



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**FARELERDE BESİN ALERJİ MODELİNİN
OLUŞTURULMASI VE BUNUN OMEGA 3'TEN
ZENGIN DİYETLE ÖNLENEBİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. ÖZGÜR GEL

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ayşe Yenigün

AYDIN-2009

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**FARELERDE BESİN ALERJİ MODELİNİN
OLUŞTURULMASI VE BUNUN OMEGA 3'TEN
ZENGİN DİYETLE ÖNLENEBİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. ÖZGÜR GEL

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ayşe Yenigün

AYDIN-2009

Bu araştırma ADÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından TPF-08005 sayı ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, ayrıca tezimin yürütülmesinde de bana yol göstererek ilgi ve yardımlarını esirgemeyen tez danışmanı hocam Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Ayşe Yenigün'e saygı ve şükranlarımı sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, emeği geçen hocalarım sayın Prof. Dr. Ayşe Yenigün'e, Prof. Dr. Ferah Sönmez'e, Prof. Dr. Ali Rahmi Bakiler'e, Doç. Dr. Münevver Türkmen'e, Yrd. Doç.Dr. Ayvaz Aydoğdu'ya, Yrd. Doç. Dr. Yusuf Ziya Aral'a, Yrd. Doç.Dr. Ayşe Tosun'a, Yrd. Doç.Dr. Emre Çeçen'e, Yrd. Doç. Dr. Bilin Çetinkaya Çakmak'a, Yrd. Doç.Dr. Tolga Ünüvar'a teşekkür ederim.

Tezin yürütülmesinde ve biyokimyasal analizlerinde büyük emeği olan Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Çiğdem Yenisey'e teşekkür ederim.

Tezimde histopatolojik verilerin belirlenmesinde emeği geçen Pataloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Yrd. Doç. Dr. İbrahim Meteoğlu'na teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tezin istatistik verilerinin değerlendirilmesinde desteklerinden faydalandığım İstatistik Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Doç.Dr. Sayın Mevlüt Türe'ye ve Halk Sağlığı Uzmanı sayın Uzm. Dr. Şeniz Karademir'e teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca her zaman yanımda olan, desteğini her zaman hissettiğim sevgili eşim Özlem Gel'e ve varlıklarıyla bana destek olan sevgili kızım Duru ve sevgili oğlum Tuna'ya teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

1. ÖNSÖZ
2. TABLO DİZİNİ
3. ŞEKİL DİZİNİ
4. KISALTMALAR DİZİNİ
5. RESİMLER DİZİNİ
6. GİRİŞ VE AMAÇ1
7. GENEL BİLGİLER3
8. GEREÇ VE YÖNTEM24
9. BULGULAR29
10. TARTIŞMA45
11. SONUÇLAR53
12. ÖZET54
13. İNGİLİZCE ÖZET55
14. KAYNAKLAR56
15. EKLER

TABLO DİZİNİ

- 1.** Tablo I: Atopik hastalıklarda sitokinlerin fonksiyonları
- 2.** Tablo II: Temel besin alerjenleri
- 3.** Tablo III: Besin spesifik Ig E düzeylerinin prediktif değerleri
- 4.** Tablo IV: Besin alerjisinde spesifik immünoterapi
- 5.** Tablo V: Fareler için 1 kg standart yemin analizi
- 6.** Tablo VI: Fare yemine eklenen balık yağı karışımının 100 ml'sinin analizi
- 7.** Tablo VII: Grup I'de eozinofil ve mast hücre sayıları
- 8.** Tablo VIII: Grup II'de eozinofil ve mast hücre sayıları
- 9.** Tablo IX: Grup III'de eozinofil ve mast hücre sayıları
- 10.** Tablo X: Histopatolojik incelemede grupların eozinofil, mast hücre sayıları ortalama değerleri.
- 11.** Tablo XI: Grup I'de sitokin düzeyleri
- 12.** Tablo XII: Grup II'de sitokin düzeyleri
- 13.** Tablo XIII: Grup III'de sitokin düzeyleri
- 14.** Tablo XIV: Sitokinlerin ortalama değerleri

ŞEKİL DİZİNİ

1. Şekil 1: T hücresi farklılaşması
2. Şekil 2: Besin toleransı mekanizmaları
3. Şekil 3: Besin hipersensitivitesi sınıflaması
4. Şekil 4: Ig E aracılı reaksiyon
5. Şekil 5: IgE aracılı olmayan reaksiyon
6. Şekil 6: Farelerde besin alerji model oluşturma takvimi
7. Şekil 7: Gruplarda eozinofil sayıları
8. Şekil 8: Gruplarda toluidine blue boyasında mast hücre sayıları
9. Şekil 9 :Gruplarda mast cell tryptase boyasında mast hücre sayıları
10. Şekil 10: Eozinofil ve mast hücre sayılarının gruplara göre dağılımı
11. Şekil 11: Grupların IL-4 düzeyleri
12. Şekil 12: Grupların IL-5 düzeyleri
13. Şekil 13: Grupların IL-8 düzeyleri
14. Şekil 14: Grupların IL-10 düzeyleri
15. Şekil 15: Grupların TNF- α düzeyleri
16. Şekil 16: Grupların IFN- γ düzeyleri
17. Şekil 17: Sitokin düzeylerinin gruplardaki dağılımı

KISALTMALAR DİZİNİ

IgE: İmmunglobulin E

EPA: Eikosapentaenoik asit

DHA: Dokosaheksaenoik asit

GIS: Gastro intestinal sistem

OVA: Ovalbümin

GALT : Gut Associated Lymphoid Tissue; bağırsakla ilişkili lenfoid doku

MCT: Mast Cell Tryptase

TB: Toluidine Blue

HE: Hemotoksilen Eozin

W-3: Omega 3

AEG: Alerjik Eozinofilik Gastroenterit

AEÖ: Alerjik Eozinofilik Ösefajit

SLIT: Sublingual immünoterapi

SIT: Spesifik immünoterapi

EFA: Esansiyel yağ asitleri

PUFA: Poliansature yağ asitleri

APC: Antijen sunan hücre

Th1: Tip 1 yardımcı T hücre

Th2: Tip 2 yardımcı T hücre

IL: İnterlökin

IFN: İnterferon

RESİMLER DİZİNİ

1. Resim 1: Sakrifiye edilen farenden intrakardiyak kan alınması
2. Resim 2: Farenin bağırsaklarının disseke edilmesi
3. Resim 3: Kalın bağırsak lamina propriyasında eozinofiller
4. Resim 4: Bağırsak mukozasında toluidine blue boyasında mast hücreleri
5. Resim 5: Bağırsak mukozasında immunohistokimyasal mast cell tryptase boyasında mast hücreleri

GİRİŞ VE AMAÇ

Alerji, 20. yüzyılda batılı toplumlarda başlıca sorunlardan birisi haline gelmiştir. Alerjik hastalıklar içinde besin alerjisi morbidite oranının önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Besin alerjili hastalar sıkı eliminasyon diyeti ve yaşam boyu sürebilecek hastalıkla engelli hale gelmektedirler. Besinlere duyarlı bazı hastalarda ölümcül reaksiyon riski günümüzde devam etmektedir (1).

Günümüzde besin alerjilerinin altta yatan immünolojik mekanizmaları ile ilgili az bilgi bulunmaktadır. Uygun hayvan modellerinin az olması en önemli nedendir.

Besin alerjisinin immünopatogenezi birden fazla immünolojik mekanizmayla açıklanabilir:

1. Akut hipersensitivite (Ig E aracılı)
2. Gecikmiş tip hipersensitivite (T lenfosit aracılı reaksiyonlar)
3. İmmün kompleksler sonucu oluşan enflamatuvar reaksiyonlar (2).

Epidemiyolojik veriler, batı toplumlarında alerjik hastalık prevalansının artışında diyetin rolü olduğunu düşündürmektedir. Önemli nedenlerinden biri uzun zincirli omega-3 yağ asitlerinin bu toplumlarda azalan tüketimidir. Omega-3 yağ asitlerinden zengin beslenen toplumlarda atopinin daha nadir geliştiği görülmektedir (3).

Son yıllarda, dünyada atopik hastalık insidansında artış izlenmektedir. ABD’de besin alerji prevalansı, yetişkinlerde %3.5-4, küçük çocuklar ve bebeklerde % 6-8 olarak tahmin edilmektedir. (4,5). Besin alerjisi, egzema, astım, ve rinokonjonktivit gibi diğer alerjik reaksiyonlardan farklı değildir. Artışın sebebi, intestinal floranın azalması ve immün reaksiyonların değişmesine sebep olan hijyen hipotezine dayandırılmaktadır (6,7). Besin alerji modelleri, mekanizmanın anlaşılması, besin alerjisini azaltmak için tedavi seçenekleri ve profilaksi açısından günümüzde daha sık kullanılmaktadır.

AMAÇ

- 1-Farelerde besin alerjisi modeli oluşturmak.
- 2-Omega 3 yağ asidinden zengin diyetle besin alerjisi gelişmesini önlemek.
- 3-Ovalbümin ve omega-3 yağ asitlerinin fare bağırsak mukozasında histopatolojik etkilerini araştırmak.
- 4-Besin alerji hayvan modellerinde, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, TNF- α , ve IFN- γ düzeylerinin değerlendirmek.

5-Omega-3 yağ asitlerinin gastrointestinal sistemden emilen yabancı proteinlerin alerjik reaksiyonlarını azaltarak antiinflamatuvar etkilerini deney hayvanlarının kanında gösterebilmek.

6-Daha sonra yapılacak besin alerjisi ile ilgili hayvan deneyleri için yol gösterici olmak ve insan çalışmalarında uygulanabilirliğini sağlamak.

GENEL BİLGİLER

Besinlere karşı istenmeyen reaksiyonlar besin ya da katkı maddesinin yenmesinin ardından oluşan her türlü olumsuz reaksiyonu içermektedir. Bu reaksiyonlar klasik olarak besin intoleransı ve besin hipersensitiviteleri olarak ikiye ayrılır (8).

Besin alerjisi, doğal besin bileşenlerinin sindirilmesi sonucu oluşan Ig E aracılı immün reaksiyondur ve genellikle toleransla sonuçlanır. Bu reaksiyonlar, besin ve besin katkı maddelerinin fizyolojik etkilerinden bağımsızdır. Besin alımı sırasında veya hemen sonra oluşan Ig E aracılı antikorlar ve IgE aracılı olmayan mekanizmaları içerir(11).

Sıklık

Diğer atopik bozukluklar gibi besin alerjileri de son 30 yıl içinde özellikle batılı ülkelerde artmıştır ve şu anda ABD toplumunun tahminen %2'sini etkilemektedir. Bebeklerin ve küçük çocukların %6'ya varan kısmı yaşamın ilk 3 yılı içinde besinlere karşı alerjik reaksiyonlar yaşarlar. Yapılan çalışmalar bebeklerin yaklaşık %2,5'inde inek sütü alerjisi, %1,5'inde yumurta alerjisi ve %0,6'sının yer fıstığı alerjisinin yaşamın ilk yılları içinde geliştiğini göstermiştir. Bebek ve çocukta süt ve yumurta alerjisi 2-3 yıl içinde kaybolur. Aksine yer fıstığı, fındık ya da deniz ürünlerine karşı alerji olanların %80'inde bu alerji ömürleri boyunca sürer (8).

Mortalite/ Morbidite

Besin alımından hemen sonra, ölümcül ciddi anafilaktik reaksiyonlar olabilir. Besinin tetiklediği anafilaktik reaksiyonlar deri, gastrointestinal sistem ve solunum sisteminde görülür. Sıklıkla gözlenen semptomlar, orofarengeal kaşıntı, anjiyoödem, stridor, disfoni, öksürük, dispne, hışıltı, bulantı, kusma, ishal ve ürtikerdir. Ölüm, ciddi laringeal ödem, geri dönüşümsüz bronkospazm ve hipotansiyon sonucu oluşur. Mayo Klinik'te acil servise anafilaksi sonucu başvuran hastaların yaklaşık üçte birinde besin alerjisi saptanmıştır (9).

Anafilaktik reaksiyonlar geniş besin çeşitlerinde görülse de fıstık, çam fıstığı ve midye bunların başlıcalarıdır.

Ölümcül besin alerjisindeki risk faktörler:

- 1) Kötü kontrollü astım varlığı,
- 2) Besin nedeniyle önceden geçirilmiş anafilaksi atağı,
- 3) Anafilaksinin erken semptomlarını tanıyamama,
- 4) Alerjik reaksiyonu tedavi etmek için hemen kullanılması gereken acil ilaçlarda

(epinefrin, antihistaminikler) gecikme ya da kullanılmamasıdır (9)

ALERJİK HASTALIKLARIN ÖZELLİKLERİ

Tip 2 Yardımcı T Hücreleri

Herkes potansiyel alerjenlerle karşılaşır. Atopik olmayan bireyler Th1'in çoğalmasıyla cevap verirler. Bu hücreler IFN- γ 'nın da aralarında olduğu bazı sitokinler salgılar. Bu sitokinler allerjene özgül IgG antikorlarının gelişmesi ile ilişkilidir. Th sitokinlerinin fagositleri aktive etme, opsonizasyon ve kompleman fiske edici antikorların üretimini hızlandırabilmektedir. Bu hücreler genellikle mikobakteriler (Şekil 1) gibi bazı intraselüler organizmaların yok edilmesinde görev alır. Genetik yatkınlığı olan atopik bireyler Th2'de hızlı artışla cevap verirler. Th2 hücreler ise IgE sentezini destekleyen sitokinler salgılar. Parazitlere karşı konak savunma mekanizmalarında görev alırlar (10).

Atopik cevaplar, deri prick testinde allerjene karşı pozitif hızlı reaksiyonlar veren allerjene özgül IgE antikorlarının üretimini içerir. IL-5 ve IL-9, IgE sentezini daha da hızlandırır ve eozinofillerin farklılaşmasında ve gelişiminde önemli rol oynarlar. IL-3, IL-4 ve IL-9 birlikte mast hücre gelişime katkıda bulunur. Bundan dolayı Th2 sitokinlerinin astım ve alerjik hastalıkların patojenezinde önemli rolleri olduğu öne sürülmüştür. Bu düşüncüyü destekleyen başka bir gözlem de Th2 hücrelerinin akut alerjik doku reaksiyonlarıyla etkilenen dokulara infiltre olmasıdır (10).

IgE ve Reseptörleri

Akut alerjik cevap IgE ve onun yüksek afiniteli Fc ϵ RI ve düşük afiniteli Fc ϵ RII'nin alfa zincirine seçici olarak bağlanma yeteneğindedir. Reseptöre bağlı IgE moleküllerinin çapraz bağlanması kompleks bir intraselüler sinyal kaskadı başlatır ve ardından mast hücresi veya bazofil degranülasyonu ve alerjik enflamasyonun çeşitli araçlarının salınımı gerçekleşir.

IgE sentezinde iki major sinyal yer alır. Başlangıç sinyali IL-4 veya IL-13'ün Ig lokusunda germline transkripsiyonu aktive etmesidir. Böylece izotip özgüllüğünü sağlar. İkinci sinyal B hücreleri üzerindeki CD40 ile T hücreleri üzerindeki CD40 ligandının birleşmesini içerir. IgE sentezini inhibe eden faktörler arasında Th1 sitokinleri (IL-12, IFN- α , ve IFN- γ) yer alır (10).

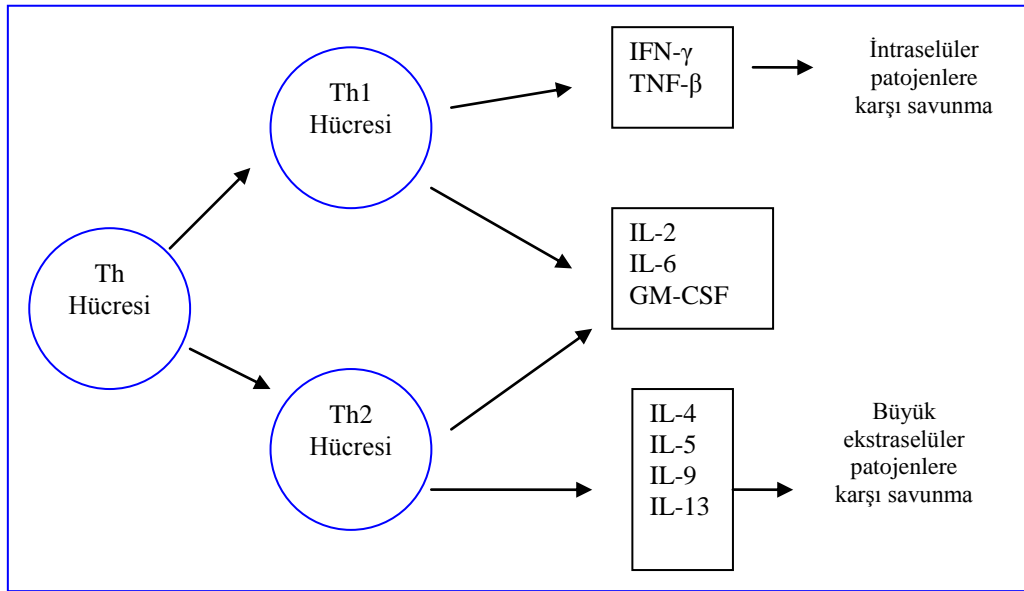
Eozinofiller

Alerjik hastalıklarda periferik kanda ve dokularda eozinofili görülür. Eozinofillerin yoğun intraselüler granülleri vardır. Bu granüller enflamatuar protein kaynağıdır. Eozinofil granül proteinlerinin epitelyum hücrelerini hasarladığı, havayollarında aşırı cevabı indüklediği, bazofil ve mast hücrelerinin degranülasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Eozinofillerin salgıladığı ürünler sitokinler (IL-4, IL-5, TNF- α), proteolitik enzimler ve

reaktif oksijen ara ürünleridir. Bunların hepsi alerjik doku enflamasyonunu hızlandırabilir (10).

Mast hücreleri

Mast hücreleri alerjik enflamasyon ve organ fonksiyonu üzerinde değişik etkileri olabilen çeşitli araçlar içerir veya üretirler. Bunlar arasında önceden oluşmuş granülle-ilişkili araçlar (örneğin; histamin, serin proteazları ve proteoglikanlar) ve membran kaynaklı lipidler, sitokinler ve kemokinlerin de novo sentezi ve salınımı yer alır. Mast hücre sitokinleri arasında Th2 tip cevaplarını (IL-4, IL-13, GM-CSF) ve enflamasyonu (TNF- α , IL-6) destekleyen ve dokuda yeniden yapılanmayı düzenleyen transforme edici büyüme faktörü, vasküler endotelial hücre büyüme faktörü yer alır (10).



Şekil 1. T hücresi farklılaşması (10)

Tablo I: Atopik hastalıklarda sitokinlerin fonksiyonları (10,99)

| | |
|--------------------------------|--|
| IL-3 | Ig E sentezi, Th2 yanıtı, mast hücre maturasyonu |
| IL-4 | Ig E sentezi, Th2 yanıtı, mast hücrelerin çoğalma faktörü |
| IL-5 | Ig E sentezi, Th2 yanıtı, eozinofillerin çoğalma ve farklılaşması |
| IL-9 | Ig E sentezi, Th2 yanıtı |
| IL-10 | Antiinflamatuvar sitokin |
| IL-13 | Ig E sentezi, Th2 yanıtı |
| TNF-α | Antijen sunumu, inflamatuvar sitokin |
| IFN-γ | IL-4 inhibisyonu; IL-4 sinyallenmesi; mast hücre gelişimi; proinflamatuvar enzim |

PATOFİZYOLOJİ

Gastrointestinal sistem (GIS), besinler kadar, bakteriler, parazit ve virüsleri de içeren birçok yabancı proteinle karşılaşır. GIS'in fonksiyonu, besinleri hücre büyümesi ve enerji için kolay sindirilebilir forma dönüştürmektir. Bu işlem sırasında, besinler içinde bulunan yabancı proteinlere tolerans ve bu yolla giren patojenlere savunma bariyeri sağlamalıdır (11).

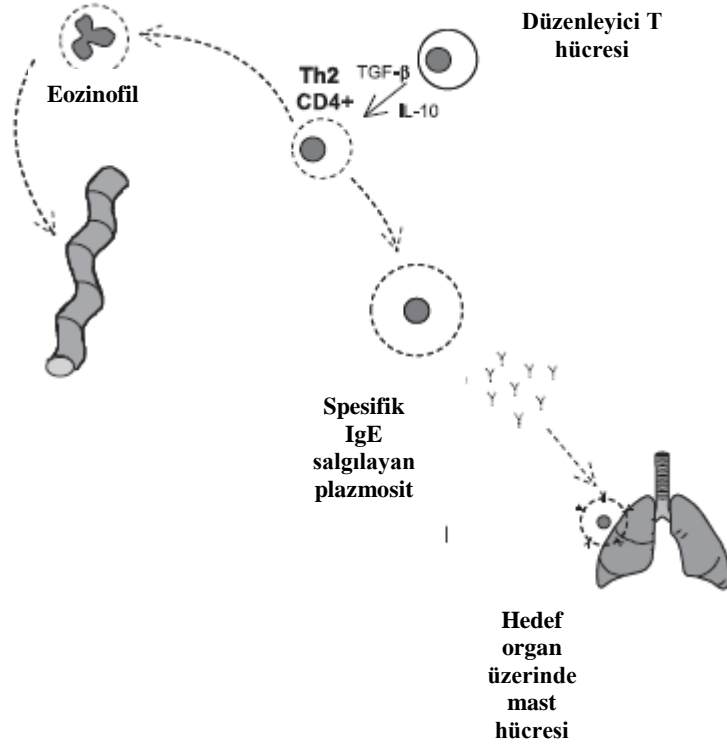
Yabancı antijenlere karşı sistemik karşılaşmayı azaltmak için, GIS'de immunolojik ve immunolojik olmayan birçok bariyer vardır. İmmunolojik olmayan veya mekanik bariyerler, gastrik asit sekresyonu ve proteolitik enzimlerdir. Bunlar proteinlerin hem boyutunu küçülterek hem de yapısını değiştirerek daha az antijenik halde sindirimini sağlar (16). Diğer fiziksel bariyerler, peristaltizm, mukus üretimi ve mukus sekresyonunu içerir. Bu bariyerler, potansiyel alerjenlerin GI mukoza ile temasını önler.

İmmunolojik bariyerler GIS, Gut associated Lymphoid Tissue (GALT) adı verilen lokal immun sistem tarafından desteklenmektedir. GALT, intestinal mukozanın her yerine dağılmış lenfoid folikülleri, intraepitelyal lenfositler ve mezenterik lenf düğümlerinden oluşur. Besin alımından sonra, antikor üretimi ve salınımı artar. Bu da Ig A üretiminde artış, Ig G, Ig M ve Ig E üretiminde baskılanma ile birlikte (18).

Tolerans

Tolerans, spesifik antijene karşı immunolojik yanıtsızlıktır. Tam mekanizma çok iyi anlaşılamamış olmasına rağmen, oral tolerans gelişmesinde hem lokal hem de sistemik immun sistem önemli rol oynar. GIS tarafından antijenlerin allerjenik veya tolerojenik form olarak işleme tabi tutulması önemlidir (20). Hayvan modellerinde, besine tolerans kazanmış fareler, alerjik farelerle karşılaştırıldığında, artmış IL-10 ve TGF- β seviyeleri gösterilmiştir (17) (Şekil 2). Bağırsaklarda IL-10'dan zengin bir çevre oluşturmak besin alerjisini önlemede,

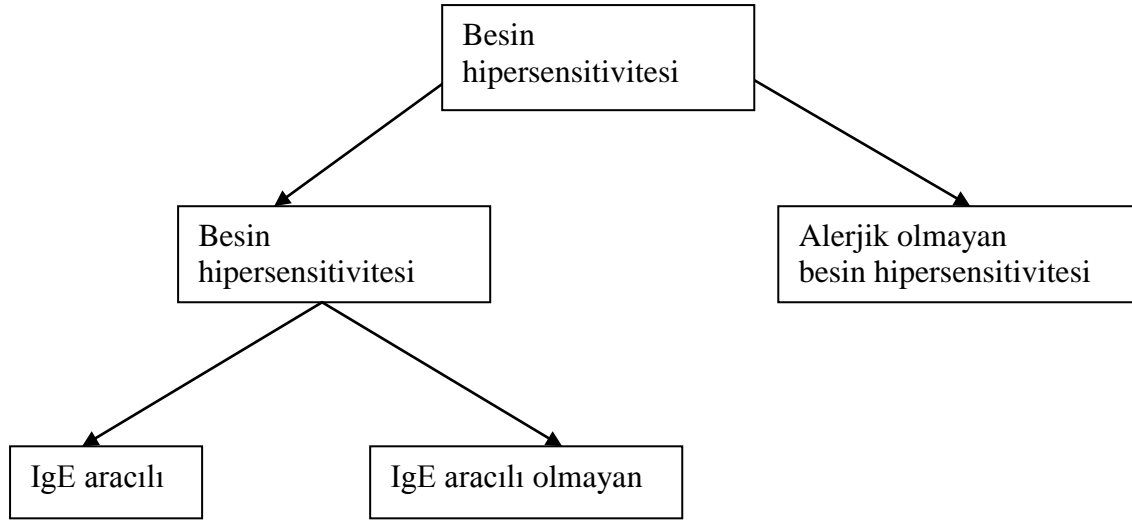
hatta tedavi etmede bir seçenek gibi görünmektedir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada IL-10 salgılayan *Lactococcus Lactis* suşuyla besin alerjisinin önlenildiği gösterilmiştir (19, 21).



Şekil 2. Besin toleransı mekanizmaları (17). Düzenleyici T lenfositler IL-10 ve TGF-β salgılayarak, önceden IL-5 ve Ig-E salgılayan yolları inhibe ederler.

Besin hipersensitivitesi, nedeni multifaktoriyel gibi görünen, tolerans kaybı veya eksikliğinin sonucudur. Bebek ve çocuklarda artmış insidans, immun sistem ve GIS fizyolojik fonksiyonlarının immatüritesi nedenidir (22). Yetişkinlerle karşılaştırıldığında, bebeklerin azalmış asit sekresyonu, glikoproteinlerin hem fiziksel hem de kimyasal özellikleri azalmış mukus sekresyonu ve enzimatik aktivitesi, immunolojik immatüriteyle de birleştirildiğinde alerji gelişim riskini artırabilir (11).

Duyarlılaşmanın oluşabilmesi için, antijenin lamina propria, peyer plakları, lenf düğümleri, dolaşımdaki lenfositlerle karşılaşması gerekir (23). İmmunolojik ve immunolojik olmayan bariyerlerin bozulması antijenin işlenmesini değiştirebilir ve sistemik antikorların aşırı üretimine neden olur. Atopiye genetik yatkınlığı olan kişilerde, antijenle tekrar karşılaşınca Ig E salgılanmasına ve sonuç olarak besin hipersensitivite reaksiyonlarının oluşmasına neden olabilir (24).



Şekil 3. Besin hipersensitivitesi sınıflaması (33)

Alerjenler

Besinlerdeki glikoproteinler besin alerjilerinde en çok suçlanan öğelerdir. Allerjenik glikoproteinlerin moleküler ağırlığı 10-67 kd'dur. Suda çözünen, ısıya dayanıklı, asit ve proteolitik sindirime dirençlidirler (25).

ABD'de (primer olarak çocuklarda) yapılan çift kör plasebo kontrollü, besin alerji çalışmasında reaksiyonların %93'ünden sekiz besin sorumludur (26). Bu besinler, sıklık sırasıyla yumurta, fıstık, inek sütü, soya, çam fıstığı, balık, deniz kabukluları ve buğdaydır (25). Tanımlanmış bazı besin alerjenleri, fıstık Ara h1, Ara h2, Ara h3; yumurta akı Gal d1, Gal d2, Gal d3; soya fasulyesi Gly m1; balık Gad c1; karides pen A12 dir. Birbiriyle ilişkili besinler, sıklıkla immünolojik olarak çapraz reaksiyona giren alerjenler içerirler (deri prick ve in vitro testlerle gösterilebilen spesifik antikorlar üretirler). Çapraz reaksiyon gösteren alerjenler, belirli bazı besinler ve polenler arasında tanımlanmıştır.

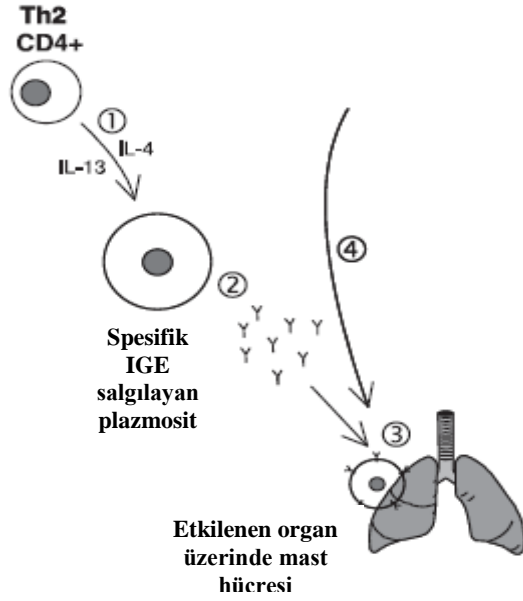
IgE aracılı besin alerjileri geliştiren çocuklar sınıf 1 besin alerjileri olan gastrointestinal bariyeri geçen alerjenlere ya da bitki polenleri gibi solunum sistemini etkileyen sınıf 2 besin alerjenleri tarafından duyarlılaştırılabilir. En sık alerjiye neden olan besinlerdeki temel alerjik proteinler Tablo II' de gösterildi (8).

Tablo II: Temel besin alerjenleri (8)

| Sınıf 1 | | |
|--------------------|----------------|--|
| Besin | Protein | Alerjen ismi |
| İnek sütü | Kazein | Bos d 8 |
| | B laktalbümin | Bos d 5 |
| Yumurta | Ovomukoid | Gal d 1 |
| Yer fıstığı | Visilin | Ara h 1 |
| | Konglütin | Ara h 2 |
| Balık | Paralbümin | Gad c 1 |
| Sınıf 2 | | |
| Polen | Protein | Çapraz reaksiyon gösteren besin |
| Huş ağacı (Birch) | Bet v 1 | Elma (Mal d1) |
| | | Havuç (Dau c 1) |
| | | Patates (Sol t 1) |
| | | Kiraz (Pru av 1) |
| Ambrosia | | Su kabağı |
| | | Cantalaupe |
| | | Kavun |

IgE ARACILI REAKSİYONLAR

Besinlere karşı reaksiyon Ig E aracılı ve Ig E aracılı olmayan olarak ikiye ayrılır. Spesifik antikolar aracılığı ile olan immün yanıtlar besin hipersensitivitesinin en sık tanınan mekanizmasıdır. Besin antijenine, APC yoluyla ilk karşılaşması ve saf T hücrelerinin işlenmesi sonucunda IL-4 ve IL-13 salgılanmasıyla birlikte TH-2 tip yanıtı neden olur. (Şekil 4). Bu iki sitokin alerji yanıtının başlamasını ve plazma hücreleri tarafından Ig E salgılanmasını sağlar. Daha sonra dolaşımdaki Ig E, hedef organlarda bulunan mast hücrelerin üzerindeki FCεR1 reseptörüne bağlanır. Aynı besinle tekrar karşılaşma sonrasında, antijenler FCεR1'e bağlı IgE'yi aktive eder ve mast hücre degranülasyonunu başlatır (17). Histamin, prostaglandinler, lökotrienler, kemotaktik faktörler ve sitokinler gibi çok sayıda mediyatör salınımını başlatan intraselüler sinyal gönderir. Bu mediyatörlerin çevre dokulara etkisi, alerjik reaksiyonlarda oluşan klinik semptomlardan sorumlu olan vazodilatasyon, düz kas kontraksiyonu ve mukus sekresyonudur. Sitokinler, birkaç saatte salgılanır ve geç faz reaksiyonlarda önemli rol oynadıkları düşünülmektedir. Ig E aracılı besin alerjilerinin kliniği, tutulan organa bağlıdır. Reaksiyonlar izole, kombine veya jeneralize anfilaktik reaksiyonun bir parçası şeklinde olabilir (11).



Şekil 4. IgE aracılı reaksiyon (17)

IgE aracılı reaksiyonun şematik gösterimi.(1) antijen-spesifik, Th2 tip lenfosit IL-4 ve IL-13 salgılayarak plazma hücrelerinden IgE salgılanması. (2) IgE'nin serumda dolaşımı. (3) Organlarda bulunan mast hücrelerine bağlanma. (4) Besinin tekrar alınımıyla, mast hücre üzerindeki IgE'ye bağlanma ve mast hücre degranülasyonu.

Deri reaksiyonları

Deri reaksiyonları, besin ve besin ürünlerine karşı alerjik reaksiyonların en sık karşılaşılan klinik bulgularıdır. Fakat deri bulgularının olmaması besinle indüklenen anafilaksiyi dışlamamaktadır (27). Semptomlar akut ürtikerden , flushing, anjiyoödem ve atopik dermatite kadar görülebilir. Besin alerjisi neredeyse hiçbir zaman kronik ürtikere neden olmaz . DBPCF (Çift kör plasebo kontrollü besin provokasyonu) ile atopik dermatitli çocukların üçte birinde besin alerjileri sorumlu bulunmuştur (28).

Atopik Dermatit

Çalışmalarda, orta dereceli kronik atopik dermatitli hastaların %35-40'ındaki deri reaksiyonlarına Ig-E aracılı besin alerjisi neden olmaktadır. Besin-spesifik Ig E aracılı ve hücrel mekanizmalar, kronik egzematöz enfeksiyondan sorumludur. Etkilenen hastalarda, spesifik besin alerjenin uzaklaştırılması klinik semptomların azalmasını sağlar. Aynı besin tekrar verildiğinde atopik dermatit kötüleşir. Şüpheli besinin tekrar verilmesi, kontrol altında olmalıdır çünkü, bazı durumlarda diyet eliminasyondan sonra besin tekrar geri verildiğinde sürekli alındığına göre daha ciddi semptomlar gözlenebilmektedir. Çalışmalarda inek sütü, yumurta, fıstık gibi besinlerin alımından kaçınmanın atopik dermatit gelişimini geciktirdiği gösterilmiştir.

Gastrointestinal sistem reaksiyonları

Gastrointestinal semptomlar, besin alerjisinin ikinci en sık bildirilen reaksiyonlarıdır. Klinik başvuru bulantı, kusma, ishal, karın ağrısı ve krampları içerir. Bu semptomlar yalnız başına veya diğer organ semptomları ile birlikte olabilir. Yapılan çalışmalarda bazı olası mekanizmaları gösterilmiştir, fakat hala bilinmeyen daha fazladır. Bu semptomların mast hücre aktivasyonu sonucu olduğuyla ilgili kanıtlar vardır (30). Radyolojik verilerle, alerjik bireylerde belirli besinlere yanıt olarak gastrointestinal motilitenin değiştiğini gösterilmiştir. Besin alerjisi verildiğinde gastrik mukozanın direkt görüntülenmesi, hiperemi, ödem, peteşi, artmış mukus, ve azalmış peritaltizmi göstermiştir (11).

Oral alerji sendromunun, besin alerjisinin oral mukoza ile temasından sonra oluşan kontakt ürtiker formu olduğu düşünülmektedir. Belirli besinleri aldıktan sonra hastaların dudak, dil ve damaklarında kaşıntı ve karıncalanma olur. Ek olarak dudak, dil ve uvulada ödem, boğazda sertlik hissi gözlemlenebilir. Bu sendrom bazı polen ve besin alerjenleri arasındaki kros-reaksiyon sonucuyla oluşur (31). Huş ağacı poleni alerjisi olan hastalarda bu semptomlar havuç, kereviz, patates, elma, fındık, kivi alımından sonra gözlenir. Oral alerji semptomları nadir ve hızlı olarak diğer hedef organlarda görülebilir.

Alerjik eozinofilik gastroenteropati GIS'in eozinofilik infiltrasyonu sonucu oluşur. Semptomlar tutulan GIS segmentlerine bağlıdır. Sıklıkla periferik eozinofili ile birlikte ve nadiren diğer organları tutar. Mukozanın eozinofilik infiltrasyonu daha sıktır ve GIS'in herhangi bir bölgesinde görülebilir. Klinik semptomlar karın ağrısı, postprandiyal bulantı, kusma, ishal, kilo kaybı, büyüme geriliği, gaitada gizli veya makroskopik kan, anemi, hipoalbuminemi ve periferik ödemi içerir (32). Submukozal ve muskuler bölgelerin tutulumu, gastrik antrumun prepilorik bölgesinde ve distal ince bağırsakta daha sıktır. Ayrıca gastrik çıkış obstrüksiyonu, epigastrik hassasiyetle birlikte kitle lezyonu ve aynı zamanda bağırsak perforasyonu gibi semptomları vardır (32). Nadiren, eozinofilik infiltrasyon belirgin asitle olan serozal yüzeyleri tutabilir. Eozinofilik gastroenteropatisi olan hastaların Ig E aracılı olduğu, astım ve alerjik riniti içeren atopi öyküsü ve artmış Ig E düzeyinin olduğu düşünülmektedir. Çok sayıda besine karşı, birçok besin intoleransı ve pozitif deri testi sonuçları bulunmaktadır (34).

İnfanıl kolik 3 aydan küçük bebeklerde olan, yineleyen huzursuzluk atakları, durdurulamayan ağlama, bacaklarını karnına çekme, batın distansiyonu ve aşırı gazla karakterize bir sendromdur. Semptomlar sıklıkla gaita ve gaz çıkışı sonrası rahatlar (35). Sıklıkla öğleden sonra veya akşam, beslenme sonrası olur ve birkaç saat sürer. Bazı çiftkör kesitsel çalışmalar, hem anne sütü hem de formüle mama ile beslenen olguların bir kısmında

mekanizmanın Ig E aracılı besin hipersensitivitesi ile olduğunu desteklemiştir (36). Semptomları tamamen rahatlatarak tedavi seçeneği olmaksızın, çok iyi tanımlanamamış ve multifaktöriyel gibi görünmektedir. Sosyal, emosyonel, çevresel faktörler, besleme teknikleri, çok fazla ve çok az besleme sorumlu tutulmaktadır. Besin alerjisinin olguların %10-15'inden sorumlu olduğu düşünülmektedir (37).

Solunum reaksiyonları

Besin alerjisinin solunum reaksiyonları , sıklıkla generalize anafilaktik reaksiyonun bir parçası olarak ortaya çıkar. Semptomlar hapşırma, burun akıntısı, göz, kulak ve damakta kaşıntı, bronkospazm ve larinks ödemi içerir. İzole havayolu semptomları oldukça nadirdir (38).

Anafilaksi

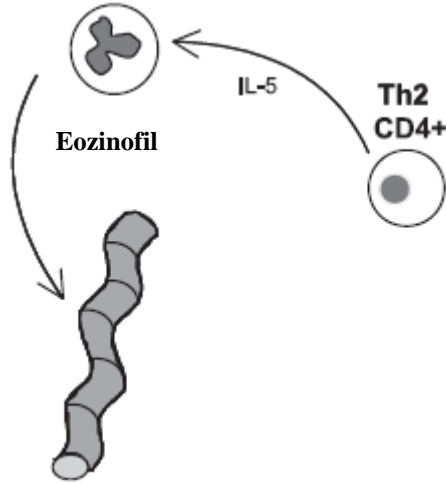
Anafilaksi yaşamı tehdit eden, şiddetli, jeneralize veya sistemik hipersensitivite reaksiyonudur. Mast hücreleri ve bazofillerden ani mediyatör salınımı sonucu deri , GIS, solunum sistemi ve bazen kardiyak (hipotansiyon, disritmi) sistemin tutulumu ile oluşur. Semptomlar besin alındıktan hemen sonra başlar, bazen bifazik olabilir. Ağır reaksiyonlarda deri bulguları görülmeyebilir.

Hafif anafilaksidede ağızda karıncalanma, kaşıntı, kötü tat, flushing, ürtiker, karın ağrısı, bulantı, kusma, ishal vardır. Ağır anafilaksidede ise boğazda tıkanma, stridor, vizing, hipotansiyon, siyanoz görülür. Başlıca tetikleyenler fıstık, fındık ve deniz ürünleridir. Aspirin, egzersiz ve alkol anafilaksi riskini artırır. Besine bağlı egzersizin oluşturduğu anafilaksi nadir bir sendromdur. Oluşması için hem alerjenik besinin yenilmesi hem de egzersiz gereklidir. Sorumlu besinler buğday, fındık, fıstık ve karıdestir. Anafilaksi tanısında yardımcı olan β triptaz besin anafilaksisinde nadiren yüksektir (47).

Bugün besin anafilaksisi birçok ülkenin acil servislerde tedavi edilen anafilaksinin en başta gelen sebebi olarak gösterilmektedir (48).

IgE-ARACILI OLMAYAN REAKSİYONLAR

Bu reaksiyonların patojenezinde, artmış IL-4, IL-5 ve IL-13 seviyesiyle karakterize Th2 tip yanıt mevcuttur. IL-5, eozinofillerin aktivasyonuna neden olan sitokindir (Şekil 5). Patojenik mekanizmasında yalnızca Th2 tip lenfositler ve eozinofiller yer almaktadır. Sonuç olarak besine bağlı eozinofilik hastalığın tanısı zordur ve pozitif IgE veya gecikmiş deri testlerine dayanmaz (17).



Şekil 5. IgE aracılı olmayan reaksiyon (17). Eozinofilik besin alerjisinin şematik gösterilmesi. Antijenle ilk sensitizasyondan sonra , Antijen spesifik Th2 tip lenfositler IL-5 salgılayarak, eozinofil aktivasyonuna neden olur.

Besine bağlı Enterokolit

Besine bağlı enterokolit, üç aya kadar olan bebeklerde uzamış kusma ve ishal olarak tanımlanır. Semptomlar alerjenin alınmasından 1- 8 saat sonra kronik ishal, eozinofili ve malabsorbsiyon kliniği ortaya çıkar. Ağır semptomlar dehidratasyona neden olabilir (39). İnek sütü proteinine karşı alerji en sık nedendir. Antijenler anne sütüyle geçtiği için, anne sütü ile beslenen bebeklerde görülür. Gaita, eritrosit, nötrofil ve eozinofilleri içerir (39). Jejunal biyopsi parsiyel villus atrofi, lenfositoz, IgM ve IgA içeren plazma hücrelerini gösterir. Deri prick testi sonuçları, immunolojik mekanizmanın IgE aracılı olmadığını destekler. Semptomların gerilemesi alerjenin eliminasyonundan sonra 72 saat içinde kaybolur, fakat ishal sekonder disakkaridaz eksikliğine bağlı olarak devam edebilir.

Besine bağlı kolit

Sorumlu alerjenler inek sütü ve soya ile birlikte besine bağlı enterokolite benzer. Tutulum kolonla sınırlıdır (40). İshal, belirgin dehidratasyon yoktur ve çocuklar daha az hasta görünümündedir. Gaitada gizli kan veya hematokezya en sık klinik bulgudur. Sigmoidoskopi

bulguları yamalı mukozal lezyonlardan ağır kanamalı aftöz ülserlere kadar uzanır. Kan kaybı alerjenin kaybolmasından 72 saat sonra geriler, fakat mukozal lezyonların iyileşmesi bir ay kadar sürer.

Malabsorbsiyon sendromları

Semptomlar genellikle yaşamın ilk ayında olup, etiyoloji nonspesifiktir. Steatoreden, uzamış ishal, kilo kaybı, ve büyüme geriliğine kadar uzanır . Gaitada artmış yağ oranı ve redüktan madde saptanır. İnce bağırsakta , normal mukoza arasında villöz atrofi alanları bulunur ve yamalı enteropati olarak adlandırılır (41).

Çölyak Hastalığı

Gluten duyarlı enteropati olarak da adlandırılan çölyak hastalığı, gluten alımına sekonder malabsorbsiyonla karakterizedir. Neden olan alerjen, buğday ve yulafta bulunan glutenin alkolde çözünen kısmı olan gliadindir. İnce bağırsak glutenin diyetten çıkarılmasıyla gerileyen karakteristik lezyonlar içerir. Hastalık 2 ay- 6 yaş arasındaki çocuklarda ortaya çıkar. İnce bağırsağın proksimal kısmı değişik derecelerde tutulur (42).

İnce bağırsak lezyonları yamalı değil sürekli, mukozayla sınırlıdır, submukoza, muskularis ve serozaya yayılabilir. Mikrovillüsler kısalmış, villüsler düzleşmiştir, kripler hiperplastiktir ve sitolojik olarak anormal yüzey hücreleri ile doludur. Lamina propria plazma hücreleri ve lenfositlerle hipersellülerdir. Bazofil, eozinofil ve mast hücreleri aynı zamanda mevcuttur (43,44).

Dermatitis herpetiformis

Gluten sensitif enteropatiyle birlikte olan, kaşıntılı döküntü tarzında besin hipersensitivite reaksiyonudur. Sıklıkla 2-7 yaş çocuklarda görülür. Döküntü, bilek, dirsek, omuzlar ve başta pleomorfik erupsiyon tarzındadır. Lezyonlar, ürtiker, papüler, veziküler veya büllöz olabilir. Düz kas endomisyuma karşı IgA antikoru % 70 hastada bulunur. Antikor titreleri intestinal hastalığın ağırlığı ile ilişkilidir (45).

Heiner Sendromu

İnek sütü hipersensitivitesi ile ilişkili primer pulmoner hemosiderozisin bir formudur. Nadirdir, bebeklerde ve küçük çocuklarda hışıltı, kronik öksürük, reküren pulmoner enfeksiyon, hipokrom mikrositer anemi ve büyüme geriliği ile karakterizedir (46). Rinit, hipertrofik nazofaringeal doku, reküren otitis media, GIS semptomları ve büyüme geriliği görülür. Hastalarda inek sütü proteinlerine karşı pozitif deri testi görülebilir. Semptomlar inek sütü diyetten çıkarılınca geriler.

BESİN ALERJİSİNDE TANI

Sorumlu besin hikaye, fizik muayene ve yardımcı laboratuvar yöntemleri ile saptanır. Hikaye çok önemlidir. Hikaye alırken hastanın hangi besini aldıktan sonra yakınmalarının başladığı, semptomların özellikleri, şiddeti, sıklığı, zamanı, semptomların başlama yaşı, kişisel ve ailevi atopik hastalıkların varlığı sorgulanmalıdır. Besinlere eklenen gizli alerjenlere de dikkat edilmelidir. Özellikle kronik hastalarda besin günlükleri hikayeye yardımcı olur, eliminasyon diyetleri tanı ve tedavi amaçlı uygulanabilir. Alerjik eozinofilik ösefajit ve alerjik eozinofilik gastroenterit gibi bazı durumlarda aminoasit formulları ile elementel diyet hasta düzelinceye kadar haftalarca devam edilebilir (47).

Besin alerji Laboratuvar Bulguları

Deri Prick Testleri

Ig E aracılı besin alerjilerinde deri prick testleri duyarlılaşmayı gösteren, sensitif, iritan olmayan, çabuk sonuç veren, kolay testlerdir. Besin prick testleri sorumlu olabilecek besinler için tarama testleri olarak kullanılır. Pozitif test her zaman besininin sorumlu olduğunu göstermez. Negatif deri testi sonuçları reaksiyonların IgE aracılı olmadıklarını gösterir. Negatif prediktif değeri % 95'ten fazladır, pozitif prediktif değeri ise % 50'dir. Fakat 2 yaşından küçük bebeklerde inek sütü, yumurta veya fıstığa karşı 8 mm'den büyük ödem plağı reaksiyonu alerjiyi belirler. Ticari besin alerjisi ekstrelerinin stabil olmaması nedeniyle özellikle meyveler ve sebzeler için taze besinlerin prick-prick yöntemi ile uygulanması daha doğru sonuçlar verir (47).

Serumda Allerjene spesifik IgE

Serum testleri ile besine spesifik IgE antikorlarını belirlemek (CAP veya UniCAP sistemi, FEIA, diğerleri) IgE aracılı besin alerjilerini değerlendirmede bir başka seçenektir. Sensitivitesi deri prick testine benzer. Deri hastalığı, ilaç kullanımı gibi deri prick testinin uygulanamadığı durumlarda gereklidir. Yüksek konsantrasyonlardaki besine spesifik IgE daha fazla klinik reaksiyon ile ilişkilidir. Tanısal değerden daha yüksek IgE değerine sahip kişiler %95 olasılıkla alerjik reaksiyon geliştirirler (Tablo III). Fakat bazı hastalarda alerjen spesifik IgE değeri 0,35 kU/L'nin altında olmasına karşın alerjik reaksiyon geçirme riski taşırlar. Eğer bir alerjik reaksiyon kuvvetle düşünülüyorsa negatif spesifik IgE ve negatif deri prick testi olsa bile doktor gözetiminde besin provokasyonu ve taze besinlerle prick to prick deri test yapılarak klinik besin alerjisi ekarte edilmelidir (49).

Tablo III: Besin spesifik Ig E düzeylerinin prediktif değerleri (47)

| Allerjen | % 95 prediktif deęer(kU/L) | Pozitif prediktif deęer |
|----------------|-----------------------------|-------------------------|
| Yumurta | 7 | 98 |
| ≤ 2 yaş | 2 | 95 |
| Süt | 15 | 95 |
| ≤ 2 yaş | 5 | 95 |
| Yer fıstığı | 14 | 100 |
| Balık | 20 | 100 |
| Fındık türleri | ~ 15 | ~ 95 |
| Soya | 30 | 73 |
| Buğday | 26 | 74 |

Atopi yama (patch) testi

Atopik dermatit ve geç reaksiyonlarda önerilir. Aeroallerjenler veya besin allerjenleri ile yapılan epikütanöz bir testtir. T hücre aracılı duyarlılaşmayı gösterdiği düşünülür. Halen uygulanmasında standart yöntemler bulunmamaktadır. Alerji şüphesi olan fakat besin spesifik IgE'si negatif veya deri prik testleri ile pozitif reaksiyon gösterilemediği, tetikleyicilerin bulunamadığı atopik egzemada tanı amaçlı kullanılabilir (50).

Oral provokasyon testi

Besin alerjisi veya intoleransının tanısında çift kör plasebo kontrollü besin provokasyonu testi (ÇKPKBP) altın standarttır. Hikaye, deri prick testleri ve serumda besine spesifik IgE hangi besinle provokasyon yapılacağını belirler. Açık veya tek kör provokasyonlar 3 yaşından küçük çocuklarda veya besine bağlı alerjik reaksiyon daha az olasılıkla düşünüldüğü durumlarda uygulanır. Besin provokasyonundan önce hasta test konusunda bilgilendirilmeli ve izin formu alınmalıdır. Şüphelenilen besin, provokasyondan 7-14 gün önce kesilmelidir. Teste başlamadan hasta semptomsuz ve aç olmalıdır. Doktor gözetiminde, acil girişimde olabilecek tüm malzemeler hazır şekilde tutularak sorumlu besin artan dozlarda yedirilir. Testten sonra hasta en az 2-4 saat gözetim altında tutulur. Eğer ÇKPKBP testi negatifse yanlış negatif sonucu önlemek için test sonrası besin açık şekilde yedirilmelidir (49).

BESİN ALERJİSİNDE TEDAVİ

Besin eliminasyonu

Günümüzde besin alerjisi tedavisinde geçerliliği kanıtlanmış tek tedavi yöntemi alerjiye yol açan besinin diyetten çıkarılmasıdır. Bir besinin kesin yasaklanması için öncelikle uygun tanı metotları ile alerjen olan besinin doğru tanımlanması gerekir. Eliminasyonu yapılan besin içeriğinin diyetle yerine konulması, çocuğun normal büyüme ve gelişmesinin sağlanması ve malnütrisyonun önlenmesi için büyük önem taşır (51).

Toleransın değerlendirilmesi

Eliminasyon diyeti uygulanan bazı hastaların semptomları zamanla azalır ve birkaç yıl içinde besin alerjisi kaybolabilir. Besinin cinsine, reaksiyonun şekline ve şiddetine göre birkaç yıllık aralıklarla besin provokasyon testleri tekrarlanarak hasta değerlendirilmelidir.

Reaksiyonların tedavisi

Anafilaksinin erken belirtilerinde acilen 0.01 mg/kg, maksimum 0.3 mg epinefrin yapılması önerilmelidir. H1 ve H2 antihistaminler ketotifen, kortikosteroidler, prostaglandin sentetaz inhibitörleri, lökotrien inhibitörleri, besin alerjisinin semptomatik tedavisinde denenmiş ve hafif şiddetteki semptomlarda düzelme görülmüştür. Hasta, ebeveyn, öğretmen, bakıcı gibi kişiler epinefrin otoenjeksiyonu (EpiPen) kullanmasını öğrenmeleri gerekir. Özellikle besin alerjisi ile birlikte astımı olan genç erişkinler, daha önce ağır reaksiyon geçirenler, fındık, fıstık, deniz ürünlerine karşı alerjisi olanlara EpiPen taşınmalıdır (47).

İMMÜNÖTERAPÖTİK YÖNTEMLER

Spesifik İmmünoterapi (SIT)

Alerjenin uzun süre enjeksiyonu , alerjene karşı azalmış sensitiviteye neden olur; bu da IFN- γ , IL-10 seviyelerinin artması ve Th2 tip yanıtın Th1 veya düzenleyici tip yanıtı kayması ile ilişkilidir. Yakın zamanda sublingual immünoterpinin (SLIT)'in , eşit etki ile birlikte enjeksiyonlardan daha az yan etkisi olduğu gösterilmiştir (56-57). Ek olarak, SIT'in oral alerji sendromunun semptomlarını ortadan kaldırabilmesinden dolayı bazı endikasyonlar vardır (58)(Tablo IV).

SLIT, bazı doğal besin alerjenleri (süt,yumurta, fındık, fıstık) ile denenmiş ve bazı hastalarda başarılı sonuçlar alındığı rapor edilmiştir. Ancak kazanılan kısmi toleransın devam etmesi için besinlerin hergün belli miktarda yenilmesi gerekmektedir (55, 56).

Nonspesifik İmmünoterapi

SIT, alerjiye neden olan altta yatan immünolojik mekanizmaları düzeltmeyi amaçlarken, Th2 sitokinleri hedefleyen nonspesifik tedavi veya anti IgE, semptomların ortadan kaldırılmasında yardımcı olabilir (59).

Anti IgE tedavisi

Anti IgE ile klinik çalışmalarda iki çeşit humanize rekombinant IgG1 monoklonal anti IgE preparatı (TNX-901 ile Omalizumab / Xolair) kullanıldı. Anti IgE antikoru IgE molekülünün Fc kısmındaki CH3 bölgesine bağlanarak IgE'nin mast hücre ve bazofillerin üzerindeki yüksek afiniteli Fcε reseptörüne bağlanmasını önler. İlk çalışma TNX-901 ile 2003'te fıstık alerjili 84 erişkin hastada rapor edildi (60).

Sitokinler

Sitokinler ve antisitokin monoklonal antikorlar birçok hastalıkta klinik çalışmalarda denenmiştir, fakat besin alerjilerine karşı test edilmemişlerdir. Ancak sitokinler astım ve atopik dermatit gibi aynı alta yatan mekanizmaya sahip olan diğer alerjik hastalıklarda test edilmiştir. IL-4 R alfa aracılığıyla sinyal gönderen IL-4, IL-5, IL-9 ve IL-13 gibi Th2 sitokinlerinin salgılanması ve IgE üretiminde önemli olduğu bilinir (61).

Fare modelleri ile gösterilmiştir ki; IL-10 oral tolerans ve immünoterapi için önemlidir ve IFN-γ oral toleransın gelişmesinde önemli rol oynar (62). Recombinant IL-10 üretildi fakat, kolit için faz-3 çalışmalarda deniyor olmasına rağmen henüz alerjilere karşı test edilmemiştir (63). Rekombinan IFN-γ alerjik rinit ve konjonktiviti olan hastalarda düzelmeye birlikte, atopik dermatit için yapılan faz 2 çalışmalarda yüz güldürücü sonuçlar vermektedir. Lipozom enkapsule RIL-12'nin oral yolla verildiği fare modelinde, fıstık alerjisi üzerinde hem önleyici hem de teröpatik etkisi görüldü (64).

DOĞAL TEDAVİ YÖNTEMLERİ

Geleneksel Çin ot tedavisi

Dokuz çeşit ot içeren bir Çin ot karışımı fıstık alerjili farelerde denendi. Bu otların fıstığa bağlı anafilaktik reaksiyonları tamamen önlediği koruyucu etkisinin kalıcı ve anlamlı olduğu, belirgin bir toksisitesinin olmadığı görüldü. Bu ot karışımının insan çalışmaları onay beklemektedir (52).

BESİN ALERJİSİNİN DOĞAL SEYRİ

Erişkinlerde besin alerjisinin doğal seyri bilinmemektedir. Çocuklarda sorumlu besinin diyetten çıkarılmasından sonra besine tolerans gelişmesi sıktır. Bebeklerdeki süt alerjisinin %50-60'ı bir yaşında, % 50-75'i iki yaşında; % 85'i üç yaşında geçer. Yumurta alerjisinin %55'i ise altı yaşında düzelir.

Fıstık, fındık, balık ve kabuklu deniz ürünlerine alerji yaşam boyu sürer fakat sık olmasa da(% 10-20) geçebilir (47).

Tablo IV: Besin alerjisinde spesifik immünoterapi (100)

| Alerji | Tedavi | Yaklaşım | İlişki | Moleküler etkiler | Klinik etkiler |
|-----------------------------|-----------------------------|--|---------------|---|--|
| Fıstık | Fıstık | Enjeksiyon | İnsan | Artmış oral tolerans | Önemli klinik etkiler |
| Fıstık | Fıstık | Enjeksiyon | İnsan | Artmış oral tolerans | Önemli klinik etkiler |
| Elma (Oral alerji sendromu) | r BET v1 (Huş ağacı poleni) | SIT | İnsan | IgG4 artmış, düzenleyici T hücreleri değişmemiş | Besin provokasyonunda semptom azalması |
| Elma (Oral alerji sendromu) | Huş ağacı poleni | SIT (Sublingual ve Subkutan karşılaştırması) | İnsan | Spesifik Ig E azalmış | Semptom azalması yok |
| Fıstık | Modifiye Ara h 1-3 | Alerjen+ısıyla öldürülmüş L. monocytogenes; subkutan enjeksiyon | Fare | Azalmış Th2 siokinleri ve spesifik IgE | Azalmış anafilaktik reaksiyonlar |
| Fıstık | Modifiye Ara h 1-3 | Alerjen+ısıyla öldürülmüş E. Coli rektal sensitizasyon | Fare | Azalmış Th2 siokinleri ve spesifik IgE | Azalmış semptomlar |
| Fıstık | Soya ekstresi | Desensitizasyon, soya ekstresi ile intraperitoneal | Fare | Azalmış Th1 sitokinleri ve Ig G1 | Azalmış anafilaktik reaksiyonlar |
| Ovalbümin | Ovalbümin | Alerjen+ısıyla öldürülmüş Lactoballus casei rektal sensitizasyon | Fare | Azalmış spesifik IgE/IgG1 | Azalmış semptomlar |
| Süt | Beta-lactoglobulin (BLG) | Karajenan | Fare | Azalmış antijen spesifik proliferatif yanıt | Azalmış semptomlar |
| Fıstık | Fıstık | Alerjen+ısıyla öldürülmüş L. monocytogenes | Köpek | Azalmış spesifik IgE ve deri prick reaktivitesi | Azalmış semptomlar |

BESİN ALERJİSİ HAYVAN MODELLERİ

Akut gastrointestinal hipersensitivitenin immunoregulator mekanizmasını saptamak, immunsensitizasyon ve alerjik yanıtlarda besin proteinlerinin prediktif rolünü geliştirmek ve besin alerji tedavisi için yeni teröpatik seçenekler sunmak adına çok sayıda hayvan modeli geliştirildi. Fare, domuz ve köpek modelleri, gastrointestinal alerjik yanıtın tanımı kadar, sensitizasyon uygulama yollarını değerlendirmek için kullanıldı. Her model, insan yanıtına benzeyen uygulama yolu, doz, sensitizasyon zamanı hakkında önemli bilgiler sundu. İmmunoregulator mekanizmalarda rol alan epitel ve mast hücrelerinin, gastrointestinal disfonksiyona neden olan Ig-E aracılı besin alerjisinde rolü ile ilgili önemli bilgiler elde edildi. Hayvan modellerinde, genetiği modifiye edilmiş besin proteinlerinin allerjenitesiyle ilgili önemli bilgiler elde edildi. Besin alerjisi için kabul edilebilir tedavilerin yokluğunda, hayvan modelleri, özellikle rat ve fareler, alerjik yanıtın azaltılmasında ve elimine edilmesinde, profilaktik ve teröpatik stratejilerin saptanması için kullanılmaktadır (70).

Geçmişte alerjenin oral uygulanması ile Ig E antikor oluşumu güçtü. Son yıllarda insan besin alerjisi fare modelleri araştırmaları geliştirildi. Besin alerji hayvan modelleri, korunma stratejileri, yeni tedavi prelinik değerlendirme, moleküler ve hücresel mekanizmalarda faydalı olmaktadır. İnsanda gösterilemeyen yüksek kaliteli araştırma ile hayvan modelinden yararlanıldı. Bağırsak immun yanıtın mekanizması, mukozal bariyerin rolü, oral toleransın kaybı ve devamlılığı araştırmaları içermektedir.

Fareler insan immünolojisine birçok yönden benzerlik gösterir. Th1 veya Th2 fenotiplerine T hücre polarizasyonu farelerde daha belirgindir. Fareler alerji çalışmalarında değerli test modelidir. Besin alerji çalışmalarında fare modellerinin bir diğer avantajı çok sayıda deney hayvanı kullanılabilmesidir. Farelerin immun yanıtı insaninkiyile tıpatıp aynı olmamasına ve fare modelleri alerjik semptomların skorlanmasında sınırlı olmasına rağmen , fare modelleri, yeni tedavi stratejilerin belirlenmesi ve denenmesi ve besin alerjisi oluşmasında altta yatan mekanizmalar hakkındaki bilgilerimizin genişletilmesine olanak sağlamaktadır (29).

Hayvan çalışmalarında Th1/Th2 paradigmaları insan alerjik hastalıklarında uygulandı. İmmun yanıtın tipi değerlendirildi (101). Hastalıkların altta yatan patofizyolojileri hakkında bilgi edinmede, hayvan modelleri önemli araçlar oldu. Özellikle de besin alerjisinde gastrointesitinal sistem gibi hedef organlar ulaşılamıyorsa, bu çalışmalar yeri doldurulamaz hale geldi. Fareler, birçok yönden insan immünolojisine benzerlik göstermektedir. Th1 ve Th2 fenotipleri ile T hücre polarizasyonu farelerde daha belirgindir. Bu nedenle alerjik araştırmalarda fare sistemi çok değerli test model olacaktır (89). Farelerde, alerjenik proteinle

karşılaştıktan sonra, selektif Th2 yanıtının aktivasyonu, IL-4, IL-5, IL-10 ve IL-13'ün salgılanmasına neden olur. Böylece farelerde proteinlerle indüklenen immun yanıt, alerjik potansiyelin değerlendirilebilmesi için alternatif yeni stratejilerin geliştirilmesine olanak sağlar (94).

Besin alerjisini tedavi etme ve önlemede, hayvan modellerinde bu konuyla ilgili birçok çalışma yürütülmektedir. Fıstık anafilaksi fare modelinde, fıstık alerjisini tedavi etmek için, fare rekombinant IL-12 profilaktik (fıstık sensitizasyonu sırasında uygulandı) ve teröpatik (sensitizasyondan üç hafta sonra) olarak kullanıldı (85). Her iki yöntem de anafilaksi semptomlarını azalttı ve tedavi edilmeyen kontrol grupla karşılaştırıldığında plazma histamin seviyelerinde belirgin düşmeye neden oldu. RIL-12 ile profilaksi, tedavi edilen farelerde fıstık spesifik IgE üretimini tamamen bloke etti.

Sensitizasyon çalışmaları için, alerjen konsantrasyonu, besin matriksi, alerjenle karşılaşma yolu ve süresi, kullanılan hayvanların yaşı dikkate alınmalıdır. Çalışma için seçilen hayvan türü, genetik faktörler IgE yanıtını değiştireceği için çalışmanın sonuçlarını direkt olarak etkiler. Deneylerde besin proteinlerinin intraperitoneal olarak uygulanması, immun yanıtın artırılmasına katkıda bulundu. Ancak, besin proteinlerinin oral yolla verilmesi, en uygun yoldur. Çalışmalar, alerjeni net olarak tanımlamak ve alerjenik olmayan proteinlerden ayırt etmek için en iyi Ig E yanıtının Balb/c farelerde elde edildiğini gösterdi.

OMEGA-3 YAĞ ASİTLERİ VE ALERJİK HASTALIK MEKANİZMALARINDAKİ YERİ

Omega-3 yağ asitleri, vücut için gerekli olup insan vücudunda üretilemediğinden dışarıdan alınmaktadır. Önemli omega-3 bağı ihtiva eden yağ asitleri, α -linolenik asit, eikosapentaenoik asit (EPA), ve dokosaheksaenoik asit (DHA) sayılabilir.

Omega-3 terimi ("n-3", "w-3" olarak da kullanılır) ilk çift bağı, karbon zincirinin ucundaki (w) metil grubundan itibaren sayılınca 3. karbon-karbon bağı olduğu anlamına gelir. İnsan beslenmesinde önemli olan omega-3 yağ asitleri şunlardır: alfa-linolenik asit (18:3, ALA), eikosapentaenoik asit (20:5, EPA) ve dokosaheksaenoik asit (22:6, DHA). Bu üç doymamış yağda, sırasıyla 18, 20 veya 22 karbonlu bir zincirde 3, 5 veya 6 çift bağ vardır.

Epidemiyolojik veriler, diyetel faktörlerin, alerjik hastalık prevalansının yakın geçmişteki artışında rolü olabileceğini göstermektedir. Omega-3 yağ asitlerinin çoğunlukla

antiinflamatuvar etkisi olduğu ve alerji gibi immun yanıtta rol oynadığı düşünülmektedir (102).

Omega-3 yağ asitlerinin immun fonksiyonlar üzerine etkisi

Balık yağı solüsyonları ve kapsüllerinde bulunan uzun zincirli n-3 PUFA 'lar DHA ve EPA'nın inflamatuvar hücre membranı fosfolipitleri içindeki oranını artırır. Böylece eikozanoidlerin araşidonik asitten sentezi için yetersiz substrat olacağından, diyetel balık yağı desteği, inflamatuvar hücreler olan PGE₂, TXB₂, LTB₄, 5- HETE ve LTE₄ 'ün üretimini azalmasını sağlar (75). EPA aynı zamanda COX ve LOX enzimleri için substrat olarak rol oynayarak farklı bir eikozanoid ailesinin ortaya çıkmasına neden olur. Böylece balık yağı desteği, LTB₅, LTE₅, 5-HETE ve PGE₃ üretimini artırır. Bunun fonksiyonel önemi, EPA'dan oluşan mediyatörlerin, araşidonik asit mediyatörlerine göre daha az potent olmasıdır (76). Ayrıca yakın çalışmalarda, EPA'dan COX-2/ LOX yoluyla üretilen E-seri rezolvin olarak adlandırılan yeni bir grup mediyatör antiinflamatuvar etki göstermektedir (77).

Omega-3 yağ asitleri immun hücreleri değişik nedenlerden dolayı etkileyebilirler:

- 1) İmmun hücreler yüksek oranda, hücre zarlarında w-6 yağ asidi olan araşidonik asit(AA) taşırlar. Omega-3 yağ asidi alımı, immun hücre membranında AA oranını ve eksojen uyarana karşı hücre yanıtını azaltır.
- 2) Omega-3 yağ asitleri EPA ve DHA, AA metabolizmasını yarışmalı olarak inhibe ederler, bu da alerji öncesi 4 seri lökotrien ve 2 seri prostaglandin üretimini azalmasıyla sonuçlanır. w-3 yağ asitlerinin metabolik ürünleri, alerjik reaksiyon oluşmasında immunolojik daha az aktiftir (15).
- 3) Omega-3 yağ asitlerinin pro-inflamatuvar hücre sinyallerinin aktivasyonu NF- κ B (Nükleer faktör kappa) sinyal iletim kaskadı gibi (12), IL-1 β , TNF- α , IL-6 ve IL-2 gibi pro-inflamatuvar sitokin üretimini, lenfosit ve NK hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir (13).

Astım tedavisinde omega-3 yağ asitlerinin yeri

Astım mast hücreleri, alveolar makrofajlar, nötrofiller, eozinofiller, lenfositler, plateletler ve çeşitli inflamatuvar hücrelerin katkısı ile olan inflamatuvar kronik bir hastalıktır. Görülme sıklığı son yıllarda artarak Batı ülkelerinde %7-15 arasına çıkmıştır. Bu oran ülkemizde % 10-15 'tir. Bu artıştan diyet dahil çevre faktörlerinin sorumlu olduğu söylenmiştir. Çeşitli tedavi ve koruma yöntemleri kullanılmasına rağmen astımın mortalitesi ve morbiditesindeki bu artış önlenememiştir. Astımın tedavisi ve önlenmesinde omega-3 yağ

asitlerinin etkin olabileceği fikri önemli oranda taraftar bulmuştur. Balık ağırlıklı beslenen eskimolarda astımın önemli oranda düşük olması bu hipotezin geliştirilmesinde önemli etken olmuştur (71). Mc Keever ve Britton'un balık yağının astımda koruyucu etkisinin olduğu dikkatleri tekrar bu konuya çekmiştir (72). Çeşitli araştırmalarda klinik olarak etkinliğini gösterecek kesin kanıtlar elde edilememiştir. Bulantı ve karın ağrısı gibi doza bağlı yan etkiler ortaya çıkmıştır. Omega-3 yağ asitlerinin astımlı hastaya vermenin erişkinlerde ayrıca FEV1, PEF üzerinde olumlu bir etkisinin olduğu gösterilememiştir. Astımın semptomları, klinik şiddet skorları ve inhaler kullanımı gibi parametreler üzerinde belirgin bir olumlu etkisi olmamıştır. Son olarak Mickleborough ve ark (72) 16 erişkin astımlı hastada balık yağının egzersize bağlı bronkospazm üzerinde etkisini incelemiş, balık yağının egzersiz sonrası FEV 'de ve inflamatuvar mediatörlerde düşme yaptığını göstermişlerdir.

Günümüzde, perinatal yaşamda, alerjik hastalıkların w-3 yağ asidi desteği ile önlenmesine yönelik birçok çalışma yürütülmektedir. 98 atopik kadında yapılan bir randomize kontrollü çalışmada, 20. gebelik haftasından doğuma kadar balık yağı veya placebo verilmiş. Balık yağı grubundaki bebeklerin 1 yaşına geldiklerinde yumurtaya karşı sensitizasyon geliştirme prevalansının daha az olduğu görülmüştür. Atopik hastalık prevalansı azalmamasına rağmen, bu çocuklar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında daha hafif atopik dermatit geçirmişlerdir. Çalışma gruplarında Ig-E düzeyleri arasında farklılık saptanmamıştır (14). Dunstan ve ark.(92) gebelikte balık yağı takviyesinin, yenidoğan hücre zarlarında DHA oranının artarken w-6 yağ asidi AA seviyelerinin düştüğünü göstermişlerdir. Yukarıda da tanımlandığı gibi hücre zarlarının içeriğinin değişmesi, immun yanıtın değişmesine neden olabilir. Gebelikte w-3 yağ asidi tedavisinin, aynı zamanda yenidoğan kord kan hücrelerinde sitokin seviyelerini etkilediği gösterildi. Prenatal balık yağı verilmiş çocukların kord serumunda IL-13 düzeylerinin plasebo verilenlerle karşılaştırıldığında anlamlı derecede düştüğü gösterilmiştir. Ayrıca Dunstan ve ark. doğumdan önce w-3 yağ asitleriyle karşılaşmış çocuklarda bazı sitokin düzeylerinin düştüğünü ve lenfoproliferatif immun yanıtın inhibe edildiğini gösterdiler. İnsan çalışmalarında olduğu kadar, hayvan deneyleri de hayatın erken dönemlerinde w-3 yağ asidi desteğinin yenidoğan immun fonksiyonlarını etkilediğini göstermektedir. Böylece alerjik hastalıkların önlenmesinde, yaşamın erken dönemlerinde w-3 yağ asidi desteği vermek, ümit verici yaklaşım gibi görünmektedir.

GEREÇ VE YÖNTEM

1.Hayvanlar

- Besin alerji modelinin oluşturulması
- Sakrifikasyon

2. Fare bağırsak mukozasının histopatolojik incelemesi

3. Fare serumunda sitokin düzeylerinin değerlendirilmesi

1.Hayvanlar

Araştırmada 6-8 hafta yaşlarında olan toplam 21 dişi Balb/c fare kullanıldı. Fareler Adnan Menderes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesinden sağlandı. Çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Burada hayvanlar bir aylık bir adaptasyon sürecinden sonra çalışmada kullanıldı. Adaptasyon ve deney süreçlerinde hayvanlar klasik koşullarda barındırıldı. Hayvanlar adaptasyon sürecinde OVA içermeyen standart fare ve sıçan yetiştirme yemi ile beslendi (MBM Ticaret, Gebze) (Tablo V). İçme suyu olarak musluk suyu kullanıldı. Deney başlangıcında hayvanlar eşit sayıda üç gruba ayrıldı ($n_1 = n_2 = n_3 = 7$).

Grup I, standart fare yemiyle beslendi ve kontrol grubunu oluşturdu.

Grup II, standart fare yemiyle beslendi, ovalbümin ile sensitize edildi.

Grup III, standart yeme omega-3 yağ asidinden zengin bir karışımdan %8 oranında eklenmiş bir yemle (Tablo VI) beslendi, ovalbümin ile sensitize edildi.

Araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunca onaylandı (Ek 1).

Deney Ocak-Mart 2009 tarihlerinde yapıldı.

Tablo V: Fareler için bir kg standart yemin analizi

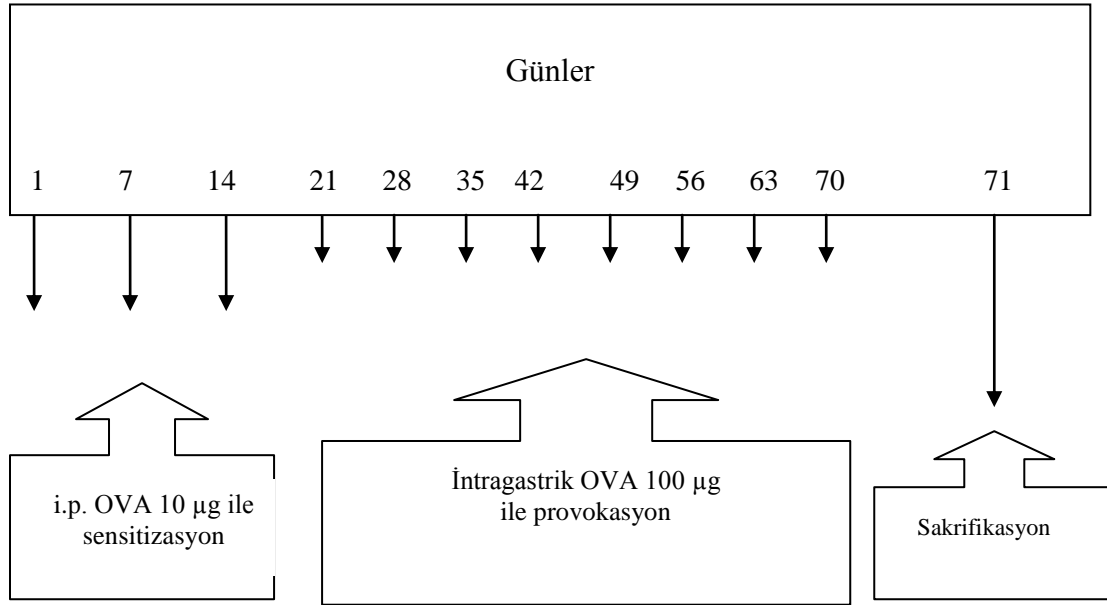
| | |
|-------------------------|----------|
| Vitamin A | 12000 IU |
| Vitamin D ₃ | 600 IU |
| Vitamin E | 16 mg |
| Vitamin K ₃ | 4 mg |
| Vitamin B ₁ | 2,4 mg |
| Vitamin B ₂ | 6 mg |
| Vitamin B ₆ | 4 mg |
| Vitamin B ₁₂ | 0.016 mg |
| Nikotinamid | 20 mg |
| Folik Asit | 0.8 mg |
| D-Biotin | 0.04 mg |
| Mangan | 64 mg |
| Demir | 32 mg |
| Çinko | 48 mg |
| Bakır | 4 mg |
| İyot | 1.6 mg |
| Kobalt | 0.4 mg |
| Selenyum | 0.12 mg |
| Antioksidan (BHT) | 8 mg |

Tablo VI: Fare yemine eklenen balık yağı karışımının 100 ml'sinin analizi

| | |
|---------------|--------------|
| Saf balıkyağı | 92 gr |
| EPA | 8.28 gr |
| DHA | 7.36 gr |
| Enerji değeri | 3470 K Joule |
| Enerji değeri | 830 Kcal |

Besin alerji modelinin oluşturulması

Farede besin alerji modeli oluşturmak için Renz yöntemi (73) ve Sakamoto ve ark.'nın oluşturduğu besin alerjisi fare modeli (74) kullanıldı. İkinci ve üçüncü gruptaki farelerin hepsine 100 µl serum fizyolojik içinde çözünmüş 10 µg Ovalbumin (OVA, Sigma A-5503, Almanya) , intraperitoneal (i.p.) yoldan 1, 7 ve 14. günlerde aşılanarak duyarlandı. Sonra, 21. günden başlamak üzere haftada bir gün 100 µg OVA 0,5 ml serum fizyolojik içinde intragastrik olarak toplam 8 kez 8 hafta süreyle uygulandı (Şekil 6).



Şekil 6 : Farelerde besin alerji modeli oluşturma takvimi: Grup II ve grup III'teki fareler 1,7, 14. günlerde intraperitoneal (i.p) OVA 10 µg ile sensitize edildi, Daha sonra 21. günden başlayarak haftada 1 gün toplam 8 hafta süresince intragastrik OVA 100 µg ile provake edidi. Son provokasyon dozundan bir gün sonra tüm fareler (grup I-II-III) sakrifiye edildi (71.gün)

Sakrifikasyon

Son intragastrik OVA verilmesinden 24 saat sonra (71.gün) (Şekil 6) tüm farelere ketamin 50 mg/kg intraperitoneal olarak uygulanarak sakrifiye edildi (Resim 1).



Resim 1. Sakrifiye edilen fareden intrakardiyak kan alınması



Resim 2. Farenin bağırsaklarının disseke edilmesi

2. Histopatolojik inceleme

Sakrifikasyon sonrası tüm farelerin mide, duodenum, jejunum ve ileumları alınarak (Resim 2) %10'luk formalinle tesbit işlemi uygulandı. Daha sonra rutin doku takibine giren doku örnekleri parafin bloklara gömüldü. Işık mikroskop altında Hemotoksilen Eozin (HE), mast hücrelerini göstermek üzere Toluidine Blue ve Mast Cell Tryptase boyaları uygulanan dört μm kalınlığında kesitler incelendi. En yoğun eozinofil ve mast hücresi bulunan alanlar küçük büyütme ile (x10) tesbit edildi. Bu alanlarda büyük büyütme (x 40) ile 10 alanda toplam eozinofil ve mast hücre sayısı kaydedildi. Mast hücre sayısı histokimyasal Toluidine Blue (TB) ve İmmunhistokimyasal Mast Cell Tryptase (MCT) boyaları ile değerlendirildi. Her iki boyada izlenen mast hücre sayıları ayrı ayrı hesaplandı.

3. Biyokimyasal inceleme

Tüm fareler sakrifiye edilirken, her birinden intrakardiyak olarak 1 cc kan alındı. Serumda ticari mouse ELİSA kiti ile (Bender Medsystems GMBH, Campus Vienna Biocenter 2 A-1030 Vienna , Austria), katalog numarası BMS607, $\text{TNF-}\alpha$, IL-10, $\text{IFN}\gamma$, IL-5, IL-4, düzeyleri ölçüldü. Sonuçlar, Bioelisa Reader Elx800 ile standart eğri kullanılarak hesaplandı. Gün içi ve günler arası varyasyon katsayıları (% CV), sırasıyla $<5\%$ ve $<10\%$ olarak bulundu.

Ticari mouse IL-8 kiti uygun olmadığı için serum IL-8 düzeyleri, ticari human IL-8 ELİSA kiti ile (Bender Medsystems GMBH, Campus Vienna Biocenter 2 A-1030 Vienna,

Austria), katalog numarası BMS607 saptandı. Gün içi ve günler arası varyasyon katsayıları (% CV), sırasıyla < %6.3 ve < %8.7 olarak bulundu.

İSTATİSTİK

Verilerin istatistiksel analizleri SPSS (Statistical Package for Social Science) 14 paket programında yapıldı.

Histopatolojik olarak görüntülenen eozinofil ve mast hücre sayılarının normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile incelendi ve eozinofil ve mast hücre sayılarının her bir grup için normal dağılım gösterdiği bulundu. Bu nedenle gruplar arası karşılaştırmada tek yönlü varyans analizi kullanıldı. Çoklu karşılaştırma testi olarak Tukey ve Tamhane testleri seçildi (Ek 3) $p < 0,05$, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Biyokimyasal verilerin değerlendirilmesinde, IFN- γ ve IL-4 düzeyleri normal dağılım göstermediği için gruplara göre karşılaştırmasında Kruskal-Wallis Anova testi kullanıldı. TNF- α , IL-5, IL-8 ve IL-10 düzeyleri normal dağılım gösterdiği için gruplara göre karşılaştırmasında tek yönlü varyans analizi kullanıldı; $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (Ek 3).

BULGULAR

Çalışmaya toplam 21 adet 6-8 hafta dişi Balb/C fare alındı. Tüm fareler her biri 7 fareden oluşan toplam üç gruba ayrıldı.

Grup I kontrol grubu olarak değerlendirildi.

Grup II ovalbümin ile sensitize edilip, normal standart fare yemi ile beslendi

Grup III ovalbümin ile sensitize edilip w-3'ten zengin fare yemi ile beslendi. Deney süresince ikinci gruptan bir, üçüncü gruptan bir olmak üzere toplam iki fare öldü. Sensitizasyon sonrası her üç grup sakrifiye edilerek histopatolojik ve biyokimyasal olarak incelendi.

Histopatolojik incelemede eozinofil ve mast hücre sayıları

Farelerin duodenum, jejunum, ileum ve kolonlarında büyük büyütme (x 40) ile 10 alanda toplam eozinofil ve mast hücre sayısı kaydedildi. Eozinofiller için hemotoksilen eosin (HE), mast hücreleri için mast cell tryptase (MCT) ve toluidine blue (TB) boya kullanıldı.

Tablo VII: Grup I' de eozinofil ve mast hücre sayıları

| Grup I | Eozinofil sayısı | Mast hücre sayısı | |
|--------|------------------|-------------------|---------|
| | | TB ile | MCT ile |
| 1 | 40 | 8 | 6 |
| 2 | 30 | 6 | 3 |
| 3 | 40 | 6 | 4 |
| 4 | 20 | 5 | 4 |
| 5 | 30 | 6 | 5 |
| 6 | 30 | 7 | 5 |
| 7 | 20 | 6 | 4 |

Tablo VII'de kontrol grubundaki farelerin bağırsak mukozalarında eozinofil ve mast hücre sayıları gösterilmektedir.

Tablo VIII : Grup II' de eozinofil ve mast hücre sayıları

| Grup II | Eozinofil sayısı | Mast hücre sayısı | |
|---------|------------------|-------------------|---------|
| | | TB ile | MCT ile |
| 1 | 130 | 13 | 11 |
| 2 | 150 | 26 | 15 |
| 3 | 140 | 33 | 17 |
| 4 | 150 | 35 | 17 |
| 5 | 140 | 39 | 19 |
| 6 | 150 | 37 | 19 |

Tablo VIII'de OVA ile sensitize edilen ve standart fare yemi ile beslenen gruptaki farelerin bağırsak mukozalarında eozinofil ve mast hücre sayıları gösterilmiştir.

Tablo IX : Grup III' de eozinofil ve mast hücre sayıları

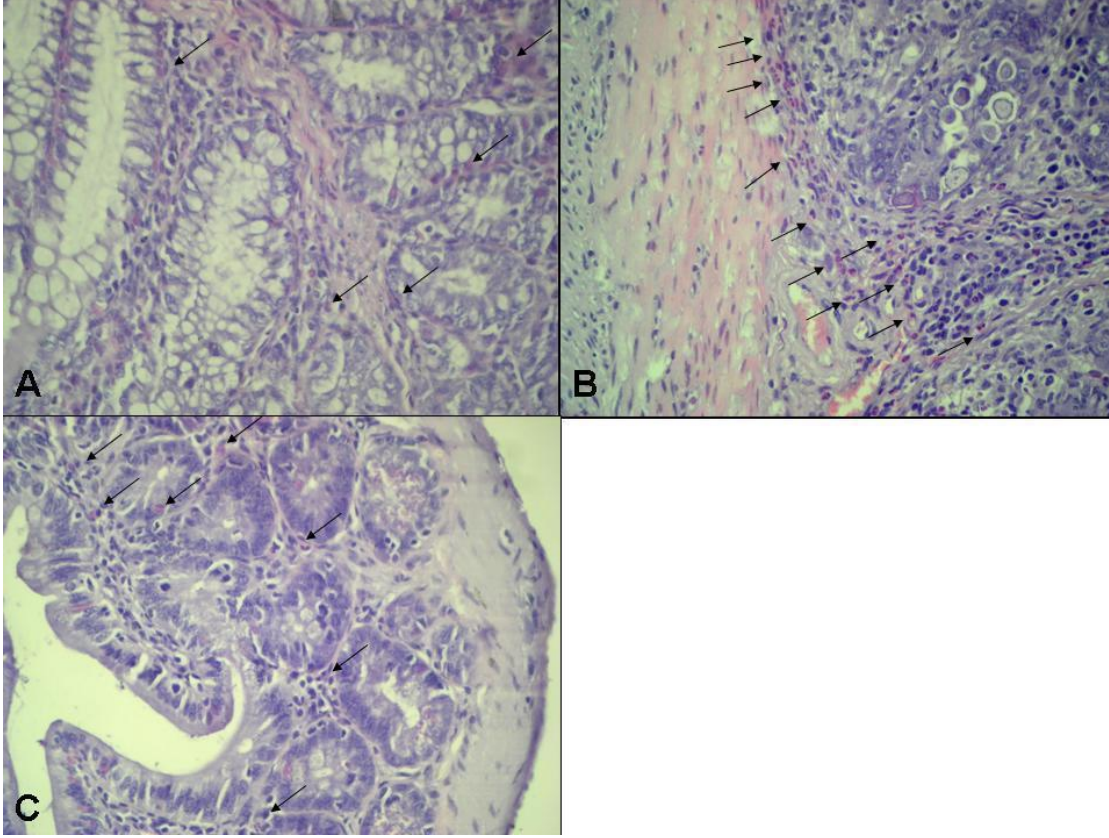
| Grup III | Eozinofil sayısı | Mast hücre sayısı | |
|----------|------------------|-------------------|---------|
| | | TB ile | MCT ile |
| 1 | 50 | 8 | 4 |
| 2 | 70 | 11 | 6 |
| 3 | 60 | 10 | 6 |
| 4 | 60 | 9 | 7 |
| 5 | 70 | 12 | 7 |
| 6 | 60 | 10 | 6 |

Tablo IX'da OVA ile sensitize edilip, omega-3 'ten zengin fare yemi ile beslenen gruptaki farelerin bağırsak mukozalarında eozinofil ve mast hücre sayıları gösterilmiştir.

Tablo X : Histopatolojik incelemede grupların eozinofil ve mast hücre sayıları ortalama değerleri

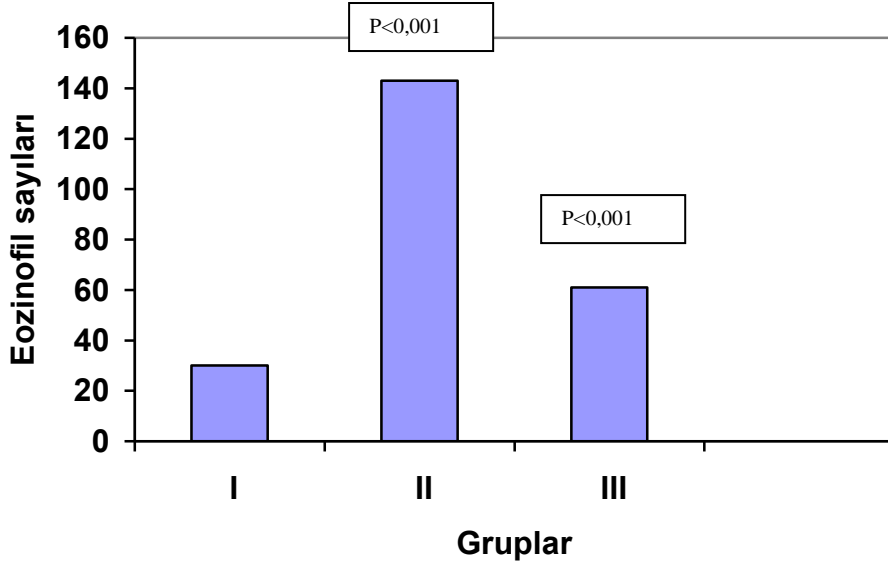
| | Grup I | Grup II | Grup III |
|-------------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| Eozinofil | 30.0± 8,1 | 143.3± 8,1 | 61.67± 7,5 |
| Mast hücre (TB) | 6.29± 0,9 | 30.50± 9,6 | 10.0± 1,4 |
| Mast Hücre(MCT) | 4.43± 0,9 | 16.33± 3 | 6± 1 |

Tablo X’da tüm farelerin bağırsak mukozalarında eozinofil ve mast hücre sayılarının ortalama değerleri ± standart sapmaları (SD) gösterilmiştir.



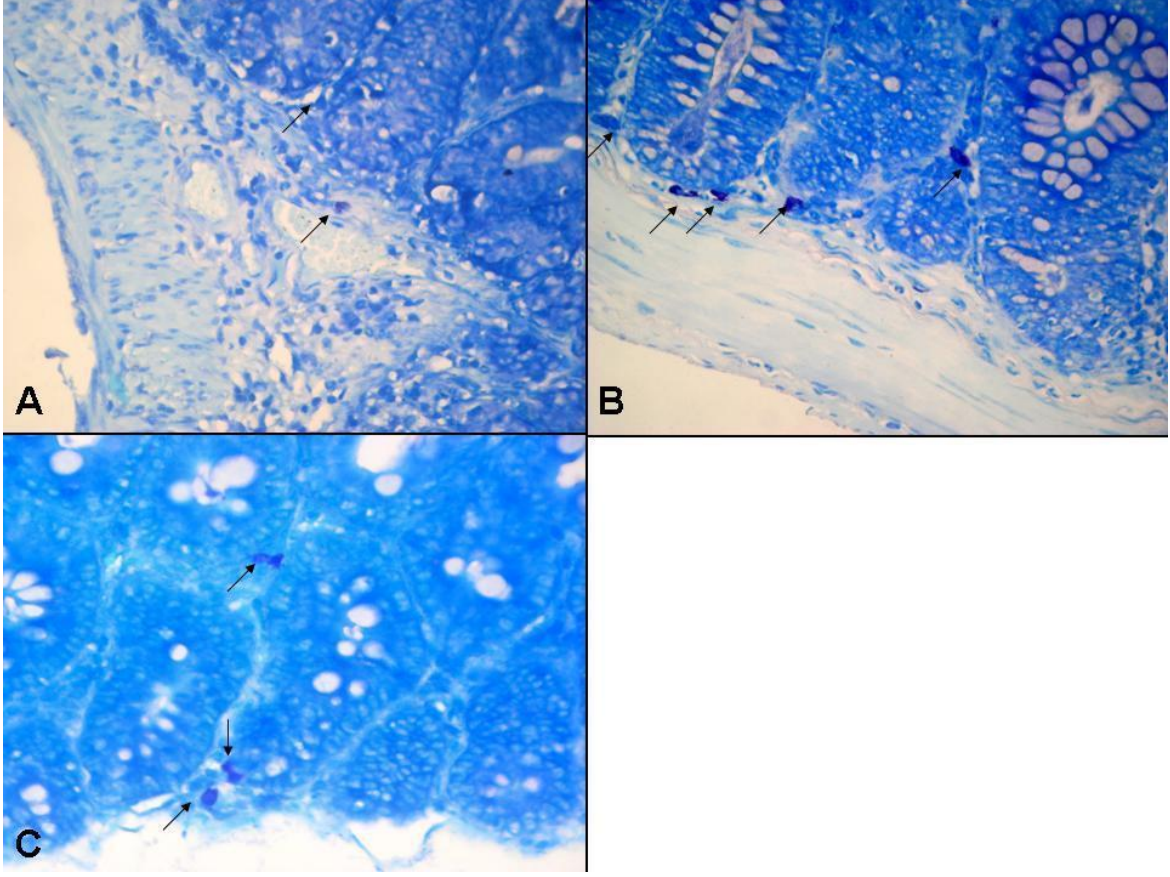
Resim 3 : Kalın bağırsak lamina propriasında hemotoksilen eozin boyasında eozinofiller . Oklar eozinofilleri gösteriyor.

- A) Standart fare yemi ile beslenmiş grup I’de eozinofiller oklarla gösterilmektedir
- B) OVA ile sensitize edilip, standart fare yemi ile beslenmiş grup II’de eozinofil sayılarındaki artış görülmektedir.
- C) OVA ile sensitize edilip, omega-3’ten zengin diyetle beslenmiş grup III’te eozinofil sayılarının grup II’ye göre azaldığı görülmektedir.



Şekil 7: Gruplarda eozinofil sayıları

OVA ile sensitize edilip standart fare yemi ile beslenmiş grup II'de, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında eozinofil sayılarının istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı ($p<0,001$), OVA ile sensitize edilip, omega-3'ten zengin diyetle beslenmiş grup III'te eozinofil sayılarının ikinci gruba göre anlamlı derecede azaldığı ($p< 0.001$) görülmektedir (p değerleri bir önceki gruba karşılaştırmayı göstermektedir.).

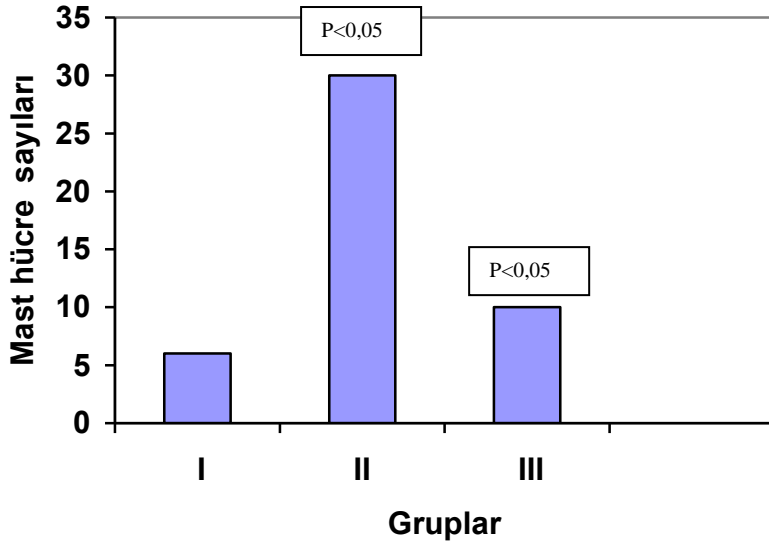


Resim 4: Bağırsak mukozasında toluidine blue boyasında mast hücreleri. Oklar mast hücrelerini gösteriyor.

A) Standart fare yemi ile beslenmiş grup I'de mast hücreler oklarla gösterilmektedir

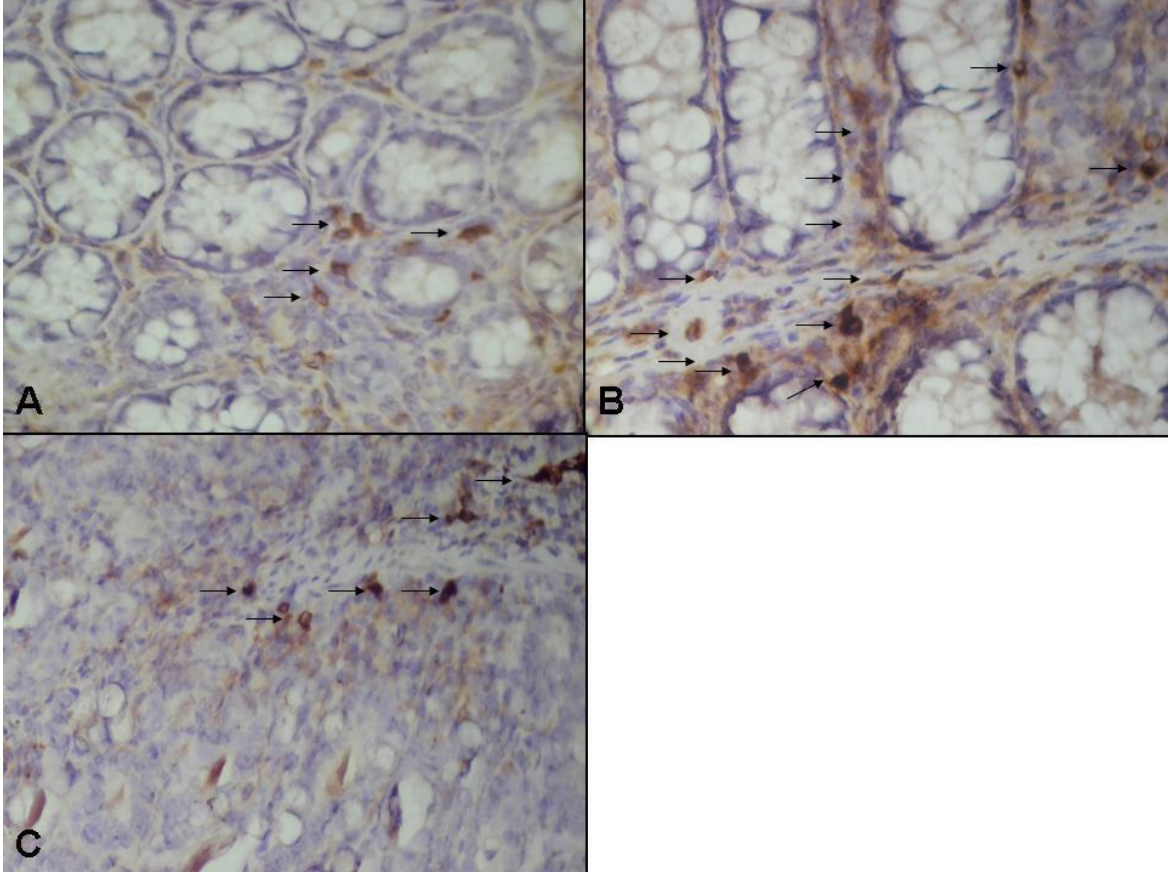
B) OVA ile sensitize edilip standart fare yemi ile beslenmiş grup II'de mast hücre sayılarındaki artış görülmektedir.

C) OVA ile sensitize edilip, omega-3'ten zengin diyetle beslenmiş grup III'te mast hücre sayılarının grup II'ye göre azaldığı görülmektedir.



Şekil 8: Gruplarda Toluidine blue boyasında mast hücre sayıları

Ovalbümin ile sensitize edilen grup II’de, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında mast hücre sayılarının istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı ($p<0,05$), w-3’ten zengin diyetle beslenen grup III’te mast hücre sayılarının grup II’ye göre anlamlı derecede azaldığı ($p<0,05$) görülmektedir. (p değerleri bir önceki grupla karşılaştırmayı göstermektedir.)

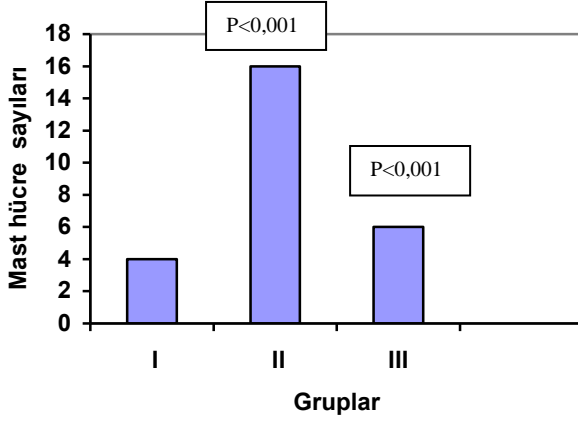


Resim 5: Bağırsak mukozasında immunhistokimyasal mast cell tryptase (MCT) boyasında mast hücreleri. Oklar mast hücrelerini göstermektedir.

A) Bazal fare yemi ile beslenmiş grup I'de (kontrol grubu) mast hücreler oklarla gösterilmektedir

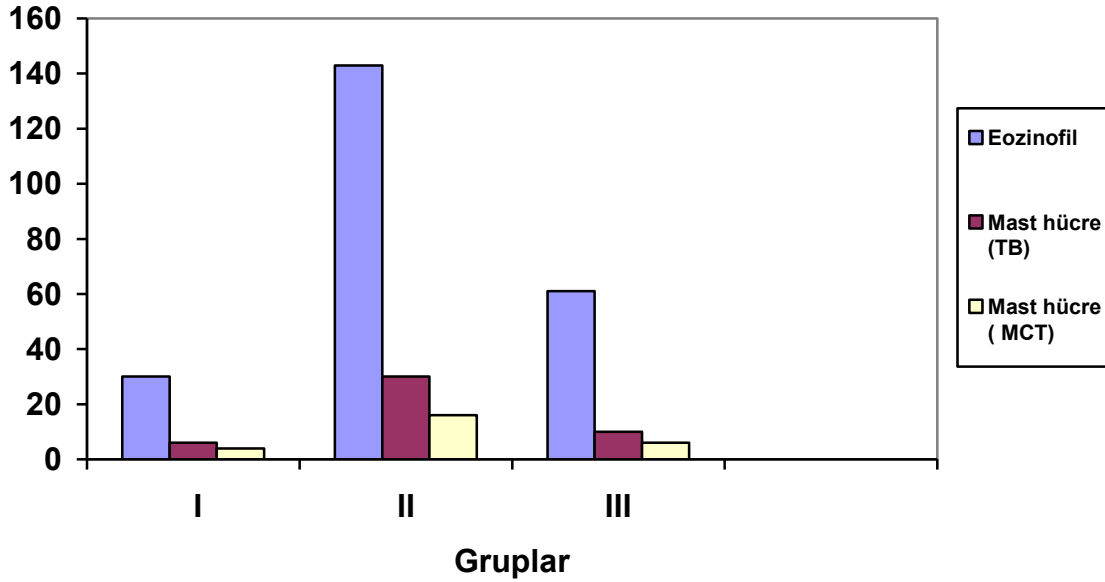
B) OVA ile sensitize edilip standart fare yemi ile beslenmiş grup II'de mast hücre sayılarındaki artış görülmektedir.

C) OVA ile sensitize edilip, omega-3'ten zengin diyetle beslenmiş grup III'te mast hücre sayılarının grup II'ye göre azaldığı görülmektedir.



Şekil 9: Gruplarda mast cell tryptase boyasında mast hücre sayıları

OVA ile sensitize edilip standart fare yemi ile beslenmiş grup II’de, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında MCT boyasında mast hücre sayılarının istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı ($p<0,001$), OVA ile sensitize edilip, omega-3’ten zengin diyetle beslenmiş grup III’te mast hücre sayılarının grup II’ye göre anlamlı derecede azaldığı ($p<0,001$) görülmektedir (p değerleri bir önceki gruba karşılaştırmayı göstermektedir.).



Şekil 10 : Eozinofil ve mast hücre sayılarının gruplara göre dağılımları

(MCT: Mast cell tryptase , TB: Toluidine blue)

Tüm fareler sakrifiye edildikten sonra, her bir farden intrakardiyak bir cc kan alındı ve serumları ayrıldı. Fare serumunda ELİSA yöntemi ile IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, TNF- α ve IFN- γ düzeyleri ölçüldü. Sonuçlar tablolarda verildi.

| | | | | | | | |
|--------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| - | | | | | | | |
| | - | - | - | - | - | - | - |
| - | - | - | - | - | - | - | - |
| - | - | - | - | - | - | - | - |
| - | - | - | - | - | - | - | - |
| - | - | - | - | - | - | - | - |
| IFN-γ | - | - | - | - | - | - | - |
| TNF-α | - | - | - | - | - | - | - |

Standart fare yemi ile beslenen kontrol grubunda, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, TNF- α ve IFN- γ düzeyleri görülmektedir.

| | | | | | | |
|--------------------------------|--|--|--|--|--|--|
| - | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| IFN-γ | | | | | | |
| TNF-α | | | | | | |

Standart fare yemi ile beslenip ovalbünin ile sensitize edilen grupta, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, TNF- α ve IFN- γ düzeyleri görülmektedir.

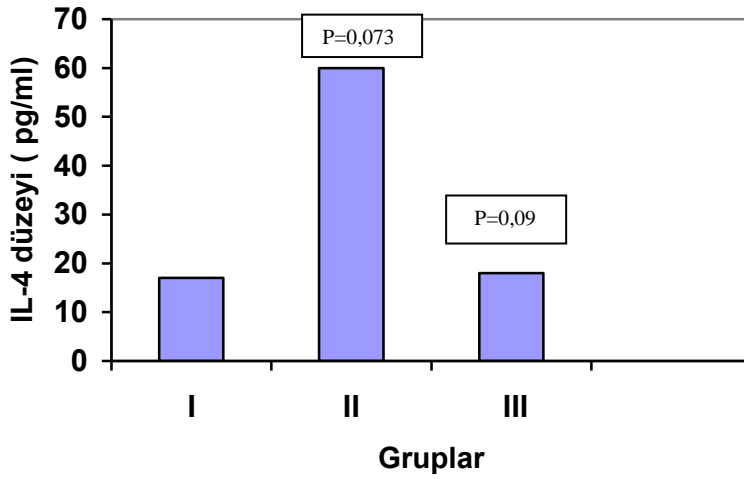
| | | | | | | |
|---|--|--|--|--|--|--|
| - | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |

| | | | | | | |
|-----------|--|--|--|--|--|--|
| | | | | | | |
| .γ | | | | | | |
| .α | | | | | | |

Omega-3'ten zengin yem ile beslenip ovalbümin ile sensitize edilen grupta IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, TNF-α ve IFN-γ düzeyleri görülmektedir.

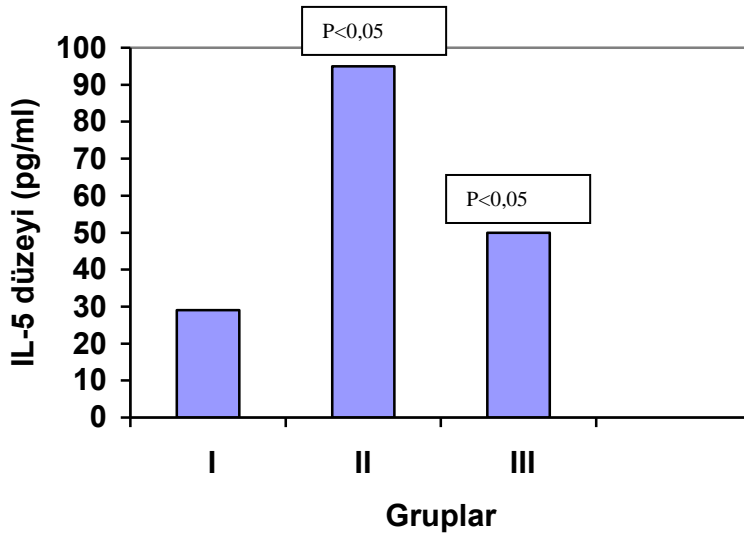
| | ± | | |
|-----------|------------|--------------|------------|
| | - | - | - |
| | 16,9±6,5 | 60± 46,5 | 18,4±8,4 |
| | 29±18,1 | 95,6±36.7 | 50±38,5 |
| | 63,5±38,4 | 347,7±185,06 | 105,6±36,7 |
| | 315.7±63.7 | 259.9±156 | 518±179 |
| .γ | 86,5±11,2 | 221±183 | 107±14,4 |
| .α | 32,2±12,2 | 105±62 | 48,4±39 |

Tüm gruplardaki fare serumlarında IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, TNF-α ve IFN-γ ortalama düzeyleri ± standart sapmaları (SD) görülmektedir.



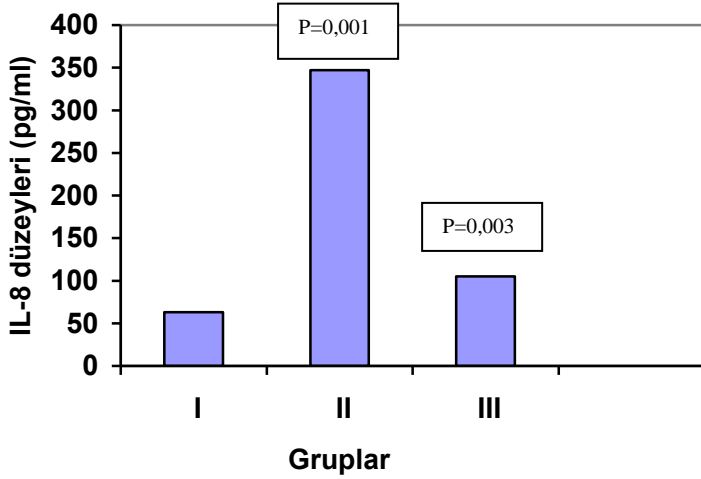
..Grupların IL-4 düzeyleri

OVA ile sensitize edilen grup II kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ortalama değerler artmasına rağmen (Tablo XIII) istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0.073$). Omega-3'ten zengin diyetle beslenen grup III ortalama değerleri, grup II'ye göre azalmış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,093$).



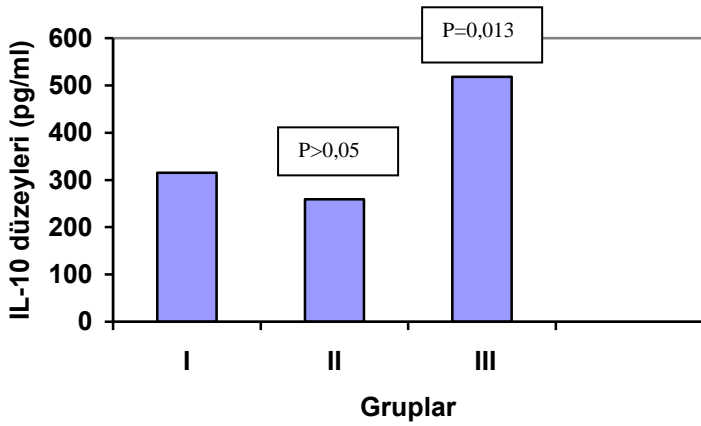
..Grupların IL-5 düzeyleri

IL-5 değerlerinin OVA ile sensitize edilen grup II'de kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı derecede arttığı ($p=0,014$) görüldü. Omega 3'ten zengin diyetle beslenen grup III değerleri de grup II ile karşılaştırıldığında anlamlı azalma saptandı ($p<0,05$).



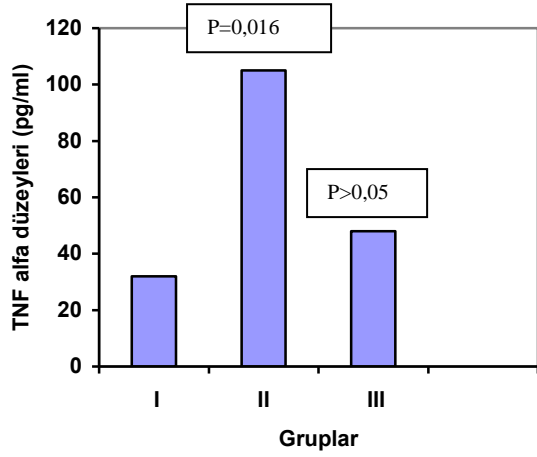
..Grupların IL-8 düzeyleri

OVA ile sensitize edilen grup II'de IL-8 değerleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı artış ($p=0,001$), w-3'ten zengin diyetle beslenen grup III değerleri grup II ile karşılaştırıldığında anlamlı düşme saptandı ($p=0,003$).



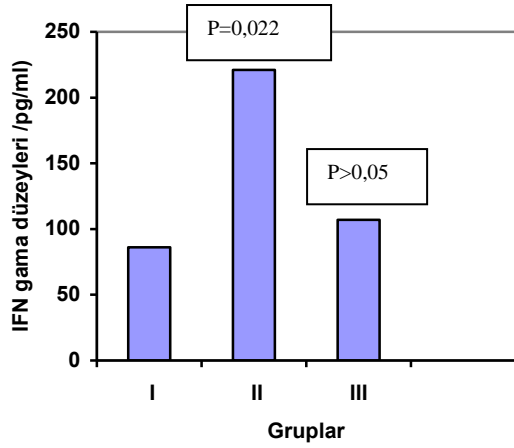
..Grupların IL-10 düzeyleri

Omega-3'ten zengin diyetle beslenen grup III'te IL-10 düzeyleri grup I'le ($p=0,045$) ve grup II (sadece OVA verilen) ile karşılaştırıldığında ($p=0,013$) anlamlı derecede artmış olarak saptandı . Grup I ve II arasında ortalama değerleri azalmış olmasına rağmen (Tablo XIII) istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).



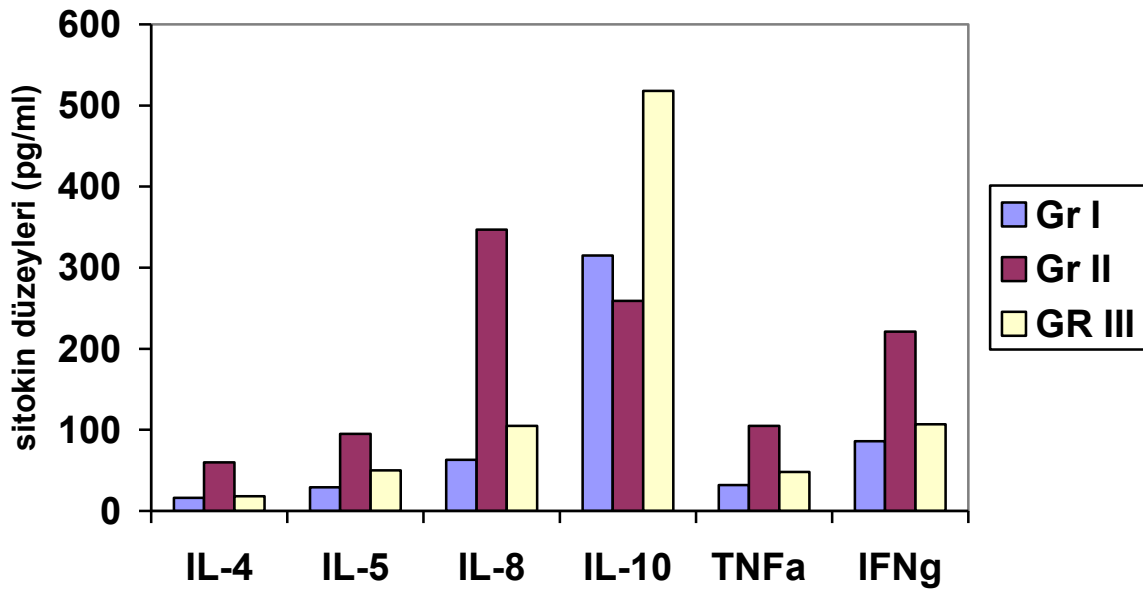
..Grupların TNF- α düzeyleri

OVA ile sensitize edilen grup II TNF- α değerleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı ($p=0,014$) görüldü. Omega-3'ten zengin diyetle beslenen grup III değerleri grup II ile karşılaştırıldığında ortalama değerler düşmesine rağmen (Tablo XIII) istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).



..Grupların IFN- γ düzeyleri

IFN- γ değerlerinin OVA ile sensitize edilen grup II'de kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı arttığı (p=0.022) görüldü. Omega-3'ten zengin diyetle beslenen grup III değerleri grup II ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark saptanmadı (p=0,394) .



Şekil 17: Sitokin düzeylerinin gruptaki dağılımı

(TNFa: TNF alfa, IFNg :IFN gama)

TARTIŞMA

Alerjik hastalık insidansının son yıllarda artış göstermesinde, w-3 yağ asitlerinin diyetel alımının azalmasını sorumlu tutmak zor gibi görünse de, bu besinlerin antienflamatuar özellikleri ve immun yanıtı değiştirdikleri yönünde kanıtlar artmaktadır. Bu yağ asitlerinin çok az yan etkileri vardır, astım ve atopik dermatit gibi hastalıklarda fayda sağlayabilmektedir (91). Bu çalışmada w-3 yağ asitlerinin besin alerjileri üzerindeki etkisini araştırmak için fare modeli oluşturuldu; ovalbümin (OVA) ile duyarlılaştırılan farelerde w-3 yağ asitlerinin etkisi araştırıldı.

Çalışmada toplam 21 adet, 6-8 haftalık, Balb/c dişi fare kullanıldı. Tüm fareler her biri yedi fareden oluşan üç gruba ayrıldı. Inoue ve ark.(84) Bifidobacterium breve M-16 V suşunun baskılayıcı etkilerini araştırmak için ovalbümin ile oluşturdukları besin alerji fare modelinde her bir grupta sekiz fare içeren 6 haftalık erkek, Balb/c fare kullandılar. Vinje ve ark. (82) geliştirdikleri lupin alerji modelinde 29 dişi fare kullandılar. Renz ve ark. (73) OVA ile sensitizasyon yönteminde Balb/c 6-8 hafta, dişi fare kullandılar. Kim ve ark. (90), oral probiyotik bakteri verilmesinin alerji yanıtını baskılaması için OVA ile oluşturdukları alerji modelinde her grup 5 fareden oluşan, üç haftalık, dişi C3H/ HeJ fare kullandılar. Bu çalışmada kullanılan fare sayısı, cinsi, yaşı daha önce yapılan çalışmalarla benzerdir. Çalışmada dişi ya da aynı cins fareler gebelik riskini önlemek için kullanıldı.

Bu çalışmada besin alerji modeli oluşturmak için Balb/c fareleri kullanıldı. Balb/c fareleri, immun yanıtının gelişmiş olması nedeniyle ve IgE yanıtı atopik fenotipe yakın olmasından dolayı seçildi (94).

Çalışmada besin alerjisi fare modeli oluşturmak için ovalbümin ile sensitizasyon yöntemi kullanıldı. İlk önce intraperitoneal olarak OVA ile sensitize edildikten sonra intragastrik OVA ile provake edildi. İntraperitoneal uygulamada Renz ve ark.'nın besin alerji modeli (73) kullanıldı. Renz ve ark intraperitoneal OVA 1.14. ve 21. günlerde uyguladılar; bu çalışmada i.p OVA 1, 7 ve 14. günlerde uygulandı İntragastrik uygulamada Sakamoto ve ark.'nın (74) oral OVA ile provake edilen farelerde IL-4, IL-6 ve TNF- α düzeylerini araştırdıkları alerji modeli örnek olarak alındı. Sakamoto ve ark. farelere 5 doz i.p OVA uygulanması sonrası, haftada bir defa 8 hafta süresince gavaj yöntemi ile 100 μ g OVA intragastrik olarak uyguladılar. Fujitani ve ark. (87) da fruktooligosakkaritlerin antialerji aktivitesini çalıştıkları besin alerji fare modelinde Sakamoto ve ark.'nın kullandığı yöntemi uyguladılar.

Bu çalışmada OVA ile oral sensitizasyon metodunun kullanılmasının nedeni insan besin alerjilerinin oluşma şekline benzemesidir. Diyetel proteinlere karşı immün yanıtın gelişmesi oral toleransın indüklenmesi ile birlikte ve bu aktif immün supresyon ortadan kaldırıldığında besin proteinlerine karşı ters reaksiyonlar ortaya çıkabilir. Oral tolerans gastrointestinal sistemin mukozal bölümünden elde edildiği için , besin alerjisi üzerine yapılan çalışmalarda, alerjenlerin intragastrik veya oral yolla verilmeleri önerilmektedir.

Bu çalışmada ovalbümin, intragastrik yolla immün yanıtın daha iyi elde edildiği önceki çalışmalarda bildirilmiş olmasından dolayı gavaj yöntemi ile intragastrik yolla uygulandı. Akiyama ve ark (86), B10A farelerde ovalbümin (OVA) 0.1 mg gavaj dozu ile OVA 1 mg gavaj dozu karşılaştırıldığında OVA-spesifik Ig E artışının korele olduğunu gördüler. Balb/c farelerde, 9 hafta boyunca günlük 1 mg ovalbümin gavaj yolu ile vermeyi , 5 mg/1 ml ovalbümini farelerin içme suyuna ekleyerek karşılaştırıldılar. Gavaj yöntemi ile güçlü ovalbümin spesifik yanıtı elde ettiler. Ovalbüminin içme suyunda verilmesi etkin bulunmadı.

Ovalbümin, 0,004 mg/g (vücut ağırlığı) dozunun, hayvanlarda gavaj yöntemiyle sistemik immün yanıtı ortaya çıkarmada yeterli olduğu belirtildi (70) Bu çalışmada kaynakta belirtildiği gibi gavaj dozu her fare için ortalama 0.004 mg/g (100 mcg) olarak belirlendi ve uygulandı.

Besin alerjileri astım, alerjik rinit, atopik dermatit gibi alerjik hastalıklar, birkaç dekattan beri özellikle batılı ülkelerde belirgin hale gelmişken, gelişmekte olan ülkelerde de milyonlarca insanın bu hastalıklardan etkilendiğine dair inanışlar artmaktadır. Bu hastalıkların sebebini tanımlamak ve tedavileri için daha iyi seçenekler geliştirmek, neredeyse zorunlu hale geldi. Genetik çalışmalar, biyolojik yollar ve mekanizmalar hakkında önemli bilgi kazandırsa da, çevresel değişiklikler artan batılılaşmayla birlikte alerjik hastalıkların son yıllardaki artışından sorumlu tutulmaktadır (91). Besin alerjisinin potansiyel zararlarının saptanması, alerjistleri yıllar önce bu konuyla ilgili etkili tedaviler için harekete geçirdi. Besinlere, özellikle de inek sütüne karşı desensitizasyon, değişik sonuçlarla çok sayıda çalışmada bildirilmiştir (66). Patriarca ve ark. 59 hastada yaptıkları bir çalışmada, değişik besinler için spesifik oral desensitizasyon protokolü uygulamışlar ve genel olarak desensitizasyonda başarılı olduklarını bildirmişlerse de yaptıkları çalışma kontrol grubuyla onaylanmadı (67). Fıstık alerjisinin önemli artışı ve reaksiyonun ciddiyeti araştırmacıları 1990'ların başında fıstık immunoterapisi çalışmalarına yönlendirdi (68). Çalışmalar sonucunda fıstık ekstreleriyle yapılan sistemik immunoterapinin etkilerinin yüksek risk taşıdığı ve sadece parsiyel etkili

olduğu sonucuna varıldı. Bir grup yazar, besin alerjisinde oral kromolin sodyumu çalıştı ve tedavi alan ve almayan gruplar arasında önemli fark saptamadılar. Besin alerjisi ve atopik dermatiti olan çocuklarda oral kromolin sodyumun faydalı olmadığı sonucuna vardılar (69).

Tüm kaynak taramalarına rağmen, w-3 yağ asitlerinin besin alerjileri fare modelinde antialerjik etkilerinin araştırıldığı çalışmaya rastlanmadı. Ancak astım modeli ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır.

Omega-3 yağ asitlerinin, besin alerjileri üzerinde antialerjik ve antienflamatuar etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada, üçüncü gruptaki farelere, deney süresince w-3 yağ asitlerinden zengin fare yemi verildi. Standart fare yemine % 8 oranında balık yağı karışımı eklenerek, omega-3'ten zengin diyet elde edildi. Robinson ve ark (54), farelerde %10 ağırlığındaki balık yağı, %10 EPA-E , %6 veya %10 DHA-E içeren diyetle, aynı oranda sığırti yağı içeren diyeti karşılaştırdıklarında renal hastalığın şiddetinin hafiflediğini, oysa % 3 ve %6 EPA-E veya %3 DHA-E içeren diyetlerin daha az etkili olduğunu gösterdiler. Bu yüzden , %6'dan daha fazla oranda balık yağının eklenmesi daha etkili olacağından, w-3 yağ asitlerinden zengin fare yemi %8 oranında hazırlandı.

Cardoso ve ark.(93) da besinin indüklediği intestinal enflamasyonu göstermek için besin alerjisi fare modeli oluşturdular. Fareleri fıstık tohumlarıyla sensitize ettiler ve fare bağırsağında hemotoksilen eozin (HE) boyasında eozinofilleri, toluidine boyasında (TB) mast hücrelerini değerlendirdiler. Sonuç olarak bağırsak mukozasında eozinofil ve mast hücre sayılarını anlamlı derecede artmış olarak buldular. Bu çalışmada da benzer şekilde besin alerji modelinin gösterilmesi ve w-3 yağ asitlerinin antialerjik etkisinin araştırılması için fare bağırsak mukozasında histopatolojik olarak HE boyasında eozinofiller, TB ve mast cell tryptase boyalarında mast hücre sayıları değerlendirildi.

Kan ve dokularda eozinofil birikimi, alerjik yanıtın belirgin özelliğidir. Besin alerjisinin ağırlığı ve gastrointesitinal eozinofillerin aktivasyonu arasındaki direkt ilişki Gleich ve ark. tarafından gözlenmiştir. Ayrıca, eozinofiller enflamasyonlu dokuda APC (antijen sunan hücre) gibi görev yapmakta ve Th2 yanıtının artmasını sağlamaktadır. Sağlıklı durumlarda ise bu hücreler mide ve bağırsak mukozasının lamina propriyasında yayılmış olarak bulunmaktadır. Fakat besin alerjili hastalarda eozinofillerin dağılımı (intraepitelyal, lamina propriya, submukoza), şekli ve fonksiyonu farklılık gösterir, çünkü bu hücreler IgE reseptörleri aracılığıyla kolayca aktive edilirler. Böylece eozinofillerin, alerjenle karşılaşmadan sonra deri ve mukozada tip I reaksiyonun başlamasına katkıda bulunduğu söylenebilir (89).

Eotaksin ve IL-5'in eozinofil aktivasyonundan sorumlu major kemokinler olduğu gösterilmiştir. IL-5 eozinofillerin kemik iliğinde proliferasyon ve farklılaşmasında ve inflamasyonlu dokudaki fonksiyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynar. Eotaksin de eozinofillerin alerjik bölgede birikmesinden sorumludur. Fareler oral olarak besin alerjenleriyle provake edildiklerinde lokal ve periferik eozinofili görülür (89). Omega-3 yağ asitlerinin besin alerjisine etkisinin araştırıldığı bu fare modelinde, fare bağırsak mukozasında eozinofil sayılarının değerlendirilmesinin faydalı olacağı düşünüldü.

Mast hücreleri, gastrointestinal sitemin her tabakasında yer alır. Alerjik doku enflamasyonunda mast hücrelerinin rolü çok iyi bilinmektedir. IL-4, mast hücre proliferasyonu ve IgE bağımlı mast hücre medyatörlerinin salınmasında rol oynar . Aktive olmuş mast hücreleri, IL-3, IL-5, ve IL-13 gibi Th2 tip sitokinler salgılar ve eozinofillerin ve alerjik hastalıklarla ilgili diğer enlamatuar hücrelerin birikmesine neden olur (89).

Bu çalışmada, eozinofillerin histopatolojik incelemesinde, Grup II'de (OVA ile sensitize edilip, standart fare yemiyle beslenen grup) eozinofil sayıları Grup I'e (kontrol grubu) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gözlemlendi ($P<0,001$). Cardoso ve ark. (93) da fıstık tohumlarıyla oluşturdukları besin alerji fare modelinde bağırsak mukozasında hemotoksilen eozin boyasıyla eozinofilleri benzer şekilde artmış olarak bulmuşlardır. OVA ile sensitize edilmiş farelerin bağırsak mukozasında eozinofil sayısının anlamlı derecede artması, alerjik yanıtın alındığını göstermektedir. Omega-3 yağ asitlerinden zengin diyetle beslenip , OVA ile sensitize edilmiş grup III'teki farelerin bağırsak mukozalarında eozinofil sayısının grup II ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı ($p<0.001$) görüldü. Bu da besin alerji modeli oluşturulan farelerde w-3 yağ asitlerinin bağırsak mukozasında eozinofil sayılarını azalttığını göstermektedir.

Mast hücrelerinin toluidine blue boyasıyla histopatolojik incelenmesinde, OVA ile sensitize edilen grup II'de bağırsak mukozasında mast hücre sayıları, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı. ($p<0,05$). OVA alımından sonra besin alerjisi oluşmasına yönelik patojenik mekanizmalar net olarak bilinmemesine rağmen artmış mast hücre ve eozinofil sayıları alerjik yanıtın oluştuğunu göstermektedir. Benzer şekilde, Fujitani ve ark (87) farelerde früktooligosakkaritlerin antialerjik etkisini araştırmak için yaptıkları çalışmada OVA ile sensitizasyon metodunu kullandılar. Fareler toplam 3 gruba ayrıldı; grup I kontrol grubu olarak değerlendirilmiş, grup II OVA ile duyarlılaştırıldı ve grup III OVA ile duyarlılaştırılıp früktooligosakkarit (FOS) içeren diyet ile beslendi. Grup II'deki farelerin bağırsak mukozasının histopatolojik incelenmesinde TB ile boyanmış mast hücrelerinin anlamlı derecede arttığı saptandı ve alerjik yanıtın elde edildiği gösterildi.

Omega-3'ten zengin diyetin antialerjik etkisinin gösterilebilmesi için grup III'teki farelerin bağırsak mukozasında T.B ile boyanan mast hücrelerinin grup II ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede düştüğü görüldü ($p<0,05$). Fujitani ve ark. da (87) farelerde oluşturdukları besin alerji modelinde, benzer etkiyi FOS içeren diyetle besledikleri fare grubunda elde ettiler; bağırsak mukozasında mast hücrelerinin anlamlı derecede düştüğünü gösterdiler.

Mast hücrelerinin mast cell tryptase (MCT) boyasıyla histopatolojik incelenmesinde, OVA ile sensitize edilen grup II'de bağırsak mukozasında mast hücre sayıları, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı ($p<0,001$). Omega -3 yağ asitleriyle beslen grupta MCT boyasıyla incelenen mast hücre sayılarında, OVA ile sensitize edilip, standart fare yemiyle beslenen grup II ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede azalma saptandı ($p<0,001$). Böylece her iki boyama yöntemiyle, w-3 yağ asitlerinin mast hücre sayılarını anlamlı derecede azalttığı gösterildi. MCT boyası, TB boyasına göre ek avantaj sağlamadı. Böylece bundan sonraki çalışmalarda mast hücrelerinin tek boya kullanılarak incelenmesinin uygun olacağı düşünüldü.

Bu çalışmanın biyokimyasal incelemesinde, fare serumunda IL-4, IL-5, TNF- α , IL-8, IL-10 ve IFN- γ düzeyleri incelendi.

IL-5 düzeylerinin değerlendirilmesinde grup II'de kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı ($p=0,014$). Vinje ve ark. (82) , Li ve ark.'nın daha önceden oluşturdukları fıstık alerji fare modelini temel alarak lüpen (yem proteini) alerji fare modeli oluşturduklar ve dalak hücre kültürlerinde IL-4, IL-5 ve IFN- γ düzeylerini ölçtüler. Her üç sitokin de kontrol grupla karşılaştırıldığında lüpen ile sensitize edilen farelerde anlamlı derecede artmış olarak bulundu IL-5 değerleri w-3 'ten zengin diyetle beslenen grupta , grup II'ye göre anlamlı derecede düştü ($p<0,05$). Alerjik rinit, saman nezlesi gibi tip 1 alerjik reaksiyonlar, primer olarak Th2 hücreleri aracılığı ile oluşan alerjenlere karşı immun yanıt ile karakterizedir. Th 2 hücreler, yüksek düzeyde IL-4, IL-5 ve IL-13 sentezleyerek, alerjen spesifik IgE ve mast hücrelerinden histamin ve lökotrienlerin salgılanmasına neden olurlar (83). Alerjik yanıtlarda görev alan ve Th2 sitokini olan IL-5 düzeylerinde w-3'ten zengin diyetle beslenen grupta anlamlı derecede azalma olması, w-3 yağ asitleriyle alerjik yanıtın baskılandığı görüşünü desteklemektedir.

IL-4 düzeylerinin değerlendirmesinde, OVA ile sensitize edilen grup II'de kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ortalama değerleri artmasına rağmen (Şekil 11) bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,073$). Cardoso ve ark. (93) da besinin indüklediği intestinal enflamasyonu göstermek için fare serumunda IL-4, IL-13 ve TNF- α düzeylerini

çalıştılar. Sonuç olarak serumda IL-4, IL-13 ve TNF- α düzeylerini anlamlı derecede artmış olarak saptadılar. Omega-3 'ten zengin diyetle beslenmiş grupta IL-4 değerleri grup II ile karşılaştırıldığında ortalama değerleri düşmüş olmasına rağmen, bu düşme istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p= 0,09$). Inoue ve ark. (84). Bifidobacterium breve M-16 V suşunun OVA ile immunize edilmiş farelerde Ig E üretimi ve Th1/Th2 balansı üzerine etkisini araştırdılar. Ig E ve IL-4 düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak düştüğünü saptadılar. Bu çalışmada da w-3 yağ asitleriyle Th2 sitokini olan IL-4 düzeylerinde azalma sağlandı, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Bu çalışmada TNF- α değerlerinin OVA ile duyarlılaştırılan farelerde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı derecede arttığı gösterildi ($p=0,016$). Endres ve ark (97), insan diyetine w-3 yağ asidi eklemenin, kan monositleri tarafından salgılanan TNF, IL-1- α , IL-1 β ve IL-6'nın düştüğünü gösterdiler. W-3 yağ asitleri aynı zamanda, PGE₂ ve 4-seri LT tarafından regüle edilen yolla inflamatuvar sitokinlerin sentezini etkiler. Hücre kültür çalışmaları, EPA ve DHA'nın monositlerden TNF- α ve IL-1 β ve venöz endotel hücrelerinden IL-6 ve IL-8 üretimini inhibe ettiğini gösterdi (78). Balık yağı ile beslenme ex vivo üretilen TNF- α ve IL-1 β ve kemirgen makrofajlarınca IL-6 üretimini azalttı ve aynı zamanda bu sitokinlerin farelerde deneysel endotoksemide dolaşımdaki konsantrasyonlarını da azalttı (80). İnsanlarda yapılan bazı çalışmalarda balık yağının, vücut dışında üretilen mononükleer hücrelerce IL-1, TNF ve IL-6 üretimini azalttığı gösterildi. Bu çalışmada w-3 yağ asitlerinden zengin diyetle beslenen grup III , OVA ile sensitize edilip standart fare yemiyle beslenen grupla (grup II) karşılaştırıldığında TNF- α ortalama değerleri düşmesine rağmen (Şekil 15), bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,07$).

IL-8 değerleri, grup II'de kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak artmış bulundu ($p=0,001$). Omega-3 yağ asitlerinden zengin fare yemiyle beslenen grupta IL-8 düzeylerinde , OVA ile sensitize edilip standart fare yemiyle beslenen grupla (grup II) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düşme ($p=0,003$) saptandı. Proinflamatuvar sitokin olan IL-8'in grup III'te düşmesi, w-3 yağ asitlerinin antienflamatuvar etkisini desteklemektedir. Ancak bu konuda IL-8'le yapılmış literatür bilgisine rastlanmadı.

IFN- γ düzeyleri, ovalbümin ile sensitize edilen grupta (grup II), kontrol grubuyla karşılaştırıldığında (grup I) istatistiksel olarak artmış bulundu ($p=0,022$). Bu da OVA ile Th1 yanıtının alındığını göstermektedir. Vinje ve ark. (82) da lüpen (yem proteini) ile oluşturdukları besin alerji fare modelinde, IFN- γ düzeylerini kontrol grubuyla karşılaştırdıklarında anlamlı artış saptadılar. Omega-3 yağ asitleriyle beslenen grupta IFN- γ düzeyleri grup II ile karşılaştırıldığında ortalama değerlerde düşme gözlemlendi (Şekil 16) ancak

istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Inoue ve ark. (84) Bifidobacterium breve M-16 V suşunun OVA ile immunize edilmiş farelerde Ig E üretimi ve Th1/Th2 balansı üzerine etkisini araştırdıkları çalışmada benzer şekilde IFN- γ düzeylerinde anlamlı düşme saptamadılar.

Bu çalışmada, IL-10 düzeylerinin değerlendirmesinde, grup II kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ortalama değerleri azalmış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilmedi ($p=0,75$). Benzer şekilde Inoue ve ark. (84) da lüpen besin alerji modelinde anlamlı fark saptamadılar. Ancak OVA ile duyarlılaştırılan ve w-3'ten zengin yemle beslenen grup (grup III), grup II ile karşılaştırıldığında IL-10 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı ($p<0,05$). Antienflamatuar sitokin olan IL-10'un, w-3 yağ asitleriyle beslenen fare serumunda artmış olması, w-3 yağ asitlerinin antialerjik etkisini desteklemektedir.

Makrofajlar tarafından salgılanan sitokinler eikozanoidler tarafından düzenlendiği için ve diyetsel lipitler de eikozanoid üretimini etkiledikleri için (özellikle w-3 yağ asidi içerenler) sitokin salgılanmasını da etkileyeceklerdir. Diyetsel balık yağı ile beslenen farelerde TNF salgılanması, bazı çalışmalarda azalmış veya hiç etkilenmemiş olarak rapor edilmesine rağmen, birkaç çalışmada da TNF üretiminin arttığı bildirilmiştir. Aynı şekilde yakın zamanda yapılmış birkaç çalışmada IL-1 ve IL-6 üretiminin balık yağı ile beslenen farelerde arttığı bildirilirken bunun tam tersi yayınlar da vardır (96). Çalışmalarda görülen farklılıkların en önemli nedeni, deneylerde farklı protokollerin kullanılmış olmasıdır: Bunlar çalışılan hücrelerin kökeni (fare, rat, domuz), hücrelerin anatomik bölgesi (karaciğer, akciğer, periton), hücre aktivasyonunun durumu (enflamatuar, aktive olmuş, aktive olmamış), sitokin salgılanması için kullanılan etken (LPS, kalsiyum iyonofor, diğer bir sitokin), kullanılan kültür ortamlarının tabiatı (serum varlığı veya yokluğu, serum kaynağı, kültür zamanı),diyette kullanılan balık yağı miktarı, beslenme süresi ve sitokin ölçümü için kullanılan metodlardır

Omega-3 yağ asitlerinin anahtar antienflamatuar etkisi araşidonik asit metabolizması antagonist etkisinden kaynaklanmasına rağmen, bu yağ asitlerinin, değiştirilmiş eikozanoid üretimi ve bundan bağımsız olabilecek birçok diğer antiinflamatuar etkileri vardır. Uzun zincirli w-3 yağ asitleri, lökosit ve endotel hücreleri arasındaki etkileşimde yer alan ve inflamasyon bölgesine lökosit göçüne neden olan adezyon moleküllerinin hücre yüzey ekspresyonunu değiştirdiler. Bu ilk defa Caterina ve ark. tarafından vurgulandı (78). Balık yağının fare makrofajları üzerindeki ICAM-1 ekspresyonunu azalttığı başka bir çalışmada gösterilmiştir (79).

Enflamatuar hastalıkların en karakteristik özelliği eikozanoid ve sitokinleri içeren inflamatuvar medyatörlerin aşırı veya yetersiz üretiminden kaynaklanıyor olmasıdır. Uzun

zincirli w-3 PUFA'ların antiinflamatuvar etkilerinin anlaşılması, bu yağ asitlerinin tamamen ya da kısmen eksik olmasının inflamatuvar durumlara neden olabileceği ve bu hastaların diyetlerine eklenmesiyle inflamatuvar hastalıklarda klinik olarak fayda sağlayacağı fikirlerini ortaya çıkarmıştır. Uzun zincirli w-3 yağ asitleri için olası hedefler, romatoid artrit, ülseratif kolit, tip-1 diyabet, kistik fibrozis, astım, alerjik hastalıklar, KOAH, psöriyazis, multiple sklerozis, aterosklerozis, akut kardiyovasküler olaylar, nörodejenerasyon, cerrahide sistemik inflamatuvar yanıt ve travmadır. Bu hastalıkların birçoğunda w-3 yağ asidi desteği ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Romatoid artrit ile yapılan çalışmalarda klinik yararlar ilgili kanıtlar elde edilmiştir, fakat yukarıda belirtilen hastalıkların çoğunda kanıtlar yetersizdir(81). Beharry ve ark. oluşturdukları kistik fibrozis fare modelinde, DHA'nın kısa ve uzun dönem etkilerini araştırdılar, ancak fare akciğeri, pankreası ve bağırsağında yararını gösteremediler (88).

Yakın çalışmalar göstermiştir ki, intestinal epitel hücreleri, sindirilen antijenlerin oranını ve tipini belirlemede santral düzenleyici rol oynamaktadır. Duyarlılaştırılmış ratlarda yapılan çalışmalar intestinal antijen taşınmasının iki fazda ilerlediğini göstermektedir. Antijen alımının ilk fazında, transepitelyal transport endozomlar üzerinden olur, antijen spesifik ve mast hücre bağımsızdır ve duyarlılaştırılmış ratlarda duyarlılaştırılmamışlarla karşılaştırıldığında 10 kez daha hızlı oluşur. İkinci fazda, paraselüler taşınma öne çıkar, mast hücre bağımlıdır, antijen spesifik değildir, antijen provakasyonu ile duyarlılaştırılmış ratlarda artar. Bu çalışmalar açıkça göstermektedir ki, IgE aracılı reaksiyonlar sırasında gastrointestinal sistemde sindirilen antijenlerin hız ve oranı belirgin olarak artmaktadır. Spesifik yol antikoru içerirken, nonspesifik yol sitokinleri içermektedir. Bu kavramla tutarlı olarak, intestinal epitel hücrelerinde çok sayıda farklı sitokin için reseptörler bulunur (IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, GM-CSF ve IFN- γ) ve intestinal epitel hücrelerinin bu sitokinlerle karşılaşma sonucu fonksiyonlarının değiştiği gösterilmiştir (95).

Diyetesel yağ asitlerinin, klinik, biyokimyasal ve immunolojik yararları birçok hayvan modelinde gösterilmiştir. Bunlar artmış yaşam beklentisi, glomerulonefritte azalmış proteinüri ve anti DNA antikoru, kolajenle indüklenen artritte azalmış eklem enflamasyonu ve kolitte azalmış enflamasyondur. Bu gözlemler, w-3 yağ asitlerinin insanlarda da bu hastalıklarda yararlı olabileceğini göstermektedir (98). Bu çalışmaya göre de w-3 yağ asitlerinin besin alerji fare modelinde hem histopatolojik hem de sitokin değerleriyle antialerjik etkisinin olduğu görüldü. Bu bulguları destekleyecek başka çalışmalarla besin alerjilerinde de w-3 yağ asitlerinin kullanımı tartışılabilir.

SONUÇLAR

Bu çalışmada, Balb/c farelerde besin alerjisi oluşturulması ve w-3 yağ asitlerinden zengin diyetle besin alerjilerinin önlenmesi amaçlanmıştır.

Her biri yedi fareden oluşan toplam üç grup oluşturuldu; Birinci grup kontrol grubu olarak değerlendirildi, ikinci ve üçüncü gruplar ilkönce intraperitoneal ovalbümin(OVA) ile duyarlılaştırıldıktan sonra intragastrik OVA ile provake edildi. Grup I ve grup II'ye standart fare yemi verilirken, grup III w-3 yağ asitlerinden zengin diyetle beslendi.

Standart fare yemi ile beslenen ve OVA ile duyarlılaştırılan grup II'de bağırsak mukozasında eozinofil ve mast hücre sayıları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış bulundu. Ayrıca proenflamatuar sitokinler TNF- α ve IL-8, Th2 sitokini ve alerjik yanıtta görev alan IL-5 ve Th1 sitokini olan IFN- γ düzeylerinde grup II'de anlamlı derecede artış saptandı. IL-4 düzeylerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. Antiinflamatuar sitokin IL-10 düzeylerinde düşme gözlemlendi, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. Böylece grup II'de hem eozinofil ve mast hücrelerinin, hem de alerjik yanıtta görev alan ve proenflamatuar sitokinlerin anlamlı artışı, ovalbüminle besin alerji modelinin oluşturulduğunu gösterdi.

Ovalbüminle duyarlılaştırılmış w-3'ten zengin diyetle beslenen üçüncü grupta eozinofil ve mast hücre sayılarında, grup II ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma saptandı. IL-5 ve IL-8 düzeylerinde de anlamlı düşme gözlemlendi. Ancak IFN- γ , TNF- α ve IL-4 düzeylerindeki düşme istatistiksel olarak anlamlı değildi. IL-10 düzeylerinde w-3'ten zengin diyetle beslenen grupta anlamlı artış saptandı.

Sonuç olarak, besin alerjisi oluşturulan fare modelinde w-3 yağ asitleri, eozinofil ve mast hücre sayılarında, IL-5 ve IL-8 düzeylerinde düşmeye ayrıca IL-10 düzeylerinde artışa neden olmuştur. Bu da w-3 yağ asitlerinin besin alerjilerindeki antialerjik etkisini desteklemektedir.

ÖZET

Günümüzde omega-3 yağ asitlerinin antialerjik ve antienflamatuar etkileriyle ilgili yapılan çalışmalarda başarılı sonuçlar elde edilmektedir. Besin alerjileri prevalansı özellikle batılı ülkelerde giderek artmakta olan bir sorun haline gelmiştir. Bu çalışmada farelerde besin alerjisi oluşturmak ve besin alerjisi fare modelinde omega-3 yağ asitlerinin koruyucu etkisini göstermek amaçlandı.

Çalışmaya toplam 21 adet, 6-8 hafta Balb/c dişi fare alındı. Fareler yedişerli üç gruba ayrıldı. Birinci grup kontrol grubu olarak değerlendirildi. Besin alerji modeli oluşturmak için Renz yöntemi (73) ile Sakamoto ve ark.'nın oluşturduğu besin alerjisi fare modeli (74) örnek olarak kullanıldı. İkinci ve üçüncü gruptaki fareler; 1, 7 ve 14. günlerde 10 µg OVA ile intraperitoneal olarak duyarlandı. Daha sonra, 21. günden başlayarak haftada bir kez toplam 8 hafta 100 µg OVA ile intragastrik olarak provake edildi. Birinci ve ikinci grup bazal fare yemi ile, üçüncü grup omega 3'ten zengin fare yemi ile beslendi. Son provokasyondan bir gün sonra tüm fareler sakrifiye edildi. Bağırsakları histopatolojik olarak incelenerek, eozinofil ve mast hücre sayıları değerlendirildi. İntrakardiyak 1 cc kan alınarak, tüm farelerin serumunda ELİSA yöntemi ile IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, TNF-α ve IFN-γ düzeyleri değerlendirildi.

Histopatolojik incelemede ikinci gruptaki farelerin bağırsak mukozasında eozinofil ve mast hücre sayıları, kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmış bulundu. İkinci grupta IL-5, IL-8, TNF-α ve IFN-γ düzeyleri, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı derecede artma saptandı. IL-4 düzeyindeki artma ve IL-10 düzeyindeki düşme istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Omega-3'ten zengin fare yemi ile beslenen grup, besin alerji modeli oluşumu histopatolojik ve biyokimyasal olarak gösterilen ikinci gruba karşılaştırıldığında, fare bağırsak mukozalarında eozinofil ve mast hücre sayılarında anlamlı düşme saptandı. Ayrıca IL-5, IL-8 düzeylerinde anlamlı düşme, IL-10 düzeylerinde anlamlı artma gözlemlendi. IFN-γ, TNF-α ve IL-4 düzeylerindeki düşme istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Bu çalışmada, ovalbüminle duyarlılaştırılan farelerde besin alerji modelinin oluşturulduğu gözlemlendi. Ayrıca omega-3 yağ asitlerinin besin alerjisinde hem histopatolojik hem de biyokimyasal incelemede antialerjik etkisinin olduğu gösterildi.

Omega-3 yağ asitlerinin antialerjik etkisini gösterebilmek için daha fazla hayvan deneyine ve insanlar üzerinde de çalışmalara ihtiyaç vardır.

ABSTRACT

Recent studies considering antiallergic and antiinflammatory effects of n-3 PUFA (Polyunsaturated fatty acids), have provided succesful results. Rising of food allergy prevalance especially in westernized countries it has become an important health concern. The purpose of this study was to develop physiological model of food allergy and to show the beneficial effects of n-3 PUFA on food allergy murine model .

Female, 6-8 weeks of age, 21 Balb/c mice were used in this study. Mice were divided into three grups; each contained seven mice. Renz method (73) and murine model of Sakamoto et al (74). were used as sample.

Mice in second and third group were sensitized with 10 μ g intraperitoneal ovalb \ddot{u} min (i.p. OVA) on days 1, 7 and 14. Intraperitoneal sensitization was done according to Renz (73). From day 21, challenging intragastric doses of ovalb \ddot{u} min 100 μ g were given to both groups one dose per week for 8 weeks with gavage method. First and second groups received standard mouse diet and omega-3 fatty acids enriched diet was given to third group during the study period. 24 hours after the last intragastric challenge (day 71) all the animals were sacrificed. Eosinophil and mast cell numbers were evaluated in gut mucosa. IL-4, IL-5, IL-8, IL-10 , TNF- α and IFN- γ levels were measured by ELISA method in mouse serum.

When compared the histopathologic evaluation of mice in second group with sham, eozinophil and mast cell numbers found increased statistically. Also IL-5, IL-8, TNF- α and IFN- γ levels were increased significantly in OVA sensitized group (group II), comparing with sham. Increasing in the level of IL-4 and decreasing in the level of IL-10 were not statistically significant.

When compared omega-3 fatty acids enriched diet given group with histopathologically and chemically food allergy developed group (group II), eozinophil and mast cell numbers decreased statistically. Also significantly decrease in IL-5 and IL-8 levels and increse in IL-10 levels have been observed. Decrease in the levels of IFN- γ , TNF- α and IL-4 were not statistically significant.

In this study, development of food allergy in OVA sensitized mice were observed . Futhermore antiallergic effects of n-3 fatty acids either histopathologically or biochemically have been shown in food allergy murine model.

In conclusion, the antiallergic effects of omega-3 fatty acids on animal models and humans should be further evaluated.

KAYNAKLAR

1. Eigenman PA. Future therapeutic options in food allergy. *Allergy* 2003; 58: 1217 - 23.
2. Helm RM, Burks AW. Animal models of food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2002; 2: 541-6.
3. Sampson HA. Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113(5): 805-19.
4. Fogg MI, Spergel JM. Management of food allergies. *Expert Opin Pharmacother* 2003; 4: 1025-37.
5. Mutius VE. The raising trends in asthma and allergic disease. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 45-9.
6. Eder W, Mutilus VE. Hygiene hypothesis and endotoxin: what is the evidence? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4(2): 113-7
7. Liu AH, Murphy JR. Hygiene hypothesis: fact or fiction ? *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 471-4.
8. Sampson HA, Donald YML. Adverse reactions to foods. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB (eds). *Textbook of pediatrics* 17th ed. Philadelphia: WB Saunders, 2004: 789-92.
9. Yunginger JW, Sweeney KG, Sturner WQ. Fatal food induced anaphylaxis. *JAMA* 1988; 260: 1450-2.
10. Donald YML. Allergy and immunologic basis of atopic disease. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB (eds). *Nelson Textbook of pediatrics*, 17 th ed. 2004; Philadelphia: WB Saunders, 130: 743-7.
11. Anne MD, Greenberger PA. Food Allergy. In: Leslie CG, Greenberger PA (eds) *Patterson's allergic disease*, 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2002: 257-72.
12. Calder PC. Fatty acids, dietary lipids and lymphocyte functions. *Biochem Soc Trans* 1995; 23: 302-9.
13. Dunstan JA, Mori TA, Barden A, Bellin LJ, Taylor AL, Holt PG. Fish oil supplementation in pregnancy reduces interleukin-13 levels in cord blood of infants at high risk of atopy. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 442-8.
14. Lee TH, Hoover RL, Williams JD, Sperling RI, Ravales J, Spur BW. Effect of dietary enrichment with EPA and DHA on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function. *N Engl J Med* 1985; 312: 1217-24.

15. Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2001; 276: 16683-9.
16. Walker WA. Pathophysiology of intestinal uptake and absorption of antigens in food allergy. *Ann Allergy* 1987; 59: 7-16.
17. Eigenmann PA. Mechanism of food allergy. *Pediatr Allergy and Immunol* 2009; 20(1): 5-11.
18. Gearhart PJ, Cebra JJ. Differentiated B- lymphocytes: Potential to express particular antibody variable and constant regions depends on site of lymphoid tissue antigen load. *J Exp Med* 1979; 149: 216-27.
19. Frossard CP, Steidler L, Eigenmann PA. Oral administration of an IL-10- secreting *Lactococcus Lactis* strain prevents food induced Ig E sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 952-9.
20. Bruce MG, Ferguson A. Oral tolerans to ovalbumin in mice: studies of chemically modified and 'biologically filtered' antigen. *Immunology* 1986; 57: 627-30.
21. Frossard CP, Tropia L, Hauser C, Eigenmann PA. Lymphocytes in Peyer's patches regulate clinical tolerance in a murine model of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:958-64.
22. Heyman M, Grasset E, Ducroc R, Desjeux JF. Antigen absorption by the jejunal epithelium of children with cow's milk allergy. *Pediatr Res* 1988; 24: 197-202.
23. Parrott DMV. The gut as a lymphoidal organ. *Clin Gastroenterol* 1976; 5: 211-28.
24. Marsh DG, Meyers DA, Bias WB. The epidemiology and genetics of food allergy. *N Engl J Med* 1981; 305; 1551-9.
25. Bock SA, Sampson HA, Atkins FM, Zeiger RS, Lehrer S, Sachs M, Bush RK, Metcalfe DD. Double blind, placebo controlled food challenge as an office procedure: a manual. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 82: 986-97.
26. Lebenthal E, Lee PC. Development of functional response in human exocrine pancreas. *Pediatrics* 1980; 66: 556-60.
27. Sampson HA, Mendelson L, Rosen JP. Fatal and near fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. *N Engl J Med* 1992; 327: 380-4.
28. Burks AW, Mallory SB, Williams LW, Shirrell MA. Atopic dermatitis: clinical relevance of food hypersensitivity reactions. *J Pediatr* 1988; 113:447-51.
29. Knippels MJ, van Wijk F, Penniks AH. Food allergy: what do we learn from animal model ?. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4: 205-9.

30. Stenton GR, Vliagoftis H, Befus AD. Role of intestinal mast cells in modulating gastrointestinal pathophysiology. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998; 81: 1-11.
31. Enberg RN, Leickly FE, , Mc Cullough J, Bailey J, Ownby DR. Watermelon and ragweed share allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 79: 867- 75
32. Steffen RM, Wyllie R, Petras RE, Caulfield ME, Michener WM, Firor HV, Norris DG. The spectrum of eosinophilic gastroenteritis. *Clin Pediatr* 1991; 30: 404-11.
33. Rance F, Dutau G. Classification and mechanism. In: Rance F, Putau G (eds). *Food allergies*, 1 st ed. Paris: The UCB Institute of Allergy, 2008: 33-43.
34. Kettlehut BV, Metcalfe DD. Adverse reactions to foods. In: Middleton E, Reed CE, Ellis EF, *Allergy: principles and practice*, 3 rd ed. St Louis: CV Mosby, 1988: 1481-1502.
35. Curran SC, Barness LA. First year feeding problems. In: Nelson WE, Behrman RE, Kliegman RM (eds). *Textbook of pediatrics*, 15 th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1996: 165-83.
36. Forsyth BWC. Colic and the effect of changing formulas: a doubleblind multiple-crossover study. *J Pediatr* 1989; 115: 521-6.
37. Sampson HA. Infantile colic and food allergy: fact or fiction? *J Pediatr* 1989; 115: 583-4.
38. Bock SA, Atkins FM. Patterns of food hypersensitivity during sixteen years of double blind, placebo controlled food challenges. *J Pediatr* 1990; 117: 561-7.
39. Powell GK. Milk and soy induced enterocolitis of infancy: clinical features and standardization of challenge. *J Pediatr* 1978; 93: 553-60.
40. Berezin S, Schwarz SM, Glassman M , Davidian M, Newman LJ . Gastrointestinal milk intolerances of infancy. *Am J Dis Child* 1989; 143: 361-2.
41. Kutiunen P, Visakorpi JK, Savilahti E. Malabsorption syndrome with cow's milk intolerance; clinical findings and course in 54 cases. *Arch Dis Child* 1975; 50: 351-6.
42. Trier JS. Celiac sprue. In: Sleisenger MH, Fordtran JS (eds). *Gastrointestinal disease: pathophysiology, diagnosis, management*, 5 th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1993: 1078-96.
43. Marsh MN, Hindle J. Inflammatory component of celiac sprue mucosa. I. Mast Cells , basophils and eosinophils. *Gastroenterology* 1985; 89: 92-101.
44. Howdle PD, Bullen AW, Losowsky MS. Cell Mediated immunity to gluten within the small intestinal mucosa in coeliac disease. *Gut* 1982; 23: 115-22.

45. Katz SI, Hall RP III, Lawley TJ, Strober W. Dermatitis Herpetiformis: the skin and the gut. *Ann Intern Med* 1980; 93: 857-74.
46. Heiner DC, Sears JW. Chronic respiratory disease associated with multiple circulating precipitins to cow's milk. *Am J Dis Child* 1960; 100: 500-2.
47. Soyer ÖU, Adalıoğlu G. Besin Alerjileri. *Güncel Çocuk Sağlığı* 2007; 1: 204-15.
48. Bock SA, Munoz FA, Sampson HA. Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107(1): 191-3.
49. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 470-5.
50. Turjanmaa K, Darsow U, Niggemann B, Rance F, Vanto T, Werfel T. EAACI/GALEN position paper: present status of the atopy patch test. *Allergy* 2006; 61(12): 1377-84.
51. Sampson HA. Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 805-19.
52. Srivastava KD, Kattan JD, Zou ZM, Li JH, Zhang L, Wallenstein S, Goldfarb J, Sampson HA, Li XM. The Chinese herbal medicine formula FAHF-2 completely blocks anaphylactic reactions in murine model of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115(1): 171-8.
53. Li XM., Serebrisky D, Lee SY, Huang CK, Bardina L, Schofield BH., Stanley JS, Burks AW, Bannon GA, Sampson HA. Murine model of peanut anaphylaxis: T and B cell responses to a major peanut allergen mimic human responses. *J Clin Immunol* 2000; 106: 150-8.
54. Robinson DR, Xu LL, Tateno S, Guo M, and Colvin RB, Suppression of autoimmune disease by dietary n-3 fatty acids. *J Lipid Research* 1993; 34: 1435- 44.
55. Enrique E, Pineda F, Malek T, Barta J, Basagana M, Tela R, Castello JV, Alonso R, de Mateo J, Cerda TT, Moncin SMMM, Monzon S, Garcia M, Palacios R, Cistero-Bahma A. Sublingual immunotherapy for hazelnut food allergy: a randomized, double blind, placebo-controlled study with a standardized hazelnut extract. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116 (5): 1073-9.
56. Wilson DR, Lima MT, Durham SR. Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis: systemic review and meta-analysis. *Allergy* 2005; 60: 4-12.
57. Bufe A, Ziegler-Kirbach E, Stoeckmann E, Heidemann P, Gehlhar K, Holland-Letz T, Braun W. Efficacy of sublingual swallow immunotherapy in children with severe grass pollen allergic symptoms: a double-blind placebo-controlled study. *Allergy* 2004; 59: 498-504.

58. Songhui MA, Sicherer SH, Anna NW. A survey on the management of pollen food allergy syndrome in allergy practices *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 784-8.
59. Natalie EN, Lopata AL. Fighting food allergy current approaches. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1056: 30-45.
60. Leung DY, Sampson HA, Yunginger JW, Burks AW Jr, Schneider LC, Wortel CH, Davis F, Hyun JD, Sanahan WR Jr. Effect of anti IgE therapy in patients with peanut allergy. *N Engl J Med* 2003; 348(11): 986-93.
61. Magnan A, Mely L, Prato S. Relationships between natural T cells, atopy, IgE levels, and IL production. *Allergy* 2000; 55 : 286-90.
62. Lee HO, Miller SD, Hurst SD, Tan LJ, Cooper CJ, Barrett TA. Interferon gamma induction during oral tolerance reduces T-cell migration to sites of inflammation. *Gastroenterology* 2000; 119: 129-38.
63. Dumont FJ. Therapeutic potential of IL-10 and its viral homologues: an update. *Exp Opin Therapeutic Patents* 2003; 13: 1551-7.
64. Lee SY, Huang CK, Zhang TF, Schofield BH, Burks AW, Bannon GA, Sampson HA, Li XM. Oral administration of IL-12 suppresses anaphylactic reactions in a murine model of peanut hypersensitivity. *Clin Immunol* 2001; 101:220-8.
65. Zeiger RS. Current issues with influenza vaccination in egg allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110(6): 834-40.
66. Bauer A, Ekanayake MS, Wigger Alberti W, Elsner P. Oral rush desensitization to milk. *Allergy* 1999; 54:894-5.
67. Patriarca G, Nucera E, Roncallo C, Pollastrini E, Bartolozzi F, De Pasquale T, Buonomo A, Gasbarrini G, Di Campli C, Schiavino D. Oral desensitizing treatment in food allergy: clinical and immunological results. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 459-65.
68. Oppenheimer JJ, Nelson HS, Bock SA, Christensen F, Leung DYM. Treatment of peanut allergy with rush immunotherapy with injections of aqueous peanut extract. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 744-51.
69. Businco L, Benincori N, Nini G, Businco E, Cantani A, De Angelis M. Double-blind crossover trial with oral sodium cromoglycate in children with atopic dermatitis due to food allergy. *Ann Allergy* 1986; 57: 433-8.
70. Helm RM, Burks WA. Animal models of food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2002; 2: 541-6.

71. Horrobin DF. Low prevalences of coronary heart disease, psoriasis, asthma and rheumatoid arthritis in Eskimos: are they caused by high dietary intake of EPA, a genetic variation of EFA metabolism or a combination of both? *Med Hypotheses* 1987; 22: 421-8.
72. Mickleborough TD, Lindley MR, Ionescu AA, Fly AD. Protective effect of fish oil supplementation on exercise-induced bronchoconstriction in asthma. *Chest* 2006; 129: 39-49.
73. Glaab T, Daser A, Braun A, Ulrich NS, Fabel H, Alarie Y, Renz H. Tidal midexpiratory flow as a measure of airway hyperresponsiveness in allergic mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 280: 565-73.
74. Sakamoto Y, Ueno K, Yofu S. An improved method for the detection of IL-4, IL-6 and TNF-alpha in the liver of food sensitized mice after oral challenge. *Int Arch Allergy Immun* 1999; 118: 226-7.
75. Lee TH, Hoover RL, Williams JD, Sperling RI, Ravalese J, Spur BW, Robinson DR, Corey EJ, Lewis RA, Austen KF. Effects of dietary enrichment with eicosapentaenoic acid and DHA on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function. *N Eng J Med* 1985; 312: 1217-24.
76. Goldman DW, Pickett WC, Goetzl EJ. Human neutrophil chemotactic and degranulating activities of leukotriene B₅ derived from eicosapentaenoic acid, *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 117: 282-8.
77. Sehan CN, Clish CB, Brannon J, Colgan SP, Gronert K, Chiang N. Anti-inflammatory lipid signals generated from dietary n-3 fatty acids via cyclooxygenase-2 and transcellular processing: a novel mechanism for NSAID and n-3 PUFA therapeutic actions. *J Physiol Pharmacol* 2000; 4: 643-54.
78. Caterina RD, Cybulsky MI, Clinton SK, Gimbrone MA, Libby P. The omega-3 fatty acid DHA reduces cytokine induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 1829-36.
79. Kim DN, Schmee J, Thomas WA. Dietary fish oil added to a hyperlipidemic diet for swine results in reduction in the excessive number of monocytes attached to arterial endothelium. *Atherosclerosis* 1990; 81: 209-16.
80. Sadeghi S, Wallace FA, Calder PC. Dietary lipids modify the cytokine response to bacterial lipopolysaccharide in mice. *Immunology* 1999; 96: 404-10.
81. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006; 75: 197-202.

82. Vinje NE, Larsen S, Lovik MA. Mouse model of lupin allergy. *Clin Exp Allergy* 2009; 1-12.
83. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations and implications for health and disease. *Altern Med Rev* 2003; 83: 223-46
84. Inoue Y, Iwabuchi N, Xiao JZ, Yashima T, Iwatsuki K. Suppressive effects of *Bifidobacterium breve* strain M-16 V on T-helper type 2 immune responses in murine model. *Biol Pharm Bull* 2009; 32 (4): 760-3.
85. Lee SY, Huang CK, Zhang TF, Schofield BH, Burks AW, Bannon GA, Sampson HA, Li XM. Oral administration of IL-12 suppresses anaphylactic reactions in a murine model of peanut hypersensitivity. *Clin Immunol* 2001 ; 101:220-8.
86. Akiyama H, Teshima R, Sakushima JI, Okunuki H, Goda Y, Sawada JI, Toyoda M. Examination of oral sensitization with ovalbumin in Brown Norway rats and three strains of mice. *Immunol Lett* 2001; 78: 1-5.
87. Fujitani S, Ueno K, Kamiya T, Tsukhuara T, Ishiara K, Kitabayashi T, Itabashi K. Increased Number of CCR4-positive Cells in the duodenum of ovalbumin induced food allergy model NC/jic mice and antiallergic activity of fructooligosaccharides. *Allergol Int* 2007; 56: 131-8.
88. Beharry S, Ackerley C, Corey M, Kent G, Heng YM, Christensen H, Luk C, Yhantis RK, Imad A, Freedman SD, Durie PD. Long-term DHA therapy in a congenic murine model of cystic fibrosis. *Am J Physiol Gastrointestinal Liver Physiol* 2007; 292:839-48.
89. Untersmayr E, Jarolin EJ. Mechanism of type I food allergy. *Pharmacology Ther* 2006; 112: 787-9.
90. Kim H, Kwack K, Kim DY, Ji GE. Oral probiotic bacterial administration suppressed allergic responses in ovalbumin-induced allergy mouse model. *Immunology Med Microbiol* 2005; 45:259-67.
91. Prescott SL, Calder PC. N-3 polyunsaturated fatty acids and allergic diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2004;7:123-9.
92. Dunstan JA, Mori TA, Barden A, Beilin LJ, Taylor AL, Holt PG, Calder, PC. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation in pregnancy on maternal and fetal erythrocyte fatty acid composition. *Eur J Clin Nutr* 2004; 58: 429-37.
93. Cardoso CR, Teixeira G, Provinciatto PR, Godoi DF, Ferreira BR, Milanezi CM, Ferraz DB, Rossi MA, Cunha FQ. Modulation of mucosal immunity in a murine model of food induced intestinal inflammation. *Clin Exp Allergy* 2007; 1-12.

94. Dearman RJ, Kimber I. Characterisation of immune responses to food allergens in mice. *Proc Nutr Soc* 2005;64: 426-33.
95. Sampson HA. Food Allergy: Immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 711-28.
96. Calder PC. N-3 polyunsaturated fatty acids and immune cell function. *Advan Enzyme Regul* 1997; 37: 197-237.
97. Enders S, Ghorbani R, Kelley VE, Georgilis K, Lonneman G, Van der Meer MW, Cannon JG, Rogers TS, Klempner MS, Weber PC, Schaeffer EJ, Wolff SM, Dinarello CA. The effect of dietary supplementation with w-3 fatty acids on the synthesis of IL-1 and TNF by mononuclear cells. *N Eng J Med* 1989; 320: 265-71.
98. Calder PC. N-3 Polyunsaturated FattyAcids as Pharmacologic Agent: A Fishy tale? *Nutrition* 1997;13: 1002-4.
99. Kılıçturgay K. Sitokinler. *İmmunoloji* 2000. Kılıçturgay K. *İmmunoloji* 2000, İkinci Baskı. Bursa: 2000; 175-97.
100. Nieuwenhuizen NE, Lopata AL. Fighting food allergy. *Ann NY Acad Sci* 2000; 1056: 30-45.
101. Nowak WA. Future Approaches to food allergy. *Pediatrics* 2003;111: 1672-80.
102. Valentine RC, Valentine DL. Omega-3 fatty acids in cellular membranes; a unified concept. *Prog Lipid Res* 2004; 43: 383-402

EK 1: HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL ONAYI



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(ADÜ-HADYEK)



Aydın, 13 Kasım 2007

Oturum : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu II. Oturumu
Sayı (Number) : B.30.2.ADÜ.0.06.00.00/124-HEK/2007/027
Proje Başlığı : Farelerde Besin Alerji Modeli Oluşturulması ve Bunun Omega 3'ten Zengin Diyetle Önlenebilmesi
Proje Yürütücüsü : Ayşe YENİGÜN
Proje Ekibi : Özgür GEL, Çiğdem YENİSEY, İbrahim METEOĞLU, Naciye KILIÇARSLAN

Bu çalışmanın hiçbir bölümünde:

İnsan embriyosu ve fötüsü kullanılması
İnsan embriyosu ve fötüsü dokularının kullanılması
Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılması
Hayvan Çalışması İnsanlarda araştırma
İnsan olmayan primatların kullanılması
Transgenik hayvanların kullanılması
Hayvanlarda genetik modifikasyon öngörülmemiştir.

Bu çalışmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamaktadır.

Prof. Dr. Fevzi BARDAKÇI
(Üye)

Doç. Dr. Muharrem BALKAYA
(Başkan)

Yrd. Doç. Dr. Sadun TEMOÇİN
(Üye)

Yrd. Doç. Dr. İbrahim CEMAL
(Üye)

Vet. Hek. Ufuk SAYIN
(Üye)

Dr. Nurten ATALAY
(Üye)

Dr. Cengiz ÜNSAL
(Üye)

EK 2: DENEY HAYVANLARI KULLANIM KURSU SERTİFİKASI



KATILIM BELGESİ

Sayın, Arş. Gör. Dr. Özgür GEL

Fakültemiz Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı, Deney Hayvanları Etik Kurulu
ve Farmakoloji Anabilim Dalı tarafından düzenlenen
“Deney Hayvanları Kullanım Kursu-IV”nu başarı ile tamamlamıştır.

20-22 / Mart / 2007
Aydın, TÜRKİYE.



Prof. Dr. Mustafa BİRİNCIOĞLU
Deney Hayvanları Araştırma Lab. Sorumlusu
Farmakoloji AD Başkanı



Prof. Dr. Ş. Öner ŞAVK
Tıp Fakültesi Dekanı



ADNAN MENDERES UNIVERSITY
MEDICAL SCHOOL

CERTIFICATE OF ATTENDANCE

We hereby certify that

Özgür GEL

has successfully completed the training course on
“Usage of Experimental Animals in Biological Research-IV”

20-22 March, 2007
Aydın, TURKEY



Mustafa BİRİNCIOĞLU, Prof. Dr.
Director of Animal Care Unit



Ş. Öner ŞAVK, Prof. Dr.
Dean of Medical School

EK 3: İSTATİSTİK ANALİZ SONUÇLARI

Multiple Comparisons

| Dependent Variable | | (I) Grup | (J) Grup | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|-------------------------------------|-----------------------|-----------|----------|-----------------------|------------|--------|-------------------------|-------------|
| | | | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| Eozinofilsayýsý Eozinofil sayýsý | Tukey HSD | 1 I | 2 II | -113,333* | 4,435 | ,000 | -124,78 | -101,89 |
| | | | 3 III | -31,667* | 4,435 | ,000 | -43,11 | -20,22 |
| | | 2 II | 1 I | 113,333* | 4,435 | ,000 | 101,89 | 124,78 |
| | | | 3 III | 81,667* | 4,602 | ,000 | 69,79 | 93,54 |
| | | 3 III | 1 I | 31,667* | 4,435 | ,000 | 20,22 | 43,11 |
| | | | 2 II | -81,667* | 4,602 | ,000 | -93,54 | -69,79 |
| | Tamhane | 1 I | 2 II | * | | | | |
| | | | 3 III | * | | | | |
| | | 2 II | 1 I | * | | | | |
| | | | 3 III | * | | | | |
| 3 III | 1 I | * | | | | | | |
| | 2 II | * | | | | | | |
| | T.Blue ile T.Blue ile | Tukey HSD | 1 I | 2 II | * | | | |
| | | | | 3 III | * | | | |
| 2 II | | | 1 I | * | | | | |
| | | | 3 III | * | | | | |
| Tamhane | 1 I | 2 II | -24,214* | 3,964 | ,005 | -38,06 | -10,37 | |
| | | 3 III | -3,714* | ,680 | ,001 | -5,72 | -1,70 | |
| | 2 II | 1 I | 24,214* | 3,964 | ,005 | 10,37 | 38,06 | |
| | | 3 III | 20,500* | 3,990 | ,010 | 6,71 | 34,29 | |
| | 3 III | 1 I | 3,714* | ,680 | ,001 | 1,70 | 5,72 | |
| | | 2 II | -20,500* | 3,990 | ,010 | -34,29 | -6,71 | |
| M.C.Tile M.C.T ile | Tukey HSD | 1 I | 2 II | -11,905* | 1,051 | ,000 | -14,62 | -9,19 |
| | | | 3 III | -1,571 | 1,051 | ,319 | -4,28 | 1,14 |
| | | 2 II | 1 I | 11,905* | 1,051 | ,000 | 9,19 | 14,62 |
| | | | 3 III | 10,333* | 1,090 | ,000 | 7,52 | 13,15 |
| | | 3 III | 1 I | 1,571 | 1,051 | ,319 | -1,14 | 4,28 |
| | | | 2 II | -10,333* | 1,090 | ,000 | -13,15 | -7,52 |
| | Tamhane | 1 I | 2 II | * | | | | |
| | | | 3 III | * | | | | |
| | | 2 II | 1 I | * | | | | |
| | | | 3 III | * | | | | |

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Descriptives

| | | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|-------------------------------------|-------|----|--------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Eozinofilsayýsý Eozinofil sayýsý | 1 I | 7 | 30,00 | 8,165 | 3,086 | 22,45 | 37,55 | 20 | 40 |
| | 2 II | 6 | 143,33 | 8,165 | 3,333 | 134,76 | 151,90 | 130 | 150 |
| | 3 III | 6 | 61,67 | 7,528 | 3,073 | 53,77 | 69,57 | 50 | 70 |
| | Total | 19 | 75,79 | 49,589 | 11,376 | 51,89 | 99,69 | 20 | 150 |
| T.Blueile T.Blue ile | 1 I | 7 | 6,29 | ,951 | ,360 | 5,41 | 7,17 | 5 | 8 |
| | 2 II | 6 | 30,50 | 9,670 | 3,948 | 20,35 | 40,65 | 13 | 39 |
| | 3 III | 6 | 10,00 | 1,414 | ,577 | 8,52 | 11,48 | 8 | 12 |
| | Total | 19 | 15,11 | 12,032 | 2,760 | 9,31 | 20,90 | 5 | 39 |
| M.C.Tile M.C.Tile | 1 I | 7 | 4,43 | ,976 | ,369 | 3,53 | 5,33 | 3 | 6 |
| | 2 II | 6 | 16,33 | 3,011 | 1,229 | 13,17 | 19,49 | 11 | 19 |
| | 3 III | 6 | 6,00 | 1,095 | ,447 | 4,85 | 7,15 | 4 | 7 |
| | Total | 19 | 8,68 | 5,667 | 1,300 | 5,95 | 11,42 | 3 | 19 |

Statistics

| GRUP | | | TNF_ALFA | IFN_GAMM | IL_4_DIL | IL_5_DIL | IL_8_DIL | IL_10 |
|---------|----------------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Kontrol | N | Valid | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 |
| | | Missing | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Mean | | 32,2403 | 86,50 | 16,9563 | 29,071 | 63,54 | 315,7551 |
| | Std. Deviation | | 12,20480 | 11,247 | 6,52296 | 18,1002 | 38,425 | 63,71096 |
| | Minimum | | 13,41 | 71 | 7,40 | 5,5 | 14 | 193,71 |
| | Maximum | | 47,95 | 100 | 22,78 | 55,5 | 132 | 385,14 |
| Ova | N | Valid | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| | | Missing | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Mean | | 105,2273 | 221,75 | 60,0277 | 95,667 | 347,07 | 259,9048 |
| | Std. Deviation | | 62,13555 | 183,436 | 46,61697 | 36,7065 | 185,069 | 156,0054 |
| | Minimum | | 42,50 | 77 | 15,99 | 28,5 | 89 | 113,71 |
| | Maximum | | 204,32 | 479 | 131,38 | 137,5 | 566 | 528,00 |
| Ova+w3 | N | Valid | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| | | Missing | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Mean | | 48,4848 | 107,08 | 17,8777 | 50,000 | 103,43 | 518,9524 |
| | Std. Deviation | | 39,02576 | 14,489 | 8,49472 | 38,5422 | 36,738 | 179,2721 |
| | Minimum | | 16,14 | 92 | 5,72 | 11,5 | 61 | 236,57 |
| | Maximum | | 122,50 | 132 | 28,87 | 109,5 | 157 | 779,43 |

Ranks

| | GRUP | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|----------|---------|----|-----------|--------------|
| IFN_GAMM | Kontrol | 7 | 4,71 | 33,00 |
| | Ova | 6 | 9,67 | 58,00 |
| | Total | 13 | | |
| IL_4_DIL | Kontrol | 7 | 5,14 | 36,00 |
| | Ova | 6 | 9,17 | 55,00 |
| | Total | 13 | | |

Test Statistics(b)

| | IFN_GAMM | IL_4_DIL |
|--------------------------------|----------|----------|
| Mann-Whitney U | 5,000 | 8,000 |
| Wilcoxon W | 33,000 | 36,000 |
| Z | -2,286 | -1,857 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | ,022 | ,063 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | ,022(a) | ,073(a) |

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: GRUP

Ranks

| | GRUP | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|----------|--------|----|-----------|--------------|
| IFN_GAMM | Ova | 6 | 7,50 | 45,00 |
| | Ova+w3 | 6 | 5,50 | 33,00 |
| | Total | 12 | | |
| IL_4_DIL | Ova | 6 | 8,33 | 50,00 |
| | Ova+w3 | 6 | 4,67 | 28,00 |
| | Total | 12 | | |

Test Statistics(b)

| | IFN_GAMM | IL_4_DIL |
|--------------------------------|----------|----------|
| Mann-Whitney U | 12,000 | 7,000 |
| Wilcoxon W | 33,000 | 28,000 |
| Z | -,961 | -1,761 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | ,337 | ,078 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | ,394(a) | ,093(a) |

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: GRUP

| Multiple Comparisons | | | | | | | | |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------------------|-------------|-------------|-------------------------|-------------|
| Dependent Variable | | (I) Grup | (J) Grup | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
| | | | | Lower Bound | Upper Bound | Lower Bound | Upper Bound | Lower Bound |
| TNF_alfa | Tukey HSD | 1 Kontrol | 2 Ova | -72,987(*) | 23,196 | ,016 | -132,840 | -13,134 |
| | | | 3 Ova+w3 | -16,245 | 23,196 | ,767 | -76,098 | 43,608 |
| | | 2 Ova | 1 Kontrol | 72,987(*) | 23,196 | ,016 | 13,134 | 132,840 |
| | | | 3 Ova+w3 | 56,742 | 24,071 | ,076 | -5,370 | 118,855 |
| | | 3 Ova+w3 | 1 Kontrol | 16,245 | 23,196 | ,767 | -43,608 | 76,098 |
| | | | 2 Ova | -56,742 | 24,071 | ,076 | -118,855 | 5,370 |
| | Tamhane | 1 Kontrol | 2 Ova | -72,987 | 25,783 | ,099 | -161,263 | 15,289 |
| | | | 3 Ova+w3 | -16,245 | 16,587 | ,745 | -71,078 | 38,588 |
| | | 2 Ova | 1 Kontrol | 72,987 | 25,783 | ,099 | -15,289 | 161,263 |
| | | | 3 Ova+w3 | 56,742 | 29,955 | ,254 | -32,164 | 145,648 |
| | | 3 Ova+w3 | 1 Kontrol | 16,245 | 16,587 | ,745 | -38,588 | 71,078 |
| | | | 2 Ova | -56,742 | 29,955 | ,254 | -145,648 | 32,164 |
| IL_5_Dil | Tukey HSD | 1 Kontrol | 2 Ova | -66,5952(*) | 17,6646 | ,005 | -112,176 | -21,015 |
| | | | 3 Ova+w3 | -20,9286 | 17,6646 | ,479 | -66,509 | 24,652 |
| | | 2 Ova | 1 Kontrol | 66,5952(*) | 17,6646 | ,005 | 21,015 | 112,176 |
| | | | 3 Ova+w3 | 45,6667 | 18,3315 | ,059 | -1,635 | 92,968 |
| | | 3 Ova+w3 | 1 Kontrol | 20,9286 | 17,6646 | ,479 | -24,652 | 66,509 |
| | | | 2 Ova | -45,6667 | 18,3315 | ,059 | -92,968 | 1,635 |
| | Tamhane | 1 Kontrol | 2 Ova | -66,5952(*) | 16,4731 | ,014 | -117,817 | -15,374 |
| | | | 3 Ova+w3 | -20,9286 | 17,1577 | ,599 | -74,692 | 32,835 |
| | | 2 Ova | 1 Kontrol | 66,5952(*) | 16,4731 | ,014 | 15,374 | 117,817 |
| | | | 3 Ova+w3 | 45,6667 | 21,7289 | ,175 | -16,510 | 107,843 |
| | | 3 Ova+w3 | 1 Kontrol | 20,9286 | 17,1577 | ,599 | -32,835 | 74,692 |
| | | | 2 Ova | -45,6667 | 21,7289 | ,175 | -107,843 | 16,510 |

| | | | | | | | | |
|----------|--------------|--------------|--------------|---------------|----------|------|-----------|----------|
| IL_8_Dil | Tukey HSD | 1 Kontrol | 2 Ova | -283,524(*) | 60,124 | ,001 | -438,66 | -128,38 |
| | | | 3 Ova+w3 | -39,890 | 60,124 | ,788 | -195,03 | 115,25 |
| | | 2 Ova | 1 Kontrol | 283,524(*) | 60,124 | ,001 | 128,38 | 438,66 |
| | | | 3 Ova+w3 | 243,633(*) | 62,393 | ,003 | 82,64 | 404,63 |
| | | 3 Ova+w3 | 1 Kontrol | 39,890 | 60,124 | ,788 | -115,25 | 195,03 |
| | | | 2 Ova | -243,633(*) | 62,393 | ,003 | -404,63 | -82,64 |
| | Tamhane | 1 Kontrol | 2 Ova | -283,524(*) | 76,937 | ,037 | -546,17 | -20,88 |
| | | | 3 Ova+w3 | -39,890 | 20,878 | ,229 | -98,72 | 18,94 |
| | | 2 Ova | 1 Kontrol | 283,524(*) | 76,937 | ,037 | 20,88 | 546,17 |
| | | | 3 Ova+w3 | 243,633 | 77,028 | ,066 | -18,87 | 506,13 |
| | | 3 Ova+w3 | 1 Kontrol | 39,890 | 20,878 | ,229 | -18,94 | 98,72 |
| | | | 2 Ova | -243,633 | 77,028 | ,066 | -506,13 | 18,87 |
| IL_10 | Tukey HSD | 1 Kontrol | 2 Ova | 55,85034 | 77,03162 | ,752 | -142,9167 | 254,6174 |
| | | | 3 Ova+w3 | -203,19728(*) | 77,03162 | ,045 | -401,9644 | -4,4302 |
| | | 2 Ova | 1 Kontrol | -55,85034 | 77,03162 | ,752 | -254,6174 | 142,9167 |
| | | | 3 Ova+w3 | -259,04762(*) | 79,93949 | ,013 | -465,3180 | -52,7773 |
| | | 3 Ova+w3 | 1 Kontrol | 203,19728(*) | 77,03162 | ,045 | 4,4302 | 401,9644 |
| | | | 2 Ova | 259,04762(*) | 79,93949 | ,013 | 52,7773 | 465,3180 |
| | Tamhane | 1 Kontrol | 2 Ova | 55,85034 | 68,08928 | ,826 | -161,9899 | 273,6906 |
| | | | 3 Ova+w3 | -203,19728 | 77,04730 | ,110 | -454,2474 | 47,8529 |
| | | 2 Ova | 1 Kontrol | -55,85034 | 68,08928 | ,826 | -273,6906 | 161,9899 |
| | | | 3 Ova+w3 | -259,04762 | 97,01906 | ,070 | -537,5660 | 19,4708 |
| | | 3 Ova+w3 | 1 Kontrol | 203,19728 | 77,04730 | ,110 | -47,8529 | 454,2474 |
| | | | 2 Ova | 259,04762 | 97,01906 | ,070 | -19,4708 | 537 |