

**BESİN ALERJİSİ PATOGENEZİNDE KISA VE UZUN
KODLAMAYAN RNA'LARIN ROLÜ**

**THE ROLE OF SHORT AND LONG NON-CODING RNAs
IN FOOD ALLERGY PATHOGENESIS**

HÜLYA ERBOĞA

DOÇ. DR. ESRA BİRBEN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

BİYOLOJİ Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır

2022

ÖZET

BESİN ALERJİSİ PATOGENEZİNDE KISA VE UZUN KODLAMAYAN RNA'LARIN ROLÜ

Hülya ERBOĞA

Yüksek Lisans, MOLEKÜLER BİYOLOJİ Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Esra BİRBEN

Ocak 2022, 96 sayfa

Zararsız olan bir besin antijenine yönelik uygunsuz bir bağışıklık yanıtı olarak tanımlanan besin alerjisi multifaktöriyel bir hastalıktır. Diğer alerjik hastalıklarda olduğu gibi besin alerjisinin sıklığı da tüm dünyada giderek artmaktadır. Bu artışın sebeplerinden birinin de epigenetik mekanizmalar olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Epigenetik mekanizmalardan biri olan miRNA ve lncRNA'ların ifade paterni, farklı hücre tiplerine ve hastalık koşullarına göre değişmektedir. miRNA'lar ve lncRNA'lar stabildir ve serum, idrar ve tükürük gibi farklı vücut sıvılarında tespit edilebildiği için önemli birer biyobelirteç olabilme potansiyeline sahiptirler. Bu çalışmada, seçilen miRNA'lar ve lncRNA'ların besin alerjisi gelişimi ve patogenezindeki etkisinin araştırılması ve besin alerjisi için bir biyobelirteç adayı olabilme potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

26 besin alerjisi hastası ve 30 sağlıklı kontrolün serumunda miRNA (miR-19a ve miR-98) ve lncRNA (lnc-MALAT-1 ve lnc-GATA3-AS1) ifadesi gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (GZ-PZR) ile tespit edildi. Serum IL-4, IL-10, IL-13 ve TGF- β seviyeleri ELISA yöntemi kullanılarak ölçüldü.

Çalışmamızın sonucunda miR-98'in besin alerjili çocuklarda, sağlıklı çocuklarla kıyaslandığında anlamlı derecede daha az ifade edildiği görülmüştür ($p<0,05$). miR-19a ve MALAT1 gen ifade seviyeleri sağlıklı çocuklar ile besin alerjili çocuklar arasında kıyaslandığında fark görülmemiştir ($p>0,05$). Hasta ve kontrollere ait serum örneklerinde GATA3-AS1 lncRNA tespit edilememiştir.

Örneklerde serum IL-4 ve IL-10 seviyeleri ölçülebilir düzeyde bulunamazken, TGF- β seviyeleri sağlıklı çocuklarda besin alerjili çocuklarla kıyaslandığında anlamlı derecede daha fazla olduğu görülmüştür ($p<0,05$). miR-98 ile ilişkili olduğu düşünülen IL-13'ün sağlıklı çocuklara kıyasla besin alerjili çocuklarda serum protein seviyelerinde bir fark görülmemiştir ($p>0,05$).

Çalışmamızda hastalar ile sağlıklı grup arasında sadece miR-98'nin ifade düzeyleri bakımından fark gözlemlendi. Literatürdeki verilerle beraber değerlendirildiğinde, miR-98'nin besin alerjisi için bir biyobelirteç adayı olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Besin alerjisi, epigenetik, miRNA, lncRNA, ifade analizi, ELISA

ABSTRACT

THE ROLE OF SHORT AND LONG NON-CODING RNAs IN FOOD ALLERGY PATHOGENESIS

Hülya ERBOĞA

Master's Degree, Department of MOLECULAR BIOLOGY

Supervisor: Doç. Dr. Esra BİRBEN

January 2022, 96 pages

Food allergy, defined as an inappropriate immune response to a harmless food antigen, is a multifactorial disease. As with other allergic diseases, the frequency of food allergy is increasing all over the world. There are studies showing that one of the reasons for this increase is epigenetic mechanisms. The expression pattern of miRNAs and lncRNAs, one of the epigenetic mechanisms, varies according to different cell types and disease conditions. miRNAs and lncRNAs are stable and have the potential to be important biomarkers as they can be detected in different body fluids such as serum, urine and saliva. In this study, it was aimed to investigate the effect of miRNAs and lncRNAs on the development and pathogenesis of food allergy and to determine their potential as a biomarker candidate for food allergy.

The expression of miRNA (miR-19a and miR-98) and lncRNA (lnc-MALAT-1 and lnc-GATA3-AS1) in the serum of 26 food allergy patients and 30 healthy controls were detected by real time polymerase chain reaction (RT-PCR). Serum IL-4, IL-10, IL-13 and TGF- β levels were measured using ELISA.

As a result of our study, it was observed that miR-98 was significantly less expressed in children with food allergies compared to healthy children ($p < 0.05$). When the gene expression levels of miR-19a and MALAT1 were compared between children with food allergies and healthy children, there was no difference in gene expression levels ($p > 0.05$). GATA3-AS1 lncRNA could not be detected in serum samples of patients and controls. While serum IL-4 and IL-10 levels were not detectable in the samples, TGF- β levels were found to be significantly higher in healthy children compared to children with food allergies ($p < 0.05$). There was no difference in serum protein levels of IL-13, which is thought to be related to miR-98, in children with food allergies compared to healthy children ($p > 0.05$).

In our study, only difference in expression levels of miR-98 was observed between the patients and the healthy group. When evaluated together with the data in the literature, it is thought that miR-98 may be a biomarker candidate for food allergy

Keywords: Food allergy, epigenetic, miRNA, lncRNA, expression analysis, ELISA

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin her aşamasında ilgi ve desteğinin yanı sıra bilgi ve birikimleriyle her zaman yanımda olan değerli hocam ve danışmanım Sayın Doç. Dr. Esra BİRBEN'e

Bu tezin tamamlanmasında 18798 numaralı proje ile maddi destek sağlayan HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ'ne,

Üniversite hayatım boyunca ve devamında da yardımları, bilgi birikimi ve tecrübesiyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Merve Gökşin KARAASLAN'a,

Gerek mesleki bilgilerle gerekse eşsiz tecrübeleriyle hayatıma farklı bakış açıları kazandıran değerli tüm HOCALARIMA,

Eğitim hayatım boyunca bana yardımlarından, tavsiyelerinden ve dostluklarından hiçbir zaman vazgeçmeyen arkadaşlarım Atife Nida ONUR, Zeynep ÇOKLUK ve Şenay DEMİR'e,

Hayatım boyunca beni her zaman destekleyen, cesaretlendiren ve yardımlarını esirgemeyen, beni bugünlere getiren canım AİLEME,

Sonsuz Teşekkürler...

Hülya ERBOĞA

Ocak 2022, Ankara

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Besin Alerjisi.....	2
2.2. Besin Alerjisinin Sınıflandırılması.....	2
2.2.1. IgE-Aracılı Besin Alerjisi.....	3
2.2.2. IgE-Aracılı Olmayan Besin Alerjisi	4
2.2.3. Karışık Tip Besin Alerjisi	5
2.3. Besin Alerjisi Epidemiyolojisi	6
2.4. Besin Alerjisi Patogenezi	8
2.5. Besin Alerjisi Gelişmesindeki Olası Risk Faktörleri	10
2.5.1. Kişisel Faktörler	11
2.5.2. Çevresel Faktörler	13
2.6. Klinik Bulgular.....	14
2.7. Besin Alerjenleri	15
2.7.1. Süt Alerjenleri	19
2.7.2. Kuruyemiş Alerjenleri.....	20
2.8. Besin Alerjisinde Tanı ve Tedavi.....	24
2.8.1. Tanı.....	24
2.8.2. Tedavi.....	27
2.9. Besin Alerjisi ve Epigenetik Mekanizmalar.....	27

2.9.1. Epigenetik Mekanizmalar	27
2.9.1.1 miRNA'lar	30
2.9.1.2. lncRNA'lar	34
2.9.2. Alerjik Hastalıklarda Kodlamayan RNA'ların Rolü	35
2.9.2.1. miRNA'ların Rolü	35
2.9.2.2. lncRNA'ların Rolü.....	37
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	39
3.1. Gereçler.....	39
3.1.1. Kullanılan Malzemeler	39
3.2. Yöntem.....	39
3.2.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	39
3.2.2. Örneklerin Elde Edilmesi.....	40
3.2.3. Belirlenen miRNA'ların ve lncRNA'ların Hazırlanması	40
3.2.4. miRNA İzolasyonu	41
3.2.5. cDNA Sentezinin Yapılması.....	42
3.2.6. miRNA İfade Analizlerinin Yapılması	42
3.2.7. lncRNA İfade Analizlerinin Yapılması	44
3.2.8. ELISA İle Sitokin/Kemokin/ Büyüme Faktörlerinin Ölçümü	45
3.2.9. Verilerin Toplanması	46
3.2.10. İstatistiksel Analizler	46
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	47
4.1. SONUÇLAR.....	47
4.1.1. Hastalara Ait Demografik ve Klinik Bulgular	47
4.1.2. Hasta Grubunda miRNA ve lncRNA İfade Analizleri	49
4.1.3. Serum örneklerinde IL-4, IL-10, TGF- β ve IL-13 protein seviyeleri	52
4.2. TARTIŞMA	54
5. YORUM.....	61
6. KAYNAKLAR	62
EKLER.....	85
EK 1 – Etik Kurul İzin Belgesi	85

EK 2 – Araştırma Amaçlı Çalışma İçin ocuk Rıza Formları.....	86
EK 3 – Araştırma Amaçlı Çalışma İçin Ebeveyn Aydınlatılmış Onam Formları.....	88
EK 4 – Tezden Türetilmış Bildiriler	94
EK 5 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu	95
ÖZGEÇMİş	96



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Besin Alerjisinin Sınıflandırılması	3
Şekil 2.2. Besin alerjisinde duyarlanma fazı.....	9
Şekil 2.3. Doğrusal ve konformasyonel epitoplar.....	15
Şekil 2.4. miRNA biyogenezi	33
Şekil 2.5. lncRNA'ların sınıflandırılması	34
Şekil 2.6. lncRNA'ların görevleri	35
Şekil 4.1. Hasta ve kontrol grubuna ait miR-19a Ct değerlerinin grafiksel olarak gösterimi	49
Şekil 4.2. Besin alerjili hastalar ile kontrol grubuna ait miR-19a ifadelerinin karşılaştırılması (Kontrol için; ortanca: 0,95, 25-75. çeyreklik: 0,3075-3,4625, Hasta için; ortanca: 1,075, 25.-75. çeyreklik: 0,2750-3,0225)	50
Şekil 4.3. Hasta ve kontrol grubunda miR-98 Ct değerlerinin grafiksel olarak gösterimi	50
Şekil 4.4. Besin alerjili ile kontrol grubuna ait miR-98 ifadelerinin karşılaştırılması (Kontrol için; ortanca: 0,945, 25-75. çeyreklik: 0,65-1,6025, Hasta için; ortanca: 0,26, 25-75. çeyreklik: 0,0875-0,57).....	51
Şekil 4.5. Hasta ve kontrol grubunda MALAT1 Ct değerlerinin grafiksel olarak gösterimi	51
Şekil 4.6. Besin alerjili ile kontrol grubun MALAT1 ifadelerinin karşılaştırılması (Kontrol için; ortanca: 1,025, 25-75. çeyreklik: 0,5675-1,7775, Hasta için; ortanca: 1,31, 25-75. çeyreklik: 0,2475-3,36).....	52
Şekil 4.7. Besin alerjili gruptan ve sağlıklı gruptan elde edilen serum örneklerinde TGF- β protein seviyelerinin karşılaştırılması (Kontrol için; ortanca: 65,98, 25-75. çeyreklik: 43,07-81,5925, Hasta için; ortanca: 45,39, 25-75. çeyreklik: 35,765-61,315).....	53
Şekil 4.8. Besin alerjili gruptan ve sağlıklı gruptan elde edilen serum örneklerinde IL-13 protein seviyelerinin karşılaştırılması (Kontrol için; ortanca: 0,8495, 25-75. çeyreklik: 0,258-7,293, Hasta için; ortanca: 1,759, 25-75. çeyreklik: 0,409-6,146).....	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Besin alerjisi risk faktörleri.....	10
Çizelge 2.2. Besin alerjisinde klinik bulgular	14
Çizelge 2.3. Yaygın hayvan kökenli alerjenik protein ailelerinin özellikleri ve bulundukları besinler	17
Çizelge 2.4. Yaygın bitki kökenli alerjenik protein ailelerinin özellikleri ve bulundukları besinler	17
Çizelge 2.5. Süt bileşenleri ve protein ailesi	20
Çizelge 2.6. Kuruyemiş bileşenleri ve protein ailesi.....	23
Çizelge 2.7. Kodlamayan RNA'lar ve fonksiyonları	29
Çizelge 3.1. Çalışma için seçilen miRNA dizileri	43
Çizelge 3.2. lncRNAlara ait primer dizileri	45
Çizelge 4.1. Besin alerjili ve kontrol grupların cinsiyet dağılımları	47
Çizelge 4.2. Besin alerjili ve kontrol grupların yaş ortalamaları	47
Çizelge 4.3. Çalışmaya katılan hastalara ait bazı klinik veriler	48
Çizelge 4.4. Çalışmaya katılan besin alerjili çocuklara ait sIgE değerler	48

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

g	Gram
HCl	Hidrojen Klorik Ait
IU	Uluslararası Birim
□	Epsilon
%	Yüzde
~	Yaklaşık
<	Küçüktür
>	Büyüktür
®	Kayıtlı ticari marka sembolü
°C	Derece santigrat
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
kU	Kilo birim
kDA	Kilo dalton
L	Litre
ml	Mililitre
ng	Nanogram
p	Probability; Olasılık
ph	Hidrojen gücü
r	Korelasyon katsayısı
rpm	Dakikada devir sayısı
α	Alfa

β	Beta
γ	Gama
Δ	Delta
κ	Kappa

Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AD	Atopik Dermatit
AGO	Argonaute Protein
AP	Alerjik Proktokolit
ASH	Antijen Sunan Hücreler
BAP	Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
BDT	Bileşene Dayalı Tedavi
BPE	Besin Proteini Kaynaklı Enteropati
BPIES	Besin Proteini İlişkili Enterokolit Sendromu
cAMP	Siklik adenosin monofosfat
CCR4-NOT	Karbon Katabolit Baskısı -TATA'sız
CD4	Farklılaşma kümesi 4
cDNA	Komplementer DNA
CpG	Sitozin fosfo Guanin
CREB	cAMP Tepki Elemanı Bağlayıcı Protein
Ct	Eşik Döngüsü
DCP	Decapping Proteini
DGCR8	DiGeorge Kritik Sendrom Bölgesi 8
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit

EF1- α	Uzama faktörü 1-alfa
EGE	Eozinofilik Gastroenterit
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
EoE	Eozinofilik Özofajit
eRNA	Güçlendirici RNA
Exp5	Eksportin 5
Fc	Parça Kristalleşebilir Bölge
Fc ϵ RI	Fc epsilon reseptörü 1
FLG	Filaggrin
FOXP3	Önçatal Kutusu P3
Gal 1	Galektin-1
GDP	Guanozin Difosfat
GI	Gastrointestinal
GIS	Gastrointestinal Sistem
gRNA	Rehber RNA
GTP	Guanozin Trifosfat
GW182	Glisin-Triptofan 182
GWAS	Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları
GZ-PZR	Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
HLA	İnsan Lökosit Antijeni
HS	Heiner Sendromu
IFBS II	Bebek Besleme Uygulamaları Çalışması II
IFN	İnterferon
IgE	İmmünoglobulin E
lincRNA	Uzun İntergenik Kodlamayan RNA

IL	İnterlökin
IncRNA	Uzun Kodlamayan RNA
IPEX sendromu	X'e bağılı immün disregölasyon, poliendokrinopati, enteropati sendromu
ISAAC	Uluslararası Çocukluk Çağı Astım ve Alerji Çalışma Grubu
KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
LTP	Lipit Transfer Proteini
LPMC	Lamina Propria Mononükleer HSLEücreler
miRNA	Mikro RNA
mRNA	Mesajcı RNA
ncRNA	Kodlamayan RNA
NSAID	Non Steroidal Antienflamatuvar İlaçlar
OAS	Oral Alerji Sendromu
OIAS	Oral-İntestinal Alerji Sendromu
ORF	Açık Okuma Çerçevesi
PABPC	Poli(A)-Bağlayıcı Protein C
PAN2-PAN3	Poli Nükleaz 2-3
PAR	Promotör ilişkili RNA
PAZ	Piwi, Argonaut ve Zwill
PBMC	Periferik Kan Mononükleer Hücreleri
piRNA	Piwi ilişkili RNA
PR	Patogenez İlişkili
RISC	RNA Kaynaklı Susturma Kompleksi
rRNA	Ribozomal RNA
shRNA	Küçük saç tokası RNA
sIgE	Spesifik İmmünoglobülin E

siRNA	Susturucu RNA
SLE	Sistemik Lupus Eritematozus
snoRNA	Küçük Nükleolar RNA
snRNA	Küçük Nükleer RNA
SPINK5	Serin Peptidaz İnhibitörü Kazal Tip 5
STAT 6	Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü 6
Tregs	T düzenleyici hücreler
TE	Tris-EDTA
TERC	Telomeraz RNA Bileşeni
TGF- β	Tümör Büyüme Faktörü
Th1	T Yardımcı Hücre 1
Th2	T Yardımcı Hücre 2
TLP	Thaumatın benzeri proteinler
TNF- α	Tümör Nekrozis Faktör-alfa
tRNA	Taşıyıcı RNA
TSLP	Timik stromal lenfopoietin
TSP1	Trombospondin-1
UTR	Çevrilmemiş bölge
Xrn1	5'-3' Eksoribonükleaz 1
α -LA	Alfa laktalbümin
β -LG	Beta laktoglobülin

1. GİRİŞ

Besin alerjisi, besin alımından sonra ortaya çıkan istenmeyen immün yanıttır [1]. Görülme sıklığı, yetişkinlerde yaklaşık % 2-4 iken çocuklarda % 6-8'dir. Klinik bulguları hafif kaşıntıdan hayatı tehdit edici anafilaksi gibi bulgulara kadar değişebilmektedir [2]. Yaşam kalitesini düşüren besin alerjisi, ayrıca halk sağlığı kaynaklarını önemli ölçüde tüketmektedir [3,4]. Besin alerjisinin sıklığı tüm dünyada giderek artmaktadır [5]. Sıklığının hızla artmasının sebebinin epigenetik mekanizmalarla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Epigenetik değişiklikler DNA dizisini değiştirmeyi içermeyen genom aktivitesini düzenleyen mekanizmalardır [6]. Başlıca epigenetik mekanizmalar, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlamayan RNA'lar olarak 3'e ayrılır. [7]. MikroRNA'lar (miRNA'lar) ve uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar), kodlamayan RNA sınıfına ait, gen ifadesinin önemli düzenleyicilerdir [8]. Ayrıca miRNA ve lncRNA'ların ifade paterni, farklı hücre tiplerine ve hastalık koşullarına göre değişmektedir. miRNA'lar ve lncRNA'lar stabildir ve serum, idrar ve tükürük gibi farklı vücut sıvılarında tespit edilebilir [9,10]. Bu yüzden kanser, nörolojik hastalıklar, kalp hastalıkları, enflamasyon gibi birçok hastalıkta olduğu gibi alerjik hastalıklarda da önemli biyo-belirteçler olabilme potansiyeline sahiptirler [11,12]. Bu tez çalışmasında besin alerjisine sahip hastalar ile sağlıklı çocuklarda besin alerjisi ile ilgili olabileceğini düşündüğümüz miRNA'ların (miR-98 ve miR-19a) ve lncRNA'ların [lnc-MALAT-1 (metastaz ilişkili akciğer adenokarsinomu-1) ve lnc-GATA3-AS1 (GATA3-antisens 1)] ifadesindeki değişimi gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (GZ-PZR) ile belirleyerek, besin alerjisi için bir biyobelirteç adayı belirlemek istedik. Gruplar arasında miRNA ve lncRNA ifadeleri arasındaki olası farkı belirleyerek besin alerjisi olan hastaları sağlıklı çocuklardan ayırt edebilecek bir biyobelirteç belirleyerek zorlu ve riskli olan besin yükleme testlerine olan ihtiyacın azaltılması ve besin alerjisi patogenezinin daha iyi anlaşılması hedeflendi. Ayrıca ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) yöntemi ile serum örneklerinde alerjik enflamasyonda rolü olan ve seçilen miRNA'lar ve lncRNA'lar ile ilişkili olabileceğini düşündüğümüz IL-4, IL-10, IL-13 ve TGF- β (tümör büyüme faktörü-beta) sitokinlerin seviyelerine bakılarak seçilen kodlamayan RNA'ların enflamasyon üzerine olan etkilerinin belirlenmesi hedeflendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Besin Alerjisi

Sağlıklı bir kişide bağışıklık sistemi, hasarlı hücrelerin temizlenmesini ve bulaşıcı organizmaların veya kanserli hücrelerin öldürülmesini sağlar. Bununla birlikte, bağışıklık sistemi, dengede kalmak için sıkı kontrol altındadır. Bazen bağışıklık sistemi yeterince yanıt vermeyebilir veya aşırı veya uygunsuz bir yanıt oluşturabilir veya normal kontrol mekanizmalarını görmezden gelebilir. Bu gibi durumların sonucunda, alerjik hastalıklar, kanser, immün yetmezlikler, otoimmün hastalıklar gibi çok çeşitli hastalıklar ortaya çıkabilir. Alerji, genellikle zararsız olan bir antijene bağışıklık sisteminin uygunsuz şekilde yanıt vermesidir [13]. "Alerji" terimi 1906 yılında ilk olarak Avusturyalı pediatrist Clemens von Pirquet tarafından bilim dünyasına kazandırılmıştır [14]. Besin alerjileri, belirli astım türleri, alerjik rinit, atopik dermatit, eozinofilik özofajit, ilaç ve böcek alerjileri, en yaygın bilinen alerjik hastalıklardır. Büyük oranda halk sağlığı kaynaklarını tüketen alerjik hastalıkların sıklığı, dünya çapında, özellikle düşük ve orta gelirli ülkelerde artmaktadır [15]. Yapılan son çalışmalar birçok faktörün (yaş, cinsiyet, aile öyküsü, anne ve bebek diyeti gibi) yanında, epigenetik mekanizmaların da besin alerjisi sıklığını artırdığını düşündürmektedir [16]. Zararsız olan bir besin antijenine yönelik uygunsuz bir bağışıklık yanıtı olarak tanımlanan besin alerjisi, aynı besine maruz kaldığında tekrarlanabilen ve yaşamı tehdit edebilen önemli bir hastalıktır. Besin alerjisi sıklıkla çocukluk çağında görülür ve en yüksek sıklık, yaşamın ilk yılında görülür. Birçok besin proteini besin alerjisine neden olabilir ama en sık alerjiye neden olan besinler, süt, yumurta, buğday, soya, yer fıstığı, kuruyemişler, balık ve deniz ürünleridir. Besin alerjisi kişinin yaşına bağlı olarak değişebilmektedir [17]. Örneğin süt ve yumurta alerjisi daha çok küçük çocuklarda görülürken, yetişkinlerde daha çok kuruyemiş ve kabuklu deniz ürünleri alerjileri görülür [18].

2.2. Besin Alerjisinin Sınıflandırılması

Oluşan immün yanıtın tipine bağlı olarak besin alerjileri IgE-aracılı, IgE-aracılı olmayan besin alerjisi ve karışık tip besin alerjisi olarak üç grupta sınıflandırılır [19].



Şekil 2.1. Besin Alerjisinin Sınıflandırılması [19]

2.2.1. IgE-Aracılı Besin Alerjisi

Besin alerjisinin en yaygın bilinen şekli olan IgE aracılı besin alerjisi, besin alımından veya maruziyetinden sonra hızlı semptom göstermesi ile karakterize edilir. Besin alımından veya maruziyetinden sonra dakikalar veya 2 saat içinde semptomlar ortaya çıkar [20]. Klinik bulguları sadece gastrointestinal sistemde görülmez aynı zamanda diğer organ sistemlerini de etkiler. Bu bulgular kaşıntı, kızarıklık gibi hafif reaksiyonlar ya da anafilaksi gibi ağır reaksiyonlar şeklinde görülebilir [21]. IgE aracılı besin alerjisi duyarlanma, efektör ve kronik olmak üzere 3 fazdan meydana gelir [22]. Duyarlanma fazında, alerjenik besin proteininin tüketiminden sonra, besine karşı hassasiyet gelişir. Antijen, antijen sunan hücrelerde işlenerek T hücrelerine sunulur. Böylelikle uyarılan T hücreleri T yardımcı hücreler 2 (Th2)' e farklılaşır. Th2 hücreler tarafından salgılanan IL-4 ve IL-5 sayesinde B hücreleri farklılaşarak besine özgü IgE'ler (immünoglobülinler) üretir. Bu IgE'ler mast hücre yüzeyinde Fc reseptörüne bağlanır ve vücut besine karşı duyarlanma geliştirir. İkinci kez aynı besinin alımı ya da maruziyet sonucunda efektör faz meydana gelir. Besin alerjenlerine yeniden maruz kalınması alerjenin mast hücreleri üzerinde FcεRI (Fc epsilon reseptör 1)'e bağlanmış olan alerjene özgü IgE'ye çapraz bağlanması ile mast hücrelerinin degranülasyonunu ve çeşitli araçların salınmasını indükler. Böylece mast hücreleri histamin, lökotrien gibi mediatörler salar ve besine karşı alerjik reaksiyonlar oluşmuş olur. Duyarlanma, efektör faz olmadan mevcut olabilir [23]. Kronik fazın ise, geç faz reaksiyonların tekrarlanması sonucu oluştuğu düşünülmektedir. Kronik inflamasyonda T yardımcı hücreler 1 (Th1)

ve Th2 hücrelerinin beraber rol aldığı görülmüştür. Bunun sonucunda gastrointestinal fonksiyonda bozulma oluşabilir [22]. Ayrıca allerji semptomları, çapraz reaksiyon sonucu da ortaya çıkabilir. Çapraz reaktivite, belirli bir yiyeceğe alerjisi olan bir kişinin, benzer alerjenleri içeren diğer yiyeceklere karşı alerjik bir tepki geliştirmesi sonucu oluşur [24]. Buna en iyi örneklerden biri polen besin sendromu olarak da bilinen oral alerji sendromudur. Oral alerji sendromu (OAS), ağız ve yutakta karıncalanma ve kaşıntıya neden olur. Polen alerjisi olan kişilerde bulunan OAS, belirli polenlere karşı IgE antikorları ile bazı taze meyve ve sebzelerde bulunan proteinler arasındaki çapraz reaktiviteden kaynaklanır. Örneğin, eğer bir kişi huş ağacı poleni alerjisine sahip ise çiğ havuç, kereviz veya elma yedikten sonra bu semptomları yaşayabilir. Bu proteinler ısıya dayanıksız olduğundan, alerjisi olan bireyler eğer bu yiyecekleri pişirirlerse yiyebilirler. [25].

2.2.2. IgE-Aracılı Olmayan Besin Alerjisi

IgE-aracılı olmayan besin alerjisine tip II, III ve tip IV aşırı duyarlılık reaksiyonlarının aracılık ettiği kabul edilir [26]. Ayrıca IgE-aracılı olmayan besin alerjilerinde IgE antikorları dışında, bağışıklık sistemin diğer bileşenlerinin etkili olduğu düşünülmektedir. Bu besin alerjisi sınıfı, besin proteini kaynaklı enterokolit sendromu, alerjik proktokolit (AP), besin proteini kaynaklı enteropati (BPIES), çölyak hastalığı, Heiner sendromu (HS) gibi geniş bir yelpazeyi kapsar [27].

Besin proteini kaynaklı enterokolit sendromu akut dehidratasyon ve uyuşukluk veya kilo kaybı gibi semptomlar gösteren, nadir görülen bir besin alerjisidir, fakat bu semptomlar, sepsis veya akut karın sorunları gibi akut hastalıkları taklit ederek, hastanın aniden kötüleşmesine neden olabilir [28]. Yapılan bir çalışmada, BPIES olan bebeklerde, bağırsak geçirgenliğini artırdığı bilinen TNF- α (Tümör büyüme faktörü-alfa) ifadesinin arttığı, epitel bariyerini koruma yeteneğine sahip olan TGF- β 1 ifadesinin azaldığı bulunmuştur [29].

Duyarlı kişilerde gluten içeren tahıllara karşı anormal adaptif immün tepki sonucu oluşan çölyak hastalığı bir otoimmün hastalıktır. [30]. Hem çocuklarda, hem de yetişkinlerde görülen bu hastalık, glutenin alkolde çözünebilen prolamın kısmı sebebiyle meydana gelmektedir [31].

Alerjik proktokolit, genellikle sağlıklı görünen bebeklerin dışkıсында mukusla karışmış, gözle görülür kan lekeleri ile karakterize olan bir hastalıktır. Ağırlıklı olarak kalın bağırsağın belirli bir bölgesini (rektosigmoid bölge) etkileyen bu hastalık, tipik olarak diyetten kaçınma ile düzelir, ancak neden olan besin tüketilirse tekrarlanır. AP'nin kesin patogenezi bilinmemekle birlikte, anne sütünden geçen bir protein alerjeninin neden olduğu düşünülmektedir. Ayrıca AP'nin antijen kaynaklı bir kolit olduğunu öne süren çalışmalar vardır [27].

İnek sütünün neden olduğu akciğer hastalığı olarak da bilinen Heiner sendromunda ise gelişme bozukluğu, öksürük, dispne, hırıltılı solunum ve rinit gibi solunum semptomları görülür. Ayrıca kusma, ishal, anemi gibi gastrointestinal semptomlar da oluşabilir. HS görülen bebekler ya da çocuklarda inek sütü proteinlerine karşı aşırı duyarlılık reaksiyonu oluşur. Hastalığın tam olarak aydınlatılamamış olması geç tanı konulmasına ve dolayısıyla tedavinin geç olmasına neden olmaktadır [32].

2.2.3. Karışık Tip Besin Alerjisi

Bu alerji sınıfı atopik dermatit (AD), eozinofilik gastroenterit (EGE) ve eozinofilik özofajit (EoE) hastalıklarını kapsar. Bu sınıfın tanısı, IgE-aracılı besin alerji sınıfından daha zordur. Laboratuvar testlerinin tanı koymada yeterli olmadığı ve klinik bulgular benzer özellikleri gösterdiğinden, bu hastalıkların patofizyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır [21].

Kronik ve nükseden enflamatuvar bir deri hastalığı olan atopik dermatit veya egzama yaşamın erken dönemlerinde başlar. Bu hastalık alerjik rinit, astım ya da besin alerjisi ile ilişkilidir. Atopik dermatit hastalığın yaygınlığı dünya genelinde büyük ölçüde değişmekle beraber, yaşamları boyunca tüm bireylerin yaklaşık beşte birini etkiler [33]. Kuru, kaşıntılı cilt gibi semptomlar görülmektedir. Hastalık sadece önemli morbiditeye neden olmaz, aynı zamanda yaşam kalitesini olumsuz etkiler. Cilt bariyer fonksiyon bozukluğu, immünolojik faktörler ve çevresel faktörler arasındaki etkileşimin sonucu oluşan AD'nin patogenezi ile ilgili bilgiler artmasına rağmen, hastalığın mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Filaggrin (FLG), su dengesini sağlama ve fiziksel bütünlüğü koruma açısından cildin koruyucu bariyerinde önemli rol oynar. AD'li hastalarda FLG genindeki işlev kaybı mutasyonları ve ciltte bulunan seramidler (lipit molekülleri) ve ayrıca birçok enfeksiyöz ajana karşı ilk savunma hattını temsil eden katelisinler gibi

antimikrobiyal peptidlerde azalma görülmüştür. Bu anormallikler, alerjenlerin ve mikropların vücuda daha kolay girişine sebep olur [34]. AD'li hastalarda *Staphylococcus aureus* gibi tekrarlayan bakteriyel enfeksiyonlar görülür. Sağlıklı kontrollerin % 5- 30'unda deride *S. aureus* kolonizasyonu görülürken, AD hastalarda bu oran % 60-100'dür [35].

Eozinofilik gastroenterit, ağırlıklı olarak mide ve ince bağırsağı etkileyen nadir bir hastalıktır. Anormal gastrointestinal (GI) semptomların varlığı, çoğunlukla karın ağrısı, GI kanalının bir veya daha fazla bölgesinde eozinofilik infiltrasyon ile karakterize edilen EGE, ilk olarak 1937'de Kaijser tarafından tanımlanmıştır [36,37].

Eozinofilik özofajit, çocuklarda ve yetişkinlerde görülen, kronik, immün/alerji aracılı, özofagus fonsiyon bozukluğu ve ezinofil ağırlıklı enflamasyon ile ilişkili bir yemek borusu hastalığıdır [38]. Hijyen koşulları, mikrobiyal disbiyoz, modern batı yaşam tarzı, gibi faktörler hastalığa neden olabilir. Ayrıca gastroözofageal reflü hastalığında özofagus mukozal bütünlük bozulduğu için besin antijenlerinin mukozaya girişi mümkün olmakta ve bu besin antijenleri EoE'yi tetiklediği için hastalıkta artış görülmektedir [39]. Hastalığın patogenezi tam olarak anlaşılamamıştır fakat T hücre yanıtı, besin ve aeroallerjenler ile ilişki olduğu düşünülmektedir [40]. Pediatrik bir kohortta yapılan genom çapında ilişkilendirme çalışmasına (GWAS) göre EoE'nin kromozom 5q22 üzerindeki timik stromal lenfopoietin (TSLP)'in bulunduğu bir bölge ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [41].

2.3. Besin Alerjisi Epidemiyolojisi

Besin alerjisi sıklığı yıllar içinde değişmiş olabilir. Yapılan birçok çalışma, son 10-20 yıldır besin alerjisi sıklığının giderek arttığı yönündedir [42]. Çocuklarda besin alerjisi sıklığı yetişkinlerden daha yüksektir ve en yüksek sıklık 3 ay - 2 yaş aralığındadır [19]. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yapılan bir elektronik ev anketi sonuçlarına göre, çocukların % 8'inin besin alerjisine sahip olduğu belirtilmiştir. Ayrıca çocukların % 2,4'nün birden fazla besine alerjisi vardır ve çocukların % 3'ünde anafilaktik reaksiyonlar görülmüştür [43]. ABD'deki genel popülasyondaki anafilaksi sıklığının en az % 1,6 olduğu tahmin edilmektedir [44]. Dünya geneline bakıldığında, Avustralya, IgE aracılı besin alerjisinde en yüksek sıklığa sahiptir (% 10). Avrupa ve ABD gibi diğer gelişmiş bölgelerdeki sıklığının % 1-5 olduğu tahmin edilmektedir [45].

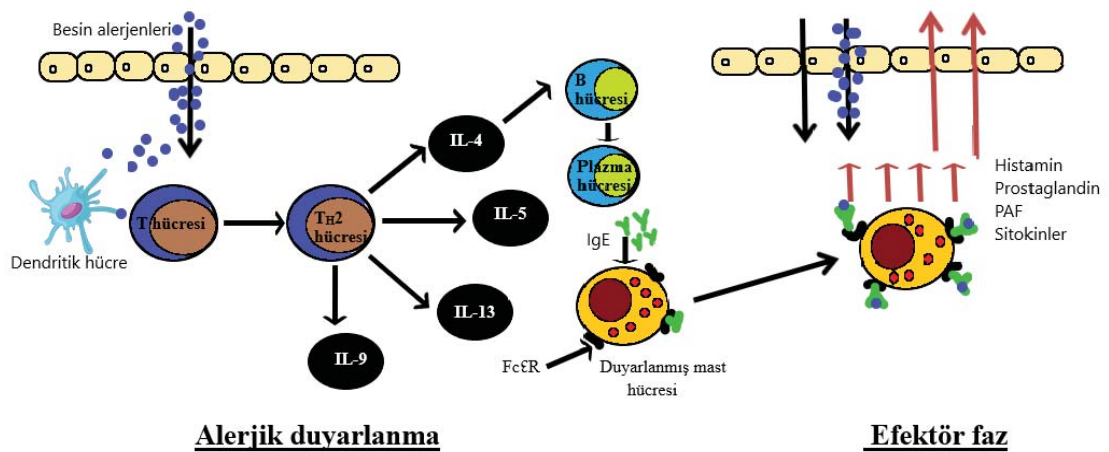
Avrupa'da yaygın besinlere karşı yaşam boyu bildirilen alerji sıklığı % 0,1- 6 aralığında bulunmuştur [46]. Kapsamlı besin alerjisi fenotiplemesine sahip ileriye dönük bir kohort çalışması olan Avustralya'daki HealthNuts araştırmasına göre, besin alerjisi sıklığı bir yaşındakiler için % 11 iken, 4 yaşında bu sıklık % 3,8'e düşmüştür. Bu kohortun yüzde 40 ila yüzde 50'sinde yaşamlarının ilk 4 yılında alerjik bir hastalığın semptomları görülmüştür [47]. 934 makaleden 51'i uygun görülerek yapılan bir metanaliz çalışmasında, kendi kendine bildirilen besin alerjisi sıklığı süt için % 1,2-17, yumurta için % 0,2-% 7, yer fıstığı ve balık için % 0-% 2, kabuklu deniz ürünleri için % 0-10 ve herhangi bir besin için %3-35 arasında bulunmuştur [48]. Kanada'da kişilerin beyanına dayanan bir besin alerjisi araştırmasına göre, çocuklarda (1-17 yaş) besin alerjisi sıklığı yaklaşık % 6,9 iken, yetişkinlerde (18+ yıl) ise sıklık yaklaşık % 7,7 bulunmuştur [49]. Birleşik Krallık'ta 3 yaşındaki 969 çocuk üzerinde yapılan bir çalışmaya göre, yumurta (% 1,4), susam (% 1,4), buğday (% 1,3), süt (% 0,5), morina (% 0,5), yer fıstığı (% 0,2) alerjiye neden olan besinler olarak bulunmuştur [50]. Bir başka çalışmada ise besin alerjisine neden olan besinler arasında yumurta, çilek, yabani çilek, çikolata ve portakal vardır [51]. Meksika'da 1253 genç yetişkinin katıldığı anket temeli bir çalışmaya göre olası besin alerjisi sıklığı % 5,9 bulunmuştur [52]. Brezilya'da yapılan bir çalışmaya göre, bebeklerde ve okul öncesi çocuklarda ebeveyn tarafından bildirilen besin alerjisi sıklığı sırasıyla, % 23,5 ve % 17,6 bulunurken, doktor tarafından onaylanan besin alerjisi sıklığı ise % 1,9 ve % 0,4 bulunmuştur [53]. Kore'de yapılan bir çalışmada, bebeklerde besin alerjisi sıklığı % 5,3 olarak bulunmuştur. 6-12 yaş arası çocuklar için % 4,7 iken 12-15 yaş arası çocuklar için % 5,1 bulunmuştur [54]. Japonya'daki büyük ölçekli bir epidemiyolojik araştırmaya göre, besin alerjisinin tahmini sıklığı bebeklerde % 5-10, küçük çocuklarda % 5 ve okul çağındaki çocuklarda % 4,5 bulunmuştur [55]. Çin'in Chongqing kentinde yapılan besin provokasyon testi ile kanıtlanmış bir çalışmada 0-1 yaş arası çocuklarda besin alerjisi sıklığı % 3,8 olduğu bulunmuştur. Bu çocuklarda yumurta alerjisi sıklığı % 2,5 bulunurken, inek sütü alerjisi sıklığı % 1,3 bulunmuştur [56]. Türkiye'nin Doğu Karadeniz bölgesinden alınan 6-9 yaş arası çocuklarda besin alerjisi sıklığı % 0,8 saptanmıştır. Bu bölgede en çok alerjiye sebep olan besin sığır eti (% 31,8) olduğu görülmüştür [57]. Ülkemizde yapılan bir diğer çalışmaya göre, yumurta (% 57,8), inek sütü (% 55,9), fındık (% 21,9), yer fıstığı (% 11,7), ceviz (% 7,6), mercimek (% 7,0), buğday (% 5,7) ve sığır eti (% 5,7) çocuklarda görülen en yaygın besin alerjilerindendir. Bir yaş altı çocuklarda en çok alerjiye neden olan besinler, yumurta ve süt iken, bir yaş üstü çocuklarda daha çok alerjiye neden olan

besinlerin fındık ve yer fıstığı olduğu görülmüştür [58]. Van'da 79 hastanın katıldığı bir çalışmada besin alerjisine neden olan besinlerin başında süt ve daha sonra yumurta ve kuruyemişlerin takip ettiği bulunmuştur [59]. Samsun'da bir kreş ve anaokulunda yapılan çalışmaya göre, çocuklarında besin alerjisi sıklığı % 7,7 olarak saptanmıştır ve en sık besin alerjisine neden olduğu bildirilen besinler % 25,3 oranında yumurta ve % 21,2 oranında çikolata olduğu bildirilmiştir [60]. 2008 yılında İstanbul'da yetişkinlerde yapılan besin alerjisi çalışmasına göre kişi tarafından bildirilen besin alerjisi ve alerjik olmayan besin aşırı duyarlılığı yaşam boyu sıklığı % 9,5 bulunurken, çift kör plasebo kontrollü besin yükleme testi ile belirlenen besin alerjisi sıklığı % 0,1 bulunmuştur [61]. Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi'nde doğan ve 1 yaşına kadar dört kez rutin muayene ile takip edilen 1.377 bebekten 90 bebekte (% 6,5) yaşamın birinci yılında muhtemel besin alerjisi varlığı gösterilmiştir. Şüpheli besinlerle besin yükleme testi yapılan bebeklerin sadece % 2,4'ünün besin alerjisine sahip olduğu doğrulanmış ve besin alerjisine neden olan ana besinin inek sütü olduğu bulunmuştur [62]. ISAAC (Uluslararası Çocukluk Çağı Astım ve Alerji Çalışma Grubu) Faz II Çalışması tarafından toplanan 6963 ilkokul çocuğu (10 - 11 yaş) üzerinde yapılan bir çalışmada, ebeveynler tarafından bildirilen tahmini besin alerjisi sıklığı % 20,22 $\pm$ 0,94 olarak bulunmuştur. Deri prick testi ile tespit edilen tahmini yaygın besin alerjenlerine duyarlılık sıklığı ise % 5,9 $\pm$ 0,6 bulunmuştur [63].

2.4. Besin Alerjisi Patogenezi

Besin alerjenleri için önemli bir giriş kapısı görevi gören gastrointestinal sistem (GİS), iç steril ortamı dış dünyadan ayıran tek hücreli bir kolumnar bağırsak epitel hücresi katmanından oluşur. Günlük olarak sürekli eksojen antijen barajına maruz kalan gastrointestinal sistem, vücuttaki en büyük immünolojik organdır [64]. Bu sistemin amacı, sadece sindirilen yiyecekleri emilebilen ve enerji ve büyüme için kullanılabilen bir forma dönüştürmek değil, aynı zamanda sürekli olarak alınan yabancı zararlı patojenlerin vücuda girmesini önlemektir [1]. Vücudumuz günlük yaklaşık 130–190 g besin proteini alır ve alınan önemli miktarlarda bozulmamış besin proteini, yemekten sonra bağırsak tarafından emilir [65]. Besin proteinleri pH, safra tuzları ve enzimlere karşı dirençlidir. [66]. Yapılan bir çalışmaya göre, *in vitro* mide ve duodenal sindirim simülasyonuna tabi tutulduğunda bile kajunun ana alerjenleri ortadan kaldırılamamıştır

[67]. Besin proteinlerin küçük bir kısmı tam sindirimden kaçabilir ve immünolojik olarak bozulmamış formlarda kana geçebilir. Bunun sonucunda oral tolerans etkin olur [68]. Besin alımı ya da maruziyeti sonucu oluşan aktif sistemik tepkisizlik durumuna oral tolerans denir [69]. Oral tolerans, üç mekanizma ile ortaya çıkar: Antijene özgü lenfositlerin delesyonu veya anerjisi veya T düzenleyici hücrelerin oluşumunun indüksiyonudur [70]. Bir oral tolerans indüksiyonun başarısı, potansiyel alerjenlere enterik maruziyetin dozuna ve zamanlamasına, bağışıklığı düzenleyen mikrobiyal bileşenlere ve diyet faktörlerine (A vitamini ve lipidler gibi) bağlı olarak değişir [71]. Tolerans ve bağışıklık arasında bir denge vardır. Bu karmaşık denge, bağırsaktaki çeşitli faktörler tarafından değiştirilebilir ve besin proteinlerine karşı, oral toleransta bozulmalar ve uygunsuz alerjik duyarlılıklara yol açabilir [72]. Besin alerjenleri dendritik hücreler veya diğer antijen sunan hücreler (ASH'ler) tarafından işlenir ve sunulur. Naiv CD4 (farklılaşma kümesi 4) T hücreleri, Th2 hücrelerine farklılaşır ve IL-4, IL-5, IL-13 ve IL9 gibi tip-2 sitokinleri üretir. Bu tip-2 sitokinler, B hücrelerinin IgE üreten plazma hücrelerine farklılaşmasını teşvik eder. Plazma hücreleri tarafından üretilen besine özgü IgE sistemik olarak dağıtılır ve mast hücreleri üzerindeki FcεRI'ye bağlanır (duyarlanma fazı). Duyarlanma sonrası besin alerjenlerine yeniden maruz kalınması (efektör fazı) allerjenin mast hücreleri üzerinde FcεRI 'ye bağlanmış olan alerjene özgü IgE'ye çapraz bağlanması sonucunda mast hücrelerinin degranülasyonunu ve çeşitli aracılardan salınmasını indükler [73].



Şekil 2.2. Besin alerjisinde duyarlanma fazı [73]

2.5. Besin Alerjisi Gelişmesindeki Olası Risk Faktörleri

Besin alerjisi multifaktöriyel bir hastalıktır. Besin alerjisine neden olabilecek faktörler arasında coğrafya, yaşamın erken döneminde yeni alerjenik ürünlere maruz kalma, genetik faktörler ve tanımlanamayan faktörler gibi nedenlerin olduğu bildirilmiştir. Bu faktörler tek başına ya da kombinasyon halinde besin alerjilerine neden olabilirler [58]. Besin alerjisi için olası risk faktörleri aşağıdaki çizelgede özetlenmiştir [74–76].

Çizelge 2.1. Besin alerjisi risk faktörleri [74–76]

Kişisel Risk Faktörleri
Aile öyküsü
Genetik polimorfizmler
Filaggrin işlev kaybı mutasyonları
Yaş
Cinsiyet
İrk/ Etnik Köken
Çevresel Risk Faktörleri
Doğum öncesi
Hamilelik sırasında anne diyeti
Doğum sonrası
Sezaryen doğum
Emzirme döneminde anne diyeti
Bebek diyeti (emzirme, mamalar, katı yiyecekler)
Multivitamin takviyesi
Sigara dumanına maruz kalma
Diğer çevresel faktörler
Coğrafya
Hijyen hipotezi

2.5.1. Kişisel Faktörler

Besin alerjisine güçlü bir genetik katkı vardır. Yapılan bir çalışmaya göre ailede alerji öyküsü olmayan çocuklara kıyasla, herhangi bir alerjik hastalığı olan bir yakın aile üyesi olan hastalarda besin alerjisi riskinin 1,4 kat artırdığı görülmüştür. Herhangi bir alerjik hastalığı olan iki veya daha fazla yakın aile üyesi olan hastalarda ise besin alerjisi riski 1,8 kat artmıştır [77]. Birleşik Krallık'ta yapılan bir çalışmaya göre bir çocuğun yer fıstığı alerjisi olan ebeveyni veya bir kardeşi varsa, yer fıstığı alerjisi riskinde 7 kat artış görülmüştür [78]. Amerika'da yapılan bir çalışmaya göre Hispanik olmayan siyah çocuklarda, Hispanik çocuklara göre besin alerjisi seviyelerinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. Başka bir çalışmaya göre İspanyol olmayan siyahların beyazlara göre, besin alerjisi riskinin daha fazla olduğu görülmüştür. Yapılan araştırmalara göre erkek çocuklarda besin alerjisi sıklığının kız çocuklara kıyasla daha yüksek olduğu bulunmuştur [76]. Besin alerjisi ile ilişkili yapılan genetik çalışmalar sonucunda pek çok aday gen bulunmuştur. 2002 yılında yapılan bir çalışmada, sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 6 (STAT 6) polimorfizmi ile kuruyemiş alerjileri arasında bir ilişki olduğu bulunmuştur [79]. Son zamanlarda, Japon popülasyonunda IL-10 geninde yer alan bir polimorfizm besin alerjisi ile ilişkilendirilmiştir [80]. 58 ikizın yer aldığı küçük bir çalışmaya göre, tek yumurta ikizleri arasında fıstık alerjisinin uyum oranının (% 64,3), dizigotik ikizlerdekine kıyasla (% 6,8) anlamlı derecede daha yüksek olduğu ve fıstık alerjisinin tahmini kalıtsallığının % 81,6 olduğu bulunmuştur [81]. HLA-DRB1*07 (insan lökosit antijeni- sınıf II DR beta 1*07) alleli için elma alerjisi ile önemli ilişki bildirilmiştir [82].

HLA genlerine ek olarak, filaggrin mutasyonları fıstık alerjisi veya fıstık duyarlılığı riski ile ilişkilidir. Filaggrin, cildin bariyer fonksiyonuna katkıda bulunan bir proteindir. Filaggrin mutasyonları egzama riskine katkıda bulunur, ancak bağımsız olarak fıstık alerjisi riskini artırır. Deri ifadesine ek olarak, filaggrin oral mukozada ifade edilir ve yemek borusunda da filaggrinin ifade edildiği ile ilgili birçok veri vardır. Bu veriler filaggrin mutasyonların oral maruziyette duyarlılığa potansiyel olarak katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir [83,84].

CD14 promotöründeki C-159T polimorfizminin, özellikle beyaz ırkta atopik olmayan astım ve besin alerjisi ile ilişkili olduğu bulunurken, başka bir çalışmada ise CD14 promotöründeki iki polimorfizm (C-159T ve C-550T) ile besin alerjisi arasında hiçbir

ilişki bulunmadığı bildirmiştir [85,86]. Yaşları 1 olan ve tanı kriterlerini karşılayan 4453 bebeğin katıldığı bir çalışmada, egzamalı bebeklerin, egzamasız bebeklere göre 12 aya kadar yumurta alerjisi olma olasılığının altı kat, yer fıstığı alerjisi olma olasılığının ise 11 kat daha fazla olduğu görülmüştür [87].

Timusta eksprese edilebilen SPINK5 (Serin Peptidaz İnhibitörü Kazal Tip 5) geninin eksikliğinin T lenfositlerinin anormal olgunlaşmasına neden olduğu ve yüksek IgE seviyesi ve eozinofili gibi Th2 yanıtlarına yol açtığı öne sürülmüştür [78]. 2017 yılında Asley ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, SPINK5 geni ile besin alerjisi arasında bir ilişki bulunmuştur. Ciltteki SPINK5 geni ifadesi azaldıkça besin alerji riski artmaktadır [88].

FOXP3 (Önçatal kutusu P3) T düzenleyici hücrelerin gelişimi ve işlevinde önemli roller oynar. IPEX (X'e bağlı immün disregülasyon, poliendokrinopati, enteropati) sendromu olan hastalarda, FOXP3 geninde 1388-baz çifti kopması (g.del-6247_-4859) sonucu mRNA (mesajcı RNA) splayında bozulmalar olur. Bunun sonucunda FOXP3 mRNA seviyelerinde düşüş ve etkilenen hastaların periferik kan lenfositlerinde protein ifadelerinde belirgin şekilde azalış gözlenir. CD4+CD25+FOXP3+ regülatör T hücrelerinde azalış olduğu için CD4+CD25+ T hücrelerinin fonksiyonu azalmaktadır. Ayrıca bu çalışma sonucunda bu gen varyantının ciddi besin alerjisine neden olabileceğini gözlemlemiştir [89].

Son zamanlarda alerjik hastalıkların sıklığında gözlenen artış gen-çevre etkileşimleri sonucu oluşan epigenetik değişikliklerin patogeneizde rolü olabileceğini düşündürmüştür. Epigenetik modifikasyonlara artan ilgi, besin alerjisi patogenezinde kalıtsal gen-çevre etkileşimlerinin rolünü açığa çıkarabilir. Örneğin, bir çalışmada, IFN- γ (İnterferon-gama) promotöründeki -53 CpG (Sitozin fosfo Guanin) sahasındaki metilasyonun, cAMP yanıt elemanı bağlama proteinini (CREB) inhibe ettiği ve IFN- γ transkripsiyonunu baskıladığı ve bu baskılanmanın Th2 polarizasyonu ile ilişkili olduğu göstermiştir. Hayvan modelinin kullanıldığı bir çalışma, solunum yolu ile çevresel maruziyetlerin, IL-4 ve IFN- γ promotor bölgelerinin metilasyonunu değiştirdiğini ve bu değişikliğin IgE seviyelerindeki değişikliklerle önemli ölçüde ilişkili olduğunu göstermiştir [90,91]. Ek olarak Su ve arkadaşları endojen histon deasetilaz aktivitesinin inhibisyonunun Th1:Th2 oranlarını 3 kattan 8 katına kaydırıldığını bulmuşlardır [78].

2.5.2. Çevresel Faktörler

Kişisel faktörlerin yanı sıra besin alerjisini etkileyen birçok çevresel faktör mevcuttur. Besin alerjisi yaygınlığı coğrafi bölgeler arasında değişiklik gösterir. Örneğin kuş yuvası çorbası alerjisini Singapur'da yaygın iken, İsrail'de susama karşı alerji yaygındır [76]. Ülkemizde ise genel olarak yumurta ve inek sütü alerjisinin sıklığı yüksektir [58].

Geniş bir nüfus veri tabanı kullanılarak yapılan bir çalışmada vajinal yolla doğum yapanlara kıyasla elektif veya acil sezaryenle doğan çocuklarda besin alerjisi riskinin arttığı bulunmuştur. Bu çalışmada ayrıca çok erken doğan çocukların besin alerjisi riskinin daha düşük olduğu bulunmuştur [92]. Eggesbo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre sezaryen ile doğumun yeni doğan bağırsağının gecikmiş veya anormal kolonizasyonuna sebep olması nedeniyle besin alerjisi gelişme riskini artırabileceği belirtilmiştir [93].

Emzirme döneminde annenin diyetinin de besin alerjisi gelişme riskini arttırdığı bilinmektedir. İnek sütü ve yumurta gibi besin proteinlerinin anne dolaşımından anne sütüne geçtiğini gösteren birçok çalışma vardır. Başka bir çalışmaya göre emzirmenin ilk üç ayında belirli besinlerden uzak duran annelerin bebeklerinde o besine karşı duyarlılığın azaldığı görülmüştür [74]. Bebek Besleme Uygulamaları Çalışması II'nin [The Infant Feeding Practices Study II, (IFBS II)] analizi ve 6 yıllık takipleri sonucu, ilk 3 ayda karma besleme modunun (memede doğrudan besleme, pompalama ile besleme ve mama ile besleme) erken dönem çocuklukta besin alerjisi semptomları için artan bir risk oluşturduğunu göstermiştir. Ayrıca bu çalışma annenin doğum öncesi sigara içmesinin, bu annelerin çocuklarına doktor tarafından besin alerjisi teşhisi koyulması riskini artırdığını göstermiştir [94]. Bazı bebeklerde anne sütü alerjiye sebep olabilmektedir, bundan dolayı bebeğin mama ile beslenmesi tavsiye edilebilir [95]. Uzun süre emzirmenin de besin alerjisini artırabildiği bildirilmiştir [96].

Hijyen hipotezinde, enfeksiyon ajanlarına, bağırsak florasına ve parazitlere erken çocukluk döneminde maruziyetin azalmasının, immünoregülatör mekanizmaları bozduğu ve alerjiye yatkınlığın arttığı öne sürülmektedir [97,98]. Koplin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre, büyük kardeşlerin olması ve evde köpek olması yumurta alerjisi riskini azaltmaktadır [99].

Sonbahar veya kış aylarında doğanlarda besin alerjisi daha yaygındır ve bunun D vitamini ile ilişkisi olabileceği düşünülmektedir [100]. Besin alerjisi ile D vitamini arasındaki ilişki konusunda çelişkili çalışmalar vardır. D vitamini yetersizliği, artan besin alerjisi riski ile ilişkilendirilmiştir. D vitamini aşırı alınması alerjik duyarlılaşma riskinin artmasıyla da ilişkilendirilmiştir [75]. Hamilelik sırasında annenin folik asit (bir metil donör) alımının atopi, astım veya besin alerjisi riskini etkilemediği bildirilmiştir [101].

2.6. Klinik Bulgular

Besin alerjisi klinik bulguları çeşitli organlarda ortaya çıkabilmektedir. Bu bulgular kaşıntı gibi hafif bulgular ya da anafilaksi gibi ciddi bulgular da olabilir. Çizelge 2.2'de gösterildiği gibi besin alerjisi semptomları çeşitli organlarda görülebilir [55].

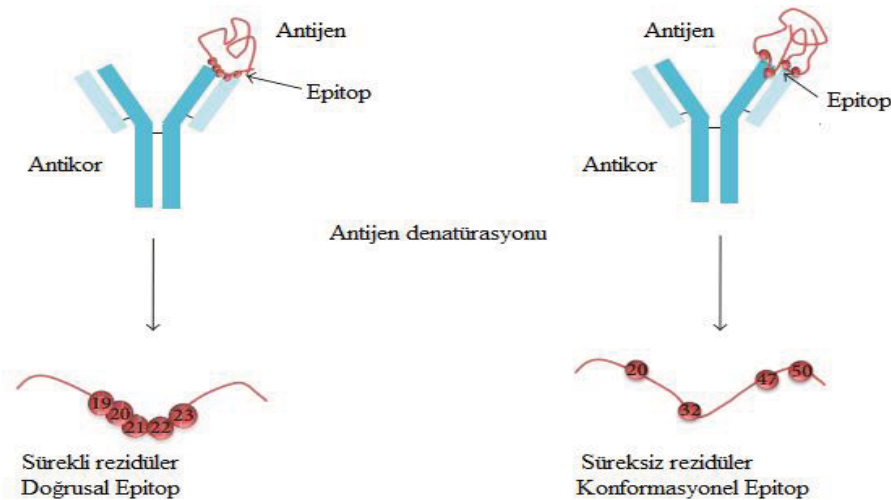
Çizelge 2.2. Besin alerjisinde klinik bulgular [55]

Organ	Semptomlar
Cilt	Eritem, ürtiker, anjioödem, kaşıntı, yanma hissi, egzama
Mukoza Zarı	Konjonktival hiperemi ve ödem, kaşıntı, lakrimasyon, blefarödem, burun akıntısı, burun tıkanıklığı, hapşıрма, ağız boşluğu/ yutak/ dudak/ dilde rahatsızlık/ şişme
Solunum Organları	Laringofarenkste rahatsızlık/ kaşıntı/ sıkılık, ses kısıklığı, yutma güçlüğü, öksürük, hırıltı, göğüste sıkışma hissi,
Sindirim Organları	Bulantı, kusma, karın ağrısı, ishal,
Sinir	Baş ağrısı, huzursuzluk, güçsüzlük, zayıf bilinç, inkontinans
Dolaşım Organları	Kan basıncında azalma, taşikardi, bradikardi, aritmi, uzuvların soğukluğu,

2.7. Besin Alerjenleri

Ani tip hipersensitiviteyi tetikleyen antijenler alerjen olarak adlandırılır. Alerjenlerin çoğu çevresel proteinler (polenler, ev tozu akarları, besinler, hayvan tüyleri) ve proteinleri modifiye edebilecek kimyasallardır (penisilin) [102]. Alerjenlere, kaynaklandıkları türün Latince ismine göre bir isim verilir. Cinsin ilk üç harfi ile başlar, onu türün ilk harfi takip eder ve Arap rakamıyla biter. Örneğin *Arachis hypogaea* (yer fıstığı) kaynaklı bir alerjenin önünde Ara h ve ardından büyük ölçüde alerjenlerin tanımlanma sırasına göre belirlenen bir sayı gelir [103].

Alerjenler ısıya, aside ve proteazlara karşı stabildir. Vücut sıvılarında çözünürler [102]. Bir antijenin alerjik reaksiyonları tetikleme yeteneği, kimyasal yapısına bağlı olabilir. Bir alerjenin yüzeyinde bulunan, antikora veya T hücresi reseptörleri gibi antijen reseptörlerine spesifik olarak bağlanabilen ve alerjik belirleyici olarak bilinen özel kimyasal gruba epitop adı verilir. Epitoplar genellikle 8-26 aminoasit uzunluğundadır [104]. Doğrusal ve konformasyonel epitop olarak ikiye ayrılır (Şekil 2.3) [105]. Doğrusal epitop, kesintisiz birbirini takip eden amino asit dizilerinden oluşurken, konformasyonel epitop, uzamsal olarak bitişik, kesintili, birbirini takip etmeyen amino asit kalıntılarından oluşur [106]. Konformasyonel epitoplar, IgE'ye bağlanması için alerjenin ikincil veya üçüncül yapısını gerektirirken, buna karşılık, doğrusal epitopların IgE ile bağlanması için alerjenin yalnızca birincil amino asit dizisi yeterlidir [107].



Şekil 2.3. Doğrusal ve konformasyonel epitoplar [105]

Besin alerjenleri ikiye ayrılır. Gastrointestinal sistem yoluyla duyarlılığa neden olan sınıf 1 besin alerjenleri (örn. süt, yumurta veya yer fıstığı) ısıya, enzime ve düşük pH'a dayanıklı suda çözünebilen oral alerjenlerdir. Sınıf 1 besin alerjenleri doğrusal epitoplara sahiptir. Sütte kazein, yer fıstığındaki visilinler, yumurtadaki ovomukoid, elmada Mal d 3 ve mısırdaki Zea m 14 sınıf 1 alerjenlere örnektir. Genellikle bitki kökenli proteinler olan sınıf 2 besin alerjenleri, solunum yoluyla duyarlılığa neden olan aeroallerjenlerdir. Sınıf 2 besin alerjenleri ise, konformasyonel epitoplara sahiptir [108]. Bu alerjenler ısıya dayanıksız ve sindirime elverişlidir. Huş ağacı poleni Bet v 1 sınıf 2 alerjen örneğidir [54,68]. Besin protein ailelerin konformasyonları değişiklik gösterebilir ve bu değişimler alerjeniteye ya da immünojeniteye katkıda bulunabilir. Örneğin, Th2 aktivasyonunda ve dendritik hücre olgunlaşmasında, yer fıstığı visilinin karbonhidrat kısmı önemli rol oynar.

Glikoprotein yapıları alerjenler düşük ila orta moleküler ağırlıktadır [5 ila 70 kilodalton (kDa)]. Bademin ana alerjeni olan amandin (~427 kDa), karbonhidrat içermez. Tekrarlayan peptit birimleri içerebilen tropomiyosinler, IgE epitop valansını artırarak immünojeniteyi artırabilir. Lipit transfer proteinleri (LTP'ler), Thaumatin benzeri proteinler (TLP'ler), 2S albüminler ve α -amilaz / tripsin inhibitörleri, disülfür bağları açısından zengin olduklarından dolayı alerjeniteye katkıda bulunabilir. Çünkü disülfür bağları alerjenik proteinleri ısı ile denatürasyona ve enzim bozunmasına karşı stabilize edebilmektedir. Besin alerjenlerine metallerin (örn. Parvalbüminler, kazeinler), lipitlerin (örn. Laktoglobülin, LTP) ve steroidlerin (örn. Bet v 1 ile ilişkili besin proteinleri) bağlanması, onların yapısını stabilize eder [109]. Besinlerin ısıtılması, hidroliz edilmesi, fermente edilmesi alerjeniteyi azaltabilir veya artırabilir [110]. Yüksek sıcaklık, GİS sindirimi kolaylaştırdığı için yumurta ovalbumin ve ovomukoidin alerjenitesini azaltabilir [111]. Isıtmak, proteolize dirençli agregat oluşumu nedeniyle, yer fıstığı vicilin alerjenitesini artırabilir [112]. Yer fıstığının kavrulması proteinlerin IgE bağlama kapasitesini artırırken, kaynatma, yer fıstığı proteinlerinin *in vitro* IgE bağlama kapasitesini azaltır. Mide sıvısı ile stimülasyon ya da Lactobacilli ile fermente edilmesinin süt ve süt alerjenlerinin (α -laktalbümin, β -laktoglobülin, α -kazein ve β -kazein gibi) alerjenitesini güçlü bir şekilde azalttığı görülmüştür [110]. Yaygın hayvan ve bitki kökenli alerjenik protein ailelerinin özellikleri ve bulundukları besinler Çizelge 2.3 ve 2.4' te özetlenmiştir [113,114].

Çizelge 2.3. Yaygın hayvan kökenli alerjenik protein ailelerinin özellikleri ve bulundukları besinler [113,114]

Köken	Protein Ailesi	Özellikleri	Bulundukları Besinler
Hayvan	Tropomiyozinler	Aktin bağlayıcı proteinler Düşük pH ve ısıl işleme karşı dayanıklılık Çapraz reaktiviteden sorumlu	Kabuklu deniz ürünleri (Crustacea ve Mollusca)
Hayvan/Bitki	EF hand ailesi Parvalbüminler	Kalsiyum bağlayıcı proteinler Balık kaynaklı alerjenler Düşük pH ve ısıl işleme karşı dayanıklı	Birçok balık türünün beyaz kasında, Istakoz
Hayvan	Kazeinler	Fosforile proteinler Isıl işleme karşı dayanıklı	Süt
Hayvan	Lipokalin	Kararlı proteinler Taşıyıcı moleküller	Hamam böceği, süt
Hayvan	Serum Albümin	pH ve ısıya dayanıksız	Süt, et

Çizelge 2.4. Yaygın bitki kökenli alerjenik protein ailelerinin özellikleri ve bulundukları besinler [113,114]

Köken	Protein Ailesi	Özellikleri	Bulundukları Besinler
Bitki	Prolamin süper ailesi	Proteoliz ve ısıl işleme karşı dayanıklı Düşük moleküler ağırlıklı	Meyveler, kuruyemişler, tohumlar
Bitki	Profilinler	Aktin bağlayıcı protein pH ve ısıya dayanıksız Çapraz reaktiviteden sorumlu	Kuruyemişler, yer fıstığı, soya fasulyesi

Bitki	Kupin süper ailesi	Bitki büyümesi için besin maddelerinin depolanması	Baklagiller, kuru yemişler ve tohumlar
Bitki	Bet v 1 benzeri proteinler	Çapraz reaktiviteden sorumlu Lipit bağlama aktivitesi	Huş ağacı poleni
Bitki	PR-10 (Patogenez-ilişkili) proteinler	Bet v 1 benzeri proteinler pH ve ısıya dayanıksız	Ağaç kuru yemişleri ve yer fıstığı
Bitki	Oleozinler	Bazı lipitlerin yapısal proteinleri Lipitlerin biyosentezine ve mobilizasyonuna yardımcı olabilme	Susam, yer fıstığı, fındık, susam
Bitki	Sınıf I kitinazlar	Bitkileri zararlılara ve patojenlere karşı koruma Böceklerin dış iskeletinin ve birçok patojenik mantarın hücre duvarlarının bileşeni olan kitini degrade etme	Lateks, muz, avokado, kestane, üzüm, mısır
Bitki	Hevein-benzeri domain	Kitine bağlanma Bitki immün sisteminde rol oynama	Lateks, muz, avokado
Bitk	Thaumatococcus-benzeri proteinler	Kararlı proteinler grubu Çapraz reaktiviteden sorumlu	Elma, kiraz, üzüm, kivi, şeftali, selvi, zeytin, muz
Bitki	Defensinler	Sistein açısından zengin, küçük ve oldukça kararlı protein grupları Bitki patojenlerine karşı savunma	Yer fıstığı

2.7.1. Süt Alerjenleri

Bir bebeğin diyetine giren ilk besinlerden biri olan inek sütü, önemli bir alerjenik besindir. Bundan dolayı erken çocukluk döneminde besin alerjisinin oluşumunun ilk ve en yaygın nedenlerinden biridir [115]. İnek sütü alerjisi, bebeklerde en yaygın besin alerjisi türüdür [116]. İnek sütü alımından sonra inek sütü antijenlerine karşı oluşan IgE'lerin mast hücreleri uyarımı sonucu salınan mediyatörler nedeniyle oluşur [117]. İnek sütü ile anne sütü arasındaki protein bileşimindeki farklılıklar (inek sütünün protein içeriği anne sütünün protein içeriğine göre daha yüksek olması), bebeklerde inek sütü alerjisine neden olabilir. [118]. Ayrıca anne sütü serum proteinleri bakımından daha zengindir. Anne sütü bebek midesinde daha yumuşak bir pıhtı oluştururken, yüksek kazein içeriğine sahip inek sütü ise bebeğin midesinde hazımsızlığa ve alerjiye neden olabilecek sert bir pıhtı oluşturmaktadır. [119]. Anne sütündeki immünolojik materyallerin içeriğinin inek sütünden daha zengin olması bebeklere daha güçlü bağışıklık fonksiyonları sağlar ve süt alerjisine sahip olma riskini azaltabilir [118].

Majör inek sütü alerjenlerinden kazein, inek sütü proteinlerinin % 80'ini oluşturur. % 20'sini ise whey proteinleri oluşturur. Kazein fraksiyonlarını, α S1-kazein (Bos d 9), α S2-kazein (Bos d 10), β -kazein (Bos d 11) ve κ -kazein (Bos d 12) oluşturur. Whey fraksiyonlarını ise, β -laktoglobülinler (β -LG, Bos d 5), α -laktalbümin (α -LA, Bos d 4) ile düşük miktarlarda bulunan sığır serum albümini (Bos d 6), demir bağlayıcı protein laktoferrin ve immünoglobulinler (Ig, Bos d 7) oluşturur [120].

Molekül ağırlığı 18,3 kDa olup 162 aminoasitten meydana gelen β -LG, sütte majör alerjen olarak sınıflandırılan bir proteindir [120]. Lipokalin protein ailesinin bir üyesidir [115]. β -LG'in asit hidrolizine, proteaz aktivitelere ve ısı işlemlere karşı nispi bir dirence sahip olması, sindirimden sonra bazı yapısal bütünlüğün korunmasını ve bağırsak mukozasından emilmesini sağlar. Bu özellikler alerjik reaksiyonlara neden olabilir [120].

α -LA (14 kDa, 123 aminoasit uzunluğunda), lizozim ailesinin bir üyesi, kalsiyum bağlayıcı, globüler bir proteindir. Yapısında 4 disülfid köprüsü bulundurması nedeniyle α -laktalbümin yüksek termal stabilite gösterir. Kalsiyuma karşı yüksek afinite gösteren bağları nedeniyle ise yeniden katlama kapasitesi gösterir. Galaktosiltransferaz sisteminde laktozu sentezlemede önemli bir role sahiptir [115].

66.3 kDa ağırlığında, 582 amino asit ve 17 disülfid bağı içeren sığır serum albümini, taşınma, metabolizma, ligandların dağılımı ve kanın ozmotik basıncında ve serbest radikallerin önlenmesinde önemli rol oynar [121].

Laktoferrin (80 kDa, 703 aminoasit uzunluğunda), transferrin ailesine ait demir bağlayıcı bir glikoproteindir. Sadece serbest radikalleri temizleyici ve antioksidan işlevi görmez, aynı zamanda antimikrobiyal özelliklere sahiptir ve enfeksiyonlara karşı savunmada önemli bir rol oynar [115].

Whey fraksiyonlarından biri olan immünoglobülinler daha düşük miktarlarda bulunur ve süt alerjilerini tetiklemede önemli bir role sahiptir [120].

Çizelge 2.5. Süt bileşenleri ve protein ailesi [115]

	Bileşen	Protein
Whey (% 20)	Bos d 4	α -Laktalbümin
	Bos d 5	β -Laktalbümin
	Bos d 6	Sığır serum albümin
	Bos d 7	İmmünoglobulinler
		Laktoferrin
Kazein (% 80)	Bos d 9	α S1-kazein
	Bos d 10	α S2-kazein
	Bos d 11	β -kazein
	Bos d 12	κ -kazein

2.7.2. Kuruyemiş Alerjenleri

Yer fıstığı ve ağaç kuruyemişleri, yaşamı tehdit eden besin alerjik reaksiyonlarına neden olabilen, güçlü, yaygın alerjen kaynaklarıdır [122]. Yer fıstığının ağaç kuruyemişleri ailesinin bir üyesi olduğu düşüncenin aksine, yer fıstığı baklagiller ailesinin bir üyesidir [123]. Ceviz, badem, Antep fıstığı, kaju, pekan cevizi, fındık, macadamia, Brezilya fıstığı ve çam fıstığı ağaç kuru yemişlerinin önemli 9 üyesidir [124]. Ağaç kuruyemişleri alerjisi sıklığı bölgeden bölgeye değişmektedir ve büyük bir halk sağlığı sorunu oluşturur. Yer fıstığı ve ağaç kuru yemişleri alerjilerinin sıklığı % 2'den daha az olduğu tahmin edilmektedir [123]. Son çalışmalarda, besin kaynaklı anafilaksiden kaynaklanan ölümlerin % 70-90'ından sorumlu olan besin alerjilerinin,

yer fıstığı ve ağaç kuruyemişleri alerjisi olduğu görülmüştür [125]. Buna ilaveten, besin kaynaklı anafilaksiden kaynaklanan ölümlerin % 18-40'ını ağaç kuruyemişleri alerjisi tek başına oluşturduğu görülmüştür [126]. Ayrıca yer fıstığı ve ağaç kuruyemişleri alerjilerinin kalıcı olabilme ihtimalini gösteren çalışmalar vardır. Hastaların sadece % 9-20'sinde yer fıstığı ve ağaç kuruyemişlerine karşı oral tolerans gelişmektedir [127].

Betulaceae familyasının bir üyesi olan fındık (*Corylus avellana*), besin değerleri ve sağlığa faydalı etkileri nedeniyle dünya çapında tüketilmektedir [122,128]. İspanyol hastalarda fındık alerjisinin neden olduğu daha şiddetli reaksiyonlar Cor a 8 ile ilişkilendirilmiştir [129]. Yapılan araştırmalar Cor a 14 ve Cor a 9 'un besin alerjisinde ağır reaksiyonlara neden olduğunu ve fındık alerjileri için iyi bir belirteç olduklarını göstermiştir [130,131]. Bu iki allerjen tohum depolama protein ailesinin üyesi olduğundan şiddetli sistemik reaksiyonlardan sorumludur [131].

Anacardiaceae ailesinin bir üyesi olan ve kaju bitkisinin (*Anacardium occidentale*) tohumu olan kajunun artan tüketimi ile alerjisi arasında doğru bir orantı vardır [122]. Anacardiaceae ailesinin üyeleri olan Antep fıstığı ve kaju benzer bir protein ifade profilini paylaşır. Ana o 3 antep fıstığı alerjileri ve kaju alerjileri teşhisinde iyi bir belirteçtir [125].

Dünya çapında ağırlıklı olarak ılıman iklimlerde yetiştirilen ceviz (*Juglans regia*) Juglandaceae familyasına aittir [132]. Yüksek çoklu doymamış yağ asitleri, fitokimyasalların yanı sıra antioksidan içerikleri nedeniyle sağlıklı, dengeli besin diyetlerinin vazgeçilmez bir besinidir. Ceviz alerjisinin yaygınlığı Avrupa'da düşük iken, ABD'de en sık bildirilen ağaç kuruyemiş alerjisidir [122]. Doğası gereği alerjenik olan Jug r 1, bir 2S albümin tohum depolama proteindir. Jug 2, bir vicilin depolama proteindir ve düşük klinik öneme sahip olduğu düşünülürken, yaygın olarak tanınan bir lipid transfer proteini (LTP) olan Jug r 3, lokal semptomlar ve sistemik reaksiyonlarla ilişkilidir [133].Yapılan bir çalışmaya göre Jug r 2'nin ceviz alerjisi olan hastalarda T hücre yanıtlarından sorumlu olduğunu göstermiştir [134]. NutCracker çalışmasına göre ceviz alerjisi olan hastaları tanımlamada Jug r 1 ve Jug r 4'ün en iyi belirteç olduğunu göstermiştir [125].

Önemli bir tarımsal ürün olan pekan cevizi (*Carya illinoensis*), en çok ABD'de yetiştirilmektedir (% 80 oranla). Car i 1, Car i 2 ve Car i 4, pekan cevizi alerjileri için

uygun belirteçlerdir [135].

Sert çekirdekli bir meyve olan badem (*Prunus dulcis*), Rosaceae ailesinin bir üyesidir. Hoş tadı ve sağlığa olan yararları nedeniyle yaygın kullanılmaktadır. Ağaç kuruyemiş alerjilerinin yaygınlığı üzerine yapılan araştırmalara göre, badem alerjisi genellikle dördüncü sırada yer almaktadır [136]. Klinik önemi yeni çalışma konusu olmasına rağmen Pru du 2, güçlü bir alerjen olarak kabul edilir. Pru du 1, hafif immün reaksiyonlarda görülür ve OAS ile ilgilidir. Bet v 1 ve diğer PR-10 alerjenler ile çapraz reaktivite göstermesi nedeniyle huş ağacı poleni alerjisi olan bazı hastalarda bildirilen ciddi alerjik reaksiyonlar vardır. Pru du 3, Rosaceae meyveleri arasında çapraz reaktiviteye neden olması nedeni ile sistemik ve yaşamı tehdit eden semptomlara neden olabilmektedir [125].

Güney Amerika'da yetişen Brezilya fıstığı, dev bir ağacın (*Bertholletia excelsa*) tohumudur. Brezilya fıstığı alerjisi sıklığı ABD ve İngiltere'de yüksektir [122]. Yapılan bir çalışmaya göre, deri prick testi (DPT) ve rekombinant Ber e 1 (rBer e 1) ile antikör testi sayesinde Brezilya fıstığı alerjisinin teşhisi için yapılan besin yükleme testine olan ihtiyacının azaltılabileceği kabul edilmiştir [137].

Baklagiller ailesinin bir üyesi olan yer fıstığı (*Arachis hypogaea*) yüksek miktarda tekli ve çoklu doymamış yağ ve lif içeren yüksek protein ve yağ kaynağı nedeniyle önemli bir kuruyemiştir [138]. Ara h 2 ve Ara h 6, Akdeniz bölgesindeki pediatrik çalışmalara göre fıstık alerjilerinden sorumlu asıl alerjenler olarak belirlenmiştir [139]. Yapılan bir diğer çalışmaya göre, yer fıstığı alerjisini teşhis etmek için en yüksek doğruluğu sağlayan belirteçler Ara h 2 ve Ara h 6 olarak bulunmuştur [140].

Çizelge.2.6. Kuruyemiş bileşenleri ve protein ailesi [125]

	Bileşen	Protein ailesi
Ağaç Kuruyemişleri		
Fındık	Cor a 1	PR-10
	Cor a 2	Profilin
	Cor a 8	LTP
	Cor a 9	Legumin
	Cor a 11	Vicilin
	Cor a 12 ve 13	Oleosin
	Cor a 14	2S albümin
Kaju	Ana o 1	Vicilin
	Ana o 2	Legumin
	Ana o 3	2S albümin
Antep fıstığı	Pis v 1	2S albümin
	Pis v 2 ve 5	Legumin
	Pis v 3	Vicilin
Ceviz	Jug r 1	2S albümin
	Jug r 2 ve 6	Vicilin
	Jug r 3	LTP
	Jug r 4	Legumin
	Jug r 5	PR-10
	Jug r 7	Profilin
Pekan Cevizi	Car i 1	2S albümin
	Car i 2	Vicilin
	Car i 4	Legumin
Badem	Pru du 1	PR-10
	Pru du 2	PR-5
	Pru du 3	LTP
	Pru du 4	Profilin
	Pru du 6	Legumin

Brezilya Fıstığı	Ber e 1	2S albümin
	Ber e 2	Legumin
Baklagiller		
Yer fıstığı	Ara h 1	Vicilin
	Ara h 2,6 ve 7	2S albümin
	Ara h 3 ve 4	Legumin
	Ara h 5	Profilin
	Ara h 8	PR-10
	Ara h 9,16 ve 17	LTP
	Ara h 10,11,14 ve 15	Oleasin
	Ara 12 ve 13	Defensin
Acı Bakla	Lup a 1, Lup a vicilin ve Lup an 11S	Vicilin
	Lup a 5	Profilin

2.8. Besin Alerjisinde Tanı ve Tedavi

2.8.1. Tanı

Öykü ve Fizik Muayene

Besin alerjileri tanısında ilk ve önemli basamaklarından biri ayrıntılı öykünün alınması ve fizik muayenenin yapılmasıdır. Olası nedensel besin veya besinleri, besinin özellikleri (pişirme koşulları) alınan miktarı, hangi yolla alındığı, reaksiyonun süresi, yardımcı faktörler (egzersiz, aspirin ve alkol), oluşan semptomlar, şüpheli besinin daha önce tüketilip tüketilmediği, son reaksiyon zamanı ve benzer reaksiyonların aynı gün içinde tekrar edip etmediği belirlenmelidir. Tanıya ulaşmak için doktor, hastalığın epidemiyolojik yönlerini, aile öyküsünü araştırmalıdır ve önceki olasılık tahminleri doğrultusunda değerlendirilebilecek uygun testleri düşünmelidir [1].

Spesifik Ig E (sIgE) Ölçümü

Pahalı ve özgüllüğü düşük olmasına rağmen hassasiyeti yüksektir. Besine özgü IgE antikorlarının serum seviyeleri kantitatif olarak ölçülür. Bu test, besin ile alerji arasındaki klinik olarak anlamlı bir reaksiyon olasılığını gösterebilir ama alerjinin

şiddetini göstermez. Yanlış pozitif sonuç olasılığı yüksektir. Bu yüzden aile öyküsü IgE-aracılı alerjiyi desteklemiyorsa sIgE'ler teşhiste yardımcı değildir. Aile geçmişinin düşündürücü olduğu durumlarda ise alerji ekarte edilemez çünkü sIgE testi, duyarlılığı düşük olduğundan anafilaksi dahil olmak üzere önemli reaksiyonların % 10 ila % 25'i gözden kaçabilmektedir [141].

Deri Prick Testi (DPT)

Deri prick testi, IgE aracılı alerjik hastalıkların tanısında yaygın, nispeten kolay uygulanabilir, düşük maliyetli ve kısa sürede sonuç alma gibi avantajlara sahiptir ama testin pozitifliği her zaman alerji varlığına kanıt değildir. Bu teste ticari ekstraktlar ya da çiğ besinler kullanılır [142]. Teste, lanset ya da plastik uç aracılığıyla epidermise kabartı oluşumuna neden olacak az miktarda alerjen yerleştirerek başlanır [141]. Pozitif (histamin) ve negatif (salin) kontrolleri kullanılır. Genellikle 30 dakika içinde kabarıklık oluşur. 3 milimetreden geniş kabarıklık oluşması testin pozitifliğini gösterir [42]. Kızarıklık, kaşıntı gibi hafif reaksiyonların yanında, hayatı tehdit eden anafilaksi gibi ağır reaksiyonlar meydana gelebileceğinden sadece hastane ortamında yapılması uygundur. Antihistamin, kortikostereoidlerden etkilendiği için, ortalama bir hafta önce kesilmesi gerekir [143].

Eliminasyon Diyeti

Alerjik reaksiyona neden olduğu düşünülen besinin diyetten tamamen çıkartılmasına esasına dayanır. Eğer diyetten çıkarıldıktan sonra semptomlar azalıyor veya kayboluyorsa veya diyetle tekrar eklendiğinde semptomlar artıyorsa, diyetten çıkarılan besinin alerjik reaksiyondan sorumlu olduğu düşünülür. Hem besin alerjisi tanısında hem de tedavisinde kullanılır. Besinden kaçınma süresi gerektiğinden uzun olursa semptomlar kaybolabilir. Bu yüzden genellikle IgE aracılı reaksiyonlarda eliminasyon 2-4 hafta, IgE aracılı olmayan reaksiyonlarda 6 haftaya kadar bir zaman önerilir. Eliminasyon diyetleri, laboratuvar testlerinin tanı koymada yeterli olmadığı bazı IgE aracılı olmayan alerjilerde tanı koymada etkili olabilir [144].

Besin Provakasyon Testi

Besin provokasyon testleri IgE aracılı ve IgE aracılı olmayan besin alerjilerinin teşhisinde önemlidir [145]. Bu testler uygulanırken gelişebilecek acil durumlar için gerekli hazırlıklar yapılır. Daha sonra sorumlu besin her 15-30 dakikada bir artan dozlar şeklinde bütün adımlar tamamlanıncaya kadar ya da semptomlara görülünceye kadar hastaya verilir [146]. Doktor gözetimi altında gerçekleştirilmelidir, çünkü besin şiddetli alerjik reaksiyonlara neden olabilir [147]. Besin provokasyon testleri çeşitli amaçlar için kullanılır. Örneğin, besin alerjisi olasılığı yüksek olduğu düşünülen bir kişide kesin besin alerjisi teşhisi sağlamak ya da alerjisi kanıtlanmış bir kişide alerjik reaksiyonun doz eşliğini keşfetmek için uygulanır. Ayrıca birden fazla alerjisi olan bir kişide diyet kısıtlamasını azaltmaya çalışmak ve artık yiyeceğe tolerans gösterebileceği düşünülen bir kişide besin alerjisini ekarte etmek için de uygulanır [148].

Bileşene Dayalı Tanı Yöntemi (BDT)

Bireysel alerjenik moleküllere karşı sIgE antikor yanıtını oluşturmak için saflaştırılmış doğal veya rekombinant alerjenleri kullanılması esasına dayanır [149]. BDT, gerçek alerjenleri çapraz reaktif alerjen moleküllerinden ayırabildiği için alerji teşhis ve tedavisine önemli bir katkısı vardır. BDT, çapraz duyarlanmayı ortaya çıkararak, semptom ortaya çıkaran alerjenlere karşı birincil duyarlanmayı etkili bir şekilde tanımlanmasına katkıda bulunabilmektedir. Çeşitli kofaktörlerin [örn. efor, steroid olmayan anti-enflamatuvar ilaçlar, (NSAID'ler)] neden olduğu anafilaksi öyküsü olan hastalara, kırmızı et tüketildikten sonra gecikmiş anafilaksi (3-6 saat) olan hastalara veya idiyopatik anafilaksi hastalarına uygulanabilmesi açısından kayda değer bir tanı yöntemidir. BDT ile hangi alerjenik moleküle karşı duyarlanma oluştuğunu bilmek sistemik immünoterapi esnasında oluşabilecek ağır reaksiyonların riskini azaltabilir. Lateks alerjisine sahip hastalar tıbbi prosedürler sırasında şiddetli reaksiyonlar için yüksek bir riske sahip olduğu için gerçek lateks alerjisi olan latekse duyarlı hastaların doğru tanımlanması büyük önem taşımaktadır. BDT ayrıca besin alerjili hastalarda kullanılır.

2.8.2. Tedavi

Günümüzde, yapılan besin alerjileri tedavilerin standartı alerjiden sorumlu olan besin ya da besinlerin kesinlikle diyetten uzaklaştırılmasıdır. Prensipite basit görünebilir ama pratikte diyetten kaçınma oldukça zordur. Yemek yerken beklenmedik, muhtemelen şiddetli bir reaksiyon riski, hastalar ve ailelerinde endişeye neden olduğundan dolayı yaşam kalitelerini düşürür. Besin alerjisi olan bireyler, riski en aza indirmek için, yiyeceklerindeki bileşenler hakkında bilgi sahibi olması gereklidir. Ayrıca bazı ülkelerde besin etiketleme yasaları uygulanmıştır. Bu yasalar, besin üreticilerinin besinde alerjiye neden olabilecek bileşenler listelenmelidir. Bir çocuğun besin alerjisinin seyri yıllık doktor ziyaretleri ile sağlanmalıdır. Besin alerjilerinin tedavilerinde bir diğer önemli nokta, hastalar ve aileleri oluşabilecek hafif, orta ve şiddetli reaksiyonların semptomlarını nasıl tanıyacakları ve tedavi edecekleri konusunda bilgi vermektir. Epinefrin, kan damarlarını kan basıncını korumaya, solunum yollarını iyileştirmeye ve hava yolu çökmesine neden olabilecek ödemi azaltmaya yardımcı olabildiği için bir besinin neden olduğu ağır alerjik reaksiyonu tedavi etmek için ilk seçenektir. Anafilaksi yaşayan hastalar semptomları izlemek için en az 4-6 saat hastane ortamında izlenmelidir. İntramüsküler enjeksiyon olarak verilen kendi kendine enjekte edilebilen bir cihazla uygulanabilen epinefrin şiddetli besin alerjisi olan ve anafilaksi öyküsü olan hastalara reçete edilmektedir. Yeterli beslenme konusunda besin alerjisi olan hastalar ve aileleri eğitilmelidir çünkü kısıtlı bir diyetin çocukları yetersiz beslenme riskine sokabileceğine ve bu durumun da büyümede gecikmelere neden olabileceğine dair kanıtlar vardır. Örneğin süt alerjisi olan hastalar, D vitamini ve kalsiyum eksikliklerine eğilimlidir. Süt, yumurta gibi alerjileri olan çoğu çocuk sonunda tolerans geliştireceği için diyetle kaçınılan besin diyetle yeniden dâhil edilmelidir [150].

2.9. Besin Alerjisi ve Epigenetik Mekanizmalar

2.9.1. Epigenetik Mekanizmalar

Epigenetik, gen ifadesini etkileyen ancak DNA'nın nükleotid dizisini değiştirmeyen faktörleri inceleyen bir bilim dalıdır [151]. Epigenetik terimi ilk olarak 1940 yıllarında C. H. Waddington tarafından bilim dünyasına kazandırılmıştır. Eski Yunancada “epi” ön eki, “üstünde”, “üzerinde”, “ötesinde” anlamı verdiği için epigenetik “genler üstü genetik” anlamını verir [152]. Epigenetik faktörler kimyasal olarak stabil ve potansiyel

olarak geri dönüşümlüdür, çevresel faktörlerle modüle edilebilir veya indüklenebilir ve mitozla yavru hücrelere ve mayozla gelecek nesillere aktarılabilir [151]. Epigenetik teorisinin moleküler temelini, birbiriyle oldukça bağlantılı olan DNA metilasyonu, asetilasyon, fosforilasyon, metilasyon, ubiquitinasyonu içeren histon modifikasyonları ve kodlamayan RNA'lar oluşturur. DNA metilasyonu, 5-metil-sitozin oluşturmak için bir metil grubunun CpG dinükleotid dizilerindeki sitozin kalıntılarının 5 pozisyonuna kovalent bağlanmasını ifade eder. DNA metilasyonu, X kromozomu inaktivasyonunda, genomik baskılamada ve embriyonik gelişimde önemli roller oynar [153]. DNA metilasyonu, diğer epigenetik mekanizmalarla kıyasla, daha çok çalışılmıştır çünkü büyük ölçüde standartlaştırılmış yöntemler ve arşivlenmiş genomik DNA örnekleri kullanılarak rutin olarak çalışılabilmektedir [154]. Histon asetilasyonu, histon asetil transferazlar ile histon deasetilazların zıt enzimatik etkisi tarafından düzenlenir. Histon asetil transferazlar, histon proteinleri üzerindeki lizin kalıntılarına negatif yüklü asetil gruplarının eklenmesini sağlar. Asetil gruplarının eklenmesi, lizinlerin pozitif yükünü nötralize ederek histon proteinleri ile DNA arasındaki elektrostatik afiniteyi azaltır. Böylece DNA'yı transkripsiyonel süreçlere açık hale getirir [155]. Histon deasetilazlar, asetil gruplarını lizin kalıntılarından uzaklaştırarak pozitif yüklerin eski haline gelmesini sağlar. Böylece daha yoğun bir kromatin yapısı ve bunun sonucunda transkripsiyonun inhibisyonunu sağlar. Esas olarak treonin, tirozin ve serin kalıntılarında meydana gelen histon fosforilasyonuna kinazlar aracılık eder. Bu enzimler, bir fosfat grubunu ATP'den hedef aminoasitin yan zincirindeki hidroksil grubuna aktarır. Histonlar, fosfat gruplarının eklenmesi sonucu negatif olarak yüklendiği için DNA ile etkileşimleri zayıflar. Histon defosforilasyonuna ise fosfatazlar aracılık eder. Histon kuyrukları içinde lizinlerin ve arjininlerin yan zincirlerinde yer alan histon metilasyonu, histon lizin metiltransferaz ve protein arjinin metiltransferaz tarafından düzenlenir. Histon lizin metiltransferaz bir metil grubunu S-adenosilmetiyoninden lizin kalıntılarına aktarırken, protein arjinin metiltransferaz bir metil grubunu S-adenosilmetiyoninden arjinin kalıntılarına aktarır. Hem lizin hem de arjinin metilasyonları, transkripsiyonda baskılayıcı ya da aktive edici olabilmektedir. Histon ubiquitinasyonuna, E1-aktive edici, E2-konjüge edici ve E3-ligasyon enzimleri olan üç enzimin ardışık hareketi aracılık eder. Histonda yer alan lizin kalıntıları ile ubiquitin arasındaki bağlanma sonucu oluşur. Spesifik izopeptidazlar, ubikuitinleri uzaklaştırma görevi gören deubikitinasyon enzimleridir [156].

Ökaryotik genomlardaki genomik DNA'nın % 90'ına kadar transkribe edildiği yakın zamandaki yüksek verimli transkriptomik analizler sayesinde ortaya çıkmıştır. Bu transkriptlerin yalnızca % 1-2'sinin proteinleri kodladığı görülmüştür. Yaklaşık yüzde 98'lik kısım birçok biyolojik süreçlerde önemli roller oynayan kodlamayan RNA'lar olarak transkribe edilir [8]. Sekans, yapı ve biyolojik fonksiyon açısından yüksek derecede heterojenliğe sahip olan kodlamayan RNA'lar genellikle çeşitli kriterlere göre alt tiplere ayrılırlar. Örneğin, kodlamayan RNA'lar biyolojik fonksiyonlarına göre ikiye ayrılır: Housekeeping kodlamayan RNA'lar ve düzenleyici kodlamayan RNA'lar. Housekeeping kodlamayan RNA'ları taşıyıcı (tRNA), ribozomal (rRNA), küçük nükleer (snRNA), küçük nükleolar (snoRNA), rehber (gRNA) ve telomeraz RNA'lar oluşturur. Düzenleyici RNA'ları ise mikro RNA (miRNA), piwi etkileşimli RNA (piRNA), susturucu RNA (siRNA), uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA), promotor ilişkili (PAR) ve güçlendirici RNA'lar (eRNA'lar) oluşturur (Çizelge 2.7) [7,8,157].

Çizelge 2.7. Kodlamayan RNA'lar ve fonksiyonları [7,8,157]

Sınıfı	Tipi	Uzunluğu (nt)	Fonksiyonları
Housekeeping Kodlamayan RNA'lar	tRNA	73-94	Translasyon sırasında amino asitleri çoğalan bir polipeptit zincirine aktarır.
	rRNA	120-5070	Ribozomun bileşenleridir. Protein sentezinde görevli rRNA'lar katalitik aktivite gösterir.
	snRNA	~120	Splayzomların bileşenleridir ve çekirdekte öncü mRNA' yı işler.
	snoRNA	70-200	rRNA, tRNA, ve snRNA gibi diğer RNA'ların kimyasal modifikasyonlarına rehberlik eder.
	gRNA	50-70	gRNA'lar hedeflenen bölünme için Cas9'u yönlendirir.
	TERC	438-541	Telomeraz ile birleşir ve kromozomların uçlarına telomer tekrarları eklemek için bir kalıp görevi görür.

Düzenleyici Kodlamayan RNA'lar	miRNA	20-24	Spesifik mRNA'larla baz eşleştirmesi yaparak gen ifadesini kontrol eder ve hem proteinlerin stabilitesini hem de proteinlerin translasyonlarını azaltır.
	piRNA	24-31	piRNA'lar ve Piwi proteinleri, germ hücrelerini transpozonların potansiyel zararlarına karşı korur.
	siRNA	20-24	Hedef genin mRNA'sına bağlanarak, mRNA'nın susturulmasında rol oynar
	PAR	16-200	Kısmen bilinmemekle birlikte transkripsiyonel düzenlemede görev alır (örneğin polikomb protein grubu ile etkileşim).
	eRNA	100-9000	Çoğunlukla bilinmemekle birlikte, transkripsiyonel gen aktivasyonunda rol oynar.
	IncRNA	>200	Kromatin düzenleyici komplekslerle etkileşim yaparak transkripsiyonel baskıya aracılık eder.

2.9.1.1 miRNA'lar

miRNA'lar, diğer genlerin intronları içindeki kümelerde bulunan çevrilmemiş transkriptlerdir. MIR genlerinden meydana gelen miRNA'lar küçük düzenleyici RNA'lardır [158]. İlk miRNA, lin-4, 1993 yılında *Caenorhabditis elegans*'ta tanımlanmıştır ve embriyo sonrası gelişim için gerekli genlerin susturulmasını sağladığı anlaşılmıştır [159]. Yaklaşık 18-26 nükleotit uzunluğundadır. Ayrıca mRNA'nın translasyonel baskılanmasından sorumludur. RISC (RNA kaynaklı susturma kompleksi) aracılığıyla hedef mRNA'nın sonunda yer alan proteine çevrilmeyen bölge (3' UTR)' sine kısmi olarak bağlanarak translasyonel olarak baskılanmasına ya da tam eşleniklik göstererek mRNA degradesonuna yol açarlar [160]. miRNA'lar stabildir ve serum, idrar ve tükürük gibi farklı vücut sıvılarında tespit edilebilir [9]. miRNA'lar apoptozis, kanser, hücre farklılaşması, enflamasyon gibi biyolojik süreçlerde rol oynamaktadır.

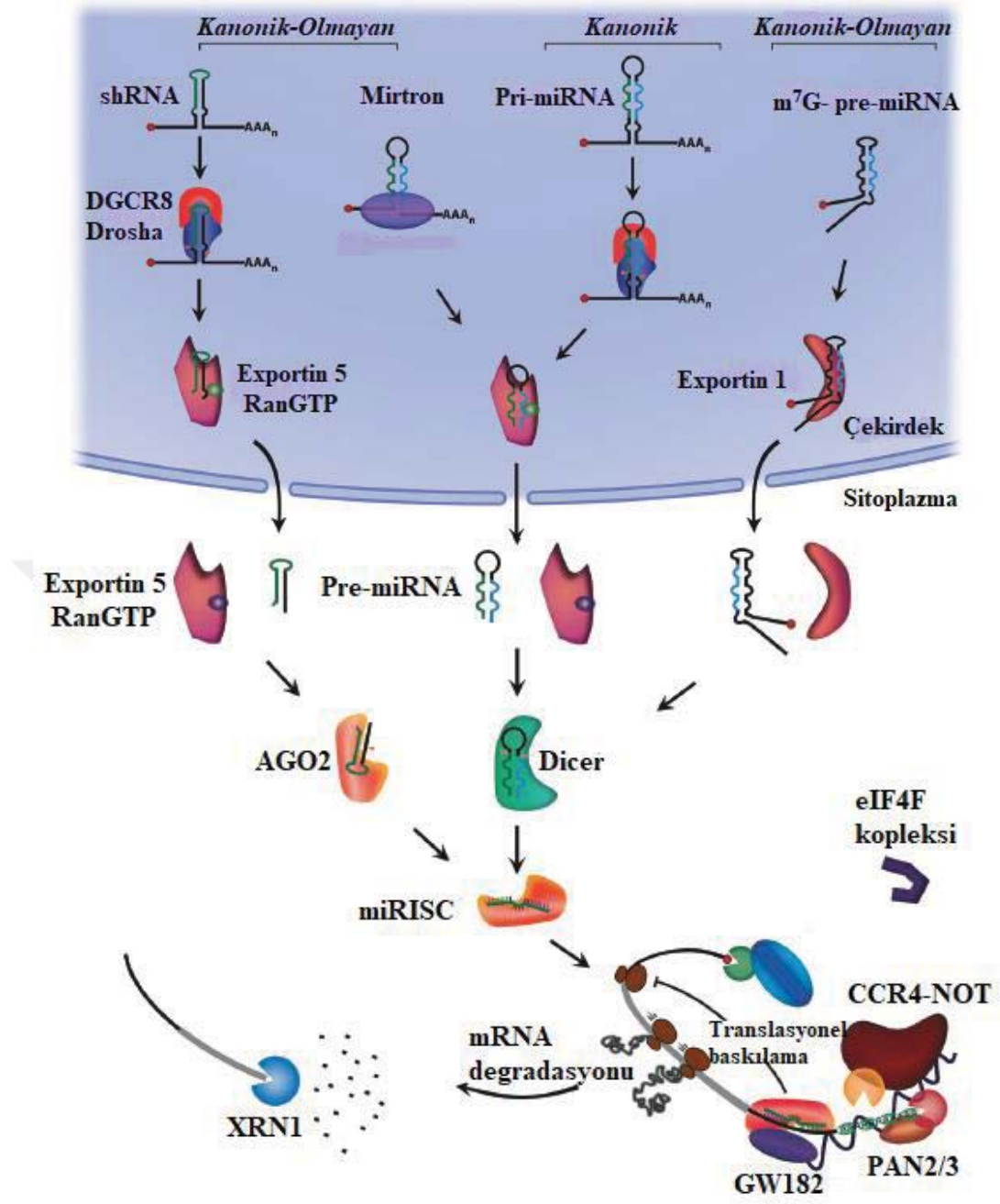
miRNA'lar immün yanıtın düzenlenmesinde de görev alır. miRNA'lar hastalıkların gelişimini veya etkilenen dokulardaki enflamasyonun gücünü etkiler. miRNA'ların ifade paterni, farklı hücre tiplerine ve hastalık koşullarına göre değişebilmektedir. Ayrıca miRNA'ların hastalığın prognozunda, hastalığa uygulanan tedaviye yanıtı tahmin etmede, hastalık sürecini takip etme gibi önemli süreçlerde rol oynayabileceği gösterilmiştir. Bu nedenle miRNA'ların hava yolu ve alerjik hastalıklarda da biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir [11].

miRNA'ların Biyogenezi

Transkripsiyon, işleme veya miRNA yapım/yıkım hızı gibi çeşitli adımlarda görev alan bir dizi protein ve enzim tarafından düzenlenen miRNA biyogenezi, çok aşamalı ve karmaşık süreçlerden oluşur. miRNA biyogenezi, miRNA genlerin, çekirdekte, RNA polimeraz II/III tarafından transkribe edilmesiyle başlar. şimdiye kadar tanımlanmış tüm miRNA'ların yaklaşık yarısı intrageniktir. Çoğunlukla intronlardan işlenir fakat nispeten az sayıda ekzondan da işlenebilir. Geri kalan miRNA'lar ise intergeniktir. Bir konakçı genden bağımsız olarak kopyalanıp kendi promotörleri tarafından düzenlenir.

miRNA biyogenezi kanonik ve kanonik olmayan yolak olarak iki sınıfa ayrılır. miRNA'nın işlendiği kanonik biyogenezi yolağı baskın bir yolaktır. Bu yolakta transkribe edilen genler sonucu sa  tokası şeklinde pri-miRNA oluşur. Daha sonra, pri-miRNA'lar mikroişlemci kompleksi tarafından pre-miRNA'lara işlenir. Bu kompleksin temel bileşenleri, RNA bağlayıcı protein DiGeorge Sendromu Kritik Bölge 8 (DGCR8) ve bir ribonükleaz III enzimi, Drosha'dan oluşur. DGCR8, bir N6-metiladenile edilmiş GGAC'yi ve pri-miRNA'daki diğer motifleri tanırken Drosha ise, pre-miRNA'nın uzunluğunu belirleyen pri-miRNA'nın 5 've 3' uçlarını parçalamaya yardımcı olur. 60-70 nükleotid uzunluğunda olan pre-miRNA GTP'ye bağlı Ran kofaktörü ile ilişkili eksportin 5 (Exp5) tarafından sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmada GTP, GDP ile değiştirilir ve Exp5 pre-miRNA'yı serbest bırakır. Son olgunlaşma, ~22 nükleotitten oluşan çift sarmallı bir miRNA dupleksini oluşturmak için pre-miRNA'yı bölen RNase III tip endonükleaz olan Dicer tarafından sağlanır. miRNA dupleks molekülünün bir ipliği yıkılırken diğeri ise RISC oluşturmak üzere Argonaut (AGO) protein kompleksiyle birleşir. AGO proteinleri, evrimsel olarak korunmuş dört alandan oluşur. Bir lobunda N-terminali ve Piwi-Argonaute-Zwilli (PAZ) alanları varken ikincisinde ise

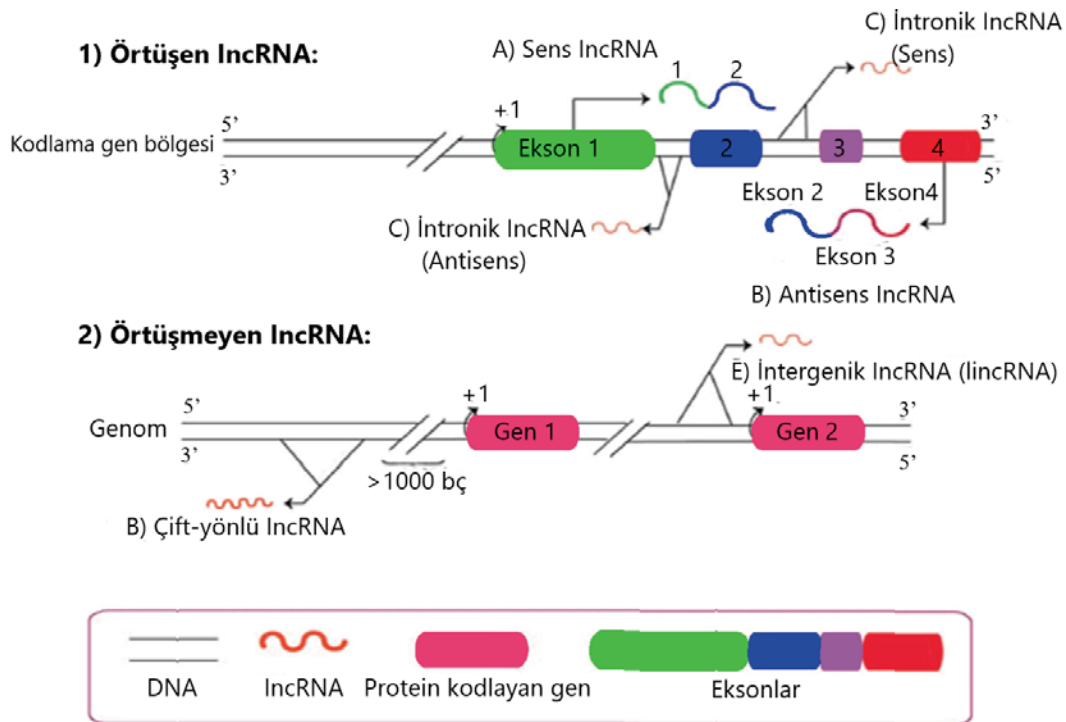
MID ve PIWI alanları vardır. AGO'lar miRNA aracılı gen susturmada önemli rollere sahiptir. Kanonik olmayan biyogenez yolağında ise, kanonik biyogenez yolağında görevli Drosha, exportin 5, Dicer ve AGO2 gibi proteinlerin farklı versiyonları kullanılır. Birçok kanonik olmayan biyogenez yolağı tanımlanmıştır. Kanonik olmayan biyogenez yolakları genel olarak Drosha/DGCR8'den bağımsız ve Dicer'den bağımsız yolaklar olarak sınıflandırılabilir. Drosha'dan bağımsız yolakta üretilen pre-miRNA, Dicer için olan substratlara benzer. İlk tanımlanan Drosha/DGCR8'den bağımsız yolak mirtron yolağıdır. mRNA splaya uğradığında, intronik dizilerden mirtron adı verilen bir mikroRNA oluşturulur. Mitron yolağında pre-miRNA üretmek için çekirdekte Drosha/ DGCR8 kompleksine ihtiyaç yoktur. Drosha/DGCR8'den bağımsız yolağa başka bir örnek ise 7-metilguanozin (m^7G) başlıklı pre-miRNA'dır. Yeni oluşan miRNA'lar Drosha ayrılması olmadan exportin 1 aracılığıyla sitoplazmadan ihraç edilir. Dicer'den bağımsız yolaklarda ise miRNA'lar endojen kısa saç tokası RNA'ların (shRNA) transkriptleri tarafından işlenir. Yetersiz uzunlukta olmaları nedeniyle Dicer için substrat olarak tanımlanamazlar. Bu yüzden pre-miRNA, olgunlaşmaları için AGO2'ye ihtiyaç duyar [160,161]. Tüm yolakların sonucunda bir susturucu miRISC kompleksi oluşur. Susturucu bir miRISC kompleksinin oluşumunda görev alan ilk proteinler Glisin-triptofan 182 (GW182, 182 kDa) protein ailesidir. GW182 protein ailesi, miRNA:hedef mRNA etkileşimini takiben poli(A)-deadenilaz kompleksleri PoliA nükleaz 2-3 (PAN2-PAN3) ve Karbon Katabolit Baskısı -TATA'sız (CCR4-NOT) gibi diğer efektör proteinleri toplamasında görev alır. PAN2/3 hedef mRNA poli(A)-deadenilasyonu başlatır ve CCR4-NOT kompleksi de işlemi tamamlar. GW182'nin triptofan (W)-tekrarları ile poli(A)-bağlayıcı protein C (PABPC) arasındaki etkileşim sayesinde de deadenilasyon verimli hale gelir. Deadenilasyonun ardından, 5-terminal başlık (m^7G), decapping protein 2-3 (DCP1-DCP2) kompleksi decapping işlemini gerçekleştirir ve 5'-3' Eksoribonükleaz 1 (Xrn1) mRNA parçalanmasını sağlar [160].



Şekil 2.4. miRNA biyogenezi [160]

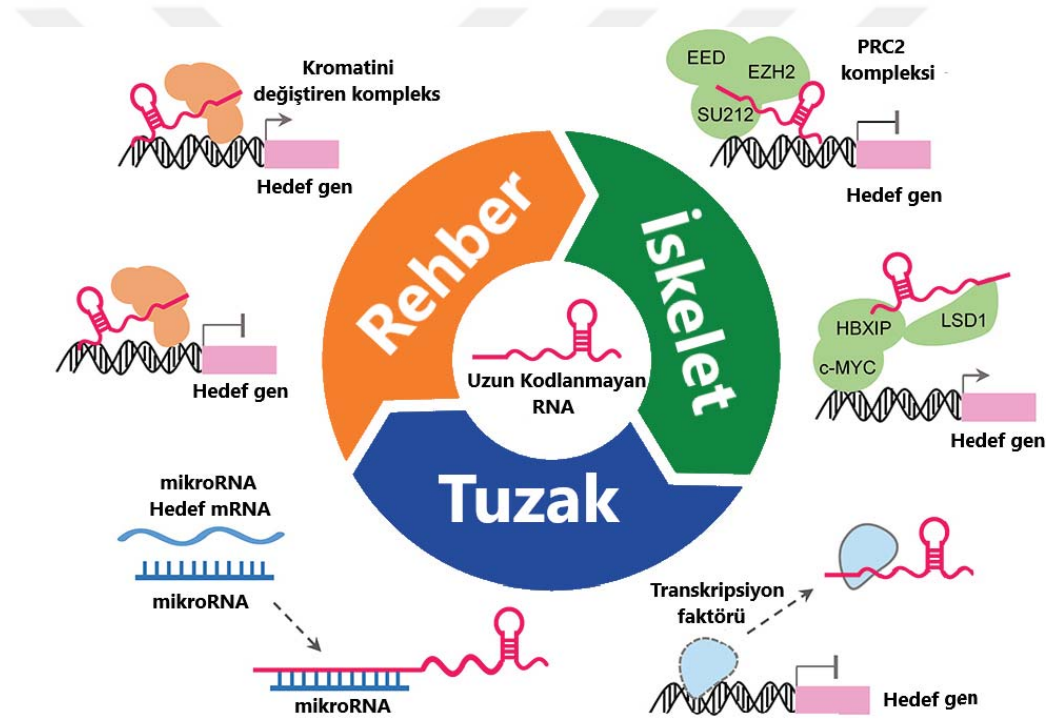
2.9.1.2. lncRNA'lar

lncRNA'lar, 200 nükleotitten daha uzun kodlamayan RNA'lardır. H19, ilk memeli lncRNA'sı, 1989'da keşfedilmiştir [162]. İnsan genomunda yaklaşık 16.000 lncRNA olduğu tahmin edilmektedir [163]. lncRNA'lar yapısal olarak mRNA'lara benzemektedir ancak lncRNA'ların açık bir okuma çerçevesi (ORF) yoktur. Bu yüzden protein kodlayamazlar [164]. lncRNA'lar, örtüşen lncRNA'lar ve örtüşmeyen lncRNA'lar olmak üzere 2 sınıfa ayrılır. Genomik yapıları ve kökenleri, sınıflandırmalarında önemli faktörlerdir. Örtüşen lncRNA'lar, sens lncRNA'lardan, antisens lncRNA'lardan ve intronik lncRNA'lardan oluşur. Sens lncRNA genleri, başka bir genin bir veya daha fazla eksonu ile örtüşür ve kodlama geniyle aynı yönde kopyalanırken antisens lncRNA ve bunların sekansı, ters yönde bir kodlama geninin bir veya daha fazla eksonu ile örtüşür. İtronik lncRNA'lar ise, protein kodlayan genlerin intronlarında bulunur. Çift yönlü lncRNA'lar ve uzun intergenik ncRNA'lar (lincRNA'lar) gibi bazı lncRNA'lar kodlama genlerinin içinde bulunur. Çift yönlü lncRNA'lar, kodlayan genlerin yakınında, ancak zıt DNA zincirinde bulunur. lincRNA'lar, iki bağımsız kodlama geni arasındaki bir genomik diziden türetilir. lncRNAs sınıflandırması, Şekil 2.5 'de gösterilmiştir [165].



Şekil 2.5. lncRNA'ların sınıflandırılması [165]

lncRNA'lar çekirdekte ve sitoplazmada bulunur ve çeşitli mekanizmalarla gen ifadesinin hemen hemen her aşamasının düzenlenmesinde rol oynar. Epigenetik modülatörler olarak, lncRNA'lar kromatin değiştirici enzimlere bağlanır ve aktivitelerini genomun spesifik bölgelerine yönlendirir. Bu bölgelerde, lncRNA'lar gen ifadesi modelini değiştirerek kromatin modifikasyonunu yönlendirir. lncRNA'lar transkripsiyon faktörlerine etki ederek, hedef genin baskılanmasına ya da aktive olmasına neden olur. lncRNA'lar splay faktörlerine etki ederek alternatif splayı düzenlerler. Ayrıca lncRNA'lar hedef mRNA ile miRNA arasında sünger görevi görüp miRNA'nın hedef mRNA'ya bağlanmasını engeller [166].



Şekil 2.6. lncRNA'ların görevleri [167]

2.9.2. Alerjik Hastalıklarda Kodlamayan RNA'ların Rolü

2.9.2.1. miRNA'ların Rolü

Allerjik hastalıkların sıklığının son yıllarda giderek artması hastalık patogenezinde gen-çevre etkileşimlerin rolünü ön plana çıkartmış ve birçok hastalık patogenezinde etkisi

gösterilmiş olan miRNA'ların alerjik hastalıklardaki rolünü belirlemeye yönelik çalışmalar hızla artmaya başlamıştır.

Hammad ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptığı çalışmada 27 astımlı çocuk ve 21 sağlıklı çocuk alınmış ve bu iki grup karşılaştırıldığında, hasta olan çocukların miR-21 ifadesinin arttığı gözlemlenmiştir [168]. Sonkoly ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptığı çalışmada, atopik dermatitli hastalarda miR-155'in aşırı eksprese olduğu görülmüştür [169]. miR-149, alerjik rinitli hastalarda, sağlıklı kontrollere göre artmıştır. Sağlıklı kontrollerden elde edilen periferik kan mononükleer hücreler (PBMC'ler) ev tozu akar özütleri ile uyarıldığında, miR-149 seviyelerinin azaldığı görülmüştür [170]. Son on yılda astım, atopik dermatit, alerjik rinit gibi hastalıklar ile miRNA ifade seviyeleri arasında ilişki ile ilgili çok çalışma yapılmıştır ama besin alerjisi ile çok az sayıda çalışma vardır. Spesifik antijene maruz kalan oral-intestinal alerji sendromlu (OIAS) farelerin bağırsağındaki CD14+ hücrelerinde miR-98 ifadesinde normal farelere göre artış görülmüştür [171].

miR-17~92 kümesi 6 üyeye sahiptir. (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 ve miR92a-1) [172]. miR-17~92 miRNA kümesi, T ve B hücre gelişimi, çoğalma, hayatta kalma, aktivasyon, farklılaşma ve sitokin üretimi gibi önemli rollere sahiptir [173]. 48 alerjik rinit hastası ve 50 sağlıklı kişinin katıldığı bir çalışmada, hastaların nazal mukoza örneklerinde miR-19a-5p ifadesi sağlıklı kişilere kıyasla, daha fazla ifade edildiği görülmüştür [174]. 35 sağlıklı kişi ve kronik plak sedef hastalığı olan 35 hastanın yer aldığı bir çalışmada, psoriatik hastaların serum miR-19a ifade seviyesinin, sağlıklı kişilere kıyasla daha az olduğu görülmüştür [175]. 26 nazal polip hastası ve 10 sağlıklı kişinin katıldığı bir çalışmada kandan dentritik hücreler izole edilmiş, nazal polip hastalarında periferik dentritik hücrelerde yüksek düzeyde miR-19a ifadesi tespit edilmiştir. Çalışmalar, şiddetli astımı olan hastalarda bronşların epitel hücrelerinde miR-19a ifade seviyesinin, kontrol grupları ve hafif astımlılardan alınan hücrelere kıyasla daha fazla olduğunu göstermiştir [176]. Sun ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, astımı olan hastalarda havayolu düz kas hücrelerinde miR-19a ifade seviyesinin, kontrol gruplarından alınan hücrelere kıyasla daha az ifade olduğu görülmüştür [177]. Başka bir çalışmada ise besin alerjisi olan farelerin bağırsaklarında CD35+ B hücrelerinde miR-19a ifadesi seviyelerine bakılmış ve sağlıklı kontrol grubuna göre miR-19a ifadelerinde artış görülmüştür [178].

Yapılan çalışmalar Let-7 ailesinin önemli bir üyesi olan miR-98'in T hücre aracılı bağışıklık cevabının düzenlenmesinde önemli rolü olduğu göstermiştir [179]. Astımlılarda (remisyon grubunda ve astımlı akut grupta) kontrollere kıyasla miR-98-5p seviyeleri düşük bulunmuştur. Ayrıca astımlı akut grupta miR-98-5p'nin nispi ifade seviyesi, astımlı remisyon grubundakinden önemli ölçüde düşük bulunmuştur. Akut astım atakları olan çocuklarda orta ve şiddetli grupta nispi miR-98-5p ifade seviyeleri hafif gruptakilere göre anlamlı derecede düşük ve şiddetli gruptakiler orta gruptakilere göre ise anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Ayrıca serum IL-13 seviyelerine bakılmıştır. Astım remisyon grubundaki ve akut astım grubundaki serum IL-13 seviyeleri sağlıklı kontrol grubundakilerden anlamlı derecede yüksek ve akut astım grubundaki serum IL-13 seviyeleri astım remisyon grubundakilerden anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. miR-98 ifade seviyesi ile serum IL-13 seviyesi arasında negatif bir ilişki bulunmuştur [180]. Liu ve arkadaşlarının çalışmasına göre, miR-98'in ifade seviyesi astımlı çocuklarda kontrol grubu çocuklarına göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur [181]. 20 astım hastası ve 20 sağlıklı kişinin dahil olduğu, Chen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada periferik kandan izole edilen B hücrelerinde miR-98, TSP1 mRNA ifade seviyeleri, serum IL-4, IL-5, IL-13 ve IFN- γ bakılmıştır. miR-98 ifade seviyesi astım hastalarında kontrol grubuna kıyasla daha yüksek bulunmuştur. TSP1 mRNA ifade seviyesi ise düşük bulunmuştur. Serum IL-4, IL-5, IL-13 seviyeleri astım hastalarında kontrol grubuna kıyasla daha yüksek bulunmuştur. miR-98 ifade seviyesi ile TSP1 mRNA ifade seviyesi arasında negatif bir ilişki bulunmuştur. Ayrıca miR-98 ifade seviyesi ile serum IL-4, IL-5, IL-13 seviyeleri arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur [182].

2.9.2.2. lncRNA'ların Rolü

Ortaya çıkan kanıtlar, lncRNA'ların, gen ifadesinin transkripsiyonel veya epigenetik düzenlenmesinde, hücre farklılaşması, embriyonik gelişim, kanser metabolizması, enflamasyon gibi çeşitli biyolojik işlemlerde rol oynadığını göstermektedir. lncRNA'lar doğuştan ve uyarılabilir yanıtların düzenlenmesinden önemli rol oynar. Son çalışmalar, lncRNA ailesinin üyelerinden lincRNA-Cox2, Lethe, PACER ve THRIL'in immün hücrelerde gen ifadesinin kontrolünde önemli rollere sahip olduğu göstermiştir. Uyarılabilir yanıtın elemanları T ve B lenfositlerdir. Lenfositlerin çok sayıda lncRNA ifade ettiğini ve bu lncRNA'ların hücrelerin gelişimi, farklılaşması ve aktivasyonu

üzerinde önemli bir rol oynadığını gösteren kanıtlar vardır. Örneğin T hücreleri dinlenmedeyken lncRNA ailesi üyelerinden biri olan NEAT sitoplazmada bulunur. NEAT fosforile olup çekirdeğe geçince T hücreleri aktive olur [183]. lncRNA'ların ifadeleri ile alerjik hastalıklar arasında ilişki olduğunu gösteren çalışmalar vardır, ama oldukça azdır. Örneğin lncTCF7 ifadesi astım olan hastalarda daha yüksektir [184]. 192 kişinin (96'sı alerjik rinitli hasta ve 96'sı kontrol) katıldığı bir çalışmada nazal mukozalarından örnek alınmış ve alerjik rinitli hastalarda, kontrollerle kıyaslandığında lncRNA ANRIL ifade seviyesinin daha yüksek olduğu bulunmuştur [12]. MALAT1, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde metastaz ile ilişkili olduğu bilinen belirgin bir intergenik lncRNA'dır [185]. T yardımcı hücre farklılaşması ve işlevindeki temel rolü aracılığıyla MALAT1 bağışıklık yanıtında önemli rollere sahiptir [186]. MALAT1 doğuştan gelen bağışıklık tepkisini düzenler [187]. Aktive edilen makrofajların, yaralanma onarımına ve fibrozize, alerjik reaksiyona, anjiyogeneze ve tümör ilerlemesine önemli katkıda bulunduğu bilinmektedir. lncRNA MALAT1 ifadesi, farklı şekilde aktive edilen makrofajlarda belirgin bir şekilde düzenlenir [188].

GATA3-AS1, Th2 hücrelerinde eksprese edilen GATA3'e komşu olan yeni bir antisens lncRNA'dır [189]. T hücre gelişimi ve farklılaşması ile ilişkili olduğu düşünülen bu lncRNA, T yardımcı 2 hücrelerinde GATA3 transkripsiyonunu düzenlediği doğrulanmıştır [190]. Yapılan bir çalışmada, GATA3-AS1'nin Th2 hücrelerinde eksprese edildiği ve Th2 sitokinlerin seviyelerin arttığı görülmüştür [189]. Zhu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, eozinofilik astım ve kontrol örnekleri arasında önemli ölçüde farklılık gösterdiği bulunmuştur [191]. Duyarlı cilde sahip hastaların mRNA'ların ve lncRNA'ların kapsamlı bir profilini elde etmek için yapılan bir çalışmada, duyarlı cilde sahip hastalarda GATA3-AS1 ifade seviyesinin sağlıklı bireylere göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir [192]. 5 hasta (Huş polenine alerjisi olan ancak ev tozu akarına alerjisi olmayan mevsimsel alerjik rinitli) ve 5 sağlıklı kontrollerden alınan PBMC'lerin rekombinant Der p 1 ve rekombinant Bet v 1 ile ayrı ayrı uyarıldığı çalışmada CD4+ hücrelerdeki GATA3-AS1 ifade seviyesinin sadece hastalardan alınan ve rekombinant Bet v 1 ile uyarılan hücrelerde arttığı görülmüştür [193]. Alerjik rinitli hastalar ve sağlıklı bireyler ile alerjik rinitli fareler ve kontrol farelerinden nazal mukoza örnekleri alınıp GATA3-AS1 ifade seviyelerine bakılmıştır. GATA3-AS1 ifade seviyesi sağlıklı bireylere kıyasla, alerjik rinitli hastalarda daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca GATA3-AS1 ifade seviyesi kontrol farelere kıyasla, alerjik rinitli farelerde de daha yüksek bulunmuştur [194].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Malzemeler

miRNeasy Serum/Plasma Kiti, miScript II RT Kiti ve miScript SYBR Green PCR Kit, miScript Primer Assay (QIAGEN, ABD), lncRNA için primerler (Integrated DNA Technologies, ABD), Human IL-13 ELISA kiti (Invitrogen, ABD), Human IL-4 ELISA kiti (USCN, Çin), Human IL-10 ELISA kiti, Human TGF- β ELISA kiti (Elabscience, ABD), MicroAmp[®] Fast 96-Well Reaction Plate (0,1 mL) ve Optical Adhesive Covers (Applied Biosystems, ABD) ilgili tedarikçi firmalardan temin edildi. lncRNA'lar için Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix kiti (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanıldı. miRNA izolasyonu için kit haricinde etanol ve kloroform (Merck, Almanya) kullanıldı. Primer Assay'lerin sulandırılmasında kullanılan Tris-EDTA (TE) için daha önce laboratuvarımızda bulunan Tris ve EDTA (Panreac Applichem, İspanya), ve pH ayarlaması için Hidroklorik asit (HCl) (Merck, Almanya) kullanıldı.

3.2. Yöntem

Çalışma kapsamında besin alerjisine sahip hastalar ile sağlıklı çocuklarda (kontrol grubu) seçilen miRNA'ların (miR-98 ve miR-19a) ve lncRNA'ların (lnc-MALAT-1 ve lnc-GATA3-AS1) ifadesindeki değişimi GZ-PZR ile belirleyerek, iki grubu birbirinden ayırt etmeye yarayacak, hastalık patogenezinde önemli olabilecek bir biyobelirteç bulunması hedeflenmiştir.

Ayrıca besin alerjisi ile ve seçilen kodlamayan RNA'lar ile ilişkili olduğunu düşündüğümüz sitokinlerin düzeyleri ELISA yöntemi ile belirlenmiştir.

3.2.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Çalışmamız, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu biriminden 17.04.2020 tarih GO 20/343 sayılı etik kurul onayı (EK-1) alındıktan sonra gerçekleştirildi. Hacettepe Üniversitesi BAP tarafından 18798 proje numarası ile desteklenen çalışmaya Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Alerji

Kliniğine Haziran 2020 ve Ağustos 2021 tarihleri arasında gelen ve hem deri ve kan testleri ile hem de besin yükleme testi ile besin alerjisi doğrulanmış, çalışmaya katılmayı kabul eden 26 besin alerjili çocuk ile 30 sağlıklı çocuk (kontrol grubu) dahil edildi. Kontrol ve hasta grubu için, araştırma amaçlı çalışma için çocuk rıza formu (EK-2) ve ebeveyn aydınlatılmış onam formu (EK-3) imzalatıldı. Bu iki gruptan serum örnekleri alındı. Bu örneklerden aşağıda belirtilen yöntemler kullanılarak ifade analizlerinde kullanılmak üzere RNA elde edildi ve ayrıca serum örneklerinde sitokin proteinlerinin seviyeleri ELISA ile belirlendi.

Hasta ve Kontrol Çalışma Kriterleri:

Aşağıda belirtilen durumlarda hasta ve sağlıklı çocuklar çalışmaya dahil edilmiştir.

Besin alerjisi grubunda;

Herhangi bir besine karşı spesifik IgE ≥ 0.35 IU/L

Epidermal prik testinde negatif kontrole göre 3 mm ve daha fazla kabarıklık olması

Klinik olarak semptomların varlığı olması

Sağlıklı kontrol grubunda ise;

Besin alerjisi ve atopisi olmaması

3.2.2. Örneklerin Elde Edilmesi

Çalışmaya katılan sağlıklı ve besin alerjisine sahip çocuklardan, jelli tüpe 2 ml kan alındı. Tüpler bir saat içerisinde $+4^{\circ}\text{C}$ ' de 3000 x rpm'de santrifüj edildi ve serum örnekleri 250-300 μl olacak şekilde steril ependorflara aktarıldı. Serum örnekleri miRNA izolasyonu yapılana kadar veya ELISA testinde kullanılıncaya kadar -80°C ' de saklandı.

3.2.3. Belirlenen miRNA'ların ve lncRNA'ların Hazırlanması

Çalışmaya alerjik hastalıklarla ilişkisi olabileceği düşünülen 2 farklı miRNA (miR-19a ve miR-98) ve 2 farklı lncRNA (MALAT1 ve GATA3-AS1) aday olarak seçildi. Seçilen miRNA'lara ve lncRNA'lara ait primerler tedarikçi firmadan satın alındı. 10x

miScript primer assayleri (liyofilize halde) sulandırmadan önce kısa bir süre santrifüjlendi. 550 µl Tris/EDTA (pH 8.0) eklendi ve 3-5 kez vorteksleyerek karıştırıldı.

20 ml, pH 8.0 TE hazırlamak için 0.024 gr Tris ve 0.006 gr EDTA tartıldı. Bu karışımın üzerine önce 10 ml distile su konuldu ve karıştırıldı. pH 8 olana kadar HCl eklendi. Sonra çözeltiye 20 ml'ye kadar distile su konuldu. Sonra çözelti otoklav kullanılarak sterilize edildi.

Satın alınan IncRNA primerleri protokolde yazan miktarlara göre steril distile su ile sulandırıldı.

3.2.4. miRNA İzolasyonu

miRNA izolasyonu miRNeasy Serum/Plasma Kit kullanılarak tedarikçi firmanın talimatlarına uygun olarak aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

- 1- 200µl serum örneği ependorf tüplere alındıktan sonra üzerine 1000 µl trizol içeren liziz solüsyonu eklendi ve vortekslendi.
- 2- Tüpler oda ısısında 5 dakika bekletildi.
- 3- Daha sonra 3,5 µl sulandırılmış spike-in kontrol miRNA ($1,6 \times 10^8$ kopya/µl) tüplere ilave edildi ve karıştırıldı.
- 4- 200 µl kloroform eklendi ve 25 saniye alt üst edilerek çalkalandı.
- 5- Tüpler oda ısısında 2-3 dakika bekletildi.
- 6- $\geq 12000 \times g$ 'de $4^\circ C$ 'de 15 dakika santrifüj edildi.
- 7- Üstteki renksiz sıvı faz (600 µl) yeni bir tüpe aktarıldı. Üzerine 900 µl % 100 etanol ilave edilip pipetaj yapıldı.
- 8- Örneğin 700 µl'si kolona aktarıldıktan $\geq 8000 \times g$ 'de 25 saniye oda ıssında santrifüj edildi ve artan hacim var ise bu işlem tekrar edildi.
- 9- Kolona 700 µl RWT eklendikten sonra $\geq 8000 \times g$ 'de 25 saniyede santrifüj edildi.
- 10- Alttaki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra kolona 500 µl RPE tamponu ilave edilerek $\geq 8000 \times g$ 'de 25 saniye santrifüj edildi.
- 11- Alttaki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra kolona 500 µl % 80 Etanol ilave edilerek $\geq 8000 \times g$ 'de 2 dakika santrifüj edildi.

- 12-** Kolonlar yeni toplama tüpüne yerleştirildikten sonra kapakları açık olarak en yüksek devirde 5 dakika santrifüj edildi.
- 13-** Kolonlar yeni tüplere alındıktan sonra üzerine 14µl RNAaz içermeyen su ilave edildi. Tüpler en yüksek devirde 1 dakika santrifüj edildi.
- 14-** Nanodrop (Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers) ile RNA'nın miktarı ve kalitesi ölçüldü.

3.2.5. cDNA Sentezinin Yapılması

Elde edilen miRNA'dan, miScript II RT Kit (QIAGEN, Germantown, Maryland, ABD) kullanılarak ve üretici firmanın talimatları takip edilerek GZ-PZR'da kullanılmak için komplementer DNA (cDNA) üretildi. Reaksiyonda kullanılan kit içeriği ve miktarları aşağıda belirtildiği şekildedir.

Reaksiyon içeriği	Reaksiyon başına gerekli miktar/hacim
RNA 50 ng-200 ng	X µL
5x miScript HiFlex Tampon	4.0 µL
miScript Ters Transkriptaz Karışımı	2.0 µL
dNTP Karışımı	2.0 µL
RNaz içermeyen su	Y µL
Son hacim	20 µl

İzole ettiğimiz miRNA'lardan 200 ng olacak şekilde hesaplanarak karışıma eklendi. Son hacim su ile 20µl' ye tamamlandı. Tüpler 37°C' de 1 saat, 5 dakika 95 °C'de (enzimin denatürasyonu) inkübe edildi. Örnekler GZ-PZR reaksiyonunda kullanılmak üzere -20 °C'de dondurucuda saklandı.

3.2.6. miRNA İfade Analizlerinin Yapılması

Çalışmada, literatür araştırması sonucu besin alerjisi ilgili olduğu düşünülen 2 miRNA ve 2 lncRNA'larının ifadesindeki değişikliklerin değerlendirilmesi amaçlandı.

İfade analizi miScript SYBR Green Kiti kullanılarak, Moleküler Biyoloji ABD Araştırma Laboratuvarında yer alan Applied Biosystem Fast 7500 Real Time PCR System cihazı ile yapıldı. Bu metotta SYBR Green boyası çift sarmal DNA'nın küçük girintisine bağlanır ve bunun sonucunda floresans ışıması meydana gelir. Her PZR döngüsünde örnek içerisindeki hedef miRNA miktarına artıka floresan ışıması da buna bağılı olarak artmaktadır.

Çizelge 3.1. Çalışma için seçilen miRNA dizileri

miRNA	miRNA dizisi
hsa-miR-19a	AGUUUUGCAUAGUUGCACUACA
hsa-miR-98	UGAGGUAGUAAGUUGUAUUGUU

GZ-PZR reaksiyonlarında cDNA örneklerinin 1-2 µl'si kullanıldı. Her bir koşul iki kez tekrar edilecek şekilde karışımlar aşağıda belirtilen şekilde yapıldı.

GZ-PZR Reaksiyon karışımı (96 kuyucuklu plak için)	
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	7,5µl
10x miScript Universal Primer	1,5 µl
10xmiScript Primer Assay	1,5 µl
Kalıp cDNA	12 µl
RNAaz içermeyen su	2,5-3,5 µl
Toplam	15 µl

Gerçek zamanlı döngüleyici

- 1- 95°C'de 15 dakika (ilk aktivasyonu)
- 2- 94°C'de 15 saniye (denatürasyon)
- 3- 55°C'de 30 saniye (bağlanma)

4- 70°C’de 30 saniye (uzama ve floresan veri toplama olarak) programlandı. 2-4 arası basamaklar 45 döngü olarak uygulandı. Plak gerçek zamanlı döngüleyiciye yerleştirildi ve program başlatıldı.

Hesaplamalarda PZR reaksiyonundaki hedef konsantrasyonunun nispi bir ölçüsü olan Ct (eşik döngüsü), eşik değeri kullanıldı. Çalışmada, miR-16’nın ortalama Ct değerleri belirlenerek, elde edilen verilerin normalizasyonu yapıldı.

3.2.7. lncRNA İfade Analizlerinin Yapılması

Çizelge 3.2’ de primer dizileri verilen lncRNAların ifade düzeyleri SYBR Green yöntemi ile “Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix” kiti kullanılarak belirlendi. cDNA örneklerinin 1µl’si kullanıldı. Her bir koşul iki kez tekrar edilecek şekilde karışımlar aşağıda belirtilen şekilde hazırlandı.

- 1- Çözdükten sonra tüm solüsyonları hafifçe vortekslendi ve kısa süre santrifüj edildi.
- 2- Aşağıdaki bileşenler (kalıp DNA hariç) eklenerek bir reaksiyon ana karışımı elde edildi.

GZ-PZR Reaksiyon karışımı (96 kuyucuklu plak için)	
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	5 µl
Direkt Primer (0,1 µM)	0,3 µl
Ters Primer (0,1 µM)	0,3 µl
Kalıp cDNA	1-2 µl
Nükleaz içermeyen su	2,5-3,5 µl
Toplam	10 µl

- 3- Ana karışım iyice karıştırıldı ve PCR plakalarına uygun hacimleri dağıtıldı.
- 4- Ana karışımı içeren her bir kuyucuğa kalıp cDNA (≤ 500 ng / reaksiyon) eklendi.

- 5- Reaksiyonlar kabarcık oluşturmada hafifçe karıştırıldı. Gerekirse kısa süre santrifüjlenmesi gerekir çünkü kabarcıklar floresan tespitine müdahale eder.
- 6- Termal döngüleyiciyi aşağıdaki önerilere göre programlandı, örnekler döngüleyiciye yerleştirildi ve programı başlatıldı.

Gerçek zamanlı döngüleyici

- 1- 95°C'de 10 dakika (ilk aktivasyonu)
- 2- 94°C'de 15 saniye (denatürasyon)
- 3- 60°C'de 30 saniye (bağlanma)
- 4- 72°C'de 30 saniye (uzama ve floresan veri toplama olarak) programlandı.

2-4 arası basamaklar 45 döngü olarak uygulandı. Plak gerçek zamanlı döngüleyiciye yerleştirildi ve program başlatıldı.

Çizelge 3.2. lncRNAlara ait primer dizileri

Gen	Direkt Primer	Ters Primer
GATA3-AS1	TGCTGACTTCTGAGGCTAAG	CCTTGCGCCCTGCAGAAG
MALAT1	GAATTGCGTCATTAAAGCC TAGTT	GTTTCATCCTACCACTCCCAA TTAAT

3.2.8. ELISA İle Sitokin/Kemokin/ Büyüme Faktörlerinin Ölçümü

IL-4, IL-10, IL-13 ve TGF- β ölçümü için kolorimetrik ELISA yöntemi kullanıldı. ELISA yöntemi kitin temin edildiği üretici firmanın direktifleri doğrultusunda gerçekleştirilmiş olup temel basamakları içeren genel işleyiş şeması aşağıda özetlendi.

- 1- Yakalayıcı antikor ile kaplı plaklardaki kuyucuklara standartlar ve örnekler ilave edildi ve belirtilen süre oda ısısında inkübe edildi.
- 2- Süre sonunda bağlanmayanlar yıkanarak uzaklaştırıldı.
- 3- Enzimle konjuge ikincil antikor ilave edildi ve belirtilen süre oda ısısında inkübe edildi.
- 4- Bağlanmayanlar yıkanarak uzaklaştırıldı.
- 5- Enzime özgü substrat ilave edildi ve belirtilen süre oda ısısında inkübe edildi.

6- Reaksiyon durduruldu ve elde edilen sinyal uygun okuyucu cihazda (kolorimetre) ölçüldü.

7- Elde edilen standart grafikten örneklerin konsantrasyonları belirlendi.

3.2.9. Verilerin Toplanması

Araştırma bünyesinde herhangi bir anket formu doldurulmadı ancak muayene veya izleme sürecinde hastaların yaş, eozinofil sayısı, eozinofil yüzdesi, sIgE seviyeleri ve deri prick testi verileri kaydedildi. Uygulanacak olan laboratuvar teknikleri ve analizleri esnasında sağlanacak veriler ve yukarıda belirtilen veriler kullanılarak ifadedeki farklılıkların hastalık ve hastalık şiddeti ile ilişki olup olmadığına bakıldı.

3.2.10. İstatistiksel Analizler

İfade analizlerinde hedef miRNA ve lncRNA'ların ifadesi için kontrol miRNA olarak miR-16 [195,196] ve lncRNA kontrolü olarak uzama faktörü 1-alfa (EF1- α) genleri kullanılarak elde edilen değerler normalize edildi. Sonuçlar $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak analiz edildi. Hastalık durumuna göre gruplar arası fark olup olmadığı araştırıldı.

miRNA ve lncRNA'ların ifade düzeylerinde gözlemlenebilecek olan değişkenliklerin eozinofiller, IgE gibi önemli atopi fenotipleri ve sitokin düzeyleri ile olan ilişkisi bivariate spearman's rho korelasyon analizi yapılarak değerlendirildi. Cinsiyet gibi kategorik değişkenler Ki-kare testi veya Fisher'in kesin testi uygulandı. Çalışmanın tüm verileri SPSS 15 yazılımı kullanılarak analiz edildi. İki grubun verileri normal dağılıp dağılmadığına bakıldıktan sonra parametrik veya non-parametrik (Mann whitney u testi) analizler olarak yapıldı. Çalışmadan elde edilen tüm verilerde $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. SONUÇLAR

4.1.1. Hastalara Ait Demografik ve Klinik Bulgular

Bu çalışmaya, kontrol grubunda 30 sağlıklı (besin alerjisi olmayan) çocuk, hasta grubu ise 26 besin alerjili çocuk olmak üzere toplam 56 gönüllü çocuk dâhil edildi. Kontrol grubundaki 30 gönüllü çocuktan 6'sı kız (% 20), 24'ü erkek (% 80) olup yaş ortalamaları $4,53 \pm 2,255$ olarak bulundu. Hasta grubunda ise besin alerjili 26 çocuktan 5'i kız (% 19,23), 21'i erkek (% 80,77) olup yaş ortalamaları $4,54 \pm 2,775$ olarak bulundu. Gruplar arasında yaş ve cinsiyet açısından anlamlı bir fark yoktur ($p=0.994$).

Çizelge 4.1. Besin alerjili ve kontrol grupların cinsiyet dağılımları

		Gruplar					
		Kontrol		Hasta (Besin Alerjili)			
		N	%	N	%	N	%
Cinsiyet	Kız	6	% 20	5	% 19,23	11	% 19,64
	Erkek	24	% 80	21	% 80,77	45	% 80,36
Toplam		30		26		56	

Çizelge 4.2. Besin alerjili ve kontrol grupların yaş ortalamaları

Gruplar	N	Ortalama	Standart Sapma
Kontrol	30	4,53	2,255
Besin Alerjili	26	4,54	2,775
Toplam	56	4,53	2,486

Çalışmaya katılan besin alerjili çocuklara ait total IgE, eozinofil sayısı ve eozinofil yüzdesi gibi klinik veriler Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Çalışmaya katılan hastalara ait bazı klinik veriler

	N	Ortanca	Çeyrekler açığı (25-75. çeyreklik)
Total IgE (UI/ml)	23	222	115-597
Eozinofil sayısı (10 ³ µl)	26	0,4	0,2-0,5
Eozinofil yüzdesi (%)	26	4,85	2,775-6,625

Çalışmaya katılan besin alerjili çocuklara ait sIgE değerleri Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Çalışmaya katılan besin alerjili çocuklara ait sIgE değerler

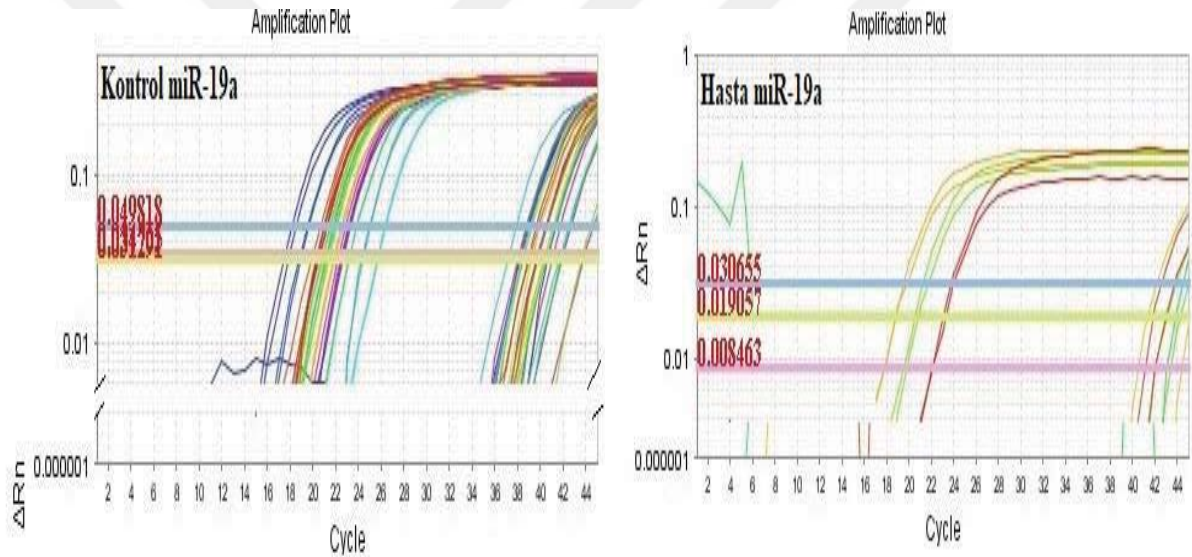
Hasta no	Besinler	sIgE (kU/L)
Hasta-1	Süt	5,6
Hasta-2	Süt	8,89
Hasta-3	Süt	8,91
Hasta-4	Süt/ Yumurta akı	102/ 39,2
Hasta-5	Süt/ Yumurta akı/ Yumurta Sarısı/ Bezelye	211/ 60,9/ 32,3/ 59,4
Hasta-6	Süt	54,1
Hasta-7	Süt	12,7
Hasta-8	Fındık/ Fıstık/ Kaju/ Badem	0,11/ 0,04/ 0,28/ 0,04
Hasta-9	Süt	6,68
Hasta-10	Süt/ Yumurta akı	1,80/ 0,83
Hasta-11	Süt, Yumurta akı	8,26, 0,43
Hasta-12	Kaju, Ceviz, Kivi	3,65/ 1,48/ 1,03
Hasta-13	Süt/ Kaju/ Antep fıstığı	0,87/ 0,07/ 0,5
Hasta-14	Fındık/ Fıstık/ Kaju/ Ceviz/ Badem/ Antep fıstığı	39,5/ 2,83/ 55,5/ 44,0/ 11,2/ 74,1
Hasta-15	Ceviz/ Badem/ Antep fıstığı	41,8/ 4,87/ 45,8
Hasta-16	Fıstık/ Antep fıstığı	0,01/ 0,32
Hasta-17	Süt/ Kazein	>200/ >200
Hasta-18	Ceviz	4,59
Hasta-19	Süt/ Kazein/ Kaju/ Ceviz/ Badem/ Antep fıstığı	5,44/ 2,76/ 0,69/ 1,11/ 0,54/ 1,70
Hasta-20	Fındık/ Fıstık/ Kaju/ Ceviz/ Antep fıstığı	4,66/ 0,14/ 5,33/ 3,77/ 5,76
Hasta-21	Kaju/ Ceviz	1,73/ 14,3
Hasta-22	Fındık/ Fıstık/ Kaju/ Ceviz/ Badem/ Antep fıstığı	4,3/ 6,43/ 3,56/ 8,02/ 2,50/ 5,49
Hasta-23	Fındık/ Fıstık/ Kaju/ Antep fıstığı	7,35/ 0,80/ 1,84/ 3,23
Hasta-24	Süt/ Fındık/ Ceviz	13,7/ 1,76/ 1,33
Hasta-25	Fındık/ Antep fıstığı	0,34/ 6,54
Hasta-26	Fındık/ Fıstık/ Ceviz/ Badem/ Antep fıstığı/ Susam	30,1/ 3,05/ 114/ 3,2/ 14,2/ 9,26

4.1.2. Hasta Grubunda miRNA ve lncRNA İfade Analizleri

Çalışma kapsamında seçilen miRNA ve lncRNA'ların ifade seviyeleri besin alerjesine sahip çocuklar ile sağlıklı çocuklar (kontrol grubu) arasında kıyaslandı. Kontrol grubundaki bireylerin ΔCT değerlerinin ortalaması hesaplanıp ortalamaya en yakın olan bireyin miRNA ve lncRNA ifade düzeyi $2^{-\Delta\Delta CT} = 1$ olarak kabul edildi ve kontrol grubundaki diğer bireylerin ve besin alerjili hastalardaki ifade değişimleri bu referans bireydeki ifade düzeyi ile kıyaslanarak yapıldı.

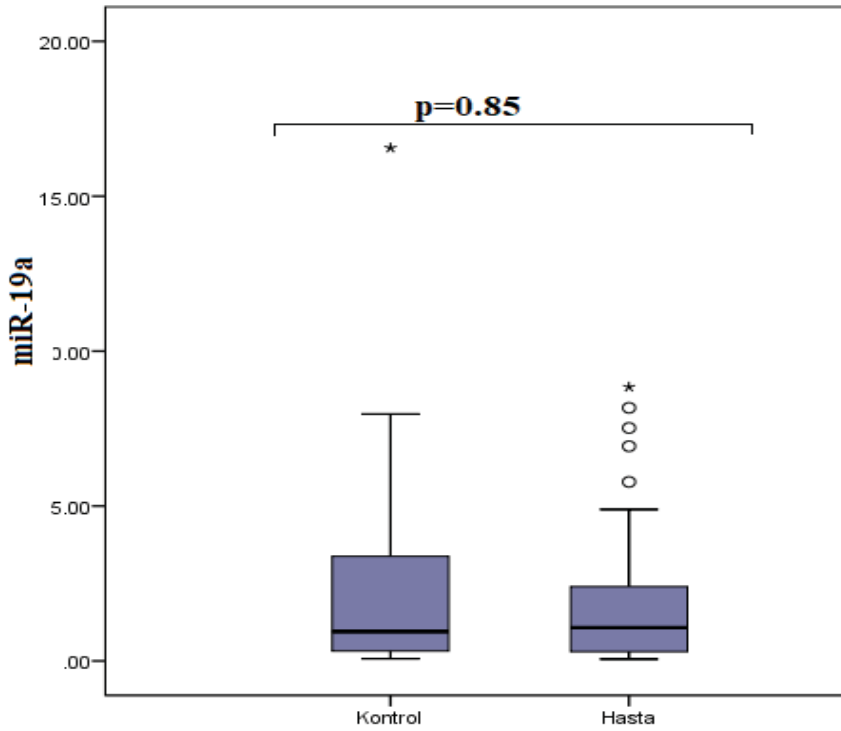
miR-19a ifade analizi

Çalışmamızın sonucunda elde edilen hasta ve kontrol grubuna ait miR-19a Ct değerlerinin grafiksel olarak gösterimi Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Hasta ve kontrol grubuna ait miR-19a Ct değerlerinin grafiksel olarak gösterimi

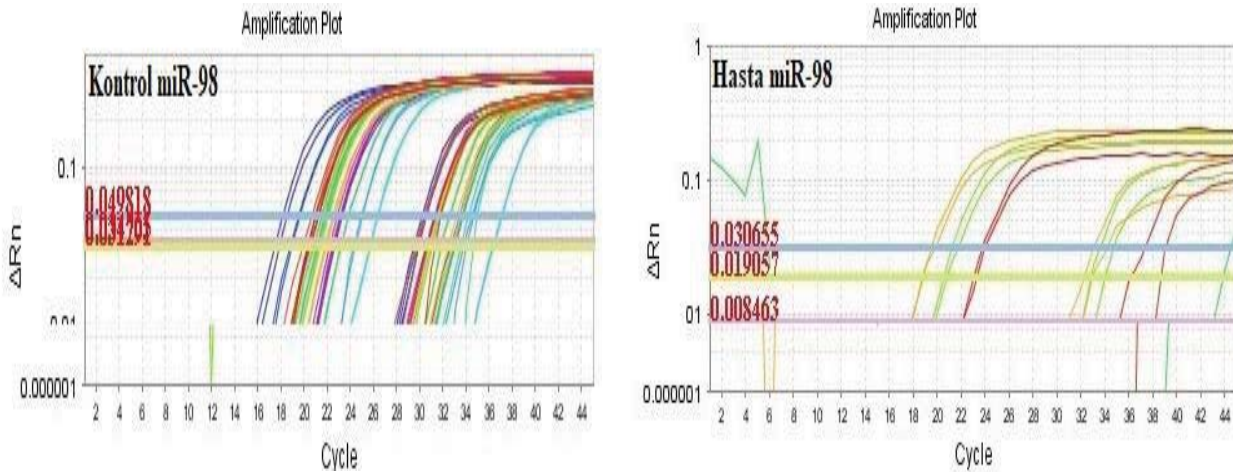
miR-19a için hesaplanan $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri iki grup arasında kıyaslandığında besin alerjili çocuklar ile sağlıklı çocuklar arasındaki gen ifade seviyelerinde bir fark görülmemiştir ($p=0,85$).



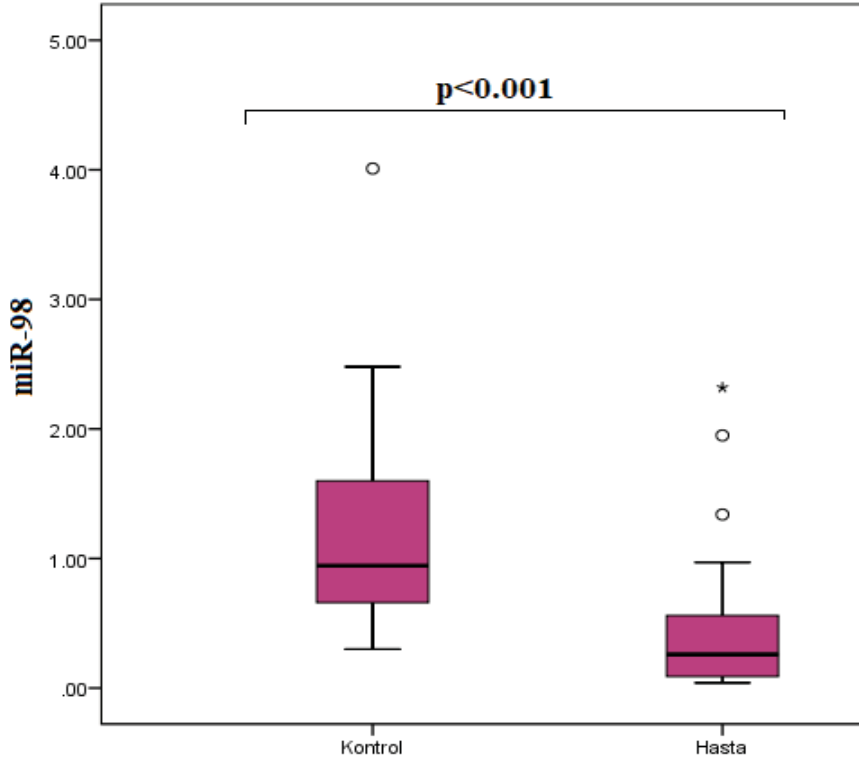
Şekil 4.2. Besin alerjili hastalar ile kontrol grubuna ait miR-19a ifadelerinin karşılaştırılması (Kontrol için; ortanca: 0,95, 25-75. çeyreklik: 0,3075-3,4625, Hasta için; ortanca: 1,075, 25.-75. çeyreklik: 0,2750-3,0225)

miR-98 ifade analizi

Çalışmamızın sonucunda elde edilen hasta ve kontrol grubuna ait miR-98 Ct değerlerinin grafiksel olarak gösterimi Şekil 4.3’de verilmiştir. miR-98’in hesaplanan $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri besin alerjili çocuklar ile, sağlıklı çocuklar arasında kıyaslandığında daha az ifade edildiği görülmüştür ($p<0,001$).



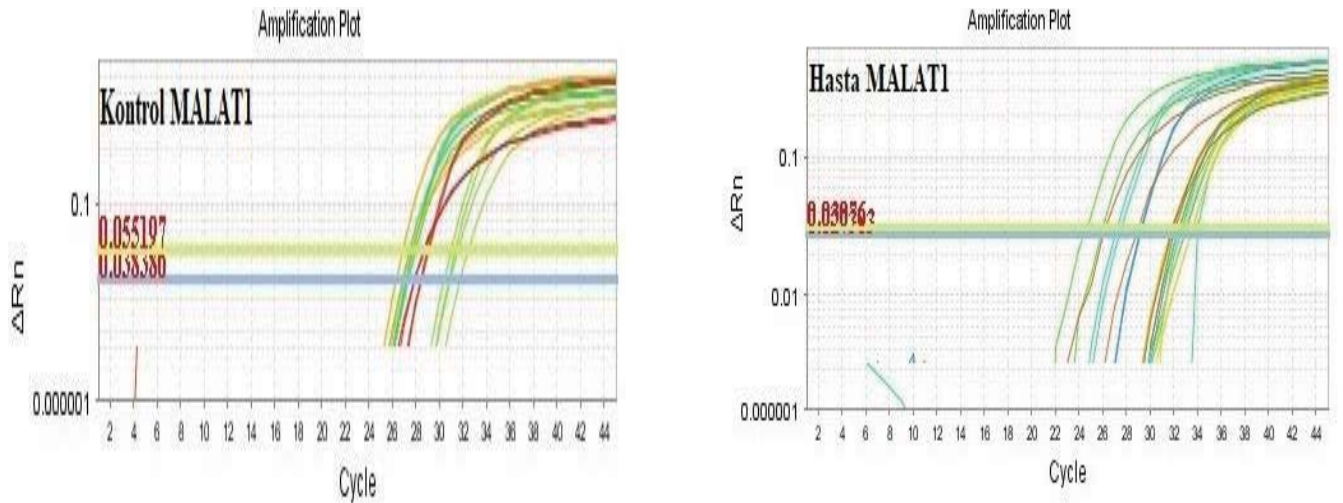
Şekil 4.3. Hasta ve kontrol grubunda miR-98 Ct değerlerinin grafiksel olarak gösterimi



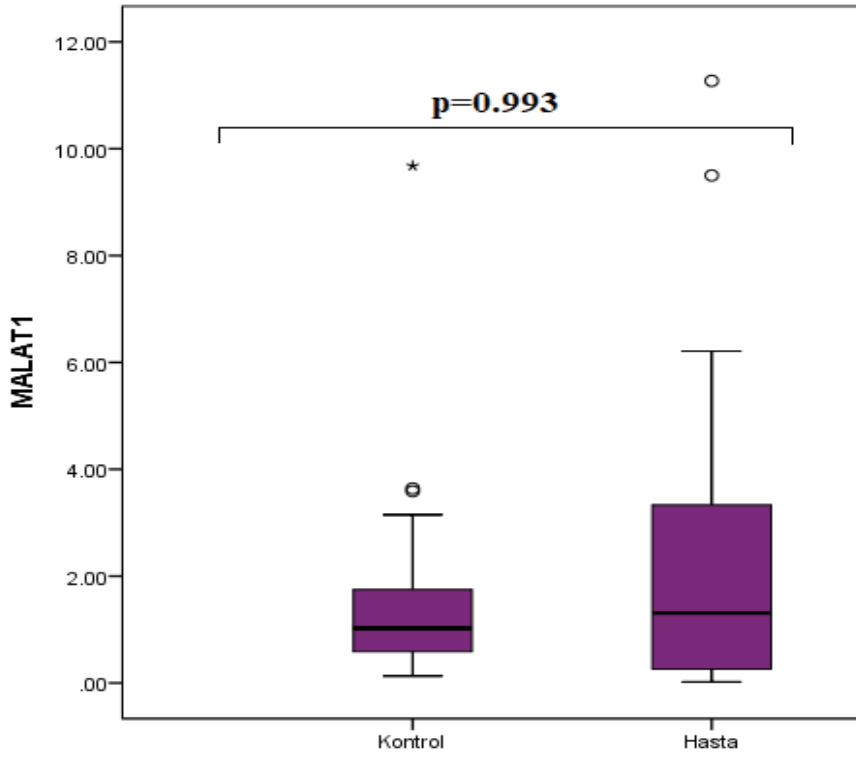
Şekil 4.4. Besin alerjili ile kontrol grubuna ait miR-98 ifadelerinin karşılaştırılması (Kontrol için; ortanca: 0,945, 25-75. çeyreklik: 0,65-1,6025, Hasta için; ortanca: 0,26, 25-75. çeyreklik: 0,0875-0,57)

MALAT1 ifade analizi

Çalışmamızın sonucunda elde edilen hasta ve kontrol grubuna ait MALAT1 Ct değerlerinin grafiksel olarak gösterimi Şekil 4.5’de verilmiştir MALAT1’in gen ifade seviyelerinde kontrol grup ile hastalar arasında fark tespit edilmemiştir (p=0,993).



Şekil 4.5. Hasta ve kontrol grubunda MALAT1 Ct değerlerinin grafiksel olarak gösterimi



Şekil 4.6. Besin alerjili ile kontrol grubun MALAT1 ifadelerinin karşılaştırılması (Kontrol için; ortanca: 1,025, 25-75. çeyreklik: 0,5675-1,7775, Hasta için; ortanca: 1,31, 25-75. çeyreklik: 0,2475-3,36)

GATA3-AS1 ifade analizi

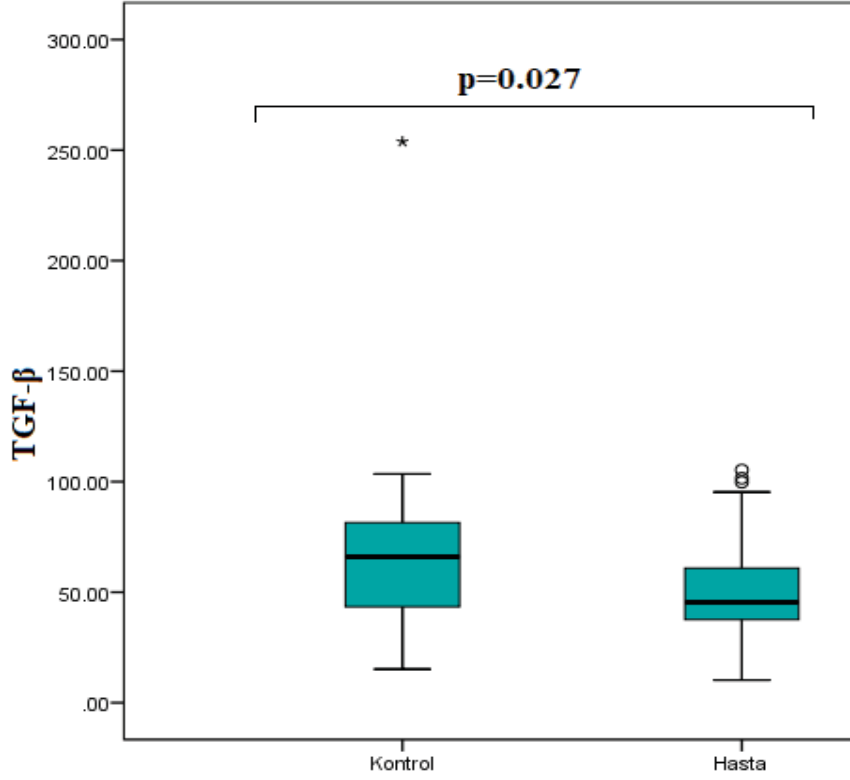
Serum örneklerinden elde edilen RNA'lar kullanılarak gerçekleştirilen GZ-PCR sonucunda GATA3-AS1 genine ait floresan sinyal elde edilememiştir.

4.1.3. Serum örneklerinde IL-4, IL-10, TGF- β ve IL-13 protein seviyeleri

Besin alerjili grup ile sağlıklı gruptan elde edilen serum örneklerinde bulunan IL-4, IL-10, TGF- β ve IL-13 proteinlerin seviyeleri ELİSA yöntemi ile belirlendikten sonra elde edilen ölçüm değerleri açısından iki grup arasında fark olup olmadığı istatistiksel yöntemler kullanılarak araştırılmıştır.

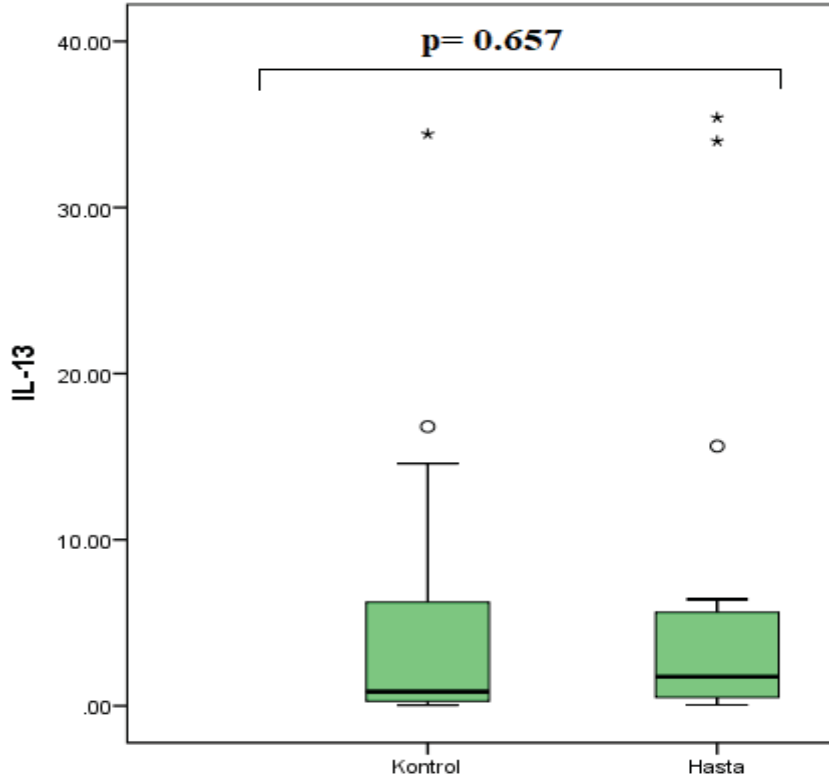
Besin alerjili ve sağlıklı grupların serum örneklerinde IL-4 ve IL-10 proteinleri ölçülebilir düzeyde bulunamamıştır.

Yapılan analiz sonucunda, besin alerjili grubun serum örneklerinde TGF- β protein seviyesinin kontrol grubun serum örneklerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı bulunmuştur ($p=0,027$).



Şekil 4.7. Besin alerjili gruptan ve sağlıklı gruptan elde edilen serum örneklerinde TGF- β protein seviyelerinin karşılaştırılması (Kontrol için; ortanca: 65,98, 25-75. çeyreklik: 43,07-81,59, Hasta için; ortanca: 45,39, 25-75. çeyreklik: 35,76-61,31)

Besin alerjili grubun serum örneklerinde IL-13 protein seviyesi kontrol grubun serum IL-13 seviyelerinden farklı bulunmamıştır ($p=0,85$).



Şekil 4.8. Besin alerjili gruptan ve sağlıklı gruptan elde edilen serum örneklerinde IL-13 protein seviyelerinin karşılaştırılması (Kontrol için; ortalanca: 0,8495, 25-75. çeyreklik: 0,258-7,293, Hasta için; ortalanca: 1,759, 25-75. çeyreklik: 0,409-6,146)

4.2. TARTIŞMA

Besin alerjisi, besine yönelik olumsuz bir immünolojik yanıt olarak tanımlanır [21]. Yaşamı tehdit eden anafilaktik reaksiyonlara neden olabilen besin alerjileri giderek daha yaygın hale gelmekte ve yaşam kalitesinin bozulmasına neden olmaktadır [197]. Yaygın hale gelmesinin sebeplerinden birinin de epigenetik mekanizmalar olduğu düşünülmektedir. Epigenetik mekanizmalardan biri olan miRNA ve lncRNA'ların ifade paterni, farklı hücre tiplerine ve hastalık koşullarına göre değişebildiği ve serum, idrar ve tükürük gibi farklı vücut sıvılarında tespit edilebildiği için önemli biyobelirteçler olabilme potansiyeline sahiptirler [9,10].

Çalışmamızda literatür taraması sonucunda besin alerjisi ile ilişkisi olabileceğini düşündüğümüz miRNA'ların (miR-19a ve miR-98) ve lncRNA'ların (MALAT1 ve

GATA3-AS1) ifade düzeylerini GZ-PZR ile belirledik. Yapmış olduğumuz bu çalışmaya; besin alerjisi hastalığının aydınlatılmasında rol oynayabilecek aday miRNA'ların ve lncRNA'ların ifadelerindeki değişimi saptayabilmek için kontrol grubuna (besin alerjisi olmayan) 30 çocuk, hasta gruba (besin alerjili) 26 çocuk katıldı. Çalışmaya dahil edilen gruplar arasında ortalama yaş ve cinsiyet dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

miR-17~92 kümesinin bir üyesi olan miR-19a, NF-KB, JAK-STAT ve PI3K yollarının inhibitörlerini aynı anda hedefleyerek Th2 sitokin üretimini destekler. Ayrıca miR-19a'nın alerjik enflamasyonda yükseldiği ve IL-5 ve IL-13 üretimini desteklediği görülmüştür [198]. 4 hafta süreyle ovalbümin ve kolera toksini verilerek oluşturulan fare modelinde, 5 hafta sonunda bağırsaklarından elde edilen B hücrelerindeki miR-19a ifade seviyeleri, kontrol gruba kıyasla daha yüksek bulunmuştur [199]. BALB/c fareler kullanılarak oluşturulan başka bir besin alerjisi fare modelinde ise bu farelerin bağırsağından izole edilen CD35+B hücrelerin miR-19a ifade seviyeleri, kontrol farelere kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada orijinal olarak trombositlerde bulunan ve bağışıklık düzenlenmesinde rol oynayan Trombospondin-1 (TSP1) ile miR-19a arasında negatif bir ilişki olduğu görülmüştür [178]. 5-6 haftalık dişi BALB/c fareler Freund adjuvanı içinde çözülmüş 0,2 mL 1 mg/mL β -LG (süt alerjeni) intraperitoneal olarak haftalık olarak enjekte edilerek duyarlılaştırılmış ve 28. günde, bu farelere ağızdan iki kez 20 mg β -LG verilmiştir (β -LG alerjili fare modeli oluşturmak için). Daha sonra alerjik farelerin ve sadece steril salin verilen kontrol grubuna ait farelerin kanları ve kolon doku örnekleri alınmış ve yapılan analizler sonucunda alerjik grupta miR-19 ifade seviyesi ve serum IL-13 sitokin seviyesi kontrol grubu kıyasla daha yüksek bulunmuştur [200].

Çalışmamız sonucunda hasta ve kontrol grupları arasında miR-19a gen ifade seviyeleri kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Ancak miR-19a seviyeleri ile hasta eozinofil sayıları arasında negatif bir korelasyon bulunmuştur ($p=0.009$, $r=-0.505$).

Çalışmamızda seçilmiş olan bir diğer miRNA olan miR-98, Let-7 ailesinin önemli bir üyesidir. miR-98, T hücresi aracılı bağışıklık tepkisinin düzenleyicisi olarak hizmet edebilmektedir [179]. Xie ve Xu'nun çalışmasında, sağlıklı donörlerle karşılaştırıldığında, sistemik lupus eritematozuslu (SLE) hastaların CD4+ T hücrelerinde miR-98'in daha az ifade edildiği görülürken Fas mRNA ve protein seviyesinin ise daha fazla olduğu bulunmuştur [201]. 41 SLE hastasının ve 20 sağlıklı

kişinin katıldığı bir başka çalışmada, bu kişilerin PBMC'lerinde miR-98'in ifade düzeyi, kontrol gruba kıyasla daha düşük bulunmuştur. Ayrıca miR-98 ifade seviyesi ile IL-6 protein seviyesi arasında negatif bir ilişki bulunmuştur. IL-6 aşırı ifadesi, PBMC'lerin çoğalmasını desteklediği ve TNF- α , IL-8, IL-1 β ve IL-10 seviyelerini arttırdığı bulunmuştur. Bu çalışma miR-98'in, hedef geni IL-6 aracılığıyla STAT3 fosforilasyon seviyelerini düzenlediğini göstermiştir [202]. Yapılan bir çalışmada inaktif ülseratif kolit hastalarının (n= 19) miR-98 ifade seviyeleri aktif ülseratif kolit hastaları (n=20) ve kontrol grubuna (n=20) kıyasla 10 kat daha yüksek bulunmuştur [203]. Xie ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, yer fıstığı ekstraktına maruz bırakılan farelerin lamina propria mononükleer hücrelerinden (LPMC) CD4+ hücreler izole edilmiş ve miR-98 ve IL-10 mRNA ifade seviyelerine bakılmıştır. Bunun sonucunda miR-98 ifade seviyesinde artış bulunurken IL-10 mRNA ifade seviyesinde ise azalış bulunmuştur. miR98 ifade seviyesi ile IL-10 mRNA ifade seviyelerinde arasında negatif bir ilişki bulunmuştur. Ayrıca miR-98 ile bağışıklık fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynadığı bilinen galektin-1 (Gal 1) arasındaki ilişkiye bakılmış, Gal1'in CD14 + hücrelerde miR-98'i baskıladığı bulunmuştur [171]. Midyat ve arkadaşlarının çalışmasında ise literatürdeki diğer çalışmalarla çelişkili olarak, miR-98'in ifade düzeyi orta derece persistan/şiddetli astımlı çocuklarda kontrol grubu çocuklarına göre anlamlı olarak daha yüksek (iki kattan fazla) bulunmuştur [204].

Çalışmamız sonucunda miR-98 gen ifade düzeyi besin alerjili çocuklar ve sağlıklı kontroller arasında kıyaslandığında iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunmuştur ($p<0,05$). Elde ettiğimiz ifade sonuçları literatürdeki diğer çalışmalarda elde edilmiş olan sonuçlarla uyumlu olmakla beraber, çalışmamızda besin alerjili hastalardaki miR-98 seviyeleri ile IL-13 seviyeleri arasında pozitif bir korelasyon ($p=0,032$, $r=0,494$) bulunmuş olsa da, her iki çalışma grubu bir arada değerlendirildiğinde miR-98 seviyeleri ile IL-13 seviyeleri arasında bir korelasyon bulunmamıştır ($p=0,273$, $r=0,175$).

772 astım hastası 441 sağlıklı gönüllünün katıldığı bir çalışmada MALAT1 ifade seviyelerine bakılmıştır. Çalışma sonucunda hasta grubundaki MALAT1 ifade seviyesi kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA) olan hastalardan (8 erkek ve 2 kadın) ve kontrol grubundan (4 erkek 6 kadın) alınan akciğer dokusu biyopsi örneklerinde KOA'lı hastaların MALAT1 ifade düzeyleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek

bulunmuştur [205]. Qiu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada astımlı hastalardan alınan CD4+ hücrelerde MALAT1'in sağlıklı hastalara kıyasla daha fazla ifade edildiği görülmüştür [206].

Çalışmamızda MALAT1'in ifade seviyelerinde kontrol grup ile kıyaslandığında iki grup arasında bir fark görülmemiştir ($p>0,05$). Bu çalışmalarda doku örnekleri veya enflamatuvar hücreler kullanılmıştır. Oysa bizim çalışmamızda serum örnekleri kullanılmış olup, bu yüzden gruplar arasında fark tespit edilmemiş olabilir.

GATA3 genine komşu olan GATA3-AS1, Th2 hücrelerinde eksprese edilen ve T hücre gelişimi ve farklılaşması ile ilişkili olduğu düşünülen yeni bir antisens lncRNA'dır [189]. GATA3-AS1'in Th2 hücrelerinde GATA3 transkripsiyonunu düzenlediği doğrulanmıştır [190]. Yapılan çalışmalar eozinofilik astımda ve duyarlı cilde sahip hastalarda GATA3-AS1 ifade seviyesinin sağlıklı bireylere göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir [191,192]. Ayrıca alerjik rinitli hastalar ve fare modelleri kullanılarak yapılan çalışmalarda nazal mukoza örneklerinde GATA3-AS1 ifadesini arttığı gösterilmiştir [193,194].

Tez çalışması kapsamında GATA3-AS1 geni analizi sonucunda iki grupta da serumda ölçülebilir düzeyde GATA3-AS1 lncRNA'sına rastlanmamıştır. GATA3-AS1 çekirdekte lokalize olur ve Th2 hücre polarizasyonu sırasında ifadesi artar [189]. Serumda bulunduğu dair literatürde bilgiye rastlanamamıştır. Çalışmamızda GATA3-AS1'in ölçülebilir düzeyde bulunmamasının hücre içinde lokalize olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Hedef tahmin programları TargetScan (<http://www.targetscan.org/>), miRDB (<http://mirdb.org/>) ve miRBase (<https://www.mirbase.org/>) kullanılarak yapılan analiz ile, IL-10, IL-6, IL6R, IL-8, IL-13, TGFBR1, TGFBR3 ve IL22RA1 genlerinin 3'-UTR'lerinin miR-98'in varsayılan bağlanma bölgelerini içerdiğini belirledik. Elde edilen bu hedef genlerden alerjik hastalıklarda ve besin alerjisi patogenezinde etkili olan, enflamatuvar ve anti-enflamatuvar yanıtla da ilişkili olduğunu düşündüğümüz IL-10, IL-13, TGF- β ve literatürde miR-98 ile ilişkisi gösterilmiş olan IL-4 seçilerek serum protein seviyeleri ELISA yöntemi ölçülmüştür.

Örneklerde IL-4 ve IL-10 proteinleri ölçülebilir düzeyde bulunamamıştır. TGF- β protein seviyelerine bakıldığında, hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$).

Bağışıklık tepkisinin ana düzenleyicisi olan TGF- β önemli anti-enflamatuvar fonksiyonlara sahiptir. Kemoatraktan etkisi vardır. TGF- β enflamasyon bölgesinde makrofajların, granülositlerin ve diğer hücrelerin hızlı birikmesine yol açar. TGF- β hem diğer enflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını teşvik eder hem de bağışıklık yanıtını güçlendiren granülositleri toplar. TGF- β 1, immün hücre farklılaşmasının (Th1 ve Th2 hücreleri ve B hücreleri) ve sitokin üretiminin (IFN- γ ve IL-2) inhibisyonu yanı sıra anti-enflamatuvar ve immünosupresif özelliklere de sahiptir. Son olarak, TGF- β , T düzenleyici hücrelerinin (Tregs) gelişimi ve farklılaşmasında görev alır [207].

37 alerjik rinitli hasta ve 30 sağlıklı kişi dahil edilen bir çalışmada, alerjik rinit hastalarında TGF- β protein seviyeleri sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur [208]. 6'sı klinik ve laboratuvar verileri ile alerjik rinit tanısı almış, 18'i alerjik rinit ve sinüzit (rinosinüzit) tanısı almış ve 12 tanesi sağlıklı olmak üzere 36 yetişkin kadının katıldığı bir çalışmada alerjik riniti olan hastalarda, plazma TGF- β -1 konsantrasyonu kontrol grubuna göre önemli ölçüde daha düşük bulunmuştur. Rinosinüzitli hastalarda ise kontrol grubuna kıyasla, TGF- β -1'in konsantrasyonu önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur [209]. Değirmenci ve arkadaşlarının yaptığı 31 perennial alerjik rinit ve 34 mevsimsel alerjik rinit hastası olmak üzere toplam 65 alerjik rinit hastası (hasta grubu) ve 31 sağlıklı birey (kontrol grubu) katıldığı çalışmada, hasta grubunun serum TGF- β protein seviyesi kontrol grubuna kıyasla daha yüksek bulunmuştur [210]. Bobrus-Chociej ve arkadaşlarının çalışmasına, inek sütü alerjili 30 hasta (18 kadın/12 erkek, 1-13 yaş), kontrol grubu ise 20 çocuk (9 kadın/11 erkek, 2-13 yaş) dahil edilmiş ve inek sütü yüklemesinden önce (ilk randevu) ve inek sütü yüklemesinden 6 hafta sonra kan örnekleri alınmıştır. İnek sütü yüklemesinden önce, çalışma grupları arasında TGF- β düzeyinde hiçbir farklılık bulunmamışken, inek sütü yükleme testinin ardından, kalıcı inek sütü alerjisi olan çocuklarda, inek sütü proteinine toleranslı çocuklara ve kontrollere kıyasla önemli ölçüde daha yüksek serum TGF- β konsantrasyonları kaydedilmiştir [211]. Manuyakorn ve arkadaşlarının çalışmasında 7-18 yaş aralığında 31 astımlı hasta ve 34 atopik olmayan sağlıklı kontrol hastasından (8-15 yaş) alınan kan örneklerinde TGF- β 1 protein seviyesi karşılaştırıldığında astımlı hastalarda kontrol gruba kıyasla serum TGF- β 1 protein seviyesi daha yüksek bulunmuştur. Astımlı grupta, steroid uygulanmamış hafif astım grubunun, anlamlı olarak en yüksek serum TGF- β 1 değerine sahip olduğu görülmüştür [212]. Lommatzsch ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, atopik astımlı erişkinlerde serum TGF- β 1

seviyelerinin kontrol grubundan farklı olmadığı bulunmuştur [213]. Doğu ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada astımlı çocuklarda serum TGF- β seviyelerinin kontrol grubundan farklı olmadığı bulunmuştur [214]. Astımla ilgili yapılan başka bir çalışmaya göre, atopi olan veya olmayan astımlı hastalarda serum TGF- β 1 protein seviyeleri, normal kontrollerdekinden daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca, atopik astımlı hastalarda serum TGF- β 1 seviyesinin, atopisi olmayan astımlı hastalardan daha yüksek olduğu görülmüştür [215]. Kamilova ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya besin proteinine bağlı enterokolit sendromlu 38 hasta (IgE ile ilişkili enterokolit n=18, IgE ile ilişkili olmayan enterokolit n=20) ve 11 sağlıklı kontrol katılmış, çalışma sonucunda en yüksek TGF- β protein seviyesi IgE ile ilişkili enterokolitli hasta grubunda bulunmuştur. Ayrıca bu gruptaki hastalarda TGF- β 1 düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür [216]. Kırk pollinoz hastası (23'ü besin alerjisi olan ve 17'si besin alerjisi olmayan) ve 17 atopik olmayan sağlıklı bireyin katıldığı bir çalışmada, serum TGF- β protein seviyesi kontrol ve besin alerjisi olmayan pollinoz hastalarına kıyasla, besin alerjisine sahip pollinoz hastalarda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur [217].

Çalışmamızda TGF- β seviyesi kontrol grubunda anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur. Bu bulgu TGF- β 'nın anti-enflamatuvar özelliği ile ve ayrıca Treg hücrelerinin farklılaşma ve gelişimine olan etkilerinden dolayı literatürdeki bu yöndeki veriler ile örtüşmektedir.

Farklı T hücre alt grupları ve dendritik hücreler tarafından üretilen IL-13, IgE üretiminin ve IgE aracılı alerjik yanıtların indüklenmesinde ve sürdürülmesinde benzersiz bir rol oynayan bir sitokindir [218]. IL-13 IgE sentezinde rol oynar. Mukus üretiminde artışa neden olur. Fibroblastların çoğalmasını sağlayarak yara iyileşmesi sürecine katkıda bulunur [219]. Zheng ve arkadaşlarının ovalbümin /kolera toksini (fare alerji modeli) kullanarak yaptığı çalışmada farelere 5. haftada gavaj yoluyla 5 mg ovalbümin verilmiş ve ertesi gün kurban edilmiştir. İnce bağırsak dokusundan elde edilen protein ekstraktlarındaki IL-13 seviyelerine ELISA ile bakıldığında IL-13 seviyeleri, besin alerjili farelerde, kontrol farelerindekienden daha yüksek bulunmuştur [220]. Antczak ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre alerjik astım grubunun IL-13 protein seviyesi kontrol grubuna kıyasla daha yüksek bulunmuştur [221]. Alasandagutti ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya 120 astım hastası (atopik ve atopik olmayan olarak iki gruba ayrılmış) ve 120 sağlıklı kontrol olmak üzere 240 kişi dahil edilmiş, IL-

IL-13 serum seviyeleri, sağlıklı kontrole kıyasla atopik ve atopik olmayan astım hastalarında anlamlı derecede yüksek bulunmuştur [222]. 6-8 yaş aralığında 242 çocuğun katıldığı bir çalışmada, düşük atopi ve erken başlangıçlı (grup 1), yüksek atopi ve yüksek eozinofil yüzdeleri ile erken başlangıçlı (grup 2), düşük atopi ve geç başlangıçlı (grup 3) ve yüksek atopi ve normal eozinofil yüzdeleri ile geç başlangıçlı (grup 4) olarak karakterize edilen dört atopik dermatit fenotipi belirlenmiş, çalışma sonucunda Grup 1 ve 2'yi içeren erken başlangıçlı AD gruplarının, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha yüksek serum IL-13 seviyelerine sahip olduğu görülmüştür [223]. 26 polip hastası ve 10 sağlıklı kişinin katıldığı bir çalışmada serum IL-13 seviyelerine bakılmış ve IL-13 seviyeleri, kontrol gruba kıyasla, hasta grubunda daha yüksek bulunmuştur [224].

Bizim yapmış olduğumuz çalışmada ise besin alerjili hastalar ile kontrol grubu arasında IL-13 protein seviyeleri açısından anlamlı bir fark gözlemlenmemişken ($p>0,05$), hasta eozinofil sayıları ile IL-13 seviyeleri arasında negatif bir korelasyon bulunmuştur ($p=0,001$, $r= -0.697$).

5. YORUM

- Literatür taraması sonucunda besin alerjisi ilişkisi olabileceğini düşündüğümüz miRNA'ların (miR-19a ve miR-98) ve lncRNA'ların (MALAT1 ve GATA3-AS1) ifade düzeylerini GZ-PZR ile belirlediğimiz çalışmamızın sonucunda miR-98'in besin alerjili çocuklarda, sağlıklı çocuklarla kıyaslandığında daha az ifade edildiği görülmüştür ($p<0.05$).
- miR-19a gen ifade seviyelerinde besin alerjili çocuklar ile sağlıklı çocuklar arasındaki bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). MALAT1'in gen ifade seviyelerinde kontrol grup ile kıyaslandığında hastalarda bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). GATA3-AS1 lncRNA'sına ise serum örneklerinde rastlanmamıştır.
- Hasta ve kontrol grupları arasında TGF- β protein seviyelerine bakıldığında, istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunmuştur ($p<0.05$).
- IL-13'ün protein seviyelerinde kontrol grubu ile hastalar arasında bir fark görülmemiştir ($p>0.05$).
- Literatürdeki verilerle beraber değerlendirildiğinde, miR-98'nin besin alerjisi için bir biyobelirteç adayı olabileceği düşünülmektedir. Elde edilen verilerin daha geniş hasta popülasyonunda tekrar edilmesine ve miR-98 ile enflamatuvar belirteçler arasındaki ilişkinin ortaya konmasına ihtiyaç vardır.

6. KAYNAKLAR

- [1] S.H. Sicherer, H.A. Sampson, Food allergy, *J. Allergy Clin. Immunol.* 125 (2010) S116–S125.
- [2] J.Y. Hong, S.S. Li, T.Y. Hu, Z.Q. Liu, D. Yu, H.Q. Yu, L. Guan, G.H. Wu, H.T. Zeng, Z.G. Liu, P.C. Yang, TLR3 activation inhibits food allergy in mice by inducing IFN- γ + Foxp3+ regulatory T cells, *J. Leukoc. Biol.* 106 (2019) 1201–1209.
- [3] I. Baiardini, F. Braido, S. Brandi, G.W. Canonica, Allergic diseases and their impact on quality of life, *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* 97 (2006) 419–429.
- [4] A.A. Dyer, O.R. Negris, R.S. Gupta, L.A. Bilaver, Food allergy: how expensive are they?, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 20 (2020) 188–193.
- [5] M.L.K. Tang, R.J. Mullins, Food allergy: is prevalence increasing?, *Intern. Med. J.* 47 (2017) 256–261.
- [6] M.K. Skinner, E.E. Nilsson, Role of environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance in evolutionary biology: Unified Evolution Theory, *Environ. Epigenetics.* 7 (2021) 1–12.
- [7] J.W. Wei, K. Huang, C. Yang, C.S. Kang, Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review), *Oncol. Rep.* 37 (2017) 3–9.
- [8] M.U. Kaikkonen, M.T.Y. Lam, C.K. Glass, Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics, *Cardiovasc. Res.* 90 (2011) 430–440.
- [9] A. Rebane, C.A. Akdis, MicroRNAs: Essential players in the regulation of inflammation, *J. Allergy Clin. Immunol.* 132 (2013) 15–26.
- [10] T. Shi, G. Gao, Y. Cao, Long noncoding RNAs as novel biomarkers have a promising future in cancer diagnostics, *Dis. Markers.* 2016 (2016) 1–10.
- [11] F. Akbas, E. Coskunpinar, E. Aynaci, Y. Müsteri Oltulu, P. Yildiz, Analysis of Serum Micro-RNAs as potential biomarker in chronic obstructive pulmonary disease, *Exp. Lung Res.* 38 (2012) 286–294.
- [12] S. Ghafouri-Fard, H. Shoorei, M. Taheri, M. Sanak, Emerging role of non-coding RNAs in allergic disorders, *Biomed. Pharmacother.* 130 (2020).

- [13] T. Mak, M. Saunders, B. Jett, *Primer to Immune Response*, 2nd ed., Academic Cell, Toronto, **2014**.
- [14] R. Valenta, H. Hochwallner, B. Linhart, S. Pahr, Food allergies: The basics, *Gastroenterology*. 148 (**2015**) 1120-1131.e4.
- [15] R. Pawankar, Allergic diseases and asthma: A global public health concern and a call to action, *World Allergy Organ. J.* 7 (**2014**).
- [16] C. Quake, K.C. Nadeau, The role of epigenetic mediation and the future of food allergy research, *Semin. Cell Dev. Biol.* 43 (**2015**) 125–130.
- [17] M. Mahmoudi, *Allergy and Asthma: The Basics to Best Practices*, Springer Nature, Switzerland, **2019**.
- [18] J.P. Wrobel, R.E. O’Hehir, J.A. Douglas, Food allergy in adults, *Aust. Fam. Physician*. 37 (**2008**) 222–226.
- [19] S.G. Emanuela Floca, Food Allergy: Always a Threat, How do We Treat it?, *Pharm. Anal. Acta*. 04 (**2013**).
- [20] W. Cosme-Blanco, E. Arroyo-Flores, H. Ale, Food allergies, *Pediatr. Rev.* 41 (**2020**) 403–413.
- [21] A.W. Burks, M. Tang, S. Sicherer, A. Muraro, P.A. Eigenmann, M. Ebisawa, A. Fiocchi, W. Chiang, K. Beyer, R. Wood, J. Hourihane, S.M. Jones, G. Lack, H.A. Sampson, ICON: Food allergy, *J. Allergy Clin. Immunol.* 129 (**2012**) 906–920.
- [22] C.T. Kırsacıoğlu, Ö. Ali, Besin Allerjileri, *Güncel Gastroenteroloji*. 10 (**2006**) 148–159.
- [23] S. Wasserman, W. Watson, Food allergy, *Allergy, Asthma Clin. Immunol.* 7 (Suppl 1 (**2011**)) S1–S7.
- [24] A.M. Kazatsky, R.A. Wood, Classification of Food Allergens and Cross-Reactivity, *Curr. Allergy Asthma Rep.* 16 (**2016**).
- [25] S. Wasserman, P. Bégin, W. Watson, IgE-mediated food allergy, *Allergy, Asthma Clin. Immunol.* 14 (Suppl 2 (**2018**)).
- [26] E.D. Mısırlıoğlu, İ. Bostancı, Besin Alerjisi, *Türkiye Çocuk Hast. Derg.* 7 (**2013**) 206–213.
- [27] L. Connors, A. O’Keefe, L. Rosenfield, H. Kim, Non-IgE-mediated food

- hypersensitivity, *Allergy, Asthma Clin. Immunol.* 14(Suppl 2 **(2018)**).
- [28] S.A. Leonard, A. Nowak-Wgrzyn, Food protein induced enterocolitis syndrome: An update on natural history and review of management, *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* 107 **(2011)** 95–101.
- [29] H.L. Chung, J.B. Hwang, J.J. Park, S.G. Kim, Expression of transforming growth factor β 1, transforming growth factor type I and II receptors, and TNF- α in the mucosa of the small intestine in infants with food protein-induced enterocolitis syndrome, *J. Allergy Clin. Immunol.* 109 **(2002)** 150–154.
- [30] L. a Gerdner, Celiac disease: From pathophysiology to treatment, *World J. Psychiatry.* 2 **(2012)** 26–32.
- [31] Z. Kuloğlu, Çölyak Hastalığı, *Türkiye Çocuk Hast Derg/Turkish J Pediatr Dis.* 2 **(2014)** 105–111.
- [32] A.B. Ojuawo, O.B. Ojuawo, A.O. Aladesanmi, M.O. Adio, M.B. Abdulkadir, O.A. Mokuolu, Heiner syndrome: An uncommon cause of failure to thrive, *Malawi Med. J.* 31 **(2019)** 229–231.
- [33] S.F. Thomsen, Atopic Dermatitis: Natural History, Diagnosis, and Treatment, *ISRN Allergy.* 2014 **(2014)** 1–7.
- [34] S. Kapur, W. Watson, S. Carr, Atopic dermatitis, *Allergy, Asthma Clin. Immunol.* 14(Suppl 2 **(2018)**).
- [35] J. Kim, B.E. Kim, K. Ahn, D.Y.M. Leung, Interactions between atopic dermatitis and staphylococcus aureus infection: Clinical implications, *Allergy, Asthma Immunol. Res.* 11 **(2019)** 593–603.
- [36] A.A. Rached, W. El Hajj, Eosinophilic gastroenteritis: Approach to diagnosis and management, *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* 7 **(2016)** 513–523.
- [37] S.B. Ingle, C.R. Hinge Ingle, Eosinophilic gastroenteritis: An unusual type of gastroenteritis, *World J. Gastroenterol.* 19 **(2013)** 5061–5066.
- [38] S. Khan, X. Guo, T. Liu, M. Iqbal, K. Jiang, L. Zhu, X. Chen, B.M. Wang, An Update on Eosinophilic Esophagitis: Etiological Factors, Coexisting Diseases, and Complications, *Digestion.* 102 **(2020)** 342–356.
- [39] S.J. Spechler, Eosinophilic esophagitis: novel concepts regarding pathogenesis

- and clinical manifestations, *J. Gastroenterol.* 54 (2019) 837–844.
- [40] J. Bystrom, N.R. O'Shea, Eosinophilic oesophagitis: Clinical presentation and pathogenesis, *Postgrad. Med. J.* 90 (2014) 282–289.
 - [41] P. Capucilli, D.A. Hill, Allergic Comorbidity in Eosinophilic Esophagitis: Mechanistic Relevance and Clinical Implications, *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 57 (2019) 111–127.
 - [42] J.A. Boyce, A. Assa'ad, W. Burks, S. Jones, H.A. Sampson, R.A. Wood, M. Plaut, S.F. Cooper, M.J. Fenton, S.H. Arshad, S.L. Bahna, L.A. Beck, C. Byrd-Bredbenner, C.A.J. Camargo, L. Eichenfield, G.T. Furuta, J.M. Hanifin, C. Jones, M. Kraft, B.D. Levy, P. Lieberman, S. Luccioli, K.M. McCall, L.C. Schneider, R.A. Simon, F.E. Simons, S.J. Teach, B.P. Yawn, J.M. Schwaninger, Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: Report of the NIAID-sponsored expert panel, *J. Allergy Clin. Immunol.* 126 (2010) S51–58.
 - [43] S.H. Sicherer, H.A. Sampson, Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment, *J. Allergy Clin. Immunol.* 133 (2014) 291–307.e5.
 - [44] R.A. Wood, C.A. Camargo, P. Lieberman, H.A. Sampson, L.B. Schwartz, M. Zitt, C. Collins, M. Tringale, M. Wilkinson, J. Boyle, F.E.R. Simons, Anaphylaxis in America: The prevalence and characteristics of anaphylaxis in the United States, *J. Allergy Clin. Immunol.* 133 (2014) 461–467.
 - [45] H. Renz, K.J. Allen, S.H. Sicherer, H.A. Sampson, G. Lack, K. Beyer, H.C. Oettgen, Food allergy, *Nat. Rev. Dis. Prim.* 4 (2018) 1–20.
 - [46] B.I. Nwaru, L. Hickstein, S.S. Panesar, G. Roberts, A. Muraro, A. Sheikh, Prevalence of common food allergies in Europe: A systematic review and meta-analysis, *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 69 (2014) 992–1007.
 - [47] R.L. Peters, J.J. Koplin, L.C. Gurrin, S.C. Dharmage, M. Wake, A.L. Ponsonby, M.L.K. Tang, A.J. Lowe, M. Matheson, T. Dwyer, K.J. Allen, The prevalence of food allergy and other allergic diseases in early childhood in a population-based study: HealthNuts age 4-year follow-up, *J. Allergy Clin. Immunol.* 140 (2017) 145–153.
 - [48] R.J. Rona, T. Keil, C. Summers, D. Gislason, L. Zuidmeer, E. Sodergren, S.T. Sigurdardottir, T. Lindner, K. Goldhahn, J. Dahlstrom, D. McBride, C. Madsen,

- The prevalence of food allergy: A meta-analysis, *J. Allergy Clin. Immunol.* 120 (2007) 638–646.
- [49] D. Yue, A. Ciccolini, E. Avilla, S. Wasserman, Food Allergy and Anaphylaxis, *J. Asthma Allergy.* 11 (2018) 111–120.
- [50] C. Venter, B. Pereira, K. Voigt, J. Grundy, C.B. Clayton, B. Higgins, S.H. Arshad, T. Dean, Prevalence and cumulative incidence of food hypersensitivity in the first 3 years of life, *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 63 (2008) 354–359.
- [51] R. Dubakienė, G. Šurkienė, R. Stukas, J. Pirmaitytė-Vilesko, A. Kavaliūnas, Food allergies among 5th-9th grade schoolchildren in Vilnius (Lithuania), *Ekologija.* 54 (2008) 1–4.
- [52] C. Puente-Fernández, R.L. Maya-Hernández, M. V. Flores-Merino, M.D.S. Romero-Figueroa, M. Bedolla-Barajas, M.V. Domínguez García, Self-reported prevalence and risk factors associated with food hypersensitivity in Mexican young adults, *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* 116 (2016) 523–527.
- [53] L.C.P. Gonçalves, T.C.P. Guimarães, R.M. Silva, M.F.A. Cheik, A.C. de Ramos Nápolis, G. Barbosa e Silva, G.R.S. Segundo, Prevalence of food allergy in infants and pre-schoolers in Brazil, *Allergol. Immunopathol. (Madr).* 44 (2016) 497–503.
- [54] Y. Han, J. Kim, K. Ahn, Food allergy, *Korean J. Pediatr.* 55 (2012) 153–158.
- [55] M. Ebisawa, K. Ito, T. Fujisawa, Japanese guidelines for food allergy 2017, *Allergol. Int.* 66 (2017) 248–264.
- [56] J. Chen, Y. Hu, K.J. Allen, M.H.K. Ho, H. Li, The prevalence of food allergy in infants in Chongqing, China, *Pediatr. Allergy Immunol.* 22 (2011) 356–360.
- [57] F. Orhan, T. Karakas, M. Cakir, A. Aksoy, A. Baki, Y. Gedik, Prevalence of immunoglobulin E-mediated food allergy in 6-9-year-old urban schoolchildren in the eastern Black Sea region of Turkey, *Clin. Exp. Allergy.* 39 (2009) 1027–1035.
- [58] S.T. Yavuz, U.M. Sahiner, B. Buyuktiryaki, O.U. Soyer, A. Tuncer, B.E. Sekerel, O. Kalayci, C. Sackesen, Phenotypes of IgE-mediated food allergy in Turkish children, *Allergy Asthma Proc.* 32 (2011) e47–e55.

- [59] H.D. Şenol, B.T. Köksal, Van ' da Besin Alerjik Çocuklar ı n Klinik Özellikleri, 22 (2015) 266–272.
- [60] F. Barlık, Ş.N. Güner, M. Barlık, A. Söğüt, R. Sancak, Samsun ili kreş ve anaokulu ocuklarında besin alerjisi yaygınlığı, Turkish Arch. Pediatr. 48 (2013) 288–293.
- [61] A. Gelincik, S. Büyüköztürk, H. Gül, E. Işık, H. Işsever, F. Özşeker, B. Çolakoğlu, M. Dal, Ö. Ayvaz, G. Güngör, A. Akkor, Confirmed prevalence of food allergy and non-allergic food hypersensitivity in a Mediterranean population, Clin. Exp. Allergy. 38 (2008) 1333–1341.
- [62] D. Doğruel, G. Bingöl, D.U. Altıntaş, M. Yılmaz, S.G. Kendirli, Clinical features of food allergy during the 1st year of life: The ADAPAR birth cohort study, Int. Arch. Allergy Immunol. 169 (2016) 171–180.
- [63] R. Mustafayev, E. Civelek, F. Orhan, H. Yüksel, A.B. Boz, B.E. Şekerel, Similar prevalence, different spectrum: IgE-mediated food allergy among Turkish adolescents, Allergol. Immunopathol. (Madr). 41 (2013) 387–396.
- [64] M. Chehade, L. Mayer, Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities, J. Allergy Clin. Immunol. 115 (2005) 3–12.
- [65] S.P. Commins, Mechanisms of Oral Tolerance, Pediatr Clin North Am. 62 (2016) 1523–1529.
- [66] H.A. Sampson, Update on food allergy, J. Allergy Clin. Immunol. 113 (2004) 805–819.
- [67] C.P. Mattison, C.C. Grimm, R.L. Wasserman, In vitro digestion of soluble cashew proteins and characterization of surviving IgE-reactive peptides, Mol. Nutr. Food Res. 58 (2014) 884–893.
- [68] S.H. Sicherer, H.A. Sampson, 9. Food allergy, J. Allergy Clin. Immunol. 117 (2006) S470–S475.
- [69] O. Pabst, A.M. Mowat, Oral tolerance to food protein, Mucosal Immunol. 5 (2012) 232–239.
- [70] M.C. Berin, L. Mayer, Can we produce true tolerance in patients with food allergy?, J Allergy Clin Immunol. 131 (2013) 14–22.

- [71] P. Brandtzaeg, Food allergy: Separating the science from the mythology, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7 **(2010)** 380–400.
- [72] J.L. Coombes, F. Powrie, Europe PMC Funders Group Dendritic cells in intestinal immune regulation, 8 **(2009)** 435–446.
- [73] J.B. Lee, Regulation of IgE-mediated food allergy by IL-9 producing mucosal mast cells and type 2 innate lymphoid cells, *Immune Netw.* 16 **(2016)** 211–218.
- [74] U. Kaza, A.K. Knight, S.L. Bahna, Risk Factors for the Development of Food Allergy, *Pediatr. Ann.* 7 **(2007)** 182–186.
- [75] X. Hong, X. Wang, Early life precursors, epigenetics, and the development of food allergy, *Semin. Immunopathol.* 34 **(2012)** 655–669.
- [76] G. Lack, Update on risk factors for food allergy, *J. Allergy Clin. Immunol.* 129 **(2012)** 1187–1197.
- [77] J.J. Koplin, K.J. Allen, L.C. Gurrin, R.L. Peters, A.J. Lowe, M.L.K. Tang, S.C. Dharmage, A.L. Ponsonby, D. Hill, M. Matheson, M. Wake, L. Thiele, H. Czech, J. Eckert, D. Anderson, O. Hamilton, N. Bertalli, J. Sanjeevan, T. Dang, T. Tan, P. Martin, N. Osborne, M. Robinson, D. Tey, G. Zurzolo, The impact of family history of allergy on risk of food allergy: A population-based study of infants, *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 10 **(2013)** 5364–5377.
- [78] X. Hong, H.J. Tsai, X. Wang, Genetics of food allergy, *Curr. Opin. Pediatr.* 21 **(2009)** 770–776.
- [79] M.M. Amoli, S. Hand, A.H. Hajeer, K.P. Jones, S. Rolf, C. Sting, B.H. Davies, W.E.R. Ollier, Polymorphism in the STAT6 gene encodes risk for nut allergy, *Genes Immun.* 3 **(2002)** 220–224.
- [80] E.J. Campos Alberto, N. Shimojo, Y. Suzuki, Y. Mashimo, T. Arima, T. Matsuura, Y. Inoue, A. Yamaide, M. Tomiita, K. Fujii, A. Hata, Y. Kohno, IL-10 gene polymorphism, but not TGF- β 1 gene polymorphisms, is associated with food allergy in a Japanese population, *Pediatr. Allergy Immunol.* 19 **(2008)** 716–721.
- [81] S.H. Sicherer, T.J. Furlong, H.H. Maes, R.J. Desnick, H.A. Sampson, B.D. Gelb, Genetics of peanut allergy: A twin study, *J. Allergy Clin. Immunol.* 106 **(2000)** 53–56.

- [82] H. Sénéchal, S. Geny, F.X. Desvaux, M. Busson, C. Mayer, Y. Aron, J.P. Oster, J.C. Bessot, G. Peltre, G. Pauli, E. Swierczewski, Genetics and specific immune response in allergy to birch pollen and food Evidence of a strong, positive association between atopy and the HLA class II allele HLA-DR7, *J. Allergy Clin. Immunol.* 104 **(1999)** 395–401.
- [83] A. De Benedetto, C.M. Qualia, F.M. Baroody, L.A. Beck, Filaggrin expression in oral, nasal, and esophageal mucosa, *J. Invest. Dermatol.* 128 **(2008)** 1594–1597.
- [84] C. Blanchard, E. Stucke, K. Burwinkel, J.M. Caldwell, C.M. H., A. Ahrens, Coordinate interaction between IL-13 and epithelial differentiation cluster genes in eosinophilic esophagitis, *J Immunol.* 184 **(2010)** 4033–4041.
- [85] J.G. Woo, A. Assa'ad, A.B. Heizer, J.A. Bernstein, G.K. Khurana Hershey, The -159 C→T polymorphism of CD14 is associated with nonatopic asthma and food allergy, *J. Allergy Clin. Immunol.* 112 **(2003)** 438–444.
- [86] E. Campos, N. Shimojo, Y. Inoue, T. Arima, S. Suzuki, M. Tomiita, T. Matsuura, A. Hata, Y. Suzuki, M. Aoyagi, Y. Kohno, No association of polymorphisms in the 5' region of the CD14 gene and food allergy in a Japanese population, *Allergol. Int.* 56 **(2007)** 23–27.
- [87] P.E. Martin, J.K. Eckert, J.J. Koplin, A.J. Lowe, L.C. Gurrin, S.C. Dharmage, P. Vuillermine, M.L.K. Tang, A.L. Ponsonby, M. Matheson, D.J. Hill, K.J. Allen, Which infants with eczema are at risk of food allergy? Results from a population-based cohort, *Clin. Exp. Allergy.* 45 **(2015)** 255–264.
- [88] S.E. Ashley, H.T.T. Tan, P. Vuillermine, S.C. Dharmage, M.L.K. Tang, J. Koplin, L.C. Gurrin, A. Lowe, C. Lodge, A.L. Ponsonby, J. Molloy, P. Martin, M.C. Matheson, R. Saffery, K.J. Allen, J.A. Ellis, D. Martino, The skin barrier function gene SPINK5 is associated with challenge-proven IgE-mediated food allergy in infants, *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 72 **(2017)** 1356–1364.
- [89] T.R. Torgerson, A. Linane, N. Moes, S. Anover, V. Mateo, F. Rieux-Laucat, O. Hermine, S. Vijay, E. Gambineri, N. Cerf-Bensussan, A. Fischer, H.D. Ochs, O. Goulet, F.M. Ruemmele, Severe Food Allergy as a Variant of IPEX Syndrome Caused by a Deletion in a Noncoding Region of the FOXP3 Gene, *Gastroenterology.* 132 **(2007)** 1705–1717.

- [90] B. Jones, J. Chen, Inhibition of IFN- γ transcription by site-specific methylation during T helper cell development, *EMBO J.* 25 **(2006)** 2443–2452.
- [91] J. Liu, M. Ballaney, U. Al-Alem, C. Quan, X. Jin, F. Perera, L.C. Chen, R.I. Miller, Combined inhaled diesel exhaust particles and allergen exposure alter methylation of T helper genes and IgE production in vivo, *Toxicol. Sci.* 102 **(2008)** 76–81.
- [92] E. Papathoma, M. Triga, S. Fouzas, G. Dimitriou, Cesarean section delivery and development of food allergy and atopic dermatitis in early childhood, *Pediatr. Allergy Immunol.* 27 **(2016)** 419–424.
- [93] M. Eggesbø, G. Botten, H. Stigum, P. Nafstad, P. Magnus, Is delivery by cesarean section a risk factor for food allergy?, *J. Allergy Clin. Immunol.* 112 **(2003)** 420–426.
- [94] J.G. Mathias, H. Zhang, N. Soto-Ramirez, W. Karmaus, The association of infant feeding patterns with food allergy symptoms and food allergy in early childhood, *Int. Breastfeed. J.* 14 **(2019)**.
- [95] M.F. Martín-Muñoz, F. Pineda, G. García Parrado, D. Guillén, D. Rivero, T. Bolver, S. Quirce, Food allergy in breastfeeding babies. Hidden allergens in human milk, *Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.* 48 **(2016)** 123–128.
- [96] N. Matsumoto, T. Yorifuji, K. Nakamura, M. Ikeda, H. Tsukahara, H. Doi, Breastfeeding and risk of food allergy: A nationwide birth cohort in Japan, *Allergol. Int.* 69 **(2020)** 91–97.
- [97] H. Renz, C. Skevaki, Early life microbial exposures and allergy risks: opportunities for prevention, *Nat. Rev. Immunol.* 21 **(2020)** 177–191.
- [98] S.A. Shu, A.W.T. Yuen, E. Woo, K.H. Chu, H.S. Kwan, G.X. Yang, Y. Yang, P.S.C. Leung, Microbiota and Food Allergy, *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 57 **(2019)** 83–97.
- [99] J.J. Koplin, S.C. Dharmage, A.L. Ponsonby, M.L.K. Tang, A.J. Lowe, L.C. Gurrin, N.J. Osborne, P.E. Martin, M.N. Robinson, M. Wake, D.J. Hill, K.J. Allen, Environmental and demographic risk factors for egg allergy in a population-based study of infants, *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 67 **(2012)** 1415–1422.

- [100] M. Ben-Shoshan, E. Turnbull, A. Clarke, Food allergy: Temporal trends and determinants, *Curr. Allergy Asthma Rep.* 12 **(2012)** 346–372.
- [101] P. Bégin, K.C. Nadeau, Epigenetic regulation of asthma and allergic disease, *Allergy, Asthma Clin. Immunol.* 10 **(2014)**.
- [102] A.K. Abbas, A.H. Lichtman, S. Pillai, *Cellular and Molecular Immunology*, 9th ed., Elsevier, **2018**.
- [103] M.D. Chapman, A. Pomés, H. Breiteneder, F. Ferreira, Nomenclature and structural biology of allergens, *J. Allergy Clin. Immunol.* 119 **(2007)** 414–420.
- [104] F. Zhou, S. He, H. Sun, Y. Wang, Y. Zhang, Advances in epitope mapping technologies for food protein allergens: A review, *Trends Food Sci. Technol.* 107 **(2021)** 226–239.
- [105] J.L. Sanchez-Trincado, M. Gomez-Perosanz, P.A. Reche, Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction, *J. Immunol. Res.* 2017 **(2017)**.
- [106] H. Matsuo, T. Yokooji, T. Taogoshi, Common food allergens and their IgE-binding epitopes, *Allergol. Int.* 64 **(2015)** 332–343.
- [107] G.A. Bannon, T. Ogawa, Evaluation of available IgE-binding epitope data and its utility in bioinformatics, *Mol. Nutr. Food Res.* 50 **(2006)** 638–644.
- [108] S. Steckelbroeck, B.K. Ballmer-Weber, S. Vieths, Potential, pitfalls, and prospects of food allergy diagnostics with recombinant allergens or synthetic sequential epitopes, *J. Allergy Clin. Immunol.* 121 **(2008)** 1323–1330.
- [109] S.K. Sathe, C. Liu, V.D. Zaffran, Food Allergy, *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 7 **(2016)** 191–220.
- [110] K.C.M. Verhoeckx, Y.M. Vissers, J.L. Baumert, R. Faludi, M. Feys, S. Flanagan, C. Herouet-Guicheney, T. Holzhauser, R. Shimojo, N. van der Bolt, H. Wichers, I. Kimber, Food processing and allergenicity, *Food Chem. Toxicol.* 80 **(2015)** 223–240.
- [111] G. Martos, R. López-Fandiño, E. Molina, Immunoreactivity of hen egg allergens: Influence on in vitro gastrointestinal digestion of the presence of other egg white proteins and of egg yolk, *Food Chem.* 136 **(2013)** 775–781.
- [112] K. Beyer, E. Morrow, X.M. Li, L. Bardina, G.A. Bannon, A.W. Burks, H.A.

- Sampson, Effects of cooking methods on peanut allergenicity, *J. Allergy Clin. Immunol.* 107 **(2001)** 1077–1081.
- [113] M. Masilamani, S. Commins, W. Shreffler, Determinants of Food Allergy, *Immunol Allergy Clin North Am.* 32 **(2012)** 11–33.
- [114] H. Breiteneder, E.N.C. Mills, Molecular properties of food allergens, *J. Allergy Clin. Immunol.* 115 **(2005)** 14–23.
- [115] H. Hochwallner, U. Schulmeister, I. Swoboda, S. Spitzauer, R. Valenta, Cow's milk allergy: From allergens to new forms of diagnosis, therapy and prevention, *Methods.* 66 **(2014)** 22–33.
- [116] L. Monaci, E. Anklam, V. Tregoat, Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review, *Aust. J. Dairy Technol.* 62 **(2007)** 62–71.
- [117] J.D. Flom, S.H. Sicherer, Epidemiology of Cow 's Milk Allergy, *Nutrients.* 11 **(2019)**.
- [118] G. Bu, Y. Luo, F. Chen, K. Liu, T. Zhu, Milk processing as a tool to reduce cow ' s milk allergenicity : A mini-review, *Dairy Sci. Technol.* 93 **(2013)** 211–223.
- [119] E.. El-agamy, The challenge of cow milk protein allergy The chal, *Small Rumin. Res.* 68 **(2007)** 64–72.
- [120] C. Villa, J. Costa, M.B.P.P. Oliveira, I. Mafra, Bovine Milk Allergens: A Comprehensive Review, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 17 **(2018)** 137–164.
- [121] H.M.J. Farrell, R. Jimenez-Flores, G.T. Bleck, E.M. Brown, J.E. Butler, L.K. Creamer, C.L. Hicks, C.M. Hollar, K.F. Ng-Kwai-Hang, H.E. Swaisgood, Nomenclature of the Proteins of Cows ' Milk — Sixth Revision, *J. Dairy Sci.* 87 **(2004)** 1641–1674.
- [122] S. Geiselhart, K. Hoffmann-Sommergruber, M. Bublin, Tree nut allergens, *Mol. Immunol.* 100 **(2018)** 71–81.
- [123] V. McWilliam, J. Koplin, C. Lodge, M. Tang, S. Dharmage, K. Allen, The Prevalence of Tree Nut Allergy: A Systematic Review, *Curr. Allergy Asthma Rep.* 15 **(2015)**.
- [124] T. Weinberger, S. Sicherer, Current perspectives on tree nut allergy: A review, *J. Asthma Allergy.* 11 **(2018)** 41–51.

- [125] E. Midun, S. Radulovic, H. Brough, J.C. Caubet, Recent advances in the management of nut allergy, *World Allergy Organ. J.* 14 **(2021)** 100491.
- [126] J.M. Smeekens, K. Bagley, M. Kulis, Tree nut allergies: Allergen homology, cross-reactivity, and implications for therapy, *Clin. Exp. Allergy.* 48 **(2018)** 762–772.
- [127] D.M. Fleischer, The natural history of peanut and tree nut allergy, *Curr. Allergy Asthma Rep.* 7 **(2007)** 175–181.
- [128] E. Calamelli, A. Trozzo, E. Di Blasi, L. Serra, P. Bottau, Hazelnut allergy, *Med.* 57 **(2021)**.
- [129] F. Schocker, D. Lüttkopf, S. Scheurer, A. Petersen, A. Cisteró-Bahima, E. Enrique, M. San Miguel-Moncín, J. Akkerdaas, R. Van Ree, S. Vieths, W.M. Becker, Recombinant lipid transfer protein Cor a 8 from hazelnut: A new tool for in vitro diagnosis of potentially severe hazelnut allergy, *J. Allergy Clin. Immunol.* 113 **(2004)** 141–147.
- [130] R. Uotila, A.K. Kukkonen, A.S. Pelkonen, M.J. Mäkelä, Cross-sensitization profiles of edible nuts in a birch-endemic area, *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 71 **(2016)** 514–521.
- [131] L.J.N. Masthoff, L. Mattsson, L. Zuidmeer-Jongejan, J. Lidholm, K. Andersson, J.H. Akkerdaas, S.A. Versteeg, C. Garino, Y. Meijer, P. Kentie, A. Versluis, C.F. Den Hartog Jager, C.A.F.M. Bruijnzeel-Koomen, A.C. Knulst, R. Van Ree, E. Van Hoffen, S.G.M.A. Pasmans, Sensitization to Cor a 9 and Cor a 14 is highly specific for a hazelnut allergy with objective symptoms in Dutch children and adults, *J. Allergy Clin. Immunol.* 132 **(2013)** 393–399.
- [132] J. Costa, I. Carrapatoso, M.B.P.P. Oliveira, I. Mafra, Walnut allergens: Molecular characterization, detection and clinical relevance, *Clin. Exp. Allergy.* 44 **(2014)** 319–341.
- [133] M.P. Borres, N. Maruyama, S. Sato, M. Ebisawa, Recent advances in component resolved diagnosis in food allergy, *Allergol. Int.* 65 **(2016)** 378–387.
- [134] L.D. Archila, D. Jeong, M. Pascal, J. Bartra, M. Juan, D. Robinson, M.L. Farrington, W. William, Walnut Allergy, 136 **(2016)** 983–992.
- [135] C.P. Mattison, R. Rai, R.E. Settlege, D.J. Hinchliffe, C. Madison, J.M. Bland, S.

- Brashear, C.J. Graham, M.R. Tarver, C. Florane, P.J. Bechtel, RNA-Seq Analysis of Developing Pecan (*Carya illinoensis*) Embryos Reveals Parallel Expression Patterns among Allergen and Lipid Metabolism Genes, *J. Agric. Food Chem.* 65 (2017) 1443–1455.
- [136] J. Costa, I. Mafra, I. Carrapatoso, M.B.P.P. Oliveira, Almond Allergens: Molecular Characterization, Detection, and Clinical Relevance, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 1337–1349.
- [137] H. Rayes, A. Raza A, A. Williams, S. Matthews, S.H. Arshad, Specific IgE to recombinant protein (Ber e 1) for the diagnosis of Brazil nut allergy, *Clin. Exp. Allergy.* 46 (2016) 654–656.
- [138] F. Shah, A. Shi, J. Ashley, C. Kronfel, Q. Wang, S.J. Maleki, B. Adhikari, J. Zhang, Peanut Allergy: Characteristics and Approaches for Mitigation, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 18 (2019) 1361–1387.
- [139] C. Agabriel, O. Ghazouani, J. Birnbaum, V. Liabeuf, F. Porri, M. Gouitaa, I. Cleach, J.J. Grob, P. Bongrand, J. Sarles, J. Vitte, Ara h 2 and Ara h 6 sensitization predicts peanut allergy in Mediterranean pediatric patients, *Pediatr. Allergy Immunol.* 25 (2014) 662–667.
- [140] O. Hemmings, G. Du Toit, S. Radulovic, G. Lack, A.F. Santos, Ara h 2 is the dominant peanut allergen despite similarities with Ara h 6, *J. Allergy Clin. Immunol.* 146 (2020) 621-630.e5.
- [141] J.L. Turnbull, H.N. Adams, D.A. Gorard, Review article: The diagnosis and management of food allergy and food intolerances, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 41 (2015) 3–25.
- [142] M. Calvani, C. Anania, C. Caffarelli, A. Martelli, M.M. Del Giudice, C. Cravidi, M. Duse, S. Manti, M.A. Tosca, F. Cardinale, E. Chiappini, F. Olivero, G.L. Marseglia, Food allergy: An updated review on pathogenesis, diagnosis, prevention and management, *Acta Biomed.* 91 (Suppl 7 (2020) e2020012.
- [143] M. Uygunsöy, V. Mevsim, Diagnostic Tests in The Management of Allergic Diseases in Primary Care, *Turkish J. Fam. Med. Prim. Care.* 14 (2020) 141–146.
- [144] A. Muraro, T. Werfel, K. Hoffmann-Sommergruber, G. Roberts, K. Beyer, C. Bindslev-Jensen, V. Cardona, A. Dubois, G. Dutoit, P. Eigenmann, M. Fernandez

- Rivas, S. Halken, L. Hickstein, A. Høst, E. Knol, G. Lack, M.J. Marchisotto, B. Niggemann, B.I. Nwaru, N.G. Papadopoulos, L.K. Poulsen, A.F. Santos, I. Skypala, A. Schoepfer, R. Van Ree, C. Venter, M. Worm, B. Vlieg-Boerstra, S. Panesar, D. De Silva, K. Soares-Weiser, A. Sheikh, B.K. Ballmer-Weber, C. Nilsson, N.W. De Jong, C.A. Akdis, EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines: Diagnosis and management of food allergy, *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 69 **(2014)** 1008–1025.
- [145] M. Calvani, A. Bianchi, C. Reginelli, M. Peresso, A. Testa, Oral food challenge, *Med.* 55 **(2019)**.
- [146] S. Anvari, J. Miller, C. Yeh, C.M. Davis, IgE-Mediated Food Allergy, **(2019)** 244–260.
- [147] S.H. Sicherer, H.A. Sampson, Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management, *J. Allergy Clin. Immunol.* 141 **(2018)** 41–58.
- [148] J.E.M. Upton, J.A. Bird, Oral food challenges: Special considerations, *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* 124 **(2020)** 451–458.
- [149] E. Calamelli, L. Liotti, I. Beghetti, V. Piccinno, L. Serra, P. Bottau, Component-resolved diagnosis in food allergies, *Med.* 55 **(2019)**.
- [150] M. Kulis, B.L. Wright, S.M. Jones, A.W. Burks, Diagnosis, management, and investigational therapies for food allergies, *Gastroenterology.* 148 **(2015)** 1132–1142.
- [151] M. Isidoro-García, I. Dávila-González, M. Pascual De Pedro, C. Sanz-Lozano, F. Lorente-Toledano, Interactions between genes and the environment. Epigenetics in allergy, *Allergol. Immunopathol. (Madr)*. 35 **(2007)** 254–258.
- [152] Ö.F. Güngör, N. Ünal, Epigenetic and genomic imprinting, *Lalahan Hay. Enst. Derg.* 55 **(2015)** 73–81.
- [153] M.S.C. Yan, C.C. Matouk, P.A. Marsden, Epigenetics of the vascular endothelium, *J. Appl. Physiol.* 109 **(2010)** 916–926.

- [154] X. Hong, X. Wang, Epigenetics and Development of Food Allergy (FA) in Early Childhood, *Curr. Allergy Asthma Rep.* 14 **(2014)**.
- [155] J. Gräff, L.H. Tsai, Histone acetylation: Molecular mnemonics on the chromatin, *Nat. Rev. Neurosci.* 14 **(2013)** 97–111.
- [156] S. Palumbo, V. Mariotti, C. Iofrida, S. Pellegrini, Genes and aggressive behavior: Epigenetic mechanisms underlying individual susceptibility to aversive environments, *Front. Behav. Neurosci.* 12 **(2018)**.
- [157] S. Zhou, F. Ding, X. Gu, Non-coding RNAs as Emerging Regulators of Neural Injury Responses and Regeneration, *Neurosci. Bull.* 32 **(2016)** 253–264.
- [158] S.S. Bhat, A. Jarmolowski, Z. Szweykowska-Kulińska, MicroRNA biogenesis: Epigenetic modifications as another layer of complexity in the microRNA expression regulation, *Acta Biochim. Pol.* 63 **(2016)** 717–723.
- [159] F. Güzelgöl, K. Aksoy, Kodlanmayan RNA'ların İşlevi ve Tıpta Kullanım Alanları, *Arch. Med. Rev. J.* 18 **(2009)** 141–155.
- [160] J. O'Brien, H. Hayder, Y. Zayed, C. Peng, Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 9 **(2018)** 1-12.
- [161] A. Fazeela M, J. Joshi, A. Verma, A. Goyal, A Review on MiRNA Biogenesis, 21 **(2013)** 314–317.
- [162] D. Turgut Coşan, E. Yağcı, H. Kurt, Epigenetikten Kansere Uzanan Çizgiler: Uzun Kodlamayan RNA'lar, *OSMANGAZİ J. Med.* 40 **(2018)** 114–121.
- [163] Q. He, J. Long, Y. Yin, Y. Li, X. Lei, Z. Li, W. Zhu, Emerging Roles of lncRNAs in the Formation and Progression of Colorectal Cancer, *Front. Oncol.* 9

(2020).

- [164] T. Derrien, R. Johnson, G. Bussotti, A. Tanzer, S. Djebali, H. Tilgner, G. Guernec, D. Martin, A. Merkel, D.G. Knowles, J. Lagarde, L. Veeravalli, X. Ruan, Y. Ruan, T. Lassmann, P. Carninci, J.B. Brown, L. Lipovich, J.M. Gonzalez, M. Thomas, C.A. Davis, R. Shiekhata, T.R. Gingeras, T.J. Hubbard, C. Notredame, J. Harrow, R. Guigó, The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression, *Genome Res.* 22 **(2012)** 1775–1789.
- [165] H. Yousefi, M. Maheronnaghsh, F. Molaei, L. Mashouri, A. Reza Aref, M. Momeny, S.K. Alahari, Long noncoding RNAs and exosomal lncRNAs: classification, and mechanisms in breast cancer metastasis and drug resistance, *Oncogene.* 39 **(2020)** 953–974.
- [166] B. Malik, F.Y. Feng, Long noncoding RNAs in prostate cancer : overview and clinical implications, *Asian J. Androl.* 18 **(2016)** 568–574.
- [167] P. Dong, Y. Xiong, J. Yue, S.J.B. Hanley, N. Kobayashi, Y. Todo, H. Watari, Long non-coding RNA NEAT1: A novel target for diagnosis and therapy in human tumors, *Front. Genet.* 9 **(2018)**.
- [168] R. Hammad Mahmoud Hammad, D.H.E.D. Hamed, M.A.E.R. Eldosoky, A.A.E.S. Ahmad, H.M. Osman, H.M. Abd Elgalil, M.M. Mahmoud Hassan, Plasma microRNA-21, microRNA-146a and IL-13 expression in asthmatic children, *Innate Immun.* 24 **(2018)** 171–179.
- [169] E. Sonkoly, P. Janson, M.L. Majuri, T. Savinko, N. Fyhrquist, L. Eidsmo, N. Xu, F. Meisgen, T. Wei, M. Bradley, J. Stenvang, S. Kauppinen, H. Alenius, A. Lauerma, B. Homey, O. Winqvist, M. Sthle, A. Pivarcsi, MiR-155 is overexpressed in patients with atopic dermatitis and modulates T-cell proliferative responses by targeting cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, *J. Allergy Clin. Immunol.* 126 **(2010)** 581-589.e20.

- [170] D. Hu, Z. Zhang, X. Ke, H. Kang, S. Hong, A functional variant of miRNA-149 confers risk for allergic rhinitis and comorbid asthma in Chinese children, *Int. J. Immunogenet.* 44 **(2017)** 62–70.
- [171] R. Xie, L. Xu, L. Yang, S. Wang, Q. Liu, Z. Liu, Galectin-1 inhibits oral-intestinal allergy syndrome, 8 **(2017)** 13214-13222.
- [172] M.A. Lindsay, microRNAs and the immune response, *Trends Immunol.* 29 **(2008)** 343–351.
- [173] E. Mogilyansky, I. Rigoutsos, The miR-17/92 cluster: A comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease, *Cell Death Differ.* 20 **(2013)** 1603–1614.
- [174] M. Jia, C. Chu, M. Wang, Correlation of microRNA profiles with disease risk and severity of allergic rhinitis., *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 11 **(2018)** 1791–1802.
- [175] L. Ateş, Analysis of serum microRNA levels in patients with psoriasis, *J. Am. Acad. Dermatol.* 76 **(2017)** AB44.
- [176] I. Haj-Salem, R. Fakhfakh, J.C. Bérubé, E. Jacques, S. Plante, M.J. Simard, Y. Bossé, J. Chakir, MicroRNA-19a enhances proliferation of bronchial epithelial cells by targeting TGF β R2 gene in severe asthma, *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 70 **(2015)** 212–219.
- [177] Q. Sun, L. Liu, H. Wang, J. Mandal, P. Khan, K.E. Hostettler, D. Stolz, M. Tamm, A. Molino, D. Lardinois, S. Lu, M. Roth, Constitutive high expression of protein arginine methyltransferase 1 in asthmatic airway smooth muscle cells is caused by reduced microRNA-19a expression and leads to enhanced remodeling, *J. Allergy Clin. Immunol.* 140 **(2017)** 510-524.e3.
- [178] L.T. Yang, X.X. Li, S.Q. Qiu, L. Zeng, L.J. Li, B.S. Feng, P.Y. Zheng, Z.G. Liu,

- P.C. Yang, Micro RNA-19a suppresses thrombospondin-1 in CD35+ B cells in the intestine of mice with food allergy, *Am. J. Transl. Res.* 8 **(2016)** 5503–5511.
- [179] S. Wang, Y. Tang, H. Cui, X. Zhao, X. Luo, W. Pan, X. Huang, N. Shen, Let-7/miR-98 regulate Fas and Fas-mediated apoptosis, *Genes Immun.* 12 **(2011)** 149–154.
- [180] J. Du, H. Wu, Y. Wu, MiR-98-5p may be a biomarker for screening bronchial asthma in children by targeting IL-13, *Clin. Lab.* 65 **(2019)** 387–393.
- [181] F. Liu, H.B. Qin, B. Xu, H. Zhou, D.Y. Zhao, Profiling of miRNAs in pediatric asthma: Upregulation of miRNA-221 and miRNA-485-3p, *Mol. Med. Rep.* 6 **(2012)** 1178–1182.
- [182] L. Chen, J. Xu, X. Chu, C. Ju, MicroRNA-98 interferes with thrombospondin 1 expression in peripheral B cells of patients with asthma, *Biosci. Rep.* 37 **(2017)**.
- [183] J. Chen, L. Ao, J. Yang, Long non-coding RNAs in diseases related to inflammation and immunity, *Ann. Transl. Med.* 7 **(2019)** 494–494.
- [184] M. Fan, J. Xu, Q. Xiao, F. Chen, X. Han, Long non-coding RNA TCF7 contributes to the growth and migration of airway smooth muscle cells in asthma through targeting TIMMDC1/Akt axis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 508 **(2019)** 749–755.
- [185] S. Biswas, A.A. Thomas, S. Chen, E. Aref-Eshghi, B. Feng, J. Gonder, B. Sadikovic, S. Chakrabarti, MALAT1: An Epigenetic Regulator of Inflammation in Diabetic Retinopathy, *Sci. Rep.* 8 **(2018)** 1–15.
- [186] J.P. Hewitson, K.A. West, K.R. James, G.F. Rani, N. Dey, A. Romano, N. Brown, S.A. Teichmann, P.M. Kaye, D. Lagos, Malat1 Suppresses Immunity to Infection through Promoting Expression of Maf and IL-10 in Th Cells, *J.*

Immunol. 204 **(2020)** 2949–2960.

- [187] M.R. Hadjicharalambous, M.A. Lindsay, Long non-coding RNAs and the innate immune response, *Non-Coding RNA*. 5 **(2019)**.
- [188] H. Cui, S. Banerjee, S. Guo, N. Xie, J. Ge, D. Jiang, M. Zörnig, V.J. Thannickal, G. Liu, Long noncoding RNA Malat1 regulates differential activation of macrophages and response to lung injury, *JCI Insight*. 4 **(2019)** e124522.
- [189] H.R. Gibbons, G. Shaginurova, L.C. Kim, N. Chapman, C.F. Spurlock, T.M. Aune, Divergent lncRNA GATA3-AS1 Regulates GATA3 Transcription in T-Helper 2 Cells, *Front. Immunol*. 9 **(2018)** 2512.
- [190] X. Luo, N. Zhou, L. Wang, Q. Zeng, H. Tang, Long Noncoding RNA GATA3-AS1 Promotes Cell Proliferation and Metastasis in Hepatocellular Carcinoma by Suppression of PTEN, CDKN1A, and TP53, *Can. J. Gastroenterol. Hepatol*. 2019 **(2019)**.
- [191] Y.J. Zhu, D. Mao, W. Gao, H. Hu, Peripheral whole blood lncRNA expression analysis in patients with eosinophilic asthma, *Med. (United States)*. 97 **(2018)** 1–9.
- [192] L. Yang, L. Lyu, W. Wu, D. Lei, Y. Tu, D. Xu, J. Feng, L. He, Genome-wide identification of long non-coding RNA and mRNA profiling using RNA sequencing in subjects with sensitive skin, *Oncotarget*. 8 **(2017)** 114894–114910.
- [193] H. Zhang, C.E. Nestor, S. Zhao, A. Lentini, B. Bohle, M. Benson, H. Wang, Profiling of human CD4+ T-cell subsets identifies the T H2-specific noncoding RNA GATA3-AS1, *J. Allergy Clin. Immunol*. 132 **(2013)** 1005–1008.
- [194] X. Zhu, X. Wang, Y. Wang, Y. Zhao, The regulatory network among CircHIPK3, LncGAS5, and miR-495 promotes Th2 differentiation in allergic

rhinitis, *Cell Death Dis.* 11 **(2020)**.

- [195] J. Rice, H. Roberts, S.N. Rai, S. Galandiuk, Housekeeping genes for studies of plasma microRNA: A need for more precise standardization, *Surg. (United States)*. 158 **(2015)** 1345–1351.
- [196] S. Donati, S. Ciuffi, M.L. Brandi, Human circulating miRNAs real-time qRT-PCR-based analysis: An overview of endogenous reference genes used for data normalization, *Int. J. Mol. Sci.* 20 **(2019)**.
- [197] J. Savage, S. Sicherer, R. Wood, The Natural History of Food Allergy, *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 4 **(2016)** 196–203.
- [198] L.J. Simpson, S. Patel, N.R. Bhakta, D.F. Choy, H.D. Brightbill, Y. Wang, H.H. Pua, D. Baumjohann, M.M. Montoya, K.A. Remedios, X. Huang, J. V Fahy, J.R. Arron, G. Woodruff, K.M. Ansel, A miRNA upregulated in asthma airway T cells promotes TH2 cytokine production, 15 **(2014)** 1162–1170.
- [199] Z.Q. Liu, G. Yang, X.R. Geng, J.Q. Liu, L.H. Mo, Z.G. Liu, P.C. Yang, Micro RNA-17-92 cluster mediates interleukin-4-suppressed IL-10 expression in B cells, *Am. J. Transl. Res.* 8 **(2016)** 2317–2324.
- [200] Q.M. Zhang, W.W. Ni, Y. Li, X. Zhang, J.C. Hou, X.C. Meng, A.L. Li, Z.M. Jiang, Analysis of altered miRNA profiling in the colon of a mouse model with β -lactoglobulin allergy, *Allergol. Immunopathol. (Madr)*. 48 **(2020)** 666–674.
- [201] L. Xie, J. Xu, Role of MiR-98 and its underlying mechanisms in systemic lupus erythematosus, *J. Rheumatol.* 45 **(2018)** 1397–1405.
- [202] S. Yuan, C. Tang, D. Chen, F. Li, M. Huang, J. Ye, Z. He, W. Li, Y. Chen, X. Lin, X. Wang, X. Cai, MiR-98 modulates cytokine production from human PBMCs in systemic lupus erythematosus by targeting IL-6 mRNA, *J. Immunol.*

Res. 2019 **(2019)**.

- [203] M. Coskun, J.T. Bjerrum, J.B. Seidelin, J.T. Troelsen, J. Olsen, O.H. Nielsen, miR-20b, miR-98, miR-125b-1*, and let-7e* as new potential diagnostic biomarkers in ulcerative colitis, *World J. Gastroenterol.* 19 **(2013)** 4289–4299.
- [204] L. Midyat, F. Gulen, E. Karaca, F. Ozkinay, R. Tanac, E. Demir, O. Cogulu, A. Aslan, C. Ozkinay, H. Onay, M. Atasever, MicroRNA expression profiling in children with different asthma phenotypes, *Pediatr. Pulmonol.* 51 **(2016)** 582–587.
- [205] T. Hu, H. Huang, H. Shen, W. Chen, Z. Yang, Role of long non- coding RNA MALAT1 in chronic obstructive pulmonary disease, *Exp. Ther. Med.* **(2020)** 2691–2697.
- [206] Y. ying Qiu, Y. Wu, M. jie Lin, T. Bian, Y. long Xiao, C. Qin, LncRNA-MEG3 functions as a competing endogenous RNA to regulate Treg/Th17 balance in patients with asthma by targeting microRNA-17/ ROR γ t, *Biomed. Pharmacother.* 111 **(2019)** 386–394.
- [207] B. Tirado-Rodriguez, E. Ortega, P. Segura-Medina, S. Huerta-Yepez, TGF- β : An important mediator of allergic disease and a molecule with dual activity in cancer development, *J. Immunol. Res.* 2014 **(2014)**.
- [208] A. Davoodi, R. Lotfi, S.H. Mortazavi, A.G. Karaji, A. Rezaeiemanesh, F. Salari, Retinoic Acid Correlates with Reduced Serum IL-10 And TGF- β in Allergic Rhinitis, *Reports Biochem. Mol. Biol.* 9 **(2021)** 399–407.
- [209] A. Rosas, M.P. Valencia, M. Sánchez, M. Bautista, G. Rico, G.B. Vega Robledo, Transforming growth factor beta and platelets in allergic rhinitis and sinusitis, *Rev. Alerg. Mex.* 58 **(2011)** 93–98.

- [210] P.B. Degirmenci, S. Aksun, Z. Altin, F. Bilgir, I.B. Arslan, H. Colak, B. Ural, D.S. Kahraman, G. Diniz, B. Ozdemir, C. Kirmaz, Allergic rhinitis and its relationship with IL-10, IL-17, TGF- β , IFN- γ , IL 22, and IL-35, *Dis. Markers*. 2018 **(2018)**.
- [211] A. Bobrus-Chociej, U. Daniluk, M. Alifier, A. Stasiak-Barmuta, M.G. Kaczmarek, Alterations of lymphocyte subpopulations and TGF- β in children with transient or persistent cow's milk allergy, *Food Agric. Immunol.* 29 **(2018)** 400–411.
- [212] W. Manuyakorn, W. Kamchaisatian, K. Atamasirikul, C. Sasisakulporn, C. Direkwattanachai, S. Benjaponpitak, Serum TGF- β 1 in atopic asthma, *Asian Pacific J. Allergy Immunol.* 26 **(2008)** 185–189.
- [213] M. Lommatzsch, K. Schloetcke, J. Klotz, K. Schuhbaeck, D. Zingler, C. Zingler, O. Schulte-Herbrüggen, H. Gill, P. Schuff-Werner, J.C. Virchow, Brain-derived neurotrophic factor in platelets and airflow limitation in asthma, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 171 **(2005)** 115–120.
- [214] F. Doğu, A. Yildiran, D. Güloğlu, F. Erol Çipe, M. Yüksek, E. Babacan, A. İkinciogullari, Serum transforming growth factor- β (TGF- β), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP-1) levels in childhood asthma, *Turkish J. Med. Sci.* 38 **(2008)** 415–419.
- [215] C.H. Chiang, C.H. Chuang, S.L. Liu, H. Der Shen, Genetic polymorphism of transforming growth factor β 1 and tumor necrosis factor α is associated with asthma and modulates the severity of asthma, *Respir. Care.* 58 **(2013)** 1343–1350.
- [216] K. AT, A. AN, S. SS, G. SI, K. ZS, Clinical Significance of Transforming Growth Factor β 1 and Tumor Necrosis Factor A in the Food-Protein-Induced Enterocolitis Syndrome in Children, *J. Gastroenterol. Metab.* 1 **(2018)** 1–9.

- [217] S. Ma, J. Yin, Imbalance of serum IL-10 and TGF- β in patients with pollen food syndrome, *Allergol. Immunopathol. (Madr)*. 42 (2014) 198–205.
- [218] J.E. De Vries, The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses, *J. Allergy Clin. Immunol.* 102 (1998) 165–169.
- [219] T.A. Wynn, IL-13 effector functions, *Annu. Rev. Immunol.* 21 (2003) 425–456.
- [220] P.Y. Zheng, X.R. Geng, J.Y. Hong, G. Yang, J.Q. Liu, L.H. Mo, Y. Feng, Y.Y. Zhang, T. Liu, P. Ran, Z.G. Liu, P.C. Yang, Regulating Bcl2L12 expression in mast cells inhibits food allergy, *Theranostics*. 9 (2019) 4982–4992.
- [221] A. Antczak, D. Domańska-Senderowska, P. Górski, D. Pastuszek-Lewandoska, A. Nielepkowicz-Goździńska, K. Szewczyk, Z. Kurmanowska, J. Kiszalkiewicz, E. Brzezińska-Lasota, Analysis of changes in expression of IL-4/IL-13/STAT6 pathway and correlation with the selected clinical parameters in patients with atopic asthma, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 29 (2016) 195–204.
- [222] M.L. Alasandagutti, M.S.S. Ansari, S.R. Sagurthi, V. Valluri, S. Gaddam, Role of IL-13 Genetic Variants in Signalling of Asthma, Inflammation. 40 (2017) 566–577.
- [223] E. Lee, S.H. Lee, J.W. Kwon, Y.H. Kim, H.J. Cho, S.I. Yang, Y.H. Jung, H.Y. Kim, J.H. Seo, B.J. Kim, H.B. Kim, S.Y. Lee, H.J. Kwon, S.J. Hong, Atopic dermatitis phenotype with early onset and high serum IL-13 is linked to the new development of bronchial hyperresponsiveness in school children, *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 71 (2016) 692–700.
- [224] X.Q. Luo, J.B. Shao, R. Di Xie, L. Zeng, X.X. Li, S.Q. Qiu, X.R. Geng, L.T. Yang, L.J. Li, D.B. Liu, Z.G. Liu, P.C. Yang, Micro RNA-19a interferes with IL-10 expression in peripheral dendritic cells of patients with nasal polyposis, *Oncotarget*. 8 (2017) 48915–48921.

EK 2 – Araştırma Amaçlı Çalışma İçin Çocuk Rıza Formları

(Hasta Çocuk)

Sevgili Kardeşim,

Benim adım Dr. Esra Birben. Besin alerjisi olan hastalarımızda bir araştırma yapıyoruz. Amacımız bu hastalarda hasta serumunda bulunan birtakım moleküllerin hastalık şiddeti ve hastalık seyri ile ilgili bir öngöründe bulunmamıza yardımcı olup olamayacağını belirlemektir. Araştırma ile yeni bilgiler öğreneceğiz. Bu araştırmaya katılmanı öneriyoruz.

Araştırmayı ben Doç.Dr. Esra Birben, Prof Dr. Ümit Murat Şahiner, Prof.Dr. Özge Soyer ve başka bazı doktorlar birlikte yapıyoruz. Bu araştırmaya katılacak olursan senden kan alacağız. Kan alınırken canın biraz acıyabilir ama çabuk geçecektir.

Bu araştırmanın sonuçları besin alerjisi olan çocuklar için yararlı bilgiler sağlayacaktır. Bu araştırmanın sonuçlarını başka doktorlara da söyleyeceğiz, sonuçları bildireceğiz ama senin adını söylemeyeceğiz.

Bu araştırmaya katılıp katılmamak için karar vermeden önce anne ve baban ile konuşup onlara danışmalısın. Onlara da bu araştırmadan bahsedip onaylarını/izinlerini alacağız. Anne ve baban tamam deseler bile sen kabul etmeyebilirsin. Bu araştırmaya katılmak senin isteğine bağlı ve istemezsen katılmazsın. Bu nedenle hiç kimse sana kızmaz ya da küsmez. Önce katılmayı kabul etsen bile sonradan vazgeçebilirsin, bu tamamen sana bağlı. Kabul etmediğin durumda da doktorlar muayene ve diğer işlemlerde sana önceden olduğu gibi iyi davranır, önceye göre farklılık olmaz.

Aklına şimdi gelen veya daha sonra gelecek olan soruları istediğin zaman bana sorabilirsin. Telefon numaram ve adresim bu kâğıtta yazıyor. Bu araştırmaya katılmayı kabul ediyorsan aşağıya lütfen adını ve soyadını yaz ve imzanı at. İmzaladıktan sonra sana ve ailene bu formun bir kopyası verilecektir.

Çocuğun adı, soyadı:

Çocuğun imzası:

Tarih:

Velisinin adı, soyadı:

Velisinin imzası:

Tarih:

Araştıracının adı, soyadı, ünvanı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

(Sağlıklı Çocuk)

Sevgili Kardeşim,

Benim adım Dr. Esra Birben. Besin alerjisi olan hastalarımızda bir araştırma yapıyoruz. Amacımız bu hastalarda hasta serumunda bulunan birtakım moleküllerin hastalık şiddeti ve hastalık seyri ile ilgili bir öngöründe bulunmamıza yardımcı olup olamayacağını belirlemektir. Araştırma ile yeni bilgiler öğreneceğiz. Bu araştırmaya katılmanı öneriyoruz.

Araştırmayı ben Doç.Dr. Esra Birben, Prof Dr. Ümit Murat Şahiner, Prof.Dr. Özge Soyer ve başka bazı doktorlar birlikte yapıyoruz. Bu araştırmaya katılacak olursan senden kan alacağız. Kan alınırken canın biraz acıyabilir ama çabuk geçecektir.

Bu araştırmanın sonuçları besin alerjisi olan çocuklar için yararlı bilgiler sağlayacaktır. Bu araştırmanın sonuçlarını başka doktorlara da söyleyeceğiz, sonuçları bildireceğiz ama senin adını söylemeyeceğiz.

Bu araştırmaya katılıp katılmamak için karar vermeden önce anne ve baban ile konuşup onlara danışmalısın. Onlara da bu araştırmadan bahsedip onaylarını/izinlerini alacağız. Anne ve baban tamam deseler bile sen kabul etmeyebilirsin. Bu araştırmaya katılmak senin isteğine bağlı ve istemezsen katılmazsın. Bu nedenle hiç kimse sana kızmaz ya da küsmez. Önce katılmayı kabul etsen bile sonradan vazgeçebilirsin, bu tamamen sana bağlı. Kabul etmediğin durumda da doktorlar muayene ve diğer işlemlerde sana önceden olduğu gibi iyi davranır, önceye göre farklılık olmaz.

Aklına şimdi gelen veya daha sonra gelecek olan soruları istediğin zaman bana sorabilirsin. Telefon numaram ve adresim bu kâğıtta yazıyor. Bu araştırmaya katılmayı kabul ediyorsan aşağıya lütfen adını ve soyadını yaz ve imzanı at. İmzaladıktan sonra sana ve ailene bu formun bir kopyası verilecektir.

Çocuğun adı, soyadı:

Çocuğun imzası:

Tarih:

Velisinin adı, soyadı:

Velisinin imzası:

Tarih:

Araştıracının adı, soyadı, ünvanı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

EK 3 – Araştırma Amaçlı Çalışma İçin Ebeveyn Aydınlatılmış Onam Formları

(Hasta Grubu)

(Hekimin Açıklaması)

Besin alerjisi hastalığıyla ilgili yeni bir araştırma yapmaktayız. Araştırmanın ismi “Besin Alerjisi Patogenezinde Kısa ve Uzun Kodlamayan RNA’ların Rolü” dir.

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

Bu araştırmayı yapmak istememizin nedeni, Besin alerjisine sahip hastalar, deri ve kan testlerine göre alerjik ancak besini tüketebilen (duyarlı ancak toleran) hastalar ve sağlıklı çocuklar (kontrol grubu) arasındaki farkı belirleyebilen bir biyobelirteç bulabilmektir. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı’nda gerçekleştirilecek bu çalışmaya katılımınız araştırmanın başarısı için önemlidir.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz çocuğunuz Prof.Dr. Özge Soyer, Prof. Dr. Ümit Murat Şahiner veya onun görevlendireceği bir hekim tarafından muayene edilecek ve bulgular kaydedilecektir. Muayene sonucunda doktorunuz uygun görürse bu çalışmaya alınacaksınız. Yine izniniz doğrultusunda bu çalışmayı yapabilmek için çocuğunuzun kolunuzdan 2-3 ml (1 tüp) kadar kan almamız gerekmektedir. İzniniz doğrultusunda bu çalışmayı yapabilmek için çocuğunuzdan alınmış olan kan örnekleri kullanılarak bazı laboratuvar analizleri yapılacak ve bu veriler çalışma sonuçları olarak değerlendirilecektir.

Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler: 1-) İğne batmasına bağlı olarak az bir acı duyabilirsiniz. 2-) Az bir ihtimal de olsa iğne batması sonrasında kanamanın uzaması veya enfeksiyon riski vardır. 3-) Yine az bir ihtimalle yanak içinden aldığımız sürüntü sonrası enfeksiyon gözlemlenebilir.

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

Sizinle ilgili tıbbi bilgiler gizli tutulacak, ancak çalışmanın kalitesini denetleyen görevliler, etik kurullar ya da resmi makamlarca gereği halinde incelenebilecektir.

Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde çocuğunuza uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz.

(Katılımcının/ Beyanı)

Sayın Doç.Dr. Esra Birben tarafından Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

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

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. *(Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim)* Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

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

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında çocuğum bir sağlık sorunu ile karşılaştığında; herhangi bir saatte, Doç. Dr. Esra BİRBEN'e XXXXXXXXXXXX (cep) no'lu telefondan ulaşacağımı biliyorum.

Araştırma sırasında çocuğum bir sağlık sorunu ile karşılaştığında; herhangi bir saatte, Prof.Dr. Özge Soyer'i, XXXXXXXXXXXX (iş) veya XXXXXXXXXXXX (cep) veya Prof. Dr. Ümit Murat Şahiner 'i XXXXXXXXXXXX (iş) veya XXXXXXXXXXXX (cep) no'lu telefonlardan ve HÜTF Çocuk Alerji Bilim Dalı adresinden arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun çocuğumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu araştırmaya kendi gönüllü onayım kendimin/çocuğumun katılmasına olurum vardır.

Katılımcı	Adı Soyadı	Doğum Tarihi	Adres/Tel	İmza
Veli/Vası	Adı Soyadı	Doğum Tarihi	Adres/Tel	İmza
Tanık	Adı Soyadı	Doğum Tarihi	Adres/Tel	İmza

Hekim:

Adı Soyadı :

Adres/Tel :

İmza :

Görüşme tarih ve saati :

Bu çalışmada elde edilecek kendimle ilgili bilgileri,

Öğrenmek istiyorum ()

Öğrenmek istemiyorum ()

- ☐ Tarafımdan alınan kodlanmış* örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileride yapılması olası diğer çalışmalar için onay veriyorum.
- ☐ Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin, araştırma konusuyla bağlantılı diğer çalışmalarda kullanımını onaylıyorum, ancak farklı çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.
- ☐ Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin gelecekte her türlü genetik çalışmada (kimliğim ile bağlantısız) olarak onaylıyorum.

***Kodlanmış örnek:** Sizden alınan örneğe bir kod numarası verilir. Kod numarasını yalnızca araştırmacı bilir ve sizin kimlik bilgilerinize yalnızca araştırmacı ulaşabilir. Böylece kimlik bilgileriniz gizli tutulmuş olur.

(Kontrol Grubu)

(Hekimin Açıklaması)

Besin alerjisi hastalığıyla ilgili yeni bir araştırma yapmaktayız. Araştırmanın ismi “Besin Alerjisi Patogenezinde Kısa ve Uzun Kodlamayan RNA’ların Rolü” dir.

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

Bu araştırmayı yapmak istememizin nedeni, Besin alerjisine sahip hastalar, deri ve kan testlerine göre alerjik ancak besini tüketebilen (duyarlı ancak toleran) hastalar ve sağlıklı çocuklar (kontrol grubu) arasındaki farkı belirleyebilen bir biyobelirteç bulabilmektir. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı’nda gerçekleştirilecek bu çalışmaya katılımınız araştırmanın başarısı için önemlidir.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz çocuğunuz Prof.Dr. Özge Soyer, Prof. Dr. Ümit Murat Şahiner veya onun görevlendireceği bir hekim tarafından muayene edilecek ve bulgular kaydedilecektir. Muayene sonucunda doktorunuz uygun görürse bu çalışmaya alınacaksınız. Yine izniniz doğrultusunda bu çalışmayı yapabilmek için çocuğunuzun kolunuzdan 2-3 ml (1 tüp) kadar kan almamız gerekmektedir. İzniniz doğrultusunda bu çalışmayı yapabilmek için çocuğunuzdan alınmış olan kan örnekleri kullanılarak bazı laboratuvar analizleri yapılacak ve bu veriler çalışma sonuçları olarak değerlendirilecektir.

Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler: 1-) İğne batmasına bağlı olarak az bir acı duyabilirsiniz. 2-) Az bir ihtimal de olsa iğne batması sonrasında kanamanın uzaması veya enfeksiyon riski vardır. 3-) Yine az bir ihtimalle yanak içinden aldığımız sürüntü sonrası enfeksiyon gözlenebilir.

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

Sizinle ilgili tıbbi bilgiler gizli tutulacak, ancak çalışmanın kalitesini denetleyen görevliler, etik kurullar ya da resmi makamlarca gereği halinde incelenebilecektir.

Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde çocuğunuza uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz.

(Katılımcının/ Beyanı)

Sayın Doç.Dr. Esra Birben tarafından Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

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

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. *(Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim)* Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

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

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında çocuğum bir sağlık sorunu ile karşılaştığında; herhangi bir saatte, Doç. Dr. Esra BİRBEN'e XXXXXXXXXXXX (cep) no'lu telefondan ulaşacağımı biliyorum.

Araştırma sırasında çocuğum bir sağlık sorunu ile karşılaştığında; herhangi bir saatte, Prof.Dr. Özge Soyer'i, XXXXXXXXXXXX (iş) veya XXXXXXXXXXXX (cep) veya Prof. Dr. Ümit Murat Şahiner 'i XXXXXXXXXXXX (iş) veya XXXXXXXXXXXX (cep) no'lu telefonlardan ve HÜTF Çocuk Alerji Bilim Dalı adresinden arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun çocuğumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu araştırmaya kendi gönüllü onayım kendimin/çocuğumun katılmasına olurum vardır.

Katılımcı	Adı Soyadı	Doğum Tarihi	Adres/Tel	İmza
Veli/Vasi	Adı Soyadı	Doğum Tarihi	Adres/Tel	İmza
Tanık	Adı Soyadı	Doğum Tarihi	Adres/Tel	İmza

Hekim:

Adı Soyadı :

Adres/Tel :

İmza :

Görüşme tarih ve saati :

Bu çalışmada elde edilecek kendimle ilgili bilgileri,

Öğrenmek istiyorum ()

Öğrenmek istemiyorum ()

- ☐ Tarafımdan alınan kodlanmış* örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileride yapılması olası diğer çalışmalar için onay veriyorum.
- ☐ Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin, araştırma konusuyla bağlantılı diğer çalışmalarda kullanımını onaylıyorum, ancak farklı çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.
- ☐ Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin gelecekte her türlü genetik çalışmada (kimliğim ile bağlantısız) olarak onaylıyorum.

*Kodlanmış örnek: Sizden alınan örneğe bir kod numarası verilir. Kod numarasını yalnızca araştırmacı bilir ve sizin kimlik bilgilerinize yalnızca araştırmacı ulaşabilir. Böylece kimlik bilgileriniz gizli tutulmuş olur.

EK 4 – Tezden Türetilmiş Bildiriler

- **Erboga H.**, Unsal H., Sahiner U.M., Soyer O.U., Sekerel B.E., Birben E., XXVIII. Ulusal Allerji ve Klinik İmmünoloji Kongresi, 13-17 Ekim 2021, Antalya (Poster).

