge 4.1). Bu gerçek, genellikle çoğu otoimmün bozuklukta gözlenen kadınlarda ÇH prevalansının daha yüksek olduğunu gösteren çok sayıda çalışmada gösterilmiştir (Dixit *et al.* 2014). Hameed *et al.* (2016) ayrıca ÇH prevalansının kadınlarda erkeklere göre daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Bu durum Irak'ta yapılan birçok çalışmayla da örtüşmektedir (Abdullah and Hanoon 2020, Hashim *et al.* 2017) ve Suudi Arabistan'da yapılan bir çalışmada ise 17'sinin kadın (%3,1) ve 9'unun erkek (%1,5) olduğu tespit edilmiştir (Aljebreen *et al.* 2013). Dünya çapındaki çalışmalara ek olarak (Aghamohamadi *et al.* 2020, Iervasi *et al.* 2020), ÇH hastalığının başladığı yaşta veya klinik semptomlarının görülme biçiminde iki cinsiyet arasında genellikle fark edilebilir bir eşitsizlik yoktur (Caio *et al.* 2019). Cinsiyetler arasındaki teşhis oranlarındaki eşitsizliğe çeşitli değişkenler katkıda bulunabilir:

- Tipik olarak kadınlarda otoimmün hastalıkların prevalansı daha yüksektir (Dixit *et al.* 2014).
- Erkekler ve kadınlar arasındaki cinsiyet hormonları arasındaki farklılıklar, kadınlarda otoimmünite prevalansının artmasından sorumludur (Owen *et al.* 2013).
- Bazı genetik lokuslar cinsiyetten etkilenen özellikler sergiler ve immünolojik tepkiyi düzenleyen cinsiyet hormonlarının katılımı bu eşitsizlikleri açıklığa kavuşturabilir (Green *et al.* 2001). Kadın hastaların sıklıkla DQ2.5 ve/veya DQ8 moleküllerine sahip olması nedeniyle cinsiyete özgü HLA korelasyonları açıktır. Erkeklerde yaygın olarak DQ2.5 ve DQ8 için çölyak hastalığı belirteçlerinin negatif olduğu bulunmuştur (Megiorni *et al.* 2008).
- ÇH'li erkeklere daha ileri yaşta tanı konulması cinsiyetler arasındaki bu eşitsizliğe katkıda bulunabilir (Hin *et al.* 1999).

4.2 Çölyak Hastaları ve Kontrollerin Klinik ve Sosyo-Demografik Sunumu

A-Klinik belirtiler: Çalışmaya katılan katılımcılarının her biri ÇH ile ilişkili semptomlar yaşamış ve bunların çoğunluğu gastrointestinal görünümde olan karın ağrısı (%80,0), ishal (%78,0), kusma (%30,0) ve şişkinlik (%60,0) ve en sık görülen gastrointestinal olmayan semptomlar: anemi (%70,0) ve kilo kaybı (%66,0) şeklinde olmuştur. Çizelge 4.2'de ÇH'ye işaret eden semptomları gösteren kişilerin ana semptomlarının yanı sıra demografik ve tanısal özelliklerini göstermektedir.

B-Glutensiz Diyet: Çölyak hastalarının çoğunluğu (%80,0) glutensiz diyetle sahip değilken, hastaların sadece %20,0'ı glutensiz diyetle başlamıştır.

C-İkametgâh: Kentsel bölgede yaşayan toplam hasta sayısı %68,0, kırsal alanda yaşayan toplam hasta sayısı ise %32,0'dir. Kontrol grubunun yaklaşık dörtte üçü kentte ikamet etmekte (%76,0) ve kırsal alanlarda (%24,0) yaşamaktadır. Bu istatistikler, aşağıda Çizelge 4.2'de gösterildiği gibi, hasta ve kontrol grupları arasında ikamet yerine göre anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir (P=0,24).

D-Aile öyküsü: Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi hastaların yüzde yetmiş beşinden fazlasında ailede ÇH öyküsü yoktur ve yalnızca yüzde yirmi dördünde ailede ÇH öyküsü vardır.

Çizelge 4.2 Çölyak hastaları ve kontrollerin klinik ve sosyo-demografik özellikleri

Klinik sunum	Vaka sayısı=50 (%)	Kontrol n=40(%)	P değerleri
İshal	(39) %78		
Şişkinlik	(30) %60		
Karın ağrısı	(40) %80		
Anemi	(33) %66		
Kilo kaybı	(35) %70		
Kusma	(15) %30		
GDO	(10) %20		
Aile öyküsü	(12) %25		
İkametgâh	Kentsel (34) %68 Kırsal (16) %32	Kentsel %38 (76) Kırsal %12 (24)	0,244 NS

A-Klinik belirtiler: Çalışmadaki çölyak hastalığı olan hasta grubu klinik heterojenlik göstermiştir. Ancak bu bulgular, bireylerin %40 ile 50'sinde ana semptomların (ishal, karın ağrısı, şişkinlik, anemi, kusma, vb.) en tipik ortak semptomlar olduğu, hastalığın çeşitli klinik sunumunu tartışan bazı çalışmalarla (Hamadi 2005, Fernández-Mestre *et al.* 2023) uyumlu olabilir (Green and Cellier 2007). Ayrıca, bazı çalışmalar ÇH'nin İran, Irak ve Kuveyt'te kalıcı ishalin yaygın bir nedeni olduğunu göstermektedir (Rostami *et al.* 1999, Al-Kazraji 2009, Ganji *et al.* 2021, Tolone *et al.* 2021). Önceki çalışmalar, ÇH'nin tipik semptomları arasında ishal, besin emiliminde bozulma, aşırı kilo kaybı ve aftöz stomatitin bulunduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, hastaların önemli bir kısmı da küçük semptomlar yaşayabilir veya asemptomatik olabilir (Fasano 2005, Barker and Liu 2008).

Hastalığın klinik görünümü, hastalığın başladığı yaş, beslenme alışkanlıkları, mukozal astarda meydana gelen hasarın derecesi ve cinsiyet gibi faktörlere bağlı olarak büyük ölçüde değişebilir. Ayrıca, bireyin immünolojik özelliklerinin de rolü olabilir (Bai *et al.* 2005). Ayrıca genetik faktörler de rol oynamaktadır. DQB1*02 homozigotluğuna sahip hastalar sadece daha şiddetli klinik semptomlar, özellikle ishal ve anemi yaşamakla

kalmaz, aynı zamanda glutensiz bir diyet uygulamadıklarında iyileşmesi daha uzun zaman alan daha şiddetli bağırsak lezyonları geliştirirler (Biagi *et al.* 2012).

B-Konut: Mevcut çalışma, 2019 sonuçlarının çölyak hastalığı ile kentsel alanlarda ikamet etme arasındaki ilişkiyi desteklediği konusunda Al-Jarrah (2019) ile hemfikirdir

Çalışma vakalarının çoğu, kırsal bölgelerde ikamet edenlere kıyasla kentsel bölgelerde ikamet etmekte (hastaların yaklaşık dörtte üçü) ve çoğunluğu eğitilidir. ÇH'nin ortalamanın üzerinde sosyoekonomik statüye sahip yerlerde daha yaygın olduğu gösterilmiştir. Bu olgu, toplumun üst kademelerine mensup bireylerin gluten içeren çeşitli bir diyet tüketimine sahip olma eğiliminde oldukları gerçeğiyle açıklanabilir. Bununla birlikte, potansiyel sağlık sorunlarına ilişkin daha yüksek bir bilinç düzeyi sergilemekte ve aktif olarak profesyonel rehberlik arayışına girerek erken tanı konulmasını sağlamaktadırlar (Stauble 2013).

C-Ailede çölyak hastalığı öyküsü: ÇH hastalarıyla yakın akraba olanlar, özellikle de birinci derece aile üyeleri (birinci derece akrabalar veya FDR'ler olarak bilinir), akraba olmayanlara kıyasla ÇH'ye sahip olma olasılığı daha yüksektir (Khosravi *et al.* 2016). ÇH hastalarının birinci derece akrabaları (FDR'ler) arasında ÇH prevalansı %5 ile %38 arasında değişmektedir. Çölyak hastalığı (ÇH) uzun süre belirti göstermeden kalabilir ve ilk belirtilerin ortaya çıkmasından ancak 10 yıl sonra fark edilebilir (Majsiak *et al.* 2022). Bu nedenle, özellikle yüksek risk altındaki asemptomatik bireylerde kesin ve dikkatli ÇH tarama tekniklerinin kullanılması gerekmektedir. Çeşitli çalışmalar, insan lökosit antijeni-DQ (HLA-DQ) tiplemesinin, ÇH hastalarının birinci derece akrabaları (FDR'ler) gibi yüksek risk altındaki kişilerde ÇH oluşumunu tahmin etmek için kullanılabileceğini göstermiştir (Martínez-Ojinaga *et al.* 2018, Özgenel *et al.* 2019, Mansouri *et al.* 2021).

Bu çalışma, ÇH ile aile öyküsü arasında anlamlı bir ilişki olduğunu kanıtlayan (Tolone *et al.* 2021, Imperatore *et al.* 2016) çalışmalarıyla uyumludur. Diğer araştırmalar da benzer şekilde aralarındaki ilişkiyi kanıtlayan sonuçlar ortaya koymuştur (Younis *et al.* 2014, Al-Kazraji 2009).

4.3 Çalışma Gruplarının Hematolojik Özellikleri

Çizelge 4.3'te gösterilen sonuçlar, çalışılan gruplar (vaka grubu ve kontrol grubu) arasındaki hematoloji testlerinin, her bir parametre için farklı anlamlı p değerleri kapsamında özetlenmiş bir karşılaştırmasını gösterir; bu değerler şunları içerir: WBC $9,48 \pm 3,01$ ve $6,21 \pm 1,41$ anlamlı farklara sahiptir p değeri 0,003, hemoglobin $10,56 \pm 3,51$ ve $14,10 \pm 1,39$, oldukça anlamlı farklar ile p değeri 0,0001, trombositler 260 ± 61 ve 210 ± 45 , anlamlı olmayan farklar içerisinde p değeri 0,09.

Çizelge 4.3 Çalışma gruplarının hematolojik özellikleri

Hematoloji testi	ÇH Ortalama $\pm$ SD (aralık)	Kontrol	P değeri
Hb g/dL	$10,56 \pm 3,51$ (6,16-16,0)	$14,10 \pm 1,39$ (11,32-17,27)	0,0001*
WBC $10^9/L$	$9,48 \pm 3,01$ (4,53-15,1)	$6,21 \pm 1,41$ (4,0-9,10)	0,003*
PLT $10^9/L$	260 ± 61 (160-560)	210 ± 45 (171,1-364)	0,09 NS

Çölyak hastalığı birçok hematolojik anormalliğin gelişiminde yaygın bir faktördür ve anemi en sık gözlenenidir. ÇH ile ilişkili anemi genellikle demir, folik asit ve B12 vitamini gibi mikro besinlerin yetersiz alımından kaynaklanır. ÇH genellikle kan sayımlarındaki çeşitli anormalliklerin, dalağın işleyişinin azalmasının ve bağırsaklardaki lenfomaların nedenleriyle ilişkilidir. ÇH'nin hematolojik belirtileri iyi belgelenmemiştir, ancak ÇH'nin anemi ve bozulmuş dalak fonksiyonuyla bağlantısı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca DH'li bireylerde malign lenfoma gelişimine karşı yüksek bir duyarlılık gösterilmiştir. Anemi insidansı, farklı çalışmalar arasında önemli farklılıklar göstermektedir ve yakın zamanda ÇH tanısı alan bireylerin %12 ile %69'unda gözlenmiştir (Halfdanarson *et al.* 2007). Bu çalışmada ÇH hastalarında sağlıklı gruplarla karşılaştırıldığında hemoglobin düzeyinde anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir ve bu sonuç Irak'ta yapılan birçok çalışmayla uyumludur (Shakir *et al.* 2021, Khorsheed 2021). Ayrıca Türkiye'de ÇH ile hemoglobin düzeyi arasında anlamlı bir ilişki olduğunu kanıtlayan Güngör and Acıpayam (2020) ile de aynı fikirdedir.

Toplam WBC sayısı, hastalar arasında anlamlı derecede yüksek bir ortalamayı göstermiştir. ÇH, glutene karşı oluşan iltihabi bir reaksiyonun sonucu olarak malabsorbsiyona neden olan bir ince bağırsak mukozası hastalığıdır; nötrofiller ve lenfositler inflamatuvar süreçlerde kilit oyuncularındır (Wirth *et al.* 1996). Bu bulgularla uyumlu olarak önceki çalışmalar da ÇH hastalarında WBC sayısının arttığını göstermiştir (Shakir *et al.* 2021, Sestak *et al.* 2018, Babania *et al.* 2021).

ÇH hastalarının trombosit sayısına göre dağılımı bazı önemli farklılıklar ortaya çıkarmıştır. Hastalar, kontrol grubuna (210 ± 45) ($171,1-364$) kıyasla sırasıyla yüksek aralık ($160-560$) ve en düşük trombosit ortalamasına (260 ± 61) sahiptir, ancak fark anlamlı değildir ($p\text{-değeri}=0,09$). Çölyak hastalığında PLT ile ilgili birçok çalışma mevcut çalışmanın sonucuyla aynı fikirdedir (Al-Kazraji 2009, Yuksel *et al.* 2016). ÇH'li kişilerde trombositoz, trombositopeniden daha sık görülür ve etkilenenlerin yaklaşık %60'ını etkiler (Alhabbal *et al.* 2021).

Bununla birlikte çölyak hastalığına bağlı trombositozun kesin nedeni bilinmemektedir. Bununla birlikte otoimmün mekanizmalarla ve inflamatuvar mediatörlerdeki artışla bağlantılı olduğuna inanılmaktadır. Demir eksikliği anemisi veya fonksiyonel hiposplenizm bazen belirli durumlara atfedilir (Carroccio *et al.* 2002, Nelson *et al.* 1976). Buna karşılık Dupond *et al.* (1993), ÇH'li 23 hastanın 14'ünde trombositozun gözlemlendiğini ve bunun demir eksikliği veya inflamatuvar hastalıkla bağlantılı olmadığını keşfettiler. Trombositozlu hastaların altısında ilişkili bir otoimmün hastalık mevcuttu, ancak trombositozlu olmayan bireylerde bu ilişki gözlenmedi. Trombositoz, ÇH'li bireylerin değerlendirilmesine yardımcı olur ve hastalığın gelişiminin arttığını gösterebilir. Üstelik bu bireylerin kan dolaşımında yüksek trombosit varlığı, eşlik eden bir immünolojik bozukluğa işaret edebilir (Alhabbal *et al.* 2021).

4.4 Hastalar ve Kontrol Grubu Arasında Çölyak Hastalığına Bağlı HLA Haplotiplerinin (HLA DQ2, HLA DQ8 ve HLA DQ2&8) Tanımlanması

Çölyak hastalıklarıyla ilişkili ana HLA haplotipleri olan HLA-DQ2 ve HLA-DQ8 genlerini kodlayan haplotiplerin varlığının veya yokluğunun tespiti, bu haplotiplerin

farklı çalışma grupları (vaka çalışması ve kontrol grubu) arasındaki dağılımını ortaya koymaktadır.

HLADQ2, çölyak hastalarında en sık görülen HLA haplotipiydi ve hastaların %76'sında tespit edildi ve anlamlı derecede yüksektir ($p=0,0001$), çölyak hastalarının %20'sinde HLADQ8 geni tespit edilmiştir ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,094$). %14 hem HLA-DQ2 hem de DQ8 haplotiplerine sahip olup istatistiksel olarak da anlamlı değildir ($p=0,157$). Kontrol grubundaki kontrollerin %22,5'i HLADQ2 haplotipine sahipken, %7,5'i HLADQ8 genine sahiptir; bireylerin %5'i hem HLADQ2 hem de HLADQ8 haplotipine sahiptir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 Hastalar ve kontrol grubu arasında çölyak hastalığına bağlı HLA haplotipleri

HLADQ		Çölyak hastalığı		Kontrol		P değeri
		Sayı	%	Sayı	%	
DQ2	Pozitif	38	76,0	9	22,5	0,0001*
	Negatif	12	24,0	31	77,5	
DQ8	Pozitif	10	20,0	3	7,5	0,094
	Negatif	40	80,0	37	92,5	
DQ2&DQ8	Pozitif	7	14,0	2	5,0	0,157
	Negatif	43	86,0	38	95,0	
0,05 düzeyinde Pearson Ki-kare testi kullanılarak yüzdeleri içeren anlamlı fark						

Çok sayıda çalışma, HLA bölgesinin ÇH gibi birçok sistemik otoimmün hastalığa genetik yatkınlıkta kritik bir rol oynadığını göstermiştir. Spesifik olarak, HLA sınıf II -DQ alanı iki spesifik aleli (HLA-DQ2 ve HLA-DQ8) kodlayan genleri içerir. Bu aleller, ana doku uyumluluk kompleksi (MHC) II'ye aittir ve ÇH'ye kalıtsal duyarlılıktan sorumludur (Cecilio and Bonatto 2015). HLA-DQ2 veya HLA-DQ8 genotipine sahip olan ve MHC sınıf II molekülleri taşıyan antijen sunan hücreler (APC'ler), gliadin doku transglutaminaz ile etkileşime girdiğinde oluşturulan büyük moleküler kompleksi tanımlama kapasitesine sahiptir. Bu tanıma, antijenik uyarı yoluyla bağışıklık tepkisinin aktivasyonuna yol açar. Bu, ÇH patofizyolojisinin temel çerçevesini oluşturur (Falcigno *et al.* 2020).

Diğer popülasyonlardan gelen, ÇH'de ve sağlıklı popülasyonlarda iki genotipin ekspresyonunu analiz eden çalışmalar vardır. Avrupa bölgesinde HLA-DQ2 prevalansı ÇH hastalarında %79 ile %86 arasında ve genel popülasyonda %24 ile %32 arasında değişirken, HLA-DQ8 için değerler sırasıyla %10-21 ve %15-17'dir (Maruntelu *et al.* 2022, Wrobleva *et al.* 2014, Fernández-Cavada-Pollo *et al.* 2013). Asya kıtasında ÇH hastalarının %80-83'ünde HLA-DQ2 ve yaklaşık %25'inde HLA-DQ8 kaydedilmiştir. Asya genel popülasyonuna bakıldığında ise HLA-DQ2 varlığı %22-35, HLA-DQ8 ise %3-22 oranında gözlenmiştir (Giriprasad *et al.* 2019, Özgenel *et al.* 2019, Alaa 2021). HLA-DQ2/DQ8 heterozigotları ÇH gelişimine en düşük duyarlılığı gösterirken genel popülasyonda %25-35 prevalansa sahiptir. Bu genotipe sahip bireylerin ÇH geliştirme olasılığı yalnızca %3'tür (Mazzilli *et al.* 1992). Bu sonuçlar, hastaların %76'sının HLA-DQ2 homozigot, %20'sinin HLA-DQ8 homozigot ve yalnızca %14'ünün HLA-DQ2/DQ8 heterozigot olduğunu gösteren çalışmanın bulgularıyla örtüşmektedir. Daha önce ÇH'li 74 bireyi içeren bir çalışmada HLA-DQ2 homozigotluğu görülme oranı %79,7, HLA-DQ8 homozigotluğu ise %8,1 olarak bulunmuştur. HLA-DQ2/DQ8 heterozigotluğu prevalansı %10,8 olarak tespit edilmiştir (Cecilio and Bonatto 2015). Dolayısıyla HLA-DQ2 homozigotluğu çölyak hastalarında görülen en yaygın genotiptir (Lopes *et al.* 2019, Mansouri *et al.* 2021). HLA-DQ2 homozigotluğu ile ÇH gelişimi arasındaki yakın ilişkinin altında yatan spesifik moleküler mekanizma henüz belirlenmemiş olmasına rağmen, HLA-DQ2'nin gliadin antijenleri için güçlü antijenik tanıma bölgeleri ve geniş bir gluten aralığına bağlanmak için daha büyük bir kapasite sağladığı öne sürülmüştür. Bu genotipe sahip bireylerde antijen sunan hücrelerin (APC'ler) MHC sınıf II üzerindeki peptitler. Sonuç olarak, bu bireylerin glutenle ilişkili enteropati gelişimine karşı duyarlılığı daha yüksektir. Bu çalışmanın bulguları, çölyak hastalarının yaklaşık %90'ının (90) HLA-DQ2 heterodimerini sunduğunu belirten yayınlanmış dünya araştırmalarının çoğuyla uyumludur (Cecilio and Bonatto 2015, Basturk *et al.* 2017).

Ayrıca HLA DQ8, Orta Doğu ve Kuzey Amerika ülkelerinde ÇH ile daha az güçlü bir şekilde ilişkilidir (Karell *et al.* 2003). Ayrıca bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, Çakır *et al.* (2014)'un Türk çocuklarında ÇH tanısı için HLA-DQ genotipleme ve IgA anti-Ttg Ab'nin doğruluğunu araştırdıkları sonuçlarla örtüşmektedir. Çölyak hastalarının

%79,3 'ünün DQ2 genotipine sahip olduğu, bu çocukların %17,9'unun ise DQ8 genotipine sahip olduğu görülmüştür.

Ayrıca, bu çalışmanın sonuçları Hameed *et al.* (2016) tarafından elde edilen sonuçlarla da uyumludur. Kufe'deki Al-Suder-Medical şehrinde Iraklı hastalarda ÇH ile HLA-DQ2 ve HLA-DQ8 alelleri arasındaki ilişkiyi incelediklerinde, HLA tiplemesinin %77,5'inin DQ2 genotipine, %7,5'inin D82 genotipine, %10'unun DR4-DQ8 genotipine ve %5'inin DQ2/DQ8 genotipine sahip olmadığını gösterdiğini ve HLA DQ8'in ÇH ile daha az güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu gösteren diğer çalışmayla aynı fikirde olduklarını belirtmişlerdir. Araştırma, spesifik aleller ve ÇH arasındaki korelasyonun çeşitli ırklar arasında farklılık gösterdiğini tutarlı bir şekilde ortaya koymaktadır. Çölyak hastalığı olan bireylerin %95'inden fazlası, aile içinde kalıtılan DQ2 ve DQ8 izoformuna sahiptir. Söz konusu aleller, antijen sunan reseptörün diğer varyantlarına kıyasla gliadin peptitlerine daha güçlü bağlanma afinitesi sergileyen reseptörler oluşturma yetenekleri nedeniyle çölyak hastalığına karşı daha yüksek bir duyarlılık sağlamaktadır. Sonuç olarak, reseptördeki bu varyasyonların T hücrelerini uyarma ve otoimmün süreci tetikleme olasılığı daha yüksektir. DQA1*0501, DQB1*0201 ve DQA1*0301, DQB1*0302 heterodimerleri, semptomatik CD vakalarının genel insidansına kıyasla insan popülasyonunda daha yaygındır (Abdullah and Thawani 2012).

4.5 Pozitif HLA Haplotiplerinin (HLA DQ2, HLA DQ8& HLA DQ2&8) Çalışma Grupları Arasında Cinsiyete Göre Dağılımı

Hastaların genetik kompozisyonu, çölyak hastalığı ile ilişkili HLA-DQ2 veya HLA-DQ8 homozigotluğunun yanı sıra HLA-DQ2/DQ8 heterozigotluğunun varlığı açısından da incelenmiştir. Elde edilen sonuçlardan 38 hastanın HLA-DQ2 homozigot olduğu belirlenmiştir. Bunların arasında erkek nüfusun %39,5'ini oluşturan 15 erkek hasta ve kadın nüfusun %60,5'ini oluşturan 23 kadın hastalardır. HLA-DQ8 açısından homozigot olan toplam 10 hasta vardır. Bu hastalar arasında 3'ü erkek olup tüm erkeklerin %30,0'ını oluştururken 7'si kadın olup tüm kadınların %70,0'ını temsil etmektedir. Hastaların 7'sinin HLA-DQ2/DQ8 heterozigot olduğu belirlenmiştir. Bunlardan iki erkek hasta erkek

nüfusun %28,6'sını, beş kadın hasta ise kadın nüfusun %71,4'ünü oluşturmaktadır. Hastaların HLA haplotiplerinin dağılımı Çizelge 4.5'te gösterilmektedir.

Çizelge 4.5 Çalışma grupları arasında pozitif HLA haplotiplerinin (HLA DQ2, HLA DQ8& HLA DQ2&8) cinsiyete göre dağılımı

Pozitif		Çölyak hastalığı		Kontrol		P değeri
		Sayı	%	Sayı	%	
DQ2	Erkek	15	39,5	3	33,3	0,733
	Kadın	23	60,5	6	66,7	
DQ8	Erkek	3	30,0	2	66,7	0,252
	Kadın	7	70,0	1	33,3	
DQ2&DQ8	Erkek	2	28,6	1	50,0	0,571
	Kadın	5	71,4	1	50,0	
χ ² -testi kullanılarak 0,05 düzeyinde yüzdeler arası anlamlı fark						

Öte yandan, kadınlar ve erkekler arasındaki ilişkileri karşılaştırmak ve yüksek riskli haplotiplerin ebeveyn kökeninin potansiyel etkisini belirlemek amacıyla yapılan analizlerde, kadın hastaların erkek hastalara göre DQ2 veya DQ8 haplotipine ve ayrıca DQ2\8 dimerlerine sahip olma olasılığının daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. DQ durumu ve cinsiyet arasında gözlemlenen korelasyon, HLA lokuslarının hastalığın cinsiyet eğilimi üzerinde bir etkisi olduğunu göstermektedir (Megiorni *et al.* 2008). Bu sonuç İtalya'da Mazzarella *et al.* (2003) tarafından yapılan çalışmanın sonuçları ile uyumlu iken, Türkiye'de Basturk *et al.* (2017) ve Venezuela'da Fernández-Mestre *et al.* (2023) tarafından yapılan çalışmaların sonuçları ile uyumlu değildir. Otoimmün hastalıkların çoğunluğuyla ilgili olarak, hastalığın yoğunluğu her iki cinsiyet için de benzer olmasına rağmen, kadın hastalarda erkek hastalara kıyasla ÇH oluşumu daha yaygındır. Bu kanıtların altında yatan nedenler belirsizliğini korumaktadır, ancak cinsiyet farklılığına katkıda bulunan potansiyel faktörler hem genetik hem de genetik olmayan faktörleri içermektedir. Bunlar arasında çevresel ajanlara maruz kalma, endojen hormonlar, hamilelik ve menstrüasyon gibi biyolojik farklılıklar, cinsiyetler arasında bağışıklık tepkisindeki farklılıklar, X inaktivasyonu, X veya Y kromozomları üzerinde bulunan genler ve epigenetik modifikasyonlar sayılabilir (Ngo *et al.* 2014).

4.6 Hastalar ve Kontrol Grubu Arasında Çölyak Hastalığı ile İlişkili HLA Haplotiplerinin Tespiti

Frekans dağılımı, ÇH hastalarında ve kontrol grubundaki elli hastada HLA-haplotiplerinden hangisinin saptanmış olduğuna dair bir fikir vermek üzere oluşturulmuştur. DQA1*05, DQB1*02 ve DRB1*3 içeren DQ2 cis-lokusuna ilişkin istatistiksel analiz, kontrollerle karşılaştırıldığında oldukça anlamlı bir artış ortaya çıkmıştır ($P=0,0001$). Öte yandan DQA1*05, DQB1*0301, DRB1*11 ve DRB1*12 içeren Haplotip 1 DQ2 trans, kontrollerle karşılaştırıldığında ÇH hastalarında anlamlı derecede yüksek frekans ($P=0,001$) göstermiştir (Çizelge 4.6). Haplotip 2 DQ2 trans alelleri arasında (DQA1*02, DQB1*02 ve DRB1*07), sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında ÇH hastaları arasında sırasıyla p değerinin (0,026*, 0,0001* ve 0,054) anlamlı farklılık tespit edilmiştir. DQA1*03, DQB1*0302 ve DRB1*04 alellerini içeren HLA-haplotip DO8 alellere (DQA1*03 ve DRB1*04) ($P=0,005$ ve 0,001) göre anlamlı bir etki gösterirken, DQB1*0302 alellerinde sonuç anlamlı değildir ($P=0,193$).

Çizelge 4.6 Hastalar ve kontrol grubu arasında ÇH ile ilişkili HLA haplotiplerinin tespiti

Aleller		Çölyak hastalığı		Kontrol		P değeri
		Sayı	%	Sayı	%	
DQ2 cis						
DQA1*05	Pozitif	41	82,0	15	37,5	0,0001*
	Negatif	9	18,0	25	62,5	
DQB1*02	Pozitif	39	78,0	12	30,0	0,0001*
	Negatif	11	22,0	28	70,0	
DRB1* 3	Pozitif	35	70,0	8	20,0	0,0001*
	Negatif	15	30,0	32	80,0	
DQ2 cis	Pozitif	34	68,0	6	15,0	0,0001*
	Negatif	16	32,0	34	85,0	
HP 1						
DQA1*05	Pozitif	43	86,0	14	35,0	0,0001*
	Negatif	7	14,0	26	65,0	
DQB1*0301	Pozitif	23	46,0	10	25,0	0,040*
	Negatif	27	54,0	30	75,0	
DRB1*11	Pozitif	25	50,0	9	22,5	0,007*
	Negatif	25	50,0	31	77,5	
DRB1*12	Pozitif	9	18,0	-	-	0,005*
	Negatif	41	82,0	40	100,0	
HP 1	Pozitif	20	40,0	4	10,0	0,001*
	Negatif	30	60,0	36	90,0	
DQ2 trans						
DQA1*02	Pozitif	21	42,0	8	20,0	0,026*
	Negatif	29	58,0	32	80,0	

Çizelge 4.6 Hastalar ve kontrol grubu arasında ÇH ile ilişkili HLA haplotiplerinin tespiti (Devam)

Aleller		Çölyak hastalığı		Kontrol		P değeri
		Sayı	%	Sayı	%	
DQB1*02	Pozitif	31	62,0	10	25,0	0,0001*
	Negatif	19	38,0	30	75,0	
DRB1*07	Pozitif	13	26,0	4	10,0	0,054
	Negatif	37	74,0	36	90,0	
HP 2	Pozitif	13	26,0	4	10,0	0,054
	Negatif	37	74,0	36	90,0	
DQ8						
DQA1*03	Pozitif	27	54,0	10	25,0	0,005*
	Negatif	23	46,0	30	75,0	
DQB1*0302	Pozitif	10	20,0	4	10,0	0,193
	Negatif	40	80,0	36	90,0	
DRB1*04	Pozitif	25	50,0	6	15,0	0,001*
	Negatif	25	50,0	34	85,0	
χ ² -testi kullanılarak 0,05 düzeyinde yüzdeler arası anlamlı fark						

Bu çalışmanın sonuçlarına göre, CD'li hastalarda ve sağlıklı kişilerde DQ2 & DQ8 genleri için HLA tiplleme bilgilerinin ilk olarak DQ2'ye kodlanan alellere göre rapor edildiği, en sık görülen DQA1 alellerinin DQA1*05 (%82,0) olduğu, 41 ÇH hastasında sıklığı önemli ölçüde artıran en sık görülen genotip olduğu, bunu sağlıklı kişilerle (%37,5, %30 ve %20) karşılaştırıldığında sırasıyla DQB1*02 (%78,0) ve DQB1*03 (%70,0) olduğu tespit edilmiştir (Martínez-Ojinaga *et al.* 2018, Haphed *et al.* 2016). HLA DQ8 haplotipine ilişkin sonuçlar; çölyak hastalığı olan hastalarda alellerin oranı sırasıyla DQA1*03 ,DQB1*0302 ve DRB1*04 (%54, %20, %50) olduğunu; bu değerlerin diğer popülasyonlar için bildirilen verilerle benzer olduğunu ortaya koymuştur (Abdullah and Thawani 2012, Maruntelu *et al.* 2022).

Genel olarak aleller, sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ÇH hastalarında oldukça anlamlı bir artış göstermiştir. DQB1*0302 dışında istatistiksel olarak anlamlı artış gösteren genotiplerin daha az sıklıkta olduğu ve P (=0,193) değerinin anlamlı olmadığı sonucu ortaya çıkmıştır. Bu konuyla ilgili mevcut çalışmayla hemen hemen örtüşen çalışmalar mevcuttur (Maruntelu *et al.* 2022). Bazı araştırmacılar bu öneriye katılmadıklarını bildirmiştir (Ramakrishna *et al.* 2021, Zamani *et al.* 2014). Enfeksiyonlar, bireysel beslenme alışkanlıkları, genetik yapı ve etnik köken gibi çeşitli faktörlerin bu farklılığa katkıda bulunabileceğini dikkate almak önemlidir. Ayrıca bu

çalışmanın kapsamı dışında kalan ve daha fazla değerlendirilmesi gereken başka hususlar da olabilir.

Bu bulgular bizi, klinik olarak bu duruma sahip olduğundan şüphelenilen bireylerin yanı sıra ÇH hastalarının birinci derece akrabaları gibi yüksek riskli gruplarda ÇH taraması yapmaya sevk etmektedir. Malignite, otoimmün hastalık ve ince bağırsak lenfoması riskinin yüksek olması nedeniyle sessiz ÇH'li hastalar önemli risklerle karşı karşıyadır (Catassi *et al.* 2022), bu nedenle ÇH'li hastaların erken tanısı zorunlu hale gelir. Ayrıca bulgularımız ÇH hastalarının %80-90'ının (DQA1*05/DQB1*02) alelleri tarafından kodlanan HLADQ2 ve HLADQ8 özellikle DQ2 genotipini taşıdığını göstermektedir. Bu nedenle, tüm kanıtlar göz önüne alındığında, bulgularımız çölyak hastalığına (ÇH) yatkınlığı olan bireylerin ve ÇH hastalarının birinci derece aile üyelerinin, durumun erken tespitini kolaylaştırmak amacıyla belirli genetik varyantlar için taramadan geçirilmesi gerektiğini göstermektedir. Araştırma sürekli olarak belirli aleller ile ÇH arasındaki korelasyonun farklı ırk grupları arasında farklılık göstermektedir. Çölyak hastalığı olan bireylerin %95'inden fazlası aileden geçen DQ2 ve DQ8 izoformuna sahiptir. Söz konusu aleller, antijen sunan reseptörün diğer varyantlarıyla karşılaştırıldığında gliadin peptidlerine daha güçlü bağlanma afinitesi sergileyen reseptörler yaratma yeteneklerinden dolayı çölyak hastalığına karşı yüksek bir duyarlılık sağlar. Bu nedenle, reseptörün bu formlarının T lenfositlerini aktive etme ve otoimmün süreci başlatma olasılığı daha yüksektir (Mazzarella 2003, Abdullah and Thawani 2012). HLA-DQ molekülleri, fizikokimyasal özellikleri ve tTG2 tarafından deamide edilen spesifik peptitlere bağlanma yetenekleri nedeniyle ÇH'de önemli bir role sahiptir. Bu bağlanma daha sonra hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık sistemlerinin aktivasyonuna yol açarak glutene karşı immünolojik bir tepkiye yol açar. Nötrofiller, eozinofiller, mastositler ve kompleman proteinleri, doğuştan gelen bağışıklık tepkisinde uyarılır ve bu, potansiyel olarak hastalığın gelişimine katkıda bulunabilir. Edinilmiş bağışıklık tepkisi sırasında, tTG2 tarafından değiştirilen glutenden türetilen peptitler, mezenterik lenf düğümlerindeki antijen sunan hücreler tarafından CD4 + T hücrelerine gösterilir. Bu, HLA-DQ2 ve/veya DQ8'in varlığında meydana gelir. Th1 tipi tepkinin sonucu, IFN ve sitokinlerin üretimini tetikler (Manavalan *et al.* 2010).

4.7 CD ve Kontrol Grubunda Anti-Gliadin IgG ve IgA Tespiti

Çölyak hastası grupları ile kontrol grubu arasında anti-gliadin IgG ve IgA serum düzeyleri karşılaştırıldığında, çölyak hasta grubunda anti-gliadin IgG ve IgA serum düzeylerinin kontrol grubuna göre oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Anti-gliadin IgG ve IgA konsantrasyonu çölyak hastalarında sağlıklı kontrol denekleriyle karşılaştırıldığında önemli ölçüde artmıştır (P değeri 0,0001*) (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7 CD ve kontrol grubunda anti-gliadin IgG ve IgA'nın tespiti

Grup	Ortalama ± SE	
	Anti-gliadin IgG	Anti-gliadin IgA
Hasta	42,80 ±8,96	34,95 ±6,23
Kontrol	5,43 ±1,09	5,51 ±1,05
T -testi	17.923 **	12.556**
P değeri	0,0001	0,0001
** (P≤0,01).		

İnce bağırsağın glutene maruz kalması anormal bağışıklık tepkilerine yol açabilir ve birçok farklı organı etkileyebilecek farklı otoantikorlar üretebilir. Bu, ince bağırsakta inflamatuvar bir reaksiyona neden olur ve belki de ince bağırsağı kaplayan villusun kısılmasına (villöz atrofi) neden olur, bu da besinlerin emilimini etkiler.

tTG Ab, anti-gliadin Ab ve EM Ab gibi serolojik testlerle belirlenebilir, ancak bağırsak hasarının doğrulanması ince bağırsak biyopsisine ve histolojik analize bağlıdır (Gujral *et al.* 2012). Sunulan çalışmanın diğer taraftan Anti-gliadin IgG ve IgA ölçümleri (Çizelge 4.7'de gösterildiği gibi), serumdaki anti-gliadin IgG ve IgA düzeylerinde önemli ve istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,0001$) bir artış olduğunu göstermektedir. Bu sonuç, kadınların çölyak hastalığıyla uyumlu anti-gliadin antikorları ve pozitif tTG IgG Ab testlerinin pozitif çıktığını gözlemleyen Cindy *et al.* (2009)'un elde ettiği sonuçlarla örtüşmektedir. Serumun anti-gliadin IgG ve gliadine karşı IgA immünoreaktivitesi açısından test edilmesi, tipik olarak gluten intoleransının tanımlanmasına yönelik karmaşık süreçte bir ilk adımdır. Bunun nedeni, çölyak hastalığı olan hastaların doğal gliadin dizilerine karşı antikorlara sahip olduğunun yaygın olarak bilinmesidir (Caja *et*

al. 2011, Ortiz *et al.* 2011). Bu, bağırsak epitelindeki deamine gliadin polipeptit zincirlerinin CD4 + T hücresi tarafından tanınmasının bir sonucu olarak ortaya çıkar (Lionetti *et al.* 2015, Elli *et al.* 2015). CD8+ T hücreleri daha sonra epitelyuma girer ve gliadin ve transglutaminaza spesifik NK reseptörlerini eksprese ederek intraepitelyal T hücrelerinin apoptoza aracılık ederek enterositleri öldürmesine neden olur (Sollid and Jabri 2005). tTG antikor testinin AGA testine göre daha üstün olduğunu kanıtlarken, bazı araştırmacılar AGA'nın daha yaygın olarak kullanıldığını bildirmiştir. Genellikle Anti-Gliadin antikor testinin, anti- tTG antikorlarına göre daha az spesifik ve daha duyarlı olduğu kabul edilir (Al-Thwani and Al-Segar 2017). Antigliadin IgG'nin 2 ila 10 yaş arasındaki yüksek seviyeleri genellikle emzirme eksikliği ve gluten açısından zengin gıdaların erken tanıtılmasıyla ilişkilidir. Bunun nedeni, gliadin peptidlerinin antijen sunan hücreler tarafından emilmesi, işlenmesi ve sunulmasıdır; bu, B hücrelerinin genişlemesini ve gliadine karşı antikorların üretimini tetikler. Anti-doku transglutaminaz antikorlarının klinik önemi belirsizliğini koruyor, ancak bazı vakalar çölyak hastalığının spesifik klinik semptomları veya ekstra bağırsak komplikasyonları ile ilişkili olabilir (Al-Saadi and Abid 2009).

4.8 CD ve Kontrol Grubunda Anti-Transglutaminaz IgG ve IgA Tespiti

Anti- tTG Ab düzeyi hasta grubu ve sağlıklı kontrol için serumda değerlendirilmiştir. Çizelge 4.8'deki sonuçlar hasta grubu ile sağlıklı kontrol serumu arasında oldukça anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir (p değeri=0,0001). Çölyak hastaları ve sağlıklı kontroller için anti- tTG IgG ve IgA medyan aralığı sırasıyla 27,96, 33,52 ve 2,88, 4,43 pg/mL dir.

Çizelge 4.8 CD ve kontrol grubunda anti-Transglutaminaz IgG ve IgA Tespiti

Grup	Ortalama±SE	
	Anti-Transglutaminaz IgG	Anti-Transglutaminaz IgA
Hasta	27,96 ±5,82	33,52 ±7,27
Kontrol	2,88 ±0,73	4,43 ±0,64
T testi	11,650**	14,488 **
P değeri	0,0001	0,0001
** (P≤0,01).		

Anti-tTG IgG ve IgA Abs'nin serum konsantrasyonları, çölyak hastalığı olan hastalarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında (sırasıyla 2,8 ve 4,4 U/mL $p \leq 0,0001$) anlamlı derecede yüksektir (sırasıyla 27,9, 33,5 U/mL) (Çizelge 4.8). Bu bulgularla tutarlı olarak daha önceki araştırmalar, kontrollerle karşılaştırıldığında ÇH hastaları arasında önemli ölçüde daha yüksek serum anti- Ttg Ab seviyeleri bildirmiştir. Irak'ta (Hasan 2017, Al-Hilali *et al.* 2015), İran'da (Anbardar *et al.* 2022) ve dünya çapındaki diğer çalışmalarda (Sahin and Mermer 2022) olduğu gibi olumlu sonuçlar vermiştir. Çölyak hastalığının toplu taranması için en uygun belirtecin anti- tTG olduğu gösterilmiştir. Ayrıca glutensiz diyetten ve düzenli izlemeden fayda görebilecek hastaların belirlenmesinde de faydalıdır. ÇH'yi tespit etmek için duodenal biyopsi en güvenilir yöntem olarak kabul edilirken, araştırmalar anti- tTG antikoru ve anti-gliadin antikorunun kombinasyonunun ÇH için oldukça hassas bir gösterge olduğunu göstermiştir (Hopper *et al.* 2008, Al-Assaf *et al.* 2021). Öte yandan, anti- tTG antikorları ÇH tanısı için yüksek öngörücü ve yaygın olarak doğrulanmış serolojik testler arasındadır. Ayrıca yetersiz beslenme, kilo kaybı ve IgA eksikliği yaşayan çölyak hastalığı olan bireyler, anti tTG -IgA için negatif sonuç sergileyebilir (Aldaghi *et al.* 2016). Bazı makalelerde kontrol grubunda pozitif değerlerin varlığı rapor edilmiştir (Lewis and Scott 2006).

tTG ve IgG- tTG antikor seviyelerinin, daha yüksek derecede mukozal villus atrofi ve daha şiddetli bir klinik tablo ile ilişkili olduğunu ve IgAtTG ve IgG- tTG testlerinin birleştirilmesi durumunda, küçük bağırsak villöz atrofisini yüksek doğrulukla tespit edebilir ve ÇH şüphesi olan hastalarda biyopsi ihtiyacını azaltabilir (Arif *et al.* 2009, Dahlbom *et al.* 2010). tTG, ÇH için tek değilse de baskın ve kabul edilen özelliği temsil eder. Gliadin, doku transglutaminaz için tercih edilen bir substrattır ve gliadin ile transglutaminazın etkileşimi, yeni antijenik komplekslerin oluşmasıyla sonuçlanabilir (Dieterich *et al.* 1997, Al-Thwani and Al-Segar 2017).

Doku transglutaminaz (tTG) otoimmünitesi, buğday gliadinine ve buğday, arpa ve çavdarın dahil olduğu *Triticeae* sınıfı otlar tarafından üretilen ilgili gluten proteinlerine yanıt olarak T hücreleri üretildiğinde ortaya çıkar. T hücreleri, HLA-DQ8 ve DQ2 ile sınırlı antijenlere tepki verme yeteneği ile karakterize edilir ve gliadin, Ag'lerden biridir. Gliadin, gliadin üzerindeki birçok enzim reaksiyon bölgesinden dolayı tTG için tercih

edilen bir diyet substratıdır. Bir hastalık sırasında tTG, bir bağlantı oluşturmak için gliadin ile etkileşime girer. Bu bağlantıyı oluştururken tTG, gliadin üzerindeki T hücresi epitoplarına bağlanır. tTG'yi tanıyan yüzey IgM'yi eksprese eden B hücreleri, tTG'yi gliadin peptidleriyle birlikte T hücrelerine sunma kapasitesine sahiptir. Bu etkileşim, B hücrelerinin IgA veya IgM antikoru üreten plazma hücrelerine olgunlaşmasını ve çoğalmasını tetikler (Fleckenstein *et al.* 2004).

4.9 Çölyak Hastalığı ve Kontrol Grubunda Anti- Endomysial IgG & IgA Tespiti

Çizelge 4.9, test edilen gruplar arasında farklılaştırılmış belirteçler olarak anti-endomizyal IgG ve IgA ile ilgili genel istatistiksel parametreleri göstermektedir. Hasta grupları ve sağlıklı kontroller arasında 0,0001 p değerine göre oldukça anlamlı farklılıklar vardır. Benzer şekilde, sağlıklı kontrollerdeki en düşük ortalama $\pm$ SD değeri $3,47 \pm 0,79$ ve $4,02 \pm 0,64$ 'tür; nihayetinde, hasta grupları anti-endomizyal IgG ve IgA'nın her biri için ortalama $26,17 \pm 4,38$ ve $31,40 \pm 6,69$ ile en yüksek değeri göstermiştir.

Çizelge 4.9 Çölyak hastalığı ve kontrol grubunda anti- endomysial IgG & IgA tespiti

Grup	Ortalama $\pm$ SE	
	Anti- endomysial IgG	Anti- endomysial IgA
Hasta	$26,17 \pm 4,38$	$31,40 \pm 6,69$
Kontrol	$3,47 \pm 0,79$	$4,02 \pm 0,64$
T testi	8,834 **	13,344 **
P değeri	0,0001	0,0001
** ($P \leq 0,01$).		

Çizelge 4.9'da görüldüğü gibi, çölyak hastalığı olan hastalarda yüksek bir ekspresyon varken, sağlıklı kontrollerde açıkça görülen en düşük anti-endomysial ekspresyonu vardır. Bu durum bazı çalışmalarla uyumludur (Carroccio *et al.* 2002). Osman *et al.* (2014) tarafından gerçekleştirilen bir başka araştırma, GFD sonrasında EMA ve tTG antikor düzeylerinin ($p=0.0001$), GFD sonrasında ÇH hastalarında EMA konsantrasyonunun önemli ölçüde azaldığını göstermiştir. Anti-EMA testi, tüm merkezlerde uygulanamayan zahmetli bir doğrulama adımıdır, EMA testi ayrıca uzman gözlemcilere ihtiyaç duyar ve pahalıdır. Ancak, çalışmalarımızda bu noktaların

üstesinden gelme olasılığını ortaya koyduğumuz için bu noktalar tanı için bir engel teşkil etmemektedir. Floresan immunoassay yerine ELISA tekniğini kullanarak endomiyal antikorları belirlenmiştir (Catassi *et al.* 2022). Normalin üst sınırının (ULN) 10 katından daha yüksek TGA seviyeleri ile pozitif EmA antikorları arasında güçlü bir korelasyon vardır. EmA, TGA testlerinin performansındaki değişkenliği düzenlemek için kullanılabilecek standart serolojik test olarak hizmet vermesi nedeniyle önemlidir (Ylönen *et al.* 2020, Sghiri *et al.* 2023).

Bu çalışmanın sonuçları, seroloji testlerinin ÇH'li hastaların taranması ve izlenmesi için iyi bir tanı yöntemi olduğunu göstermektedir. Bu testlerin doğruluğu alıcı işletim karakteristiği (ROC) eğrisi kullanılarak değerlendirilmiş ve uygun bir kesme değeri belirlenmiştir. Bu sonuçlar Irak'ta yapılan önceki çalışmalarla tutarlıdır (Alaa 2021, Majeed 2021). Anti-tTG, anti-EMA ve anti-GA testleri temel tanı testleri olarak kabul edilir ve genellikle ÇH için ilk tarama görevi görür (Brusca 2015). Araştırmalar, anti-tTG ve anti-GA testlerinin kombinasyonunun, ÇH'den şüphelenilen bireylerin teşhisinde etkili bir gösterge olduğunu ortaya koymuştur (Al-Kazraji 2009). Bu araştırmanın sonuçları, diğer çalışmalarla birlikte, çölyak hastaları için tarama anketleri yürütürken çift tanısal seroloji testlerini önermektedir (Aldaghi *et al.* 2016).

ÇH tanısı için basit serolojik testlerin uygulanmasının ardından, Orta Doğu, Kuzey Afrika ve Hindistan ülkelerinde düşük riskli popülasyonlarda ÇH prevalansının Batı ülkelerine benzer olduğu, ancak yüksek riskli popülasyonlarda %3 ile 20 arasında değişen oranlarda daha yüksek olduğu görülmüştür (Hariz *et al.* 2007, Ageep 2012). Bu nedenle, gelişmekte olan ülkelerde çölyak hastalarının erken teşhisi için hem genel popülasyonda serolojik taramanın hem de risk altındaki gruplarda serolojik testlerin yapılması gerektiği öne sürülmüştür (Akbari *et al.* 2006, Cataldo and Montalto 2007).

4.10 Hasta ve Sağlıklı Grupta Serum IL-15, TNF- α ve IL-21'in Saptanması

Hasta grubunda ve sağlıklı deneklerde serum IL-15, TNF- α ve IL-21 konsantrasyonu Çizelge 4.10'da gösterilmiştir (15,07, 10,40 ve 22,44), sağlıklı kontrol denekleriyle

karşılaştırıldığında (6,66, 9,45 ve 15,75) sonuç istatistiksel olarak anlamlıdır (P değeri=0,001, 0,018 ve 0,0001).

Çizelge 4.10 Hasta ve sağlıklı grupta serum IL-15, TNF- α ve IL-21 tespiti

	Çölyak hastalığı	Kontrol	P değeri
IL-15 (pg/mL)	15,076 $\pm$ 15,076 (1,90-78,30)	6,666 $\pm$ 6,227 (1,12-32,00)	0,001#
TNF- α (pg/mL)	10,406 $\pm$ 2,106 (6,7-14,9)	9,451 $\pm$ 1,528 (7,42-12,90)	0.018#
IL-21 (pg/mL)	22,445 $\pm$ 6,547 (14,0-39,0)	15,759 $\pm$ 4,635 (11,78-31,30)	0.0001#
#0.05 düzeyinde Students-t-testi kullanılarak iki bağımsız ortalama arasındaki anlamlı fark.			

IL-15: Bulgularımız, ÇH'li hastalarda Th-1'in ve öncelikle APC'den türetilen sitokinlerin yüksek seviyelerinin bu hastalığın inflamatuvar yanıtını karakterize ettiğini, bazı serum sitokin yükselmelerinin ince bağırsak mukozasında gözlenenlere benzer olduğunu ve diğerlerinin farklı olduğunu göstermektedir. Çeşitli in vitro araştırmalar glutenin (gliadin) Th tip 1 çeşidinin proinflamatuvar sitokinlerinin sürdürülebilir üretimini indüklediğini göstermiştir (Manavalan *et al.* 2010). İnce bağırsak mukozasındaki glutene karşı Th1 immün tepkisi, lamina propriadaki lenfositlerin ve monositlerin infiltrasyonunun ana nedenidir. Rollerinde bazı örtüşmeler olsa da Th-1 ve Th-2 hücrelerinden üretilen sitokinlerin farklı aktiviteleri vardır. Th-1 yanıtı, hücre aracılı bağışıklığı ve proinflamatuvar yanıtları artırırken, Th-2 sitokinleri öncelikle humoral bağışıklık yanıtını etkiler ve inflamatuvar süreçlerin düzenlenmesine katkıda bulunur. Her iki yanıt da ÇH'de tespit edilmiştir (Abed *et al.* 2017). İBH, sistemik lupus eritematoz, tip 1 diyabet ve romatoid artrit gibi otoimmün bozuklukları olan hastaların serumunda IL-15 seviyesinin arttığı rapor edilmiştir (Di Sabatino *et al.* 2006, Losy *et al.* 2002). Dikkat çekici bir şekilde, IL-15'in ekspresyonu aktif, potansiyel ve glütensiz diyet uygulanan hastalar gibi farklı ÇH türleri arasında farklılık göstermektedir. Önceki bir çalışma, aktif CD'li hastaların ince bağırsak mukozasında IL-15 seviyelerinin arttığını doğrulamıştır (Di Sabatino *et al.* 2016). Öte yandan, bir GFD'de ÇH hastalarının epitelyumunda IL-15 ekspresyonunun düzensizliğinin villöz atrofiyi indüklemek için yetersiz olduğu öne sürülmüştür (Kuczyński *et al.* 2005). Di Sabatino *et al.* (2016) ile çalışmamızdaki çalışılan gruplar karşılaştırıldığında ÇH'li hastalarda IL-15 seviyesinin önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir. Ayrıca Abed *et al.* (2017), kontrol grubuyla karşılaştırıldığında

tedavi edilmemiş ÇH'li hastalarda IL-15 seviyesinin önemli ölçüde arttığını doğrulamıştır.

Estonya'da Vorobjova *et al.* (2019), ÇH'li bireylerde kontrollerle karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha yüksek olduğunu ve bataklik tarafından belirlenen ince bağırsak mukozal hasarının ciddiyeti ile anlamlı bir korelasyon gösterdiğini belirtmiştir. Ayrıca, dolaşımdaki IL-15 konsantrasyonu ile eşzamanlı T1D'li ÇH hastalarının ince bağırsak astarındaki FOXP3+ Treg'lerin bolluğu arasında dikkate değer bir ilişki keşfedilmiştir. Bu durum, bu bireylerde düzgün çalışmayan Treg'lerin güçlü bir telafi edici tepkisine işaret etmektedir. Gliadin, lamina propriadaki mononükleer hücreler veya enterositler tarafından IL-15 üretimini uyarır (Jabri and Sollid 2009). Farklı çalışmalara göre aktif CD'de IL-15'in aşırı ekspresyonu, epitelyal hasarın oluşumunda rol oynayan inflamatuvar hücrelerin sayısını artırabilir (Aghamohamadi *et al.* 2020, Di Sabatino *et al.* 2006, Pagliari *et al.* 2013). Ayrıca (Borrelli *et al.* 2013, Abed *et al.* 2017), aktif ÇH hastalarında IL-15 sitokin seviyesinin arttığını göstermiştir. Ayrıca CD ve kontrol grupları arasında inflamatuvar sitokinlerin (IL-15) serum seviyelerinde anlamlı ilişki olduğunu kanıtlamıştır. İnce bağırsak mukozasının hem lamina propriasında hem de epitelinde yüksek miktarda IL-15 hücresi vardır. IL-15, Treg'ler tarafından düzenlenen yolları içeren anti-inflamatuvar yolun işleyişini kolaylaştırabilir (Pagliari *et al.* 2013, Castillo-Rodal *et al.* 2020). ÇH'nin farklı klinik evrelerinde IL-15 düzeylerinin değerlendirilmesi ileri araştırmalar için önemli bir konu olmaya devam etmektedir. Mevcut çalışma Heydari *et al.* (2018) ile aynı fikirde değildir. İran'da çalışma grupları arasında serum düzeylerinde anlamlı olmayan bir ilişki olduğu kanıtlanmıştır.

TNF-a: Salınan Th1 sitokinlerinin otoimmün bozukluklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Moudgil and Choubey 2011). TNFa, Th1 hücreleri tarafından salınan önemli bir sitokindir (Lionetti and Catassi 2011). Elde edilen veriler, TNFa'nın metaloproteinazların aktivitesini artırarak ÇH'de bağırsak dokusunun bozulmasını indüklediğini göstermektedir (Aziz *et al.* 2011, Nasiri *et al.* 2018). Çalışmamızın sonuçlarına göre TNFa, sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında etkili ÇH'de artışlar göstermiştir. In vitro, gliadin peptitlerinin, aktif ÇH'li hastalardaki periferik kan monositlerini, sağlıklı kontrollerden veya glütensiz diyet uygulayan hastalardan alınan monositlerle

karşılaştırıldığında çok daha yüksek TNF-a seviyeleri üretmek üzere uyardığı gösterilmiştir (Nasiri *et al.* 2018). Irak'ta Abed *et al.* (2017), İran'da Babania *et al.* (2021) ve Polonya'da Piatek-Guziewicz *et al.* (2017) ELISA yöntemi de dahil olmak üzere farklı tahmin yöntemleri kullanılarak dünya çapında yapılan diğer araştırmalar da benzer sonuçlara sahiptir.

Manavalan *et al.* (2010), TNFa gibi APC'den türetilen sitokinlerin, glütensiz diyet alan hastalarla karşılaştırıldığında aktif ÇH hastalarında tutarlı artışlar gösterdiğini belirlemiştir. TNF α , makrofajlar tarafından türetilen bir sitokindir ve aşağıdakileri üreterek ÇH patogeneğinde rol oynar:

- Epitel hücreleri ve makrofajlar üzerinde HLA sınıf 2'nin ekspresyonunda artış (Sturgess *et al.* 1992).
- Yapışma molekülü ifadesi (Gamble *et al.* 1985).
- Kemotaksis (Ming *et al.* 1987).
- T hücresi proliferasyonu (Yokota *et al.* 1988).
- Bağırsak epitel dokusuna doğrudan toksisite (Pober 1988).
- Reaktif oksijen ara ürünlerinin üretimi.

ÇH'de mukozal hasar geliştiğinde, ince bağırsak mukozasında lokal olarak üretilen TNF- α 'nın patojenik öneme sahip olduğu kabul edilmektedir (Manavalan *et al.* 2010). Nasiri *et al.* (2018) sonuçlarına göre, İran'da bizim sonuçlarımızın aksine iki grup arasında serum TNFa düzeylerinde anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P=0,1$). Bildirilen serum TNFa seviyeleri Romaldini *et al.* (2002) ile tutarlı olup; bu da tedavi edilmemiş ÇH hastaları, tedavi altındaki hastalar ve kontrol grubu arasında serum TNF-a konsantrasyonunda anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir. Björck *et al.* (2015) kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ÇH'li çocukların serum TNFa konsantrasyonunda anlamlı bir fark bulamamıştır. Kapoor *et al.* (2013)'un yaptığı araştırmada gruplar arasında TNF- α düzeyleri açısından anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Ayrıca bu sonuç çalışmamızda elde edilen sonuçlarla uyumluluk göstermemiştir.

IL-21: IL-21, çevresel ipuçlarına dayalı olarak geniş bir etki yelpazesi gösterir ve hem humoral hem de hücrel bağışıklık tepkilerini etkileyebilir. IL-21'in, yalnızca bağışıklık hücrelerini (CD4 ve CD8 T hücreleri, Treg, B hücreleri, doğal öldürücü hücreler ve dendritik hücreler) aynı zamanda epitelyal, sinovyal, stromal ve endotelyal hücreleri de içeren bağışıklık hücreleri gibi çeşitli hücre türlerini etkilediği görülmektedir (Sutherland *et al.* 2009). IL-21, insan CD4 + T hücrelerinin Th-17 hücrelerine farklılaşması için gerekli olan TGF- β 'nın üretiminde kritik bir rol oynar (Jabri *et al.* 2014). İnsan hücreleri üzerinde yapılan araştırmalar, IL-21'in, Th1'e bağlı transkripsiyon faktörlerini yukarı doğru düzenleyerek ve IFN- γ üretimini artırarak Th1 hücrelerinin farklılaşmasını artırabildiğini göstermiştir. IL-21, dendritik hücrelerin gelişimini ve işlevini engelleyebilir. IL-21, B proliferasyonunu, germinal merkez oluşumunu, plazma hücre farklılaşmasını, immünoglobulin sentezini ve izotip değişimini kontrol etmek için gereklidir (Konforte *et al.* 2009). Dolayısıyla bunun yokluğu, mukozal hasara doğru ilerlemenin yokluğunu açıklayabilir (Iervasi *et al.* 2020).

Mevcut çalışmanın sonuçlarına göre, sağlıklı gruba kıyasla ÇH hastalarının serumunda yüksek düzeyde IL-21 bulunmuştur ve bu, İran'da ÇH'li hastaların serumlarında kontrol gruplarına kıyasla önemli ölçüde daha yüksek IL-21 seviyeleri gösteren çalışma ile uyumludur (Ajdani *et al.* 2022). Dünya çapında yapılan diğer çalışmalarda (Van Leeuwen *et al.* 2013, Castillo-Rodal *et al.* 2020), immünohistokimya ve akış sitometrisi, doğuştan gelen bağışıklık aktivasyonunda, sitokin odaklı polarizasyonda ve Th1 ve Th17/Th22 yanıtlarının yanı sıra anti-inflamatuar/profibrojenik sitokinlerin sürdürülmesinde rol oynayan pro-inflamatuar sitokin ekspresyon eden monositleri ve monosit türevli dendritik hücreleri tespit etmek için kullanılmıştır. Ciszewski *et al.* (2020) tarafından ABD'de yapılan bir çalışmada, tedavi edilmemiş çölyak hastalarının duodenal dokularında kontrollere kıyasla daha yüksek seviyelerde IL15RA ve IL21 ekspresyonu keşfedilmiştir. IL15 ve IL21, bağırsak intraepitelyal sitotoksik T hücrelerini sinerjik olarak uyarmıştır. Özellikle, transkripsiyonel aktivitelerini, proliferasyonlarını ve sitolitik aktivitelerini arttırmışlardır.

Ayrıca bu durum, tedavi edilmemiş ÇH hastalarının kontrollere kıyasla serumlarında önemli ölçüde yüksek IL-21 konsantrasyonlarına sahip olduğunu, tedavi edilmiş ÇH

hastalarının ise düşük IL-21 seviyelerine sahip olduğunu keşfeden Iervasi *et al.* (2020) çalışmasıyla da uyumludur. Boylamsal araştırmalar, glutenin IL-21 üretimini uyaran bir otoantijen olarak hareket edebileceğini düşündürmektedir. Kanıtlar, glutensiz bir diyet uygulamanın bu sitokin seviyelerinde önemli bir düşüşe yol açtığını göstermektedir (Kurppa *et al.* 2010, Borrelli *et al.* 2016, Galatola *et al.* 2013). IL-21'in serum konsantrasyonu ile duodenal mukoza hasarının şiddeti arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur, bu da bu sitokinin sitotoksik T-hücre aktiviteleri üzerinde güçlü bir immünomodülatör etkisi olduğunu göstermektedir. ÇH gelişiminin başlangıcında, IL-21 eksikliğinin pozitif bir geri bildirim döngüsünün halihazırda kurulmuş olan Th1 hücrelerini güçlendirmesini ve sürdürmesini engelleyeceği teorize edilebilir (Galatola *et al.* 2013). Ayrıca, IL-21'in stromal hücreler tarafından hücre dışı matris parçalayıcı proteazların salgılanmasını arttırdığı ve epitel hücreleri tarafından üretilen bir kemoatraktan görevi gördüğü ve Treg hücrelerinin immünolojik baskılayıcı işlevlerine karşı koyduğu bilinmektedir (Zanzi *et al.* 2011, Mazzearella 2015). Bu durum, serum IL-21 düzeyleri ile mukozal hasar arasındaki ilişkiye dair ek bir kavrayış sağlayabilir. Duodenal mukoza hasarı zaman içinde kademeli olarak ilerleyerek hasarın şiddetinin artmasına neden olur (villöz atrofi olarak tanımlanan villusların tamamen yok olmasıyla sonuçlanır). Literatürü incelediğimizde, Faghih *et al.* (2018)'in İran'da çölyak hastalarının ince bağırsaklarında IL-21 serum seviyelerini (qPCR) tekniklerini kullanarak ölçmeye çalıştıklarını ve IL21 gen ekspresyonunun üç grupta ölçüldüğünü gözlemlenmiştir. Tedavi edilen ve edilmeyen gruplar, kontrol grubuna kıyasla daha fazla IL21 gen ekspresyonu ortaya koymuştur, ancak bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı değildir (her iki karşılaştırma için $p=0,3$). Ek olarak, IL21 ekspresyonu tedavi edilen grupla karşılaştırıldığında tedavi edilmeyen grupta önemli ölçüde yükselmemiştir ($p=0,7$). Araştırmamız ile önceki araştırmalar arasındaki bulgu farklılığı, yüksek riskli bireylerin seçimi, semptomlardaki farklılıklar ve çalışmaya dahil edilen hasta sayısı gibi çalışma popülasyonundaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir. Bu farklılığın çocukluk çağını etkileyen çevresel değişkenlerden mi yoksa çölyak hastalığının yetişkinlikte gecikmeli olarak başlamasından mı kaynaklandığı ileriye dönük uzunlamasına araştırmalarla henüz kanıtlanmamıştır. Bununla birlikte, çalışmalar arasında ÇH prevalansındaki farklılıklar, potansiyel olarak katılımcıların yaş ve cinsiyet dağılımındaki yanlılıktan kaynaklanabilir.

Bu çalışmada, ilk kez, ÇH ve sağlıklı kontrol için sitokinlerin olası tanısal performansı değerlendirilmiştir. Bulgularımız, IL-21'in ÇH hastalarının tespiti için sırasıyla en yüksek duyarlılıklara, özgüllüklere, pozitif ve negatif prediktif değerlere ve ACU'ya (84,4) sahip olduğunu ve bunu sırasıyla IL-15 ve TNF- α 'nın izlediğini ve ACU değerlerinin (71,1 ve 58,9) sırasıyla orta ve zayıf olduğunu göstermiştir.

4.11 Serum Belirteçleri (anti gliadin IgG, IgA) ile Diğer Laboratuvar Bulguları (IL-15, TNF- α ve IL-21) Arasındaki Korelasyon

Veriler, anti-gliadin IgG, IgA ve IL-15'in serum seviyeleri arasında sırasıyla orta derecede güçlü bir korelasyon ($r=0,67$ ve $r=0,51$) olduğunu ve anlamlı bir değere ($**P \leq 0,01$) sahip olduğunu göstermektedir. Anti-gliadin IgG, IgA ve TNF- α arasında (sırasıyla $r=0,81$ ve $r=0,75$) anlamlı bir farkla ($**P \leq 0,01$) pozitif korelasyon vardır. Ayrıca anti-gliadin IgG, IgA ve IL-21 arasında (sırasıyla $r=0,66$ ve $0,57$) orta derecede güçlü bir korelasyon ve anlamlılık ($**P \leq 0,01$) belirlenmiştir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11 Serum belirteçleri (anti gliadin IgG, IgA) ile diğer laboratuvar bulguları (IL-15, TNF- α ve IL-21) arasındaki korelasyon

İnterlökinler	Korelasyon katsayısı-r	
	Anti-gliadin IgG	Anti-gliadin IgA
IL-15	0,67**	0,51**
TNF-a	0,81**	0,75**
IL-21	0,66**	0,57 **
*Korelasyon 0,05 düzeyinde anlamlıdır. **Korelasyon 0,01 düzeyinde oldukça anlamlıdır.		

4.12 Çölyak Hastalıkları Grubunda Anti-Transglutaminaz IgG, IgA ve İnterlökinler (IL-15, TNF- α ve IL-21) Arasındaki Korelasyon Katsayısı

tTG IgG ile IL-15, TNF-a ve IL-21'in her biri arasında (sırasıyla $r=0,71$, $0,84$ ve $r=0,71$) yüksek anlamlılıkla ($**P \leq 0,01$) pozitif bir korelasyon gözlemlenmiştir. Veriler, anti-Ttg-IgA ile IL-15 ($r=0,75$), TNF-a ($r=0,83$) ve IL-21 ($r=0,73$)'in her biri arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermektedir ($**P \leq 0,01$) (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12 Çölyak hastalıkları grubunda anti-Transglutaminaz IgG, IgA ve interlökinler (IL-15, TNF- α ve IL-21) arasındaki korelasyon katsayısı

İnterlökinler	Korelasyon katsayısı-r	
	Anti-Transglutaminaz IgG	Anti-Transglutaminaz IgA
IL-15	0,73**	0,75**
TNF-a	0,85**	0,83**
IL-21	0,71**	0,78**
*Korelasyon 0,05 düzeyinde anlamlıdır. **Korelasyon 0,01 düzeyinde oldukça anlamlıdır.		

4.13 Çölyak Hastalıkları Grubunda Anti-Endomizyal IgG, IgA ve İnterlökinler (IL-15, TNF- α ve IL-21) Arasındaki Korelasyon Katsayısı

Anti- endomisiyal IgG ile TNF- α arasındaki ilişki göz önüne alındığında, IL-21 verileri anlamlı düzeyde ** ($P \leq 0,01$) ile pozitif bir korelasyon ($r=0,83$ ve $r=0,79$) görülmüştür. Antiendomisiyal IgA ile TNF-a ve IL-21'in her biri arasında (sırasıyla $r=0,82$ ve $0,74$) anlamlı ** ($P \leq 0,01$) pozitif bir ilişki gözlemlenmiştir. Anti- endomysial IgG ve IgA ile IL-15 ($r=0,61$ ve $r=0,60$) arasında anlamlı ($P=0,01$) orta düzeyde kuvvette bir korelasyon belirlenmiştir (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13 Çölyak hastalıkları grubunda anti-endomizyal IgG, IgA ve interlökinler (IL-15, TNF- α ve IL-21) arasındaki korelasyon katsayısı

İnterlökinler	Korelasyon katsayısı-r	
	Anti- endomysial IgG	Anti- endomysial IgA
IL-15	0,61 **	0,68**
TNF-a	0,83**	0,87**
IL-21	0,79**	0,74**
*Korelasyon 0,05 düzeyinde anlamlıdır. **Korelasyon 0,01 düzeyinde oldukça anlamlıdır.		

Bu çalışma, proinflamatuvar sitokinlerin her birinin, örneğin IL-15'in, serolojik testlerle güçlü bir korelasyon kurmayı başardığı gerçeğine dikkat çekmiştir; bu sonuçlar yapılan çalışmalar ile uyumludur (Castillo-Rodal *et al.* 2020). Korelasyon analizi çölyak antikollarının bu proinflamatuvar sitokinlerle ilişkili olduğunu belirtmektedir (Hmida *et al.* 2012, Masaebi *et al.* 2020). Serolojik testlerle serum sitokin düzeylerine ilişkin olarak, Ciszewski *et al.* (2020)'nin bulgularıyla ve Bondar *et al.* (2014)'in tespitleriyle örtüşen

IL-21 ile kayda değer bir pozitif ilişkinin olduğu sonucuna varılmıştır. Ek olarak Iervasi *et al.* (2020), çölyak hastalığı olan hastalarda serum IL-21 düzeyleri ile tTG oto-antikorları arasında dikkate değer bir ilişki bulmuştur. Aktif ÇH'li hastalarda bazı sitokinlerin bazal seviyelerinin, glutensiz diyet ve sağlıklı kontrollere kıyasla yükseldiğini belirtmiştir. Daha önceki çalışmalar, çölyak hastalığı olan bireylerin kanındaki çeşitli sitokinlerin (IL-4, IL-10, IL-1 α , IL-1 β , IL-8 ve IL-21 dahil) yüksek seviyelerinin IgA anti-tTG2 seviyeleri ve bağırsak villusundaki hasar, bunların tanısal biyobelirteçler olarak potansiyellerini ortaya koymaktadır (Iervasi *et al.* 2020). Sonuçlarımız, TNF düzeyleri ile serolojik testler arasında oldukça pozitif bir ilişki olduğunu gösteren diğer araştırmalar tarafından sunulan sonuçlarla uyumludur (Babania *et al.* 2021, Cinova *et al.* 2007). Buna ek olarak, Jin *et al.* (2004) TNF ile serolojik belirteçler arasında önemli bir ilişki olduğunu göstermiştir (Cherñavsky *et al.* 2008). Çölyak hastalığı (ÇH), çeşitli klinik semptomlarla sonuçlanan, birden fazla bileşeni ve immünolojik yanıtları içeren karmaşık bir bağırsak hastalığıdır. Çoğunlukla buğday, çavdar ve arpada bulunan gluten tüketiminin duyarlı bireylerde çölyak hastalığının birincil dış nedeni olduğu iyi bilinmektedir (Nejad *et al.* 2009). Bugüne kadar ÇH tanısı, endoskopi ve ince bağırsak biyopsisinin patolojik değerlendirmeleri ile doğrulanan tTG antikorları ve EMA gibi serolojik testlere dayanmaktadır (Tursi *et al.* 2003, Rostami-Nejad *et al.* 2013). ÇH'de hem T yardımcı hücre tip 1'in (Th1) hem de T yardımcı hücre tip 2'nin (Th2) yükseldiği rapor edilmiştir (Hisamatsu *et al.* 2016). ÇH'nin, T hücrelerinin aracılık ettiği istenmeyen bir otoimmün yanıttan geldiği bilinmektedir. Bu işlem sırasında, değiştirilmiş gliadin türevi peptitler, tTG enzimlerinin etkisi nedeniyle CD4+ T yardımcı hücreleri üzerindeki insan lökosit antijeni (HLA) molekülleri DQ2 ve DQ8 ile etkileşime girer. Bu etkileşim, T hücrelerini ve B lenfositlerini aktive ederek lamina propriada gluten ve tTG'ye karşı antikorların üretilmesine yol açar ve sonuçta otoreaktif Th hücrelerinin aktivasyonunu tetikler (Mazzarella 2015). Otoreaktif Th hücrelerinin aktivasyonu, proinflamatuvar sitokinlerin salınmasına neden olur, bunlar daha sonra intraepitelyal lenfositleri aktive ederek ince bağırsak mukozasında histolojik değişikliklere yol açar. ÇH'nin patogenezinde yer alan sitokinler (Hüe *et al.* 2004), bağışıklık aracılı yanıtların hem bastırılmasında hem de geliştirilmesinde yer alan T hücrelerini ve diğer bağışıklıkla ilgili faktörleri etkiler (Mashayekhi *et al.* 2015). Önceki çalışmalar aynı zamanda ince bağırsak mukozasında T hücresi aktivasyonunun rolünü de ortaya koymuş, ÇH'nin aktif formunda interferon-

gamma (IFN- γ) üreten Th1 hücrelerini teşvik etmiştir. Ayrıca interlökin 15, doğuştan gelen hücrelerin aktivitesini indükler ve bu doğuştan gelen hücrelerin intraepitelyal infiltrasyonu, IFN- γ dahil çok çeşitli sitokinlerin yüksek miktarlarda salgılanmasına yol açar (Meresse *et al.* 2004).

Tümör nekroz faktörü (TNF-a) ve interlökin (IL-1 β) gibi sitokinlerin, bazı metaloproteinazların ekspresyonunu artırarak hücre dışı matris bileşenlerinin parçalanmasına yol açarak mukozal hasara neden olmada rol oynadığı gösterilmiştir (Mauviel 1993, Graham *et al.* 1995). Gliadinin, aktif çölyak hastalığı olan kişilerden in vitro periferik kan monositleri tarafından TNF-a ve IL-8 üretimini uyardığı gözlemlenmiştir (Daum *et al.* 1999). Sitokinler, T hücrelerini ve diğer immünolojik efektörleri etkileyerek immün yanıtların hem inhibe edilmesinde hem de arttırılmasında rol oynar. IL-2, IL-12, INF- γ ve TNF-a, Th-1 hücrelerini aktive eder (Cinova *et al.* 2007). IL-21, hem doğuştan hem de edinilmiş bağışıklık tepkilerinin düzenlenmesinde önemlidir ve ÇH'de mukozal hasarın gelişiminde önemli bir rol oynar (Borrelli *et al.* 2016).

4.14 Çölyak Hastalığı Grubunda HLA DQ2'nin Serum Belirteçleri (Gliadin, Ttg ve Endomysial) ile İlişkisi

Çizelge 4.14, HLADQ2'nin anti-gliadin IgG ($58,72 \pm 6,26$) pozitif ortalama $\pm$ SE ile anti-gliadin IgG'nin ($20,56 \pm 5,76$) negatif ortalama $\pm$ SE ilişkisini göstermektedir. Ancak sonuç 0,039 gibi anlamlı bir P değerine sahiptir. Anti-gliadin IgA ile HLADQ2 arasında anlamlı bir ilişki görülmezken, p değeri 0,096'ya güvenilmektedir. Hastaların HLA-DQ haplotipi, ilgili IgG ve IgA anti- tTG sınıflarıyla karşılaştırıldı ve pozitif (ortalama $\pm$ SE). Hastaların Ttg IgG ve IgA sınıflarının her biri için sırasıyla $34,24 \pm 7,34$ ve $41,13 \pm 9,20$, HLA-DQ2 homozigotları pozitif iken, IgG ve IgA sınıflarının negatif ortalaması $8,06 \pm 2,67$ ve $41,13 \pm 9,20$ 'dir. anti-tTG'nin anlamlı sonuçları sırasıyla ($p=0,05 \pm 0,044$)'e eşittir.

Sonuçlar HLA DQ2'nin anti-endomizyal IgG ve IgA ile ilişkisini göstermektedir; Çizelge 4.14 sırasıyla 0.050 ve 0.048 p-değerlerine göre parametreler arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.14 Çölyak hastalığı grubunda HLA DQ2'nin serum belirteçleri (gliadin, Ttg ve endomysial) ile ilişkisi

DQ2	Ortalama±SE					
	AGA-IgG	AGA-IgA	Ttg IgG	Ttg IgA	EM-IgG	EM-IgA
Negatif	20,56±5,76	16,53±4,41	8,06±2,67	9,40±2,93	12,63 ±3,93	7,97 ±2,26
Pozitif	58,72±6,26	40,76±7,88	34,24±7,34	41,13±9,20	31,44 ±4,48	38,79 ±8,45
P değeri	0,039	0,097	0,050	0,042	0,050	0,048
*(P≤0,05), NS: Anlamlı değil						

4.15 Hasta Gruplarında HLA DQ2 ile IL-15, TNF- α ve IL-21 Arasındaki İlişki

Veri dağılımı, HLA-DQ2 değişkeni ile TNF-a ve IL-15'in pozitif ve negatif ortalama $\pm$ SE'si arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. IL-21 ile HLA-DQ2 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p= 0,191) (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15 Hasta gruplarında HLA DQ2 ile IL-15, TNF- α ve IL-21 arasındaki ilişki

DQ2	Ortalama±SE		
	IL-15 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	IL-21 (pg/mL)
Negatif	9,153±5,685	9,463±1,736	20,277±6,370
Pozitif	16,947±12,626	10,704±2,145	23,130±6,534
P değeri	0,045	0,047	0,191
#0,05 düzeyinde Students-t-testi kullanılarak iki bağımsız ortalama arasındaki anlamlı fark, NS: Önemsiz			

4.16 Çölyak Hastalığı Grubunda HLA DQ8'in Serum Belirteçleri (Gliadin, tTG ve Endomizyal) ile İlişkisi

HLA DQ8'in çölyak tarama testleri ile ilişkisinde Çizelge 4.16'da, p değerine göre parametreler arasında anlamlı bir ilişkinin olmadığını gösterilmektedir.

Çizelge 4.16 Çölyak hastalığı grubunda HLA DQ8'in serum belirteçleri (gliadin, tTG ve endomizyal) ile ilişkisi

DQ8	Ortalama±SE					
	AGA IgG	AGA IgA	tTG IgG	tTG IgA	EMA IgG	EMA IgA
Negatif	51,53±10,21	36,64±7,34	28,83±6,80	34,14±8,03	26,77±5,03	34,52±8,15
Pozitif	37,90±19,07	28,18±10,89	24,46±10,94	31,01±17,84	23,75±9,11	18,93±6,68
P değeri	0,548	0,592	0,767	0,865	0,786	0,356
#0,05 düzeyinde Students-t-testi kullanılarak iki bağımsız ortalama arasındaki anlamlı fark, NS: Önemsiz						

4.17 Çölyak Hastalıkları Grubunda HLA DQ8'in İnterlökinler (IL-15, TNF- α ve IL-21) ile İlişkisi

Çizelge 4.17'de hasta grubunda HLA DQ8 ile interlökinler (IL-15, TNF- α ve IL-21) arasındaki ilişki gösterilmektedir, bunlar da istatistiksel olarak anlamlı değildir (sırasıyla $p=0,503$, $0,292$ ve $0,466$)

Çizelge 4.17 Çölyak hastalıkları grubunda HLA DQ8'in interlökinler (IL-15, TNF- α ve IL-21) ile ilişkisi

DQ8	Ortalama $\pm$ SE		
	IL-15 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	IL-21 (pg/mL)
Negatif	15,801 $\pm$ 16,227	10,248 $\pm$ 2,051	22,103 $\pm$ 6,263
Pozitif	12,179 $\pm$ 9,211	11,040 $\pm$ 2,317	23,812 $\pm$ 7,799
T testi	11,41 NS	3,29 NS	4,74 NS
#0.05 düzeyinde Students-t-testi kullanılarak iki bağımsız ortalama arasındaki anlamlı fark, NS: Önemsiz.			

4.18 Çölyak Hastalığı Grubunda HLA DQ2&8'in Serum Belirteçleri (Gliadin, tTG ve Endomysial) ile İlişkisi

Bu çalışma, hasta grubunda Gliadin, Ttg ve Em antikorunun pozitif ve negatif ortalama $\pm$ SE değerlerini ve HLA DQ2&8 ile ilişkisini ortaya koymuştur. Sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildir (Çizelge 4.18).

Çizelge 4.18 Çölyak hastalığı grubunda HLA DQ2&8'in serum belirteçleri (gliadin, tTG ve endomysial) ile ilişkisi

DQ2&8	Ortalama $\pm$ SE					
	AGA IgG	AGA IgA	Ttg IgG	Ttg IgA	EMA IgG	EMA IgA
Negatif	48,60 $\pm$ 9,63	35,72 $\pm$ 6,92	27,63 $\pm$ 6,38	32,21 $\pm$ 7,55	26,04 $\pm$ 4,74	32,85 $\pm$ 7,64
Pozitif	50,01 $\pm$ 26,33	30,18 $\pm$ 14,9	29,98 $\pm$ 14,98	41,57 $\pm$ 24,81	26,94 $\pm$ 12,23	22,45 $\pm$ 9,14
P değeri	0,957	0,761	0,890	0,659	0,944	0,594
Pearson Ki-kare testi (χ^2 -test) kullanılarak yüzdeler arasındaki fark 0,05 düzeyinde anlamlıdır, NS: Önemsiz						

4.19 Çölyak Hastalığı Grubunda HLA DQ2&8 ile İnterlökinler (IL-15, TNF- α ve IL-21) Arasındaki İlişki

Bu çalışmada, HLA 2 ve 8 pozitif olan çölyak hastalığı grubunda interlökinlerin (IL-15, TNF- α ve IL-21) pozitif ortalaması sırasıyla 12,48, 10,84 ve 23,71 iken negatif ortalaması 15,49, 10,33 ve 22,23'tür. Bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir (Çizelge 4.19).

Çizelge 4.19 Çölyak hastalığı grubunda HLA DQ2&8 ile interlökinler (IL-15, TNF- α ve IL-21) arasındaki ilişki

DQ2&8	Ortalama $\pm$ SE		
	IL-15 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	IL-21 (pg/mL)
Negatif	15,498 $\pm$ 15,818	10,335 $\pm$ 2,020	22,238 $\pm$ 6,464
Pozitif	12,486 $\pm$ 9,780	10,843 $\pm$ 2,721	23,714 $\pm$ 7,445
T testi	10,19 NS	3,79 NS	5,482 NS
Pearson Ki-kare testi (χ^2 -test) kullanılarak yüzdeler arasındaki fark 0,05 düzeyinde anlamlıdır, NS: Önemsiz			

İncelenen kan parametreleri, ÇH hastalarında araştırılan parametreye bağlı profillere sahip olan önemli pozitif ve negatif ilişkiler göstermiştir. HLADQ2, Ttg, EMA ve gliadin IgG antikorlarının her biriyle pozitif ilişki gösterirken, gliadin IgA HLADQ2 ile negatif ilişki göstermiştir.

Ayrıca, ÇH hastalarının HLADQ2'si ile IL-15 ve TNF- α arasında pozitif, IL-21 ile negatif bir ilişki bulunmuştur. Bizim bulgularımızda da HLADQ8, HLADQ2,8 ile serolojik testler ve immünolojik belirteçler (sitokinler) arasında bir ilişki gözlenmemiştir. Çölyak hastalığı, iyi tanımlanmış ana genetik bileşenler (insan lökosit antijeni HLA-DQ2 ve HLA-DQ8), otoantijen doku transglutaminaz ve çevresel tetikleyici gluten ile karakterize otoimmün bir durumdur (Caio *et al.* 2019). Histolojik olarak, bağırsak mukozasında hasar; serolojik olarak ise anti-tTG2 Ab, anti-EMA ve/veya DGP antikorlarının varlığı (Bajor *et al.* 2019) ÇH'deki ana genetik belirleyici HLA moleküllerini, özellikle de HLADQ2 ve/veya HLA-DQ8 heterodimerlerini içerir (Shannahan and Leffler 2017). HLA-DQ2 heterodimeri, HLA-DQA1*05 ve HLA-DQB1*02 alelleri tarafından belirlenen bir α alt birimi ve bir β alt biriminden oluşur. Bu da DQ2 heterodimerlerinin iki varyasyonu ile sonuçlanır: DQ2.5 (DQA1*0501/DQB1*0201) ve DQ2.2 (DQA1*0201/DQB1*0202). HLA-DQ8 heterodimeri, sırasıyla HLA-DQA1*0301 ve

HLA-DQB1*0302 alelleri tarafından belirlenen bir α zinciri ve bir β zincirinden oluşur (Kupfer and Jabri 2012). HLA-DQ moleküllerinin fizikokimyasal özellikleri ve tTG2 tarafından belirli deamidlenmiş peptidleri bağlama yetenekleri, çölyak hastalığına yol açan glutene karşı bir bağışıklık tepkisinin aktive edilmesinde çok önemlidir. Nötrofiller, eozinofiller, mastositler ve kompleman proteinleri doğuştan gelen immün yanıtta uyarılır ve muhtemelen hastalığın gelişiminde rol oynar. Adaptif immünolojik yanıt sırasında, tTG2 tarafından değiştirilen gluten türevi peptitler, mezenterik lenf düğümlerindeki antijen sunan hücreler tarafından HLA-DQ2 ve/veya DQ8 ile ilişkili olarak CD4 + T hücrelerine gösterilir. Th1 tipi yanıt, bağırsaklarda IFN- γ üretimi ve enflamasyon ile sonuçlanır. Kronik enflamasyon, IFN- γ üretiminde de rol oynayan γ T hücrelerinin çoğalmasına ve uzun süreli varlığına yol açar.

Plazma hücreleri lezyonda bol miktarda bulunur ve bazıları baskın gluten peptidini üreterek tTG2 ve diğer hedeflere bağlanan antikorların salgılanmasına yol açar (Fernández-Mestre *et al.* 2023). Daha önceki araştırmalar, serum interlökin seviyelerinin HLA ve ÇH hastalarının serolojik testleri ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu durum, anti-doku transglutaminaz ve/veya anti-endomizyal IgA antikorları ve HLA için serolojik olarak pozitif olan inflamatuvar sitokin seviyelerinde artış olduğunu bildiren Castillo-Rodal *et al.* (2020)'ın bulguları ile örtüşmektedir, Ayrıca Mention *et al.* (2003), interlökin 15 konsantrasyonunun yüksek olduğu ve aynı zamanda örneklerin HLA-DQA1*0501/DQB1*0201 genotipi için pozitif olduğu bulunmuştur (Yuksel *et al.* 2016, Goel *et al.* 2020, Sperandeo *et al.* 2011, Ajdani *et al.* 2022).

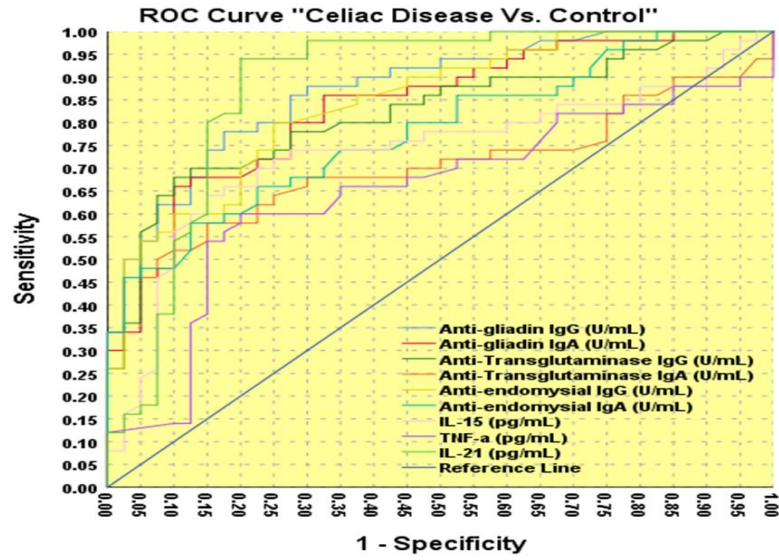
Her biri tutarsızlıklarda yer almıştır (Heydari *et al.* 2018, Björck *et al.* 2015, Faghieh *et al.* 2018), bu muhtemelen hastaların örneklem büyüklüğünden kaynaklanmaktadır. Farklı yazarlar tarafından açıklanan çelişkili sonuçlar, araştırılan grupların heterojenliğinden, klinik grup çeşitliliğinden, ELISA duyarlılık farkından, hastalığın aktivite endekslerindeki farklılıklardan ve yönetim yaklaşımlarının çeşitliliğinden kaynaklanıyor olabilir. Muhtemelen bunun ana nedeni, çalışmada HLADQ8 ve HLADQ2,8 için pozitif örnek sayısının az olmasıdır.

4.20 Çölyak Hastalarında her biri için IgG ve IgA Sınıflarının (Gliadin, Ttg, Endomizyal) ve İnterlökinlerin (IL-15, TNF- α ve IL-21) Eğri Altında Kalan Alanı Gösteren ROC Eğrisi Analizi

Alıcı işletim karakteristiği (ROC) eğrisinin analizi, araştırma parametrelerinin çölyak hastalığını öngörmekte herhangi bir ek avantaj sağlayıp sağlamadığını değerlendirmek için yapılmıştır. Antikorların (anti-gliadin, anti-tTG ve endomizyal antikorlar) ve interlökinlerin (IL-12, IL-15 ve TNF- α) her biri önemli bir eğri altı alana (AUC) sahiptir. İlk antikor için bu değer 0.879 iken, ikinci antikorda daha düşüktür (AUC=0,648) (Çizelge 4.20) (Şekil 4.1).

Çizelge 4.20 CD hastalarında her bir Ttg, gliadin, endomizyal ve interlökinler (IL-15, TNF- α , IL-21) için IgG ve IgA sınıflarının eğri altında kalan alanı gösteren ROC eğrisi analizi

Test Sonucu Değişkenleri	(EAA)	Std. Hata	P değeri	%95 Güven Aralığı	
				Alt sınır	Üst Sınır
Anti-gliadin IgG (U/mL)	0,872	0,036	0,0001*	0,802	0,943
Anti-gliadin IgA (U/mL)	0,835	0,042	0,0001*	0,753	0,917
Anti- tTG IgG (U/mL)	0,820	0,044	0,0001*	0,733	0,907
Anti- tTG IgA (U/mL)	0,705	0,056	0,001*	0,595	0,814
Anti- endomysial IgG (U/mL)	0,845	0,040	0,0001*	0,767	0,923
Anti- endomysial IgA (U/mL)	0,780	0,047	0,0001*	0,687	0,873
IL-15 (pg /mL)	0,734	0,055	0,001*	0,627	0,842
TNF- α (pg/mL)	0,648	0,060	0,016*	0,531	0,764
IL-21 (pg/mL)	0,879	0,041	0,0001*	0,798	0,960



Şekil 4.1 CD hastalarında her bir Ttg, gliadin, endomizyal ve interlökinler (IL-15, TNF- α ve IL-21) için IgG ve IgA sınıflarının eğri altında kalan alanı gösteren ROC eğrisi analizi

4.21 ROC ve Üretici için Optimal Kesim Değerlerine göre IL-15, TNF- α ve IL-21 Testlerinin Tanısal Performansı

Mevcut araştırma, Duyarlılık (Sen), Özgüllük (Spe), Pozitif Öngörücü Değer (PPV) ve Negatif Öngörücü Değer (NPV) dahil olmak üzere immünolojik testlerin çeşitli parametrelerinin hesaplanmasını içermektedir. Sonuçlar, Çizelge 4.21'de gösterildiği üzere, IL-21'in en yüksek değerlere sahip olduğunu, bunu IL-15'in izlediğini ve TNF- α 'nın tüm immünolojik karakterlerde diğer testlere kıyasla en düşük değerlere sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Çizelge 4.21 ROC ve IL-15, TNF- α ve IL-21 testlerinin tanısal performansı

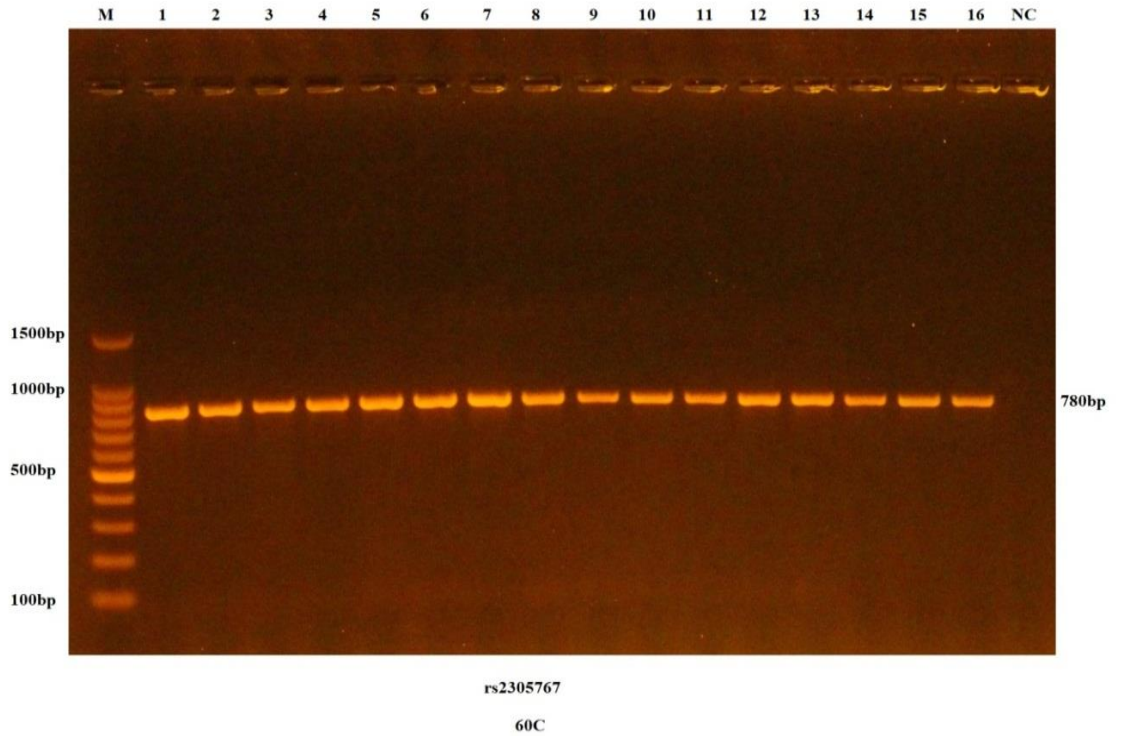
Test Sonucu Değişkenleri	Duyarlılık	Özgüllük	PPV	NBD	FN%	FP%	Doğruluk oran
IL-15 (pg/mL) ≥ 6	74,0	67,5	74,0	67,5	26,0	32,5	71,1
TNF- α (pg/mL) ≥ 9	72,0	42,5	61,0	54,8	25,0	57,5	58,9
IL-21 (pg/mL) ≥ 17	88,0	80,0	84,6	84,2	12,0	20,0	84,4

4.22 MYO9B Geninin Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP)

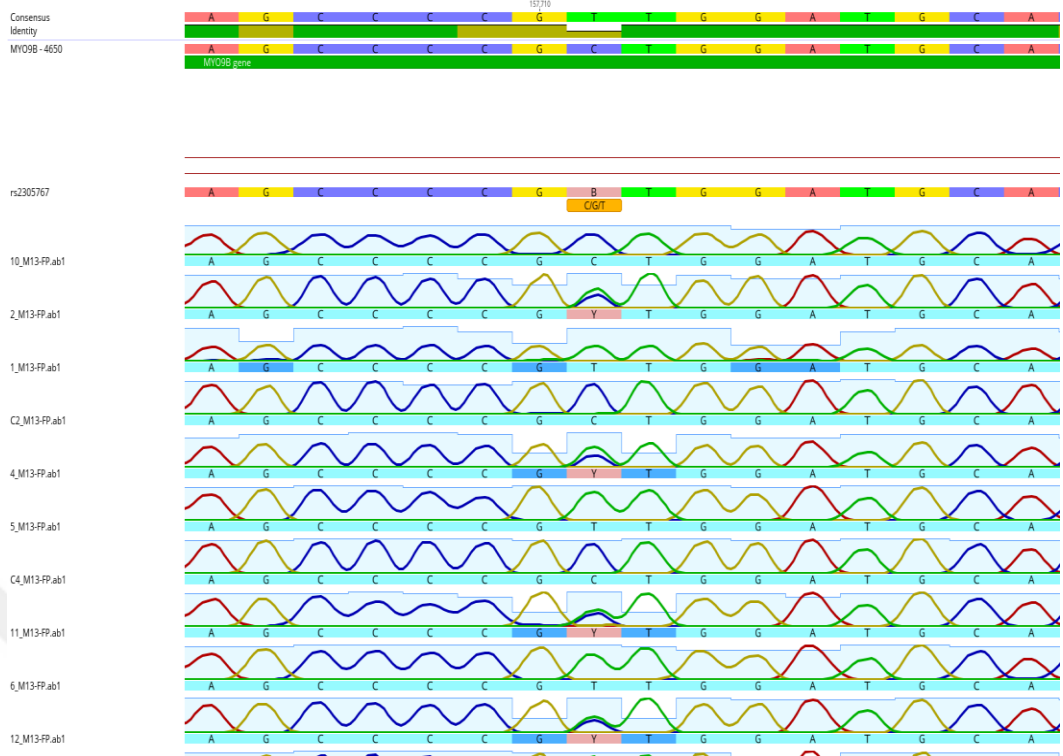
Bu çalışma aynı zamanda yakın zamanda kromozom 19 (intron 28), rs2305767 bölgesinde tanımlanan miyozin geninde yer alan SNP'yi araştırarak MYO9B geninin ÇH etiolojisiindeki rolünü de hedeflemiştir.

4.22.1 Çalışma gruplarında rs2305767 SNP tespiti

SNP rs2305767 (C/T); Kromozom 19 (780bp) üç genotip (Homozigot CC, Heterozigot CT ve Mutant Homozigot TT) ve iki alel (C ve T) ile sunulmuştur (Şekil 4.2) (Şekil 4.3). ÇH hastalarında SNP'nin üç genotipi (CC, CT ve TT) tanınırken, kontrollerde sadece CC genotipleri gözlenmiştir. HWE analizi, hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark olduğunu ortaya koymuştur (Çizelge 4.22).



Şekil 4.2 MYO9B'nin jel elektroforezi PCR ürünleri, 780 bp moleküler boyuttaki bantları



Şekil 4.3 MYO9B gen SNP'sinin (rs2305767 A/G) üç genotipi gösteren DNA dizisi kromatogramı

Çizelge 4.22 ÇH hastalarında ve kontrollerde MYO9B geni (rs2305767SNP) genotiplerinin sayıları ve yüzde frekansları ve bunların hardy-weinberg dengesi (HWE)

SNP rs2305767	Çölyak hastalığı		Kontrol		P	OR(95%CI)
	Sayı	%	Sayı	%		
TT	12	40.0	4	20,0	0,005*	9,0 (1,82-44,59)
BT	14	46.7	4	20,0	0,002*	10,5(2,15-51,28)
CC (Vahşi)	4	13.3	12	60,0	-	Ref.
χ^2 -testi kullanılarak 0,05 düzeyinde yüzdeler arası anlamlı fark						
-Odds oranı ve referans grubu (Wild) ile karşılaştırıldığında %95 güven aralığı						

Hastalar ve kontroller arasındaki karşılaştırma anlamlı farklılıklar göstermiştir. ÇH hastalarında homozigot TT genotipi ve heterozigot CT genotipi kontrollerden daha yüksek frekansa sahiptir (sırasıyla P=0,005, P=0,002). Öte yandan, CC genotipi kontrol grubunda (vahşi tip) en yaygın olanıdır.

Bu çalışmada, rs2305767 polimorfizmi ÇH ile ilişkilendirilmiştir. rs2305767 polimorfizminin CC genotipi koruyucu bir faktör (vahşi), TT ve CT genotipi ise risk faktörü olarak işlev görmüştür. Bu sonuç MYO9B'deki polimorfizmin ÇH ile ilişkili olduğu fikrini desteklemektedir.

RS2305767, MYO9B rs2305767 polimorfizminin ÇH ile ilişkili olduğunu kanıtlayan Liao *et al.* (2015) verileriyle ve ayrıca Madrid'deki Loeff *et al.* (2012) ile uyumludur, ancak Wolters *et al.* (2007) tarafından yapılan çalışmanın sonuçlarıyla farklıdır. Ayrıca 1965 ÇH hastası ve 4894 kontrolü içeren yedi çalışmanın meta-analizi, ÇH ile ilişkili olarak sık görülen dört MYO9B polimorfizminin önemine dair kapsamlı bir değerlendirme sunmuştur. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar:

rs1545620 polimorfizmi Avrupa kökenli bireylerde artmış ÇH riski ile bağlantılıdır.

Avrupalılar ve Latin Amerikalı bir grup da dahil olmak üzere tüm çalışma katılımcılarında ÇH riski ile rs1457092, rs2305767 ve rs2305764 polimorfizmleri arasında bir korelasyon yoktur.

Liao *et al.* (2015)'ya göre RS1457092 ve rs2305767 Latin Amerika popülasyonunda artmış ÇH riski ile ilişkilendirilmiştir. Tanımlanan benzerlikler ve farklılıklar, küresel popülasyondaki önemli jenerik heterojenliği vurgulamaktadır. ÇH, hem çevresel hem de kalıtsal faktörlerden etkilenen karmaşık bir hastalıktır. Çölyak hastalığına genetik yatkınlık, etnik kökenler arasında farklılık gösteren birçok çevresel faktörden etkilenebilir. Üçüncü olarak, farklılık çeşitli etnik gruplar arasındaki klinik varyasyonlardan kaynaklanıyor olabilir. Bu polimorfizmler ve ÇH arasındaki bağlantıyı aydınlatmak için daha fazla kanıt gerekmektedir. Hem MYO9B hem de HLA-DQ2 homozigotluğunun ÇH'nin prognozu ve ÇH geliştirme şansı ile ilgili olabileceğini göstermektedir (Loeff *et al.* 2012, Sánchez *et al.* 2007, Wolters *et al.* 2007). MYO9B, 19. kromozom üzerinde 28. intronda bulunan bir miyozin genidir. Kuyruk bölgesinde Rho ailesi GTPaz aktive edici protein (GAP) alanı bulunan tek başlı bir moleküler motoru kodlar. MYO9B, sınıf IX miyozin ailesine aittir (Post *et al.* 2002). Bağırsak epitel hücrelerinde bulunur ve bağırsak mukozasının önemli bir yapısal unsurudur. MYO9B,

Rho GTPazların deaktivasyonunu teşvik ederek ve seviyelerini azaltarak negatif bir düzenleyici olarak işlev görür. Rho bağımlı sinyal yolları (Wirth *et al.* 1996). Rho GTPazlar, her ikisi de epitelyal paraselüler geçirgenliğin artmasına yol açan aktin filament yeniden şekillenmesinin ve sıkı bağlantı montajının temel düzenleyicileridir (Matter and Balda 2003, Schlegel *et al.* 2011). Bu nedenle, MYO9B mutasyonlarının bağırsağın epitelyal bariyer işlevini değiştirerek gluten peptitlerinin daha derin mukozal tabakaya nüfuz etmesine ve bağışıklık sistemiyle etkileşime girmesine izin verebileceği varsayılmaktadır.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çölyak hastalığı, diğer birçok otoimmün hastalıkta olduğu gibi, çocuklarda diğer yaş gruplarına göre, kadınlarda ise erkeklere göre daha yaygındır. Çölyak hastalığı olan hastalarda genel popülasyona kıyasla hemoglobin düzeylerinde azalma ve beyaz kan hücreleri sayılarında artış görülmektedir. Ayrıca, trombosit sayımlarında bazı önemli farklılıklar görülmüştür, ancak bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu çalışmada anti-tTG, anti-gliadin ve anti-EMA kullanılmış ve hepsi de kontrol grubuna kıyasla ÇH'li hastalarda serum seviyelerinde anlamlı bir artış göstermiştir. Bu durum, ÇH'nin antikor profilinin, benzer semptomlara sahip diğer hastalıkların teşhisi ve bunlardan ayırt edilmesi için en etkili serolojik araç olmaya devam ettiğini göstermektedir. Bu araştırmada, ÇH'nin immünopatogeneze katkıda bulunan üç proinflatuar sitokin seçilmiştir: IL-15, IL-21 ve TNF- α . Bunların her biri, kontrol grubuna kıyasla ÇH'li bireylerde serum seviyelerinde önemli bir artış göstermiştir. Bu sitokinlerin serum düzeylerinin saptanması, ÇH ile ilişkili enflatuar sürecin izlenmesinde kullanılabilir.

Araştırma verileri, çalışmada kullanılan belirteçlerin (anti-tTG, anti-gliadin, anti-endomysial, IL-15, IL-21 ve TNF- α) aralarında pozitif korelasyon olduğunu göstermektedir. HLADQ2 genotipi Irak'taki çölyak hastaları arasında en yaygın HLA genotipidir ve bunu HLADQ8 takip etmektedir. Çölyak hastalığı ile ilişkilendirilen en sık aleller (DQA1*05, DQB1*02 ve DRB1*3) içeren DQ2 cis-lokusu ile ilgilidir. Öte yandan, (DQA1*05, DQB1*0301, DRB1*11 ve DRB1*12) içeren Haplotip 1 DQ2 trans önemli ölçüde artmış frekans göstermiştir. Ayrıca Haplotip 2 DQ2 trans alellerinin (DQA1*02, DQB1*02 ve DRB1*07) anlamlı farklılıklar gösterdiği gözlenmiştir. (DQA1*03, DQB1*0302 ve DRB1*04) alellerini içeren HLA-haplotip DO8, (DQA1*03 ve DRB1*04) alellerine göre anlamlı bir farklılık gösterirken, DQB1*0302 sonucu anlamlı değildir. Çölyak hastalığı olan hastalarda HLADQ2 ile tTG, endomizyal ve gliadin IgG arasında güçlü bir ilişki vardır. Çölyak hastalarında HLADQ2 ile IL-15 ve TNF- α arasında pozitif, IL-21 ile negatif korelasyon vardır. HLADQ8 & HLADQ2,8'in (serolojik testler ve immünolojik belirteçler) ile anlamlı bir ilişki göstermemesinin ardındaki nedenler, dolaşımdaki HLADQ'nun tespit edilebildiği hasta sayısının azlığına

bağlanabilir. Bulgularımız, MOBO9 geni rs2305767 alellerinin artmış ÇH gelişme riski ile ilişkili olduğuna dair ilk kanıtı sunmakta olup, bu durum ÇH'nin etiyojijisini ve patogenejisini etkileyebilir.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, çalışmamız iki kısıtlama içermektedir. İlk olarak, CD hastalarından alınan biyopsi örneklerinin analize dahil edilmesi sonuçların yorumlanmasını geliştirecektir. Çalışmanın ikinci kısıtlaması ise hasta ve kontrol örnekleminin küçük olmasıdır. Daha büyük bir örneklem büyüklüğü ile daha güvenilir sonuçlar elde edilebilir. Iraklı hastalar arasında ÇH hastalığının epidemiyolojisi hakkında ek raporlar ve istatistiksel çalışmalar yapılması, hastalık prevalansının artması nedeniyle çok önemlidir. Bu bulguları doğrulamak ve altta yatan süreci araştırmak gerekmektedir. Ayrıca, tanı konulmamış vakaları tespit etmek için farklı yaş gruplarında çölyak hastalığına yönelik ulusal bir tarama programı planlanması önerilmektedir. Çölyak hastalığı, tespit edilmemiş vakaların bilinenlerden daha fazla olduğu bir buzdağına benzetilmektedir ve özellikle çölyak hastalığı olan bireylerin birinci derece akrabaları arasında yaygınlığı artmaktadır. Çalışmada, ek SNP'ler içerdığı gösterilen mob9 genlerinin tek bir SNP'si araştırılmıştır. ÇH'li hastalarda bu ek SNP'lerin incelenmesi önerilmektedir. Kemokin reseptörleri CXCR3 ve transferrin reseptörü CD71'in bağırsak biyopsilerinde ekspresyonunun incelenmesi, çünkü bunlar bağırsakta submukozaya gliadin translokasyonu için spesifik reseptörlerdir. Bu nedenle, lokal interlökin etkilerini değerlendirmek için bağırsak mukozal hücrelerinde interlökin ekspresyonunun incelenmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abadie, V. and Jabri, B. 2014. IL-15: A central regulator of celiac disease immunopathology. *Immunological Reviews*, 260(1): 221-234.
- Abadie, V., Sollid, L. M., Barreiro, L. B. and Jabri, B. 2011. Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Annual Review of Immunology*, 29(1): 493-525.
- Abdullah, H. and Thawani, A. 2012. Association of celiac disease with HLA-DRB1 and HLADQB1 alleles in a sample of Iraqi patients. *Iraqi Journal of Biotechnology*, 11(2): 529-36.
- Abdullah, R. Y. and Hanoon, R. A. 2020. Celiac disease: Biochemical and histopathological considerations of local patients. *Medical Journal of Babylon*, 17(4): 332-336.
- Abed, R. M., Yaaqoob, L. A., Alwan, I. A., Samir, H. F. and Jasim, R. A. 2017. Evaluation of some serum cytokine and adipokines profile in Iraqi celiac patients before and after treatment. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 12(6): 36-41.
- Abenavoli, L., Dastoli, S., Bennardo, L., Boccuto, L., Passante, M., Silvestri, M. and Nisticò, S. P. 2019. The skin in celiac disease patients: the other side of the coin. *Medicina*, 55(9): 578.
- Aflatoonian, M., Moghimi, M., Akbarian-Bafghi, M. J., Morovati-Sharifabad, M., Jarahzadeh, M. H. and Neamatzadeh, H. 2019. Association of TNF- α -308G> A polymorphism with susceptibility to celiac disease: a systematic review and meta-analysis. *Arquivos de Gastroenterologia*, 56(1): 88-94.
- Agarwal, A., Chauhan, A., Ahuja, V. and Makharia, G. K. 2020. Opportunities and challenges in the management of celiac disease in Asia. *JGH Open*, 4(5): 795-799.
- Ageep, A. K. 2012. Celiac disease in the Red Sea state of Sudan. *Tropical Gastroenterology*, 33(2): 118-122.
- Aghamohamadi, E., Kokhaei, P., Rostami-Nejad, M., Pak, F., Rostami, K., Moradi, A. and Zali, M. R. 2020. Serum level and gene expression of interleukin-15 do not correlate with villous atrophy in celiac disease patients. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 24(8): 502-507.

- Agostoni, C., Decsi, T., Fewtrell, M., Goulet, O., Kolacek, S., Koletzko, B. and ESPGHAN Committee on Nutrition. 2008. Complementary feeding: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *Journal of pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 46(1): 99-110.
- Ahadi, Z., Shafiee, G., Razmandeh, R., Keshtkar, A. A., Sani, M. N., Azemati, B. and Heshmat, R. 2016. Prevalence of celiac disease among the Iranian population: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Turkish Journal of Gastroenterology*, 27(2): 122-128.
- Ajdani, M., Mortazavi, N., Besharat, S., Mohammadi, S., Amiriani, T., Sohrabi, A. and Edris, G. 2022. Serum and salivary tissue transglutaminase IGA (tTG-IGA) level in celiac patients. *BMC Gastroenterology*, 22(1): 1-7.
- Akbari, M. R., Mohammadkhani, A., Fakheri, H., Zahedi, M. J., Shahbazkhani, B., Nourai, M. and Malekzadeh, R. 2006. Screening of the adult population in Iran for coeliac disease: comparison of the tissue-transglutaminase antibody and anti-endomysial antibody tests. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 18(11): 1181-1186.
- Akobeng, A. K. and Thomas, A. G. 2008. Systematic review: tolerable amount of gluten for people with coeliac disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 27(11): 1044-1052.
- Al Hatlani, M. M. 2015. Prevalence of celiac disease among symptom-free children from the Eastern Province of Saudi Arabia. *Saudi journal of gastroenterology: official journal of the Saudi Gastroenterology Association*, 21(6): 367.
- Alaa, J. K. 2021. Evaluation of HLA-DQ2 and DQ8 haplotypes in patients with CD correlation with circulating anti-Ttg and anti-Gliadin antibodies. MSc. Thesis, University of Kerbala, 118 page, Kerbala.
- Al-Ajlan, A. S. 2016. Screening of coeliac disease in undetected adults and patients diagnosed with irritable bowel syndrome in Riyadh, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(4): 462-466.
- Al-Assaf, A. I., Ali, H. M. and Ad'hiah, A. H. 2021. Gene expression of NLRP3 inflammasome in celiac disease of Iraqi Children. *Ibn AL-Haitham Journal For Pure and Applied Sciences*, 20(1): 15-22.

- Aldaghi, M. A., Dehghani, S. M. and Haghighat, M. 2016. Evaluation of the correlation between tTG-IgA titer and duodenal biopsy findings in children with suspected celiac disease. *Iranian Journal of Pediatrics*, 26(1): 1-3.
- Alhabbal, A., Murad, H. and AbouKhamis, I. 2021. Celiac Disease: What about Hematological Manifestations?. *Govaresh*, 25(4): 272-283.
- Al-Hilali, H. A., Mohammad, B. I. and Khlebos, A. H. 2015. The relationship between the type 1 diabetes and celiac disease: A study based on anti tissue transglutaminase antibodies and anti-glidine antibodies Screening. *Al-Qadisiyah Medical Journal*, 11(20): 197-204.
- Al-Jarrah, I. H. H. 2019. Study of serum level of zonulin protein and interleukin-15 in CD patients. PhD. Thesis, University of Kerbala 184 page, Kerbala.
- Aljebreen, A. M., Almadi, M. A., Alhammad, A. and Al Faleh, F. Z. 2013. Seroprevalence of celiac disease among healthy adolescents in Saudi Arabia. *World Journal of Gastroenterology*, 19(15): 2374.
- Al-Kazraji, K. 2009. Celiac disease: presentation with clinical and serological response. *The Medical Journal of Tikrit University*, 2(2): 145.
- Alkemaw, S. N. Y. and Alsaltani, S. N. H. 2021. Serological tests assessment in patients suspected to have celiac disease attending the Gastroenterology and Hepatology Teaching Hospital in Baghdad. *Prof.(Dr) RK Sharma*, 21(1): 904.
- Al-Saadi, H. A. and Abid, A. H. 2009. Celiac disease in Karbala. *Journal of Kerbala University*, 7(2): 51-61.
- Al-Thwani, A. N. and Al-Segar, R. Q. 2017. Serological Study for Celiac Disease among Sample of Iraqi Patients. *Journal of Biotechnology Research Center*, 11(2): 25-29.
- Al-Toma, A., Goerres, M. S., Meijer, J. W., Peña, A. S., Crusius, J. B. A. and Mulder, C. J. 2006. Human leukocyte antigen–DQ2 homozygosity and the development of refractory celiac disease and enteropathy-associated T-cell lymphoma. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 4(3): 315-319.
- Al-Toma, A., Volta, U., Auricchio, R., Castillejo, G., Sanders, D. S., Cellier, C. and Lundin, K. E. 2019. European Society for the Study of Coeliac Disease (ESsCD) guideline for coeliac disease and other gluten-related disorders. *United European Gastroenterology Journal*, 7(5): 583-613.

- Anbardar, M. H., Haghighi, F. G., Honar, N. and Zahmatkeshan, M. 2022. Diagnostic value of immunoglobulin G anti-deamidated gliadin peptide antibody for diagnosis of pediatric celiac disease: A study from Shiraz, Iran. *Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition*, 25(4): 312.
- Anderson, R. P., Henry, M. J., Taylor, R., Duncan, E. L., Danoy, P., Costa, M. J. and Pasco, J. A. 2013. A novel serogenetic approach determines the community prevalence of celiac disease and informs improved diagnostic pathways. *BMC Medicine*, 11(1): 1-13.
- Ansaldi, N., Tavassoli, K., Faussone, D., Forni, M. and Oderda, G. 1988. Clinico-histological behavior of celiac patients after gluten load following the definitive diagnosis. *La Pediatria Medica e Chirurgica: Medical and Surgical Pediatrics*, 10(1): 3-6.
- Arif, H. S., Al-Hadithi, R. and Elah, S. A. 2009. Some Diagnostic Aspects of Celiac Disease in Iraqi children. *Iraqi Journal of Medical Sciences*, 32(2): 9-13.
- Aslebahar, F., Neamatzadeh, H., Meibodi, B., Karimi-Zarchi, M., Tabatabaei, R. S., Noori-Shadkam, M. and Dehghani-Mohammadabadi, R. 2019. Association of tumor necrosis factor- α (TNF- α)-308G> A and-238G> A polymorphisms with recurrent pregnancy loss risk: a meta-analysis. *International Journal of Fertility and Sterility*, 12(4): 284.
- Aziz, I., Evans, K. E., Papageorgiou, V. and Sanders, D. S. 2011. Are patients with coeliac disease seeking alternative therapies to a gluten-free diet. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, 20(1): 27-31.
- Babania, O., Mohammadi, S., Yaghoubi, E., Sohrabi, A., Sadat Seyedhosseini, F., Abdolahi, N. and Yazdani, Y. 2021. The expansion of CD14⁺ CD163⁺ subpopulation of monocytes and myeloid cells-associated cytokine imbalance; candidate diagnostic biomarkers for celiac disease (CD). *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 35(10): 239-284.
- Badizadegan, K., Vanlandingham, D. M., Hampton, W. and Thompson, K. M. 2020. Value of biopsy in a cohort of children with high-titer celiac serologies: observation of dynamic policy differences between Europe and North America. *BMC Health Services Research*, 20(1): 1-12.

- Bähler, M., Kehrer, I., Stoeffler, H. E., Gorden, L. and Olsen, A. S. 1997. Physical mapping of human myosin-IXB (MYO9B), the human orthologue of the rat myosin myr 5, to chromosome 19p13. 1. *Genomics*, 43(1): 12-15.
- Bai, D., Brar, P., Holleran, S., Ramakrishnan, R. and Green, P. H. 2005. Effect of gender on the manifestations of celiac disease: evidence for greater malabsorption in men. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 40(2): 183-187.
- Bajor, J. 2020. The role of HLA genotype in determining the phenotype of coeliac disease. PhD. Thesis, University of Pécs, 92 page, Pécs.
- Bajor, J., Szakács, Z., Farkas, N., Hegyi, P., Illés, A., Solymár, M. and Vincze, A. 2019. Classical celiac disease is more frequent with a double dose of HLA-DQB1* 02: A systematic review with meta-analysis. *PLoS One*, 14(2): 212-329.
- Balaban, D. V., Popp, A., Ionita Radu, F. and Jinga, M. 2019. Hematologic manifestations in celiac disease—A practical review. *Medicina*, 55(7): 373.
- Barker, J. M. and Liu, E. 2008. Celiac disease: pathophysiology, clinical manifestations, and associated autoimmune conditions. *Advances in Pediatrics*, 55(1): 349-365.
- Barone, M. V., Troncone, R. and Auricchio, S. 2014. Gliadin peptides as triggers of the proliferative and stress/innate immune response of the celiac small intestinal mucosa. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(11): 20518-20537.
- Basso, D., Guariso, G., Fogar, P., Meneghel, A., Zambon, C. F., Navaglia, F. and Plebani, M. 2009. Antibodies against synthetic deamidated gliadin peptides for celiac disease diagnosis and follow-up in children. *Clinical Chemistry*, 55(1): 150-157.
- Basturk, A., Artan, R. and Yilmaz, A. 2017. The incidence of HLA-DQ2/DQ8 in Turkish children with celiac disease and a comparison of the geographical distribution of HLA-DQ. *Gastroenterology Review/Przegląd Gastroenterologiczny*, 12(4): 256-261.
- Berger, E., Bürgin-Wolff, A. and Freudenberg, E. 1964. Diagnostische bewertung des nachweises von gliadin-antikörpern bei cöliakie. *Klinische Wochenschrift*, 42(1): 788-790.
- Beyerlein, A., Donnachie, E. and Ziegler, A. G. 2017. Infections in early life and development of celiac disease. *American Journal of Epidemiology*, 186(11): 1277-1280.

- Biagi, F., Bianchi, P. I., Vattiato, C., Marchese, A., Trotta, L., Badulli, C. and Corazza, G. R. 2012. Influence of HLA-DQ2 and DQ8 on severity in celiac disease. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 46(1): 46-50.
- Biagi, F., Gobbi, P., Marchese, A., Borsotti, E., Zingone, F., Ciacci, C. and Corazza, G. R. 2014. Low incidence but poor prognosis of complicated coeliac disease: a retrospective multicentre study. *Digestive and Liver Disease*, 46(3): 227-230.
- Björck, S., Lindehammer, S. R., Fex, M. and Agardh, D. 2015. Serum cytokine pattern in young children with screening detected coeliac disease. *Clinical & Experimental Immunology*, 179(2): 230-235.
- Bondar, C., Araya, R. E., Guzman, L., Rua, E. C., Chopita, N. and Chirido, F. G. 2014. Role of CXCR3/CXCL10 axis in immune cell recruitment into the small intestine in celiac disease. *PloS One*, 9(2): 890-968.
- Borrelli, M., Gianfrani, C., Lania, G., Aitoro, R., Ferrara, K., Nanayakkara, M. and Maglio, M. 2016. In the intestinal mucosa of children with potential celiac disease IL-21 and IL-17A are less expressed than in the active disease. *Official Journal of the American College of Gastroenterology*, 111(1): 134-144.
- Borrelli, M., Salvati, V. M., Maglio, M., Zanzi, D., Ferrara, K., Santagata, S. and Troncone, R. 2013. Immunoregulatory pathways are active in the small intestinal mucosa of patients with potential celiac disease. *Official Journal of the American College of Gastroenterology*, 108(11): 1775-1784.
- Bratanic, N., Smigoc Schweiger, D., Mendez, A., Bratina, N., Battelino, T. and Vidan-Jeras, B. 2010. An influence of HLA-A, B, DR, DQ, and MICA on the occurrence of Celiac disease in patients with type 1 diabetes. *Tissue Antigens*, 76(3): 208-215.
- Brusca, I. 2015. Overview of biomarkers for diagnosis and monitoring of celiac disease. *Advances in Clinical Chemistry*, 68(1): 1-55.
- Caio, G., Volta, U., Sapone, A., Leffler, D. A., De Giorgio, R., Catassi, C. and Fasano, A. 2019. Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC Medicine*, 17(1): 1-20.
- Caja, S., Mäki, M., Kaukinen, K. and Lindfors, K. 2011. Antibodies in celiac disease: implications beyond diagnostics. *Cellular and Molecular Immunology*, 8(2): 103-109.

- Calado, J. and Verdelho Machado, M. 2022. Celiac disease revisited. *GE-Portuguese Journal of Gastroenterology*, 29(2): 111-124.
- Canova, C., Zabeo, V., Pitter, G., Romor, P., Baldovin, T., Zanotti, R. and Simonato, L. 2014. Association of maternal education, early infections, and antibiotic use with celiac disease: a population-based birth cohort study in northeastern Italy. *American Journal of Epidemiology*, 180(1): 76-85.
- Carroccio, A., Giannitrapani, L., Di Prima, L., Iannitto, E., Montalto, G. and Notarbartolo, A. 2002. Extreme thrombocytosis as a sign of coeliac disease in the elderly: case report. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 14(8): 897-900.
- Carroccio, A., Vitale, G., Di Prima, L., Chifari, N., Napoli, S., La Russa, C. and Notarbartolo, A. 2002. Comparison of anti-transglutaminase ELISAs and an anti-endomysial antibody assay in the diagnosis of celiac disease: a prospective study. *Clinical Chemistry*, 48(9): 1546-1550.
- Castillo, N. E., Theethira, T. G. and Leffler, D. A. 2015. The present and the future in the diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterology Report*, 3(1): 3-11.
- Castillo-Rodal, A. I., Furuzawa-Carballeda, J., Peláez-Luna, M., Castro-Gómez, J., López-Vidal, Y. and Uscanga, L. 2020. More fuel to the fire: some patients with non-celiac self-reported wheat sensitivity exhibit adaptive immunological responses in duodenal mucosa. *BMC Gastroenterology*, 20(1): 1-13.
- Cataldo, F. and Montalto, G. 2007. Celiac disease in the developing countries: a new and challenging public health problem. *World Journal of Gastroenterology*, 13(15): 2153.
- Catassi, C., Gatti, S. and Fasano, A. 2014. The new epidemiology of celiac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 59(1): 7-9.
- Catassi, C., Verdu, E. F., Bai, J. C. and Lionetti, E. 2022. Coeliac disease. *The Lancet*, 399(10344): 2413-2426.
- Cecilio, L. A. and Bonatto, M. W. 2015. The prevalence of HLA DQ2 and DQ8 in patients with celiac disease, in family and in general population. *ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva*, 28(1): 183-185.
- Cherñavsky, A. C., Páez, M. C., Periolo, N., Correa, P., Guillén, L., Niveloni, S. I. and Anaya, J. M. 2008. The simultaneous presence of IL-1B and TNFA two-positions

- risk haplotypes enhances the susceptibility for celiac disease. *Cytokine*, 42(1): 48-54.
- Cielo, D., Galatola, M., Fernandez-Jimenez, N., De Leo, L., Garcia-Etxebarria, K., Loganes, C. and Bilbao, J. R. 2019. Combined analysis of methylation and gene expression profiles in separate compartments of small bowel mucosa identified celiac disease patients' signatures. *Scientific Reports*, 9(1): 10020.
- Cindy, H., Amy, T. and Xiangbing, W. 2009. Hyperthyroidism iron–deficiency anemia and celiac disease. *Thyroid Science*, 4(3): 21-24.
- Cinova, J., Palova-Jelinkova, L., Smythies, L. E., Černá, M., Pecharova, B., Dvořák, M. and Tučková, L. 2007. Gliadin peptides activate blood monocytes from patients with celiac disease. *Journal of Clinical Immunology*, 27(2): 201-209.
- Ciszewski, C., Discepolo, V., Pacis, A., Doerr, N., Tastet, O., Mayassi, T. and Jabri, B. 2020. Identification of a γ c receptor antagonist that prevents reprogramming of human tissue-resident cytotoxic T cells by IL15 and IL21. *Gastroenterology*, 158(3): 625-637.
- Coenen, M. J., Trynka, G., Heskamp, S., Franke, B., van Diemen, C. C., Smolonska, J. and Zhernakova, A. 2009. Common and different genetic background for rheumatoid arthritis and coeliac disease. *Human Molecular Genetics*, 18(21): 4195-4203.
- Costes, L. M., Meresse, B., Cerf-Bensussan, N. and Samsom, J. N. 2015. The role of animal models in unravelling therapeutic targets in coeliac disease. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 29(3): 437-450.
- Çakır, M., Baran, M., Uçar, F., Akbulut, U. E., Kaklıkkaya, N. and Ersöz, Ş. 2014. Accuracy of HLA-DQ genotyping in combination with IgA anti-tissue transglutaminase serology and a "scoring system" for the diagnosis of celiac disease in Turkish children. *Turkish Journal of Pediatrics*, 56(4): 1-3.
- Dahlbom, I., Korponay-Szabó, I. R., Kovács, J. B., Szalai, Z., Mäki, M. and Hansson, T. 2010. Prediction of clinical and mucosal severity of coeliac disease and dermatitis herpetiformis by quantification of IgA/IgG serum antibodies to tissue transglutaminase. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 50(2): 140-146.

- Daum, S., Bauer, U., Foss, H. D., Schuppan, D., Stein, H., Riecken, E. O. and Ullrich, R. 1999. Increased expression of mRNA for matrix metalloproteinases-1 and-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in intestinal biopsy specimens from patients with coeliac disease. *Gut*, 44(1): 17-25.
- De Lourdes Moreno, M., Cebolla, Á., Muñoz-Suano, A., Carrillo-Carrion, C., Comino, I., Pizarro, Á. and Sousa, C. 2017. Detection of gluten immunogenic peptides in the urine of patients with coeliac disease reveals transgressions in the gluten-free diet and incomplete mucosal healing. *Gut*, 66(2): 250-257.
- De Nitto, D., Monteleone, I., Franzè, E., Pallone, F. and Monteleone, G. 2009. Involvement of interleukin-15 and interleukin-21, two γ -chain-related cytokines, in celiac disease. *World Journal of Gastroenterology*, 15(37): 4609.
- Debiec, H. and Ronco, P. 2011. Nephrotic syndrome: A new specific test for idiopathic membranous nephropathy. *Nature Reviews Nephrology*, 7(9): 496.
- Denham, J. M. and Hill, I. D. 2013. Celiac disease and autoimmunity: Review and controversies. *Current Allergy and Asthma Reports*, 13(1): 347-353.
- Dewar, D. H., Donnelly, S. C., McLaughlin, S. D., Johnson, M. W., Ellis, H. J. and Ciclitira, P. J. 2012. Celiac disease: management of persistent symptoms in patients on a gluten-free diet. *World Journal of Gastroenterology*, 18(12): 1348.
- Di Sabatino, A., Brunetti, L., Maffè, G. C., Giuffrida, P. and Corazza, G. R. 2013. Is it worth investigating splenic function in patients with celiac disease?. *World Journal of Gastroenterology*, 19(15): 2313.
- Di Sabatino, A., Ciccocioppo, R., Cupelli, F., Cinque, B., Millimaggi, D., Clarkson, M. M. and Corazza, G. R. 2006. Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in coeliac disease. *Gut*, 55(4): 469-477.
- Di Sabatino, A., Giuffrida, P., Fornasa, G., Salvatore, C., Vanoli, A., Naviglio, S. and Corazza, G. R. 2016. Innate and adaptive immunity in self-reported nonceliac gluten sensitivity versus celiac disease. *Digestive and Liver Disease*, 48(7): 745-752.
- Dieterich, W., Ehnis, T., Bauer, M., Donner, P., Volta, U., Riecken, E. O. and Schuppan, D. 1997. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature Medicine*, 3(7): 797-801.

- Dixit, R., Lebwohl, B., Ludvigsson, J. F., Lewis, S. K., Rizkalla-Reilly, N. and Green, P. H. 2014. Celiac disease is diagnosed less frequently in young adult males. *Digestive Diseases and Sciences*, 59(1): 1509-1512.
- Dowd, B. and Walker-Smith, J. 1974. Samuel Gee, Aretaeus, and the coeliac affection. *British Medical Journal*, 2(5909): 45.
- Du, Y., Shan, L. F., Cao, Z. Z., Feng, J. C. and Cheng, Y. 2018. Prevalence of celiac disease in patients with Down syndrome: a meta-analysis. *Oncotarget*, 9(4): 5387.
- Dubois, P. C., Trynka, G., Franke, L., Hunt, K. A., Romanos, J., Curtotti, A. and Van Heel, D. A. 2010. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nature Genetics*, 42(4): 295-302.
- Dubsky, P., Saito, H., Leogier, M., Dantin, C., Connolly, J. E., Banchereau, J. and Palucka, A. K. 2007. IL-15-induced human DC efficiently prime melanoma-specific naive CD8⁺ T cells to differentiate into CTL. *European Journal of Immunology*, 37(6): 1678-1690.
- Dumic, I., Nordin, T., Jecmenica, M., Stojkovic Lalosevic, M., Milosavljevic, T. and Milovanovic, T. 2019. Gastrointestinal tract disorders in older age. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 10(1): 1-9.
- Dupond, J. L., De Wazieres, B., Flausse-Parrot, F., Fest, T., Morin, G., Closs, F. and Vuitton, D. 1993. Thrombocytosis of celiac disease in adults: a diagnostic and prognostic marker?. *Presse Medicale*, 22(29): 1344-1346.
- Ebert, E. C. 2009. Interleukin 21 up-regulates perforin-mediated cytotoxic activity of human intra-epithelial lymphocytes. *Immunology*, 127(2): 206-215.
- Elli, L., Branchi, F., Tomba, C., Villalta, D., Norsa, L., Ferretti, F. and Bardella, M. T. 2015. Diagnosis of gluten related disorders: Celiac disease, wheat allergy and non-celiac gluten sensitivity. *World Journal of Gastroenterology*, 21(23): 7110.
- Faghih, M., Rostami-Nejad, M., Amani, D., Sadeghi, A., Pourhoseingholi, M. A., Masotti, A. and Zali, M. R. 2018. Analysis of IL17A and IL21 expression in the small intestine of celiac disease patients and correlation with circulating thioredoxin level. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 22(9): 518-525.
- Falchuk, Z. M., Rogentine, G. N. and Strober, W. 1972. Predominance of histocompatibility antigen HL-A8 in patients with gluten-sensitive enteropathy. *The Journal of Clinical Investigation*, 51(6): 1602-1605.

- Falcigno, L., Calvanese, L., Conte, M., Nanayakkara, M., Barone, M. V. and D'Auria, G. 2020. Structural perspective of gliadin peptides active in celiac disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23): 9301.
- Fallang, L. E., Bergseng, E., Hotta, K., Berg-Larsen, A., Kim, C. Y. and Sollid, L. M. 2009. Differences in the risk of celiac disease associated with HLA-DQ2. 5 or HLA-DQ2. 2 are related to sustained gluten antigen presentation. *Nature Immunology*, 10(10): 1096-1101.
- Fasano, A. 2005. Clinical presentation of celiac disease in the pediatric population. *Gastroenterology*, 128(4): 68-73.
- Fasano, A. 2011. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiological Reviews*, 91(1): 151-175.
- Fasano, A. and Catassi, C. 2012. Celiac disease. *New England Journal of Medicine*, 367(25): 2419-2426.
- Fernández-Cavada-Pollo, M. J., Alcalá-Peña, M. I., Vargas-Pérez, M. L., Vergara-Prieto, E., Vallcorba-Gómez-Del Valle, I., Melero-Ruiz, J. and González-Roiz, C. 2013. Celiac disease and HLA-DQ genotype: diagnosis of different genetic risk profiles related to the age in Badajoz, southwestern Spain. *Revista Espanola De Enfermedades Digestivas*, 105(8): 469-76.
- Fernández-Mestre, M., Padrón-Lowe, D., Salazar-Alcalá, E. and Blanco-Pérez, F. 2023. Role of HLA-DQB1 alleles in the risk, signs and symptoms, and severity of celiac disease in a Venezuelan population. *Revista de Gastroenterología de México*, 88(2): 125-131.
- Ferreira, R. C., Pan-Hammarström, Q., Graham, R. R., Fontán, G., Lee, A. T., Ortmann, W. and Behrens, T. W. 2012. High-density SNP mapping of the HLA region identifies multiple independent susceptibility loci associated with selective IgA deficiency. *PLoS Genetics*, 8(1): 1002476.
- Fleckenstein, B., Qiao, S. W., Larsen, M. R., Jung, G., Roepstorff, P. and Sollid, L. M. 2004. Molecular characterization of covalent complexes between tissue transglutaminase and gliadin peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 279(17): 17607-17616.

- Freeman, H. J. 2015. Celiac disease: a disorder emerging from antiquity, its evolving classification and risk, and potential new treatment paradigms. *Gut and Liver*, 9(1): 28.
- Freeman, H. J. 2017. Dietary compliance in celiac disease. *World Journal of Gastroenterology*, 23(15): 2635.
- Gagliardi, M., Clemente, N., Monzani, R., Fusaro, L., Ferrari, E., Saverio, V. and Corazzari, M. 2021. Gut-Ex-Vivo system as a model to study gluten response in celiac disease. *Cell Death Discovery*, 7(1): 45-49.
- Galatola, M., Izzo, V., Cielo, D., Morelli, M., Gambino, G., Zanzi, D. and Auricchio, R. 2013. Gene expression profile of peripheral blood monocytes: a step towards the molecular diagnosis of celiac disease?. *PLoS One*, 8(9): 747-748.
- Gamble, J. R., Harlan, J. M., Klebanoff, S. J. and Vadas, M. A. 1985. Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(24): 8667-8671.
- Ganji, A., Geraylow, K. R., Shahbazkhani, B. and Attarian, F. 2021. Common clinical symptoms and concomitant disease in celiac patients—A large cohort study in the North-East of Iran. *Journal of Contemporary Medical Sciences*, 76(6): 2-9.
- García-Molina, M. D. and Barro, F. 2017. Characterization of changes in gluten proteins in low-gliadin transgenic wheat lines in response to application of different nitrogen regimes. *Frontiers in Plant Science*, 8(1): 257.
- Gasbarrini, G. B., Mangiola, F., Gerardi, V., Ianiro, G., Corazza, G. R. and Gasbarrini, A. 2014. Coeliac disease: an old or a new disease? History of a pathology. *Internal and Emergency Medicine*, 9(1): 249-256.
- Gasbarrini, G., Miele, L., Corazza, G. R. and Gasbarrini, A. 2010. When was celiac disease born?: the Italian case from the archeologic site of Cosa. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 44(7): 502-503.
- Giriprasad, V., Mechenro, J., Balamurugan, R. and Ramakrishna, B. S. 2019. Frequency of HLA celiac disease risk alleles and haplotypes in healthy adults in Tamil Nadu. *Indian Journal of Gastroenterology*, 38(1): 178-182.

- Goel, G., Daveson, A. J. M., Hooi, C. E., Tye-Din, J. A., Wang, S., Szymczak, E. and Anderson, R. P. 2020. Serum cytokines elevated during gluten-mediated cytokine release in coeliac disease. *Clinical & Experimental Immunology*, 199(1): 68-78.
- Grabstein, K. H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V. and Giri, J. G. 1994. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the β chain of the interleukin-2 receptor. *Science*, 264(5161): 965-968.
- Graham, M., Willey, A., Adams, J., Yager, D., Sugerman, H. and Diegelmann, R. 1995. IL-1 β downregulates collagen and augments collagenase expression in human intestinal smooth muscle (HISM) cells. *Gastroenterology*, 108(4): 826.
- Green, P. H. and Cellier, C. 2007. Celiac disease. *The New England Journal of Medicine*. 357(2): 1731-1743.
- Green, P. H., Stavropoulos, S. N., Panagi, S. G., Goldstein, S. L., McMahon, D. J., Absan, H. and Neugut, A. I. 2001. Characteristics of adult celiac disease in the USA: results of a national survey. *The American Journal of Gastroenterology*, 96(1): 126-131.
- Guandalini, S. and Assiri, A. 2014. Celiac disease: A review. *JAMA Pediatrics*, 168(3): 272-278.
- Gujral, N., Freeman, H. J. and Thomson, A. B. 2012. Celiac disease: prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World Journal of Gastroenterology*, 18(42): 6036.
- Güngör, Ş. and Acıpayam, C. 2020. Comparison between celiac patients and healthy control group regarding vitamin-mineral levels and complete blood count parameters. *Trends in Pediatrics*, 1(2): 68-74.
- Haas, S. V. 1924. The value of the banana in the treatment of celiac disease. *American Journal of Diseases of Children*, 28(4): 421-437.
- Hadithi, M., Von Blomberg, B. M. E., Crusius, J. B. A., Bloemena, E., Kostense, P. J., Meijer, J. W. and Pena, A. S. 2007. Accuracy of serologic tests and HLA-DQ typing for diagnosing celiac disease. *Annals of Internal Medicine*, 147(5): 294-302.
- Halfdanarson, T. R., Litzow, M. R. and Murray, J. A. 2007. Hematologic manifestations of celiac disease. *Blood*, 109(2): 412-421.
- Hamadi, S. S. 2005. Histopathological changes of gastric mucosa and *H. pylori* infection in patients with CD. *The Medical Journal of Basrah University*, 23(1): 13-17.

- Hameed, W. S., Abdul-Mehdi, R. J., Tarish, H. R. and Alsherees, H. A. A. 2016. Prevalence of DQ2, DQ8 and DR4 Alleles in Iraqi Celiac Patients. *International Archives of BioMedical and Clinical Research*, 2(3): 118-121.
- Hammo, S. H. and Hayawi, M. A. 2021. The Significance of CD3 Marker in the Diagnosis of Celiac Disease. *Annals of the College of Medicine, Mosul*, 42(2): 99-108.
- Haphed, N. S., Ali, E. N. and Mahdi, B. M. 2016. Profile of HLA-DQ allele in a sample of Iraqi Celiac disease Patients. *International Journal of Innovation Science*, 16(1): 1-8.
- Hariz, M. B., Kallel-Sellami, M., Kallel, L., Lahmer, A., Halioui, S., Bouraoui, S. and Maherzi, A. 2007. Prevalence of celiac disease in Tunisia: mass-screening study in schoolchildren. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 19(8): 687-694.
- Harris, K. M., Fasano, A. and Mann, D. L. 2010. Monocytes differentiated with IL-15 support Th17 and Th1 responses to wheat gliadin: implications for celiac disease. *Clinical Immunology*, 135(3): 430-439.
- Hasan, A. A. 2017. Some Immunological Parameters in Women With Celiac Disease. *Journal of Babylon University*, 26(1): 233-237.
- Hashim, Z. A., AL-Namil, S. A., Jazi, W. M. and Strak, S. K. 2017. The value of endoscopic biopsies from first and second parts of duodenum in the diagnosis of celiac disease in correlation with a serological test. *Basrah Journal of Surgery*, 23(2): 34-39.
- Herter, C. A. 1908. On infantilism from chronic intestinal infection, characterized by the overgrowth and persistence of flora of the nursling period. *MacMillan*, 8(2): 416.
- Heydari, F., Rostami-Nejad, M., Moheb-Alian, A., Mollahoseini, M. H., Rostami, K., Pourhoseingholi, M. A. and Zali, M. R. 2018. Serum cytokines profile in treated celiac disease compared with non-celiac gluten sensitivity and control: a marker for differentiation. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, 27(3): 247-250.
- Hill, I. D., Dirks, M. H., Liptak, G. S., Colletti, R. B., Fasano, A., Guandalini, S. and Seidman, E. G. 2005. Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American Society for Pediatric

- Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 40(1): 1-19.
- Hin, H., Bird, G., Peter, F., Mahy, N. and Jewell, D. 1999. Coeliac disease in primary care: case finding study. *BMJ*, 318(7177): 164-167.
- Hisamatsu, T., Erben, U. and Kühl, A. A. 2016. The role of T-cell subsets in chronic inflammation in celiac disease and inflammatory bowel disease patients: more common mechanisms or more differences?. *Inflammatory Intestinal Diseases*, 1(2): 52-62.
- Hmida, N. B., Ahmed, M. B., Moussa, A., Rejeb, M. B., Said, Y., Kourda, N. and Cerf-Bensussan, N. 2012. Impaired control of effector T cells by regulatory T cells: a clue to loss of oral tolerance and autoimmunity in celiac disease?. *Official Journal of the American College of Gastroenterology*, 107(4): 604-611.
- Hmida, N. B., Ahmed, M. B., Moussa, A., Rejeb, M. B., Said, Y., Kourda, N. and Cerf-Bensussan, N. 2012. Impaired control of effector T cells by regulatory T cells: a clue to loss of oral tolerance and autoimmunity in celiac disease?. *Official Journal of the American College of Gastroenterology*, 107(4): 604-611.
- Hopper, A. D., Hadjivassiliou, M., Hurlstone, D. P., Lobo, A. J., McAlindon, M. E., Egner, W. and Sanders, D. S. 2008. What is the role of serologic testing in celiac disease? A prospective, biopsy-confirmed study with economic analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 6(3): 314-320.
- Husby, S., Koletzko, S., Korponay-Szabó, I. R., Mearin, M. L., Phillips, A., Shamir, R. and ESPGHAN Gastroenterology Committee. 2012. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 54(1): 136-160.
- Husby, S., Koletzko, S., Korponay-Szabó, I., Kurppa, K., Mearin, M. L., Ribes-Koninckx, C. and Wessels, M. 2020. European Society Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition guidelines for diagnosing coeliac disease 2020. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 70(1): 141-156.
- Hüe, S., Mention, J. J., Monteiro, R. C., Zhang, S., Cellier, C., Schmitz, J. and Caillat-Zucman, S. 2004. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity*, 21(3): 367-377.

- Ibrahim, M. M. 2020. Prevalence of CD among cases of irritable bowel syndrome in Baghdad, Iraq. Executive Editor, 11(1): 1943.
- Iervasi, E., Auricchio, R., Strangio, A., Greco, L. and Saverino, D. 2020. Serum IL-21 levels from celiac disease patients correlates with anti-tTG IgA autoantibodies and mucosal damage. *Autoimmunity*, 53(4): 225-230.
- Igbinedion, S. O., Ansari, J., Vasikaran, A., Gavins, F. N., Jordan, P., Boktor, M. and Alexander, J. S. 2017. Non-celiac gluten sensitivity: All wheat attack is not celiac. *World Journal of Gastroenterology*, 23(40): 7201.
- Imperatore, N., Rispo, A., Capone, P., Donetto, S., De Palma, G. D., Gerbino, N. and Tortora, R. 2016. Gluten-free diet does not influence the occurrence and the Th1/Th17-Th2 nature of immune-mediated diseases in patients with coeliac disease. *Digestive and Liver Disease*, 48(7): 740-744.
- Jabri, B. and Sollid, L. M. 2009. Tissue-mediated control of immunopathology in coeliac disease. *Nature Reviews Immunology*, 9(12): 858-870.
- Jabri, B., Chen, X. and Sollid, L. M. 2014. How T cells taste gluten in celiac disease. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(5): 429-431.
- James, L. M. and Georgopoulos, A. P. 2018. Persistent antigens hypothesis: the human leukocyte antigen (HLA) connection. *Journal of Neurology and Neuromedicine*, 3(6): 34-39.
- Janeway, C., Travers, P., Hunt, S. V. and Walport, M. 1997. *Immunobiology: the immune system in health and disease*. Garland, 97(4): 1-8.
- Jin, H., Carrio, R., Yu, A. and Malek, T. R. 2004. Distinct activation signals determine whether IL-21 induces B cell costimulation, growth arrest, or Bim-dependent apoptosis. *The Journal of Immunology*, 173(1): 657-665.
- Ju, J. M., Marietta, E. V. and Murray, J. A. 2015. Generating transgenic mouse models for studying celiac disease. *Celiac Disease: Methods and Protocols*, 15(1): 23-33.
- Junker, Y., Zeissig, S., Kim, S. J., Barisani, D., Wieser, H., Leffler, D. A. and Schuppan, D. 2012. Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation via activation of toll-like receptor 4. *Journal of Experimental Medicine*, 209(13): 2395-2408.

- Kabbani, T. A., Goldberg, A., Kelly, C. P., Pallav, K., Tariq, S., Peer, A. and Leffler, D. A. 2012. Body mass index and the risk of obesity in coeliac disease treated with the gluten-free diet. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 35(6): 723-729.
- Kagnoff, M. F. 2007. Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(1): 41-49.
- Kamil, L. M. 2005. Evaluation of coeliac disease serological markers. *Journal of the Faculty of Medicine Baghdad*. 57(2): 156-159.
- Kapoor, A., Patwari, A. K., Kumar, P., Jain, A. and Narayan, S. 2013. Serum soluble interleukin-2 receptor, interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha as markers of celiac disease activity. *The Indian Journal of Pediatrics*, 80(1): 108-113.
- Karell, K., Louka, A. S., Moodie, S. J., Ascher, H., Clot, F., Greco, L. and European Genetics Cluster on Celiac Disease. 2003. HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1* 05-DQB1* 02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Human Immunology*, 64(4): 469-477.
- Kaswala, D. H., Veeraraghavan, G., Kelly, C. P. and Leffler, D. A. 2015. Celiac disease: diagnostic standards and dilemmas. *Diseases*, 3(2): 86-101.
- Kelly, C. P., Bai, J. C., Liu, E. and Leffler, D. A. 2015. Advances in diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterology*, 148(6): 1175-1186.
- Khan, S., Mandal, R. K., Jawed, A., Dar, S. A., Wahid, M., Panda, A. K. and Haque, S. 2016. TNF- α -308 G> A (rs1800629) polymorphism is associated with celiac disease: A meta-analysis of 11 case-control studies. *Scientific Reports*, 6(1): 32677.
- Khorsheed, Z, H. 2021. Evaluation of Autoimmune markers and frequency of HLA-DQ2\DQ8 in patients with type 1 diabetes\or celiac disease. MSc. Thesis, University of Kerbala, 114 page, Kerbela.
- Khosravi, A., Mansouri, M., Rostami-Nejad, M., Shahbazkhani, B., Ekhlesi, G. and Kalantari, E. 2016. The likelihood ratio and frequency of DQ2/DQ8 haplotypes in Iranian patients with celiac disease. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 9(1): 18.
- Kilander, A. F., Dotevall, G., Fällström, S. P., Gillberg, R. E., Nilsson, L. Å. and Tarkowski, A. 1983. Evaluation of gliadin antibodies for detection of coeliac disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 18(3): 377-383.

- Kim, S. M., Mayassi, T. and Jabri, B. 2015. Innate immunity: actuating the gears of celiac disease pathogenesis. *Best practice & research Clinical Gastroenterology*, 29(3): 425-435.
- King, J. A., Jeong, J., Underwood, F. E., Quan, J., Panaccione, N., Windsor, J. W. and Kaplan, G. G. 2020. Incidence of celiac disease is increasing over time: a systematic review and meta-analysis. *Official Journal of the American College of Gastroenterology*, 115(4): 507-525.
- Kits, E. L. I. A. 2006. Evaluation of the INOVA Diagnostics. *Clinical and Vaccine Immunology*, 6(1): 150-151.
- Konforte, D., Simard, N. and Paige, C. J. 2009. IL-21: an executor of B cell fate. *The Journal of Immunology*, 182(4): 1781-1787.
- Korneychuk, N., Ramiro-Puig, E., Ettersperger, J., Schulthess, J., Montcuquet, N., Kiyono, H. and Cerf-Bensussan, N. 2014. Interleukin 15 and CD4⁺ T cells cooperate to promote small intestinal enteropathy in response to dietary antigen. *Gastroenterology*, 146(4): 1017-1027.
- Kuczyński, S., Winiarska, H., Abramczyk, M., Szczawińska, K., Wierusz-Wysocka, B. and Dworacka, M. 2005. IL-15 is elevated in serum patients with type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 69(3): 231-236.
- Kunisato, T., Watanabe, M., Inoue, N., Okada, A., Nanba, T., Kobayashi, W. and Iwatani, Y. 2018. Polymorphisms in Th17-related genes and the pathogenesis of autoimmune thyroid disease. *Autoimmunity*, 51(7): 360-369.
- Kupfer, S. S. and Jabri, B. 2012. Celiac disease pathophysiology. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*, 22(4): 639-660.
- Kupper, C. 2005. Dietary guidelines and implementation for celiac disease. *Gastroenterology*, 128(4): 121-127.
- Kurppa, K., Ashorn, M., Iltanen, S., Koskinen, L. L., Saavalainen, P., Koskinen, O. and Kaukinen, K. 2010. Celiac disease without villous atrophy in children: a prospective study. *The Journal of Pediatrics*, 157(3): 373-380.
- Kylökäs, A., Kaukinen, K., Huhtala, H., Collin, P., Mäki, M. and Kurppa, K. 2016. Type 1 and type 2 diabetes in celiac disease: prevalence and effect on clinical and histological presentation. *BMC Gastroenterology*, 16(1): 1-7.

- Lähdeaho, M. L., Mäki, M., Laurila, K., Huhtala, H. and Kaukinen, K. 2011. Small-bowel mucosal changes and antibody responses after low-and moderate-dose gluten challenge in celiac disease. *BMC Gastroenterology*, 11(1): 1-9.
- Lammers, K. M., Chieppa, M., Liu, L., Liu, S., Omatsu, T., Janka-Junttila, M. and Fasano, A. 2015. Gliadin induces neutrophil migration via engagement of the formyl peptide receptor, FPR1. *PLoS One*, 10(9): 1383-1438.
- Lammi, A., Arikoski, P., Simell, S., Kinnunen, T., Simell, V., Paavanen-Huhtala, S. and Ilonen, J. 2015. Antibodies to deamidated gliadin peptide in diagnosis of celiac disease in children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 60(5): 626-631.
- Laurikka, P., Nurminen, S., Kivelä, L. and Kurppa, K. 2018. Extraintestinal manifestations of celiac disease: early detection for better long-term outcomes. *Nutrients*, 10(8): 1015.
- Lebwohl, B. and Rubio-Tapia, A. 2021. Epidemiology, presentation, and diagnosis of celiac disease. *Gastroenterology*, 160(1): 63-75.
- Lebwohl, B., Sanders, D. S. and Green, P. H. 2018. Coeliac disease. *The Lancet*, 391(10115): 70-81.
- Lee, A. R., Ng, D. L., Zivin, J. and Green, P. H. R. 2007. Economic burden of a gluten-free diet. *Journal of human Nutrition and Dietetics*, 20(5): 423-430.
- Leffler, D. A. and Schuppan, D. 2010. Update on serologic testing in celiac disease. *Official Journal of the American College of Gastroenterology*, 105(12): 2520-2524.
- Leffler, D., Schuppan, D., Pallav, K., Najarian, R., Goldsmith, J. D., Hansen, J. and Kelly, C. P. 2013. Kinetics of the histological, serological and symptomatic responses to gluten challenge in adults with coeliac disease. *Gut*, 62(7): 996-1004.
- Lewis, D., Haridy, J. and Newnham, E. D. 2017. Testing for coeliac disease. *Australian Prescriber*, 40(3): 105.
- Lewis, N. R. and Scott, B. B. 2006. Systematic review: the use of serology to exclude or diagnose coeliac disease (a comparison of the endomysial and tissue transglutaminase antibody tests). *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 24(1): 47-54.

- Lewis, N. R. and Scott, B. B. 2010. Meta-analysis: deamidated gliadin peptide antibody and tissue transglutaminase antibody compared as screening tests for coeliac disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 31(1): 73-81.
- Liao, N., Chen, M. L., Zhao, H. and Xie, Z. F. 2015. Association between the MYO9B polymorphisms and celiac disease risk: a meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(9): 14916.
- Lincoln, M. R., Ramagopalan, S. V., Chao, M. J., Herrera, B. M., DeLuca, G. C., Orton, S. M. and Ebers, G. C. 2009. Epistasis among HLA-DRB1, HLA-DQA1, and HLA-DQB1 loci determines multiple sclerosis susceptibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(18): 7542-7547.
- Lindfors, K., Ciacci, C., Kurppa, K., Lundin, K. E., Makharia, G. K., Mearin, M. L. and Kaukinen, K. 2019. Coeliac disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1): 3-8.
- Lionetti, E. and Catassi, C. 2011. New clues in celiac disease epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, and treatment. *International Reviews of Immunology*, 30(4): 219-231.
- Lionetti, E. and Catassi, C. 2015. The role of environmental factors in the development of celiac disease: what is new?. *Diseases*, 3(4): 282-293.
- Lionetti, E., Castellaneta, S., Francavilla, R., Pulvirenti, A., Tonutti, E., Amarri, S. and Catassi, C. 2014. Introduction of gluten, HLA status, and the risk of celiac disease in children. *New England Journal of Medicine*, 371(14): 1295-1303.
- Lionetti, E., Gatti, S., Pulvirenti, A. and Catassi, C. 2015. Celiac disease from a global perspective. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 29(3): 365-379.
- Loeff, T., Araya, M. and Pérez-Bravo, F. 2012. Frequency of MYO9B polymorphisms in celiac patients and controls. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*, 104(11): 566-571.
- Lopes, L. H., Muniz, J. G., Oliveira, R. P. and Sdepanian, V. L. 2019. Celiac disease in Brazilian first-degree relatives: the odds are five times greater for HLA DQ2 homozygous. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 68(5): 77-80.
- Losy, J., Niezgoda, A. and Zaremba, J. 2002. IL-15 is elevated in sera of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Folia Neuropathologica*, 40(3): 151-153.
- Ludvigsson, J. F., Bai, J. C., Biagi, F., Card, T. R., Ciacci, C., Ciclitira, P. J. and BSG Coeliac Disease Guidelines Development Group. 2014. Diagnosis and management

- of adult coeliac disease: guidelines from the British Society of Gastroenterology. *Gut*, 63(8): 1210-1228.
- Ludvigsson, J. F., Leffler, D. A., Bai, J. C., Biagi, F., Fasano, A., Green, P. H. and Ciacci, C. 2013. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*, 62(1): 43-52.
- Ludvigsson, J. F., Rubio-Tapia, A., Chowdhary, V., Murray, J. A. and Simard, J. F. 2012. Increased risk of systemic lupus erythematosus in 29,000 patients with biopsy-verified celiac disease. *The Journal of Rheumatology*, 39(10): 1964-1970.
- Lundin, K. E. and Wijmenga, C. 2015. Coeliac disease and autoimmune disease—genetic overlap and screening. *Nature reviews Gastroenterology & Hepatology*, 12(9): 507-515.
- Maiuri, L., Ciacci, C., Auricchio, S., Brown, V., Quarantino, S. and Londei, M. 2000. Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology*, 119(4): 996-1006.
- Majeed, M. S. 2021. Correlation of Serum Soluble Interleukin-2 Receptor and Interleukin-18 with Auto-antibody Profile In Patients With Celiac Disease In Karbala Province. MSc. Thesis, University of Kerbala, 169 page, Kerbela.
- Majsiak, E., Gubska, O., Cichoż-Lach, H. and Cukrowska, B. 2022. Celiac disease-disease of children and adults: symptoms, disease complications, risk groups and comorbidities. *Polski Merkuriusz Lekarski*, 44(1): 31-35.
- Mäki, M. 1995. 3 The humoral immune system in coeliac disease. *Baillière's Clinical Gastroenterology*, 9(2): 231-249.
- Manavalan, J. S., Hernandez, L., Shah, J. G., Konikkara, J., Naiyer, A. J., Lee, A. R. and Bhagat, G. 2010. Serum cytokine elevations in celiac disease: Association with disease presentation. *Human Immunology*, 71(1): 50-57.
- Mansour, A. A. and Najeeb, A. A. 2011. Coeliac disease in Iraqi type 1 diabetic patients. *Arab Journal of Gastroenterology*, 12(2): 103-105.
- Mansouri, M., Dadfar, M., Rostami-Nejad, M., Ekhlasi, G., Shahbazkhani, A. and Shahbazkhani, B. 2021. The frequency of HLA-DQ2/DQ8 haplotypes and celiac disease among the first-degree relatives of patients with celiac disease. *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench*, 14(1): 36.

- Marsh, S. G., Albert, E. D., Bodmer, W. F., Bontrop, R. E., Dupont, B., Erlich, H. A. and Trowsdale, J. 2010. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens*, 75(4): 291.
- Martínez-Ojinaga, E., Molina, M., Polanco, I., Urcelay, E. and Núñez, C. 2018. HLA-DQ distribution and risk assessment of celiac disease in a Spanish center. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 110(7): 421-426.
- Maruntelu, I., Preda, C. M., Sandra, I., Istratescu, D., Elena Chifulescu, A., Manuc, M. and Constantinescu, I. 2022. HLA genotyping in Romanian adult patients with celiac disease, their first-degree relatives and healthy persons. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, 31(2): 1-8.
- Masaebi, F., Looha, M. A., Rostami-Nejad, M., Pourhoseingholi, M. A., Mohseni, N., Samasca, G. and Zali, M. R. 2020. The predictive value of serum cytokines for distinguishing celiac disease from non-celiac gluten sensitivity and healthy subjects. *Iranian Biomedical Journal*, 24(6): 340.
- Mashayekhi, K., Rostami-Nejad, M., Amani, D., Rezaei-Tavirani, M., Mohaghegh-Shalmani, H. and Zali, M. R. 2018. A rapid and sensitive assay to identify HLA-DQ2/8 risk alleles for celiac disease using real-time PCR method. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 11(3): 250.
- Mashayekhi, K., Rostami-Nejad, M., Azimzadeh, P., Amani, D., Kazemian, S., Derakhshani, S. and Zali, M. R. 2015. Setup of SYBR green real-time PCR method to detect the HLA-DQ alleles in patients with celiac disease. *Koomesh*, 16(4): 527-535.
- Matter, K. and Balda, M. S. 2003. Signalling to and from tight junctions. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 4(3): 225-237.
- Matysiak-Budnik, T., Moura, I. C., Arcos-Fajardo, M., Lebreton, C., Ménard, S., Candalh, C. and Heyman, M. 2008. Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(1): 143-154.
- Mauviel, A. 1993. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *Journal of Cellular Biochemistry*, 53(4): 288-295.
- Mazzarella, G. 2015. Effector and suppressor T cells in celiac disease. *World Journal of Gastroenterology*, 21(24): 7349.

- Mazzarella, G., Maglio, M., Paparo, F., Nardone, G., Stefanile, R., Greco, L. and Troncone, R. 2003. An immunodominant DQ8 restricted gliadin peptide activates small intestinal immune response in in vitro cultured mucosa from HLA-DQ8 positive but not HLA-DQ8 negative coeliac patients. *Gut*, 52(1): 57-62.
- Mazzilli, M. C., Ferrante, P., Mariani, P., Martone, E., Petronzelli, F., Triglione, P. and Bonamico, M. 1992. A study of Italian pediatric celiac disease patients confirms that the primary HLA association is to the DQ ($\alpha 1 * 0501$, $\beta 1 * 0201$) heterodimer. *Human immunology*, 33(2): 133-139.
- McInnes, I. B. and Gracie, J. A. 2004. Interleukin-15: a new cytokine target for the treatment of inflammatory diseases. *Current Opinion in Pharmacology*, 4(4): 392-397.
- Megiorni, F., Mora, B., Bonamico, M., Barbato, M., Montuori, M., Viola, F. and Mazzilli, M. C. 2008. HLA-DQ and susceptibility to celiac disease: evidence for gender differences and parent-of-origin effects. *Official Journal of the American College of Gastroenterology*, 103(4): 997-1003.
- Megiorni, F., Mora, B., Bonamico, M., Barbato, M., Nenna, R., Maiella, G. and Mazzilli, M. C. 2009. HLA-DQ and risk gradient for celiac disease. *Human Immunology*, 70(1): 55-59.
- Mehrdad, M., Mansour-Ghanaei, F., Mohammadi, F., Joukar, F., Dodangeh, S. and Mansour-Ghanaei, R. 2012. Frequency of celiac disease in patients with hypothyroidism. *Journal of Thyroid Research*, 20(12): 1-4.
- Meijer, C. R., Schweizer, J. J., Peeters, A., Putter, H. and Mearin, M. L. 2021. Efficient implementation of the ‘non-biopsy approach’ for the diagnosis of childhood celiac disease in the Netherlands: a national prospective evaluation 2010–2013. *European Journal of Pediatrics*, 180(1): 2485-2492.
- Mention, J. J., Ahmed, M. B., Bègue, B., Barbe, U., Verkarre, V., Asnafi, V. and Cerf-Bensussan, N. 2003. Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology*, 125(3): 730-745.
- Meresse, B., Chen, Z., Ciszewski, C., Tretiakova, M., Bhagat, G., Krausz, T. N. and Jabri, B. 2004. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling

- pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity*, 21(3): 357-366.
- Mills, J. R. and Murray, J. A. 2016. Contemporary celiac disease diagnosis: Is a biopsy avoidable?. *Current Opinion in Gastroenterology*, 32(2): 80-85.
- Ming, W. J., Bersani, L. and Mantovani, A. 1987. Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Immunology*, 138(5): 1469-1474.
- Monzani, A., Rapa, A., Fonio, P., Tognato, E., Panigati, L. and Oderda, G. 2011. Use of deamidated gliadin peptide antibodies to monitor diet compliance in childhood celiac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 53(1): 55-60.
- Moudgil, K. D. and Choubey, D. 2011. Cytokines in autoimmunity: role in induction, regulation, and treatment. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 31(10): 695-703.
- Namatovu, F. 2015. The multifactorial etiology of celiac disease explored by combining several national registers. MSc. Thesis, Umeå University, 64 page, Umeå.
- Namatovu, F., Sandström, O., Olsson, C., Lindkvist, M. and Ivarsson, A. 2014. Celiac disease risk varies between birth cohorts, generating hypotheses about causality: evidence from 36 years of population-based follow-up. *BMC Gastroenterology*, 14(59): 1-8.
- Nandiwada, S. L. and Tebo, A. E. 2013. Testing for antireticulin antibodies in patients with celiac disease is obsolete: a review of recommendations for serologic screening and the literature. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20(4): 447-451.
- Nasiri, Z., Nikzamir, A., Rostami-Nejad, M., Sirati-Sabet, M., Aghamohammadi, E., Chaleshi, V. and Zali, M. R. 2018. Serum level of tumor necrosis factor- α and its gene polymorphisms has no association with susceptibility to celiac disease in Iranian population. *International Journal of Celiac Disease*, 6(2): 42-6.
- Nejad, M. R., Rostami, K., Pourhoseingholi, M. A., Mojarad, E. N., Habibi, M., Dabiri, H. and Zali, M. R. 2009. Atypical presentation is dominant and typical for coeliac disease. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, 18(3): 291-297.
- Nelson, E. W., Ertan, A., Brooks, F. P. and Cerda, J. J. 1976. Thrombocytosis in patients with celiac sprue. *Gastroenterology*, 70(6): 1042-1044.

- Nenna, R., Tiberti, C., Petrarca, L., Lucantoni, F., Mennini, M., Luparia, R. P. L. And Bonamico, M. 2013. The celiac iceberg: characterization of the disease in primary schoolchildren. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 56(4): 416-421.
- Ngo, S. T., Steyn, F. J. and McCombe, P. A. 2014. Gender differences in autoimmune disease. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 35(3): 347-369.
- Ortiz, M., Fragosó, A. and O'Sullivan, C. K. 2011. Detection of antigliadin autoantibodies in celiac patient samples using a cyclodextrin-based supramolecular biosensor. *Analytical Chemistry*, 83(8): 2931-2938.
- Osman, M., Taha, B. and Al Duboni, G. 2014. Assessment of the response to gluten-free diet in an Iraqi population with coeliac disease. A histological and serological follow-up study. *Archives of Medical Science*, 10(2): 294-299.
- Owen, J. A., Punt, J., Stranford, S. A. and Jones, P. P. 2013. *Kuby immunology*. WH Freeman, 27(1): 109.
- Ozuna, C. V., Iehisa, J. C., Giménez, M. J., Alvarez, J. B., Sousa, C. and Barro, F. 2015. Diversification of the celiac disease α -gliadin complex in wheat: a 33-mer peptide with six overlapping epitopes, evolved following polyploidization. *The Plant Journal*, 82(5): 794-805.
- Özgenel, Ş. M., Temel, T., Teke, H. Ü., Yıldız, P., Korkmaz, H. and Özakyol, A. 2019. HLA-DQ2/DQ8 frequency in adult patients with celiac disease, their first-degree relatives, and normal population in Turkey. *The Turkish Journal of Gastroenterology*, 30(4): 321.
- Pagliari, D., Cianci, R., Frosali, S., Landolfi, R., Cammarota, G., Newton, E. E. and Pandolfi, F. 2013. The role of IL-15 in gastrointestinal diseases: a bridge between innate and adaptive immune response. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 24(5): 455-466.
- Pagliari, D., Urgesi, R., Frosali, S., Riccioni, M. E., Newton, E. E., Landolfi, R. and Cianci, R. 2015. The interaction among microbiota, immunity, and genetic and dietary factors is the condicio sine qua non celiac disease can develop. *Journal of Immunology Research*, 20(15): 1-4.

- Parisis, D., Chivasso, C., Perret, J., Soyfoo, M. S. and Delporte, C. 2020. Current state of knowledge on primary Sjögren's syndrome, an autoimmune exocrinopathy. *Journal of Clinical Medicine*, 9(7): 2299.
- Parzanese, I., Qehajaj, D., Patrinoicola, F., Aralica, M., Chiriva-Internati, M., Stifter, S. and Grizzi, F. 2017. Celiac disease: From pathophysiology to treatment. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 8(2): 27.
- Pastore, R. L., Murray, J. A., Coffman, F. D., Mitrofanova, A. and Srinivasan, S. 2019. Physician review of a celiac disease risk estimation and decision-making expert system. *Journal of the American College of Nutrition*, 38(8): 722-728.
- Paulley, J. W. 1954. Observations on the aetiology of idiopathic steatorrhea. *British Medical Journal*, 2(4900): 1318.
- Piatek-Guziewicz, A., Ptak-Belowska, A., Przybylska-Felus, M., Pasko, P., Zagrodzki, P., Brzozowski, T. and Zwolinska-Wcislo, M. 2017. Intestinal parameters of oxidative imbalance in celiac adults with extraintestinal manifestations. *World Journal of Gastroenterology*, 23(44): 7849.
- Pietzak, M. M., Schofield, T. C., McGinniss, M. J. and Nakamura, R. M. 2009. Stratifying risk for celiac disease in a large at-risk United States population by using HLA alleles. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 7(9): 966-971.
- Plugis, N. M. and Khosla, C. 2015. Therapeutic approaches for celiac disease. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 29(3): 503-521.
- Pober, J. S. 1988. Cytokine-mediated activation of vascular endothelium, physiology and pathology. *The American Journal of Pathology*, 133(1): 426-433.
- Post, P. L., Tyska, M. J., O'Connell, C. B., Johung, K., Hayward, A. and Mooseker, M. S. 2002. Myosin-IXb is a single-headed and processive motor. *Journal of Biological Chemistry*, 277(14): 11679-11683.
- Ramakrishna, B. S., Venugopal, G., Singh, A., Pugazhendhi, S., Dutta, S., Ahuja, V. and Makharia, G. K. 2021. Human Leukocyte Antigen DQ (HLA-DQ) genotypes and haplotypes and their association with phenotype in patients with celiac disease in India. *JGH Open*, 5(10): 1190-1196.
- Rampertab, S. D., Pooran, N., Brar, P., Singh, P. and Green, P. H. 2006. Trends in the presentation of celiac disease. *The American Journal of Medicine*, 119(4): 355-359.

- Rashtak, S., Ettore, M. W., Homburger, H. A. and Murray, J. A. 2008. Combination testing for antibodies in the diagnosis of coeliac disease: comparison of multiplex immunoassay and ELISA methods. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 28(6): 805-813.
- Reilly, N. R., Aguilar, K., Hassid, B. G., Cheng, J., DeFelice, A. R., Kazlow, P. and Green, P. H. 2011. Celiac disease in normal-weight and overweight children: clinical features and growth outcomes following a gluten-free diet. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 53(5): 528-531.
- Rider, P., Carmi, Y. and Cohen, I. 2016. Biologics for targeting inflammatory cytokines, clinical uses, and limitations. *International Journal of Cell Biology*, 20(16): 1-3.
- Rodrigo, L., Pérez-Martínez, I., Lauret-Braña, E. and Suárez-González, A. 2018. Evaluation of efficacy and adherence to gluten-free diet in patients with celiac disease. *Nutrients*, 10(11): 1777-1781.
- Romaldini, C. C., Barbieri, D., Okay, T. S., Raiz, R. and Cançado, E. L. 2002. Serum soluble interleukin-2 receptor, interleukin-6, and tumor necrosis factor- α levels in children with celiac disease: response to treatment. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 35(4): 513-517.
- Romero-Adrián, T. B., Leal-Montiel, J. and Fernandez, G. 2015. Celiac disease: participation of cytokines and other factors in the immune response. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, 1(1): 1-6.
- Roos, S., Kärner, A. and Hallert, C. 2006. Psychological well-being of adult coeliac patients treated for 10 years. *Digestive and Liver Disease*, 38(3): 177-180.
- Roshan, B., Leffler, D. A., Jamma, S., Dennis, M., Sheth, S., Falchuk, K. and Kelly, C. P. 2011. The incidence and clinical spectrum of refractory celiac disease in a north american referral center. *Official Journal of the American College of Gastroenterology| ACG*, 106(5): 923-928.
- Rostami, K., Kerckhaert, J., Tiemessen, R., von Blomberg, M. B., Meijer, J. W. and Mulder, C. J. 1999. Sensitivity of antiendomysium and antigliadin antibodies in untreated celiac disease: disappointing in clinical practice. *Official Journal of the American College of Gastroenterology*, 94(4): 888-894.
- Rostami-Nejad, M., Villanacci, V., Hogg-Kollars, S., Volta, U., Manenti, S., Reza-Zali, M. and Rostami, K. 2013. Endoscopic and histological pitfalls in the diagnosis of

- celiac disease: A multicentre study assessing the current practice. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*, 105(6): 326-333.
- Rubio-Tapia, A., Hill, I. D., Semrad, C., Kelly, C. P., Greer, K. B., Limketkai, B. N. and Lebwohl, B. 2023. American College of Gastroenterology guidelines update: Diagnosis and management of celiac disease. *Official Journal of the American College of Gastroenterology*, 118(1): 59-76.
- Rubio-Tapia, A., Ludvigsson, J. F., Choung, R. S., Brantner, T. L., Rajkumar, S. V., Landgren, O. and Murray, J. A. 2016. Increased mortality among men aged 50 years old or above with elevated IgA anti-transglutaminase antibodies: NHANES III. *BMC Gastroenterology*, 16(1): 1-6.
- Rujner, J., Socha, J., Romańczuk, W., Stolarczyk, A., Woźniewicz, B., Gregorek, H. and Syczewska, M. 2002. Individual sensitivity of jejunal mucosa to small doses of gluten in coeliac disease. *Wiadomosci Lekarskie*, 55(9-10): 554-560.
- Sahin, Y. and Mermer, S. 2022. Frequency of celiac disease and distribution of HLA-DQ2/DQ8 haplotypes among siblings of children with celiac disease. *World Journal of Clinical Pediatrics*, 11(4): 351.
- Salmi, T. T., Collin, P., Korponay-Szabo, I. R., Laurila, K., Partanen, J., Huhtala, H. and Kaukinen, K. 2006. Endomysial antibody-negative coeliac disease: clinical characteristics and intestinal autoantibody deposits. *Gut*, 55(12): 1746-1753.
- Sánchez, E., Alizadeh, B. Z., Valdigem, G., Ortego-Centeno, N., Jiménez-Alonso, J., de Ramón, E. and Koeleman, B. P. 2007. MYO9B gene polymorphisms are associated with autoimmune diseases in Spanish population. *Human Immunology*, 68(7): 610-615.
- Sapone, A., De Magistris, L., Pietzak, M., Clemente, M. G., Tripathi, A., Cucca, F. and Fasano, A. 2006. Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. *Diabetes*, 55(5): 1443-1449.
- Schlegel, N., Meir, M., Spindler, V., Germer, C. T. and Waschke, J. 2011. Differential role of Rho GTPases in intestinal epithelial barrier regulation in vitro. *Journal of Cellular Physiology*, 226(5): 1196-1203.
- Schumann, M., Siegmund, B., Schulzke, J. D. and Fromm, M. 2017. Celiac disease: role of the epithelial barrier. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 3(2): 150-162.

- Senger, S., Sapone, A., Fiorentino, M. R., Mazzarella, G., Lauwers, G. Y. and Fasano, A. 2015. Celiac disease histopathology recapitulates hedgehog downregulation, consistent with wound healing processes activation. *PLoS One*, 10(12): 1446-1534.
- Sestak, K., Dufour, J. P., Liu, D. X., Rout, N., Alvarez, X., Blanchard, J. and Doyle, A. G. 2018. Beneficial effects of human anti-interleukin-15 antibody in gluten-sensitive rhesus macaques with celiac disease. *Frontiers in Immunology*, 9(1): 1603.
- Sghiri, R., Hassine, H. B., Almogren, A., Shakoor, Z. and Alswayyed, M. 2023. Diagnostic performances of celiac disease serological tests among Saudi patients. *Saudi Journal of Gastroenterology: Official Journal of the Saudi Gastroenterology Association*, 29(1): 31.
- Shakir, S. K., AL-Saeed, A. H. and Abdulwahid, A. A. 2021. Estimation of some hematological parameters, liver enzymes and iron mineral in adult of celiac disease patients. *Basrah Journal of Science*, 39(3): 484-495.
- Shannahan, S. and Leffler, D. A. 2017. Diagnosis and updates in celiac disease. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics*, 27(1): 79-92.
- Sharma, N., Bhatia, S., Chunduri, V., Kaur, S., Sharma, S., Kapoor, P. and Garg, M. 2020. Pathogenesis of celiac disease and other gluten related disorders in wheat and strategies for mitigating them. *Frontiers in Nutrition*, 7(1): 6.-13.
- Sheikhpour, E., Noorbakhsh, P., Foroughi, E., Farahnak, S., Nasiri, R. and Neamatzadeh, H. 2018. A survey on the role of interleukin-10 in breast cancer: A narrative. *Reports of Biochemistry and Molecular Biology*, 7(1): 30.
- Shoeib, S., El-Shebiny, E., Efat, A. and El-Hady, K. A. 2019. Human leukocyte antigen in medicine. *Menoufia Medical Journal*, 32(4): 1197.
- Singh, P., Arora, A., Strand, T. A., Leffler, D. A., Catassi, C., Green, P. H. and Makharia, G. K. 2018. Global prevalence of celiac disease: systematic review and meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 16(6): 823-836.
- Singh, P., Arora, S., Lal, S., Strand, T. A. and Makharia, G. K. 2015. Risk of celiac disease in the first-and second-degree relatives of patients with celiac disease: a systematic review and meta-analysis. *Official Journal of the American College of Gastroenterology*, 110(11): 1539-1548.

- Singh, P., Arora, S., Singh, A., Strand, T. A. and Makharia, G. K. 2016. Prevalence of celiac disease in Asia: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 31(6): 1095-1101.
- Sollid, L. M. and Jabri, B. 2005. Is celiac disease an autoimmune disorder?. *Current Opinion in Immunology*, 17(6): 595-600.
- Sollid, L. M., Qiao, S. W., Anderson, R. P., Gianfrani, C. and Koning, F. 2012. Nomenclature and listing of celiac disease relevant gluten T-cell epitopes restricted by HLA-DQ molecules. *Immunogenetics*, 64(1): 455-460.
- Sperandeo, M. P., Tosco, A., Izzo, V., Tucci, F., Troncone, R., Auricchio, R. and Greco, L. 2011. Potential celiac patients: a model of celiac disease pathogenesis. *PloS One*, 6(7): 21281.
- Spijkerman, M., Tan, I. L., Kolkman, J. J., Withoff, S., Wijmenga, C., Visschedijk, M. C. and Weersma, R. K. 2016. A large variety of clinical features and concomitant disorders in celiac disease—a cohort study in the Netherlands. *Digestive and Liver Disease*, 48(5): 499-505.
- Spolski, R. and Leonard, W. J. 2008. Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity. *Annual Review of Immunology*, 26(1): 57-79.
- Stamnaes, J. and Sollid, L. M. 2015. Celiac disease: autoimmunity in response to food antigen. In *Seminars in immunology*. Academic Press, 27(5): 343-352.
- Stauble, T. M. 2013. Celiac disease: A gluten free diet and diet quality. MSc. Thesis, University of Kentucky, 61 page, Kentucky.
- Stefanelli, G., Viscido, A., Longo, S., Magistrini, M. and Latella, G. 2020. Persistent iron deficiency anemia in patients with celiac disease despite a gluten-free diet. *Nutrients*, 12(8): 2176.
- Størdal, K., White, R. A. and Eggesbø, M. 2013. Early feeding and risk of celiac disease in a prospective birth cohort. *Pediatrics*, 132(5): 1202-1209.
- Sturgess, R. P., Hooper, L. B., Spencer, J., Hung, C. H., Nelufer, J. M. and Ciclitira, P. J. 1992. Effects of interferon- γ and tumour necrosis factor- α on epithelial HLA class-II expression on jejunal mucosal biopsy specimens cultured in vitro. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 27(11): 907-911.

- Sutherland, A. P., Van Belle, T., Wurster, A. L., Suto, A., Michaud, M., Zhang, D. and Von Herrath, M. 2009. Interleukin-21 is required for the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes*, 58(5): 1144-1155.
- Tolone, C., Piccirillo, M., Dolce, P., Alfiero, S., Arenella, M., Sarnataro, M. and Strisciuglio, C. 2021. Celiac disease in pediatric patients according to HLA genetic risk classes: a retrospective observational study. *Italian Journal of Pediatrics*, 47(1): 1-8.
- Tonutti, E., Visentini, D., Picierno, A., Bizzaro, N., Villalta, D., Tozzoli, R. and Brusca, I. 2009. Diagnostic efficacy of the ELISA test for the detection of deamidated anti-gladiadin peptide antibodies in the diagnosis and monitoring of celiac disease. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 23(3): 165-171.
- Treem, W. R. 2004. Emerging concepts in celiac disease. *Current Opinion in Pediatrics*, 16(5): 552-559.
- Troncone, R., Greco, L., Mayer, M., Paparo, F., Caputo, N., Micillo, M. and Auricchio, S. 1996. Latent and potential coeliac disease. *Acta Paediatrica*, 85(1): 10-14.
- Trowsdale, J. 2011. The MHC, disease and selection. *Immunology Letters*, 137(2): 1-8.
- Tully, M. A. 2008. Pediatric celiac disease. *Gastroenterology Nursing*, 31(2): 132-140.
- Tursi, A., Brandimarte, G. and Giorgetti, G. M. 2003. Prevalence of antitissue transglutaminase antibodies in different degrees of intestinal damage in celiac disease. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 36(3): 219-221.
- Vader, W., Stepniak, D., Kooy, Y., Mearin, L., Thompson, A., van Rood, J. J. and Koning, F. 2003. The HLA-DQ2 gene dose effect in celiac disease is directly related to the magnitude and breadth of gluten-specific T cell responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(21): 12390-12395.
- Van Belzen, M. J., Koeleman, B. P. C., Crusius, J. B. A., Meijer, J. W. R., Bardoel, A. F. J., Pearson, P. L. and Wijmenga, C. 2004. Defining the contribution of the HLA region to cis DQ2-positive coeliac disease patients. *Genes and Immunity*, 5(3): 215-220.
- Van Leeuwen, M. A., Lindenberg-Kortleve, D. J., Raatgeep, H. C., De Ruiter, L. F., De Krijger, R. R., Groeneweg, M. and Samsom, J. N. 2013. Increased production of interleukin-21, but not interleukin-17A, in the small intestine characterizes pediatric celiac disease. *Mucosal Immunology*, 6(6): 1202-1213.

- Vaquero, L., Caminero, A., Nuñez, A., Hernando, M., Iglesias, C., Casqueiro, J. and Vivas, S. 2014. Coeliac disease screening in first-degree relatives on the basis of biopsy and genetic risk. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 26(3): 263-267.
- Viken, M. K., Flâm, S. T., Skrivarhaug, T., Amundsen, S. S., Sollid, L. M., Drivvoll, A. K. and Lie, B. A. 2017. HLA class II alleles in Norwegian patients with coexisting type 1 diabetes and celiac disease. *HLA*, 89(5): 278-284.
- Villanacci, V., Ceppa, P., Tavani, E., Vindigni, C. and Volta, U. 2011. Coeliac disease: the histology report. *Digestive and Liver Disease*, 43(4): 385-395.
- Villanacci, V., Vanoli, A., Leoncini, G., Arpa, G., Salviato, T., Bonetti, L. R. and Parente, P. 2020. Celiac disease: histology-differential diagnosis-complications. A practical approach. *Pathologica*, 112(3): 186.
- Voisine, J. and Abadie, V. 2021. Interplay between gluten, HLA, innate and adaptive immunity orchestrates the development of coeliac disease. *Frontiers in Immunology*, 12(1): 6743-6813.
- Volta, U., Caio, G., Giancola, F., Rhoden, K. J., Ruggeri, E., Boschetti, E. and De Giorgio, R. 2016. Features and progression of potential celiac disease in adults. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 14(5): 686-693.
- Vorobjova, T., Tagoma, A., Oras, A., Alnek, K., Kisand, K., Talja, I. and Uiibo, R. 2019. Celiac disease in children, particularly with accompanying type 1 diabetes, is characterized by substantial changes in the blood cytokine balance, which may reflect inflammatory processes in the small intestinal mucosa. *Journal of Immunology Research*, 19(2): 198.
- Wirth, J. A., Jensen, K. A., Post, P. L., Bement, W. M. and Mooseker, M. S. 1996. Human myosin-IXb, an unconventional myosin with a chimerin-like rho/rac GTPase-activating protein domain in its tail. *Journal of Cell Science*, 109(3): 653-661.
- Wolters, V. M., Verbeek, W. H., Zhernakova, A., Onland-Moret, C., Schreurs, M. W., Monsuur, A. J. and Mulder, C. J. 2007. The MYO9B gene is a strong risk factor for developing refractory celiac disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 5(12): 1399-1405.
- Wroblowa, K., Kolorz, M., Pav, I., Horakova, Z., Filipova, P., Bartos, M. and Bartosova, L. 2014. Frequencies of HLA-DQ2 and HLA-DQ8 haplotypes in Czech and Slovak

- coeliac patients and the healthy population. *Acta Biochimica Polonica*, 61(1): 191-193.
- Wu, Y., Liu, B., Lin, W., Xu, Y., Li, L., Zhang, Y. and Xu, A. 2007. Human leukocyte antigen class II alleles and risk of cervical cancer in China. *Human Immunology*, 68(3): 192-200.
- Yan, D. and Holt, P. R. 2009. Willem Dicke. Brilliant clinical observer and translational investigator. Discoverer of the toxic cause of celiac disease. *Clinical and Translational Science*, 2(6): 446-448.
- Ylönen, V., Lindfors, K., Repo, M., Huhtala, H., Fuchs, V., Saavalainen, P. and Kurppa, K. 2020. Non-biopsy serology-based diagnosis of celiac disease in adults is accurate with different commercial kits and pre-test probabilities. *Nutrients*, 12(9): 2736.
- Yokota, S. H., Geppert, T. D. and Lipsky, P. E. 1988. Enhancement of antigen-and mitogen-induced human T lymphocyte proliferation by tumor necrosis factor- α . *Journal of Immunology*, 140(2): 531-536.
- Yoosuf, S. and Makharia, G. K. 2019. Evolving therapy for celiac disease. *Frontiers in Pediatrics*, 7(1): 193.
- Younis, S. T., Farhood, H. F. and Wtw, M. A. 2014. Nutritional and Neurological Assessment in Adult Patients with Celiac Disease. *Medical Journal of Babylon*, 11(4): 4-8.
- Yuksel, M., Kaplan, M., Ates, I., Kilic, Z. M. Y., Kilic, H., Suna, N. and Kayacetin, E. 2016. The role of soluble tumor necrosis factor like weak inducer of apoptosis and interleukin-17A in the etiopathogenesis of celiac disease: A cross-sectional study. *Medicine*, 95(26): 393-397.
- Zamani, M., Modares-Sadeghi, M., Shirvani, F., Zamani, H. and Emami, M. H. 2014. The involvement of the HLA-DQB 1 alleles in the risk and the severity of Iranian coeliac disease patients. *International Journal of Immunogenetics*, 41(4): 312-317.
- Zanzi, D., Stefanile, R., Santagata, S., Iaffaldano, L., Iaquinto, G., Giardullo, N. and Mazzearella, G. 2011. IL-15 interferes with suppressive activity of intestinal regulatory T cells expanded in Celiac disease. *Official Journal of the American College of Gastroenterology*, 106(7): 1308-1317.

- Zhang, T. Y., Lin, Y., Fan, R., Hu, S. R., Cheng, M. M., Zhang, M. C. and Zhong, J. 2016. Potential model for differential diagnosis between Crohn's disease and primary intestinal lymphoma. *World Journal of Gastroenterology*, 22(42): 9411.
- Zhang, X., Zhang, B. Q., Wu, H. Y., Lu, C. B., Lü, G. F., Liu, D. T. and Gao, D. R. 2018. Effect of high-molecular-weight glutenin subunit deletion on soft wheat quality properties and sugar-snap cookie quality estimated through near-isogenic lines. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(5): 1066-1073.
- Zintzaras, E. and Germanis, A. E. 2006. Performance of antibodies against tissue transglutaminase for the diagnosis of celiac disease: meta-analysis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(2): 187-192.
- Zubillaga, P., Vidales, M. C., Zubillaga, I., Ormaechea, V., García-Urkía, N. and Vitoria, J. C. 2002. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 genetic markers and clinical presentation in celiac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 34(5): 548-554.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : **Sardar Khudhur Aswad HASAK**

Eğitim

Doktora	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2022-2024
Yüksek Lisans	Tikrit Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2016-2018
Lisans	Medill Üniversitesi Sağlık ve Tıp Teknolojisi Fakültesi Tıbbi Laboratuvar Teknikleri	2010-2014