

**T.C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**BESİN ALERJİSİ OLAN ÇOCUKLARDA BARSAK MİKROBİYOTASI  
VE TOLL-LİKE RESEPTÖR 2 VE 4 POLİMORFİZİMİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ  
Dr. Elif BEYAZIT**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Mehmet KILIÇ**

**ELAZIĞ  
2020**

**T.C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**BESİN ALERJİSİ OLAN ÇOCUKLARDA BARSAK MİKROBİYOTASI  
VE TOLL-LİKE RESEPTÖR 2 VE 4 POLİMORFİZİMİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ  
Dr. Elif BEYAZIT**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Mehmet Kılıç**

**ELAZIĞ  
2020**

## DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. Ahmet KAZEZ

## DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Erdal YILMAZ

## Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafınızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet KILIÇ \_\_\_\_\_Danışman

## Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri

.....

.....

.....

.....

.....

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesi için değerli katkılarını esirgemeyen aşağıda ismi geçen kişilere tüm içtenliğimle teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık tezimin hazırlanmasında bana baştan sona yol gösteren ve bilgi birikimleri ile değerli katkılarını eksik etmeyen çok değerli hocam Prof. Dr. Mehmet Kılıç'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamın laboratuvar aşamasında yardımlarını esirgemeyen, değerli katkılarıyla tezimin son halini almasına yardımcı olan değerli hocam Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Ebru Önalın'a teşekkür ederim.

Çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları bölümü uzmanlarına, asistanlarına, hemşirelerine ve tüm yardımcı sağlık hizmetleri personeline teşekkür ederim.

Son olarak tüm yaşamım boyunca bana her türlü destek veren ve yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkürler.

## ÖZET

İmmünglobulin E (IgE) ve IgE bağımlı olmayan besin alerjisi prevalansı son on yılda dramatik bir şekilde artmış ve neredeyse bazı ülkelerde popülasyonun %10'una yaklaşan bir kısmını etkiler olmuştur. Artan kanıtlar erken immünolojik gelişimin sağlanmasında konakçı mikrobiyal florasının anahtar bir rol oynadığını göstermekte ve bu floranın besin alerjisi ve sensitizasyonu gibi alerjik hastalık risklerini modifiye edebileceğini göstermektedir. Bu açıdan değerlendirildiğinde immün sistem ve barsak mikrobiyotasının ortak düzenleme yolları, değişik hücrelerden salınan toll-benzeri reseptörler (TLR) gibi bazı mekanizmaları içermektedir. TLR'ler, özellikle TLR2 ve TLR4 inflamatuvar kaskadın aktivasyonunun baskılanmasında hayati rol oynarlar ve spesifik patojen mikro-organizmalara karşı gelişen inflamatuvar cevabı düzenlerler. Çalışmamız besin alerjisi, TLR gen polimorfizimi ve barsak mikrobiyotası arasındaki ilişkiyi değerlendirme amacıyla yapılmıştır.

Toll-benzeri reseptör polimorfizimleri 1,5-23 ay yaş aralığındaki 130 yumurta ve/veya süt alerjili çocuk ile 110 sağlam kontrolde prospektif olarak ölçülerek sonuçlar kıyaslandı. Dört adet polimorfizm (TLR 2 Rs1898830/Rs5743708 ve TLR4 Rs4986790/ Rs4986791) allelik diskriminasyon polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile genotiplendi. Barsak mikrobiyota analizi high-throughput paralel dizi analizi ile yapıldı. Besin alerjili hasta grubunda TLR4 geni Rs4986790 (Asp299Gly) single nükleotid polimorfizmi (SNP) için Majör/Minör allel frekansı 0,788/0,212 kontrol grubunda 0,719/0,280 olarak saptandı ( $p=0,017$ ). Her iki grup arasında genotip (AA, AG, GG) sayıları açısından anlamlı bir fark mevcuttu ( $p=0,016$ ). Barsak mikrobiyota analizinde besin alerjili grupta gaitada *Firmicutes* filum'u artmış konsantrasyonlarda saptandı. Bu çalışmada Rs4986791 (Thr399Ile) alleli dışındaki diğer TLR polimorfizimleri ile besin alerjisi arasında herhangi bir ilişki olmadığı sonucuna varıldı.

Sonuç olarak, bu çalışmada TLR4 gen polimorfizimlerinin ve barsak mikrobiyota değişikliklerinin besin alerjisi gelişiminde kısmi rol oynadıkları gösterilmiştir. Barsak mikrobiyotası içeriğini ve fonksiyonunu modüle eden değişik mikrobiyal türleri inceleyen ve bunların TLR transkripsiyon yolları ile olan ilişkisini ortaya koyan daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar kelimeler:** Besin alerjisi, Toll-benzeri reseptör 2, Toll-benzeri reseptör 4, genetik polimorfizim, barsak mikrobiyotası



## ABSTRACT

### EVALUATION OF TOLL-LIKE RECEPTORS 2 AND 4 POLYMORPHISM AND INTESTINAL MICROBIOTA IN CHILDREN WITH FOOD ALLERGY

The prevalence of Immunglobulin E (IgE) and non-IgE mediated food allergy has increased dramatically in recent decades affecting nearly 10% of the population in some countries. Accumulating evidence suggests that resident microbial communities play a key role in early host immunologic development and can modify risk for allergic disorders including food allergy and sensitization. In this context, mutual regulation between immune system and gut microbiota is achieved through several mechanisms including the engagement of toll-like receptors (TLRs) which is expressed on numerous cell types. TLRs, specisifically TLR2 and TLR4 play a pivotal role in suppressing the activation of the inflammatory cascade in order to maintain the balance of intestinal homeostasis and in promoting inflammatory responses to specific pathogenic microorganisms. In this study we aimed to explore association between food allergy and TLR gene polymorphisms in association with gut microbiota.

Toll-Like Receptors polymorphism frequencies in 130 infants aged 1,5-23 months with egg and/or milk allergy in a prospective cohort were compared 110 non-food allergic controls. Four candidate polymorhpsims (TLR 2 Rs1898830/Rs5743708 and TLR4 Rs4986790/ Rs4986791) were genotyped by allelic discrimination polymerase chain rection (PCR) method. Gut microbiota analysis was achieved by using high-throughput sequencing. The mutant TLR4 Rs4986790 (Asp299Gly) single nucleotide polymorphism (SNP) major/minor allele frequency was 0.788/0.212 in food allergy patients and 0.719/0.280 in controls ( $p=0.017$ ). There was a statistically significant differece between groups in terms of genotype frequencies (AA, AG, GG). Gut microbiota analysis revealed increased *Firmicutes* phylum in gaita of the patients with food allergy. Except for mutant Rs4986791 (Thr399Ile) allele, the other TLR polymorphisms were not associated with food allergy in children.

In conclusion, this study demonstrated a partial role of TLR4 gene polymorphism and gut microbiota in the development of food allergy. Future work in this area will be required to clarify the roles of different microbial strains that

modulates gut microbiota composition and function in conjunction with TLR transcription pathways.

**Key Words:** Food allergy, Toll-like receptor 2, Toll-like receptor 4, genetic polymorphism, gut microbiota



## İÇİNDEKİLER

|                                                             |      |
|-------------------------------------------------------------|------|
| <b>BAŞLIK SAYFASI</b>                                       | i    |
| <b>DEKANLIK ONAYI</b>                                       | iii  |
| <b>TEŞEKKÜR</b>                                             | iii  |
| <b>ÖZET</b>                                                 | iv   |
| <b>ABSTRACT</b>                                             | vi   |
| <b>İÇİNDEKİLER</b>                                          | viii |
| <b>TABLO LİSTESİ</b>                                        | xi   |
| <b>ŞEKİL LİSTESİ</b>                                        | xii  |
| <b>KISALTMALAR LİSTESİ</b>                                  | xiii |
| <b>1. GİRİŞ</b>                                             | 1    |
| 1.1. Besin Alerjileri                                       | 3    |
| 1.1.1. Tarihçe                                              | 3    |
| 1.1.2. Tanım                                                | 4    |
| 1.1.3. Epidemiyoloji                                        | 5    |
| 1.1.4. Patofizyolojik Mekanizmalar                          | 6    |
| 1.1.4.1. Barsak Mukozal Defans Sistemleri                   | 7    |
| 1.1.4.2. Oral Tolerans                                      | 7    |
| 1.1.4.3. İmmünolojik Mekanizmalar                           | 9    |
| 1.1.4.3.1. İmmünglobulin E Aracılı Besin Alerjileri         | 9    |
| 1.1.4.3.2. İmmünglobulin E Aracılı Olmayan Besin Alerjileri | 10   |
| 1.1.4.4. Genetik Faktörler                                  | 10   |
| 1.1.5. Besin Alerjenleri                                    | 11   |
| 1.1.5.1. İnek Sütü                                          | 11   |
| 1.1.5.2. Yumurta                                            | 12   |
| 1.1.5.3. Meyve ve Sebze Alerjileri                          | 13   |
| 1.1.5.4. Yer Fıstığı ve Ağaç Fıstıkları Alerjileri          | 14   |
| 1.1.5.5. Balık ve Deniz Mahsülleri Alerjileri               | 14   |
| 1.1.5.6. Et Alerjisi                                        | 14   |
| 1.1.5.7. Tahıl Alerjisi                                     | 15   |

|                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1.5.8. Bal ve Çikolata                                                          | 16 |
| 1.1.6. Besin Alerjileri ile İlişkili Klinik Tablolar                              | 16 |
| 1.1.7. Besin Alerjilerinde Tanısal Yöntemler                                      | 17 |
| 1.1.7.1. Öykü ve Fizik Muayene                                                    | 18 |
| 1.1.7.2. Tanısal Testler                                                          | 18 |
| 1.1.7.2.1. Deri Prik Testi                                                        | 18 |
| 1.1.7.2.2. Serum Spesifik IgE                                                     | 19 |
| 1.1.7.2.3. Atopi Yama Testi                                                       | 19 |
| 1.1.7.2.4. Bazofil Histamin Salınım Testi                                         | 20 |
| 1.1.7.2.5. Besin Provokasyon Testi                                                | 20 |
| 1.1.7.2.6. Eliminasyon Diyeti                                                     | 21 |
| 1.1.8. Besin Alerjisinde Tedavi                                                   | 21 |
| 1.1.8.1. Akut Reaksiyonların Tedavisi                                             | 21 |
| 1.1.8.2. Uzun Süreli Tedavi                                                       | 21 |
| 1.2. İntestinal Mikrobiyota ve Besin Alerjileri                                   | 23 |
| 1.3. Toll-Benzeri Reseptörler                                                     | 28 |
| 1.3.1. TLR-2 Geni ve Fonksiyonu                                                   | 29 |
| 1.3.2. TLR-4 Geni ve Fonksiyonu                                                   | 30 |
| 1.3.3. TLR-2 ve TLR-4 Gen Polimorfizimleri                                        | 31 |
| 1.3.4. Toll-Benzeri Reseptörler ve Barsak Mikrobiyotası                           | 34 |
| <b>2. GEREÇ ve YÖNTEM</b>                                                         | 37 |
| 2.1. Çalışmaya Alınma Kriterleri ve Grupların Oluşturulması                       | 37 |
| 2.2. Çalışmadan Dışlanma Kriterleri                                               | 39 |
| 2.3. Moleküler Genetik Analizler                                                  | 39 |
| 2.3.1. DNA İzolasyon Protokolü                                                    | 39 |
| 2.3.2. DNA Konsantrasyonu ve Saflık Derecesinin Ölçülmesi                         | 41 |
| 2.3.3. Varyantların Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Genotiplendirilmesi | 41 |
| 2.3.3.1. TaqMan Probları ile Genotiplendirme                                      | 41 |
| 2.4. Gaitadan DNA İzolasyonu                                                      | 44 |
| 2.4.1. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu [Real Time           |    |

|                                                                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Quantitative Polymerase Chain Reaction (QRT-PCR)]                                                                                  | 45 |
| 2.5. İstatistiksel Analizler                                                                                                       | 46 |
| <b>3. BULGULAR</b>                                                                                                                 | 47 |
| 3.1 Hasta ve Sağlıklı Kontrol Gruplarının Genel Özellikleri                                                                        | 47 |
| 3.2. Tek Nükleotid Polimorfizim Sonuçları                                                                                          | 48 |
| 3.2.1. TLR2 Rs1898830 tek nükleotid polimorfizim sonuçları                                                                         | 48 |
| 3.2.2. TLR2 Rs5743708 (Arg753Gln) tek nükleotid polimorfizim sonuçları                                                             | 48 |
| 3.2.3. TLR4 Rs4986790 (Asp299Gly) tek nükleotid polimorfizim sonuçları                                                             | 48 |
| 3.2.4. TLR4 Rs4986791 (Thr399Ile) tek nükleotid polimorfizim sonuçları                                                             | 48 |
| 3.3. Besin Alerjili Hasta Grubunun Demografik ve Klinik Verileri ile TLR2 ve TLR4 Gen Polimorfizimlerinin Karşılaştırma Sonuçları  | 50 |
| 3.4. Besin Alerjili Hasta Grubunun Laboratuvar Değerleri ile TLR2 ve TLR4 Gen Polimorfizimlerinin Karşılaştırma Sonuçları          | 53 |
| 3.5. Besin Alerjili Hasta Grubunun In Vivo Alerji Testleri ile TLR2 ve TLR4 Gen Polimorfizimlerinin Karşılaştırma Sonuçları        | 53 |
| 3.6. Besin Alerjili Grupta ve Kontrol Grubunda Barsak Mikrobiyotasının Klinik ve Laboratuvar Bulguları ile Karşılaştırma Sonuçları | 59 |
| 3.7. Besin Alerjili Hasta Grubunda Barsak Mikrobiyotasının TLR2 ve TLR4 Gen Polimorfizimi ile Karşılaştırma Sonuçları              | 60 |
| <b>4. TARTIŞMA</b>                                                                                                                 | 61 |
| <b>5. KAYNAKLAR</b>                                                                                                                | 68 |
| <b>6. EKLER</b>                                                                                                                    | 89 |
| <b>7. ÖZGEÇMİŞ</b>                                                                                                                 | 90 |

## TABLO LİSTESİ

|                                                                                                                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1.</b> TLR gen polimorfizimleri ve hastalıklar ile ilişkileri                                                                                                                                         | 33 |
| <b>Tablo 2.</b> FNDC5 genindeki polimorfizimlere ait referans numaraları ve dizileri                                                                                                                           | 42 |
| <b>Tablo 3.</b> RT-PZR’ da kullanılan genotipleme testleri                                                                                                                                                     | 42 |
| <b>Tablo 4.</b> RT-PZR reaksiyon karışımı                                                                                                                                                                      | 43 |
| <b>Tablo 5.</b> Genotipleme için uygulanan RT-PZR programı                                                                                                                                                     | 43 |
| <b>Tablo 6.</b> QRT-PCR’da kullanılan primerler                                                                                                                                                                | 45 |
| <b>Tablo 7.</b> QRT-PCR için kullanılan bileşikler                                                                                                                                                             | 46 |
| <b>Tablo 8.</b> RT-PCR programı                                                                                                                                                                                | 46 |
| <b>Tablo 9.</b> Besin alerjisi ve kontrol grubunun klinik ve demografik verilerinin karşılaştırılması                                                                                                          | 47 |
| <b>Tablo 10.</b> T Besin alerjili hastalarda ve sağlıklı kontrol grubunda TLR2 ve TLR4 gen polimorfizimlerinin genotip sıklıkları ve allel frekansları                                                         | 49 |
| <b>Tablo 11.</b> Hastaların demografik ve klinik özellikleri ile TLR2 gen polimorfizimleri arasındaki ilişki                                                                                                   | 51 |
| <b>Tablo 12.</b> Hastaların demografik ve klinik özellikleri ile TLR4 gen polimorfizimleri arasındaki ilişki                                                                                                   | 52 |
| <b>Tablo 13.</b> Hastaların in vitro laboratuvar parametreleri ile TLR2 gen polimorfizimleri arasındaki ilişki                                                                                                 | 55 |
| <b>Tablo 14.</b> Hastaların in vitro laboratuvar parametreleri ile TLR4 gen polimorfizimleri arasındaki ilişki                                                                                                 | 56 |
| <b>Tablo 15.</b> Hastalara uygulanan in vivo alerji testleri ile TLR2 gen polimorfizimleri arasındaki ilişki                                                                                                   | 57 |
| <b>Tablo 16.</b> Hastalara uygulanan in vivo alerji testleri ile TLR4 gen polimorfizimleri arasındaki ilişki                                                                                                   | 58 |
| <b>Tablo 17.</b> Besin alerjili hastalar ve sağlıklı kontrol grubunda gaitada <i>Bacteroides</i> , <i>Bifidobacterium</i> ve <i>Firmicutes</i> konsantrasyonlarının değerlendirilmesi                          | 59 |
| <b>Tablo 18.</b> Besin alerjili hasta ve sağlıklı kontrol grubu gaita mikrobiyotasındaki <i>Bacteroides</i> , <i>Bifidobacterium</i> ve <i>Firmicutes</i> ile Serum IgE arasındaki ilişkinin karşılaştırılması | 59 |
| <b>Tablo 19.</b> Besin alerjili hasta grubu gaita mikrobiyotasındaki <i>Bacteroides</i> , <i>Bifidobacterium</i> ve <i>Firmicutes</i> ile TLR2 gen polimorfizimleri arasındaki ilişki                          | 60 |
| <b>Tablo 20.</b> Besin alerjili hasta grubu gaita mikrobiyotasındaki <i>Bacteroides</i> , <i>Bifidobacterium</i> ve <i>Firmicutes</i> ile TLR4 gen polimorfizimleri arasındaki ilişki                          | 60 |

## ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1.** Barsak mikrobiyotasının oral tolerans ve besin alerjisi ile ilişkisinin şematik gösterimi 5
- Şekil 2.** Barsak mikrobiyotasının oral tolerans ve besin alerjisi ile ilişkisinin şematik gösterimi 27
- Şekil 3.** Barsak mikrobiyotasının hücre içi enerji değişikliğindeki rolü 36



## KISALTMALAR LİSTESİ

|                 |                                           |
|-----------------|-------------------------------------------|
| <b>BHRT</b>     | Bazofil histamin salınım testi            |
| <b>BPT</b>      | Besin provokasyon testi                   |
| <b>DA</b>       | Dalton ağırlığı                           |
| <b>DPT</b>      | Deri prik testi                           |
| <b>FcεRI</b>    | Fc epsilon RI                             |
| <b>FLG</b>      | Filaggrin                                 |
| <b>GALT</b>     | Mukoza ilişkili lenfoid doku              |
| <b>GIS</b>      | Gastrointestinal sistem                   |
| <b>GM-CSF</b>   | Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör |
| <b>HLA</b>      | İnsan lökosit antijeni                    |
| <b>IgE</b>      | İmmünglobulin E                           |
| <b>IL</b>       | İnterlökin                                |
| <b>ILC</b>      | İnnate lenfoid hücreler                   |
| <b>LPS</b>      | Lipopolisakkarid                          |
| <b>LRR</b>      | Lösinden zengin tekrar                    |
| <b>MD-2</b>     | Miyeloid farklılaşma proteini-2           |
| <b>MHC</b>      | Majör histokompatibilite kompleksi        |
| <b>MyD88</b>    | Miyeloid farklılaştırma faktörü 88        |
| <b>NF-kappa</b> | Nükleer faktör kappa B                    |
| <b>NK</b>       | Natural killer                            |
| <b>OAS</b>      | Oral alerji sendromu                      |
| <b>PZR</b>      | Polimeraz zincir reaksiyonu               |
| <b>RAST</b>     | Radioallergosorbent test                  |
| <b>ROS</b>      | Reaktif oksijen türleri                   |
| <b>sIgE</b>     | Spesifik İmmünglobulin E                  |
| <b>SNP</b>      | Tek nükleotid polimorfizimleri            |
| <b>Th2</b>      | Yardımcı T hücresi-2                      |
| <b>TIR</b>      | Toll/interleukin-1 reseptör               |
| <b>TLR</b>      | Toll-benzeri reseptörler                  |

## 1. GİRİŞ

Besin alerjileri besin proteinlerine karşı gelişen immün reaksiyonlardır. Besin alerjileri İmmünglobulin E (IgE) aracılı ve non IgE aracılı olmak üzere ikiye ayrılır ve hayatı tehdit edebilen ciddi reaksiyonlara yol açabilmektedir (1). Yapılan araştırmalara göre, üç yaşına kadar olan çocuklarda besin alerjisi prevalansı %6-8 olup, yedi yaş üzerinde ve erişkinlerde bu oran %2'den azdır (2). Besin alerjisinin prevalansının artmasının muhtemel nedenleri ise annenin diyeti ve bebeğin beslenmesi, obezite, tamamlayıcı besinlere geçiş zamanı gibi modifiye edilebilir faktörlerle ilişkili gibi gözükmemektedir (3). Çocuklarda, besin alerjilerinde %90 civarında sorumlu olan besinler; inek sütü, yumurta, fındık, fıstık türü kuruyemişler, soya, balık ve buğdaydır. Geri kalan %10'dan sorumlu olan besinler ise; tohumlar, susam, baklagiller, kabuklu deniz ürünleri, meyve ve sebzelerdir. Atopik dermatitli çocuklarda %35, astımlı çocuklarda ise %6-10 oranında besin alerjisi görülmektedir (4).

Gastrointestinal mukozal immünite gelişimi intrauterin başlar, doğumdan sonra genetik ve çevresel etkenlerle düzenlenir. Barsak epitelyum hücrelerinin apikal bölgelerinde özellikle peptidlerin, proteinlerin ve moleküler ağırlığı 600 Dalton Ağırlığından (DA) büyük makromolekülerin paraselüler yoldan serbest difüzyonunu önleyen sıkı bağlantılar mevcuttur. Yenidoğan döneminde, barsak epitelyal hücreleri ve aralarındaki sıkı bağlantılar tam işlev göremezler, erişkinlere göre barsak geçirgenliği daha fazladır. Yenidoğanlarda mukozal immün sistemi besinsel proteinlere ve zararsız bakterilere karşı tolerans oluştururken, aynı zamanda enterik patojenleri tanıyarak cevap oluşturmalıdır. Bu görev vücuttaki en büyük lenfoid organ olan mukoza ilişkili lenfoid doku (Gut Associated Lymphoid Tissue; GALT) tarafından gerçekleştirilir. Doğal immün sistemin, adaptif immün sistem tarafından besin proteinlerine karşı geliştirdiği immün cevabı kontrol etme yeteneği vardır. Bu işlemde dendritik hücreler ve Toll-benzeri reseptörler (Toll-like receptors; TLR) önemli bir rol oynar (5). Bu noktada alerjik yanıt üzerinde etkili olan bir diğer faktörün intestinal mikrobiyota olduğu rapor edilmiştir. İnsan vücudunda kommensal ve mutual şekilde yaşayan mikroorganizmaların tamamına mikrobiyota denmekte ve bu mikroorganizmaların genomuna da mikrobiyom denmektedir. Her ne kadar mikrobiyota dendiğinde ilk olarak gastrointestinal sistem (GIS) özellikle de kolon

florası aklımıza gelse de, GIS dışında genitoüriner sistem, deri ve solunum sisteminde de mikroorganizmalar bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile intestinal mikrobiyotanın aslında birçok metabolik olayda, sistemik ve mukozal immün sistem fonksiyonlarında önemli işlevleri olan bir "organ" gibi davrandığı anlaşılmıştır (6). Gram negatif bakteriler peptidoglikanlar ve lipopolisakkaritler üzerinden sekretuar immünglobulin (Ig) A ve intestinal alkalin fosfataz üretimini artırarak immün sistem gelişimine katkıda bulunurlar. Diğer yandan, *Bacteroides fragilis* polisakkarit A sayesinde, *Bacteroides thetaiotaomicron* ise Nükleer Faktör Kappa B (NF-kappa B) inaktivasyonu ile hücrel immünite, lenfoid organogenez ve mukozal immünite üzerinde etkili olur. Bunların dışında *Lactobaciller* ve *Escherichia coli* (E. coli) ise hem mukozal bariyerin oluşumuna katkıda bulunurken, hem de dendritik hücrelerin immün toleransını artırarak özellikle inflamatuvar bağırsak hastalığında önemli rol oynayan immün toleransın oluşmasını sağlarlar (7).

İnsanlarda en az 10 farklı TLR olduğu bilinmektedir. Her biri farklı mikrobiyal komponentleri tanır. Toll like reseptör 2'nin peptidoglikan ve bakteriyel lipopeptidlerle, TLR4'ün gram negatif lipopolisakkaritler (LPS) ile ilişkileri iyi bilinmektedir. Bu reseptörler, başta makrofajlar olmak üzere epitel hücreleri, mast hücreleri, dendritik hücreler, eozinofiller, nötrofiller, doğal öldürücü hücreler, T ve B hücrelerinde bulunurlar. Toll like reseptörler mikroorganizmalara karşı innate immün cevapta, mikrobiyal ürünleri tanıma reseptörleri olarak ve onların primer sensörleri olarak görev alırlar. Doğal immünite ile edinsel immünite arasında ilişki sağlayan en önemli transmembran proteinleridir. İmmün ve inflamatuvar genlerin indüksiyonunu sağlayan sinyal yollarını aktive ederler. Toll benzeri reseptörler, mikrobiyal ürünlerin primer sensörleri gibi davranır, immün ve inflamatuvar genlerin sentezini başlatacak mekanizmaları devreye sokarak, T ve B lenfositlerden oluşan kazanılmış (adaptif) immün yanıtı başlatırlar (8). Ancak TLR'nin gıda intoleransı ve alerjisi ile ilişkisi halen net olarak gösterilmemiştir. Konu ile alakalı yapılan tek çalışma Galli ve ark. (9) tarafından 2010 yılında yayınlanmıştır. Bu çalışmada TLR2 ve TLR4 genetik polimorfizimlerinin besin alerjisi ve egzema ile ilişkisi 159 çocuk üzerinde incelenmiştir. Yazarlar TLR2 ve 4 genetik polimorfizimi ve besin alerjisi arasında herhangi bir ilişki bulamadıklarını belirtmişlerdir. Ancak bu çalışmanın en büyük

kısıtlılığı 159 çocuk hastanın sadece 57 tanesinde besin alerjisi bulunmasıdır. Genetik polimorfizimin incelendiği bir çalışmada kesin bir yargıya varmak için daha fazla sayıda örneklem incelemesi yapılması gerektiği çalışmanın yazarları tarafından da belirtilmiştir.

Biz bu çalışmamızda kliniğimizde besin alerjisi tanısı almış 1,5-23 (ay) yaş aralığındaki hastaların demografik özelliklerini belirlemeyi ve bu hasta grubunda besin alerjisi ile TLR2 ve TLR4 genetik polimorfizimlerinin ilişkisini saptamayı amaçladık. Bununla birlikte TLR2 ve TLR4 gen polimorfizimleri ile intestinal mikrobiyota arasında herhangi bir ilişkinin var olup olmadığı da araştırdığımız bir diğer parametre idi.

## **1.1. Besin Alerjileri**

### **1.1.1. Tarihçe**

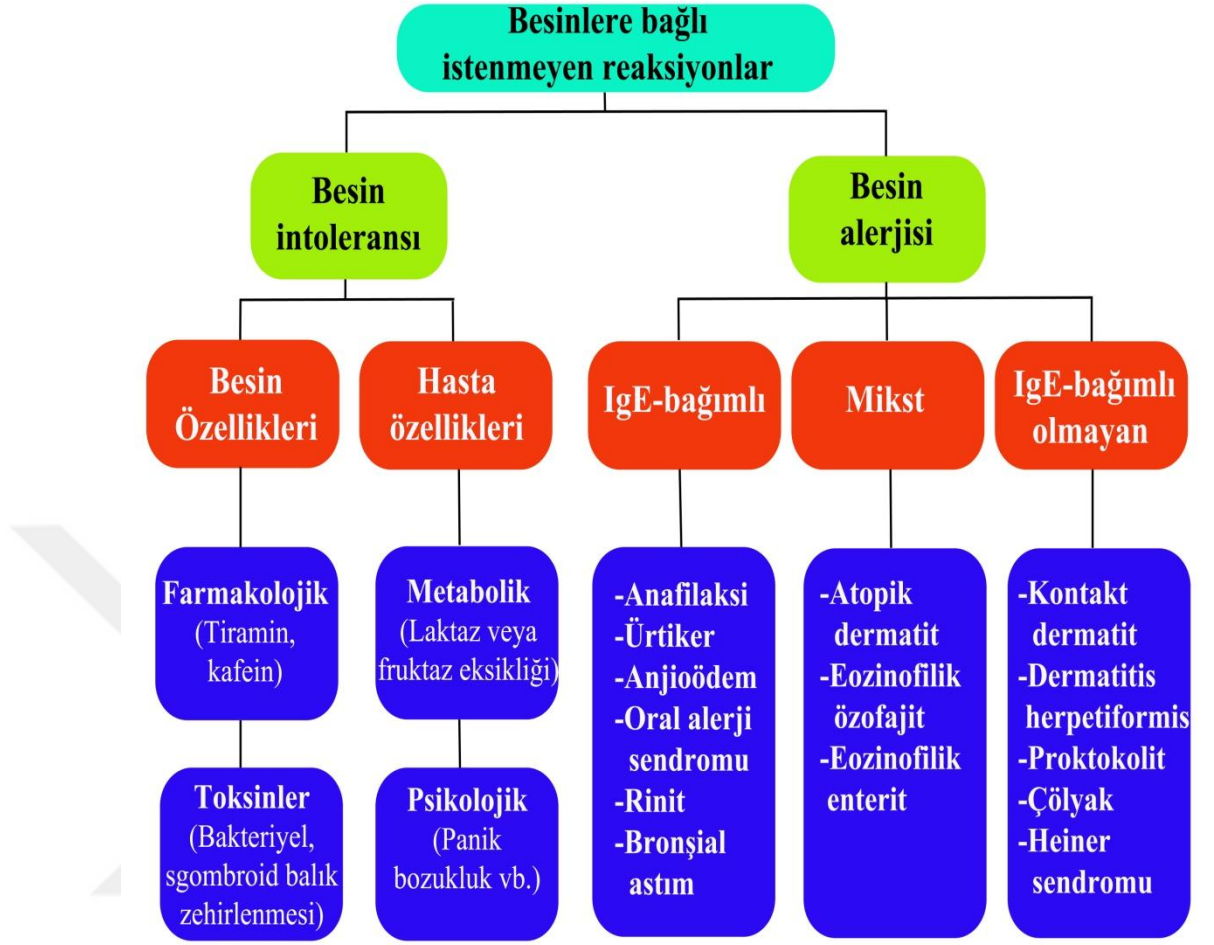
Besin alerjisinin tarihçesi günümüzden oldukça eski dönemlere, Hipokrat zamanına kadar uzanmaktadır (10). Hipokrat bundan yaklaşık 2500 yıl kadar önce ‘Besinler ilacınız, ilacınız besininiz olsun’ sözleriyle, besinlerin sağlıklı olmamız için önemine değinmiş, gıda ile oluşabilecek reaksiyonları ilk kez bu dönemde tanımlamıştır. Milattan sonra 1. ve 2. yüzyıllarda Yunan bilginler inek sütü ile oluşan reaksiyonlardan bahsetmişlerdir. Eski Roma dönemlerinden elde edilen belgelerde bazı kişilerde emniyetle ve sıkıntı olmadan yenilen yiyeceklerin bazı insanlarda ters besin reaksiyonlarına neden olabileceğini göstermektedir (11). Marcello Donati yumurta ile oluşan anaflaktik reaksiyonu ilk defa 16. yüzyılda, Philipp Sach ise balık ile oluşan anafilaktik reaksiyonu 17. yüzyılda tanımlamıştır (12). İnsanlarda besin alerjisine neden olan faktörlerin etki mekanizmaları 1921 yılında Carl Prausnitz ve Heinz Kustner’in yaptıkları bir çalışma ile ortaya konmuştur (13). İki araştırmacının 1921 yılında yayınladıkları bu çalışma balık alerjisi ile ilgili çığır açan bir çalışmadır. Çalışmada balığa alerjik bir kişi olan Kustner’in kan serumunun alerjik olmayan sağlıklı bir kişiye nakledilmesi ile balık alerjisinden sorumlu maddelerin başka bir kişiye geçirilebildiği gözlenmiştir. Prausnitz’in balık etini yedikten çok kısa bir süre sonra ön kol kısmında deri değişiklikleri gözlenmiş ve bu bölgeye Kustner serumu olarak adlandırılan serum enjekte edilmiştir. Bu test daha sonraları Prausnitz-Kustner

testi olarak adlandırılmış ve çok özel alerjenlere karşı bir hastanın reaksiyon gösterip göstermediğini belirlemek için immünolojik bir test olarak kullanılmaya başlanmıştır (14). Bu tarihten 1950 yıllarına kadar konu ile alakalı güvenilir çalışmalar mevcut olmamakla birlikte 1950 yılında Loveless süt alerjisi hakkında yaptığı plasebo kontrollü kör bir çalışmada hasta hikayesinin besin alerjisinin tanısında tek başına yeterli olmadığını rapor etmiştir (15). İmmünglobulin E (IgE) 1967 yılında bulunmuş ve alerji tanısında devrim yaratacak gelişmelerin önünü açmıştır. 1976’ da Charles May’in besin alerjisi tanısı için önerdiği çift kör, plasebo kontrollü oral besin provokasyon testi şu anda besin ile oluşan alerjik hastalıkların tanısında altın standart olmuştur (16).

### **1.1.2. Tanım**

Besin alerjileri vücudumuzun bağışıklık sistemi aracılığı ile besinlere karşı gösterdiği aşırı duyarlılık reaksiyonlarıdır (17). Bu reaksiyonlar immünolojik olarak ortaya çıkan reaksiyonlar olduğu için altta yatan mekanizmalar üç ana grupta toplanmıştır. Bu mekanizmalar IgE’ye bağlı, IgE’ye bağlı olmayan ve her ikisinin karışık olarak rol aldığı reaksiyonlar olarak sınıflandırılabilir (18).

Besin alerjilerine bağlı klinik belirtiler solunum sisteminde, dolaşım sisteminde veya ciltte farklı şekillerde ortaya çıkabilmekte, bazen anafilaksi gibi çok ciddi olabilen farklı klinik bulgular ortaya çıkarabilmektedirler. İnek sütü, yumurta, buğday, soya, fıstık, balık ve kabuklu deniz ürünleri alerjisi besin alerjilerinin büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Şekil 1’de besinlere karşı gelişen reaksiyonlar gösterilmiştir.



**Şekil 1.** Besinlere bağlı istenmeyen reaksiyonların şematik özeti

### 1.1.3. Epidemiyoloji

Hayatın ilk yıllarında daha fazla olmakla birlikte besin alerjisi sıklığı kişinin yaşı ve tükettiği gıda olmak üzere temelde 2 faktörle ilişkilidir (19). Bu farklılıkların çalışmalarda çoğunlukla göz ardı edilmesi sebebiyle besin alerjisinin tam olarak sıklığını ortaya koymak son derece güç olmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezinin 2013 yılında yayınladıkları bir bildiride 1997-2011 yılları arasında besin alerjisi prevalansının 0-17 yaş grubunda belirgin bir şekilde arttığını istatistiklerle ortaya koymuştur. Bu rapora göre 1997-1999 yılları arasında besin alerjisinin toplumdaki prevalansı %3,4 iken, 2009-2011 yılları arasında prevalans %5,1'e yükselmiştir (20). Bu rapordaki bir diğer ilginç nokta ise besin alerjisi sıklığının gelir durumu arttıkça yükseldiğidir. Yoksulluk sınırının altında geliri

olan ailelerdeki besin alerjisi sıklığı %4,4 iken, yoksulluk sınırının 2 katına kadar geliri olan ailelerde bu oran %5 ve 2 katı üzerinde geliri olan ailelerde besin alerjisi sıklığı %5,4 olarak rapor edilmiştir (20). Ülkemizde her ne kadar besin alerjisinin sıklığını net belirten geniş kapsamlı bir çalışma olmasa da Orhan ve ark. (21) yaptıkları bir çalışmada Karadeniz bölgesinde 6-9 yaş grubunda IgE ilişkili besin alerjisi sıklığı %5,7 iken, çift kör plasebo kontrollü besin yükleme testinde %0,8 olarak saptanmıştır. Gelincik ve ark. (22) 2008 yılında İstanbul ilinde 11816 katılımcıyı içeren çalışmalarında her ne kadar katılımcılar tarafından raporlanan besin alerji prevalansı %9,5 olarak belirlense de, besin yükleme testi sonucunda katılımcıların sadece %0,1'inde besin alerjisi olduğu rapor edilmiştir. Çocukluk çağında birçok besin alerji sebebi olabilirken, besin alerjisi yaptığı sıklıkla gösterilen besinler süt, yumurta, buğday, soya, yer fıstığı, diğer kuruyemişler, balık ve deniz ürünleridir (23). Hastanın yaşı, yaşadığı toplumun özellikleri ve hastanın beslenme alışkanlıkları besin alerjisine neden olan besin maddelerindeki farklılıklara sebep olmaktadır. Süt ve yumurta alerjisi küçük çocuklarda etiyolojide üst sıralarda yer alırken, kuruyemiş, yer fıstığı, balık ve deniz ürünleri daha büyük çocuklarda etiyolojide suçlanmaktadır (19). Amerika Birleşik Devletlerinde 3 yaş altı çocuklarda en sık görülen besin alerjileri sırasıyla inek sütü (%2,5), yumurta (%1,3), yer fıstığı (%0,8), buğday (%0,4), soya (%0,4), ağaç fındıkları (%0,2) ve balık (%0,1) alerjileri şeklinde sıralanmıştır (24). Ülkemizde yapılan çalışmalarda benzer gıda maddelerinin besin alerjisi etiyolojisinden sorumlu olduğunu göstermekte, Yavuz ve ark.'larının yakın zamanlı bir çalışmasında IgE aracılı besin alerjisi tanısı almış çocuklarda en sık yumurta ve süt; sonrasında sırasıyla fındık, yer fıstığı, ceviz, mercimek, buğday ve kırmızı et alerjisi saptanmıştır. Bir yaş altı çocuklarda ise sıklıkla yumurta ve süt alerjisi görülürken bir yaş üstü çocuklarda fındık ve yer fıstığı alerjileri daha sık saptanmıştır (25).

#### **1.1.4. Patofizyolojik Mekanizmalar**

Besin antijenlerine karşı vücudun verdiği doğal yanıt öncelikle sistemik duyarsızlaştırma ve oral toleranstır (26). Bu cevabı etkileyen değişik faktörler bulunmaktadır. Besinin verilme zamanı, besinin alerjenitesi, hastanın genetik yapısı

ve GIS bariyeri besin antijenine vücudun verdiği cevabı etkilemektedir (27).

Patofizyolojide etkili bir diğer faktör ise besin alerjenleri ile karşılaşma yeridir. Hayvan modellerinde fıstık veya ovalbumine deri yolu ile karşılaşma sonucu da besin spesifik IgE (sIgE) yapımının arttığı, oysa oral alımla tolerans geliştiği gösterilmiştir (26).

#### **1.1.4.1. Barsak Mukozal Defans Sistemleri**

Gastrointestinal sistem vücuttaki immün hücrelerin en fazla bulunduğu alandır ve buradaki mukozal immün sistem, kommensal mikrobiyotayı dış patojenlerin invazyonundan koruma fonksiyonunu üstlenmektedir (28). Barsak mukozal immün sistemi barsak lümeninden tek sıralı kolumnar epitelyal hücrelerle ayrılır. Epitelyal hücreler bariyer fonksiyona katkıda bulunan müsin, antimikrobiyal peptidler ve trefoil peptidleri gibi bazı faktörleri salgılar (29).

Gastrointestinal sistem'deki mukozal bariyer fiziksel ve immünolojik mekanizmaları içeren kompleks bir yapıya sahiptir. Fiziksel mekanizmalar kalın mukus tabakası, sıkı epitelyal hücre aralıkları, asitler ve enzimlerden oluşmakta ve öncelikle bakteri, virüsler ve partiküllerin girişini engellemektedirler. Epitelyal hücre aralıklarının sıkı karakterde olması özellikle peptid yapıdaki moleküllerin, proteinlerin ve moleküler ağırlığı 600 DA'dan büyük makromoleküler maddelerin paraselüler yoldan serbest diffüzyonunu önlemektedir. Bu sayede gastrointestinal lümendeki proteinlerin en fazla %1'lik kısmı barsak mukozasına geçer ve bunların da %90'lık kısmı endolizozomal sistem ile yıkılır (30). Sonuç olarak barsak mukozasına geçen proteinlerin çok az bir miktarı transellüler yol ile enterositin serozal yüzeyine ulaşır ve sınırlı oranda sistemik dolaşıma katılır.

#### **1.1.4.2. Oral Tolerans**

Diyetle alınan yüksek miktardaki antijenik yüke rağmen sınırlı sayıdaki insanda besin alerjisi görülmektedir. Bunu sağlayan temel faktör ise diyetle alınan proteinlere karşı sistemik cevapsızlık gelişmesidir. "Oral tolerans" olarak adlandırılan bu durum ilk olarak Osborne ve Wells (31) tarafından 1911 yılında tanımlanmış ve o günden sonra araştırmacıların yoğun ilgisini çekmiştir.

Besin proteinleri gibi zararsız antijenlerin oral yolla alınması normal koşullarda lokal ve sistemik immün yanıtı ile sonuçlanmaktadır (32). GIS'e ulaşan oldukça yüksek antijenik yüke rağmen az sayıda insanda besin alerjisi gelişmesinin temelinde işte bu immün yanıtı yatmaktadır. Yapılan çalışmalar oral tolerans gelişiminde gastrik asidite, mukus, epitelyal bütünlük gibi özgül olmayan faktörlerle çok sayıda özgül immünolojik mekanizmaların etkili olduğunu ortaya koymuştur (33). Oral tolerans gelişiminde intestinal epitelyal hücreler ve dendritik hücreler gibi antijen sunan hücreler ile birlikte regülatuar T hücrelerin kritik önemi mevcuttur. İntestinal immün sistemde birden fazla tip regülatuar T hücreleri rol oynamaktadır. Bunlar CD4+CD25+ regülatuar T yardımcı (T helper; Th) hücreleri, tip 1 regülatuar hücreler, CD8+ baskılayıcı T hücreler ve  $\delta$  T hücreleridir (34). Barsak epitelyal hücreleri dışarıdan alınan antijeni majör histokompatibilite kompleksi (major histocompatibility complex; MHC) klas II ile T hücrelerine sunabilirler. Ancak ikinci sinyal yolağını başlatamaz bu sayede oral toleransa katkıda bulunurlar (35). Oral toleransa katkıda bulunan bir diğer faktör ise anne sütü alımıdır. Birçok randomize kontrollü çalışmada anne sütü alımının oral tolerans gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (36). Buna sebep olarak ise yabancı proteinlere maruziyetin azlığı, anne sütünde bulunan sekretuar IgA'nın yabancı protein ve patojenlere karşı pasif koruyuculuğunun mevcut olması ve intestinal mukozal bariyerin gelişimini hızlandıran faktörlere sahip olması gibi sebepler öne sürülmektedir (19, 37). Lenfoid dokular vücudun değişik bölgelerine dağılmış bir şekilde bulunur. Bu bölgelerden en önemlileri lenf bezleri, dalak ve barsak ilişkili lenfoid dokudur. İnflamatuvar, enfeksiyöz, otoimmün ve neoplastik süreçlerde ortaya çıkan tersiyer lenfoid organların aksine bu organ ve dokular insanda doğal olarak bulunurlar (38). Oral toleransdaki önemli faktörlerden biri olan barsak ilişkili lenfoid doku bir yıllık süreçte hem  $10^{14}$  kommensal bakteri, hem de 30 kilogramdan fazla besin proteinleri ile temas eder. Bu zararsız antijenleri potansiyel patojenlerden ayırt edip uygun cevabı verme görevini başarıyla yerine getirmek için konakçı bağışıklık sistemini uygun bir şekilde kullanır. Bu noktada doğal bağışıklık sistemi ve konakçının barsak mikrobiyotası arasındaki ilişkiyi sağlayan fonksiyonel epitelyal bariyer oral toleransı sağlamada önemli görevlere sahiptir. Bu

sebeple barsak homeostazının regülasyonunun bozulması ve sonrasında gelişen oral tolerans bozukluğu besin alerjisi gelişiminde kritik bir rol oynamaktadır (39).

#### **1.1.4.3. İmmünolojik Mekanizmalar**

Duyarlı kişilerde oral toleransın kaybolmasıyla alınan besinlere karşı çeşitli tiplerde aşırı duyarlılık reaksiyonları gelişebilir. Bu duyarlılık reaksiyonları altta yatan immünolojik mekanizmalara göre geniş bir spektrumda değerlendirilebilir. Spektrumun bir ucunu erken başlangıçlı IgE aracılıklı klinik tablolar oluştururken, diğer ucunu geç başlangıçlı hücresel immün sistemin etken olduğu IgE aracılıklı olmayan mekanizmalar oluşturur. Her iki tip mekanizmanın da birlikte rol aldığı klinik tablolar da mevcuttur (19, 40).

##### **1.1.4.3.1. İmmünglobulin E Aracılı Besin Alerjileri**

Besinlere karşı gelişen alerjik reaksiyonlar içinde en kapsamlı bilgiler bu grupta elde edilmiştir. Ig E aracılı olmayan besin alerjilerinden en önemli farkı hızlı başlangıçlı olması ve klinik semptomların alerjenin alımından dakikalar-saatler içinde ortaya çıkmasıdır (41). Alerjene oral toleransın kaybolması ile birlikte aşırı miktarda besin sIgE yapımı meydana gelmektedir. Bu antikorlar mast hücreleri ve bazofillerin üzerindeki yüksek afiniteli Fc epsilon RI (FcεRI) reseptörleri ve eozinofil, lenfosit, makrofaj, monosit ve trombositler üzerindeki düşük afiniteli FcεRII reseptörleri ile bağlanarak bir takım mediyatörlerin salgılanması sonucu çeşitli alerjik reaksiyonların gelişmesine neden olmaktadır (42). İmmünglobulin E aracılı reaksiyonlar temelde 3 faza ayrılarak incelenmektedirler. Bu dönemlerden ilki duyarlanma fazıdır. Bu dönemde ilk olarak makrofajlar ve dendritik hücreler gibi antijen sunan hücreler antijeni alıp CD4+ T hücrelerine sunarlar. Takibinde interlökin (IL)-4 ve IL-13 gibi sitokinlerin uyarısıyla bu hücreler yardımcı T hücresi-2 (Th2) lenfositlere dönerler ve bunların etkisi ile B hücreleri antijenik besine karşı özgül IgE üreten plazma hücrelerini oluştururlar (43-45). Effektör fazında ise antijenle tekrar karşılaşma söz konusudur. Bu dönem akut ve geç faz reaksiyonu olarak ikiye ayrılır. Üçüncü faz kronik faz olarak adlandırılır ve tekrarlayıcı geç faz reaksiyonları sonucu oluştuğu düşünülür. Bununla birlikte Th2 ve Th1 lenfositlerin ve sitokinlerin süregelen

inflamasyonda birlikte yer almaları vasküler geçirgenlikte artışa, duyuşal sinirlerin uyarılmasına ve gastrointestinal fonksiyonda bozulmaya yol aarak fibrozis ve organ işlev bozukluğu gibi yapısal değişikliklere sebep olabilir (46).

#### **1.1.4.3.2. İmmünglobulin E Aracılı Olmayan Besin Alerjileri**

İmmünglobulin E aracılı olmayan besin alerjilerinde patofizyolojik mekanizmalar kısmen daha az bilinmektedir. Gıda proteinlerine karşı deri ve akciğerde Th2 aktivasyonu, intestinal sistemde ise Th1 ve Th2 cevabı mevcuttur. Her ne kadar mast hücre aktivasyonu görülebilirse de hücre degranülasyonu doku içinde olduğundan sistemik reaksiyonlar görülmeyebilir (46). İmmünglobulin E aracılı olmayan besin alerjileri temel olarak 3 tip reaksiyonla ilişkilidir. Bu reaksiyonlardan biri olan Tip II sitotoksik reaksiyonlar, spesifik antikorun (IgG, IgM) yüzeysel doku antijenine veya haptene bağlanması ve kompleman aktivasyonu ile oluşur. Diğer bir reaksiyon tipi olan Tip III antijen-antikor kompleksine bağlı aşırı duyarlılık reaksiyonları yüksek düzeyde besinsel antijen ve ona karşı oluşmuş antikor komplekslerinin bulunduğu hastalarda gösterilmiştir. Bu hastaların serumlarında besin antijen-antikor komplekslerinin artışı söz konusudur. Tip IV geç hücreşel aşırı duyarlılık reaksiyonları ise besin alımını takiben saatler içinde klinik bulguların ortaya çıktığı, mukozal lezyonların görülebildiği bir diğer Ig E aracılı olmayan besin alerjisi reaksiyonudur (37, 47).

#### **1.1.4.4. Genetik Faktörler**

Alerjik hastalıklarda genetik yatkınlığın varlığı ve 1. derece akrabalarda alerjik bir hastalığın görölme riskinin arttığı bilinmektedir. Besin alerjilerinde de benzer bir şekilde genetik yatkınlığın var olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Özellikle yer fıstığı alerjisinin insan lökosit antijeni (Human leucocyte antigen; HLA) sınıf 2 geninde yer alan DRB1\*08/\*12, DRB1\*08/12tyr16, DQB1\*04/+0301, DPB1\*0301 allelleri ve inek sütü alerjisinin DQ7 mutasyonu ile ilişkisi bildirilmiştir (48). Yakın zamanlı yapılan bir meta-analizde ise Filaggrin (FLG) genindeki bir mutasyonun besin alerjisi için bir risk faktörü olabileceği belirtilmiştir (49). FLG geni memeli epidermisinde bulunan ve su retansiyonunda önemli olan intermediate filament ilişkili

bir proteini kodlamaktadır. Bu gendeki bir mutasyon deri geçirgenliğini artırmakta ve alerjen absorpsiyonunu artırmaktadır.

#### **1.1.5. Besin Alerjenleri**

Genelde tespit edilen majör besin alerjenleri, molekül ağırlığı 10.000–60.000 DA arasında, ısıya, aside ve proteazlara dirençli suda eriyen glikoproteinlerdir (50). Bunun dışında gıdalarda alerji oluşmasına sebep olan ve halen tanımlanamamış birçok faktörün de mevcut olduğu bilinmektedir. Her ne kadar, tüm besinlere karşı alerji gelişme ihtimali mevcut ise de, insanlarda sıklıkla alerjiye neden olan besinler inek sütü, yumurta, balık ve kabuklu deniz ürünleri, kabuklu ve kuru yemişler (fındık, fıstık gibi), tahıllar, etler, meyveler, sebzeler ve kuru baklagiller, baharatlar ve çeşni vericiler, çikolata, bal ve bazı içecekler ve katkı maddeleridir. Bu besinlerden bazıları diğerlerine göre daha sık alerjiye neden olmakta, bazıları ise diğerlerine göre daha ciddi reaksiyonlara neden olabilmektedirler (yer fıstığı ve ağaç fıstıkları vb.). Bazı besinler özellikle erken çocukluk döneminde alerjik reaksiyonlara neden olurken (inek sütü alerjisi), fıstık alerjisi gibi bazı besin alerjileri hayat boyu artmış alerji riski ile ilişkilidir (50, 51).

##### **1.1.5.1. İnek Sütü**

İnek sütü alerjisi infantlarda ve çocuklarda yaygın bir besin alerjisi tipidir (52). Bir ya da daha fazla süt proteinine (genellikle kazeinler veya whey proteinlerinden biri olan beta laktoglobulin) karşı tekrarlayan, çeşitli etyolojik faktörlere bağlı oluşan reaksiyonlardır. İnek sütündeki whey ve kazein proteinleri toplamda 5 majör komponent içerir. Bunlar Alfa-Laktalbumin, Beta-Laktoglobulin, Bovin Serum Albumin, Bovin immünglobulin ve kazeinlerdir (53). Sıklıkla suçlanan mekanizma IgE bağımlı reaksiyonlar olup az miktarda alınan besini takiben dakikalar içinde (1 saate kadar uzayabilir) gelişebilmektedir.

İnek sütü alerjisi prevalansı değişik toplumlarda farklılıklar arz etse de, yapılan çalışmalarda genel olarak iki yaşın altındaki çocuklarda yaklaşık %2,5 oranında inek sütü alerjisi olduğu bildirilmiştir (54). Yapılan çalışmalarda süt alerjisi semptomları ile başvuran çocuklarda eliminasyon ve besin provokasyonu ile tanının doğrulanması

halinde sıklığın %1,8-7,5 arasında değişmekte olduğu, çift kör plasebo kontrollü çalışmalarda ise besin provokasyon testleri yapıldığı takdirde bu sıklığın %1'ler civarına düştüğü belirtilmiştir (55). Etkilenmiş

infantlarda sıklıkla yaşamın ilk 6 ayında semptomlar ortaya çıkmaktadır. Anne sütü ile beslenen bebeklerde de anne sütüne annenin diyeti nedeniyle inek sütü proteinlerinin geçişine bağlı olarak görülebilmektedir (56). Etkilenen çocukların büyük bir kısmında bir veya birden fazla organın etkilenmesine bağlı semptomlar ortaya çıkabilmekte, çoğunlukla da gastrointestinal sistem ve deri etkilenmektedir. Semptomlar hafif klinik şikayetlerden şiddetli anafilaksiye kadar geniş bir aralıkta olabilmektedir.

#### **1.1.5.2. Yumurta**

Çocukluk çağında bir diğer sık görülen besin alerjisi türü yumurta alımı ile ilişkilidir. Kullanılan tanı yöntemlerine bağlı olarak prevalansı çalışmalarda farklı rapor edilse de Muraro ve ark. (57) yumurta alerjisinin yaşam boyu prevalansının %2,5 olduğunu belirtmişlerdir. Her ne kadar ülkemize ait sağlıklı veriler mevcut değil ise de Küçükosmanoğlu ve ark. (58) deri prik testi ile yumurta alerjisi prevalansını araştırdıkları çalışmalarında yumurta proteinine karşı duyarlılığı %1,87 olarak rapor etmişlerdir. Ülkemizde yapılan başka bir çalışmada ise Şanlıurfa ilimizde 2 yaşın altındaki çocuklarda yumurta alerjisi prevalansı % 1,3 olarak rapor edilmiştir (59). Kılıç ve Taşkın (60) yakın zamanlı bir çalışmalarında, kliniklerinde takip ettikleri 186 besin alerjili çocuğun etyolojik dağılımlarını rapor etmişler ve yumurta beyazının %49,2 ile en sık alerjiye neden olan besin olduğunu saptamışlardır. Bunu %42,3 ile inek sütü, %7,7 ile yumurta sarısı takip etmiştir. Patogenezden sıklıkla IgE

aracılı besin reaksiyonları sorumlu gibi görünse de IgE aracılı olmayan besin reaksiyonları nadiren de olsa etyolojide rol alabilmektedir. Alerjinin temelinde ovoalbumin, ovomukoid, ovotransferrin, konalbumin ve lizozim gibi yumurta beyazında bulunan maddeler yatmaktadır. Ovomukoidin ısıya dirençli olması, pişmiş yumurta ve hazır gıdalara katılan yumurta preparatlarının sebep olduğu alerjiden sorumludur (61).

Yumurta alerjisine bağı şikâyetler yumurta alımını takiben dakikalar içinde başlamakta, nadiren de olsa 1-2 saat sonra görülebilmektedir. Yumurta alerjisinin, erken çocukluk döneminde özellikle egzema ile birlikte olduğunda solunum yoluyla alınabilecek alerjenlere duyarlılığı arttırdığı ve solunumsal alerjik semptomların daha şiddetli seyretmesine neden olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte yumurta alerjisinde yaygın kızarıklık, hırıltılı solunum, kusma ve ishal sık görülen şikâyetlerdir.

### **1.1.5.3. Meyve ve Sebze Alerjileri**

Meyve ve sebze alerjileri sıklıkla oral alerji sendromu ve polen-meyve-sebze sendromu şeklindedir ve genellikle çiğ sebze ve taze meyve tüketimi sonrası gözlemlenir. Sıklıkla meyve ve sebzelerin içerdiği proteinlerin, polenlerin yapısında bulunan homolog proteinler ile çapraz reaksiyonları sorumlu tutulur (62). Sıklıkla polen duyarlı kişilerde saptanmakla birlikte izole olarak da görülebilmektedir.

Meyvelere karşı gelişen alerjik reaksiyonlar özellikle ürtiker olmak üzere deri bulguları ile prezente olur. Herhangi bir meyve alerjik reaksiyona sebep olabileceği için, hangi meyveye karşı alerjik reaksiyon geliştiğinin tayini bazen zor olmaktadır. Ama özellikle elma, armut, kivi, çilek, kavun, karpuz ve sert çekirdekli meyveler (kiraz, vişne, kayısı, şeftali) besin alerjisine neden olabilirler. Sebzeler özellikle çiğ tüketildiklerinde alerjen özellik gösterirler. Domates, kabak, kuru baklagillerden; fasulye, bezelye, soya fasulyesi alerjik reaksiyonlara yol açabilen besin maddeleridir. Prevalans iki yaşın altındaki çocuklarda %11.5'lara kadar çıkabilmektedir (63). Ancak bu oranlar coğrafi farklara bağı olarak değişebilmektedir. Altman ve Chiaramonte (64) 1996 yılında ABD'deki meyve alerjisi prevalansını araştırdığı bir çalışmada bu oranın tüm meyvelere karşı %1,4 olduğu belirtilmiştir. Sebze alerjisi prevalansı kısmen daha az rapor edilmekle birlikte 0-6 yaş aralığındaki çocuklarda bu oranı %0,3-3,0 olarak tesbit edilmiştir (57). Ülkemizde konu ile alakalı yeterli çalışma mevcut olmamakla birlikte Orhan ve ark. (21) yaptıkları bir çalışmada oral provokasyon ile doğrulanmış meyve alerjisi sıklığı %0,11 ve sebze alerjisi sıklığı %0,04 olarak tespit edilmiştir.

#### **1.1.5.4. Yer Fıstığı ve Ağaç Fıstıkları Alerjileri**

Yer fıstığı ve ağaç fıstığı alerjileri yaşamın erken dönemlerinde kendini gösterir ve çoğu hastada ömür boyu sürer. Bazı çok duyarlı kişilerde mikrogramlarla ifade edilebilecek kadar küçük miktarlar reaksiyona neden olurken, miligram miktarındaki alımlar bile IgE aracılı sistemik reaksiyonlara yol açabilmektedir (65). Yer fıstığında bulunan Ara h 1'den Ara h 9'a kadar numaralandırılmış dokuz major ve minör alerjik protein'in içerdiği allerjenlerin patogeneze sorumlu olduğu düşünülmektedir (65, 66). Klinikte orofarenks bölgesini etkileyen hafif yakınmalardan, ciddi anafilaksiye uzanan ve birden fazla organı tutabilen ciddi reaksiyonlara yol açabilmektedir.

#### **1.1.5.5. Balık ve Deniz Mahsülleri Alerjileri**

Balık ve kabuklu deniz mahsülleri alerjileri ölümcül anafilaktik reaksiyonlar dahil ciddi akut hipersensitivite reaksiyonlarının önemli bir nedenidir (67). Çocuklarda çoğu zaman astım veya egzemaya sebep olmalarına rağmen aslında cilt kaşıntısı, deri ve gözde lezyonlar ve sindirim sistemindeki alerjiden sorumludurlar. Pişmiş ya da çiğ balığın kokusunu alma, hatta bazen balığa sadece dokunma ile bile aşırı duyarlı bireylerde semptomlar gözlenebilir. Ancak her yan etki direkt olarak balığın kendisine bağlı olmayabilir. Gıda kontaminasyonu, yeni oluşmuş toksik ürünler ve gıda koruyucuları alerjik durumdan sorumlu olabilirler. Bu grup içinde alerjik reaksiyonlara sıklıkla sebep olan balık ve deniz ürünlerinden bazıları; sardalye, uskumru, ton balığı, köpek balığı, istakoz, kerevit, karides, yengeç, salyangoz, midye, kalamar ve ahtapotur (68, 69).

#### **1.1.5.6. Et Alerjisi**

Kırmızı ete karşı gelişen alerji nadirdir ve özellikle genç atopik çocuklarda daha sık gözlenir (70). Bir tür oligosakkarit olan galactose- $\alpha$ -1,3-galactose'a karşı gelişen spesifik IgE'lerin çoğunlukla etyolojiden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Gıda tüketiminden sonra sensitizasyon gelişir ve klinik reaksiyonlar 3-6 saat sonra ortaya çıkar.

Yapılan çalışmalarda inek sütüne karşı alerjik reaksiyon hikâyesi olan çocukların %10-20'sinin aynı anda dana etine karşı da alerjik reaksiyon gösterdikleri belirlenmiştir. Bu durumun moleküler temeline bakıldığında bovine serum albumin kaynaklı bir mekanizmanın bundan sorumlu olduğu saptanmıştır. Ancak bovine serum albumin proteininin diğer protein yapıdaki allerjenler gibi ısıya duyarlı olması, pişirme işleminden sonra alerjik reaksiyonların daha az olması ile sonuçlanmaktadır (71). Sütün ve yumurtanın çapraz antijenik özelliğinden dolayı tavuk etine karşı besin alerjisi de genelde bebeklik çağında görülebilir. Yakın antijenik ilişkilerden dolayı grup reaksiyonları görülebilir. Örneğin yumurta alerjisi olan bireyler de tavuk etine karşı duyarlılık gözlemlenebilir. Bu da yumurta kontaminasyonu sebebiyle, neden horoz eti değil de tavuk etine karşı alerjik reaksiyon gösterildiğini açıklamaktadır.

#### **1.1.5.7. Tahıl Alerjisi**

Diyette sıklıkla bulunan buğday ve mısır gibi gıdalar nisbeten sık görülen alerjik reaksiyonlara neden olabilirler. Bu ürünler hem çiğ hem de pişmiş olarak tüketilebilmektedir. Mısır, buğday ile kıyaslandığında daha az alerji riski içermekte ve bu sebeple buğday ile kıyaslandığında daha fazla tercih edilmektedir. Buğdayda bulunan bir glikoprotein olan alfa-amilaz tripsin inhibitörü sindirildiğinde immün sistemde IgE ve/veya non IgE aracılı mediyatörlerle ortaya çıkan aktivasyon kaşınıtı, egzema benzeri cilt lezyonları, ishal, baş ağrısı, hırıltılı solunum, dispne ve anafilaksi gibi ciddi semptomlara neden olabilir. Burada akılda tutulması gereken nokta buğday alerjisi olan kişilerin bir çoğu diğer tahılları tüketebilir, çünkü sadece çocukların %20'si buğdayın yanı sıra diğer tahıllara da alerjik tepki verirler (71). Tahıl alerjisi, spesifik olarak ifade edilecek olursa buğday alerjisi, çölyak hastalığı ile karıştırılmamalıdır. Buğday alerjisinde vücut buğdaydaki proteinlere karşı antikor oluştururken, çölyak hastalığında buğdayda bulunan spesifik bir proteine (gluten proteininin, gliadin adlı alt fraksiyonuna) karşı anormal bir immün yanıt oluşumu söz konusudur (72).

#### **1.1.5.8. Bal ve Çikolata**

Bal dünya çapında yaygın tüketilen bir besin maddesidir ve günümüze kadar bal'a bağlı alerji vakaları nadiren rapor edilmiştir. Bu reaksiyonlar genelde deride kızarıklık, kaşıntı, şişlik ve sindirim sisteminde bozukluk şeklindedir. Bal arılardan elde edilen çok sayıda organik maddeyi içerir (bez salgıları, çiçek nektarları, polenler vb.). Polen proteinleri (kompozit polenler) ve bez salgı proteinleri bu tip alerjilerden sorumlu molekülüdür (73). Bal alerjisi olan hastalar genelde kara buğday, yonca veya polene karşı da duyarlı bireylerdir. Çikolataya

bağlı alerjik reaksiyonlar da nadiren izlenir. Ama böyle bir durumda öncelikle altta yatan etyolojik faktör net olarak ortaya konmalıdır. Çikolata içindeki kakao, kakao yağı, fındık, badem, fıstık ve süt gibi maddelere karşı alerjinin olup olmadığı saptanmalıdır. Sıklıkla gözlenen şikayetler karın ağrıları, anjiyoödem, öksürük, kaşıntı ve ürtiker gibi deri döküntüleridir.

#### **1.1.6. Besin Alerjileri ile İlişkili Klinik Tablolar**

Besin alerjileri hedef organın tutulumuna göre bir dizi semptom ve bulgulara sebep olmaktadır. Bu açıdan değerlendirildiğinde klinik bulgular temel sistemik, deri, GIS ve solunum sistemi bulguları olmak üzere 4 gruba ayrılabilir.

Besin alerjilerinde görülen sistemik reaksiyonlar anafilaksi başlığı altında incelenebilir. Güncel tanımıyla anafilaksi terimi ani başlayan ve ölüme yol açabilen ciddi sistemik bir hipersensitivite reaksiyonunu ifade etmektedir (74). İmmünglobulin E, IgG, immün kompleks ve kompleman sistemi gibi immünolojik mekanizmalarla oluşan anafilaksi, alerjik (immünolojik) anafilaksi olarak tanımlanmakta, geçmişte anafilaktoid reaksiyon olarak tanımlanan immünolojik olmayan mekanizmalarla gelişen anafilaksi ise, alerjik olmayan anafilaksi olarak adlandırılmaktadır. Besinlerin dışında ilaçlar ve böcek sokmalarına bağlı olarak da görülen anafilaktik reaksiyonlarda sıklıkla deri, solunum sistemi, gastrointestinal sistem, kardiyovasküler sistem, nöropsikiyatrik belirti ve bulgularla gözlenmektedir (55).

Besin alerjilerine bağlı gelişen cilt lezyonları sıklıkla ürtiker ve anjiyoödem şeklinde prezente olmaktadır. Ani başlayan besin reaksiyonlarının en yaygın belirtisi bu şekilde olmaktadır. Bazen birkaç

dakika içinde bazen de saatler sonra ortaya çıkmaktadır. Genellikle IgE aracılı mekanizmalarla bu reaksiyonlardan sorumlu gibi görünse de IgG ilişkili mekanizmalarla da deri bulguları ortaya çıkabilmektedir. Erişkinde sorumlu besinler sıklıkla balık, karides, fındık ve fıstık iken çocuklarda süt ve yumurta alerjileri daha sık görülür (75).

Besin alerjilerinde gözlenen GIS bulguları IgE aracılı, IgE aracılı olmayan ve miks tip olarak 3'e ayrılır. Klinik belirtiler birkaç dakikadan 2 saate kadar uzayabilir. Sıklıkla mide bulantısı, kusma, ishal ve karın ağrısı gözlenir. GIS reaksiyonları gastrointestinal anafilaksi, oral alerji sendromu (OAS), alerjik eozinofilik özofajit, alerjik eozinofilik gastroenterit, besin protein enterokolit ve besin proteini koliti şeklinde sınıflandırılabilir (76).

Besin alerjisi ilişkili akut solunum sistemi semptomları saf IgE aracılı reaksiyonlarken, kronik semptomlar miks Ig E aracılı ve Ig E aracılı olmayan hipersensitivite reaksiyonları şeklindedir. Semptomlar nadiren tek başına solunum sistemi ile sınırlıdır ve genellikle sistemik anafilaksinin bir parçası olarak görülür (68, 77). Besin alımından sonra dakikalar ile 2 saat arasında alerjenler gözde kızarma ve kaşıntı, göz yaşarması, nazal konjesyon, nazal kaşıntı, hapşırık ve burun akıntısı semptomlarını içeren rinokonjunktivite ait tipik semptomlara yol açabileceği gibi astım semptomlarını arttırarak bunla ilişkili klinik durumlara sebep olabilir.

#### **1.1.7. Besin Alerjilerinde Tanısal Yöntemler**

Besinlerin çeşitli reaksiyonlara yol açarak birden fazla sistemi etkileyen klinik semptomlara yol açmaları sebebiyle besin alerjilerinde tanı koymak zor olabilmektedir. Özellikle Tip I aşırı duyarlılık aracılığı ile ortaya çıktığı bilinen anafilaksi gibi sistemik ya da çeşitli sistemlere ait alerjik kaynaklı olabilecek bulgulara ve gıda alımını takiben ortaya çıkan alerjiyle ilişkilendirilebilecek bulguların varlığında besin alerjisi düşünülmelidir. Öykü ve fizik muayeneyi takiben yapılacak uygun tanısal testler tanı konulmasında son derece önemlidir.

#### **1.1.7.1. Öykü ve Fizik Muayene**

Alerjik reaksiyon şüphesi ile değerlendirilen bir hastada dikkatlice alınmış bir anamnez tanısal değerlendirmenin ilk adımını oluşturmaktadır. Anamnez alırken alerjik reaksiyona neden olduğu düşünülen besinin türü, miktarı, gıdanın alımından semptomların ortaya çıkışına kadar geçen süre, lokal ve sistemik bulguların olup olmadığı, aynı besinle geçmişte benzer reaksiyon gelişip gelişmediği sorgulanmalıdır. Alerjik reaksiyonu provoke eden egzersiz, alkol veya aspirin kullanımı gibi faktörler mutlaka sorgulanmalıdır. Bununla birlikte anne veya babada atopi hikayesinin varlığı veya kardeşlerinde besin alerjisi varlığının olup olmadığı sorgulanmalıdır (75, 78).

Dikkatli bir sistemik muayene ile gözden kaçabilecek olan ayrıntıların değerlendirilmesi tanıda çok önemlidir. Özellikle cilt bulguları açısından dikkatli olunmalıdır. Ancak sistemik muayenenin tam olarak tanı koydurucu özelliğinin olmadığı bilinmelidir.

#### **1.1.7.2. Tanısal Testler**

##### **1.1.7.2.1. Deri Prik Testi**

Besin alerjisi düşünüldüğünde tanı aşamasında ilk planda yapılması gereken testlerden biri deri prik testidir (DPT). Tek başına tanı koydurucu olmamakla birlikte IgE aracılı reaksiyon düşünüldüğünde besin duyarlılığını tespit etmek için basit ve ucuz bir tanı yöntemidir. Yenidoğan döneminden itibaren her yaşta yapılabilir. Antijen olarak doğal allerjen ya da yapay ekstrakt kullanılır. Bu yöntemde 1:10 ya da 1:20 dilüsyonundaki gliserinli besin ekstraktları kullanılmaktadır. Test için doğal allerjen kullanımının avantajı gerçeğe daha yakın cevap alınmasıdır. Kabarıklık çapının 3 mm üzerinde olması anlamlıdır. İnek sütü alerjisi için kabarıklık çapının 8 mm'in üzerinde olması, 2 yaş altındaki çocuklarda kabarıklık çapının 6 mm üzerinde olması inek sütü alerjisi olasılığını kuvvetlendirir (24, 79). Yanlış pozitiflik %30, özgüllüğü %50, duyarlılık %95'in üzerindedir yani test negatif ise IgE aracılı bir duyarlanma olmadığı sonucuna varılabilir (43, 80). Deri prik testi inek sütü ve yumurta alerjisinde spesifik IgE ölçümünden daha duyarlıdır (81).

#### **1.1.7.2.2. Serum Spesifik IgE**

Serumda alerjene spesifik IgE ölçümleri özellikle IgE'ye bağlı aşırı duyarlılık reaksiyonlarının tanısında ve takibinde yararlı olabilmektedir. En büyük avantajı sistemik reaksiyon riskinin olmamasıdır ve hastanın ilaç kullanımından etkilenmemektedir. Serum spesifik IgE düzeyi birçok besin için klinik bulguların şiddeti ile ilişkilidir. Genellikle besin spesifik IgE değeri yükseldikçe klinik reaksiyon riski artar (82). Spesifik IgE immünoassay yöntemler ile ölçülür. Dolaşımda besine karşı oluşmuş IgE antikorları ölçülür ve sonuçlar kU/L biriminden verilir. Ölçülen total IgE'nin yaşa göre belirtilen sınırların altında olması hastanın alerjik olmadığını kanıtlamaz. Çünkü serum total IgE konsantrasyonunun 20 kU/L üzerinde olması alerjen spesifik IgE oluşturabilmek için yeterlidir. Ayrıca çok yüksek IgE değerlerinin (>2500 kU/L) spesifik IgE testlerinde yanlış pozitif sonuçlara neden olabileceği de unutulmamalıdır (82, 83).

#### **1.1.7.2.3. Atopi Yama Testi**

Atopi yama testi atopik hastalarda alerjenlere karşı oluşan gecikmiş tipte aşırı duyarlılık reaksiyonlarının değerlendirilmesi için kullanılır. En büyük avantajı uygulamasının kolay, non-invaziv ve yan etki profilinin çok düşük olmasıdır. Alerjik bireyin cildi alerjene uzun bir süre (genellikle 48 saat) temas ettirilir ve reaksiyon yaklaşık 72 saat sonra değerlendirilir (84, 85). Temas alerjene karşı duyarlılığın saptanmasında altın standart olarak değerlendirilmekle birlikte besin alerjileri ile alakalı veriler yakın zamanlı çalışmalarda daha net bir şekilde gösterilmiştir. Pustisek ve ark. (86) besin alerjisi klinik semptomu olan ancak standart testlerin erken alerjik reaksiyonu göstermede başarısız olduğu 151 çocuğu inceledikleri çalışmalarında, atopi yama testinin besin alerjisini göstermede son derece yararlı olduğunu belirtmişlerdir. Yazarlar atopi yama testinin halihazırda kullanılan alerji testlerine ek katkıları olduğunu belirtmişler ve diğer testlerle ispatlanması zor gecikmiş hipersensitivite reaksiyonlarında kullanılmasının yararlı olduğu sonucuna vardıklarını rapor etmişlerdir. Strömberg'in (87) DPT ve atopi yama testini karşılaştırdığı bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiş, atopi yama testinin atopik

egzema/dermatitli 2 yaş altı çocuklarda DPT ile kıyaslandığında besin alerjisini tanımlamada daha duyarlı bir metot olduğu belirtilmiştir.

#### **1.1.7.2.4. Bazofil Histamin Salınım Testi**

Bu test, vücutta IgE yapım ve/veya varlığına bakmaksızın spesifik alerjenlere karşı hassasiyet seviyesinin ölçülmesine imkan tanır. Bazofil Histamin Salınım Testi (BHRT) hasta kanından yapılır ve serumdaki spesifik IgE miktarını ölçer. Radyoallergosorbent test (RAST) ve Enzim-Linked ImmünoSorbent Assay testlerinin aksine, BHRT’de, spesifik antijene maruz kaldıktan sonra kan bazofilleri tarafından seruma salınan histamin miktarı ölçülür. Bu sayede IgE oluşmadan histamin salınımı ile sonuçlanan hipersensitivite reaksiyonlarının analizi mümkün olur. Böylece immünolojik olmayan reaksiyonlar ve IgE ilişkili reaksiyonlar BHRT ile uygun bir şekilde analiz edilebilir. Ancak testin zaman alıcı olması ve standardizasyon zorluğu gibi dezavantajları bulunmaktadır (88).

#### **1.1.7.2.5. Besin Provokasyon Testi**

Şüpheli besinin giderek artan dozlarda hastaya yedirilerek hastanın reaksiyon gelişimi açısından gözlemlendiği testlere besin provokasyon testleri (BPT) denmektedir. BPT açık, plasebosuz ya da tek kör ve çift kör plasebo kontrollü olmak üzere üç değişik şekilde yapılır. Çift kör plasebo kontrollü BPT, besin alerjisi tanısında “altın standart” olarak kabul edilir. Ancak tanı için oldukça güvenilir bir yöntem olsa da iş gücü ve uzun zaman isteyen bir yöntem olduğundan pratikte daha çok tek kör ve açık BPT testleri yapılır. Yükleme testlerinden önce şüphelenilen bir besin varsa 15 gün diyetten elimine edilir. Diyet eliminasyonu sonrası bireyde belirtiler kaybolursa, deri testleri, RAST ve/veya direkt olarak provokasyon testleri uygulanır. Şüphelenilen belli bir besin yoksa en alerjik besinler (süt, yumurta, yer fıstığı, çilek, domates, deniz ürünleri v.s.) kesilir. Test uygulandıktan sonraki gözlem süresi, IgE aracılığı ile gelişen reaksiyonlar için yaklaşık iki saattir (89).

#### **1.1.7.2.6. Eliminasyon Diyeti**

Diyet eliminasyonu, istenmeyen besin reaksiyonlarının hem tanısında hem de tedavisinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Eliminasyon diyeti tanı amacıyla yapıldığında anamnez sonucu şüphelenilen besin diyetten uzaklaştırılır (90). Eliminasyon diyeti ile diyetten uzaklaştırılan gıda klinik semptomların azalması ile ilişkili bulunursa, şüphe edilen besinin alerjik reaksiyondan sorumlu olabileceği fikri ağırlık kazanır ancak bu besin alerjisi tanısı koymak için yeterli değildir. Kesin tanı besin provokasyon testleri yapılarak konmalıdır.

#### **1.1.8. Besin Alerjisinde Tedavi**

Besin alerjisinde en büyük problem tanıyı koyup etyolojiden sorumlu ajanın saptanmasıdır. Sorumlu etyolojik ajan bulunduğundan sonra tek tedavi diyetten o besinin çıkarılmasıdır. Ancak bebeklik döneminde sakınma tedavisi uygulanırken, kesin tanının konmuş olması ve bu eliminasyonun doğru bir şekilde uygulanması çok daha önemlidir. Çünkü özellikle en sık görülen süt alerjisi sebebiyle süt ve ürünlerinden sakınılırken, yerine uygun beslenme düzenlemesinin getirilmesi önem arz etmektedir. Aksi durumda beslenme, büyüme ve gelişme bozuklukları ortaya çıkabilir. Besin alerjilerinin yönetimi 2 alt başlıkta toplanır.

##### **1.1.8.1. Akut Reaksiyonların Tedavisi**

Akut hayatı tehdit etmeyen hafif semptomlarda antihistaminik ilaçlar ve kortikosteroidler kullanılabilir. Profilaktik antihistaminik kullanımı anafilaksin bulgularını maskeleyip adrenal tedavisinde geç kalınmasına sebep olabilir. Anafilaksi öyküsü olan ve/veya yüksek riskli besin alerjili hastalara adrenal oto-enjektör verilmeli ve kullanımı hakkında bilgilendirilmelidir (91).

##### **1.1.8.2. Uzun Süreli Tedavi**

Eliminasyon diyetleri, immünoterapi ve inek sütü alerjisi olan bireylerde inek sütü yerine kullanılabilecek formülasyonların verilmesi uzun süreli tedavilerin temelini oluşturmaktadır. Bu formülasyonlar ileri derecede hidrolize mama, aminoasit bazlı mamalar, soya bazlı mamalar ve pirinç bazlı mamalar şeklinde ayrılabilir.

İleri derece hidrolize mamalar inek sütünün hidrolize edilmesi sonucu elde edilir. Bu mamalardaki peptidlerin moleköl ağırlığı 3000 kDA'dan daha düşüktür. İnek sütü, protein alerjili çocukların %90'ı tarafından iyi tolere edilir ve hipoalerjen mama seçiminde ilk tercihtirler. İleri derecede hidrolize mamaların atopik dermatit ve inek sütü alerjisi gelişimini önleyebildiği geniş kapsamlı çalışmalarda gösterilmiştir (92).

Kısmi hidrolize mamalar inek sütü formülasyonları ile kıyaslandığında düşük moleküler ağırlıklı proteinler içermektedirler. Sıçanlarda yapılmış çalışmalarda kısmi hidrolize mamaların, ileri derecede hidrolize mamalar ile kıyaslandığında  $\beta$  laktoglobulin spesifik IgE ve IgG antikor üretimini ve mast hücre cevabını belirgin bir şekilde baskıladığını göstermiştir (93).

Her ne kadar inek sütü alerjili çocuklarda ileri derecede hidrolize mamalar ile yeterli cevap alınabilmekte ise de bu mamalar aşırı hassas infantlarda alerjik reaksiyonları tetikleyebilecek küçük peptid fragmanları içerebilmektedir (94). Bu sebeple ileri derecede hidrolize mamalara büyüme geriliğine ve alerji şikayetlerinin devam etmesine sebep olabilirler. Bu nedenle aminoasit bazlı mamalar ileri derecede hidrolize mamalara cevap vermeyen çocuklarda önerilebilecek alternatif bir ürün olarak değerlendirilebilir (95). Aminoasit bazlı mamaların moleköl ağırlığı ileri derece hidrolize mamalardan daha düşüktür ancak daha maliyetlidir. Az miktarda alerjenik proteinler ihtiva ettiğinden dolayı anafilaksi, alerjik eozinofilik özofajit, inek sütü proteini ile ilişkili enterokolit, çoklu besin alerjisi gibi ağır olgularda kullanılması önerilir. Bununla birlikte ileri derecede hidrolize mamalara cevap vermeyen infantlarda aminoasit bazlı mama kullanımı durumunda artmış kilo alımı ve alerjik şikayetlerde azalma olduğunu gösteren kanıtlar gün geçtikçe artmaktadır (96).

Soya bazlı mamalar besin alerjili çocuklarda kullanılabilecek bir diğer alternatif üründür. Ancak inek sütü protein alerjili bebeklerde soya alerjisi bulunma olasılığının %10-50 civarında olduğu bilinmelidir. Bu sebeple inek sütü alerjisi olan çocuklarda soya alerjisi açısından değerlendirilme yapıldıktan sonra bu ürünlerin kullanılması önerilir (97). Diğer mamalara göre daha ekonomik ve tatları güzeldir (98). Ancak, içerdikleri fitoproteinlerin östrojen etkisi göstermesi ve yüksek alüminyum

içerikleri sebebiyle prematürlerde, 6 aydan küçük infantlarda ve böbrek yetmezliği olan çocuklarda kullanımları önerilmez (99). Bununla birlikte Avrupa Pediatrik Gastroenteroloji Hepatoloji ve Beslenme Birliğinin 2012 yılında yayınladığı beslenme kılavuzunda soya bazlı mamaların sadece belirli durumlarda kullanılması önerilmiştir. Bu durumlar galaktozemi, kalıcı laktoz intoleransı ve diğer dini ve etnik durumlar şeklinde özetlenmiştir (100).

Pirinç tüm dünyada en sık bulunan tahıl ürünlerinden biridir. Dünya nüfusunun günlük kalori ihtiyacının neredeyse yarısını tek başına karşılar ve birçok kültürde infantların katı gıda ile beslenmeye başladıklarında aldıkları ilk besin maddesidir. Son yarım yüzyıldır inek sütü alerjisi olan çocuklarda sütün yerine pirinç bazlı mama kullanımının tartışması yapılmaktadır (101). Pirinç, kısmen düşük alerjenik riskli bir gıdadır ve erken hipersensitivite reaksiyonları ile ilişkisi sadece birkaç vaka sunumunda bildirilmiştir, bu yüzden son derece güvenli bir ürün olarak değerlendirilmektedir (102). Reche ve ark. (103) tarafından yayınlanan yakın zamanlı bir çalışmalarında IgE ilişkili inek sütü alerjisi olan 92 çocuğa kısmi hidrolize pirinç bazlı mamaya klinik tolerans değerlendirilmesi yapılmış; inek sütü alerjisi olan tüm bu çocuklarda pirinç bazlı mamaların iyi tolere edildiği gösterilmiştir. Fiocchi ve ark. (104) yaptıkları bir çalışmada pirinç bazlı mamaların sadece inek sütü alerjisi olan çocuklarda değil, diğer besinlere de alerjisi mevcut olan çocuklarda iyi bir tedavi alternatifi olduğunu göstermişlerdir.

## **1.2. İntestinal Mikrobiyota ve Besin Alerjileri**

İnsan vücudunda kommensal ve mutual şekilde yaşayan mikroorganizmaların tamamına mikrobiyota; bu mikroorganizmaların genomuna da mikrobiyom denmektedir (6). Her ne kadar mikrobiyota dendiğinde ilk olarak GIS, özellikle de kolon florası aklımıza gelse de, GIS dışında genitoüriner sistem, deri ve solunum sisteminde de mikroorganizmalar bulunmaktadır. Belirtilen tüm bu bölgelerdeki (en büyük kısım GIS’de olmak üzere) mikroorganizma sayısı 1000’in üzerinde, genom çeşitliliği 150 kat daha zengin ve toplam ağırlığı 2 kiloya yaklaşmaktadır (105). Son yıllarda yapılan çalışmalar ile intestinal mikrobiyotanın aslında birçok metabolik

olayda, sistemik ve mukozal immün sistem fonksiyonlarında önemli işlevleri olan bir “organ” gibi davrandığı anlaşılmıştır. Gram negatif bakteriler peptidoglikanlar ve lipopolisakkaritler üzerinden sekretuar Ig A ve intestinal alkalen fosfataz üretimini artırarak immün sistem gelişimine katkıda bulunurlar. Diğer yandan, *Bacteroides fragilis* polisakkarit A sayesinde, *Bacteroides thetaiotaomicron* ise NF-kappa B inaktivasyonu ile hücrel immünite, lenfoid organogenez ve mukozal immünite üzerinde etkili olur. Bunların dışında *Lactobaciller* ve *Escherichia coli* (E. coli) ise hem mukozal bariyerin oluşumuna katkıda bulunurken, hem de dendritik hücrelerin immün toleransını artırarak özellikle inflamatuvar bağırsak hastalığında önemli rol oynayan immün toleransın oluşmasını sağlarlar. İntestinal mikrobiyotanın mukozal ve sistemik immünite üzerine olan bu etkileri göz önüne alındığında; gastrointestinal sistemin, alerjik ve otoimmün hastalıkların patogeneğinde mikroorganizmaların kritik öneme sahip oldukları düşünülmektedir (7). Barsak florasını oluşturan birçok bakteri her ne kadar rutin incelemelerde kültüre edilemiyorsa da yeni moleküler yöntemler ile izolasyon ve tanımlanmaları mümkün hale gelmiştir (106). Son yıllarda özellikle büyük çaplı klinik çalışmalarda 16S rRNA geni kullanılarak fekal örnek profillemesi barsak mikrobiyotası hakkında fikir sahibi olmak için en iyi yollardan biri olarak kabul edilmektedir. Ancak bu yöntemde de dikkat edilmesi gereken noktalardan bir tanesi DNA ekstraksiyon metodu ve hedeflenen 16S rRNA bölgesidir. 16S rRNA sekanslaması yaygın ve kullanışlı bir aplikon sekanslama metodudur ve bakteriyel 16S rRNA alt ünitesini kodlayan genin değişik bölgelerini hedeflemektedir (107).

Mikrobiyomların konağa birçok faydası mevcuttur. Enzimatik reaksiyonlarda, konak homeostazında, mikrobese sentezinde, detoksifikasyon, epitel gelişimi ve bağışıklık sisteminde önemli görevlere sahiptirler. Mikrobiyotanın en önemli fonksiyonlarından biri alınan besinlerden verimli kalori sağlamaktır. Barsak mikrobiyotası dengesinin bozulmasıyla diyabetes mellitus, alerjik hastalıklar, hipertansiyon, metabolik sendrom, duyu durum bozuklukları, gluten enteropatisi, mide kanseri, otizm, şişmanlık, romatizmal hastalıklar ve fonksiyonel barsak hastalıkları gibi hastalıklar ortaya çıkabilmektedir (108, 109). Bununla birlikte son yıllarda elde edilen sonuçlar, barsak mikrobiyotasının özellikle besin alerjileri

gelişiminde önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir (110).

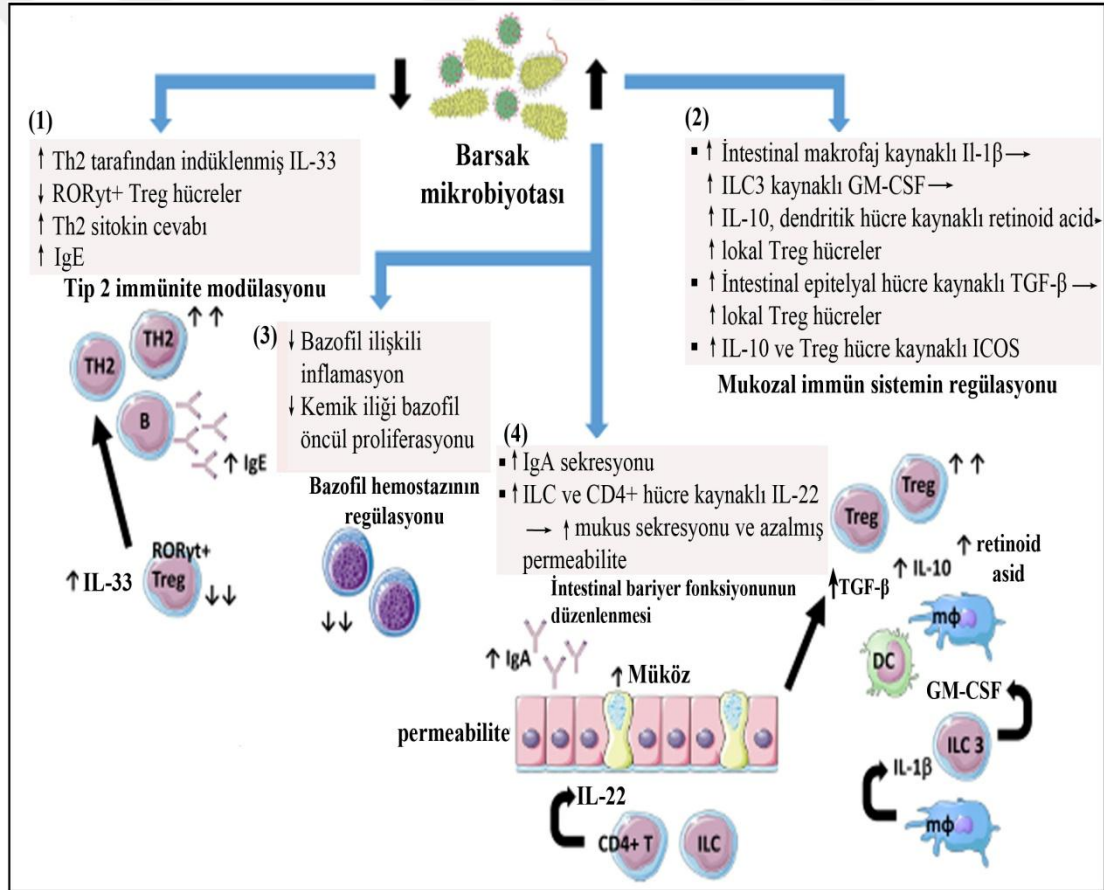
Barsak mikrobiyotasının besin alerjileri olan bireylerde farklılıklar gösterdiğine dair kanıtlar son yıllarda giderek artmaktadır (111, 112). Barsak mikrobiyotasının besin alerjisi olan ve olmayan bireylerde kültüre edildiği çalışmalarda bu bulgu üzerine erken kanıtlar sağlanmış ve 16S rRNA sekanslamaları içeren yeni nesil metotlar ve metagenomik sekanslama yöntemleri bu kanıtları doğrulamıştır (113). 16S rRNA sekans temelli çalışmalardan elde edilen bulgular, besin alerjisi olan çocukların besin alerjisi olmayan çocuklar ile kıyaslandığında barsak mikrobiyomlarında belirgin farklılıklar içerdiğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte barsak mikrobiyotası değişik besin alerji türlerinde farklılıklar içerebilmektedir.

Besin alerjisi ve barsak mikrobiyotası ile ilişkili insanlarda yapılan ilk gözlemsel çalışmalar çoğunlukla kültür temelli ve kısıtlı sayıda mikroorganizmaya odaklanılarak yapılan çalışmalardır. Bu çalışmalar açık bir şekilde yaşamın erken yıllarındaki disbiyozisin alerjik hastalık gelişimi ile ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır (114). Normal sağlıklı yenidoğanlarda barsak mikrobiyotasının %98'i *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* ve *Actinobacteria* filumlarından oluşmaktadır. Yaşamın 2. haftasından itibaren anne sütü ile beslenen bebeklerin gastrointestinal sistemleri ağırlıklı olarak *Bifidobacteria* türü bakterilerden oluşmaktadır. Yaşamın ilerleyen dönemlerinde diyet değişiklikleri ile beraber mikrobiyota içeriği çok daha çeşitli bir hal almaya başlamaktadır. İki yaşından sonra normal sağlıklı bir çocuğun barsak mikrobiyotası erişkinlerde gözlenen ile benzer bir hal almaya başlamaktadır (115). Besin alerjili çocukların barsak mikrobiyotaları bahsedilen bu tablolardan tamamen farklı bir durumdadır. Barsak mikrobiyotasındaki değişikliklerin besin alerjisi gelişiminde önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir. Diaz ve ark. (116) yaptıkları bir çalışmalarında inek sütü proteinine alerjisi olan ve formüle mama ile beslenen 17 infant'ın gaita örnekleri kontrol grubu ile kıyaslandığında azalmış oranlarda *Bacteriodes* türleri saptanmıştır. Bununla birlikte tüketilen formüle mamanın içeriğinin de barsak mikrobiyotası ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. İspanyol çocuklar üzerinde yapılan başka bir çalışmada süt alerjili çocuklarda sağlıklı kontroller ile kıyaslandığında total bakteri ve anaerobik bakteri

sayısında bir artma olduğu rapor edilmiş ve 6 aylık formüla mama ile beslenme sonrasında infantların barsak mikrobiyotalarında artmış *Lactobasillus* ve azalmış *Enterobacteria* ve *Bifidobacteria* türlerinin saptandığı belirtilmiştir (117). Ancak kültür temelli gözlem çalışmalarındaki sınırlı sayıdaki bakteri izolasyonu bu çalışmaların en büyük kısıtlılıklarından birini oluşturmaktadır (118). Yakın zamanlı çalışmalarda 16s rRNA gen sekanslaması yöntemi daha geniş kapsamlı bakteriyel izolasyona imkan sağlamış hem de daha kesin sonuçlar alınmasının önünü açmıştır. Bu sayede özellikle barsak inflamasyonu ilişkili disbiyozisde barsak mikrobiyotası özellikleri net bir şekilde ortaya konabilmiştir. Amerika Birleşik Devletlerinde yapılan ve 16sRNA gen sekanslamasını kullanan bir çalışmada, 3-6 aylık 225 besin alerjili çocuğun gaita örneklerinde *Haemophilus*, *Dialister*, *Dorea* ve *Clostridium* türlerinde düşük göreceli bolluk saptanmıştır (119). Inoue ve ark. (120) ise 2017 yılında yayınladıkları makalelerinde besin alerjili çocuklarda aynı yöntemle barsak mikrobiyotasını değerlendirmişler ve görece daha az *Akkermansia* cinsi ile görece daha fazla *Veillonella* türünü gaita örneklerinde saptamışlardır.

Besin alerjisi ile ilgili yapılan fare deneyleri barsak mikrobiyotasının intestinal mukoza ile doğuştan veya edinsel olmak üzere birçok yönden etkileştiğini göstermektedir. Barsak mikrobiyotası tip 2 immüniteyi modüle etmekte ve mikrop içermeyen farelerde (germ-free mice) Th2 tarafından indüklenen IL-33 düzeyini artırmaktadır. Buna zıt bir şekilde Th2 tarafından inhibe edilen ROR $\gamma$ t + T regülatuar hücreleri belirgin bir şekilde hem mikrop içermeyen farelerde hem de antibiyotik verilmiş farelerde (antibiotic-treated mice) azalmaktadır. Sonuç olarak Th2 ilişkili patolojik durum ilerlemekte ve IgE seviyeleri mikrobik sinyaller olmadan artmaktadır. Barsak mikrobiyotası mukozal immün sistemin düzenleyici rolünü devam ettirmektedir. Mikrop içermeyen farelerde mikrobiyal kolonizasyon Treg hücrelerinin sayıca artmasını indüklemektedir. Artmış mikrobiyal işaretlerin varlığında intestinal makrofajlar tarafından IL-1 $\beta$  salınımı sağlanır bu da tip 3 innate lenfoid hücreler (Innate Lenfoid Cells; ILC) tarafından granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor; GM-CSF) salınımına sebep olur. Sonuç olarak dendritik hücreler ve makrofajlar tarafından salınan IL-10 ve retinoid asid düzeyleri artar, bu da lokal Treg hücrelerin artışına sebep olur. Buna ek

olarak *Clostridia* kolonizasyonu Treg hücrelerde IL-10 ve indüklenebilir kostimülatör (Inducible Costimulator; ICOS) gibi önemli anti-inflamatuar moleküllerin artmasına sebep olur. Bunlara ek olarak barsak mikrobiyotasının bazofil hemostazını regüle ederek besin alerjisinin önlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar. Mikrobiyal sinyallerin varlığı kemik iliği kaynaklı bazofil öncüllerinin proliferasyonunu sınırlar ve bazofil ilişkili alerjik inflamasyonu azaltır. Mikrop içermeyen farelerde yapılan deneylerde *Clostridia* ve *Bacteroides*'in bazı suşlarının intestinal IgA sekresyonunu uyardığı bunun da immün toleransa sebep olduğu ve alerjen alımını azalttığı gösterilmiştir (121) (Şekil 2).



**Şekil 2.** Barsak mikrobiyotasının oral tolerans ve besin alerjisi ile ilişkisinin şematik gösterimi. [Ho ve Bunyavanich (121) çalışmasından modifiye edilerek kullanılmıştır].

### 1.3. Toll-Benzeri Reseptörler

Toll-benzeri reseptörler terimi ilk defa 1985 yılında Dr. Christiane Nüsslein-Vollhard ve ekibi tarafından Toll geninin bir meyve sineği olan *Drosophila*'nın embriyogenez aşamasında kritik bir rol oynadığının gösterilmesinden sonra kullanılmıştır. Dr. Christiane Nüsslein-Vollhard erken embriyonik gelişimdeki genetik kontrolü gösterdiği bu keşfinden sonra Edward B. Lewis ve Eric Wieschaus ile birlikte 1995 yılında Nobel Tıp ödülünün sahibi olmuştur. *Drosophila* toll proteininin insan homologunun karakterizasyonunun ve TLR'nin insanlarda kazanılmış immün sistemi de aktive edebileceği 1997'de Janeway ve Medzhitov tarafından gösterildikten sonra bu alanda çığır açıcı gelişmeler yaşanmıştır (122). TLR'ler doğal immünitenin parçaları olan makrofaj ve dendritik hücreler tarafından eksprese edilen, sitoplazmik ve ekstrasellüler bölgeden oluşan, tek membranlı, non-katalitik tip 1 transmembran proteinleridir (123).

Bu reseptörler ligandların tanınmasından sorumlu ekstrasellüler bölüm, transmembran heliks bölümü ve sinyal yollarının başlangıcı olan Toll/interleukin-1 reseptör (TIR) bölümü olmak üzere 3 bölümden oluşmaktadır (124). Reseptörlerin sitoplazmik bölgesi, IL-1 reseptörü ile büyük oranda benzerlik gösterir ve bu sebeple TIR bölgesi olarak isimlendirilir. Reseptörlerin ekstrasellüler bölgesinde her biri 24-29 amino asit (aa)'den oluşan, lösinden zengin tekrar (Leucine-Rich Repeat; LRR) motifleri mevcuttur. Bu LRR alanlarının farklı patojenlerin saptanmasından sorumlu olduğu bilinmektedir. İnsanlarda TLR ailesinin tanımlanmış 10 üyesi (TLR1-10) mevcuttur. TLR 1, 2, 4, 5, 6, 10 tipleri hücre yüzeyinde, TLR 3, 7, 8, 9 sitoplazmada özellikle endozomlarda bulunur (124, 125). Moleküler çalışmaların sonucunda, TLR1'in ağırlıklı olarak monosit, nötrofil, B-hücreleri ve natural killer (NK) hücrelerinde, TLR2'nin monosit, nötrofil ve dendritik hücrelerde, TLR3'ün dendritik hücrelerde, TLR4'ün endotelial hücreler, monosit, nötrofil ve dendritik hücrelerde, TLR5'in ise monosit ve dendritik hücrelerde eksprese olduğu gösterilmiştir (126).

Besin alerjisi gelişiminde barsak Treg hücrelerinin veya TLR'lerin rolü artık kesin olarak biliniyor ise de süreçteki patofizyolojik mekanizmalar halen gizemini korumaktadır. Bu noktada CD4+CD25+ Treg hücrelerin rolü gün geçtikçe daha belirgin şekilde açığa çıkmaktadır (127). Özellikle Foxp3 genindeki mutasyon sonucu ortaya çıkan bağışıklık sistemi bozukluklarının birçok endokrin sistem ilişkili otoimmün hastalıklara ve besin alerjilerine neden olabileceği gösterilmiştir (128). Farelerde yapılan çalışmalar da bu bulguları desteklemiş ve Foxp3 eksprese eden CD4+CD25+ Treg hücrelerin oral toleransda etkili olduğu gösterilmiştir (129). Westerholm-Ormio ve ark. (130) besin alerjili çocukların barsaklarında tedavi öncesi artmış Foxp3 ve TLR4 hücrelerinin varlığını göstermişler ve artmış TLR4 hücreleri ile korele saptanan T hücre reseptör yüzey belirteçlerinin besin alerjisi ve intestinal mikrobiyota arasındaki ilişkinin açığa çıkarılması bakımından önemli olduğunu belirtmişlerdir.

Toll-benzeri reseptörler ile çocukluk çağı besin alerjileri arasındaki ilişkide maternal alerji mevcudiyeti büyük önem arz etmektedir. Maternal alerji varlığının çocukta alerjik hastalık gelişimi için bir risk faktörü olduğu bilinmektedir. Kordon kanı örneklerinde azalmış TLR2, TLR4 ve CD14 mRNA seviyelerinin varlığı ile beraber azalmış neonatal TLR2 cevapları bu ilişkinin en büyük kanıtıdır (131). Alerji riski yüksek yeni doğanlarda LPS uyarısına bağlı regülatuar T hücre cevabındaki değişiklikler TLR4 yolağı üzerinden meydana gelmektedir. Bununla birlikte maternal alerji mevcut olan bireylerde TLR2, TLR3 ve TLR4 aktivasyonuna bağlı neonatal IL-12 ve interferon gama cevabı belirgin derecede yüksek bulunmuştur (132). Erken dönemde artmış olarak saptanan bu TLR cevapları genetik ve barsak mikrobiyotası ilişkili çevresel faktörlerle son derece yakın bir ilişki içindedir (133).

### **1.3.1. TLR-2 Geni ve Fonksiyonu**

Toll-benzeri reseptör 2, TLR ailesinin bir üyesidir ve doğal immün sistemin aktivasyonu ve patojen tanınmasında rol almaktadır. Bakteriyel lipoproteinlere ve diğer mikrobiyal hücre duvarlarına karşı tepki vererek doğal immün cevaba aracılık eder ve NF-kappa-B aktivasyonunu, sitokin salınımını ve inflamatuvar cevabın ortaya çıkmasını sağlar. Bakteriyel lipoproteinlerin ve lipopeptidlerin tanınmasında TLR1 ve

TLR6 birlikte görev almaktadır (134). TLR2/6 heterodimerinin, peptidoglikan ve mayalar (zimosan) ile etkileşime girdiği ortaya konmuştur, ancak TLR2'nin, bakteriyel lipoprotein yapısını birlikte tanıdığı heterodimeri şu an için tanımlanamamıştır. Peptidoglikan, TLR2 ve TLR6'nın oluşturduğu dimer reseptör aracılığı ile sinyal iletimini sağlarken, lipoproteinler, TLR6'ya ihtiyaç duymadan TLR2'yi aktive edebilmektedir. Benzer şekilde TLR2 ve TLR6 birlikte mikoplazma lipoproteininin tanınması için gereklidir. Yine TLR2 ile TLR1'in dimerizasyonu ile Neisseria reseptörü oluşmaktadır. Sadece TLR2, TLR1 ve TLR6 ile heterodimerize olarak farklı molekülleri tanıma kapasitesini artırırken, aktive olmak için heterodimerizasyon gerekmeyen TLR4 için bu görevi muhtemelen miyeloid farklılaşma proteini-2 (Myeloid Differentiation Protein-2; MD-2) ve CD14 gibi diğer yardımcı moleküller yürütmektedir (135). Bu açıdan değerlendirildiğinde TLR2'nin bakteriler, parazitler, mantarlar ve virüsler gibi birçok patojen ile ilişkili moleküler paternler'in tanınmasında son derece önemli bir yere sahip olduğu söylenebilir.

### **1.3.2. TLR-4 Geni ve Fonksiyonu**

Toll-benzeri reseptör 4, LPS tanınmasında ve LPS aracılı inflamatuvar cevaptan sorumlu en önemli TLR'dir. Doğal bağışıklık sisteminin merkezi reseptörüdür ve kardiyomiyositlerde, makrofajlarda, soluk borusu epitelinde, endotelyal ve düz kas hücrelerinden eksprese olur (136).

Toll-benzeri reseptör 4, insanlardaki TLR4 geni tarafından kodlanır ve kromozom 9q-32-33 üzerinde bulunan bir proteindir. Yaklaşık uzunluğu 13 kb'dır ve 222 amino asitlik bir proteini kodlayan 3 ekzonu vardır (137). TLR4, bir dizi kinaz yolağını ve transkripsiyon faktör aktivasyonunu indükleyerek patojenlere karşı doğal immün cevabın oluşmasını sağlar ve belirli enfeksiyonlara doğuştan gelen bir bağışıklık tepkisinin ortaya çıkmasında yaşamsal bir rol oynar. TLR4 fonksiyonel olarak hücre yüzeyinde CD14, MD-2 ve LPS-bağlayıcı proteini içeren bir molekül kompleksini oluşturur ve bu moleküllerden herhangi birisi eksik olan farelerde LPS cevabının da eksik olduğu gözlenir. TLR4 sinyalizasyonunda miyeloid farklılaştırma faktörü 88 (Myeloid Differentiation Factor 88; MyD88) bağımlı yolak ve MyD88 bağımsız yolak olmak üzere 2 yolak tanımlanmış olup, MyD88 bağımlı yollardaki

sinyal kaskadları, pro-inflamatuar sitokinlerin, kemokinlerin, eikosanoidlerin ve reaktif oksijen türleri (Reactive Oxygen Species; ROS) gibi doğal immünite etkenlerinin oluşumuna neden olur (138).

### 1.3.3. TLR-2 ve TLR-4 Gen Polimorfizimleri

Hücre DNA nükleotid dizilimindeki değişikliklere mutasyon denir ve mutasyonlar temelde hücrede kromozom sayısını etkileyen mutasyonlar (genom mutasyonu), tek başına kromozomun yapısını etkileyen mutasyonlar (kromozom mutasyonu) ve genleri etkileyen mutasyonlar (gen mutasyonları) şeklinde 3 gruba ayrılır. DNA sekanslarındaki bu gen mutasyonları tek nükleik asit değişimlerinden binlerce baz çiftini etkileyecek değişimlere kadar uzanır. Ancak genomdaki en yaygın dizi varyasyonu tek nükleotid polimorfizimleridir (Single Nucleotide Polymorphisms; SNP). Genlerdeki bu nükleotid değişimleri gen ekspresyonunun tamamen kaybına, varyant protein ekspresyonuna veya tamamen normal fenotipik değişikliklere neden olabilir. Bunlar birçok hastalığa yatkınlık için değerli belirteçlerdir. İsimlerinden de anlaşılacağı üzere SNP'ler tek bir baz çiftinin farklılaşmasını sağlayan değişimlerin sonucudur ve toplumda SNP varyasyonlarının sıklığı düşük olsa da bazı durumlarda kritik rollere sahiptirler (139). Yapılan çalışmalar, belirli bireylerin TLR ligandlarına uygun cevap verebilme yeteneğinin SNP tarafından etkilenebileceğini göstermektedir. Etkilenen lokusta birden fazla allelin bulunması şeklindeki DNA nükleotid değişimlerine polimorfizim adı verilir. TLR'lerin konak tarafından patojen tanınmasındaki önemli rolü göz önüne alındığında, TLR2 ve TLR4 polimorfizimlerinin bakteriyel enfeksiyonlar için risk faktörü oluşturabileceği aşıkardır. TLR2'nin korunmuş C-terminal bölgesinde yer alan Arg753Gln (R753Q) polimorfiziminin, TLR2 ligandı ile transfekte olmuş HEK293 hücrelerinde azalmış aktivasyona neden olduğu gösterilmiştir. Bu polimorfizmde genin 753. pozisyonunda arjinin/glutamin aminoasit değişikliği oluşmaktadır. Bu değişimin gen ürünü proteinin fosforilasyon mekanizması dolayısı ile sinyal yolağında değişime neden olduğu bildirilmiştir (140). Literatürde alerjik hastalıklarda TLR2 ve TLR4 genetik polimorfizimin incelendiği ve çelişkili sonuçların alındığı çok sayıda çalışma mevcuttur (141-143). Bu çalışmalardan biri olan Oh ve ark.'nın (141) çalışmasında

atopik dermatitli olan bireylerde TLR1, TLR2, TLR4 ve TLR9’u kodlayan genlerde 9 değişik SNP incelenmiş ve kontrol grubu ile kıyaslandığında bu SNP’lerde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Başka bir çalışmada ise atopik dermatitli 78 hasta TLR2 R753Q polimorfizimi açısından incelenmiş ve ağır seyreden atopik dermatitli hastalarda bu polimorfizim açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunduğu belirtilmiştir (142). Başka bir çalışmada ise Potaczec ve ark. (143) atopik dermatitli 130 hastayı TLR2–16934A>T polimorfizimi açısından incelemişler ve atopik dermatitin şiddetinin değerlendirilmesinde bu genetik polimorfizmin önemli olduğunu vurgulamışlardır. Benzer şekilde Salpietro ve ark. (144) TLR2 (R753Q ve A-16934T) ve TLR4 (D299G and T399I) SNP araştırdıkları 187 atopik dermatitli ve 150 sağlıklı çocuğu içeren çalışmalarında TLR2 R753Q SNP sıklığını yüksek bulmuşlar ve bu sıklığın hastalık şiddeti ile korele olduğunu rapor etmişlerdir. TLR4 D299G ve T399I SNP’ler için homozigot hasta saptanmamıştır. Atopik dermatitli hastalarda benzer genetik polimorfizimlerin incelendiği başka bir çalışmada ise TLR2 R753Q ve A-16934T polimorfizimlerinin hastalık ile ilişkisi saptanmamıştır (145). Bu bulgu genetik polimorfizimlerin toplumsal farklılıkları göstermesi açısından son derece anlamlı bir bulgudur. Yakın zamanlı başka bir çalışmada, psoriazisli 100 hasta TLR2 ve TLR4 gen polimorfizimleri açısından incelenmiştir (146). Psoriazisin, TLR2 Arg753Gln polimorfiziminde GA genotipi ve A alleli ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu saptanmış ve TLR2 genindeki varyant allellerin, psoriazisin moleküler etiyopatogenezinde önemli rolü olduğu belirtilmiştir. TLR4 Asp299Gly ve Thr399Ile gen polimorfizimi için hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. TLR4 gen polimorfizimleri ile değişik hastalıklar arasında yapılan çalışmalarda çelişkili sonuçlar rapor edilmiştir. Örneğin TLR4 Asp299Gly gen polimorfiziminin romatoid artrit ve ülseratif kolit oluşmasını engellediğini ve kardiyovasküler hastalık riskini azalttığını bildiren yayınların mevcudiyetine rağmen, sarkoidoz, multiple skleroz, periodontit ve tip 2 diyabet gibi hastalıklarda TLR4 genetik polimorfiziminin herhangi bir etkisinin olmadığını belirten çalışma sayısı gün geçtikçe artmaktadır (147-152). TLR4 genetik polimorfizimi ile hastalık gelişimi açısından bir diğer önemli kanıt Lorenz ve ark. (153) tarafından yayınlanmıştır. Bu raporda TLR4’te Asp299Gly polimorfizimi ile Finli toplumdaki

premature doğum riskinde artış olduğu bildirilmiş ve yine aynı grup başka bir çalışmalarında TLR4 mutasyonları ile HLA uygun kardeşten kemik iliği nakli yapılmış vakalarda Graft-versus-Host Hastalığı riskinde artışın paralellik gösterdiğini saptamışlardır (153-154). TLR gen polimorfizimleri ile değişik klinik durumlar arasındaki ilişki Tablo 1’de özetlenmiştir.

**Tablo 1.** TLR gen polimorfizimleri ve hastalıklar ile ilişkileri (149 no’lu referansdan modifiye edilmiştir)

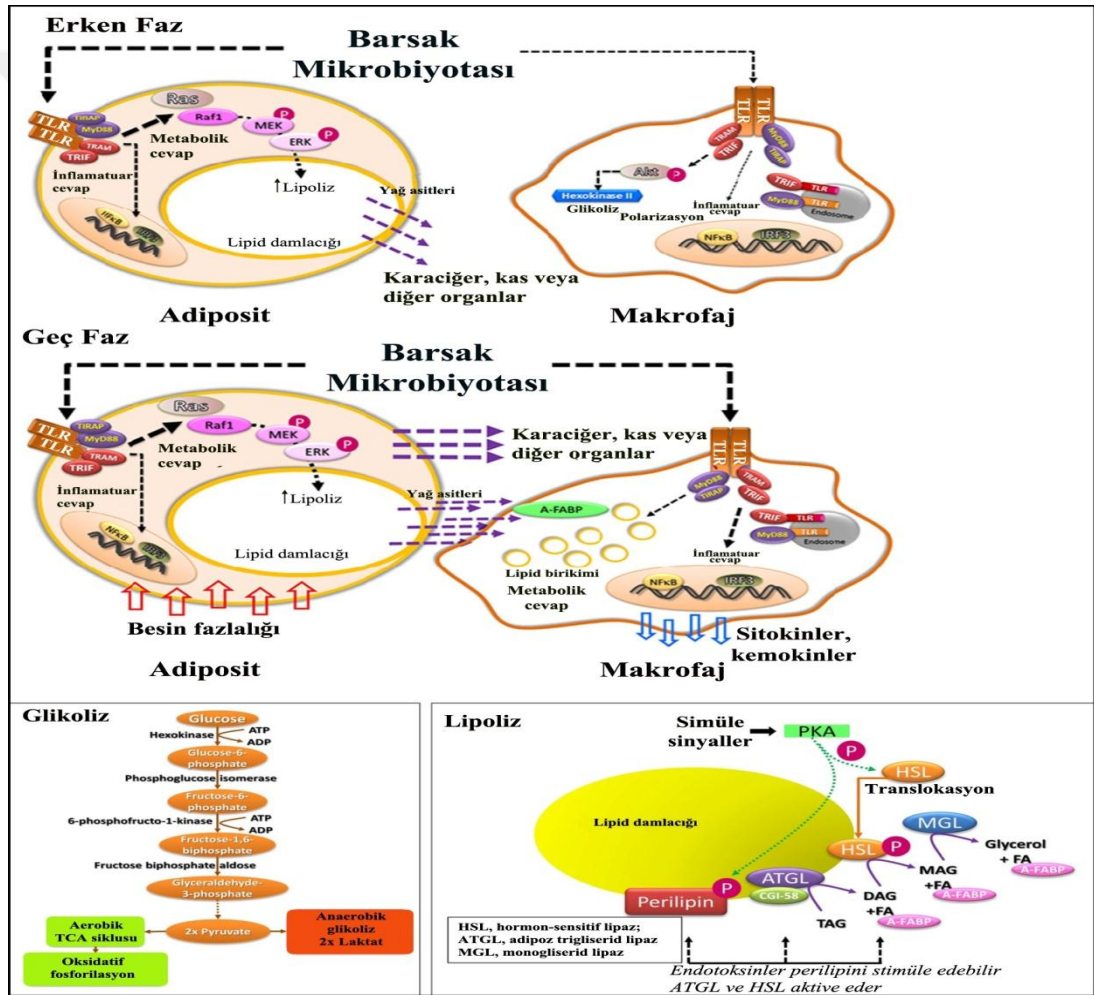
| TLR   | SNP                            | Hastalık                                                                                                                                                       | İlişki |
|-------|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| TLR2  | Arg753Gln                      | <i>Staphylococcus, Mycobacterium leprae</i> ve <i>Mycobacterium</i>                                                                                            | Evet   |
|       | -16934 A/T                     | Astım ve alerjiler                                                                                                                                             | Evet   |
|       | -196 to -174                   | Astım                                                                                                                                                          | Hayır  |
|       | -191 G/A, 1350 T/C             |                                                                                                                                                                |        |
| TLR3  | -7 A/C, +71 Leu412Phe 1377 C/T | Astım                                                                                                                                                          | Hayır  |
| TLR4  | Asp299Gly                      | İnhale endotoksinlere cevap, Gram negatif sepsis, Ağır RSV bronşiyoliti, Romatoid artrit, Diyabetik nöropati, Crohn hastalığı, Ülseratif kolit, Aterosklerozis | Evet   |
|       |                                | Meningokokal hastalık, Romatoid artrit, Sistemik lupus eritematozis, Multiple sklerozis, Ateroskleroz, Astım                                                   | Hayır  |
|       | Thr399Ile                      | İnhale endotoksinlere cevap, Ağır RSV bronşiyoliti, Ülseratif kolit                                                                                            | Evet   |
|       |                                | Romatoid artrit, Sistemik lupus eritematozis, Multiple skleroz, Astım                                                                                          | Hayır  |
| TLR5  | 392 Stop                       | <i>Lejyonella pnömophila</i> enfeksiyonu                                                                                                                       | Evet   |
| TLR6  | Ser249Pro                      | Astım                                                                                                                                                          | Evet   |
| TLR9  | -1237 C/T                      | Crohn hastalığı, Astım                                                                                                                                         | Evet   |
| TLR10 | +1031 G/A, +2322 G/A           | Astım                                                                                                                                                          | Evet   |

#### 1.3.4. Toll-Benzeri Reseptörler ve Barsak Mikrobiyotası

İnsan barsakları, kommensal bir şekilde yaşayan trilyonlarca bakteriye ev sahipliği yaparlar ve patojenik bakterilere benzer şekilde barsak mikroorganizmaları ve onların ürünleri TLR'ler tarafından tanınırlar. İntestinal bağışıklığın dengelenmesi barsak mikrobiyotası ve lokal TLR'ler arasındaki ilişki ile yakından alakalıdır. Özellikle bazı TLR tipleri barsak mikrobiyota kolonizasyonunda son derece etkilidir (155). Örneğin barsak mikrobiyotasının intestinal mukozal sistemle teması epitelyal ve dendritik hücrelerdeki TLR5 aktivasyonuna yol açmakta, bunun sonucu olarak da B hücrelerinin ve T hücrelerinin salınımı artmakta ve sonuç olarak oluşan IgA barsak mikrobiyotasının aşırı kolonizasyonunu sınırlamaktadır (156). T hücre üzerindeki TLR2 *Bacteriodes fragilis* üzerindeki polisakkarit A'yı tanımakta ve kolonizasyonunu kontrol etmektedir. Yüksek yağ içerikli gıda tüketimi veya şişmanlık barsak bütünlüğünü zayıflatabilmekte ve barsak mikroorganizmalarının sistemik dolaşıma katılımına yol açabilmektedir. Kommensal mikrobiyotanın tetiklediği bu düşük dereceli endotokseminin TLR aktivasyonunun bir sonucu olduğu düşünülmektedir (157). Bu sebeple GİS'in spesifik patolojik durumlarının başlangıcında ve ilerlemesinde TLR ve barsak mikrobiyotası arasındaki var olan ilişki son derece önemlidir (158). Mesela barsak mikrobiyotasının bozulduğu durumlardan biri olan inflamatuvar barsak hastalıklarında barsakta artmış *Enterococcus* ve *Bacteroides* türleri ile birlikte azalmış *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* türleri saptanmaktadır (159). İnflamatuvar barsak hastalığında mevcut olan artmış TLR2 ve TLR4 ekspresyonları bu reseptörler ile alakalı sinyal mekanizmalarının barsak mikrobiyotasını ve motilitesini etkilediğini düşündürmektedir.

Her ne kadar hücresel düzeydeki mikrobik patojenleri tanıyan reseptörler gıda toleransı ve alerjen tanımlama ile ilişkili görevler yapıyor olsalar da, TLR2 gastrointestinal sistem mikroçevresinde epitelyal hücreler ve dendritik hücreler tarafından eksprese edilmesinden dolayı ayrı bir öneme sahiptir. Bununla birlikte kommensal bakterilerin büyük kısmı gram pozitifdir ve TLR'yi yüksek miktarda aktive etme potansiyeline sahiptirler (160). Günümüzde TLR2'nin alerjenlere karşı tolerans göstermesi veya aktif immün cevabın başlatılması kararının verilmesinde en önemli faktörlerden biri olduğu gösterilmiştir. TLR2 ile birlikte bir lipopolisakkarid reseptörü

olan TLR4'ün besin alerjisi patogenezinde önemli bir role sahip olduğu gerçeği de unutulmamalıdır. Bashir ve ark. (161) TLR4'ün besin alerjisi gelişimindeki rolünü fareler üzerinde yaptıkları çalışmalarında ayrıntılı bir şekilde göstermişlerdir. TLR4 için fonksiyonel reseptörü olmayan fareye intragastrik Ara h1 allerjeni verilmesi anafilaktik reaksiyona benzer tepkilere neden olmuş ve bunun TLR4'ün besin alerjisinden korunmadaki kritik rolünün bir kanıtı olduğu bu çalışmanın bir sonucu olarak belirtilmiştir. Barsak mikrobiyotası ve TLR arasındaki ilişki ve bunun hücre içi enerji değişikliğindeki rolü Şekil 3'de verilmiştir.



**Şekil 3.** Barsak mikrobiyotasının hücre içi enerji değişikliğindeki rolü. Yağ hücresi gibi metabolik hücrelerdeki Toll-benzeri reseptörler, düşük miktardaki bakteriyel flora kaynaklı TLR ligandlarını tanıyabilir bu da lipoliz gibi katabolik süreçlere yol açabilir. Toll-benzeri reseptör yolağının aktivasyonu, bağışıklık sistem hücrelerinde (makrofaj gibi) glikolize sebep olarak polarizasyonu başlatır (en üst panel). Bağışıklık hücreleri

artan bir şekilde diğerk organlara geçiş yapar, enerji veya yağlar yakındaki makrofajlar tarafından inflamasyonun devamının sağlanması için tutulur bu da metabolik disfonksiyonu şiddetlendirir (orta panel). [Yiu ve ark. (157) alışmasından modifiye edilerek kullanılmıştır]



## 2. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmaya Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Alerji ve İmmünoloji Polikliniğine başvuran ve besin alerjisi tanısı alan 0-5 yaş aralığında 130 hasta dahil edilmiştir. Çalışmanın kontrol grubunu ise Genel Çocuk Polikliniğine rutin izlem amacı ile başvuran kronik hastalığı olmayan, sağlıklı aynı yaş grubundaki 110 çocuk oluşturmuştur.

Çalışma öncesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan 21.06.2018 tarih ve 11/04 sayılı kurul kararı alındıktan sonra, çalışmaya dahil edilen katılımcıların ailelerine çalışma hakkında bilgi verildi ve yazılı onamları alındı. Tıbbi öykü, fizik muayene, klinik özellikler, laboratuvar sonuçları ve besin alerjenleri ile ilgili bilgiler prospektif olarak toplandı ve kaydedildi. Çalışmada yer alan her katılımcının adı-soyadı, cinsiyeti, yaşı, şikayeti, doğum şekli, gestasyonel yaşı, doğum ağırlığı, beslenme şekli, antibiyotik kullanımı, alerji türü, absolü eozinofil sayısı, besin sIgE düzeyi, deri prik testi, besin yama testi, oral provokasyon testi bulguları kaydedildi.

Hasta ve kontrol grubundaki katılımcıların rutin tetkiklerine ek olarak antekübital venden 1 cc kadar kan alınarak uygun tüpler içinde -20°C’de saklandı. Bu tüpler içindeki kanlardan çalışma bitiminde Tıbbi Genetik Bölümü laboratuvarında TLR2, TLR4 gen polimorfizimleri çalışıldı.

Besin alerjisi olan hastalardan ve kontrol grubundaki vakalardan kan örnekleriyle birlikte gaita örnekleri de alındı. Katılımcılardan alınan gaita örneklerinden intestinal mikrobiyota değerlendirilmesinin yapılması amacıyla 16S rRNA analizi uygulanarak bakteri türleri saptandı.

### 2.1. Çalışmaya Alınma Kriterleri ve Grupların Oluşturulması

Çalışmaya dahil edilen hastalarda besin alerjisi tanısı; anamnez, deri prik testi, besin yama testi, çocuk yiyecek paneli (fx5), besin sIgE ölçümü ve besinler ile yapılan oral provokasyon testi sonuçlarının değerlendirilmesi ile konuldu. Bunlara ek olarak besinlerle DPT <%95 prediktif değeri olan hastalara oral provokasyon testleri uygulandı. İki yaşın altındaki çocuklara yapılan DPT; süt, yumurta akı, yumurta sarısı, buğday, sığır eti, yer fıstığı, fındık, muz, soya, balık, kakao, tavuk eti, ceviz, bezelye, çilek, mısır, pirinç, domates, yeşil biber, patates, üzüm, elma, portakal, limon, armut,

şeftali, kivi, kırmızı biber ve susam içeriyordu. İki yaşından büyük çocuklara yapılan DPT ise; aeroallerjen paneli ile birlikte yukardaki besin alerjenlerini içeriyordu (Allergopharma, Reinbek, Almanya).

Besinler ile DPT’de alerjen solüsyonları ve/veya taze besinler kullanıldı. Alerjen solüsyonları standardizasyon sağlamak için ön kolun volar yüzüne damlatıldı ve travmatik olmayan bir lanset veya aplikatör yardımıyla alerjenlerin epidermise ulaşması sağlandı. Testler uygulandıktan 15 dakika sonra aynı kişi tarafından değerlendirildi, endurasyon ve eritem çapları negatif ve pozitif kontrollerle karşılaştırıldı. Üç mm’den büyük veya eşit olan reaksiyonlar pozitif kabul edildi. İnek sütü için deri prik testinin >%95 prediktif değeri; 2 yaş altı  $\geq 6$  mm olarak, 2 yaş üzeri  $\geq 8$  mm olarak kabul edildi. Yumurta akı için deri prik testinin >%95 prediktif değeri; 2 yaş altı  $\geq 5$  mm olarak, 2 yaş üzeri  $\geq 7$  mm olarak kabul edildi.

Oral provokasyon testi, sIgE düzeyleri veya DPT için endurasyon çapı <%95 prediktif değeri olan hastalara uygulandı. Oral provokasyon testi pozitif olan hastalar çalışmaya alındı. İnek sütü ile oral provokasyon testi, uygun tedavi ve resüsitasyon malzemelerinin hazırda bulunduğu alerji ünitesinde yapıldı. Oral provokasyon testinden en az 2 hafta öncesinden başlamak üzere tüm çocuklara şüpheli besin içermeyen diyet eliminasyonu uygulandı. Çocukların yaşının küçük olması nedeniyle oral provokasyon testi açık metot kullanılarak yapıldı. İnek sütü ile yapılan oral provokasyon testinde inek sütü ( veya <12 ay ise formüla mama ) kullanılarak yapıldı. Oral provokasyon testleri Amerikan Alerji, Astım ve İmmünoloji Akademisi ve Amerikan Alerji, Astım ve İmmünoloji Kolejinin önerilerine uygun olarak uygulandı ve değerlendirildi (147).

Deri prik testindeki endurasyon çapı veya sIgE düzeyleri için >%95 prediktif değeri olan hastalarda ( $\leq 2$  yaş hastalarda süt spesifik IgE için  $>5$  kUA/L, DPT için endurasyon çapı  $\geq 6$  mm;  $>2$  yaş çocuklarda süt spesifik IgE için  $>15$  kUA/L, DPT için endurasyon çapı  $\geq 8$  mm) ve son 6 aylık süre içinde süt ile anafaksi hikayesi olan hastalarda oral provokasyon testi yapılmadı. Bu hastaların inek sütü alerjisi olduğu kabul edildi, eliminasyon diyeti uygulandı ve çalışmaya alındı. Anne emziriyorsa kendisine de alerjik besin için eliminasyon diyeti uygulandı ve 1000 mg kalsiyum, 10 mg D vitamini profilaksisi başlandı (148, 149).

Mikrobiyota incelemesi için katılımcılardan toplanan taze insan gaita (100 mg) örnekleri; ortalama 25 ml ebatlı, steril, ağzı sızdırmaz, kapaklı ve kaşıklı gaita numune kaplarına bırakıldı. Daha sonra ilk 0-2 saat içinde teslim alındı. Gaita numuneleri alındıktan hemen sonra, test edilmek üzere kullanılabilecek kadar -80 ° C’de saklandı. Gaita örneklerinden bakteriyel DNA izolasyonu yapılmasının ardından, bakteriyel 16S rRNA amplifikasyonu gerçekleştirildi. Oluşan ampliconlar, içerdikleri hiper değişken bölgelere göre ayrıştırılarak mikrobiyota analizi yapıldı.

## **2.2. Çalışmadan Dışlanma Kriterleri**

Kronik akciğer ve diğer solunum yolu hastalıkları, gastrointestinal sistem hastalıkları (inflamatuvar barsak hastalığı vs), renal/ürolojik hastalık, hepatik hastalık, kardiovasküler hastalık, metabolik hastalık, nörolojik hastalık, kistik fibrozisli çocuklar, kemik hastalığı ve immün yetmezlik öyküsü olan çocuklar, beş yaş üstü çocuklar, sürekli antibiyotik profilaksisi kullanan ve son 6 ay içinde antibiyotik kullanım hikayesi olan çocuklar çalışma dışı bırakıldı.

## **2.3. Moleküler Genetik Analizler**

Polimorfizim analizlerinde Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi kullanıldı. Analiz Taq-Man temelli primer prop çiftleri kullanılarak kantitatif gerçek zamanlı (Quantitative Real Time; QRT) PZR yöntemi ile gerçekleştirildi. Hastalardan rutin EDTA’lı biyokimya tüplerine 1 ml kan örneği alındı ve kullanılıncaya kadar -20°C’de saklandı. DNA izolasyonu öncesi kanlar oda ısısına gelinceye kadar çözdürüldükten sonra aşağıda detayları verilmiş olan manuel DNA izolasyon yöntemi uygulandı.

### **2.3.1. DNA İzolasyon Protokolü**

DNA izolasyonu için Genomik DNA izolasyonu WIZARD Genomik DNA Purification Kit (Katalog No: A1125, Promega, MA, USA) kullanıldı.

1. 5 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine 900 µl hücre parçalayıcı (Cell lysis buffer) solüsyon eklendi.

2. Örnek alınan tüpteki kanın tamamen karışması sağlanana kadar hafifçe sallandı, daha sonra 300 µl kan, hücre parçalayıcı solüsyonu içeren mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Karışması için tüp 5-6 kez alt-üst edildi.
3. Kırmızı kan hücrelerinin lizisi için 10 dakika oda ısısında bekletildi, bu esnada tüp 2-3 defa alt-üst edildi. Daha sonra 13.000-16.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
4. Görünen beyaz pellete dokunmaksızın süpernatant yaklaşık 10-20 µl rezidüel sıvı bırakacak şekilde atıldı.
5. Beyaz kan hücreleri resüspanse olana dek tüp 10-15 saniye kadar hafifçe vortekslendi.
6. 300 µl nuclei lysis solüsyonu resüspanse hücrelerin bulunduğu tüpe eklendi. Beyaz kan hücrelerinin lizisi için solüsyon 5-6 kere pipetlendi. Solüsyonun visköz bir hale gelmesi gözlemlendi. Karıştırma sonunda hücre çökeltileri görünenler çözülene kadar 37°C de inkübe edildi.
7. 1.5 µl RNAaz solüsyonu eklenen tüpler 25 defa alt-üst edilerek karıştırıldı. Karışım 37°C de 15 dakika inkübe edildi. Devam etmeden önce karışımın oda sıcaklığına gelmesi beklendi.
8. Nükleer pellete 100 µl protein presipitasyon solüsyonu 10 M (Molar) amonyum asetat eklendi, 30 saniye vortekslendi. Vortekslemeden sonra küçük protein çökeltileri görüldü.
9. Tüpler 13 000-16 000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Koyu kahverengi protein pelleti görüldü.
10. İçinde DNA bulunan süpernatant, içine 300 µl isopropanol konulmuş temiz bir 1.5 ml lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak kuvvetlice alt üst edildi.
11. İşleme ağ şeklinde DNA kütlesi görülene kadar devam edildi.
12. 13 000-16 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. DNA dipte küçük beyaz bir pellet şeklinde görüldü.
13. Süpernatant atıldı, 300 µl %70 lik etanol eklendi ve ardından kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

### **2.3.2. DNA Konsantrasyonu ve Saflık Derecesinin Ölçülmesi**

Her bir hastanın DNA konsantrasyonu nanodrop cihazında (Maestrogen, MaestroNanodrop, USA) ölçüldükten sonra saflık derecesinin belirlenmesi UV spektrofotometresi ile yapıldı. Absorbans genellikle 260 nm dalga boyunda ölçülür. Saf bir DNA örneğinin 260 ve 280 nm'deki absorbans oranı ( $A_{260nm}/A_{280nm}$ ) 1.8'dir. Bu değer elimizdeki DNA örneğinin verimini gösterir. Dolayısıyla bulduğumuz değer 1.8'e ne kadar yakınsa verim o kadar yüksektir. 1.8'den düşük değerler örnekte fenol ya da protein kontaminasyonu, 1.8'den büyük değerler ise RNA kontaminasyonu varlığını gösterir. Hasta ve kontrol grubuna ait DNA örnekleri ölçülerek konsantrasyonları ve saflıkları belirlendi. 1.8'e yakın olmayan değerlere sahip örneklerin DNA'ları tekrar izole edildi.

### **2.3.3. Varyantların Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile**

#### **Genotiplendirilmesi**

#### **2.3.3.1. TaqMan Probları ile Genotiplendirme**

Hasta ve kontrol örneklerinde aşağıda detayları Tablo 2 ve Tablo 3'de verilmiş olan FNDC5 genine ait Rs5743708, Rs1898830, Rs4986791 ve Rs4986790 polimorfizimleri TaqMan problemleri kullanılarak ABI 7500 Fast Real Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA) cihazında çalıştırıldı.

**Tablo 2.** FNDC5 genindeki polimorfizimlere ait referans numaraları ve dizileri

|             | <b>Referans No</b> | <b>Polimorfizim DNA dizilimi</b>   |
|-------------|--------------------|------------------------------------|
| <b>TLR2</b> | <b>Rs5743708</b>   | ATTCCCCAGCGCTTCTGCAAGCTGC[A/G]GAAG |
|             | [VIC/FAM]          | ATAATGAACACCAAGACCTAC              |
|             | <b>Rs1898830</b>   | ATAGTAAAATAAATCCAGAGAAATC[A/G]GAA  |
|             | [VIC/FAM]          | CAGGGGAAATAATAATATAAGA             |
| <b>TLR4</b> | <b>Rs4986791</b>   | TGTTCTCAAAGTGATTTTGGGACAA[C/T]CAGC |
|             | [VIC/FAM]          | CTAAAGTATTTAGATCTGAGC              |
|             | <b>Rs4986790</b>   | GCATACTTAGACTACTACCTCGATG[A/G]TATT |
|             | [VIC/FAM]          | ATTGACTTATTTAATTGTTTG              |

**Tablo 3.** RT-PZR’da kullanılan genotipleme testleri (Applied Biosystems, Foster City, CA)

| <b>Test adı</b> |                  | <b>Katalog Numarası</b> | <b>Kodon Değişimi</b>           | <b>Polimorfizim özelliği</b> |
|-----------------|------------------|-------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| <b>TLR2</b>     | <b>Rs5743708</b> | C__27860663_10          | CAG,CGG<br>Missense<br>mutation | Q753R,<br>Arg753Gln          |
|                 | <b>Rs1898830</b> | C__11853988_10          | Intron                          |                              |
| <b>TLR4</b>     | <b>Rs4986791</b> | C__11722237_20          | ACC,ATC<br>Missense<br>mutation | T399I,<br>Thr399Ile          |
|                 | <b>Rs4986790</b> | C__11722238_20          | GAT,GGT<br>Missense<br>mutation | D299G,<br>Asp299Gly          |

Elde edilen DNA konsantrasyonları 1-10 ng olacak şekilde sulandırıldı. PZR reaksiyon karışımı buz üzerinde hazırlandı. Tablo 4’de RT-PZR reaksiyonu için kullanılan malzeme miktarları detaylı olarak verilmiştir.

**Tablo 4.** RT-PZR reaksiyon karışımı

|                                         | <b>Bileşik Hacim (µl)</b> | <b>Katalog No:</b> |
|-----------------------------------------|---------------------------|--------------------|
| <b>TaqMan genotyping master miks</b>    | 5 µl                      | 4401890            |
|                                         |                           | C__27860663_10     |
| <b>TaqMan genotyping assay (20 X)</b>   | 0,25 µl                   | C__11853988_10     |
|                                         |                           | C__11722237_20     |
|                                         |                           | C__11722238_20     |
| <b>Nükleaz içermeyen H<sub>2</sub>O</b> | 1.0µl                     | C-34204885-10      |
| <b>Örnek</b>                            | 2.5µl                     | C-927694-10        |
| <b>Reaksiyon toplamı</b>                | 10.0µl                    |                    |

Doksan-altı kuyucuklu pleyt’in her bir kuyucuğuna sırasıyla her örnekten 2,5 µl DNA konuldu. DNA’ların üzerine, hazırlanan PZR reaksiyon miksinden 7,5 µl ilave edilip toplamda 10 µl’lik reaksiyon hacmi oluşturuldu. Pleyt’in üzeri optik film ile kapatılıp santrifüj yapıldı. Pleyt, 7500 Fast Real Time PZR cihazına yerleştirildikten sonra aşağıda Tablo 5’de verilen programa göre 40 döngü olacak şekilde PZR programı çalıştırıldı.

**Tablo 5.** Genotipleme için uygulanan RT-PZR programı

| <b>RT-PZR X 40 Döngü</b> |       |       |       |      |       |
|--------------------------|-------|-------|-------|------|-------|
|                          | Adım  | Adım  | Adım  | Adım | Adım  |
| <b>Sıcaklık</b>          | 60 °C | 95 °C | 95°C  | 60°C | 60°C  |
| <b>Zaman</b>             | 30 sn | 10 dk | 15 sn | 1 dk | 30 sn |

Polimeraz Zincir Reaksiyonu sonrası cihazın software sistemi kullanılarak allel 1 ve allel 2 ayırımına göre homozigot mutant, heterozigot ve homozigot normal genotipler belirlendi.

#### 2.4. Gaitadan DNA İzolasyonu

300 mg örnek tartılarak üzerine 3 ml serum fizyolojik (0.9% NaCl solüsyonu) eklenir ve vortekslenir. 3.000 rpm'de 2 dk santrifüj yapılır. Santrifüj sonrası süpernatant yeni bir tüpe alınır. 1.000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılır ve santrifüj sonrası süpernatant atılır. Tüpün dibinde kalan pellet üzerine 2 ml fosfat tamponu (Phosphate-Buffered Saline; PBS) eklenir ve vortekslenir. 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj yapılarak üstteki süpernatant atılır. Pellet üzerine 1 ml parçalayıcı tampon [1% (w/v) *N*-setil-*N,N,N*-trimetilamonyum bromür (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*; CTAB), 100 mM Etilen diamin tetra asetik asit (*Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*; EDTA), 1.5 M Sodyum klorür (*Sodium Chloride*; NaCl), 100 mM Trisodyum fosfat (*Trisodium Phosphate*; Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) ve 100 mM of Tris hidroklorid (*Tris Hydrochloride*; Tris-HCl (pH 8.0)] eklenerek pipetaj yapılır. Oluşan homojenizat üzerine 4 µl (20 mg/ml) proteinaz K ve 40 µl (1 mol) Dithiotheritol (DTT) eklendikten sonra tüpler 55°C 'de 1 saat su banyosunda bekletilir. 13.000 rpm'de 5 dk santrifüj sonrası üstteki süpernatant yeni bir tüpe alınır. Alınan süpernatant üzerine süpernatant ile aynı oranda fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) eklenir ve vortekslenir. 10.000 rpm'de 10 dk santrifüj sonrası üst faz yeni bir tüpe alınır. Alınan üst faz üzerine üst faz ile aynı oranda kloroform ve izoamilalkol (24:1) eklenir ve vortekslenir. 10.000 rpm'de 10 dk santrifüj sonrası üst faz yeni bir tüpe alınır. Üzerine 100 µl sodyum asetat eklenir ve vortekslenir. Daha sonra üzerine 1600 ml saf etanol, soğuk olarak eklenir ve elle alt üst edilerek homojenizasyon sağlanır. Örnekler bu aşamadan sonra -80°C de 1 saat bekletilir. 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj sonrası süpernatant atılır. Santrifüj sonrası dibe çöken DNA pelleti üzerine 1 ml %70'lik etil alkol eklenerek DNA yıkanır. 13.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilir ve süpernatant atılır. DNA pelletinin kuruması beklenir. Pellet büyüklüğü ile orantılı olacak şekilde örnekler DNAaz, RNAaz ve pirojen içermeyen su ile sulandırılır (162).

#### 2.4.1. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu [Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (QRT-PCR)]

Elde edilen DNA'lar sekans spesifik primerlerin varlığında Gerçek Zamanlı (Real Time) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile amplifiye edildi. Örneklerde çalışılan mikrobiyota spesifik bakteriler ve kullanılan primerler Tablo 6'de verilmiştir. RT-PCR analizleri sonucunda bakteri miktarındaki farklılıkların hesaplanmasında  $2^{-\Delta\Delta CT}$  metodu kullanıldı.

**Tablo 6.** QRT-PCR'da kullanılan primerler

| Bakteriler<br>(16S rRNA<br>spesifik) | Primerler (5-3)                            | Kaynak                                 |
|--------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------|
| <i>Bacteroides</i>                   | GGCGACCGGCGCACGGG<br>GRCCTTCCTCTCAGAACCC   | Nakanishi ve ark. (163)                |
| <i>Bifidobacterium</i>               | CCTGGTAGTCCACGCCGTAA<br>CAGGCGGGATGCTTAACG | Mäkiyuokko ve ark.<br>(164)            |
| <i>Firmicutes</i>                    | TGAAACTYAAAGGAATTGACG<br>ACCATGCACCACCTGTC | Bacchetti de Gregoris ve<br>ark. (165) |
| Universal                            | AAACTCAAAGGAATTGACGG<br>CTCACRRCACGAGCTGAC | Bacchetti de Gregoris ve<br>ark. (165) |

QRT-PCR üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Pleyt kuyucuklarına DNA (5 ng/ml) örneklerinden 2 µl koyuldu. Her bir örnek için 5µl Eva Green Master Mix, 3 µl nükleaz içermeyen su ve 1 µl primer örnek sayısına göre bileşen miktarları hesaplanarak eppendorflara bırakıldı ve vortekslendi. Pleyt'deki DNA örneklerinin üzerine hazırlanan karışımdan 9 µl pipet ile bırakılarak pleyt'in üzeri optik filmle kapatıldı (Tablo 7). Pleyt örneklerinin tamamen dibe çökmesi ve oluşan kabarcıkların yok edilmesi amacıyla mini pleyt spin santrifüj cihazında 1 dakika santrifügasyon işlemine tabi tutuldu. Bakterilerin kantitatif seviyeleri, Applied Biosystems 7500 Real Time PCR cihazı ile ölçüldü. Çalışmada kontrol gen (housekeeping) kullanıldı. Isı

koşulları 50°C’de 2 dakika, 95°C’de 10 dakika, 95°C’de 15 saniye ve 60°C’de 1 dakika olacak şekilde ayarlandı (Tablo 8).

**Tablo 7.** QRT-PCR için kullanılan bileşikler (TaqMan Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems, Katalog No:4369016)

| Bileşikler            | Hacim (10 µl )*Örnek sayısı (1) |
|-----------------------|---------------------------------|
| DNA                   | 1                               |
| Primer                | 1                               |
| Green Master Mix      | 5                               |
| Nükleaz içermeyen H2O | 3                               |
| Toplam                | 10                              |

## 2.5. İstatistiksel Analizler

**Tablo 8.** RT-PCR programı

| RT-PCR   | 1. Adım | 2. Adım | 3. Adım | 4. Adım |
|----------|---------|---------|---------|---------|
| Sıcaklık | 50 °C   | 95 °C   | 95°C    | 60°C    |
| Zaman    | 2 dk    | 10 dk   | 15 sn   | 1 dk    |

İstatistiksel analizler Fırat Üniversitesi lisanslı SPSS 22 (Statistical Package for the Social Sciences) paket programı kullanıldı. Sayısal değişkenlerden normal dağılım gösterenler ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası, normal dağılım göstermeyenler ortanca ve çeyrekler arası aralık olarak belirtildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda Kruskal Wallis testi, ikili grupların karşılaştırmasında MannWhitney-U testi kullanıldı. Nitel verilerin karşılaştırmalarında ise Fisher’s kesin ki-kare ve Pearson ki-kare testi kullanıldı. Analiz sonuçları %95 güven aralığında değerlendirilerek,  $p<0,05$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Hasta ve Sağlıklı Kontrol Gruplarının Genel Özellikleri

Bu çalışmaya 130 besin alerjili, 110 kontrol grubu olmak üzere toplam 240 katılımcı dahil edilmiştir. Besin alerjisi olan 130 hastanın 89'u (%68,5) erkek, 41'i (%31,5)'u kız, kontrol grubunun 61 (%55,5)'i erkek, 49 (%44,5)'u kız idi. Hasta grubun yaş ortalaması  $8,145 \pm 5,95$  ay, kontrol grubunun yaş ortalaması  $8,860 \pm 4,66$  ay idi. Gruplar arasında yaş açısından istatistiksel açıdan anlamlı bir fark mevcut değildi ( $p=0,847$ ). Gruplar doğum şekli, gestasyonel yaş ve doğum ağırlığı açısından değerlendirildiklerinde gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Beslenme şekli açısından hasta grup ve kontrol grubu değerlendirildiğinde her ne kadar formüle ile beslenen bebeklerde besin alerjisi gelişimi daha düşük olma eğiliminde saptandı ise de, bu bulgu istatistiksel açıdan anlamlı değildi ( $p=0,214$ ) (Tablo 9).

**Tablo 9.** Besin alerjisi ve kontrol grubunun klinik ve demografik verilerinin karşılaştırılması

|                                 |                                 | Hasta grup (n:130) | Kontrol (n:110)  | p    |
|---------------------------------|---------------------------------|--------------------|------------------|------|
| Cinsiyet n(%)                   | Erkek                           | 89 (68,5 )         | 61 ( 55,4 )      | 0,38 |
|                                 | Kız                             | 41 ( 31,5)         | 49 ( 44,6 )      |      |
| Yaş (ay)<br>(ortalama $\pm$ SD) |                                 | 8,145 $\pm$ 5,95   | 8,860 $\pm$ 4,66 | 0,84 |
| Doğum Şekli n(%)                | Sezaryen                        | 78 (60)            | 68 (61,8)        | 0,63 |
|                                 | Normal doğum                    | 52(40)             | 42 (38,2)        |      |
| Gestasyonel yaş<br>(hafta) n(%) | $\geq 38$                       | 82 (63,1)          | 76 (69,0)        | 0,40 |
|                                 | $< 38$                          | 48 (36,9)          | 34 (31,0)        |      |
| Doğum ağırlığı (gr)<br>n(%)     | $\geq 3500$                     | 33 (25,4)          | 19 (17,3)        | 0,31 |
|                                 | 3000-3500                       | 45 (34,6)          | 44 (40)          |      |
|                                 | $< 3000$                        | 52 (40,0)          | 47 (42,7)        |      |
| Beslenme Şekli<br>n(%)          | Anne sütü                       | 64 (49,2)          | 49 (44,5)        | 0,21 |
|                                 | Anne sütü+ formüle              | 22 (16,9)          | 15 (13,6)        |      |
|                                 | Anne sütü+<br>formüle+inek sütü | 21 (16,2)          | 19 (17,2)        |      |
|                                 | Anne sütü+ inek                 | 20 (15,4)          | 17 (15,4)        |      |
|                                 | Formüle                         | 3 (2,3)            | 10 (9,3)         |      |
| Antibiyotik<br>kullanımı n(%)   | Var                             | 73 (56,2)          | 66 (60)          | 0,54 |
|                                 | Yok                             | 57 (43,8)          | 44 (40)          |      |

### **3.2. Tek Nükleotid Polimorfizim Sonuçları**

#### **3.2.1. TLR2 Rs1898830 tek nükleotid polimorfizim sonuçları**

Toll-benzeri reseptör 2 geni Rs1898830 SNP için minör allel (A/G) ( $p=0,643$ ) ve genotip ( $p=0,860$ ) dağılımı bakımından besin alerjili hasta grubu ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Hasta grupta Major/Minör allel frekansı 0.60/0.40 ve kontrol grubunda Major/Minör allel frekansı 0.546/0.453 olarak saptandı. AA, AG ve GG genotip sayıları hasta ve kontrol grubunda benzer oranlarda idi (sırasıyla 43/59/28 ve 40/48/22) (Tablo 10).

#### **3.2.2. TLR2 Rs5743708 (Arg753Gln) tek nükleotid polimorfizim sonuçları**

Besin alerjili hasta grubunda TLR2 geni Rs5743708 (Arg753Gln) SNP için (A/G) Majör/ Minör allel frekansı 0.884/0.116, kontrol grubunda ise 0.91/0.09 idi. Bu fark istatistiksel açıdan anlamlı değildi ( $p=0,578$ ). Gruplar genotip sayıları açısından kıyaslandığında hasta grupta genotip sayısı AA, AG ve GG için sırasıyla 127/3/0 iken kontrol grubunda AA, AG ve GG sayıları sırasıyla 108/2/0 idi ( $p=0,578$ ) (Tablo 10).

#### **3.2.3. TLR4 Rs4986790 (Asp299Gly) tek nükleotid polimorfizim sonuçları**

Besin alerjili hasta grubunda TLR4 geni Rs4986790 (Asp299Gly) SNP için (A/G) Majör/Minör allel frekansı 0,788/0,212, kontrol grubunda 0,719/0,280 olarak saptandı. Her iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark vardı ( $p=0,017$ ). Her iki grup arasında genotip (AA, AG, GG) sayıları açısından anlamlı bir fark mevcuttu ( $p=0,016$ ) (Tablo 10).

#### **3.2.4. TLR4 Rs4986791 (Thr399Ile) tek nükleotid polimorfizim sonuçları**

Besin alerjili hasta grubunda ve kontrol grubunda Majör/ Minör allel frekansı (C/T) ( $p=0,463$ ) ve genotip sayıları ( $p=0,463$ ) açısından anlamlı bir fark mevcut değildi (Tablo 10).

**Tablo 10.** Besin alerjili hastalarda ve sağlıklı kontrol grubunda TLR2 ve TLR4 gen polimorfizimlerinin genotip sıklıkları ve allel frekansları

|      | Referans<br>numarası     | Majör/<br>minör | Hasta grup<br>(n=130)         | Genotip<br>sayısı | Kontrol grubu<br>(n=110)      | Genotip<br>sayısı | Minör OR<br>(%95 GA)       | Minör<br>allel için<br>p | Genotip<br>için OR         | Genotip<br>için p |
|------|--------------------------|-----------------|-------------------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|-------------------|
| TLR2 | Rs5743708<br>(Arg753Gln) | A/G             | Majör/<br>Minör<br>allel frk. | 127/3/0           | Majör/<br>Minör<br>allel frk. | 108/2/0           | 0,785<br>(0.130-<br>4.746) | 0.578                    | 0.784<br>(0.128-<br>4.778) | 0.578             |
|      | Rs1898830                | A/G             | 0.60/<br>0.40                 | 43/59/ 28         | 0.546/<br>0.453               | 40/48/ 22         | 0.906<br>(0.630-<br>1.302) | 0.643                    | 0,910<br>(0.486-<br>1.704) | 0,860             |
| TLR4 | Rs4986791<br>(Thr399Ile) | C/T             | 0.683/<br>0.317               | 122/8/0           | 0.622/<br>0,377               | 102/8/0           | 1.188<br>(0.438-<br>3.221) | 0.463                    | 1.196<br>(0.433-<br>3.299) | 0,463             |
|      | Rs4986790<br>(Asp299Gly) | A/G             | 0.788/<br>0.212               | 111/19/0          | 0.719/<br>0,280               | 102/8/0           | 0.352<br>(0.138-<br>0.899) | 0.017                    | 0,337<br>(0.129-<br>0.876) | 0.016             |

OR: odds ratio; GA: güvenlik aralığı

### **3.3. Besin Alerjili Hasta Grubunun Demografik ve Klinik Verileri ile TLR2 ve TLR4 Gen Polimorfizimlerinin Karşılaştırma Sonuçları**

Çalışmaya dahil edilen besin alerjili hastaların cinsiyeti ile TLR2 ve TLR4 gen polimorfizimleri arasında anlamlı bir ilişki mevcut değildi (Cinsiyet ile TLR2 Rs1898830, TLR2 Rs5743708 (Arg753Gln), TLR4 Rs4986790 (Asp299Gly) ve TLR4 Rs4986791 (Thr399Ile) gen polimorfizimleri arasındaki ilişkiyi gösteren p değerleri sırasıyla 0,25, 0,18, 0,98 ve 0,23 idi. Alerji türleri ile TLR gen polimorfizimleri arasındaki ilişki incelendiğinde besin alerjili hastalarda alerji türleri ile TLR4 Rs4986790 (Asp299Gly) gen polimorfizimleri arasında anlamlı bir ilişki mevcut olduğu ( $p=0,025$ ) bu farklılığın izole süt alerjisi olan grup ile multipl besin alerjisi olan grup arasında ( $p=0,036$ ) olduğu saptanmıştır. Bunun

dışında hastaların klinik şikayetleri, alerji türleri, doğum şekli, gestasyonel yaş, doğum ağırlığı ve beslenme şekilleri ile diğer TLR2 ve TLR4 gen polimorfizimleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark mevcut değildi. Besin alerjili hastaların demografik verileri ve klinik özellikleri ile TLR2 Rs1898830, TLR2 Rs5743708 (Arg753Gln), TLR4 Rs4986790 (Asp299Gly) ve TLR4 Rs4986791 (Thr399Ile) genetik polimorfizimlerinin genotip sıklıkları ve dağılımları Tablo 11 ve Tablo 12’de ayrıntılı bir şekilde sunulmuştur

**Tablo 11.** Hastaların demografik ve klinik özellikleri ile TLR2 gen polimorfizimleri arasındaki ilişki

|                                |                        | TLR 2 için Genotip sıklığı ve dağılımı (n/%) |           |          |      |                       |         |    |      |
|--------------------------------|------------------------|----------------------------------------------|-----------|----------|------|-----------------------|---------|----|------|
|                                |                        | Rs1898830                                    |           |          |      | Rs5743708 (Arg753Gln) |         |    |      |
|                                |                        | AA                                           | AG        | GG       | p    | AA                    | AG      | GG | p    |
| <b>Cinsiyet</b>                | Erkek                  | 24(18,4)                                     | 42 (32,3) | 21(16,1) | 0,25 | 88(67,74)             | 1(0,76) | 0  | 0,18 |
|                                | Kız                    | 19(14,6)                                     | 17(13,3)  | 7(5,3)   |      | 39(30)                | 2(1,5)  | 0  |      |
| <b>Şikayet</b>                 | Egzema                 | 29(22,3)                                     | 34(26,1)  | 19(14,6) | 0,53 | 85(65,3)              | 2(1,53) | 0  | 0,93 |
|                                | Kusma                  | 2(1,5)                                       | 8(6,1)    | 5(3,8)   |      | 12(9,56)              | 1(0,76) | 0  |      |
|                                | Öksürük                | 3(2,3)                                       | 4(3,0)    | 3(2,3)   |      | 9(6,9)                | 0       | 0  |      |
|                                | İnfanıl Astım          | 3(2,3)                                       | 6(4,6)    | 0        |      | 8(6,15)               | 0       | 0  |      |
|                                | Diğer                  | 4(3,42)                                      | 9(6,92)   | 1(0,76)  |      | 13(9,86)              | 0       | 0  |      |
| <b>Alerji Türü</b>             | İzole yumurta alerjisi | 17(13)                                       | 21 (16,1) | 17(13)   | 0,36 | 59(45,3)              | 3(2,3)  | 0  | 0,33 |
|                                | İzole süt alerjisi     | 12(9,2)                                      | 19 (14,6) | 5(3,8)   |      | 31(23,8)              | 0       | 0  |      |
|                                | Multipl besin alerjisi | 13(10)                                       | 19 (14,6) | 6(4,6)   |      | 36(27,6)              | 0       | 0  |      |
| <b>Doğum Şekli</b>             | Sezarven               | 26(20,1)                                     | 35(26,9)  | 16(12,3) | 0,99 | 77(59,2)              | 2(1,53) | 0  | 0,96 |
|                                | Normal doğum           | 17(13,1)                                     | 24(18,4)  | 12(9,2)  |      | 50(38,51)             | 1(0,76) | 0  |      |
| <b>Gestasyonel Yaş (hafta)</b> | >38                    | 22(16,9)                                     | 37(28,4)  | 20(15,3) | 0,34 | 80(61,5)              | 2(1,53) | 0  | 0,99 |
|                                | <38                    | 21(16,35)                                    | 22(16,9)  | 8(6,15)  |      | 47(36,21)             | 1(0,76) | 0  |      |
| <b>Doğum Ağırlığı (gr)</b>     | >3500                  | 13(10)                                       | 17(13)    | 3(2,3)   | 0,14 | 33(25,51)             | 0       | 0  | 0,54 |
|                                | 3000-3500              | 14(10,7)                                     | 14(10,7)  | 13(10)   |      | 44(33,8)              | 1(0,76) | 0  |      |
|                                | <3000                  | 17(13,4)                                     | 28(21,5)  | 11(8,4)  |      | 50(38,4)              | 2(1,53) | 0  |      |
| <b>Beslenme Şekli</b>          | Anne sütü              | 25(19,2)                                     | 26(20)    | 12(9,2)  | 0,40 | 63(48,57)             | 1(0,76) | 0  | 0,88 |
|                                | Anne sütü+ formüla     | 8(6,15)                                      | 9(6,9)    | 6(4,84)  |      | 21(16,25)             | 1(0,76) | 0  |      |
|                                | Anne sütü+             | 6(4,6)                                       | 14(10,7)  | 4(3,0)   |      | 20(15,3)              | 1(0,76) | 0  |      |
|                                | Anne sütü+ inek sütü   | 4(3,20)                                      | 8(6,15)   | 7(5,3)   |      | 20(15,3)              | 0       | 0  |      |
|                                | Formüla                | 1(0,76)                                      | 0         | 0        |      | 3(2,3)                | 0       | 0  |      |
| <b>Antibiyotik Kullanımı</b>   | Var                    | 24(31,6)                                     | 33(43,4)  | 19(25)   | 0,68 | 72(98,6)              | 1(1,4)  | 0  | 0,42 |
|                                | Yok                    | 19(35,2)                                     | 26(48,1)  | 9(16,7)  |      | 55(96,5)              | 2(3,5)  | 0  |      |

**Tablo 12.** Hastaların demografik ve klinik özellikleri ile TLR4 gen polimorfizimleri arasındaki ilişki

|                                |                        | TLR 4 için Genotip sıklığı ve dağılımı (n/%) |         |    |       |                      |         |    |      |
|--------------------------------|------------------------|----------------------------------------------|---------|----|-------|----------------------|---------|----|------|
|                                |                        | Rs4986790 (Asp299Gly)                        |         |    |       | Rs4986791(Thr399Ile) |         |    |      |
|                                |                        | AA                                           | AG      | GG | p     | CC                   | CT      | TT | p    |
| <b>Cinsiyet</b>                | Erkek                  | 76 (58,5)                                    | 13(10)  | 0  | 0,98  | 82(63,24)            | 7(5,3)  | 0  | 0,23 |
|                                | Kız                    | 35(26,9)                                     | 6(4,6)  | 0  |       | 40(30,7)             | 1(0,76) | 0  |      |
| <b>Şikayet</b>                 | Egzema                 | 77(59,2)                                     | 10(7,6) | 0  | 0,32  | 82(63)               | 5(3,8)  | 0  | 0,36 |
|                                | Kusma                  | 11(8,6)                                      | 2(1,5)  | 0  |       | 13(10)               | 0       | 0  |      |
|                                | Öksürük                | 7(5,6)                                       | 2(1,5)  | 0  |       | 7(5,3)               | 2(1,5)  | 0  |      |
|                                | İnfanıl Astım          | 6(4,6)                                       | 2(1,5)  | 0  |       | 8(6,44)              | 0       | 0  |      |
|                                | Diğer                  | 10(7,69)                                     | 3(2,30) | 0  |       | 12(9,2)              | 1(0,76) | 0  |      |
|                                |                        |                                              |         |    |       |                      |         |    |      |
| <b>Alerji Türü</b>             | İzole yumurta alerjisi | 53(40,7)                                     | 9(6,9)  | 0  | 0,025 | 59(45,3)             | 3(2,3)  | 0  | 0,47 |
|                                | İzole süt alerjisi     | 22(16,9)                                     | 9(6,9)  | 0  |       | 26(20)               | 5(3,8)  | 0  |      |
|                                | Multipl besin alerjisi | 35(26,9)                                     | 1(0,76) | 0  |       | 36(27,6)             | 0       | 0  |      |
|                                |                        |                                              |         |    |       |                      |         |    |      |
| <b>Doğum Şekli</b>             | Sezarven               | 67(51,5)                                     | 12(9,2) | 0  | 0,87  | 72(55,46)            | 7(5,38) | 0  | 0,26 |
|                                | Normal doğum           | 44(33,8)                                     | 7(5,5)  | 0  |       | 50(38,4)             | 1(0,76) | 0  |      |
| <b>Gestasyonel Yaş (hafta)</b> | ≥38                    | 71(54,6)                                     | 11(8,4) | 0  | 0,81  | 78(60,07)            | 4(3,07) | 0  | 0,79 |
|                                | <38                    | 40(30,85)                                    | 8(6,15) | 0  |       | 44(33,79)            | 4(3,07) | 0  |      |
| <b>Doğum Ağırlığı (gr)</b>     | ≥3500                  | 29(22,3)                                     | 3(2,3)  | 0  | 0,45  | 33(25,3)             | 0       | 0  | 0,18 |
|                                | 3000-3500              | 41(31,6)                                     | 5(3,8)  | 0  |       | 43(33,26)            | 2(1,53) | 0  |      |
|                                | <3000                  | 41(31,6)                                     | 11(8,4) | 0  |       | 46 (35,3)            | 6(4,61) | 0  |      |
| <b>Beslenme Şekli</b>          | Anne sütü              | 54(41,5)                                     | 9(6,9)  | 0  | 0,34  | 60(46,1)             | 4(3,07) | 0  | 0,97 |
|                                | Anne sütü+ formüla     | 20(15,3)                                     | 3(2,3)  | 0  |       | 21(16,1)             | 1(0,76) | 0  |      |
|                                | Anne sütü+             | 15(11,64)                                    | 6(4,6)  | 0  |       | 19(14,6)             | 2(1,53) | 0  |      |
|                                | Anne sütü+ inek sütü   | 19(14,6)                                     | 1(0,76) | 0  |       | 19(14,6)             | 1(0,76) | 0  |      |
|                                | Formüla                | 3(2,4)                                       | 0       | 0  |       | 3(2,48)              | 0       | 0  |      |
| <b>Antibiyotik Kullanımı</b>   | Var                    | 60(81)                                       | 14(19)  | 0  | 0,10  | 66(90,4)             | 7(9,6)  | 0  | 0,06 |
|                                | Yok                    | 51(91)                                       | 5(9)    | 0  |       | 56(98,2)             | 1(1,8)  | 0  |      |

### **3.4. Besin Alerjili Hasta Grubunun Laboratuvar Değerleri ile TLR2 ve TLR4 Gen Polimorfizimlerinin Karşılaştırma Sonuçları**

Absolü eozinofil sayısı (AES) ile TLR2 Rs1898830 ve Rs5743708 (Arg753Gln) ile TLR4 Rs4986790 (Asp299Gly) ve Rs4986791 (Thr399Ile) gen polimorfizimleri karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Benzer şekilde besin spesifik (yumurta akı ve inek sütü) IgE ile TLR gen polimorfizimleri arasında da istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki saptanmadı. Serum IgE değerleri normal olan grupta TLR2 Rs5743708 (Arg753Gln) gen polimorfizimi için AA genotipi, serum IgE düzeyleri yüksek olan grupla kıyaslandığında anlamlı bir şekilde düşük idi. Besin alerjili hastaların laboratuvar değerleri ile TLR2 ve TLR4 SNP arasındaki ilişki Tablo 13 ve Tablo 14’de verilmiştir.

### **3.5. Besin Alerjili Hasta Grubunun In Vivo Alerji Testleri ile TLR2 ve TLR4 Gen Polimorfizimlerinin Karşılaştırma Sonuçları**

Hastalara uygulanan in vivo alerji testleri ile TLR2 ve TLR4 gen polimorfizimleri arasındaki ilişki incelendiğinde, deri prik testi pozitif olanlarla negatif olanlar arasında TLR2 Rs1898830 ve TLR2 Rs5743708 (Arg753Gln) gen polimorfizimleri arasında anlamlı bir fark mevcut değildi (sırasıyla  $p=0,46$  ve  $p=0,25$ ). Ancak deri prik testinde tek başına yumurta akı pozitifliği veya yumurta akıyla birlikte süt pozitifliği olan hastalar, sadece süt pozitifliği olan ve/veya deri testi negatif olan hastalarla kıyaslandığında TLR4 Rs4986790 (Asp299Gly) gen polimorfizimi açısından istatistiksel olarak artmış AA genotipi ile ilişkili saptandı ( $p=0,017$ ). Deri prik testi ile TLR4 Rs4986790 (Asp299Gly) ve TLR4 Rs4986791 (Thr399Ile) gen polimorfizimleri arasında anlamlı bir ilişki olduğu saptandı. Bu farklılığın sadece süt pozitifliği olan grupla hem süt hem de yumurta pozitifliği olan gruptan kaynaklandığı bulunmuştur ( $p$  değerleri sırasıyla  $p=0,003$  ve  $p=0,011$ ). Yine deri prik testinde tek başına yumurta akı pozitifliği veya yumurta akıyla birlikte süt pozitifliği olan hastalar, sadece süt pozitifliği olan ve/veya deri testi negatif hastalarla kıyaslandığında TLR4 Rs4986791 (Thr399Ile) gen polimorfizimi için artmış CC genotipi ile ilişkili idi ( $p=0,003$ ). Besin provokasyon testi ve besin yama testi yapılan ve yapılmayan

hastalarda TLR2 ve TLR4 gen polimorfizimleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark mevcut değildi (Tablo 15 ve 16).



**Tablo 13.** Hastaların in vitro laboratuvar parametreleri ile TLR2 gen polimorfizimleri arasındaki ilişki

|                                        |               | TLR 2 için Genotip sıklığı ve dağılımı (n/%) |           |           |      |                       |         |    |       |
|----------------------------------------|---------------|----------------------------------------------|-----------|-----------|------|-----------------------|---------|----|-------|
|                                        |               | Rs1898830                                    |           |           |      | Rs5743708 (Arg753Gln) |         |    |       |
|                                        |               | AA                                           | AG        | GG        | p    | AA                    | AG      | GG | p     |
| <b>AES (kU/l)</b>                      | Normal (n, %) | 36 (33,9)                                    | 50 (47,1) | 20 (19)   | 0,82 | 106 (97,2)            | 3 (2,8) | -  | 0,66  |
|                                        | Yüksek (n, %) | 46 (34,4)                                    | 58 (43,3) | 30 (22,3) |      | 129 (98,5)            | 2 (1,5) | -  |       |
| <b>Serum IgE</b>                       | Normal (n, %) | 7 (36,9)                                     | 9 (47,4)  | 3 (15,7)  | 0,91 | 20 (90,9)             | 2 (9,1) | -  | 0,02  |
|                                        | Yüksek (n, %) | 36 (32,5)                                    | 51 (45,9) | 24 (21,6) |      | 107 (99,1)            | 1 (0,9) | -  |       |
| <b>Yumurta akı spesifik IgE (kU/l)</b> | Normal (n, %) | 50 (35,7)                                    | 64 (45,8) | 26 (18,5) | 0,63 | 136 (99,3)            | 1 (0,7) | -  | 0,016 |
|                                        | Yüksek (n, %) | 32 (32)                                      | 44 (44)   | 24 (24)   |      | 99 (96,1)             | 4 (3,9) | -  |       |
| <b>İnek sütü spesifik IgE (kU/l)</b>   | Normal (n, %) | 57 (34,7)                                    | 68 (41,5) | 39 (23,8) | 0,23 | 166 (97,6)            | 4 (2,4) | -  | 1,00  |
|                                        | Yüksek (n, %) | 26 (34,2)                                    | 39 (51,4) | 11 (14,4) |      | 69 (98,6)             | 1 (1,4) | -  |       |

**Tablo 14.** Hastaların in vitro laboratuvar parametreleri ile TLR4 gen polimorfizimleri arasındaki ilişki

|                                        |               | TLR 4 için Genotip sıklığı ve dağılımı (n/%) |           |    |      |                       |          |    |      |
|----------------------------------------|---------------|----------------------------------------------|-----------|----|------|-----------------------|----------|----|------|
|                                        |               | Rs4986790 (Asp299Gly)                        |           |    |      | Rs4986791 (Thr399Ile) |          |    |      |
|                                        |               | AA                                           | AG        | GG | P    | CC                    | CT       | TT | p    |
| <b>AES (kU/l)</b>                      | Normal (n, %) | 96 (88,1)                                    | 14 (11,9) | -  | 0,49 | 100 (91,7)            | 9 (8,3)  | -  | 0,36 |
|                                        | Yüksek (n, %) | 118 (90,8)                                   | 12 (9,2)  | -  |      | 124 (94,7)            | 7 (5,3)  | -  |      |
| <b>Serum IgE</b>                       | Normal (n, %) | 18 (85,7)                                    | 3 (14,3)  | -  | 0,95 | 22 (100)              | 0        | -  | 0,18 |
|                                        | Yüksek (n, %) | 93 (85,4)                                    | 16 (14,6) | -  |      | 100 (92,6)            | 8 (7,4)  | -  |      |
| <b>Yumurta akı spesifik IgE (kU/l)</b> | Normal (n, %) | 123 (89,1)                                   | 15 (10,9) | -  | 0,77 | 124 (90,5)            | 13 (9,5) | -  | 0,06 |
|                                        | Yüksek (n, %) | 92 (90,2)                                    | 10 (9,8)  | -  |      | 100 (97,1)            | 3 (2,9)  | -  |      |
| <b>İnek sütü spesifik IgE (kU/l)</b>   | Normal (n, %) | 155 (91,1)                                   | 15 (8,9)  | -  | 0,21 | 159 (93,5)            | 11 (6,5) | -  | 0,78 |
|                                        | Yüksek (n, %) | 60 (85,7)                                    | 10 (14,3) | -  |      | 65 (92,9)             | 5 (7,1)  | -  |      |

**Tablo 15.** Hastalara uygulanan in vivo alerji testleri ile TLR2 gen polimorfizimleri arasındaki ilişki

|                               |                | TLR 2 için Genotip sıklığı ve dağılımı (n/%) |          |          |      |                       |         |    |      |
|-------------------------------|----------------|----------------------------------------------|----------|----------|------|-----------------------|---------|----|------|
|                               |                | Rs1898830                                    |          |          |      | Rs5743708 (Arg753Gln) |         |    |      |
|                               |                | AA                                           | AG       | GG       | p    | AA                    | AG      | GG | p    |
| <b>Deri prik testi</b>        | Yumurta akı    | 17 (13)                                      | 20(15,3) | 15(11,5) | 0,46 | 52(40)                | 3(2,3)  | -  | 0,25 |
|                               | Yumurta+ Süt + | 12(9,2)                                      | 17(13)   | 6(4,6)   |      | 34(26,1)              | -       | -  |      |
|                               | Süt            | 12(9,2)                                      | 13(10)   | 3(2,3)   |      | 25(19,2)              | -       | -  |      |
|                               | Deri testi -   | 2(1,5)                                       | 9(6,9)   | 3(2,3)   |      | 15(11,5)              | -       | -  |      |
| <b>Besin yama testi</b>       | Yapılmayan     | 37(28,4)                                     | 49(37,6) | 28(21,5) | 0,51 | 109(83,8)             | 3(2,3)  | -  | 0,99 |
|                               | Yumurta akı    | 1(0,76)                                      | 2(1,5)   | 3(2,3)   |      | 8(6,1)                | -       | -  |      |
|                               | Süt            | 1(0,76)                                      | 3(2,3)   | -        |      | 4(3,0)                | -       | -  |      |
|                               | Yama testi -   | 2(1,5)                                       | 2(1,5)   | -        |      | 4(3,0)                | -       | -  |      |
|                               | Yumurta+ Süt + | -                                            | 1(0,76)  | -        |      | 1(0,76)               | -       | -  |      |
| <b>Oral provokasyon testi</b> | Yapılmayan     | 29(22,3)                                     | 27(20,7) | 22(16,9) | 0,07 | 73(56,1)              | 2(1,5)  | -  | 0,82 |
|                               | Yumurta akı    | 2(1,5)                                       | 9(6,9)   | 3(2,3)   |      | 19(14,6)              | 1(0,76) | -  |      |
|                               | Yumurta +Süt + | 8(6,1)                                       | 12(9,2)  | 1(0,76)  |      | 20(15,3)              | -       | -  |      |
|                               | Süt            | 3(2,3)                                       | 12(9,2)  | 1(0,76)  |      | 14(10,7)              | -       | -  |      |

**Tablo 16.** Hastalara uygulanan in vivo alerji testleri ile TLR4 gen polimorfizimleri arasındaki ilişki

|                               |                | TLR 4 için Genotip sıklığı ve dağılımı (n/%) |          |    |      |                       |         |    |       |
|-------------------------------|----------------|----------------------------------------------|----------|----|------|-----------------------|---------|----|-------|
|                               |                | Rs4986790 (Asp299Gly)                        |          |    |      | Rs4986791 (Thr399Ile) |         |    |       |
|                               |                | AA                                           | AG       | GG | p    | CC                    | CT      | TT | p     |
| <b>Deri prik testi</b>        | Yumurta akı    | 48(36,9)                                     | 7(5,3)   | -  | 0,01 | 54(41,5)              | 1(0,76) | -  | 0,003 |
|                               | Yumurta+ Süt + | 33(25,3)                                     | 1(0,76)  | -  |      | 34(26,1)              | 0       | -  |       |
|                               | Süt            | 17(13)                                       | 8(6,1)   | -  |      | 20(15,3)              | 5(3,84) | -  |       |
|                               | Deri testi -   | 12(9,2)                                      | 3(2,3)   | -  |      | 13(10)                | 2(1,53) | -  |       |
| <b>Besin yama testi</b>       | Yapılmayan     | 93(71,5)                                     | 19(14,6) | -  | 0,60 | 104(80)               | 8(6,15) | -  | 0,92  |
|                               | Yumurta akı    | 8(6,1)                                       | -        | -  |      | 8(6,15)               | -       | -  |       |
|                               | Süt            | 4(3,0)                                       | -        | -  |      | 4(3,07)               | -       | -  |       |
|                               | Yama testi -   | 4(3,0)                                       | -        | -  |      | 4(3,07)               | -       | -  |       |
|                               | Yumurta+ Süt + | 1(0,76)                                      | -        | -  |      | 1(0,76)               | -       | -  |       |
| <b>Oral provokasyon testi</b> | Yapılmayan     | 65(50)                                       | 11(8,4)  | -  | 0,59 | 70(53,8)              | 5(3,8)  | -  | 0,28  |
|                               | Yumurta akı    | 15(11,5)                                     | 4(3,0)   | -  |      | 17(13,07)             | 3(2,3)  | -  |       |
|                               | Yumurta +Süt + | 19(14,6)                                     | 1(0,76)  | -  |      | 20(15,3)              | -       | -  |       |
|                               | Süt            | 11(8,4)                                      | 3(2,3)   | -  |      | 14(10,7)              | -       | -  |       |

### 3.6. Besin Alerjili Grupta ve Kontrol Grubunda Barsak Mikrobiyotasının Klinik ve Laboratuvar Bulguları ile Karşılaştırma Sonuçları

Çalışmaya dahil edilen hasta grup ve kontrol grubu barsak mikrobiyotası açısından karşılaştırıldıklarında *Firmicutes* filum'unun kısmi konsantrasyonunun hasta grubun gaitasında daha yüksek konsantrasyonda olduğu görüldü ( $p<0,001$ ) (Tablo 17). Her iki grup serum IgE düzeyleri ve gaita mikrobiyotasındaki *Bacteroides*, *Bifidobacterium* ve *Firmicutes* miktarları açısından kıyaslandıklarında ise yüksek serum IgE konsantrasyonları olan bireylerde gaitada *Bifidobacterium* miktarının azaldığı ( $p=0,012$ ), *Firmicutes* miktarının ise anlamlı olarak arttığı gözlemlendi ( $p<0,001$ ) (Tablo 18). Hasta grupta yapılan lineer korelasyon analizinde yumurta spesifik IgE ile gaitada *Bacteroides* ( $p=0,009$ ,  $r=0,270$ ) miktarı arasında pozitif ve anlamlı bir korelasyon olduğu görüldü. Kontrol grubu lineer korelasyon analizi ile değerlendirildiğinde ise yaş arttıkça gaitadaki *Bifidobacter* konsantrasyonunun azaldığı görüldü, aralarında negatif korelasyon olduğu saptandı.

**Tablo 17.** Besin alerjili hastalar ve sağlıklı kontrol grubunda gaitada *Bacteroides*, *Bifidobacterium* ve *Firmicutes* konsantrasyonlarının değerlendirilmesi

| Mikrobiyota            | Hasta grubu      | Kontrol grubu    | p      |
|------------------------|------------------|------------------|--------|
|                        | Kısmi kat artışı | Kısmi kat artışı |        |
| <i>Bacteroides</i>     | 1,11             | 1                | 0,788  |
| <i>Bifidobacterium</i> | 0,64             | 1                | 0,171  |
| <i>Firmicutes</i>      | 4,14             | 1                | <0,001 |

**Tablo 18.** Besin alerjili hasta ve sağlıklı kontrol grubu gaita mikrobiyotasındaki *Bacteroides*, *Bifidobacterium* ve *Firmicutes* ile Serum IgE arasındaki ilişkinin karşılaştırılması

| Mikrobiyota            | Serum IgE        | p      |
|------------------------|------------------|--------|
|                        | Kısmi kat artışı |        |
| <i>Bacteroides</i>     | 1,83             | 0,134  |
| <i>Bifidobacterium</i> | 0,44             | 0,012  |
| <i>Firmicutes</i>      | 4,51             | <0,001 |

### 3.7. Besin Alerjili Hasta Grubunda Barsak Mikrobiyotasının TLR2 ve TLR4 Gen Polimorfizimi ile Karşılaştırma Sonuçları

Besin alerjili hasta grubunda TLR4 Rs4986791 (Thr399Ile) polimorfiziminin, CT genotipine göre CC genotipinde, gaitada *Bifidobacterium* konsantrasyonunda azalma olduğu görüldü ve anlamlı olarak değerlendirildi ( $p=0,004$ ) (Tablo 19 ve Tablo 20).

**Tablo 19.** Besin alerjili hasta grubu gaita mikrobiyotasındaki *Bacteroides*, *Bifidobacterium* ve *Firmicutes* ile TLR2 gen polimorfizimleri arasındaki ilişki

| Mikrobiyota            | TLR2             |      |    |       |                       |    |       |
|------------------------|------------------|------|----|-------|-----------------------|----|-------|
|                        | Rs1898830        |      |    |       | Rs5743708 (Arg753Gln) |    |       |
|                        | Kısmi Kat Artışı |      |    |       | Kısmi Kat Artışı      |    |       |
|                        | AA               | AG   | GG | p     | AA                    | AG | p     |
| <i>Bacteroides</i>     | 1,04             | 1,17 | 1  | 0,973 | 1,69                  | 1  | 0,389 |
| <i>Bifidobacterium</i> | 2,87             | 1,19 | 1  | 0,140 | 1,15                  | 1  | 0,169 |
| <i>Firmicutes</i>      | 1,73             | 1,68 | 1  | 0,499 | 1,10                  | 1  | 0,937 |

**Tablo 20.** Besin alerjili hasta grubu gaita mikrobiyotasındaki *Bacteroides*, *Bifidobacterium* ve *Firmicutes* ile TLR4 gen polimorfizimleri arasındaki ilişki

| Mikrobiyota            | TLR4                  |    |       |                       |    |       |
|------------------------|-----------------------|----|-------|-----------------------|----|-------|
|                        | Rs4986790 (Asp299Gly) |    |       | Rs4986791 (Thr399Ile) |    |       |
|                        | Kısmi Kat Artışı      |    |       | Kısmi Kat Artışı      |    |       |
|                        | AA                    | AG | p     | CC                    | CT | p     |
| <i>Bacteroides</i>     | 1,76                  | 1  | 0,459 | 0,25                  | 1  | 0,229 |
| <i>Bifidobacterium</i> | 1,98                  | 1  | 0,318 | 0,05                  | 1  | 0,004 |
| <i>Firmicutes</i>      | 1,02                  | 1  | 0,961 | 2,42                  | 1  | 0,276 |

#### 4. TARTIŞMA

Doğum şeklinin besin alerjisi gelişimindeki rolünü araştıran çok sayıda çalışma mevcuttur (166-168). Ancak bu çalışmalar çoğunlukla çelişkili ve ikna edici sonuçlar içermemektedir. Doğum esnasında bebeğin vajinal ve perianal flora ile temas etmemesi ilerleyen dönemlerde besin alerjisi gelişiminde bir risk faktörü olarak değerlendirilmektedir (169-171). Bu görüşlerin aksine Pyrhonen ve ark. (172) ile Koplin ve ark. (173) yakın zamanlı çalışmalarında doğum şekli ile besin alerjisi arasında herhangi bir demografik veya çevresel bir ilişkiden söz edilemeyeceğini belirtmektedirler. Benzer şekilde bizim çalışmamızda doğum şeklinin besin alerjisi ile ilişkisine dair bir kanıt bulunamadı. Ancak bu sonucumuz değerlendirilirken çalışmamızın kesitsel bir dönemi içerdiği dikkate alınmalıdır. Bu çalışmada araştırdığımız bulgulardan bir diğeri, beslenme şekli ve besin alerjisi arasında herhangi bir ilişkinin var olup olmadığının belirlenmesi idi. Çalışmamızın sonucunda mama ile beslenen bebeklerde besin alerjisi gelişme riskini kontrol grubu ile kıyasladığımızda kısmen düşük olarak (hasta grupta %2,3, kontrol grubunda %9,3) saptamış olmakla birlikte, bu bulgu istatistiksel açıdan anlamlı değildi.

Toll-benzeri reseptörler prenatal ve erken çocukluk döneminde mikrobiyom modifikasyonu ile bakteriyel lipoproteinlere ve diğer mikrobiyal hücre duvarlarına karşı tepki oluşturarak doğal bağışıklık sistem cevabına aracılık ederler ve NF-kappa-B aktivasyonunu, sitokin salınımını ve inflamatuvar cevabın ortaya çıkmasını sağlarlar. Bu sebeple TLR gen polimorfizimleri (özellikle TLR2 ve TLR4) veya bu sistemin bozulmuş sinyal mekanizmalarında alerji riski belirgin artış göstermektedir (174). Literatürde TLR2 ve TLR4 SNP'leri ile alakalı değişik alerjik durumlar hakkında çalışmalar mevcutsa da, besin alerjileri ve TLR2/TLR4 gen polimorfizimleri ile alakalı sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu sebeple çalışmamız TLR2/TLR4 gen polimorfizimi ile besin alerjisi arasındaki ilişkiyi incelemesi bakımından son derece önemlidir.

Bu çalışmanın en önemli bulgularından biri TLR4 Rs4986790 (Asp299Gly) minör allel (A/G) ( $p=0,017$ ) genotip polimorfizimi ( $p=0,016$ ) ile hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark saptanmasıdır. Konu ile alakalı yapılan tek çalışmada

Galli ve ark. (9) TLR4 Rs4986790 (Asp299Gly) SNP ile besin alerjisi arasında anlamlı bir ilişki bulmadıklarını belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızdaki bu farklı bulgu toplumdaki ırksal farklılıklar ile açıklanabilir. Genetik altyapıdaki farklılıkların TLR4 üzerindeki etkilerini araştıran birçok çalışma mevcuttur (174, 175). Bu çalışmalardan birinde Berin ve ark. (175) farelerde bireysel genetik altyapı farklılıkları ve karşılaşılan antijen yapısındaki farklılıklara bağlı olarak TLR4'ün alerjik cevapları pozitif veya negatif olarak etkileyebileceğini göstermişlerdir. Benzer şekilde bakteriyel patojenlerin TLR4 sinyal mekanizmaları aracılığı ile besin alerjisi üzerindeki etkinliği Bashir ve ark. (161) tarafından gösterilmiştir. TLR4 reseptörü açısından negatif bir fare modelinde, besin alerjenlerinin intragastrik uygulanması alerjen spesifik IgE salınımını uyarmış ve artmış histamin salınımına sebep olmuştur. Bununla birlikte bakteriyel floranın tekrar oluşmasına yetecek kadar zaman verildiğinde bu farelerde

Çalışmamızda hasta ve kontrol grubunun genotipleri karşılaştırıldığında TLR2 Rs5743708 (Arg753Gln), TLR2 Rs1898830 ve TLR4 Rs4986791 (Thr399Ile) SNP varlığı ile besin alerjisi arasında herhangi bir ilişki olmadığı görüldü. Literatürde TLR2 Rs5743708 gen polimorfizimi ile besin alerjisinin ilişkisini inceleyen sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalardan biri olan Galli ve ark. (9) çalışmasında 159 alerjik çocuk (57'si besin alerjisi, 102'sinde egzema) incelenmiş, TLR2 Rs5743708 SNP varlığının besin alerjisi ve egzema ile ilişkisi olmadığı gösterilmiştir. Yine aynı SNP varlığının atopik dermatit ile olan ilişkisini inceleyen yakın zamanlı bir meta-analizde özellikle GA genotipinin atopik dermatit ile ilişkisi olduğu sonucuna varılmıştır (176).

Ulaşabildiğimiz literatür bilgilerine göre bizim çalışmamız TLR2 Rs1898830 SNP varlığı ile besin alerjisini inceleyen ilk çalışmadır. Bu açıdan bakıldığında bizim çalışmamız TLR2 Rs1898830 SNP varlığının besin alerjisine yatkınlık oluşturmadığını göstermesi açısından önemlidir. Her ne kadar TLR2 Rs1898830 SNP ile besin alerjisi arasındaki ilişkinin incelendiği başka çalışma yok ise de Liu ve ark. (177) TLR2 Rs1898830 GG genotip taşıyıcılarında regülatuar T gen ekspresyonunun yaşamın erken dönemlerinde başladığını belirtmişler ve bunun da maternal atopi ile ilişkili olduğunu ifade etmişlerdir.

Laboratuvar parametreleri ile TLR2 ve TLR4 SNP varlığı arasındaki ilişki incelendiğinde, serum IgE değerleri yüksek grupta TLR2 Rs5743708 (Arg753Gln) AA genotipinin normal IgE grubu ile kıyaslandığında belirgin şekilde yüksek olduğu görüldü. Gruplar arasında AES, yumurta akı spesifik IgE ve inek sütü spesifik IgE değerleri açısından anlamlı bir fark mevcut değildi. Literatürde serum IgE düzeyleri ile TLR2 ve TLR4 gen polimorfizimlerinin karşılaştırıldığı sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Gülen ve ark. (178) astım ve alerjik rinitli çocuklarda TLR2 ve TLR4 gen polimorfizimlerini araştırdıkları çalışmalarında TLR2 Arg753Arg, Arg753Gln, Gln753Gln ve de TLR4 Asp299Gly, Thr399Ile genetik polimorfizimleri ile serum IgE düzeyleri arasında bir ilişkinin mevcut olmadığını göstermişlerdir. Noguchi ve ark. (179) da benzer şekilde serum IgE değerleri ile TLR2, TLR3, TLR4, ve TLR9'un 16 varyantının hiçbirisi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptamamışlardır. Bizim çalışmamız bu açıdan incelendiğinde literatür ile uyumlu olarak değerlendirilebilir.

Besin alerjisi gelişiminde ve seyrinde barsak mikrobiyotasının rolüne ait veriler gün geçtikçe artmaktadır (180, 181). Besin alerjisi patogenezinde anahtar rol oynayan bu mikrobiyota değişikliklerine disbiyozis denmektedir ve bu durumdan sıklıkla sorumlu tutulan faktörler sezaryen doğumlar, anne sütü alım eksiklikleri, kullanılan ilaçlar (sıklıkla antibiyotikler ve mide asit inhibitörleri), antiseptik ajan kullanımı ve düşük lif yüksek yağlı diyet kullanımıdır (182). Her ne kadar besin alerjisinden sorumlu spesifik bir bakteri türü izole edilmemiş ise de kanıtlar besin alerjisi belirti ve bulguları başlamasından çok önceleri disbiyozisin başladığını göstermektedir. Besin alerjisi ile barsak mikrobiyotası arasındaki ilişkiyi gösteren çalışmalardan biri olan Fazlollahi ve ark. (183) çalışmasında 141 yumurta alerjili çocuk ile kontrol grubu barsak mikrobiyotası yönünden karşılaştırılmıştır. Yazarlar, *Lachnospiraceae*, *Streptococcaceae* ve *Leuconostocaceae* türlerini yumurta alerjisi olan çocukların barsaklarında anlamlı bir şekilde daha fazla izole etmişlerdir. Süt alerjisi olan çocuklarda yapılan benzer çalışmalarda da barsak mikrobiyotası yönünden buna yakın sonuçlar elde edilmiştir. Bu konuyla alakalı olarak Berni Canani ve ark. (184) yaptıkları bir çalışmada inek sütü alerjisi olan 19 infantta barsak mikrobiyal yapının

*Lachnospiraceae* (20.5±9.7%) ve *Ruminococcaceae* (16.2±9.1%) tarafından domine edildiği saptanmıştır. Bununla birlikte *Lactobacillus rhamnosus* ilave edilmiş ileri derecede hidrolize mama tedavisi alan infantlarda barsak mikrobiyotasında *Blautia*, *Roseburia* ve *Coprococcus* türlerinin belirgin bir şekilde arttığı saptanmıştır.

Biz bu çalışmamızda besin alerjili grup ile kontrol grubun gaitasından izole ettiğimiz 3 bakteri içinden sadece *Firmicutes* türünde hasta grupta artmış konsantrasyonlar gözlemledik (hasta grupta kısmi kat artışı= 4,14; p<0,001). Anaerob bakteri türlerinden biri olan filum *Firmicutes*'in bağışıklık sistemi ve inflamatuvar cevapta rol alarak sağlıklı bir yaşam sürülmesinde son derece önemli bir rolü olduğu bilinmektedir (185). Filum *Firmicutes*'in sınıflarından biri olan *Clostridia*'nın besin alerjisinde koruyucu olduğu gösterilmiş ve *Clostridia* sınıfının alt cinslerinden biri olan *Dorea*'nın yapılan çalışmalarda besin alerjisini ve sensitizasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Savage ve ark. (186) yakın zamanlı bir çalışmalarında 3-6 ay yaş aralığındaki 225 çocuk besin alerjisi yönünden araştırılmış ve bu çocuklardan 14 tanesinde besin alerjisi mevcudiyeti, 87 tanesinde besin sensitizasyonu bulunduğu rapor edilmiştir. Besin alerjili bu çocukların intestinal mikrobiyota analizlerinde *Dorea* cinsinin azaldığı gösterilmiş ve bu sebeple *Dorea* cinsinin besin alerjisinde koruyucu bir mikroorganizma olduğu belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda ortaya çıkan sonuçlardan biri olan besin alerjili hastaların gaita analizinde artmış *Firmicutes* miktarları bu sebeple literatür ile çelişmektedir. Ancak biz bu çalışmamızda *Firmicutes*'in alt sınıf ve cinslerini ölçemedik ve özellikle besin alerjisinden koruyucu özelliği olduğu bilinen *Dorea* cinsinin ne şekilde etkilendiğini ortaya koyamadık. Bu sebeple elde ettiğimiz sonuçlara dayanarak hasta grubumuzda filum *Firmicutes*'in besin alerjisi ile ilişkili olduğu şeklinde bir yorum yapılması doğru olmayacaktır. Hatta çalışmamız besin alerjisi ile ilişkili mikrobiyota analizlerinde alt tür ve cins mikroorganizmaların saptanmasının önemini bir kez daha ortaya koymaktadır.

Barsak mikrobiyotasındaki değişimler doğumdan hemen sonra başlamakta ve hayat boyu devam etmektedir. Erken hayat dönemindeki konakçı mikroorganizma etkileşimleri, bu değişimleri sağlayan en önemli etkenlerden bir tanesidir (187). Yaş ile barsak mikrobiyotasının değiştiğini gösteren çalışmalardan biri Bunyavanich ve

ark. (188) tarafından 2016 yılında yayınlanmıştır. Bu çalışmada 226 süt alerjili infant 3 aylıktan 8 yaşına kadar takip edilmiş ve barsak mikrobiyomu 16s rRNA gen dizilimini kullanılarak sınıflandırılmıştır. Çalışmanın sonunda 8 yaşına gelen çocukların %56,6'sında süt alerjisinin zamanla düzeldiği gözlenmiştir. Süt alerjisi düzelen bu çocukların erken süt çocukluğu döneminde barsak mikrobiyomlarındaki *Clostridia* ve *Firmicutes* artışının, süt alerjisindeki bu düzelme ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. Bu bulguların ışığında erken süt çocukluğu dönemi barsak mikrobiyotasının şekillenerek besin alerjisi gelişimini etkileyen özel bir dönem olarak değerlendirilebilir. Bu yaş aralığından sonraki dönemlerde (>6 ay) de barsak mikrobiyota içeriği besin alerjisi seyri üzerinde rol oynama potansiyeline sahiptir ancak mikrobiyota dışı faktörler ileri yaşlarda mikrobiyotanın etkisini maskeleyebilmektedir.

Her ne kadar biz bu çalışmamızda gruplar arasında *Bacteroides* ve *Bifidobacterium* türlerine ait artmış barsak mikrobiyota değişiklikleri saptamamış olsak da literatürde bu türlerin besin alerjisi ile ilişkisine dair çeşitli veriler bulunmaktadır (189-191). Bu çalışmalardan biri olan Ling ve ark. (189) çalışmalarında besin alerjili hasta grubunda filum *Bacteroides*, *Proteobacteria*, ve *Actinobacteria* miktarlarının anlamlı bir şekilde azaldığı, buna karşılık *Firmicutes* filum'unun ise anlamlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir. Benzer şekilde Azad ve ark. (190) da 3-12 aylık infantlarda artmış *Enterobacteriaceae* ve azalmış *Bacteroidaceae* miktarlarının besin alerjisi ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. Fieten ve ark. (192) ise atopik dermatitli 82 çocuk hastalarını besin alerjisi olan ve olmayan olarak 2'ye böldükleri çalışmalarında, besin alerjisi olan grupta artmış *Escherichia coli* (*E.coli*) ve *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ve azalmış *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Faecalibacterium prausnitzii*, ve *Akkermansia muciniphila* miktarları saptamışlardır.

Çalışmamızda serum IgE düzeyleri ile barsak mikrobiyotası arasında özellikle *Bifidobacterium* ( $p=0,012$ ) ve *Firmicutes* ( $p<0,001$ ) filumları arasında anlamlı bir ilişki olduğu gözlemlendi. Serum IgE düzeylerinin yüksek olduğu hasta grubumuzda fekal mikrobiyom analizinde *Bifidobacterium* tür miktarının azaldığı ve *Firmicutes* filum

miktarının arttığını saptadık. Ancak literatürde besin alerjili hasta grubunda serum IgE ile barsak mikrobiyotası arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışma miktarı sınırlı olmakla birlikte alerjik hastalıklarda serum / fekal IgE ile barsak mikrobiyotası arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalardan biri olan Chiu ve ark. (193) çalışmasında alerjik rinit ve astımı olan çocukların gaita ve serum IgE düzeyleri ile barsak mikrobiyotası arasındaki ilişki incelenmiştir. Alerjik rinit ve astımlı hastalarda *Firmicutes* filumuna ait organizmalarda azalma saptanmış, erken çocukluk dönemindeki fekal total IgE seviyeleri, serum *D. pteronyssinus*- ve *D. farinae*-spesifik IgE seviyeleri ile ilişkili bulunmuş ancak gıda spesifik IgE seviyeleri ile herhangi bir ilişki saptanmamıştır. Rinitli hastalarda *Firmicutes* filum'undan *Dorea* cinsinin gaitada daha az bulunduğu ve total fekal IgE ile negatif korele olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte *Clostridium* cinsinin astımlı hastalarda barsak mikrobiyotasında baskın olarak bulunduğu saptanmış ve fekal IgE seviyeleri ile pozitif korele olduğu sonucuna varılmıştır.

Barsak mikrobiyotası ve lokal TLR'ler arasındaki ilişki sağlıklı bir intestinal bağışıklık sistemi için son derece önemlidir. Farelerde yapılan çalışmalarda TLR2 aktivasyonu ile uyarılan Treg hücrelerinin başarılı bir intestinal kolonizasyon için gerekli olduğu gösterilmiştir (194, 195). Benzer şekilde *Bifidobacterium infantis*'in insanlarda Treg hücrelerini ve regülatuar sitokin üretimini uyardığı ve TLR2 üzerinden etki ettiğini bildiren çalışmalar da mevcuttur (196). *Bifidobacterium* dışındaki barsak mikrobiyotası üyelerinin de bu mekanizmalar üzerinden etki ettiği hesaba katıldığında TLR2 ve TLR4 regülasyonunun barsak mikrobiyotası üzerindeki etkisi açıkça ortaya çıkacaktır. Bu açıdan bakıldığında, TLR2 ve TLR4 fonksiyonları üzerinde etkisi açıkça gösterilen genetik polimorfizimlerin besin alerjisi gelişimi üzerinde etkili olacağı düşünülebilir. Bizim çalışmamızda besin alerjili hasta grubunda TLR4 Rs4986791 (Thr399Ile) polimorfiziminin CT genotipine göre CC genotipinde, gaitada *Bifidobacterium* konsantrasyonunda azalma olduğu görüldü ve bu istatistiksel olarak anlamlı değerlendirildi (p=0,004). Değerlendirmeye aldığımız diğer mikroorganizma türleri ve genetik polimorfizimler arasında anlamlı bir ilişki mevcut değildi.

Çalışmamız özellikle teknik imkânlar açısından değerlendirildiğinde bazı kısıtlılıklara sahiptir. Özellikle TLR2 ve TLR4 gen polimorfizimlerinin sonuçları değerlendirilirken hasta sayısının kısıtlı olması istatistiksel karşılaştırmalarda anlamlı bir sonuç elde edilmesini engellemiş olabilir. Çalışmamızın bir diğer kısıtlılığı fekal mikrobiyom analizinde kısıtlı sayıda mikroorganizmaya bakılmış olmasıdır. Bazı filumlara ait cins ve türleri saptayamamış olmamız daha kapsamlı sonuçlara ulaşmamızı engellemiştir. Literatürde de belirtildiği üzere besin alerjili hasta gruplarında özellikle *Firmicutes* filum'larına ait alt cins ve türler azalmış veya artmış olarak saptanabilmektedir. Bu sebeple sadece bir filum'a bakarak, besin alerjili hasta popülasyonunda barsak mikrobiyotası hakkında genel yorum yapmak doğru olmayacaktır. Son olarak bu çalışmada total fekal IgE değerleri ölçülmemiştir. Total fekal IgE değerleri, barsak mikrobiyotası ile serum IgE değerleri arasındaki ilişkinin incelendiği böyle bir çalışmada son derece yararlı bilgiler ortaya koyabilecektir.

Sonuç olarak bu çalışmada besin alerjili hasta grubunda TLR4 geni Rs4986790 (Asp299Gly) SNP için (A/G) Majör/Minör allel frekans farkında besin alerjisi ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte TLR4 geni Rs4986790 SNP için gruplar arasında genotip (AA, AG, GG) sayıları açısından anlamlı farklar olduğu da saptadığımız bir diğer bulgudur. Besin alerjili hasta grubunda TLR4 Rs4986791 (Thr399Ile) polimorfiziminin, CT genotipine göre CC genotipinde, gaitada *Bifidobacterium* konsantrasyonunda azalma olduğu görüldü ve bu istatistiksel olarak anlamlı değerlendirildi. Çalışmamızdan elde edilen verilerin doğrulanabilmesi ve tedaviye uyarlanabilmesi için TLR ile alakalı farklı polimorfizimlerin gerek ülkemiz popülasyonunda gerekse farklı popülasyonlardaki besin alerjili hastalarda ayrıntılı bir şekilde incelenmesinin gerekli olduğu düşünülmektedir. Buna ek olarak barsak mikrobiyotasının içeriğini ve fonksiyonunu modüle eden değişik mikrobiyal türleri inceleyen ve bunların TLR transkripsiyon yolları ile olan ilişkisini ortaya koyan daha geniş ve kapsamlı çalışmalar yeni tedavi modellerinin de geliştirilmesini sağlayabilecektir.

## 5. KAYNAKLAR

1. Devdas JM, Mckie C, Fox AT3, Ratageri VH. 17. Food allergy in children: an overview. *Indian J Pediatr* 2018; 85: 369-374.
2. Ajala A, Cruz A, Faria J, Walter E, Granato D, Ana A. Food allergens: knowledge and practices of food handlers in restaurants. *Food Control* 2010; 21: 1318–1321.
3. Sicherer SH. Epidemiology of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 594-602.
4. Du Toit G, Sampson HA, Plaut M, Burks AW, Akdis CA, Lack G. Food allergy: update on prevention and tolerance. *J Allergy Clin Immunol* 2018; 141: 30-40.
5. Duez C, Gosset P, Tonnel AB. Dendritic cells and toll-like receptors in allergy and asthma. *Eur J Dermatol* 2006; 16: 12-16.
6. Majamaa H, Isolauri E. Evaluation of gut mucosal barrier: evidence for increased antigen transfer in children with atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 985-990.
7. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* 2012; 148: 1258-1270.
8. Tosi MF. Innate immune responses to infection. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 241-249.
9. Galli E, Ciucci A, Cersosimo S, Pagnini C, Avitabile S, Mancino G, et al. Eczema and food allergy in an Italian pediatric cohort: no association with TLR-2 and TLR-4 polymorphisms. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2010; 23: 671-675.
10. Sampson HA: Adverse reactions to foods. Adkinson NF, Yunginger JW, Busse WW (editors). *Allergy: principles and practice*. St. Louis: C.V. Mosby, 1993: 1661-1686.
11. Öneş Ü. Besin alerjilerini nasıl tanımlayabiliriz, tarihçesi nedir. Güler N (editor). *Çocuklarda Besin Alerjileri*. İstanbul: Selen Yayıncılık, 2017: 1-5.

12. Sampson HA. Food allergy. Part 1: Immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy and Clin Immunol* 1999; 103: 717-728.
13. Sampson HA. Food allergy: past, present and future. *Allergol Int* 2016; 65: 363–369.
14. Reunala T, Brummer-Korvenkontio H, Räsänen L, François G, Palosuo T. Passive transfer of cutaneous mosquito-bite hypersensitivity by IgE anti-saliva antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 902-906.
15. Loveless MH. Allergy for corn and its derivatives: experiments with a masked ingestion test for its diagnosis. *J Allergy* 1950; 21: 500–509.
16. May CD. Objective clinical and laboratory studies of immediate hypersensitivity reactions to foods in asthmatic children. *J Allergy Clin Immunol* 1976; 58: 500-515.
17. Sharma HP, Bansil S, Uygungil B. Signs and symptoms of food allergy and food induced anaphylaxis. *Pediatr Clin North Am* 2015; 62: 1377-1379.
18. Tordesillas L, Berin MC, Sampson HA. Immunology of food allergy. *Immunity* 2017; 47: 32-50.
19. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125: 116-125.
20. Jackson KD, Howie LD, Akinbami LJ. Trends in allergic conditions among children: United States, 1997-2011. *NCHS Data Brief* 2013; 121: 1-8.
21. Orhan F, Karakas T, Cakir M, Aksoy A, Baki A, Gedik Y. Prevalence of immunoglobulin E-mediated food allergy in 6-9-year-old urban school children in the Eastern Black Sea Region of Turkey. *Clin Exp Allergy* 2009; 39: 1027-1035.
22. Gelincik A, Büyüköztürk S, Gül H, Işık E, Işsever H, Özşeker F, et al. Confirmed prevalence of food allergy and non-allergic food hypersensitivity in a Mediterranean population. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 1333-1341.

23. Allen KJ, Koplin JJ. The epidemiology of IgE-mediated food allergy and anaphylaxis. *Immunol Allergy Clin North Am* 2012; 32: 35-50.
24. Sampson HA. Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 805-819.
25. Yavuz ST, Sahiner UM, Buyuktiryaki B, Soyer OU, Tuncer A, Sekerel BE, et al. Phenotypes of IgE-mediated food allergy in Turkish children. *Allergy Asthma Proc* 2011; 32: 47-55.
26. Cengizlier R. Besin alerjilerinin dünyada ve Türkiye’de sıklığı ne kadardır? Etkileyen faktörler nelerdir? Güler N (editor). *Çocuklarda Besin Alerjileri*. İstanbul: Selen Yayıncılık, 2017: 7-15.
27. Chin S, Vickery BP. Pathogenesis of food allergy in the pediatric patient. *Curr Allergy Asthma Rep* 2012; 12: 621-629.
28. Berin MC, Sampson HA. Mucosal immunology of food allergy. *Curr Biol* 2013 ; 23: 389-400.
29. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 799–809.
30. Kırışaçoğlu CT, Özden A. Besin alerjileri. *Güncel Gastroenteroloji* 2006; 10:148-159.
31. Wells HG, Osborne TB. The biological reactions of the vegetable proteins I. anaphylaxis. *J Infect Dis* 1911; 8: 66–124.
32. Bozdoğan G, Bingöl G. Oral tolerans nedir? Güler N (editor). *Çocuklarda Besin Alerjileri*. İstanbul: Selen Yayıncılık, 2017: 39-45.
33. Rezende RM, Weiner HL. History and mechanisms of oral tolerance. *Semin Immunol* 2017; 30: 3-11.
34. Harrison OJ, Powrie FM. Regulatory T cells and immune tolerance in the intestine. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5: a018341.

35. Akyüz Hatice Ceren. Besin Alerjisi Olan Çocukların Beslenme Durumunun Değerlendirilmesi. Tıpta Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü, 2018.
36. Zeiger RS, Friedman NJ. The relationship of breastfeeding to the development of atopic disorders. Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program 2006; 57: 93-105.
37. Mısırlıoğlu ED, Bostancı İ. Besin Alerjisi, Turkish J Pediatr Dis 2013; 4: 206-213.
38. Magrone T, Jirillo E. Development and organization of the secondary and tertiary lymphoid organs: influence of microbial and food antigens. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets 2019; 19: 128-135.
39. Iweala OI, Nagler CR. The microbiome and food allergy. Annu Rev Immunol 2019; 37: 377-403.
40. Johnston LK, Chien KB, Bryce PJ. The immunology of food allergy. J Immunol 2014; 192: 2529-2534.
41. Sampson HA, Aceves S, Bock SA, James J, Jones S, Lang D, et al. Food allergy: a practice parameter update 2014. J Allergy Clin Immunol 2014; 134: 1016-25.e43.
42. Anvari S, Miller J, Yeh CY, Davis CM. IgE-mediated food allergy. Clin Rev Allergy Immunol 2019; 57: 244-260.
43. Punnonen J, Yssel H, de Vries JE. The relative contribution of IL-4 and IL-13 to human IgE synthesis induced by activated CD4+ or CD8+ T cells. J Allergy Clin Immunol 1997; 100 (6): 792-801.
44. Bischoff S, Crowe SE. Gastrointestinal food allergy new insights into pathophysiology and clinical perspectives. Gastroenterology 2005; 128: 1089-1113.
45. Beyer K, Teuber S. The mechanism of food allergy what do we know today? Curr Opin Allergy Clin Immunol 2004; 4: 197-199.

46. Heine RG. Pathophysiology, diagnosis and treatment of food protein induced gastrointestinal disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4: 221-229.
47. Oettgen HC, Burton OT. IgE receptor signaling in food allergy pathogenesis. *Curr Opin Immunol* 2015; 36: 109-114.
48. Björkstén B. Genetic and environmental risk factors for the development of food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5: 249-253.
49. Suaini NHA, Wang Y, Soriano VX, Martino DJ, Allen KJ, Ellis JA, et al. Genetic determinants of paediatric food allergy: a systematic review. *Allergy* 2019; 74: 1631-1648.
50. Vickery BP, Chin S, Burks AW. Pathophysiology of food allergy. *Pediatr Clin North Am* 2011; 58: 363-376.
51. Boudreau-Romano S, Qamar N. Peanut allergy: changes in dogma and past, present, and future directions. *Pediatr Ann* 2018; 47 (7): 300-304.
52. Lifschitz C, Szajewska H. Cow's milk allergy: evidence-based diagnosis and management for the practitioner. *Eur J Pediatr* 2015; 174: 141-150.
53. Wal JM. Cow's milk proteins/allergens. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 89: 3-10.
54. Silva G, Marapana RAUJ. A review on current food allergy. *J. Food Sci & Technol* 2012; 7: 14-21.
55. Rona RJ, Keil T, Summers C, Gislason D, Zuidmeer L, Sodergren E, et al. The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 638-646.
56. Høst A. Frequency of cow's milk allergy in childhood. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 89: 33-37.

57. Muraro A, Dreborg S, Halken S, Host A, Niggemann B, Aalberse R, et al. Dietary prevention of allergic diseases in infants and small children. Part III: Critical review of published peer-reviewed observational and interventional studies and final recommendations. *Pediatr Allergy Immunol* 2004; 15: 291-307.
58. Kucukosmanoglu E, Yazı D, Yesil O, Akkoc T, Gezer M, Bakirci N, et al. Prevalence of egg sensitization in Turkish infants based on skin prick test. *Allergol Immunopathol* 2008; 36: 141-144.
59. Zeyrek D, Koruk I, Kara B, Demir C, Cakmak A. Prevalence of IgE mediated cow's milk and egg allergy in children under 2 years of age in Sanliurfa, Turkey: the city that isn't almost allergic to cow's milk. *Minerva Pediatr* 2015; 67: 465-472.
60. Kılıç M, Taşkın E. Evaluation of the clinical features of children valuation of the clinical features of children diagnosed with IgE-mediated food allergy. *Asthma Allergy Immunol* 2015; 13: 6-14.
61. Caubet JC, Wang J. Current understanding of egg allergy. *Pediatr Clin North Am* 2011; 58: 427-443.
62. Ballmer-Weber BK, Hoffmann-Sommergruber K. Molecular diagnosis of fruit and vegetable allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2011; 11: 229-235.
63. Eggesbo M, Halvorsen R, Tambs K, Botten G. Prevalence of parentally perceived adverse reactions to food in young children. *Pediatr Allergy Immunol* 1999; 10: 122-132.
64. Altman DR, Chiaramonte LT. Public perception of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 1247-1251.
65. Green TD, LaBelle VS, Steele PH, Kim EH, Lee LA, Mankad VS, et al. Clinical characteristic of peanut allergic children: recent changes. *Pediatrics* 2007; 120: 1304-1310.

66. Magnusdottir H, Vidarsdóttir AG, Ludviksson BR, Clausen M, Lund SH, Jensen AB, et al. Ara h 1 and Ara h 6 sensitization causes clinical peanut allergy in Ara h 2 negative individuals. *Int Arch Allergy Immunol* 2019; 178: 66-75.
67. Tsabouri S, Triga M, Makris M, Kalogeromitros D, Church MK, Priftis KN. Fish and shellfish allergy in children: review of a persistent food allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 2012; 23: 608-615.
68. Turan EK. Edirne İlindeki Kreş Çocuklarında Besin Alerjisi Prevalansı, Risk Faktörleri ve Astımla İlişkisi. Tıpta Uzmanlık tezi, Trakya Üniversitesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü, 2012.
69. Scurlock AM, Laurie AM, Lee MD, Burks AW. Food allergy in children. *Immunol Allergy Clin N Am* 2005; 25: 369-388.
70. Wilson JM, Platts-Mills TAE. Red meat allergy in children and adults. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2019; 19: 229-235.
71. Fuentes Aparicio V, Sánchez Marcén I, Pérez Montero A, Baeza ML, de Barrio Fernández M. Allergy to mammal's meat in adult life: immunologic and follow-up study. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2005; 15: 228-231.
72. Caio G, Volta U, Sapone A, Leffler DA, De Giorgio R, Catassi C, et al. Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC Med* 2019; 17: 142.
73. Aguiar R, Duarte FC, Mendes A, Bartolome B, Barbosa MP. Anaphylaxis caused by honey: a case report. *Asia Pacific Allergy* 2017; 7: 48.
74. Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, et al. Revised nomenclature for allergy for global use: report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 832-836.

75. Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA, Wood RA, et al. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-Sponsored Expert Panel. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126: 1-58.
76. Garcia-Careaga M Jr, Kerner JA Jr. Gastrointestinal manifestations of food allergies in pediatric patients. *Nutr Clin Pract* 2005; 20: 526-535.
77. James JM. Respiratory manifestations of food allergy. *Pediatrics* 2003; 111: 1625-1630.
78. Koplin JJ, Allen KJ, Gurrin LC, Peters RL, Lowe AJ, Tang ML, et al. The impact of family history of allergy on risk of food allergy: a population-based study of infants. *Int J Environ Res Public Health* 2013; 10 (11): 5364-5377.
79. Kattan JD, Sicherer SH. Optimizing the diagnosis of food allergy. *Immunol Allergy Clin North Am* 2015; 35: 61-76.
80. Beyer K, Teuber SS. Food allergy diagnostics scientific and unproven procedures. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5: 261-266.
81. Ewan PW, Clark AT. IgE mediated food allergy when is food challenge needed? *Arch Dis Child* 2005; 90: 555-556.
82. Celik-Bilgili S, Mehl A, Verstege A, Staden U, Nocon M, Beyer K, et al. The predictive value of specific immunoglobulin E levels in serum for the outcome of oral food challenges. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 268-273.
83. Cox L, Williams B, Sicherer S, Oppenheimer J, Sher L, Hamilton R, et al. Pearls and pitfalls of allergy diagnostic testing: report from the American College of Allergy, Asthma and Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology Specific IgE Test Task Force. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008; 101: 580-592.

84. Osterballe M, Andersen KE, Bindslev-Jensen C. The diagnostic accuracy of the atopy patch test in diagnosing hypersensitivity to cow's milk and hen's egg in unselected children with and without atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2004; 51: 556-562.
85. Mehl A, Rolinck-Werninghaus C, Staden U, Verstege A, Wahn U, Beyer K, et al. The atopy patch test in the diagnostic workup of suspected food-related symptoms in children. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 923-929.
86. Pustisek N, Jaklin-Kekez A, Frkanec R, Sikanić-Dugić N, Misak Z, Jadresin O, et al. Our experiences with the use of atopy patch test in the diagnosis of cow's milk hypersensitivity. *Acta Dermatovenerol Croat* 2010; 18 (1): 14-20.
87. Strömberg L. Diagnostic accuracy of the atopy patch test and the skin-prick test for the diagnosis of food allergy in young children with atopic eczema/dermatitis syndrome. *Acta Paediatr* 2002; 91 (10): 1044–1049.
88. Du Buske LM. Introduction: basophil histamine release and the diagnosis of food allergy. *Allergy Proc* 1993; 14: 243-249.
89. Hadley C. Food allergies on the rise. *European Molecular Biology Organization* 2006; 7: 1080-1083.
90. Chinthrajah RS, Tupa D, Prince BT, Block WM, Rosa JS, Singh AM, et al. Diagnosis of food allergy. *Pediatr Clin North Am* 2015; 62: 1393-1408.
91. Muraro A, Werfel T, Hoffmann-Sommergruber K, Roberts G, Beyer K, Bindslev-Jensen C, et al. EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines: diagnosis and management of food allergy. *Allergy* 2014; 69: 1008-1025.
92. Szajewska H, Horvath A. Meta-analysis of the evidence for a partially hydrolyzed 100% whey formula for the prevention of allergic diseases. *Curr Med Res Opin* 2010; 26: 423–437.

93. Fritsche R. Induction of oral tolerance to cow's milk proteins in rats fed with a whey protein hydrolysate. *Nutr Res* 1998; 18: 1335-1341.
94. Burks W, Jones SM, Berseth CL, Harris C, Sampson HA, Scalabrin DM. Hypoallergenicity and effects on growth and tolerance of a new amino acid-based formula with docosahexaenoic acid and arachidonic acid. *J Pediatr* 2008; 153 (2): 266–271.
95. Isolauri E, Sütas Y, Mäkinen-Kiljunen S, Oja SS, Isosomppi R, Turjanmaa K. Efficacy and safety of hydrolyzed cow milk and amino acid-derived formulas in infants with cow milk allergy. *J Pediatr* 1995; 127: 550–557.
96. Vanderhoof J, Moore N, de Boissieu D. Evaluation of an amino acid-based Formula in infants not responding to extensively hydrolyzed protein formula. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2016; 63: 531–533.
97. Osborn DA, Sinn J. Soy formula for prevention of allergy and food intolerance in infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; 2006 (4): CD003741.
98. Tamay Z. İnek sütü alerjisi. *Klinik Tıp Pediatri* 2010; 2: 14-18.
99. Koca T, Akçam M. İnek sütü protein alerjisi. *Dicle Med J* 2015; 42: 268-273.
100. Koletzko S, Niggemann B, Arato A, Dias JA, Heuschkel R, Husby S, et al. Diagnostic approach and management of cow's-milk protein allergy in infants and children: ESPGHAN GI Committee practical guidelines. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012; 55: 221–229.
101. Guerra MJ, González D, Jaffé WG, Calderón M. Formulación de una bebida de alto valor nutritivo a base de arroz [Formulation of a rice-based beverage of high nutritive value]. *Arch Latinoam Nutr* 1981; 31: 337–349.

102. Fiocchi A, Travaini M, D'Auria E, Banderali G, Bernardo L, Riva E. Tolerance to a rice hydrolysate formula in children allergic to cow's milk and soy. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 1576–1580.
103. Reche M, Pascual C, Fiandor A, Polanco I, Rivero-Urgell M, Chifre R, et al. The effect of a partially hydrolysed formula based on rice protein in the treatment of infants with cow's milk protein allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 2010; 21 (4 Pt 1): 577–585.
104. Fiocchi A, Restani P, Bernardini R, Lucarelli S, Lombardi G, Magaazzú G, et al. A hydrolysed rice-based formula is tolerated by children with cow's milk allergy: a multi-centre study. *Clin Exp Allergy* 2006; 36: 311–316.
105. Kim D, Zeng MY, Núñez G. The interplay between host immune cells and gut microbiota in chronic inflammatory diseases. *Exp Mol Med* 2017; 49: 339.
106. Konturek PC, Haziri D, Brzozowski T, Hess T, Heyman S, Kwiecien S, et al. Emerging role of fecal microbiota therapy in the treatment of gastrointestinal and extra-gastrointestinal diseases. *J Physiol Pharmacol* 2015; 66: 483–491.
107. Walker AW, Martin JC, Scott P, Parkhill J, Flint HJ, Scott KP. 16S rRNA gene-based profiling of the human infant gut microbiota is strongly influenced by sample processing and PCR primer choice. *Microbiome* 2015; 3: 26.
108. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* 2012; 148: 1258–1270.
109. Mell B, Jala VR, Mathew AV, Byun AV, Waghulde H, Zhang Y, et al. Evidence for a link between gut microbiota and hypertension in the Dahl rat. *Physiol Genomics* 2015; 47: 187–197.
110. Shu SA, Yuen AWT, Woo E, Chu KH, Kwan HS, Yang GX, et al. Microbiota and food allergy. *Clin Rev Allergy Immunol* 2019; 57: 83–97.

111. Aitoro R, Paparo L, Amoroso A, Costanzo MD, Cosenza L, Granata V, et al. Gut microbiota as a target for preventive and therapeutic intervention against food allergy. *Nutrients* 2017; 9: 672.
112. Rachid R, Chatila TA. The role of the gut microbiota in food allergy. *Curr Opin Pediatr* 2016; 28: 748-753.
113. Bunyavanich S, Berin MC. Food allergy and the microbiome: current understandings and future directions. *J Allergy Clin Immunol* 2019; 144: 1468–1477.
114. Marrs T, Sim K. Demystifying dysbiosis: can the gut microbiome promote oral tolerance over IgE-mediated food allergy? *Curr Pediatr Rev* 2018; 14: 156-163.
115. Cukrowska B. Microbial and nutritional programming. The importance of the microbiome and early exposure to potential food allergens in the development of allergies. *Nutrients* 2018; 10: 1541.
116. Díaz M, Guadamuro L, Espinosa-Martos I, Mancabelli L, Jiménez S, Molinos-Norniella C, et al. Microbiota and derived parameters in fecal samples of infants with Non-IgE cow's milk protein allergy under a restricted diet. *Nutrients* 2018; 10: 1481.
117. Thompson-Chagoyan OC, Vieites JM, Maldonado J, Edwards C, Gil A. Changes in faecal microbiota of infants with cow's milk protein allergy, a Spanish prospective case-control 6-month follow-up study. *Pediatr Allergy Immunol* 2010; 21 (2): 394–400.
118. Zhao W, Ho HE, Bunyavanich S. The gut microbiome in food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2019; 122: 276-282.
119. Lozano-Ojalvo D, Berin C, Tordesillas L. Immune basis of allergic reactions to food. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2019; 29: 1-14.
120. Inoue R, Sawai T, Sawai C, Nakatani M, Romero-Pérez GA, Ozeki M, et al. A preliminary study of gut dysbiosis in children with food allergy. *Biosci Biotechnol Biochem* 2017; 81: 2396-2399.

121. Ho HE, Bunyavanich S. Role of the microbiome in food allergy. *Curr Allergy Asthma Rep* 2018; 18: 27.
122. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388: 394-397.
123. Botos I, Segal DM, Davies DR. The structural biology of Toll-like receptors. *Structure* 2011; 19: 447-459.
124. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 335-376.
125. Lee BL, Barton GM. Trafficking of endosomal Toll-like receptors. *Trends Cell Biol* 2014; 24: 360-369.
126. Turul T, Ersoy F. Dostu düşmanı ayıran bir doğal immünite bileşeni: toll-like reseptörler (TLR) *Hacettepe Tıp Dergisi* 2004; 35: 114-118.
127. Stelmaszczyk-Emmel A, Zawadzka-Krajewska A, Szypowska A, Kulus M, Demkow U. Frequency and activation of CD4+CD25 FoxP3+ regulatory T cells in peripheral blood from children with atopic allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2013; 162: 16-24.
128. Torgerson TR, Linane A, Moes N, Anover S, Mateo V, Rieux-Laucat F, et al. Severe food allergy as a variant of IPEX syndrome caused by a deletion in a noncoding region of the FOXP3 gene. *Gastroenterology* 2007; 132: 1705-1717.
129. Ziegler SF. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 209-226.
130. Westerholm-Ormio M, Vaarala O, Tiittanen M, Savilahti E. Infiltration of Foxp3- and Toll-like receptor-4-positive cells in the intestines of children with food allergy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010; 50: 367-376.

131. Amoudruz P, Holmlund U, Malmström V, Trollmo C, Bremme K, Scheynius A, et al. Neonatal immune responses to microbial stimuli: is there an influence of maternal allergy? *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 1304–1310.
132. Prescott SL, Noakes P, Chow BW, Breckler L, Thornton CA, Hollams Em, et al. Presymptomatic differences in Toll-like receptor function in infants who have allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 391-399.
133. Krauss-Etschmann S, Hartl D, Heinrich J, Thagi A, Prell C, Campoy C, et al. Association between levels of Toll-like receptors 2 and 4 and CD14 mRNA and allergy in pregnant women and their offspring. *Clin Immunol* 2006; 118: 292–299.
134. Takeda K, Akira S. Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes Cells* 2001; 6: 733-742.
135. Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, et al. Differential expression and regulation of Toll-like receptors (TLR) in human leucocytes: selective expression of TLR-3 in dendritic cells. *J Immunol* 2000; 164: 5998-6004.
136. Yu L, Feng Z. The Role of Toll-like receptor signaling in the progression of heart failure. *Mediators Inflamm* 2018; 2018: 9874109.
137. Ito M, Hanaoka M, Droma Y, Kobayashi N, Yasuo M, Kitaguchi Y, et al. The association of Toll-like receptor 4 gene polymorphisms with the development of emphysema in Japanese subjects: a case control study. *BMC Res Notes* 2012; 5: 36.
138. Özbayer C, Kurt H, Yangı B. Genetic Variants of TLR4 and TLR4 signal pathway and its association with insulin resistance and diabetes risk. *J Clin Anal Med* 2014; 5: 168-172.
139. Vaizoglu RD, Acar C. The relationship between Tuberculosis and TLR gene polymorphisms. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 2019; 49: 1-10.

140. Pattabiraman G, Panchal R, Medvedev AE. The R753Q polymorphism in Toll-like receptor 2 (TLR2) attenuates innate immune responses to mycobacteria and impairs MyD88 adapter recruitment to TLR2. *J Biol Chem* 2017; 292: 10685-10695.
141. Oh DY, Schumann L, Neumann K, Worm M, Heine G. Association of the Toll-like receptor 2 A-16934T promoter polymorphism with severe atopic dermatitis. *Allergy* 2009; 64: 1608-1615.
142. Ahmad-Nejad P, Mrabet-Dahbi S, Breuer K, Klotz M, Werfel T, Herz U, et al. The toll-like receptor 2 R753Q polymorphism defines a subgroup of patients with atopic dermatitis having severe phenotype. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 565–567.
143. Potaczek DP, Nastalek M, Okumura K, Wojas-Pelc A, Undas A, Nishiyama C. An association of TLR2–16934A >T polymorphism and severity/phenotype of atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011; 25: 715-721.
144. Salpietro C, Rigoli L, Miraglia Del Giudice M, Cuppari C, Di Bella C, Salpietro A, et al. TLR2 and TLR4 gene polymorphisms and atopic dermatitis in Italian children: a multicenter study. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2011; 24 (4): 33-40.
145. Can C, Yazıcıoğlu M, Gürkan H, Tozkır H, Görgülü A, Süt NH. Lack of association between Toll-like receptor 2 polymorphisms (R753Q and A-16934T) and atopic dermatitis in children from thrace region of Turkey. *Balkan Med J* 2017; 34: 232-238.
146. Keni FM, Çelik SK, Solak N, Genç GÇ, Dursun A. Relationship between TLR2 and TLR4 gene polymorphisms with psoriasis. *Turk J Dermatol* 2018; 12: 28-32.
147. Urcelay E, Blanco-Kelly F, de Las Heras V, de la Concha EG, Arroyo R, Martínez A. TLR4 haplotypes in multiple sclerosis: a case-control study in the Spanish population. *J Neuroimmunol* 2007; 192: 215-218.
148. Berdeli A, Emingil G, Han Saygan B, Gürkan A, Atilla G, Köse T, et al. TLR2 Arg753Gly, TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile gene polymorphisms are not associated

- with chronic periodontitis in a Turkish population. *J Clin Periodontol* 2007; 34: 551-557.
- 149.** Sanchez E, Orozco G, Martin J. Toll-like receptors and human pathology. *Immunologia* 2004; 23: 328-338.
- 150.** Kolz M, Baumert J, Müller M, Khuseyinova N, Klopp N, Thorand B, et al. Association between variations in the TLR4 gene and incident type 2 diabetes is modified by the ratio of total cholesterol to HDL-cholesterol. *BMC Medical Genetics* 2008; 9: 9.
- 151.** Shen X, Shi R, Zhang H, Li K, Zhao Y, Zhang R. The Toll-like receptor 4 D299G and T399I polymorphisms are associated with Crohn's disease and Ulcerative colitis: a meta-analysis. *Digestion* 2010; 81: 69-77.
- 152.** Achyut BR, Ghoshal UC, Moorchung N, Mittal B. Association of Toll-like receptor 4 (Asp299Gly and Thr399Ileu) gene polymorphisms with gastritis and precancerous lesions. *Hum Immunol* 2007; 68: 901-907.
- 153.** Lorenz E, Hallman M, Marttila R, Haataja R, Schwartz DA. Association between the Asp299Gly polymorphisms in the Toll-like receptor 4 and premature births in the Finnish population. *Pediatr Res* 2002; 52: 373–376.
- 154.** Lorenz E, Schwartz DA, Martin PJ, Gooley T, Lin MT, Chien JW, et al. Association of TLR4 mutations and the risk for acute GVHD after HLA-matched-sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; 7: 384-387.
- 155.** Chassaing B, Ley RE, Gewirtz AT. Intestinal epithelial cell toll-like receptor 5 regulates the intestinal microbiota to prevent low-grade inflammation and metabolic syndrome in mice. *Gastroenterology* 2014; 147: 1363–1377.
- 156.** Uematsu S, Fujimoto K, Jang MH, Yang BG, Jung YJ, Nishiyama M, et al. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol* 2008; 9: 769–776.

157. Yiu JH, Dorweiler B, Woo CW. Interaction between gut microbiota and Toll-like receptor: from immunity to metabolism. *J Mol Med (Berl)* 2017; 95: 13-20.
158. Hug H, Mohajeri MH, La Fata G. Toll-like receptors: regulators of the immune response in the human gut. *Nutrients* 2018; 10: 203.
159. Lane ER, Zisman TL, Suskind DL. The microbiota in inflammatory bowel disease: current and therapeutic insights. *J Inflamm Res* 2017; 10: 63–73.
160. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005; 308: 1635–1638.
161. Bashir ME, Louie S, Shi HN, Nagler-Anderson C. Toll-like receptor 4 signaling by intestinal microbes influences susceptibility to food allergy. *J Immunol* 2004; 172: 6978–6987.
162. Kumar J, Kumar M, Gupta S, Ahmed V, Bhambi M, Pandey R, et al. An improved methodology to overcome key issues in human fecal metagenomic DNA extraction. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2016; 14: 371–378.
163. Nakanishi Y, Murashima K, Ohara H, Suzuki T, Hayashi H, Sakamoto M, et al. Increase in terminal restriction fragments of Bacteroidetes-derived 16S rRNA genes after administration of short-chain fructooligosaccharides. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 6271-6276.
164. Mäkituokko H, Wacklin P, Koenen ME, Laamanen K, Alakulppi N, Venema K, et al. Isolation of bifidobacteria for blood group secretor status targeted personalised nutrition. *Microb Ecol Health Dis* 2012; 23: 10.
165. Bacchetti De Gregoris T, Aldred N, Clare AS, Burgess JG. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. *J Microbiol Methods* 2011; 86: 351-356.

166. Koplin J, Allen K, Gurrin L, Osborne N, Tang ML, Dharmage S. Is caesarean delivery associated with sensitization to food allergens and IgE-mediated food allergy: a systematic review. *Pediatr Allergy Immunol* 2008; 19: 682–687.
167. Laubereau B, Filipiak-Pittroff B, von Berg A, Reinhardt D, Wichmann HE, Koletzko S, et al. Caesarean section and gastrointestinal symptoms, atopic dermatitis, and sensitisation during the first year of life. *Arch Dis Child* 2004; 89 (11): 993–997.
168. Gu L, Zhang W, Yang W, Liu H. Systematic review and meta-analysis of whether cesarean section contributes to the incidence of allergic diseases in children: a protocol for systematic review and meta analysis. *Medicine (Baltimore)* 2019; 98 (52): e18394.
169. Papathoma E, Triga M, Fouzas S, Dimitriou G. Cesarean section delivery and development of food allergy and atopic dermatitis in early childhood. *Pediatr Allergy Immunol* 2016; 27 (4): 419-424.
170. Eggesbo M, Botten G, Stigum H, Samuelsen SO, Brunekreef B, Magnus P. Cesarean delivery and cow milk allergy/intolerance. *Allergy* 2005; 60: 1172–1173.
171. Chernikova D, Yuan I, Shaker M. Prevention of allergy with diverse and healthy microbiota: an update. *Curr Opin Pediatr* 2019; 31: 418–425.
172. Pyrhönen K, Näyhä S, Hiltunen L, Läärä E. Caesarean section and allergic manifestations: insufficient evidence of association found in population based study of children aged 1 to 4 years. *Acta Paediatr* 2013; 102: 982–989.
173. Koplin JJ, Dharmage SC, Ponsonby AL, Tang MLK, Lowe AJ, Gurrin LC, et al. Environmental and demographic risk factors for egg allergy in a population based study of infants. *Allergy* 2012; 67: 1415–1422.
174. Zeng M, Nourishirazi E, Guinet E, Nouri-Shirazi M. The genetic back ground influences the cellular and humoral immune responses to vaccines. *Clin Exp Immunol* 2016; 186: 190–204.

175. Berin MC, Zheng Y, Domaradzki M, Li XM, Sampson HA. Role of TLR4 in allergic sensitization to food proteins in mice. *Allergy* 2006; 61: 64–71.
176. Dasgupta Y, Golovine K, Nieborowska-Skorska M, Luo L, Matlawska-Wasowska K, Mullighan CG, et al. Drugging DNA repair to target T-ALL cells. *Leuk Lymphoma* 2018; 59: 1746–1749.
177. Liu J, Rädler D, Illi S, Klucker E, Turan E, Mutius EV, et al. TLR2 polymorphisms influence neonatal regulatory T cells depending on maternal atopy. *Allergy* 2011; 66: 1020–1029.
178. Gülen F, Köksoy H, Tanaç R, Berdeli A, Demir E, Zeyrek D, et al. Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 polymorphisms in children with asthma and allergic rhinitis. *J Ped Res* 2014; 1: 13-21.
179. Noguchi E, Nishimura F, Fukai H, Kim J, Ichikawa K, Shibasaki M, et al. An association study of asthma and total serum immunoglobulin E levels for Toll-like receptor polymorphisms in a Japanese population. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 177–183.
180. Stephen-Victor E, Chatila TA. Regulation of oral immune tolerance by the microbiome in food allergy. *Curr Opin Immunol* 2019; 60: 141-147.
181. Zhao W, Ho HE, Bunyavanich S. The gut microbiome in food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2019; 122: 276-282.
182. Di Costanzo M, Amoroso A, Canani RB. Gut microbiota as a target for food allergy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2016; 63: 11–13.
183. Fazlollahi M, Chun Y, Grishin A, Wood RA, Burks AW, Dawson P, et al. Early-life gut microbiome and egg allergy. *Allergy* 2018; 73: 1515–1524.
184. Berni Canani R, Sangwan N, Stefka AT, Nocerino R, Paparo L, Aitoro R, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG-supplemented formula expands butyrate-producing bacterial strains in food allergic infants. *ISME J* 2016; 10: 742–750.

185. Molloy J, Allen K, Collier F, Tang ML, Ward AC, Vuillermin P. The potential link between gut microbiota and IgE-mediated food allergy in early life. *Int J Environ Res Public Health* 2013; 10: 7235–7256.
186. Savage JH, Lee-Sarwar KA, Sordillo J, Bunyavanich S, Zhou Y, O'Connor G, et al. A prospective microbiome wide association study of food sensitization and food allergy in early childhood. *Allergy* 2018; 73: 145-152.
187. Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 2012; 486: 222–227.
188. Bunyavanich S, Shen N, Grishin A, Wood R, Burks W, Dawson P, et al. Early life gut microbiome composition and milk allergy resolution. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 138: 1122–1130.
189. Ling Z, Li Z, Liu X, Cheng Y, Luo Y, Tong X, et al. Altered fecal microbiota composition associated with food allergy in infants. *Appl Environ Microbiol* 2014; 80: 2546-2454.
190. Azad MB, Konya T, Guttman DS, Field CJ, Sears MR, HayGlass KT, et al. Infant gut microbiota and food sensitization: associations in the first year of life. *Clin Exp Allergy* 2015; 45: 632-643.
191. Berni Canani R, De Filippis F, Nocerino R, Paparo L, Discala C, Cosenza L, et al. Gut microbiota composition and butyrate production in children affected by non-IgE-mediated cow's milk allergy. *Sci Rep* 2018; 8 (1): 12500.
192. Fieten KB, Totté JEE, Levin E, Reyman M, Meijer Y, Knulst A, et al. Fecal microbiome and food allergy in pediatric atopic dermatitis: a cross sectional pilot study. *Int Arch Allergy Immunol* 2018; 175: 77-84.
193. Chiu CY, Chan YL, Tsai MH, Wang CJ, Chiang MH, Chiu CC. Gut microbial dysbiosis is associated with allergen-specific IgE responses in young children with airway allergies. *World Allergy Organ J* 2019; 12 (3): 100021.

194. Round JL, Lee SM, Li J, Tran G, Jabri B, Chatila TA, et al. The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science* 2011; 332(6032): 974–977.
195. Tunis MC, Marshall JS. Toll-like receptor 2 as a regulator of oral tolerance in the gastrointestinal tract. *Mediators Inflamm* 2014; 2014: 606383.
196. Konieczna P, Groeger D, Ziegler M, Frei M, ferstl R, Shanahan F, et al. *Bifidobacterium infantis* 35624 administration induces Foxp3 T regulatory cells in human peripheral blood: potential role for myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Gut* 2012; 61: 354–366.

## 6. EKLER

T.C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı

### ETİK KURUL KARARI

| TOPLANTI<br>TARİHİ | TOPLANTI<br>SAYISI | KARAR<br>NO | ÇALIŞMACININ ADI SOYADI |
|--------------------|--------------------|-------------|-------------------------|
| 21.06.2018         | 11                 | 04          | Prof. Dr. Mehmet KILIÇ  |

#### KARAR

"Besin Alerjisi Olan Çocuklarda Barsak Mikrobiyotası ve Toll-Like Reseptör 2 ve 4 Polimorfizminin Değerlendirilmesi" konulu çalışma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna oybirliğiyle karar verilmiştir.

|                                         |                                                                                     |                                           |           |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------|
| Prof. Dr. Mustafa KAPLAN<br>(Başkan)    |  | Prof. Dr. Demet ÇİÇEK<br>(Üye)            | İmza      |
| Prof. Dr. Figen DEVECİ<br>(Üye)         | Bulunmadı                                                                           | Prof. Dr. Engin ŞAHNA<br>(Üye)            | Bulunmadı |
| Prof. Dr. Erdal TAŞKIN<br>(Üye)         | Katılmadı                                                                           | Prof. Dr. Yüksel SAVUCU<br>(Üye)          | İmza      |
| Doç. Dr. Funda GÜLCÜ<br>BULMUŞ<br>(Üye) | İmza                                                                                | Doç. Dr. Fazilet ERMAN<br>(Üye)           | İmza      |
| Dr. Öğr. Üyesi Turgay BÖRK<br>(Üye)     | İmza                                                                                | Dr. Öğr. Üyesi Gökhan<br>GÖKDERE<br>(Üye) | İmza      |

## 7. ÖZGEÇMİŞ

21.08.1989 tarihinde Diyarbakır ilinde doğdum. İlk ve ortaöğrenimimi Şehit Namık Tümer ilkokulunda, Liseyi Nevzat Ayaz Anadolu Lisesinde okudum. Üniversite eğitimime Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesinde 2008 yılında başladım ve 2014 yılında mezun oldum. Mecburi hizmet için Kocaeli Gölcük Necati Çelik Devlet Hastanesi acil servisine pratisyen hekim olarak atandım. Mecburi hizmetimi bitirmeden, 2016 yılında girdiğim TUS sınavında başarılı olarak Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalında uzmanlık eğitimime başladım. Halen bu klinikte eğitime devam etmekteyim.